

碩士學位論文

제주지역 옹돈정액의 특성과  
바이러스감염 양상

濟州大學校 大學院

獸醫學科

朴容相

2008年 12月

제주지역 옹돈정액의 특성과  
바이러스감염 양상

指導教授 金 哉 勳

朴 容 相

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2008年 12月

朴容相의 獸醫學 碩士論文을 認准함

審査委員長 이득식

委 員 배종익

委 員 김지훈



濟州大學校 大學院

2008年 12月

초 록

# 제주지역 웅돈정액의 특성과 바이러스감염 양상

지도교수 : 김 재 훈

박 용 상

제주대학교 대학원 수의학과

정액검사는 사출정액으로부터 수정능력을 평가하는데 중요한 방법이며 이때 검사되는 정액 내 정자의 수, 형태, 운동성은 수정과정에서 중요한 지표로 사용된다. 세균 또는 바이러스에 감염된 정액은 정자 운동성 및 질에 영향을 줄 수 있기 때문에 수정 전 정액검사는 반드시 필요하다. 정액을 통해 전파될 수 있는 바이러스로는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV), 돼지파보바이러스(PPV), 돼지 썬코바이러스 2형(PCV-2)이 있으며 이는 인공수정 시 우선적으로 모니터링 되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 제주지역 웅돈 정액의 특성 및 정액 내 바이러스의 감염양상을 살펴보고 그 상관관계를 알아보고자 하였다. 제주지역 13농가, 42두의 웅돈 정액을 공급받아 5일간 저온보관하며 CASA (Computer-Assisted Semen Analysis)를 이용하여 정액의 운동성과 형태학적인 조사를 수행하였다. 모든 정액 시료의 PRRSV, PPV, PCV-2의 감염여부는 PCR 기법으로 확인하였다. 제주지역 웅돈 정액의 채취 당일 운동성은  $68.4 \pm 9.1\%$ , VAP  $48.6 \pm 7.1 \mu\text{m/s}$ , VSL  $45.3 \pm 7.0 \mu\text{m/s}$ , VCL  $79.1 \pm 8.7 \mu\text{m/s}$ , ALH  $1.3 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$ , BCF  $8.3 \pm 0.4 \text{ Hz}$ , STR  $93.6 \pm 3.5\%$ , LIN  $57.9 \pm 6.4\%$ 로 나타났다. 형태학적인 조사

결과 정상 정자는 80.3%로 나타났으며, 정자의 부위별 기형은 두부, 중편, 미부기형이 각각  $0.3\pm 0.7\%$ ,  $14.4\pm 12.5\%$ ,  $4.9\pm 6.6\%$ 로 나타났다. PCR을 이용한 바이러스 검사 결과, PRRS와 PCV-2는 모든 개체에서 음성이었고, PPV는 42 두 중 20 두 (48%)에서 양성을 나타내었다. PPV 음성군과 양성군에서 정자의 운동성은 큰 차이가 없었으나 형태학적으로 PPV 양성군에서 꼬리탈락과 꼬리감김이 유의성 있게 증가하는 경향을 나타내었다. 제주지역 웅돈 정액의 특성과 바이러스 감염 양상을 살펴 본 결과 정액 내 정자의 운동성은 수정에 적합한 활력을 보였다. 그러나 PPV가 48%로 높은 양성율을 나타내어 정액을 통한 질병 전파 가능성이 있으므로, 제주도내 돼지 웅돈 정액에 대한 지속적인 질병모니터링이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

---

중심어: 돼지정액, CASA, PCV-2, PPV, PRRS

## 목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
III. 결 과	9
IV. 고 찰	13
V. 결 론	16
VI. 참고문헌	17
영문초록	23

## I. 서론

동물 정자의 크기나 모양은 동물의 종류에 따라서 다르지만 기본적인 형태학적 구조는 유사하다. 형태학적으로 동물의 정자는 크게 두부(head), 경부(neck)를 포함한 중편(mid piece) 및 미부(tail)로 구분되고 있다. 정원세포에서 발육된 정자세포는 다량의 사립체(mitochondria)를 함유하는 세포질에 의해 둘러싸인 구형의 핵을 가지며, 세포질 내에 골지체(Golgi body)가 바로 형성된다. 정자 완성단계에서는 첨단체(acrosome)와 두관(head cap)은 골지체에서 유래하며, 꼬리는 중심체, 중편부는 사립체에서 각각 만들어 진다. 정자가 정소 내에 있을 때에는 세포질 소적(cytoplasmic droplet)이라고 하는 불필요한 세포질이나 골지 물질이 정자의 경부에 위치하고 있으나, 정자 완성 말기 즉 정자가 정소상체를 통과할 때 없어지게 된다. 이러한 세포질 소적은 정자의 두부에서 멀리 떨어져 있을수록 수정율이 높아진다고 보고되고 있으며, 성숙한 정자에 남아있는 세포질 소적은 정자의 꼬리를 휘게 하는 기형을 유발 할 수도 있다 [8]. 형태학적으로 정자의 기형은 두부의 경우 쌍두, 대두, 소두, 조롱박형 등으로, 중편의 경우 꼬임, 접힘, 원위와 근위의 세포질 소적, 미부는 접힘, 꼬임, 쌍미 등으로 세분할 수 있다 [11, 28, 31, 36]. 일반적으로 인공수정에 적합한 정액은 적어도 70% 이상의 정상 정자를 가지고 있어야하며, 정자의 전체 기형율은 20% 미만이어야 한다고 알려져 있다 [11, 28, 31, 36]. 정자의 부위별로는 두부기형 10% 미만, 세포질 소적을 포함한 중편의 기형은 20% 미만, 중편의 세포질 소적은 15% 미만으로 검출되어야 인공수정이 가능한 것으로 확인되고 있다.

정자의 운동성을 보존하고 수정 능력을 향상시키는 기술은 최근 동물의 번식 산업에 있어서 매우 중요하게 여겨지고 있다. 정액검사는 사출된 정액의 질과 수정능력을 평가하는 기본적인 과정 중 하나로 특히 정액 내 정자의 수, 정자의 형태 및 운동성은 가장 중요한 지표로 활용되고 있다 [21, 35]. 일반적으로 정액검사는 정액의 양, 냄새, 색 등을 조사하는 육안적 검사와 정자의 운동성과 생존율, 형태학적 특성 분석, 산도 등을 검사하는 현미경적 및 화학적 검사로 세분되어 진다 [7, 9, 18]. 이 중 형태학적인 검사는 정자를 특수 염색하여 확인하는 것으

로 특정 기술을 요구하지 않기 때문에 검사자 간에 큰 차이가 나타나지 않는다. 그러나 육안적 검사와 현미경적 검사는 검사자의 주관적인 견해가 포함되어, 검사자간에 상이한 결과를 보일 수도 있다. 특히 현미경 검사 시 정자생존율은 동일한 시료 내에서도 검사자 간의 차이(변이계수)가 약 30-80% 정도 나타날 수 있다[13, 17, 26]. 최근에는 이러한 변이계수를 보완하기 위하여 laser doppler spectroscopy와 flow cytometric sorting 등과 같은 방법 등이 제안 되었다 [7, 10, 32, 34, 3].

정자의 움직임, 운동 속도 및 형태를 보다 객관적으로 평가하기 위하여 컴퓨터를 이용한 정자분석(Computer-Assisted Sperm Analysis; CASA) 이론이 1950년대 최초로 수립되었다. 이 후 1970년대부터 CASA를 이용한 정자 분석이 시도되었으나, 컴퓨터 화상도에 한계가 있어 정자와 이물질의 구별이 어려운 관계로 정확도가 현저히 낮았다 [13]. 그러나 1980년대부터 정자와 이물질과의 정확한 식별이 가능해짐에 따라 현재까지 정자의 운동성을 평가하는 객관적 방법으로 널리 활용되고 있다 [1, 13]. 일반적으로 CASA 검사 결과 정자의 운동성이 60% 이상일 경우 수정에 적합한 것으로 보고되고 있으며, 수정 전 정액내 정자의 운동성 검사는 필수불가결한 단계로 인식되고 있다 [3, 20, 27]. 학문적으로 CASA 기법은 말 [1]과 소 [13]와 같은 경제동물, 개 [25] 등의 애완동물 및 제브라피쉬 [39]와 같은 관상어류에 까지 광범위하게 활용되고 있다.

정자의 운동성 및 형태에 영향을 미칠 수 있는 또 다른 요인으로는 정액 내 세균 및 바이러스 등의 병원체의 감염을 들 수 있다. 이러한 정액 내 병원체의 오염은 정자 자체에 영향을 줄 뿐만 아니라 회석액내 영양분의 소모를 가져와 정액보존성을 저하시키는 주 원인이 될 수 있다. 또한 모돈이나 기타 농장 내 다른 동물에게 질병전파의 원인이 되기도 한다.

돼지의 경우 정액 내에 오염이 되는 세균은 약 13여종이 알려져 있으며, 특히 *Brucella suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 등의 오염정도가 심할 경우 정자 질, 생존성 및 수태율 저하를 초래할 수 있다 [12, 23, 33]. 바이러스로는 돼지열병(Classical swine fever virus = Hog cholera virus), 구제역(Foot and mouth disease), 일본뇌염바이러스(Japanese B-encephalitis virus) 등



20여종이 있다 [12, 23]. 특히 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV)는 정자의 운동성을 저하시키며 정자 기형을 증가시키는 것으로 알려져 있다 [12, 19, 33]. 최근 돼지 이유후 전신 소모성 증후군(Postweaning multisystemic wasting syndrome: PMWS)의 원인체로 알려진 돼지 썩코 바이러스 2형(Porcine circovirus type 2: PCV2)과 모돈에 유사산을 유발하는 돼지 파보 바이러스(Porcine parvo virus: PPV)도 정액에 감염될 수 있음이 보고되었다 [23, 30, 32]. 이와 같이 바이러스에 감염 또는 오염된 정액을 사용하여 인공수정을 실시할 경우 순식간에 농장의 모돈 전체에 질병이 전파되어 양돈 농가에 막대한 경제적 손실을 유발할 가능성이 매우 높다 [23].

인공수정은 자연교배에 필요한 종모돈의 확보, 유지 및 관리 등에 필요한 비용을 절감할 수 있는 장점이 있어 국내 많은 양돈 농장에서 활용되고 있다. 제주도의 경우에도 웅돈의 액상 정액을 이용한 인공수정이 폭 넓게 행해지고 있을 뿐만 아니라, 1999년 돼지 전염병 청정화를 선언한 이후 청정 유지를 위한 각고의 노력이 경주되고 있는 실정이다. 그러나 제주도내 사육되고 있는 웅돈의 정액이나 인공수정 센터의 액상 정액에 대한 질적 평가 및 병원체 감염 여부에 대한 연구는 전무한 상황이다. 따라서 본 연구는 제주지역에서 사용되고 있는 웅돈의 정액의 운동성, 기형 발생율 등 질적 평가와 함께 정액 내 PRRSV, PPV, PCV-2 등 주요 바이러스의 감염 여부를 살펴보고 그 상관관계를 규명하고자 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 공시축 및 정액 채취와 보관

본 연구에 공여된 정액은 제주지역 13개 농가 42개체로부터 주 1회 수압법으로 농후정액만 분리 채취하여 Androhep extender (26 g glucose, 6.9 g sodium citrate, 1.25 g sodium bicarbonate, 2.25 g EDTA, 5.65 g trisodium citrate/ $\ell$ , 4 차 증류수)로 단계 희석하였다. 채취한 정액을 100 ml 비닐팩에 넣고 17°C 정액 보관고에 5일간 보관하면서 매일 실험에 공여하였다.

### 2. 정액 검사

17°C 정액보관고에 보관된 정액 1.5 ml을 eppendorf tube에 취하여 30분간 37°C 수조에서 배양시키고 37°C로 예열된 Makler counting chamber (Sefi-Medical Instrument)에 10  $\mu\text{l}$ 의 정액을 떨어뜨린 후 현미경 (Axioskop, Zeiss)의 관찰배율을 200배로 설정하고 CCD (Toshiba, Japan)로 연결된 CASA system (Sperm2.1, VideoTesT)으로 분석하였다.

CASA를 이용하여 10개의 시야를 선택하여 이물질이 정자로 오인되는 것을 방

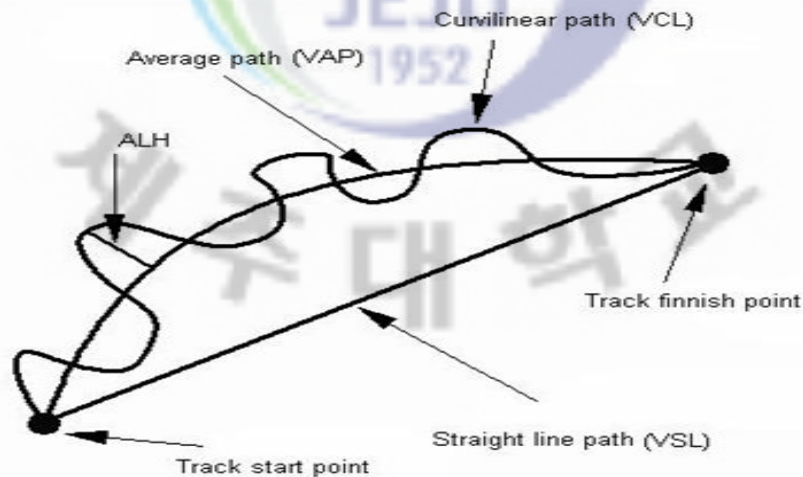


Fig 1. Diagram and parameter for sperm movement

지하고 정자가 잘 구분 될 수 있도록 화면의 밝기와 대비를 조절하였다. 영상을 시스템에 입력한 후 1시야가 1초 노출되는 동안 25 frame을 분석하여 평균치를 측정하였다. 그 외 실험에 사용한 CASA system의 초기 설정치는 Table 1과 같다.

정자의 운동성은 A (매우 활발한 운동성), B (활발한 운동성), C (약한 운동성), D (아주 미약한 운동성)로 분류하여 백분율로 표시하였다. 각 그룹은 정자의 활력 (motility; MOT, %), 곡선운동속도 (curvilinear velocity; VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), 직선운동속도 (straight line velocity; VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), 평균경로속도 (average path velocity; VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), 측두 이동거리 (평균이동경로와 실제 이동경로와의 측방거리의 차이, amplitude of lateral head displacement: ALH), 평균경로 선형도 (straightness: STR, %), VCL과 VAP의 경로간 교차율 (실제 이동경로가 평균 이동경로와 만나는 횟수의 시간당 비율, beat cross frequency; BCF, Hz) 등을 측정 하였다.

Table 1. Initial parameter setting used in CASA system

Setting parameter	Value
Number of captured fields	10
Image sample frequency (frame/s)	25
Minimum motile speed ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL 10
Maximum motile speed ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL 250
Maximum countable number (sperm)	400
Maximum countable frame	10

### 3. 기형검사

정자의 형태학적 검사는 eosine-nigrosine 염색법을 이용하였다 [11]. 검사 당일 각 시료를 슬라이드 위에 5  $\mu\text{l}$ 의 액상정액과 5  $\mu\text{l}$ 의 eosine-nigrosine을 혼합하여 30초간 말린 후 광학현미경으로 관찰하였다. 정자의 형태는 두부, 중편 및 미부로 구분하고 기형 여부를 관찰하였다. 각각의 항목은 두부기형의 경우 쌍두,

대두, 소두, 조롱박형 등, 중편의 경우 꼬임, 접힘, 원위와 근위의 세포질 소적의 존재 등, 미부기형은 꼬리 탈락, 접힘, 꼬임, 쌍미 등으로 세분하여 확인하였다. 슬라이드 당 100개의 정자를 기준으로 하였고 모든 실험은 각 시료 당 2회 반복하였다.

#### 4. 중합효소연쇄반응

##### 1) 정액의 핵산 추출

RNA 바이러스인 PRRS에 대한 역전사중합효소연쇄반응 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)과 DNA 바이러스인 PCV-2 및 PPV에 대한 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)을 실시하였다.

DNA추출은 G-spin™ DNA extraction kit (iNtRON biotechnology, Korea)를 이용하였다. 정액 200  $\mu$ l에 G-buffer 400  $\mu$ l을 잘 혼합한 다음 70°C에서 10분간 방치하고 binding buffer 400  $\mu$ l를 첨가하여 column에 800  $\mu$ l를 넣고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Collection tube에 여과된 용액을 제거하고 500  $\mu$ l의 washing buffer를 분주하여 12,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상기 과정을 1회 반복하였다. 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 column을 넣고 100  $\mu$ l elution buffer를 첨가하여 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 실시하여 최종 추출물에 대한 PCR 검사를 실시하였다.

RNA의 추출은 RNeasy® Protyect mini Kit (QIAGEN, GmbH, Germany)를 이용하였다. 정액 200  $\mu$ l와 RLT buffer 350  $\mu$ l를 혼합한 후, 70% ethanol 350  $\mu$ l을 첨가하여 Mini column에 700  $\mu$ l의 반응액을 넣고 4°C, 10,000 rpm으로 다시 30초간 원심분리 하였다. Column에 새로운 collecting tube를 장착하고 RPE buffer 500  $\mu$ l을 첨가하여 4°C, 10,000 rpm에서 1분간 원심분리 한 후, 상기 과정을 1회 반복하였다. Column에 용액이 남지 않도록 4°C, 12,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 column을 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 넣고 RNase free water를 40  $\mu$ l 분주하여 4°C, 12,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 최종 추출물로 RT-PCR 검사를 실시하였다.

## 2) Oligonucleotide primer의 염기서열 및 PCR

PRRS의 검출을 위한 primers는 Christopher-Hennings 등 [15]의 방법에 준하여 제작하였으며, PCV-2 및 PPV의 검출을 위한 primer는 Larochele 등과 수의 과학 검역원에서 제시한 염기서열에 준하여 제작하였다 [6, 29].

## 3) RT-PCR 반응조건

PRRS의 검출을 위한 반응조건은 추출한 RNA 2  $\mu$ l와 primer 0.5  $\mu$ l (20 pmol) 및 DNase RNase free water 17  $\mu$ l를 RT-PCR premix (Maxime RT-PCR, iNtRON biotechnology, Korea)에 첨가하여 최종 반응용량이 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. 42°C 및 72°C에서 30초간 30회 반복하고 최종 72°C에 15분간 반응시켰다 [15]. RT-PCR 과정이 완료된 후 반응산물 2  $\mu$ l에 ORF7nF2, ORF7nR2 primer를 이용하여 nested PCR를 실시하였다 (Table 2).

## 4) PCR 반응 조건

PCV-2 및 PPV의 검출을 위한 반응조건은 추출한 DNA 2  $\mu$ l와 검출하고자 하는 바이러스의 primer 각각 0.5  $\mu$ l (20 pmol) 및 DNase RNase free distilled water 17  $\mu$ l를 PCR premix (Maxime PCR premix, iNtRON biotechnology, Korea)에 첨가하여 최종 반응용량이 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. PCV-2는 95°C에 5분간 반응한 다음 95°C, 65°C 및 72°C에 각각 1분씩 35회 반복하고 최종 72°C에서 10분간 반응하였다 [29]. PPV는 94°C에 5분간 반응한 다음 53°C에 30초, 72°C에 45초씩 30회 반복하고 최종 72°C에서 10분간 반응하였다 [6]. PCR의 증폭은 PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa, Japan)을 이용 하였다.

## 5) PCR 및 RT-PCR 증폭산물의 확인

반응 종료 후 각각의 반응액 7  $\mu\text{l}$ 를 1.5% agarose gel상에서 전기영동을 실시한 다음, ethidium bromide 용액 (0.5  $\mu\text{l}/\text{ml}$  in DW)으로 염색하였다. UV transilluminator (Mupid-Scope WD, TaKaRa, Japan)로 각각의 병원체에 대한 특이적인 밴드유무를 확인하였으며, 증폭산물을 확인하기 위하여 100 bp DNA ladder(TaKaRa, Japan)를 molecular size marker로 이용하였다.

Table 2. Oligonucleotide primer pairs for the detection of RNA and DNA virus in semen

Agent	Primer	Sequences (5' to 3')	Size of amplified products (bp)
PRRSV	ORF7 F1	TCGTGTTGGTGGCAGAAAAGC	484
	ORF7 R1	GCCATTCACCACACATTCTTCC	
	ORF7 nF2	CCAGATGCTGGGTAAGATCATC	236
	ORF7 nR2	CAGTGTAACTTATCCTCCCTGA	
PCV-2	CF8	TAGGTTAGGGCTGTGGCCTT	263
	CR8	CCGCACCTTCGGATATACTG	
PPV	P2F2	CCATACACACCAGCAGCACC	455
	P2R1	ACCTGAGCTGGCCTAATTGC	

## 5.. 통계처리

본 실험의 그룹별로 측정된 운동성 및 기형율은 대응표본 T-test 쌍체비교 (Excell, Microsoft)를 통하여 유의성( $p < 0.05$ )을 검증하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 정자의 운동성 분석

CASA를 이용한 정액의 보존기간별 운동성의 변화 양상은 Table 3과 같다. 이때 정자의 운동성이 아주 미약한 D그룹은 제외하였다. 정액 채취 당일부터 검사 2일째까지 3일간은 액상정액의 활력이 60% 내외로 수정에 적합한 운동성을 보였으나, 보존 후 3일부터는 운동성이 감소되는 경향을 나타내었다.

운동성이 매우 활발한 A그룹의 경우 VAP, VSL, VCL, ALH, LIN STR, BCF 등은 보존기간 5일까지 큰 변화를 나타내지 않았다.

Table 3. Changes of motion parameters according to storage day in Jeju boar semen

Motion parameter	Storage (days)				
	0	1	2	3	4
MOT (%)	68.4±9.1*	62.7±11.6	58.7±12.0	55.4±15.7	52.5±16.5
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	48.6±7.1	47.6±5.8	47.0±6.1	45.9±7.6	44.6±7.0
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	45.3±7.0	44.3±5.7	44.2±6.0	42.5±6.6	42.1±6.6
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	79.1±8.7	79.1±7.8	77.7±8.7	75.7±11.0	77.6±10.1
ALH ( $\mu\text{m/s}$ )	1.3±0.2	1.3±0.2	1.2±0.2	1.2±0.2	1.2±0.2
LIN (%)	57.9±6.4	56.6±5.3	57.6±4.8	56.9±4.5	54.8±5.5
STR (%)	93.6±3.5	93.5±3.7	94.3±2.9	93.3±5.3	94.7±2.9
BCF (Hz)	8.3±0.4	8.4±0.4	8.3±0.4	8.3±0.5	8.4±0.5

MOT, motility; VAP, average path velocity; VSL, straight line velocity; VSL, straight line velocity; ALH, amplitude lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; STR (VSL/VAP), straightness; LIN (VSL/VCL), linearity.

\* Mean± SD.



## 2. 정자의 형태학적 특성 분석

Eosine-nigrosine 염색을 이용하여 정자의 기형율을 조사한 결과, Table 4와 같다. 정상 정자는 80% 이상으로 나타났으며, 정자 기형의 유형별로 두부기형 0.3%, 중편의 기형 14.4%, 중편 내 세포질 소적 5.1%, 미부기형 4.9%로 나타났다.

Table 4. Morphological characteristics in Jeju boar spermatozoa

Morphological parameters	Mean± S.D.
Normal sperm (%)	80.3±15.8
Abnormal head (%)	0.3±0.7
Abnormal midpiece (%)	14.4±12.5
- cytoplasmic droplets* (%)	5.1±5.3
Abnormal tail (%)	4.9±6.6

\* cytoplasmic droplets include both proximal and distal cytoplasmic droplets



### 3. RT-PCR/PCR 검사결과

정액으로부터 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR과 Nested PCR을 실시한 결과 PRRSV는 42두 모두 음성으로 확인되었다. 정액에서 추출한 DNA를 대상으로 PCR를 실시한 결과 PCV-2는 전 두수 음성이었으나, PPV는 42두 중 20두 (48%)가 양성반응을 나타내었다.

### 4. 돼지 파보바이러스 감염에 따른 정자 운동성 비교

돼지 파보바이러스 감염여부에 따른 정자의 운동성을 비교한 결과 음성군 및 양성군에서 모두 68.5%로 나타나 바이러스의 감염에 따른 차이는 없는 것으로 확인되었다 (Table 5).

Table 5. Comparison of motion parameters between PPV negative and positive group in Jeju boar semen

Motility	PPV negative	PPV positive
MOT (%)	68.5±9.2*	68.5±9.0
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	47.8±6.1	49.9±8.0
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	44.9±5.9	46.0±8.2
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	77.6±6.9	81.4±10.2
ALH ( $\mu\text{m/s}$ )	1.2±0.2	1.3±0.2
LIN (%)	58.7±5.8	56.8±7.0
STR (%)	94.4±3.3	92.4±3.4
BCF (Hz)	8.3±0.4	8.3±0.4

MOT, motility; VAP, average path velocity; VSL, straight line velocity; VSL, straight line velocity; ALH, amplitude lateral head displacement; BCF, beat cross frequency; STR (VSL/VAP), straightness; LIN (VSL/VCL), linearity.

\* Mean± SD.

## 5. 돼지 파보바이러스 감염에 따른 정자의 형태학적 비교

파보바이러스에 감염에 따른 정자의 기형율을 비교한 결과 정상정자는 파보 양성군이 78.3%로 나타나 파보 음성군의 81%에 비하여 다소 낮은 양상을 보였으나, 유의성( $P < 0.05$ )의 차이는 없었다. 파보바이러스 양성군과 음성군에서 기형 발생 양상을 비교한 결과 양성군의 미부기형은  $6.5 \pm 8.9\%$ 로 음성군( $3.3 \pm 2.9\%$ )에 비하여 증가하였으며, 특히 미부기형을 세분하여 보았을 때 꼬리탈락과 미부의 꼬임이 증가하는 경향을 보이고 있었다 ( $P < 0.05$ ).

Table 6. Comparison of sperm morphology between PPV negative and positive group in Jeju boar semen

Morphological parameter	PPV negative	PPV positive
Normal sperm (%)	$81.1 \pm 13.2^*$	$78.3 \pm 19.1$
Abnormal head (%)	$0.3 \pm 0.7$	$1.2 \pm 0.4$
Abnormal midpiece (%)	$14.3 \pm 12.1$	$13.8 \pm 12.1$
- cytoplasmic droplets* (%)	$5.6 \pm 4.8$	$4.6 \pm 3.6$
Abnormal tail (%)	$3.3 \pm 2.9$	$6.5 \pm 8.9$
- Detached head (%) <sup>..</sup>	$1.9 \pm 3.1$	$4.2 \pm 6.1$
- Coiled tail (%) <sup>..</sup>	$1.0 \pm 1.6$	$1.8 \pm 3.2$

\*cytoplasmic droplets include both proximal and distal cytoplasmic droplets.

<sup>..</sup>Slight increases in detached head and coiled tail of abnormal tail after infection were significant( $P < 0.05$ ).

\*Mean  $\pm$  SD.

## IV. 고 찰

1955년 처음으로 우리나라에 돼지 인공수정이 소개된 후, 70년대와 80년대를 기점으로 인공수정센터로부터 상업용 인공수정 정액이 공식적으로 판매되기 시작하면서 돼지의 인공수정이 본격적으로 활성화되었다. 최근 인공수정 보급률은 과거에 비하여 약 27배 이상 증가하였으며 질적인 면에서도 크게 향상되어 현재 양돈 산업에서 아주 중요한 부분으로 자리 잡고 있다 [2]. 제주지역에서도 많은 농가에서 상업용 인공수정 정액을 구입하거나 자체적으로 정액을 생산하여 자가 인공수정을 활발히 실시하고 있다. 그러나 아직까지 이러한 정액에 대한 품질 기준 지표는 제대로 마련되어 있지 않은 실정이다. 특히 전염성 질병이 만연된 농장에서 생산된 정액은 바이러스나 세균에 쉽게 오염될 수 있으며, 특히 질병에 감염정액을 사용할 경우 수정 능력의 저하뿐만 아니라 질병을 전파하는 매개체가 되어 농가의 경제적 손실을 초래할 수 있다. 따라서 정액의 품질기준을 확실하게 정립하고 체계적인 정액검사를 실시함으로써 수정 능력을 더욱 향상시키며 나아가 질병의 전파도 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 제주지역 13개 양돈 농장으로부터 42두의 자가 정액을 수거하여 정액의 질적 검사와 함께 PCR을 통하여 정액 내 감염을 유발할 수 있는 주요 바이러스인 PPV, PRRSV, PVC-2의 감염 여부를 확인하였다. 형태학적인 검사는 정액 수거 당일에 한하여 eosine-nigrosine 염색을 통해 정자기형률을 관찰하였으며 정액을 5일간 17℃에서 저온보관하면서 CASA를 이용하여 정자의 운동성을 측정하였다.

국내에서 경기도와 충남지역 시판용 돼지액상정액의 보존기간에 따른 정자의 운동성을 CASA를 이용해 측정한 결과 검사당일은 정자활력(MOT) 68.0%, VAP 39.9  $\mu\text{m/s}$ , VSL 28.2  $\mu\text{m/s}$ , VCL 49.3  $\mu\text{m/s}$ , ALH 4.0  $\mu\text{m/s}$ , STR 75.4%를 나타내었으며 이 지표들은 보존기간 2일부터 감소하기 시작하여 4일 및 6일째에는 현저한 감소를 나타내었다 [3]. 그러나 본 연구에서 제주도 옹돈의 정자 운동성은 검사당일 정자활력(MOT) 68.4%, VAP 48.6  $\mu\text{m/s}$ , VSL 45.3  $\mu\text{m/s}$ , VCL 79.1  $\mu\text{m/s}$ , ALH 1.3  $\mu\text{m/s}$ , STR 93.6%를 나타내어 시판용 돼지정액보다 우수한 운동성

을 보여주고 있었으며 3일부터 완만하게 저하되는 경향을 나타내었다.

Donnelly 등 [16]은 VCL, VSL, VAP 와 ALH 등이 정자의 수정률을 판단하는 주된 지표라고 하였으며, Gil 등 [21]은 VSL, LIN, STR이 정자의 전진 운동성을 판단하는 지표가 된다고 주장하였다. 그러므로 제주지역 웅돈의 정자는 정자의 활력이 우수함과 동시에 수정 능력의 지표인 VAP, VSL, VCI가 다른 지역의 돼지에 비하여 월등히 뛰어난 것으로 확인되었으며, VSL, LIN, STR 지표를 비교한 결과 전진 운동성 또한 우수한 것으로 평가할 수 있었다. 그러나 Holt 등은 각기 다른 CASA system을 사용하기 때문에 운동성 지표의 차이가 발생할 수 있으므로 단순한 지표 수치 비교는 무리가 따른다고 하였다 [24]. 또한 좀더 정확한 비교를 위하여 저온 보관된 정액의 해동온도 및 시간에 따른 영향도 고려되어야 한다 [1].

PCR을 통하여 정액의 바이러스 감염여부를 확인한 결과 본 실험에서는 42두의 웅돈 정액 중 PRRSV와 PCV-2는 전두수 음성이었으나 PPV의 경우 42두 중 20두(48%)에서 검출되었다. Christopher-Hennings 등 [14]은 웅돈에 PRRSV를 인공접종 한 후 PCR을 통하여 정액 내 바이러스를 검출한 결과 92일까지 배출됨을 보고하였다. Larochelle 등 [29]은 PCV-2 바이러스를 인공감염시킨 웅돈에서 접종 후 5일에서 47일까지 간헐적으로 바이러스가 정액으로 배출되고 있음을 보고하였다. PPV의 경우 웅돈에 인공감염 후 약 3주까지 정액에서 바이러스가 검출된 바 있다 [22]. 돼지에서 바이러스의 자연감염이 있을 경우 바이러스의 감염 시기, 바이러스 혈증의 시기 및 정액을 통한 병원체의 배출 양상이 질병에 따라 상이하게 나타난다. 따라서 본 실험에서와 같이 일회적인 PCR 검사 시 음성이라 할지라도 바이러스 감염이 전혀 없었다고 하기에는 큰 무리가 따른다.

CASA를 이용하여 돼지 파보바이러스 감염에 따른 정자의 운동성을 비교 분석한 결과 음성군과 양성군에서 모두 68.5%로 나타나 PPV 감염이 정자의 운동성에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. 그러나 PPV 바이러스에 양성군의 정액에서 정자의 기형율은 약 22%로 나타나 기준치(20%)를 초과하였으며, 음성군의 정액과 비교하였을 때 약 3% 정도 기형율이 높은 것으로 확인되었다. 파보바이러스 감염에 따른 정자 기형의 유형을 분석한 결과 PPV 양성군에서 미부기형은  $6.5 \pm 8.9\%$ 로 나타나 음성군( $3.3 \pm 2.9\%$ )에 비하여 2배 정도 증가하는 양상을

보이고 있었다. 특히 PPV 양성군에서 꼬리탈락과 미부의 꼬임이 각각  $4.2 \pm 6.1\%$ ,  $1.8 \pm 3.2\%$ 로 검출되어 음성군에 비하여 유의성 있게 증가하는 경향을 나타내었다 ( $P < 0.05$ ). Thacker 등 [39]은 약 8-12개월령 옹돈에 PPV를 인공 감염 전후 정액을 검사한 결과 정액의 양, 정자의 수 및 운동성에 차이는 없었으나, 꼬리탈락, 근위 세포질 소적 및 중편의 기형 등 정자의 형태학적 변화가 유의성 있게 증가하고 있음을 보고한 바 있다. 따라서 PPV 인공감염된 옹돈과 마찬가지로 자연 감염에서도 정자의 운동성에는 큰 영향이 없으나, 정자의 기형 발생을 증가시키고 있음을 강력히 시사하고 있다.

국내에서 김 등 [4]은 돈군별로 PPV에 대한 혈청학적 역학 조사를 실시한 결과 모돈에서는 비교적 견고한 면역이 형성되어 있으나, 자돈에서 90일령 이전에 PPV에 자연감염되는 양상을 보이고 있음을 보고하였다. 또한 제주도의 경우 혈구응집억제 반응을 이용한 혈청검사를 통하여 PPV 항체 보유 현황을 조사한 바 약 30%의 돼지에서 역가 5이하의 매우 낮은 항체 수준을 보유하고 있었다 [5]. 그러므로 모돈에서 PPV 감염으로 인한 유사산 피해를 최소화하기 위하여 PPV 예방 접종이 강화되어야 한다고 보고하였다.

본 실험을 통하여 제주도 내에 사육중인 옹돈의 정액에 대한 질적 평가와 함께 병원성 질병 감염 양상을 파악하였다. 정자의 운동성, 형태학적 특징 등은 국내 다른 지역에 비하여 비교적 우수한 것으로 판단된다. 정액 내 바이러스의 경우 최근 가장 문제시되고 있는 PRRSV 및 PCV-2는 검출되지 않았으나, PPV의 경우 48%의 높은 감염율을 보이고 있었다. 따라서 정액 내에 오염된 PPV로 인하여 모돈 및 다른 돼지에게 질병이 전파될 가능성이 높은 상황이다. 그러므로 농장에 사육 중인 옹돈에 대한 보다 체계적인 관리 방안과 종부 전 모돈에 PPV 예방접종을 반드시 실시하여 할 것으로 사료된다. 또한 제주도내에서 사용되고 있는 인공수정 정액을 대상으로 정액 매개 질병에 대한 정기적이고 지속적인 모니터링 체계의 구축이 반드시 이루어져야 할 것으로 판단된다.



## V. 결 론

제주지역 13개 양돈 농장에서 채취한 42두 옹돈 정액을 대상으로 질적 평가와 병원체 감염 여부를 검사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 제주도 옹돈 정자의 운동성은 정자활력  $68.4 \pm 9.1\%$ , VAP  $48.6 \pm 7.1 \mu\text{m/s}$ , VSL  $45.3 \pm 7.0 \mu\text{m/s}$ , VCL  $79.1 \pm 8.7 \mu\text{m/s}$ , ALH  $1.3 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$ , LIN  $57.9 \pm 6.4\%$ , STR  $93.6 \pm 3.5\%$  BCF  $8.3 \pm 0.4 \text{ Hz}$ 로 나타났다.
2. 옹돈 정자의 기형 발생율은 19.7%였으며, 부위별로 두부 기형 0.3%, 세포질 소적을 포함한 중편 기형 14%, 미부 기형 4.9%로 나타났다.
3. 옹돈의 정액에 대한 PCR 검사 결과, PRRSV와 PCV-2는 전 두수 음성이었으나 PPV는 20예(48%)에서 양성을 나타내었다.
4. PPV 감염에 따른 정자 운동성을 비교한 결과 바이러스 감염에 따른 특이적 변화는 관찰할 수 없었다. 그러나 정자기형의 경우 양성군에서 미부기형이  $6.5 \pm 8.9\%$ 로 나타나 음성군( $3.3 \pm 2.9\%$ )에 비하여 증가하였으며, 특히 꼬리탈락과 미부의 꼬임이 증가하는 경향을 보였다 ( $P < 0.05$ ).

이 연구를 통해 제주도 인공수정 정액에 대한 정액 품질 기준 지표에 기초자료를 제공하였고, PPV의 경우 48%로 높은 양성율을 나타내어 정액을 통한 전파 가능성이 있음을 시사하고 있다. 따라서 제주도내 돼지 옹돈 정액에 대한 질병 모니터링이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. 강태영, 강민수. Computer-assisted sperm analysis(CASA)를 이용한 제주마 정액의 운동성 평가. *Koran J Emb Trans* 2006, 21, 69-75.
2. 김인철. 돼지 인공수정 현황과 발전방안. 농촌진흥청 축산연구소. 2005, 8-25
3. 김창근, 김인, 이장희, 윤희진. 돼지 인공수정 효율향상을 위한 정액품질 평가, 동결정액생산 및 발정동기화기술 개발. 농림부 농림기술개발사업 연구보고서. 2003.
4. 김혜수, 박정서, 오진식, 박봉균. 한국에서 사육중인 모돈 및 30, 60, 90일령 돼지의 돼지파보바이러스에 대한 혈청학적 역학조사. *Korean J Vet Res* 2001, 41, 505-510.
5. 류영수, 박최규, 김로미, 이창희, 최상호, 김성일, 배종희. 제주지역에 대한 돼지 주요 전염병의 혈청학적 역학조사. 1997, 37, 765-772.
6. 박최규, 주후돈, 신진호, 김재훈, 손현주, 김기석, 강영배. 돼지 바이러스성 번식장애 질병 모니터링 및 진단법 개선연구. 국립수의과학검역원 연구보고서. 2000, 14-28.
7. 심훈섭, 이원진, 박광석, 백재승. 영상처리를 이용한 정자의 운동특성 분석. 대한전자공학회 논문집. 1994, 31, 108-114.
8. 최상용, 황우석, 박종임, 김용준, 신상태, 김일화, 김희석, 이병천, 손창호, 이은송, 강태영. *수의산과학*. 영재교육원. 1995, 143-151.



9. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Mortimer D, Templeton AA, Lees MM. An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility : conventional criteria movement characteristics and fertilizing capacity. *Fertil Steril* 1982, 38, 212-221.
10. Auger J, Leonce S, Jouannet P, Ronot X. Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *J Histochem Cytochem* 1993, 41, 1247-1251.
11. Björndahl L, Soderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Hum Reprod* 2003, 18, 813-816.
12. Britt JH, Almond GW, Flowers WL. Disease of the reproductive system. Straw BE, D'allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ(eds). *Diseases of swine*. 8th ed. pp. 902-906, Iowa State University Press, Ames, 1999.
13. Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships between computerized measurement of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 1988, 9, 41-54.
14. Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Chase CCL, Yaeger MJ, Benfield DA. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 1995, 7, 456-464.
15. Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Hines RJ, Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Katz JB, Yaeger MJ, Chase CCL, Benfield DA. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar

- semen by PCR. *J Clin Microbiol* 1995, 33, 1730-1734.
16. Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril* 198, 70, 305-314.
  17. Dunphy BC, Kay R, Barratt CL, Cooke ID. Quality control the conventional analysis of semen as essential exercise. *J Androl* 1989, 10, 378-385.
  18. Eggert-Kruse W., Schwarz H, Rohr G. Demirakca T, Tilgen W, Runnebaum B. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in vivo conditions of conception. *Hum Reprod* 1996, 11, 139-146.
  19. Feitsma H, Grooten HJ, Van Schie FW, Colenbrander B. The effect of PEARS on sperm production. In: *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction 1992*. 1710 - 1712.
  20. Flower WL. Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil* 1997, 52, 67 - 78.
  21. Gil MC, García-Herreros M, Barón FJ, Aparicio IM, Santos AJ, García-Marín LJ. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology* 2009, 71, 254-263.
  22. Gradil C, Molitor T, Harding M, Crabo B. Excretion of porcine parvovirus through the genital tract of boars. *Am J Vet Res.* 1990, 51, 39-62.

23. Guérin B, Pozzi N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Theriogenology* 2005, 63, 556-572.
24. Holt W, Watson P, Curry MC. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison five differ systems used in a practical workshop. *Fertil Steril* 1994, 62, 1277-1282.
25. Iguer-ouada M, Verstegen J. Evaluation of the Hamilton - Thorne computer-based automated system for dog semen analysis. *Theriogenology* 2001, 55, 733 - 749.
26. Jequier AM, Ukombe EB. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol* 1983, 55, 434-436.
27. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000, 18, 143-72.
28. Kuster CE, Althouse GC. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in androhep<sup>®</sup> and X-cell<sup>™</sup> extenders. *Theriogenology* 1999, 52, 365 - 376.
29. Larochelle R, Bielanski A, Muller P, Magar R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol* 2000, 38, 4629-4632.
30. Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruif A,

- Van Soom A. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview. *Theriogenology* 2008, 70, 1337-1345.
31. Martin-Rillo S, Martinez E, Garcia Artiga C, De Alba C. Boar semen evaluation in practice. *Reprod Dom Anim* 1996, 31, 519-526.
32. McIntosh KA, Harding JC, Parker S, Ellis JA, Appleyard GD. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *Vet Diagn Invest* 2006, 18, 380 - 384.
33. Prieto C, Suarez R, Sanchez R, Solana A, Simarro L, Martin-Rillo S. Semen changes in boars after experimental infection with PEARS virus. In: *Proceedings of the 8th International Pig Veterinary Society Congress*, 1984. 98.
34. Purvis K, Tollefsrud A, Rui H. Correlates of human sperm motility assessed by laser Doppler spectroscopy. *Int J Androl* 1989, 12, 10-16.
35. Pusch HH, Leitinger S, Winter R, Urdl W. Evaluation of sperm motility by laser-Doppler-Spectroscopy in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1986, 1, 233-235.
36. Shipley C. Breeding soundness examination of the boar. *Swine Health Prod* 1999, 7, 117-120.
37. Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey J. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 1999, 52, 447-459.

38. Thacker BJ, Joo HS, Winkelman NL, Leman AD, Barnes DM. Clinical, virologic, and histopathologic observations of induced porcine parvovirus infection in boars. 1987, 48, 763-767.
39. Wilson-Leedy JG, Ingermann RL. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 2007, 67, 661-672.



# A study on the characterization of boar semen and the infectious aspects of pathogenic viruses

YongSang Park

(Supervised by professor Jae-Hoon Kim)

College of Veterinary Medicine, Graduate School,  
Cheju National University, Korea

## Abstract

Sperm examination is an important tool in estimating the fertilizing capacity of an ejaculate. The number of spermatozoa in a semen dose, morphology and motility are important for the fertilization process. By evaluation of semen, artificial insemination (AI) using high quality of semen can increase fertilization percentage. Boar semen is subject to contamination by various pathogens that can result in fertility disorders in sows. Among these pathogens, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine parvovirus (PPV), porcine circovirus-2 (PCV-2) are of particular importance and accurate monitoring prior to and during the presence of boars in AI stations is essential. Because of the high risk of dissemination of disease via AI, the absolute goal is to provide pathogen-free semen and this is feasible with the adequate measures. The disease affects boars semen causes a significant reduction quality. In this study we investigated the

characterization boar semen in Jeju, interaction of pathogenic virus infection with characterization of boar semen. Forty-two boar semen from 13 farms were investigated. The semen were stored during 5 days at 17°C and the sperm qualities in the stored semen were analysed. Visual-motility assessment is a tool (Computer-Assisted Semen Analysis) used to determine the quality of boar semen. Percentage of morphologically normal spermatozoa were assessed. PRRS, PPV and PCV-2 were detected in boar semen using PCR. The motion characteristics in boar semen was showed 68.4±9.1% for motility, 48.6±7.1  $\mu\text{m/s}$  for VAP, 45.3±7.0  $\mu\text{m/s}$  for VSL, 79.1±8.7  $\mu\text{m/s}$  for VCL, 1.3±0.2  $\mu\text{m/s}$  for ALH, 8.3±0.4 Hz for BCF, 93.6±3.5% for STR, 57.9±6.4 % for LIN. The percentage of sperm with abnormal head, midpiece and tail were 0.3±0.7%, 14.4±12.5%, 4.9±6.6%, respectively. Based on the PCR method, PPV was detected in 20 samples (48%). However, PCV-2 and PRRSV were not detected in any cases. Marked differences in motility and morphology between PPV negative and PPV positive semen were not observed. Sperm cell production was not affected by PPV infection. However, slight increases in detached head, coiled tail after infection were observed ( $P < 0.05$ ). The motility of semen in Jeju is similar to case comparing with other regions in Korea. Although PPV in semen was not affected in semen quality, there is the high risk of virus excretion in the semen of Jeju boars. Therefore continuous screening tests for some particular pathogens in boar semen would be warranted.

---

Key words: boar semen, CASA, PCV-2, PPV, PRRS



## 감사의 글

지난해 대학원에 진학하여 시간이 흐르는 것조차 알지 못한 채 벌써 두해 지나 졸업을 앞두고 겨울이 왔지만 많은 분들의 도움과 사랑으로 올겨울은 유독 저에게 있어 따뜻했던 겨울이었던 것 같습니다.

이 짧은글로 그간 제게 주신 은혜를 표할 순 없지만 저의 감사의 마음이 조금이나마 전해졌으면 합니다.

부족한 저를 타국에서도 관심과 사랑을 언제나 웃으시면서 그동안 보살펴 주신 강태영교수님, 여기까지 당겨주고 밀어주시며 아버지처럼 때론 형처럼 관심과 열정을 다해주신 김재훈교수님의 기대에 미치지 못하여 죄송하고 감사합니다.

실험에 많은 관심과 조언을 아끼지 않았던 윤영민교수님, 함께 진료를 보며 든든한 힘을 실려주신 김정훈선생님 감사드립니다.

논문 시작부터 완성하기까지 본인의 것 이상으로 신경쓰고 도와주신 상철선배, 정지열, 김미령, 은희누나 최종호, 이진영, 제욱선배 부족한 제게 쏟아 주신 분에 넘치는 사랑에 깊이 감사드립니다.

끝으로 저를 늘 걱정하고 사랑해 주시는 부모님 평소 쉽게 전하지 못했던 감사의 마음을 보냅니다.

2008년 12월

박 용 상 올림