

젖소에 있어서 Lipopolysaccharide의 처리가 면역 반응에 미치는 영향

백광수[†] · 박수봉 · 박성재 · 이왕식 · 김현섭 · 정경용 · 기광석 ·
전병순 · 안병석 · 이현준 · M. Ajmal Khan · 김태일

농촌진흥청 축산연구소 낙농과

Effect of Intra-Uterine Lipopolysaccharides Injection on Immunological Response of Uterus in Lactating Holsteins

Kwang-Soo Baek[†], Soo-Bong Park, Seong-Jai Park, Wang-Sik Lee, Hyeon-Shup Kim, Gyeong-Yong Jeong, Kwang-Seok Ki, Byeong-Soon Jeon, Byeong-Seog Ahn, Hyeon-Jun Lee, M. Ajmal Khan and Tae-Il Kim

Dairy Cattle Research Division, National Livestock Research Institute, RDA, Cheonan 330-801, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to determine the immunological response of uterus-induced by Lipopolysaccharides (LPS) in Holstein cows. The LPS isolated from *Bacteroids helcogenes* and *Fusobacterium varium* was injected at the rate of 100 µg with 30 ml of phosphate buffer saline (PBS) in each cow (n=5). Three cows were acted as control. There was no difference in total polymorphonuclear leukocytes (PMNL) concentration in uterine fluid between control and LPS groups at 24, 48 and 72 hrs after LPS treatment. There was significant difference in rate of PMNL between control and LPS groups at 24 (41.7% vs 72.1%), 48 (41.0% vs 81.6%) and 72 hrs (44.3% vs 79.0%) after LPS treatment. There was no difference in PMNL viability between control and LPS groups at 24, 48 and 72 hrs after LPS treatment. There was significant difference in rate of phagocytic PMNL between control and LPS groups at 48 hr after LPS treatment (1.1% vs 7.7%).

(Key words : Holstein, Lipopolysaccharide, *Bacteroids helcogenes*, *Fusobacterium varium*, Polymorphonuclear leukocyte)

요 약

본 연구는 젖소에 있어서 Lipopolysaccharide의 처리가 착유우의 면역 반응에 미치는 영향을 구명하기 위하여 처리구 5두 및 대조구 3두를 공시하여 LPS 처리후 시간의 경과에 따른 PMNL의 비율, PMNL의 생존율 및 탐식 PMNL의 비율 등을 분석하였다. PMNL의 비율에 있어서, 처리전(0시간째)에는 대조구 및 처리구가 각각 41.0% 및 47.2%였으나 24시간째에는 41.7% 및 72.1%, 48시간째에는 41.0% 및 81.6%, 72시간째에는 44.3% 및 79.0%로 24시간째, 48시간째 및 72시간째에 공히 처리구가 대조구에 비하여 유의적($p < 0.01$)으로 높은 경향을 나타내었다. 대조구와 처리구의 PMNL의 생존율은 처리시간에 따른 차이가 없었다. 탐식 PMNL의 비율에 있어서, 처리전(0시간째) 및 처리 후 24시간째에는 대조구와 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 48시간째에는 각각 1.1% 및 7.7%로 처리구가 대조구에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 높은 경향을 나타내다가 72시간째에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

서 론

분만 후 1~2주 동안은 *E. coli*와 같은 Gram-negative 통성 혐기성 균이 자궁 내에 존재하고 분만후 2주부터는 *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacteroids*, *Fusobacterium*와 같은 Gram-negative 혐기성 균들이 존재하게 된다(Ahlers와 Grunert, 1993; Dohmen 등, 1996). 특히 후산정체와 난산은 분만후 번식능력에 악영향을 미치고 자궁 감염을 용이하

게 한다(Corea 등, 1993; Mellado와 Reyes, 1994; Kanee-ne 등, 1995; Laven과 Peters, 1996). 그러나 정상적인 자궁은 분만후 박테리아 침입에 대한 방어 기구를 가지고 있는데(Jainudeen 등, 1993) polymorphonuclear inflammatory cells(PMNs)이 질이나 자궁강으로 유입되어 자궁 내를 감염시키는 미생물들을 탐식함으로써 방어적인 기능을 한다고 알려져 있다(Hill 등, 1976; Hussain과 Daniel, 1992; Dhaliwal 등, 2001).

분만 후 경산우나 미경산우가 정상적인 발정 주기를

[†] Corresponding author : Phone: +82-41-580-3386, E-mail: bks@rda.go.kr

가지고 있고 표면적인 임상 조사에서 정상적임에도 불구하고 3회 이상 종부를 시켜도 임신이 되지 않은 경우가 흔히 있는데 이에 대한 요인으로서 영양, 대사성 질병, 호르몬 장애, 자궁 감염, 조기배 사멸, 축사 수용 시설, 발정 발견의 효율성, 수정 과정, 환경 등과의 관련성을 지적하고 있다(Lafi S와 Kaneene S, 1988; Lafi와 Kaneene, 1992). 특히 세균성으로 인한 자궁 감염은 저수태우의 주된 원인이 되는데(Singh 등, 2000) Semambo 등(1992)은 *Actinomyces pyogenes*를 접종후 4시간 만에 자궁으로부터 수정란이 분리되어 배 사멸이 일어난 것을 확인하였고 Peter와 Ball (1997)도 *Campylobacter fetus venerealis*가 번식장애 및 배 사멸의 원인이 된다고 보고하였다. 분만 후 자궁 내에 병원성 및 비병원성 박테리아가 존재하면 자궁정복이 35일 이상으로 소요되기도 하고(Ahmad 등, 1985; Khan 등, 1985) 어떤 미생물들은 자궁의 방어 기구를 무력화시킴으로써 자궁내막염을 일으키고, 이 미생물들의 활동과정에서 생성되는 대사성 산물 및 염증성 분비물로 인하여 자궁내 환경이 변화됨으로써 수태를 방해하게 된다(Akhtar와 Singh, 1979). 자궁내막염의 수태율 향상을 위하여 povidone-iodine(Nakao, 2006) 및 항생제(Gupta 등, 1983) 등이 주로 사용되어 오고 있으나 약제에 따라서는 오히려 좋지 않은 영향을 미치는 경우가 있다(Nakao, 2006).

Targowski(1984) 및 Hussain과 Daniel(1992)은 *E. coli* LPS 100 μ g을 정상적인 소에 처리하여 처리후 6시간 및 24시간째에 PMN의 수가 증가하는 것을 확인하였고 Dhalliwal 등(1998)은 혼탁한 질점액이 나오는 저수태우에 *E. coli* LPS를 처리한 결과 모두 수태되었다고 보고하였다. Singh 등(2000)도 항생제가 주로 임신을 방해하는 작용을 하는 미생물에 대한 감염을 방어하는데 사용되지만 bacteria에 대한 저항성을 키우고 고비용이며 자궁의 방어 기구를 약화시키는 단점을 가지고 있기 때문에 대체요법으로서 자궁내 *E. coli* lipopolysaccharide(LPS) 사용이 가능함을 시사하였다. 이와 같이 LPS는 사람이나 동물에 감염되면 병을 일으키는 endotoxin의 원인물질이기도 하지만 감염 저항성 증가, 비특이적 감염 방어, 면역 부활작용 등 생물에게 유익한 생화학적 특성이 있다고 알려져 있어 항생제 대체물질로서 많은 연구가 활발하게 시도되고 있다(류 등, 1991). 따라서 본 연구에서는 LPS의 처리가 자궁내 면역 반응에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

균 분리 및 동정

균 분리 동정을 위하여, 도축장으로부터 수송한 자궁내막의 시료를 1 cm \times 1 cm로 채취하여 혐기상태에서 거품이 생길 때까지 vortexing한 후 균액 300 μ l를 뽑아 혐기 배지에 도말하였고 도말한 plate는 37 $^{\circ}$ C 혐기 chamber에서 24시간 배양하였다. 혐기배지에서 자란 균의 colony를 따서 Mac, BHI+B, BHI 배지에 배양한 후 Gram stain을 실시하였고 BHI 배지에서 자란 균의 colony를 따서 BUA+B 배지에 계대배양하였으며 BUA+B 배지에서 자란 균중에 가장 마지막으로 자란 균을 따서 AN-IF에 넣고

탁도를 63%T로 맞춘 후 Biolog용 AN micro plate에 100 μ l씩 분주하였다. 분주한 plate를 37 $^{\circ}$ C 혐기 chamber에서 20~24시간 동안 배양한 후 Biolog(Microstation, USA)를 실시하여 6두의 비정상자궁에서 공통적으로 존재하는 미생물인 *Bacteroides helcogenes*와 *Fusobacterium varium*을 검출하였다.

LPS 제조

시료의 UV 측정을 위하여, Sonic Processor(GEX-400, USA)로 세포를 분쇄하였고 분쇄한 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 10,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 0.45 μ m 필터로 여과한 다음 여과액을 취하여 UV로 standard(*E. coli* serotype O26 B6 LPS, Sigma)와 sample (10배 및 20배 희석액)을 측정하여 *E. coli* LPS와 동일한 역가를 가지도록 조정하여 *Bacteroides helcogenes*와 *Fusobacterium varium*으로부터 50 μ g/ml의 lipopolysaccharide를 제조하였다(Fig. 1 및 Fig. 2).

LPS 처리 및 관류

LPS 처리후 번식성적을 조사하기 위하여 2회 이상 인공수정을 실시하여도 수태가 되지 않은 개체를 대상으로 대조구 3두 및 처리구 5두를 공시하였다. 처리구는 Singh 등(2000)의 방법에 따라 *Bacteroides helcogenes*와 *Fusobacterium varium*으로부터 분리한 LPS 100 μ g을 PBS 용액 35 ml에 희석하여 수정란 이식용 카테타로 자궁 내에 무균상태를 유지하면서 주입·관류하였고, 대조구는 PBS 용액 35 ml만을 주입하였다.

PMNL 분석

세균 배양은 자궁 세척액을 Sabouraud dextrose agar에 멸균면봉으로 spread하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 배양하여 colony가 자랐을 때 pure culture하여 세균을 동정하였고 자궁세척액 중의 세균수는 채취액을 10배 희석하여 colony를 세어서 계산하였다. 총 백혈구수(total leucocyte count)는 Eppendroff tube에 자궁세척액과 Türk solution을 1:3으로 희석하여 적혈구를 용혈시킨 후 Hemocytometer 4개의 large square에서 전체 백혈구를 세어 계산(백혈구 수 \times 10 \times 1000=백혈구수/ml)하였다. PMNL viability test는 자궁세척액과 Trypan blue(0.4%)를 slide 위에서 1:1로 혼합하여 건조시키지 않은 상태로 microscope에서 세포를 관찰하였고 stain되지 않은 것은 살아 있다고 판정하고 blue stain된 것은 죽은 것으로 판정하여 전체 100개의 PMNL을 세는 동안 살아 있는 PMNL의 수를 세었다. PMNL수는 자궁세척액을 1,500 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 따르고 침전물을 slide에 도말하여 Diff-Quik으로 염색하여 현미경(유침시야 1,000배)으로 전체 100개의 백혈구를 세는 동안 PMNL(neutrophil)을 세었다. PMNL의 탐식능력 시험(phagocytic activity test)을 위하여, 멸균 거즈로 자궁세척액을 걸러서 혈액액고 덩어리나 debris를 제거한 다음 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 따라 내었다(filtering). Cornical tube에 NH₄Cl을 자궁세척액과 1:1로 희석하여 적혈구를 용혈시킨 다음 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 cell을 가라 앉혔고 적혈구가 계속 남아 있으면 다시 한번 더 위의 과정을 반복하였다(적혈구 용혈). 상층액을 모

두 버리고 cell을 FCS가 0.5% 들어 있는 RPMI 1640 배양액 1 ml에 부유시킨 다음 cell의 수가 1×10^6 개 정도가 되도록 농도를 조절하였다(세포의 부유). 형광물질과 결합된 latex bead 10 μ l와 세포 부유액 1 ml를 24 multi-well에 주입한 다음 CO₂ incubator에서 1시간 동안 배양하여 eppendroff tube에 옮겨 담고 0.11% EDTA 함유된 PBS buffer(약 500 μ l)로 바닥의 cell을 씻어내어 같이 담은 후 원심분리(4°C, 1,600 rpm, 5분간 두 번 정도)로 cell을 가라앉혀 100~300 μ l의 PBS에 재부유시켰고 조각어름을 담은 상자에 넣어 phagocytosis 반응을 정지시킨 다음 Flow cytometry를 이용하여 탐식세포의 탐식능을 측정하였다(phagocytotic activity 측정).

통계분석

본 연구에서 얻어진 실험 자료의 통계처리는 MINI-TAB™ 을 이용하여 평균간의 유의성을 검정하였다.

LPS 처리후 총백혈구수는 Table 1에서 보는 바와 같다. 처리전(0시간째)에는 대조구 및 처리구가 각각 $3.3 \pm 1.5 \times 10^4$ /ml 및 $3.0 \pm 0.7 \times 10^4$ /ml, 24시간째에는 6.0×10^4 /ml 및 10.3×10^4 /ml, 48시간째에는 5.0×10^4 /ml 및 29.8×10^4 /ml, 72시간째에는 7.3×10^4 /ml 및 13.2×10^4 /ml로 처리후 24, 48 및 72 시간째에 처리구가 대조구에 비하여 높은 수준으로 유지되었으나 개체간의 변이가 큰 관계로 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

PMNL의 비율은 Table 2에서 보는 바와 같이 처리전(0시간째)에는 대조구 및 처리구가 각각 41.0% 및 47.2%였으나 24시간째에는 41.7% 및 72.1%, 48시간째에는 41.0% 및 81.6%, 72시간째에는 44.3% 및 79.0%로 24시간째, 48시간째 및 72시간째에 공히 처리구가 대조구에 비하여 유의적($p < 0.01$)으로 높은 경향을 나타내었다.

PMNL의 생존율은 Table 3에서 보는 바와 같이 처리전(0시간째)에는 대조구와 처리구가 각각 55.3% 및 42.9%였고 24시간째에는 82.7% 및 73.0%, 48시간째에는 94.3% 및 91.6%, 72시간째에는 75.3% 및 66.6%로 시간이 경과함에 따라 대조구와 처리구간에 유의적인 차이를 나타내

결 과

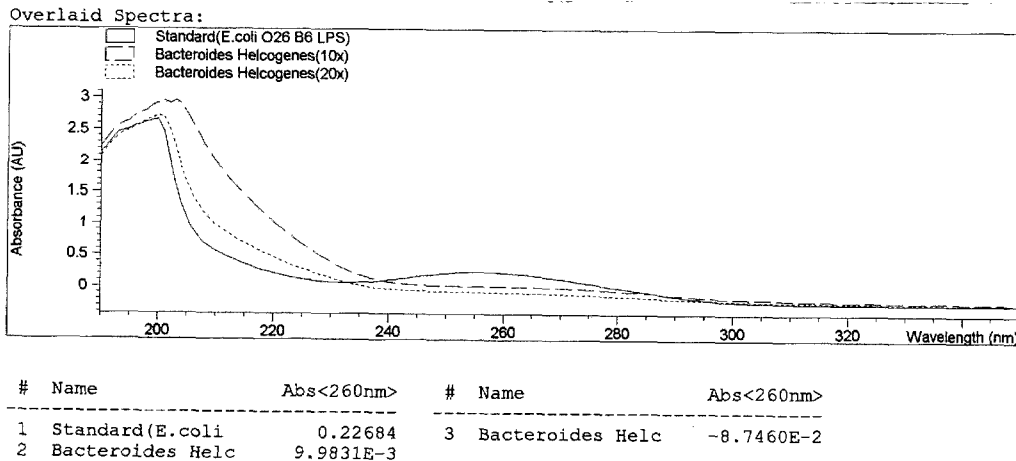


Fig. 1. LPS from *Bacteroides helcogenes*.

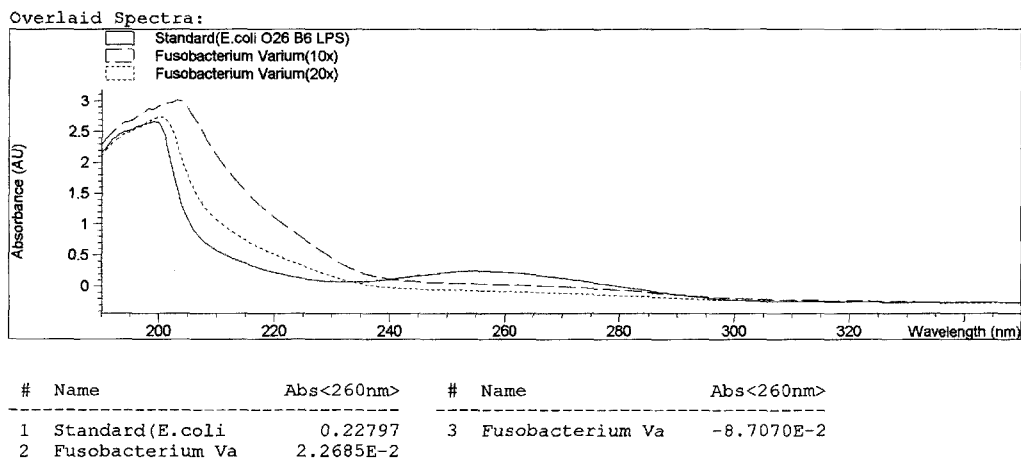


Fig. 2. LPS from *Fusobacterium varium*.

Table 1. Change of total leucocyte count ($\times 10^4$ cells/ml) after LPS treatment (Mean \pm SE)*

Group	The number of head	Time afetr LPS treatment (hr)			
		0	24	48	72
Control	3	3.3 \pm 1.5	6.0 \pm 1.7	5.0 \pm 1.2	7.3 \pm 0.9
Treatment	5	3.0 \pm 0.7	10.3 \pm 2.2	29.8 \pm 12.3	13.2 \pm 2.7

* LPS : lipopolysaccharides.

Table 2. Change of rate of polymorphonuclear leucocyte(PMNL) after LPS treatment (Mean \pm SE)

Group	The number of head	Time afetr LPS treatment (hr)			
		0	24	48	72
Control	3	41.0 \pm 0.6 ^a	41.7 \pm 2.0 ^a	41.0 \pm 5.5 ^a	44.3 \pm 4.7 ^a
Treatment	5	47.2 \pm 3.6 ^a	72.1 \pm 3.1 ^b	81.6 \pm 3.5 ^b	79.0 \pm 4.2 ^b

^{a,b} Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).Table 3. Change of polymorphonuclear leucocyte viability (Mean \pm SE) after LPS treatment

Group	The number of head	Time afetr LPS treatment (hr)			
		0	24	48	72
Control	3	55.3 \pm 7.7	82.7 \pm 2.8	94.3 \pm 0.7	75.3 \pm 4.4
Treatment	5	42.9 \pm 10.0	73.0 \pm 5.5	91.6 \pm 4.5	66.6 \pm 10.1

Table 4. Change of rate of phagocytic polymorphonuclear leucocyte after LPS treatment (Mean \pm SE)

Group	The number of head	Time afetr LPS treatment (hr)			
		0	24	48	72
Control	3	1.0 \pm 0.3	2.8 \pm 0.9	1.1 \pm 0.4 ^a	3.0 \pm 0.4
Treatment	5	0.3 \pm 0.1	4.1 \pm 1.6	7.7 \pm 1.9 ^b	4.0 \pm 0.5

^{a,b} Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

지 않았다.

탐식 PMNL의 비율은 Table 4에서 보는 바와 같다. 처리전(0시간째)에는 대조구 및 처리구가 각각 1.0% 및 0.3%, 24시간째에는 각각 2.8% 및 4.1%로 대조구와 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 48시간째에는 대조구 및 처리구가 각각 1.1% 및 7.7%로 처리구가 대조구에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 높은 경향을 나타내었고 72시간째에는 대조구 및 처리구가 각각 3.0% 및 4.0%로 대조구와 처리구간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

고 찰

LPS 처리후 번식성적을 조사하기 위하여 2회 이상 인

공수정을 실시하여도 수태가 되지 않은 개체를 대상으로 태조구 3두 및 처리구 5두를 공시하여 *Bacteroids helcogenes*와 *Fusobacterium varium*으로부터 분리한 LPS 100 μ g을 PBS 용액 35 ml에 희석하여 수정란 이식용 카테타로 자궁 내에 무균상태를 유지하면서 주입·관류하였고, 대조구는 PBS 용액 35 ml만을 주입하여 관류액내의 총백혈구수, PMNL의 비율, PMNL 생존율, 탐식 PMNL의 비율을 분석한 결과, 총백혈구수에 있어서, Singh 등(2000)은 6시간째에 대조구 및 처리구가 각각 0.04×10^6 /ml 및 15.42×10^6 /ml, 24시간째에 0.09×10^6 /ml 및 11.33×10^6 /ml, 48시간째에 0.03×10^6 /ml 및 8.67×10^6 /ml, 72시간째에 0.03×10^6 /ml 및 6.25×10^6 /ml로 6, 24, 48 및 72시간째에 공히 처리구가 대조구에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 높은 수준이었다고 하여 본 시험의 결과와는 차이를 나타내었다.

PMNL의 비율에 있어서, Singh 등(2000)은 처리 전에

대조구 및 처리구가 각각 12.33% 및 10.25%로 차이가 없었으나 6시간째에는 11.75% 및 85.50%, 24시간째에는 11.83% 및 77.83%, 48시간째에는 11.58% 및 71.33%, 72시간째에는 11.25% 및 70.25%로 6시간째부터 72시간째까지 처리구가 대조구에 비하여 유의적으로 높았다고 하여 본 시험결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

PMNL 생존율에 있어서, Singh 등(2000)은 처리 전에 대조구 및 처리구가 각각 2.25% 및 2.33%였고 6시간째에는 3.25% 및 68.33%, 24시간째에는 2.67% 및 65.42%, 48시간째에는 2.75% 및 57.08%, 72시간째에는 2.42% 및 58.33%로 6시간째부터 72시간째까지 처리구가 대조구에 비하여 유의적으로 높았다고 하여 본 시험의 결과와는 일치하지 않은 양상이었고 대조구의 비율 자체에 있어서도 차이를 나타내었다.

탐식 PMNL의 비율에 있어서, Singh 등(2000)은 처리 전(0시간째)에는 대조구 및 처리구가 각각 1.17% 및 1.08%였으나 6시간째에는 1.33% 및 55.42%, 24시간째에는 1.67% 및 55.42%, 48시간째에는 1.25% 및 55.83%, 72시간째에는 1.42% 및 55.42%로 6시간째부터 72시간째까지 처리구가 대조구에 비하여 유의적으로 높았다고 하여 본 시험의 48시간째와는 유사한 경향이었으나 24시간째 및 72시간째와는 다소 상이한 경향을 나타내었다.

이상에서 세포벽 구성 성분이 Gram-negative로서 lipopolysaccharide를 가지고 있는 미생물(Scanlan, 1988)인 *Bacteroides*와 *Fusobacterium*으로부터 분리한 LPS 100 µg을 PBS 용액 35 ml에 희석하여 자궁 내에 주입한 후 관류액을 분석하여 LPS 처리전 (0시간째), 6시간째, 24시간째, 48시간째 및 72시간째와 같이 시간의 경과에 따른 총백혈구의 수, PMNL의 비율, PMNL의 생존율 및 탐식 PMNL의 비율 등에 대하여 대조구와 비교분석을 하여 보았는데 이전에 발표되었던 보고(Singh 등, 2000)와 PMNL의 비율에 있어서는 일치하는 경향을 보였고 탐식 PMNL의 비율에 있어서는 비슷한 경향을 나타내었다. 그러나 총백혈구의 수 및 PMNL의 생존율에 있어서는 차이를 나타내었다. 이는 개체간의 면역 반응에 대한 차이에 기인된 것으로 사료되므로 금후에는 좀더 많은 공시축을 확보하여 분석에 사용함으로써 보다 정밀한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Ahlers D, Grunert E (1993): Zur Problematik der Behandlung des infizierten Uterus beim Rind im Puerperium. Prakt. Tierarzt Sondert. Coll. Vet. XX-IV, pp 57-62.
- Ahmad R; Amin SM, Kazmi SE (1985): Studies on the bacterial causes of delayed uterine involution in postpartum buffaloes. Pak Vet J 5:168-170.
- Akhtar MH, Singh BK (1979): Viability and fertility rate of spermatozoa in bovine cervical mucous under normal and disease conditions. Indian Vet J 56: 112-117.
- Correa MT, Erb H, Scarlett J (1993): Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. J Dairy Sci 76:1305-1312.
- Dhaliwal GS, Murray RD, Woldehiwet Z (2001): Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. Anim Reprod Sci 67(3-4):135-152.
- Dhaliwal GS, Singh J, Singh N (1998): Treatment of repeat breeding in dairy cows - A comprehensive approach in: Proceedings of the 20th World Buiatr, Congress, Sydney, pp 673-676.
- Dohmen MJW, Huszenicza GY, Fodor M, Kulcsár M, Vámos M, Porkoláb L, Szilágyi N, Lohuis JA-CM (1996): Bacteriology and fertility in healthy postpartum cows and cows with acute endometritis, Proc. XIX world Buiatrics Congress, pp 238-241.
- Gupta RC, Simha AK, Krishnaswamy A (1983): Studies on the efficacy of some post-service intrauterine infusions on the conception rate in repeat breeding cattle. Theriogenology 20:559-564.
- Hill AW, Hibbit KG, Shears AL (1976): Increased antibacterial activity against *E. coli* in serum after the induction of endotoxin tolerance. Infect Immun 14:257-265.
- Hussain AM, Daniel RCW (1992): Effects of intrauterine infusion of *Escherichia coli* endotoxin in normal cows and in cows with endometritis induced by experimental infection with *Streptococcus agalactiae*. Theriogenology 37:791-810.
- Jainudeen MR, Hafez ESE (1993): Reproductive failure in females. In reproduction in farm animals. 6th ed. ESE, Hafez(ed), Philadelphia Lea & Febiger, pp 261-286.
- Kaneene JB, Miller R (1995): Risk factors for metritis in Michigan dairy cattle using herd-and cow-based modeling approaches. Prev Vet Med 23:183-200.
- Khan N, Ahmad M, Ahmad R, Ahmad A (1985): Post partum uterine involution and causes of its delay. Proc 1st World Buffalo Congr, Cairo Egypt, p 964.
- Lafi SQ, Kaneene JB (1988): Risk factors and associated economic effects of the repeat breeder syndrome in dairy cattle. Vet Bull (London) 58:891-903.
- Lafi SQ, Kaneene JB (1992): Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. I. Epidemiological modeling. Prev Vet Med 14:87-98.
- Laven RA, Peters AR (1996): Bovine retained placenta : aetiology, pathogenesis and economic loss. Vet Rec 139:465-471.
- Mellado M, Reyes C (1994): Associations between periparturient disorders and reproductive efficiency in Holstein cows in northern Mexico. Prev Vet Med 19:203-212.
- Peter JH, Ball H (1997): Late embryo and early fetal mortality in the cow. Animal Breeding Abstracts 65

- (3):75-95.
19. Scanlan CM (1988): Introduction to veterinary bacteriology. Department of veterinary microbiology and parasitology. Texas veterinary medical center, Texas A&M University, College station, Texas, p 8.
 20. Semambo DKN, Boyd JS, Taylor DJ, Ayliffe TR, Omran SN (1992): Ultrasonographic study of early embryonic loss induced by *Actinomyces pyogenes* in cattle. Vet Rec 131:7-12.
 21. Singh J, Sidhu SS, Dhaliwal GS, Pangaonkar GR, Nanda AS, Grewal AS (2000): Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. Anim Reprod Sci 59:159-166.
 22. Targowski SP (1984): Immunologically induced uterine inflammation. in : Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and AI. Urbana, Champaign, VI, pp 473-475.
 23. Nakao T (2006): 한국우병학회 제11차 학술대회 및 한·일 합동 산업동물 심포지움. 소의 주요 생산성 저해질병에 대한 대책 : 고비유우의 번식장해의 특징과 그에 대한 대책. 한국우병학회지 11:1-21.
 24. 류병호, 박우열, 김희숙, 박종욱 (1991): *Proteus vulgaris* RH-90에서 추출하여 감마선 조사시킨 Lipopolysaccharide(LPS)의 항암 및 면역 활성화에 미치는 영향. 한국생물공학회지 6:45-54.
(접수일자: 2006. 8. 8 / 채택일자: 2006. 9. 12)