

## 優秀 哺乳動物 受精卵의 利用效率 提高에 關한 研究 IV. 移植한 受精卵의 着床率 增進에 關한 基礎研究

鄭柄鉉·鄭吉生·金正翊\*·金鍾培·李勳澤·崔錫和·元聖一  
建國大學校 畜產大學

Elevating Utilization Efficiency of Excellent Embryos in Mammals  
IV. Study of Improving the Implantation of Transferred Embryos  
Chung, B.H., K.S. Chung, J.I. Kim\*, J.B. Kim, H.T. Lee, S.H. Choi and S.I. Won  
College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

### SUMMARY

These experiments were investigated the effects of bacterial infection of uterus and vagina during bovine embryo transferring on the development of embryo. We examined the distribution of reproductive disordered cow by a kind of disease, identified the bacteria isolated from the vagina of those cows and bacterial infection of media and its treatment with several kinds of antibiotics at that. The results obtained were summarized as follows :

1. The total 592 reproductive disordered cows were caused by ovarian dysfunction(43.4%), ovary-uterus complication(24.5%), endometritis(17.7%), and repeat breeder(12.0%).
2. The main bacteria among 11 kinds of bacteria(113 colonies) was *E. coli*(38 colonies, 33.6%). Likewise, *E. coli* was proportioned to 23 and 22.7% among bacteria from vagina of endometritis and repeat breeder, respectively.
3. The sensitivities of vaginal bacteria to penicillin and streptomycin were 6.2 and 4.4% respectively, but those to gentamycin and chloramphenicol were 22.1 and 16.8%, respectively. The similar sensitivities were found in the embryo recovery media.
4. The rates of bacterial infection of recovery medium and that of abnormal development of embryo were 75 and 80%, respectively.
5. The antibiotic sensitivity assay of ova recovery media showed gentamicin and chloramphenicol gave better results than streptomycin and penicillin.
6. The developmental rate of 1-cell stage mice embryos was 34.0% in bacterial infected culture media, but was 40.0, 58.0, 40.0 or 30.0% with the treatment of kanamycin, gentamycin, chloramphenicol, streptomycin, or penicillin, respectively.

### I. 緒 論

소의 受精卵 移植에서 正常卵자의 回收率과 着床率을

左右하는 가장 큰 要因은 Donor 와 Recipient 의 健康 狀態 및 發情週期 同期化의 程度, 이식과정에서의 衛生 的인 處理狀態 그리고 移植技術者의 技術的 熟練度 等

본 논문은 1989년도 교육부 지원 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의해 연구되었음.

\*江原大學校 畜產大學(College of Animal Agriculture, Kangwon National University)

을 들 수 있겠으나, Seidel 等(1975)과 Brand 等(1976)은 수정란 이식의 전 과정에서 수정란의 세균오염이 수정란의 착상은 물론 수정란 및 난포란의 배양에 미치는 영향은 절대적으로 중요하다고 하였으며 이들 연구자들은 또한 Recipient의 생식기내 세균의 감염 기회를 규명하기 위하여 황체기 및 비황체기에 있는 소에 각각 인공수정용 피펫을 통과시킨 후 자궁내의 세균을 검출한 결과 황체기의 소에서는 비황체기의 소보다 세균 검출율이 현저하게 높았다고 하였다.

Ayalon(1978)은 인공수정란 소에서 수정란 死滅은 수정후 8일까지에 가장 많이 일어난다고 하였고, Maurer와 Chenault(1983)은 經產肉牛에서 受精의 失敗와 受精卵의 早期死滅이 繁殖損失을 일으키는 가장 큰 원인이라 하였으며 수정란의 사멸은 대부분이 수정후 8~16일 사이에 많이 발생된다고 하였다. Sreenan과 Diskin(1983)은 소에서 초회 수정후 번식상 손실은 수태가 되지 않은 개체의 75%가 수정란의 胚發達 異常 및 胎兒의 早期死滅이라 하였다.

Boyd(1965)는 수정란 사멸의 여러 원인중 細菌 및 原蟲에 의한 수정란 사멸은 소에서는 *Trichomonas fetus*와 *Campylobacter fetus*라 하였고, Singh(1985)은 수정란 이식과 관련된 수정란의 위생적 처리법에 대하여 강조하였다. Lamming과 Rowson(1953)은 progesterone分泌時期에는 子宮內에 細菌感染이 容易하고 estrogen의 分泌 혹은 投與時期에는 세균감염이 용이하지 않으며 子宮內膜炎에 의한 자궁의 손상이나 이물 등으로 인한 자궁내막의 자극은 PGF<sub>2α</sub>의 분비를 阻害하기 때문에 황체의 퇴행이 용이하게 이루어지지 않는다고 하였다.

受精卵移植에서도 이와 마찬가지로 Donor에서 人工授精과의 차이점은 1회 발정당 2~3회 인공수정을 해야 하고 採卵 및 選別過程에서 汚染의 機會가 더 많은 것은 물론 Recipient는 모든 生殖器가 progesterone의 지배하에 있는 성주기 5~7일경에 수정란을 자궁의 심부까지 誘導注入해야 하기 때문에 이식과정에서 미생물이 자궁에 오염되는 확률이 인공수정시보다 높을 것으로 생각된다. 물론 感染源이 非病原性이라 할지라도 일단 감염이 되면 미생물의 增殖으로 자궁내의 環境이 受精卵에 不利한 條件을 提供하여 Donor에서 胚發達에 影響을 미치게 될 것이며 Recipient 역시 배발달 및

착상에 영향을 줄 것으로 판단되어 기본 조사로서 번식장해우와 정상 번식우에 散在되어 있는 생식기내 정상 세균총의 分布와 藥劑耐性 檢査를 실시하여 수정란의 세균오염이 배발달 및 수태율에 미치는 영향과 오염에 대한 예방 및 효과적인 처치방법을 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 公事동물의 病類別 分類

#### 1) 公事동물

1989年 1月부터 1991年 12月까지 3년동안 京畿道 지역과 江原道 및 忠清道 一部地域에서 發生한 繁殖障害牛中 建國大學校 畜產大學 附屬 動物病院에 診療依頼한 유우중 분만후 80일 이상된 무발정 정소를 대상으로 하였다.

#### 2) 진 단

번식장해로 의뢰된 외래환축에 대해서 현지 출장후 직장검사 및 축주와의 문진과 현지 인공수정사의 기록을 참고하여 확진하였다.

#### 3) 병류별 분류

##### (1) 난소 기능 장애

분만후 80일 이상된 무발정우 중에서 난소 발육 불량, 난소 위축, 황체 잔류 및 둔성 발정우로 부생식기는 정상상태로 판명된 개체

##### (2) 난소기능 장애 및 생식기 이상

경도의 자궁내막염으로 염증 자체가 난소기능 장애를 일으킨 것으로 진단된 개체

##### (3) 자궁내막염

직장검사 소견으로 자궁내막염이 확실하다고 판단된 개체

##### (4) 자궁경관염 및 질염

직장검사상 자궁경의 종창과 질내 이상, 뇨질, 기질 등의 질 이상우

##### (5) 저수태우

직장검사상 생식기는 정상이고 인공수정기록에서는 정상 성주기이면서 3회 이상 인공수정 경력이 있는 개체

### 2. 繁殖障害牛와 正常牛의 體內 細菌叢 分離

질내 세균총 조사를 위한 번식장해 유우의 분류는 난 소기능 이상은 인정되나 자궁이 정상인 38두를 A群으로 하고, 子宮內膜炎이 單獨으로 發生한 37두를 B群으로 저수태우 37두는 C群으로 각각 분류하였는데 여기에서 子宮內膜炎과 合併症인 것은 제외시켰다.

#### 1) Sample 採取

Sample 채취는 공시동물에 腔鏡을 사용하여 滅菌된 綿棒으로 자궁경관 입구에서 채취하여 nutrient broth agar (Mueller-Hinton Co., USA)에 接種시켜 37°C에서 24시간 增菌시켰다.

#### 2) 細菌의 分離 同定

증균된 細菌은 血液倍地 (Mueller-Hinton Co., USA)에 선상 도말하여 37°C에서 24시간 배양하고 가장 대표적인 집락을 취하여 同定用 種菌으로 사용하였다. 세균의 분리동정은 Finegold와 Baron(1986)의 기준에 따라 실시하였다.

### 3. 抗生物質 感受性 檢査

Kirby-Bauer의 방법으로 항생물질의 感受性 檢査를 하였다 (Alcamo, 1983).

### 4. 卵子 回收用 培地の 細菌感染과 受精卵 回收

#### 1) 供試動物

경기도 가평군 소재 푸른 牧場의 유우 4두를 사용하였다.

#### 2) 卵子 回收方法

卵子回收는 鄭等(1983)이 사용한 方法에 準하여 實施하였다.

#### 3) 卵子 回收用 培地の 細菌感染 檢査

Donor 1두에 상요된 수정란 세척액 전체를 혼합하고 자궁점액이 침전된 다음 상층액 5ml을 취하여 혈액배지 (Mueller-Hinton Co., USA)의 상층에 골고루 도말하여 37°C에서 24시간 增菌시킨 후 세균의 집락을 확인하였다.

#### 5. 卵子 回收用 培地の 抗生物質 耐性 檢査

Kirby-Bauer의 방법으로 난자 회수용 배지의 항생제 내성검사를 실시하였다 (Alcamo, 1983).

### 6. 各種 抗生物質 添加가 생쥐 1-細胞期 受精卵의 體外 發達에 미치는 影響

#### 1) 供試動物

본 연구를 위하여 실험동물로는 6주령의 ICR 系統의 雌性생쥐와 12週齡 以上の 生殖能力이 확인된 同一系統의 雄性 생쥐를 사용하였다.

#### 2) 多排卵誘起와 受精卵 回收

發情前期의 雌性 생쥐의 腹腔內에 5 IU의 妊馬血清性 性腺刺戟호르몬 (PMSG, Sigma Chemical Co., USA)를 投與 48時間後에 5 IU의 絨毛性 性腺刺戟 호르몬 (hCG, Sigma Chemical Co., USA)를 투여함으로써 다배란을 유도한 후, 雄性 생쥐와 ผสม함으로써 수정을 유도하였다. 翌日 아침 腔栓 (vaginal plug)의 有無를 확인한 다음 질전이 존재하는 個體를 外科의 으로 卵管을 摘出した 후 실험미경하에서 전핵기 受精卵를 회수하였다. 회수된 난자는 신선한 배양액으로 3회 세척한 후 培養小滴으로 옮겨 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 空氣條件의 배양기에서 배양하였다.

#### 3) 培養液과 抗生物質 處理

사용된 배양액으로는 T6배양액 (Quinn 등, 1982)에 kanamycin (0.5g/l), gentamycin (40mg/l), chloramphenicol (0.3g/l) 및 streptomycin (50mg/l)과 penicillin (75mg/l)을 배양액에 각각 단독 또는 混合 첨가하여 실험에 공시하였다.

#### 4) 體外培養

세균에 感染된 배지에 항생제를 첨가한 다음 상기에 기술한 전핵기 受精卵를 培養小滴에 옮긴 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 공기조건의 배양기내에 배양하면서 24시간 간격으로 실험미경 하에서 胚發達 정도를 관찰하였다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 生殖器 疾患에 의한 繁殖障害牛의 病類別 分類

金子와 吉原(1983), 鄭(1985)은 繁殖障害는 생식기 질환과 밀접한 관계가 있으며 정상적인 人工授精時 수정장애 및 受精卵의 死滅로 인한 受胎率 低下는 경미한 생식기 질환에서 연유된 것이 많으며 저수태우 역시 直腸檢査와 診斷할 수 없는 생식기의 細菌汚染이 가장 큰 원인인 점을 지적한 바, 본 연구는 수정란 이식시 Donor 및 Recipient의 선발과정에서 생식기의 정상 유무를 판정하고 지표를 설정하는데 기초자료로 이용하기 위한 조사 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

Table 1. The classification of reproductive disordered cow by a kind of disease

	Total	Ovarian disorder	Ovary+ uterus Complex	Endo-metritis	Cervicitis Vaginitis	Repeat breeder
No. of cow	592	257	145	106	13	71
Incidence (%)	100.0	43.4	24.5	17.9	2.2	12.0

난소 및 生殖器 이상우으로 판정된 592두중 内分泌異常으로 추정되는 난소 기능 이상우가 257두(43.4%), 난소 기능 이상과 자궁감염의 합병증이 145두(24.5%) 그리고 생식기 감염증이 190두(32.1%)로 나타났는데 생식기 감염우중 임상증상이 뚜렷한 생식기 단독 감염증이 119두(20.1%), 저수태우가 71두(12.0%)로 나타났다.

金子와 吉原(1983)은 직장검사나 발정점액의 육안적 검사에서 이상이 없는 유우에서 수회 인공수정시켜도 수태가 되지 않는 경우 자궁 내막염 치료를 함으로써 수태율이 향상되었다고 하였고 金子와 吉原(1983), 鄭(1985)은 저수태우에 인공수정하기 전과 후에 항생물질의 자궁내 투여는 수태율을 향상시키는데 큰 효과가 있는 것으로 보고한 사실을 고려한다면 본 연구에서 임상증상이 뚜렷한 생식기 단독 감염증이 전체의 20.1%인 119두로 나타났으나 직장검사로 자궁내에 경미한 감염증은 확인할 수 없었으므로 자궁내 감염증우는 더 많은 것으로 추정된다. 그래서 Donor 나 Recipient 를 선발하는 과정에서 난소 상태나 생식기의 감염 유무를 정확한 진단하에서 선발하는 것이 정상 수정란의 採卵率 및 受胎率 향상에 중요한 영향을 미칠 수 있다는 사실을 추측할 수 있다. 따라서 Donor 나 Recipient 의 선발과정에서 生殖器 診斷은 어디까지나 주관적이기 때문에 객관적인 진단법 개발이 요구되며 경미한 炎症이라 할지라도 정상난자의 회수율과 수태율에 큰 영향을 미칠 것이므로 세심한 주의가 필요하다고 생각된다.

## 2. 繁殖障害牛 및 正常牛의 膈內 細菌叢 分離

Seidel 等(1975)은 수정란 이식기구가 질 및 자궁경관을 통과하는 과정에서 세균이 자궁내로 이행되므로 이식 수정란의 수태율이 낮아진다고 하였고, Brand

等(1976)은 수정란 이식기구의 주입 부위에 따라 세균의 오염도가 다르게 나타난다는 결과와 Lamming 과 Rowson(1953)이 *Corynebacterium pyogenes* 에 오염된 精液을 발정기의 소와 황체기의 소에게 주입한 결과 황체기의 소에서는 11두중 9두가 子宮蓄膿症을 유발했으며 全例에서 *Corynebacterium pyogenes* 가 검출되었고 반면에 발정기의 소에서는 자궁축농증이 보이지 않았고 *Corynebacterium pyogenes* 도 검출되지 않았다는 보고는 생식기가 estrogen 의 지배하에 있을 때는 세균에 대한 저항성이 높지만 황체기에는 progesterone 의 지배하에 있기 때문에 세균에 대한 저항성이 낮다고 하였다.

이러한 보고에서 수정란 이식시 수정란 이식기구의 질 및 자궁경관을 통과할 때 세균의 오염을 배제하기가 어려운 점과 수정란을 이식하는 시기에는 생식기가 progesterone 의 지배하에 있기 때문에 자체 방어기전이 약해져 있다.

이때 수정란 이식과 함께 자궁내에 오염된 세균은 증식이 용이한 환경이므로 이식된 수정란의 胚發達 障礙와 死滅로 인해 수태율이 낮아진다는 사실은 밝혀졌지만 구체적으로 이에 대한 대책에 관해서는 아직 보고된 바가 없다.

子宮內膜炎이 발생하는 요인은 분만 후 정상적으로 자궁수복후 progesterone 의 지배하에 있는 황체기에 일어난다는 사실과 子宮內膜炎이 발생하는 원인이 되는 병원균의 자궁내 침입경로는 중부, 인공수정, 질검사, 정액의 취급 부주의에 의해 일어난다는 사실도 Rowson(1972)에 의해 밝혀졌다.

이와 같은 결과에서 인공수정시보다 수정란 이식에서 Donor 나 Recipient 가 자궁내에서 세균오염의 기회가 더 많고 생식기가 세균에 대한 저항성이 낮다는 점을

Table 2. The bacteria isolated from the intravagina of dairy cattle

	Head(%)	Group A	Group B	Group C
<i>E. coli</i>	38(33.6)	15(39.5)	11(29.7)	12(31.6)
<i>Streptococcus</i>	17(15.0)	3( 7.9)	11(29.7)	3( 7.9)
<i>Proteus</i>	12(10.6)	3( 7.9)	4(10.8)	5(13.1)
<i>Staphylococcus</i>	9( 8.0)	1( 2.6)	5(13.5)	3( 7.9)
<i>Salmonella</i>	8( 7.1)	3( 7.9)	2( 5.4)	3( 7.9)
<i>Micrococcus</i>	8( 7.1)	3( 7.9)	2( 5.4)	3( 7.9)
<i>Corynebacteria</i>	6( 5.3)	2( 5.2)	1( 2.7)	3( 7.9)
<i>Alkaligenes</i>	5( 4.4)	3( 7.9)	—	2( 5.2)
<i>Shigella</i>	4( 3.5)	2( 5.2)	—	2( 5.2)
<i>Bacillus</i>	3( 2.7)	2( 5.2)	—	1( 2.6)
<i>Enterobacter</i>	3( 2.7)	1( 2.6)	1( 2.7)	1( 2.6)
Total	113(100)	38(100)	37(100)	38(100)

감안한다면 Table 1에 나타난 바와 같이 경미한 子宮 內膜炎이나 저수태우는 직장 검사를 통한 주관적인 진단으로는 불가능하여 Donor와 Recipient의 選定過程에서 비임상형 자궁내막염 등은 정상우로 취급하기가 쉽다. 그래서 수정란을 이식하는 시기에는 자궁내 세균 증식이 용이한 황체기이므로 수정란 이식용 피펫이 질 내를 통과하는 과정에서 질내의 상재균이 자궁내로 오염될 수 있는 가능성을 배제할 수가 없다.

정상우 및 비정상우의 질내 세균총을 분리 동정한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 질내 세균총 검사에서 공시우 113두 모두가 11종류의 병원성 세균이 검출되었으며 그중 *E. coli*가 38두(33.6%), *Streptococcus* spp.가 17두(15.0%), *Proteus*가 12두(10.6%)의 순으로 나타났으며 *E. coli*는 의외로 정상우인 A군에서 39.5%는 높은 감염율로 자궁내막염으로 진단된 B군의 29.7%보다 높은 감염율을 나타내었다. 자궁 질환우에서는 전체의 59.5%가 *E. coli*와 *Streptococcus* spp.의 감염에 의한 것으로 확인이 되었다.

이와 같이 공시동물 1두당 배양된 세균 집락중 대표적인 집락 1개만을 취하였고 혐기성 세균의 제외를 고려한다면 이보다 더 많은 종류의 세균이 질내에 감염되어 있을 것으로 사료되며, 수정란 이식을 위해 선발된 Donor나 Recipient에서 인공수정과 채란 및 수정란

주입시 주입기를 통하여 질내에 세균이 오염되는 것을 최대한으로 방지하는 것이 정상 수정란의 회수율과 착상율을 높이는데 크게 기여할 것으로 생각된다.

### 3. 分離細菌叢의 抗生物質 耐性 檢査

Table 2에서 보는 바와 같이 직장검사에서 정상우로 판정된 개체라 할지라도 질내에는 여러가지 병원성 세균이 상재해 있으므로 수정란 이식시 Donor 및 Recipient에 대하여 채란전과 수정란 이식전에 질내의 병원성 세균에 대한 항생물질의 적용이 바람직할 것으로 생각되어 항생물질에 대한 내성검사를 실시한 결과 Table 3과 같이 penicillin과 streptomycin은 각각 6.2%와 4.4%의 感受性を 보여 거의 효과가 없는 것으로 나타났으며 gentamycin, kanamycin, chloramphenicol, oxytetracycline의 順으로 각각 22.1%, 18.6%, 16.8%, 13.3%의 순으로 감수성이 있는 것으로 나타나 난자 회수용이나 이식용 및 배양용 배지와 인공수정용 精液稀釋液에 주로 첨가되는 항생물질이 streptomycin과 penicillin인 점을 감안할 때 이는 배지 자체의 미생물 발육억제 효과 이외에는 무의미한 것으로 판정되었다. 이러한 결과는 우리나라 養畜 農家에서 自家治療용으로 penicillin이나 streptomycin을 濫用한 것이 그 원인으로 생각된다.

수정란 이식 및 정액 제조에 사용되는 배지에 이러한

Table 3. The antibiotic sensitivity assay to bacteria isolated from the intravagina of dairy cattle

Bacteria	Head(%)	Antibiotics							
		P	SM	CM	GM	K	TM	SD	CF
<i>E. coli</i>	38(33.6)	3	2	8	9	4	3	6	3
<i>Streptococcus</i>	17(15.0)	—	1	4	3	3	5	—	1
<i>Proteus</i>	12(10.6)	1	—	—	3	4	2	2	—
<i>Staphylococcus</i>	9( 8.0)	1	1	2	1	1	—	—	3
<i>Salmonella</i>	8( 7.1)	1	—	2	3	1	—	—	1
<i>Micrococcus</i>	8( 7.1)	—	—	—	2	4	1	—	1
<i>Corynebacter</i>	6( 5.3)	—	1	—	1	2	2	—	—
<i>Alkaligens</i>	5( 4.4)	1	—	1	—	1	—	1	1
<i>Shigella</i>	4( 3.5)	—	—	1	2	—	1	—	—
<i>Bacillus</i>	3( 2.7)	—	—	1	—	—	1	—	1
<i>Entrobacter</i>	3( 2.7)	—	—	—	1	1	—	1	—
<i>Total</i>	113 (100)	7 (6.2)	5 (4.4)	19 (16.8)	25 (22.1)	21 (18.6)	15 (13.3)	10 (8.8)	11 (9.7)

여건을 감안하여 우리나라에서는 수정란 이식 및 精液 製造用 배지에 사용할 항생물질은 gentamycin 이나 chloramphenicol 의 사용이 권장되며 채란전과 수정란의 이식전 Donor 와 Recipient 의 膺에 이러한 항생물질의 적용이 자궁내 오염을 예방할 수 있는 방법이라 생각된다.

#### 4. Flushing medium 의 감염 유무에 따른 회수란의 성상

채란에 사용된 난자 회수용 배양액을 이용하여 자궁

내 세균감염이 난자의 회수율과 배발달에 미치는 영향은 Table 4에서 보는 바와 같이 황체수에 대한 난자 회수율은 71.4%로 鄭 等(1983)의 59.5%, Testard 와 Godard-Siour(1975)의 43%, Ayalon 等(1976) 69%보다 높은 회수율을 나타내었고 두당 평균 회수 난자수는 鄭 等(1983)의 4.8개, Ayalon 等(1976)의 4.3개, Betteridge 等(2980)의 4.8개보다 다소 많은 5.2개였으나 Rowe 等(1976)의 6.3개, Elsdén 等(1976)의 6.9개, Schneider 等(1980)의 9.9개보다는 적은 결과이었는데 이러한 차이는 채란기술 및 숙련도

Table 4. The number of embryo recoverd and colony in flushing medium

Donor	No. of corpus luteum	No. of embryos recovered				Recovery rate (%)	No. of colony
		Normal	Abnormal	Total			
푸른 102	6	3	1	4	67	3	
푸른 98	11	5	2	7	63	9	
푸른 61	7	4	1	5	71	—	
푸른 7	5	1	4	5	100	32	
Total	29	13	8	21	72.4		

에도 차이가 있었으나 본 연구에서는 공시동물이 4두로 적은 숫자이었으므로 유의성을 찾기는 어려웠다. 그러나 flushing medium으로 자궁내 세균오염 유무를 확인한 결과 푸른 61호를 제외한 3두의 Donor에서 colony가 확인되었다. 특히 푸른 7호에서는 회수액의 육안적 소견에서 혼탁했으며 자궁점액에 농포가 인정되었고 colony는 다른 개체보다 3~10배가 많은 32개로 확인되었다. 이러한 결과는 Donor의 선발시 직장검사로 촉진할 수 없을 정도로 輕度の 자궁내막염이었거나 인공수정시 오염된 세균의 단순한 증식으로 생각된다.

세균의 감염이 가장 심한 푸른 7호에서 난자의 회수율은 100%로 5개의 난자를 회수하였고 5개중 1개는 미수정란이었으며 3개는 비정상적인 배발달 및 발육중지였고 1개는 정상란이었다. 그러나 세균의 오염도가 낮은 푸른 102호는 4개중 1개, 푸른 98호는 7개중 2개, 푸른 61호는 5개중 1개가 비정상란으로 확인되었다. 이러한 결과는 Donor의 자궁내 세균감염은 수정란의 회수율에는 아무런 영향을 미치지 못하나 배발달에는 큰 영향을 미치는 것으로 이는 수정란이 자궁 선단으로 이동하는 시기에 자궁이 progesterone의 지배하에 놓이게 되므로 어떠한 경로이거나 오염된 세균이 자궁내에서 병변을 형성하지 않는다고 할지라도 단순한 세균의 증식만으로도 수정란에 불리한 자궁환경을 제공하는 것이 배발달을 저해하는 요인이라 판단된다.

### 5. Flushing medium의 抗生劑 耐性 檢査

난자 회수용으로 사용된 배지의 항생물질 내성검사 결과는 Table 5와 같이 streptomycin과 penicillin에는 감수성이 전혀 없는 것으로 나타났고 gentamycin과 chloramphenicol에는 감수성이 높은 것으로 나타났다. 正常牛, 子宮內膜炎牛 및 低受胎牛의 질내 세균총에 대한 항생제 내성검사의 성적과 비슷한

결과로 질내의 세균총이 過排卵 처리후 2~3회의 인공수정시 정액주입기에 오염된 세균이 자궁경을 통과하여 자궁내로 유입된 것으로 추정할 수 있다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 수정란 이식에 사용되는 이식용 혹은 회수용 배지에 사용할 항생물질을 결정하기 위하여 선행되어야 할 조건으로써 當該 牧場에 散在되어 있는 세균총에 대한 항생물질 내성검사이며 그 결과에 따라 항생물질의 종류를 결정하는 것이 체란율 및 수태율을 향상시키는데 큰 효과가 있을 것으로 추정된다.

### 6. 各種 抗生劑 添加가 생쥐 1-세포기 受精卵의 體外 發達에 미치는 影響

세균에 감염된 배양액에 각종 항생제를 첨가하여 수정란의 체외 배양에 미치는 효과를 검토한 결과 Table 5에서 보는 바와 같다. 세균에 감염되지 않은 배양액과 감염된 배양액에 각종 항생제를 첨가한 후 생쥐 1-세포기 수정란의 체외 배양에서 세균에 감염되지 않은 배양액(Control I)의 경우 胚盤胞期로의 배 발생율이 74.0%인 반면에 감염된 배양액에 항생제를 첨가하지 않은 것(Control II)과 kanamycin(0.5g/l), gentamycin(40mg/l), chloramphenicol(0.3g/l) 및 streptomycin(50mg/ml)과 penicillin(75mg/l)을 처리한 각각의 배양액에서 배반포기로의 발달율은 각각 34.0%, 40.0%, 58.0%, 40.0% 및 30.0%로서 세균에 감염되지 않은 배양액에서의 발달율 74.0%에 비해 낮은 성적을 나타내었으므로 세균의 감염이 수정란의 체외배양에 유해한 효과를 나타내는 것으로 판명되었고 또한 항생제별 효과는 gentamycin을 제외한 다른 항생제의 첨가는 난자의 배발달에 유익한 효과를 나타내지 못하는 것으로 판명되었다(p<0.01).

한편 세균에 감염된 배양액에서의 수정란의 생존성을 배양 24시간 간격으로 관찰하였을 때 항생제가 첨가되

Table 5. Results of antibiotic susceptible test in the embryo recovery media

Recipient	Antibiotics							
	P	SM	CM	GM	KM	TM	SD	CF
푸른 102	-	-	+	+	±	+	+	±
푸른 98	-	±	+	+	+	-	-	+
푸른 61	±	±	±	+	+	±	±	+
푸른 7	-	-	±	+	+	±	+	+

Table 6. Effects of various antibiotics *in vitro* culture of mouse embryos

Antibiotic (concentration)	No. of embryos examined <sup>a</sup>	Development stage (%)					No. of embryos degenerated
		2-cell	4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst	
Control I	5.0	41 (80)	40 (80)	40 (80)	38 (76)	37 (74)	13 (26)
Control II <sup>b</sup>	5.0	6 (12)	2 (4)	2 (4)	2 (4)	2 (4)	48 (96)
Kanamycin <sup>c</sup> (0.5g/l)	5.0	23 (46)	21 (42)	21 (42)	19 (38)	17 (34)	33 (66)
Gentamycin <sup>d</sup> (40mg/l)	5.0	36 (72)	33 (66)	31 (62)	31 (62)	29 (58)	21 (42)
Chloramphenicol (0.3g/l) <sup>e</sup>	5.0	31 (62)	27 (54)	23 (46)	20 (40)	20 (40)	30 (60)
Streptomycin + Penicillin G <sup>f</sup> (50mg/l + 75mg/l)	5.0	29 (58)	27 (46)	20 (40)	18 (36)	15 (30)	35 (70)

a : 1-cell stage embryos

b : without antibiotics

c~f : infected medium + added antibiotics

지 않은 Control II의 경우에는 2-세포기로서, 발달부터 그 생존성이 급격히 저하되는 것으로 나타나 세균감염시 항생제를 첨가하지 않을 경우 수정란의 생존성에 심각한 영향을 미치는 것으로 확인할 수 있었다.

또한 항생물질이 첨가된 배양액에서 수정란의 체외발생능을 관찰하였을 때 2-세포기로의 발달율과 桑實胚期로서의 발달율이 급격히 저하되는 것으로 나타나 세균 감염이 着床前에 受精卵의 胚發生중 embryonic genome activation 이 이루어지는 시기 (1-세포기에서 2-세포기), 8-세포기와 桑實胚期사이에서 특히 유해한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

이상의 결과를 미루어 볼 때 세균감염은 생쥐 수정란의 체외발생에 유해한 작용을 나타내며 이때 항생제의 첨가는 이와 같은 유해작용을 다소 억제시켜 주며 특히 gentamycin 의 첨가효과는 다른 어떤 항생제의 첨가 효과보다도 유의하게 높은 것으로 나타나 ( $p < 0.01$ ) 현재 여러 연구실에서 사용되고 있는 penicillin 과 streptomycin 의 혼합첨가보다 양호한 성적을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

#### IV. 摘 要

受精卵 移植時 子宮 및 膻의 細菌汚染이 胚發達에 미치는 影響을 研究하기 위하여 3년간 건국대학교 축산대학 부속 동물병원에 의뢰한 외래환축중 번식장애 유우

592頭를 대상으로 疾病發生 現況을 調査하고 생식기에 감염되어 있는 세균의 분포상황을 알아보기 위하여 卵巢疾患과 子宮疾患을 病類別로 區分하여 繁殖障害牛의 膻內細菌을 分離 同定하여 抗生物質의 感受性 檢査를 실시하였다.

수정란의 회수, 미세조작, 체외배양에 이용된 기초 배양액에 세균의 감염과 항생물질의 첨가가 배발달에 미치는 영향에 관한 실험의 결과는 다음과 같다.

1. 繁殖障害牛: 592두중 卵巢機能 異常牛가 257두 (43.4%), 卵巢異常과 子宮感染 合併症이 145두 (24.5%), 子宮內膜炎이 106두 (17.9%), 低受胎牛가 71두 (12.0%)의 順으로 나타났다.
2. 膻內細菌은 11種의 細菌 113菌株를 檢出하였고 그중 *E. coli* 가 38菌株 (33.6%)로 가장 많았으며, 이것은 子宮內膜炎에서 11균주 (29.7%), 저수태우에서 12균주 (31.6%)로 가장 많이 검출되었다.
3. 질내 세균의 항생물질 감수성은 penicillin 과 streptomycin 에 각각 6.2%와 4.4%가 감수성이 있었고 gentamycin 과 chloramphenicol 에는 22.1%와 16.8%가 감수성 陽性反應을 보였다.
4. 회수액의 세균오염율은 75%이었으며 감염 정도가 심한 개체에서는 회수된 난자의 80%가 비정상적인 배발달임을 확인하였다.
5. 난자 회수용 배지의 항생제 내성검사 결과는 streptomycin 과 penicillin 에 대한 感受性은 전혀



없고 gentamycin 과 chloramphenicol 에 높은 감수성을 갖는 것으로 나타났다.

6. 생취 1-細胞期 수정란이 세균에 감염된 배양액에 항생제를 첨가하지 않은 것(Control II)과 kanamycin(0.5g/l), gentamycin(40mg/l), chloramphenicol(0.3g/l) 및 streptomycin(50 mg/l)과 penicillin(75mg/l)을 混合添加한 培養液에서 胚盤胞로의 發達率은 各各 34.0%, 40.0%, 58.0%, 40.0% 및 30.0%를 나타내었다.

## V. 引用文獻

1. Alcamo, E. 1983. Fundamentals of Microbiology. Addison-Wesley Publishing Co.
2. Ayalon, N. 1978. A review of embryonic mortality in cattle. J. Reprod. Fert., 54 : 483-493.
3. Ayalon, N., Y. Krieger and I. Lewis. 1976. Nonsurgical ova recovery of late blastocysts in cow. Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. I. Krakow. 3 : 233-236.
4. Betteridge, K.J., M.D. Eaglesome, G.C.B. Randall and D. Mitchell. 1980. Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16 days after oestrus. J. Reprod. Fertil., 59 : 205-216.
5. Brand, M.P. et al. 1976. Birth of twin calves following a single transcervical non surgical egg transfer technique. Vet. Rec., 99 : 274-275.
6. Boyd, H. 1965. Embryonic death in cattle, sheep and pigs. Vet. Bull., Weybride. 35 : 251-266.
7. Brand, A., J.W. Gunnink, M. Drost, M. H. Aarts and C.H.W. De Bois. 1976. Non-surgical embryo transfer in cattle. II. Bacteriological aspects. In Egg Transfer in Cattle. L.E.A. Rowson(Ed.). Commision of European Communities, Luxemburg, EUR. 5491, pp.57-66.
8. Elsdon, R.P., J.F. Hasler and G.E. Seidel, Jr. 1976. Non-surgical recovery of bovine eggs. Theriogenology, 6(5) : 523-532.
9. Finegold, S.M. and E.J. Baron. 1986. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. The C.V. Mosby Company.
10. Lamming, G.E. and L.E.A. Rowson. 1953. Ovarian hormones and uterine infection in cattle. Proc. R. Soc. Med., 46 : 387-392.
11. Maurer, R.R. and J.R. Chenault. 1983. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. J. of Anim. Sci. 56(5) : 1186-1189.
12. Quinn, P., C. Barros and D.G. Whittingham. 1982. Perservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. J. Reprod. Fert. 66 : 161-168.
13. Rowe, R.F., M.R. Del Campo, C.L. Eilts, L.R. French, R.P. Winch and O.J. Ginther. 1976. A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. Theriogenology, 6(5) : 471-483.
14. Rowson, S.J. 1972. Veterinary Obstetrics and Genital Disease. Edward and Brothers. Inc., p.459.
15. Schneider, H.J., R.S. Castleberry and J. L. Griffin. 1980. Commercial aspects of bovine embryo transfer. Theriogenology. 13(1) : 73-85.
16. Seidel, G.E. Jr. et al. 1975. Fertility of heifers with sham embryo transfer through the cervix. Vet. Rec., 97 : 307-308.
17. Singh, E.L., F.C. Thomas, G. Papp-Vid, M.D. Eaglesome and W.C.D. Hare. 1982. 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. 18(2) : 133-140.

18. Sreenan, J.M. and M.G. Diskin. 1983. Early embryonic mortality in the cow; its relationship with progesterone concentration. *Vet. Rec.*. 112: 517-521.
19. Testard, J. and C. Godard-Siour. 1975. Transvaginal recovery uterine eggs in the cow. *Theriogenology*. 4(5) : 157: 161.
20. 金子一幸, 吉原進平. 1983. 發情期の子宮頸管粘液中の白血球による子宮内膜炎の診斷について. *家畜診療*. 227: 31.
21. 鄭柄鉉. 1985. 乳牛의 繁殖障碍 發生率과 繁殖障碍牛의 腔内細菌叢에 관한 調査研究. *大韓獸醫師會誌*. 21:740-747.
22. 鄭吉生, 李勳宰, 朴欽大, 鄭柄鉉, 柳承煥. 1983. 受精卵 移植에 의한 牛의 雙胎誘起에 관한 研究. *韓畜誌*. 25(5) : 413-417.
23. 鄭柄鉉. 1985. Prostaglandin  $F_2\alpha$ , GTH 및 Antibiotics의 투여가 Repeat breeder의 치료에 미치는 영향. *한국가축번식연구회보*. 9: 66-71.