

최 중
연구보고서

오존요법(Ozone therapy)을 이용한 젖소
발굽질병 및 유방염의 예방과 치료기술 개발

Development of prevention and treatment
techniques using ozone therapy for bovine hoof
disease and mastitis

연구기관
충남대학교 수의과대학

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “오존요법(Ozone therapy)을 이용한 젖소 발굽질병 및 유방염의 예방과 치료기술 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “젖소 유방염에 대한 오존요법의 치료 및 예방효과 시험”, “오존제제의 젖소 유방염 및 발굽질병의 원인균에 대한 살균효과 시험”, “오존제제의 처리에 따른 유방염 및 발굽질병에 대한 병리조직학적 시험“, “젖소 발굽질병에 대한 오존요법의 외과적 치료 시험“)의 최종 보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 27 일

주관연구기관명 : 충남대학교 수의과대학

총괄연구책임자 : 김덕환

세부연구책임자 : 김덕환,
전무형,
조성환,
김명철

연 구 원 : 이주상,

연 구 원 : 김영찬

연 구 원 : 김일택

연 구 원 : 조우영

연 구 원 : 김남중

요 약 문

I. 제 목

오존요법(Ozone therapy)을 이용한 젖소 발굽질병 및 유방염의 예방과
치료기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

젖소의 유방염 및 발굽질병은 국내에 있어서 발생률이 아주 높을 뿐 만 아니라
치료가 잘 되지 않아 만성화하는 경향이며, 그로 인한 낙농가의 경제적인 손실이
크기 때문에 이에 대한 대책의 수립은 매우 중요하다. 또한 유방염 및 발굽질병의
치료에 있어 항생제의 남용으로 내성이 매우 강한 균주가 지속적으로 출현하고 있고,
항생제요법에 따른 우유 및 우유내 항생제의 잔류가 공중위생상 중요한 문제로 대두
되고 있다. 최근 외국에서는 오존요법이 인체의 감염성질병과 일부 동물의 질병 치료
에 응용되어 탁월한 치료효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 따라서 현재 국내
낙농업에서 가장 문제시되고 있는 유방염 및 발굽질병 치료에 있어 종래의 항생제요
법이 아닌 새로운 치료기술인 오존요법을 확립하는 것은 낙농가의 소득증대는 물론
우리 나라 낙농업의 국제 경쟁력을 제고시킬 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내 낙농업에서 가장 문제시되고 있는 젖소의 유방염 및 발굽질병의
치료를 위한 오존요법을 확립하기 위하여, 제 1세부과제<젖소 유방염에 대한 오존요
법의 치료 및 예방효과 시험>에서는 오존가스의 유방염 치료효과 시험<1년차>, 시험
용 오존제제(오존수)의 유방염 치료효과 시험 및 시험용 오존제제(오존가스)의 유방염
예방효과 시험<2년차>, 그리고 시제품 오존제제(오존연고)의 유방염 치료효과<3년
차>에 대하여 검토하였다. 또한 제 2세부과제<오존제제의 젖소 유방염 및 발굽질병
원인균에 대한 살균효과>에서는 유방염 및 발굽질병원인균에 대한 시험관내 살균효
과<1년차>, 유방염 및 발굽질병 발병동물에 대한 시험용 오존제제의 살균효과 시험
<2년차>, 그리고 유방염 및 발굽질병 발병동물에 대한 시제품 오존제제에 대한 살균

효과 시험<3년차>에 대하여 검토하였다. 제 3세부과제< 오존제제 처리에 따른 유방염 및 발굽질병에 대한 병리조직학적 시험>에서는 오존수의 독성시험과 유방 및 발굽조직에 대한 병리조직학적 시험<1년차>, 시험용 오존제제 처리에 따른 병리조직학적 시험<2년차>, 그리고 시제품 오존제제의 처리에 따른 병리조직학적 시험<3년차>에 대하여 검토하였다. 또한 제 4세부과제<젖소 발굽질병에 대한 오존요법의 외과적 치료시험>에서는 오존가스의 발굽질병에 대한 치료효과 시험<1년차>, 시험용 오존제제의 발굽질병에 대한 외과적 치료효과 시험<2년차>, 그리고 시제품 오존제제의 발굽질병에 대한 외과적 치료효과 시험<3년차>에 대하여 검토하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에 있어서 얻어진 연구결과를 종합적으로 살펴보면 다음과 같았다.

<제 1세부과제>에 있어서는 오존가스(1 ppm 농도, 50ml, 1일 2회)를 3일간 유방 내 주입이 젖소 유방염의 치료에 가장 유효하였으며, 오존수의 유두내 주입은 우유 중 체세포의 증가를 초래하여 유방염의 치료에 효과를 발휘하지 못하였고, 오존가스의 유두소독은 유방염의 예방에 효과가 없었다. 또한 오존연고의 유방염에 대한 치료효과가 인정되었다.

<제 2세부과제>에서는 유방염의 원인균인 *E. coli*, *S. aureus* 및 *Streptococcus spp.* 그리고 발굽질병의 원인균인 *Fusobacterium necrophorum* 및 *Bacteroides nodosus*에 대한 오존가스의 살균효과는 *E. coli*, 및 *Streptococcus spp.*를 오존가스 1.0ppm을 10분간 처리 시 감소하기 시작하였고, 1.0-5.0ppm을 30-60분간 이상 처리 시 완전 살균되었다. *Staph. aureus*는 30분간 처리시 5.0ppm에서부터 현저히 감소하여 1.0ppm을 60분간 처리시 완전 살균되었다. *F. necrophorum* 및 *B. nodosus*는 1.0-5.0ppm을 30-60분간 이상 처리시 완전 살균되었다. 오존수의 살균효과시험 결과 0.1ppm, 1.0ppm 및 5.0ppm에서 유의한 살균효과가 인정되었다. *Staph. aureus*에 대한 유방염 시험에서 0.1ppm 및 1.0ppm 오존수의 살균효과는 인정되지 않았으나 *necrophorum* 인공 감염된 흑염소 발굽은 5.0ppm 오존수에서 살균효과가 인정되었다. 오존연고에 대한 살균효과 시험 결과, 200ppm 및 300ppm처리 오존연고가 100ppm 처리오존연고에 비해 살균효과가 높았고 통성혐기성균보다 편성혐기성균이 감수성이 높았다. 200ppm 처리 오존연고를 젖소 발굽질병에 처치 후 전 레에서 현저한 균수의 감소가 관찰되었으며, 균 감소율은 호기성 배양 보다 혐기성 배양에서 높았다. 200ppm처리

오존연고의 4℃에서 보존효과를 시험한 바 *E. coli* 및 *Staph. aureus*에서 9개월간 살균효능이 유지되었으며 12개월에는 현저히 감소하였다.

<제 3 세부과제>에서는 오존수에 대한 일본산 송사리의 반수치사농도(LC 50)은 2.2 ppm이었다. 또한 오존가스 5 ppm 농도로 주입한 유선의 병변에서는 선포상피세포의 탈락, 증생 및 화생 등의 현미경적 소견이 관찰되었으며, 0.2 ppm 및 1 ppm 농도에서는 간질에 경미한 염증세포의 침윤이 인정되었다. 그리고 발굽조직에서는 0.2 ppm, 1ppm 및 5 ppm 노출 군에서 특이한 차이를 인정 할 수 없었다. 임상증상 및 육안적인 소견으로 *S. aureus* 및 *S. agalactiae*를 접종한 유방은 발열, 발적, 종창 및 통증 등의 임상증상과 *S. aureus*를 접종한 유방은 육안적으로 유두주위가 흑청색으로 변색된 괴저성 유방염을 관찰할 수 있었으며, *S. aureus*를 접종한 분방중 오존수를 처리한 분방이 육안적으로 흑청색병변부위가 다소 적게 나타났다. 현미경적 소견으로 *S. aureus*를 접종한 유선조직은 고도의 괴사를 특징으로 하는 괴사성 유방염을, *S. agalactiae*를 접종한 유선조직은 농양을 특징으로 하는 화농성 유방염을 관찰할 수 있었으며, 오존수를 처리한 유선조직은 생리식염수를 처리한 대조군의 유선조직과 현미경 관찰 시 현저한 차이가 인정되지 않았다. 그러나 발굽병변에 대한 오존수 처리는 육안적 및 현미경적으로 회복속도가 빠르며, 효과가 인정되었다. 유방염에서 오존연고 투여 후 급성염증소견이 관찰된 분방조직에서는 선상피세포의 재생 및 선포 내 유가 많은 부위에서 관찰 되었으며, 만성염증소견을 보였던 분방에서는 선포 내 염증세포의 수가 다소 감소하였으나, 실질세포 및 간질조직의 병리학적변화는 차이가 없었으며 발굽질환의 조직에서는 오존연고 도포 후 14일째에 정상적인 진피조직 소견을 관찰할 수 있었다.

<제 4 세부과제>에서는 발굽 둘레의 창상 유발 후 오존가스의 적용 결과 창상면적은 생리식염수를 적용한 군보다 더욱 감소하였으며, 특히 1 ppm 및 6 ppm의 오존가스 적용 시 크게 감소하였다. 1ppm의 오존가스 적용시 종창되었던 연부조직이 빠르게 감소되었다. 0.1 ppm 오존가스에서는 염증이 완화되고 표피가 많이 재생되었으며 가피가 형성되어 있었다. 1 ppm오존가스 적용 시 표피와 진피의 염증이 관찰되지 않았으며, 정상적인 피부의 조직소견을 나타내고 있었다. 6ppm에서는 표피와 진피에 염증이 관찰되며, 표피가 거의 재생되지 않았다. 발굽 질환에서 오존수는 파행, 종창 및 병변 등급에서 치료 14일 후 유의성 있는 감소 소견을 나타내었다. 오존 연고는 파행, 종창 및 병변 등급에서 치료 14일 후 유의성 있는 감소를 보였으며 .백혈구와 호중구 수는 처치 전에는 정상범위보다 약간 높았으나 치료 14일 후 호전되었다.

연구결과 활용에 대한 건의로는 본 연구 결과 입증된 오존연고를 대량 생산하여 산업화시키는 방안을 모색할 필요가 있으며, 또한 본 연구에서 검토한 젖소의 유방염 및 발굽질병 이외의 가축의 질병을 대상으로 한 오존요법의 치료효과에 대하여도 앞으로 다각적으로 검토되어야 할 것으로 판단되었다.

SUMMARY

I. Title

Development of prevention and treatment techniques for bovine hoof disease and mastitis using ozone therapy

II. The purpose and necessity of research

The occurrence rate of bovine mastitis and hoof disease is high and those diseases are difficult to cure. Those diseases usually become chronic. It is very important to prepare solving method because economical loss due to bovine hoof disease and mastitis is big. Strong resistant bacteria caused by abuse of antibiotics was frequently shown. The existence of antibiotics in milk and bovine meats becomes issue in public health. Recently it was reported that ozone treatment had superior treatment effect on human and animal diseases in foreign countries. Therefore, The establishment of new ozone therapy for treatment of bovine mastitis and hoof disease is useful not only for increase of income and but also for competition with foreign countries in dairy industry.

III. The contents and limits of research

The purpose of the present study is to establish ozone treatment for issue diseases , bovine mastitis and hoof disease. Treatment effect of ozone gas for bovine mastitis(1st year), therapeutic effect of ozonated water for bovine mastitis and prevention effect of ozone gas for mastitis(2nd year), and treatment effect of ozone ointment for bovine mastitis(3rd year) were investigated, respectively in subsubject 1.

In addition, bactericidal effect of ozone gas on etiological agents of bovine mastitis and hoof disease in vitro(1st year), that of ozonated water on

etiological agent of bovine mastitis and hoof disease(2nd year) and bactericidal effect of ozone ointment on etiological agent of bovine mastitis and hoof disease(3rd year) were examined, respectively in subsubject 2.

The toxicity of ozonated water and pathohistological examination for the udder and hoof tissue(1st year), pathohistological examination according to injection with ozonated water(2nd year) and pathohistological examination according to application with ozone ointment(3rd year) were investigated, respectively in subsubject 3.

Therapeutic effect of ozone gas on bovine hoof disease(1st year), treatment effect of ozonated water on bovine hoof disease(2nd year) and that of ozone ointment on bovine hoof disease(3rd year) were investigated, respectively in subsubject 4.

IV. Results of research development and proposal for application

The results obtained were as follows in the present study.

The injection with ozone gas(1 ppm, 50 ml, twice/day, for 3 days) was most effective for treatment of bovine mastitis. The ozonated water did not show therapeutic effect for treatment of bovine mastitis because of increase of somatic cells in milk and ozone gas was not effective for prevention of bovine mastitis. Further, therapeutic effect of ozone ointment was observed in subsubject 1

In subsubject 2, decrease of E-coli and Streptococcus spp., etiological agent of mastitis were started in 10 minutes' treatment with ozone gas(1 ppm) and complete bactericidal effect was found over 30-60 minutes' treatment with ozone gas(1.0-5.0 ppm). In Staphylococcus aureus decrease of the number was detected from 5.0 ppm in 30 minutes' treatment and complete bactericidal effect was found in 60minutes' treatment with 1.0 ppm. Bactericidal effect was detected over 30-60 minutes' treatment with 1.0-5.0 ppm in Fusobacterium necroforum and Bacteroides nodosus, causative agent of bovine hoof disease. Significant bactericidal effects were observed in 0.1 ppm, 1.0 ppm and 5 ppm, respectively in ozonated water. Bacteicidal effects

on *Staphylococcus aureus* were not detected in 0.1 ppm and 5 ppm of ozonated water, respectively. However, bactericidal effect on *Fusobacterium necroforum* was found in ozonated water with 5.0 ppm in artificially induced hoof disease of Korean native goat. In addition, bactericidal effects of ozone ointment treated with 200 ppm and 300 ppm were higher than that of ozone ointment treated with 100 ppm. Facultative anaerobic bacteria were sensitive than that of obligatory anaerobic bacteria in treatment with ozone ointment. Marked decrease of bacteria was observed in feet of all cases treated with ozone ointment.

the decreasing rate of bacteria in anaerobic culture was higher than that in aerobic culture. The stabilities of ozone ointment according to storage period was 9 months in *E-coli* and *Staphylococcus aureus*. Bactericidal effect of ozone ointment was markedly decreased in 12 months' storage.

In subject 3, LC 50 of Japanese cyprinodont to ozonated water was 2.2 ppm. Microscopic findings such as Falling, hyperplasia and metaplasia of the alveolar epithelial cells were found in the udder with injection of ozone gas(5 ppm). Mild interstitial infiltration of inflammatory cells was observed in 0.2 ppm and 1 ppm of ozone gas. Specific difference was not detected in hoof treated with 0.2 ppm, 1 ppm and 5 ppm, respectively. Clinical symptoms such as fever, redness, swelling and pain were found in the udder injected with *Staphylococcus* and *Streptococcus agalactiae*. Gangrenous mastitis was found in the udder injected with *S. aureus*. Blue-black macroscopic lesions of the udder was slightly diminished in the udder injected with ozonated water. Mammary tissues injected with *Staphylococcus aureus* showed necrotic mastitis and those injected with *Streptococcus agalactiae* revealed purulative mastitis characterized by abscess. The mammary tissues injected with ozonated water did not show marked difference comparing with that of the injected with saline. However, recovery was rapid macroscopically and microscopically in treatment with ozonated water on the hoof lesions and ozonated water was effective. Regeneration of the alveolar epithelial cells was observed in the mammary tissues with acute mastitic lesion after injection of ozone ointment. Slight decrease of inflammatory cells was found within the alveolar, however, pathological change was not detected in the parenchymal and interstitial

tissues. Normal dermal tissue was found in tissues with hoof disease on 14 days after application of ozone ointment.

In subsubject 4, decrease of the trauma area was marked in ozone gas treated area comparing with saline injected, especially in 1 ppm and 6 ppm, respectively. Decrease of swollen soft tissues was rapid in ozone gas treatment with 1 ppm. Inflammatory findings were not found in ozone gas treatment with 1 ppm and showed normal skin. Inflammation in the epidermis and dermis was observed in ozone gas treatment with 6 ppm and epidermis was not nearly regenerated. Significant decrease of lameness, swelling and grade of lesion was shown in hoof lesions on 14 days after application of ozonated water. Significant decrease of lameness, swelling and grade of lesion was found in hoof disease on 14 days after application with ozone ointment. The number of leukocytes and neutriphils were slightly higher than that of normal, however, those were improved on 14 days after application of ozone ointment.

In proposal for application, it was considered that the industrialization of ozone ointment based on the results of the present study was necessary. In addition, investigation on therapeutic effect of ozone ointment for different diseases should be performed in the future.

CONTENTS

Chapter 1. The outline of subject for research

Chapter 2. The present situation of development in techniques of Korea and foreign countries

Chapter 3. Contents and results of research

Section 1. The examination for treatment and preventive effects of ozone therapy on bovine mastitis

Section 2. The examination for bactericidal effect on the etiological agents of bovine mastitis and hoof disease by ozone products

Section 3. Pathohistological examination for bovine mastitis and hoof disease with treatment of ozone products

Section 4. The examination for surgical treatment effect on bovine hoof disease

Chapter 4. The accomplishment of targets and devotion for associated area

Chapter 5. Application schedule of research results

Chapter 6. Foreign scientific technological informations collected in process of the present study

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 젖소 유방염에 대한 오존 요법의 치료 및 예방 효과 시험

제 2절 오존 제제의 젖소 유방염 및 발굽질병 원인균에 대한 살균 효과 시험

제 3절 오존 제제 처리에 따른 젖소 유방염 및 발굽 질병에 대한 병리조직학적 시험

제 4절 젖소 발굽질병에 대한 오존 요법의 외과적 치료 효과 시험

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

젖소의 유방염 및 발굽질병은 국내에 있어서 발생률이 아주 높을 뿐 만 아니라 치료가 잘 되지 않아 만성화하는 경향이며, 그로 인한 낙농가의 경제적인 손실이 크기 때문에 이에 대한 대책의 수립은 매우 중요하다. 또한 유방염 및 발굽질병의 치료에 있어 항생제의 남용으로 내성이 매우 강한 균주가 지속적으로 출현하고 있고, 항생제요법에 따른 우유 및 우유내 항생제의 잔류가 공중위생상 중요한 문제로 대두되고 있다. 최근 외국에서는 오존요법이 인체의 감염성질병과 일부 동물의 질병 치료에 응용되어 탁월한 치료효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 따라서 현재 국내 낙농업에서 가장 문제시되고 있는 유방염 및 발굽질병 치료에 있어 종래의 항생제요법이 아닌 새로운 치료기술인 오존요법을 확립하는 것은 낙농가의 소득증대는 물론 우리 나라 낙농업의 국제 경쟁력을 제고시킬 수 있다.

이에 본 연구는 현재 국내 낙농업에 있어서 문제시 되고 있는 젖소 유방염 및 발굽질병에 대한 오존 요법의 치료 및 예방 효과를 구명하는데 그 목적이 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

오존은 독일의 화학자인 Christian Friedrich Schonbein에 의해 발견되었는데, Fox에 의해 오존의 살균작용이 보고된 이래, 독일에서는 오존의 살균력을 이용하여 정수 처리에 사용하였다. 또한 Wolff는 오존의 산화 분해력을 이용하여 도살장의 악취제거에 오존의 사용을 주장하였고, 산부인과와 암 이나 직장종양의 악취를 경감시킬 목적으로 국소 부위에 오존 가스를 접촉시켰다. 그리고, 이 경험을 통하여 장, 질 및 기타 체강질환에 대한 오존 치료의 가능성을 지적한 바 있다. 또한 Payr는 자기 자신의 치과치료에 오존 치료를 받은 경험을 발표한 바 있으며, 독일의 물리학자인 Hansler가 의료용 오존발생기를 제작한 이래 여러 환자에게 실제적으로 이용하게 되었다.

오존요법은 독일을 중심으로 발전해 왔는데, 프랑스, 이태리, 스페인, 러시아, 쿠바 및 일본 등 세계 여러 나라에서 세균성, 바이러스성 및 진균성 감염증 등 인체질환의 치료에 우수한 치료효과를 발휘하는 것으로 보고되어 있다.

오존의 살균작용 기전으로는 대장균을 오존 처리한 경우 핵산이 용출되는 점으로부터 세균세포막에 손상을 주어 세포막 구조변화가 오존의 침투성을 증가시킴으로써 세포의 내용물이 누출되어 살균작용을 하는 것으로 알려져 있고, 또한 세포막의 손상 및 효소나 핵산의 불활성화에 의하여 살균작용을 하는 것으로 알려져 있다.

오존요법을 실제 임상에 사용하는 방법으로는, 대량 자가 혈액요법(Major autohemotherapy), 소량 자가 혈액요법(Minor autohemotherapy), 직장내 주입방법(Rectal insufflation) 및 국소 적용 방법(관정강내 주사 및 국소 피부에 도포) 등이 알려져 있다. 그러나 국내에서는 외국에서 연구되어 알려진 바와 같은 인체 및 동물 질환의 치료를 위한 오존요법에 대하여 거의 검토된 바 없는 실정이다.

따라서 국내에서도 농가의 소득증대를 실현하기 위한 방법으로써 가장 문제시되고 있는 젖소의 유방염 및 발굽질환의 치료를 위한 오존요법의 확립은 매우 시급하며, 또한 이에 대한 연구가 다각도로 이루어져야함은 두말할 나위 없이 중요한 문제로 판단된다.

지금 현재 외국의 경우, 독일, 캐나다 및 쿠바에서 인체 질병치료용 오존연고가 생산되고 있는 실정이며, 일본에서는 젖소 유방염 치료용 오존연고가 최근 생산된 것으로 알려져 있다. 국내에서는 본 연구가 인체 및 동물질환의 치료에 있어 오존요법의 치료효과를 구명하는 최초의 연구이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 젖소 유방염에 대한 오존요법의 치료 및 예방효과 시험

1.오존가스의 젖소 유방염에 대한 치료 효과 시험

가. 재료 및 방법

1) 재료

오존가스의 젖소 유방염에 대한 치료효과를 구명하기 위하여 실험에 사용한 재료는 충남 공주시 근교 목장 2개소 (SR 목장:3두, 5분방 및 HK 목장:4두, 5분방), 충북 보은군 소재 목장 3개소 (SS목장:21두, 21분방, MR 목장:3두, 3분방 및 WJ목장:6두, 7분방) 및 서울우유협동조합 파주유우진료소 관할 목장3개소 (K목장: 4두, 4분방, B목장: 2두, 2분방 및 G목장: 1두, 2분방)에서 사육중인 착유우로부터 체세포 검사결과 우유 중의 체세포수가 $500 \times 10^3/\text{ml}$ 이상으로 만성 유방염에 이환된 총 44두, 49분방을 대상으로 선발하여 각각 공시하였다.

2) 방법

가) 군배치:

오존가스의 젖소 유방염에 대한 치료효과를 구명하기 위하여 사용한 공시분방은 총 49분방으로서 대조군 (5분방) 및 실험군 I (5분방), 실험군 II (14분방), 실험군 III (17분방) 및 실험군 IV (8분방)으로 각각 나누어 공시하였다.

나) 각 군의 처치:

오존가스의 젖소 유방염에 대한 치료효과를 구명하기 위하여 대조군에 있어서는 항생제 감수성 시험의 결과를 토대로 감수성이 가장 높게 나타난 norfloxacin(비유기용 유방염연고: 노파진, 8g <주> 대성미생물, 한국)을 1일 2회, 3일간 해당 분방에 각각 주입하였다.

한편, 실험군 I에서는 오존 발생장치(<주> MH, 한국)를 이용하여 발생시킨 오존가스(0.1ppm)를 해당 분방에 각각 250ml씩, 1일 2회, 착유 후 1주일간 주입하였다.

또한 실험군 II에 있어서는 1주일간은 오존가스(0.1ppm)를 250ml씩 1일 2회 각각 주입하였고, 다음 1주일간은 오존가스를 분방이 약간 팽만할 정도로 1일 2회씩 각각 주입하였다.

실험군 III에 있어서는 오존가스(0.1ppm)를 분방이 약간 팽만할 정도로 1일 1회씩 1주일간 주입하였고, 또한 키토산 제제(키토마스티: 삼양약화학, 한국)를 1일1회씩 1주일간 해당 분방에 각각 주입하였다.

그리고 실험군 IV에 있어서 오존가스(1ppm)를 해당 분방에 50ml씩, 1일 2회, 3일간 각각 주입하였다.

다) 체세포수의 측정:

대조군 및 실험군에 있어서 우유중의 체세포수의 변화는 자동 유즙 체세포 수 측정기(Fossmatic-90, 덴마크, 남양유업 소재)를 이용하여 측정하였다.

라) 혈액검사:

혈액검사를 위하여 공시우의 미정맥과 유정맥에서 약 5ml를 진공 채혈관(EDTA 첨가)을 사용하여 채혈하였으며, 말초 혈액 총 백혈구 수 및 백혈구 백분비의 변화는 자동혈액검사기(HemaVet, 미국)를 이용하여 각각 측정하였다.

마) 혈액화학검사:

혈청 총 단백질(Total protein:TP)의 변화를 검사하기 위하여 미정맥과 유정맥에서 약 5ml의 혈액을 항응고제 띠첨가 진공채혈관을 사용하여 채혈하였으며, 실온에서 응고시킨 다음, 혈청을 분리하여 동결(-20 C)하였다가 측정에 공하였다. TP는 굴절계로 측정하였다.

바) 통계처리:

본 실험에서 얻어진 결과에 대한 유의성 검정은 t-test로 수행하였다.

나. 결과

1) 우유 중 체세포수의 변화

가) 대조군

대조군에 있어서 항생제 투여에 따른 우유 중 체세포 수의 변화를 보면 투여 전 ($4,065.0 \pm 5,059.4 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 투여 후 1주일 ($2,493.0 \pm 1,884.6 \times 10^3/\text{ml}$)에 현저하게 감소하였으나 군내 변화에서는 유의성이 인정되지 않았다.

나) 실험군 I

실험군 I에 있어서는 250ml의 오존가스(0.1ppm)를 1주일간 해당 분방에 각각 주입하였는데, 오존가스 투여 후 1주일($4,041.6 \pm 1,755.3 \times 10^3/\text{ml}$)에 체세포수가 투여 전($4,508.2 \pm 2,827.3 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 감소하는 추세를 나타내었으나, 대조군에 비하여 높은 수준을 유지하였다(Fig. 1).그러나 군내 및 군간에는 유의성이 인정되지 않았다.

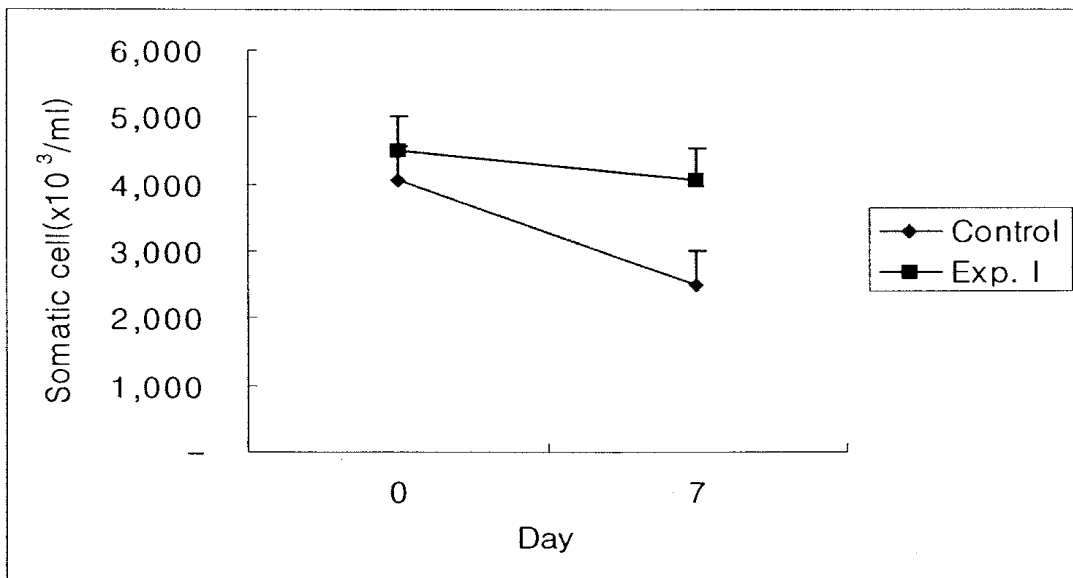


Fig. 1. The change of the somatic cells in milk of experimental group I

다) 실험군 II

실험군 II에 있어서는 우선 1주일간은 250ml의 오존가스(0.1ppm)를 해당 분방에 각각 주입하였고, 그 후 1주일간은 분방이 약간 팽만할 정도로 오존가스를 주입하였다. 그 결과, 우유 중의 체세포수의 변화는 7일째($8,440.3 \pm 9,502.0 \times 10^3/\text{ml}$)에 투여 전 ($3,617.6 \pm 2,418.1 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 급격하게 상승하였다가 이후 14일째

($7,077.1 \pm 5,951.4 \times 10^3/\text{ml}$) 약간 감소하였으나, 투여 전에 비하여 현저하게 증가된 수치이었다. 또한 대조군에 비하여도 높은 수준이었다. 그리고 군내 및 군 간에는 유의성이 인정되지 않았다.

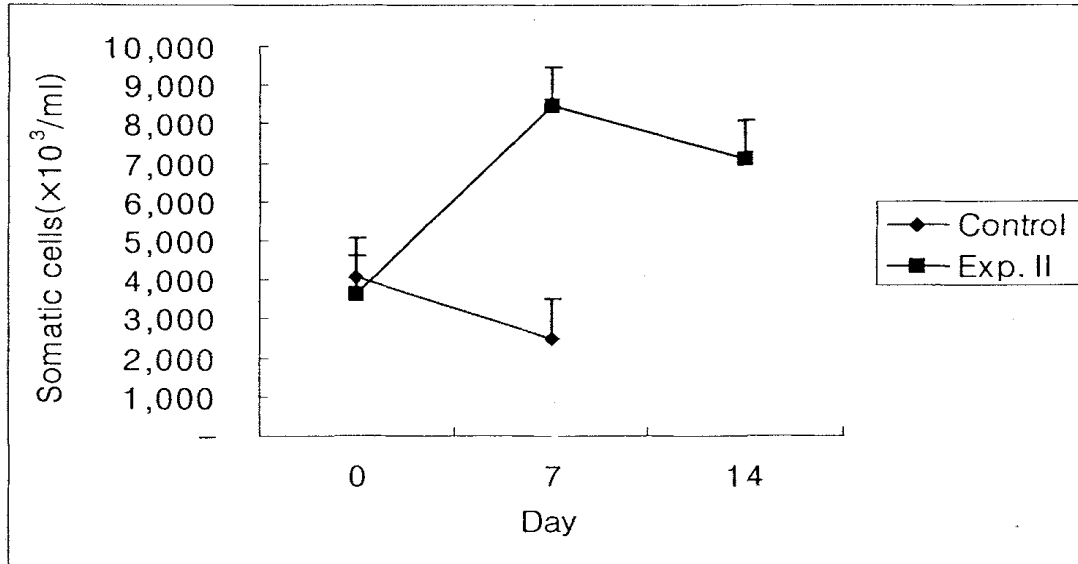


Fig. 2. The change of the somatic cells in milk of experimental group II*

*: Injected with 250ml of ozone gas(0.1ppm) for 1 week and then fully injected with ozone gas into affected quarter for 1 week

라) 실험군 III

실험군 III에 있어서는 키토산제제(키토마스티)와 오존가스(0.1ppm)를 분방이 약간 팽만할 정도로 1일 1회 각각 1주일간 주입하였다. 그 결과, 우유 중의 체세포수의 변화는 7일째($5,802.7 \pm 3,701.2 \times 10^3/\text{ml}$)에는 투여 전 ($6,056.2 \pm 7,007.1 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 감소하였으나, 대조군에 비하여 훨씬 높은 수준이었다. 또한 군내 및 군간 유의성이 인정되지 않았다.

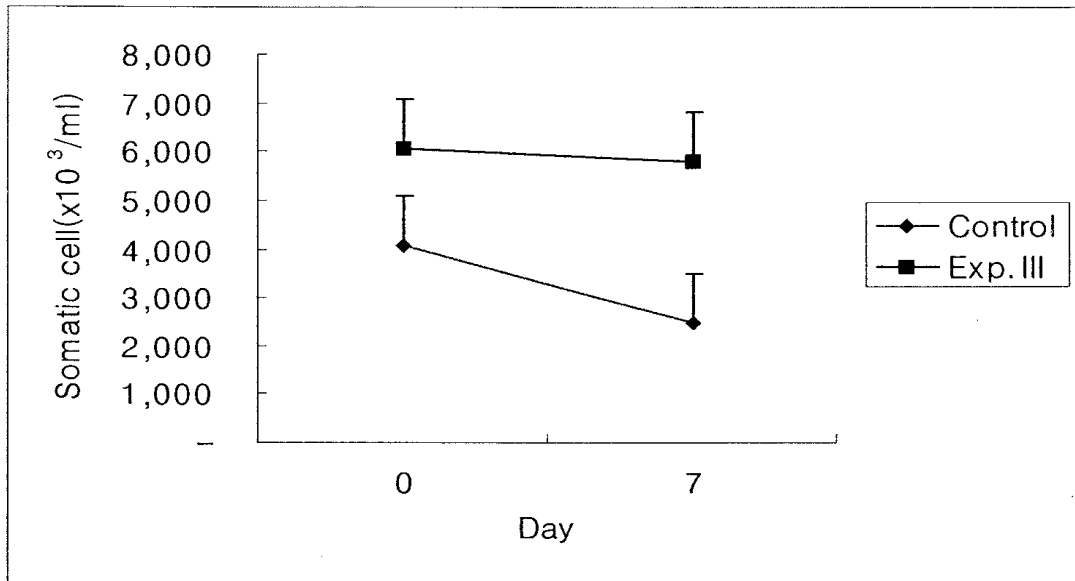


Fig. 3. The change for the somatic cells in milk of experimental group III*

* : Injection with kitomasti and ozone gas(0.1ppm) into affected quarters

마) 실험군 IV

실험군 IV에 있어서는 오존가스(1ppm) 50ml를 3일간 분방에 주입하였다. 그 결과, 우유 중의 체세포수의 변화는 오존가스 투여 후 7일째 ($673.9 \pm 475.1 \times 10^3/\text{ml}$)에는 투여 전 ($3,898.3 \pm 5,149.1 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 유의성 있는 감소 소견을 나타내었다 ($p < 0.05$). 그러나 군 간에는 유의성이 인정되지 않았다.

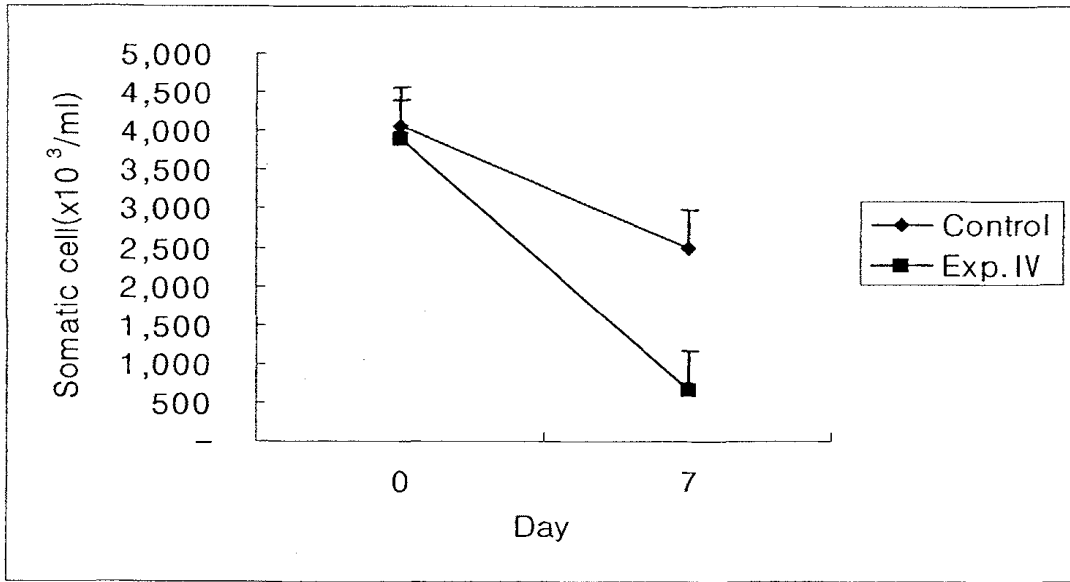


Fig. 4. The change of the somatic cell($\times 10^3$ /ml) in milk of experimental group IV*
 * : Injected with 50ml of ozone gas(1ppm) for 3 days

2) 말초혈액 총 백혈구 수 및 백혈구 백분비의 변화

가) 총 백혈구 수의 변화

말초 혈액 총백혈구 수의 변화를 보면, 대조군 및 실험군 III에서 7일째에 투여전과 유사하였으나, 실험군 I에서는 7일째 투여 전에 비하여 약간의 증가된 소견을 나타내었고, 그리고 실험군 II에서는 7일째 투여 전에 비하여 감소하였다. 군내 및 군간에 유의성이 인정되지 않았다(Fig. 5).

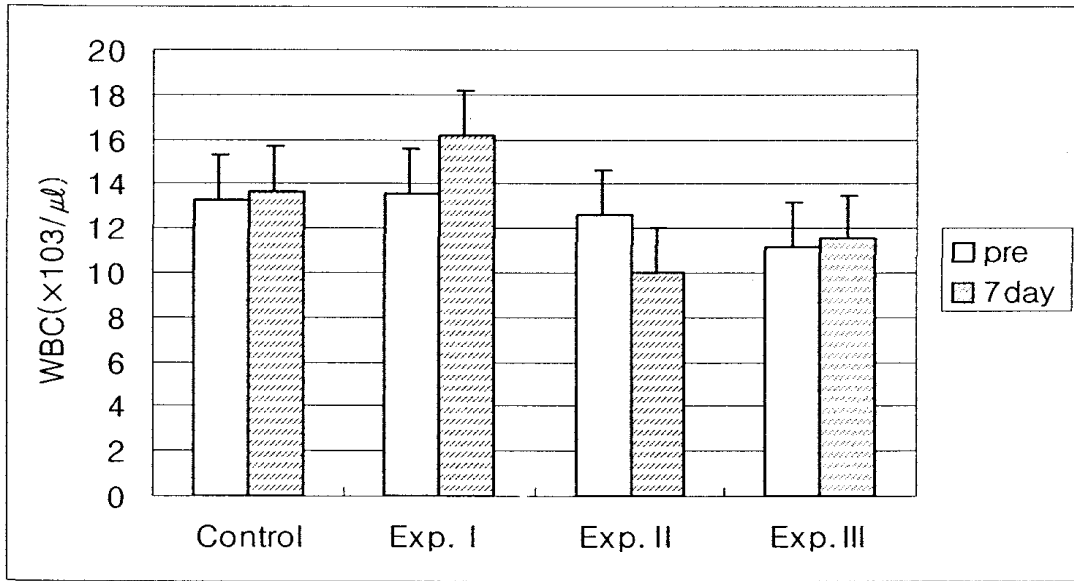


Fig. 5. The change of WBC in peripheral blood of examined cows among groups

나) 호중구 수의 변화

말초 혈액 호중구 수의 변화를 보면, 대조군 및 실험군 II에서는 7일째 투여 전과 유사한 수준을 나타내었으나, 실험군 I에서는 7일째 투여 전에 비하여 약간의 증가된 소견을 나타내었고, 실험군 III에서는 약간 감소된 소견을 나타내었다(Fig. 6).

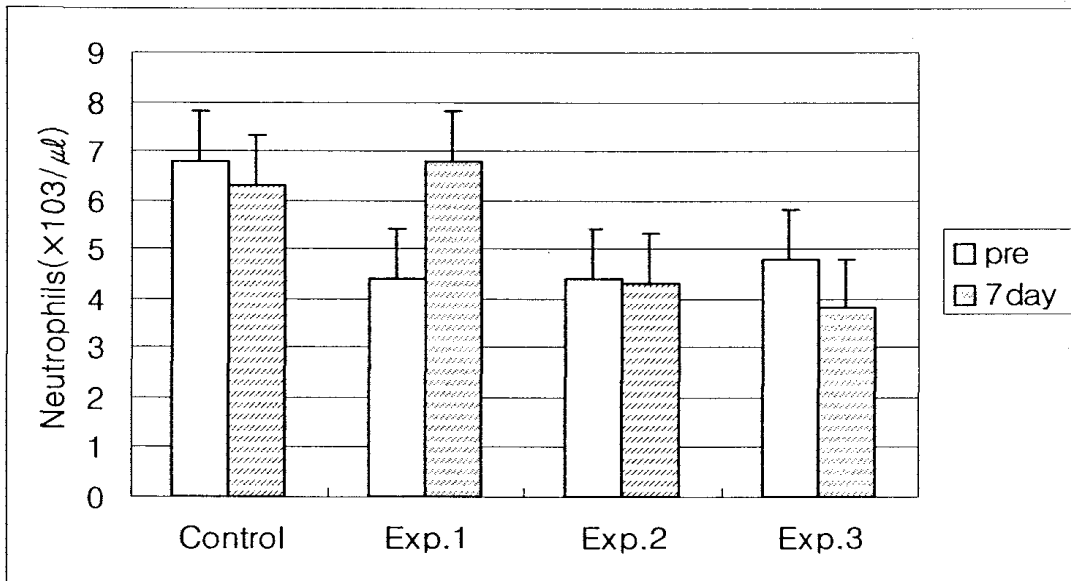


Fig. 6. The change of neutrophils in peripheral blood of examined cows among groups

다) 림프구 수의 변화

말초 혈액 림프구 수의 변화를 보면, 대조군, 실험군 I 및 실험군 III에서 투여 후 7일째에 투여 전과 유사한 소견을 나타내었으나, 실험군 II에서는 7일째 투여 전에 비하여 감소된 소견을 나타내었다(Fig. 7).

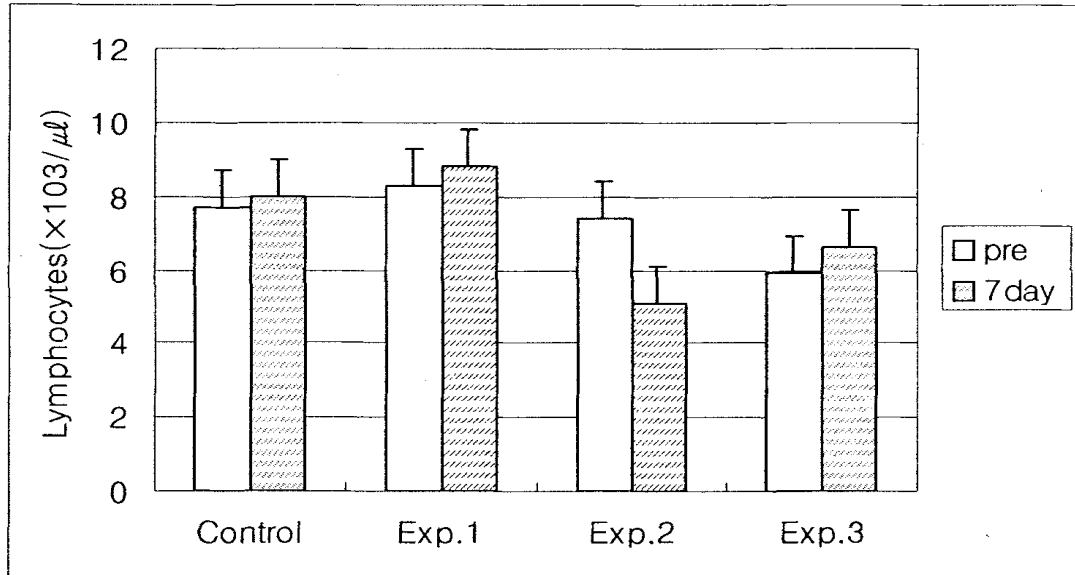


Fig. 7. The change of lymphocytes in peripheral blood of examined cows among groups

라) 호중구/림프구 비(N/L ratio)

말초 혈액 N/L ratio는 대조군, 실험군 I 및 실험군 III에서 7일째에 각각 투여전과 유사한 소견을 나타내었으나, 실험군 II에서는 7일째 투여 전에 비하여 증가된 소견을 나타내었다(Fig. 8).

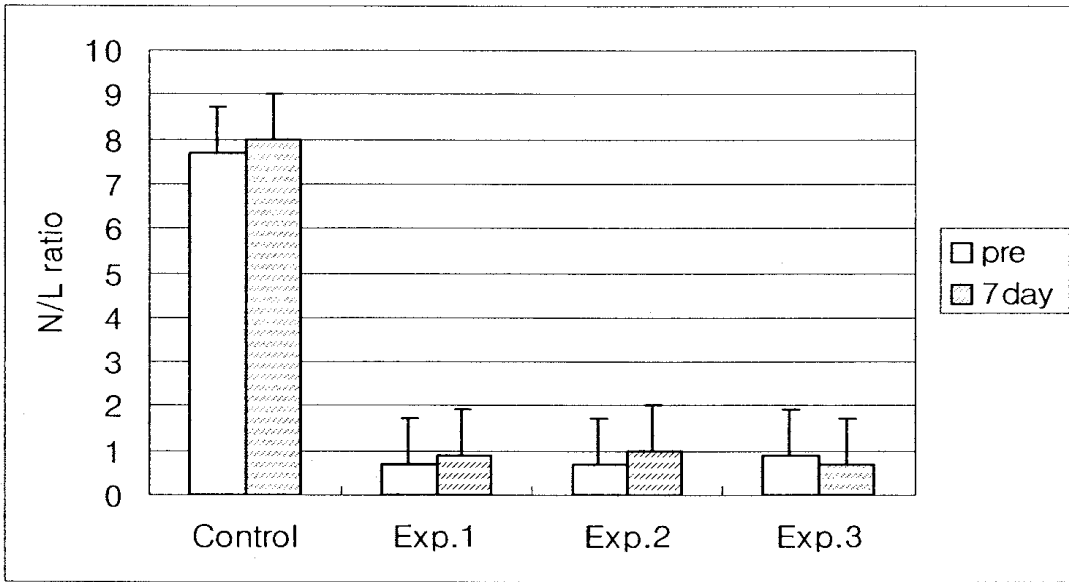


Fig. 8. The change of N/L ratio in peripheral blood of examined cows among groups

3) 혈액화학치의 변화

혈청 TP의 변화를 보면, 대조군 및 실험군 I, II, III에 있어서 각 군 공히 7일째에 투여 전과 유사한 소견을 나타내었다 (Fig.9).

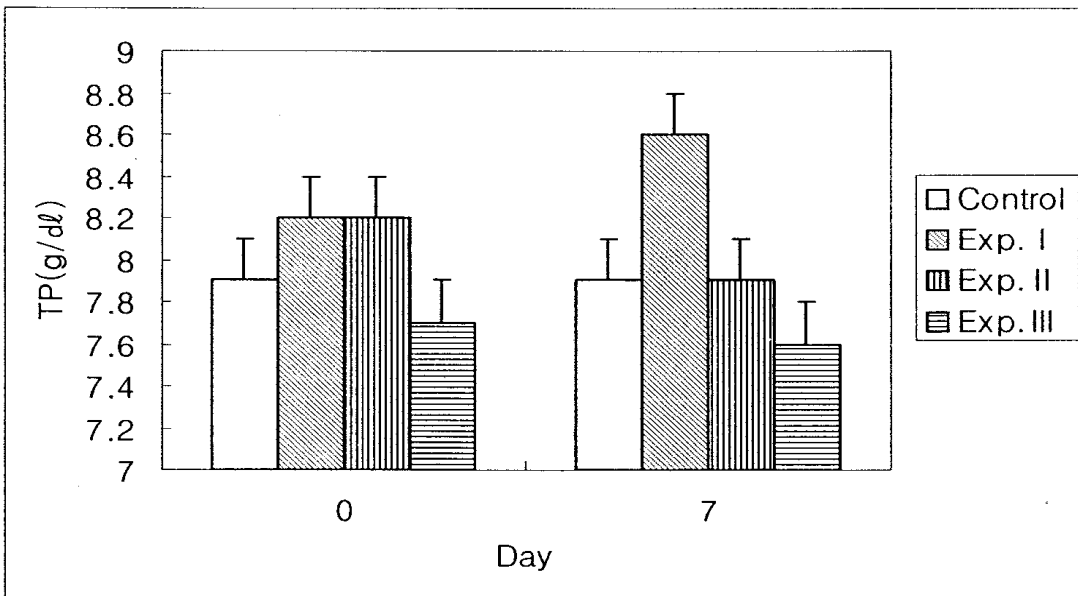


Fig. 9. The change of serum total protein contents of examined cows among groups

다. 결론

1) 대조군에 있어서는 항생제 투여에 의해 우유 중 체세포수가 투여 전에 비하여 투여 후 1주일에 현저하게 감소하였으나 군내의 변화에서 유의성은 인정되지 않았다.

2) 실험군 I에서는 오존가스 투여 후 1주일에 우유 중 체세포수가 투여 전에 비하여 감소하는 추세를 나타내었으나 대조군에 비하여 높은 수준을 유지하였다. 또한 군내 및 군 간에 유의성이 인정되지 않았다.

3) 실험군 II에서는 오존가스 투여 후 7일째에 체세포수가 투여 전에 비하여 상승하였다가 14일째에 약간 감소하였으나 투여 전에 비하여 증가된 소견이었다. 또한 대조군에 비하여도 높은 수준을 나타내었다.

4) 실험군 III에서는 오존가스 투여 후 7일째에 체세포수가 투여 전에 비하여 감소하였으나, 대조군에 비하여 높은 수준이었다. 또한 군내 및 군간 유의성이 인정되지 않았다.

5) 실험군 IV에서는 오존가스 투여 후 7일째에 우유중 체세포수가 투여 전에 비하여 유의성 있는 감소 소견을 나타내었으나 ($p < 0.05$), 군 간에는 유의성이 인정되지 않았다.

6) 말초 혈액 총백혈구수, 호중구수, 림프구수 및 호중구/림프구비의 변화에서는 각 군내 및 군 간에 유의성이 인정되지 않았다.

7) 이상의 결과를 종합해 볼 때, 1ppm 농도 오존가스 50ml를 3일간 유방내로 주입하는 것이 유방염 치료에 효과적인 것으로 판단되었다.

2. 오존요법(오존수)의 젖소 유방염에 대한 치료 및 예방효과

가. 오존요법(오존수)의 젖소 유방염에 대한 치료효과

1) 재료 및 방법

가) 재료

오존요법(오존수)의 유방염 치료효과를 구명하기 위한 실험에 사용한 재료는 충북 보은군 소재 목장(29두, 41분방) 및 조치원읍 소재 목장(3두, 6분방)에서 사육중인 만성 유방염에 이환된 총 32두, 47분방을 대상으로 선발하여 각각 공시하였다.

나)방법:

(1) 군 배치:

본 실험에서 사용한 공시분방은 총 47분방으로서 실험군(41분방) 및 대조군 (6분방)으로 나누어 각각 공시하였다.

(2)각 군의 처치:

대조군에 있어서는 항생제 감수성 시험의 결과를 토대로 가장 감수성이 높게 나타난 norfloxacin(비유기용 유방염연고: 노파진, 8g <주> 대성미생물, 한국)을 1일 2회, 5일간 해당 분방에 각각 주입하였다.

실험군에 있어서는 착유 1시간 전에 오존 발생장치(꼬레아, 한국)를 이용하여 폭기조에 준비된 증류수에 오존을 폭기하여 오존수(0.1 ppm)를 생성시킨 다음, 해당 분방에 25ml씩 1일 2회, 1주일간 각각 주입하였다

(3) 체세포수의 측정:

대조군 및 실험군에 있어서 우유 중의 체세포수의 변화는 처치 전, 처치 후 3일 및 7일째에 각각 분방별로 유즙을 채취한 다음, 자동 유즙 체세포 수 측정기 (Fossmatic-90, 덴마크, 남양유업 소재)를 이용하여 측정하였다.

(4) 혈액검사:

혈액검사를 위하여 공시우의 유정맥에서 처치 전 및 처치 후 7일째에 각각 약 5ml를 진공 채혈관(EDTA 첨가)을 사용하여 채혈하였으며, 말초 혈액 총 백혈구 수 및 백혈구 백분비의 변화는 자동혈액검사기(HemaVet, 미국)를 이용하여 각각 측정하였다.

(5) 혈액화학검사:

혈청 총 단백질(Total protein:TP)의 변화를 검사하기 위하여 유정맥에서 약 5ml

의 혈액을 항응고제 미첨가 진공채혈관을 사용하여 채혈하였으며, 실온에서 응고시킨 다음, 혈청을 분리하여 동결(-20 C)하였다가 측정에 공하였다. TP는 자동혈액화학 분석기로 측정하였다.

(6)통계처리

본 실험에서 얻어진 결과에 대한 유의성 검정은 t-test로 수행하였다.

나. 오존요법의 젖소 유방염에 대한 예방효과

1) 재료 및 방법

가) 재료

오존요법 (오존가스)의 젖소 유방염 예방 효과를 구명하기 위한 실험에 사용한 재료는 조치원읍 소재 1개 목장으로부터 동일 조건하에서 사육중인 17두 67분방을 대상으로 선발하여 공시하였다.

나)방법:

(1) 군배치:

본 실험에서 사용한 공시분방은 총 67분방으로서 실험군 (36분방) 및 대조군 (31분방)으로 나누어 각각 공시하였다.

(2) 각 군의 처치:

대조군에 있어서는 아무런 처치를 하지 않았으며, 실험군에 있어서는 매 착유 후 오존 발생장치(꼬레아, 한국)를 이용하여 각 유두를 오존가스(8ppm)로 1분간씩 3주간 각각 처리하였다.

(3) 체세포수의 측정:

대조군 및 실험군에 있어서 우유중의 체세포수의 변화는 처치 전, 처치 후 7일, 14일 및 21일째에 각각 분방별로 유즙을 채취한 다음, 자동 우유 체세포 수 측정기 (Fossmatic-90, 덴마크, 남양유업 소재)를 이용하여 각각 측정하였다

3) 결과

가) 오존요법(오존수)의 젖소 유방염에 대한 치료효과

(1) 우유 중 체세포수의 변화

(가) 대조군

대조군에 있어서 항생제 투여에 따른 우유 중 체세포 수의 변화는 처치 전 ($1,018.0 \pm 479.4 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 7일째 ($690.5 \pm 320.8 \times 10^3/\text{ml}$)에 감소하는 경향을 나타내었다.

(나) 실험군

실험군에 있어서는 25ml의 오존수(0.1ppm)를 1주일간 해당분방에 각각 주입하였는데,

처치 전 ($5,153.8 \pm 5,477.5 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 3일째 및 7일째 ($21,379 \pm 20,901.4 \times 10^3/\text{ml}$)에 우유 중 체세포 수는 계속 증가하는 추세를 나타내었다.

또한 대조군과 비교해 볼 때, 대조군에 있어서는 항생제의 치료와 더불어 우유 중 체세포 수가 감소하는 경향을 나타낸 반면, 실험군에 있어서는 우유 중 체세포 수가 오존수의 처치에 의해 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 10).

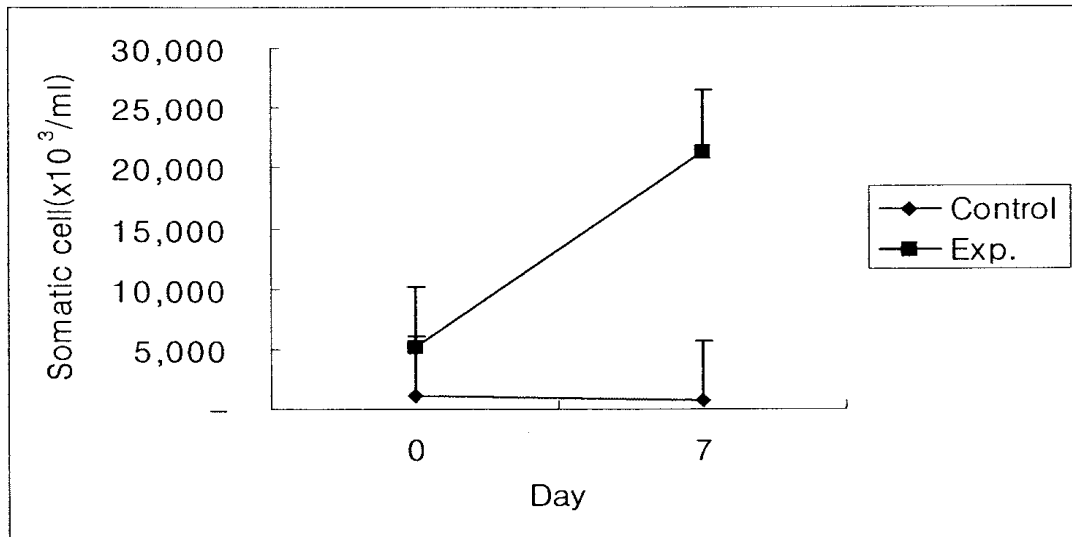


Figure 10. The change of the somatic cells in milk of experimental group using ozone water(0.1ppm)

(2) 말초혈액 총 백혈구 수 및 백혈구 백분비의 변화

(가) 총 백혈구 수의 변화

말초 혈액 총 백혈구 수의 변화를 보면 실험군에 있어서 전에 비하여 처치 후 7일째에 증가하였다(Fig. 11).

(나) 호중구 수의 변화

말초 혈액 호중구 수의 변화를 보면, 실험군에 있어서 처치 전에 비하여 처치 후 7일째에 증가하였다(Fig. 11).

(다) 림프구 수의 변화

말초 혈액 림프구 수의 변화를 보면, 실험군에 있어서 처치 전에 비하여 처치 후 7일째에 감소하였다(Fig.11).

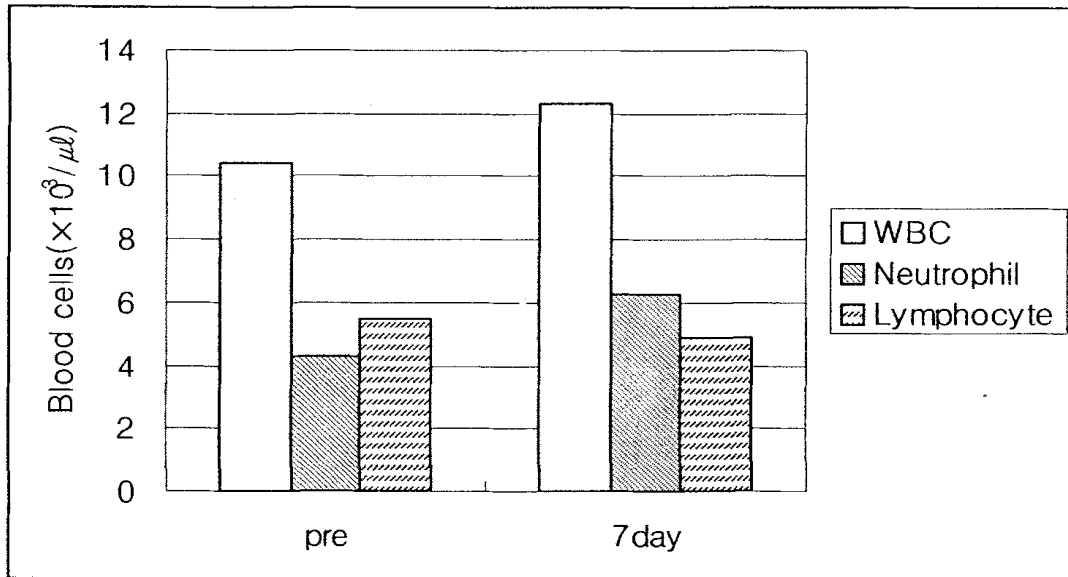


Fig.11 The chang of blood cells in peripheral blood of experimental group using ozone water

(라) 호중구/림프구 비(N/L ratio)

말초 혈액 N/L ratio는 처치 전($0.96 \pm 0.65 \times 10^3 / \mu l$)에 비하여 처치 후 7일째에 $16.16 \pm 76.86 \times 10^3 / \mu l$ 로 증가하였다.

나) 오존요법(오존가스)의 젖소 유방염의 예방효과

(1) 우유 중 체세포 수의 변화

(가) 대조군

대조군에 있어서 우유 중 체세포 수의 변화를 보면 3주간 증감을 반복하여, 0일, 7일, 14일 및 21일에 각각 $1,879 \pm 2,722.5$, $895.5 \pm 2,722.5$, $895.5 \pm 1,179.0$, $1,543.0 \pm 2,496.4$ 및 $953.2 \pm 1,628.7 \times 10^3/\text{ml}$ 이었다.

(나) 실험군

실험군에 있어서 오존 가스로 21일간 유두를 소독한 결과 수가 처치 전 ($992.6 \pm 1,499.0 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 처치 후 14일째 ($653.5 \pm 1,716.7 \times 10^3/\text{ml}$)에 우유 중 체세포 다소 감소하였다가, 이후 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 대조군과 비교해 볼 때, 처치 후 14일째에 실험군이 대조군에 비하여 우유 중 체세포 수가 현저하게 저하하였으나, 21일째에는 실험군 ($1,150.0 \pm 3,033.0 \times 10^3/\text{ml}$)이 대조군 ($953.2 \pm 1,628.7 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 증가된 수준이었다(Fig. 12).

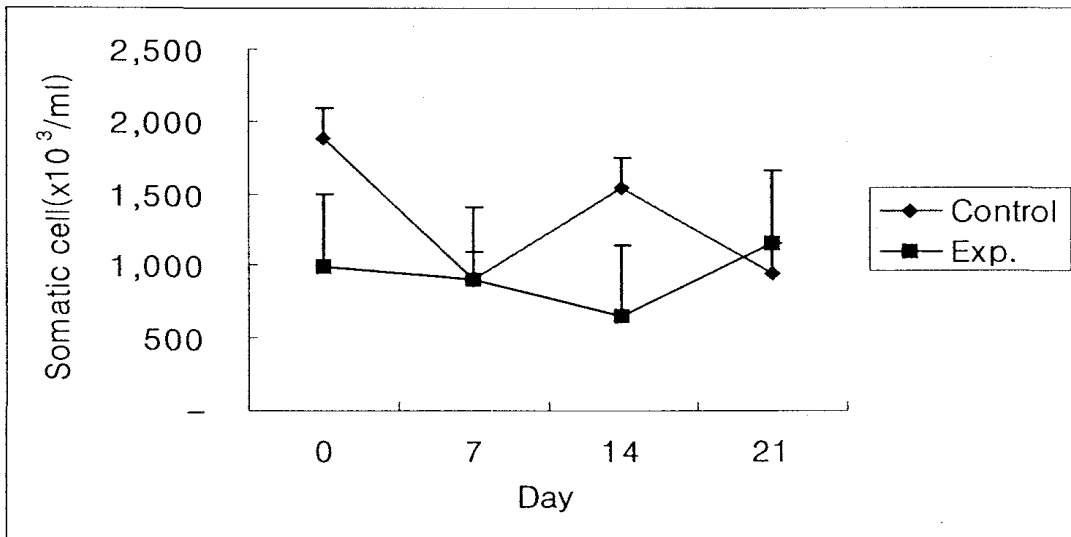


Figure 12. The change of the somatic cells in milk of experimental group treated with ozone gas(8ppm)

4) 결론

가) 우유 중 체세포수의 변화는 대조군에 있어서는 항생제의 치료와 더불어 감소하는 경향을 나타낸 반면, 실험군에 있어서는 오존수의 투여에 의해 증가하는 경향을

나타내었다.

나) 말초혈액 총 백혈구 수 및 백혈구 백분비의 변화에서는 총 백혈구 수, 호중구 수 및 호중구/림프구 비는 오존수 투여 후 7일째 투여 전에 비하여 증가된 소견을 나타내었고, 림프구수는 감소된 소견을 나타내었다.

다) 실험군에 있어서 오존가스로 21일간 유두를 소독한 결과 14일째 우유 중 체세포수가 처치 전에 비하여 감소하였다가 이후 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 군 내 및 군 간에 있어 유의성이 인정되지 않았다.

라) 이상의 결과를 종합해 볼 때, 오존수의 유두내 주입은 젖소 유방염의 치료에 유효하지 못하였으며, 또한 오존가스를 이용한 유두소독은 유방염의 예방에 영향을 미치지 못하였다.

3. 시제품 오존제제의 젖소 유방염에 대한 치료효과 시험

가. 재료 및 방법

1) 재료:

오존연고의 유방염 치료효과를 구명하기 위한 실험에 사용한 재료는 충남 연기군 소재 목장 1개소(6두, 13분방) 및 조치원읍 소재 목장 1개소(3두, 7분방), 충남 공주시 소재 목장 1개소(10두, 11분방), 전북 익산 소재 목장 2개소(5두 17분방)에서 각각 사육중인 만성 유방염에 이환된 총 24두, 49분방을 대상으로 하여 각각 공시하였다.

2) 방법:

가) 군배치:

본 실험에서 사용한 공시분방은 총 49분방으로서 대조군(7분방) 및 실험군(42분방)으로 나누어 각각 공시하였다.

실험군은 유즙 체세포수를 기준으로 A군(50만-100만/ml), B군(100만-300만/ml) 및 C군(300만 이상/ml)으로 각각 나누어 공시하였다.

나) 오존 연고의 제조:

본 실험에 사용한 오존 연고는 식물유(채종유)에 오존 발생 장치(꼬레아, 한국)로 3일간 200ppm의 농도로 폭기하여 제조하였다.

다) 각 군의 처치:

대조군에 있어서는 항생제 감수성 시험의 결과를 토대로 가장 감수성이 높게 나타난 norfloxacin(비유기용 유방염연고: 노파진, 8g <주> 대성미생물, 한국)을 1일 2회, 3일간 해당 분방에 각각 주입하였다.

실험군A, B 및 C는 실험실에서 제조한 오존 연고를 1일 2회 3일간 해당 분방에 각각 주입하였다.

라) 체세포수 및 세균수 측정

대조군 및 실험군에 있어서 우유중의 체세포수와 세균수의 변화는 처치 전, 처치 후 3일 및 7일째에 각각 분방별로 유즙을 채취한 다음, 자동 유즙 체세포 수 측정기(Fossmatic-90, 덴마크, 남양유업 소재)를 이용하여 측정하였다.

마) 혈액검사:

혈액검사를 위하여 공시우의 유정맥 및 미정맥에서 처치 전과 처치 후 7일째에 각각 약 5ml를 진공 채혈관(EDTA 첨가)을 사용하여 채혈하였으며, 말초 혈액 총 백혈구 수 및 백혈구 백분비의 변화는 자동혈액검사기(HemaVet, 미국)를 이용하여 각각 측정하였다.

바) 혈액화학검사:

혈청 총 단백질(Total protein:TP)의 변화를 검사하기 위하여 유정맥에서 약 5ml의 혈액을 항응고제 미첨가 진공채혈관을 사용하여 채혈하였으며, 실온에서 응고시킨 다음, 혈청을 분리하여 동결(-20 C)하였다가 측정에 공하였다. TP는 자동혈액화학 분석기(SM-4000, B.S. Biochemical systems, Italy)로 측정하였다.

사) 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과에 대한 유의성 검정은 t-test로 수행하였다.

나. 결과

1) 우유 중 체세포수의 변화

가) 대조군

대조군에 있어서 항생제 투여에 따른 우유 중 체세포 수의 변화를 보면 투여 후 3일째($1685.857 \pm 2079.821 \times 10^3/\text{ml}$)에 투여 전($4,358 \pm 2753.9 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 감소하였다가 7일째($4019.4 \pm 4652.0 \times 10^3/\text{ml}$) 약간 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 13).

나) 실험군

실험군에 있어서는 10ml의 오존연고를 3일간 해당분방에 각각 주입하였는데, 처치 전에 비하여 3일째 및 7일째에 각각 유즙내 체세포 수는 계속 감소하는 추세를 나타내었다. A군에 있어서는 오존연고 투여 전($662 \pm 195.8 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 투여 후 유즙 체세포수가 약간씩 감소하는 경향을 나타내어 7일째 $595 \pm 541.9 \times 10^3/\text{ml}$ 이었으나 군내의 변화에는 유의성이 인정되지 않았다. 또한 B군은 A군과 유사하게 투여 전($1,762.05 \pm 601.9 \times 10^3/\text{ml}$)에 비해 유즙 체세포수가 약간씩 감소하여 7일째 $1,258 \pm 823.9 \times 10^3/\text{ml}$ 이었고 군내의 변화는 투여 후 7일째 투여 전에 비하여 유의성 있는 감소 소견을 나타내었다($p < 0.01$). 한편 C군에 있어서는 오존연고 투여 전($7,515.9 \pm 3604.0 \times 10^3/\text{ml}$)에 비하여 투여 후 현저한 감소 경향을 나타내었고 7일째 유즙내 체세포수는 $1,276.1 \pm 973.5 \times 10^3/\text{ml}$ 이었다. 군내의 변화에서는 오존연고 투여 후 3일째에 투여 전에 비하여 유의성 있는 감소 소견이 인정되었다($p < 0.01$). 그러나 대조군과 각 실험군 간의 유의성은 인정되지 않았다 (Fig. 13).

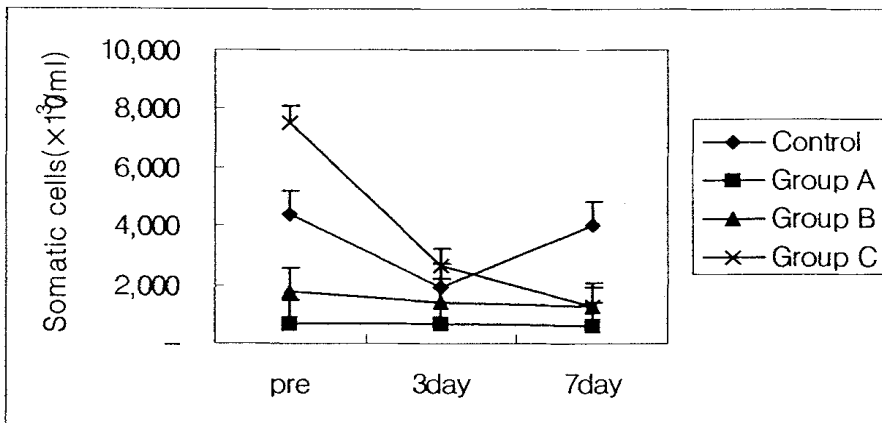


Fig.13 The change of somatic cells after injection with ozone ointment

2) 우유 중 세균수의 변화

대조군에 있어서 항생제 투여에 따른 우유 중 세균 수의 변화를 보면 투여 전 ($40 \pm 53.39 \times 10^3/\text{ml}$)과 비교하여 7일째($32.8 \pm 46.3 \times 10^3/\text{ml}$)에 감소하는 경향을 나타내었다. 오존연고에 대한 세균수의 변화는 실험군에 있어서 처치 전에 비하여 7일째에 각각

감소하는 추세를 나타내었다. A군에서는 오존연고 투여 전($28.6 \pm 26.1 \times 10^3/\text{ml}$)과 비교하여 7일째 세균 수가 $25.7 \pm 38.2 \times 10^3/\text{ml}$ 로 약간 감소하는 경향을 보였으며, B군은 오존연고 투여 전($38.5 \pm 50.2 \times 10^3/\text{ml}$)과 비교하여 7일째($22.5 \pm 21.6 \times 10^3/\text{ml}$) 감소하였다. 특히 C군은 오존 연고 투여 전 세균수가 $83.0 \pm 101.6 \times 10^3/\text{ml}$ 이었으나 투여 후 7일째 $27.8 \pm 32.5 \times 10^3/\text{ml}$ 으로 현저한 감소를 보였다(Fig. 14).

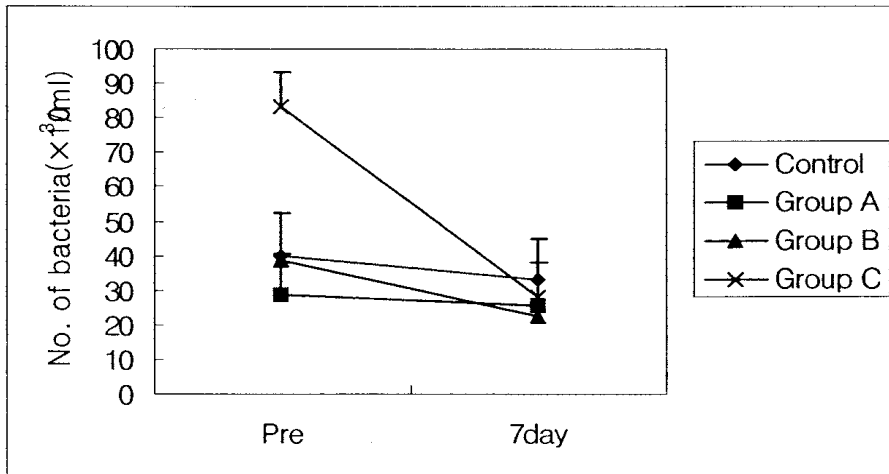


Fig. 14 The change of number of bacteria after injection with ozone ointment

3) 말초혈액 총 백혈구 수 및 백혈구 백분비의 변화

가) 총 백혈구 수의 변화

말초 혈액 총 백혈구 수의 변화를 보면 B군에서는 오존연고 투여 전에 비하여 투여 후 7일째에 약간 감소하였으나 투여 전과 거의 유사한 소견을 나타내었다 (Fig.15).

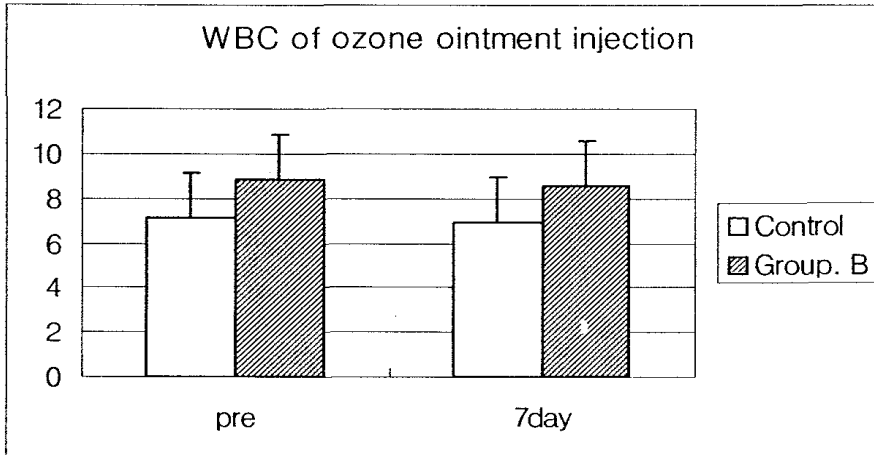


Fig. 15 The Change of WBC after injection with ozone ointment

4) 혈액화학치의 변화

혈액 단백질 농도의 변화를 보면, 대조군에서는 7일째 투여 전에 비하여 약간 감소하는 소견을 나타낸 반면, B 군에서는 투여 전과 유사하였다. 그러나 군 간에는 유의성이 인정되지 않았다 (Fig. 16).

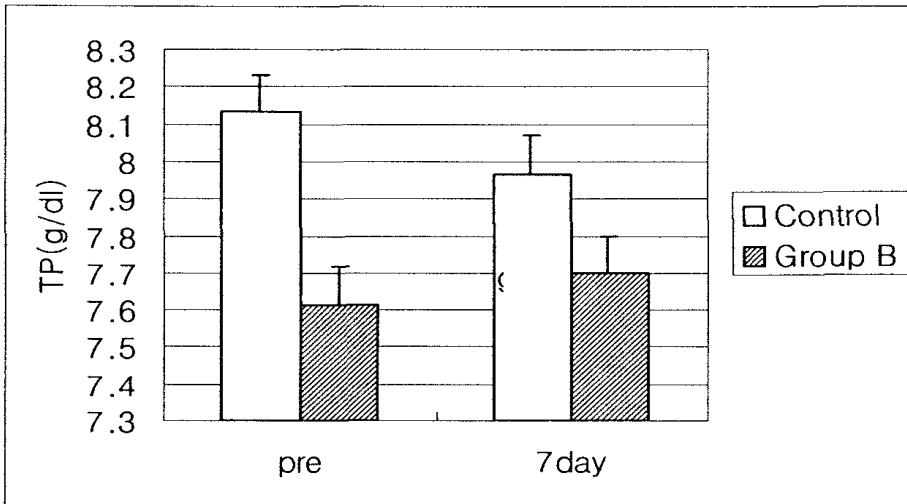


Fig. 16 The change of total protein after injection with ozone ointment

다. 결론

1) 우유 중 체세포수의 변화를 보면, 대조군에 있어서는 항생제 투여 후 3일째에 투

여 전에 비하여 감소하였다가 7일째 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

2) 실험군에 있어서는 모든 군에서 오존연고 투여에 의해 체세포수가 감소하는 경향을 나타내었는데, 특히 C군에서 3일째 투여 전에 비하여 유의성 있는 감소 소견을 나타내었다($p < 0.01$). 그러나 군 간에는 유의성이 인정되지 않았다.

3) 오존연고의 투여에 따른 세균수의 변화에서는 대조군 및 실험군 모두에서 7일째 투여 전에 비하여 감소하는 경향을 나타내었는데, C군에서 가장 현저하였다. 그러나 실험군과 대조군간의 유의성은 인정되지 않았다.

4) 말초 혈액 총 백혈구 수는 대조군 및 B 군에서 7일째 투여 전과 유사한 소견을 나타내었다.

5) 혈액단백농도는 대조군에서는 7일째 투여 전에 비하여 약간 감소하는 소견을 나타내었으나 B 군에서는 투여 전과 유사하였다. 그러나 군 간의 유의성은 인정되지 않았다.

6) 이상의 결과를 종합해 볼 때, 오존연고의 투여는 유방염의 치료에 유효한 것으로 판단되었다.

제 2절. 오존제제의 젖소 유방염 및 발굽질병 원인균에 대한 살균효과 시험

1. 유방염 및 발굽질병 원인균에 대한 시험관내 살균효과 시험

가. 재료 및 방법

1) 유방염 원인균의 배양 및 성상확인 시험

공주, 홍성, 부여 및 경기지역에 위치한 젖소 농장에서 유방염에 이환된 젖소의 유즙을 무균적으로 채취하여 균분리 시험에 공시하였다. Tryptic soy broth, Tryptic soy agar, Brain heart infusion broth, Brain heart infusion agar, Desoxycholate agar, Brilliant green agar, MacConkey agar, TSI medium 등을 공시하였고 변양 혈액액가 blood medium을 제조하여 사용하였다.

Enterobacteriaceae 분리 및 성상확인 시험법과 Gram positive cocci의 분리 및 생화학적 동정시험법을 응용하여 *E. coli*, *Staphylococcus aureus* 및 *Streptococcus spp.*를 분리 동정하였다. 시험기간 중 21례의 가검물로부터 *E. coli* 28주, *Staphylococcus aureus* 16주, 그리고 *Streptococcus spp.* 8주를 분리하여 공시하였다.

표준균주로는 *E. coli* ATCC 43814, ATCC 35750, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, KCTC 1916 그리고 *Streptococcus pyogenes* KCTC 3096을 공시하였다.

2) 발굽질병 원인균의 배양 및 성상확인 시험

젖소 발굽질병의 주요 원인체인 *Fusobacterium necrophorum* 및 *Bacteriodes nodosus*를 분리하기 위해 대전, 충남서부 및 경기지역에 위치한 젖소 농장에서 사육 중이거나 도축장에 계류된 젖소 중 발굽질병의 증세를 나타내는 젖소를 대상으로 균분리를 시도하였다. 염증부위의 표면을 희석알콜(70%)로 세척한 후 외과도 또는 투관침을 이용하여 깊은 조직으로부터 시료를 채취하였다. 직접 도말검사에 의해 그람음성, 비아포형성, 장간균 형태를 관찰하였다. 가검재료를 Cooked meat broth에서 증균시킨 다음, BHI 또는 Tryptic soy broth base Blood agar에 접종하고 Anaerobic jar 또는 CO₂ incubator를 이용하여 배양하였다. 48-72시간에 집락을 채취하고 다시 증균시킨 다음 Bergey's Manual에 따른 생화학적 성상 검사를 실시하여 동정하였다.

시험기간 중 9 례의 가검물로부터 *Fusobacterium spp.* 1주 그리고 *Bacteriodes spp.* 2주를 분리하였다. 표준균주로는 *Fusobacterium necrophorum* ATCC 51357 및

Bacteriodes nodosus ATCC 25549를 도입하여 공시하였으며, 본 시험에서는 표준균주를 대상으로 시험하였다.

3) 오존가스의 살균효과 시험

유방염 및 발굽질병 병원으로부터 분리된 균주 및 표준균주를 Blood agar에 접종하고 각각 적합한 배양 조건에서 증식한 다음, 집락을 채집하여 액체배지에 접종하여 증균시킨 후 희석하여 Plate 당 생균집락수가 호기성균은 약 100-200cfu/200 μ l 그리고 혐기성균은 약 50-100 cfu/200 μ l 되도록 조정하였다. 이 균액 200 μ l를 Plate count agar 또는 Blood agar 평판에 접종하고 밀폐조절용 특수 용기 속에 넣고, 특수 제작된 오존가스 발생기를 이용하여 0.5ppm, 1.0ppm, 5.0ppm, 10ppm 및 20ppm 농도의 오존가스를 각각 주입한 다음, 5분, 10분, 30분, 60분 간 작용시켰다. 그리고 Agar plate를 균종에 따라 호기성 배양은 24시간 그리고 혐기성 배양은 72시간 실시한 후 집락수를 계산하였다.

각 균종에 대해 오존가스를 처리하지 않은 음성 대조시험을 동시에 실시하였다.

4) 오존수의 살균효과 시험

유방염 및 발굽질병 병원으로부터 분리된 균주 및 표준균주를 Blood agar에 접종하고 각각 적합한 배양 조건에서 증식한 다음, 집락을 채집하여 액체배지에 접종하여 증균시킨 후 희석하여 Plate 당 생균집락수가 호기성균은 약 100-200 cfu/200 μ l 그리고 혐기성균은 약 50-100 cfu/200 μ l 되도록 각각 해당되는 액체배지를 이용하여 조정하였다. 그리고 특수 제작된 오존가스 발생기를 이용하여 0.5ppm, 1.0ppm, 5 ppm, 10 ppm 및 20 ppm 의 오존가스를 액체 배지 속에 5분, 30분, 60분 및 120분 동안 각각 주입하여 용존오존수를 형성하게 하고 밀봉하였다. 그리고 균종에 따라 호기성배양은 24시간 그리고 혐기성 배양은 72시간 배양한 후, 이 배양액 200 μ l를 취하여 Plate count agar 또는 Blood agar 평판에 도말 하여 호기성 또는 혐기성 배양을 24시간 및 72시간 각각 실시 한 후 집락수를 계산하였다.

각 균종에 대해 오존처리하지 않은 액체배지의 음성 대조시험을 동시에 실시하였다.

나. 결과

1) 오존가스의 살균효과

젖소 유방염 및 발굽질병 원인균에 대한 오존가스의 살균효과를 시험한 바 Table 1과 같은 결과를 얻었다.

유방염 원인균인 *E. coli* 균의 표준주와 분리주 3주를 대상으로 시험한 바, 오존가스를 5분 및 10분간 처리시 10ppm에서 유의한 살균효능을 나타내기 시작했으나 20ppm에서도 완전살균 효과는 인정되지 않았다. 30분간 처리시에는 5.0ppm 이상에서 완전살균 효과를 보였으며, 60분 처리시에는 1.0ppm 이상에서 완전살균 효과가 관찰되었다.

Staphylococcus aureus 균은 오존가스의 5분 및 10분 처리시에 20ppm에서 살균효과가 관찰되었으나 완전살균 효과는 없었다. 30분 처리시에는 10ppm에서 살균효과가 있었으나 20ppm에서도 완전살균 효과는 인정되지 않았다. 그리고 60분 처리시에는 1.0ppm 이상에서 완전살균 효과가 인정되었다.

Streptococcus spp 는 5분 및 10분 처리시 10ppm에서부터 살균효과가 인정되었으며, 20ppm에서 완전살균 효과가 관찰되었다. 30분 처리시에는 1.0ppm에서 살균효과 그리고 5.0ppm에서 완전살균 효과가 관찰되었으며, 60분 처리시에는 0.5ppm부터 살균효과가 있었고 1.0ppm에서 완전살균이 인정 되었다.

발굽질병의 원인체인 *Fusobacterium necrophorum*을 오존가스로 5분간 처리시 20ppm에서 살균효능이 인정되었으나 완전살균은 되지 않았다. 10분간 처리시는 10ppm에서 살균효과가 있었고 20ppm에서 완전살균 효과가 인정되었다. 30분처리시에는 5.0ppm에서 살균 효과 그리고 10ppm에서 완전살균 효과가 있었다. 60분처리시에는 1.0ppm 이상에서 완전살균 효과가 인정되었다.

*Bacteriodes nodosus*는 5분 및 10분 처리시에 10ppm과 5.0ppm에서 각각 살균효과가 있고 20ppm에서 완전살균 효과가 관찰되었다. 30분 및 60분 처리시에는 1.0ppm에서 살균효과가 인정되었으며, 5.0ppm 이상에서 완전살균 효과가 있었다.

Table 1. *In vitro* bactericidal effects of ozone gas on the bacteria originated from bovine mastitis and food-rot

Organisms	Exposure time (min)	Ozone gas treatment (ppm)					Control
		0.5	1.0	5.0	10	20	
<i>E. coli</i> (n=3)	5	181*	179	168	46	36	186
	10	190	182	118	39	24	
	30	93	87	0	0	0	
	60	74	0	0	0	0	
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=3)	5	189	177	169	121	21	174
	10	166	170	136	98	17	
	30	155	154	87	33	9	
	60	79	0	0	0	0	
<i>Streptococcus spp.</i> (n=3)	5	129	137	79	26	0	128
	10	124	68	55	11	0	
	30	109	41	0	0	0	
	60	34	0	0	0	0	
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (n=1)	5	87	77	64	55	46	89
	10	75	79	70	29	0	
	30	56	44	29	7	0	
	60	41	0	0	0	0	
<i>Bacteriodes nodosus</i> (n=1)	5	81	69	48	19	0	97
	10	64	31	19	4	0	
	30	79	26	0	0	0	
	60	56	12	0	0	0	

* Mean colony numbers per plate of the triplicate trials :cfu/200 μ l

2) 오존수의 살균효과

젖소 유방염 및 발굽질병 원인균에 대한 오존가스의 살균효과를 시험한 바 Table

2 와 같은 결과를 얻었다.

유방염 원인균인 *E. coli* 균의 표준주와 분리주 3주를 대상으로 시험한 바, 오존수에 5분 처리시 10ppm에서 살균효과가 있었고, 20ppm에서 완전살균 효과가 있었다. 10분간 처리시 1.0ppm에서 살균효과 그리고 5.0ppm에서 완전 살균효과를 나타내었다. 30ppm 처리시에는 1.0ppm부터 완전살균 효과를 보였고, 60분 간 처리에서는 0.5ppm부터 완전살균 효과를 보였다.

Staphylococcus aureus 균은 오존수에 5분 간 처리시 10ppm 농도부터 살균효과가 인정되었고, 20ppm에서 완전살균 효과가 관찰되었다. 10분 처리시에는 5.0ppm에서 살균효과가 있었고 10ppm 이상에서 완전살균이 이뤄졌다. 30분간 처리에서는 1.0ppm에서 살균 효과 그리고 5.0ppm에서 완전살균 효과가 인정되었으며 60분간 처리에서는 1.0ppm에서부터 완전살균 효과가 인정되었다.

*Streptococcus spp.*를 오존수에 5분 처리시 5.0ppm에서부터 살균효과가 인정되었으며, 10ppm 이상 농도에서 완전살균 효과가 관찰되었다. 10분간 처리시에는 1.0ppm 이상의 농도에서 완전살균 효능이 인정되었다. 30분 처리시에는 1.0ppm 이상에서 완전 살균 효과가 관찰되었으며, 60분 처리시에는 0.5ppm 농도에서 부터 완전살균 효과가 인정 되었다.

발굽질병의 원인체인 *Fusobacterium necrophorum*을 오존수로 5분간 처리시 10ppm 농도에서 살균효능이 인정되었으며 20ppm에서 완전살균이 관찰되었다. 10분간 처리시는 1.0ppm에서 살균효과가 있었고 5.0ppm 이상에서 완전살균 효과가 인정되었다. 30분처리시에는 0.5ppm에서도 강한 살균효과가 있었고 그 이상 농도에서는 완전 살균 효과가 있었다. 60분처리시에는 0.5ppm 이상 농도에서 완전살균 효과가 인정되었다.

*Bacteriodes nodosus*는 5분간 처리시 5.0ppm에서부터 살균효과가 있었고, 10ppm 이상 농도에서 완전살균 효과가 인정되었다. 10분 처리시에 1.0ppm에서부터 강한 강한 살균 효과가 있었으며 1.0ppm 이상에서는 완전살균 효과가 관찰되었다. 30분 및 60분 간 처리시에는 0.5ppm에서부터 매우 유의한 살균효과가 인정되었으며, 60분간 처리시에는 0.5ppm 이상에서 완전 살균 되었다.

오존가스와 오존수의 살균효과를 위에서 얻어진 성적으로 비교하면 오존수의 처리가 오존가스에 비해 2-4 배의 강한 살균효능이 있었다.

Table 2. *In vitro* bactericidal effects of ozone water on the bacteria originated from bovine mastitis and food-rot

Organisms	Treatment time (min)	Ozone water treatment (ppm)					Control
		0.5	1.0	5.0	10	20	
<i>E. coli</i> (n=3)	5	136*	92	58	16	0	172
	10	83	21	0	0	0	
	30	63	0	0	0	0	
	60	0	0	0	0	0	
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=3)	5	132	71	29	18	0	179
	10	110	46	7	0	0	
	30	102	27	0	0	0	
	60	32	0	0	0	0	
<i>Streptococcus spp.</i> (n=3)	5	87	55	21	0	0	182
	10	44	0	0	0	0	
	30	46	0	0	0	0	
	60	0	0	0	0	0	
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (n=1)	5	73	42	36	4	0	93
	10	28	11	0	0	0	
	30	8	0	0	0	0	
	60	0	0	0	0	0	
<i>Bacteriodes nodosus</i> (n=1)	5	61	43	12	0	0	74
	10	36	8	0	0	0	
	30	28	0	0	0	0	
	60	0	0	0	0	0	

* Mean colony numbers per plate of the triplicate trials.; cfu/200 μ l

다. 결론

1) 오존가스 처리에 대한 *E. coli*, 및 *Streptococcus spp.*의 살균효과는 1.0ppm을 10분간 처리시 감소하기 시작하였고, 1.0-5.0ppm을 30-60분간 이상 처리시 완전 살균되었다. *Staph. aureus*는 30분간 처리시 5.0ppm에서부터 현저히 감소하였고 1.0ppm을 60분간 처리시 완전 살균되었다. *F. necrophorum* 및 *B. nodosus*는 1.0-5.0ppm을 30-60분간 이상 처리시 완전 살균되었다.

2) 오존수 처리의 살균효과는 *E. coli*는 1.0-5.0ppm을 30-60분 이상, *Staph. aureus*는 5.0-10ppm을 10-30분간 이상, *Streptococcus spp.*는 1.0-10ppm을 5-10분간 이상, 그리고 *F. necrophorum* 및 *B. nodosus*는 5.0-10ppm을 10분 이상 처리시 완전 살균되었다.

2. 유방염 및 발굽질병 발병동물에 대한 오존수의 살균효과시험

가. 재료 및 방법

1) 유방염 원인균의 배양 및 성상확인 시험

1년차와 동일한 방법으로 수행하였다.

시험기간 중 46례의 가검물로부터 *E. coli* 13주, *Salmonella spp.* 4주, *Staphylococcus aureus* 7주, *Streptococcus pyogenes* 8주, *Strep. agalactiae* 11주를 분리하였다. 7주의 *Staph. aureus* 중 3주는 coagulase-positive 이고 6주는 용혈성 양성 균주였으며, 11주의 *Strep. agalactiae* 중 9주는 CAMP test 양성이었다. 분리주를 24종의 항균제에 대해 감수성시험을 실시한 바, *E. coli*, *Salmonella* 와 *Staph. aureus*는 amikacin, sulfamethokazole 및 ciprofloxacin, 그리고 *Strep. spp.*는 sulfamethokazole, trimethoprim 및 amikacin에 대해 감수성이 있었으며, 그의 항균제는 높은 저항성을 보였다.

표준균주로는 *E. coli* ATCC 43814, ATCC 35750, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, KCTC 1916 그리고 *Streptococcus pyogenes* KCTC 3096을 공시하였다.

2) 발굽질병 원인균의 배양 및 성상확인 시험

1년차와 동일한 방법으로 수행하였다.

Bacillus spp. 5주, *Staphylococci* 3주, *Streptococci* 2주, *E. coli* 6주 를 분리하였다.

표준균주로는 *Fusobacterium necrophorum* ATCC 51357 및 *Bacteriodes nodosus* ATCC 25549를 도입하여 공시하였으며, 본 시험에서는 표준균주를 대상으로 시험하였다.

3) 오존수의 살균효과 시험

1년차 방법과 동일하게 수행하였다. 즉 유방염 및 발굽질병 병변으로부터 분리된 균주 및 표준균주를 blood agar에 접종하고 각각 적합한 배양 조건에서 증식한 다음, 집락을 채집하여 액체배지에 접종하여 증균시킨 후 희석하여 Plate 당 생균집락수가 호기성균은 약 100-200 cfu/200 μ l 그리고 혐기성균은 약 50-100 cfu/200 μ l 되도록 액체배지를 이용하여 조정하였다. 그리고 특수제작된 오존가스 발생기를 이용하여 0.05ppm, 0.1ppm, 1.0ppm, 5.0ppm 농도의 오존이 포함된 식염수(10 ml)내에 균액 1.0 ml을 넣고 5분, 30분, 60분 및 120분 동안 처리한 다음 200 μ l를 채취하여 균종에 따라 호기성배양은 24시간 그리고 혐기성 배양은 72시간 blood agar에 배양한 후 집락수를 계산하였다. 각 균종에 대해 오존처리하지 않은 식염수액에 대한 음성 대조시험을 동시에 실시하였다.

4) 유방염 및 발굽질병 원인균 감염 흑염소에 대한 오존수의 살균효과 시험

젖소 유방염 병변으로부터 분리된 *Staph. aureus*를 대상으로 병원성 스크리닝시험에서 선별된 균주를 5 \times 10⁶ cfu/ml 및 5 \times 10⁹ cfu/ml되게 농도를 조절한 후 재래 흑염소의 유방 내에 주입한 다음 24시간 후에 0.1 ppm 오존수 20ml을 주입하였다. 그리고 24, 48 및 72시간 별로 유즙내 존재하는 균수(cfu/200 μ l)를 계산하였다. 또한 젖소 발굽질병의 주요 원인체인 *F. necrophorum*을 배양한 후 균농도를 5 \times 10⁶ cfu/ml 되게 조정하여 발굽 지간에 1ml씩 접종하였다. 그 후 발굽을 0.1 ppm 또는 5.0 ppm 농도의 오존수에 8시간 간격으로 1일 3회씩 3일간 침적한 후 집종 부위의 biopsy(0.5g)조직을 갖고 교질화 한 후 10배 되게 BHI broth를 가하고 진탕한 다음 200 μ l를 취하여 Blood agar 평판에 도말하고 anaerobic jar를 이용한 혐기성배양을 18-48 시간실시한 후 집락수를 계산하였다.

5) 자연 발병된 젖소 유방염 및 발굽질병에 대한 오존수의 살균효과시험

대전 충남지역에 사육 중인 유방염과 발굽질병에 이환된 젖소를 대상으로 하였다. 유방염에 걸린 소의 유즙 중 총세균수를 산정한 다음 0.1 ppm의 오존수 100ml 을 분방마다 주입하고 24, 48, 72시간 별로 유즙내 존재하는 균수를 계산하였다. 또한 발굽질병에 이환된 젖소를 대상으로 병변 부위로부터 혐기성 세균수를 산정한 다음, 0.1 ppm 및 5.0 ppm 오존수를 발굽 소독조에 넣고 하루 4회 이상 발굽침적을 실시하였

ppm 및 5.0 ppm 오존수를 발굽 소독조에 넣고 하루 4회 이상 발굽침적을 실시하였다. 시험개시 후 3일째 병변부로부터 biopsy(0.5g)조직을 취하여 위 항과 동일한 요령으로 집락수를 계산하였다. 발굽소독조의 오존수는 1일 3회 교체하였다.

나. 결과

1) 오존수의 살균효과

1차년도에 이어 젖소 유방염 및 발굽질병 원인균에 대한 오존수의 시험관내 살균효과를 확대 시험한 바 Table 1과 같은 결과를 얻었다.

유방염 원인균인 *E. coli* 균의 표준주와 분리주 7주를 대상으로 시험한 바, 오존수에 5분 처리시 10ppm에서 살균효과가 있었고, 10분-30분간 처리시 0.1-1.0ppm부터 완전살균 효과를 보였고, 60분간 처리에서는 0.05ppm부터 완전살균 효과를 보였다.

Staph. aureus 균은 오존수에 5분간 처리시 0.1ppm 농도부터 살균효과가 인정되었고, 10분 처리시에는 1.0ppm 이상에서 완전살균이 이뤄졌다. 30분간 처리에서는 0.05ppm에서 살균 효과 그리고 0.1ppm에서 완전살균 효과가 인정되었으며, 60분간 처리에서는 0.05ppm에서부터 완전살균 효과가 인정되었다. *Streptococcus spp.*를 오존수에 5분 처리시 0.1ppm에서부터 살균효과가 인정되었으며, 10분간 처리시에는 0.1ppm 이상의 농도에서 완전살균 효능이 인정되었다. 30분 처리시에는 0.1ppm 이상에서 완전살균 효과가 관찰되었으며, 60분 처리시에도 0.1ppm 농도에서부터 완전살균 효과가 인정되었다.

발굽질병의 원인체인 *F. necrophorum*을 오존수로 5분간 처리시 0.1ppm 농도에서 살균효능이 인정되었으며 5.0ppm에서 완전살균이 관찰되었다. 10분간 처리시는 1.0ppm 이상에서 완전살균 효과가 인정되었다. 30분 처리시에는 0.05ppm에서부터 매우 유의한 살균효과가 인정되었으며, 60분간 처리시에는 0.05ppm 이상에서 완전살균 되었다.

1차년도 시험성적과 비교한 바 오존을 액체 배지속에 용존시킨 경우와 생리식염수속에 용존시켜 균을 처리한 경우 생리식염수 내에 용존 오존의 살균효과가 높게 나타났다. 이후 유방염 및 발굽질병에 대한 살균효과시험에서 오존수 처리 농도는 0.1ppm으로 하여 수행하였다.

2) *Staph. aureus*를 유방내 인공감염시킨 흑염소에 대한 오존수의 살균효과

*Staph. aureus*를 유방내에 인공감염시킨 흑염소에 대한 오존수 살균효과 시험 결과는 Table 2와 같다.

5×10^9 cfu/ml의 균을 12 분방에 접종한 후 24시간째에 0.1ppm의 오존수를 주입한 후 24, 48 및 72시간에 각각 유즙 중 일반 균수를 측정한다 72시간에는 급히 증가하는

경향이 있었으며, 5×10^6 cfu/ml의 접종 분방은 $4.2-9.2 \times 10^3$ cfu/ml의 균이 인정되어 특이한 균수의 변동은 인정되지 않았다. 식염수를 주입한 대조 분방의 경우 오존수 처리 후 균수가 상승하였으며 48-72시간째에 감소하였다.

3) *F. necrophorum* 를 발굽내 인공감염시킨 흑염소에 대한 오존수의 살균효과

F. necrophorum 균(5×10^6 cfu/ml)을 흑염소의 발굽 지간부 피하 근육 내에 접종한 다음 오존수를 처리하여 살균효과를 측정함바 Table 3과 같은 결과를 얻었다.

0.1ppm의 오존수를 처리한 균에서는 접종 후 3일째에 접종부위를 biopsy하여 혐기성 균 수를 측정함 바 대조군과 유의한 차이가 인정되지 않았으나 5.0ppm의 오존수 처리균에서는 유의한 균 수의 감소효과가 관찰되었다.

Table 1. *In vitro* bactericidal effects of ozone water on the bacteria originated from bovine mastitis and food-rot

Organisms	Treatment time (min)	Ozone water treatment(ppm)				Control+
		0.05	0.1	1.0	10	
<i>E. coli</i> (n=7)	5	169*	126	24	22	186
	10	96	11	0	0	
	30	66	0	0	0	
	60	0	0	0	0	
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=7)	5	185	69	7	11	184
	10	174	51	0	0	
	30	81	0	0	0	
	60	57	0	0	0	
<i>Streptococcus spp.</i> (n=8)	5	170	45	16	0	168
	10	119	0	0	0	
	30	62	0	0	0	
	60	45	0	0	0	
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (n=2)	5	108	71	19	0	136
	10	67	10	0	0	
	30	40	0	0	0	
	60	0	0	0	0	
<i>Bacteroides nodosus</i> (n=3)	5	69	36	8	0	78
	10	35	0	0	0	
	30	22	0	0	0	
	60	0	0	0	0	

* Mean colony numbers per plate of the triplicate trials; cfu/200 μ l

+No ozone treatment

Table 2. Bactericidal effects of ozone water on the udders of Korean black goats artificially infected with *Staph. aureus*

Groups	Inocul. cfu/ml	Udders	Ozone water (20ml)*	Time(hrs) after treatment		
				24	48	72
Treated	5×10^9	12	0.1ppm	8.6×10^5 **	7.3×10^6	5.8×10^8
	5×10^6	12	0.1ppm	9.2×10^2	4.2×10^3	6.2×10^3
Control	saline	4	0.1ppm	8.6×10^2	6.7×10^1	2.8×10^1

* Ozone water was administered at 24 hrs after bacterial inoculation.

** Mean colony number per plate of the groups: cfu/200 μ l

Table 3. Bactericidal effects of ozone water on the hooves of Korean black goats artificially infected with *F. necrophorum*

Groups	Inocul. cfu/ml	No. of hooves	Ozone water	Viable cells (cfu/200 μ l)
Treated	5×10^6	6	0.1ppm	4.8×10^2
		6	5.0ppm	1.7×10^1
Control	5×10^6	2	-	2.6×10^2

4) 젖소 유방염에 대한 오존수의 살균효과

젖소 유방염에 이환되어 부종과 경결등 중등도의 임상소견을 보이는 분방을 대상으로 0.1ppm과 1.0ppm의 오존수 100ml을 주입한 후 유즙중에 존재하는 일반 세균수를 검사한 바 Table 4와 같은 결과를 얻었다.

0.1ppm 오존수 처리군에서 유의한 균수의 감소현상은 인정되지 않았으며, 1.0ppm 처리군에서는 24시간과 72시간에 다소 감소하는 경향을 보였다. 대조군으로 공시한 유방염 이환 분방에서는 식염수 접종에 따른 유의한 균수 변화가 인정되지 않았다.

Table 4. Bactericidal effects of ozone water on the mastitis of dairy cattle

Groups	Ozone water	Mastitic udders	Viable cells before Treat. (cfu/200 μ l)	Time(hrs) after treatment		
				24	48	72
Treated	0.1ppm	38	$7.2 \times 10^{5*}$	4.1×10^6	5.7×10^5	3.7×10^6
	1.0ppm	24	4.8×10^6	5.3×10^4	4.8×10^5	7.8×10^7
Control**	0.1ppm	6	6.3×10^5	5.1×10^5	3.6×10^5	2.4×10^6
	1.0ppm	6	5.2×10^4	7.4×10^5	5.9×10^5	5.7×10^5

* Mean colony number per plate of the groups: cfu/200 μ l

** The mastitic udders inoculated with saline

5) 젖소 발굽질병에 대한 오존수의 살균효과

발굽질병에 이환된 젖소의 지간부 병변으로부터 biopsy한 가검물에 대해 오존수 처리에 따른 균수의 변화를 측정할 때 Table 5와 같은 결과를 얻었다.

0.1ppm의 오존수를 3일간 처리한 경우 병변부의 균수에 유의한 차이가 없었다. 5.0ppm의 오존수 처리군에서는 접촉전에 비해 유의한 균수의 감소가 인정되었다. 오존수를 처리하지 않은 대조군(control)에는 균수가 다소 증가하였다.

Table 5. Bactericidal effects of ozone water on the hooves with foot-rot

Groups	Ozone water	No. of hooves	Viable cells(cfu/200 μ l)	
			Before treatment	After treatment
Treated	0.1ppm	9	4.3 \times 10 ^{3*}	5.2 \times 10 ²
	5.0ppm	6	6.7 \times 10 ²	0.7 \times 10 ¹
Control	0	1.1.1.1.1.1. 3	8.8 \times 10 ²	2.9 \times 10 ³

* Mean colony number per plate of the groups by anaerobic culture: cfu/200 μ l

다. 결론

- 1) 오존수의 시험관내 살균효과시험 결과 0.1ppm, 1.0ppm 및 5.0ppm에서 유의한 살균효과가 인정되었다.
- 2) *Staph. aureus* 인공 감염된 흑염소 유방에 대한 시험에서 0.1ppm 및 1.0ppm 오존수의 살균효과는 인정되지 않았다.
- 3) *F. necrophorum* 인공 감염된 흑염소 발굽에 대한 오존수의 살균효과시험에서 5.0ppm 오존수는 살균효과가 인정되었다.
- 4) 젖소 유방염에 대한 0.1ppm 및 1.0ppm의 오존수의 살균효과는 유의하지 않았으며, 발굽질병에서는 5.0ppm 오존수 처리에서 살균효과가 관찰되었다.

3. 유방염 및 발굽질병 발병 동물에 대한 시제 오존연고의 살균효과시험

가 재료 및 방법

- 1) 유방염 및 발굽질병 원인균의 분리배양 및 정상확인
1년 및 2년차와 동일한 방법으로 수행하였다. 유방염에 이환된 젖소 27두를 대상으

로 원인균을 분리하고 성상을 시험하였다. 유방염 가검재료 27건으로 부터 *Staph. aureus* (11주), *Strep. pyogenes* (2주), *Strep. agalactiae* (9주), *Salmonella spp* (5주) 그리고 *E. coli* (15주)를 각각 분리하였다. *Staph. aureus* 중 5주는 coagulase-positive 이고 10주는 용혈성 양성 균주였으며, *Strep. agalactiae* 중 8주는 CAMP test 양성 이었다. 분리주를 22종의 항균제에 대해 감수성시험을 실시한 바, *E. coli*, *Salmonella* 와 *Staph. aureus*는 ampicillin, cephalothin, clindamycin, enrofloxacin, erythromycin, kanamycin, lincomycin, streptomycin, sulfamethokazole 및 ciprofloxacin 에 대해 저항성이 있었으며, amikacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, lincospectin 및 neomycin에 대해 감수성이 있었다.

또한, 젖소 발굽질병 병변부로 부터 주요 원인균을 분리하기 위해 발굽병변 부위로 부터 균분리를 시도하였다. 발굽병변 부위의 표면을 희석 알콜 (70%)로 세척한 후 외과도 또는 투관침을 이용하여 깊은 조직으로부터 biopsy시료를 채취하였다. 직접 도말검사에 의해 그람염색성, 균형태, 균감염정도를 관찰하였다. 그리고 가검재료를 cooked meat broth에서 증균시킨 다음, BHI 또는 tryptic soy broth base blood agar 에 접종하고 Anaerobic jar 또는 CO₂ incubator를 이용하여 배양하였다. 48-72시간에 집락을 채취하고 다시 증균시킨 다음 Bergey's Manual에 따른 생화학적 성상 검사를 실시하여 동정하였다. 시험기간 중 7례 13개 발굽 가검물로부터 *Fusobacterium spp.* 7주, *Bacteroides spp.* 3주, *Bacillus spp.* 4주, *Staphylococci spp* 3주, *Streptococci spp* 9주, *E. coli* 12주를 분리하였다. 분리된 *Fusobacterium spp.* 7주와 *Bacteroides spp.* 3주의 성상확인 시험을 Koneman의 방법에 따라 수행하였으며, 동정요령은 Bergey's Manual을 참고하였다.

표준균주로는 *E. coli* ATCC 43814, ATCC 35750, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, KCTC 1916 그리고 *Streptococcus pyogenes* KCTC 3096, *Fusobacterium necrophorum* ATCC 51357 및 *Bacteriodes nodosus* ATCC 25549를 공시하였다.

2) 오존연고의 시험관내 살균효과 시험

오존연고의 살균효과 측정법, 즉 O₃ MIC(ozone minimum inhibitory concentration) 측정법을 고안하여 수행하였다. 간략히 기술하면 저장중인 균을 BHI broth에서 1차 배양하고 난 후 Blood agar에서 18-48시간 배양하고 난 다음 집락을 취하여 BHI broth에서 pure culture한 다음 균 농도를 10⁸⁻¹⁰cfu/ml 되게 조정하였다. 그리고 균액 20 μ l를 BHI broth(5ml)에 분주하였다. 각 각 시험관에 100ppm, 200ppm 및 300ppm 오존가스를 3일간 처리하여 제조한 오존연고를 시험관별로 10 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 500 μ l, 1,000 μ l, 2000 μ l씩 주입하고 30분간 혼합하였으며, 그후 시험관을 호기성균은 18시간 그리고 혐기성균은 48시간 각 각 배양하고, 배양된 균액을 한 평판 당 약 200개의 집락이 형성되는 희석배수 주로 10⁻⁴⁰으로 희석한 다음 200 μ l를 Blood agar 평판에 도

말하여 다시 18~48 시간 호기성 또는 anaerobic jar를 이용한 혐기성배양을 실시한 후 집락수를 계산하였다.

본 시험에는 *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *F. necrophorum* 및 *B. nodosus*의 분리주 및 표준균주를 공시하였다.

3) 젖소 유방염 및 발굽질병에 대한 오존연고의 살균효과시험

젖소 유방염에 대한 오존연고의 살균효과시험은 제1세부과제와 병행하여 수행하였다. 200ppm 오존가스를 3일간 처리하여 제조한 오존연고를 분방 당 10ml씩 주입하고 3일간 매일 2회 주입한 후 4일 째 유즙내 존재하는 균수를 계산하였다. 항생제 대조군으로는 노파진 유방염연고를 공시하였다.

발굽질병에 대한 오존연고의 살균효과시험은 제4세부과제와 병행하여 수행하였다. 발굽질병에 이환된 젖소를 대상으로 병변부위에 200ppm 오존가스를 3일간 처리하여 제조한 오존연고를 제4세부과제에서 실시한 방법으로 시술하고 14일째 균수를 측정하였다. 병변부위의 균수를 측정하기 위해 병변부위 표면을 희석알콜(70%)로 세척한 후 외과도 또는 투관침을 이용하여 깊은 병변조직으로부터 앞에서 기술한 동일한 방법으로 시료를 채취하였다. 생검조직을 갈고 교질화 한 후 10배 되게 BHI broth를 가하고 진탕한 다음 0.2ml을 취하여 Blood agar 평판에 도말하여 다시 18-48 시간 호기성 또는 anaerobic jar를 이용한 혐기성배양을 실시한 후 집락수를 계산하였다.

나. 결 과

1) 소 유방염 및 발굽질병 유래 세균의 오존연고에 대한 시험관내 살균효과

100ppm, 200ppm 및 300ppm 처리오존연고의 살균효과를 통성혐기성균인 *E. coli*, *Staph. aureus*, *Strep. pyogenes*와 편성혐기성균인 *B. nodosus* 및 *F. necrophorum* 균을 대상으로 수행 하였던 바 Table 1과 같은 결과를 얻었다.

100ppm 처리 오존연고의 경우 *E. coli*, *Staph. aureus* 및 *Strep. pyogenes*는 1000 및 100 μ l/tube에서 현저한 살균효과가 인정되었다. 그리고 *B. nodosus* 및 *F. necrophorum*에서는 모두 50 μ l/tube에서 현저한 살균효과가 관찰되었다.

200ppm 처리 오존연고의 경우 *E. coli*, *Staph. aureus* 및 *Strep. pyogenes*는 500 및 50 μ l/tube에서 유의한 살균효과가 인정되었다. 그리고 *B. nodosus* 및 *F. necrophorum*에서는 모두 100 μ l/tube에서 현저한 살균효과가 관찰되었다.

300ppm 처리 오존 연고의 경우 *E. coli*, *Staph. aureus* 및 *Strep. pyogenes*는 10 및 50 μ l/tube에서 유의한 살균효과가 인정되었으며, *B. nodosus* 및 *F. necrophorum*에는 모두 100 μ l/tube 이상에서 완전한 살균효과가 관찰되었다. 100ppm, 200ppm 및

300ppm 처리오존연고 모두 통성혐기성균에서 보다 편성혐기성균에서 살균효과가 높게 나타났다.

Table 1. *In vitro* bactericidal effects of ozone ointment on the bacteria originated from bovine mastitis and food-rot

o Ointment treated with 100 ppm ozone

Organisms	Ozone ointment vol.(μ l) / tube						Control*
	10	50	100	500	1000	2000	
<i>E. coli</i> (n=8)	203 (221)	186	216 (169)	192	88	22 ⁺ (124)	217
<i>Staph. aureus</i> (n=5)	213 (186)	174	102 (213)	115	74	0 (89)	194
<i>Strept. pyogenes</i> (n=3)	172 (239)	148	67 (227)	78	27	0 (119)	198
<i>B. nodosus</i> (n=2)	91 (87)	42	20 (79)	0	0	0 (40)	119
<i>F. necrophorum</i> (n=4)	123 (138)	89	57 (85)	36	0	0 (52)	122

o Ointment treated with 200 ppm ozone

Organisms	Ozone ointment vol.($\mu\ell$) / tube						Control *
	10	50	100	500	1000	2000	
<i>E. coli</i> (n=8)	162	143	128	51	0	0 ⁺	194
<i>Staph. aureus</i> (n=5)	230	182	92	120	17	0	224
<i>Strept. pyogenes</i> (n=3)	197	126	138	47	0	0	186
<i>B. nodosus</i> (n=2)	87	94	32	0	0	0	98
<i>F. necrophorum</i> (n=4)	118	129	73	16	0	0	132

o Ointment treated with 300 ppm ozone

Organisms	Ozone ointment vol.($\mu\ell$) / tube						Control *
	10	50	100	500	1000	2000	
<i>E. coli</i> (n=8)	217	123	62	0	0	0 ⁺	222
<i>Staph. aureus</i> (n=5)	235	176	112	29	0	0	242
<i>Strept. pyogenes</i> (n=3)	193	143	82	15	0	0	173
<i>B. nodosus</i> (n=2)	129	77	0	0	0	0	159
<i>F. necrophorum</i> (n=4)	153	83	42	0	0	0	148

* : Data represent untreated control.

+ : Mean colony number per plate of the bacteria tested : cfu/200 $\mu\ell$.

() = Ointment control

2) 젖소 유방염에 대한 오존연고의 살균효과

제1세부과제 결과에서 기술하였음.

3) 젖소 발굽질병에 대한 오존연고의 살균효과

지간부란(8 개) 및 제저부란(2 개)에 이환된 발굽 10개를 대상으로 오존연고 처리에 따른 균수의 변화를 측정하 바 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 가검재료에 대해 호기성 배양과 혐기성배양을 수행하였던 바 오존연고 처치후 전 레에서 현저한 균수의 감소가 관찰되었으며, 균 감소율은 호기성 배양 보다 혐기성 배양에서 높았다. 대조군의 3개 발굽(지간부란)은 호기성 및 혐기성 배양에서 균 감소가 인정되었으나 처치군에 비해서는 낮았다.

Table 3. Bactericidal effects of ozone ointment on the hooves of dairy cattle with foot-rot

Groups	Hooves	Aerobic culture(x10) *		Anaerobic culture(x10) **	
		Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment
Treated	1	59.4 ⁺	12.4	43.1	9.6
	2	73.9	19.0	21.2	0.8
	3	7.7	0	11.7	0
	4	86.3	23.9	8.5	0
	5	6.5	0.5	9.3	0
	6	6.8	5.7	34.7	12.0
	7	3.1	0	25.1	1.2
	8	2.9	2.4	9.7	0.3
	9	41.4	33.9	7.6	0.8
	10	4.8	1.7	8.1	0.2
Control ⁺⁺	1	48.3	19.8	7.8	4.7
	2	8.5	7.4	22.8	19.4
	3	53.7	21.6	6.2	4.9

* ; *Bacillus spp.*, *Staphylococci spp*, *Streptococci spp*, and *E. coli*

** ; *Fusobacterium spp.* and *Bacteroides spp.*,

+ : Mean colony number per plate of the triplicate trials: cfu/200 μ l.

++ = Ointment control

4) 오존연고 살균효과의 안정성

200ppm 처리 4℃ 보관 오존연고의 살균효과의 실온에서의 안정성을 측정하기 위해 *E. coli* 와 *Staph aureus*를 대상으로 12개월간 시험을 수행한 바 Table 4와 같은 결과를 얻었다. *E. coli* 의 경우 9개월 까지 57.7-82.2%의 살균효과를 나타내었으며, 12개월에는 현저히 감소하여 30%이었다. *Staph aureus*에서는 9개월까지 56.9-80.3%의 살균효과를 보이다가 12개월에는 38.6%로 나타났다.

Table 4. Stability of bactericidal effects of the ozone ointment

Groups	Preservation at room temperature(months)**				
	0	2	5	9	12
<i>E. coli</i> n=2	48 ⁺	35	77	58	130
Control*	169	197	182	173	178
Rate(%)	71.6	82.2	57.7	66.5	30
<i>Staph. aureus</i> n=2	56	38	47	81	148
Control	187	193	208	188	241
Rate(%)	70.1	80.3	77.4	56.9	38.6

* Ointment treated with 200 ppm ozone was used

** Ointment control

+ Mean colony number per plate of the bacteria tested: cfu/200 μ l.

% = (Control-Treatment/Control) x 100

5) 발굽병변으로부터 분리된 균의 정상 및 동정

시험기간 중 7례의 발굽질병 이병우의 10개 발굽 가검물로부터 분리된 6종의 균 중 발굽질병 병인체로 알려진 *Fusobacterium spp.* 7주와 *Bacteroides spp.* 3주에 대해 정상확인시험 결과는 Table 5와 같다. 분리된 *Fusobacterium spp.* 7주는 *F. necrophorum* 그리고 *Bacteroides spp.* 3주는 *B. nodosus*로 동정되었다.

Table 5. Characterization of *Bacteroides spp* and *Fusobacterium spp* isolated from foot-rot lesions

	<i>Bacteroides</i> <i>spp.</i> (3 isolates)	<i>Fusobacterium</i> <i>spp.</i> (7 isolates)	Standard strains	
			<i>B. nodosus</i> ATCC 25549	<i>F. necrophorum</i> ATCC 51357
Anaerobic	+	+	+	+
Gram stain	-	-	-	-
Spore-form	-	-	-	-
Morphology bacillus	+	+	+	+
Hydrogen production	-	- ~ +	-	+
Growth in 20% bile	- ~ ±	- ~ +	- ~ ±	+
Indole production	-	+	-	+
Nitrate reduced	-	-	-	-
Urease production	-	- ~ +	-	-
Sheep RBC hemolysis	-	- ~ +	-	-
Gelatin digestion	+	- ~ +	+	+
Meat digestion	+	- ~ +	+	+
Gas(PYG agar)	-	+	-	+
Acid production				
Esculin	-	-	-	-
Glucose	-	+	-	+
Maltose	-	-	-	-

다. 결론

- 1) 소 유방염 및 발굽질병 유래 세균의 오존연고에 대한 살균효과 시험 결과, 200 및 300ppm처리 오존연고가 100ppm 처리오존연고에 비해 살균효과가 높았으며, 통성혐기성균보다 편성혐기성균이 감수성이 높았다.
- 2) 200ppm처리 오존연고를 젖소유방염에 처리한 바 현저한 살균효과가 인정되었다.(제1세부과제 참조)
- 3) 200ppm 처리 오존연고를 젖소 발굽질병에 처리한 결과 처치후 전 레에서 현저한 균수의 감소가 관찰되었으며, 균 감소율은 호기성 배양 보다 혐기성 배양에서 높았다.
- 4) 200ppm처리 오존연고의 안전성을 시험한 바 *E. coli* 및 *Staph. aureus*에서 9개월간 살균효능이 유지되었으며 12개월에는 현저히 감소하였다.
- 5) 시험기간 중 유방염 가검재료로부터 *Staph. aureus* (11주), *Strep. pyogenes* (2주), *Strep. agalactiae* (9주), *Salmonella spp* (5주) 그리고 *E. coli* (15주)를 각각 분리하였고, 발굽 가검물로부터 *Fusobacterium spp.*(7주), *Bacteroides spp.*(3주), *Bacillus spp.*(4주), *Staphylococci spp.*(3주), *Streptococci spp.*(9주), *E. coli*(12주)를 분리하였다

제 3절. 오존제제의 처리에 따른 젖소 유방염 및 발굽질병에 대한 병리조직학적 시험

1. 오존수의 독성시험과 젖소 유방 및 발굽조직에 대한 병리조직학적 시험

가. 재료 및 방법

1) 공시어 및 오존수

공시한 어류는 한국화학연구원 안전성 연구 센터에서 번식 사육하고 있는 0.18~0.20g의 건강한 일본산 송사리(*Oryzias latipes*)를 분양 받아 연구실로 이동한 후 수온 및 조명이설이 완비된 사육수조에서 약 7일간 안정시켜 순치 시킨 후 사용하였으며, 순치 과정 중에 유영상태 및 외부 병변을 관찰하여 이상이 없는 송사리를 이용하

였다. 실험실에서 사육조건으로 수온은 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 pH는 6.8~7.1로 하였으며 용존오존량은 본 대학에서 소유하고 있는 오존발생장치(<주>MH)와 수조를 연결하고 폭기하여 4ppm의 오존 수를 만들었으며, 4ppm의 오존수를 지하수로 배수 회석하여 2ppm 및 1ppm의 오존 수를 만들어 사용하였다. 실험 후 오존수가 혼탁하면 새로운 오존수로 교환하였으며, 사료는 열대어박편사료(TetraMIn : made in Germany)를 하루 2번씩 급여하였다.

2) 실험동물 및 오존가스

체중 20 - 25kg의 성숙 암컷의 한국재래산양(Capra hircus)을 10두 구입하여 10일간 순화과정동안 임상증상을 관찰하여 질병이 없고 유방과 발굽에 이상이 없음을 확인한 후 실험에 공시하였으며, 오존가스는 본 대학에 있는 오존발생장치로부터 5ppm, 1ppm 및 0.2ppm 등으로 오존농도를 조절하여 사용하였다.

및 공기 주입 균으로 나누어 각 농도의 오존 gas를 30ml씩 유방내 1일 두 번 일주일간 주입시켰으며,

3) 실험방법

일본산 송사리를 20마리를 4ppm, 2ppm 및 1ppm 으로 조절된 오존 수와 오존이 없는 지하수 등 4개 실험 균으로 나누어 각 균 송사리 5마리씩 분배하여 유영상태 및 임상증상을 96시간까지 관찰하였으며, LC_{50} 는 Stephan(39)의한 방법으로 분석하였다. 폐사된 송사리는 병리조직학적으로 관찰하기 위하여 중성 formalin용액에 고정하였다.

한국재래산양은 10두를 5마리씩 유방내주입 균과 발굽노출 균으로 나누어 오존농도 5ppm, 1ppm 및 0.2ppm의 가스와 오존이 없는 공기를 각 각 30ml씩 매일 하루 2번씩 1주일간 유방내주입한 균과 전혀 주입하지 않았던 무처리 균으로 하여 5개 실험 균으로 5마리를 사용하였으며, 같은 방법으로 나머지 5두의 발굽조직에 노출시켜서 유방조직 및 발굽조직을 각 각 생검하여 통상방법에 따라 병리조직표본을 제작하여 현미경으로 관찰 하였다.

나. 결과

1) 일본산 송사리에 미치는 오존수의 영향

Table I. Mortality data of *Oryzias latipes* exposed to ozone

O ₃ concentration(ppm)	number of fish	Death(%)
control	5	0
1	5	1(20)
2	5	2(40)
4	5	4(80)

표 1에서 보는 바와 같이 1ppm농도에서는 2마리, 2ppm농도에서는 4마리 그리고 4ppm에서는 8마리가 폐사하였으며, 시간별 폐사 양상을 보면, 24시간이내에 2ppm 및 4ppm농도에서 각 각 4마리씩 폐사하였고, 48시간이내에 1ppm농도에서 2마리 폐사하였으며, 72시간이내에서는 4ppm농도에서 2마리 폐사하였다. 96시간이내에서는 4ppm농도에서 2마리 폐사하였다. 살아 있는 송사리의 상태를 보면 4ppm농도에서는 생존수는 2마리로서 유영상태가 횡와 자세이거나 느리고, 자극에 대한 반응이 매우 둔감하였으며, 2ppm에서는 생존수가 6마리로서 다소 유영상태나 자극에 대한 반응이 1ppm농도의 송사리는 자극에 대한 반응이 매우 민감하고, 유영상태도 매우 활발하였다.

Table II. LC₅₀(ppm) for *Oryzias latipes* exposed to ozone

Dose(ppm)	Probability
0.6	LC ₅
0.8	LC ₁₀
1.1	LC ₂₀
1.4	LC ₃₀
1.8	LC ₄₀
2.2	LC ₅₀
2.7	LC ₆₀
3.3	LC ₇₀

Stephan(39)에 의한 방법으로 실험결과를 분석한 결과 표2에서 보는 바와 같이 LC₄₀는 1.8 ppm이고, LC₆₀는 2.7 ppm이었으며, LC₅₀는 2.2 ppm으로 나타났다.

2) Ozone이 한국재래산양의 유선 및 발굽조직에 미치는 영향

유선조직 : 공기주입군(사진1) 및 0.2ppm농도의 오존가스 주입 군(사진2)를 주입한 유선조직에서는 무처치군의 조직과 차이를 볼 수 없었고, 1ppm농도 주입 군(사진3)에서는 선포주위 간질조직에 경미한 염증세포 침윤이 인정되었으며, 5ppm농도 주입 군(사진4,5,6)에서는 간질조직에 경미한 염증세포 침윤과 선포상피세포의 증생(사진6)(hyperplasia) 또는 화생(사진5)(metaplasia) 소견이 관찰되었다.

발굽조직 : 0.2ppm, 1ppm 및 5ppm 노출시킨 발굽조직, 공기 노출조직 및 무처치군의 조직의 광학현미경으로 관찰한 결과 차이가 없었으며, 특이한 소견도 없었다.

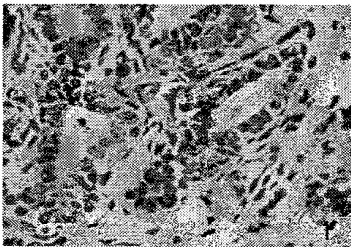


그림1. 공기주입 유선

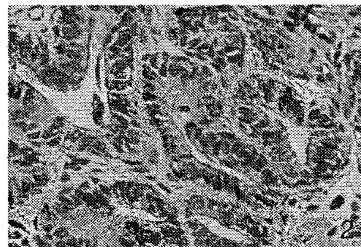


그림2. 0.2ppm 주입 유선

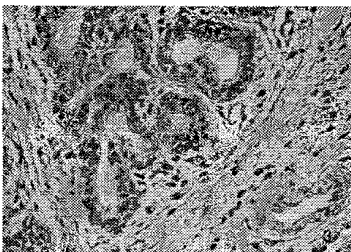


그림3. 1ppm 주입 유선

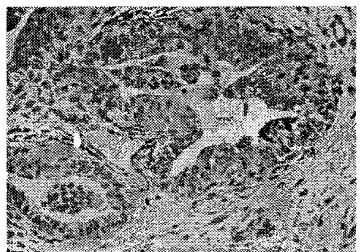


그림4. 5ppm 주입 유선

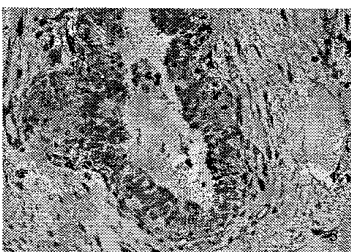


그림 5. 5ppm 주입 유선

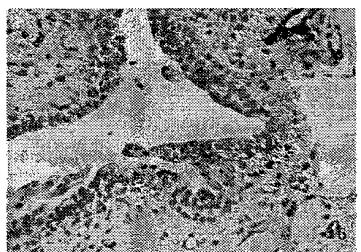


그림6. 5ppm 주입 유선

사진설명

사진 1. 대조군으로 공기를 주입한 유선의 조직으로 특이한 병변을 볼 수 없었다. X400.

사진 2. 0.2ppm농도로 주입한 유선조직으로 대조군과 유사하다. X400.

사진 3. 1ppm농도로 주입한 유선조직으로 대조군 및 0.2ppm주입군 등과 차이가 없었다. X400.

사진 4,5,6. 5ppm농도로 주입한 유선조직으로 유선상피의 탈락(사진4), 화생(사진5) 및 상피세포의 유두상 증생(사진6) 등의 소견이 관찰되었다. X400.

다. 결론

오존수가 일본산송사리에 미치는 영향과 독성과 오존가스가 한국재래산양의 유선 및 발굽조직에 미치는 영향을 병리조직학적으로 관찰하였든 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 오존수에 대한 일본산 송사리의 반수치사농도는(LC₅₀)는 2.2 ppm이었다.

2) 오존가스 5 ppm농도로 주입한 유선의 병변은 선포상피세포 탈락, 증생(hyperplasia) 및 화생(metaplasia) 등의 현미경적소견이 관찰되었으며, 0.2 ppm 및 1 ppm농도에서는 간질에 경미한 염증세포침윤이 인정되었다. 발굽조직에서는 0.2 ppm, 1 ppm 및 5 ppm 노출군에서 특이한 차이를 인정할 수 없었다.

2. 시험용 오존제제 처리에 따른 젖소 유방염 및 발굽 질병에 대한 병리조직학적 시험

가. 재료 및 방법

1) 공시균

충남대학교 수의과대학 미생물학 교실에서 유방염에 이환된 유우의 유방으로부터 분리 유지하고 있는 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*) 및 *Streptococcus agalactiae*(*S. agalactiae*) 사용하였으며, 공시균의 농도는 미생물학 교실에서 배양한 *S. aureus* 3.3x10⁹cfu/ml 및 *S. agalactiae* 3.3x10⁹cfu/ml의 농도를 *S. aureus* 3.3x10⁷cfu/ml 및 *S. agalactiae* 3.3x10⁷cfu/ml로 희석해서 사용하였다.

2) 공시동물

본 실험에 공시된 동물은 임상적으로 건강하다고 인정되는 체중 14 - 25kg의 초산 및 삼산의 암컷 한국재래산양 10두를 구입하여 실험환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사료와 물을 자유급식 시켰다.

3) 오존수

오존발생기(power zone^R, 주식회사 코레아)를 사용하였으며, 오존수는 2ℓ 용기에 멸균 증류수 1ℓ를 넣은 용기에 오존발생기의 설명대로 99%로 오존가스를 침적시켜 1시간이상 폭기한 후 오존 농도 1ppm (mg/L O₃)이 되도록 오존측정기(HACH Pocket ColorimeterTM : HACH company, USA)로 농도를 조절하여 오존수를 만들어 사용하였다.

4) 시험방법

유방염 시험

10두의 산양을 *S. aureus* 접종그룹 5두 그리고 *S. agalactiae* 접종그룹 5두로 나누어 각 공시균을 좌우분방에 각각 10ml씩 cateter 부착 주사기(D&B-CATH^R, 신동방의료주식회사)를 사용하여 투여한 후 4일째 염증을 확인하기 위하여 초음파기(SA-8800, 한국메디슨사)를 사용하여 유선조직을 확인하면서 생검침(COOK^R : 14g, 9cm, 20mmT)으로 유선조직을 생검하였고, 투여 후 7일째부터 오존농도 1ppm의 오존수 20ml 씩 우측 분방에, 좌측분방에는 멸균 생리식염수를 같은 방법으로 1일 1회 6일간 유두관으로 주입시켜 우측분방은 시험군으로 좌측분방은 대조군으로 하였다. 오존수 및 생리식염수를 주입한 후 7일째, 14일째 유방염의 진행병변을 관찰하기 위하여 유방염을 확인시 최초 생검한 방법과 동일하게 수행하였고, 15일째 안락사시켜 육안으로 유방의 외부를 관찰한 후 유방을 분리하여 포르말린에 보관하였다. 생검조직들은 중성 포르말린에 고정한 후 통상방법에 따라 탈수 및 파라핀 포매하고, 5μm께로 박절하여 Hematoxylin 및 Eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

발급질환 시험

발급병변을 유발시키기 위하여 유방염유발시험을 수행중인 동일한 산양 5두에 각각 좌 우 전지 발급 시작부위에서 상부 1cm 위치에 1 × 1cm 피부에 표피, 진피 및 피하조직을 제거하고 근막을 노출시켰다. 우측 전지발급은 유방염 시험군에서 사용한 동일 농도의 오존수를 1일 1회 도포하여 시험군으로 하였고, 좌측전지발급은 멸균생리식염수를 동일한 방법으로 7일간 처리하여 대조군으로 하였다. 오존수 및 생리식염수 처리 후 8일째에 육안으로 병변부위를 관찰하고 발급조직을 채취하여 유방염시험에서

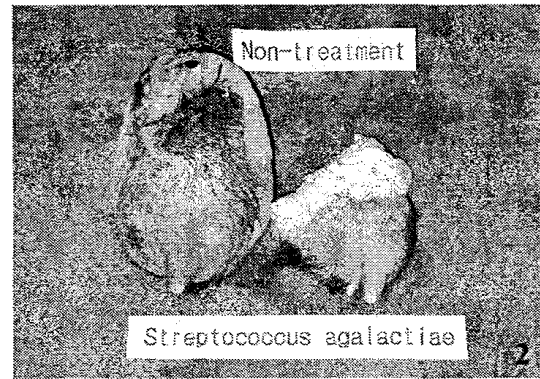
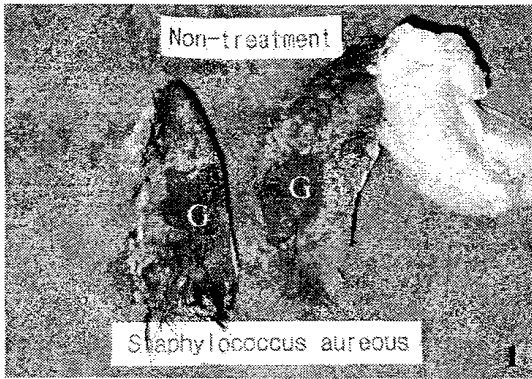
와 동일한 방법으로 병리조직표본을 제작하여 광학현미경으로 관찰하였다.

나. 결 과

1) 유방염 시험

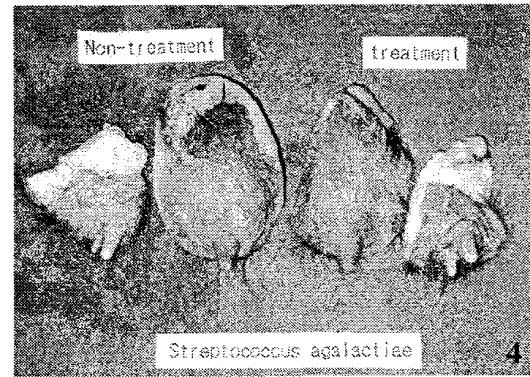
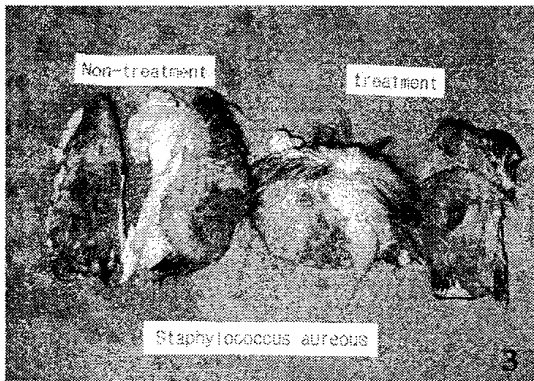
육안적 소견

*S. aureus*를 접종한 유방은 접종 후 3일째부터 유방부위에 열, 종창, 충혈 및 통증 등의 증상을 볼 수 있었으며, 7일째부터는 열감은 사라지고 유두 주위 피부가 청색 또는 흑색(G)으로 변색된 소견(사진 1)을 볼 수 있었으며, *S. agalactiae*를 접종한 유방은 특이한 육안적 소견을 관찰할 수 없었다(사진 2).



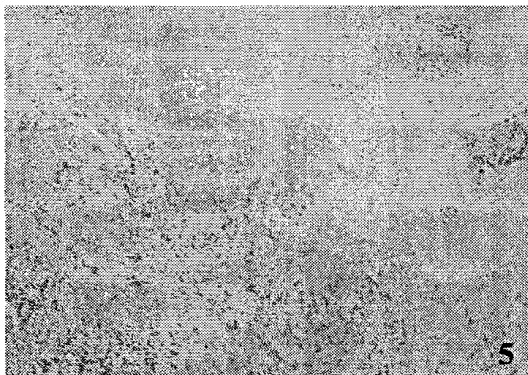
G : gangrene

오존수로 처리한 시험군과 생리식염수로 처리한 대조군을 비교하면 *S. aureus*접종군에서는 청색 및 흑색으로 변색정도가 대조군에서 더심하고 시험군에서는 다소 얇게 변색된 것을 육안적으로 차이(사진 3)가 있어 오존수에 효과가 있는 것으로 사료된다. 그러나 *S. agalactiae*를 접종한 군에서는 시험군 및 대조군의 차이가 없었다(사진 4).

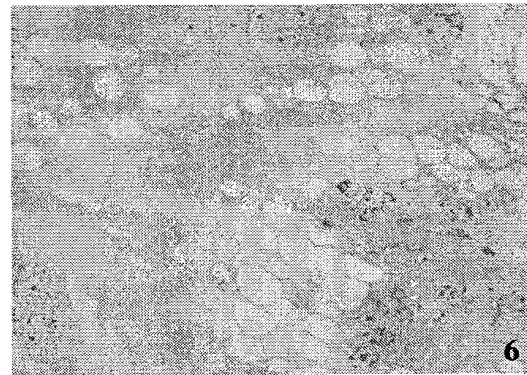


현미경적소견

*S. aureus*를 접종한 후 4일째 생검한 유선조직에서는 심한 간질성 부종, 유선포 위축, 유선상피세포 공포변성, 괴사 및 탈락, 간질 및 선포내 호중구 침윤 등의 괴사성 유방염 소견을 관찰할 수 있었다. *S. agalactiae*를 접종한 후 4일째 생검한 유선조직에서는 *S. aureus*를 접종한 유선조직과 유사한 소견을 볼 수 있었으나 병변의 정도가 다소 경미한 화농성 유방염소견을 관찰할 수 있었다.



S. aureus 접종 후 오존수 처리한 7 일째 생검한 유선조직.

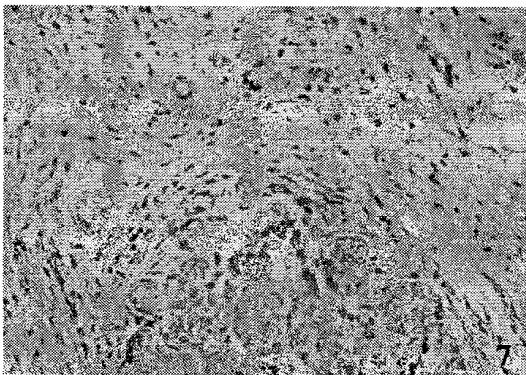


S. aureus 접종한 후 생리식염수 처리한 7일째 생검한 유선조직.

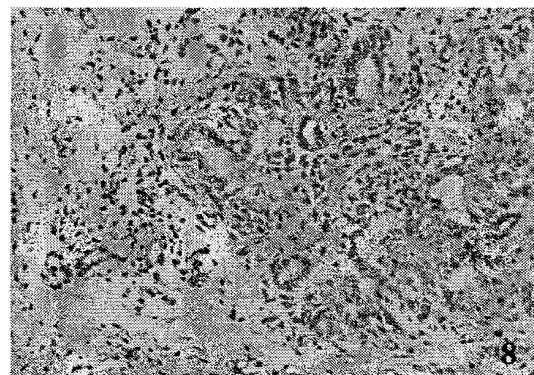
*S. aureus*으로 유방염을 유발시켜 오존수를 처리한 후 7일째 생검한 유선조직(사진 5)에서는 간질 및 유선조직의 부분적인 응고괴사, 선포상피세포 변성, 간질에 섬유증식 및 염증세포 침윤 등의 소견들을 볼 수 있었으며, 생리식염수로 처리한 후 7일째 생검한 유선조직(사진 6)에서는 간질 및 선포의 광범위한 응고괴사, 부종, 선포상

피세포 괴사 탈락 및 소실 등의 소견이 관찰 되었으며, 전형적인 괴사성 염증 소견을 관찰할 수 있었다. 따라서 오존수를 처리한 유선에 다소 경미한 염증소견을 볼 수 있었으나 생리식염수를 처리한 유선과 큰차이가 없기 때문에 오존수의 효능은 미약하다고 사료된다.

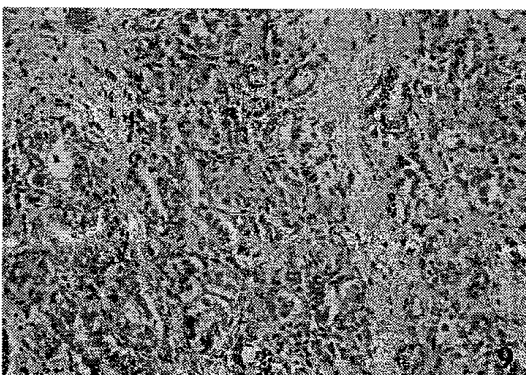
*S. agalactiae*으로 유방염을 유발시켜 오존수를 처리한 후 7일째 생검한 유선조직(사진7)에서는 간질 및 실질 조직에 소수의 염증세포 침윤과 경미한 부종 등의 경미한 유방염 소견을 볼 수 있었으며, 식염수를 처리한 후 7일째 생검한 유선조직(사진 8)에서는 간질에 다수의 염증세포 침윤 및 중등도의 부종, 선상피세포의 공포변성 등의 중등도의 유방염 소견을 관찰할 수 있었다. 따라서 *S. agalactiae*으로 유발된 유방염에서는 *S. aureus*에 의한 유발된 유방염보다 병변이 경미하고 오존수에 대한 효과도 높다고 사료된다.



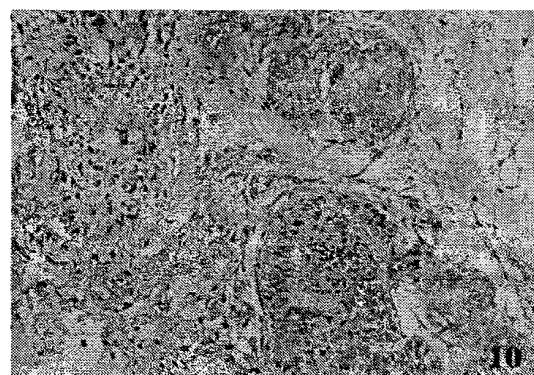
S. agalactiae 접종 후 오존수 처리한 7일째 생검한 유선조직



S. agalactiae 접종 후 생리식염수 처리한 7일째 생검한 유선조직

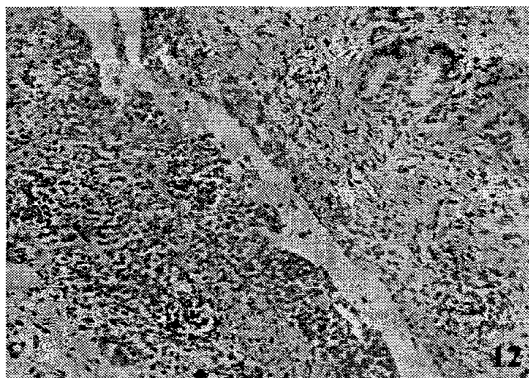
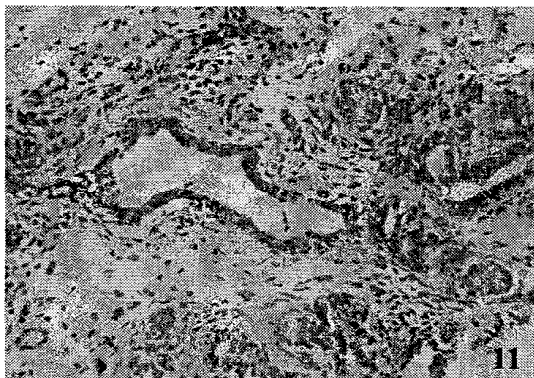


S. aureus 접종한 후 오존수로 7일간 처리하고 중단한 후 5일째 생검한 유선



S. aureus 접종한 후 생리식염수로 7일간 처리하고 중단한 후 5일째 생검한 유선

*S. aureus*으로 유방염을 유발시켜 오존수로 7일간 처리하고 중단한 후 5일째 생검한 유선조직(사진 9)과 생리식염수로 동일한 방법으로 처리하여 생검한 유선조직(사진 10)에서는 실질조직의 괴사후 부분적으로 재생하고 있지만 염증세포 침윤 및 부종 등의 염증 소견은 오존수 및 생리식염수 처리군에서 모두 진행되고 있으며, 오존수의 효과는 미약하거나 없는 것으로 사료된다.



S. agalactiae 접종한 후 오존수로 7일간 *S. agalactiae* 접종한 후 생리식염수로 7일간 처리하고 중단한 후 5일째 생검한 유선 조직

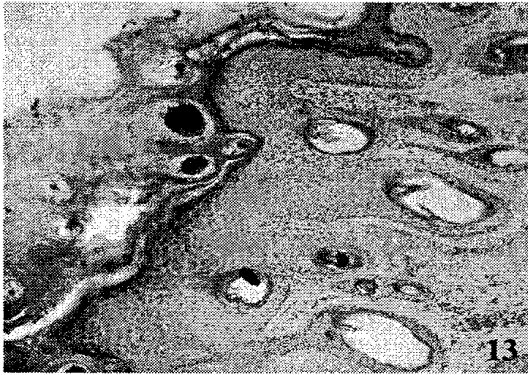
*S. agalactiae*으로 유방염을 유발시켜 오존수로 7일간 처리하고 중단한 후 5일째 생검한 유선조직(사진 11)과 생리식염수를 동일한 방법으로 처리한 유선조직(사진 12)으로 양 처리군 모두 염증반응이 계속되고 있으며, *S. agalactiae*에 대한 오존수의 효과도 *S. aureus*에 대한 오존수의 효과와 동일하게 미약하거나 거의 없는 것으로 사료된다.

2) 발굽질환 시험

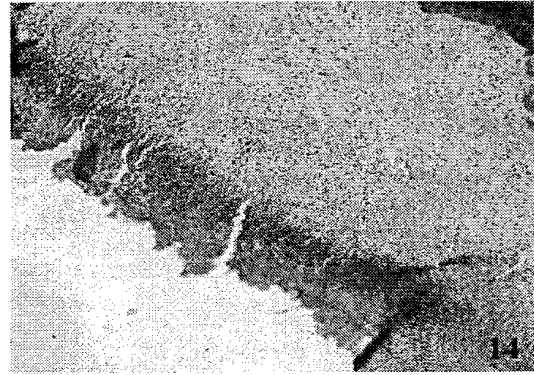
육안적으로 오존수 처리군이 생리식염수처리군보다 손상부위가 빨리 회복되어 오존수 처리한 후 8일째에 거의 회복되어 손상부위는 가피 또는 표피가 형성된 반면 생리식염수로 처리한 손상부위는 염증 및 궤양으로 손상부위의 치유과정이 느리게 진행되고 있었다.

현미경적 소견으로 오존수를 처리한 발굽부위의 피부조직(사진 13)으로 표피에 아직까지 가피가 부착되어 있으나 아래부분에는 완전히 표피층이 회복되었고 진피부분에 모낭이 형성되어 있으며, 반면에 생리식염수로 처리한 손상부위(사진 14)는 아직 출혈 및 염증세포 침윤등의 염증병변과 표피층이 전혀 형성되지 않았고, 진피부분에

는 많은 염증세포의 침윤으로 심한 염증이 진행되고 있었다. 따라서 오존수처리한 발굽피부의 병변에서는 육안적 및 현미경적 소견으로 관찰한 결과 매우 치유과정이 빠르고 상당한 효과가 있는 것으로 사료된다.



오존수 처리한 발굽조직



생리식염수 처리한 발굽조직

다. 결론

Staphylococcus aureus(*S.aureus*) 및 *Streptococcus agalactiae*(*S.agalactiae*)를 한국재산양에 유방염을 유발시켜 그리고 발굽피부에 실험적으로 병변을 만들어 오존수의 치료효과를 병리조직학적으로 알아보기 위하여 수행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 임상증상 및 육안적인 소견으로 *S. aureus* 및 *S. agalactiae*를 접종한 유방은 발열, 발적, 종창 및 통증 등의 임상증상과 *S. aureus*를 접종한 유방은 육안적으로 유두주위가 흑청색으로 변색된 괴저성 유방염을 관찰할 수 있었으며, *S. aureus*를 접종한 분방중 오존수를 처리한 분방이 육안적으로 흑청색병변부위가 다소 적게 나타났다.

2) 현미경적 소견으로 *S. aureus*를 접종한 유선조직은 고도의 괴사를 특징으로하는 괴사성 유방염을, *S. agalactiae*를 접종한 유선조직은 농양을 특징으로하는 화농성 유방염을 관찰할 수 있었으며, 오존수를 처리한 후 7일째 및 12일째 유선조직은 생리식염수를 처리한 대조군의 유선조직과 현미경으로 관찰한 결과 현저한 차이는 인정할 수 없었다.

3) 발굽병변에 대한 오존수처리는 육안적 및 현미경적으로 관찰한 결과 회복속도가 빠르며, 효과가 있는 것으로 사료되었다.

이상의 결과를 종합하면 유방염에 대한 오존수의 효과는 매우 미미하고 발굽병변에는 효과가 있는 것으로 사료된다.

3. 시제품 오존제제의 처리에 따른 젖소유방염 및 발굽질병에 대한 병리조직학적 시험

가. 재료 및 방법

1) 오존연고

식물성유에 오존발생장치(꼬레아, 한국)로 3일간 200ppm의 농도로 폭기하여 사용하였다.

2) 실험동물

체중 450kg 및 500kg의 비유기 암컷 홀스타인 2두로서 임상형 유방염으로 진단된 것을 충남도내 목장으로부터 구입하여 충남대학교 농과대학 부속동물농장에서 일반사육기준에 의하여 관리사육하면서 1주일간 적응시킨 후 시험에 공하였다.

3) 체세포수 및 세균수 산정

오존연고를 투여하기 전 및 투여 후 7일째 및 14일째 각 분방유즙을 체세포 및 세균수 측정기(Fossmatic-90, Denmark)를 사용하여 산정하였다.

4) 원인균분리

유방염의 원인균을 확인하기 위하여 오존연고를 투여하기 전에 각 분방유즙을 채취하여 충남대학교 수의과대학 미생물학 교실에 의뢰하였다.

5) 병리조직학적 검사

고정된 유선 및 발굽조직들을 통상방법에 따라 H-E염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

6) 시험방법

오존연고를 투여하기 전에 유방의 외관을 육안으로 관찰하고 체세포 및 세균수 산정과 세균분리를 위한 각 분방 유즙 과 오존연고를 하루 2번씩 3일간 투여한 후 2두 중 1두는 7일째(A)에, 나머지 1두는 14일째(B)에 도살하기 직전 각 분방으로부터 분방 유즙을 채취하여 각 각 실험실로 의뢰하였다.

유선조직의 병리조직학적 검사를 위하여 오존연고를 투여하기 전에 림폰 및 케타민으로 전신 마취한 후(사진 1) 각 분방의 조직크기를 1cm² 로 절취하여(사진 2) 포르말린에 고정시켰다. 그리고 오존연고를 하루에 2번씩 3일간 유두로 주입시킨 다음 2두 중 1두는 1주 후, 그리고 나머지 1두는 2주 후 각 각 도축하여 각 분방의 조직을 채취한 다음 포르말린에 고정시켰으며, 도축장에서 유방염의 증상이 없는 유우의 유선조직을 채취하여 비교하였다.

발굽조직의 병리조직학적 검사를 위하여 자연 발생된 발굽질환 젓소 13두를 대조군 3두 및 실험군 10두로 나누어 대조군에는 발굽질환부위를 삭제한 후 베타딘을 적용한 후 백색 연고로 처리하였고 실험군은 같은 방법으로 오존 연고로 처리하였다. 오존연고 처리하기 전 과 처리 후 14일째에 각 각 biopsy punch를 사용하여 발굽조직을 절취한 후 포르말린에 고정시켰다.

나. 결과

1) 임상증상

유방

7일째 도살우의 오존연고 투여하기 전 右前분방은 종창, 동통 및 열감이 인정되었고, 左後 및 右後분방은 중등도로 종창되어 있었으며, 左前 분방은 거의 특이한 증상을 관찰할 수 없었다. 투여 후 7일째 도살하기 전 우전분방은 열감과 경미한 종창을 볼 수 있었고 그 외 분방들은 특이한 증상을 관찰할 수 없었다.

14일째 도살우의 오존연고 투여하기 전 우후 및 좌전분방은 고도의 종창, 열감 및 동통이 있었으며, 좌후 및 우전 분방은 중등도의 종창 및 열감을 인정할 수 있었다. 투여 후 14일째 우후분방에 경미한 열감과 종창이 인정되었고 좌전, 좌후 및 우전분방은 특이한 증상을 볼 수 없었다.

발굽

오존연고 도포 전 13두 모두 심한 파행과 궤양 및 종창 등의 지간부란 병변이 관찰되었으며 연고 도포 후 14일째에는 육안적으로 병변의 크기가 감소되었으며 파행증상

도 매우 완화된 증상을 관찰할 수 있었다.

2) 원인균 분리

7일째 도살우의 우전분방유즙에서는 *Corynebacterium* spp.와 *Staphylococcus* spp.가, 우후, 좌전 및 좌후분방유즙에서는 *Staphylococcus* spp. 및 *Streptococcus* spp가 분리되었으며, 14일째 도살우의 우전, 좌전 및 좌후분방유즙에서는 *Staphylococcus* spp.가, 우후분방유즙에서는 *E. coli*가 분리되었다.

3) 체세포수 및 세균수

체세포수

7일째 도살우의 오존연고 투여 전 체세포 수는 표1에서 보는 것과 같이 우전분방유가 23,911,000cell/ml로서 가장 많고, 우후분방 유는 8,361,000cell/ml, 좌후분방 유는 1,927,000cell/ml, 좌전분방 유가 543,000cell/ml로서 우전, 우후 및 좌후분방 유 등은 체세포 수를 기준으로 하면 임상형 유방염으로 좌전분방 유는 준임상형 유방염으로 판정되었다. 오존연고 투여 후 7일째의 체세포 수는 가장 많은 수로 산정된 우전분방 유는 1,445,000cell/ml로 감소되었으며, 우후, 좌후 및 좌전분방 유는 6,249,000, 1,255,000 및 285,000cell/ml로 감소되었다.

14일째 도살우의 체세포수는 우후분방유가 32,612,000cell/ml로서 가장 많고, 좌전, 우전 및 좌후분방 유에서는 각 각 16,531,000, 4,337,000 및 1,987,000cell/ml 순으로 산정되었으며 4개 분방 모두 임상형 유방염으로 간주되었다. 오존연고 투여 후 14일째의 체세포수는 가장 많이 산정된 우후분방 유의 체세포수는 17,631,000cell/ml로 감소되었고, 좌전, 우전 및 좌후분방 유는 794,000, 582,000 및 759,000cell/ml로 각 각 감소되었다.

세균수

7일째 도살우의 오존연고 투여 전 세균 수는 우후분방 유에서 가장 많은 221,000/ml이며, 좌후, 우전 및 좌전분방 유에서는 각 각 69,000, 45,000 및 7,000/ml로 산정되었다. 오존연고 투여 후 세균 수는 우후, 좌후, 우전 및 좌전분방 유에서 각 각 72,000, 46,000, 205,000 및 9,000/ml로 오존연고 투여 전 후의 세균 수의 차이는 없었다.

14일째 도살우의 오존연고 투여 전 세균 수는 우전분방 유에서 136,000/ml로서 가장 많고 좌전, 좌후 및 우후분방 유에서는 각 각 35,000, 53,000 및 84,000/ml로 산정되었다. 오존연고 투여 후 14일째의 세균 수는 좌전, 좌후, 우전 및 우후분방 유에서 각 각 18,000, 27,000, 14,000 및 11,000/ml로서 투여 전보다 다소 감소한 것으로 나타났다.

표1. 체세포수 및 세균수

분방	7일째도살후				14일째도살우			
	체세포수(천)/ml		세균수(천)/ml		체세포수(천)/ml		세균수(천)/ml	
	투여전	투여후	투여전	투여후	투여전	투여후	투여전	투여후
우전	23.911	1.445	45	46	4.337	582	136	14
우후	8.361	6.249	221	205	32.612	17.631	84	11
좌전	548	289	7	7	16.531	794	35	18
좌후	1.927	1.255	69	16	1.987	759	53	275

4) 병리조직학적 소견

유선조직

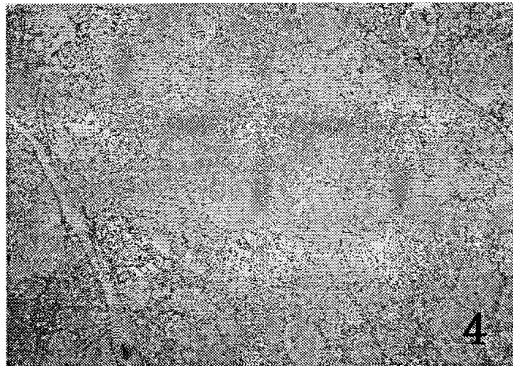
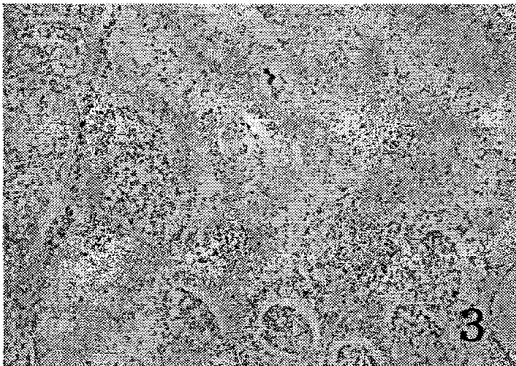
7일째 도살우의 오존연고 투여 전 각 분방의 병리조직소견을 보면 우전분방조직은 선포 내에 호중구 침윤, 선세포 괴사, 탈락 및 공포변성 등의 급성유방염소견(사진 3)이 많은 부위에서 보였고, 투여 후 7일째에는 선포 내 호중구 수가 감소하였고, 선상피세포의 재생 및 유분비기능이 부분적으로 회복된 소견을 볼 수 있었다(사진 4). 그리고 좌후 및 우후분방조직은 선포 내에 호중구 침윤과 간질에 임파구 및 형질구등이 침윤한 만성 유방염소견을 많은 부위에서 볼 수 있었고(사진 5), 투여 후 7일째에 실질세포와 간질조직의 변화는 거의 차이가 없었으며, 염증세포의 수가 다소 감소한 소견을 관찰할 수 있었다(사진 6). 체세포 수가 가장 적은 수를 보였던 좌전분방조직도 좌후 및 우후분방조직과 투여 전 후의 실질세포 및 간질조직의 큰 변화는 없었으며, 다만 선포 내에 호중구 수가 투여 전(사진 7) 후(사진 8) 모두 감소한 소견을 볼 수 있었다.

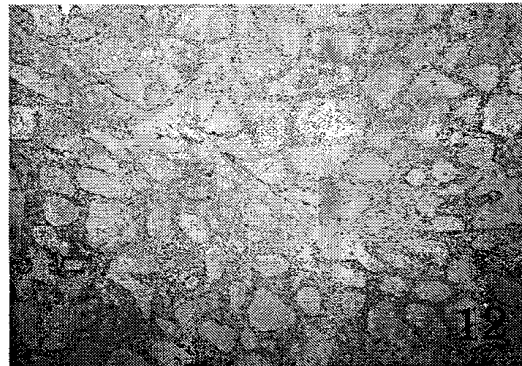
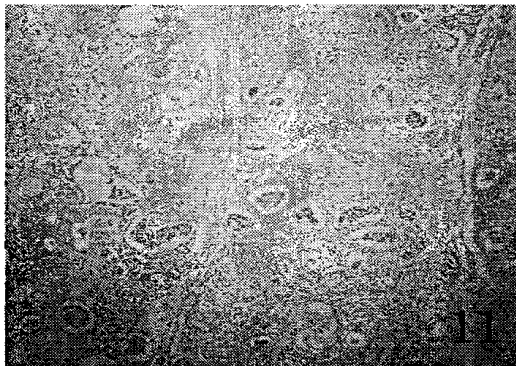
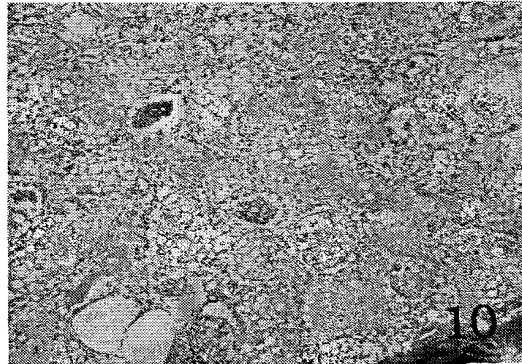
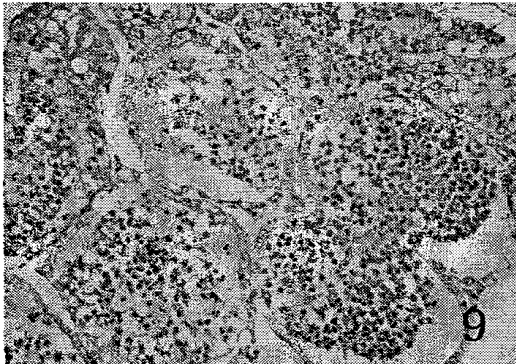
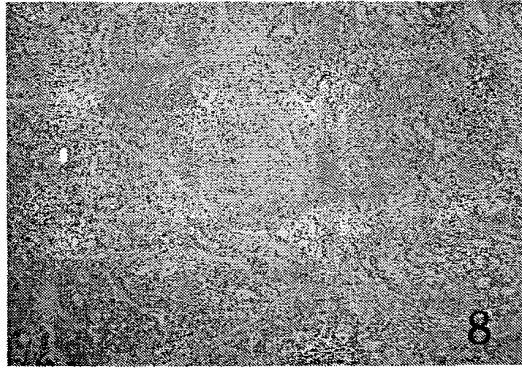
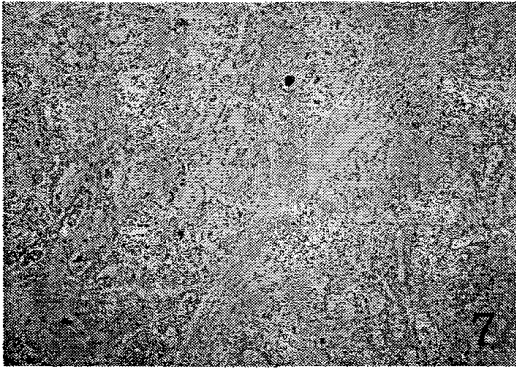
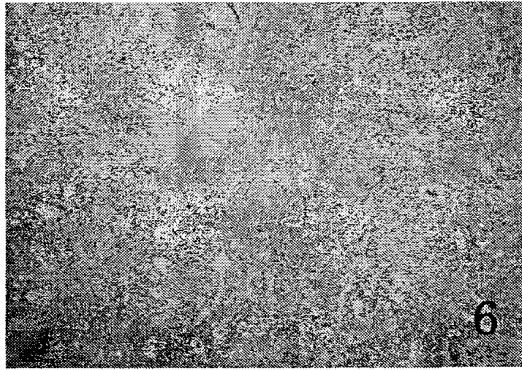
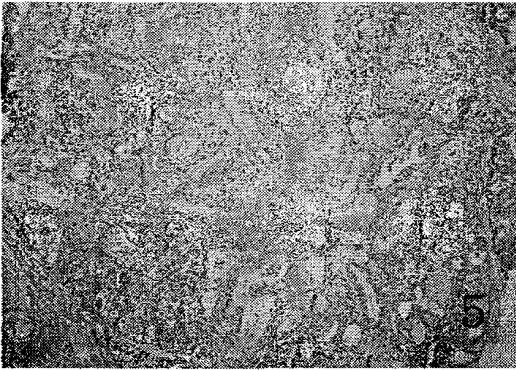
14일째 도살후의 오존연고 투여 전 체세포 수가 가장 많은 우후분방조직은 7일째 도살우의 우전분방조직과 같이 급성유방염소견을 인정할 수 있었고(사진 9), 연고 투여 후 14일째에는 7일째 도살 우의 우전분방조직과 유사하게 변성, 괴사 및 탈락된 선세포의 재생 그리고 선세포의 분비기능이 회복된 소견을 관찰할 수 있었으며, 선포 내 염증세포의 수는 투여 후 7일째 보다는 14일째에 더 많이 감소된 경향을 볼 수 있었다(사진 10). 그리고 우좌, 좌전 및 좌후분방조직에서도 오존연고 투여 전(사진 11)과 후(사진 12)의 조직변화 및 염증세포 수는 7일째 도살 우의 좌후, 우후 및 좌전분

방조직과 유사하였으나 염증세포 수는 7일째보다는 더 많이 감소하는 경향이였다. 그리고 연고 투여 후 14일째의 유선 간질조직에는 섬유조직이 부분적으로 증식된 소견을 관찰할 수 있었다.

발굽조직

육안적으로 가피 형성과 육아조직의 형성이 대조군보다 빠르게 진행되었으며 병리조직학적으로 오존연고를 도포하기 전에는 진피조직에 충출혈과 염증세포가 침윤소견이 관찰되었으나(사진 13) 도포 후 14일째의 진피조직은 경미한 임파구 침윤소견이 관찰될 뿐 거의 정상 진피조직으로 볼 수 있었다(사진 14). 따라서 오존연고는 유선조직에서보다 발굽조직질환에 효과가 있는 것으로 사료된다.





사진설명

사진 1 : 유방염우를 마취 후 횡와자세

사진 2 : 유선조직의 생검

사진 3 : 7일째 도살우의 오존연고 투여 전 우전분방의 유선조직으로 선포 내 염증세포 침윤 및 선상피세포 변성 피사된 급성염증소견이 관찰할 수 있었다. H-E. X100.

사진 4 : 사진 3의 투여 후 7일째 우전분방의 유선조직으로 선상피세의 재생 및 선포 내에 유가 인정되었으며 선포 내 염증세포의 수가 감소된 소견을 관찰하였다.

H-E. X100.

사진 5 : 7일째 도살우의 오존연고 투여 전 우후분방의 유선조직으로 선포 내 염증세포 침윤 및 간질에 임파구와 형질세포가 침윤된 만성유방염소견이 관찰되었다.

H-E. X100.

사진 6 : 사진 5의 투여 후 7일째 우후분방의 유선조직으로 사진 5에서 보다 선포 내 감소된 염증세포가 관찰되었다. H-E. X100.

사진 7 : 7일째 도살우의 오존연고 투여 전 좌전분방조직으로 사진 5와 선포 내 염증세포수가 적은 것 외에 유사한 소견을 볼 수 있었다. H-E. X100.

사진 8 : 사진 7의 투여 후 7일째 좌전분방조직으로 사진 7에서 보다 선포 내 염증세포 수가 적은 것 외에 거의 유사한 소견이 관찰되었다. H-E. X100.

사진 9 : 14일째 도살우의 오존연고 투여 전 우후분방조직으로 사진 3과 유사한 급성유방염 소견을 관찰할 수 있었다. H-E. X200.

사진10 : 사진 9의 투여 후 14일째 우후분방조직으로 사진 4와 거의 유사한 소견을 볼 수 있었다. H-E. X100.

사진11 : 14일째 도살우의 오존연고 투여 전 좌전분방조직으로 사진 5 및 7과 유사하게 만성유방염소견이 관찰되었다. H-E. X100.

사진12 : 사진11의 투여 후 14일째 좌전분방조직으로 선포 내 염증세포의 수가 매우 감소된 소견을 볼 수 있었다. H-E. X100.

사진13 : 발굽질환이 자연발생된 발굽의 피부조직으로 진피에 충 출혈 및 염증세포가 침윤된 심한 염증병변이 관찰되었다. H-E. X100.

사진14 : 사진 13의 오존연고 도포 후 14일째 피부조직으로 거의 정상적으로 회복된 소견을 볼 수 있었다. H-E. X100.

다. 결론

임상형 유방염 우 및 자연발생 발굽질환 우에 오존연고를 주입 및 도포한 후 치료효

과를 알아보기 위하여 체세포 수, 세균 수 및 병리조직학적으로 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 체세포 수는 오존연고 투여 후 7일째 및 14일째에 감소하였으며, 14일째에 더욱 감소하였다.

2) 세균 수는 오존연고 투여 후 감소하는 경향이나 차이는 없었다.

다. 병리조직학적으로 오존연고 투여 후 급성염증소견이 관찰된 분방조직에서는 선상피세포의 재생 및 선포 내 유가 많은 부위에서 관찰 되었으며, 만성염증소견을 보였던 분방에서는 선포 내 염증세포의 수가 다소 감소하였으나, 실질세포 및 간질조직의 병리학적변화는 차이가 없었다.

라. 병리조직학적으로 발굽질환의 조직에서는 오존연고 도포 후 14일째에 정상적인 진피조직 소견을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 오존연고는 체세포 수의 감소, 급성유방염, 발굽질환에 유효한 영향이 인정되었으며, 세균 수 및 만성유방염에서는 효과가 체세포 수, 급성유방염 및 발굽질환에서 보다는 다소 미흡하였다.

제 4절. 젖소발굽질병에 대한 오존요법의 외과적 치료 효과 시험

1. 오존가스의 발굽질병에 대한 치료효과시험

가. 재료 및 방법

1) 재료

가) 실험 동물

본 실험에 공시된 동물은 임상적으로 건강하다고 인정되는 체중 14-22kg의 한국 흑염소, 수컷 20두로 5개월의 예비 사육을 통하여 실험 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사료와 물을 자유 급식 시켰다. 창상 유발 24시간 전부터 절식시키고 창상을 유발할 부위를 전모하였다.

나) 오존 가스 발생기

본 실험에서 오존 가스의 발생은 오존 발생기 (MH 오존, Korea)를 이용하였다. 실험 전 가스 측정기를 이용하여 정확한 오존 가스 농도로 기계를 조작하였다.

2) 방법

가) 군 배치

20두의 한국 흑염소를 5두씩 무작위로 선발한 후, 실험군은 0.1ppm 오존 가스 처치군 (Group I), 1ppm 오존 가스 처치군 (Group II) 및 6ppm 오존 가스 처치군 (Group III)의 3개군으로 나누었으며, 대조군은 1개군으로 각각 배치하였다.

나) 마취 및 절손창 유발

절손창을 유발하기 위하여 우선 한국 흑염소에 0.35mg/kg의 Xylazine HCl (rompun®, Bayer Korea)을 정맥 주사하여 진정시킨 뒤, 전지의 외측 발굽둘레에서 1cm정도 근위부에 1×1cm 크기로 피부를 절제하고 피하직을 노출시켰다.

다) 각 군의 처치

대조군은 생리식염수 5ml를 창면에 도포하였고, 실험군은 Group I에서는 0.1ppm, Group II에서는 1ppm, 그리고 Group III에서는 6ppm 농도의 오존 가스를 5분간, 14일 동안 매일 1회 각각 적용한 후 거즈를 대고 포대를 하였다.

라) 창상 면적 측정

창상 부위의 면적을 측정하기 위하여, 창상 유발 후 0일, 4일 및 14일째에 셀로판 용지에 창상부를 표시한 뒤, 그 면적을 영상분석장치 (Image-Pro PLUS, Media Cybernetics Co., USA)로 측정하여 시간 경과에 따른 창상의 수축 정도를 각각 조사하였다.

마) 창상 부위 연부조직의 두께 측정

창상 유발 후 0일, 4일 및 14일째에 X-ray 촬영을 하여 1지골과 2지골사이 관절의 피부에서 골막까지의 연부조직 두께를 각각 측정하였다.

바) 병리조직학적 검사

오존 가스를 적용하기 전에 전지의 외측 발굽둘레에서 1cm정도 근위부에 1×1cm 크기로 피부를 절제한 후, 10% formalin으로 고정한 뒤 정상 조직 검사를 하였다. 그리고 창상 유발 후 14일째에 동일한 부위에 2×1cm 크기로 조직을 적출한 뒤 치유 상태를 확인하기 위해 병리 조직 검사를 실시하여 궤양의 존재 유무, 가피 형성 여부와 세포 침윤 상태 등을 평가하였다.

사) 통계 처리

본 연구에서 얻어진 결과는 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

나. 결과

1) 창상 부위 면적 측정 결과

창상 유발 후 농도를 달리한 오존 가스를 적용하고 경과일에 따른 창상 면적의 크기를 측정한 결과는 표 1과 같다.

Table 1. Reduced mean squares of wound in relation to days after wounding

mean±SD

(mm²)

Control : Normal saline, Group I : 0.1ppm, Group II : 1ppm, Group III : 6ppm

* : P<0.05 (significant difference between control and experimental groups)

a : P<0.05 (significant difference from base)

aa : P<0.01 (significant difference from base)

창상의 면적은 4일째에 대조군에 비하여 실험군들이 모두 감소의 소견을 나타내었고 14일째에는 대조군에 비하여 Group I, Group II는 감소의 소견을, Group III는 증가의 소견을 나타내었다.

창상 유발 후 4일째에 창상의 면적은 대조군에 비하여 Group II (P<0.05), Group III (P<0.05)는 유의성 있는 감소를 나타내었고 14일째에는 Group II (P<0.05)가 유의성 있는 감소를 나타내었다.

창상 유발 후 경과일간의 비교에 있어서, 4일째에 대조군 (P<0.05), Group I (P<0.01), Group II (P<0.01)는 0일째에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었고, 14일째에는 대조군 (P<0.01), Group I (P<0.01), Group II (P<0.01)가 0일째에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다.

Table 2. Mean squares reduced rates of wound as compared with the previous day

Day	Control	Group I	Group II	Group III
4	35.5±12.41	42.0±9.06	55.1±4.34 *	58.5±2.87 *

14	38.0±8.49	35.8±10.71	27.1±4.10 ^{aa}	10.5±12.44 ^{*aa}
----	-----------	------------	-------------------------	---------------------------

Control : Normal saline, Group I : 0.1ppm, Group II : 1ppm, Group III : 6ppm

* : P<0.05 (significant difference between control and experimental groups)

aa : P<0.01 (significant difference from base)

mean±SD (%)

창상 유발 직후-4일과 4일-14일 사이의 창상 수축률의 변화는 표 2와 같다.

창상 유발 직후-4일 사이에는 대조군에 비하여 실험군들의 창상 수축률이 모두 높았고 Group II (P<0.05), Group III (P<0.05)에서 유의성 있는 변화를 나타냈다.

4일-14일 사이에는 대조군에 비하여 실험군의 창상 수축률이 모두 낮았는데, Group

Day	Control	Group I	Group II	Group III
0	100	100	100	100
4	64.5±12.41 ^a	58.0±9.06 ^{aa}	44.9±4.34 ^{*aa}	41.5±2.87 [*]
14	26.5±4.06 ^{aa}	22.2±2.72 ^{aa}	17.7±2.95 ^{*aa}	31.0±13.57

III (P<0.05)에서 유의성 있는 변화를 나타냈다.

창상 유발 후 경과일간의 비교에 있어서, 14일째에 Group II (P<0.01), Group III (P<0.01)는 4일째에 비하여 유의성 있는 창상수축률의 변화를 나타내었다.

Table 3. Mean squares reduced rates of wound as compared with the first day

Day	Control	Group I	Group II	Group III
4	35.5±12.41	42.0±9.06	55.1±4.34 [*]	58.5±2.87 [*]
14	73.5±4.06 ^{aa}	77.8±2.72 ^{aa}	82.3±2.95 ^{*aa}	69.0±13.57

Control : Normal saline, Group I : 0.1ppm, Group II : 1ppm, Group III : 6ppm

* : P<0.05 (significant difference between control and experimental groups)

aa : P<0.01 (significant difference from base)

mean±SD (%)

창상 유발 최초일 대비 창상 수축률의 결과는 표 3과 같다.

최초일 대비 창상 수축률을 보면 4일째에 대조군에 비하여 실험군의 창상 수축률이 모두 높았으며 Group II (P<0.05), Group III (P<0.05)에서 유의성 있는 변화를 나타냈다.

14일째에는 대조군에 비하여 Group I, Group II는 창상 수축률이 높았고 Group III는 낮았는데, Group II ($P<0.05$)에서 유의성 있는 변화를 나타냈다.

창상 유발 후 경과일간의 비교에 있어서, 14일째에 대조군 ($P<0.01$), Group I ($P<0.01$), Group II ($P<0.01$)는 0일째에 비하여 유의성 있는 창상 수축률의 변화를 나타내었다.

2) 창상 부위 연부조직의 두께 측정 결과

창상 유발 후 0일, 4일 및 14일째에 X-ray 촬영을 하여 창상 부위 연부조직의 두께를 측정한 결과는 표 4와 같다.

창상 유발 후 4일째에는 0일에 비하여 모든 군에서 연부조직의 두께가 증가하였으며, 대조군 ($P<0.05$), Group I ($P<0.05$), Group III ($P<0.05$)에서 유의성 있는 변화를 나타냈다.

창상 유발 후 14일째에는 4일에 비하여 모든 군에서 연부조직의 두께가 감소하였으며, Group II ($P<0.05$)에서 유의성 있는 변화를 나타냈다.

Table 4. Reduced mean soft tissue depth of wound in relation to days after wound mean \pm SD (mm)

Day	Control	Group I	Group II	Group III
0	3.2 \pm 0.99	2.7 \pm 1.24	2.4 \pm 1.31	2.5 \pm 1.39
4	5.7 \pm 0.38 ^a	5.6 \pm 1.05 ^a	5.2 \pm 1.04	5.6 \pm 0.42 ^a
14	5.1 \pm 1.01	4.1 \pm 1.05	4.5 \pm 0.52 ^a	5.3 \pm 1.29

Control : Normal saline, Group I : 0.1ppm, Group II : 1ppm, Group III : 6ppm

a : $P<0.05$ (significant difference from base)

3) 병리조직학적 검사 결과

발굽 상부의 정상 조직 소견은 Fig 1과 같다.

창상 유발 14일째의 창상 부위의 조직 소견을 보면 대조군 (Fig 2)에서는 표피와 진피에 염증이 관찰되며 표피에 출혈 소견이 있었다. Group I (Fig 3)에서는 대조군에 비하여 염증이 완화된 것을 관찰할 수 있었고 표피가 많이 재생되었으며 가피가 형성되어 있었다. Group II (Fig 4)에서는 대조군에서 보였던 표피와 진피의 염증이 관찰되지 않으며, 정상적인 피부의 조직소견을 나타내고 있었다. Group III

(Fig 5)에서는 표피와 진피에 염증이 관찰되었으며, 표피가 거의 재생되지 않았고 Group I 과 Group II에 비하여 창상 치유가 느린 속도로 진행되고 있었다.

Legends for Figures

Fig 1. Normal skin tissue, H&E, ×100.

Fig 2. Histopathological feature of wound treated with physiological saline (Control group) on 14 day, H&E, ×100.

Fig 3. Histopathological feature of wound treated with 0.1ppm ozone gas (Group I) on 14 day, H&E, ×100.

Fig 4. Histopathological feature of wound treated with 1ppm ozone gas (Group II) on 14 day, H&E, ×100.

Fig 5. Histopathological feature of wound treated with 6ppm ozone gas (Group III) on 14 day, H&E, ×100.

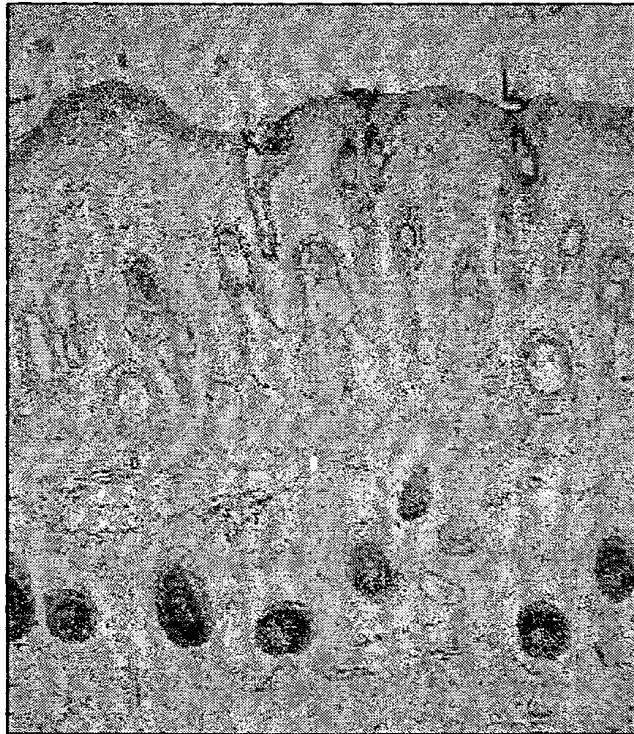


Fig 1.

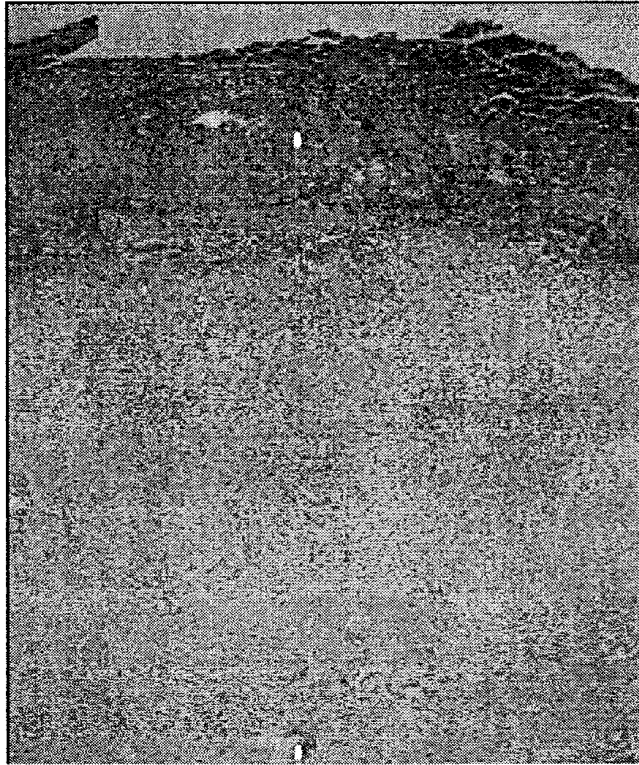


Fig 2.

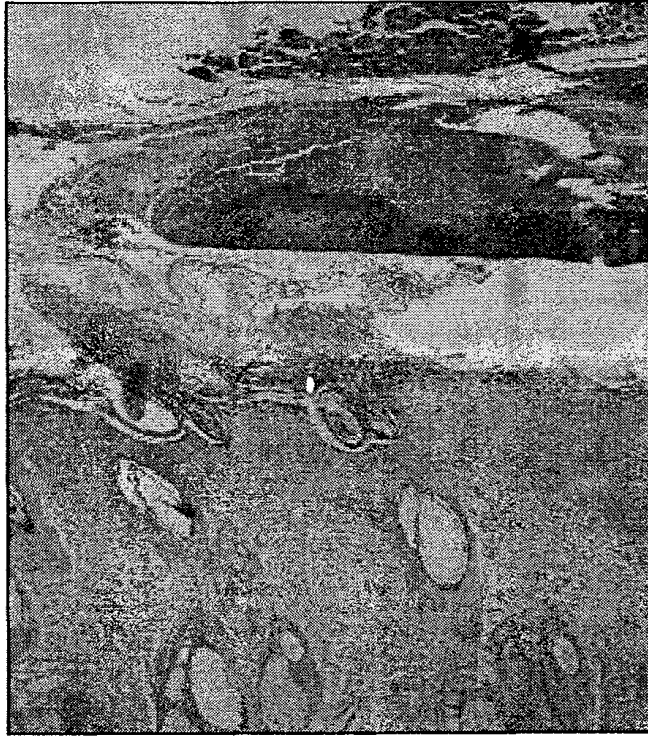


Fig 3.



Fig 4.



Fig 5.

다. 결 론

창상 치유에 적합한 오존의 적정 용량을 확립하기 위하여 한국 흑염소 20두를 무작위로 4개군으로 나누고, 각 군에서 전지의 외측 발굽둘레에서 1cm 정도 근위부에 1×1cm 크기로 피부 절제를 하여 창상을 유발한 후, Group I은 0.1ppm, Group II는 1ppm, Group III는 6ppm의 오존 가스를 5분씩, 대조군은 5ml의 생리식염수를 매일 14일동안 적용하였다.

창상 유발 후 0일, 4일 및 14일째에 영상분석장치를 이용한 창상 면적 및 X-ray 촬영에 의한 창상 부위 연부조직의 두께를 측정하였다. 그리고 오존 가스를 적용하기 전 및 창상 유발 후 14일째에 창상 부위의 병리조직학적 검사를 실시하였다.

창상 면적은 각 실험군에서 4일째에 대조군에 비하여 더욱 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 Group II ($P<0.05$)와 Group III ($P<0.05$)는 유의성 있는 감소를 나타내었다. 14일째에는 Group I 및 Group II ($P<0.05$)는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으나, Group III는 대조군보다 창상 면적이 크게 나타났다.

창상 부위 연부조직의 두께 측정 결과, 4일째에는 실험군들 및 대조군 모두 중창되는 결과를 나타내었으나 14일째에는 4일에 비하여 감소되는 결과를 나타내었으며, 특히 Group II ($P<0.05$)에서는 유의성 있는 결과를 나타내었다.

창상 유발 14일째의 창상부위의 조직 소견을 보면 대조군에서는 표피와 진피에 염증이 관찰되며 표피에 출혈 소견이 있었다. Group I에서는 대조군에 비하여 염증이 완화된 것을 관찰할 수 있고 표피가 많이 재생되었으며 가피가 형성되어 있었다. Group II에서는 대조군에서 보였던 표피와 진피의 염증이 관찰되지 않으며, 정상적인 피부의 조직소견을 나타내고 있었다. Group III에서는 표피와 진피에 염증이 관찰되며, 표피가 거의 재생되지 않았고 Group I 과 Group II에 비하여 창상 치유가 느린 속도로 진행되고 있었다.

상기의 결과를 종합하여 볼 때에 Group II가 가장 양호한 창상 치유 촉진 효과가 있는 것으로 판명되었다.

2. 시험용 오존제제의 발굽질병에 대한 외과적 치료효과시험

가. 재료 및 방법

1) 재료

가) 공시동물

충청남·북도의 여러 젖소 목장에서 자연 발증 발굽질환에 이환된 젖소 30두를 선정하여 치료제의 적용에 따라 2군으로 나누어 각군에 15두씩 배정하였다.

나) 실험군의 배치

대조군 : 삭제를 하고 나서, 베타딘을 적용후에 Penicillin연고를 적용하였다.

실험군 : 삭제를 하고 나서, 0.1ppm 오존수를 적용후에 Penicillin연고를 적용하였다.

다) 실험기기

(1) 오존 발생기(MH Korea): 99%로 1시간 동안 증류수에 폭기하여 0.1ppm의 오존수를 제조하였다.

(2) 혈액검사: 자동혈액분석기(Hemavet 800, CDC technologies, USA)

(3) 유압식 횡와 보정틀: 실험을 위하여 발굽질환을 갖고 있는 젖소를 보정시에 사용하였다.

2) 방법

가) 파행등급 판정 (lameness score, Rosenberger G)

Grade	Degree of lameness
I	Slight
II	Moderate
III	Pronounced
IV	Severe
V	Very severe

I: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 바닥을 완전히 짚고 있지만 기동시 미세한 파행

II: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 완전히 짚고 있지만 기동시 인지하기에 충분한 파행

III: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 완전히 짚고 있지만 기동시 허리를 구부리며 명백한 파행

IV: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 바닥을 부분적으로만 짚고 기동시 허리를 구부리며 심한 파행

V: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 바닥을 짚지 못하거나 발굽끝으로 지면을 짚는다.

나) 종창 등급 (swelling score)

0 : no swelling

1 : slight to moderate swelling

2 : moderate to severe swelling

3 : severe swelling

다) 병변 등급 (lesion score)

0 : no lesion

1 : healed lesion or lesion that appeared to be healing

- 2 : small necrotic lesion extending up to a quarter the length of the interdigital space
- 3 : medium-sized necrotic lesion extending a quarter to a half the length of interdigital space
- 4 : large necrotic lesion extending more than half the length of interdigital space

라) 발굽질환의 종류 판정

- Chronic necrotic pododermatitis(제저부란, 족피염)
- Foot rot(interdigital phlegmon, 지간부란)
- Interdigital fibroma(지간섬유종)
- Papilloma(유두종)

마) 치유반응의 판정

파행등급, 종창등급, 병변등급은 실험전, 수술후 7일 및 14일에 각각 판정하였으며 혈액검사도 감별검사 하였다.

나. 결과

1) 파행등급

파행등급을 Rosenberger G의 파행등급 판정(lameness score)에 준하여 실시한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. The effect of ozone solution treatment on lameness of cattle with foot disease

Group	Day 0	Day 7	Day 14
Iodophor	1.4±0.70*	0.3±0.16	0.1±0.03
Ozone solution	1.5±0.82*	0.2±0.12	0.1±0.02

파행등급은 iodophor를 사용한 대조군과 ozone solution을 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다

($p < 0.01$).

2) 종창등급

실험군 및 대조군에서 처치 전후에 있어서의 종창등급을 검사한 결과는 Table 2.와 같다.

Table 2. The effect of ozone solution treatment on swelling of foot lesion in cattle

Group	Day 0	Day 7	Day 14
Iodophor	$2.0 \pm 0.66^*$	1.1 ± 0.32	0.1 ± 0.04
Ozone solution	$2.1 \pm 0.59^*$	1.0 ± 0.28	0.1 ± 0.03

종창등급은 iodophor를 사용한 대조군과 ozone solution을 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$).

3) 병변등급

실험군 및 대조군에서 처치 전후에 있어서의 병변등급을 검사한 결과는 Table 3.와 같다.

Table 3. The effect of ozone solution treatment on lesion score of cattle with foot disease

Group	Day 0	Day 7	Day 14
Iodophor	$2.5 \pm 0.66^*$	1.3 ± 0.29	1.2 ± 0.02
Ozone solution	$2.7 \pm 0.72^*$	1.4 ± 0.31	1.1 ± 0.03

병변등급은 iodophor를 사용한 대조군과 ozone solution을 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 그리고 오존연고를 사용한 실험군에서 Day 14에 더 낮은 병변등급을 나타내었다.

4) 총백혈구수 검사

실험군 및 대조군에서 처치 전후에 있어서의 총백혈구수를 검사한 결과는 Table 4.와 같다.

Table 4. The effect of ozone solution treatment on WBC of cattle with foot disease

Group	Unit : K/ μ L	
	Day 0	Day 14
Iodophor	12.8 \pm 6.57	13.1 \pm 5.11
Ozone solution	11.3 \pm 7.39	11.6 \pm 6.28

총백혈구수는 처치전인 Day 0에는 대조군 및 실험군에서 각각 12.8 \pm 6.57 및 11.3 \pm 7.39 K/ μ L로서 정상범위(4.0 - 12.0 K/ μ L)를 약간 상회하는 수치를 나타내었으며, 처치후인 Day 14에서는 대조군 및 실험군에서 각각 13.1 \pm 5.11 및 11.6 \pm 6.28 K/ μ L를 나타내었다.

5) 호중구수 검사

실험군 및 대조군에서 처치 전후에 있어서의 호중구수를 검사한 결과는 Table 5.와 같다.

Table 5. The effect of ozone solution treatment on neutrophil of cattle with foot disease

Group	Unit : K/ μ L	
	Day 0	Day 14
Iodophor	4.1 \pm 1.14	4.6 \pm 1.43
Ozone solution	4.2 \pm 1.06	4.3 \pm 1.25

호중구수는 처치전인 Day 0에는 대조군 및 실험군에서 각각 4.1 \pm 1.14 및 4.6 \pm 1.43 K/ μ L로서 정상범위(0.6 - 4.1 K/ μ L)를 약간 상회하는 수치를 나타내었으며, 처치후인 Day 14에서는 대조군 및 실험군에서 각각 4.2 \pm 1.06 및 4.3 \pm 1.25 K/ μ L를 나타내었다.

6) 육안적 소견

Fig. 1. Foot rot in right hindlimb.

Fig. 1은 Iodophor를 적용한 대조군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : grade 1
- 종창등급 : score 2
- 손상등급 : score 3



Fig. 2. Foot rot in left hindlimb.

Fig. 2는 ozone solution을 적용한 실험군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : grade 1
- 종창등급 : score 2
- 손상등급 : score 2



Fig. 3. Healed foot (right hindlimb) on Day 14 in ozone treatment group

Fig. 3은 ozone solution을 적용한 실험군에서의 처치후인 Day 14에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 치유소견을 나타내었다.

1) 우측 후지

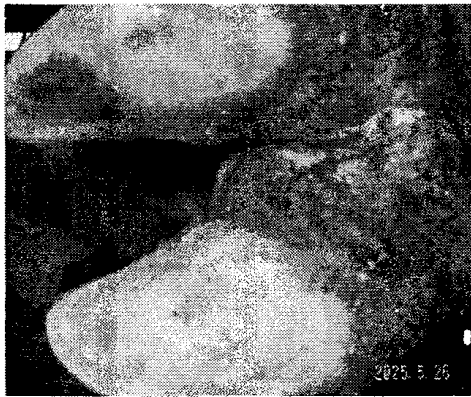
- 병변부위 치유완료
- 파행등급, 종창등급 정상
- 손상등급 : score 1
- 병리조직 sample 채취 후
teramycin 도포 후 bandage



Fig. 4. Healed foot (left hindlimb) on Day 14 in ozone treatment group

Fig. 4는 ozone solution을 적용한 실험군에서의 처치후인 Day 14에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 치유소견을 나타내었다.

- 병변부위 치유완료
- 파행등급, 종창등급 정상
- 손상등급 : score 1
- 병리조직 sample 채취 후
teramycin 도포 후 bandage



다. 결론

Ozone solution이 소의 발굽질환에 미치는 치유효과를 파행등급, 종창등급, 병변등급, 혈액학적 검사, 육안소견을 통하여 관찰하였던 바, 다음과 같은 소견을 얻었다.

1) 파행등급은 iodophor를 사용한 대조군과 ozone solution을 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다($p < 0.01$).

2) 종창등급은 iodophor를 사용한 대조군과 ozone solution을 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다($p < 0.01$).

3) 병변등급은 iodophor를 사용한 대조군과 ozone solution을 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다($p < 0.01$). 그리고 오존연고를 사용한 실험군에서 Day 14에 더 낮은 병변등급을 나타내었다.

4) 총백혈구수는 처치전인 Day 0에는 대조군 및 실험군에서 각각 12.8 ± 6.57 및 11.3 ± 7.39 K/ μ L로서 정상범위(4.0 - 12.0 K/ μ L)를 약간 상회하는 수치를 나타내었으며, 처치후인 Day 14에서는 대조군 및 실험군에서 각각 13.1 ± 5.11 및 11.6 ± 6.28 K/ μ L를 나타내었다.

5) 호중구수는 처치전인 Day 0에는 대조군 및 실험군에서 각각 4.1 ± 1.14 및 4.6 ± 1.43 K/ μ L로서 정상범위(0.6 - 4.1 K/ μ L)를 약간 상회하는 수치를 나타내었으며, 처치후인 Day 14에서는 대조군 및 실험군에서 각각 4.2 ± 1.06 및 4.3 ± 1.25 K/ μ L를 나타내었다.

3. 시제품 오존제제의 발굽질병에 대한 외과적 치료효과시험

가. 재료 및 방법

1) 재료

가) 공시동물

충청남·북도 여러 젖소 목장에서 자연 발증 발굽질환에 이환된 젖소 30두를 선정하여 치료제의 적용에 따라 2군으로 나누어 각군에 15두씩 배정하였다.

나) 실험군의 배치

대조군: 삭제를 하고 나서, 베타딘을 적용후에 백색연고를 적용하였다.

실험군: 삭제를 하고 나서, 베타딘을 적용후에 오존연고를 적용하였다.

다) 실험기기

(1) 오존 발생기(꼬레아, 한국): 99%의 오존가스를 식물성유에 200ppm 농도로 3일간 폭기하여 오존연고를 제조하였다.

(2) 혈액검사: 자동혈액분석기(Hemavet 800, CDC technologies, USA)

(3) 병리조직검사: biopsy punch로 병리조직을 절제하여 10% formalin에 고정한 후, 병리조직검사를 실시하였다.

(4) 미생물검사: culture swab으로 균을 sampling 한 후 분리동정 하였다.

(5) 유압식 횡와 보정틀: 실험을 위하여 발굽질환을 갖고 있는 젖소를 보정시에 사용하였다.

2) 방법

가) 파행등급 판정 (lameness score, Rosenberger G) : 파행등급은 다음과 같은 기준으로 판정하였다.

Grade	Degree of lameness
I	Slight
II	Moderate
III	Pronounced
IV	Severe
V	Very severe

I: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 바닥을 완전히 짚고 있지만 기동시 미세한 파행

II: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 완전히 짚고 있지만 기동시 인지하기에 충분한 파행

III: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 완전히 짚고 있지만 기동시 허리를 구부리며 명백한 파행

IV: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 바닥을 부분적으로만 짚고 기동시 허리를 구부리며 심한 파행

V: 서 있는 상태에서 아픈 다리가 바닥을 짚지 못하거나 발굽끝으로 지면을 짚는다.

나) 종창 등급 (swelling score) : 종창등급은 다음과 같은 기준으로 분류하였다.

0 : no swelling

1 : slight to moderate swelling

2 : moderate to severe swelling

3 : severe swelling

다) 병변 등급 (lesion score) : 병변등급은 다음과 같이 분류하였다.

0 : no lesion

1 : healed lesion or lesion that appeared to be healing

2 : small necrotic lesion extending up to a quarter the length of the interdigital space

3 : medium-sized necrotic lesion extending a quarter to a half the length of interdigital space

4 : large necrotic lesion extending more than half the length of interdigital space

라) 발굽질환의 종류 판정 : 병변조건에 따라서 다음과 같이 각각 구분하였다.

Chronic necrotic pododermatitis(제저부란, 족피염)

Foot rot (interdigital phlegmon, 지간부란)

Interdigital fibroma(지간섬유종)

Papilloma(유두종)

마) 치유반응의 판정 : 치유반응의 판정은 파행등급, 종창등급, 병변등급은 실험전, 수술후 7일 및 14일에 판정하였으며, 혈액학적검사, 병리조직학적 검사, 미생물학적 검사는 실험전 및 수술후 14일에 실시·판정하였다.

나. 결과

1) 파행등급

파행등급을 Rosenberger G의 파행등급 판정(lameness score)에 준하여 실시한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. The effect of ozone ointment treatment on lameness of cattle with foot disease

Group	Day 0	Day 7	Day 14
Vaseline Ointment	1.6±0.65*	0.5±0.17	0.3±0.05
Ozone Ointment	1.0±0.16*	0.4±0.26	0.2±0.25

파행등급은 바셀린연고를 사용한 대조군과 오존연고를 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다 (p<0.01). 그리고 오존연고를 사용한 실험군에서 Day 14에 더 낮은 파행등급을 나타내었다.

2) 종창등급

실험군 및 대조군에서 처치 전후에 있어서의 종창등급을 검사한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. The effect of ozone ointment treatment on swelling of foot lesion in cattle

Group	Day 0	Day 7	Day 14
Vaseline Ointment	1.3±0.58*	0.7±0.28	0.3±0.05
Ozone Ointment	1.0±0.67*	0.6±0.49	0.2±0.31

종창등급은 바셀린연고를 사용한 대조군과 오존연고를 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다 (p<0.01). 그리고 오존연고를 사용한 실험군에서 Day 14에 더 낮은 종창등급을 나타내었다.

3) 병변등급

실험군 및 대조군에서 처치전후에 있어서의 병변등급을 검사한 결과는 Table 3와 같다.

Table 3. The effect of ozone ointment treatment on lesion score of cattle with foot disease

Group	Day 0	Day 7	Day 14
Vaseline Ointment	2.3±0.32*	1.6±0.21	1.3±0.03
Ozone Ointment	2.0±0.67*	1.4±0.52	1.1±0.31

병변등급은 바셀린연고를 사용한 대조군과 오존연고를 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다 (p<0.01). 그리고 오존연고를 사용한 실험군에서 Day 14에 더 낮은 병변등급을 나타내었다.

4) 총백혈구수 검사

실험군 및 대조군에서 처치 전후에 있어서의 총백혈구수를 검사한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. The effect of ozone ointment treatment on WBC of cattle with foot disease

Unit : K/ μ L

Group	Day 0	Day 14
Vaseline Ointment	11.8±4.54	8.5±5.13
Ozone Ointment	12.2±6.38	9.7±7.25

총백혈구수는 처치전인 Day 0에는 대조군 및 실험군에서 각각 11.8±4.54 및 12.2±6.38

K/ μ L로서 정상범위(4.0 - 12.0 K/ μ L)의 경계수치를 나타내었으나, 처치후인 Day 14에서는 대조군 및 실험군에서 각각 8.5 ± 5.13 및 9.7 ± 7.25 K/ μ L로서 각각 호전되는 결과를 나타내었다.

5) 호중구수 검사

실험군 및 대조군에서 처치 전후에 있어서의 호중구수를 검사한 결과는 Table 4와 같다.

Table 5. The effect of ozone ointment treatment on neutrophil of cattle with foot disease

Unit : K/ μ L

Group	Day 0	Day 14
Vaseline Ointment	2.1 ± 1.21	2.7 ± 1.73
Ozone Ointment	4.6 ± 2.15	3.3 ± 1.85

대조군에서는 처치전 및 후에 있어서 각각 2.1 ± 1.21 및 2.7 ± 1.73 K/ μ L로서 정상범위(0.6 - 4.1 K/ μ L)내에 있었다. 실험군에서는 처치전인 Day 0에는 4.6 ± 2.15 K/ μ L로서 정상범위보다 약간 높았으나, 처치후인 Day14에는 3.3 ± 1.85 K/ μ L로서 호전되는 결과를 나타내었다.

6) 육안적 소견

Fig. 1. Foot rot in rear right foot(cnu-22) on Day 0 in vaseline treatment group.

Fig. 1은 바셀린연고를 적용한 대조군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : Grade 2

- 종창등급 : Grade 1
- 병변등급 : Grade 2



Fig 2. Foot rot and interdigital fibroma in rear left foot(cnu-16) on Day 0 in vaseline treatment group.

Fig. 2는 오존연고를 적용한 실험군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : Grade 2
- 종창등급 : Grade 2
- 병변등급 : Grade 3



Fig 3. Foot rot in rear right foot(cnu-12) on Day 0 in vaseline treatment group.

Fig. 3은 바셀린연고를 적용한 대조군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : Grade 2
- 종창등급 : Grade 2
- 병변등급 : Grade 3



Fig 4. Healed foot(cnu-22) on Day 14 in vaseline treatment group

Fig. 4는 바셀린연고를 적용한 대조군에서의 처치후인 Day 14에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 치유소견을 나타내었다.

- 병변부위 치료완료
- 파행등급 정상
- 종창등급 정상
- 병변등급 치유소견



Fig 5. Foot rot in rear right foot(Doosan-1) on Day 0 in ozone ointment treatment group.

Fig. 5는 오존연고를 적용한 실험군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : Grade 1
- 종창등급 : Grade 1
- 병변등급 : Grade 1

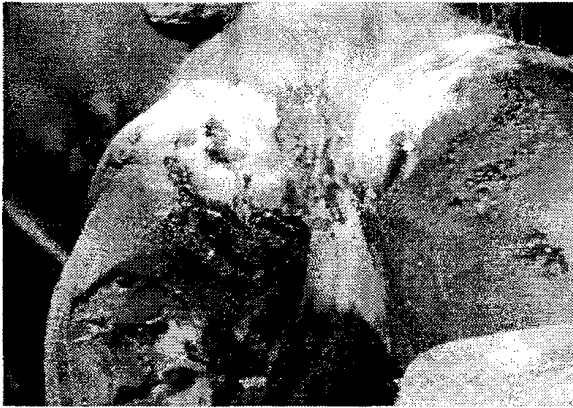


Fig 6. Chronic necrotic pododermatitis in rear right foot(Doosan-3) on Day 0 in ozone ointment treatment group.

Fig. 6은 오존연고를 적용한 실험군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : Grade 1
- 종창등급 : Grade 0
- 병변등급 : Grade 1



Fig 7. Chronic necrotic pododermatitis in rear right foot(Doosan-8) on Day 0 in ozone ointment treatment group.

Fig. 7은 오존연고를 적용한 대조군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : Grade 1
- 종창등급 : Grade 0
- 병변등급 : Grade 2



Fig 8. Foot rot in rear right foot(Doosan-10) on Day 0 in ozone ointment treatment group.

Fig. 8은 오존연고를 적용한 대조군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : Grade 1
- 종창등급 : Grade 2
- 병변등급 : Grade 3



Fig 9. Foot rot in rear right foot(Doosan-9) on Day 0 in ozone ointment treatment group.

Fig. 9는 오존연고를 적용한 실험군에서의 처치전인 Day 0에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란
- 파행등급 : Grade 1
- 종창등급 : Grade 2
- 병변등급 : Grade 3

Fig 10. Healed foot (right hind limb of Doosan-9) on Day 14 in ozone ointment treatment group.

Fig. 10은 오존연고를 적용한 실험군에서의 처치후인 Day 14에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 치유소견을 나타내었다.

- 체저부란



- 파행등급 : Grade 0
- 종창등급 : Grade 0
- 병변등급 : Grade 1

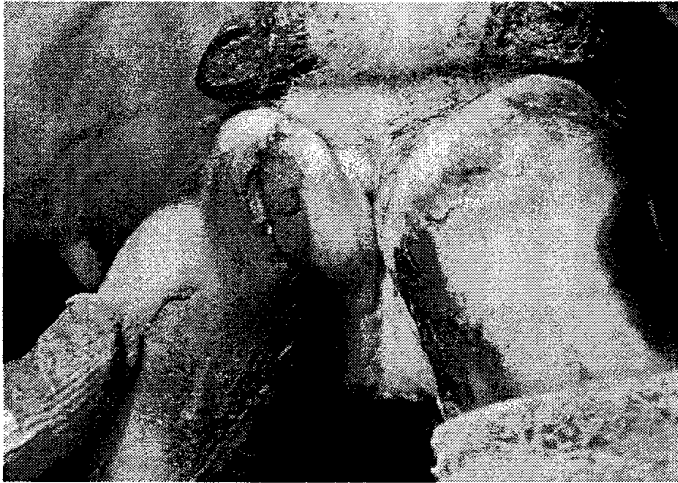


Fig 11. Healed foot (right hind limb of Doosan-8) on Day 14 in ozone ointment treatment group.

Fig. 11은 오존연고를 적용한 실험군에서의 처치후인 Day 14에서의 육안적 소견으로서 다음과 같은 소견을 나타내었다.

- 지간부란

- 파행등급 : Grade 0
- 종창등급 : Grade 0
- 병변등급 : Grade 1



3. 결론

오존연고가 소의 발굽질환에 미치는 치유효과를 파행등급, 종창등급, 병변등급, 혈액학적 검사, 육안소견을 통하여 관찰하였던 바, 다음과 같은 소견을 얻었다.

1. 파행등급은 바셀린연고를 사용한 대조군과 오존연고를 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 그리고 오존연고를 사용한 실험군에서 Day 14에 더 낮은 파행등급을 나타내었다.
2. 종창등급은 바셀린연고를 사용한 대조군과 오존연고를 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 그리고 오존연고를 사용한 실험군에서 Day 14에 더 낮은 종창등급을 나타내었다.
3. 병변등급은 바셀린연고를 사용한 대조군과 오존연고를 사용한 실험군 공히 처치전인 Day 0에 비하여, 치료후 14일 경과일인 Day 14에 유의성있는 감소를 나타내었다 ($p < 0.01$). 그리고 오존연고를 사용한 실험군에서 Day 14에 더 낮은 병변등급을 나타내었다.
4. 총백혈구수는 처치전인 Day 0에는 대조군 및 실험군에서 각각 11.8 ± 4.54 및 12.2 ± 6.38 K/ μ L로서 정상범위(4.0 - 12.0 K/ μ L)의 경계수치를 나타내었으나, 처치후인

Day 14에서는 대조군 및 실험군에서 각각 8.5 ± 5.13 및 9.7 ± 7.25 K/ μ L로서 각각 호전되는 결과를 나타내었다.

5. 호중구수는 대조군에서는 처치전 및 후에 있어서 각각 2.1 ± 1.21 및 2.7 ± 1.73 K/ μ L로서 정상범위($0.6 - 4.1$ K/ μ L)내에 있었다. 실험군에서는 처치전인 Day 0에는 4.6 ± 2.15 K/ μ L로서 정상범위보다 약간 높았으나, 처치후인 Day14에는 3.3 ± 1.85 K/ μ L로서 호전되는 결과를 나타내었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 국내 낙농업에서 가장 문제시되고 있는 젖소의 유방염 및 발굽질병의 치료를 위한 오존요법을 확립하기 위하여, 제 1세부과제<젖소 유방염에 대한 오존요법의 치료 및 예방효과 시험>에서는 오존가스의 유방염 치료효과 시험<1년차>, 시험용 오존제제(오존수)의 유방염 치료효과 시험 및 시험용 오존제제(오존가스)의 유방염 예방효과 시험<2년차>, 그리고 시제품 오존제제(오존연고)의 유방염 치료효과<3년차>에 대하여 검토하였다. 또한 제 2세부과제<오존제제의 젖소 유방염 및 발굽질병 원인균에 대한 살균효과>에서는 유방염 및 발굽질병원인균에 대한 시험관내 살균효과<1년차>, 유방염 및 발굽질병 발병동물에 대한 시험용 오존제제의 살균효과 시험<2년차>, 그리고 유방염 및 발굽질병 발병동물에 대한 시제품 오존제제에 대한 살균효과 시험<3년차>에 대하여 검토하였다. 제 3세부과제<오존제제 처리에 따른 유방염 및 발굽질병에 대한 병리조직학적 시험>에서는 오존수의 독성시험과 유방 및 발굽조직에 대한 병리조직학적 시험<1년차>, 시험용 오존제제 처리에 따른 병리조직학적 시험<2년차>, 그리고 시제품 오존제제의 처치에 따른 병리조직학적 시험<3년차>에 대하여 검토하였다. 또한 제 4세부과제<젖소 발굽질병에 대한 오존요법의 외과적 치료시험>에서는 오존가스의 발굽질병에 대한 치료효과 시험<1년차>, 시험용 오존제제의 발굽질병에 대한 외과적 치료효과 시험<2년차>, 그리고 시제품 오존제제의 발굽질병에 대한 외과적 치료효과 시험<3년차>에 대하여 검토하였다.

따라서 각 세부과제에 있어서 예정한 년차 별 연구 목표를 각각 100% 달성하였다. 또한 오존요법의 확립으로 농가 소득 증대에 기여할 수 있을 것으로 판단되었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과를 토대로 동물의 피부질병의 치료에 있어 오존요법의 치료효과 구명에 응용할 예정이며, 또한 오존연고를 장기간 보존할 수 있는 안정성(적어도 1년 이상)에 대한 문제를 보완한 후에야 기업화가 가능 할 것으로 판단된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 일본에서 젖소 유방염 치료용 오존연고가 생산되고 있다는 사실이 알려졌으며, 또한 독일, 캐나다 및 쿠바에서는 인체질병 치료용 오존연고가 이미 생산 시판되고 있어, 국내에서도 인체질병 치료용 오존연고에 대한 연구개발이 매우 시급하다. 그리고, 쿠바에는 오존 연구소가 설립되어 있어 오존의 의료에의 응용에 관하여 집중적으로 연구하고 있다. 국내에서도 이에 관한 대책이 필요한 것으로 판단된다.

제 7 장 참고문헌

1. Betancourt, Y., Tolendo, J. M., Recio, E., Rodruetz, G. M., Harrys, C. Pina, J. P. : Ozone therapy : an useful alternative on virulent hepatitis treatment. Proceedings of the 2nd international symposium on ozone application (Ozone in medicine), Havana, Cuba, 1997 : 61-62.
2. Delgado, J., Wong, R., Regalado, C.P., Noriega, A. : Subcutaneous ozone therapy in the treatment of simplex herpes. Proceedings of the 2nd international symposium on ozone application (Ozone in medicine), Havana, Cuba, 1997 : 62.
3. Durana, R. A., Mendez, S., Rivero, O.E., Nieves, A. : Ozone therapy in suppurative chronic middle ear disease. Proceedings of the 2nd international symposium on ozone applicatior (Ozone in medicine), Havana, Cuba, 1997 : 46-47.
4. Hoblet, KH, Schnitkey, GD, Arbaugh, D et al. Costs associated with selective preventuve practices and with episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. JAVMA 1991;199:190.
5. Kachalina, T. S. et al. : Some aspects of ozone therapy in gynecological practice. Ozone in biology and medicine Nizhny Norvgorod : Ministry of public health in Russia Federation O ; 1992 : 90.
6. Konrad, H. : Ozone vs. hepatitis and herpes. Medical application of ozone. Norwal, coun : International ozone association, Pan American Committee, 1983 : 140-141.
7. Krivatkin, S.L., Krivatkina, E. V. : Ozone therapy in dermatoses : Pyometra. Proceedings of the 2nd international symposium on ozone application (Ozone in medicine), Havana, Cuba, 1997 : 62-63.
8. Matassi, R., D'Angelo, F., Franching, A., Bassi, P. : Ozone as therapy in

- Herpes simplex and Herpes zoster disease. Medical applications of ozone. Norwalle CT : International ozone association. Pan American Committee, 1985 : 1384-1390.
9. Murakami, H., Sakuma, S., Nakamura, K., et al. : Disinfection of removable dentures using ozone. Dent Mater 1996, 15(2) : 220-225.
 10. Pina, J.C., Mapolone, Y., Palma, M., Recio, E., Harrys, C. Rodriguez, M. : Application of ozone in patients with keratitis. Proceedings of the 2nd international symposium on ozone application (Ozone in medicine), Havana, Cuba, 1997 : 40-41.
 11. Rilling, S. : The possibilities of medical ozone application in the light of historical development of ozone therapy. Ozone Chrichten 1983, 2 : 27-34.
 12. Roy, D., Wong, P. K.Y., Englebrecht, R. S. , Chain, S.K. : Mechanism enteroviral inactivation by ozone. Appl. Environ. Microbiol., 1981(41) : 718-723.
 13. Viebahn, R. : The use of ozone in medicine. Karl F. Haug Publishers, Heilelberg, 1994 : 1-178.
 14. 宗 宮 功 : 医療-オゾン療法. 新版オゾン利用の新技術. 三秀書房, 1st ed. 横 浜, 1993: 463-480.
 15. 김두, 유우의 임상형 유방염 원인균과 항생제 감수성의 변화양상. 대한수의학회지 1998; 28: 397-404.
 16. 김홍수, 홍순국, 노경택, 한홍률. 충남지역 유우 유방염의 감염을 및 원인균에 관한 연구. 대한수의학회지 1975; 15: 83-91.
 17. 서진석, 황수현, 김덕환등 : 개 세균성 피부염에 대한 오존수의 치료효과. 한국임상수의학회지 1998;15(2) 부록 : 57.
 18. 아오끼고타, 황수현, 서진석 등 : 소사마귀에 대한 외과적 및 오존요법의 병용치료. 한국임상수의학회지 1999; 16(1) 부록 : 86.