

최 종
연구보고서

산란계 지방간(Fatty liver hemorrhagic syndrome,
FLHS)의 발생과 isoflavone의 관계 규명 및 FLHS
예방기술 개발연구

연 구 기 관
고려대학교 생명과학대학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “산란계 지방간(Fatty liver hemorrhagic syndrome, FLHS)의 발생과 isoflavone 관계규명 및 FLHS 예방기술 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 10 월 14 일

주관연구기관명 : 고 려 대 학 교

총괄연구책임자 : 지 규 만

세부연구책임자 : 지 규 만

요 약 문

I. 제 목

산란계 지방간(Fatty liver hemorrhagic syndrome, FLHS)의 발생과 isoflavone 관계규명 및 FLHS 예방기술 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

산란계에서 지방간 (fatty liver) 과 출혈성 지방간 (fatty liver hemorrhagic syndrome, FLHS) 은 소모성 질환의 일종으로 국내 사육농가에 광범위하게 발생하여 피해를 주고 있다. 실제로 대부분의 농가에서 지방간에 의한 피해를 호소하고 있으나 국내에서는 현재 실태조차 파악되지 않고 있으며, 또한 예방대책에 관한 연구도 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 산란계에서 그동안 FLHS 연구에서 간과하였던 대두박내 isoflavone 성분의 estrogenic 효과가 산란계 FLHS 발생에 미치는 영향을 규명하고, 이를 통해 FLHS의 예방 대책을 찾기 위해 수행하였다.

지방간은 수의학적인 질병이라기보다 영양 사료적인 요인에 의해 주로 발생한다고 보며, 국내 산란계 사료의 배합표는 우리대로의 특징을 갖고 있어 국내 조건에서의 연구가 절대적으로 필요하다

본 연구의 궁극적 목표는 그동안 FLHS 연구에서 간과하였던 대두박내 isoflavone 성분의 estrogenic 효과가 산란계 FLHS 발생에 미치는 영향을 규명하고, 이를 통해 FLHS의 예방 대책을 찾는 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2002. 10. ~2003.9.)	산란계 FLHS 발생 연구를 위한 모델 개발 및 biomarker 후보 성분 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 산란계의 FLHS 발생을 조사 <ul style="list-style-type: none"> · 사육조건별, 환경별, 품종별 및 주령별 발생을 및 발생특성 조사 및 주 발생요인 추정 · FLHS score 기준 완성 · 향후 연구를 위한 기초자료 획득 - 산란계용 purified type diet개발에 의한 비교수단 확보 <ul style="list-style-type: none"> · 실험용 산란계 purified type diet 개발 · 원료 및 구성성분에 적합한 연구용 diet 제조 · FLHS 모델 개발을 위한 diet 및 급여방법 - FLHS 발생유도 및 조기 발병 감지를 위한 biomarker 후보 성분 탐색 <ul style="list-style-type: none"> · 혈액과 간의 biomarker 후보 성분 활용도 조사
2차년도 (2003.10. ~2004.9.)	사료 원료별, 구성 성분 별 영향 비교 및 biomarker 효용성 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 국내산란계의 FLHS 발생을 조사 (계속) - 사료 원료별, 구성성분별 FLHS 발생에 미치는 영향 비교 <ul style="list-style-type: none"> · purified diet를 활용한 원료사료의 영향 평가 · 에너지 및 단백질의 고저에 따른 FLHS 발생 비교 - Biomarker 후보 성분의 탐색(계속) <ul style="list-style-type: none"> · FLHS의 발생의 조기 검출을 위한 biomarker 개발
3차년도 (2004.10. ~2005.9.)	본 연구 결과 확인 실증 실험	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 산란계의 FLHS 발생을 조사(계속) - FLHS 발생기전 연구(계속) - 연구결과 확인을 위한 비교 사양시험 실시 <ul style="list-style-type: none"> · Biomarker 효용성 검증 및 연구 결과 확인

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서 FLHS과 대두박내 isoflavones와의 관련성은 어느 정도 분자 생물학적 방법에 의해 확인되었다. 지방간의 출현 빈도는 저단백질 사료에서 더 높았으며, 저 단백질 사료에 isoflavones 공급이 추가 되었을 때 발생빈도가 추가로 더 높아짐을 보였다.

본 연구결과의 추론에 의해 FLHS 및 일반 지방간의 방지를 위해 권장할 수 있는 것 중 하나는 산란계사료에서 단백질 함량을 요구량 수준으로 유지해야 하며 특히 필수 아미노산 중 메치오닌 (제 1 제한 아미노산)의 공급에 만전을 기하는 것이다.

지방간의 조기 출현 증세를 파악하기 위한 biomarker로서는 혈중 alanine transaminase (ALT) 활성 또는 AST (aspartic acid transaminase)와 ALT 활성 비율 등이 병아리나 산란계에서 효과적 일수 있다는 것을 보였다.

산란계의 지방간 문제에서 우선적으로 해결해야 하는 것은 국내 산란계에서의 지방간 발생 통계를 확보하는 것이다. 일반 지방간 발생 및 FLHS 발생 정도가 매우 심하다는 주관적인 정보이외에 실제로 어느 정도 발생하고 있는지 객관적인 자료가 없으며, 본 연구에서도 그 자료를 확보하지 못했다. 그 이유는 일반 사육농장에서의 병성 감정이 정확하게 이뤄지지 않고 있으며, 특히 농장 방문 수의사들이 일반 지방간과 FLHS를 구별하지 않기 때문이기도 하다. 또 한 가지 우려되는 것은 모든 지방간이 여름철 환경에서 더 발생율이 높은 것을 고려할 때 현대식 계사에서 지방간의 발생 가능성이 더 높아지지 않을까 하는 것이다.

지방간 과 FLHS의 발생으로 인한 생산성의 저하를 방지하기 위한 첫 시도로 지방간 발생율에 대한 체계적인 조사가 이뤄져야 하며, 산란계사료에서 필수아미노산의 충분한 공급여부도 검토될 필요가 있다고 본다.

SUMMARY

(영문 요약문)

This study was to investigate a relationship between dietary isoflavones(IF) and development of fatty liver hemorrhagic syndrome (FLHS) in laying hens. The IF, a weak estrogenic compound present abundant in soybean meal, were hypothesized as risk factor for development of the FLHS in laying hens by the authors. No other definite factors have been proposed yet as dietary ingredients resulting into development of the syndrome.

We developed FLHS models in laying hens by forced-feeding extra amount(about 35% more) of the diets for a month. Purified-type diet for laying hens was also developed to simplify phytochemicals in the diets and to exclude any undesirable phytochemicals in the diets. Young growing chicks were also used in studying the basic mechanism involved in accumulation of liver lipids when daidzein was added to a low protein diet. The effect of daidzein(DE) on the liver lipid content was also compared with those of estradiol (E2) in laying hens and in young chicks. E2 was injected intramuscularly every other day at a level of 2 mg/ kg body weight.

DE added to the purified or semipurified layer diets at level of 1,000 ppm tended to increase liver lipid accumulation. However, the effects of DE on liver weight or total lipid content was weaker than those of E2 (in every experiment). Lower level (LP, 11% crude protein) of dietary protein than normal (22% c. p.) or higher proteins (33% or 44% c. p.) was more effective in accumulating liver lipid in young chicks. The effects of low dietary protein on liver lipid content were more apparent when DE was added to the diet in young chicks.

The chicks of LP+DE group showed significantly lower FAS mRNA transcription, apo-B mRNA transcription, than those of the chicks of LP or LP+E2 groups. HMG-CoA reductase mRNA transcription was also lower in

LP+DE chicks than that of the LP group. These measurements suggest that higher lipid accumulation in the liver and lower plasma lipid profiles VLDL from the liver into blood circulation even though hepatic fatty acid synthesis rate was not activated.

Biomarkers to predict early stage of fatty liver development have been investigated throughout the study. Serum levels of alanine aminotransferase(ALT) shown rather than aspartate aminotransferase(AST), and the ratio of AST/ALT have consistent relationships to the extent of hepatic lipid accumulation in laying hens and in young chicks. Serum level of gamma glutamyl transferase activity needs to be investigated further in relation to fatty liver diseases in the birds.

In conclusion, IF could be one of the factors causing fatty liver in the birds. The If effects on the liver were more apparent when dietary protein supply was not enough or there is any limiting amino acid, particularly methionine, in the diets.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	10
Part 1. Objective of the study	10
Part 2. Necessity of the study	10
Part 3. Outlines of the study	13
Chapter 2. Present status of technological development in fatty liver hemorrhagic syndrome (FLHS) of laying hens domestic and abroad	14
Part 1. Domestic research on the FLHS issue	14
Part 2. Research abroad and perspectives on the FLHS issue	15
Chapter 3. Experimental studies, results and discussion	20
Part 1. Effect of isoflavones intake on fatty liver development in layinghens	20
Part 2. Development of purified-type diet to study FLHS in laying hens	30
Part 3. Effects of supplemented daidzein and estradiol administration on development of FLHS in laying hens forced-fed a semi-purified type diet	33
Part 4. Study to investigate a relationship between dietary ingredients and isoflavones in influencing liver lipid contents, and biomarkers and molecular mechanism for FLHS development	38
4-1. Comparative effects of dietary protein levels on liver lipid accumulation in young chicks	40
4-2. Synergic effects of dietary protein levels and daidzein supplementation on liver lipid accumulation in young chicks	45
4-3. Comparative effects of daidzein and estradiol (E2) on liver lipid accumulation in young chicks fed a low protein diet	48
Part 5. Investigation for FLHS occurrence in laying hens on commercial farm	57
Chapter 4. Achievement and contribution of the study for poultry industry	63

Chapter 5. Practical application plan of the study results	65
Chapter 6. New knowledges and information from international sources on the FLHS during the study	66
Chapter 7. Literatures cited	67

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	10
제 1 절	연구개발의 목적	10
제 2 절	연구개발의 필요성	10
제 3 절	연구의 범위	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황	14
제 1 절	국내에서 산란계 지방간 문제의 연구 현황	14
제 2 절	국외 지방간 관련 기술 개발 현황	15
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	20
실험 1.	Isoflavones 섭취량에 따른 산란계의 지방간 발생 가능성 조사	20
실험 2.	산란계 FLHS 발생 연구를 위한 정제사료 (purified-type diet) 개발	29
실험 3.	강제급이 사양방식에서 산란계에게 daidzein 과 estradiol administration이 간지방 축적에 미치는 영향 비교	33
실험 4.	병아리에서 사료 성분과 DE의 상호관련, FLHS 의 biomarker 확인 및 간 지방축적 기전의 분자생물학적 연구	38
4-1.	병아리에서 단백질 수준에 따른 간 지방 축적 영향 비교	40
4-2.	사료단백질 수준과 첨가 DE가 병아리의 간 지방축적에 미치는 영향	45
4-3.	저 단백질 사료에서 DE 첨가가 병아리의 간지방 축적에 미치는 영향	48
실험 5.	국내 산란계 FLHS 발생을 조사	57
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	63
제 5 장	연구개발 결과의 활용계획	65
제 6 장	연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보	66
제 7 장	참고문헌	67

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목적

산란계에서 지방간 (fatty liver) 과 출혈성 지방간 (fatty liver hemorrhagic syndrome, FLHS) 은 소모성 질환의 일종으로 국내 사육농가에 광범위하게 발생하여 피해를 주고 있다. 실제로 대부분의 농가에서 지방간에 의한 피해를 호소하고 있으나 국내에서는 현재 실태조차 파악되지 않고 있으며, 또한 예방대책에 관한 연구도 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 산란계에서 그동안 FHLS 연구에서 간과하였던 대두박내 isoflavone (IF) 성분의 estrogenic 효과가 산란계 FLHS 발생에 미치는 영향을 조사하고, 이를 통해 FLHS의 예방 대책을 찾기 위한 것이다.

제 2 절 연구의 필요성

산란계에서 출혈성 지방간(fatty liver hemorrhagic syndrome, FLHS))은 일종의 소모성 질환으로 모든 사육농가에 장기간에 걸쳐 경제적 손실을 주고 있다. 국내 산란계 농가에서 그 피해를 호소하고 있으나 아직 FLHS의 발생 실태조차 파악하지 못하고 있지 않으며, 예방 대책에 대한 연구가 전혀 이뤄지지 않고 있다.

지방간은 수의학적인 질병이라기보다 영양 사료적인 요인에 의해 주로 발생한다고 보며, 국내 산란계 사료의 배합표는 우리대로의 특징을 갖고 있어 국내 조건에서의 연구가 절대적으로 필요하다

본 연구의 궁극적 목표는 그동안 FHLS 연구에서 간과하였던 대두박내 isoflavone 성분의 estrogenic 효과가 산란계 FLHS 발생에 미치는 영향을 규명하고, 이를 통해 FLHS의 예방 대책을 찾는 것이다.

1. 기술적 측면

- 산란계에서 발생하는 지방간(FLHS)은 육계의 지방간(fatty liver and kidney syndrome, FLKS)과 발생 기전이 다르다 (Leeson 과 Summers, 1991).
- FLHS의 사후 진단에 의하면 지방축적에 의해 간이 매우 커지고, 연황색을 띄며 조직의 탄력이 부족하여 부서지기 쉬운 형태가 되면서 출혈반점이 나타난다.
- 이 FLHS은 수의학적인 문제라기 보다 영양 사료적 차원의 문제라고 판단된다.
- FLHS 발생 기전과 원인은 오래 전부터 연구되었음에도 불구하고 아직 확실하게 제시된 것이 없다.
- FLHS의 부분적인 현상은 많은 연구자에 의해 밝혀져 있어 이를 토대로 체계적인 연구가 필요하다.
- 우리나라 양계 사료의 원료 구성과 영양소 수준이 미국, 일본과 달리 우리대로의 특성을 갖고 있기 때문에 국내 배합사료의 상황을 고려하면서 지방간 발생 방지를 위한 연구가 이루어져야 한다.
- 본 연구진이 착안하고 있는 대두박 isoflavones의 estrogenic 효과는 그동안 지방관 관련 연구에서 간과해왔던 분야이며, isoflavone의 역할에 대한 최근의 새로운 발견이 산란계의 FLHS 문제 해결의 실마리가 될 수 있다고 판단한다.

2. 경제·산업적 측면

- FLHS 증상은 산란이 활발하게 일어나고 있는 계군에서 발생한다.
- 이 증후군은 완전히 성숙된 산란계에서 발생하여 산란중지와 폐사를 일으킬 수 있다.
- FLHS에 걸린 계군은 산란율이 서서히(10-40%) 저하되거나 산란 피크에 도달하지 못하며, 체중은 20-25% 정도까지 계속 증가하나 뚜렷한 외관적인 특

- 이성이 없어 지속적인 경제적 손실을 주게 된다.
- FLHS는 평소 보다 케이지 사육 산란계에서 더 급성적으로 나타나며, 외부 환경 온도의 영향을 받아 특히 여름철에 많이 발생하므로 현대식 계사의 경우에는 연중 계속 발생할 가능성이 있어 기존 계사에 비해 더 큰 피해가 일어날 수 있다.
 - 우리나라에서는 산란계 FLHS 발생 상황에 대한 체계적인 조사나 그의 방지를 위한 연구가 전혀 없이 무방비 상태로 방치하고 있어 양계산업에 적지 않은 피해를 미치고 있다고 판단된다.
 - 국내 사료업계에서도 이의 심각성은 인식하고 있으나 1회 사양 실험기간이 최소 6개월의 긴 연구기간이 필요하고, 연구비 확보 애로 등으로 단기적인 영업 차원의 대응(비타민 제제의 추가 첨가 등)만 하고 있는 실정이나 그 효과는 불명확하다.

3. 사회·문화적 측면

- 산란계의 FLHS 발생 문제는 산란계 사육농가의 불안 요소의 하나다.
- 산란계 산업의 현안중의 하나인 FLHS을 본 연구진이 착안하고 있는 관점에서 해결이 될 경우 사육 농가의 경제적, 심리적 문제 해결에 큰 도움을 줄 수 있다.
- 국내에서 발명하는 산란계 FLHS의 특성과 주 발생기전에 대한 이해도가 깊어져 이를 활용한 신규 제품의 생산이 가능하게 되리라 여겨진다.
- Biomarker 활용에 의해 발생가능성을 정확히 알게 됨으로써 농장에서 예방 대책을 강구하게 되며 피해를 최소화 할 수 있다. 사료 업계에서도 연구 결과를 활용하여 파급효과가 클 것으로 생각된다.
- 본 연구는 국내 계란 생산비를 개선하여 경쟁력 강화에 도움을 줄 수 있다.

제 3 절 연구의 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002.10 ~2003.9)	산란계 FLHS 발생 연구를 위한 모델 개발 및 biomarker 후보 성분 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 산란계의 FLHS 발생을 조사 ·사육조건별, 환경별, 품종별 및 주령별 발생을 및 발생특성 조사 및 주 발생요인 추정 ·FLHS score 기준 완성 ·향후 연구를 위한 기초자료 획득 - 산란계용 purified type diet개발에 의한 비교 수단 확보 ·실험용 산란계 purified type diet 개발 ·원료 및 구성성분에 적합한 연구용 diet 제조 ·FLHS 모델 개발을 위한 diet 및 급여방법 - FLHS 발생유도 및 조기 발병 감지를 위한 biomarker 후보 성분 탐색 ·혈액과 간의 biomarker 후보 성분 활용도 조 사
2차 년도 (2003.10 ~2004.9)	사료 원료별, 구성 성분 별 영향 비교 및 biomarker 효용성 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 국내산란계의 FLHS 발생을 조사(계속) - 사료 원료별, 구성성분별 FLHS 발생에 미치 는 영향 비교 ·purified diet를 활용한 원료사료의 영향 평가 ·에너지 및 단백질의 고저에 따른 FLHS 발생 비교 - biomarker 후보 성분의 탐색(계속) ·FLHS의 발생의 조기 검출을 위한 biomarker 개발
3차 년도 (2004.10 ~2005.9)	본 연구 결과 확인 실증 실험	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 산란계의 FLHS 발생을 조사(계속) - FLHS 발생기전 연구(계속) - 연구결과 확인을 위한 비교 사양시험 실시 ·biomarker 효용성 검증 및 연구 결과 확인

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

산란계 지방간에 관련된 연구는 모두 국외에서만 이뤄졌으며 국내에서는 전혀 연구된바가 없는 것 같다. 수많은 연구가 수행되었음에도 불구하고 아직 FLHS 발생의 근본적인 원인을 모르고 있다 (Leeson 과 Summers, 1991).

제 1 절 국내에서 산란계 지방간 문제의 연구 현황

- 국내에서 일반 지방간 및 FLHS 발생현황이나 FLHS 방지를 위한 어떤 연구도 보고된 바 없다. 농가의 주관적인 관찰에 의하면 지방간 발생 상태가 심각한 수준이다.
- 본 연구에서 FLHS 발생의 중요 요인으로 주목하고 있는 isoflavones (IF)의 작용 기전과 효과에 대해서는 본연구진이 현재 농림기획과제의 일부분으로 연구하고 있다. 국내 축산학계에서는 본 연구진의 IF 연구가 유일한 것으로 알고 있다.
- IF는 estrogen과 유사한 구조를 갖고 있어 체내에서 weak estrogenic 효과를 나타낸다는 보고가 많이 있어 본 연구실에서는 사료내 IF 성분들이 동물 생리에 미치는 영향에 대해 관심을 갖고 있었다.
- 여러 자료의 검토 결과 사료를 통한 IF 섭취가 산란계에서 FLHS의 주요 원인이 될 수 있다는 것을 가설로 발전시키고, 이를 검증하기 위해 본 연구에 착수하였다.
- 본연구진은 대두박, isolated soy protein 및 순수한 IF (genistein, daidzein)등을 활용하면서 estrogenic 효과가 병아리에서 미치는 생리, 생화학적 영향을 연구하고 있으며, 대두박이나 혈액, 뇨중의 IF 농도의 분석을 위한 HPLC 기술등 충분한 시설과 경험을 확보하고 있다.
- 실험 목적으로 만들 정제사료도 본 연구실에서 실제로 병아리와 실험 쥐등의 실험을 위해 자주 만들었던 경험을 갖고 있다. 산란계용 사료에 대해서도 과거에 경험한 바가 있어 큰 문제가 되지 않을 것으로 판단한다.

제 2 절 국외 지방간 관련 기술 개발 현황

1. 산란계 지방간 (FLHS)발생의 일반적 현상

- 산란계 FLHS 개시의 일차적인 증세는 체중의 증가와 간의 지방축적이다.
- 닭은 사람과 마찬가지로 간 조직이 체내 지방산 합성의 주요 장소이다.
- 간 조직 세포에 지방이 과다하게 축적되는 원인은 독소(toxin), 대사적 이상, 영양장애 와 내분비 교란 같은 것을 들 수 있다.
- 간의 지방 축적은 간 기능이 어떤 이유로 변화되어 지방의 합성 증가, 합성된 지방의 방출 저하, 또는 간 조직으로 지방 전입 증가 등의 현상에 의해 결과적으로 간에 지방 함량이 증가되기 때문이다 (Leeson과 Summers, 1991).
- FLHS는 일단 발생하면 치료가 불가능하므로 예방에 중점을 두어야 한다.
- 산란전의 성체는 간 지방함량이 건물기준으로 10-15% 수준인데 암닭은 성숙에 달하면서 혈중 estrogen의 영향에 건물의 50% 까지 증가한다. 이 지방은 대부분이 중성지방이며 그 외는 fatty acids의 cholesterol ester가 주를 이룬다.
- 어떤 이유로 간 지방이 산화되며 출혈이 생기며 산란계가 폐사하는 FLHS는 간 조직에 출혈 반점이 나타나며 이것과 일반적인 간의 고지방과는 구별되어야 한다.

2. 산란계 FLHS 발생을 증가 요인

- 특히 고능력의 산란계에서 사료의 과도한 섭취에 의해 나타난다.
- 산란계에 pellet, crumble 사료의 급여시 과잉섭취로 인해 FLHS 발생이 많아진다.
- 사료섭취량의 증가 요인, 즉 skip-a-day feeding, 환경온도의 변화, high fiber diet급여 등 과도한 사료섭취에 의해 FLHS 발생이 높아질 수 있다.
- 일반적으로 고에너지 사료가 FLHS 발생을 높이지만, 저에너지 사료 (또는 일시적인 제한급이)도 FLHS의 발생을 일으킬 수 있다.

- 배합사료의 구성 원료에 따라 FLHS의 발생 정도가 다르다는 보고가 많다.
- 사료에 동물성 지방 첨가로 에너지 함량을 높이면 FLHS 발생이 증가하였다. 이는 사료의 저 단백질 함량, 고에너지, 아미노산의 불균형 등이 생길 수 있기 때문이다.
- 사료의 lipotropic 요인, 즉 methionine, choline, vitamin B₁₂등의 부족에 의해 간으로 지방의 infiltration이 증가되어 지방간이 된다는 주장도 있으나 이는 일반 농장의 지방간의 발생과 연관성은 적을 것 같다.
- Chelated mineral의 급여에 의해 FLHS 발생이 증가하였다 (Branton 등, 1995).
- 채종박 중 glucosinolate 함량이 높은 품종의 경우 FLHS를 유발한다는 증거가 확실하다. 그러나 canola 품종이 FLHS를 일으킨다는 증거는 없다 (Akiba 등, 1982).
- 사료내 mold나 mold toxin도 이 증후군을 일으킨다는 보고가 있으나 인과 관계가 확실하지 않다는 주장도 있다(Leeson 과 Summers, 1991).

3. 산란계 FLHS 발생을 저하요인 및 예방법

- 서구에서 1980년대 후반부에 그 전 10년에 비해 지방간 발생율이 감소하는 경향을 보였으나 그 이유는 모른다 (Leeson 과 Summers, 1991).
- 배합사료에 biotin, niacin의 첨가는 FLHS 방지에 도움이 되지 않았다.
- FLHS 발생시 사료 톤당 60 g 유산동, 500 g choline, 3 mg vitamin B₁₂, 5000 iu vitamin E 와 500 g DL-methionine을 첨가를 권한다. 그러나 이것이 FLHS해결을 보장하지는 못한다.
- 사료 단백질 함량 1-2% 증가가 도움을 주기도 하나 역시 보장된 방법은 아니다.
- 사료에 첨가한 식물성 지방이 도움이 되기도 하나 항상 그렇지는 않다. 간에서 탄수화물로부터 지방산 합성 부담을 덜어주는 것이 도움이 된다고 설명된다.

- 대두박을 canola 박이나 해바라기씨박으로 대체하면서 iso-caloric하게 지방을 첨가할 경우 FLHS에 도움이 되는 현상도 이 이론으로 설명하고 있다.
- 배합사료 원료로 옥수수 대신 보리, 소맥 등을 사용할 때 FLHS 발생이 저하되었다.
이 경우도 에너지 수준을 맞추기 위해 지방을 추가로 첨가해 주기 때문이라고 설명한다. 그러나 사료의 지방 첨가는 반대로 FLHS를 일으킨다는 보고도 있다.
- 옥수수-대두박 원료 대신 옥수수-어분 또는 옥수수-distillers dried grains with solubles를 사용시 FLHS 발생이 감소하였다 (Akiba 등, 1982).

4. 간 조직에서의 지방 대사의 생리·생화학적 연구

- 조류에서는 간이 지방산 합성의 주요 장소이다.
- 절식과 재급식(refeeding)은 간 지방산 합성에 큰 영향을 미쳐 어린 거위에서 2일간 절식후 재급식에 의해 fatty acid synthetase 활성이 42배나 증가하였다 (Wilson 등, 1986).
- 지방산 합성의 조정 역할과 rate limiting enzyme인 acetyl-CoA carboxylase는 citrate에 의해 활성화되며 long chain fatty acyl CoA에 의해 억제된다.
- 간에서 지질 합성은 여러 hormone에 의해 좌우된다(Fischer 와 Goodridge, 1978).
- Stearyl CoA desaturase는 TG내 oleic acid 와 palmitoleic acid 양을 증가시키며, 그의 활성은 estradiol에 의해 촉진된다 (Pageaux 등, 1992).
- Estradiol-17 β 를 12주령의 암컷 중추에게 총12일간 12 mg을 근육 주사할 때 간 지방이 대조구의 두배 정도 증가하였다. 증가된 지방은 adipose tissue에서 유래된 것이 아니고 간세포의 cytoplasm에 존재하는 intracellular origin이었다. 동시에 간 조직의 total RNA, RNA/DNA비율이 크게 증가하였다 (Yu 와 Marquardt, 1973).
- Estradiol-17 β 를 11주령의 암, 수 중추에게 2 mg/체중 kg 으로 21일간 주사

하여 FLHS가 유도되었고, 암컷이 더 예민하게 반응하였다 (Polin 과 Wolford, 1977).

- 닭의 간에서 lipoprotein 합성은 estrogen 유도체인 diethylstilbesterol에 의해 VLDL이 400배, LDL 합성이 70배나 크게 증가하였다 (Kudzman 등, 1979).
- 그러나 estradiol 처리가 산란계에서 간의 지방량은 증가시켰으나 FLHS는 발생시키지 못하였다는 보고도 있다 (Pearce 와 Johnson, 1986).
- 간에서 lipogenesis에 필요한 NADPH는 glucose-6-phosphate dehydrogenase 보다 malic enzyme(ME)의 활성에 의해서 공급된다(Pearce, 1977).
- 닭에서 malic enzyme activity는 lipogenic activity를 나타내는 좋은 지표이며, 또한 혈중 VLDL 함량과도 매우 좋은 상관관계를 보였다 (Whitehead 등, 1984).
- 거위 간 개발 연구에서는 간 지방의 축적이 유전적 요인에 따라 크게 좌우되었으나(Mourot 등, 2000), 산란계에서는 유전적 요인의 차이가 크지 않았다. 거위에서 간의 중량과 ME 활성, 혈중 VLDL 함량간에 좋은 상관관계가 있었으나 이런 반응이 거위의 품종에 따라 달랐다.

5. 산란계 지방간의 인위적 유도 및 동물 모델 개발

- 산란계에서 일반 섭취량의 115-120% 정도되는 사료를 강제 급여 (forced-feeding) 하여 FLHS를 성공적으로 발생시킬 수 있다는 것이 보고되었다 (Polin 과 Wolford, 1977).
- 동일한 연구자들이 보고 한 또 한 가지 방법은 Estradiol-17 β 을 근육주사하는 방법이다.

6. 대두박 IF의 estrogenic 효과

- IF는 polyphenolic 계통의 물질로서, glycosidic form의 genistin, daidzin과 aglycone form의 genistein 및 daidzein 이 대표적 성분이다.

- 최근에 IF를 비롯한 몇 가지 phytochemicals이 여성hormone인 estrogen 과 비슷한 성질을 갖고 있다는 사실이 보고되면서 이의 활용에 의해 폐경기 여성의 골다공증 치료 와 유방암 등의 치료와 예방에 많은 연구가 이뤄지고 있다 .
- IF의 estrogenic 효과는 섭취한 host animal의 생리적 상태에 따라 antiestrogenic하게 작용할 수도 있다. 최근의 연구결과는 IF이 나타내는 estrogenic 효과도 사람의 경우 뼈, 난소, 유방 등 조직에 따라 다르며, 동물 종에 따라 또 반응이 달라질 수 있다는 것을 보여주고 있다. 따라서 닭의 간 조직에서 IF에 의한 estrogenic 효과가 위의 실험에서 사용된 estradiol과 같은 효과를 나타낼지 확인이 필요하다.
- 대두박에 IF 함량이 매우 높다는 것이 밝혀지면서 서구에서는 콩 식품의 중요성이 재삼 부각되고 있다 (Finley 등,1996).
- 대두박은 산란계 사료의 중요한 단백질 급원으로 거의 모든 사료에 첨가되고 있으나 그의 사용량은 타 박류와의 시장 가격 비교에 따라 변경되고 있다.
- FLHS과 estradiol과의 관계를 밝힌 Polin 과 Wolford(1977)의 경우도 산란계 사료의 대두박에 estrogenic 효과를 나타내는 물질이 있다는 사실은 모르고 있었으며, 현재까지 IF와 FLHS과 연관된 연구는 문헌 조사 결과 보고된 것이 없는 것 같다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

실험 1. Isoflavones 섭취량에 따른 산란계의 지방간 발생 가능성 조사

1. 실험목적

대두박 이외의 단백질 공급원료사료(면실박과 채종박)는 일반적으로 산란계에서 지방간을 유도하는 것으로 알려져 있음. 이들 면실박과 채종박은 실제 field에서 산란후기사료에 다량 사용되고 있으며 산란계가 지방간 또는 FLHS의 발생이 많아지는 시점과 일치하여 확인할 필요성이 있음

2. 재료 및 방법

- 공시동물: 34 주령 갈색 Hyline 192수(3처리X4반복X16수/반복)
- 사양시험기간: 60일
- 처리구: 대두박 0%, 대두박 8%, 대두박 16%(시판사료)
- 조사항목
 - 사료 섭취량, 체중, 산란율, 난중, 간무게, 간내 지방함량, 혈액 AST, ALT, 혈액내 isoflavones 함량
 - 혈중 AST, ALT, cholesterol 함량 - 시판되는 분석 kit (Wako Pure Chemicals Co.)를 사용하여 spectrophotometer 방식으로 측정하였다.
 - 혈중 isoflavones 함량 - King 등(1996)의 방법에 의해 electron chemical detector을 이용하여 HPLC 로 측정하였다. IF 측정을 위한 HPLC의 분석 조건은 Table 1 과 같다.
 - 간 총지방함량 - Folch 방법 (1957)에 의해 chloroform 과 methanol (2:1) 용액으로 지방을 추출후 증량법에 의해 측정하였다.
 - 간 중성지방 함량 - Neri 와 Frings (1973) 방법에 의해 isopropanol로 추출 후에 spectrophotometer로 405 nm에서 측정하였다.

- 간 cholesterol 함량 - Folch 방법 (1957)에 의해 간의 총지방을 추출한 후 혈 중 cholesterol 과 같은 방법으로 분석 kit (Wako Pure Chemicals Co.) 를 사용하여 측정하였다.

Table 1. HPLC condition for daidzein analysis in plasma

Item	Analytical conditions
Pump	60F , Waters Co. (Milford, MA)
Controller	600 series, Waters Co.
Detector	L-ECD 6A, Shimadzu Co. (Japan)
Injection module	717 plus autosampler, Waters Co., equipped with 200 uL sample loop
Data processing module	Peak simple 202, SRI Instrument (USA)
Column	Mightysil C18, 250 X 4.5 (L XOD, mm), Cica [®] , Kanto Chemical Co. (Tokyo, Japan)
Column temperature	30°C
Mobile phase	Methanol/0.1 M ammonium acetate (pH 6.0)/25 mM EDTA = 40/50/1
Flow rate	1 ml/min
Electrode potential	0.75 V

- 사료배합 : 대두박의 함량이 감소함에 따라 동일한 CP 및 에너지 공급을 위해 isoflavone의 함량이 매우 적은 것으로 조사된 corn gluten meal, cotton seed meal 및 rape seed meal로 대체하여 배합함 (Table 2)

Table 2. Dietary formulations for layer

Ingredients	SBM 0%	SBM 8%	SBM 16%
Corn, large size, China	26.000	26.000	26.000
Corn, medium size, China	18.766	21.943	21.872
Corn, small size, China	3.000	3.000	3.000
Wheat, soft, large size	8.000	8.000	8.000
Wheat, soft, small size	1.000	1.000	1.000
Corn gluten meal	4.080	3.291	1.034
Corn germ meal	5.000	5.000	5.000
Coconut meal	-	0.294	2.000
Cotton seed meal	10.000	5.000	0.518
Rape seed meal	10.000	5.000	2.000
Soybean meal, domestic	-	8.300	16.600
Limestone	6.594	6.569	6.439
Oyster shell	3.000	3.000	3.000
DCP	0.477	0.608	0.668
Salt	-	0.046	0.170
NaHCO ₃	0.430	0.333	0.166
dl-Met, 100%	0.054	0.067	0.093
Lysine	0.194	0.108	-
Tallow	2.964	2.000	2.000
Vitamin mixture	0.060	0.060	0.060
Mineral mixture	0.130	0.130	0.130
Choline chloride, liquid, 50%	0.050	0.050	0.050
Natuphos, 500G	0.060	0.060	0.060
Kemglo, dry	0.140	0.140	0.140

3. 실험 결과 및 고찰

가. 산란계 사육 성적

9주간 산란계 사육 시험결과 대두박을 채종박과 면실박으로 대치시 사료 섭취량에는 큰 차이가 없었다 (Table 3). 산란율은 실험 전 기간 동안 SBM 16% 처리구가 다른 두 처리구에 비해 통계적으로 더 높았다 ($P<0.05$). 난중역시 대두박을 완전 대치한 SBM 0%처리구가 작은 경향 이었다 ($P<0.05$). 일반적으로 산란계는 나이가 들에 따라 산란율이 떨어지며 더 무거운 계란을 생산한다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에 사용된 사료가 모두 동일 에너지 및 단백질 인 것을 감안하면 난중이 작아진 이유는 채종박과 면실박의 영양평가가 다소 부정확하여 기존에 알려진 data에서 에너지나 단백질 이용성중 하나에 대한 평가문제이거나 항영양인자(aflatoxin 이나 glucosinolate)에 기인된 것으로 생각된다. 또한 이들 잡박류의 첨가량을 한계치이상 첨가하게 됨으로써 나타나는 현상으로, 이는 향후 관련 분야에 대해 추가로 연구해야 할 필요가 있는 부분으로 판단된다. 결국 대두박을 제외한 기타 박류 사료원료의 잘못된 영양평가가 지방간을 발생하는데 대한 의문을 향후에 좀더 자세히 규명해야 할 것으로 여겨진다.

나. 혈액검사 결과

혈액 결과에서 특이한 것은 대두박을 채종박과 면실박으로 완전 대치한 SBM 0%군에서 ALT 과가 다른 처리군 보다 매우 높았다는 점이다 (Table 4, $P<0.05$). 이는 대두박의 완전 대치에 의해 간기능에 문제가 생겼음을 암시한다. 간에 상당한 손상이 발생하면 AST 와 AL수치가 상승한다는 다른 연구자들의 결과는 많이 발표되었다

다. 간의 생화학적 검사

대두박 함량에 의한 간의 지방함량 분석결과는 Table 5에서와 같다. 혈액 분석결과에서 유추한 것과 같이 대두박을 전혀 첨가하지 않은 SBM 0% 처리구는 간의 총지질의 함량이 가장 높았다 ($P<0.05$). TG 역시 총지질 함량과 동일한 경향이었지만

통계적으로 유의적인 차이는 없었다 ($P>0.05$). 간의 cholesterol 함량도 처리구간 차이는 없었다 ($P>0.05$). 이러한 결과는 산란계의 생산성적에서의 차이를 고려할 때 처리구간의 차이가 분명하게 나타나지 않았지만 지방간의 경우 간의 총지질 함량이 7.8% 정도의 수준이면 산란계의 성적에 영향을 나타낼 것으로 여겨진다. 지방간의 판정과 관련하여 산란계에서 간내 지방의 함량수준이 7.8% 수준에 이르면 지방간의 진단할 수 있는 상당한 근거를 제공한 것으로 판단된다.

그러나 산란계에서 대두박의 사용량 감소에 따라 간의 지방함량은 증가하였지만 FLHS의 일반적인 특성인 출혈 반점은 나타나지 않았다. 물론 지방간의 현상이 극심하게 나타난후 발생하는 FLHS의 특성상 본 실험에서는 지방의 축적이 많이 일어나지 않았기 때문에 여겨진다. 하지만 산란계에서 잡박의 사용량 증가에 의한 간에의 부담은 극심했을 것으로 여겨지는데 이는 SBM 0% 와 SBM 8% 처리구에서 간에 사진에서와 같은 이상 조직의 발병율이 각각 70 및 40%에 이른 것을 감안하면 FLHS 현상은 대두박 이외의 잡박의 사용량 증가에 의해서 발생하는 것은 아닌 것으로 판단된다.

Table 3. Performance of laying hens¹

Items	SBM 0%	SBM 8%	SBM 16%
	----- g/day -----		
Feed intake	113.2 ± 6.6	114.7 ± 7.0	113.2 ± 6.0
	---- % ----		
Egg production rate			
1st week	93.08 ± 1.68	93.15 ± 2.87	96.65 ± 4.34
2nd week	90.18 ± 3.18b ²	91.07 ± 4.73ab	95.53 ± 2.82a
3rd week	93.30 ± 2.68	93.16 ± 3.38	95.76 ± 2.86
4th week	91.74 ± 3.04b	93.15 ± 4.22ab	94.87 ± 3.12a
5th week	90.40 ± 2.35	92.26 ± 3.14	91.49 ± 4.12
6th week	88.39 ± 2.82b	90.18 ± 2.68b	95.09 ± 2.78a
7th week	89.73 ± 4.16	91.67 ± 4.58	94.20 ± 3.68
8th week	91.74 ± 3.60b	89.58 ± 2.72b	95.09 ± 2.13a
9th week	87.50 ± 1.72c	90.10 ± 1.81b	96.09 ± 2.71a
All period	90.67 ± 2.12b	91.59 ± 1.64b	94.97 ± 2.72a
	----- g/egg -----		
Egg weight	59.4 ± 0.5a	60.5 ± 0.9ab	62.0 ± 1.2b

¹ Values are means ± SD.

² Means in a row without a common superscript differ, P < 0.05.

Table 4. AST, ALT, total cholesterol and isoflavones content of plasma in laying hens¹

Items	SBM 0%	SBM 8%	SBM 16%
	----- IU/ml -----		
AST	137.50 ± 24.35a ²	107.60 ± 42.59b	104.61 ± 11.29b
ALT	20.55 ± 6.28a	3.28 ± 1.90b	5.53 ± 1.86b
AST/ALT	6.96 ± 1.28b	33.76 ± 10.91a	19.93 ± 4.22a
	----- mg/100 ml -----		
Total cholesterol	127.1 ± 26.7	109.1 ± 16.8	132.8 ± 24.3
	----- ug/100 ml -----		
Daidzein	0.287 ± 0.317c	3.822 ± 1.757b	7.549 ± 1.458a
Glycitein	0.012 ± 0.038c	1.113 ± 0.834b	1.927 ± 0.376a
Genistein	0.297 ± 0.298c	3.266 ± 1.064b	7.760 ± 1.356a

¹. Values are means ± SD.

². Means in a row without a common superscript differ, P < 0.05.

Table 5. Total lipid, TG and cholesterol levels in liver of laying hens¹

Items	SBM 0%	SBM 8%	SBM 16%
Total lipid, %	7.80±1.33a ²	6.48±1.67ab	6.16±0.79b
Triglyceride, mg/g liver	64.31±17.67	53.49±19.13	46.63±9.43
Cholesterol, mg/g liver	2.84±0.21	2.73±0.42	3.04±0.27

¹ Values are means ± SD.

² Means in a row without a common superscript differ, P < 0.05.



Figure 1. Photography of abnormal liver of laying hens (실험 1)

실험 2. 산란계 FLHS 발생 연구를 위한 정제사료 (purified-type diet) 개발

1. 실험목적

지방간이나 FLHS 발생과 원료사료의 상호관련성을 입증하기 위한 수단으로서 정제된 원료를 이용한 산란계 사료의 개발은 필수적인 과정이다. 다만 산란계의 경우 사료급이의 특성상 grain을 선호하기 때문에 정제사료 개발과정중 사료의 섭취량을 일정하게 유지시키는 것이 과거 본 연구실에서 진행된 선행 연구에서 어려움이 있었다. 따라서 지방의 축적을 유도하는 정제사료의 개발은 본 연구 수행에 있어 매우 중요한 과정이다.

2. 재료 및 방법

- 공시동물: 45 주령 갈색 Hyline 20수(4처리X5반복)
- 시험설계: 자유 채식군: 정제사료, 정제사료 + DE (1000 ppm)
강제 급이군: 정제사료, 정제사료 + DE (1000 ppm): 175g/d 강제급이
- 사양시험기간: 3주
- 조사항목: 사료섭취량, 산란율, 난중, 간의 무게, 총지질, cholesterol 함량
혈액과 간의 성분 분석은 실험 1에서와 같다.
- 사료 배합표: glucose, soyprotein concentrate를 위주로 제조한 정제사료
(Table 6)

3. 실험 결과 및 고찰

가. 사양시험 성적

강제 급이군의 경우 사료섭취량이 일반 자유 채식 처리구에 비해 DE를 첨가하지 않은 처리구는 40.3% 와 DE를 첨가한 처리구는 26.8% 더 많았다 (Table 7, $P < 0.05$). 그러나 자유 채식구 간에는 DE의 첨가유무에 따른 사료섭취량에서는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다 ($P > 0.05$). 이것은 DE가 사료섭취량에 별다른

영향을 주지 않음을 의미한다. 또한 강제급이 처리구와 자유 채식 처리구간의 사료 섭취량의 차이는 결과적으로 시험 종료 체중에 영향을 주어 강제급이를 실시한 두 처리구가 자유채식 처리구에 비해 더 체중이 많았다 ($P<0.05$). 간 무게의 경우도 체중의 경우와 비슷한 경향으로 강제급이 처리구가 자유 채식 처리구에 비해 유의하게 더 많았다 ($P<0.05$).

산란계를 위한 정제 사료개발 관점에서 금번 개발한 정제사료는 자유급식 처리구의 결과에서와 같이 산란계의 경제능력을 전혀 손상을 시키지 않았다. 본 연구팀이 개발한 산란계용 정제사료는 추후 타 연구과제의 수행에 있어서 산란계 능력에 미치는 여러 요인의 평가에 있어 현 단계보다 더 정밀한 실험을 요하는 연구과제에 많은 도움을 줄 것으로 여겨진다.

나. 간내 총지질, triglyceride 및 cholesterol 함량

산란계에서 간내 총지질, triglyceride 및 cholesterol 함량은 table 8에서와 같다. 간내 총지질 함량은 DE의 첨가에 의한 영향은 유의적인 차이가 없었다 ($P>0.05$). 하지만 급이 방법간 간내 총지질은 자유채식과 강제급이구 간에 통계적으로 유의하게 강제급이 처리구가 더 많았다 ($P<0.05$). Triglyceride의 경우도 총 지질과 같은 경향이였다. 다만 cholesterol 함량의 경우는 조금 다른 경향이 나타났는데 자유 채식 처리군에서 DE의 첨가에 의해 간의 cholesterol 함량이 유의하게 더 많았다 ($P<0.05$). 또한 강제 급이의 경우도 DE를 첨가했을 경우가 통계적으로 유의하게 무첨가군 보다 cholesterol 함량이 더 많았다. 이는 DE가 간에 cholesterol이 축적되는 과정을 촉진한다는 것을 의미하며, 다만 본 연구에서 실시한 DE 첨가량인 1000 mg/kg 수준이 농장의 상황보다 4-5배 높은 수준이었다. 따라서 일상적인 사양 환경인 200-250 mg/kg 수준의 isoflavone함량도 동일한 영향을 주는지는 좀더 연구해야할 가치가 충분하다. 비정상적으로 높은 isoflavone 함량 상태와 일상적인 사육환경에서의 isoflavone 상태에서 동일한 결과가 나오는지는 시급히 확인실험이 필요하다고 판단된다.

Table 6. Purified diet formulation of Laying hen

Ingredient	Inclusion rate g/kg diet
Glucose	612.1
Soy protein concentrate (70% CP)	210.0
Soy bean oil	10.0
Cellulose	30.0
Calcium phosphate, dibasic	20.0
Calcium carbonate	79.0
NaCl	3.0
DL-Methionine	1.9
Vitamin premix ¹	2.0
Mineral premix ²	30.0
Choline chloride	2.0
Calculated values	
Metabolizable energy, kcal/kg	2980.00
Crude protein, %	14.26
Methionine+Cystine, %	0.60
Methionine, %	0.39
Ca, %	3.52
P, %	0.41

¹. Vitamin premix provided the following in mg/kg or IU/kg diet: thiamin HCl, 20; riboflavin, 10; calcium panthothenate, 30; niacin, 50; pyridoxine HCl, 6; folacin, 4; biotin, 0.6; vitamin B12, 0.04; inositol, 100; para-aminobenzoic acid, 2; ascorbic acid, 250; menadione sodium bisulfite, 2; α -tocopherol acetate (source 500 IU/g), 20; retinyl palmitate (source 1,000,000 IU/g), 5200; cholecalciferol (source 5,000,000 IU/g), 600.

². Mineral premix provided the following in g/kg; CaCO₃, 3; Ca₃(PO₄)₂, 28; MgSO₄·7H₂O, 3.5; KH₂PO₄, 9; MnSO₄·H₂O, 0.650; ZnCO₃ 0.1; ferric citrate, 0.5; CuSO₄·5H₂O, 0.02; Na₂SeO₃, 0.0002; KI, 0.04; CoSO₄·7H₂O, 0.001; H₃BO₃, 0.009; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.009.

Table 7. Performance of Laying hens during experimental period¹

Treatments	Ad libitum	Ad libitum+DE	Forced	Forced + DE
Feed intake, g/day	124.8±10.9b ²	137.1± 6.0b	174.4± 2.1a	173.8± 3.6a
Egg production rate, %	84.8± 7.3	91.3± 4.8	92.1± 5.2	87.4± 6.7
Initial BW, g/b	1954.1±126.4	1948.7±152.1	1968.2±143.1	1953.9±147.2
Final BW, g/b	2089.0±149.0b	2096.6±165.2b	2248.2±132.4a	2290.6±152.6a
Liver weight, g/100g BW	1.84±0.29b	1.87±0.29b	2.20±0.25a	2.32±0.24a

¹ Values are means ± SD.

² Means in a row without a common superscript differ, P < 0.05.

Table 8. Total lipid, triglyceride and cholesterol content in liver of laying hen¹

Treatments	Ad libitum	Ad libitum+DE	Forced	Forced + DE
Total lipid, %	5.60±0.78b ²	6.17±0.66b	19.25±1.34a	21.47±1.69a
Triglyceride, mg/g liver	51.24±5.98b	58.47±5.47b	187.42±15.47a	192.44±15.48a
Cholesterol, mg/g liver	3.04±0.17c	4.29±0.28ab	3.58±0.21bc	4.49±0.20a

¹ Values are means ± SD.

² Means in a row without a common superscript differ, P < 0.05.

실험 3. 강제급이 사양방식에서 산란계에게 daidzein 과 estradiol administration이 간지방 축적에 미치는 영향 비교

1. 실험 목적

산란계에서 DE 급여와 estradiol (E2) 투여가 지방간 발생에 미치는 영향을 비교 하면서, DE의 weak estrogenic effect를 확인하기 위해 실시하였다. 실험 방법상 산란계는 강제급이에 의해 사료를 급여하였다.

2. 재료 및 방법

공시동물: 45주령의 Hyline Brown 계통의 산란계 18수를 사용하였다.

실험설계: 3개의 처리군을 두었고, 한 처리당 6마리씩 배치하였다.

대조군

대조군 + DE (사료에 1,000 ppm 수준으로 첨가)

대조군 + E2 (체중 kg 당 2 mg 수준으로 48시간 간격으로 근육 주사)

(E2는 corn oil에 10 mg/ml 농도로 용해시켰으며, 대조군과 대조군 + DE 실험군도 동일한 양의 corn oil (vehicle)을 근육 주사하여 주었다.)

실험 사료: 실험사료 배합표는 표 9에서와 같다. 단백질 급원으로 SPC, casein, corn gluten, fish meal 네 가지를 혼합해서 사용하였으며, 탄수화물 급원으로 포도당을 사용하였다. 이 사료를 한 마리당 175 g 씩 강제 급여 하였다.

실험 기간: 3 주

조사 항목: 산란율, 증체량, 간 중량, 간 총 지질 함량

간의 총 지질함량 분석 방법은 실험 1에서와 같다.

Table 9. Diet composition for laying hens

Ingredients	%
Glucose	61.11
Soy protein concentrate	2.0
Corn gluten meal	8.0
Fish meal (75%)	4.5
Casein (92%)	5.0
Soy oil	3.0
Cellulose	3.0
Dicalcium phosphate	1.4
Limestone	8.0
NaCl	0.3
DL-methionine	0.19
Lysine-HCl	0.1
Vitamin mixture ¹	0.2
Mineral mixture ¹	3.0
Choline-HCl	0.2
.....	
Nutrient contents, calculated	
AME, kcal/kg	3,150
Crude protein, %	14.9

¹ Scott's Nutrition of the Chicken (4th ed., 2001)

3. 실험 결과 및 고찰

실험 3의 결과는 Table 10 및 Figure 2에서와 같다. 모든 실험군에서 동일한 양 (175 g/day)의 사료를 강제 급여 하였고, 그 결과 실험군 별 증체량도 거의 같은 수준으로 나타났다. 그러나 간의 무게 (체중 %)와 총 지방 함량은 실험 처리에 따라 변했으며, E2 처리군 에서 대조군에 비해 두 가지 항목 모두 유의 ($P < 0.05$)하게 증가하였으며 DE군은 대조군과 E2처리군의 중간 수준이었다.

Figure 2는 세 처리군의 간에서 대표적인 것들을 보여주고 있다. 대조군의 경우 간의 크기와 색깔이 모두 정상 이었고, E2투여군의 간은 간의 크기가 가장 컸으며, 색깔도 지방축적에 의해 황색도가 강했다. 또한 간 표면에 출혈반점이 나타났다. DE 첨가군의 간은 크기와 색깔에서 대조군의 E2 처리군의 중간에 해당되며, 출혈반점이 보이지 않았다.

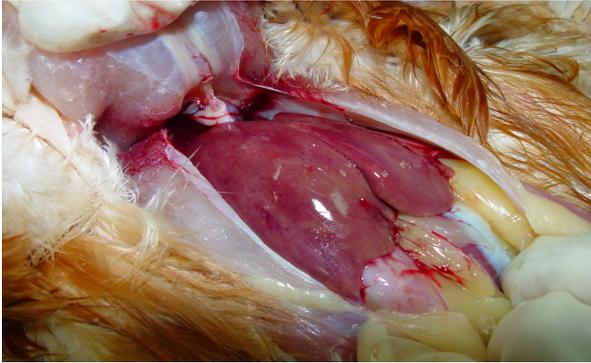
본 실험에서 DE군의 간에서 출혈반점이 나타나지 않았으나, E2군에서도 극히 제한된 숫자의 출혈 반점이 보여서, 이 실험결과만 갖고 DE 섭취와 출혈반점 발생과의 관계에 대한 결론을 내리는 것은 불가능했다. 본 연구에서는 간의 지방축적에 미치는 영향은 E2가 DE에 비해 더 효과적임을 보였으나 E2와 DE 효과 비교에서 DE의 첨가 수준에 따라 dose-effect를 검토하지 않았기 때문에 이 두 가지 성분의 효능에 대해 여전히 결론적인 비교를 하는 것은 불가능하다고 판단된다.

Table 10. Performances, liver weight and liver lipid contents of laying hens

Items	Control	Control + DE	Control + E2
Body weight, g/b			
Initial	2,114 ± 95	2,073 ± 75	2,105 ± 135
Final	2,330 ± 106	2,289 ± 77	2,318 ± 134
BW gain	216 ± 21	215 ± 14	213 ± 13
Feed intake, g/b	175 ± 1.5	175 ± 1.3	175 ± 1.1
Liver weight, g/100 g BW	2.49 ± 0.22a	2.59 ± 0.23ab	2.89 ± 0.23b
Liver total lipid, % fresh wt.	24.3 ± 2.5a	26.4 ± 1.8ab	28.8 ± 2.7b
Egg production, %	74 ± 6	73 ± 5	68 ± 5

Mean ± S.D.

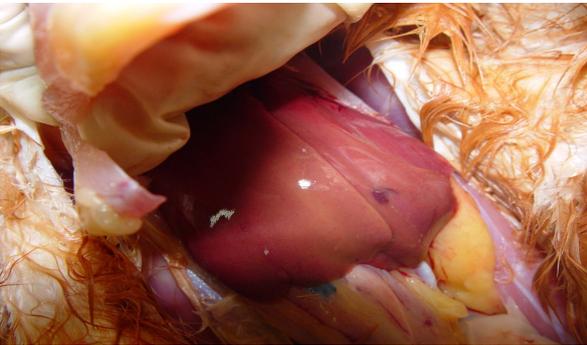
a, b P < 0.05.



Control 군



Control + DE 군



Control + E2 군

Figure 2. DE 및 E2 투여 산란계의 간 사진

실험 4. 병아리에서 사료 성분과 DE의 상호관련, FLHS의 biomarker 확인 및 간 지방축적 기전의 분자생물학적 연구

병아리를 사용하면서 3차례의 실험 (실험 4-1, 4-2 및 4-3)에 의해 사료 단백질 수준과 DE 첨가가 지방간에 미치는 영향의 상호관계를 조사하였고, 이를 통해 FLHS의 조기 진단을 위한 biomarker 평가를 수행하였다. 동시에 DE가 간 지방축적을 증가시키는 기전에 대해 분자생물학적인 조사를 시도하였다.

산란계의 간 지방 축적기전을 좀 더 쉽게 연구하고 개발된 모델을 활용하여 DE의 영향을 조사하기 위해 가급적 빠른 시간 내에 원하는 결과를 도출하고자 병아리를 활용하였다. 사료 단백질함량이 간의 지방함량에 많은 영향을 미치기 때문에 저수준의 단백질 (low protein), 보통 수준의 단백질 (normal protein) 및 고 단백질 (high protein) 수준의 3가지 식이를 급여하면서 간의 지방함량에 미치는 영향을 조사하였다. 1 차 실험은 단백질 수준의 영향, 2 차 실험은 각 단백질수준의 사료에 DE를 첨가하였고, 3차 실험에서는 저 단백질 사료에서 estrogen과 DE 투여의 영향을 비교하였다.

실험 4의 측정 항목 및 측정 방법: 3 실험의 측정 항목이 동일함.

혈중 cholesterol, TG, AST, ALT, 간의 total lipid 및 TG - 실험 1에서와 동일한 방법으로 측정하였음.

간의 malic enzyme 과 isocitrate dehydrogenase activity - Malic enzyme

[L-malate-NADP⁺ oxidoreductase (decarboxylating), E.C. 1.1.1.40, ME] 와 isocitrate dehydrogenase [L-isocitrate-NADP⁺ oxidoreductase

(decarboxylating), E.C. 1.1.1.42, ICDH] 활성도는 실온에서 NADP가 NADPH로 환원되는 속도를 340 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다

(MacDonald, 2002).

Apo-B 100 mRNA 및 fatty acid synthase mRNA 분석 - Total RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 분리하였고, RNA quantity는

spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. cDNA는 Random Primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) 와 SuperScriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 만들었다. 각 gene sequence는 GenBank에서, primer (Table 11)들은 Primer 3 software에서 선택하였다.

각 cDNA는 PCR에서 TakaRa Ex TaqTM (TaKaRa Korea Biomedical Inc., Seoul)로 증폭하였다. 시료는 agarose gel에서 용해후, ethidium bromide로 visualize 시켰다. Band는 Image QuantTMTL (Amersham Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

Table 11. Primers employed for RT-PCR

Gene	Primers (5'-3')	Predicted size
		bp
FAS		282
Left	gagctgcatcttcgtggata	
Right	gctatcaagacagcgggtcaa	
APO-B		320
Left	agctgtacaaggacgcaatg	
Right	tgtgaggcgtgtaaccaagt	
Fructose diphosphatase		284
Left	gcacatgcgttattgtgtca	
Right	acagttgacacctccagcag	
β -Actin		209
Left	gcaagcaggagtacgatgaa	
Right	actgctgctgacacttcac	

실험 4-1. 병아리에서 단백질 수준에 따른 간 지방 축적 영향 비교

1. 실험목적

사료 단백질 수준 (3수준)이 병아리의 간 지방 축적에 미치는 영향을 조사하였다. 동시에 지방산 생합성에 관여하는 효소 활성의 변화, apolipoprotein B 및 fatty acid synthase mRNA expression 등을 측정하였다.

2. 재료 및 방법

공시 동물: 4일령 산란종 Hyline Brown, 수평아리 36수

시험 설계: 사료 단백질 수준을 11% (LP), 22% (NP) 및 44% (HP)의 3 수준으로 하고, 정제된 원료사료를 이용하였다. 각 처리에 3반복을 두고 한 반복에 4마리씩을 배치하였다.

실험 사료: 실험사료 배합표는 Table 12에서와 같다. 실험사료의 에너지 함량은 14.44 MJ/kg 수준으로 전체적으로 isocaloric 하게 만들었다. 모든 사료군에서 dl-methionine, l-arginine 및 glycine을 첨가하여 단백질 중 필수아미노산의 비율 (%)면에서 NRC (1994) 요구량 기준에 맞추었다. 실험사료와 음수는 자유롭게 섭취토록 하였다.

실험 기간: 48 시간

Table 12. Composition of diets containing three different protein levels

(실험 4-1)

Ingredient ¹⁾	Low protein diet	Normal protein diet	High protein diet
	g/kg diet		
Casein	100.0	200.0	400.0
Glucose, monohydrate	762.2	644.7	409.7
Corn oil ²⁾	30.0	30.0	30.0
α-Cellulose	30.0	30.0	30.0
DL-Methionine	2.5	5.0	10.0
L-Arginine	5.0	10.0	20.0
Glycine	10.0	20.0	40.0
Choline chloride	2.0	2.0	2.0
Vitamin premix ³⁾	2.0	2.0	2.0
Mineral premix ⁴⁾	56.3	56.3	56.3
Calculated value			
Crude protein, %	10.95	21.90	43.80
Metabolizable energy, MJ/kg	14.44	14.44	14.44

^{1.} Casein was obtained from NZMP Ltd. (Wellington, New Zealand) and contains 92% crude protein. Glucose and corn oil were from Daesang Company (Seoul, Korea). α-Cellulose was from Sigma chemical. DL-Methionine were from Degussa Company. L-Arginine was from Lancaster (Morecambe, UK). Glycine and choline chloride were form Junsei Chemicals Company (Tokyo, Japan).

^{2.} Corn oil stabilized by adding butylated hydroxy toluene at a level of 0.0125% of added oil.

^{3.} Vitamin premix provided the following in mg/kg or IU/kg diet: thiamin HCl, 20; riboflavin, 10; calcium panthothenate, 30; niacin, 50; pyridoxine HCl, 6; folacin, 4; biotin, 0.6; vitamin B12, 0.04; inositol, 100; para-aminobenzoic acid, 2; ascorbic acid, 250; menadione sodium bisulfite, 2; α-tocopherol acetate (source 500 IU/g), 20; retinyl palmitate (source 1,000,000 IU/g), 5200; cholecalciferol (source 5,000,000 IU/g), 600.

^{4.} Mineral premix provided the following in g/kg: NaCl, 8.8; CaCO₃, 3; Ca₃(PO₄)₂, 28; MgSO₄·7H₂O, 3.5; KH₂PO₄, 9; MnSO₄·H₂O, 0.650; ZnCO₃ 0.1; ferric citrate, 0.5; CuSO₄·5H₂O, 0.02; Na₂SeO₃, 0.0002; KI, 0.04; CoSO₄·7H₂O, 0.001; H₃BO₃, 0.009; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.009.

3. 실험 결과 (실험 4-1)

단백질 수준이 다른 사료를 섭취한 병아리의 증체량, 사료섭취량 및 혈액과 간의 성분 변화는 Table 13 과 Figure 3 및 4 에서와 같다.

Table 13. Growth performance and totalcholesterol, triglyceride, ALT and AST of plasma, total lipid, triglyceride, enzyme activities of liver in chicks fed various levels of protein in experiment 1

	Low protein	Normal protein	High protein
Body weight, g/bird, n = 6			
Initial	61.6 ±0.3	61.2 ± 0.2	60.9 ± 0.3
Final	74.0 ±0.7 ^{ab}	77.3 ± 0.9 ^a	73.1 ± 1.2 ^b
Gain	12.5 ±0.7 ^b	16.2 ± 0.8 ^a	12.2 ± 1.0 ^b
Food intake, g/bird/day, n = 6	13.12 ±0.83 ^a	12.88 ± 0.85 ^a	7.72 ± 0.75 ^b
Food/gain ratio, n = 6	2.11 ±0.04 ^a	1.59 ± 0.04 ^b	1.27 ± 0.05 ^c
Plasma, n = 10 ²⁾			
Triglyceride, mmol/L	7.28 ±0.35 ^a	6.59 ± 0.43 ^a	4.48 ± 0.22 ^b
Cholesterol, mmol/L	4.57 ±0.17 ^a	3.87 ± 0.15 ^b	3.80 ± 0.22 ^b
ALT, IU/mL	3.59 ±0.40 ^a	1.66 ± 0.38 ^b	1.30 ± 0.26 ^b
AST, IU/mL	28.97 ±1.94	22.82 ± 2.01	26.73 ± 0.93
Liver, n = 10 ³⁾			
Total lipid, %	20.76 ±1.48 ^a	9.07 ± 0.50 ^b	4.69 ± 0.21 ^c
Triglyceride, umol/g	238.74 ±14.81 ^a	106.46 ± 4.78 ^b	36.50 ± 4.17 ^c
ME, nmol/min/mg protein	42.05 ±4.25	48.76 ± 5.86	48.77 ± 7.11
ICDH, nmol/min/mg protein	313.49 ±10.04 ^b	376.59 ± 24.44 ^b	510.34 ± 42.19 ^a

^{1.} Values are means ±SEM. Means in a row without a common superscript differ, P < 0.05.

^{2.} ALT: alanine transaminase AST: aspartate transaminase

^{3.} ME: malic enzyme; ICDH: isocitrate dehydrogenase

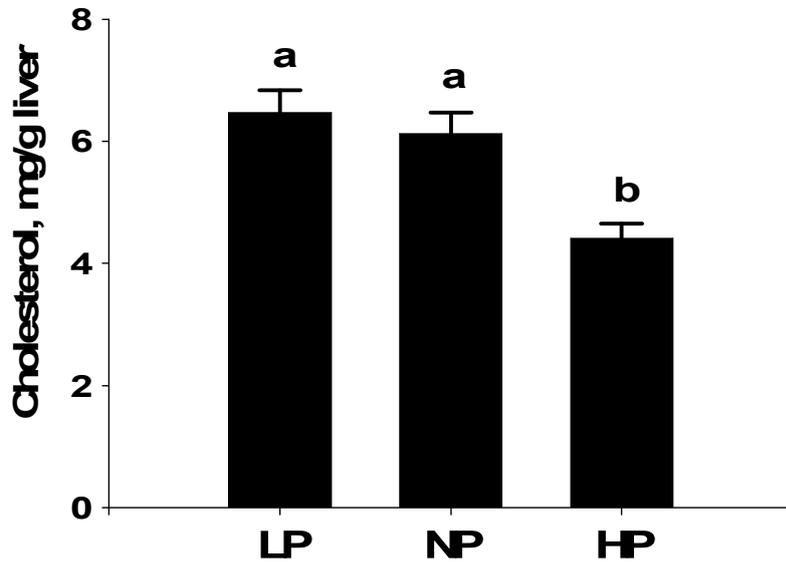


Figure 3. Hepatic cholesterol levels in chicks fed with diets containing 10.95% (LP), 21.9% (NP) and 43.8% (HP) protein for 48 hours. Data are means for n = 5 or 6 chicks and bars represent S.E.M. Different letters indicate a significant difference by Tukey's Studentized Range (HSD) test between treatments ($P < 0.05$).

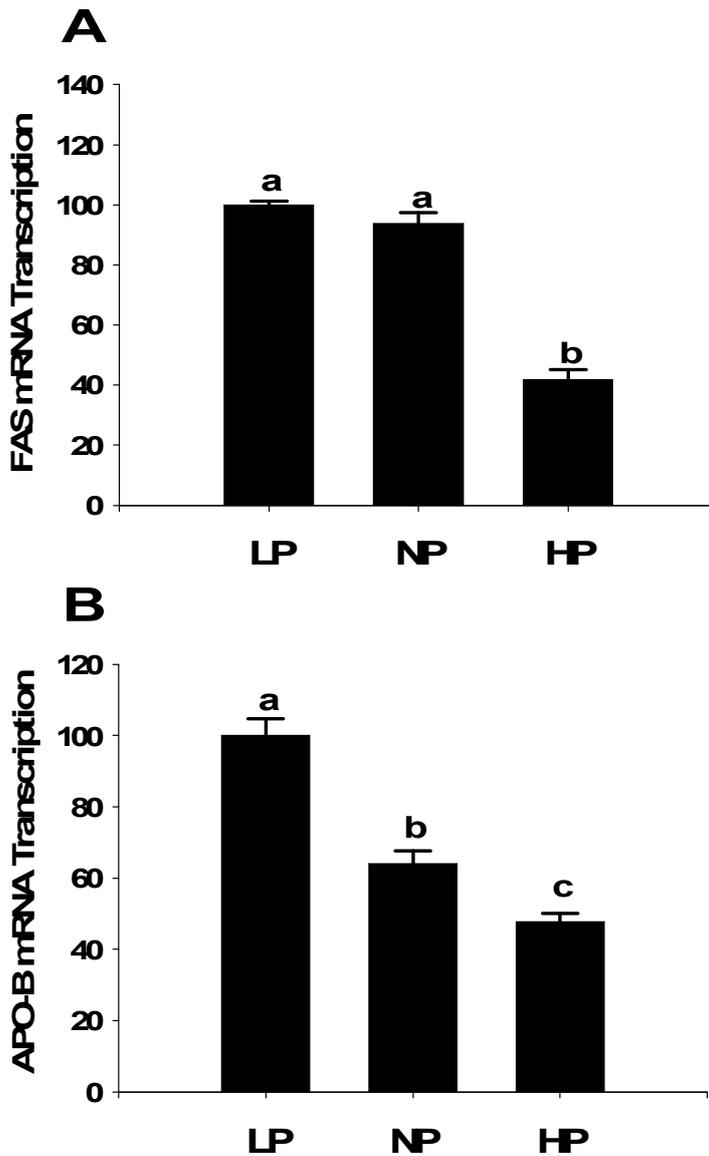


Figure 4. Effects of dietary protein level on transcriptions of FAS (A), and APO-B (B). All data are normalized by the intensity of β -actin band. The levels are the percentage of the LP dietary group (LP = 100). Data are means \pm SEM, n=4. Bars in a panel without a common letter differ, $P < 0.05$.

실험 4-2. 사료단백질 수준과 첨가 DE가 병아리의 간 지방축적에 미치는 영향

1. 실험 목적:

사료 단백질 수준에 따라 첨가한 DE의 간 지방 축적에 미치는 효과가 달라지는지 여부를 확인하기 위함.

2. 재료 및 방법:

실험 동물: 7일령 Hyline Brown 수평아리, 36마리

실험 설계: 6처리 x 6마리, 사료 단백질 3 수준과 DE 첨가/무첨가. 사료의 DE 첨가 수준은 1,000 ppm 임.

Low protein (11% cp) +/- DE

Normal protein (22% cp) +/- DE

High protein (33% cp) +/- DE

실험 사료 및 실험 기간: 실험사료는 실험 4-1에서와 동일하며, 실험사료 급여 기간은 48시간임.

실험 결과의 통계분석: 본 실험 4-2는 단백질 수준 3개와 DE 첨가 수준 2개 (첨가/무첨가)의 3 x 2 factorial 설계로 간주하여 two-way ANOVA로 통계 분석을 시도하였으며, 동시에 6가지 실험 처리로서의 비교를 위해 Tukey's test 에 의해서도 처리 평균간에 비교해 보았다.

3. 실험 결과

사료 단백질 수준에 따른 DE 첨가가 병아리의 증체, 사료섭취량 및 혈액과 간 조직의 성분 변화에 미치는 영향은 Table 14 과 Figure 5 에서와 같다.

Table 14. Growth performance and total cholesterol, triglyceride, ALT, AST and daidzein of plasma, total lipid, triglyceride, enzyme activities of liver in chicks fed various levels of protein with or without daidzein in experiment 2¹

	Low protein	Low protein + DE ²⁾	Normal protein	Normal protein + DE	High protein	High protein + DE	ANOVA ³⁾		
							P. Level	DE	P. Level X DE
Body weight, g/bird, n = 3									
Initial	98.4 ± 0.2	98.9 ± 0.2	98.3 ± 0.5	97.9 ± 0.3	98.6 ± 0.1	98.2 ± 0.4	-	-	-
Final	117.7 ± 2.5	116.2 ± 0.4	120.3 ± 0.6	122.7 ± 0.4	120.9 ± 1.3	118.3 ± 2.4	0.05	NS	NS
Gain	19.32 ± 2.51 ^{ab}	17.32 ± 0.16 ^b	21.95 ± 0.71 ^{ab}	24.80 ± 0.09 ^a	22.33 ± 1.41 ^{ab}	20.07 ± 1.95 ^{ab}	0.05	NS	NS
Food intake, g/bird/day, n = 3	19.4 ± 1.8 ^b	18.6 ± 0.3 ^{ab}	17.2 ± 0.5 ^{abc}	17.1 ± 0.1 ^{abc}	14.9 ± 1.0 ^{bc}	14.0 ± 0.4 ^c	0.01	NS	NS
Food/gain ratio, n = 3	2.02 ± 0.08 ^a	2.14 ± 0.04 ^a	1.57 ± 0.09 ^b	1.38 ± 0.01 ^b	1.33 ± 0.01 ^b	1.42 ± 0.12 ^b	0.01	NS	NS
Plasma, n = 5 ⁴⁾									
Triglyceride, mmol/L	6.80 ± 0.27 ^a	5.68 ± 0.32 ^{ab}	5.98 ± 0.56 ^{ab}	5.59 ± 0.11 ^{ab}	5.49 ± 0.34 ^{ab}	5.05 ± 0.21 ^b	0.05	0.05	NS
Cholesterol, mmol/L	5.07 ± 0.28 ^a	5.32 ± 0.32 ^a	4.29 ± 0.19 ^b	4.28 ± 0.32 ^{ab}	3.65 ± 0.22 ^b	3.79 ± 0.17 ^b	0.01	NS	NS
ALT, IU/mL	1.78 ± 0.34	1.61 ± 0.40	0.75 ± 0.23	1.85 ± 0.18	1.08 ± 0.27	1.07 ± 0.42	NS	NS	NS
AST, IU/mL	30.72 ± 3.28	25.47 ± 1.07	23.65 ± 2.85	23.77 ± 1.56	28.55 ± 2.72	25.57 ± 1.01	NS	NS	NS
Daidzein, nmol/L	28.7 ± 18.7 ^c	722.9 ± 88.0 ^b	15.7 ± 15.7 ^c	707.1 ± 64.2 ^b	21.6 ± 13.6 ^c	1235.4 ± 103.9 ^b	0.01	0.01	0.01
Liver, n = 5 ⁵⁾									
Total lipid, %	7.82 ± 0.53 ^a	7.62 ± 0.30 ^{ab}	5.88 ± 0.69 ^{ab}	5.04 ± 0.63 ^b	5.67 ± 0.54 ^{ab}	5.10 ± 0.40 ^b	0.05	NS	NS
Triglyceride, umoll/g	53.74 ± 4.87 ^a	50.27 ± 2.30 ^a	45.16 ± 7.89 ^{ab}	42.04 ± 8.13 ^{ab}	37.40 ± 3.90 ^{ab}	32.02 ± 2.34 ^b	0.05	NS	NS
ME, nmol/min/mg protein	49.28 ± 7.14 ^{ab}	72.18 ± 8.17 ^a	37.44 ± 10.61 ^b	53.38 ± 6.35 ^{ab}	53.48 ± 3.24 ^{ab}	49.99 ± 4.99 ^{ab}	NS	NS	NS
ICDH, nmol/min/mg protein	230.73 ± 8.28 ^b	209.00 ± 13.56 ^b	350.81 ± 29.34 ^a	273.58 ± 22.25 ^{ab}	347.44 ± 21.41 ^a	280.53 ± 22.19 ^{ab}	0.01	0.01	NS

¹. Values are means ± SEM. Means in a row without a common superscript differ, P < 0.05.

². DE: daidzein. Daidzein was added to each protein level diet at 1000 mg/kg diet.

³. P. Level: dietary protein level. ⁴. ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase. ⁵. ME: malic enzyme; ICDH: isocitrate dehydrogenase

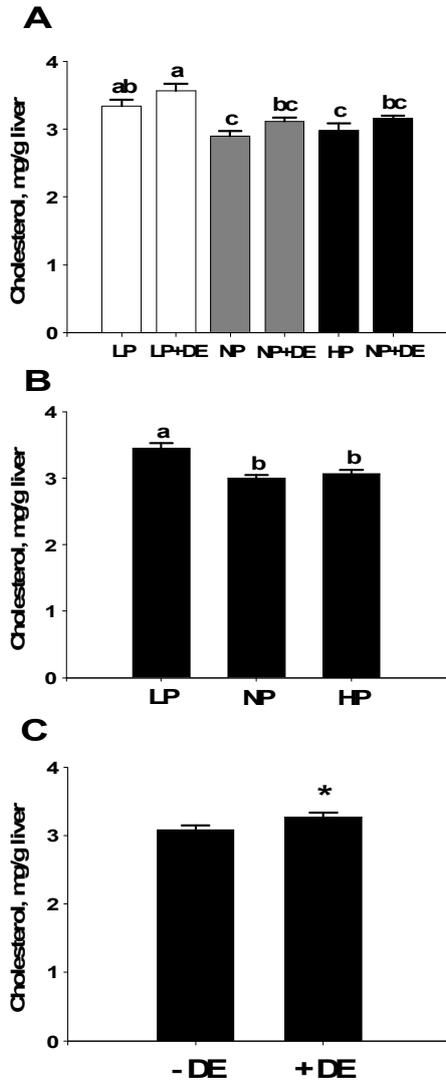


Figure 5. Hepatic cholesterol levels in chicks fed diets containing 10.95% (LP), 21.9% (NP) and 32.85% (HP) protein with or without DE for 48 hours. Data are means for $n = 5$ chicks and bars represent S.E.M. Different letters indicate a significant difference by Tukey's Studentized Range (HSD) test between treatments ($P < 0.05$) (A). Hepatic cholesterol levels with different dietary protein levels. Data are means for $n = 10$ chicks and bars represent S.E.M. Different letters indicate a significant difference by Tukey's Studentized Range (HSD) test between treatments ($P < 0.05$) (B). Hepatic cholesterol levels with or without DE. Data are means for $n = 15$ chicks and bars represent S.E.M. The symbol indicate a significant difference by t-test ($P < 0.05$) (C).

실험 4-3. 저 단백질 사료에서 DE 첨가가 병아리의 간 지방 축적에 미치는 영향

1. 실험 목적

간 지방축적 효과가 가장 높았던 저 단백질 사료에 DE을 첨가하면서 동시에 E2 첨가군과 간 지방축적에 미치는 효과를 비교코자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

실험 동물: 7일령의 Hyline Brown 수평아리, 36 마리

실험 설계: 3개 처리군 x 4반복 x 3 마리/반복

Low protein (11% cp)

LP + DE (1,000 ppm)

LP + E2 (2 mg/kg BW)

Estradio (E2)는 corn oil에 10 mg/ml 기준으로 용해하여 48시간 간격으로 근육 주사하였다. 다른 실험군도 동일한 량의 corn oil을 근육 주사하여 주었다.

실험 기간: 7일간

3. 실험 결과

실험 4-3의 결과는 Table 15 과 Figure 6, 7 및 8에서와 같다.

Table 15. Growth performance and total cholesterol and triglyceride of plasma and total lipid, triglyceride and enzyme activities of liver in chicks fed experimental diets in experiment 4-3¹

	Low protein	Low protein +DE ²	Low protein + E2
Body weight, g/bird, n = 6			
Initial	75.9 ± 1.2	77.0 ± 0.9	77.2 ± 1.0
Final	125.1 ± 1.6	136.2 ± 4.3	138.0 ± 4.1
Gain	49.2 ± 1.3	59.3 ± 4.5	60.8 ± 3.9
Food intake, g/bird/day, n = 6	17.9 ± 0.4	19.1 ± 1.2	18.7 ± 0.6
Food/gain ratio, n = 6	2.56 ± 0.10 ^a	2.28 ± 0.06 ^{ab}	2.18 ± 0.09 ^b
Plasma, n = 5			
Triglyceride, mmol/L	6.61 ± 0.39 ^b	6.69 ± 0.36 ^b	8.37 ± 0.42 ^a
Cholesterol, mmol/L	5.35 ± 0.22 ^{ab}	4.80 ± 0.11 ^b	6.13 ± 0.32 ^a
Liver, n = 4 ³			
Total lipid, %	5.22 ± 0.35 ^b	12.82 ± 1.82 ^a	11.50 ± 1.23 ^a
Triglyceride, umol/g	49.69 ± 5.62 ^b	125.02 ± 19.13 ^a	114.72 ± 11.26 ^a
ME, nmol/min/mg protein	27.24 ± 6.55	25.19 ± 10.93	18.35 ± 5.89
ICDH, nmol/min/mg protein	280.61 ± 12.88 ^a	247.16 ± 13.97 ^{ab}	198.90 ± 16.80 ^b

¹. Values are means ±SEM. Means in a row without a common superscript differ, P < 0.05.

². DE, daidzein; E2, 17β-estradiol

³. ME, malic enzyme; ICDH, isocitrate dehydrogenase

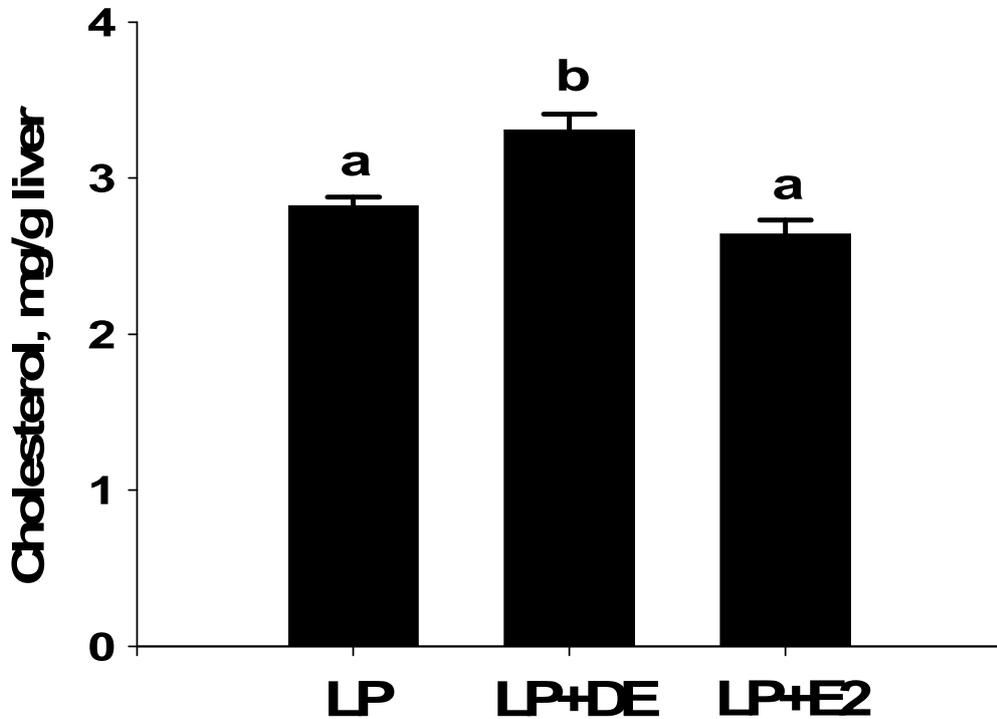


Figure 6. Hepatic cholesterol levels in chicks fed the LP diets with or without DE (1000mg/kg diet) or administration of E2 (2 mg/kg body weight) for 7 days. Data are means for n = 5 or 6 chicks and bars represent S.E.M. Different letters indicate a significant difference by Tukey's Studentized Range (HSD) test between treatments ($P < 0.05$)

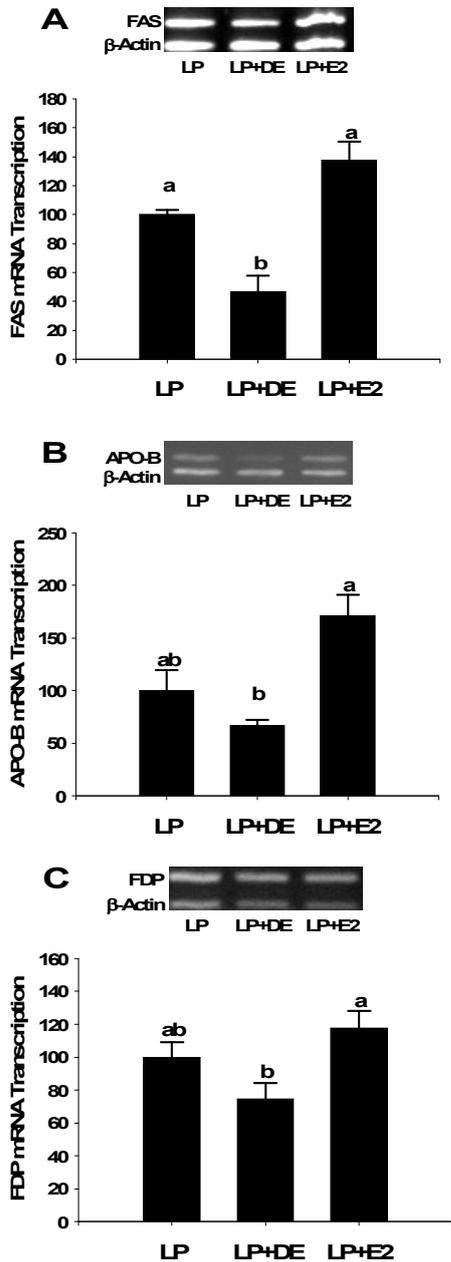


Figure 7. Effects of the administrations of DE and E2 in the LP diet on transcriptions of FAS (A), APO-B (B) and Fructose diphosphatase (C). The upper panel shows a representative photograph stained by ethidium bromide. The levels are the percentage of the LP diet (LP = 100). Data are means±SEM, n=4. Bars in a panel without a common letter differ, $P < 0.05$.

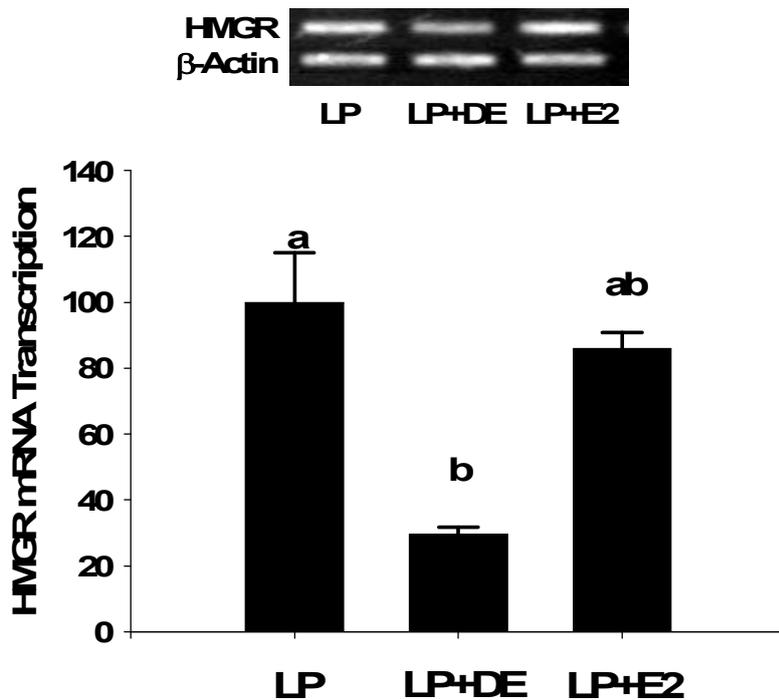


Figure 8. Effects of administrations of DE and E2 on transcription of HMG-CoA reductase mRNA. All data are normalized by the intensity of β -actin band. The levels are the percentage of the LP dietary group (LP = 100). Data are means \pm SEM, n=4. Bars in a panel without a common letter differ, $P < 0.05$.

Table 16. Pearson product moment correlation of chicks in experiment 4

	Liver		Plasma				
	Total lipid	Triglyceride	Triglyceride	Cholesterol	AST	ALT	ALT/AST
Liver							
Total lipid	1.000	0,985	0.767	0.258	0.353	0.912	0.862
P value		0.000	0.016	0.503	0.351	0.000	0.003
Triglyceride		1.000	0.742	0.135	0.244	0.905	0.881
P value			0.022	0.730	0.526	0.001	0.002
Plasma							
Triglyceride			1.000	0.456	0.253	0.680	0.656
P value				0.217	0.511	0.044	0.055
Cholesterol				1.000	0.262	0.321	0.282
P value					0.497	0.399	0.462
AST					1.000	0.365	0.163
P value						0.334	0.675
ALT						1.000	0.975
P value							0.000
ALT/AST							1.000

실험 4의 종합적 결과 및 결론

본 연구 결과 사료내 단백질의 함량은 간의 지방함량에 상당히 많은 영향을 준 것으로 나타났다. LP 처리구의 경우 간의 지방함량이 NP와 HP 처리구에 비해서 통계적으로 유의하게 많았다 (Table 12, $P < 0.05$). 이는 LP 사료 급여는 간의 지방함량을 증가시키게 되므로 isoflavone이 간의 지방함량에 미치는 영향을 좀더 효율적이고 예민하게 검출할 수 있음을 의미한다.

실제로 LP 사료에 DE를 첨가하여 간의 지방함량에 미치는 영향을 E2와 비교한 결과 (실험4-3), DE는 E2와는 달리 FAS와 HMG-CoA mRNA의 수준을 감소시키면서도 TG와 chloesterol의 함량을 증가시켰다 ($P < 0.05$). 결과적으로 DE는 E2와는 전혀 다른 기작을 통해서 간의 지방함량을 증가시키는 것으로 사료된다. 또한 DE는 간접적으로 FAS 및 HMG-CoA mRNA의 expression을 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

또한 본 연구 결과 동물을 희생시키지 않고 간의 지방상태를 예측할 수있는 대표적인 biomarker는 혈중 ALT 수치로 결론을 내릴수 있었다. 또한 간 조직 검사의 경우는 APO-B mRNA expression을 조사하여 가능할 것으로 여겨진다.

저단백질 사료는 어린 병아리에서 매우 급격한 간내 지방을 축적시키는 경향을 보였다. 이는 정상 단백질 함량 (NP) 및 고단백질 함량 (HP) 처리구에 비해 통계적으로 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 저단백질 사료에 의한 간의 지방 축적의 switch on 현상이 나타난다는 것을 의미한다.

혈액내 TG의 함량은 LP=NP>HP 처리구 순으로 고단백질 사료의 혈중 TG 저하 효과가 확인되었다. 혈중 가장 특이한 반응은 ALT activity가 LP 처리구가 가장 높았으며 ALT가 저 단백질에 의한 지방간 발생초기에 검출할 수 있는 유용한 biomarker로 활용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

간에서는 3처리구가 뚜렷한 차이를 나타냈으며 ($p < 0.05$) 특히 ICDH 활성 역시 처리구별로 차이가 매우 컸다 ($p < 0.05$).

간에서의 fatty acid synthase (FAS), HMG-CoA reductase (HMGR) 및 apolipoprotein B (APO-B) mRNA expression을 조사한 결과 사료내 단백질의 함량이 이들 유전자의 발현조절에 많은 영향을 주는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). LP 사료

처리구의 경우 기존 보고 자료에서는 APO-B mRNA expression의 감소가 보고되었지만 본 연구에서는 APO-B mRNA가 오히려 더 많이 발현되는 것으로 보아 혈액내 TG함량이 높았던 것을 충분히 설명할 수 있다고 여겨진다. 또한 FAS의 경우도 저단백질 사료에 의해서 나머지 사료 처리구에 비해 많은 함량을 나타낸 것으로 나타나 이에 대한 충분한 연구가 필요하리라 생각되어 졌다.

실험 4-2는 실험 4-1과 동일한 저단백질, 적정단백질 및 고단백질 사료에 각각 daidzein (DE)을 첨가한 구와 첨가하지 않은 처리구로 나누어 실험하였다. DE의 첨가량은 1000 mg/kg diet 였다. 첨가량의 경우 일반사료에 isoflavone의 함유량이 본 연구실에서의 선행 연구 결과에 의하면 150-250 mg/kg 수준으로 함유되어 있으며 지방간에 대한 DE의 영향을 좀더 빠르고 분명하게 관찰하기 위해서 사료에 첨가하는 수준을 1000 mg/kg으로 결정하였다. 총 실험기간은 실험 4-1과 마찬가지로 2일이었다.

혈액내 TG 와 cholesterol 함량은 사료에 첨가한 DE에 의한 영향보다는 사료내 단백질 함량에 의한 영향이 우세하였다 ($p < 0.05$). 다만 혈액내 DE 함량은 첨가한 DE와 단백질 수준 및 이두 factor간에 interaction이 통계적으로 인정되었다 ($p < 0.05$). 이러한 현상은 HP diet의 사료 섭취량이 LP diet에 비해서 적어 DE 섭취량도 HP+DE 처리구가 LP+DE 처리구에 비해 적지만 혈액내 DE 함량은 HP+DE 처리구가 매우 많았다 ($p < 0.05$). 이런 결과는 아마도 LP+DE 처리구 병아리는 체조직에 지방이 축적되면서 자연적인 지방산화가 많이 발생하여 DE 섭취량이 많음에도 불구하고 많은 양의 DE가 소모되거나 대사됨으로써 본실험의 결과가 나타났을 것으로 판단된다.

간내 지방함량도 1차실험과 유사하게 나타나 DE의 영향보다는 사료내 단백질 수준에 따른 영향을 많이 받은 것으로 생각되었다. 이것은 DE의 영향이 거의 없다가 보다는 짧은 실험기간(48시간)으로 인해 DE의 생리학적 역할이 충분히 나타나지 않은 결과로도 생각되어 결국 LP diet 만을 선택해서 3차 실험을 하게한 주요한 이유였다. 좀더 오랜기간 DE의 섭취에 따른 영향과 estrogen투여의 효과와 직접적인 비교가 필요한 시점으로 판단되어 실험 4-3을 실행하였다.

실험 4-3은 4-1 및 4-2 실험에서 사용한 LP diet를 사용하여 daidzein (DE)을 첨가한 구와 estrogen 투여군을 비교 시험 하였다. 이는 estrogen 효과물질로 알려진

DE의 생리학적 역할을 규명하고자 실험하였다. estradiol이 충분한 효과를 나타내기 위해서는 약 7일 정도의 시험기간이 필요하여 4-3실험은 4-1 및 4-2 실험과 달리 시험기간을 7일로 하였다.

병아리 혈액 성분과 간 지방함량의 상관관계를 조사한 결과는 Table 16에서와 같다. 간의 총지질 함량과 가장 상관 관계가 높은 혈액 성분은 ALT이며 이때 상관계수는 0.912 였고 이는 유의적 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 간의 TG와 혈액 ALT와도 상당히 우수한 상관관계를 나타냈는데 이때는 상관계수가 0.905였고 이때도 유의적인 차이가 인정되었다 ($P < 0.05$). 이 결과는 병아리의 경우 동물의 희생없이 간의 지방축적을 알아낼수 있는 factor로서 ALT의 유용성이 확인된 것으로 볼 수 있다. 또한 ALT/AST 비율도 상당히 높은 상관관계를 보였다.

결론적으로 혈액내 TG의 경우는 DE에 의해 변화가 없었다. 하지만 본 실험에서는 mRNA추출을 위해 희생전 일정시간 절식을 시키지 않았으며 따라서 섭취한 사료에 의한 영향을 많이 받았을 것으로 여겨진다, 따라서 본 연구에서 혈액 내 TG 결과에는 사료로부터 유래한 지방의 영향이 분명 있는 것으로 여겨진다.

실험 5. 국내 산란계 FLHS 발생을 조사

1. 실험목적

본 연구는 국내 산란계의 연령별 지방간 발생 현황 파악하고 산란계 지방간의 발생특성과 physiological 및 biochemical pattern을 조사하며 지방간의 진행 경로추정과 진행 정도의 수치화 및 향후 연구에 필요한 지방간의 규정 및 정의에 대한 판단 자료 확보를 위해서 실시하였다

2. 재료 및 방법

- 일정 규모 이상의 농장을 선택하여 performance 조사
- 산란계 sampling (각 단계별 10 마리, 총 60 마리)
 - 15주-17주: 육성 단계
 - 35주: 산란 peak 직후(산란율 90% 이상)
 - 55주: 산란율 70-80%
- 사육농장에서 수의사에 의한 폐사계 부검
- 체중: 12시간 이상의 절식 후 마리별 체중
혈액 과 간을 채취

3. 실험 결과

1) 산란계 주령별 지방 대사 변화

15주령 산란계와 55주령 산란계의 경우 체중이 55주령의 산란계가 체중이 15주령의 산란계에 비해 2배정도 더 무거웠으며 이에 따라 간의 절대적 무게는 55주령의 산란계가 더 무거운 경향이였다. 그러나 체중 100 g당 간 무게는 오히려 15주령의 산란계가 더 무거웠다 (Table 16).

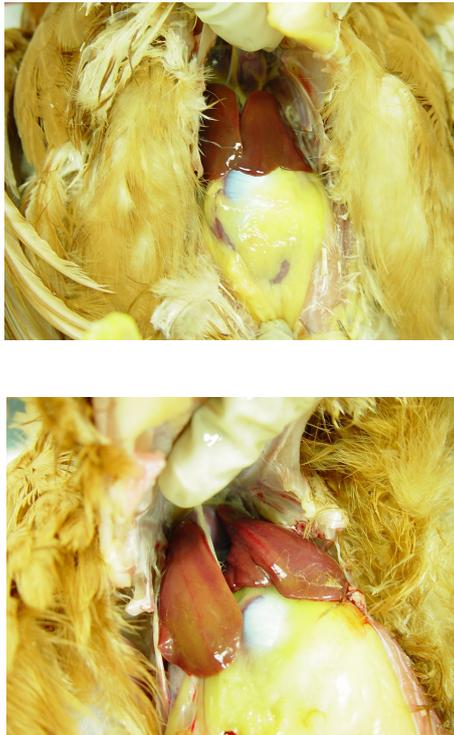


Figure 9. Liver color comparison in laying hens of 15- and 55-week old ages

Table 17. Age, body weight, liver weight and liver weight index of laying hens

Age	Body weight	Liver weight	Liver wt index
weeks	g/bird	g/liver	g/100 g BW
15	1030.4 ± 109.8	20.5 ± 1.2	2.0 ± 0.2
35	1743.8 ± 132.7	25.7 ± 3.2	1.5 ± 0.2
55	2043.9 ± 161.9	27.3 ± 2.7	1.3 ± 0.2

15주령 산란계와 55주령 산란계의 경우 체중이 55주령의 산란계가 체중이 15주령의 산란계에 비해 2배정도 더 무거웠으며 이에따라 간의 절대적 무게는 55주령의 산란계가 더 무거운 경향이였다. 그러나 체중 100 g당 간무게는 오히려 15주령의 산란계가 더 무거웠다. 이러한 경향은 나머지 주령의 산란계를 추가로 더 실험해보면 보다 명확한 추세를 알 수 있을 것으로 생각되지만 육성기때 간의 충분한 발달과 같은 요인도 지방간의 생성 및 간손상 과 어떤 경향을 보여주는 흥미로운 결과라 생각된다.

Table 18. Chromameter analysis of liver color

Age	Lightness	a(Redness)	b(Yellowness)
15	34.2 ± 2.1	9.7 ± 1.8	-0.17 ± 0.71
35	32.3 ± 3.6	13.4 ± 3.5	2.19 ± 1.15
55	31.8 ± 3.8	19.7 ± 4.2	5.50 ± 3.78

Figure 9에서와 같이 두 주령의 산란계 간에서의 색깔차이를 분명히 알 수 있다. 이것을 색채 분석기로 분석해본 결과 lightness는 두 주령간에 별 차이가 없었지만, redness는 55주령이 더 붉은 색을 띠는 것으로 분석되었다 (Table 17). Yellowness는 15주령 산란계 간이 55주령의 간에 비해 매우 낮으며 오히려 파란색 계열의 색채를 띠는 분석결과가 나와 지방간의 발달과정에 따른 색채의 변화도 매우 민감한 분석항목으로 사용이 가능하리라 생각되었다. 이러한 결과는 지방간과 FLHS의 scoring 사진을 작성하는데 과학적인 수치를 바탕으로 작성할 수 있도록 하는 유용한 자료로 판단된다.

혈액 분석결과는 Table 18 에서와 같다. 일반 산란계의 혈액 분석결과 cholesterol은 산란중인 55주령의 산란계가 육성중인 15주령의 산란계에 비해서 매우 낮았다. 이는 계란의 난황에 cholesterol을 지속적으로 공급되나 cholesterol의 합성은 그에 따라가지 못해 혈액에서는 매우 낮은 것으로 생각되었다.

Table 19. Biochemical analysis results of serum in laying hens

Age	Cholesterol	ALT	AST	AST/ALT	γ -GT
weeks	- mg/100 ml -	--- IU/ml ---			- mIU/ml -
15	104.2 \pm 15.6	2.06 \pm 1.54	97.72 \pm 8.99	66.3 \pm 38.6	36.59 \pm 7.63
35	54.7 \pm 5.9	1.27 \pm 0.53	105.49 \pm 10.34	83.1 \pm 39.7	43.41 \pm 7.84
55	57.6 \pm 6.4	1.38 \pm 0.74	116.51 \pm 11.02	111.0 \pm 57.8	45.00 \pm 10.95

혈중 cholesterol 수치가 산란직전에 높은후 산란이 시작되면 오히려 감소하는 경향을 보였는데 이는 계란에 축적되는 cholesterol이 대부분 간에서 생성되는 것으로 알려져 있는 점을 감안하면 간에서도 과도하게 오히려 cholesterol 수치가 낮아져 간의 세포막이 안정하지 못해 지방간이 발생할 가능성도 있는 흥미로운 결과였다.

Cholesterol을 제외한 ALT, AST 및 γ -GT의 경우는 큰 변화는 없어서 지방간을 이들 간기능을 검사하는 혈청학적 임상검사만으로는 감지하기가 상당히 어려울 것으로 여겨졌다. 이들 임상검사 항목은 상당히 지방간이 진행되어야만 인지가 가능하다는 다른 factor를 찾아야하는 본실험이 매우 가치가 있다는 것을 보여주는 결과라 하겠다.

간의 총 지질 함량 분석결과는 Table 19 에서와 같다. 간의 총지질 분석결과는 간의 외형과는 55주령 산란계의 간과는 달리 총 지방함량은 15주령의 간과 비교해서 많지 않았다. 하지만 이 결과는 다른 연구자들의 간에 5% 이상의 지방이 축적되면 지방간으로 보는 견해에 의하면 이미 10마리의 55주령 산란계중 3마리가 이기준을 넘어 심각한 수준을 보인 것으로 판단된다. 반면 15 주령 산란계의 간에서는 5% 이상의 지방이 축적된 개체는 없었으며 다만 육성중의 사양관리 잘못에 의해서도 쉽게 간에 5%이상의 지방이 축적 될 수 있는 가능성을 보여주어 상당히 세심한 관리를 요함을 알수 있다. 간의 지방 함성과 관련된 효소의 activity는 현재 분석중이며 모든 결과를 종합해서 지방간과 FLHS의 발달을 평가해야 할 것으로 판단된다.

Table 19. Total lipid content of liver in laying hens

Age	Total lipid
weeks	- % -
15	4.11 ± 0.41
35	4.85 ± 0.34
55	4.85 ± 0.81

2) 산란계 농장에서 폐사계의 부검 현황

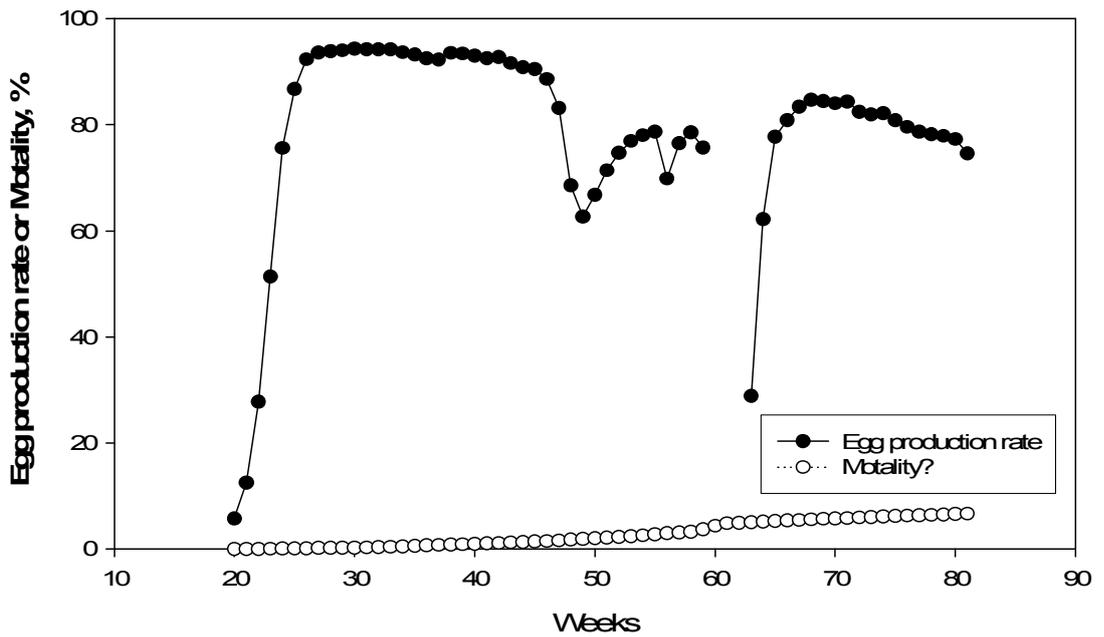


Figure 8. Egg production rate and mortality of laying hens on a commercial farm

참여농장에서 실시한 필드 테스트는 23,000 수를 사용하여 계군이 입추시에서 폐계로 출하시 까지 성적을 조사하였다 (Figure 8). 이계군의 경우 환우를 실시하여 가급적 오랜기간 동안 사양하였으며 환우전까지 826 마리가 폐사하였고 폐사율은 3.59% 였다. 이중 254마리를 수의사가 직접 부검하여 사인을 조사하였다. 폐사계 중에서 출혈성 지방간 현상을 나타낸 폐사계는 전혀 없었다. 그러나 90% 이상의 폐사계는 지방간 현상을 나타내 아직도 지방간이 소모성 질병으로 일반농가에서 상당한 피해를 주는 것으로 파악되었다.

환우 후에는 369수가 폐사하였고 이때의 폐사율은 1.6% 였다. 환우기간 중에는 1.5%의 폐사율을 나타냈다. 환우후에 폐사한 산란계 역시 230수를 수의사와 부검하였으며 이때도 출혈성 지방간 현상은 나타나지 않았다. 또한 지방간 소견을 보인 폐사계는 95%에 달하여 환우전보다 더 높은 경향을 보였다.

국내 일반농장에서 출혈성 지방간의 출현율이 보고된 바가 없는것 같다. 이는 국내에서 지방간이 발생하지 않는 다는 것이 아니라 일반 지방간과 구별을 하고 있지 않기 때문이다. 이 계군은 이사브라운 계열의 계군이며 무창계사용 사료로 사양하고 있었다.

본 연구의 조사에서는 출혈성 지방간이 발견되지 않았지만 이것 역시 국내 상황을 대표하는 것은 못된다. 본조사 농장의 관리상태는 환우전 까지의 폐사율이 3.6% 일 정도로 매우 좋은 여건 이었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

구 분	연구 개발 목 표	연구개발 내용 및 범위	달성도
1차년도 (2002.10. ~ 2003.9.)	산란계 FLHS 발생 연구를 위한 모델 개발 및 biomarker 후보성분 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 산란계의 FLHS 발생을 조사 <ul style="list-style-type: none"> · 사육조건별, 환경별, 품종별 및 주령별 발생율 및 발생특성 조사 및 주발생요인 추정 · FLHS score 기준 완성 · 향후 연구를 위한 기초자료 획득 - 산란계용 purified type diet개발에 의한 비교수단 확보 <ul style="list-style-type: none"> · 실험용 산란계 purified type diet 개발 · 원료 및 구성성분에 적합한 연구용 diet 제조 · FLHS 모델 개발을 위한 diet 및 급여 방법 - FLHS 발생유도 및 조기 발병 감지를 위한 biomarker후보 성분 탐색 <ul style="list-style-type: none"> · 혈액과 간의 biomarker 후보 성분 활용도조사 	100 80 100 100 100 100 100
2차년도 (2003.10. ~ 2004.9.)	사료 원료별, 구성성분 별 영향 비교 및 biomarker 효용 성 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 국내산란계의 FLHS 발생을 조사(계속) - 사료 원료별, 구성성분별 FLHS 발생에 미치는 영향 비교 <ul style="list-style-type: none"> · purified diet를 활용한 원료사료의 영향 평가 · 에너지 및 단백질의 고저에 따른 FLHS 발생 비교 - Biomarker 후보 성분의 탐색(계속) <ul style="list-style-type: none"> · FLHS의 발생의 조기 검출을 위한 biomarker 개발 	100 100 100 100 100
3차년도 (2004.10. ~ 2005.9.)	본 연구 결과 확인실증 실험	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 산란계의 FLHS 발생을 조사(계속) - FLHS 발생기전 연구(계속) - 연구결과 확인을 위한 비교 사양시험 실시 · Biomarker 효용성 검증 및 연구 결과 확인 	100 100 100

제 2 절 관련분야의 기여도

최근 사양규모의 대규모화에 의한 사양환경의 급격한 변화로 산란계 농가에서 지방간 발생이 급증하여 피해를 호소하고 있다. 하지만 발생원인이 복잡하여 연구가 실패되고 있지 않다. 따라서 본 연구는 사료내 isoflavone에 의한 지방간 발생여부와 그 특성을 조사하고 출혈성 지방간과의 관련 여부를 조사하고자 실시하였다. 그러나 사양과는 달리 갈색종을 사육하는 여건에서 출혈성 지방간의 발생은 확인하지 못하였다. 하지만 결국 출혈성 지방간도 지방간의 진행된 형태로 보았을 때 지방간의 발생원인을 파악하고 예방에 주력하고자 실시한 본 연구는 산란계의 지방간 연구에서 많은 자료를 제공하고 기초 data를 관련 업계에 전달함으로써 상당한 파급효과가 있으리라 예상된다

제 5 장 연구결과의 활용계획

국제 학술지 발표 2건 확정 (AJAS 2006 vol 1, 2006)

관련업계와 학계에 학술지 발표를 통해 본 연구에서 획득한 자료를 소상히 전달하고 발표회를 통해서 성과의 확산을 꾀할 것임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

해당 없음

제 7 장 인 용 문 헌

- Akiba Y, Jensen LS, Barb CR, Kraeling RR. 1982. Plasma estradiol, thyroid hormones, and liver lipid content in laying hens fed different isocaloric diets. *J Nutrition* 112:299-308.
- Barnes S, Coward L, Kirk M. 1996. The Isoflavone Genistein: A Good Reason for Eating Soy. In *Hypernutritious Foods* (ed. Finley JW, Armstrong DJ, Nagy S, Robinson SF), pp.141-159. Agscience, Inc. Auburndale, Florida.
- Branton SL, Lott BD, Maslin WR, Day EJ. 1995. Fatty liver hemorrhagic syndrome observed in commercial layers fed diets containing chelated minerals. *Avian Diseases* 39:631-635.
- Kouba M, Catheline D, Leclercq B. 1992. Lipogenesis in turkeys and chickens: a study of body composition and liver lipogenic enzyme activities. *Br Poult Sci* 33:1003-1014.
- Kudzman DJ, Swaney JB, Ellis EN. 1979. Effects of estrogen administration on the lipoproteins and apoproteins of the chicken. *Biochim Biophys Acta* 572:257-268.
- Leeson S, Summers JD. 1991. *Commercial Poultry Nutrition*. University Books.
- Pageaux JF, Joulain C, Fayard JM, Lagarde M, Laugier C. 1992. Changes in fatty acid composition of plasma and oviduct lipids during sexual-maturation of Japanese quail. *Lipids*. 27:518-525.
- Pearce J. 1977. Comparative aspects of lipid metabolism in avian species. *Biochem. Soc. Trans.* 8:295-252.
- Pearce J, Johnson AH. 1986. Failure of oestradiol administration to induce fatty liver haemorrhagic syndrome in the laying hen. *Br Poult Sci* 27:41-47.
- Polin D, Wolford JH. 1977. Role of estrogen as a cause of fatty liver hemorrhagic syndrome. *J Nutrition* 107:873-886.
- Wilson SB, Back DW, Morris SM, Swierczynski J, Goodridge AG. 1986. Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in

culture. J Biol Chem 261:15179-15182.

Yu JYL, Marquardt RR. 1973. Effects of estradiol and testosterone on the immature female chicken (*Gallus Domesticus*)- 1. Quantitative changes in nucleic acid, proteins and lipids in the liver.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.