

항산화제 첨가와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의
체외발육에 미치는 영향
II. 체세포 공동배양과 항산화제 첨가가 소 체외수정란의
체외발육에 미치는 효과

양부근 · 황환섭 · 박동현 · 정희태 · 박춘근 · 김종복 · 김정익
강원대학교 축산대학

**Effect of Antioxidants and Co-culture System on the Development
of Bovine Embryos Derived from *In Vitro* Fertilization**
II. **Effect of Antioxidants and Amino Acids with Somatic Cells on
the Development of Bovine IVM/IVF Embryos**

Yang, B. K., H. S. Hwang, D. H. Park, H. T. Choung, C. K. Park,
J. B. Kim and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

This study was designed to evaluate the efficacy of antioxidants and amino acid with buffalo rat liver cell(BRLC), bovine oviductal epithelial cell(BOEC) and STOC monolayers in supporting the development of *in vitro* matured(IVM) and *in vitro* fertilized(IVF) bovine oocytes. Bovine embryos developed to the 2~8 cell stage after *in vitro* fertilization were cultured for 5 to 6 days at 39°C in CR_{1aa} containing antioxidants and amino acids with various somatic cells. Embryo development was examined and cell numbers of blastocysts were counted by fluorescence staining method.

In experiment 1, the proportion of embryos that reached the blastocyst stage in control, catalase(250U), SOD(600U), glutathione(100 μ M) and taurine(2.5mM) with BRLC were 11.4, 8, 0, 16.7 and 43.4 respectively. Taurine(2.5mM) with BRLC group was significantly the highest among treatments(P<0.05).

In experiment 2, *in vitro* development rate into blastocyst in control, catalase(250U), SOD(600U), glutathione(100 μ M) and taurine(2.5mM) with BOEC were 15.8, 23.5, 22.8, 28.6 and 56.9 respectively.

In experiment 3, embryonic development in all treatments as control, catalase(250U), SOD(600U), glutathione(100 μ M) and taurine(2.5mM) added to CR_{1aa} with STO cells were 23.5, 24.5, 17.0, 28.8 and 50.0 blastocysts.

These results show that antioxidants and amino acids with somatic cells can provide a significant benefit for coculture of early bovine embryos derived from IVM and IVF.

I. 서론

최근 수정란의 발육억제현상에 관한 연구에서 체외 배양액내의 산소는 free oxygen radical의 형성으로 대기중의 여러 형태의 세포들에 대해 독성이 있다는 보고가 있다. 몇몇 연구자들은 항산화제를 배양액에 첨가함으로써 포유동물의 수정란의 체외발육을 개선시켰으며, oxygen radical이 체외발육억제현상의 한 원인이라고 제시했다(Li 등, 1993; Pabon 등, 1989). Thompson 등(1990)은 공동배양체계가 산소농도를 줄여주며, 항산화물질을 생산하는 작용을 하는 것으로 보고하였다.

소 초기배 수정란의 발육과정중 세포 발육억제현상을 극복하고, 체외 수정란의 체외 발육율을 향상시키는 방법으로 성장촉진인자의 첨가, 난구세포, 난관 상피세포 및 BRL세포 등과 같은 여러 종류의 somatic cell과 공동배양을 실시하는 것이 체외 수정란의 발생능을 향상시킨다고 보고하였으나(Camous 등, 1984; Collas 등, 1991; Ellington 등, 1990; Goto 등, 1988; Heyman 등, 1987; Rehman 등, 1994), 이와 같은 배양체계에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 즉 배양액에 첨가되는 첨가물질 또는 공동배양에 이용되는 세포에서 생산되는 물질성분을 정확하게 판단할 수 없기 때문에 초기배 발육에 필요한 성분에 대한 연구가 더 많이 진행되어야 하며, 따라서 체외 수정란의 체외 배양체계를 확립시킬 필요가 있다.

본 연구는 소의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 2~8세포기의 체외 수정란을 CR₁₀₀ 배양액에 BRLC, BOEC 및 STO 세포와의 공동배양액에 일정량의 항산화제(superoxide dismutase와 catalase), glutathione 및 taurine의 첨가배양이 소 수정란의 초기발육에 미치는 영향을 검토하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 체외성숙 배양, 체외수정 및 배반포 수정란의 세포수 조사

난포란의 체외성숙 배양과 체외수정 및 배반포 수정란의 세포수 조사는 “I. 항산화제 첨가가 소 체외수

정란의 체외발육에 미치는 효과”의 논문에 의한 방법에 준하여 실시하였다.

2. BOEC의 준비

도축장에서 입수한 난관을 얼음속에 넣어 실험실내로 운반하여 주위의 결체조직과 혈액을 제거한 후 PBS-PVA로 2~3회 세척한 후 자궁난관 부위에 plastic관을 연결하여 20ml 주사기를 이용하여 PBS-PVA용액과 Ham' F10용액으로 각각 1회 원심분리(1,000rpm, 5분)하여 세척한 후, 4-well용기에 각각 0.5ml씩 담아 체외수정란의 배양에 이용하기 2~3일 전에 배양하여 체외수정란의 배양실험에 이용하였다.

3. BRL 세포의 준비

냉동보존된 BRLC(America Type Culture Collection, CRL 1442)를 37℃의 항온수조에서 1~2분간 용해하여 15ml의 원심분리관으로 옮긴 후 5ml의 Defined Modified Eagles Media(DMEM-low glucose, Gibco)에 10% FBS가 함유된 배양액과 혼합시킨 후, 원심분리(1,000rpm, 5분)를 2회 실시하여 세척시킨 후 세포부유액을 준비하였다. 체외수정란의 체외배양에 이용하기 2~3일전에 준비된 세포부유액을 4-well용기에 0.5ml씩 분주하여 체외수정란의 체외배양에 이용하였다.

4. STO 세포의 준비

냉동보존된 STOC(American Type Culture Collection, CRL 1503)를 37℃의 항온수조에서 1~2분간 용해하여 15ml의 원심분리관으로 옮긴 후 5ml의 Defined Modified Eagles Media(DMEM-high glucose, Gibco)에 10% FBS가 함유된 배양액과 혼합시킨 후, 원심분리(1,000rpm, 5분)를 2회 실시하여 세척시킨 후 세포부유액을 준비하였다. 체외수정란의 체외배양에 이용하기 2~3일전에 준비된 세포부유액을 4-well용기에 0.5ml씩 분주하여 체외수정란의 체외배양에 이용하였다.

5. BOEC, BRLC 및 STO 세포의 monolayer에 항산화제 첨가 배양

상기 방법으로 준비된 BOEC, BRLC 및 STO 세포의 monolayer에 catalase(250U), SOD(600U),

glutathione(100 μ l) 및 taurine(2.5mM)을 첨가하여 39 $^{\circ}$ C CO $_2$ 및 고습도의 조건에서 5~6일간 배양하여 상실배기 이상 발육된 수정란의 체외발육 성적을 조사하고, 배반포기 이상 발육된 수정란은 형광염색법에 의하여 세포수를 조사하였다(Pursel 등, 1985).

6. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 최소유의차검정(least significant difference test) 및 다중검정(duncan test)를 실시하여 통계처리하였다.

III. 결과 및 고찰

난포란을 회수하여 체외수정시킨 후 40~44시간에 회수한 2~8세포기 수정란을 CR $_{1aa}$ 배양액에 BRLC와 공동배양하여 catalase, SOD, glutathione 및 taurine을 첨가하여 5~6일간 체외배양후 얻은 체외발육 성적을 Table 1에 요약하였다.

최근에 BRL 세포는 소의 체외 수정란 생산을 위한 공동배양체계의 이용에 유용하다고 보고되었고(Voelkel 등, 1992), murine embryonic stem cell 분열을 촉진하는 백혈병억제인자(LIF)를 생산하는 것으로 알려져 있다(Kurzrock 등, 1991). 또한 BRL 세포의 역할은 명확하게 규명되지는 않았지만 수정란 성장촉진 성분을 제공해 주거나, 배양액으로부터의 수정란 독성물질을 중화시켜 주는 것으로 추론할 수 있다(Pinyopummintr와 Bavister, 1991; Thibodeaux 등, 1993).

CR $_{1aa}$ 배양액에 BRLC와 공동배양하여 무첨가,

catalase (250U), SOD(600U), glutathione(100 μ M) 및 taurine (2.5mM)을 첨가한 구에서 배반포 이상 체외발육율은 각각 11.4, 8.0, 0, 16.7 및 43.4%로서 taurine 2.5mM 첨가구가 여타구보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈다($P < 0.05$).

이상의 성적은 양 등(1995)이 체외수정란을 BRL 세포와 KSOM배양액에 배양한 결과 상실배기 이상 발육된 체외발육율이 42%보다, taurine첨가구가 71.7%로서 높은 결과를 보였지만, 여타구(43.2, 44, 45.7 및 50.0%)와는 유사한 성적을 나타냈고, Rehman 등(1994)이 4~8 세포기 수정란을 BRL세포와 TCM-199 배양액에 배양한 결과 상실배기 이상 발육된 체외발육율이 68.7%로서 taurine첨가구와는 유사한 성적을 보였지만 여타구는 저조한 성적을 보였다. 이러한 결과는 난포란의 체외수정에 공용된 배양액의 종류와 배양시간 등의 배양조건이 상이한데 기인된 것으로 보인다.

배반포기 수정란의 세포수는 대조구 85.8 ± 3.7 , catalase 86.8 ± 4.4 , glutathione 89.4 ± 4.0 및 taurine 95.4 ± 3.5 로서 커다란 차이는 인정되지 않았다.

단순배양액인 CR $_{1aa}$ 에 BOEC와 공동배양하여 catalase, SOD, glutathione 및 taurine을 첨가하여 5~6일간 체외배양후 얻은 체외발육 성적을 Table 2에 요약하였다.

CR $_{1aa}$ 배양액에 BOEC와 공동배양하여 무첨가, catalase (250U), SOD(600U), glutathione(100 μ M) 및 taurine(2.5mM)을 첨가한 구에서 배반포 이상 발육된 체외발육율은 각각 15.8, 23.5, 22.8, 28.6 및 56.9%로서 taurine 2.5mM 첨가구가 여타구보다 높은

Table 1. Effect of antioxidant on the development of bovine IVM/IVF embryo in CR $_{1aa}$ with BRL cell

Antioxidants	Dosage	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to(%);			Aver. cell no. of blasto. (Mean \pm S.E)
			Pre-morulae	Morulae	Blastocysts	
—	—	44	25(56.8)	14(31.8)	5(11.4) ^a	85.8 \pm 3.7
Catalase	250 U	50	28(56.0)	18(36.0)	4(8.0) ^a	86.8 \pm 4.4
SOD	600 U	46	25(54.3)	21(45.7)	—	—
Glutathione	100 μ M	48	24(50.0)	16(33.3)	8(16.7) ^a	89.4 \pm 4.0
Taurine	2.5mM	53	15(28.3)	15(28.3)	23(43.4) ^b	95.4 \pm 3.5

^{a,b} Within column treatment superscript differ, $P < 0.05$

Table 2. Effect of antioxidant on the development of bovine IVM/IVF embryos in CR_{1aa} with BOEC

Antioxidants	Dosage	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to(%);			Aver. cell no. of blasto. (Mean ± S.E)
			Pre-morulae	Morulae	Blastocysts	
—	—	38	20(52.6)	12(31.6)	6(15.8) ^a	78.3 ± 9.9
Catalase	250 U	34	13(38.2)	13(38.2)	8(23.5) ^a	77.5 ± 7.3
SOD	600 U	35	15(42.9)	12(34.3)	8(22.8) ^a	99.8 ± 10.5
Glutathione	100 μM	35	11(31.4)	14(40.0)	10(28.6) ^a	82.2 ± 5.4
Taurine	2.5mM	58	18(31.0)	7(12.1)	33(56.9) ^b	100.8 ± 4.9

^{a,b} Within column treatment superscript differ, P < 0.05

성적을 얻어(P < 0.05), BRLC와 공동 배양한 실험 1의 결과와 유사한 경향을 나타냈다.

이상의 성적은 Rehman 등(1994)이 4~8세포기 체외수정란을 TCM 199액과 BOEC와의 공동배양하여 65.7%의 배반포율을 얻은 결과보다는 저조한 결과지만, Eyestone과 First(1989)가 보고한 상실배기이상 체외발육율이 43% 보다는 높은 성적을 나타냈다.

난관상피세포는 소, 양, 돼지 및 말을 포함한 몇몇 포유동물의 수정란 체외발육에 적합한 환경을 제공해주는 것으로 알려졌다(Eyestone 등, 1987; Gandolfi 등, 1987; Rexroad 등, 1988). Rexroad(1989)는 난관 상피세포가 수정란 발생에 필요한 알지 못하는 성분을 분비한다고 하였고, Brown 등(1986)은 난관에서 분비되는 특수한 당단백질이 수정과 분할하는 동안 중요한 역할을 한다고 추론하였다.

난관 상피세포가 초기배의 체외발생에 영향을 미치는 기전은 명확하게 알려져 있지 않으나, 난관 상피

세포는 성장인자를 제공하거나, 특이적 에너지 기질의 제공 및 배양액의 독성 중화에 의해 수정란 발육을 증진시켜 준다고 보고하였다(Bavister, 1988; Carney 등, 1990; Rexroad 등, 1989).

한편 현재의 BOEC 공동배양의 한계점은 primary culture을 구축하기 위하여 매번 신선한 난관을 채취해야 하며, 시간이 많이 소비되고, 불편하고, 오염의 위험성이 있으며 과도한 세포증식에 의한 형태변형 등의 문제점들이 있다.

배반포기 수정란의 세포수는 대조군 78.3 ± 9.9, catalase 77.5 ± 7.3, SOD 99.8 ± 10.5, glutathione 82.2 ± 5.4 및 taurine 100.8 ± 4.9로서 SOD와 taurine이 다소 높은 성적을 나타냈다.

난포란을 회수하여 체외수정시킨 후 40~44시간에 회수한 2~8세포기 수정란을 CR_{1aa} 배양액에 STOC와 공동배양하여 catalase, SOD, glutathione 및 taurine을 첨가하여 5~6일간 체외배양후 얻은 체외

Table 3. Effect of antioxidant on the development of bovine IVM/IVF embryos in CR_{1aa} with STO cell

Antioxidants	Dosage	No. of IVM /IVF embryos	No. of embryos developed to(%);			Aver. cell no. of blasto. (Mean ± S.E)
			Pre-morulae	Morulae	Blastocysts	
—	—	51	25(49.0)	14(27.5)	12(23.5) ^a	91.3 ± 8.7
Catalase	250 U	53	19(35.8)	21(39.6)	13(24.5) ^a	93.0 ± 2.2
SOD	600 U	53	27(50.9)	17(32.1)	9(17.0) ^a	88.6 ± 4.7
Glutathione	100 μM	52	16(30.8)	21(40.4)	15(28.8) ^a	95.1 ± 5.7
Taurine	2.5mM	54	17(31.5)	10(18.5)	27(50.0) ^b	97.0 ± 5.5

^{a,b} Within column treatment superscript differ, P < 0.05

발육 성적을 Table 3에 요약하였다.

STO 세포는 mouse embryonic fibroblast line을 형질전환한 것으로 이것은 공동배양시 생쥐 배반포의 내부세포괴로부터 얻은 미분화된 cell line을 유지한 것이다(Martin 등, 1975; Evans 등, 1981).

STO 세포의 수정란의 체외배양에 대한 효과는 명확하게 알려지지 않았지만, Schmitt 등(1991)은 STO 세포가 수정란을 좋은 상태로 유지할 수 있는 자궁의 능력과 수정란의 발육을 증진시키고, 수정란의 발육을 조절하는 중요한 역할을 하는 여러 종류의 cytokine 유전자를 발현한다고 보고하였다.

CR_{1aa} 배양액에 STOC과 공동배양하여 무첨가, catalase (250U), SOD(600U), glutathione(100 μ M) 및 taurine(2.5mM)을 첨가한 구에서 배반포 이상 체외발육율은 각각 23.5, 24.5, 17.0 28.8 및 50.0%로서 taurine 2.5mM 첨가구가 여타구보다 높은 성적을 얻었다(P<0.05).

이상의 성적은 Rexroad 등(1993)이 보고한 양의 체외수정란을 TCM-199 배양액에 STO 세포와 공동배양한 결과 배반포기 이상 발육된 체외발육율이 33%로서 taurine첨가구가 높은 성적을 보였다. 그러나 여타구는 저조한 성적을 나타냈다.

배반포기 수정란의 세포수는 대조구 91.3 \pm 8.7, catalase 93.0 \pm 2.2, SOD 88.6 \pm 4.7, glutathione 95.1 \pm 5.7 및 taurine 97.0 \pm 5.5로서 커다란 차이는 인정되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 수정 초기배의 배양시 발현되는 세포 발육억제현상을 BRLC, BOEC 및 STOC 등과 같은 체세포와 수정 초기배를 공동배양하면 체외발육이 증진되며, 이들 체세포 배양액에 taurine을 첨가하여 배양하면 상실배기이상 체외발육율을 더욱 증진시키는 것으로 생각된다.

IV. 적 요

본 연구는 도살장에서 손쉽게 구입한 난소로부터 채취한 소의 미성숙 난포란을 체외에서 성숙, 수정시킨 후 2~8세포기의 체외수정란을 CR_{1aa} 배양액에 BRLC, BOEC 및 STOC 세포와의 공동배양액에 일정량의 SOD, catalase, glutathione 및 taurine의 첨가배양하여 체외발육 성적을 조사하였다.

1. CR_{1aa} 배양액에 BRLC와 공동배양하여 무첨가, catalase(250U), SOD(600U), glutathione (100 μ M) 및 taurine (2.5mM)을 첨가한 구에서 배반포 이상 체외발육율은 각각 11.4, 8.0, 0, 16.7 및 43.4%로서 taurine 2.5mM 첨가구가 여타구보다 통계적으로 유의하게 높은 성적을 나타냈다(P<0.05).
2. CR_{1aa} 배양액에 BOEC와 공동배양하여 무첨가, catalase (250U), SOD(600U), glutathione (100 μ M) 및 taurine(2.5mM)을 첨가한 구에서 배반포 이상 체외발육율은 각각 15.8, 23.5, 22.8, 28.6 및 56.9%로서 taurine 2.5mM 첨가구가 여타구보다 높은 성적을 얻었다(P<0.05).
3. CR_{1aa} 배양액에 STOC와 공동배양하여 무첨가, catalase (250U), SOD(600U), glutathione (100 μ M) 및 taurine(2.5mM)을 첨가한 구에서 배반포 이상 체외발육율은 각각 23.5, 24.5, 17.0 28.8 및 50.0%로서 taurine 2.5mM 첨가구가 여타구보다 높은 성적을 얻었다(P<0.05).

V. 인용문헌

1. Bavister, B. D. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology 29:143-154.
2. Brown, C. R. and W. K. T. Cheng. 1986. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. J. Embryol. Exp. Morph. 77:411-417.
3. Camous, S., Y. Heyman., W. Meziou and Y. Menezo. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. J. Reprod. Fert. 72:479-485.
4. Carney, E. W., C. Tobback., J. E. Ellington and R. H. Foote. 1990. Co-culture of rabbit 2-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells. Mol. Reprod. Dev. 27:209-215.
5. Collas, P., R. T. DUBY and J. M. Robl.

1991. *In vitro* development of rabbit pronuclear embryos in rabbit peritoneal fluid. Biol. Reprod., 44:1100-1107.
6. Ellington, J. E., P. B. Farrel., M. Simkin., R. H. Foote., E. E. Goldman and A.B. McGrath. 1990. Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1~2 cells morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert. 89:293-299.
 7. Evans, M. J. and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature(Lond).
 8. Eyestone, W. H., J. Vignieri and N. L. First. 1987. Co-culture of early bovine embryo with oviductal epithelium. Theriogenology 27:288 abstr.
 9. Eyestone, W. H., J. M. Jones and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert. 85:715-720.
 10. Gandolfi, F. and R. M. Moor. 1987. Stimulation of early development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert. 81:23-28.
 11. Goto, K., Y. Kajihara., S. Kosaka., M. Koba., Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 83:753-758.
 12. Heyman, Y., Y. Menezes., P. Chesne., S. Camous and V. Garnier. 1987 *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos : improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. Theriogenology 27:59-68.
 13. Kurzrock, R., Z. Estrov., M. Wetzler., J.V. Gutterman and M. Talpoz. 1991 LIF: Not just a leukemia-inhibitory factor. Endocrinol. Rev. 12:208-217.
 14. 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.
 15. Martin, G. R., and M. J. Evans. 1975. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72:1441-1445.
 16. Pabon, W. E., W. E. Findley and W. E. Gibbons. 1989. The toxic effect of short exposure to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. Fertil. Steril. 51:896-900.
 17. Pinyopummintr, T. and B. D. Bavister. 1991. *In vitro* matured/*In vitro* fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. Biol. Reprod. 45:736-742.
 18. Pursel, V. G., R. J. Wall., C. E. Rexroad and R.L. Brinster. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology 24:687-694.
 19. Rehman, N., A. R. Collins., T. K. Suh and R. W., Wright, Jr. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes co-cultured with buffalo rat liver cells. Theriogenology 41:1453-1462.
 20. Rexroad, C. E., Jr. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. Theriogenology 31:105-114.
 21. Rexroad, C. E. Jr. and A. M. Powell. 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. J. Anim. Sci. 66:947-953.
 22. Schmitt, R. M., E. Bruys and H. R. Snodgrass. 1991. Hematopoietic development of embryonic stem cells *in vitro*: cytokine and receptor gene expression. Genes. & Dev. 5:728-740.
 23. Thibodeux, J. K., R. P. Del Vecchio and W.

- Hansel. 1993. Role of platelet-derived growth factor in development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. J. Reprod. Fert. 98:61-66.
24. Thompson, J. G. E., A. C. Simpson., P. A. Pugh., P. E. Donnelly. and H. R. Tervit. 1990. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. J. Reprod. Fertil. 89:573-578.
25. Voelkel, S. A., Y. X. Hu., K. Moore and K. R. Bondioli. 1992. Freeze survival of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and culture of oocytes. Theriogenology 37:317 abstr.
26. 양부근, 정희태, 김정익. 1995. Buffalo Rat cell 과 Platelet Derived Growth Factor가 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과. 10(3):229-236.