

닭에서 녹차 및 유산균 혼합 사료 투여가 *Eimeria maxima*의 감염에 미치는 효과

장승익* · 정년기* · 민원기** · 유명조*** · 박배근 · 전무형¹

충남대학교 수의과대학, *대전시보건환경연구원
경상대학교 수의과대학, *전북대학교 수의과대학

(게재승인: 2006년 6월 23일)

Effects of the Feeds Supplemented with Korean Green Tea and Lactic Acid Bacteria on Infection of *Eimeria maxima* in Chickens

Seung-Ik Jang*, Nyun-Ki Chung*, Wongi Min**, Myung-Jo You***, Bae-Keun Park and Moo-Hyung Jun¹

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon
**Daejeon Metropolitan City Institute of Health & Environment, Daejeon*
***College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju*
****College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju*

Abstract : The chickens fed with the feeds supplemented with green tea (GT) and lactic acid bacteria (LB) were infected orally with 10,000 oocysts per chicken of *E. maxima*. The groups administered with the feeds supplemented with GT by 0.5% and 2.0% of feed showed the significant levels of decreasing in the number of oocysts shed for 5 days after *E. maxima* infection. The feeds supplemented with LB by 0.1% and 0.5% of feed were less effective in reducing the number of the fecal oocyst, compared with the groups administered with GT. To evaluate the immunoregulatory effects of the feed additives, the expression patterns of IL-2 and IFN- γ in spleen cells were studied by RT-PCR and ELISA. The higher levels of IL-2 transcripts after *E. maxima* infection were observed in the groups with GT, compared with the groups with LB and the mixture of GT and LB. The IFN- γ mRNA bands were observed in the all of experimental groups except the uninfected control. The culture supernatants of Con A-stimulated spleen cells (5×10^6 cells/ml) were measured for the concentration of IL-2 and IFN- γ by ELISA. The levels of IL-2 and IFN- γ on days 3 and 7 after *E. maxima* infection were significantly augmented in the groups with GT. These results indicated that GT-supplemented feeds resulted in higher reduction of oocyst-shedding and more enhanced immune responses in the chicken infected with *E. maxima*, as compared with LB-supplemented feeds. According to the results, it was implicative that the supplements could be utilized for development of feed additives for anti-coccidiosis.

Key words : cytokine, green tea, lactic acid bacteria, *Eimeria maxima*.

서 론

닭 구포자충(닭 콕시듐; avian coccidia)은 국내 닭 사육농가에 지속적으로 감염하여 양계산업에 경제적 손실을 초래하고 있으며, 닭 살모넬라균, 와포자충(cryptosporidium) 등과 함께 만성적으로 계군에 감염하여 양계의 생산성을 저하시키고 있다(31). 닭 구포자충증의 원인체로는 *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. necatrix* 등이 닭에서 가장 검출 빈도가 높으며, 특히 *E.*

acervulina, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*는 닭의 성장과 사료효율에 심각한 불균형을 일으킨다(5,27).

*Eimeria*는 종간에 장관내 기생부위가 특이하게 차이가 있으며, 숙주동물인 닭의 체내에서 성장과정 중 세포내 및 세포외 증식단계를 거치는 복잡한 생활사를 가지며, 무성 및 유성생식 과정을 가진다(10,14). *Eimeria*는 닭 체내에서 증식과정 중에 발생하는 다양한 충체항원으로 인해 복잡한 특이적 및 비특이적 면역 반응을 유발한다(26). 특이적 면역반응 요소에는 림프구, 항체, 싸이토키인, 림포카인, interleukins 등과 같은 세포 대사산물이 있으며(10,13), *Eimeria*에 대한 면역은 종 특이성이 강하다. 즉, 한 종류의 *Eimeria*에 대해 면역이 형성되었더라도 다른 종류의 *Eimeria*에 대해서는 감

¹Corresponding author.
E-mail : mhjun@cnu.ac.kr

수성을 보인다. 따라서 *Eimeria* 중 간 기관별 특이성, 숙주와 기생충 항원과의 복잡한 상호작용 및 난포낭(oocyst)의 외부환경에 대한 높은 저항성은 닭 구포자충증을 방역하거나 예방약 개발을 어렵게 하는 요소들로 지적되고 있다(10,24).

닭 구포자충증 국내 계군에 만연되어 있으므로 양계사료 특히 육용계 사료에는 항콕시딕제제가 첨가되어 급여되고 있으며, 국내에서 사용하고 있는 항콕시딕제제는 polyether ionoporous antibiotics (salinomycin, monensin), sulfamethazine 을 포함하여 약 60여종에 이른다(31).

녹차는 기호성 음료의 일종이지만 병원세균과 기생충에 대해 치료효과를 나타내는 카테킨(catechin)이 함유되어 있으며, 카테킨은 항바이러스효과가 있고, 세포의 노화를 저지시키는 강력한 항산화작용을 가짐으로 건강에 유익한 효과를 나타낸다는 사실이 실험적으로 입증되어 이에 대한 연구가 활성화 되고 있다(6,21). 한편 유산균은 그람양성 세균으로 사람과 동물에서 정관작용을 가지며, 면역증강 물질로써 장관관련 림프조직의 특이 및 비특이 면역반응과 전신성 면역반응을 증강시킴으로써 probiotics 요법에 응용되고 있다(4,25).

닭 구포자충증은 치료와 예방약 개발이 용이하지 않으며, 현재로는 화학적 항균제를 사료에 첨가하여 대량 투여하는 방법을 쓰고 있으므로 항콕시딕제제의 남용에 따른 약제 내성 원충주의 출현과 식육내 약제의 잔류에 따른 여러 문제가 대두되고 있다. 따라서 여러 연구자들이 닭 구포자충증을 예방하기 위하여 고전적인 항균제 투여 방법 이외에 보다 효과적인 예방대책을 확립하기 위해 면역학적 방법, 분자생물학적 방법 및 자연친화적 사료첨가제 개발을 위해 다양한 연구를 시도하고 있다(1,4,12,18,19,29,30).

본 연구에서는 녹차와 유산균제제를 사료에 첨가하여 닭에 급여한 후, *E. maxima*를 인공감염시켜 분변으로 배출되는 난포낭의 변화를 관찰하였다. 또한, 녹차 및 유산균제제가 *E. maxima* 감염 닭의 면역기전에 미치는 영향을 구명하고자, 실험계군에 대해 IL-2 및 IFN- γ 의 유전자 발현양상을 분석하고, 비장세포 배양액에 대한 IL-2와 IFN- γ 분비 농도의 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

실험동물

1일령 육용계(한국 토종닭 \times 로드아일랜드레드우) 150마리를 축산연구소(대전시 소재)에서 분양받아 1주일 간격으로 2회 분변검사 하여 *E. maxima*의 난포낭이 검출되지 않은 병아리를 선별하여 1개월간 적응 사육시킨 후 본 실험에 사용하였다. 닭 사육용 케이지를 사용하여 격리사육 하였으며, 항콕시딕제제가 첨가되지 않은 사료를 별도 주문생산 하여 급여하였고, 지하수를 공급하였다.

Eimeria maxima 감염

*E. maxima*는 중앙백신연구소(대전시 소재)에서 분양받았

으며, Sheather액(자당 500 g에 물 600 ml를 가한 용액; 비중; 1.2)을 이용한 부유법으로 분변 중 난포낭을 집충하여 증류수로 수세한 다음 2.5% 중크롬산칼륨용액에 넣어 포자를 형성시킨 후 4°C에 보관하면서 사용하였다. 난포낭은 집충하기 전 phosphate buffered-saline (PBS, pH 7.2)을 이용하여 10배 희석하고 700 g에서 5분간 원심분리 한 후 회수하는 과정을 3회 반복하였다. 최종적으로 1×10^4 oocysts/ml로 조정하여(4,15,18), 경구삽관을 이용하여 경구로 감염시켰다.

녹차제제

사료첨가제로 사용된 녹차는 전라남도 보성에서 재배된 녹차 잎을 6월에 수확하여 오븐(105°C)에서 24시간 동안 처리한 후 세절한 녹차로 보성 녹돈 영농조합(광주광역시 소재)에서 구입하여 Table 1과 같이 사료에 첨가하여 실험하였다.

유산균제제

유산균제제는 엠디랩(충남대학교 소재)에서 분양받아 사용하였으며, 유산균제제 “Lacto-BLS”는 *Bacillus* BLS주 (1×10^{11} CFU/ml) 10%, *Lactococcus* DH1주 (3×10^9 CFU/ml) 30%, *Lactobacillus* Km37주 (3×10^9 CFU/ml) 30%, 그리고 *Pediococcus* SL4주 (3×10^9 CFU/ml) 30%를 혼합하여 제조하였다. *Lactococcus* DH1, *Lactobacillus* Km37, 그리고 *Pediococcus* SL4는 각각 MRS broth (Difco, USA)에서 16시간 배양하였고, *Bacillus* BLS는 LB broth (Difco, USA)에서 16시간 배양하였다. *Lactococcus* DH1, *Lactobacillus* Km37, 그리고 *Pediococcus* SL4 혼합액과 *Bacillus* BLS 배양액은 4°C 냉장고에 보관하였고, 사용전에 *Lactococcus* DH1, *Lactobacillus* Km37, *Pediococcus* SL4, 그리고 *Bacillus* BLS균의 혼합비율이 30:30:30:10 되도록 제조한 다음 에어로졸 분무기(aerosol spray, Nalgene, USA)를 이용하여 사료에 골고루 혼합하였다.

Table 1. Experimental designs

Groups	No. of chickens	Treatments	<i>E. maxima</i> infection on 47 day old (oocysts/ml)
I	15	Control (normal)	-
II	15	Control (infected)	1×10^4
III	15	GT (0.5%)	1×10^4
IV	15	GT (2.0%)	1×10^4
V	15	GT (2.0%)+LB (0.1%)	1×10^4
VI	15	LB (0.1%)	1×10^4
VII	15	LB (0.5%)	1×10^4

The control groups were fed with the feeds without GT or LB. The group I was administered with PBS instead of *E. maxima*. Groups III to VII were fed with the feeds supplemented with GT or LB for 2 weeks before *E. maxima* infection. GT; Green tea, LB; the mixtures of *Bacillus* BLS, *Lactococcus* DH1, *Lactobacillus* Km37, and *Pediococcus* SL4. %; mixture ratio of green tea (g/g) or LB (ml/g) vs feed.

실험설계

E. maxima 감염에 미치는 녹차 및 유산균계제의 효과를 구명하기 위하여 Table 1과 같이 30일령의 닭 105마리를 선정하여 7개 군(I~VII)에 15마리씩 배정하였으며, 33일령 부터 57일령 까지 녹차 첨가사료 (사료 당 녹차의 비율; 0.5% 및 2.0%; g/g)와 유산균 첨가사료 (사료 당 균액량; 0.1% 및 0.5%; ml/g), 그리고 녹차 및 유산균 혼합 첨가사료 (2.0% 녹차사료와 0.1% 유산균 사료를 동량 혼합)를 각 각 급여하였다(Table 1). 47일령 제에 *E. maxima*를 감염시켰으며, 감염 후 6일 부터 5일 동안 분변을 매일 수거하여 배설된 난포낭의 수를 측정하였다(4,10,29). 대조군 I과 II는 항콕시듐 제제가 첨가되지 않은 일반사료를 급여하였으며, 무처치 대조군 I은 *E. maxima* 대신에 PBS를 투여하였고, 무처치 대조군 II는 *E. maxima*를 감염시켰다.

난포낭(oocyst) 수 계산

Lillehoj 등(15) 및 Min 등(18)의 방법을 응용하여 다음과 같이 수행하였다. 분변으로 배출되는 *E. maxima*의 난포낭 수를 측정하기 위하여 인공감염 후 6일부터 5일 동안 매일 채취된 분변에 증류수를 가하여 1,000 ml가 되도록 조정하였고, 실온에서 18시간 처리 후, 호모게나이저 (Fisher, USA)에 넣어 균질화 하였다. 그 중 1ml를 취한 후 원침관에 넣고 Sheather액 49 ml를 가한 후 잘 혼합하고 150 µl를 취해 McMaster OPG 계산판에 넣어 현미경(×100)하에서 병아리 당 평균 난포낭 수를 다음 공식에 의해 산정하였다.

$$\frac{\text{No. of oocyst counted} \times 1,000 \times 50}{0.15} \div \frac{\text{Total No. of chicken}}{\text{oocyst/chicken}} = \text{Total No. of oocyst/chicken}$$

IL-2 및 IFN-γ 유전자 분석

(1) RNA 추출 및 cDNA 합성

시험 닭의 비장을 적출하여 분쇄한 후 원침관에 넣고 Tris-reagent(Molecular Research Center, USA) 2 ml를 첨가하여 30초간 진탕한 다음 5~10분간 실온에 방치하였다. 여기에 chloroform(Sigma, USA) 500 µl를 첨가하고 30초간 진탕하고 10분간 방치한 후 4°C에서 15분간 원심분리(12,000 g) 하였다. 상층액을 취하여 동량의 isopropyl alcohol(Sigma, USA)을 넣고 잘 섞은 후 -20°C에서 하루 동안 방치하였다. 그 후 30분간 4°C에서 12,000 g로 원심분리하여 상층액을 버린 후 70% 에타놀 1 ml를 넣어 4°C에서 12,000 g로 10분간 원심분리 하였다. 침전물을 10 µl의 DEPC(Sigma, USA)로 처리한 멸균증류수를 넣어 잘 섞은 후 total RNA를 얻은 후 -70°C 저온냉동고에 보관하면서 사용하였다. Total RNA template 5 µl, 5×reverse transcriptase(RT) buffer 3 µl, dNTP 4 µl(2.5 mM), RNase inhibitor 0.5 µl(20U, Invitro, USA), reverse transcriptase 0.5 µl(100U, invitro, USA), oligo dT(20mer, bioneer) 1 µl, 멸균된 3차 증류수 6 µl를 넣어 총용량 20 µl로 하여 T-gradient PCR(Biometra, Germany) 기기를 사용하여 42°C에서 60분간, 그

리고 95°C에서 5분간 반응하여 reverse transcription을 수행하여 cDNA를 합성하였다(11).

(2) RT-PCR

cDNA template 2 µl, 15 mM MgCl₂를 포함한 10×PCR buffer 5 µl, dNTP 4 µl(2.5 mM), IL-2 및 IFN-γ primer를 각각 1 µl(10 pmol), Tag polymerase 1 µl(2.5U, Solgent, Korea), 멸균증류수 6 µl를 가하여 총용량 20 µl reaction mixture로 하여 T-Gradient(Biometra, Germany)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 94°C에서 5분간, 그리고 94°C에서 1분간 열처리하고, 55°C에서 1분간 접합, 72°C에서 1분간 연장 과정을 38회 반복 실시하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 처리하였다. 반응이 끝난 후 8 µl의 PCR 산물을 1.2% 아가로즈 겔(Gibco, USA)에 전기영동한 후 ethidium bromide(EtBr, Gibco, USA)에 염색하여 유전자의 유무를 Image analyzer(Pharmacia, USA)로 분석하였다. RT-PCR을 위한 primers는 Lillehoj 등(11)의 방법을 이용하여 제작하였으며, IL-2(400bp; 201-600nt)에 대한 forward primer로는 5'-CAGGAGTGCACCCAGCAAAC-3', reverse primer로는 5'-GAACAGACGTCATATCACCCA-3', 그리고 IFN-γ(435 bp; 154-588nt)에 대한 forward primer로는 5'-CATACTGCAAGTAGTCTAAAT-3', reverse primer로는 5'-GCAATTGCATCTCTCTGAGA-3'를 각각 제작하여 공시 하였다.

ELISA에 의한 IL-2 및 IFN-γ 측정

(1) 비장세포 상층액

*E. maxima*를 인공감염 시킨 후 1일, 3일 그리고 7일에 닭의 비장을 무균적으로 적출한 후 만든 미세 조직 파편을 Hanks's balanced salt solution(HBSS, Sigma, USA)에 부유하여 채집된 세포 부유액을 Histopaque(Sigma, USA)과 밀도구배원심 기법(1,800rpm, 20분, 실온)을 이용하여 림프구를 수집하고 HBSS에 부유하여 250 g에서 5분간 원심하여 2회 세척하였다. 수집된 림프구는 10% 우태이혈청(Sigma, USA), 페니실린(100 U/ml), 스트렙토마이신(100 ug/ml)이 포함된 RPMI 1640 배지에 재 부유시키고 Trypan blue dye exclusion 방법으로 산정한 세포 농도를 5×10⁶ cells/ml로 조정한 후 마이클로플레이트(96-well, tissue culture)에 분주하고 Con A(12.5 µg/ml)를 첨가하여 5% CO₂-41°C에서 48 시간 동안 배양하여 상층액을 수거하였다. 비장세포 상층액은 시험에 사용하기 전까지 -70°C에 저장하였다(23).

(2) ELISA

앞에서 준비된 비장세포 배양 상층액을 여과멸균(0.45 µm, Nalgene, USA)한 다음 Okamura 등(23)의 술식에 준해 실험하였다. 96-well ELISA plates를 준비하여 상층액 100 µl를 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer로 희석하여 well에 피복 시킨 후 플레이트는 상온에서 20분 동안 처리 후 4°C에서 18시간 반응시켰다. PBS-T(0.05% Tween-20포함)로 6회 세척한 후 100 µl의 PBS(1% BSA포함)를 첨가하여 상온에서 1시간 정지시키고 상층액을 버렸다. 다음에 0.1 M

carbonate-bicarbonate buffer로 mouse anti-chicken IL-2 monoclonal antibody (Serotec, UK) 및 mouse anti-chicken IFN- γ monoclonal antibody (Serotec, UK)를 100배 희석하여 각각 100 μ l 첨가하였다. 플레이트는 상온에서 1시간 배양 시키고 PBS-T로 5회 세척한 후, 0.1% BSA-PBS로 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma, USA)를 2000배 희석하여 각 well에 100 μ l씩 첨가하였다. 다음에 상온에서 1시간 배양 시키고 세척한 후 각 well에 O-phenylenediamine·2HCl이 첨가된 발색제 (TMB substrate)를 가하고 5분 배양한 후에 2N H₂SO₄ 50 μ l로 반응을 정지시켜 450 nm (GENios, Tecan, USA)에서 측정하였다.

통계처리 및 분석

*E. maxima*를 닭에 감염 시킨 후 채취한 분변에서 난포낭의 수와 ELISA를 이용한 IL-2 및 IFN- γ 농도를 측정된 결과를 GraphPad InStat(GraphPad Software, INC, USA)를 사용하여 통계학적으로 분석하였다.

결 과

분변 중 배설된 난포낭 수의 변동

녹차 및 유산균 첨가사료를 2주일 동안 급여한 후 1×10^4 oocysts/ml 농도의 *E. maxima*를 닭에게 경구로 인공 감염시킨 후 6일(생후 53일령)부터 10일(생후 57일령)까지 5일 동안 매일 분변을 수거하여 난포낭의 수를 측정하고 병아리 당 배설한 총 난포낭을 계수하여 비교하였다. 그 결과 (Fig 1), 감염대조군(II)은 $55.38 \times 10^6 \pm 4.74 \times 10^6$ 의 난포낭을 배설하였으며, 0.5% 녹차 첨가사료 투여군(III)은 $33.91 \times 10^6 \pm 3.57 \times 10^6$ 의 난포낭을 배설하여 감염대조군(II)에 비해 매우 유의한 난포낭 수의 감소를 나타내었다 ($p < 0.001$). 또한 2.0% 녹차 첨가사료 투여군(IV)은 $40.24 \times 10^6 \pm 2.17 \times 10^6$, 2.0% 녹차와 0.1% 유산균 첨가사료 급여군(V)은 $41.77 \times 10^6 \pm 2.39 \times 10^6$ 의 난포낭을 배설하여 유의성($p < 0.01$) 있게 감소 효과를 나타냈다. 또한 0.5% 유산균 첨가사료 급여군(VII)은 $46.27 \times 10^6 \pm 2.77 \times 10^6$ 의 난포낭을 배설하여 감염대조군(II)에 비해 $p < 0.05$ 의 유의성이 있었다 (Fig 1).

IL-2 및 IFN- γ RNA 검출

녹차와 유산균 첨가사료 급여가 *E. maxima* 감염에 따른 사이토카인 변화에 미치는 영향을 알기 위해 *E. maxima* 감염 후 1일과 3일, 5일 그리고 7일에 IL-2와 IFN- γ RNA를 검출하였다. IL-2 RNA는 감염 후 1일에 III군(0.5% 녹차)에서 일반사료 또는 유산균을 급여한 군 보다 현저한 증가를 보였다. 또한 V군(2.0% 녹차와 0.1% 유산균 혼합 투여군)과 VII군(0.5% 유산균)에서는 낮은 수준의 RNA가 검출되었다. 또한 감염 후 3일에는 III군(0.5% 녹차), V군(2.0% 녹차와 0.1% 유산균 혼합 투여군) 그리고 VII군(0.5% 유산균)에서 미약하게 검출되었으며, 이후 5일과 7일에는 IL-2 RNA가 검출되지 않았다 (Fig 2, Table 2).

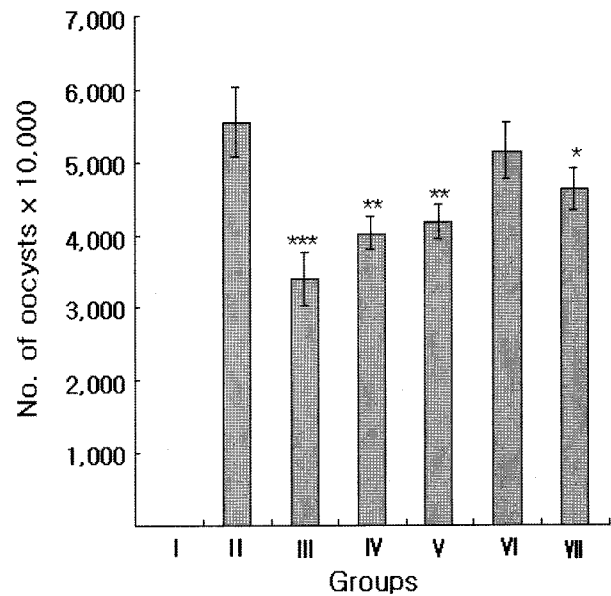


Fig 1. Total numbers of fecal oocysts per chicken counted between day 6 and day 10 following *E. maxima* infection. Groups I; Control (normal), II; Control (infection), III; 0.5% green tea, IV; 2.0% green tea, V; 2.0% green tea mixed with 0.1% lactobacillus, VI; 0.1% lactobacillus, VII; 0.5% lactobacillus. Chickens were infected orally with the oocysts at 10^4 /ml. Bars represent the means \pm SD of the groups with 15 chickens. The significant reduction of oocyst-shedding compared to group II; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$.

IFN- γ RNA는 감염 대조군(II)에서 감염 후 1, 3 및 7일에 미약하게 검출되었다. III군(0.5% 녹차)은 감염 3일, 5일 및 7일에, IV군(2.0% 녹차)에서는 감염 1일과 7일에 강하게 검출되었고, 녹차와 유산균 혼합 투여군(V)에서는 1일, 3일, 5일 및 7일에 약하게 나타났다. VI군(0.1% 유산균)은 감염 1일, 3일, 그리고 5일에 약하게, 그리고 VII군(0.5% 유산균)은 감염 후 1일에 강하게, 5일과 7일에 약하게 검출되었다 (Fig 3, Table 2).

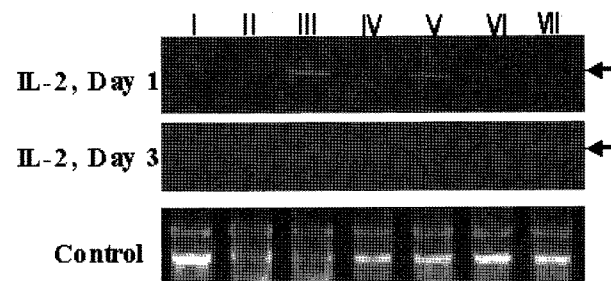


Fig 2. Changes of IL-2 RNA levels at days 1 and 3 after *E. maxima* infection. Groups I; Control (normal), II; Control (infection), III; 0.5% green tea, IV; 2.0% green tea, V; 2.0% green tea mixed with 0.1% lactobacillus, VI; 0.1% lactobacillus, VII; 0.5% lactobacillus. Groups II, III, IV, V, VI and VII were infected with the oocysts at 10^4 /ml. The arrowheads indicate the position of the expected 400 bp band.

Table 2. Detection of IL-2 and IFN- γ RNA at days postinoculation of *E. maxima* following treatment with green tea and lactobacillus products

DPI	IL-2							IFN- γ						
	I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII
-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	++	-	+	-	±	-	+	-	++	±	+	+++
3	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+++	-	++	+	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	++	±
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++++	+	-	++	

DPI = days postinoculation of *E. maxima*.

+, mild expression, ++, moderate expression, +++, intense expression, ±; weak expression, -, no expression.

Groups I; Control (normal), II; Control (infection), III; 0.5% green tea, IV; 2.0% green tea, V; 2.0% green tea mixed with 0.1% lactobacillus, VI; 0.1% lactobacillus, VII; 0.5% lactobacillus.

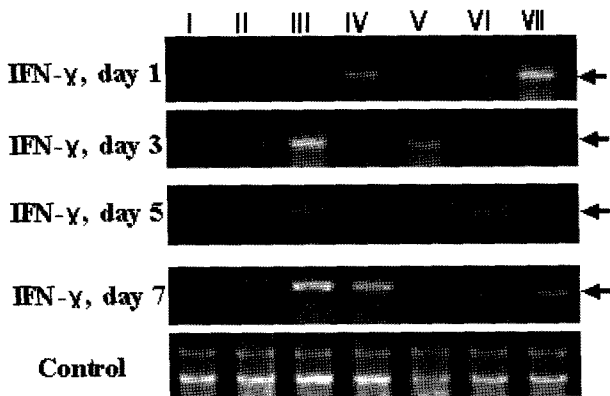


Fig 3. Changes of IFN- γ RNA levels at days 1, 3, 5 and 7 after *E. maxima* infection. Groups I; Control (normal), II; Control (infection), III; 0.5% green tea, IV; 2.0% green tea, V; 2.0% green tea mixed with 0.1% lactobacillus, VI; 0.1% lactobacillus, VII; 0.5% lactobacillus. Groups II, III, IV, V, VI and VII were infected with the oocysts at 10^4 /ml. The arrowheads indicate the position of the expected 435 bp band.

비장세포의 IL-2 및 IFN- γ 발현

녹차와 유산균 첨가사료를 급여하고 있는 닭에 *E. maxima*를 인공접종한 후, 1일, 3일, 및 7일에 적출한 비장으로 준비한 비장세포 (5×10^6 cells/ml)를 Con A와 함께 48시간 동안 배양 후 상층액을 회수하고 ELISA를 이용하여 IL-2와 IFN- γ 의 발현양상을 측정하였다. IL-2는 *E. maxima* 감염 후 3일과 7일에 III군(0.5% 녹차)은 OD값 0.363 ± 0.02 및 0.422 ± 0.05 를 나타내어 음성대조군(I)의 0.09 ± 0.008 및 0.12 ± 0.03 과 감염대조군(II)의 0.233 ± 0.03 과 0.228 ± 0.03 에 비해 유의하게 높은 결과를 나타냈다 ($P < 0.05$). IV군(2.0% 녹차)은 3일(0.27 ± 0.04)과 7일(0.27 ± 0.03)에 II군에 비해 높았으며, I군(음성대조군) 보다 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). V군(2.0% 녹차+0.1% 유산균 혼합), VI군(0.1% 유산균) 및 VII군(0.5% 유산균)은 I군에 비해서는 유의한 차이가 있었으나 ($P < 0.05$), II군과는 유의한 차이가 없었다 (Fig 4). IFN-

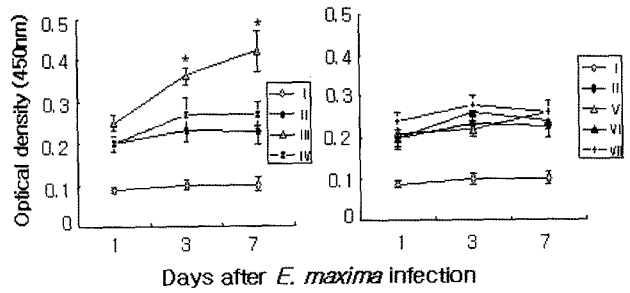


Fig 4. Expression pattern of IL-2 in culture supernatants of spleen cells (5×10^6 cells/ml) stimulated with Con A. Groups I; Control (normal), II; Control (infection), III; 0.5% green tea, IV; 2.0% green tea, V; 2.0% green tea mixed with 0.1% lactobacillus, VI; 0.1% lactobacillus, VII; 0.5% lactobacillus. Groups II, III, IV, V, VI and VII were infected with the oocysts at 10^4 /ml. The significant differences against group II : *, $p < 0.05$.

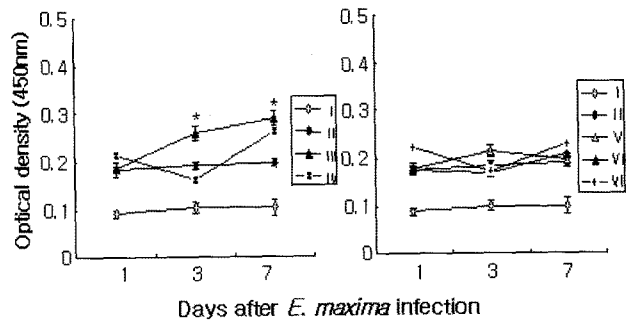


Fig 5. Expression pattern of IFN- γ in culture supernatants of spleen cells (5×10^6 cells/ml) stimulated with Con A. Groups I; Control (normal), II; Control (infection), III; 0.5% green tea, IV; 2.0% green tea, V; 2.0% green tea mixed with 0.1% lactobacillus, VI; 0.1% lactobacillus, VII; 0.5% lactobacillus. Groups II, III, IV, V, VI and VII were infected with the oocysts at 10^4 /ml. The significant differences against group II : *, $p < 0.05$.

γ 는 III군(0.5% 녹차)에서는 감염 후 3일과 7일에 0.251 ± 0.015 와 0.282 ± 0.014 로 나타나 감염대조군 II(0.184 ± 0.008 , 0.19 ± 0.009)에 비해 유의한 차이를 보였고 ($P < 0.05$), IV군(2.0% 녹차)은 인공감염 후 1일과 3일에는 감염대조군 II와 차이가 없었으나 7일에 0.253 ± 0.01 의 OD값을 보여 유의한 차이를 나타냈다 ($P < 0.05$). V군(2.0% 녹차+0.1% 유산균 혼합), VI군(0.1% 유산균) 및 VII군(0.5% 유산균)은 I군에 비해서는 유의한 차이가 있었으나 ($P < 0.05$), II군과는 유의한 차이가 없었다 (Fig 5).

고 찰

닭 구포자충증(avian coccidiosis)의 치료와 예방 대책으로 화학요법이 주로 이용되고 있으며, 최근 화학제제의 남용에 따른 약제 내성 원충주의 출현과 식육내 항구포자충제제의 잔류에 따른 문제가 대두되고 있다. 따라서 본 증의 예방을 위해 기존의 항균제 투여 방법 이외에 자연친화적 사료첨

가제 개발을 위해 다양한 연구가 시도되고 있다(1,4,12,18,19, 29,30).

*Eimeria maxima*는 세포내 및 세포외 증식과 무성생식 및 유성생식 증식단계를 거치는 복잡한 생활사를 가지고 있으며, 숙주 면역반응 역시 매우 복잡하다(10,12). 본 연구에서는 녹차와 유산균제제 첨가사료가 닭에서 *E. maxima* 감염에 미치는 영향을 관찰하고, 또한, 녹차 및 유산균제제가 *E. maxima* 감염 닭의 싸이토카인 생성에 미치는 영향을 구명하고자 일련의 시험을 수행하였다.

자연생산물을 이용한 항구포자충증 치료제제로는 지방산, 감마-토코페롤, 어유(fish oils), 아마종자유 등이 연구된 바 있으며(1), 이들의 항구포자충 작용기전으로는 강한 산화작용과 과산화분해 효소의 결핍 때문이라고 보고하였다(17). 그리고 약초 *Artemisia annua*로부터 추출한 항말라리아 치료제인 Artemisinin이 *E. acervulina*와 *E. tenella*의 인공감염시 난포낭의 배출을 감소시키는 효과가 있다고 보고된 바 있다(1,30). 본 시험에 공시한 녹차는 카테킨(catechin)이 중요 구성성분으로 항미생물, 항돌연변이성, 항바이러스성, 항암성, 및 항알레르기성 효과가 있고, 나아가서는 면역증강 등의 다양한 효과를 가진 차 음료이다. 녹차의 주요 약리학적 기능으로는 카테킨이 체내에서 유해한 유리기를 제거하고 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써 효능을 발휘한다(6,20,21). 또한 유산균제제는 대동물을 위시하여 가금류에서 probiotics로 이용되고 있으며, 대장균, 살모넬라균 및 캄필로박터균과 같은 병원세균의 감염을 저지시키는 효과가 있어 사료첨가제로 응용되고 있다. 유산균제제의 투여는 장내에서 유익한 정상 미생물균총을 유지하고, 병원균의 감염과 증식을 저지하며, 장 점막면역계의 증강을 도와주는 효과가 있다(4,15,25).

본 연구에서는 녹차 및 유산균 첨가사료를 급여한 후 *E. maxima*를 닭에게 경구로 인공 감염시키고 5일 동안 분변 중에 배설되는 난포낭의 수를 측정하여 비교한 그 결과(Fig 1), 2.0% 녹차 첨가사료 투여군(IV)과 2.0% 녹차와 0.1% 유산균 첨가 사료 급여군(V)의 난포낭 배설량이 감염대조군에 비해 유의하게 감소되는 효과를 나타냈으며, 또한 0.5% 유산균 첨가사료 급여군(VII)에서도 IV군과 V군보다는 약하지만 다소 감소하는 경향이 인정되었다(Fig 1).

분변 중 배설되는 난포낭의 수는 *Eimeria spp.*의 감염 상태를 측정하는 기준이 되며, 항구포자충제제 및 사료첨가제의 효능 평가를 위해 일반적으로 이용되고 있다(15). 본 시험에 얻어진 결과로 볼 때, 녹차 첨가 사료가 유산균제제 첨가사료 보다 닭 구포자충증의 감염을 막아주는 효과가 더 높다는 사실을 알 수 있었다. 사료에 첨가된 유산균제제의 항구포자충 효과는 유산균 총체의 장관내 세포의 침입을 방해하고, 숙주의 자연 및 획득 면역을 자극하여 면역이 증강되었기 때문이며, 유산균제제에 의한 점막면역은 병원균에 대항하는 방어효과가 있다고 하였다(4,15). 본 시험에서 유산균제제 첨가 사료 급여군에서 관찰된 난포낭 배설 감소효과는 이와 같은 기전에 의해 일어난 것으로 추정된다.

유산균제제가 숙주 체내에서 면역기능을 증가 시킨다는 사실과, 본 실험의 유산균제제 첨가 사료 급여 군에서 난포낭 배출 감소와 아울러 싸이토카인 유전자 발현 증가가 있다는 성적은 유산균제제의 투여가 면역세포를 활성화 시켜 면역증강 효과에 영향을 미쳤음을 추정할 수 있었다. 그러나 녹차 첨가사료 급여군에서 현저하게 난포낭 배설의 양이 감소된 것은 녹차의 항산화작용에 의한 항미생물효과와 면역증강 효과에 기인된 것으로 추정되나 작용기전에 대한 시험이 필요하였다. 따라서 *Eimeria spp.*는 장상피 세포내에서 증식하는 기생충으로 숙주 방어 기전에서 장관임파절에 의한 세포매개 면역반응이 매우 중요하기 때문에 닭 구포자충 감염에 대한 세포성 면역을 평가하는 수단으로서 사용되고 T cell marker로 알려진 싸이토카인 IL-2와 IFN- γ 에 대한 시험을 수행하였다(14,28,29,3,22).

본 연구에서는 녹차 및 유산균제제 첨가사료 급여가 닭의 비장세포에서 IL-2 및 IFN- γ RNA 합성능과 배출 효능을 RT-PCR과 ELISA 법으로 시험 하였던 바, IL-2는 감염 후 1일과 3일에 III군(0.5% 녹차), V군(2.0% 녹차와 0.1% 유산균 혼합 투여군)과 VII군(0.5% 유산균)에서 다양한 수준으로 검출되었으며, IFN- γ RNA는 III군(0.5% 녹차), IV군(2.0% 녹차), 녹차와 유산균 혼합 투여군(V), VI군(0.1% 유산균), 및 VII군(0.5% 유산균)에서 감염 후 1일에서 7일 사이에 감염대조군(II)에 비해 높게 검출되었다(Fig 3, Table 2). 또한 ConA와 함께 배양된 비장세포의 IL-2 및 IFN- γ 발현 양상은 III군(0.5% 녹차)과 IV군(2.0% 녹차)에서 감염대조군(II)에 비해 증가하는 경향을 보였으며, V군, VI군 및 VII군은 차이가 없었다(Fig 5). 본 실험에서 일반사료를 급여한 후 *E. maxima*를 인공감염 시킨 대조군에서도 약하게 INF- γ 의 발현이 일어난 현상은 *E. tenella*, *E. acervulina* 및 *E. maxima*가 닭에 감염되면 IFN- γ mRNA 증가된다는 보고와 일치하였으며(9,29), 녹차 투여군에서 싸이토카인이 더 강한 발현이 나타난 것은 녹차중의 카테킨 성분이 I κ B의 활성화로 NF- κ B를 인산화 시키고 면역관련 유전자의 전사를 유발하여 싸이토카인 발현을 자극하므로써 세포매개 관련 면역증강이 일어난 것이라고 추정된다(2,16).

또한 *E. maxima* 감염 후 1일부터 IL-2와 IFN- γ mRNA가 검출되고 비장세포 배양액에서 3일과 7일에 녹차제제 투여군에서 대조군보다 높게 나타난 결과는 감염 후 7일에 가장 높게 IL-2 발현이 나타난다는 보고(22)와는 다소 차이가 있거나 기생충 감염시 싸이토카인 유전자는 초기에 발현되어 세포매개 면역반응에 관여하며 숙주방어 작용 기능을 한다는 보고와 관계가 있다고 생각된다. 또한 비장에서 생성된 IL-2가 *Eimeria spp.*에 대한 국소세포매개반응을 증대하는 싸이토카인의 장관내 발현을 상위조절 한다고 지적된 바 있으며, 본 실험에서도 녹차제제 및 유산균제제 투여 군에서 감염 1일에 발현된 IL-2가 IFN- γ 의 발현을 자극함으로써 IFN- γ 의 반응이 강하게 나타난 것으로 생각된다.

이상과 같은 결과를 종합해 볼 때 녹차제제와 유산균제제를 첨가한 사료의 급여가 *E. maxima* 감염 닭에서 난포낭

배설을 감소시키고, 세포매개면역체계를 촉진하여 세포면역을 항진시키는 효과가 있으며, 특히 녹차제제가 *E. maxima*의 닭 체내 증식을 현저히 저지하였다고 생각된다. 본 제제의 작용기전을 보다 구체적으로 구명하고, 녹차와 유산균제제를 항구포자충증용 사료첨가제로 실용화하기 위해서는 추가 시험이 필요하다고 생각된다.

결 론

녹차와 유산균제제 첨가사료가 닭에서 *E. maxima* 감염에 미치는 영향을 관찰하고, *E. maxima* 감염 닭의 싸이토카인 생성에 미치는 영향을 구명하고자 일련의 시험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 녹차 및 유산균 첨가사료를 급여한 후 *E. maxima*를 닭에게 경구 감염시키고 5일 동안 분변 중에 배설되는 난포낭의 수를 측정하여 비교한 그 결과, 2.0% 녹차 첨가사료 투여군 (IV)과 2.0% 녹차와 0.1% 유산균 첨가 사료 급여군(V)의 난포낭 배설량이 감염대조군에 비해 유의하게 감소되는 효과를 나타냈으며, 또한 0.5% 유산균 첨가 사료 급여군(VII)에서도 감소하는 경향이 관찰되었다. 닭의 비장세포에서 세포매개면역반응 관련 싸이토카인 수준을 시험하였던 바, IL-2 RNA는 감염 후 1일과 3일에 III군(0.5% 녹차), V군(2.0% 녹차와 0.1% 유산균 혼합 투여군)과 VII군(0.5% 유산균)에서 다양한 수준으로 검출되었으며, IFN- γ RNA는 III군, IV군, V군, VI군 및 VII군에서 감염 후 1일에서 7일 사이에 감염대조군에 비해 높게 검출되었다. 또한 Con A와 함께 배양된 비장세포의 IL-2 및 IFN- γ 발현 양상을 ELISA 범으로 시험한 바, III군과 IV군에서 감염대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, V군, VI군 및 VII군은 차이가 없었다. 이상과 같은 결과를 종합해 볼 때 녹차와 유산균제제는 항구포자충증용 사료첨가제로 실용화될 수 있는 잠재력이 있다고 생각된다.

감사의 글

저자들은 *Eimeria* 원충을 분양해 준 중앙백신연구소(대전시)와 유산균제제를 제공해 준 엠디랩(충남대학교 소재)에 대해 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Allen PC, Danforth HD, Augustine PC. Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int J Parasitol* 1998; 28: 1131-1140.
2. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
3. Choi KD, Lillehoj HS. Role of chicken IL-2 on gammadelta T-cells and *Eimeria acervulina*-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gammadelta T-cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 73: 309-321.
4. Dalloul RA, Lillehoj HS, Shellem TA, Doerr JA. Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed

- a lactobacillus-based probiotics. *Poult Sci* 2003; 82: 62-66.
5. Fernando AM. *Eimeria*; Infectious of the intestine, In *Coccidiosis of man and domestic animals*, Long PL(ed). CRC Press Inc, Boca Raton, Fla. 1990: 63-75.
6. Hara Y. Green tea: Health benefits and applications. Marcel Dekker AG, Publishing Company Basel, Switzerland. 2001: 1-9.
7. Jeffers TK. *Eimeria acervulina* and *E. maxima*- Incidence and anticoccidial drug resistance of isolates in major broiler-producing areas. *Avian Dis* 1974; 18: 331-342.
8. Jeffers TK, Brentley EJ. Experimental development of monensin resistance in *Eimeria meleagridis*. *Poult Sci* 1980; 59: 1731-1735.
9. Laurent F, Mancassola R, Lacroix S, Menezes R, Naciri M. Analysis of chicken mucosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription-PCR. *Infect Immun* 2001; 69: 2527-2534.
10. Lillehoj HS. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *Int J Parasitol* 1998; 28: 1071-1081.
11. Lillehoj HS, Kaspers B, Jenkins MC, Lillehoj EP. Avian interferon and interleukin-2. A review by comparison with mammalian homologues. *Poult Sci Rev* 1992; 4: 67-85.
12. Lillehoj HS, Lillehoj EP. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Review. Avian Dis* 2000; 44: 408-425.
13. Lillehoj HS, Min W, Dalloul RA. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*, *Review. Poult Sci* 2004; 83: 611-623.
14. Lillehoj HS, Trout JM. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 349-360.
15. Lillehoj EP, Yun CH, Lillehoj HS. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Review. Anim Health Res Rev* 2000; 1: 47-65.
16. Liu SF, Ye X, Malik AB. In vivo inhibition of nuclear factor-kappa B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol* 1997; 159: 3976-3983.
17. Michalski WP, Prowse SJ. Superoxide dismutase in *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 47: 189-195.
18. Min W, Lillehoj HS, J Burnside, KC Weining, P Staeheli, JJ Zhu. Adjuvant effects of IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-15, IFN- α , IFN- γ , TGF- β 4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine* 2001; 20: 267-274.
19. Min W, Lillehoj HS, S Kim, JJ Zhu, H Beard, N Alkharouf, BF Matthews. Profiling local gene expression changes associated with *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina* using cDNA microarray. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 62: 392-399.
20. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea carechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 2001; 131: 27-32.
21. Mitscher LA, Jung M, Shankel D. Chemoprotection: a review of the potential therapeutic anti-oxidant properties of green tea(*Camellia sinensis*) and certain of its constituents, *Reviews. Med Res* 1997; 17: 327-365.
22. Miyamoto T, Min W, Lillehoj HS. Kinetics of interleukin-2 production in chickens infected with *Eimeria tenella*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2002; 25: 149-158.

23. Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA. Cell-mediated immune responses to a killed *Salmonella enteritidis* vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell change and interleukin-6(IL-6), IL-1, IL-2, and IFN- γ production. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 255-272.
24. Sasai K, Lillehoj HS, Matsuda H, Wergin WP. Characterization of a chicken monoclonal antibody that recognized the apical complexes of *Eimeria acervulina* sporozoites and partially inhibits sporozoite of CD8 lymphocytes *in vitro*. *J Parasitol* 1996; 82: 82-87.
25. Takahashi T, Oka T, Iwana H, Kuwata T, Yamamoto Y. Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; 57: 1557-1560.
26. Trout JM, Lillehoj HS. *Eimeria acervulina* infection: evidence for the involvement of CD8+ T lymphocytes in sporozoite transport and host protection. *Poult Sci* 1995; 74: 1117-1125.
27. Williams RB, Epidemiological studies of coccidiosis in the domestic fowl(*Gallus gallus*). II. Physical condition and survival of *Eimeria acervulina* oocysts in poultry house liter. *Appl Parasitol* 1995; 36: 90-96.
28. Yun CH, Lillehoj HS, Choi KD. Chicken IFN-gamma monoclonal antibodies and their application in enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 73: 297-308.
29. Yun CH, Lillehoj HS, Choi KD. *Eimeria tenella* infection induces local gamma interferon production and intestinal lymphocyte subpopulation changes. *Infect Immun* 2000; 68: 1282-1288.
30. 오화균, 윤희정, 노재욱, 장두환, 강영배. *Artemisia annua* 추출액의 *Eimeria tenella*에 대한 항콕시듐 효과. *대한수의학회지* 1995; 35: 115-121.
31. 윤희정, 노재욱. 항콕시듐제제가 콕시듐 백신에 미치는 영향. *대한수의학회지* 1998; 38: 129-132.