

토끼 수정란 체외 배양액의 개발에 관한 연구

임경순 · 진동일* · 김대경 · 김성우 · 정소용 · 최화식**

서울대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과

Study on Development of *In Vitro* Culture Medium for Rabbit Embryos

Im, K. S., D. I. Jin*, D. K. Kim, S. Y. Joung and H. S. Choi**

Department of Animal Science & Technology,

College of Agriculture and Life Science, Seoul National University

SUMMARY

This experiment was carried out to improve *in vitro* development of rabbit one-cell embryos to the blastocyst stage. One-cell rabbit embryos were collected at 19~20hr after superovulation induction and incubated at 39°C in 5% CO₂ for 72hr. In order to find optimum conditions in medium that affects the rabbit embryo's development *in vitro*, RDH medium which mixed with RPMI1640, DMEM and Ham's F10 was compared with the previously reported mediums (Ham's F10 and RD) for embryo development and cell numbers. Three additives (BSA, taurine and glucose) were tested for the development of rabbit one-cell embryos *in vitro*. When the embryos were cultured in RDH medium, their development was markedly promoted as compared with Ham's F-10 or RD alone. Glucose exhibited no significant effects on embryo development and cell numbers. BSA appeared to promote transition from morula to blastocyst stage and taurine increased cell numbers of cultured embryos markedly regardless of mediums. BSA and taurine together in RDH medium showed the additive effects on embryo development and cell number.

(Key words : *In vitro* development, Rabbit embryo, Medium)

I. 서 론

수정란 이식 기술의 효율적인 응용을 위해서는 1-세포배를 배반포까지 체외배양하는 기술을 확립할 필요가 있다. 토끼 수정란의 체외 배양을 위해서 Ham's F-10, TCM 및 RD 등의 배양액들이 개발되었다 (Ham, 1963; Kane, 1972; Anderson과 Foote,

1975; Kane, 1987; Carney와 Foote, 1991). 토끼의 수정란은 단순 배양액에서 보다는 아미노산을 함유한 다양한 배양액에서 배반포와 확장하는 배반포로 발달할 뿐 아니라 수정란의 세포수가 증가하는 것으로 보고되고 있다(Kane, 1987). 최근에 개발된 RD 배양액은 혈청이 없는 조건에서 토끼 수정란의 높은 발육을 보여주었고 세포분열 속도를 증가시켜 세포수를 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Carney 와 Foote,

이 논문은 1996년도 농림수산 기술 개발사업에 의하여 연구되었음.

* 선문대학교 식량자원학부(Dept. of Food Resources, Sun Moon University)

** 김천전문대학교 임상병리과(Dept. of Clinical Pathology, Kimchun College)

1991; Li 등, 1993; Li 등, 1997). RPMI1640과 DMEM의 혼합배양액인 RD배양액의 아미노산 조성은 Ham's F-10배양액과는 다르기 때문에 혼합 조합이 토끼 수정란의 체외발달에 미치는 영향은 알려져 있지 않다. 혈청이 없는 배양액으로 이용성이 높은 RD배양액은 수정란의 체외배양시 혈청의 변이의 영향을 제거하고자 개발되었으나 혈청에 대한 긍정적인 효과에 대해서는 좀 더 연구가 필요하다. 또한 taurine은 IVF시 수정능력을 증가시켜줄 뿐만 아니라 생쥐, 토끼, 돼지 및 소 수정란의 체외배양에 긍정적인 효과가 있다고 보고되고 있다(Dumoulin 등, 1992; Reed 등, 1992; Li 등, 1993; Liu 와 Foote, 1995).

본 실험에서는 Ham's F-10, RPMI1640과 DMEM의 혼합 배양액인 RDH배양액이 토끼 수정란의 체외 발달에 미치는 영향을 기존의 배양액과 비교하고 또한 배양액에 BSA, glucose 및 taurine첨가가 토끼 수정란의 발달과 세포수에 미치는 효과를 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

실험에 사용한 토끼는 생후 약 6~9개월령의 New Zealand White종으로 체중 3.2kg이상의 성성숙에 도달한 개체를 사용하였다. 조명은 낮 14시간 밤 10시간으로 고정하고 퓨리나 코리아(주)의 토끼사료를 제한 급여하면서 청초기에는 알팔파 청초를, 고초기에는 옥수수 사일리지를 급여하였다.

2. 다배란 유도 및 수정란의 회수

다배란의 유도는 FSH(Sigma)를 12시간 간격으로 0.3, 0.4, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5mg를 피하주사한 다음 마지막 FSH처리 12시간후 hCG(Sigma)를 30 IU 쿼정맥 주사하였다(Kennelly와 Foote, 1965). HCG주사후 수컷과 2회 교미시켰고 약 19~20시간후 마취제 ketamine-xylazine을 근주하여 마취시켜 배 정중선을 절개하여 난관과 난소를 드러내고 난관채 부위로 카테터를 삽입시켜 자궁-난관 협부로부터 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)으로 난관을 관류하여 1세포기의 난자를 회수하였다(최 등, 1997).

3. 수정란의 배양

교미 후 19~20시간에 회수한 1세포기의 수정란을 처리별로 72시간 배양하면서 상실배, 배반포 및 확장된 배반포의 수를 기록하였다. 배양액으로 RPMI-1640, DMEM 및 Ham's F-10을 각각 1:1:1과 1:1:2로 혼합한 배양액(RDH)과 Ham's F-10 및 RD을 준비하였다. 각각의 배양액 50 μ l에 수정란을 부유하여 mineral oil로 덮고 39 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 72시간 배양하면서 상실배, 배반포 및 확장된 배반포의 수를 기록하였다. 수정란을 bis-benzamide solution으로 염색하여 형광 현미경하에서 세포수를 측정하였다. BSA의 첨가효과를 알아보기 위해서 수정란을 RD, RD+BSA(0.3%), RDH, RDH+BSA(0.3%)에서 72시간 배양한 후 수정란의 발달율과 세포수를 조사하였다. Glucose의 첨가의 효과를 알아보기 위하여 RDH와 RD에 glucose를 첨가하였는데 glucose를 첨가하지 않은 것을 low glucose로, 첨가한 것을 high glucose로 하였다. Taurine의 효과를 알아보기 위해서 수정란을 RDH+taurine(5mM), RDH+BSA(0.3%), RDH+taurine(5mM)+BSA(0.3%)에서 72시간 배양한 후 발달율과 세포수를 조사하였다.

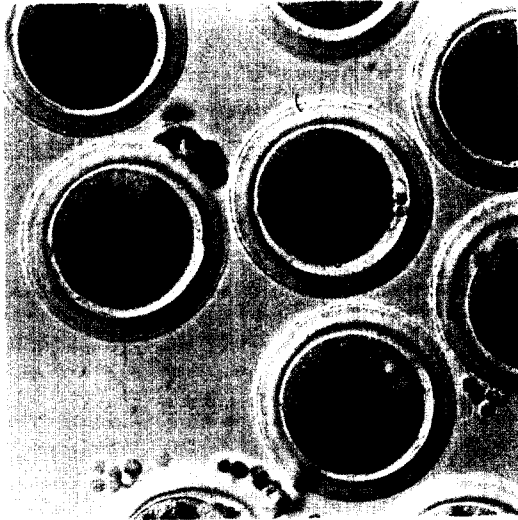
4. 세포수 관찰

발달한 수정란의 세포수를 파악하기 위해서 각각의 처리별로 1세포기의 난자를 72시간 배양한 후 확장된 배반포로 발달한 난자를 선별하여 핵염색을 실시하였다(Pursel 등, 1985). 먼저 수정란을 슬라이드 글라스 위에 놓고 0.1% trypan blue로 1분 동안 counter-stain한 다음 Hoechst 33342로 DNA를 염색하였다. 세포수를 형광 현미경하에서 관찰하면서 세었다(Fig. 2).

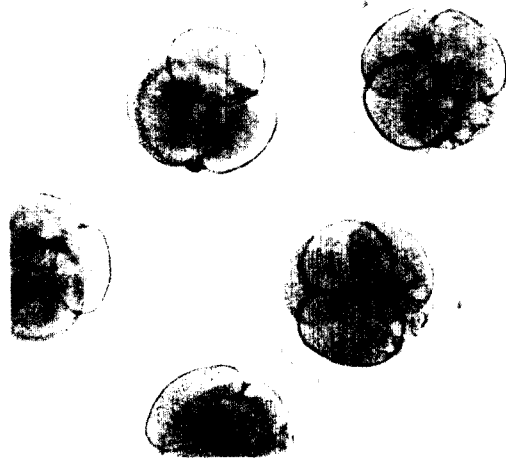
5. 통계처리

각 발육 시기별 발달율은 Chi-square에 의해서 유의성을 분석하였고 각 처리별 세포수는 Student t-test와 Fisher's Least Significant Difference (LSD)에 의해서 유의성을 분석하였다(Snedecor와 Cochran, 1967).

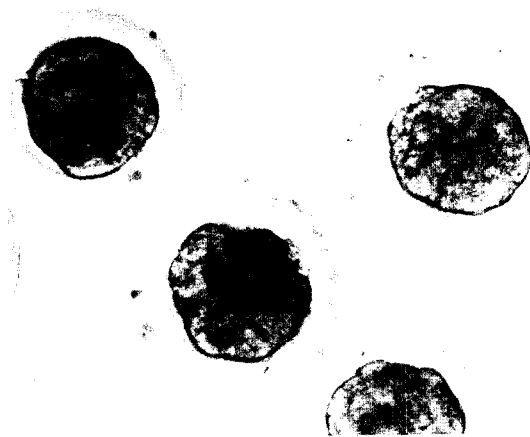
a. one-cell embryos



b. 4-cell embryos



c. morular embryos



d. blastocyst embryos

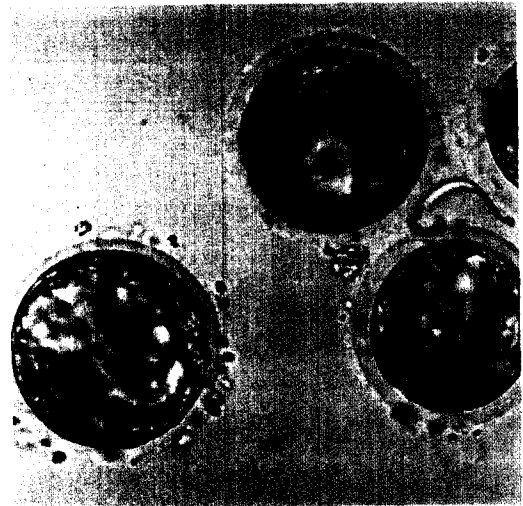


Fig. 1. Rabbit embryos following *in vitro* culture in RDH medium

Ⅲ. 결 과

1. 배양액의 종류가 1세포기 난자의 체외발달에 미치는 영향

본 연구는 배양액의 종류가 토끼 1세포기 난자의 체

외발달에 미치는 영향을 규명하기 위하여 배양액으로 Ham's F-10, RD(RPMI1640과 DMEM의 1:1 혼합액), RDH(RPMI1640, DMEM과 Ham's F-10의 1:1:1 또는 1:1:2 혼합액)를 비교하였다. 토끼 1세포기 난자를 39 °C, 5% CO₂ 배양기에서 약 72시간 배양했을 때 배반포와 확장된 배반포로 발달한 비율은

RD, Ham's F-10, RDH(1:1:2)와 RDH(1:1:1)에서 각각 53.1, 43.7, 71.9 및 75.1%로 RDH(1:1:2)와 RDH(1:1:1)이 RD와 Ham's F-10보다 유의하게 ($p < 0.01$) 높았다. 한편 배반포의 세포수는 RD, Ham's F-10, RDH(1:1:2) 및 RDH(1:1:1)가 각각 107, 105, 125 및 130으로 역시 RDH(1:1:2)와 RDH(1:1:1)이 RD와 Ham's F-10보다 유의하게 ($p < 0.01$) 많았다. 배반포와 확장된 배반포로의 발달율과 배반포의 세포수 모두 RDH(1:1:1)이 RDH(1:1:2)보다 약간 높았으나 유의한 차이는 없었다. 체외 배양으로 1세포기 배에서 상실배와 배반포로 발달한 난자는 mucin coat를 가지지 않았다(Fig. 1).

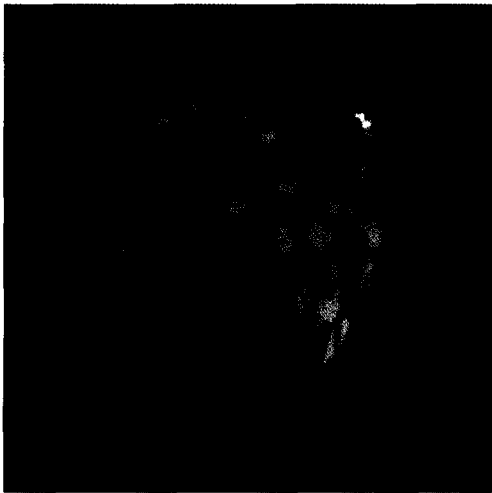


Fig. 2. Rabbit blastocyst stained with Hoechst

2. 배양액에 소혈청 알부민, 포도당 및 taurine 첨가가 1세포기 난자의 체외 발달에 미치는 영향

토끼 수정란의 체외배양시 BSA(bovine serum albumin) 첨가효과를 알아보기 위해서 0.3%의 BSA를 첨가한 RD와 RDH배양액에서 토끼 1세포기 난자를 72시간동안 배양하였다. 배반포와 확장된 배반포로 발달한 비율은 RD, RD+BSA, RDH 및 RDH+BSA에서 각각 52.3, 69.0, 72.0 및 82.0%로 RDH+BSA가 RD, RD+BSA 및 RDH보다 유의하게 ($p < 0.01$) 높았으며 또한 RD+BSA가 RD보다 유의하게 ($p < 0.01$) 높았다(Table 2). 즉 BSA는 상실배에서 배반포로 발달하는데 있어서 두드러진 효과를 나타내었다. 배반포의 세포수는 RD, RD+BSA, RDH 및 RDH+BSA에서 각각 108, 132, 121 및 142로 처리간에 유의한($p < 0.01$) 차가 있었으며 BSA첨가가 BSA무첨가보다 유의하게($p < 0.01$) 높았다(Table 2). 배양액내에 glucose의 효과를 알아보기 위해 RD와 RDH배양액에 glucose를 추가로 첨가하여 glucose농도를 높였다. 배반포와 확장된 배반포로 발달한 비율은 RD low glucose, RD high glucose, RDH low glucose 및 RDH high glucose가 각각 57.1, 46.4, 76.8 및 66.1%로 처리간의 유의적 차이가 없었으나 RD와 RDH 공히 high glucose가 low glucose보다 낮은 경향을 보였다. 배반포의 세포수도 RD low glucose, RD high glucose, RDH low glucose 및 RDH high glucose가 각각 117, 111, 129 및 121로 처리간에 유의차가 없었으며 RD와 RDH 공히 high glucose가 low glucose보다 낮은 경향을 보였다

Table 1. *In vitro* development of rabbit one-cell embryo in different media

Medium	No. of embryos	No (%)			No. of cells
		Morula	Blastocyst	Expanded blastocyst	
RD	64	25(39.1)	27(42.2) ^a	7(10.9)	107 ^c
Ham's F-10	64	32(50.0)	23(35.9) ^a	5(7.8)	105 ^c
RDH(1:1:2)*	64	14(21.9)	37(57.8) ^b	9(14.1)	125 ^d
dRDH(1:1:1)**	64	10(12.6)	40(62.5) ^b	10(12.6)	130 ^d

Values with different superscripts within columns are significantly ($p < 0.01$) different.

* 1:1:2 mixture of RPMI1640, DMEM and Ham's F-10 media.

** 1:1:2 mixture of RPMI1640, DMEM and Ham's F-10 media.

Table 2. *In vitro* development of rabbit one-cell embryos in RD and RDH with BSA

Medium	No. of embryos	No. (%)			No. of cells
		Morula	Blastocyst	Expanded blastocyst	
RD	42	18(42.8)	18(42.8)	4(9.5) ^a	108 ^d
RD+BSA	42	10(23.8)	21(50.0)	8(19.0) ^b	132 ^e
RDH*	50	11(22.0)	29(58.0)	7(14.0) ^{ab}	121 ^f
RDH*+BSA	50	8(16.0)	22(44.0)	19(38.0) ^c	142 ^g

Values with different superscripts within columns are significantly ($p < 0.01$) different.

*1:1:1 mixture of RPMI1640, DMEM and Ham's F-10.

Table 3. *In vitro* development of rabbit one-cell embryos in RD and RDH with high glucose

Medium*	No. of embryos	No. (%)			No. of cells
		Morula	Blastocyst	Expanded blastocyst	
RD low glucose	56	21(37.5)	25(44.6)	7(12.5)	117
RD high glucose	56	26(46.4)	22(39.3)	4(7.1)	111
RDH low glucose	56	11(19.6)	36(64.3)	7(12.5)	129
RDH high glucose	56	15(26.8)	31(55.4)	6(10.7)	121

*A low glucose contained 8.3 and 9.3mM glucose in RD and RDH and high glucose contained 27.3mM glucose in RD and RDH.

(Table 3).

BSA와 taurine의 첨가 효과를 알아보기 위해 RDH배양액에 5mM의 taurine과 0.3%의 BSA를 첨가하였다. 배반포와 확장된 배반포로 발달한 비율은 RDH, RDH+B, RDH+T 및 RDH+B+T에서 각각 74.5, 81.8, 72.2 및 90.9%로 처리간에 유의차가 없었으나 BSA나 taurine을 별도로 첨가한 것보다 BSA나 taurine을 같이 첨가한 것이 높은 경향을 보였

다. 한편 배반포의 세포수는 RDH, RDH+B, RDH+T 및 RDH+B+T에서 각각 125, 141, 139 및 154로 처리간에 유의차가 있었으며 RDH+B+T가 RDH, RDH+B 및 RDH+T보다 유의하게 ($p < 0.01$) 많았으며 RDH+B와 RDH+T가 RDH보다 유의하게 ($p < 0.01$) 많았으며 RDH+B와 RDH+T 간에는 유의한 ($p > 0.01$) 차이가 없었다(Table 4).

Table 4. *In vitro* development of rabbit one-cell embryos in RDH with BSA and taurine

Medium	No. of embryos	No. (%)			No. of cells
		Morula	Blastocyst	Expanded blastocyst	
RDH	55	7(12.7)	34(61.8)	7(12.7)	125 ^a
RDH+B*	55	6(10.9)	23(41.8)	22(40.0)	141 ^b
RDH+T*	55	9(16.3)	24(43.6)	16(29.1)	139 ^b
RDH+B*+T*	55	4(7.3)	22(40.0)	28(50.9)	154 ^c

Values with different superscripts within columns are significantly ($p < 0.01$) different.

*B : BSA , T : Taurine.

IV. 고찰

토끼 수정란의 배양을 위해서 개발된 기존의 배양액들은 토끼 수정란을 확장된 배반포와 부화한 배반포로 발달을 유도하였지만 그 발달 속도가 *in vivo*와 비교해서 24시간 이상 지연되고 발육 후 세포수도 적어 수란도에 이식하였을 때 임신율이 낮고 산자수가 적은 것으로 보고되고 있다(Fischer, 1987; Carney와 Foote, 1991). 본 실험은 토끼 수정란의 *in vitro*에서의 발달 지연을 극복하고 배반포의 세포수의 증가를 가져오는 체외 배양액을 개발하고자 수행되었다. 본 실험에서 개발한 RDH배양액에서 토끼 1세포란을 72시간 배양했을 때 약 80% 이상이 배반포로 발달하였으며 수정란의 발달속도는 *in vivo*에서의 발달 속도와 큰 차이가 없었으며 배반포의 세포수도 증가하였다. 본 실험에서 개발된 RDH배양액은 다른 배양액(Ham's F-10, TCM-199, or RD)(Carney와 Foote, 1990; Carney와 Foote, 1991; Li와 Foote, 1993)에 비해 난자의 체외 발달능이 우수한 것으로 나타나 토끼 수정란의 체외배양을 위한 기본 배양액으로 사용될 수 있으며 또한 RDH배양액에서 배양한 수정란을 수란도에 이식하였을 경우에도 임신이 가능하다. 토끼 수정란은 다른 종들과는 달리 체외발달을 위해서 특히 아미노산의 공급이 필수적인데(Kane, 1987) RPMI1640, DM-EM과 Ham's F-10을 혼합한 RDH배양액은 아미노산의 조성이 토끼 수정란의 배양을 위해서 적절한 것으로 생각된다.

BSA(bovine serum albumin)는 일반적으로 단백질원으로 수정란의 체외배양을 위한 배양액에 첨가되며 그 효과는 잘 알려져 있으나 그 구성성분이 정확히 알려져 있지 않으며 같은 회사 제품인 경우에도 만든 시기에 따라 그 성분이 다르다는 보고가 있어 최근 BSA-free배양액에 대한 연구가 실시되고 있다(Carney와 Foote, 1991; Li와 Foote, 1993; Li 등, 1993). 본 실험에서 BSA를 RD 및 RDH배양액에 첨가하였을 때 상실배에서 배반포로의 발달이 우수했으며 확장된 배반포로의 발달율도 높은 것으로 나타났으며 세포수에 있어서도 증가를 가져왔다. 이러한 결과는 BSA가 난황률을 증가시키고 상실배에서 배반포로의 전이에 관여한다는 보고들과 일치한다(Kane,

1980; Kane, 1987; Carney와 Foote, 1991). 그러므로 BSA는 미지의 구성성분에 의한 유해한 효과보다는 수정란의 발육에 유익한 효과를 나타내고 있어 새로운 대용물질이 발견되기 전까지는 토끼 배양액에 첨가되어야 할 것으로 사료된다.

Glucose는 lactate, pyruvate와 함께 배양액의 주요 에너지원으로 사용되고 있으며 생쥐, 흰쥐, 햄스터, 소 등에서 배의 초기분열을 억제하나 포배강 형성이나 후기발육에 있어서는 필수적인 것으로 알려져 있다(Seshagiri와 Bavister, 1989; Chatot 등, 1994; 이와 진, 1996). 본 실험에서 RD와 RDH배양액에 glucose는 수정란의 발달율과 세포수에 좋지 않은 영향을 주었다. 이러한 glucose의 효과가 다른 동물의 수정란에서와 같이 phosphate와의 상호작용에 의한 억제 효과인지에 대해서는 좀 더 연구가 필요하다.

Taurine은 자성 생식도관의 분비액과 정액내에 높은 농도로 존재하며 정자의 수정능 획득과 체외수정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 한편 taurine은 설치류의 난관과 토끼 자궁에서는 아미노산의 주요 구성분자로서 배양액에서는 antioxidant, osmolyte, chelating agent로서 작용한다고 추정되고 있다(Dumoulin 등, 1992; Li 등, 1993). Taurine은 생쥐(Dumoulin 등, 1992), 토끼(Li 등, 1993)와 돼지(Reed 등, 1992)의 수정란 배양액에서 사용되어 배 발달율에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서 taurine은 BSA와 함께 상승효과를 나타내어 토끼 수정란의 발육을 촉진하고 세포수를 증가시켰다. Taurine만으로도 유의적으로 높은 확장된 배반포의 형성률과 세포수의 증가를 보여주어 taurine은 수정란의 활구의 분활을 촉진시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 적 요

본 실험에서는 Ham's F-10, RPMI1640과 DM-EM배양액을 혼합한 RDH배양액을 제조하여 토끼 수정란의 체외 발달율을 기존의 RD나 Ham's F-10배양액과 비교하였다. 한편 RD와 RDH배양액에 BSA, glucose 및 taurine을 첨가했을 때 수정란의 체외발달율과 세포수에 미치는 효과도 검토하였다. 토끼 1세포기의 수정란은 RD나 Ham's F-10배양액에서 보다 RDH배양액에서 배반포 발달율과 배반포의 세포수가

유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였다. RD와 RDH배양액에 glucose의 첨가는 토끼 수정란의 발달율에 영향을 미치지 않았으나 BSA첨가는 체외 발달율과 배반포의 세포수에 유의하게 ($p < 0.01$) 영향을 주었고 taurine은 BSA와 함께 첨가하였을 때 상승효과가 있었다.

VI. 인용문헌

1. Anderson, G. B. and R. H. Foote. 1975. Development of rabbit embryo after storage at 10°C. *J. Anim. Sci.*, 40(5):900-904.
2. Carney, E. W. and R. H. Foote. 1990. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 89:543-551.
3. Carney, E. W. and R. H. Foote. 1991. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *J. Reprod. Fertil.*, 91:113-123.
4. Chatot, C. L., J. Lewis-Williams, I. Torres and C. A. Ziomek. 1994. One-minute exposure of 4 cell mouse embryo to glucose overcome morula block in CZB medium. *Mol. Reprod. Develop.*, 37:407-412.
5. Dumoulin, J. C. M., J. L. H. Evers, M. Bras, M. H. E. C. Pieters and J. P. P. M. Geraedts. 1992. Positive effect of taurine on preimplantation mouse embryo *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 94:373-380.
6. Fischer, B. 1987. Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryo. *J. Reprod. Fertil.*, 79:115-123.
7. Ham, R. G. 1963. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp. Cell. Res.*, 29:515-526.
8. Kane, M. T. 1972. Energy substrates and culture of single cell rabbit ovary to blastocyst. *Nature*, 238:1972.
9. Kane, M. T. 1987. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biology of Reproduction*, 37:775-778.
10. Kane, M. T. and D. R. Headon. 1980. The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. *J. Reprod. Fertil.*, 60:469-475.
11. Kennelly, J. J. and R. H. Foote. 1965. Superovulatory response of pre- and post-pubertal rabbit to commercially available gonadotrophins. *J. Reprod. Fertil.* 9:177-188.
12. Li, J. and R. H. Foote. 1993. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. *J. Reprod. Fertil.*, 98:163-167.
13. Li, J., R. H. Foote and M. Simkin. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.*, 48:33-37.
14. Li, J., R. H. Foote, Z. Liu and J. R. Giles. 1997. Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein free medium and offspring born following culture and embryo transfer. *Theriogenology*, 47:1103-1113.
15. Liu, Z. and R. H. Foote. 1995. Development of bovine embryo in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol. Reprod.*, 53:786-790.
16. Pursel, V. G., R. J. Wall, C. E. Rexroad, Jr., R. E. Hammer and R. L. Brinster 1985. A Rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 37:95-109.
17. Reed, M. L., M. J. Illera and R. M. Petters. 1992. *In vitro* culture of pig embryos *Theriogenology*, 37:95-109.
18. Seshagiri, P. B. and B. D. Bavister. 1989. Glucose inhibits development of hamster

- 8-cell embryos *in vitro*. Biol. Reprod., 40: 599-606.
19. Snedecor, G. W. and W. G. Cochran. 1967. Statistical Methods. The Iowa State University Press, Iowa., pp 59-220.
20. 이흥미, 진동일. 1996. Glucose와 inorganic phosphate가 Rat 8-세포기 난자의 체외배 양에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 20:251-258.
21. 최화식, 임경순, 진동일. 1997. H-Y항체에 의한 토끼배의 성감별과 이등분 절단 토끼 배의 융합에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 21:85-93.
(접수일자 : 1998. 2. 15. / 채택일자 : 1998. 3. 16.)