

# Ibaraki virus가 着床前 마우스受精卵의 生存성에 미치는 影響

金 容 浚·趙 忠 鎬

서울대학교 수의과대학

(1989. 2. 20 접수)

## Effects of ibaraki virus on viability of preimplantation mouse embryos

Yong-jun Kim, Choong-ho Jo

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received Feb 20, 1989)

**Abstract:** To study the effects of ibaraki virus on preimplantation mouse embryos collected from prepubertal ICR and BALB/cByJ mice (30~40days old) by superovulation, zona pellucida-intact(ZPI) or free(ZPF) embryos(n=774) of 4- to 8-cell and morulae were exposed to  $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub> of the virus up to 96 hours. The embryos were examined morphologically by observing the degeneration and hatching rates, and virologically and immunologically by determining the presence of infection with the virus, in addition, the effect of washing the embryos to remove virus possibly attached to was also investigated.

The ZPI 4- to 8-cell embryos and morulae exposed to the virus showed considerably higher degeneration rate than those not exposed, for 96, and for 72 to 96 hours, respectively( $p<0.01$ ).

The ZPF 4- to 8-cell embryos and morulae exposed to the virus showed considerably higher degeneration rates than those not exposed, throughout the whole culture hours *in vitro* ( $p<0.01$ ).

The ZPI 4- to 8-cell embryos and morulae not exposed to the virus showed considerably higher rates of hatched blastocyst than those exposed ( $p<0.01$ ).

The virus infection rates of the ZPF 4- to 8-cell embryos and morulae were significantly higher than those of the ZPI embryos according to cell culture system.

The viral antigen was detected exclusively on the zona pellucida of ZPI embryos, while the antigen was evenly distributed in the blastomeres of ZPF embryos by the immunofluorescent assay.

In the ZPI embryos exposed to ibaraki virus, the virus was detected in the two times-washing groups, but not in the ten times-washing groups.

The results indicated that zona pellucida of murine embryos would provide an effective protection and that ten times-washing of the ZPI embryos previously exposed to the virus was effective to remove virus from the embryos.

**Key words:** Ibaraki virus, preimplantation, mouse, embryo.

### 緒 論

家畜의 繁殖效率에 있어서 가장 큰 沮害要因이 될 수 있는 受精卵의 着床前 死滅은 현재까지 그 원인이

뚜렷하게 밝혀지지 않고 있으므로 獸醫·畜産分野에 있어서 규명되어야 할 가장 큰 課題中の 하나라고 생각된다.

Boyd<sup>1</sup>는 受精卵의 死滅을 일으키는 여러가지 원인

중 細菌 및 原蟲에 의한 受精卵의 死滅은 소에서 *Trichomonas fetus*와 *Campylobacter fetus*, 돼지에서 *Leptospira canicola*의 감염에 의한다고 하였고, 바이러스에 의한 감염으로서는 돼지에서 african swine fever virus(ASFV), 말에서 equine rhinopneumonitis virus(ERV)에 의한 受精卵의 死滅과 流産이 일어난다고 하였다.

受精卵移植術은 家畜의 優秀한 遺傳形質을 널리 普及할 수 있다는 점에서 근래 脚光을 받고 있는 尖端畜産技術이라 할 수 있으나, 家畜傳染病의 전염 위험성이 배제되지 못하고 있다.

受精卵移植을 통해 傳染危險性이 있는 가축질병으로 Parez<sup>2</sup>는 소에서 bovine viral diarrhea (BVD)와 infectious bovine rhinotracheitis(IBR)을 지적하였다. Singh과 Hare<sup>3</sup>는 受精卵移植과 관련하여 소에서 bovine viral diarrhea virus(BVDV), bluetongue virus (BTV), infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV), bovine leukemia virus(BLV), foot and mouth disease virus(FMDV), akabane virus(AV)등 그리고 돼지에서 ASFV, porcine parvovirus(PPV), pseudorabies virus(PrV), swine vesicular disease virus(SVDV)의 傳染可能性 與否에 대하여 보고한 바 있다.

Hare<sup>4</sup>는 受精卵移植에 의해 소에서 BVDV에 감염된 두 건의 사실을 보고하였고, Gilbert et al<sup>5</sup>은 또한 양에서의 BTV감염 사실을 보고하였다.

Eaglesome et al<sup>6</sup> 그리고 Singh과 Hare<sup>3</sup> 및 Shelton<sup>7</sup>은 受精卵이 바이러스를 비롯한 傳染原에 의해 감염되는 방법으로서 受精時 傳染原이 精子 또는 卵子內로 侵入하거나 또는 精子의 표면에 존재함으로써 兩配偶者를 통하여 감염이 일어나는 방법과, 發育中인 受精卵이 母體의 生殖器官內에서 傳染原에 오염된 卵管, 子宮, 또는 精液中에 노출됨으로써 감염이 일어나는 방법이 있다고 보고한 바 있다.

生體實驗을 통하여 發育中인 受精卵에 대한 바이러스 감염을 보고한 연구들로서, Archald et al<sup>8</sup>은 BVDV를 소의 子宮內에 주입했을 때, 對照子宮角으로부터 採卵된 受精卵은 정상적인 발달을 보인 반면 바이러스가 주입된 子宮角의 受精卵은 變性狀態를 보였다고 하였고, 電子顯微鏡에 의해 受精卵內 바이러스 粒子를 확인하였다. Grahn et al<sup>9</sup>은 BVDV를 소의 子宮內 주입 후 바이러스가 處理된 群에서는 受精된 受精卵 수의 감소가 있었고 孵化胚盤胞期 受精卵 울도 감소되었다고 하였다.

한편, 體外實驗을 통하여 發育中인 受精卵에 대한

바이러스 감염을 보고한 연구들로서는, Bowen et al<sup>10</sup>은 着床前 마우스 受精卵과 牛受精卵을 透明帶를 除去하여 BTV에 노출시켰을 때, 兩受精卵들이 바이러스에 감염된 사실을 細胞培養法과 螢光抗體法을 이용하여 증명하였다. Bowen et al<sup>11</sup>은 孵化胚盤胞期 牛受精卵을 IBRV에 노출시켰을 때 受精卵에 바이러스 감염이 일어나 受精卵이 死滅되었고, 바이러스가 受精卵細胞內 증식된 사실을 電子顯微鏡과 細胞培養法으로 증명하였다. Bielanski et al<sup>12</sup>은 牛受精卵을 透明帶를 除去하여 IBRV와 BVDV에 노출시켰을 때 IBRV에 노출된 受精卵은 對照群의 受精卵보다 유의성있게 낮은 生存率을 보였다고 하였다.

Gwatkin과 Auerbach<sup>12</sup>은 마우스 受精卵을 meningo-encephalitis virus(MEV)에 노출시켰을 때, 바이러스가 2細胞期 受精卵內에서 증식된 사실을 밝혔으며, Baranska et al<sup>12</sup>은 透明帶를 除去한 마우스 受精卵을 腫瘍을 일으키는 simian virus 40(SV40) 또는 moloney sarcoma virus(MSV)에 노출시켰을 때, 受精卵으로부터 바이러스를 細胞培養法으로 증명하였다.

이상과 같은 연구들에서 볼때, 受精卵의 死滅은 繁殖障礙 특히 流・死産 및 畸形등을 發生시키는 바이러스가 한 원인이 된다고 생각할 수 있다.

따라서 著者는 産業動物인 소에 있어서 流産 및 死産을 일으키는 bluetongue virus가 마우스 受精卵을 감염시킨 사실에 기초하여 bluetongue virus와 유사한 바이러스로 알려진 ibaraki virus도 마우스 受精卵의 生存性에 어떠한 영향을 미칠 수도 있다는 假定하에, ibaraki virus가 着床前 마우스 受精卵에 미치는 영향을 조사하여 受精卵에 대한 바이러스의 감염여부를 규명함으로써 ibaraki virus 감염이 受精卵의 早期死滅의 한 원인이 될 수 있다는 사실을 확인하여 産業動物에 있어서 繁殖效率을 높이는 데 대한 기초적인 研究資料를 제시하고자 마우스에서의 본 實驗을 시도하였다.

## 材料 및 方法

供試動物: 이 실험에 사용된 마우스는 생후 6주령의 ICR 및 BALB/c ByJ 系 미성숙 마우스로서 사육실은 오전 7시 30분에 點燈하고 오후 9시 30분에 消燈하여 명암을 조절하였다.

사료는 마우스·랫트 研究檢定用 固型飼料(삼양사료)로서 자유급식시켰으며, 물도 자유급수시켰다.

過排卵 處理: 過排卵을 유기하기 위하여 오후 4시에 pregnant mare serum gonadotrophin(PMSG) 5I.U.를 마우스 腹腔內 주사하였고, 48시간후 human chorionic gonadotrophin(HCG) 5I.U.를 복강내 주사하

었다.

HCG 투여 후 즉시 同系의 雌雄 한쌍을 한케이지내에 넣어 하룻밤 동거시키고 다음날 體腔形成有無로써 交配與否를 확인하였다.

**受精卵 採取** : 供試 마우스에 HCG 투여 후 평균 66시간과 74시간에 頸椎脫兒法으로 마우스를 죽인 후 子宮, 卵管 및 卵巢를 적출하여 實體顯微鏡을 사용하여 각각 4~8細胞卵과 桑實胚를 채취하였다.

**實驗에 사용될 受精卵**은 實體顯微鏡하에서 50배의 크기로 鏡檢하여 그 형태가 양호하고 생존력이 좋아 보이는 受精卵만을 選定하여 供試하였다.

**受精卵 採取 및 選定시 사용된 培養液**은 fetal calf serum(FCS)을 10%로 첨가한 M<sub>2</sub> 培地<sup>30</sup>였으며, 受精卵을 體外培養할 때의 培養液은 M<sub>2</sub> 培地에 FCS를 15%로 첨가하여 사용하였다.

**透明帶 除去** : 體外培養前 일부 受精卵을 0.5% pronase로 37°C에서 약 10분간 處理하여<sup>30</sup> 透明帶를 除去한 후 M<sub>2</sub> 培地로 washing하여 實驗에 사용하였다.

**實驗群 設定** : 實驗群은 표1과 같이 4~8細胞卵과 桑實胚를 각각 透明帶가 있는 군(zona pellucida-intact, ZPI)과 透明帶를 除去한 군(zona pellucida-free, ZPF)으로 구별하였고, 이를 다시 각각 바이러스 處理群(ZPI+V, ZPF+V)과 對照群으로서 바이러스 非處理群(ZPI-V, ZPF-V)으로 구별하여 설정하였다.

**바이러스 處理** : 이 實驗에 供試된 바이러스는 家畜衛生研究所에 보관되어 온 ibaraki virus(No. 2 strain)를 Mardin-Darby bovine kidney(MDBK) cell line에 3~4회 繼代하여 증식시킨 stock virus로 그 力價는 10<sup>7.5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml이었다. MDBK세포 및 바이러스 培養에 사용된 培地는 minimum essential medium (MEM, Gibco)에 0.75% NaHCO<sub>3</sub>, 0.025% lactalb-

umin hydrolysate, 10% FCS 및 항생제가 첨가된 완전 培地였다.

바이러스 處理 및 受精卵의 培養을 위하여는 60×15 mm petri dish내 9개의 40μl 培地 droplet을 만들었으며, 이때 각 droplet은 바이러스 處理群의 경우 20μl 受精卵 培養液+20μl stock virus 액, 對照群의 경우 20μl 受精卵 培養液+20μl 바이러스 증식용 培養液으로 조성되었다.

**受精卵 培養** : Droplet을 만든 후 petri dish는 즉시 light paraffin oil로 도포하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣고 37°C에서 2~3시간 동안 CO<sub>2</sub> 평형을 시키고 나서 受精卵을 droplet내 한개씩 넣어 37°C로 조정된 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 96시간까지 培養하였다. 培養을 除外한 受精卵의 모든 처리작업은 clean bench내 實體顯微鏡하에서 실시하였다.

**受精卵 變性率** : 受精卵을 96시간까지 培養하는 동안 24시간마다 週期的으로 受精卵을 倒立顯微鏡하에서 100배, 200배로 鏡檢하였고, 受精卵의 發達過程과 形態變化를 보아 實驗群間 變性率을 비교하였다.

**受精卵의 形態變化**는 Hafez<sup>13</sup>의 受精卵評價基準을 응용하여 受精卵을 크게 生存受精卵과 變性受精卵으로 구별하여 判定하였다.

**胚盤胞率 및 孵化胚盤胞率** : 透明帶가 있는 群의 受精卵은 體外培養中 바이러스 處理群 및 對照群間의 胚盤胞率 및 孵化胚盤胞率을 보아 實驗群間의 發育率을 비교하였다.

**바이러스 感染調查** : 體外培養中 바이러스 感染調查를 위해 3시간, 24시간, 48시간의 바이러스 처리시간 별로 受精卵을 배양기에서 꺼내 受精卵 培養用 M<sub>2</sub> 培地로 washing하였다.

washing횟수는 透明帶가 있는 受精卵은 바이러스에 대한 washing의 효과를 알아보기 위하여 2회

Table 1. Experimental design

Embryo stage	Experimental group
4~8 cell	ZPI +V=Zona pellucida-intact embryos exposed to virus
	ZPI -V=Zona pellucida-intact embryos not-exposed to virus
	ZPF +V=Zona pellucida-free embryos exposed to virus
	ZPF -V=Zona pellucida-free embryos not-exposed to virus
Morula	ZPI +V=Zona pellucida-intact embryos exposed to virus
	ZPI -V=Zona pellucida-intact embryos not-exposed to virus
	ZPF +V=Zona pellucida-free embryos exposed to virus
	ZPF -V=Zona pellucida-free embryos not-exposed to virus

washing群과 10회 washing群으로 구별하였고, 透明帶가 제거된 受精卵는 10회 washing하였다.

受精卵를 washing할 때 각 횟수마다 새로운 pasteur pipette을 사용하였으며, 각 횟수의 washing 액은 0.5ml의 정도로서 약 50배의 희석배율이 되게 하였다.

이 실험에 준비된 試料는 受精卵 및 각 횟수의 受精卵 washing액이었다. 시료는 受精卵를 washing한 후 바이러스 感染調査를 위해 즉시 處理되었다.

細胞培養에 의한 조사 : Ibaraki virus의 감염여부를 조사하기 위하여 MDBK cell line을 이용하였다. 즉, microplate 각 well당  $2\sim 5 \times 10^5$  cell/0.1ml의 MDBK cell을 배양한 후 여기에 10진법으로 희석한 가검시료를 well당  $100\mu\text{l}$ 씩 duplicate로 접종한 후  $\text{CO}_2$ 배양기에서 48~72시간을 培養하였다.

바이러스 감염여부는 ibaraki virus에 의한 特異한 細胞變性效果의 유무를 관찰하여 결과를 판정하였다.

間接螢光抗體法에 의한 조사 : 間接螢光抗體檢査는 Johnstone과 Thorpe<sup>14</sup>의 방법을 참고하였다. 培養한 受精卵를 바이러스 處理 시간별로 採取하여 phosphate buffered saline(PBS, pH7.2)에 2~3회 washing한 후 슬라이드상에 乾燥시켰으며, 이어 acetone으로 10분간 固定하였다. 固定된 受精卵는 PBS로 7회 washing한 후 10배로 희석한 bovine anti-ibaraki virus에 45분간 반응시킨 후 PBS로 다시 washing하고, FITC conjugated anti-bovine IgG에 45분간 반응시켰다. 반응이 끝난 슬라이드는 PBS로 7회 washing한 후 PBS-glycerol로 mounting하여 형광현미경으로 관찰하였

다.

結果分析 : 이 實驗에서의 受精卵 變性率, 胚盤胞率 및 孵化胚盤胞率은 F검정 또는 T검정에 의하여 통계 처리되었다.

## 結 果

受精卵의 變性率 : 4~8세포란과 桑實胚를 96시간까지 體外培養했을 때 각 實驗群의 바이러스 處理群과 對照群의 變性率은 표2와 같다.

4~8細胞卵의 變性率 : 培養 24시간, 48시간, 72시간에서의 變性率은, ZPF+V군이 각각  $52.3 \pm 12.7\%$ ,  $65.2 \pm 18.6\%$ ,  $92.9 \pm 12.1\%$ 로서 다른 모든 군에 비하여 현저히 높은 變性率을 보였으나( $p < 0.01$ ), 다른 군간에서는 유의성이 인정되지 않았다.

培養 96시간에서는, ZPI+V군의 變性率은  $86.9 \pm 7.5\%$ , ZPF+V군은  $100.0 \pm 0.0\%$ 로서 서로간의 유의성은 인정되지 않았고, ZPI-V군 및 ZPF-V군과는 각각 현저히 높은 變性率을 나타내었다( $p < 0.01$ ). 한편, ZPF-V군은 ZPI-V군보다 유의성있는 變性率의 차이가 인정되었다( $p < 0.05$ ).

桑實胚의 變性率 : 培養 24시간, 48시간에서의 變性率은 ZPF+V군이 각각  $39.2 \pm 6.0\%$ ,  $58.5 \pm 9.3\%$ 로서 다른 모든 군에 비하여 현저히 높은 變性率을 보였으나( $p < 0.01$ ), 다른 군간에서는 유의성이 인정되지 않았다.

培養 72시간에서는, ZPI+V군과 ZPF+V군은 각각  $68.2 \pm 10.6\%$ ,  $92.6 \pm 8.2\%$ 로서 서로간에는 유의성이 인정되었고( $p < 0.05$ ), ZPI-V군 및 ZPF-V군과는 각

Table 2. Effect of ibaraki virus on degeneration rate of mouse embryos

Embryo stage	Experimental group	No. of embryos	in vitro culture hours			
			24	48	72	96
4~8 cell	ZPI+V	77	$10.4 \pm 4.9^*$	$11.8 \pm 2.8$	$15.8 \pm 8.2$	$8.6.9 \pm 7.5^a$
	ZPI-V	52	$9.7 \pm 2.5$	$11.4 \pm 3.7$	$13.5 \pm 2.6$	$21.8 \pm 5.4$
	ZPF+V	78	$52.3 \pm 12.7^a$	$65.2 \pm 18.6^a$	$92.9 \pm 12.1^a$	$100.0 \pm 0.0^a$
	ZPF-V	55	$12.4 \pm 3.2$	$17.6 \pm 6.3$	$22.7 \pm 8.8$	$39.4 \pm 10.7^b$
Morula	ZPI+V	137	$2.7 \pm 1.3$	$6.2 \pm 4.5$	$68.2 \pm 10.6^a$	$90.7 \pm 18.4^a$
	ZPI-V	101	$2.1 \pm 1.8$	$6.8 \pm 5.4$	$14.8 \pm 5.7$	$27.5 \pm 8.9$
	ZPF+V	168	$39.2 \pm 6.0^a$	$58.5 \pm 9.3^a$	$92.6 \pm 8.2^a$	$100.0 \pm 0.0^a$
	ZPF-V	106	$8.7 \pm 6.4$	$9.6 \pm 6.2$	$22.9 \pm 7.6$	$40.3 \pm 11.1^b$

\* : Mean  $\pm$  SD (%)  
 a :  $p < 0.01$   
 b :  $p < 0.05$

ZPI + V = Zona pellucida-intact embryos exposed to virus  
 ZPI - V = Zona pellucida-intact embryos not-exposed to virus  
 ZPF + V = Zona pellucida-free embryos exposed to virus  
 ZPF - V = Zona pellucida-free embryos not-exposed to virus

각 현저히 높은 變性率을 나타내었다( $p < 0.01$ ).

培養 96시간에서는 ZPI+V군의 變性率은  $90.7 \pm 18.4\%$ , ZPF+V군의 變性率은  $100.0 \pm 0.0\%$ 로서 서로간의 유의성은 인정되지 않았고, ZPI-V군 및 ZPF-V군과는 각각 현저히 높은 變性率을 나타내었다( $p < 0.01$ ). 한편, ZPF-V군은 ZPI-V군보다 유의성있는 變性率의 차이가 인정되었다( $p < 0.05$ ).

透明帶가 있는 受精卵의 發育比較: 透明帶가 있는 4~8細胞卵과 桑實胚에서 바이러스 處理群과 非處理對照群의 胚盤胞 및 孵化胚盤胞로 발육된 率은 표3과 같다.

胚盤胞率: 4~8細胞卵 및 桑實胚는 각각 바이러스 處理群과 非處理群間에 유의성이 인정되지 않았으나, 桑實胚는 4~8細胞卵보다 높은 胚盤胞率을 나타내었다.

孵化胚盤胞率: 4~8細胞卵의 孵化胚盤胞率은, 培養 72시간에서 ZPI+V군과 ZPI-V군간에 유의성이 인정되지 않았으나, 培養 96시간에서는 각각  $20.2 \pm 6.8\%$ ,  $64.2 \pm 5.9\%$ 로 가장 높은 孵化胚盤胞率을 나타내었으며, ZPI-V군이 ZPI+V군보다 현저히 높은 孵化胚盤胞率을 나타내었다( $p < 0.01$ ).

桑實胚의 孵化胚盤胞率은, 培養 48시간에서 ZPI+V군과 ZPI-V군간에 유의성이 인정되지 않았으나, 培養 72시간에서는 각각  $20.3 \pm 12.4\%$ ,  $73.1 \pm 18.1\%$ , 培養 96시간에서는 각각  $21.8 \pm 13.2\%$ ,  $76.8 \pm 19.1\%$ 로 시간이 경과됨에 따라 높은 孵化率을 나타내었고, 培養 72시간 및 96시간 모두에서 ZPI-V군이 ZPI+V군보다 현저히 높은 孵化胚盤胞率을 나타내었다( $p < 0.01$ ).

受精卵에 대한 ibaraki virus의 感染調査: 透明帶가 있는 受精卵과 透明帶를 除去한 受精卵에 ibaraki virus를 感作하고 受精卵을 washing한 후 受精卵의

바이러스 감염여부를 細胞培養法으로 檢정한 결과는 표4와 같다.

透明帶가 있는 군에서, 2회 washing한 4~8세포란 및 實桑胚는 3시간, 24시간 및 48시간의 바이러스 처리시간에서 모든 受精卵으로부터 바이러스가 분리되었다.

10회 washing한 4~8細胞卵은 각 바이러스 처리 시간에서의 모든 受精卵으로부터 바이러스가 검출되지 않았고, 桑實胚는 3시간 및 48시간 處理에서 바이러스가 검출되지 않았으나, 24시간 處理에서는 受精卵 7개중 1개에서 바이러스가 분리되었다.

Table 4. Detection of ibaraki virus in mouse embryos washed after exposure to virus

Embryos	Exposure (hours)	Embryo stage		
		4~8 cell	Morula	
Zona pellucida-intact (ZPI+V)				
Washed	2 times	3	8/8	8/8**
	10 times	24	8/8	6/6
		48	9/9	8/8
		3	0/7	0/9
	24	0/8	1/7	
48	0/8	0/9		
Zona pellucida-free (ZPF+V)				
Washed 10 times	3	3/7	3/7	
	24	3/6	3/5	
	48	4/7	6/7	

\*: Virus detection was performed by cell culture system.

\*\* : No. of virus positive embryos/Total no. of embryos examined.

Table 3. Rate of blastocyst and hatched blastocyst in zona pellucida intact groups

Embryo stage	Group	No. of rate of embryos blastocyst		in vitro culture hours			
				24	48	72	96
4~8 cell	ZPI+V	77	62/77(80.5)*	0	0	$7.7 \pm 6.8^{**}$	$20.2 \pm 6.8$
	ZPI-V	52	43/52(82.6)	0	0	$12.5 \pm 5.9$	$64.2 \pm 5.9^a$
Morula	ZPI+V	137	122/137(89.1)	0	$7.9 \pm 7.5$	$20.3 \pm 12.4$	$21.8 \pm 13.2$
	ZPI-V	101	93/101(92.1)	0	$12.7 \pm 11.6$	$73.1 \pm 18.1^a$	$76.8 \pm 19.1^a$

\*: Blastocyst/total No. of embryos(%), \*\* : Mean  $\pm$  SD(%), a :  $p < 0.01$

ZPI+V=zona pellucida intact embryos with virus.

ZPI-V=zona pellucida intact embryos without virus.

透明帶를 除去한 군에서, 4~8 細胞卵은 3시간 처리에서 受精卵 7개중 3개, 24시간 處理에서 6개중 3개, 48시간 處理에서 7개중 4개의 受精卵으로부터 바이러스가 분리되었고, 桑實胚는 3시간 處理에서 受精卵 7개중 3개, 24시간 處理에서 5개중 3개, 48시간 處理에서 7개중 6개의 受精卵으로부터 바이러스가 분리되었다.

바이러스가 處理되지 않은 4~8細胞卵 및 桑實胚는 ZPI-V 및 ZPF-V군의 모든 受精卵으로부터 바이러스가 검출되지 않았다.

한편, ibaraki virus로 感作된 受精卵 및 非感作 受精卵을 바이러스 노출시간에 따라 각각 培養한 후 間接 螢光抗體法에 의하여 검사한 결과, 透明帶가 있는 바이러스 處理群은 透明帶의 抗原증명이 불가능 하였으나(사진 5), 바이러스 處理群은 透明帶 주변 전체에 걸쳐 바이러스 抗原이 확인되었다(사진 6).

透明帶를 除去한 바이러스 非處理群은 受精卵細胞內의 바이러스 抗原이 증명되지 않았으나(사진 7), 바이러스 處理群은 受精卵 세포내 존재하는 바이러스 抗原을 확인할 수 있었다(사진 8).

## 考 察

이 實驗에서 透明帶가 있는 受精卵은 4~8細胞卵 및 桑實胚 모두 孵化時期前까지는 바이러스 處理群과 非處理對照群間에 變性率의 차이가 인정되지 않았는데, 이 결과는 透明帶가 있는 受精卵을 體外實驗에서 AV,<sup>15</sup> BTV,<sup>15</sup> BVDV,<sup>15,16,17</sup> FMDV,<sup>18,19</sup> IBRV,<sup>16,20</sup> PrV<sup>21</sup>에 노출시켰을 때 受精卵의 發育 및 生存에 어떠한 영향이나 障礙가 나타나지 않았다고 한 여러 연구자들의 보고와 일치되는 것으로 생각된다.

그러나 Gwatkin<sup>22,23</sup>이 透明帶가 있는 마우스 受精卵을 mengoencephalitis virus(MEV)에 노출시켰을 때 受精卵에서 變性이 일어났다고 한 보고는 이 實驗에서의 透明帶가 있는 受精卵에 대한 결과와는 다르다. 이와같은 차이는 MEV가 picornavirus의 하나로서 바이러스중 가장 작은 粒子的 바이러스로 受精卵의 pore를 통한 침입이 가능했던 것으로 Gwatkin은 고찰한 바 있어 orbivirus에 속하는 ibaraki virus에 노출된 본 實驗에서의 결과와 다른 것으로 사료된다.

한편, 透明帶가 있는 4~8細胞卵 및 桑實胚 모두 孵化時期에 바이러스에 처리된 군이 非處理群보다 높은 變性率을 나타냈는데 이 결과는 Wrathall과 Mengeling이 排卵後 32시간에 돼지 受精卵을 採卵하여 5일간 PPV에 노출시켰을 때 PPV가 受精卵의 透明帶에 붙어 있어 受精卵이 孵化된 후 受精卵의 발달에 障礙를

일으킬 위험성이 크다고 하였고, Bowen<sup>11</sup>등이 소 受精卵을 IBRV에 노출시켰을 때 孵化된 受精卵의 變性 및 死滅을 인정할 수 있었고, 이 受精卵들로부터 바이러스 粒자를 電子顯微鏡으로 증명하였다고 하였으며 Stringfellow<sup>24</sup>등은 *Brucella abortus*에 그리고 Kaneene<sup>25</sup>등 및 Thomson<sup>26</sup>등은 *Haemophilus somnus*에 소 受精卵을 각각 노출시켰을 때 孵化된 受精卵에서 變性이 일어났다고 한 결과와 유사한 것으로 생각된다. 이 실험에서 透明帶가 있는 受精卵이 ibaraki virus에 노출될 때 孵化前까지는 바이러스의 영향을 받지 않았던 결과로 보아 孵化時期의 變性은 透明帶가 열려진 상태에서 受精卵細胞가 바이러스에 感染되어 일어난 결과로 사료된다.

哺乳動物 受精卵의 透明帶는 糖蛋白質로 구성되어 있으며,<sup>7,10,13,27</sup> 受精卵이 透明帶로부터 孵化되기까지 受精卵 細胞를 外部環境으로부터 보호하여 發達을 돕고<sup>37</sup> 또한 病原體에 노출된 受精卵을 보호하는 防禦壁으로서의 機能이 있다는 보고문들이 있다.<sup>3,10,15,16,18,20,21,28,29,30-35</sup>

Ibaraki virus에 노출된 4~8細胞卵 및 桑實胚가 透明帶로부터 孵化되기까지 受精卵 變性率에서 바이러스 處理群과 對照群間의 유의성이 인정되지 않은 것은 受精卵의 透明帶가 ibaraki virus의 感染 및 영향으로부터 受精卵을 보호하는 기능이 있는 것으로 생각된다.

이 實驗에서 透明帶를 除去하고 바이러스를 처리한 實驗群은 4~8細胞卵 및 桑實胚 모두 培養 24시간부터 96시간까지 바이러스 處理群이 非處理對照群에 비하여 높은 變性率을 나타내었다. 이와같은 결과는 Gwatkin<sup>23,36</sup>이 透明帶를 除去한 着床前 마우스 受精卵을 MEV에 노출시켰을 때 受精卵의 발달이 정지되거나 또는 受精卵細胞의 壞死와 같은 變性이 있었고, 4細胞卵은 受精卵細胞가 서로의 결합력을 잃고 분리되어 變性된 현상을 보였다고 한 것과, Bowen<sup>10</sup>등이 日齡이 다른 着床前 스 및 마우스 受精卵을 透明帶를 除去하고 BTV에 노출시켰을 때 BTV가 소에서는 桑實胚를, 마우스에서는 2細胞卵과 桑實胚를 모두 感染시켜 受精卵의 細胞變性이 신속히 일어났다고한 보고와 또한 Bielanski 등<sup>16</sup>이 소 受精卵을 透明帶를 除去하거나 透明帶가 있는 상태로 IBRV 또는 BVDV에 노출시킨 후 受精卵의 細胞變性を 보아 生存率을 觀望했을 때 透明帶가 除去된 IBRV에 노출된 受精卵이 對照群에 비해 낮은 生存率을 보였다고 한 결과 및 이밖에 돼지<sup>38</sup> 및 마우스<sup>39,40</sup> 受精卵에 대한 보고들은 이 實驗에서의 성적과 유사한 것으로 여겨진다.

이 實驗에서 ibaraki virus가 受精卵 細胞變性を 일

오킨 결과는 *ibaraki virus*와 유사한 바이러스로 알려진 BTV가 細胞變性を 일으키는 바이러스로 알려져 있고<sup>41,42</sup> 소 및 마우스 受精卵에 대해 變性を 일으켰다는 보고로<sup>10</sup> 보아 *ibaraki virus*도 受精卵에 대해 유사한 變性を 일으킬 수 있는 것으로 생각할 수 있다.

한편, 透明帶가 除去되거나 孵化된 受精卵이 바이러스에 노출되었을 때 受精卵의 變性결과를 볼 수 없었다고 한 사실들<sup>19,43-49</sup>은 이 실험의 결과와 다른데 상기 연구결과 사용된 여러가지 종류의 바이러스로 보아 受精卵細胞의 變性여부는 바이러스 종류에 따라 다를 수 있을 것으로 사료된다.

이 實驗에서 培養 96시간에 4~8細胞卵 및 桑實胚의 ZPF-V군은 ZPI-V군보다 각각 유의성있게 높은 變性率을 나타냈는데, 이 결과는 Konwinski등<sup>50</sup>이 마우스 受精卵를 pronase를 이용하여 透明帶를 除去한 후 體外에서 培養했을 때 透明帶가 除去된 受精卵은 透明帶를 除去하지 않은 受精卵에 비해 현저히 發育이 進行되었다고 한 보고와 비교하여 볼 때, 이 實驗에서 培養 72시간 및 96시간에 桑實胚와 4~8細胞卵이 각각 대부분이 孵化된 결과로 보아, 透明帶가 除去된 受精卵은 透明帶가 있는 受精卵보다 더 빠른 發育을 하여 體外培養이라는 제한된 환경에서 變性率이 더 높게 나타난 것으로 생각된다.

이 實驗에서 桑實胚가 4~8細胞卵보다 胚盤胞率이 높게 나타난 것은 Ziomek<sup>51</sup>이 착상전 마우스 受精卵의 8세포기 때 이루어지는 細胞對稱性은 胚盤胞期때의 營養胚葉과 內部細胞塊를 형성하는 기초가 되므로 受精卵의 發育에 매우 중요하다고 하였고, Eyestone과 First<sup>52</sup>가 소 受精卵에서 8細胞期 發育障礙시기가 있다고 한 연구결과와 비교해 볼 때, 桑實胚 단계에서 體外培養 되는 것이 4~8細胞卵보다 더 높은 發育能力을 보이는 것으로 유추된다.

한편, 이 實驗에서 透明帶가 있는 4~8細胞卵 및 桑實胚는 각각 바이러스 處理群과 非處理群의 胚盤胞率에서 서로 간에 차이가 인정되지 않았는데, 이 결과는 Schachner등<sup>53</sup>이 體外實驗에서 마우스 受精卵를 herpes simplex virus-1에 노출시켰을 때 바이러스 處理群과 非處理群간의 胚盤胞率이 차이가 없었다는 보고 및 Singh등<sup>15</sup>이 소 受精卵를 AV, BTV 또는 BVDV에 노출시켰을 때 바이러스 非處理群의 胚盤胞率의 범위가 77~86%, 바이러스 處理群의 胚盤胞率이 78~86%로 서로간의 차이가 없었다고 한 결과들과 유사한 것으로 사료된다.

그러나 Wrathall과 Mengeling<sup>54</sup>이 生體實驗에서, Gwatkin<sup>56</sup>은 體外實驗에서 각각 돼지와 마우스의 受

精卵을 바이러스에 노출시켰을 때 바이러스 處理群의 胚盤胞率이 非處理群에 비하여 저하되었다고 한 결과는 이 實驗의 결과와 다르나, Gwatkin의 결과는 바이러스가 透明帶를 통과하여 受精卵細胞變性を 일으킨 사실이 증명되었고, Wrathall과 Mengeling의 결과는 生體實驗을 통해 얻어진 것으로 이들은 자궁환경이 오염될 때 受精卵의 發育障礙가 있다고 하여 體外培養에서의 이 實驗의 결과와 다른 것으로 사료된다.

이 實驗에서 孵化胚盤胞率은 바이러스가 처리되지 않은 군에서 4~8細胞卵이 64.2±5.9%, 桑實胚가 76.8±19.1%를 나타냈는데, 이 결과는 Konwinski등<sup>50</sup>이 ICR 마우스의 胚盤胞를 採卵하여 體外培養했을 때 孵化胚盤胞率이 약 65%이었던 성적과 비교할 때 이 實驗에서 桑實胚의 孵化胚盤胞率은 이보다 上廻한 결과로 볼 수 있다.

또한 4~8細胞卵은 培養 96시간에서, 桑實胚는 培養 72시간 및 96시간에 각각 바이러스 非處理群이 處理群보다 孵化胚盤胞率이 높게 나타났는데, 이 결과는 Archbald등<sup>8</sup>, Bolin과 Bolin<sup>38</sup>, Ferm과 Kilham<sup>55</sup> 및 Grahn<sup>9</sup>의 보고에서 바이러스 非處理群에서 處理群보다 孵化胚盤胞率이 높게 나타났다고 한 결과들과 유사한 성적으로 생각된다.

한편, 이 實驗에서 4~8細胞卵과 桑實胚 모두 바이러스 非處理群은 각각 培養 72시간 및 48시간에서의 孵化中胚盤胞가 각각 96시간 및 72시간에서 대부분이 孵化된 반면에, 바이러스 處理群의 孵化中胚盤胞는 계속된 培養時間에서 대부분이 孵化되지 못하고 變性되었다. 이 결과는 Bowen등<sup>10</sup>의 보고에서 BTV에 노출된 소 및 마우스의 胚盤胞는 신속한 變性變化를 보였다고 하여, 바이러스 處理群은 孵化가 開始되면서 透明帶가 열려질 때 透明帶 밖으로 나온 受精卵細胞가 바이러스에 노출됨으로써 신속한 變性이 일어나 완전히 孵化되지 못하게 된 결과로 보여진다.

受精卵의 *ibaraki virus* 감염여부를 조사한 바, 透明帶가 있는 受精卵을 *ibaraki virus*에 3시간, 24시간, 48시간 노출시킨 후 2회 washing한 4~8細胞卵 및 桑實胚의 모든 受精卵으로부터 바이러스가 분리되었다. 이러한 결과는 受精卵을 바이러스에 노출시킨 후 washing하였을 때 2회 washing액에서 높은 농도의 바이러스 역가가 인정되었다고 한 여러 연구자들의 보고<sup>19, 20, 55, 57</sup>와 일치된다.

즉, 바이러스에 感作된 受精卵을 2회정도 washing할 때는 透明帶로부터 바이러스가 충분히 除去되지 않았음을 나타낸 결과로 생각된다.

한편, 透明帶가 있는 受精卵을 동일한 방법으로 바

이러스에 노출시킨 후 24회 washing한 균은 桑實胚의 24시간 處理群중 한 개를 제외한 모든 實驗群의 受精卵으로부터 ibaraki virus가 분리되지 않았으며, 이러한 결과는 透明帶가 있는 受精卵을 높은 力價의 바이러스 및 세균에 노출시킨 후 10 회 반복 washing함으로써 대부분의 바이러스 및 세균을 受精卵으로부터 除去할 수 있었다고 한 여러 연구자들의 보고<sup>10,15,17,18,24,26,30,58</sup>와 일치된다고 생각된다.

그러나 Singh등<sup>56</sup>은 透明帶가 있는 돼지 受精卵을 ASFV에 노출시키고 washing한 후 95%의 受精卵에서 바이러스를 분리할 수 있었다고 하였고, Singh 등<sup>20</sup>이 着床前 소 受精卵을 IBRV에 노출시키고 washing한 후 다시 培養했을 때 受精卵의 57~64%에서 바이러스가 분리되었다고 하였으며, 이러한 결과는 受精卵을 washing한 후에도 透明帶에 바이러스가 존재할 수 있음을 유추하게 되는 결과로 이 實驗에서 桑實胚의 24시간 處理群中 한 개에서 바이러스가 분리된 결과와 연관될 수 있다.

이러한 현상은 感作한 바이러스 力價도 관계되나<sup>56,57,59,60</sup> 바이러스 종류에 따라 특이하게 결합할 수 있는 바이러스의 특성과 관련된다는 보고들<sup>20,21,56,61</sup>도 있다. 또한 돼지 受精卵을 ASFV,<sup>56</sup> FMDV,<sup>19</sup> HCV,<sup>31</sup> PPV,<sup>61,62</sup> PrV,<sup>21,31,61</sup> SVDV,<sup>57</sup> vesicular stomatitis virus<sup>60</sup>와 같은 바이러스에 노출시킨 후 washing 하였을 때 정도의 차이는 있으나 대부분 바이러스가 검출되었다는 결과로 보아 동물의 종류에 따른 感受性的 차이도 인정된다고 볼 수 있다.

이 實驗에 사용된 ibaraki stock virus의 역가가 10<sup>7.5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml의 높은 수준이었던 점에서 washing횟수가 낮을 시는 잔존 바이러스에 의해 受精卵으로부터 바이러스 분리가 가능하였으나 10회정도 충분히 washing한 후엔 受精卵에서 바이러스 검출이 인정되지 않았음은 ibaraki virus가 특이적으로 결합할 수 있는 receptor가 마우스 受精卵의 透明帶에 존재하지 않는 결과라고 생각되며 이 透明帶가 ibaraki virus의 침입을 防禦하는 防禦外皮膜으로 작용할 수 있다고 사료된다.

한편, 透明帶가 除去된 受精卵에 ibaraki virus를 노출시킨 후 10회 washing한 4~8細胞卵과 桑實胚는 細胞培養檢査 결과 바이러스를 感作한 시간의 차이없이 일부 受精卵들이 바이러스에 感染되었다. 이러한 결과는 Bowen<sup>10</sup>등 이 透明帶를 除去한 소의 桑實胚와 胚盤胞, 그리고 마우스의 2細胞卵과 桑實胚를 BTV에 노출시키고 나서 washing하였을 때 소는 桑實胚에서, 마우스는 2細胞卵 및 桑實胚에서 바이러스가 인정되었다는 보고와 일치하였다. 이외에도 Singh등은<sup>19</sup> 孵化된

소 受精卵을 FMDV에 노출시켰을 때, 그리고 Bowen<sup>11</sup> 등은 孵化된 소 受精卵을 IBRV에 노출시켰을 때, Baranska등은<sup>43</sup> 마우스 受精卵을 SV40 또는 MSV에 노출시켰을 때, 또한 Gwatkin<sup>36</sup>, 그리고 Gwatkin과 Auerbach<sup>12</sup>는 透明帶가 除去된 마우스 受精卵을 MEV에 노출시켰을 때, 受精卵 細胞가 바이러스에 感染된 사실을 보고한 바 있다.

이 實驗의 결과로 보아 ibaraki virus는 透明帶가 없는 마우스 受精卵에 感染을 일으켜 受精卵의 變性 및 死滅을 초래하는 것으로 여겨지며, 따라서 정상적인 受精卵의 發育중에는 透明帶가 열려지는 孵化時期에 感染 위험성이 있다고 하겠다.

한편, ibaraki virus에 대하여는 주로 소가 감수성이 있는 동물로 알려져 있어<sup>41,42,63,64,65</sup> 이 바이러스 感染에 의한 소 受精卵의 死滅도 추측할 수 있으며, 이에 대하여는 앞으로 더 자세한 疫學調查와 生體 및 體外에서 受精卵과 바이러스의 상호관계에 대한 체계적인 연구가 요구된다 하겠다.

이 實驗에서 4~8細胞卵 및 桑實胚 모두 ibaraki virus에 感作한 시간이 길수록 感染된 受精卵의 數가 증가하는 경향이 있었는데, 이러한 현상은 受精卵에 대하여 ibaraki virus가 感染되는데 시간이 소요되는 것으로 추측할 수 있으며, Singh등<sup>19</sup> 이 소 및 돼지 受精卵을 FMDV에 2시간 노출시켰을 때의 感染力價가 24시간 또는 48시간 노출시켰을 때보다 낮았다는 보고와 유사한 결과로 생각된다.

한편, 透明帶가 있는 受精卵을 바이러스에 노출시키고 나서 螢光抗體法으로 관찰한 바, 바이러스 처리시간과 관계없이 모든 受精卵의 透明帶 주변으로 많은 바이러스 抗原이 인정되었는데, 이 결과는 Wrathall과 Mengeling<sup>62</sup> 이 1½ 일령의 돼지 受精卵을 體外에서 5일간 PPV에 노출시키고 나서 螢光抗體法으로 검사한 결과 透明帶 표면에 바이러스 抗原이 존재하였다고 한 보고와, Singh등<sup>56</sup> 이 透明帶가 있는 돼지 受精卵을 ASFV에 18~20시간 노출시켰을 때 透明帶에 존재한 바이러스 抗原이 검출되었다는 보고와 유사한 것으로 사료되며, 이와 동시에 受精卵 세포내부에는 바이러스 抗原검출이 불가능하였던 이 實驗의 결과는 透明帶가 病原體의 침입방지에 중요한 역할을 할 것으로 평가할 수 있을 것이다.

이러한 추리는 透明帶가 除去된 受精卵을 ibaraki virus로 처리했을 때 受精卵 細胞內 존재한 바이러스 抗原을 검출할 수 있었던 이 實驗의 결과로 더욱 반증된다고 하겠다. 이러한 결과는 Wrathall과 Mengeling<sup>54</sup> 이 32시간령의 돼지 受精卵을 採卵하여 體外에서 18~



21시간동안 PPV에 노출시킨 후 수란돈에 移植하였고, 그리고 나서 8일후 受精卵를 재 採卵하여 變性이된 受精卵를 螢光抗體法으로 관찰하였을 때 受精卵細胞內 바이러스의 존재를 인정한 보고와, Bowen 등<sup>10</sup> 이 소 및 마우스의 透明帶를 除去한 受精卵를 BTV에 1시간 또는 3시간 노출시키고 나서 바이러스가 없는 培地에 24시간 또는 48시간 培養後 양동물의 受精卵이 바이러스에 감염된 사실을 細胞培養法으로 증명하였고, 이로부터 螢光抗體法으로 확인하였다고 한 보고들과 유사한 것으로 생각된다.

透明帶가 있는 家畜의 受精卵를 바이러스에 노출시키고 나서 受精卵를 단계적으로 10회 washing하여 바이러스의 力價動向을 살펴본 보고문들로서, Singh 등<sup>20</sup>은 소 受精卵를 IBRV에 노출시킨 결과에서, 그리고 돼지 受精卵를 ASFV에 노출시킨 결과에서<sup>56</sup>, 또한 FMDV에 소 및 돼지 受精卵를 노출시킨 결과에서<sup>19</sup> 그리고 Singh과 Thomas<sup>57</sup>는 돼지 受精卵를 SVDV에 노출시킨 實驗結果에서 受精卵 washing액의 처음 3~4회까지는 항상 바이러스 力價가 감소되면서 바이러스가 존재하였으나, 그 후 6~7회까지는 바이러스가 드물게 검출된다 하였으며<sup>19, 20</sup> 마지막 3~4회<sup>20, 57</sup>는 항상 바이러스가 검출되지 않았다고 하였다. 이상의 결과들은 이 實驗에서 透明帶가 있는 受精卵를 washing하였을 때 바이러스 處理時間에 관계없이 1회 washing액에서 높은 力價의 바이러스가 존재하였으나 이후 그 力價가 점차 감소하여 7회부터는 전 實驗群의 washing액에서 바이러스가 검출되지 않은 성적과 유사한 것으로 생각된다.

透明帶가 除去되거나 孵化中인 受精卵를 washing한 결과에 대하여는 Singh 등<sup>19</sup>은 FMDV에 노출된 소의 孵化胚盤胞를 10회 washing하였을 때 7회 washing액부터 바이러스가 검출되지 않았다고 하였고, Stringfellow 등<sup>24, 58</sup>은 透明帶가 除去된 소 受精卵를 *B abortus*에 노출시키고 washing하였을 때 8회 washing액까지 brucella가 검출되었다고 하였는데, 이상의 결과들은 이 實驗에서 3시간 바이러스 處理群의 washing액은 7회부터, 48시간 處理群은 8회부터 바이러스가 검출되지 않았던 결과와 유사한 것으로 사료된다.

한편, 이 實驗에서 24시간 處理 受精卵은 바이러스 力價가 점차 감소되다가 7회부터 9회까지는 바이러스의 力價가 낮게 유지되었고, 10회에는 바이러스가 검출되지 않았는데, 이 결과는 透明帶가 除去된 受精卵를 연속적으로 washing하는 과정에서 受精卵細胞의 일부가 washing액중에 떨어져나가 나타난 결과로 생

각된다.

이 實驗에서 ibaraki virus에 노출된 受精卵에 대한 washing效果를 조사한 결과, 透明帶가 있는 受精卵를 10회 washing하였을 때 受精卵 한 개를 除外한 모든 受精卵에서 바이러스가 분리되지 않았으나, 2회 washing한 모든 受精卵에서 바이러스가 검출된 사실을 감안할 때 受精卵를 여러번 washing하는 것은 受精卵으로부터 病原體를 除去할 수 있는 유효한 방법인 것으로 사료된다.

## 結 論

Ibaraki virus가 着床前 마우스 受精卵의 生存性에 미치는 영향을 알기 위해 ICR 및 BALB/cByJ系 미성숙 마우스를 過排卵 處理하여 4~8細胞卵 및 桑實胚 受精卵 774개를 採取한 후 透明帶가 있는 受精卵과 除去한 受精卵를 10<sup>5.8</sup>TCID<sub>50</sub> 力價의 ibaraki virus에 노출시켜 96시간까지 體外培養하여 受精卵變性率, 孵化胚盤胞率, 細胞培養과 螢光抗體法에 의한 바이러스 感染與否 및 바이러스에 대한 受精卵 washing효과를 조사한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

透明帶가 있는 4~8細胞卵은 배양 96시간에, 桑實胚는 72시간 및 96시간에 각각 바이러스에 노출된 군이 바이러스 非處理 對照群보다 현저히 높은 變性率을 나타내었다( $p < 0.01$ ).

透明帶를 除去한 4~8세포란 및 상실배는 바이러스에 노출된 군이 非處理 對照群보다 각각 현저히 높은 變性率을 나타내었다( $p < 0.01$ ).

透明帶가 있는 군에서, 4~8細胞卵群은 桑實胚群보다 낮은 胚盤胞率을 나타내었다.

透明帶가 있는 군에서, 4~8細胞卵 및 桑實胚는 바이러스에 노출된 군이 非處理 對照群보다 각각 현저히 낮은 孵化胚盤胞率을 나타내었다 ( $p < 0.01$ ).

透明帶가 있는 受精卵를 ibaraki virus에 노출시킨 후 2회 washing한 모든 受精卵에서 바이러스가 인정되었으나, 10회 washing한 대부분의 受精卵에서는 바이러스가 인정되지 않았다.

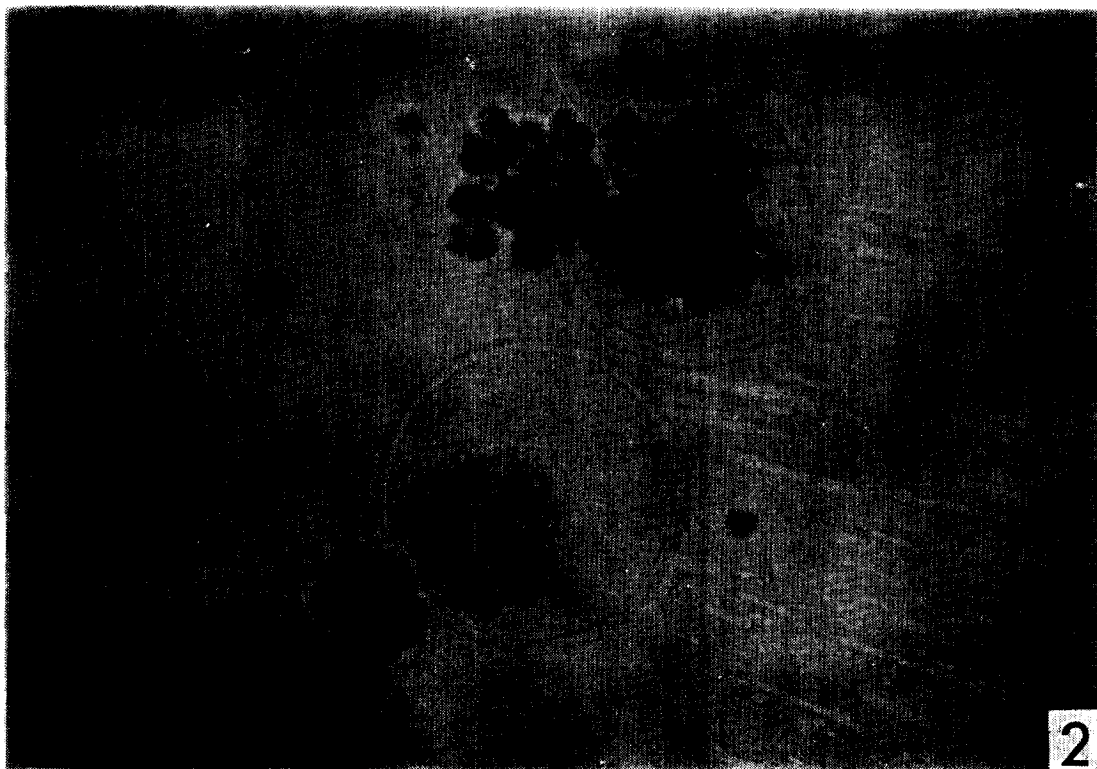
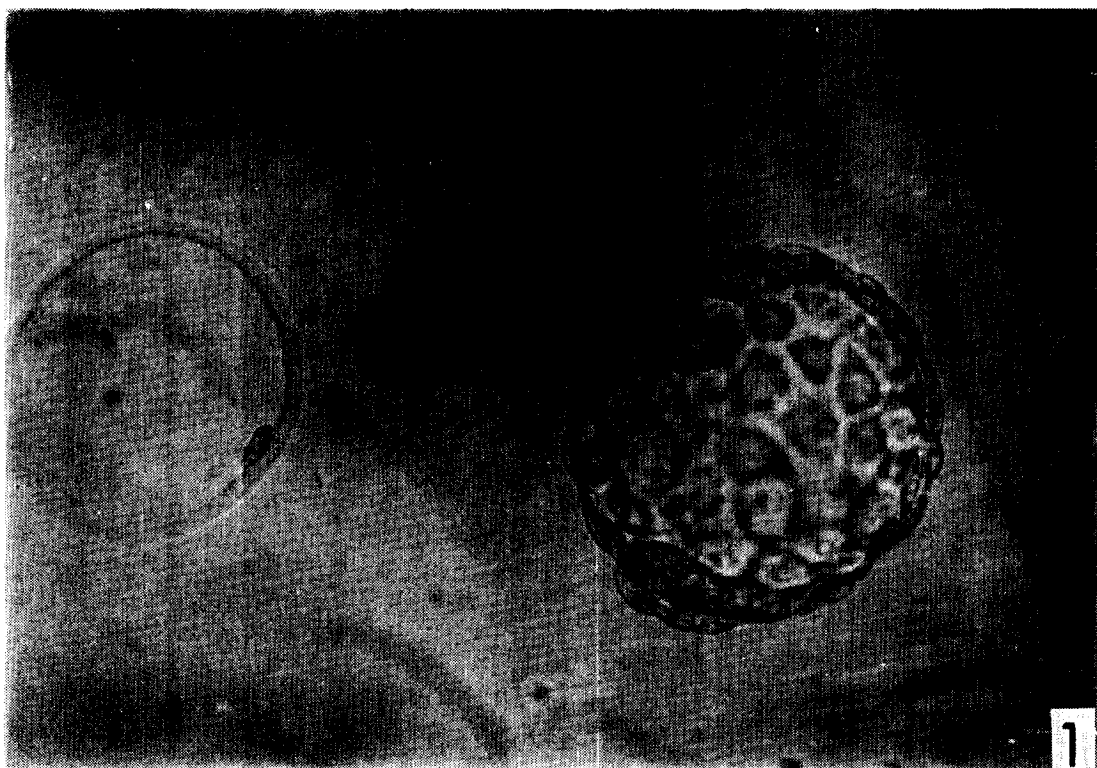
이상의 결과 ibaraki virus에 노출된 透明帶가 있는 受精卵를 10회 washing한 것은 透明帶에 존재한 바이러스를 除去하는데 효과적이었다.

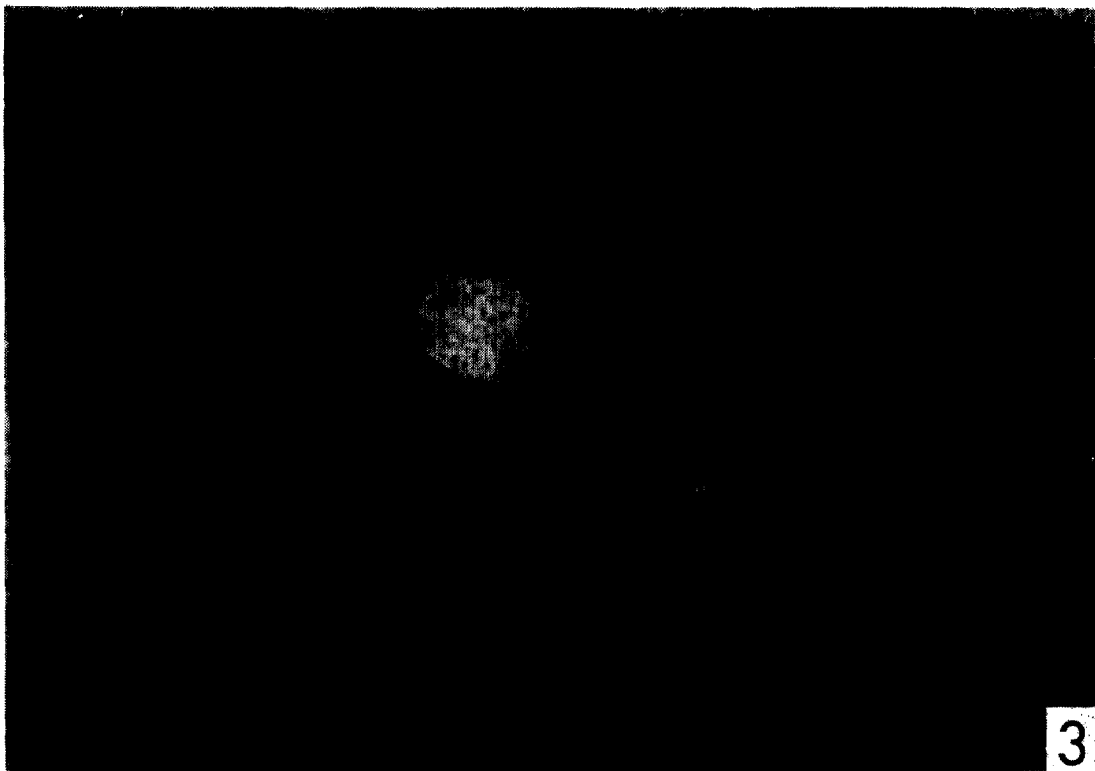
透明帶가 除去되고 마우스에 노출된 受精卵은 ibaraki virus 감염을 확인할 수 있었다.

마우스 受精卵의 透明帶는 ibaraki virus 감염을防禦할 수 있음을 확인할 수 있었다.

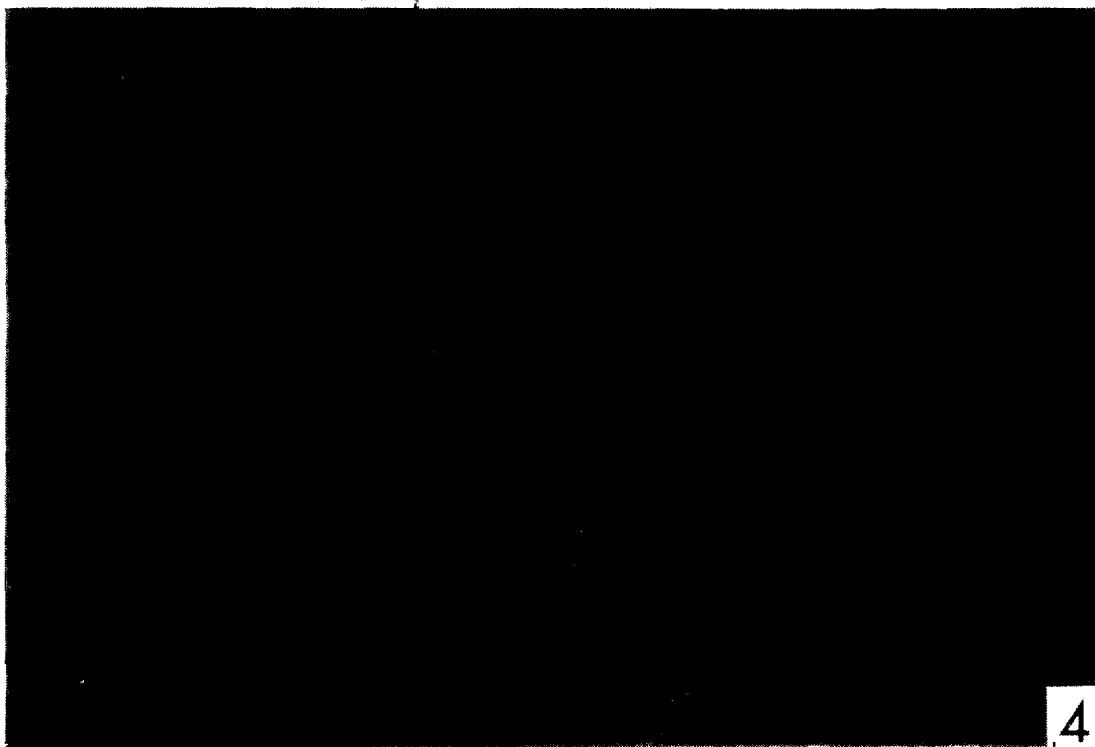
### Legends for figures

- Fig 1.** Hatched mouse embryo after 72 hour-culture without ibaraki virus: zona pellucida can be seen beside the developing hatched blastocyst. Inverted light microscope.  $\times 200$ .
- Fig 2.** Two zona pellucida-intact embryos after 72 hour-exposure to ibaraki virus: both developed to hatching blastocysts, but they are degenerated and unhatched. Inverted light microscope.  $\times 200$ .
- Fig 3.** Zona pellucida-free 4 cell embryo after 24 hour-exposure to ibaraki virus: no development can be seen and all the embryonic cells are degenerated. Inverted light microscope.  $\times 200$ .
- Fig 4.** Two zona pellucida-free morulae after 48 hour-exposure to ibaraki Virus: development has been arrested and embryos are degenerating. Inverted light microscope.  $\times 200$ .
- Fig 5.** Zona pellucida-intact 4 cell embryo cultured in normal medium for 3 hours, and then reacted with fluorescent antibody for ibaraki virus. Note absence of viral antigen. Indirect immunofluorescence.  $\times 200$ .
- Fig 6.** Zona pellucida-intact 4 cell embryo exposed to ibaraki virus for 3 hours, and then tested by fluorescent antibody: viral antigens are distributed entirely on the surface of the zona pellucida. Indirect immunofluorescence.  $\times 200$ .
- Fig 7.** Zona pellucida-free blastocyst cultured in normal medium for 24 hours, and then reacted with fluorescent antibody for ibaraki virus. Note absence of viral antigens in the blastomeres of the embryo. Indirect immunofluorescence.  $\times 200$ .
- Fig 8.** Zona pellucida-free late morula exposed to ibaraki virus for 24 hours, and then tested by fluorescent antibody: viral antigens are distributed in the whole blastomeres of the embryo. Indirect immunofluorescence.  $\times 200$ .

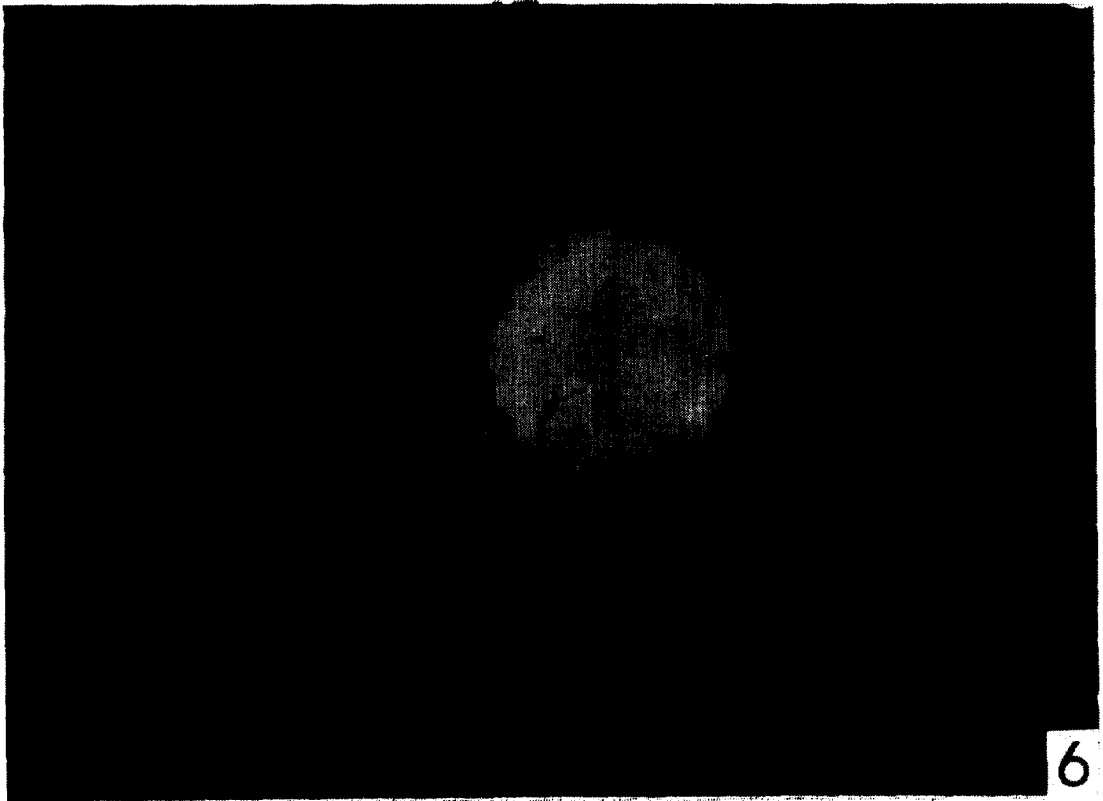
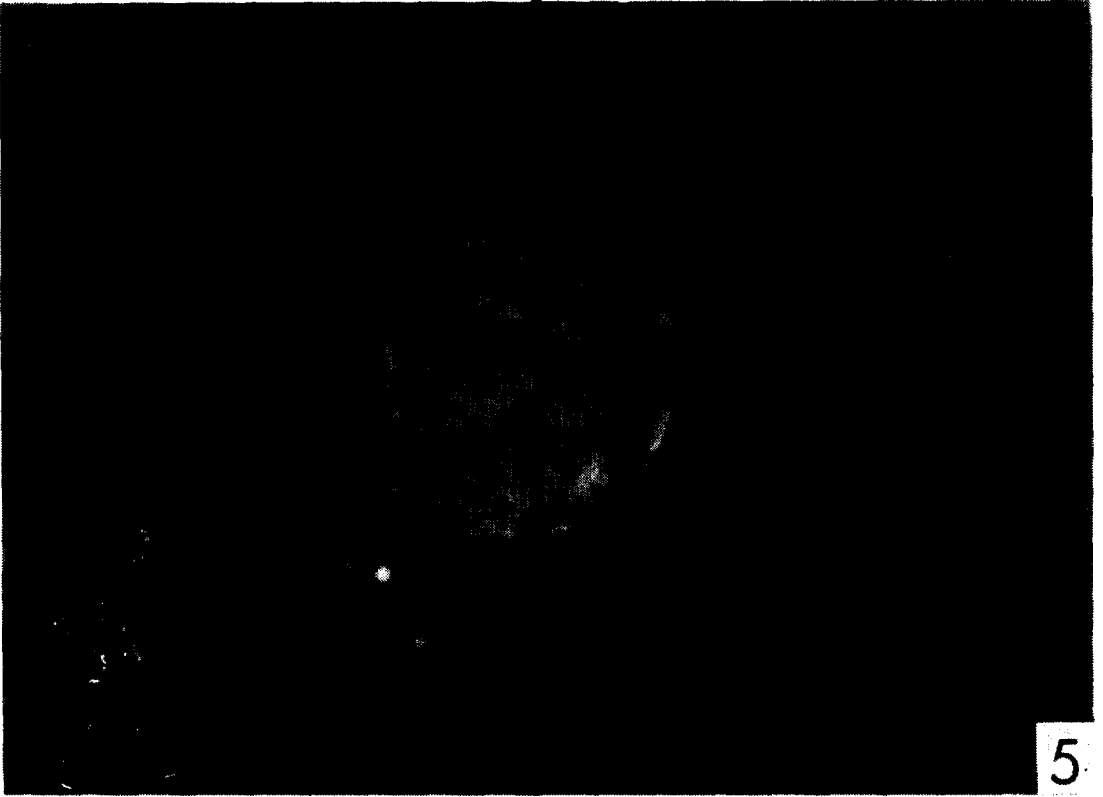


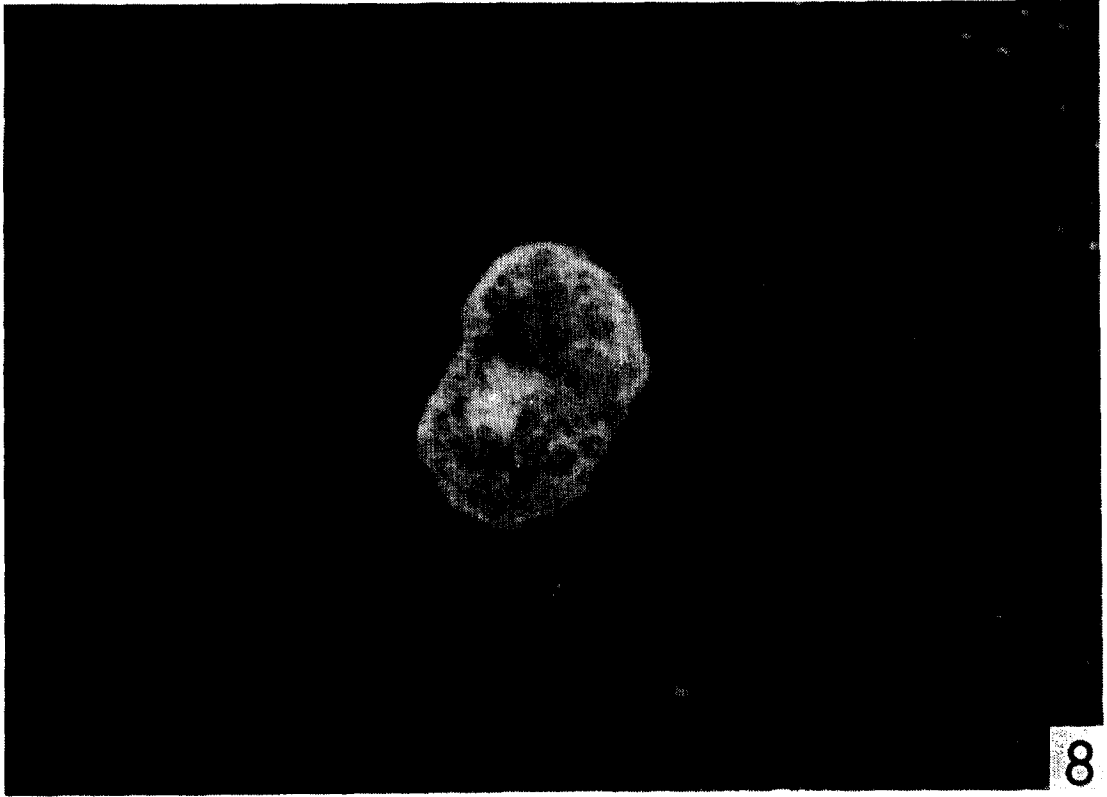
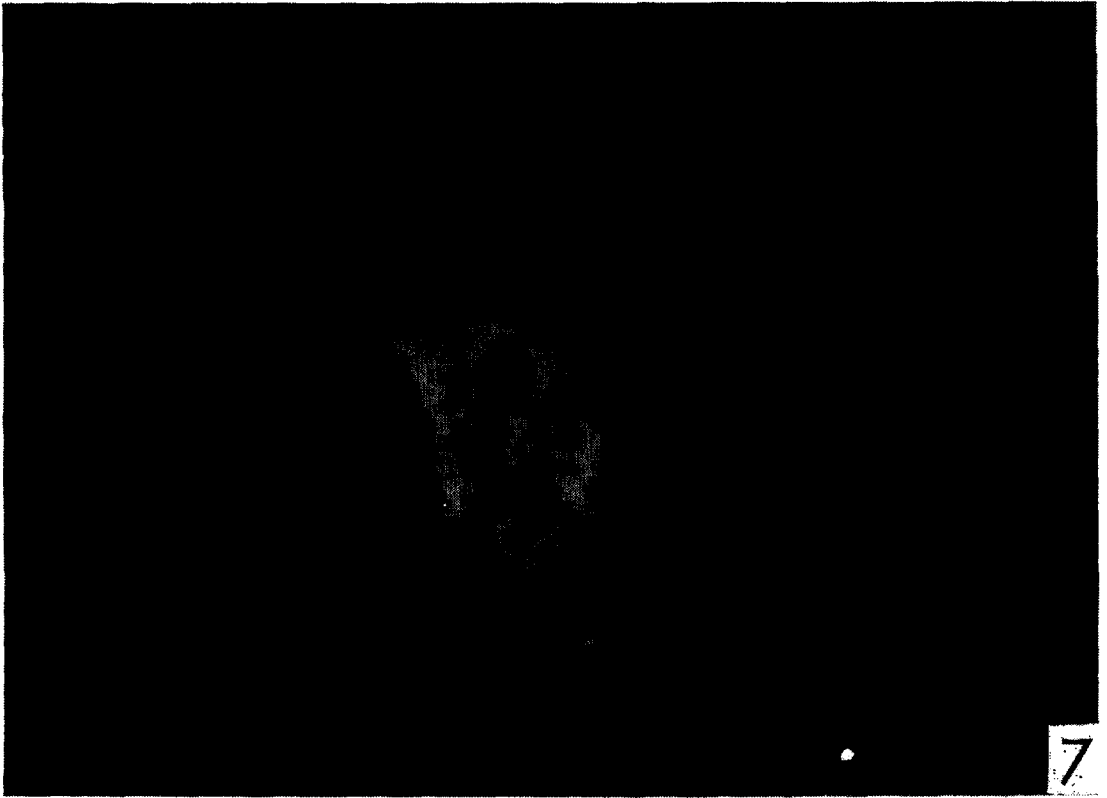


3



4





### 参 考 文 献

1. Boyd H. Embryonic death in cattle, sheep and pigs. *Vet Bulletin* 1965;35:251~266.
2. Parez M. The most important genital diseases of cattle(control, treatment and the hygiene of semen collection. *Rev sci tech Off int Epiz* 1985;4(1):69~87.
3. Singh EL, Hare WCD. Embryo-pathogen interaction in relation to disease transmission. In: Morrow, DA ed. *Current therapy in theriogenology*. W. B Saunders Co, 1986;84~87.
4. Hare, WCD. BVD virus infection and embryo transfer. *Vet Rec* 1986;118:544.
5. Gilbert RO, Coubrough RI, Weiss KE. The transmissin of bluetongue virus by embryo transfer in sheep. *Theriogenology* 1987;27:527~540.
6. Eaglesome MD, Hare WCD, Singh EL. Embryo transfer: A discussion on its potential for infectious disease control based on a review of studies on infection of gametes and early embryos by various agents. *Can vet J* 1980;21:106~112.
7. Shelton JN. Prospects for the use of embryos in the control of disease and the transport of genotypes. *Aust Vet J* 1987;64:6~10.
8. Archbald LF, Fulton RW, Seger CL, et al. Effects of the bovine viral diarrhoea(BVD) virus on preimplantation bovine embryos: A preliminary study. *Theriogenology* 1979;11:81~89.
9. Grahn TC, Fahning ML, Zemjanis R. Nature of early reproductive faillure caused by bovine viral diarrhoea virus. *JAVMA* 1984;185:429~432.
10. Bowen RA, Howard TH, Pickett BW. Interaction of bluetongue virus with preimplantation embryos from mice and cattle. *Am J Vet Res* 1982;43:1907~1911.
11. Bowen RA, Elsdén RP, Seidel GE. Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. *Am J Vet Res* 1985;46:1095~1097.
12. Gwatkin RBL, Auerbach S. Synthesis of a ribonucleic acid virus by the mammalian ovum. *Nature* 1966;209:993~994.
13. Hafez ESE. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. In: Hafez, ESE ed. *Reproduction in farm animals*. Lea & Febiger, 1987;574.
14. Johnstone A, Thorpe R. *Immunochemistry in practice*. 1st ed. Blackwell Scientific Publications, 1982;257~270.
15. Singh EL, Eaglesome MD, Thomas FC, et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. I. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to Akabane, bluetongue and bovine viral diarrhoea viruses. *Theriogenology* 1982;17:437~444.
16. Bielanski A, Singh EL, Hare WCD. Effect of bovine rhinotracheitis virus(IBRV) and bovine viral diarrhoea virus(BVDV) on survival of prehatched embryos. *Theriogenology* 1987;27:214.
17. Potter ML, Cortvet RE, Looney CR, et al. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus uptake by preimplantation embryos. *Am J Vet Res* 1984;45:1778~1780.
18. McVicar JW, Singh EL, Mebus CA, et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. VIII. Failure to detect foot and mouth disease viral infectivity associated with embryos collected from infected donor cattle. *Theriogenology* 1986;26:595~603.
19. Singh EL, McVicar JW, Hare WCD, et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. VII. The in vitro exposure of bovine and porcine embryos to foot and mouth disease virus. *Theriogenology* 1986;26:587~593.
20. Singh EL, Thomas FC Papp-Vid G, et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. II. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Theriogenology* 1982;18:133~140.
21. Bolin SR, Runnels LJ, Sawyer CA, et al. Resistance of porcine preimplantation embryos to pseudorabies virus. *Am J Vet Res* 1981;42:1711~1712.
22. Gwatkin RBL. Passage of mengovirus through

- the zona pellucida of the mouse morula. *J Reprod Fert* 1967;13:577~578.
23. Gwatkin RBL. Studying the effects of viruses on eggs. In: Daniel, JCJr, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco: W, H. Freeman and Company, 1971:228~237.
  24. Stringfellow DA, Scanlan CM, Brown RR, et al. Culture of bovine embryos after in vitro exposure to *Brucella abortus*. *Theriogenology* 1984;21:1005~1012.
  25. Kaneene JB, Coe PH, Gibson, CD, et al. "The role of *Haemophilus somnus* in early embryonic death" I. The effect of the organism on embryos by day 8 postbreeding. *Theriogenology* 1986;26: 189~198.
  26. Thomson MS, Stringfellow DA, Lauerman LH. In vitro exposure of preimplantation bovine embryos to *Haemophilus somnus*. *Theriogenology* 1987;27:287.
  27. Hogan B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1986;91~106, 273, 252~256.
  28. Chemineau P, Procureur R, Cognié Y, et al. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology* 1986; 26:279~290.
  29. Eaglesome MD, Mitchell D, Betteridge KJ, et al. Transfer of embryos from bovine leukemia virus-infected cattle to uninfected recipients: Preliminary results. *Vet Rec* 1982;111:122~123.
  30. Hare, WCD, Mitchell, D, Singh, EL, et al. Embryo transfer in relation to bovine leukaemia virus control and eradication. *Can Vet J* 1985; 26:231~234.
  31. Singh EL. The disease control potential of embryos. *Theriogenology* 1987;27:9~20.
  32. Singh EL, Hare WCD, Thomas, FC, et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. W. Nontransmission of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. *Theriogenology* 1983;20:169~176.
  33. Singh EL, Thomas FC, Hare WCD, et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. X. The in vivo exposure of zona pellucida-intact porcine embryos to swine vesicular disease virus. *Theriogenology* 1987;27:451~457.
  34. Singh EL, Thomas FC, Hare WCD, et al. Embryo transfer in disease control. *Theriogenology* 1982;17:108.
  35. Wolfe DF, Nusbaum KE, Lauerman LH, et al. Embryo transfer from goats seropositive for caprine arthritis-encephalitis virus. *Theriogenology* 1987;28:307~316.
  36. Gwatkin RBL. Effect of viruses on early mammalian development, I. action of mengo encephalitis virus on mouse ova cultivated in vitro. *Proc Nat Acad Sci USA* 1963;50:576~581.
  37. Trounson AO, Moore NW. The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *J Reprod Fert* 1974;41:97~105.
  38. Bolin SR, Bolin CA. Pseudorabies virus infection of six- and ten-day-old porcine embryos. *Theriogenology* 1984;22:101~108.
  39. Neighbour PA. The effect of maternal cytomegalovirus infection on preimplantation development in the mouse. *J Reprod Fert* 1976;48:83~89.
  40. Neighbour PA. Studies on the susceptibility of the mouse preimplantation embryo to infection with cytomegalovirus. *J Reprod Fert* 1978;54: 15~20.
  41. Gillespie JH, Timoney JF. *Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals*. 7th ed. Cornell University Press, 1981:653~661.
  42. Kahrs RF. *Viral diseases of cattle*. 2nd ed. The Iowa State University Press, 1985:72~73.
  43. Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Infection of mammalian unfertilized and fertilized ova with oncogenic viruses. *Nature* 1971;230: 591~592.
  44. Bentvelzen P, Daams JH, Hageman P, et al. Genetic transmission of viruses that incite mammary tumor in mice. *Proc Nat Acad Sci*



- USA 1970;67:377~384.
45. Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, et al. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Nat Acad Sci USA* 1971;68:353~357.
  46. Gönczöl E, Andrew PW, Plotkin SA. Cytomegalovirus replicates in differentiated but not in undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Science* 1984;224:159~161.
  47. Jaenisch R, Fan H, Crocker B. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice with leukemia virus: Tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. *Proc Nat Acad Sci USA* 1975;72:4008~4012.
  48. Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974; 71:1250~1254.
  49. Stoller A, Collmann RD. Virus aetiology for Down's syndrome(Mongolism). *Nature* 1965; 208:903~904.
  50. Konwinski M, Solter D, Koprowski, H. Effect of removal of the zona pellucida on subsequent development of mouse blastocysts in vitro. *J Reprod Fert* 1978;54:137~143.
  51. Ziomek CA. Cell polarity in the preimplantion mouse embryo. In: Bavister, BD ed. *The mammalian preimplantation embryo*. New York: Plenum Press, 1987;23~37.
  52. Eyestone WH, First NL. A study of the 8 to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 1986;25:152.
  53. Schachner R, Hochstein-Mintzel V, Reinhardt G, et al. In vitro exposure of the early mouse embryo to herpes simplex virus-1 strain wal. *Theriogenology* 1987;28:283~290.
  54. Wrathall AE, Mengeling WL. Effects of transferring parvovirus-infected fertilized pig eggs into seronegative gilts. *Br Vet J* 1979;135:255~261.
  55. Ferm VH, Kilham L. Congenital anomalies induced in hamster embryos with H-1 virus. *Science* 1964;145:510~511.
  56. Singh EL, Dulac GC, Hare, WCD. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. V. The in vitro exposure of zona pellucida-intact porcine embryos to African swine fever virus. *Theriogenology* 1984;22:693~700.
  57. Singh EL, Thomas FC. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. X. The in vitro exposure of zona pellucida-intact porcine embryos to swine vesicular disease virus. *Theriogenology* 1987;27:443~449.
  58. Stringfellow DA, Wolfe DF, Lauerman LH, et al. Resistance of preimplantation bovine embryos to infection with *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 1986;47:1924~1927.
  59. Bolin SR, Runnels LJ, Sawyer CA, et al. Experimental transmission of pseudorabies virus in swine by embryo transfer. *Am J Vet Res* 1982;43:278~280.
  60. Singh EL, Thomas FC. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. XI. The in vitro exposure of bovine and porcine embryos to vesicular stomatitis virus. *Theriogenology* 1987;28:691~697.
  61. Bolin SR, Turek JJ, Runnels LJ, et al. Pseudorabies virus, porcine parvovirus, and porcine enterovirus interactions with the zona pellucida of the porcine embryo. *Am J Vet Res* 1983;44: 1036~1039.
  62. Warathall AE, Mengeling WL. Effect of porcine parvovirus on development of fertilized pig eggs in vitro. *Br Vet J* 1979;135:249-254.
  63. Blood DC, Henderson JA, Radostits OM. *Veterinary medicine*. 5th ed. The English Language Book Society and Baillière Tindall, 1979;648~651.
  64. Inaba Y. Ibaraki disease and its relationship to bluetongue. *Aust Vet J* 1975;51:178~185.
  65. Suzuki Y, Nakagawa S, Namih M, et al. RNA and protein of ibaraki virus. *Kitasato Arch of Exp Med* 1978;51:61~71.