

난소 수송 온도에 따른 소 체외 수정란의 발육 및 동결-융해 후의 생존성

조상래 · 최선호 · 김현종 · 최창용 · 진현주 · 손동수[†]
농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장

In Vitro Development and Survival Following Cryopreservation of Bovine Embryos according to Ovary Transport Temperature

S. R. Cho, S. H. Choi, H. J. Kim, C. Y. Choe, H. J. Jin and D. S. Son[†]

Animal Genetic Resources Station, NLRI, RDA

SUMMARY

The present study was carried out to investigate *in vitro* development and post-thawed survivability of bovine embryos according to different ovary transport temperatures. Bovine ovaries were collected at a local slaughterhouse and were transported at 4 different temperature categories to laboratory: 7~10°C (T1), 11~17°C (T2), 18~25°C (T3) and above 26°C (control group). The cumulus-oocyte-complexes aspirated from ovaries were *in vitro* matured, fertilized and cultured. The rates of maturation (to metaphase II), cleavage and development to blastocysts were compared among treatment groups. Furthermore, frozen-thawed blastocysts were *in vitro* cultured to compare the survivability among groups. The maturation rates in the T1, T2 and T3 groups (60.0~68.2%) were significantly lower than that in the control group (81.8%, $p<0.05$). The cleavage rates in the T1 and T2 groups (52.6 and 54.5%) were significantly lower than that in the control group (83.6%, $p<0.05$). However, there was no difference in the development rate to blastocysts among all groups (27.9~33.0%, $p>0.05$). The survivability of frozen-thawed embryos was significantly lower in the T1 group (46.2%) than those in the T2, T3 and control groups (68.8~7.13%, $p<0.05$).

In conclusion, the results suggest that ovary transport temperature at 26°C may be optimal for the better *in vitro* development and the survival of frozen-thawed embryos produced *in vitro*. Furthermore, exposure of ovary to temperature below 10°C during transport may significantly decrease both *in vitro* development and survivability of frozen-thawed blastocysts.

(Key words : bovine, embryo, ovary, transport, temperature, survivability)

서론

도축된 소의 난소로부터 회수된 난자는 수정란

이식 산업과 생명 공학 분야의 연구에 아주 중요한 역할을 하며 광범위하게 이용되고 있다. 난자의 성숙은 호르몬의 영향과 생리학적인 기전에 의해

* 본 연구는 2005~2006년도 농촌진흥청 축산연구소 박사후 연구과정 지원 사업에 의해 이루어진 것임.

[†] Correspondence : E-mail : sonds@rda.go.kr

암컷의 번식기관 내에서 이루어진다. 호르몬 기전 조절은 정상적으로 건강한 환경 하에서 이루어지기 때문에 발달 중인 난포의 온도는 가축의 신체 중심부 온도와 밀접한 관련이 있을 것으로 추측된다 (Hewitt, 1921). 난자의 체외 성숙은 체외 수정과 수정란의 발달 그리고 산자의 생산까지 도달했을 때만이 성공적이라고 할 수 있다. 주로 소 난자의 체외 성숙은 핵 성숙율과 수정 후의 정상적인 분할율로서 평가를 하지만, 일부 말(equine)을 연구하는 연구자는 체외 성숙의 성공을 임신율로서 평가한다 (Carnevale 등, 2003; Lihe 등, 2001; Scott 등, 2001).

난자의 체외 성숙율은 제2감수분열 주기까지 도달한 난자의 수를 기준으로 삼는다. 그러나, 배양 조건의 개선에도 불구하고 난자의 핵성숙이 제2감수분열 주기까지 도달하더라도 그것이 배반포기까지 발달하는 능력을 지녔다고 볼 수 없다. 이것은 세포질의 성숙도 동시에 일어나야 하며, 또한 착상 전·후 단계까지의 발달에 영향을 미치는 체외성숙을 위한 배양 조건과 성숙전의 환경적인 요인이 대단히 중요하기 때문인 것으로 알려져 있다 (Krisher와 Bavister, 1998).

소 수정란의 체외 생산 과정에서 난자의 이용은 배양 체계와 다양화된 실험실 환경에 의해 영향을 받는다. 난자는 자주 광범위하고 다양한 온도에 노출되게 되는데, 이것은 궁극적으로 난자의 발달에 영향을 미치게 된다. 사람(Sathananthan 등, 1988; Van Blerkom과 Davis, 1994; Vincent 등, 1992), 양 (Moor와 Crosby, 1985) 및 소(Aman과 Parks, 1994; Glass와 Voelkel, 1990; Heyman 등, 1986)의 난자를 이용한 연구에서도 생리학적인 온도 이하에 노출되어 분리된 난자는 감수분열 단계에서 많은 비정상적인 변화를 일으켜 난자의 생존에 불리한 영향을 미칠 수 있다고 보고되었다. 또한, 수정란의 동결 보존 실험에서도 세포들은 동결 보호제의 첨가, 평형 시간 및 식빙 단계에서 저온에 노출되는 과정을 거치면서 상해를 입는다(Mazur, 1990; Pickering 등, 1990).

따라서 본 실험은 난소 수송 온도를 7~10℃, 11~17℃, 18~25℃ 그리고 control 그룹으로서 26℃ 이상 온도를 유지하여 실험실로 운반하여 난소로부터 난포란(COCs)을 회수하여 성숙 배양하였

을 때 체외 성숙율, 수정율, 발달율 및 동결-융해 후의 생존율을 조사하여 난소 수송 온도가 체외 수정란 발달 및 동결-융해 후 생존율에 미치는 영향을 조사하고자 실시되었다.

재료 및 방법

1. 체외 성숙 및 핵형 분석

한우 도축 암소로부터 추출된 난소를 회수하여 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다. 본 실험의 조건에 맞춘 난소 수송 온도는 0.8% 생리식염수의 온도를 7~10℃(T1 그룹), 11~17℃(T2 그룹), 18~25℃(T3 그룹) 및 26℃ 이상(control 그룹)으로서의 조건으로 맞추어 보온병에 담아 실험실로 2시간 이내로 운반하였다. 직경이 2~6 mm의 난포로부터 난포란을 난포액과 함께 19 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡입방법으로 IVF 100(IFP, Japan)을 이용하여 채취하였다. 체외 성숙은 TCM199(Sigma, USA)을 기본 배양액으로 5% FBS(Gibco, USA), LH(10 μg/ml) 및 FSH(35 μg/ml)를 첨가하여 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 22시간 동안 체외성숙을 유도하여 체외수정을 실시하였다. 핵형 분석을 위해서 체외성숙된 난포란을 0.5% Hyaluronidase 용액을 이용하여 난구세포를 제거하고, acetic acid(1) : ethanol(3) 용액에 30초간 고정한 후 3% basic Fuchsin으로 염색하여 200배의 광학 현미경하에서 핵형을 관찰하였다.

2. 체외수정

체외수정에 사용된 정액은 동결 정액(KPN, 농협)을 이용하였으며, 정자분리는 BO medium을 이용하여 1,800 rpm에서 5분 동안 2회 원심분리 후 체외수정에 사용하였다. 사용된 정액의 최종 농도는 2×10⁶/ml 였다. 체외성숙된 난포란의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 0.1% PVA(polyvinyl alcohol)가 첨가된 D-PBS(Sigma) 배양액에서 약 10초간 vortexing 후 수정을 실시하기 위해서 수정 배양액인 50 μl IVF 100(IFP, Japan) 미소적에 20개의 체외성숙된 난포란과 정자를 공동 배양하여 체외수정을 유도하였다. 체외수정은 6시간 동안 CO₂ 인큐베이터 내에서 실시하였다.

3. 체외배양 및 세포수 조사

체외배양에 사용된 모든 수정란은 체외수정 후 무혈청 배양배지인 IVMD(IFP, Japan) 배양액에서 실시하였다. 체외수정 후 48시간에 분할율을 확인하였으며, 72시간(3일)과 120시간(5일)에 신선한 배양액으로 배양액 교환을 실시하였다. 배반포 생산율은 수정 후 168(7일) 및 192시간(8일)에 확인하였다. 배반포기배의 세포수 확인은 수정 후 168 및 192시간에 생산된 배반포 수정란을 Hoechst 33342 용액으로 염색하여 10분간 배양 후 광학현미경하에서 실시하였다.

4. 수정란의 동결 보존

수정란 동결을 위한 동결 보호제로서는 1.8M ethylene glycol(IFP, Japan)을 사용하였다. 수정란의 동결은 autocomputer programmable 동결기(CL 863, U.S.A)를 사용하여 실시하였다. 수정란은 0.25 ml 스트로우에 장착되었으며, 스트로우 양끝에는 D-PBS 층과 공기층을 형성하고, 중간 부위에 동결 보호제와 수정란을 위치시켰다. 스트로우를 동결기의 chamber에 넣고 3분간 정지(-7℃, 10분)한 후 seeding을 실시하고, -35℃까지 -0.3℃/분 속도로 동결시킨 후 액체 질소에 침지하였다. 수정란의 생존성을 확인하기 위하여 동결 보존 후 스트로우를 보관고로부터 꺼내어 공기 중에 약 10초간 노출시킨 후 37℃로 가온된 온수에서 약 20초간 용해 후 체외 배양액으로 옮겨 배양 48시간 및 72시간 후 확장 및 부화 여부로 생존율을 판단하였다.

5. 통계 처리

실험 결과의 통계 분석은 SAS package(version 6,12)를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) procedure를 사용하여 각 요인의 Least square means를 구하여 요인간의 유의성을 검정하였다. $p < 0.05$ 일 때 각 군간의 유의성을 인정하였다.

결과 및 고찰

1. 난소 수송온 도에 따른 한우 난포란의 체외 성숙율

Table 1은 난소의 수송 온도에 따른 체외 성숙

율을 조사한 결과를 나타낸 것이다. 체외 배양 22 시간 후 핵형 조사 결과를 살펴보면 정상적인 체외성숙이 이루어져 수정적기인 Metaphase II 까지 이른 비율은 control 그룹에서 81.8%로서 다른 처리구에 비해서 유의적($p < 0.05$)으로 높은 결과를 나타내었다. Pollard 등(1996) 등은 체외수정란 생산에 영향을 미치는 많은 요인들 중에서 난자가 노출되는 온도는 실험실에 따라 다르며, 이는 난자의 체외 발달에 다양한 변화를 가져올 수도 있다고 보고하였다. 난자의 성공적인 체외 성숙은 성숙율과 수정율에 의해서 판단을 하게 된다. 난소의 수송 온도는 난자의 생존율에 중요한 영향을 미치는 요소로 알려져 있다. 이러한 영향은 주로 난자 내의 membrane lipids의 변화가 13~20℃ 사이에서 일어나기 때문에 이보다 더 낮은 온도에 노출되는 것은 유해하다고 보고하였다(Preis 등, 2004).

그러나 GV와 GVBD 단계에 머물러 있는 난자의 비율이 처리군(T1, T2 및 T3)에서는 각각 25.0~31.7%였으나, control 그룹에서는 13.6% 였다. 이는 저온의 영향에 기인한 것으로 보인다. 난포란의 핵성숙 및 체외 성숙율은 다양한 배양 조건과 여러 환경적인 요인에 의해서 영향을 받는데, 온도 충격 특히, 체외 성숙 시 감수 분열의 모든 단계에서 비정상적인 핵형의 출현이 난자의 생존성을 좌우하는 요인이 되기 때문에 생리적 온도 이하의 온도에서 난소 수송은 난자의 체외 성숙에 많은 영향을 끼친다고 보고하였다(Pollard 등, 1996).

본 실험 결과에 있어서 GV, GVBD, MI까지의 단계는 각 처리군간 유의적인 차이를 보이지 않았으나, MII 단계까지 도달한 것은 26℃ 이상에서 수송된 그룹에서 다른 처리구에 비해서 유의적으로($p < 0.05$) 높은 결과를 보였다. 또한 난자의 체외 성숙 시 감수분열과 관련하여 저온의 영향으로서는 25℃ 이하에서 보다 4℃ 이하에서는 Microtubule의 해체 효과가 더 광범위하게 나타나며 이러한 현상은 소뿐만 아니라 다른 종에서도 관찰되는 현상이기도 하다(Aman와 Parks, 1994). 따라서 적정 난소 수송 온도 설정이 체외 성숙에 중요한 영향을 끼칠 수 있을 것으로 사료된다.

2. 난소 수송 조건에 따른 수정란의 배발달율

Table 2는 난소의 수송 온도에 따른 수정율과 배발달율을 조사한 결과이다. 각 처리군별로 수정란의 분할율은 T1(52.6%)과 T2 그룹(54.5%)이 control 그룹(83.6%)에 비해서 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 이러한 결과는 체외성숙 시 저온 충격으로 인한 손상이 원인이 될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 배반포 생산율에 있어서는 유의적인 차이가 없었으나, control 그룹이 33%로서 나머지 3처리군의 27.9, 28.9 및 27.2%보다 다소 높은 경향을 보였다. 배발달율에 있어서 수송 온도에 관계없이 성숙이 완료된 난자는 배반포까지 정상적으로 발달할 수 있는 것으로 생각된다. 본 실험에서 생산된 배반포의 세포수를 확인한 결과 총세포수는 처리군별로 각각 85 ± 3.2 (T1), 71 ± 6.6 (T2) 및 102 ± 7.4 개(T3)였으며, control 군은 117 ± 4.0 개로 유의적인 차이를 보이지 않았으나 저온으로 수송된 경우에

총세포수가 다소 낮은 경향을 나타내었다.

Pollard 등(1992)은 난소 수송 온도가 25℃ 및 35℃ 일때 수정율이 각각 77% 및 75%이며, 수정 후 192시간의 배반포 발달율은 각각 18% 및 11.2%라고 보고하였다. 이는 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보여준다. 난자가 저온에 노출될 경우에 수정 후 배반포 생산율이 감소되는 결과를 가져오는데 이러한 사실은 난자가 체외성숙 시 germinal vesicle 단계에서 온도 충격에 민감하기 때문인 것으로 생각된다(Pollard 등, 1992).

3. 난소 수송 온도에 따른 수정란의 동결 융해 후 생존성

Table 3은 각 수송온도에 따라 생산된 소 수정란을 동결 보존하여 융해하였을 때 수정란의 생존성을 확인한 결과이다. T1 그룹의 생존율은 46.2%

Table 1. Comparison of nuclear status after maturation in TCM199 of bovine oocytes derived from different ovary transport temperatures

Treatments*	No. of oocytes	No. of analysis of nuclear status (%)			
		GV	GVBD	M I	M II
T1	40	4 (10.0)	6 (15.0)	6 (15.0)	24 (60.0) ^a
T2	41	7 (17.1)	6 (14.6)	3 (7.3)	25 (61.0) ^a
T3	44	5 (11.4)	6 (13.6)	3 (6.8)	30 (68.2) ^a
Control	44	3 (6.8)	3 (6.8)	3 (6.8)	36 (81.8) ^b

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

* T1: 7~10℃, T2: 11~17℃, T3: 18~25℃, Control: above 26℃. Replicates 4.

Table 2. Development of bovine oocytes exposed to different ovary transfer temperatures

Treatments*	No. of oocytes	No. of cleavage	No. of blastocysts (%)**		
			at 168 hpi	at 192 hpi	Total
T1	116	61 (52.6) ^a	11 (18.0)	6 (9.8)	17 (27.9)
T2	121	66 (54.5) ^a	10 (15.1)	9 (13.6)	19 (28.9)
T3	128	81 (71.1) ^{ab}	10 (12.4)	12 (14.8)	22 (27.2)
Control	134	112 (83.6) ^b	14 (12.5)	23 (20.5)	37 (33.0)

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

* T1: 7~10℃, T2: 11~17℃, T3: 18~25℃, Control: above 26℃. Replicates 5.

** Percentage of the number of blastocysts/cleaved embryos

로 다른 3 처리 그룹의 68.8~73.1%에 비해서 유의적으로 낮은 생존율을 나타내었다($p<0.05$). 이 같은 결과는 총세포수(Table 2)도 다른 처리군에 비해서 T1 그룹이 낮은 결과를 나타냈는데, 이는 아마도 생존율에까지도 영향을 미치는 것으로 보인다. 총세포수 감소는 동결 용해 후 동결에 의한 손상으로 세포 자가사멸율의 증가에 기인한 것으로 생각된다. 또한 세포질 성숙의 결핍으로 인한 미세 소기관의 비정상적인 발달이 생존율에 영향을 미친 것으로 사료된다. Aman과 Parks(1994)은 저온에 노출된 난소에서 채취된 난자는 그 시간이 상대적으로 짧아도 염색체 이상을 가져올 수도 있다고 보고하였다. 이러한 염색체 이상은 발달 능력과 더불어 동결 용해 후의 생존성에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다. 26°C 이상의 온도에서 난소 수송이 이루어졌을 경우는 73.1%의 생존율을 보였다. 실험 결과에는 나타나지 않았으나 26°C에서 생산된 수정란을 동결 용해 후 부화 중 또는 부화 상태까지 발달된 수정란의 총세포수를 조사했을 때 평균 159 ± 5.5 개였다. 그러나 T3 그룹에서도 이와 비슷한 72%의 생존율을 나타내었다. 그러나 이러한 결과로 T3 그룹과 control 그룹간의 차이가 없다고 할 수는 없다. 왜냐하면 T3 그룹에 있어서는 난자내의 미세구조의 변화에 따른 수정란의 질적인 문제가 관여하기 때문일 것으로 추정되기 때문이다. 따라서 체외수정란을 생산하여 이식할 경우 저온에 의한 손

상을 입은 수정란은 유산과 같은 문제점들을 야기할 수도 있기 때문이다. Scherthner 등(1997)은 난소를 15~21°C에서 24시간 동안 저장한 후 체외수정란 유래 배반포를 생산하는데 아무런 영향을 미치지 않았음을 보고 하기도 하였다.

적 요

본 연구는 도축되는 소 난소의 효율적인 이용을 위해서 도축장으로부터 실험실로 운반되는 난소 수송 온도에 따른 체외 수정란 생산 효율을 조사하고자 실시되었다. 도축장의 HACCP 적용으로 도축장 출입이 불가능하므로 위탁하여 난소를 공급받게 되어 취급자의 부주의로 적절한 온도 유지가 되지 않는 경우가 많다. 특히 겨울철에는 더 많은 주의가 필요하다. 따라서 본 실험에서는 겨울철 난소수송 온도에 따라서 4처리 그룹, 즉 7~10°C (T1), 11~17°C(T2), 18~25°C(T3) 그리고 26°C 이상인 경우를 control 그룹으로 구분하였다. 회수된 난포란을 체외 성숙, 수정 및 배양을 실시하여 처리 그룹간 체외 성숙율, 분할율, 배반포 발달율 및 배반포의 세포수를 비교하였으며, 동결-용해한 배반포에 대해서도 생존성에 대하여 비교하였다. 실험 결과를 요약하면 다음과 같다.

Table 3. Survivability of frozen-thawed blastocysts produced *in vitro* according to different ovary transport temperatures

Treat-ments*	No. of blastocysts	No. (%) of survivability
		Re-expansion and hatched balstocysts
T1	13	6 (46.2) ^a
T2	16	11 (68.8) ^b
T3	18	13 (72.2) ^b
Control	26	19 (73.1) ^b

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$).

* T1: 7~10°C, T2: 11~17°C, T3: 18~25°C, Control: above 26°C. Replicates 5.

- 회수된 난포란을 22시간 동안 체외 성숙시켰을 때 수정 적기인 제2감수분열 중기에 도달한 비율은 T1~T3 그룹에서 60.0~68.2%의 비율로 나타났으나, control 그룹에서는 81.8%로 다른 처리군에 비해서 유의적으로($p<0.05$) 높은 결과를 보였다.
- 체외 수정 후 48시간에 확인한 분할율은 control 그룹이 83.6%로서 T3 그룹과는 유의적인 차이가 없었으나, T1(52.6%) 또는 T2 그룹(54.5%)에 비해서 유의적인($p<0.05$) 차이를 보였다. 수정 후 168시간과 192시간까지의 배반포 생산율은 처리군간 유의적인 차이를 보이지 않았다.
- 생산된 blastocysts를 동결-용해하여 수정란의 생존성을 확인한 결과, T1 그룹이 46.2%로서 다른 처리군(68.8~73.1%)에 비해서 유의적으로($p<0.05$) 낮은 생존율을 나타내었다.

따라서 본 실험의 연구 결과를 살펴볼 때 도축되는 소 난소의 수송 온도는 26℃ 이상을 온도를 유지하는 것이 저온에 의한 난포란 손상을 최소화하여 체외 발달을 및 동결-융해 후 생존율을 높여, 궁극적으로 수정란이식 산업과 생명 공학 분야의 실험의 효율을 증진시키는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aman RR and Parks JE. 1994. Effect of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosome of *in vitro* matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:103-110.
- Carnevale E, Maclellain LJ, Couthinho da Silva M A and Squires EL. 2003. Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanized mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 222:60-62.
- Glass KW and Voelkel SA. 1990. Loss of viability in frozen bovine oocytes associated with specific steps in the cryopreservation process. *Biol. Reprod.*, 42:52.
- Hewitt EA. 1921. A preliminary study of the normal variation in temperature of cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 55:544-548.
- Heyman Y, Smorag Z, Katska L and Vincent C. 1986. Influence of carbohydrates, cooling and rapid freezing on the viability of bovine non-matured oocytes and 1-cell fertilized eggs. *Cryo-Letters*, 7:179-183.
- Krisher RL and Bavister BD. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, 49:103-114.
- Lihe X, Morris LH and Allen WR. 2001. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection(ICSI). *Reproduction*, 121:925-932.
- Mazur P. 1990. Equilibrium, quasi-equilibrium, and non-equilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.*, 17:53-92.
- Moor MR and Crosby IM. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *J. Reprod. Fertil.*, 75:467-473.
- Pickwring SJ, Brude PR, Johnson MH, Cant A and Currie J. 1990. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the spindle in the human oocytes. *Fertil. Steril.*, 54:102-108.
- Pollard JW, Martino A, Rumph ND, Songsasen N, Plante C and Leibo SP. 1996. Effect of ambient temperatures during oocytes recovery on *in vitro* production of bovine embryo. *Theriogenology*, 46:849-858.
- Preis KA, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Caracciolo, Brienza V, Gomes GM, Maclellain LJ and Squires EL. 2004. *In vitro* maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22℃. *Theriogenology*, 61:1215-1223.
- Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L and Brady T. 1988. The effect of cooling human oocytes. *Hum. Reprod.*, 3:968-977.
- Scherthner W, Schmoll F, Brem G and Schellander K. 1997. Storing bovine ovaries for 24 h between 15 and 21℃ does not influence *in vitro* production of blastocysts. *Theriogenology*, 41:297.
- Scotte TJ, Carnevale EM, Maclellain LJ, Scoggins CF and Squires EL. 2001. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. *Theriogenology*, 55:705-715.
- Van Blerkom J and Davis PW. 1994. Cytogenetic, Cellular and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc. Res. Tech.*, 27:165-193.
- Vincent C and Johnson MH. 1992. Cooling, cryoprotectants and cytoskeleton of the mammalian oocytes. *Oxford. Rev. Reprod. Biol.*, 14:73-100.

(접수일: 2006. 6. 20 / 채택일: 2006. 6. 26)