韓國受精卵移植學會誌(1993) 第 8 券 第 2 號
Korean J. Emb. Trans. (1993) Vol.8, No.2 pp.151~157

반복핵이식에 의한 복제동물 생산에 관한 연구
Ⅰ. 토끼 수핵난자의 전기자극에 의한 활성화

이효종 · 최민철 · 최상용 · 박충생* · 윤창현* · 강대진*
경상대학교 수의과대학

Study on Production of Cloned Animals by Recycling Nuclear Transplantation
I. Activation of Nuclear Recipient Oocytes by Electrostimulation in Rabbits

H. J. Lee, M. C. Choi, S. Y. Choe, C. S. Park*, C. H. Yun* and D. J. Kang*
Departments of Veterinary Medicine and, Gyeongsang National University

SUMMARY

The present study was undertaken to determine the optimal condition for parthenogenetic activation of rabbit oocytes by electric stimulation *in vitro* in an attempt to develop nuclear transplantation techniques for cloning mammalian embryos and animals. Freshly ovulated oocytes were collected from superovulated rabbits from 13 to 26 hrs. after hCG injection. The cumulus-free oocytes were activated parthenogetically by repeated stimuli of square direct electric pulses in 0.3M mannitol solution. After applying electric stimulations of different voltages, pulse durations and pulse times, all of the oocytes were cultured in TCM-199 with 10% FCS for 96 hours in a 5% CO_2 incubator, and their developmental potential *in vitro* was examined. The higher activation rate(68.9%) was achieved at the voltage of 2.0kv/cm, the pulse duration of 60 μsec and three pulse times and the activation rate of 100% was achieved at the pulse duration of 100 and 200 μsec, the voltage of 1.5kv/cm and three pulse times. Although the higher rates of activation of oocytes were achieved at 100 and 200 μsec, none of them developed to blastocyst *in vitro*. The oocytes collected 18~20 hours post hCG injection showed the highest rate of activation and development to blastocyst *in vitro* than the oocytes collected 13~15 or 25~26 hours post hCG injection.

Therefore, it can be suggested that the application of electric stimulation of 2.0kv/cm, 60 μsec and three pulse times to the oocytes collected at 18~20 hours post hCG injection would be more beneficial for the parthenogenetic activation of oocytes in rabbits.

서 론

유전적으로 동일한 동물을 생산하기 위한 하나의 수단으로써 수정란의 양분에 의한 일란성 쌍태 생산기법이 연구되어 왔으나, 이러한 기법으로서는 하나의 수정란로 부터 복제 생산할 수 있는 산자의

이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

* 경상대학교 농과대학(Department of Animal Science, Gyeongsang National University)

수는 2 내지 4 마리 밖에 되지 않는 한계점이 있다.

반면, 핵이식기술은 전능한(totipotent) 시기에 있는 수정란의 핵을 다수의 할구세포로 부터 얻어서 이를 탈핵된 다른 접합체 또는 초기 수정란에 이식시키는 기술로서 하나의 수정란로 부터 20개의 동일한 성과 유전형질을 가진 복제 수정란를 작출할 수가 있으며, 나아가서 이들 핵이식 수정란를 체내 또는 체외에서 배양하여 상실배 혹은 배반포로 발달시킨 다음 이를 핵의 공급원으로 재이용하는 반복핵이식(recycling nuclear transplantation) 기법을 응용하면 그 수를 기하급수적으로 증가시킬 수 있다.

이러한 반복핵이식기법을 개발하기 위하여서는 우선 수핵난자의 다량 확보가 필요하며 아울러 이들의 활성화 및 핵-세포질융합 기술의 확립이 매우 중요하다. 핵-세포질융합기술은 미세외과적 방법(Illmensee와 Hoppe,1981), Sendai virus 매개에 의한 방법(McGrath와 Solter, 1983) 등이 개발되어 사용되어 왔으나 그 효율이 낮고 과정이 복잡할 뿐만 아니라 수핵난자의 활성화를 일으키는데는 효과적이 못되었다. 수핵난자로서 수정후의 접합체 또는 2-세포기의 수정란을 이용할 경우에는 수핵난자의 활성화가 따로 필요하지 않지만 미수정란을 이용할 경우에는 활성화 자극이 필요하다. 경제적으로 유익한 가축의 핵이식에 있어서는 체내·외에서 성숙된 난자를 탈핵시켜 수핵난자로 많이 이용하고 있다.

난자의 활성화를 유도하기 위하여서는 ethanol (이 등, 1992; 한 등, 1987; Barton 등, 1985; Cuthbertson, 1983; Cuthbertson 등, 1981), avertin 같은 마취제 처리법(Siracusa 등, 1978; Seeman 등, 1974; Kaufman, 1975), 삼투압조절법(Rickords와 White, 1992), hyaluronidase 등을 이용한 효소처리법(이 등, 1992; Kaufman, 1973; Graham과 Deussen, 1974), 열처리법(Balkier와 Tarkowski, 1976), 단백질합성억제제 처리법(Ridgway 등, 1977), ionophore 처리법(Ware 등, 1989; Aoyagi 등, 1992) 등이 응용 연구되어 왔다. 소, 면양, 돼지, 토끼 등 가축에서는 이러한 방법들이 유용하지 못하였으므로 Zimmermann 등(1982)이 개발한 전기적 방법이 효과적으로 널리 이용되어 오고 있다. 그러나 이 방법은 각종 동물의 핵이식에 적용하는데 있어서는 난자의 성숙도, 전압, 통전시간, 통전횟수, 융합용액의 종류 등에 따라 다양한 난자의 활성화율 및 핵융합율을 나타내고 있다.

그러므로 본 실험에서는 반복핵이식기법을 확립하기 위하여 토끼를 모델 동물로 사용하여 난자의 활성화 및 핵융합에 가장 적합한 전압, 통전시간, 통전횟수 및 난자의 성숙도 등을 알아보고자 일련의 실험을 수행하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 사양관리

본 실험에 사용된 동물은 New-Zealand White 계통의 성숙된 토끼로서, 토끼용 펠렛사료와 물을 자유로이 급식토록하여 사육하였다.

2. 과배란처리와 수핵 난자의 채란

성숙된 암토끼를 PMSG(SIGMA, U. S. A.) 100 IU를 근육주사하고 72시간후 hCG(SIGMA, U. S. A.) 100 IU를 근육주사하여 과배란을 유기하였다. hCG 투여 14~26시간 후 암토끼를 sepamin과 ketamine으로 전신마취시키고 외과적 방법으로 하복부를 개복 수술하여 난관을 노출시켰다. 난관누두부에 외경 1mm의 IV catheter를 삽입하고 난관-자궁 접합부에서 주사기를 삽입하여 FCS가 10% 함유된 D-PBS로서 역관류함으로써 채란하였다. 채란된 난자는 실체현미경 아래에서 회수하고 이들을 bovine testes hyaluronidase (SIGMA, U.S.A.) 1mg/ml 이 함유된 배양액에 처리한 다음 좁은 pipette 으로 흡입을 반복함으로써 난구세포를 제거하였다.

3. 난자의 활성화 자극

난구세포가 제거된 난자를 100 μM의 $CaCl_2$과 $MgCl_2$ 이 함유된 0.3M mannitol 용액으로 충만된 fusion chamber에 옮기고 두 전극 사이에 놓은 다음 배세포융합기(EYELA Co., Japan)로서 직류전압은 field strength가 1.0~2.25kv/cm의 범위에서, 통전시간은 30~200 μsec의 범위에서, 통전횟수는 1~4회의 범위에서 전기자극을 가하였다. 난자

의 성숙도에 따른 활성화율을 조사하기 위하여는 hCG 주사후 13~15, 18~20 및 25~26 시간에 채란된 난자들을 구분하여 전압은 1.5kv/cm로, 통전시간은 60㎲sec로 그리고 통전횟수는 3회로 고정하여 전기자극을 주었다.

4. 난자의 체외배양

전기자극이 주어진 다음 난자들을 FCS가 10% 함유된 TCM-199 배양액에 넣고 37℃로 조정된 5% 의 CO_2 배양기에서 96 시간 배양하여 이들의 발달을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 전압에 따른 난자의 활성화 및 체외발달

hCG 주사 후 17~20 시간에 채란된 난자를 fusion chamber내에 넣고 전압을 1.0, 1.5, 2.0 및 2.25kv/cm로 조정하면서 자극하였다. Pulse duration은 60㎲sec로 그리고 pulse time 은 1sec. 간격으로 3회로 고정하여 실시하였던 바 그 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다.

전압을 1.0, 1.5, 2.0 및 2.25kv/cm로 주었을 경우 난자의 활성화율은 각각 62.8, 68.0, 68.9 및 57.1%로 나타났다. 이들 활성화된 난자를 체외에서 배양하였던 바 상실배로의 발달율은 각각 51.9, 42.0, 64.5 및 37.5%로서 전압을 2.25kv/cm로 높혔을 경우에는 상실배로의 발달율이 다른 처리구에 비하여 낮았으며 배반포까지 발달한 난자는 없었다. Onodera와 Tsunoda(1989)는 토끼난자의 활성화는 ethanol 처리로서는 부적합하다고 하였으며, 1.5 kv/cm 에서 200㎲sec로 1회 통전하였을 때 가장 높은 활성화율(77%)과 배반포로의 발달율(25%)을 보였는데 본 실험의 결과와 상응하였다. Stice와 Robl(1988)은 hCG 주사후 20~24 시간에 채란된 난자에서 1.6 kv/cm, 60㎲sec 로 1회 통전하여 52%의 활성화율과 16%의 배반포로의 발달율을 얻었다고 한다. 그러므로 토끼 난자의 활성화를 위하여서는 통전시간을 60㎲sec에서 3회를 줄 경우 전압은 1.0~2.0kv/cm 에서 가장 높은 활성화와 배반포로의 발달을 기대할 수 있을 것으로 본다.

2. 통전시간에 따른 난자의 활성화 및 체외발달

hCG 주사 후 17~20 시간에 채란된 난자를 fusion chamber내에 넣고 통전시간을 30, 60, 100

Table 1. Effect of electric voltage on acitivation and *in vitro* development of rabbit oocytes

Electric voltage (kv/cm)	Pulse duration (μ sec)	Pulse times	No. of eggs used	No. of eggs activated (%)	No. of eggs developed to (%)			
					2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
1.00	60	3	43	27(62.8)	27(100)	26(96.3)	14(51.9)	5(18.5)
1.50	60	3	50	34(68.0)	34(100)	29(58.0)	21(42.0)	5(10.0)
2.00	60	3	45	31(68.9)	31(100)	27(87.1)	20(64.5)	8(17.8)
2.25	60	3	28	16(57.1)	16(100)	13(81.3)	6(37.5)	9(0.0)

Table 2. Effect of pulse duration on acitivation and *in vitro* development of rabbit oocytes

Pulse duration (kv/cm)	Voltage (Kv/cm)	Pulse times	No. of eggs used	No. of eggs activated (%)	No. of eggs developed to (%)			
					2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
30	1.5	3	18	13(72.2)	13(100)	10(79.9)	2(15.4)	1(7.7)
60	1.5	3	59	38(64.4)	38(100)	32(84.2)	23(60.5)	5(13.2)
100	1.5	3	9	9(100)	9(100)	8(88.9)	3(33.3)	0(0.0)
200	1.5	3	11	11(100)	11(100)	11(100)	4(36.4)	9(0.0)

및 200 μsec로 조정하면서 자극하였다. 전압과 통전 횟수는 1.5kv /cm에서 1초 간격으로 3회 실시하였던 바 그 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 통전시간을 30, 60, 100 및 200 μsec로 하였을 경우 활성화율은 각각 72.2, 64.4, 100 및 100%로서 통전시간을 늘릴수록 활성화율도 높아졌다. 그러나 이들을 체외 배양하였던 바 상실배로의 발달율은 60 μsec에서 60.5%로 가장 높았으며 배반포로의 발달율은 13.2%를 보였다. 반면에 통전시간을 100 및 200 μsec로 하였을 경우에는 배반포로의 발달을 전혀 보이지 않았다. 토끼의 핵이식후 핵융합에 있어서도 Ozil과 Modlinski(1986)는 35 μsec를, Stice와 Robl(1988)과 Collas와 Robl(1990)은 60 μsec에서 가장 높은 핵융합율을 얻었다고 한다. 전압을 높게 하거나 통전시간을 길게 하면 형질막의 불안정(destabilization)을 일으켜서 융합율이 낮아지고, 세포질의 용해가 일어나서 생존력이 떨어진다고 한다(Robl 등, 1992).

3. 통전횟수에 따른 난자의 활성화 및 체외발달

hCG 주사 후 17~20 시간에 채란된 난자를 fusion chamber 내에 넣고 통전횟수를 1, 2, 3 및 4회로 조정하면서 자극하였다. 전압과 통전시간은 1.5 kv /cm에서 60 μsec로 하여 실시하였던 바 그 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. 통전횟수를 1, 2, 3 및 4회로 하였을 때 난자의 활성화율은 각각 56.3, 80.0, 59.1 및 85.7% 를 보였고, 체외배양에서 상실배로의 발달율은 각각 55.6, 50.0, 59.0 및 8.3% 로서 통전횟수를 3회로 하였을 경우에 가장 높은 발달율을 보였다. 통전횟수를 4회로 하였을 경우에는 활성화율은 높으나 체외발달 능력은 저하되는 결과를 가져왔다. Clement-Sengewald(1988), Ozil과 Modlinski(1986), Stice와 Robl(1988) 등은 1회 통전으로써 각각 56, 90 및 84%의 핵융합율을 얻었으나 Collas와 Robl(1990)은 1회보다 3회에서 보다 높은 활성화율(80%) 및 핵융합율(94%)을 보였다고 한다. 난자에 전기자극을 주면 형질막에 pore를 형성하여 융합을 일으키게 할 뿐만 아니라 Ca^{2+} 이온의 유입을 일으켜서 난자의 활성화를 유도한다는 것이 지배적 견해이다. 이러한 현상은 정자가 유입되는 수정시에도 관찰된다고 한다. 통전을 반복하면 난자내 Ca^{2+} 이온의 반복적 상승이 관찰된다고 한다(Robl 등, 1992). 반복적 통전은 난자의 활성을 촉진하는 것으로 보이나 4회 이상 통전할 경우에는 난자의 불안정 및 와해를 가져와서 배반포로의 발달이 저해되는 것으로 보인다.

4. 성숙도에 따른 난자의 활성화 및 체외발달

hCG 주사 후 13~15, 18~20 및 25~26 시간에 채란된 난자로 구분하여 fusion chamber 내에 넣고 전압은 1.5kv /cm로, 통전시간은 60 μsec 로 그리고 통전횟수는 3회로 고정하여 자극을 준 다음 이들의 활성화율과 체외발달 능력을 비교조사하였던 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다.

hCG 주사 후 13~15, 18~20 및 25~26시간에 채란된 난자의 활성화율은 각각 12.8, 62.7 및 52.9%로서 18~20 시간에 채란된 난자에서 가장 높은 활성화율을 보였다. 또한 이들을 체외배양하여 보았던 바 상실배로의 발달율은 각각 0, 62.5 및 44.4%로서 역시 18~20시간에 채란된 난자가 가장 높은

Table 3. Effect of pulse on acitivation and *in vitro* development of rabbit oocytes

Pulse times	Voltage (Kv /cm)	Pulse duration (μ sec)	No. of eggs used	No. of eggs activated (%)	No. of eggs developed to (%)			
					2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
1	1.5	60	16	9(53.6)	9(100)	8(88.9)	5(55.6)	2(22.2)
2	1.5	60	15	12(80.0)	12(100)	10(83.3)	6(50.0)	1(8.3)
3	1.5	60	66	39(59.1)	39(100)	32(82.1)	23(59.0)	5(12.8)
4	1.5	60	14	12(85.7)	12(100)	5(41.7)	1(8.3)	0(0.0)

Table 4. Effect of age of oocyte on acitivation and *in vitro* development of rabbit oocytes

Oocyte age (hrs post hCG)	Electric voltage (kv/cm)	Pulse duration (μ sec)	Pulse times	No. of eggs used	No. of eggs activated (%)	No. of eggs developed to (%)			
						2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst
13~15	1.5	60	3	39	5(12.8)	3(60)	3(60)	0(0.0)	0(0.0)
18~15	1.5	3	51	32(62.7)	32(100)	28(87.5)	20(62.5)	5(15.6)	
25~26	1.5	60	3	17	9(52.9)	9(100)	6(66.7)	4(44.4)	1(11.1)

발달율을 보였다. 13~15시간에 채란된 난자는 활성율도 낮고, 체외배양시 상실배 및 배반포로 전혀 발달되지 못하였으므로 배란직후의 난자는 활성화 및 핵융합에 적합하지 않은 것으로 사려된다. Stice와 Robl(1988)은 hCG 주사후 16~20 시간에 채란된 난자는 활성화율이 4%이고, 상실배 또는 배반포로의 발달이 전혀 일어나지 않은 반면 20~24시간에 채란된 난자는 활성화율이 52%이고, 상실배 또는 배반포로의 발달율이 16%이었다고 한다. 생쥐에서는 hCG 주사 16시간 이전에 채란된 난자는 인공적으로 활성유도가 어렵다고 하며(Kaufmen, 1983), 소에 있어서도 20시간 이전에는 활성이 잘 유도되지 않는다고 한다(Ware 등, 1989). Stice와 Robl(1988)은 토끼에서 hCG 주사후 20시간이 경과되어야만 전기적 활성이 유도된다고 하였는데 본 실험에서도 hCG 주사후 18~20 시간에 회수된 난자에서 가장 높은 활성화율을 보였다.

결 론

반복핵이식기법에 의한 복제배 및 동물을 효율적으로 생산하기 위하여 중요한 요건이 되는 수핵난자의 활성화 및 핵융합기술을 수립하기 위하여 New Zealand White 계통의 성숙된 토끼를 PMSG 100 IU를 근육주사한 다음 72시간후 hCG 100 IU를 이정맥주사하여 과배란을 유기시킨 다음 17~25시간에 전신마취시켜 개복수술을 실시하고 난관으로부터 배란된 난자를 채란하였다. 이들로부터 난구세포를 제거하고 0.3M mannitol용액이 담긴 fusion chamber에 넣어 배세포융합기를 이용하여 활성화에 가장 적합한 전압, 통전시간 및 통전횟수 등을 조사하였다. 아울러 이들 활성화된 난자들을 FCS가 10% 함유된 TCM~199 배양액에 넣고 5% CO_2 및 37℃로 조절된 배양기에서 72시간 배양하여 이들의 체외발달 능력을 조사하였다. 전압은 2.0 kv/cm로 하였을 때가 가장 높은 활성화율(68.9%)을 보였고, 상실배 또는 배반포로의 발달율도 64.5%로 가장 높았다. 통전시간은 100 및 200 μsec에서 가장 높은 활성화율(100%)을 보였으나 상실배 또는 배반포로의 발달율은 60 μsec에서 가장 높은 발달율(60.5%)을 보였다. 통전횟수는 4회에서 가장높은 활성화율(85.7%)을 보였으나 상실배 또는 배반포로의 발달율은 3회에서 가장 높은 발달율(59.0%)을 보였다. 그러므로 토끼난자의 활성화 및 핵융합을 위하여서는 전압은 2.0kv/cm, 통전시간은 60 μsec 그리고 통전횟수는 3회로 하는 것이 가장 적합한 것으로 사료된다.

참고문헌

Aoyagi Y, Kameyama K and Takeda T. 1992. Artiificial activation of bovine oocytes matured *in vitro* by electric shock or exposure to ionophore A23187. Theriogenology 37:188.

Balkier H and Tarkowiski AK. 1976. Diploid parthenogenetic mouse embryo produced by heat-shock and cytochalasin B. J. Embryol. exp. Morph. 35:25~39. 1976.

Barton SC, Adams CA and Norris ML. 1985. Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and trophectoderm tissues in recons-tituted blastocyst in the mouse. J. Embryol. exp. Morph. 90:267~285.

Clement-Sengewald A. 1988. Elektrofusion and

enukleation von blastomerenbei saugetier embryonen. Dissertation zur Erlangung der Tiermedizinischen Doktorwurde, Tierarztlichen Fakulat der Ludwig-Maximilians-Universitat, Munchen, FRG. ciof early mammalian embryos.

Collas P and Robl JM. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol. Reprod. 43:877~884.

Cuthbertson KSR, Whittingham DG and Cobbold PH. 1981. Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. Nature 294:754~757.

Cuthbertson KSR. 1981. Parthenogenetic activation of mouse oocytes *in vitro* with ethanol and benzylalcohol. J. exp. Zool. 226:311~314.

Fissore RA and Robl JM. 1992. Intracellular Ca^{2+}response of rabbit oocytes to electrical stimulation. Mol. Reprod. Dev. 32:9~16.

Graham CF and Deussen ZA. 1974. *In vitro* activation of mouse eggs. J. Embryol. exp. Morph. 31:497~512.

Illmensee K and Hoppe PC. 1981. Nuclear transplantation in Musculus:developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. Cell 23:9~18.

Kaufman MH. 1973. Parthenogenesis in the mouse. Nature(Lond.) 242:457~476.

Kaufman MH and Surani MAH. 1974. The osmolarity of mouse parthenogenesis. J. Emrbyol. exp. Morph. 31:513~526.

Kaufman MH. 1975. Parthenogenetic activation of mouse oocytes following avertin anesthesia. J. Embryol. exp. Morph. 233:941~946.

Kaufman MH. 1983. "Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies." Cambridge:Cambridge University Press.

Kono T, Iwasaki S and Nakahara T. 1989. Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology 32:569~576.

McGrath J and Solter D. 1983. Nuclear transplantation in mouse embryos by microsugery and cell fusion. Science 220:1300~1302.

Onodera M and Tsunoda Y. 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. Gamete Res. 22:277~283.

Rickords LF and White KL. 1992. Electrofusion-induced intracellular Ca^{2+} flux and its effect on murine oocyte activation. Mol. Reprod. Dev. 31:152~159.

Ridgway EB, Gilkey JC and Juffe LF. 1977. Free calcium increases explosivelyin activation medulca eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74:623~627.

Robl JM, Collas P and Fissore R. 1992. Electrically induced fusion and activation in nuclear transplant embryos. In "Guide to electroporation and electrofusion" (Chang D. C., Chassy B. M. and Saunders J. A. eds.) Academic Press, Inc., San Diego. pp 535~551.

Seeman P, Chen SS and Chan-Wong M. 1974. Calcium reversal of nerve blockage by alcohols, anesthetics, tranquilizers and barbiturates. Can. J. Physiol. Pharmacol. 52:526~534.

Siracusa G, Whittingham DF and Codonesu M. 1978. Local anesthetics and phenothazine tranquilizers induce parthenogenetics activation of the mouse oocyte. Develop. Biol. 65:531~535.

Siracusa G, Whittingham DF and Codonesu M. 1978. Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. J. Embryol. exp. Morph. 43:157~166.

Stice SL and Robl JM. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit

embryos. Biol. Reprod. 39:657~664.

Ware CB, Barnes FL and Maiki-Laurila M. 1989. Age dependence of bovine oocyte activation. Gamete Research 22:265~275.

Zimmermann U and Vienker J. 1982. Electric field-induced cell-to cell fusion. J. Membr. Biol. 67:165~182.

이효종, 하대식, 강태영, 최민철. 1992. 생쥐난자의 단위발생에 관한 연구. I. Ethanol 및 hyaluronidase 처리에 의한 단위발생유기. 대한수의학회지, 32(4):663~669.

한용만, 백청순, 이경아, 등. 1987. 생쥐에 있어서 Ethanol 處理에 의한 單爲發生의 誘起. 한국축산학회지, 29(9):383~389.