인간 배아줄기세포 확립에 따른 문제점

Problems Associated with Establishment of Human Embryonic Stem Cell

문 신 용
서울의대서울대병원산부인과
서울종로구연건동 28
Shin Yong Moon, M.D.
Department of Obstetrics and Gynecology
Seoul National University College of Medicine & Hospital
E-mail : shmoon@plaza.snu.ac.kr

Abstract

Stem cells are the body's master cells and have the ability to produce all manner of tissues. Embryonic stem(ES) cells, derived from the inner cell mass(ICM) of the mammalian blastocyst, can continuously proliferate in an undifferentiated state and differentiate into a desired cell lineage under certain conditions. These abilities make ES cells an appealing source for cell replacement therapies, the study of developmental biology, and drug/toxin screening studies. Compared to mouse ES cells, human ES cells have only recently been derived and studied. Although there are many differences in properties between mouse and human ES cells, the study of mouse ES cells has provided important insight into human ES cell research. In this review, I describe the advantages and disadvantages of methods used for human ES cell derivation, the expansion of human ES cells.

Keywords : Embryonic stem cell;
Mouse embryonic fibroblast (MEF);
Chromosomal abnormalities

핵 심 용 어 : 배아줄기세포; 지지세포; 염색체 이상

서 론

배아줄기세포(embryonic stem cell)는무한히 증식하면서우리몸을구성하는모든세포로분화할수 있는 능력을 갖고 있어, 세포 치료의 잠재적 가능성을 제시하면서 미래의학의 꽃으로 연구자들의 관심을 끌게 되었다. 생쥐의 배아줄기세포는 1981년에 확립된 이후 많은 연구가진행되어왔다(1, 2). 그러나인간의배아줄기세포는 1998년 Thomson 등(3)에 의하여 냉동 보존되었던 폐기 예정의 인간 배아를 시험관에서 배양하여 배반포의 내세포괴를 분리하여 방사선이 조사된 mouse embryonic fibroblasts(MEFs) 위에서 계대배양에 성공하면서 인간의 배아줄기세포주를 처음으로 확립하게 되었다. 이후 많은 연구자들이 착상 직전의 배반포 내세포괴로부터 배아줄기세포를분리하여확립하였다고보고하였다(3~20).

인간배아줄기세포를 세포 치료에 사용하기 위해서는 배아줄기세포를증식시키고, 원하는 세포로 분화시킨 후, 분화된 세포를 분리하여 실험동물에 이식하는 방법을 개발하고, 실험동물에서의 안전성 검증 및 치료 효과를 확인한 후 전 임상단계 시험을 거쳐야 한다. 필자는 배아줄기세포를 확립하고 배양하는 데 있어서 생길 수 있는 문제점을고려하여향후개선방향을제시하고자한다.

표 1. The advantages and disadvantages of each derivation method

Derivation Methods	Advantages	Disadvantages	References
Immunosurgical method	• Easy isolation of the ICM from blastocysts possessing large and distinct ICM • Selective removal of the trophectoderm from expanded blastocysts	• Possibility of contamination with animal pathogens • Difficult to isolate ICM from blastocysts having small or indistinct ICM	3~15, 17~20
Whole embryo culture method	• Can be used regardless of blastocyst quality • No loss of ICMs during the process • Alleviate contamination due to animal pathogens	• Risk of trophectodermal overgrowth which impedes the growth of ICM	9~12
Partial embryo culture method	• Efficient method to derivate human ES cells from blastocysts possessing large or small ICM • Minimize the risk of trophectordermal overgrowth • Alleviate contamination due to animal pathogens	• Difficult to isolate the portion of the blastocyst containing the ICM	12, 16, 17

인간배아줄기세포주의 확립

배아줄기세포를 확립하기 위해서는 1975년 Solter와 Knowles(21)가 개발한 면역학적 수술법(immunosurgical method)으로 내세포괴를 분리하는 방법이 사용되어 왔다. 면역학적 수술은 antibody와 complement를 이용하여 내세포괴를 둘러싸고 있는 trophectoderm을 제거하는 방법을 말한다. 우선 팽창된 배반포의 투명대를 제거하기 위해서 pronase로 처리한 다음, 투명대가 제거된 배반포를 antihuman whole serum antibody로 처리한 후, guinea pig complement를 다시 처리한다. 처리 후 trophectoderm이 일부 붙어있는 내세포의 배양액으로 씻어낸 다음 분리하여 젤라틴이 입혀진 배양접시 위의 MEF feeder layer 위에서 배양을 시작하게 되며 여기서 증식을 하는 세포가 인간배아줄기세포주 (human embryonic stem cell line)가되는것이다.

그러나 면역학적 수술이 어떤 경우에도 최선의 방법은 아니다(9). 냉동 보존되었던 배아를 녹여서 실험실에서 다시 배양을 하기때문에모든 배아의 내세포괴가충실하게 발달한 좋은 질을 유지한 포배로 발달하지는 못한다. 경우에따라서는 아주 작은크기의 내세포괴를 갖고 있거나, 혹은내세포괴를확인하기어려운경우도있다.

이미 설명한 바와 같이 면역학적 수술방법은 배아줄기세포확립을 위해서 가장 흔히 사용되는 방법이지만 단점으로는내세포괴의크기가 작은 경우또는 내세포괴의 존재를 확인할 수없는 경우에는 실험과정에서내세포괴를

잃어버릴 가능성이 아주 높다. 면역학적수술방법을 사용하는 경우에는 여기에 사용하는 시약이 동물에서 유래된 것이기 때문에 동물 유래 병원균에의해 감염될 위험성도 배제할 수 없다. 이러한 단점을 해결하기 위해서 배아 전부를배양하거나, 일부분을 배양하는방법이 개발되었다. 투명대를 포함한 포배 전체를 배양하는 whole embryo culture method는 feeder layer 위에서 포배를 배양하는 방법을 말한다(9). 이 방법은 배아의 질에 관계없이 사용할 수 있으나, 포배 안에서 내세포괴를 확인할 수 없는 경우에 가장 효과적인 방법이다. 그러나 예견되는 바와 같이 배아줄기세포를 확립하는 과정에서 trophectoderm이 지나치게 증식하여 내세포괴가 성장하는 것을 방해할 수 있다(22). 이런 단점을 보완하기 위해서 partial embryo culture 방법이 개발되어 내세포괴의 크기가 중간 정도인 경우에 이용되고 있다. 아주 가느다란 유리피펫을 이용하여 내세포괴를 포함하고 있는부분만도려내어 feeder layer 위에서 배양하면 trophectoderm이 증식하여 내세포괴의 성장을방해하는것을 예방할 수 있다. 이 방법은 내세포괴가 분명하고 아주 큰 경우에도 사용할 수 있으며 배아줄기세포를 확립하는 효율에 있어서는 면역학적 수술방법과 거의 동일하다. 김 등(12)이 개발한 partial embryo culture 방법과 whole embryo culture 방법은 배아줄기세포주를 확립하는 과정에서 발생할 수도 있는 동물 병원균의 감염을 최소화할 수 있다. 치료 가능한 배아줄기세포주(clinical grade human embryonic stem cell)를확립하기위해서는여하한 경우에도 동물 병원균에 의해서 감염이 되면 안된다. 이렇게 배아의 질에 따라서 배아줄기세포를 확립하는 방법을 달리 한다면 우리는 더 효율적으로 인간의 배아줄기세포를 확립할 수있을것이다. 이세가지방법을사용할때 장점과단점을 표1에정리하였다.

인간배아줄기세포의 증식

인간의 배아줄기세포가 확립된 후에는 적정한 배양조건에서 충분한 양으로 증식을 시켜야 한다. 생쥐의 경우에는 분리된 내세포괴가 배아줄기세포로 자라면서 미분화상태를 유지하기 위해서 MEF feeder layer 위에서배양을 하였다. 이렇게 MEF feeder layer 위에서 배아줄기세포를 증식시키는 방법은 cytokine의 일종인 leukemia inhibitory factor(LIF)를 사용하면 MEF feeder layer 위에서키우지않더라도생쥐의배아줄기세포는미분화상태를 유지한다는 것이 알려지기까지 사용되어 왔다(4).

인간배아줄기세포를 확립하기 위해서 MEF feeder layer를 사용하였고, 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 20% FBS, 1mM glutamine, 0.1mM β-mercaptoethanol, 1% nonessential amino acids로 구성되어 있다(3). 비록 이와 같은 배양조건은 인간의 배아줄기세포를 어느 정도까지는 미분화 상태로 유지하면서 증식시킬 수 있었으나, 인간의 배아줄기세포를 실험실에서 증식시키는 과정에서자연분화가일어나는것을관찰할수있었다(3, 4).

인간의 배아줄기세포에 관한 연구가 진행되면서 인간의 배아줄기세포는 첨가되는 성장인자(growth factor)에 대해서 생쥐의 배아줄기세포와는 달리 반응한다는 것을 알게 되었고, 미분화 상태를 유지하기 위한 조건도 달라져야 한다는것을 깨닫게되었다. 생쥐의 배아줄기세포를 미분화 상태로 유지하면서 증식시키기 위해서는 LIF가 사용되나 인간의 배아줄기세포의 경우에는 LIF가 분화를 억제하지못한다(3, 4).

현재까지 확립되어 있는 인간배아줄기세포는 실험실에서 분화 등을 연구할 수는 있으나 치료용으로 사용할 수

표 2. Methods for expansion of human ES cells

Expansion Methods	Advantages	Disadvantages	References
Mechanical transfer	• Ideal for maintenance of human ES cell lines • Selective transfer of undifferentiated human ES cells from differentiated cells • Produce similar sized clumps and obtain similar sized human ES cell colonies	• Laborious and time—consuming • Difficult to process many cells simultaneously	5, 8~10, 14
Whole embryo culture method	• Can be used regardless of blastocyst quality • No loss of ICMs during the process • Alleviate contamination due to animal pathogens	• Risk of trophectodermal overgrowth which impedes the growth of ICM	9~12
Partial embryo culture method	• Useful for experiments requiring large quantities of cells • Faster and simpler than mechanical transfer • Easy to process many cells simultaneously	• Both differentiated and undifferentiated cells may be transferred • Cell clumps vary in size • Occurrence of chromosomal abnormalities	3, 4, 6, 7, 13, 15~18, 20, 26, 28~31

있는 것은 아니다. 치료용으로 사용할 수 없는 이유는 동물에서 유래된 혈청, feeder layer, 화학물질, 효소 등을 사용하여배아줄기세포를확립하였기때문이다.

현재 진행되고 있는 연구는 MEF feeder layer 없이 배양하거나, 인간 유래 세포를 feeder layer로 사용할 수 있는 조건을 확립하고, 가능하면 동물 혈청을 대체할 수 있는 물질에성장인자를첨가하는방법을 연구하고 있다. 인간의 배아줄기세포를 생쥐의 MEF feeder layer 위에서 배양하면 동물의 병원균이 인간배아줄기세포에 감염을 일으킬 수도 있다는 잠재적인 위험성을 갖고 있기 때문이다. 이런 이유로 현재까지 MEF feeder layer 위에서 배양된 인간의 배아줄기세포는 치료용으로 사용하기에는 부적절한 것이다. 예를 들면 MEF feeder layer 위에서 배양된 인간의 배아줄기세포를 환자에게 이식하면, MEF feeder layer에서유래된silaic acid Neu5Gc가면역학적 반응을 유발시킬 수도 있는 것이다(27). 이러한 이유로세포 치료를하기위한 임상수준의 배아줄기세포(clinical grade embryonic stem cell)를확립하기 위해서는 배아줄기세포의확립 및배양에있어서 기본적인 방법의 개선이 있어야 한다. Xu 등(28)은 feeder layer가 없는 조건에서 인간의 배아줄기세포를 배양하는 방법에 대하여 보고하였다. 비록 이 연구에서 MEF feeder

layer를 사용하지 않고 인간의 배아줄기세포를 확립하였지만, MEF feeder를 이용한 conditioned medium과 bFGF를 포함하고 있는 배양액을 사용하였기 때문에 동물 병원균이 인간의 세포를 감염시킬 수 있는 잠재적 위험성을 완전히 제거하지는 못하였다. 최근 Klimanskaya 등(20)은 어떤 feeder layer도 사용하지 않고 인간의 배아줄기세포를 확립할 수 있다고 보고하였다. Hovatta 등(13)은 인간의 foreskin fibrolast를 생쥐 MEF layer 대신 사용하는 방법을 보고하고 있다. Inzuna 등(14)은 postnatal human fibroblasts를 feeder layer로 사용하고 소태아혈청을 사용하는 대신 serum replacement를 사용하여 인간의 배아줄기세포를 확립하였다고 보고하였다. 한국에서도 이 등(19)은 uterine endometrial cell을 feeder layer로 사용하여 3개의 인간 배아줄기주를 확립하였다. 그러나 가능한한 동물 유래의 혈청이나 feeder layer를 사용하지 않았다 하더라도 내세포괴를 분리하기 위해서 면역학적 수술방법을 사용하였다면 완전히 동물유래 물질을 사용하지 않고 인간의 배아줄기세포주를 확립하였다고는 말할 수 없는 것이다(12).

인간배아줄기세포를연구하기 위해서는 미분화 상태를 유지하면서 증식을 시켜야한다. 일부 연구자들은 콜로니 형태로 자라는 인간배아줄기세포를 아주 가늘게 뽑은 유리 micropipettes를 사용하여 기계적으로 분리한 후 증식을 시키거나(5, 8~10, 14), 또 다른 연구자들은 collagenase(3, 6, 15, 28~31), trypsin(7, 20), dispase(4, 13, 16, 18, 26)와 같은 효소를 이용하여 증식시킨다. 최근 우리 연구팀도 기계적인 방법으로 인간의 배아줄기세포를 증식시키는 방법과 collagenase IV를 사용하는 효소를 이용하는 방법에 대하여 보고하였다(33). 배아줄기세포를 기계적인 방법이나 혹은 효소를 이용하여 증식시키는 방법에는 각각의 장단점이 있다(표 2). 기계적인 방법을 사용하는 경우에는 효소를 사용하지 않는다는 장점 이외에 분화된 세포를 제외하고 미분화된 세포만 선택적으로 분리하여 증식시킬 수 있다. 그러나 기계적인 방법은 많은 노동력과 시간이 소요되는 단점이 있으며 일시에 많은 양의 세포로 동시에 증식시킬 수는 없는 것이다. 그러므로 기계적인 증식 방법은 인간의 배아줄기세포를 실험실에서 유지하기 위해서 주로 사용이 된다.

그러나 효소를 이용해서 증식시키는 방법은 기계적인 방법과 비교할 때 더욱 빨리쉽게 증식시킬 수있다. 그래서 이 방법은 많은 양의 세포가 실험에 필요할 때에 한해서 사용한다. 효소를 사용하는 경우에는 우선 분리되어 나오는 세포 덩어리의 크기가 서로 다르고, 일부 분화된 세포가 미분화된 세포와 섞여 나오는 단점이 있다. 기계적으로 증식시키는 방법과 효소를 사용하는 방법을 동시에 사용하는 경우에는 미분화된 세포만 기계적으로 분리한 다음, 효소를 사용하는 방법을 동시에 사용한다면 분화된 세포가 섞여 나오는 것을 방지하면서 많은 세포를 증식시킬수있다.

실험실에서 인간의 배아줄기세포를 장기간 배양하는 경우에 세포를 증식시키는 방법에 따라서 염색체 이상이 발생한다고 Brimble 등(34)은 보고하였다. 특히 인간배아줄기세포의 콜로니를 효소로 분리한 경우에는 12번과 17번 염색체의 삼배수체가 관찰되었으며, 기계적인 방법을 사용해서 인간배아줄기세포를 배양하면 오랜기간 동안 정상적인 염색체 핵형을 유지할 수 있다고 보고하였다. 인간배아줄기세포를 증식하기 위해서 효소를 사용하는 것은 기계적인 방법을 사용할 때와 비교할 때 염색체 이상을 초래할 수 있는 빈도가증가되는것으로 관찰되고 있다(37). Mitalipova 등(38)은 세포를 계대배양하기 위

해서 buffer 용액을 사용하거나 collagenase 나 trypsin 과 같은 효소 등을 사용하면 인간배아줄기세포의 염색체 이상이 생길 수 있다고 보고하였다. 이러한 사실은 현재 우리가 가지고 있는 인간배아줄기세포의 배양 방법이 아직도 최상의 방법은 아니고 개선될 필요가 있다는 것을 암시한다. 인간의 배아줄기세포를 실험실에서 증식시킬 때는 주기적으로 염색체 이상이 생기는지 여부를 확인하여야 한다. 그러므로 인간의 배아줄기세포를 이용한세포치료를 생각하기 전에실험실의 배양조건의 최적화, 염색체 이상의 발현빈도 등을 관찰하고, 이런 이상이 생기지 않는조건을찾아내야한다.

결 론

인간의 배아줄기세포가 미래의학의 꽃인 세포 치료에 유용하게 사용될 것으로 믿는다. 그러나 세포 치료에 응용되기 위해서는 세포의 확립 및 증식에 관한 연구가 진행되면서 우선 동물에서 유래된 감염의 잠재적 위험성이 없는 인간배아줄기세포주 확립 및 배양방법이 개발되어야 한다. 배아줄기세포에관한 연구는난치성 환자에게는 커다란 희망을 제공하여 주지만의사들은연구 결과에 따라서미래의학을완성해 가야하는것이다.

참 고 문 헌

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154 - 6
2. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981; 78: 7634 - 8
3. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science1998; 282: 1145 - 7
4. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat. Biotechnol 2000; 18: 399 - 404
5. Park JH. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. Biol. Reprod 2003; 69: 2007 - 14
6. Stojkovic M. Derivation of human embryonic stem cells from day—8 blastocysts recovered after three—step in vitro culture. Stem Cells 2004; 22: 790 - 7
7. Cowan CA, et al. Derivation of embryonic stem—cell lines from human blastocysts. N Engl J Med 2004; 350: 1353 - 6
8. Hwang WS, et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. Science 2004; 303: 1669 - 74
9. Oh SK, et al. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines, SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. Stem Cells 2005; 23: 211 - 9
10. Hwang WS, et al. Patient—specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. Science 2005; 308: 1777 - 83
11. Heins N, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells 2004; 22: 367 - 76
12. Kim HS, et al. Methods for Derivation of Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells Express, published online July 28, 2005; doi: 10. 1634/stemcells. 2004 - 0296
13. Hovatta O, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Hum Reprod 2003; 18: 1404 - 9
14. Inzunza J, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. Stem Cells 2005; 23: 544 - 9
15. Park SP, et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen—thawed blastocysts using STO cell feeder

layers. Hum Reprod 2004; 19: 676 - 84

16. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taee A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. Differentiation 2004; 72: 224 - 9
17. Amit M. Itskovitz—Eldor JDerivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. J. Anat 2002; 200: 225 - 32
18. Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. Na Biotechnol 2002; 20: 933 - 6
19. Lee JB, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum—free condition. Biol Reprod 2005; 72: 42 - 9
20. Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, Johnson J, Wes MD, Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. Lancet 2005; 365: 1636 - 41
21. Solter D, Knowles BB. Immunosurgery of mouse blastocyst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975; 72: 5099 - 102
22. Pickering SJ, et al. Preimplantation genetic diagnosis as a novel source of embryos for stem cell research. Reprod. Biomed. Online 2003; 7: 353 - 64
23. Smith AG, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature 1988; 336: 688 - 90
24. Williams RL, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature 1988; 336: 684 - 7
25. James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati—Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. Development 2005; 132: 1273 - 82
26. Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson, JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. Nat Methods 2005; 2: 185 - 190
27. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. Nat. Med 2005; 11: 228 - 32
28. Xu C, et al. Feeder—free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2001; 19: 971 - 4
29. Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz—Eldor J. Feeder layer—and serum—free culture of human embryonic stem cells. Biol Reprod 2004; 70: 837 - 45
30. Carpenter MK, et al. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder—free culture system. Dev Dyn 2004; 229: 243 - 58
31. Rosler ES, et al. Long—term culture of human embryonic stem cells in feeder—free conditions. Dev Dyn 2004; 229: 259 - 74
32. Amit M, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. Biol. Reprod 2003; 68: 2150 - 6
33. Oh SK, et al. Methods for expansion of human embryonic stem cells. Stem Cells 2005; 23: 605 - 9
34. Brimble SN, et al. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder—free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines. Stem Cells Dev 2004; 13: 585 - 97
35. Inzunza J, et al. Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveal the occurrence of an isodicentric X chromosome after long—term cultivation. Mol. Hum. Reprod 2004; 10: 461 - 6
36. Draper JS, et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2004; 22: 53 - 4

37. Buzzard JJ, Gough NM, Crook JM, Colman A. Karyotype of human ES cells during extended culture. Nat Biotechnol 2004; 22: 381 - 2

38. Mitalipova MM, et al. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem—cells. Nat Biotechnol 2005; 23: 19 - 20

Peer Reviewer Commentary

이 상 훈 (한양의대 생화학교실)

본 논문은 인간 배아줄기세포의 확립 및 유지 배양 과정중에 발생할 수 있는 문제점, 특히 배아줄기세포를 치료적 목적으로 환자에게 사용하고자 할 때 고려해야 할 요소 등을 본 저자의 인간 배아줄기세포 확립 연구 경험과 기존에 발표된 연구업적을 토대로 심도있게 고찰하였다. 이와 같은 고찰은 현재 인간 배아줄기세포를 이용한 난치성 질환의 치료가 크게 이슈화 되고 있는 사회적인 분위기에서 그 가능성과 문제점을 과학적인 근거에 입각하여 판단할 수 있는 계기를 마련한 다는 점에서 그 가치가 인정된다고 본다. 또한 본 잡지의 대부분의 독자가 환자의 질병을 다루는 의사라는 점에서 일반인과는 달리 배아줄기세포의 치료적 이용 가능성의 허와 실을 판단할 수 있는 근거있는 정보를 제공한다는 점에서 본 논문의 중요성이 강조된다.

자율학습 9월호 (진단서 작성과 의사의 법적 의무) 정답

1. ①
2. ③
3. ②
4. ④
5. ④
6. ③
7. ④
8. ④
9. ②
10. ④