

난포의 크기 및 난포란의 형태가 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 영향

박병권[†] · 박영석 · 이미영 · 이성호 · 김덕환* · 이종완** · 권건오 · 김인봉 · 김형태***
공주문화대학 애완동물과

Effect of Follicle Size and Oocyte Type on *In Vitro* Maturation of Porcine Follicular Oocytes

B. K. Park[†], Y. S. Park, M. Y. Lee, S. H. Lee, D. H. Kim*, J. W. Lee**, G. O. Kwon,
I. B. Kim and H. T. Kim***

Department of Companion Animal, Kongju National Culture College

SUMMARY

This study was conducted to find out the effect of follicle size and oocyte type on *in vitro* maturation of porcine follicular oocytes. TCM-HEPES medium was used to basic medium, and the oocyte matured *in vitro* was stained with the Rapid staining method. The results obtained were summarized as follows:

1. The number of follicles an ovary was 20.5. The number of A-and B-typed oocytes an ovary was 2.34. The proportion of A- and B-typed oocytes was 40% of the recovery oocytes.
2. Cumulus expansion indexes(CEI) by the follicle size were 1.62~2.34 (<2mm), 1.27~2.28(2~5mm) and 1.46~2.75(>5mm). It was no differ to maturation rate by the follicle size.
3. The degree of oocyte maturation based on oocyte type did not differ for B- and C-typed oocytes but the index of oocyte type A was higher than that of B- and C-typed oocytes.
4. When follicular oocytes were cultured for 42 hours, the proportion of the Met-II (second metaphase) stage were 22.5%(degree 1), 35.4%(degree 2) and 65.5% (degree 3).

(Key words : porcine oocyte, IVM, follicle size, oocyte type)

* 충남대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Chungnam National University)

** 공주대학교 산업과학대학(College of Industrial Science, Kongju National University)

*** 대주산업(Dajoo Co.)

† 교신저자

서 론

토끼 난소의 난포에서 회수된 난포란을 생리식염수에서 배양시켰을 때, 체내에서의 경우와 마찬가지로 배란 직전의 난포란, 즉 제2성숙분열중기(Met-II)의 상태로 성숙된다는 사실이 확인된 이래(Pincus와 Enzman, 1935), 가축을 포함한 대부분의 다른 포유동물에서도 난소에서 회수한 난포란을 적당한 배양조건하에서 배양하면 수정이 가능한 단계까지 성숙시킬 수 있다는 사실이 확인되었다(Edwards, 1965; Sato와 Ishibashi, 1977; Fagbohun과 Downs, 1990; Naito 등, 1992; Trounson, 1992; Bousquet 등, 1994; Nagai, 1994).

일반적으로 체외의 배양액에서 난포란을 배양하는 조건에서는 체내 성숙조건에 경우보다 난포란의 교통반(gap junction)의 감소가 빨라지는 것으로 알려져 있는데, 그 결과 교통반의 기능인 물질의 이동에 장애가 발생되고, 이에 따라 난포란의 성숙이 불완전하게 된다(Motlik 등, 1984). 체내수정의 경우와는 달리 체외수정시에는 빈번한 다정자침입과 진행형성물의 저하를 나타내는데, 이러한 비정상수정은 정자의 상태에 따라 영향을 받기도 하지만, 난포란의 성숙(핵성숙 및 세포질성숙)이 체외성숙 배양과정에서 완전하게 이루어지지 않기 때문이다(Ball 등, 1983). 돼지의 경우 이러한 현상을 극복하여 난포란의 체외성숙을 향상시키기 위한 다각적인

연구가 수행되고 있다. 즉, 난소의 형태(Byun 등, 1992) 및 난포의 크기(Leibfried와 First, 1979; Nagai 등, 1993)에 따른 미성숙난포란의 회수 등과 같은 요인에 대하여 연구가 수행되어 왔다. 그러나, 아직 까지도 마우스나 래트와 같은 실험동물이나 다른 축종의 가축에서와는 달리 돼지에서는 불완전한 체외 성숙률이 높아서 체외수정란의 생산이 제한되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 체외수정을 위한 돼지 난포란의 체외성숙에 난포의 크기 및 채취된 난포란의 형태가 미치는 영향을 알아보려고 수행되었다.

재료 및 방법

1. 공시 난포란의 채취

실험에 공시한 난포란은 도축직후 암돼지(체중 100kg 내외)에서 적출한 난소로부터 채취하였다. 난소를 100IU/ml의 penicillin G와 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 30~36 $^{\circ}$ C의 멸균 생리식염수로 1~2회 세척한 다음, 동일 생리식염수에 침지하여 30분 이내에 실험실로 운반한 후, 실온(25~30 $^{\circ}$ C)에서 난소의 표면을 생리식염수로 2~3회 세척한 다음, 온수조에서 39 $^{\circ}$ C를 유지하면서 실험에 공시하였다. 난포란의 채취는 18-gauge의 주사침이 장착된 20ml 주사기로 포상난포를 연속적으로 찢어 난포액과 함께 난포란을 흡입하였으며, 이것을 15ml 원심분리관에 넣어 온수조(39 $^{\circ}$ C)에서 5~10분간 정치시켜 난포란의 침전을 유도한 다음, 침전물만을 취

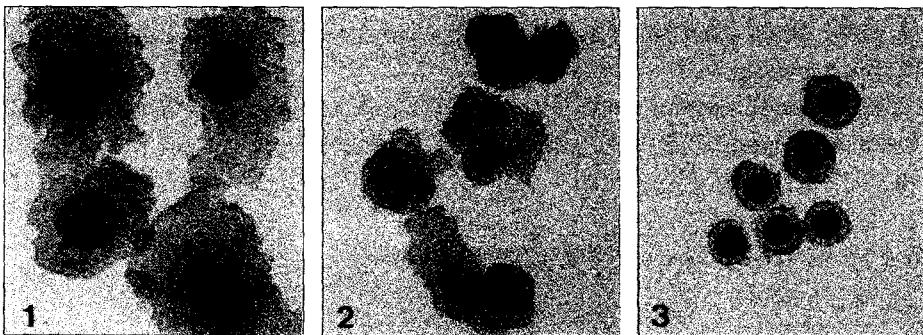


Fig. 1. Types of oocyte-cumulus complexes at collection(60 \times)

1. Type A: cumulus-enclosed oocytes, completely
2. Type B: Corona-enclosed oocytes
3. Type C: cumulus-denuded oocytes, nearly

하여 1.5cm 간격으로 방안을 표시한 87×15mm 페트리접시에 넣고, 4mg/ml BSA(Fraction V, Sigma, USA)가 첨가된 PBS로 희석하여 난구세포의 부착상태에 따라 난구세포층이 전체적으로 치밀하고 넓게 분포된 A형 난포란, 난구세포층이 전체적으로 넓게 분포되지 않고 부분적으로 상실된 B형 난포란 및 난구세포층이 거의 부착되어 있지 않은 C형 난포란으로 구분하였으며, 모든 난포란은 실체현미경(20~40×)하에서 난세포질의 상태가 균일한 것만을 확인·회수하여 실험에 공시하였다(Fig. 1).

2. 체외성숙 배양액

본 연구에서 사용된 체외성숙 배양액은 TCM-HEPES 배양액을 pH 7.4, 삼투압 290~300mOsmol로 조정하여 사용하였으며, 사용전에 0.22μm millipore filter로 여과·멸균한 다음, 39℃, 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도의 CO₂ 배양기에서 10~12시간 동안 평형시킨 후 사용하였다.

3. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 TCM-HEPES 배양액에 10%(v/v) FBS(Gibco, USA), 10%(v/v) pFF(porcine follicular fluid), 호르몬(1μg/ml FSH, 2IU/ml hCG, 1μg/ml estradiol-17β) 및 100IU/ml penicillin G와 100μg/ml streptomycin sulfate를 첨가하여 4-well plastic dish에 0.5ml씩 분주하고 mineral oil로 피복한 후 2~3시간 동안 39℃, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 습도로 조절된 CO₂ 배양기내에서 평형시킨 후, well 당 30~35개의 미숙 난포란을 적하하여 42시간 동안 배양하여 체외성숙을 유도하였다.

4. 난포의 크기에 따른 난구세포의 팽화도

난포의 크기에 따른 난포란의 성숙도를 판정하기 위하여 2mm 이하, 2~5mm 및 5mm 이상의 난포로 구분하여 난포를 채취하였다. 체외성숙 배양 후 난포란은 Fagbohun과 Downs(1990)의 난구세포 팽화도에 따른 난자의 성숙판정 방법을 이용하여 난구세포의 팽화 정도에 따라, 등급 1은 난구세포가 30% 이하, 등급 2는 30~70%, 등급 3은 70% 이상

팽화된 것의 3가지 등급으로 분류하였다.

5. 체외성숙 난포란의 염색

TCM-HEPES 배양액에서 42시간 동안 성숙배양시킨 및 등급 1, 2 및 3의 난포란을 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법(Rapid Staining Method)으로 염색하여 난포란의 핵성숙단계를 비교 판정하였다. 염색방법은 먼저, 150~300IU/ml hyaluronidase(IV-S, Sigma USA) 용액에 성숙배양이 완료된 난포란을 옮겨 1~2분간 처리한 후, 직경이 난포란의 크기와 비슷한 미세피펫으로 pipetting하여 난구세포를 완전히 제거한 다음 5%(v/v) FBS가 함유된 PBS로 2~3회 세척하였다. 멸균 slide glass 위에 난포란 10~20개를 적하한 다음, cover glass로 덮고, 난포란의 부피로 생긴 cover glass와 slide glass의 틈으로 고정액(glacial acetic acid : absolute ethanol = 1 : 3)을 흘리는 방법으로 5~10분간 고정을 하였다. 고정이 끝난 난포란은 염색액(Table 1)을 고정액과 같은 방법으로 주입하여 2~3분간 염색을 실시한 후, 탈염제(glacial acetic acid : distilled water : glycerol = 1 : 3 : 1)를 흘려 난세포질 이외의 염색액을 제거한 다음 위상차현미경(400~1,000×)하에서 난포란의 핵성숙 단계를 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 난포의 크기에 따른 난포란의 회수율

Table 2에서 나타난 바와 같이 전체 난소 169개에서 실험에 공시된 가시난포의 개수는 각 난포의 크기별로 2mm 이하가 1,996개, 2~5mm가 1,670개

Table 1. Chemical composition of basic fuchsin staining solution

Solution A	Basic fuchsin	3 g
	70% ethanol	100 ml
Solution B	Solution A	10 ml
	5% phenol	90 ml
Working solution	Solution B	45 ml
	Glacial acetic acid	6 ml
	37% formaldehyde	6 ml

Table 2. Distribution of 3 different size of follicles from the analysis of 169 ovaries

Follicle size(mm)	No. of follicle	Type of oocyte-cumulus complex ¹			Total(%)	No.(%) of A, B type ²
		A	B	C		
< 2	1,996	50	147	675	872(43.7)	197(22.6)
2 to 5	1,670	58	125	281	464(27.8)	183(39.4)
> 5	137	7	8	13	28(20.4)	15(53.6)
Total	3,803	115	280	969	1,364(35.9)	395(29.0)

¹ A : cumulus-enclosed oocytes, completely.

B : corona-enclosed oocytes.

C : cumulus-denuded oocytes, nearly.

² A, B type / Total

그리고 5mm 이상인 난포가 137개로서 총 3,803개였으며, 난소 1개당 공시난포의 수는 22.5개로 조사되었다.

한편, 각 난포 크기별로 회수된 난포란의 수는 2mm 이하, 2~5mm 및 5mm 이상의 난포에서 각각 872개, 464개 및 28개로 가시난포 3,803개에서 총 1,364개의 난포란이 회수되었다. 이 가운데 난포란의 체외성숙 실험에 이용할 수 있는 난포란은 A형 및 B형 난포란인데, 실험에 공시한 난소 169개중 395개가 회수되어 난소 1개당 2.4개였으며, 회수된 전체 난포란 1,364개중 이용 가능한 난포란은 395개로서 그 비율은 29.6%였다. 한편, 돼지의 체외수정 실험에서 일반적으로 이용되는 난포의 크기(2~5mm) 이외의 2mm 이하 난포에서도 A, B형 난포란의 회수율이 높은 것으로 나타났다.

돼지에서는 난포 크기에 따른 난포란의 형태 및 회수율에 관하여 보고된 바가 없는데, 소를 대상으로 Armstrong 등(1992)이 보고한 결과를 보면 난소 1개당 2mm 이상 되는 난포의 수가 8.7~14.5개, 회수된 난포란의 수가 3.8~5.3개였으며, 그 중 체외수정실험에 이용될 수 있는 A, B형 난포란의 회수율은 39~41%였다고 보고하였다.

2. 난포의 크기 및 난포란의 형태에 따른 체외성숙률

난포의 크기 및 난포란의 형태에 따라 회수된 난포란의 성숙률을 판정하기 위하여 Fagbohun과 Downs(1990) 및 Fenton 등(1993)의 방법을 다소 변경하여 42시간 체외성숙배양 후 난포란의 난구세포 팽화 정도를 난구세포 팽화지수(cumulus cells

expansion index, CEI)로 표시한 결과는 Table 3과 같다. 난포의 크기에 따라 회수된 난포란의 난구세포의 팽화지수는 2mm 이하, 2~5mm 및 5mm 이상의 난포에서 각각 1.62~2.34, 1.27~2.28 및 1.46~2.75로서 난포 크기에 따른 난포란의 체외성숙률에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나, 회수된 난포란의 형태에 따라서는 A형 난포란이 B형 및 C형 난포란보다 난구세포 팽화지수가 높게 나타나서 난구세포가 많이 부착되어 있는 난포란일수록 난포란의 체외성숙률이 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과만으로 볼 때 돼지난포란을 체외성숙시켜 체외수정에 공시하고자 할 경우에는 난포의 크기에 관계 없이 A나 B형의 난포란을 이용하는 것이 좋을 것으로 판단되었다. 또한, 본 실험의 결과는 난포란 회수시 1~5mm 난포 크기의 범위에서는 난포란의 성숙배양후 성숙률에 큰 차이점을 나타내지 않았지만 난포의 크기가 증가됨에 따라 난포란의 성숙률이 증가되는 경향이었다고 한 보고(Leibfried와 First, 1979)와, 난포의 크기가 난포란의 체외성숙률에 영향을 미치지 않았다고 한 보고(McGraughey, 1977)와는 일치되는 결과였다. 그러나, 난포의 크기가 난포란의 세포질성숙에 크게 영향을 미친다고 한 보고(Ding과 Foxcroft, 1994)와 난구세포가 적게 부착된 난포란일수록 성숙률이 높았다는 보고(Kikuchi 등, 1993)와는 차이가 있었다. 또한, 소 난포란의 체외성숙 배양시 난포란에 부착되어 있는 난구세포의 존재가 성숙률에는 크게 영향을 미치지 못하였지만, 수정물이나 전핵형성물을 향상시켰다고 하여 난포란의 체외성숙에 난구세포의 중요성을 강조하지 않은 보고(Lenz 등, 1983)

Table 3. Cumulus cells expansion after *in vitro* maturation for 42 hours in three different oocyte types and follicle size

Follicle size(mm)	Oocyte type ¹	No.(%) of oocytes examined	Degree of cumulus cells expansion ²				No.(%) of 2, 3 degree oocytes
			1	2	3	CEI ³	
< 2	A	32	5	11	16	2.34	27(84.4)
	B	79	21	51	7	1.82	58(73.4)
	C	131	66	49	16	1.62	65(49.6)
2 to 5	A	146	26	53	67	2.28	120(82.2)
	B	90	23	44	23	2.00	67(74.5)
	C	128	97	28	3	1.27	31(24.2)
> 5	A	20	0	5	15	2.75	20(100)
	B	24	11	8	5	1.75	13(54.2)
	C	26	16	8	2	1.46	10(38.5)

¹ A : cumulus-enclosed oocytes, completely. B : corona-enclosed oocytes. C : cumulus-denuded oocytes, nearly.

² 1 : oocytes with < 30% of cumulus cells expanded. 2 : oocytes with 31% to 70% of cumulus cells expanded. 3 : oocytes with 70% to 100% of cumulus cells expanded.

³ CEI(cumulus cell expansion index) was defined as $\sum DiFi / \sum Fi$. Di : degree of cumulus cell expansion(1, 2 and 3). Fi : frequency corresponding to Di.

와는 다소의 차이를 나타냈다.

3. 난구세포 팽화지수와 핵형분석 방법의 성숙판정 비교

체외성숙난포란의 난구세포 팽화지수에 의한 성숙 여부 판정방법과 난자의 핵형분석에 의한 성숙 판정방법간의 관계를 알아보기 위하여 체외성숙배양 후 난포란을 난구세포 팽화지수별로 구분하여 Byun 등(1991)의 방법에 따라 난자급속염색법으로

염색하여 핵성숙단계(Fig. 2)를 판정하였는데 그 결과는 Table 4와 같다. 난구세포 팽화지수 1의 경우 난포란을 42시간 체외성숙배양시킨 후 제 2성숙분열중기(Met- II) 도달률은 22.5%, 팽화지수 2는 35.4%, 팽화지수 3은 65.5%의 성적을 나타냈다. 이와 같은 결과는 일반적으로 체외성숙에 공시하는 수준인 Table 3의 2~5mm 난포 크기의 A형 난포란 난구세포 팽화지수와 비교해 보면, 팽화지수 1, 2 및 3의 경우 각각 17.8%(26/146), 36.3%

Table 4. Comparative of cumulus cell expansion degree and nuclear stage after *in vitro* maturation for 42 hours

Degree of cumulus cell expansion ¹	No. of oocytes examined	No. (%) of nuclear stage ²					
		GV	Pro I	Met I	Ana I	Tel I	Met II
1	49	15(30.6)	2(4.1)	13(26.5)	7(14.3)	0(0.0)	11(22.5)
2	93	10(10.8)	10(10.8)	20(21.5)	20(21.5)	0(0.0)	33(35.4)
3	61	7(11.5)	2(3.3)	8(13.1)	4(6.6)	0(0.0)	40(65.5)

¹ 1 : oocytes with < 30% of cumulus cells expanded

2 : oocytes with 31% to 70% of cumulus cells expanded

3 : oocytes with 70% to 100% of cumulus cells expanded

² GV : germinal vesicle stage, Pro I : first prometaphase, Met I : first metaphase, Ana I : first anaphase, Tel I : first telophase, Met II : second metaphase

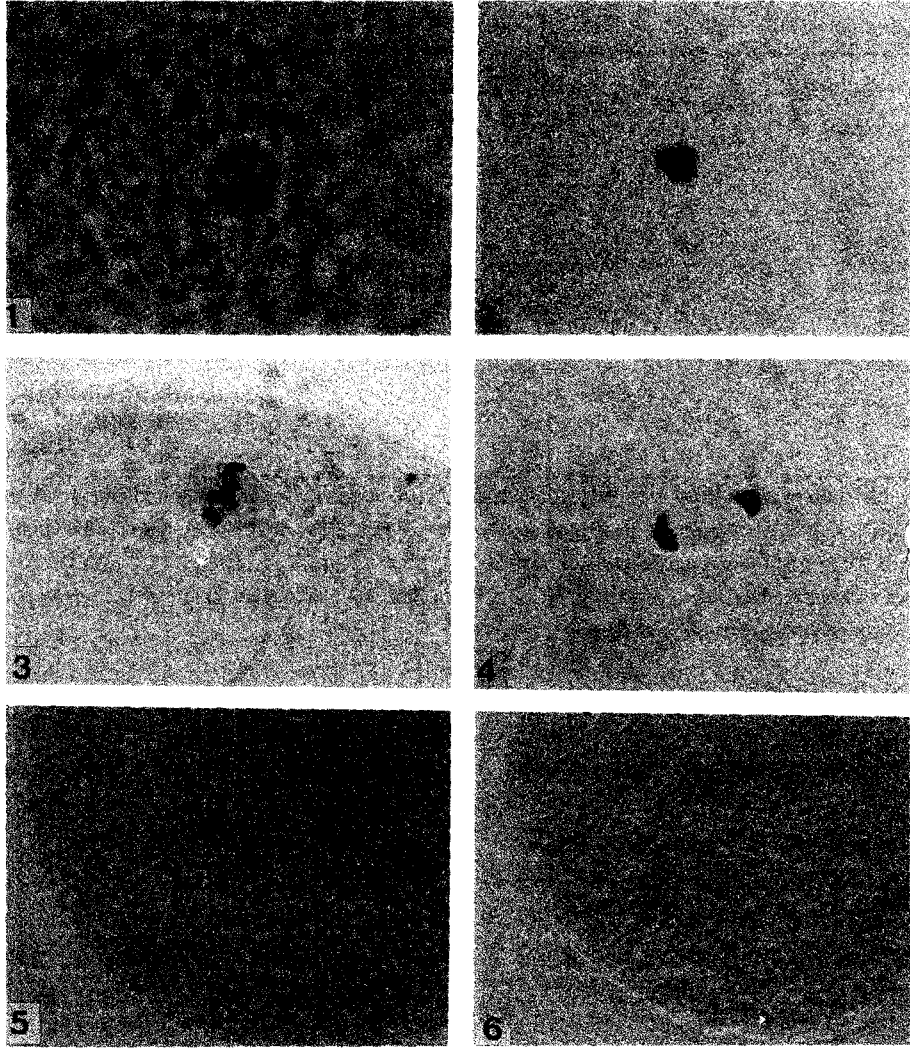


Fig. 2. Whole mount preparation of porcine follicular oocytes stained with the Rapid Staining Method showing nuclear stages of *in vitro* maturation 1: germinal vesicle stage(600×), 2: prometaphase(600×), 3: first metaphase(600×) 4: first anaphase(600×), 5: first telophase(350×), 6: second metaphase(350×).

(53/146) 및 45.9%(67/146)로서 약간의 차이는 있었지만, 대체적으로 일치되는 결과를 나타냈다.

이러한 결과는 Yoshida 등(1989)과 Byun 등(1991)이 돼지난포란의 체외성숙시 난포란의 난구세포 팽화도와 핵성숙간에 상당히 일치하였다는 보고와 소(Fenton 등, 1993) 및 생쥐(Fagbohun과 Downs, 1990)에서 난구세포의 팽화지수에 의하여 성숙 여부를 판단하는 것이 상당히 유용한 방법이

라고 한 보고들과도 일치하는 결과였다. 또한, 난포란의 난구세포 팽화도와 실제 핵성숙 여부가 상당부분 일치함으로써 난포란의 체외성숙 배양후 체외수정에 공시하여야 할 성숙난포란을 선별하는데 있어서 난구세포의 팽화도를 이용한 육안적 판단이 상당히 객관적이라는 사실을 증명하는 결과였다고 사료된다.

적 요

본 연구는 난포의 크기 및 난포란의 형태가 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실시하였다. 기본 배양액은 TCM-HEPES를 사용하였으며, 난포란의 염색은 난자급속염색법을 사용하였다. 실험에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 난소 1개당 공시난포의 수는 20.5개, A·B형 난포란의 수는 2.34개였는데, 이는 전체 회수 난포란중 40%를 차지했다.
2. 난포의 크기에 따라 회수된 난포란의 난구세포 팽화지수는 2mm 이하, 2~5mm 및 5mm 이상에서 각각 1.62~2.34, 1.27~2.28 및 1.46~2.75로서, 난포 크기에 따른 난포란의 체외성숙률의 차이점은 없는 것으로 조사되었다.
3. 회수된 난포란의 형태에 따라서는 A형 난포란이 B형 및 C형 난포란보다 난구세포 팽화지수가 높게 나타나서 난구세포가 많이 부착되어 있는 난포란일수록 난포란의 체외성숙률이 높은 것으로 나타났다.
4. 난포란을 42시간 체외성숙배양시켰을 때 제2성숙분열증기 도달률은 난구세포 팽화지수 1의 경우 22.5%, 팽화지수 2는 35.4% 그리고 팽화지수 3은 65.5%의 성적을 나타냈다.

참고문헌

- Armstrong DT, Holm P, Irvine B, Petersen BA, Stubbings RB, Mclean D, Stevens G and Seamark RF. 1992. Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology*, 38:667-678.
- Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD and First NL. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 28:717-725.
- Bousquet D, Milovanov C, Bell JC, Drocher J and Smith LC. 1994. Nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes aspirated from large follicles in superovulated heifers. *Theriogenology*, 172. Abstr.
- Byun TH and Lee SH. 1992. Morphological and cellular criteria ovaries, follicles and oocytes for *in vitro* maturation in the pig. *Kor. J. Emb. Tran.*, 7:97-110.
- Byun TH, Lee SH and Song HB. 1991. Development of a rapid staining method for of the oocytes from domestic animals. *Kor. J. Anim. Sci.*, 33:25-31.
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Conditioned media produced by follicular shells of different maturity affect maturation of pig oocytes. *Biol. Reprod.*, 50:1377-1384.
- Edwards RG. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus, monkey and human ovarian oocytes. *Nature*. 208:349-351.
- Fagbohun CF and Downs SM. 1990. Maturation of the mouse oocyte-cumulus complex: stimulation by lectins. *Biol. Reprod.* 42:413-423.
- Fenton SE, Dentine MR and Ax RL. 1993. Modulation of bovine oocyte-cumulus cell complex maturation and fertilization *in vitro* by glycosaminoglycans. *J. Dairy Sci.*, 76:701-712.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:394-384.
- Kikuchi K, Nagai T, Motlik J, Shioya Y and Izaike Y. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology*, 39:593-599.
- Leibfried ML and First NL. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 48:76-86.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML and First NL. 1983. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent

- processes. Biol. Reprod. 29:173-179.
- Mcgaughey RW. 1977. The culture of pig oocytes in minimal medium, and the influence of progesterone and oestradiol-17 β on meiotic maturation. Endocrinology 100:39-45.
- Motlik J, Grozet N and Fulka J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. J. Reprod. Fertil. 72:323-328.
- Nagai T, Ding J and Moor RM. 1993. Effects of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization *in vitro* of pig oocytes. J. Exp. Zool. 266:146-151.
- Nagai T. 1994. Current status and perspectives in IVM-IVF of porcine oocytes. Theriogenology, 41:73-78.
- Naito K, Dean FP and Toyoda Y. 1992. Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of pig oocytes matured in different media *in vitro*. Biol. Reprod. 47:43-47.
- Pincus G and Enzmann EV. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs. J. Exp. Med. 62:665-675.
- Sato E and Ishibashi T. 1977. Meiotic arresting action of the substance obtained from cell surface of porcine ovarian granulosa cells. Jpn. J. Zotech. Sci. 48(1):22-26.
- Trounson A. 1992. The production of ruminant embryos *in vitro*. Anim. Reprod. Sci. 28:125-137.
- Yoshida M and Kojima Y. 1989. Male pronuclear formation by boar spermatozoon with hair-pin-curved tail in zona-free hamster egg. Jpn. J. Vet. Sci. 51(2):428-430.
-
- (접수일 : 1999. 10. 2 / 채택일자 : 1999. 12. 10)