

생분해성 iodophor microsphere 함유 유두침지 소독제의 건유기 젖소에서의 유방내 신규감염 예방 효과

황철용 · 김종민 · 윤화영 · 韓 博¹ · 한홍율*

서울대학교 수의과대학

¹중국 농업대학교 동물의학원

(제재승인: 2003년 12월 30일)

Effects of teat dipping disinfectant containing biodegradable iodophor microspheres on preventing dry period intramammary infection in dairy cows

Cheol-Yong Hwang, Jong-Min Kim, Hwa-Young Youn, Bo Han, and Hong-Ryul Han*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

¹College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 10094, China

(Accepted: December 30, 2003)

Abstract : 1% iodophor loaded microspheres of PLGA (Poly[DL-Lactide-co-Glycolide]) were prepared by solvent evaporation method and were applied to the cows on dry period for evaluating it's preventive effects on intramammary infections. The morphology of the microspheres were evaluated using scanning electron microscopy and their releasing patterns were investigated. On investigating idophor releasing patterns of the microsphere, burst releasing pattern was detected until 2 days after in vitro incubation and sustained releasing was observed until 4 weeks. In field trial of teat dipping solution containing idophor loaded microspheres in dry cows showed significant preventive effects of intramammary infection caused by *S. aureus*, *S. agalactiae*, coagulase negative Staphylococci and coliform bacteria ($p<0.05$).

Key words : microsphere, teat dipping solutin, iodophor, dairy cow

서 론

젖소 유방은 유방염을 야기하는 원인균들이 유두관이나 유두 또는 유방에 생긴 상처를 통해 유선 내에 침입함으로써 유선 조직에 염증이 생긴 상태를 말하며 발열, 식욕감퇴 증상과 함께 산유량 감소, 유질 저하를 일으켜 막대한 경제적 손실을 야기하는 가장 중요한 젖소 질병중 하나이다 [4].

유방염 관리 기본 원칙은 이미 감염된 분방의 치료를 통한 감염 수준의 감소와 신규 감염의 예방이 주가 된다는 사실하에 건유 기간 동안 항생제 연고 주입에 의한 유방염 치료 및 신규감염 예방에 관한 사항들이 권장되고 있으나 다수의 연구자들은 또한 유두 피부 표면

의 세균 존재 정도 또한 유방염 발생과 관계가 있기에 유두침지 소독의 중요성도 강조하고 있다 [14, 24, 26].

유두 침지는 유두 피부 표면에 있는 유방염 원인균을 감소시켜 유방염 발생을 예방할 수 있는 간단하면서도 효과적이고 경제적인 방법으로 특히 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)나 *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*)와 같은 전염성 유방염균에 의한 유방내 신규 감염을 예방하는데 매우 효과적인 방법으로 보고되고 있다 [6, 15, 17-19, 23]. 현재 널리 사용되고 있는 유두 침지제 성분인 iodine은 광범위 살균제로서 유방염을 일으킬 수 있는 모든 세균들에 빠르고 효과적으로 살균력을 발휘한다. 그러나 iodine은 그 자체만으로는 물에 녹지 않기 때문에 세정성분 또는 surfactant와 결합된 형태인 iodophor

*Corresponding author: Hong-Ryul Han
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: 82-2-880-1279, Fax: 82-2-875-5588, E-mail: hrhan@snu.ac.kr]

를 사용하고 있는데 이 때 사용되는 세정성분으로 인해 유두 피부의 지방이 제거되어 피부 손상을 야기할 위험성이 존재한다. 그러나 glycerin이나 propylene, lanolin과 같은 피부 보습제를 2~10% 농도로 첨가하게 되면 피부를 보호하는 보호제로 작용하게 되는데 특히 한냉 견조하며, 바람이 많이 부는 지역에서 유두 피부를 보호하는 데 효과적인 것으로 보고되고 있다 [16].

지속형 제어 방출 시스템은 치료 유효 농도 내에서 약물을 지속적으로 방출하여 작용 부위로 효과적으로 약물을 수송하는 방법으로 작용 부위에 직접 적용할 수 있는 시스템을 설계할 경우 약물 요법의 국소화를 이루어 약물의 생체 이용률을 극대화하고 부작용을 최소화할 수 있는 것으로 보고되고 있다 [9]. 이러한 제어 방출형 시스템의 하나로는 중합체를 이용한 봉입형 depot 시스템이 있는데 이는 중합체 막 내에 약물을 봉입시킨 microcapsule 형과 중합체 매트릭스 구조내부에 약물 입자를 균일한 상태로 분산시킨 매트릭스형으로 분류할 수 있다 [3].

효과적인 유방염 발생 예방을 위해서는 특히 유방염의 발생율이 높은 분만전 2주와 건유후 2주간의 관리가 중요하다 [20]. 특히 건유기는 젖소의 유방염 치료 및 신규 감염 예방에 매우 중요한 시기로 유방내 항생제 연고 주입과 함께 유두 침지를 동시에 실시할 것을 권장하고 있다. 그러나 건유기 젖소에 매일 유두 침지를 실시하는 것은 현실적으로 불가능하기에 실제 목장에서는 제대로 실행되지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 장기간의 살균력 유지를 목적으로 지속형 제어 방출 시스템의 하나인 microsphere 제조기술을 이용한 새로운 형태의 지속형 유두침지제를 제조하여 microsphere의 iodophor 방출 양상 및 건유기 젖소에 적용시의 실제 유방내 신규감염 예방 효과 정도를 알아보려 하였다.

재료 및 방법

Microsphere의 제조 방법

Iodophor를 포함하는 microsphere는 solvent-evaporation 방법에 의해 제조하였다 [3]. Dichlormethane 50 mL에 65:35 PLGA (poly[DL-lactide-co-glycolide]), 분자량 40,000~70,000, Sigma Chemical Co., U.S.A.) 2.5 g을 녹인 5%(w/v) 고분자 용액을 제조한 후 이 고분자 용액 50 mL에 1% iodophor (유효 iodine으로 11.7%, Sigma Chemical Co., U.S.A.) 용액 5 mL을 가하여 homogenizer (IKA-T-25 BASIC, IKA LABORTECHNIK D2M-M)로 15,000 rpm의 속도로 5분간 교반하여 균질한 용액 상태로 만들었다. 이 용액을 다시 1% PVA (poly[vinyl alcohol], 분자량 30,000~70,000, Sigma Chemical Co., U.S.A.) 용액 1 L에 가한 후 다시 15,000 rpm으로 5분간 2차 교반하

였다. 유기 용매인 dichlormethane을 증발시키기 위해 2차 교반한 용액을 중류수 2 L에 가하여 자석 교반기로 200 rpm의 속도로 8시간 동안 교반하였다. 고화된 microsphere는 원심분리하여 채취하였으며 중류수로 3회 세척 후 동결 견조하여 분말상의 미립자를 획득하였다.

제조된 microsphere의 수득율은 전체 사용된 고분자 물질의 질량에 대한 제조된 microsphere의 무게의 비율로 산출하였다.

Microsphere의 형태 관찰

제조된 microsphere의 표면 특성 및 크기, 시간에 따른 봉괴상 등을 관찰하기 위해 주사전자현미경 (scanning electron microscopy, JSM-5410LV, JEOL, Japan)을 이용해 관찰하였다.

Microsphere의 내장을 판정

제조된 microsphere 10 mg을 0.1 N Sodium hydroxide/5% SDS 용액 1 mL에 가하여 용해시켰는데 용해되지 않은 경우에는 50°C로 가온 처리하여 용해시켰다. 용해된 액을 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액의 흡광도를 spectrophotometer (U-1100, Hitachi, Japan)를 이용해 265 nm 파장에서 측정하여 내장된 iodophor의 양을 결정하였다. Iodophor의 양은 1% 용액의 흡광도에 대한 비율로 산출하였다.

Microsphere의 iodophor 방출양상 관찰

30 mg의 microsphere에 phosphate buffer solution (PBS, pH7.4) 5 mL를 가하여 37°C 항온수조에서 75 rpm으로 교반을 실시하여 microsphere의 봉괴를 유도하고 iodophor 방출 정도를 관찰하였다. 반응 후 1일, 2일, 4일, 7일, 이후에는 일주일에 1회씩 4주 동안 반응시료를 원심 분리해 채취하고, 채취된 상층액의 흡광도를 265 nm 파장에서 측정하여 반응 시간에 따른 흡광도의 변화정도를 기록하였다.

제조된 iodophor 함유 Microsphere 를 침가한 유두 침지제의 효과판정

젖소 사육목장 두곳에서 사전 검사를 통해 유방염 원인균에 감염되어 있지 않은 것으로 판정된 총 167두의 홀스타인 젖소를 선별하여 유두침지제의 효과판정 야외 실험에 이용하였다.

Split-udder experimental design법 [20]에 의해 동일 젖소에서 좌측 전후 분방은 처치 분방군으로, 우측 전후 분방은 대조 분방군으로 정하였다. 처치 분방군은 건유 시작 직전의 마지막 착유후 iodophor 평균 내장율이 60% 대인 microsphere가 0.5%, glyderin이 10% 함유된 1%

Table 1. Vermont teat skin and teat end evaluation system

TEAT END CONDITION SCORING	
0	Teat end has been subjected to physical or chemical injury(e.g. stepped on or frostbitten) not related to treatment or the quarter is nonlactating.
1	Teat end sphincter is smooth with no evidence of irritation.
2	Teat end has a raised ring.
3	Teat end sphincter is roughened with slight cracks but no redness is present.
4	Teat end sphincter is inverted with many cracks, giving a “flowered” appearance. Teat end may have old but healing scabs.
5	Teat end is severely damaged and ulcerative with scabs or open lesions. Large or numerous warts are present that interfere with teat end function.
TEAT SKIN CONDITION SCORING	
0	Teat skin has been subjected to physical injury(e.g. stepped on or frostbitten) not related to the treatment or the quarter is nonlactating.
1	Teat skin is smooth and free from scales, cracks, or chapping.
2	Teat skin shows some evidence of scaling.
3	Teat skin is chapped. Some small warts may be present.
4	Teat skin is chapped and cracked. Redness, indicating inflammation, is present. Numerous warts may be present.
5	Teat skin is severely damaged and ulcerative with scabs or open lesions. Large or numerous warts are present that interfere with teat end function.

iodophor 용액으로 유두 침지를 실시하였으며 대조 분방 군은 glycerin이 10% 함유된 1% iodophor 용액으로 유두 침지를 실시하였다. 모든 분방에는 유두침지 직전 cloxacillin 함유 건유기용 유방연고 (크록사겔 500®, Virbac, France)를 투여하였다.

처치 분방군과 대조 분방군의 분방 모두에서 분만에 정 1일전, 분만 직후 무균적인 방법을 통해 유즙을 채취하였으며 채취된 유즙은 5% calf blood와 0.1% esculin 이 첨가된 혈액배지에 도말해 37°C로 48시간 배양하여 세균 감염 여부를 조사하였다. 채취된 두번의 유즙 모두에서 주요 유·병원 원인균이 동정된 경우에는 건유기간 동안 신규감염이 이루어진 것으로 판정하였다.

사용된 유두 침지제에 의한 피부 자극 여부를 판단하기 위해 유두 침부와 유두 피부의 상태를 Vermont 대학교에서 개발된 subjective scoring system에 근거하여 분만 직전에 평가하였다(Table 1).

통계분석

처치 분방군과 대조 분방군에 적용한 유두 침지제의 건유기 동안의 유방내 신규감염 예방효과를 비교하기 위해 분리된 각 세균별로 신규 감염율의 차이를 SAS 프로그램(release 8.0, SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.)을 이용해 Student's *t*-test 법으로 검정하였으며 *p*<0.05를 유

의한 기준으로 삼았다.

결 과

Microsphere의 형태 관찰

PLGA (65:35, 분자량 40,000-75,000) 2.5 g을 사용하여 Solvent evaporation 방법에 의해 제조된 iodophor loaded microspheres는 1.43 g으로 57.3%의 수득율을 보였다.

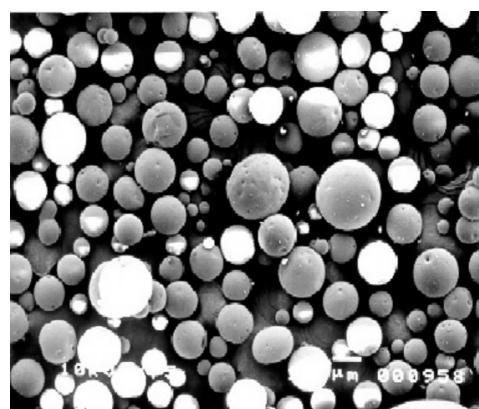


Fig. 1. Scanning electron microscopy photographs for iodophor loaded microspheres ($\times 100$).

Fig. 1은 동결 건조된 microsphere를 주사전자현미경으로 촬영한 사진으로 제조된 microsphere는 구형의 매트릭스형 미립자이며 표면에 작은 소공들이 존재함을 확인할 수 있었다. 제조된 Microsphere의 크기가 균일하지 않았고 주변보다 밝은 부분도 관찰되었다.

Microsphere의 내장을

제조된 microsphere 10 mg을 소화시킨 후 원심분리하여 채취한 상층액의 265 nm 대 파장에서 측정한 평균

Table 2. Iodophor encapsulation efficiency of PLGA microspheres prepared with solvent evaporation method (wave length=265 nm)

Number of sample	Absorbance	Standard absorbance (1 g/100 ml)	Encapsulation efficiency
1	0.47	0.69	
2	0.46		
3	0.51		69.6%

흡광도 값은 0.48로 나타나 1% iodophor 용액의 흡광도 0.69를 기준으로 할 때 제조된 iodophor-loaded microsphere 10 mg의 평균 iodophor 내장율은 69.6%로 나타났다(Table 2).

Table 3. Releasing pattern of iodophor in microspheres expressed by mean absorbance

Time	Mean absorbance
0 day	0.142
1 day	0.474
2 days	0.395
3 days	0.216
4 days	0.206
7 days	0.197
14 days	0.177
21 days	0.292
28 days	0.332

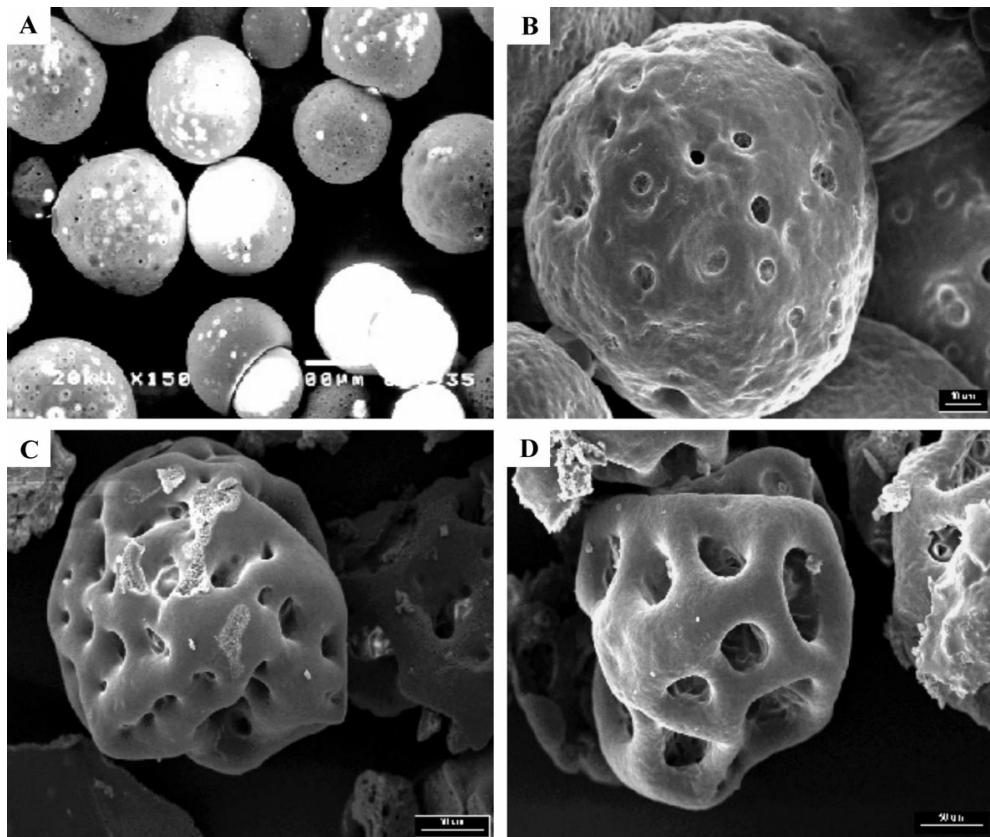


Fig. 2. Scanning electron micrograph showing the change in surface morphology *in vitro* incubation. A : 1day ($\times 150$), B : 1week ($\times 350$). C : 3weeks ($\times 350$), D : 4week ($\times 350$).

Microsphere의 iodophor 방출양상

반응 시간에 따른 흡광도 변화 양상은 초기 2일째까지의 흡광도가 microsphere 용해 시작전의 흡광도에 비해 3배 이상 증가되어 이 시기에 iodophore의 상당량이 대거 방출되는 것으로 나타났다. 또한 용해 시작 후 28 일간의 관찰 기간 중 1주일 간격으로 측정한 흡광도 값도 용해 시작전의 흡광도에 비해 높게 유지됨을 확인할 수 있었다(Table 3).

Fig. 2는 시간별 microsphere의 봉괴상을 주사전자현미경으로 촬영한 것으로 전반적으로 표면의 소공 크기가 시간이 지남에 따라 커짐과 함께 내부 구조도 함께 봉괴되어 감을 확인할 수 있었는데 3주와 4주째 촬영 사진에서는 microsphere의 고분자 물질이 급격히 봉괴되는 양상을 보였다.

제조된 Iodophor 함유 Microsphere 를 첨가한 유두침지제의 효과판정

분만 직전과 분만직후 환경한 치치 분방군과 대조 분방군의 유방내 신규 감염 양상은 Table 3과 같다. *S. aureus* 균은 전체 41개 분방에서 감염이 확인되었는데 치치 분방군은 대조분방군의 32개 분방에 비해 9개 분방만이 감염되어 감염율에 유의성 차이가 인정되었다 ($p<0.05$). *S. agalactiae* 균은 전체 23개 분방에서 신규 감염이 확인되었는데 치치 분방군과 대조 분방군이 각각 5, 18개 분방으로 치치 분방군의 분방내 신규 감염율이 유의성 있게 낮게 나타났다($p<0.05$). Coagulase 음성 *staphylococci*는 전체 59개 분방에서 신규 감염이 확인되었는데 치치 분방군과 대조 분방군의 신규 감염 분방수 가 각각 19, 40개로 역시 치치 분방군의 분방내 신규 감염율이 대조 분방군에 비해 유의성 있게 낮게 나타났다 ($p<0.05$). *S. agalactiae* 이외의 *streptococci*는 전체 12개 분방에서 신규 감염이 확인되었으나 치치 분방군과 대조 분방군 사이의 신규 감염율에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다($p>0.05$). 대장균속균은 치치 분방군 1개 분방, 대조 분방군 7개 분방 등 총 8개 분방에서 신규 감염이 확인되어 치치 분방군의 신규 감염율이 유의성

있게 낮게 나타났다($p<0.05$).

분만 직전의 유두 첨부와 유두 피부 상태를 비교해 본 결과 치치 분방군의 분방들이 대조 분방군의 분방들보다 앙호한 상태임을 알 수 있었다. 유두 첨부 상태는, 치치 분방군의 총 331개 분방 중 대다수인 325개 분방이 정상 상태를 유지하였고, 6개 분방만이 전유 시작시 보다 상태가 악화된 것으로 나타났다. 대조 분방군에서는 총 334개 분방만이 정상 상태를 유지하였으며 103개 분방들은 건유 전 보다 상태가 악화된 것으로 나타났다.

유두 피부 상태는 치치 분방군의 총 331개 분방 중 326개 분방이 정상 상태를 유지하였으며 5개 분방만이 건유 시작시 보다 상태가 악화된 것으로 조사되었다. 대조 분방군은 총 334개 분방 중 261개 분방이 정상 상태를 유지하였으나 73개 분방이 건유 시작때 보다 유두 피부 상태가 악화된 것으로 나타났다.

고 칠

PLGA는 생체적 합성과 생분해성이 유일하게 인정된 고분자로서 copolymer의 비율과 분자량의 조절에 따라 그 생분해 기간 및 약물의 방출을 조절할 수 있을 뿐만 아니라 고분자 부형제의 활성 등에 의해 항원의 효과를 높일 수 있는 장점이 있어 단백항원 함유 미립자 제조에 가장 많이 사용되는 합성 고분자 중 하나이다 [22]. 현재 여러가지 마이크로캡슐화 제조기술 중에서 water-in-oil-in-water (W/O/W) 이중유화법은 PLGA microsphere 내로 단백질과 백신 항원을 봉입하는 방법으로 가장 널리 사용되고 있으며 [1, 12, 25, 27, 28] solvent evaporation 방법은 수용성 약물의 캡슐화에 가장 일반적으로 사용되는 방법이다 [1, 8].

Linhardt [11]는 microsphere에 내재된 약물이 방출되는 기전 중의 하나로 전자현미경 상에서 관찰되었던 microsphere 표면의 소공들을 통한 약물의 확산 이론을 제시하고 있다. 특히 초기의 급격한 방출 양상은 microsphere의 표면이나 표면에서 가까운 곳에 분포하고 있는 약물이 확산에 의해 쉽게 방출되었기 때문인 것으

Table 4. Effects of teat dipping disinfectant for preventing of dry period new intramammary infection in dairy cows

Groups	No. of Quarters	Organism				
		<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>	CNS*	other streptococci	Coliforms
Treatment	331	9 ^a	5 ^a	19 ^a	3	1 ^a
Control	334	32	18	40	9	7
Total	665	41	23	59	12	8

*CNS : coagulase negative *staphylococci* species.

^aStatistical difference from controls ($p<0.05$).

로 여겨진다고 했다. 본 연구에서는 solvent evaporation 방법을 이용하여 iodopore 수용액을 microsphere에 내장하여 제조된 iodophor 함유 microsphere의 *in vitro* 상태 하의 방출 양상을 조사하였는데 초기에 급격한 방출 양상을 나타낸 후에는 4주 이상 지속적으로 서서히 방출되는 양상을 나타내었다. 또한 방출 실험전에 촬영한 주사전자현미경 사진에서 microsphere 표면이 주위보다 밝게 나타난 부분이 있는데 이는 microsphere 표면에 묻은 iodine의 전하 때문으로 사료되며 초기의 급격 방출양상과도 관련이 있을 것으로 여겨졌다. Micosphere의 방출 실험에서 교반 2주, 3주, 4주째 촬영한 주사현미경 사진상에서는 표면의 iodophor가 방출됨으로 인해 주변보다 밝은 부분은 나타나지 않았다. 현재 이러한 초기의 급격한 방출 양상은 약물의 함량이 증가할수록 현저히 증가하는 것으로 보고된 바 있다 [29].

Microsphere에서 약물의 방출은 중합체 매트릭스의 소공을 통한 약물의 확산뿐만 아니라 중합체 매트릭스의 붕괴에 의해서도 이루어지기도 하는데 Heller [7]는 이러한 중합체 매트릭스의 붕괴는 표면에서부터 점차로 일어나는 과정보다는 매트릭스 전체를 통해 일어나는 bulk erosion에 의한 과정이라 보고하고 있다. 본 연구에서도 교반 3, 4주째에는 미약하나마 방출되는 iodophor 양이 증가하는 맥동성 방출이 관찰되기도 하는데 이는 매트릭스 전체의 급속한 붕괴 양상으로 인한 bulk erosion 때문이라 생각할 수 있는데 실제 본 연구에서도 이 시기에 촬영된 붕괴된 microsphere 주사현미경 사진에서도 급속한 붕괴 양상을 확인할 수 있었다.

Microsphere의 제조시 크기 및 입자도, 약물의 내장율, 약물의 방출 등에 영향을 줄 수 있는 여러 요인에 있어서 Jeferry 등 [8]은 PVA의 농도를 증가시키면 평균 입자 크기가 감소한다고 보고하였다. PLGA의 농도가 증가할 수록 입자가 커지며 중합체의 농도가 증가함에 따라 입자의 크기도 증가하는데 이는 고분자 용액의 점도 상승으로 인한 작은 유적의 형성이 어렵기 때문이다. 또한 중합체 양의 증가는 점도의 증가 및 약물 봉입 효율을 증가시키는 것으로 보고되고 있다 [11]. Micosphere 제조시는 교반 속도에 의해서도 크기 및 균질도에 큰 차이가 있는 것으로 보고되고 있다 [11]. 교반 속도를 감소 시켰을 때 평균 입자의 크기가 증가하고 수득율이 감소함을 보이고 있는데 이는 microsphere의 생성 속도가 약물의 봉입율과 microsphere의 수득율에 영향을 미치기 때문이라고 한다. Microsphere 생성되는 속도가 감소할수록 microsphere내로 봉입되지 못하고 수상에 잔류하는 약물의 양이 증가하고 microsphere의 매트릭스 형성에 참여하지 못하는 중합체의 양도 증가하기 때문이다 [29]. 본 연구에서는 microsphere 제조시

1500 rpm 대의 교반 속도를 유지하여 평균 60% 대 내장율을 가진 microsphere를 획득할 수 있었다.

젖소 유방염을 예방하기 위해서는 건유기 동안의 관리가 중요한데 이는 건유기가 유선 조직의 기능 재생과 함께 차기 비유 시작시의 비유 능력을 결정짓는 중요한 시기이기 때문이다. 그러나 건유기는 또한 손상된 유선 조직의 재생 기간과 동시에 유방염 감염율이 가장 높은 기간으로 *S. aureus*균과 *S. agalactiae*균과 같은 전염성 유방염 원인체에 감염되지 않기 위한 특별한 관리가 필요한 시기이기도 하다. 일반적으로 건유기간 동안의 유방염 관리는 이미 존재하는 감염을 제거할 수 있는 기간일 뿐만 아니라 새로운 신규 감염 예방에 정성을 다해야하는 시기로도 이해되고 있다 [5, 14].

수년전부터 유방내 항생제 연고 주입이 젖소 유방염 치료 및 예방에 많은 효과가 있음이 입증되고 있다 [14, 24, 26]. 특히 Kingwill 등 [10]은 항생제 연고 주입과 유두 침지를 함께 적용시는 이들의 단독 적용시보다 유방염 예방 효과가 훨씬 뛰어나다고 보고한바 있다. 특히 재래식의 벗짚 축사 바닥에서 콘크리트 축사 바닥으로 바뀌어 가는 현시점에서 유두가 손상 받을 기회가 많아 침에 따라 유방염에서 가장 문제가 되는 *S. aureus*균의 유선내 감염이 급속히 증가했다는 보고와 체표면의 *S. aureus*균의 증식이 유선 내 *S. aureus*균 감염의 위험성을 증가시킨다는 보고는 건유 기간 동안의 지속적인 유두 침지 필요성을 제시해 주고 있다 [13, 21]. 그러나 국내 대다수의 젖소 사육 목장에서는 실제 건유기 동안 침유를 실시하지 않는 젖소에게는 유두 침지를 실시하지 않고 있다. 그러므로 한번 침지로 유선 조직의 퇴축이 완전히 끝나는 최초 3주간이나 그 이상의 시기가 지날 때까지 살균력을 지속할 수 있는 유두 침지제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 microsphere를 이용하여 장기간 살균력을 유지 할 수 있는 유두 침지제를 제조하였다. 본 연구에서 microsphere에 내장시킨 iodophor는 광범위 살균력을 지니고 있으며 조직 자극성이 없고 고유의 색깔로 인해 침지후 침지 실시 여부를 육안으로 쉽게 확인할 수 있는 장점을 갖고 있어 유두 침지제로 널리 이용되고 있다 [2]. 본 연구에서 제조한 유두침지제를 이용해 아외 실험을 실시한 결과 주요 전염성 유방염 원인균인 *S. aureus*균과 *S. agalactiae*균에 대해 실험군 분방들의 신규 감염율이 대조군 분방들에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며 CNS에 의한 신규 감염도 줄일 수 있는 것으로 나타났다. 그러나 *S. agalactiae* 이외의 기타 *streptococci* 균에 대해서는 유의한 차이가 인정되지 않았다. 환경성 유방염 원인균인 대장균속균에 대해서도 신규 감염을 줄일 수 있는 것으로 조사되었는데 이는 microsphere가

함유된 유두 침지제로 침지 실시시 유두 첨부와 유두 상피 표면에 microsphere가 부착되어 지속적으로 iodophor를 방출하여 살균력을 발휘했기 때문으로 사료된다. 최근 전염성 유방염 뿐만 아니라 대장균성 유방염의 건유기와 초유 초기 감염의 중요성이 증가하고 있다는 보고 [24, 26]는 microsphere를 유두 침지제에 적용한 이번 연구결과들이 의의가 있음을 보여주고 있다.

젖소에서 온도가 낮고 건조하며 바람이 많이 부는 겨울기후에 유두가 노출되었을 경우에는 유두부의 상처 발생율이 높아지고 상처부에서 유래된 세균에 의한 유방 감염이 용이하게 이루어지는 것으로 보고 되고 있다 [20]. 따라서 적당한 피부 보습제의 사용은 유방염 발생 억제에 어느정도 기여 할 수 있다고 알려져 있는데 본 연구에서는 처치 분방군과 대조 분방군 모두 동일 농도의 glycerin이 함유된 유두 침지제를 사용 했음에도 불구하고 iodophor 함유 microsphere를 첨가한 유두 침지제를 적용한 처치 분방군 분방들의 유두 첨부와 유두 상피의 상태들이 대조군 분방들에 비해 양호한 것으로 나타났다. 이는 microsphere에서 지속적으로 방출된 iodophor의 살균 작용으로 유두 피부의 상처 치유가 용이했기 때문으로 추정되며 또한 유방내 신규 감염율을 줄일 수 있었으리라 사료된다.

결 론

건유기 젖소에서 유방내 신규 감염을 예방할 목적으로 지속형 제어 방출 시스템의 한 부류인 서방형 microsphere를 이용한 iodophor 유두 침지제를 제조하고 건유기 젖소에 적용한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 고분자 물질로 65:35 PLGA를 사용해 solvent evaporation 방법으로 제조한 microsphere에 유두 침지제인 1% iodophor 수용액을 내장시킨 결과 제조된 microsphere의 수득율은 57.3%, 내장을 69.6%로 나타났다.
2. 주사전자현미경 촬영을 통해 제조된 microsphere는 구형의 매트릭스형 미립자형태로 표면에 많은 소공이 존재함을 확인하였다. 시간의 경과에 따른 microsphere의 붕괴 모습은 매트릭스 전체를 통해 일어남을 확인할 수 있었고 3주 이후에 급격한 붕괴 양상을 나타내었다. 방출 실험 결과 초기 2일째 까지 급속 방출양상을 보인 후 4주 이상 지속적인 방출 양상을 보였다.
3. Iodophor가 내장된 microsphere를 0.5% 함유한 유두 침지제를 건유기 젖소에 적용한 결과 처치 분방군의 *S. aureus*, *S. agalactiae*, coagulase 음성 *Staphylococci* 균과 대조군속균들에 의한 유선내 신

규 감염율이 microsphere를 함유하지 않은 유두 침지제를 사용한 대조군 분방군보다 유의성 있게 낮게 나타났으며($p<0.05$) 유두 첨부와 유두 피부 상태도 더욱 양호하였다.

이상과 같이 서방형 microsphere에 내장된 iodophor를 함유한 유두 침지제는 유두 표면에서 지속적으로 살균력을 유지하는 새로운 건유기 젖소용 유두 침지제로 이용될 수 있으리라 본다.

참고문헌

1. Arshady, R. Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques : Part III Solvent evaporation. Poly. Eng. Sci. 1990, **30**, 915-924.
2. Boddie, R. L. and Nickerson, S. C. Efficacy of two iodophor postmilking teat germicides against *Streptococcus agalactiae*. J. Dairy Sci. 1990, **73**, 2790-2793.
3. Coti, B., Pavanetto, F. and Genta I. Use of polylactic acid for the preparation of microparticulate drug delivery system. J. Microencapsulation. 1992, **9**, 153-166.
4. Craven, N. Efficacy and Financial Value of Antibiotic Treatment of Bovine Clinical Mastitis during Lactation-a Review. Br. Vet. J. 1987, **143**, 410-422.
5. Dodd, F. H., Westgarth, D. R., Neave, F. K. and Kingwill, R. G. Mastitis - the strategy of control. J. Dairy Sci. 1969, **52**, 689-691.
6. Gottardi, W. Disinfection, sterilization and preservation pp.183, 3rd ed. Lippincott, Philadelphia, 1983.
7. Heller, J. Biodegradable polymers in controlled drug delivery. CSC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems, 1984, **1**, 39-90.
8. Jeffery, H., Davis, S. S. and O'Hagan, D. T. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticle I : Oil-in-water emulsion solvent evaporation. Int. J. Pharm. 1991, **77**, 169-175.
9. Johnson, P. and Lloyed-Jones, J. G. Drug delivery systems, pp. 12-55, 1st ed. Ellis Horwood, England Chicheste, 1987.
10. Kingwill, R. G., Neave, F. K., Dodd, F. H., Griffin, T. K. and Westgarth, D. R. The effect of a mastitis control system of levels of subclinical and clinical mastitis in two years. Vet. Rec. 1993, **87**, 94-98.
11. Linhardt, R. J. Polymers and Aggregate systems, pp. 53-96, VCH Publishers, New York, 1988.
12. Mehta, R. C., Jeyanthi, R. S., Calis, B. C., Thanoo,

- Burton, K. W. and DeLuca, P. P.** Biodegradable microspheres as depot system for parental delivery of peptide drugs. *J. Control Release*. 1994, **29**, 375-384.
13. **Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T. and Huovinen, P.** Association of changes of in bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. *Acta Vet. Scand*. 1994, **35**, 363-369.
14. **Natzke, R. P.** Therapy : one component in a mastitis control system. *J. Dairy Sci*. 1971, **54**, 1895-1898.
15. **Neave, F. K., Dodd, F. H., Kingwill, R. G. and Westgarth, D. R.** Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J. Dairy Sci*. 1969, **52**, 696-702.
16. **Nickerson, S. C. and Stephen, C.** Choosing the best teat dip for mastitis control and milk quality. In Proc of National Mastitis Council Milk Quality Conference. p. 43-54, 2001.
17. **Nickerson, S. C., Watts, J. L., Boddie, R. L. and Pankey, J. W.** Evaluation of 5% and 1% iodophor teat dips on commercial dairies. *J. Dairy Sci*. 1986, **69**, 1693-1698.
18. **Pankey, J. W., Eberhart, R. J., Cuming, A. L., Daggett, R. D., Farnsworth, R. J. and McDuff, C. K.** Update on postmilking teat antisepsis. *J. Dairy Sci*. 1984, **67**, 1336-1341.
19. **Pankey, J. W. and Philpot, W. N.** Hygiene in the prevention of udder infections. I. Comparative efficacy of four teat dips. *J. Dairy Sci*. 1975, **58**, 202-207.
20. **Philpot, W. N. and Nickerson, S. C.** Winning the fight against mastitis. pp. 44-53, 1st ed. Westfalia-Surge Inc, 2000.
21. **Roberson, J. R., Fox, L. K., Hancock, D. D. and Gay, J. M.** Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci*. 1994, **77**, 3354-3364.
22. **Sah, H., Toddywala, R. and Chien, Y. W.** Continuous release of protein from biodegradable microcapsules and in vivo evaluation of their potential as a vaccine adjuvant. *J. Control Release*. 1995, **35**, 137-144.
23. **Schultze, W. D. and Smith, J. W.** Effectiveness of postmilking teat dips. *J. Dairy Sci*. 1972, **55**, 426-431.
24. **Smith, A., Neave, F. K., Dodd, F. H., Jones, A. and Gore, D. N.** Methods of reducing the incidence of udder infection in dry cow. *Vet. Rec.* 1966, **79**, 233.
25. **Sturesson, C., Carl fors, J., Edsman, K. and Andersson, M.** Preparation of biodegradable poly(lactic-co-glycolic)acid microspheres and their *in vitro* release of timolol maleate. *Int. J. Pharm.* 1993, **89**, 235-244.
26. **Urarov, O., Evans, J. M., Marshall, M. and Sizer, D.** Dry cow therapy. *Vet. Rec.* 1967, **81**, 241-243.
27. **Wang, H. T., Schmitt, E., Flanagan, D. R. and Linhardt, R. J.** Influence of formulation methods on the *in vitro* controlled release of protein from poly(ester) microspheres. *J. Control Release*. 1991, **17**, 23-32.
28. **Watts, P. J., Davies, M. C. and Melia, C. D.** Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation; an overview of techniques and applications. CRC. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 1990, **7**, 235-259.
29. **Yong, C. S., Kwon, M. R., Park, S. H. and Oh, D. M.** Preparation and characterization of poly(d,l-lactic acid) microspheres containing alprazolam. *J. Korea Pharm. Sci.* 1996, **26**, 13-22.