

# 토끼 精子 및 精漿에 의한 同種免疫이 雌性生殖道內的 抗體價와 精子에 미치는 影響

## I. 生殖道液 및 血清內的 Immunoglobulins 濃度

徐敬德·金昌根\*·鄭英彩\*·李龍雨\*\*

蓮庵畜産園藝專門大學 畜産科

## Effects of Isoimmunization by Sperm and Seminal Plasma on Their Antibodies and Sperm in Female Reproductive Tracts of Rabbit

### I. Density of immunoglobulins in reproductive tract fluids and serum

Seo, Kyung D., Chang K. Kim\*, Yung C. Chung\*, and Young W. Lee\*\*

Dept. of Animal Science, Yonam Junior College of Livestock & Horticulture

### Summary

This study was carried out to investigate the effects of Isoimmunization by sperm and seminal plasma on density of immunoglobulins in reproductive tract fluids and serum of immunized rabbits. The results obtained were summarized as follows:

1. Antibody titers against sperm and seminal plasma antigen ranged from 8 to 64 and 64 to 512, respectively.
2. All immunoglobulins; IgG, IgA and IgM were detected with Indirect ELISA method in the uterine and oviductal fluids as well as the sera of immune rabbits.
3. Concentrations of IgGs in the uterine and oviductal fluids of rabbits immunized with sperm and seminal plasma were higher than those of the control rabbits, but not showed any differences in sera.
4. Amount of IgA in the sera and oviductal fluids of control animals was more than that of the immune animals, while that of IgA in the uterine fluids of control and seminal plasma-immunized animals was higher as compared to sperm immune animals.
5. Average concentration of IgM in the uterine fluids of control and seminal plasma-immunized rabbits was higher than that of sperm-immunized ones. In the oviductal fluids, average concentrations of IgM of immune rabbits was higher than that of immune rabbits.

### I. 緒 論

精子가 抗原으로 작용하여 抗體形成을 유도할 수 있다는 사실이 Landsteiner (1899)에 의하여 최초로 보고되었고, Metalnikoff (1900)는 실험적으로 抗體의 존재를 밝힌 바 있다.

1960년 이전의 대부분의 研究結果에서 免疫으로 受胎率이 저하되는 것으로 여러 포유류에서 보고되었을 뿐만아니라 (Katsch, 1959), 그 후 1981년까지 약 90%의 研究결과에서도 受胎率의 저하가 보고되었으며 특히 토끼, 생쥐, 기니아피그, 소 및 양에서는 免疫에 의해 不妊이 유기된 바 있다 (Wegman

\*중앙대학교 산업대학 축산학과 (Dept. of Animal Science, Chung-Ang University)

\*\*국립보건원 신경성 병독과 (Dept. of Microbiology, National Institute of Health)

과 Gill III, 1983). 그러나 아직도 결과에 대한 抗體作用의 機轉은 不明한 상태이다. 이를 규명하는 방법의 일환으로 雌性生殖道液에 存在하는 物質 또는 抗體들의 特性和 濃度에 대한 관심이 최근에 고조되고 있다.

토끼의 雌性生殖道液중에는 다양한 종류의 단백질을 함유하고 있으며, 이들중 일부는 특이적인 것이 있으나 그 외의 것은 모두 血清에서 유래된 것으로 알려져 있다 (Steven 등, 1964; Beier, 1968; Daniel, 1968). 雌性生殖道液中 단백질의 농도가 비록 血清内の 수준보다 훨씬 낮지만 血清과 體液에서 가장 뚜렷한 IgG가 포함되어 있다. IgG와 IgA 그리고 특이抗體들은 많은 동물들의 子宮液 또는 子宮灌流液에서 검출되었으며 子宮液中 IgG의 양이 腔液 혹은 頸管-腔部位의 液보다 낮다는 것이 보고되었다. Symons와 Herbert (1971)는 電氣泳動을 통해 IgG와 IgA를 子宮液에서 검출하였으며 McAnulty와 Morton (1978)은 horseadish peroxidase로 면역시킨 토끼의 자궁과 질에서 IgG系 抗體를 발견하였다.

卵管液의 단백질성분에 관하여 상당히 흥미를 가져왔음에도 불구하고 immunoglobulin 또는 抗體에 관한 報告例는 적다. Behrman (1969)은 토끼정자로 免疫시킬 경우 血清內 抗體價가 높아지는데 반하여 卵管液에서는 항체를 검출하지 못하였다. 그러나 그 후 많은 연구자들에 의하여 여러 동물의 卵管液에서 IgG의 존재가 보고되었다 (Moghissi, 1970; Shapiro 등, 1971; Lippl 등, 1972; Oliphant 등, 1977; Schumacher, 1980; Kille와 Goldberg, 1979). Oliphant 등 (1977)은 yeast alcohol dehydrogenase로 면역시킨 토끼의 난관액에서 偽妊娠기간 동안 혈청내에 있는 總 immunoglobulin의 10%가 나타났으며, HCG 주사 후 첫 3일동안 약 20% 이상으로 증가됨을 관찰하였는데, 이는 혈청내 IgG, IgA 및 IgM의 각각 4%, 24% 및 2%였다고 보고하였다. Kille와 Goldberg (1979) 및 Schumacher (1980)는 精子特異抗原에 반응하는 雌性生殖道內 분비액의 總 immunoglobulin은 血清의 약 10% 정도라고 하였다.

그러나 生殖道液의 成分測定方法 및 分析對象의 조건에 따라 그 결과가 다양하게 보고되어 있다.

따라서 本 研究은 精子和 精漿으로 同種免疫시킨 암토끼에 있어서 子宮과 卵管液중 immunoglobulin의 농도를 ELISA 방법으로 조사하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 精液採取 및 精子和 精漿의 分離

10마리의 New Zealand White種 수컷으로부터 人工腔로 정액을 채취한 뒤, 즉시 膠樣物質을 제거하고 6,000rpm에서 20분간 원심분리하여 1차로 정자와 정장을 분리하였다. 분리된 精子는 다시 정장성분을 완전히 제거하기 위하여 생리식염수를 첨가하면서 6,000rpm에서 20분간씩 3회 원심분리하여 세척하였다. 한편 精漿에서도 정자를 완전히 제거하기 위해 같은 방법으로 3회 원심분리하였다. 완전분리된 精子和 精漿은 抗原製造를 위하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 2. 精子和 精漿의 抗原製造

精子抗原은 여러 차례 凍結 解氷으로 파괴시킨 정자용액과 同量의 Freund's complete adjuvant (FCA) 또는 incomplete Freund's adjuvant (IFA)를 cell ultrasonic homogenizer로 균질 혼합시켜 만들었으며, 精漿抗原은 PBS (pH 7.2)로 2배 희석한 정장을 FCA 또는 IFA의 동량과 함께 cell ultrasonic homogenizer로 균질 혼합시켜 만들었다. 정자와 정장抗原의 단백질 濃度는 1ml에 각각 2mg과 4mg이 되도록 조정하였으며, 항원의 단백질 농도는 Lowry法 (1951)에 의하여 측정하였다.

### 3. 免疫過程

면역시킨 암토끼는 背線을 따라 좌우로 피모를 깨끗이 깎았으며, 抗原注射 직전에 70% 알코올로 피부를 소독한 후 적어도 10개 部位以上에 FCA와 혼합된 정자 또는 정장항원용액 2ml를 균등하게 나누어 1주일 간격으로 연속 3회 피하주사하였으며, 다시 4주 후에 IFA와 혼합된 精子和 精漿抗原 溶液 2ml를 1주일 간격으로 2회 피하주사하여 면역시켰으며, 한편 對照區의 면역은 정자와 정장 대신에 생리식염수를 FCA 또는 IFA와 혼합하여 사용하였으며, 면역방법은 免疫區와 똑같이 하였다. 각 처리별 供試頭數는 9頭로 총 27두였다.

### 4. 特異抗體價의 測定

試驗血清의 抗體價조사는 Stavitsky (1954)의 passive haemagglutination test 방법에 준하였다.

## 5. Immunoglobulin 測定

Voller 등(1979)의 Indirect ELISA 방법으로 자궁액, 난관액 및 혈청중에 있는 immunoglobulins의 농도를 측정하였다. 즉, coating buffer (pH 9.6)로 자궁액, 난관액 및 혈청중의 총 immunoglobulins (Igs)와 immunoglobulin G (IgG)는  $10^3$ 에서  $10^9$ 까지, immunoglobulin A (IgA)와 immunoglobulin M (IgM)은  $2 \times 5^0$ 에서  $2 \times 5^7$ 까지 희석하여 microplate well의 수직열로 200  $\mu$ l의 試料를 채운 후 4°C의 保濕床에서 하룻밤을 정치하였다. 그 뒤 microplate well을 P-BS-Tween 20으로 6회 세척하고, anti-rabbit Igs, IgG, IgA, IgM peroxidase conjugate (CAPPEL Laboratory, USA)를 PBS-Tween 20으로 1:400으로 희석하고, 이 액 200  $\mu$ l를 각각의 microplate well에 標識하였다. 이것을 37°C에서 1시간 배양시킨 후 다시 PBS-Tween 20으로 6회 세척하였다. 그리고 substrate solution (OPD-sigma p-388) 200  $\mu$ l를 각 well에 채운 후 실내 어두운 곳에서 30분간 培養시킨 후 IN  $H_2SO_4$ , 50  $\mu$ l로 반응을 정지시킨 후 Titertek (490nm)에서 optical density를 측정하였다.

## Ⅲ. 結果 및 考察

### 1. 血清內 抗體價

각 처리별로 供用된 6두의 토끼에 있어서 同種 免疫抗體價는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 精漿으로 變역한 토끼가 精子로 變역한 토끼보다 血清內 抗體價가 다소 높았다. 正장으로 變역한 토끼의 抗體價는 1:64~512였으며, 正자로 變역한 토끼는

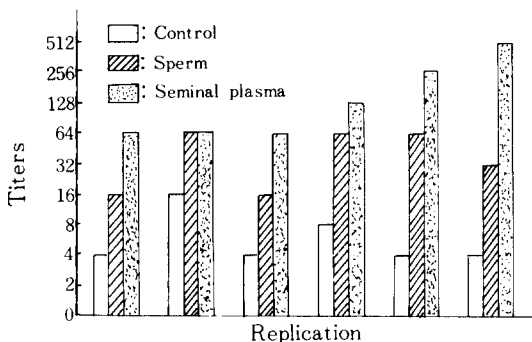


Fig. 1. Passive haemagglutination titers in control, sperm and seminal plasma sera.

1:8~64였는데, 같은 免疫過程임에도 불구하고 개체간에 抗體價의 차이가 많았다.

본 실험에서 正자보다 正장면역에서 혈청내 抗體價가 다소 높았던 결과는 Edwards (1960), Behman과 Nakayama (1965)의 결과와 유사하였으나, 李(1984)에서 正자면역의 抗體價가 높았던 것과는 다소 다른 결과였다. 특히 精子免疫兔에서의 혈청내 抗體價가 개체간에 차이가 컸던 결과는 Kummerfeld와 Foote (1976) 및 Kille과 Goldberg (1979)의 결과에서도 관찰된바 있다. 그러나 본 실험의 抗體價가 낮았던 것은 Kummerfeld 등 (1976)이 보고한 것과 같이 免疫方法과 抗體測定方法의 차이에 기인된 것 같다.

## 2. 生殖道液 및 血清內의 Immunoglobulin

### 1) 總 Immunoglobulins (Igs)

Fig. 2에서 보는 바와 같이 子宮과 卵管灌流液 및 血清中の Igs는 變역구와 대조구에서 모두 1:10<sup>10</sup> 稀釋倍數까지 검출되었다. 그러나 Igs의 最適 抗原濃度는 卵管灌流液에서 1:10<sup>4</sup>이며, 子宮灌流液과 血清에서는 1:10<sup>7</sup>이었다. 자궁과 난관 관류액중의 Igs의 濃度는 變역구가 대조구보다 높은 OD값을 나타내었으며, 그리고 혈청에 있어서는 對照區에 비해 正자 變역구가 높은 OD값을 나타내었으나, 正장 變역구는 낮은 OD값을 나타내었다. 한편 子宮과 卵管 관류액 중의 Igs의 濃度는 혈청의 것보다 낮은 OD값을 나타내었다.

### 2) Immunoglobulin G (IgG)

子宮과 卵管灌流液 및 血清中の IgG는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 變역구와 대조구에서 모두 1:10<sup>10</sup> 稀釋倍數까지 검출되었다. 그리고 IgG의 最適 抗原濃度는 子宮灌流液에서 1:10<sup>7</sup>이었으며, 이보다 높은 농도에서는 非特異反應이 강하였다. 卵管灌流液에서 1:10<sup>5</sup>이었고 그리고 血清에서는 1:10<sup>6</sup>이었으나 이보다 높은 농도에서는 非特異反應이 강하였다. 子宮, 卵管灌流液 및 血清中の IgG의 濃度는 免疫區가 대조구보다 높은 OD값을 나타내었으며, 또한 精子免疫區가 精漿免疫區보다 낮은 OD값을 나타내었다. 자궁, 난관관류액 및 혈청간의 IgG 농도는 혈청의 OD값이 生殖道液보다 높았으며, 그리고 子宮液의 OD값이 卵管液보다 높았다.

### 3) Immunoglobulin A (IgA)

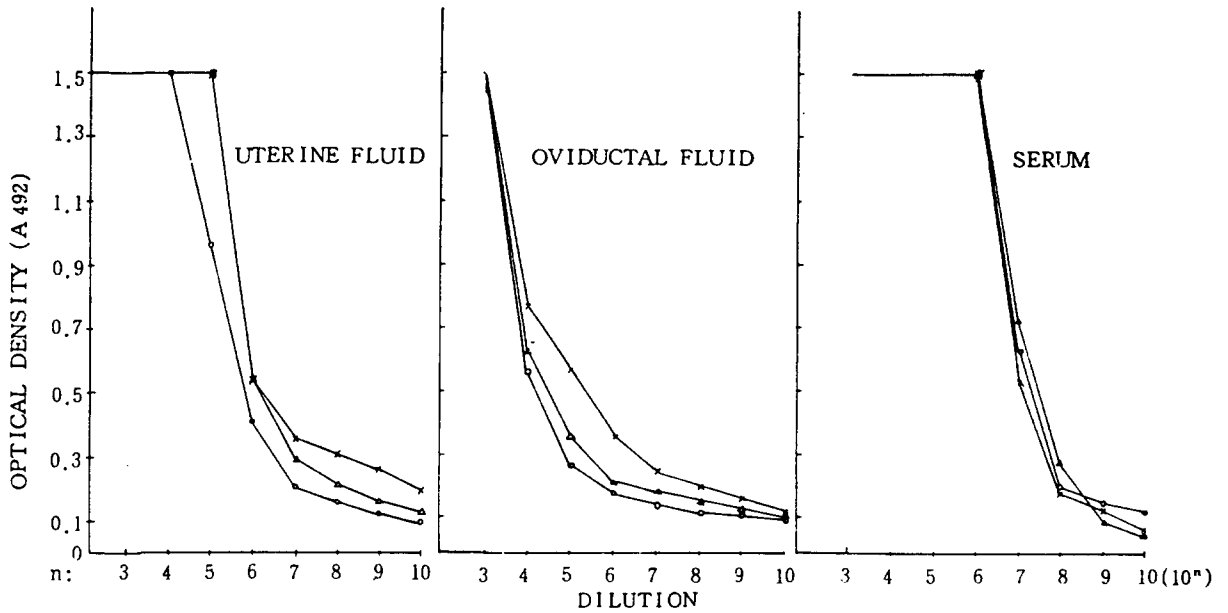


Fig. 2. Optical densities of peroxidase labelled anti-rabbit Igs to uterine fluid, oviductal fluid, serum of control and immune rabbit by indirect ELISA (○—○:control, △—△:sperm, ×—×:se-minal plasma)

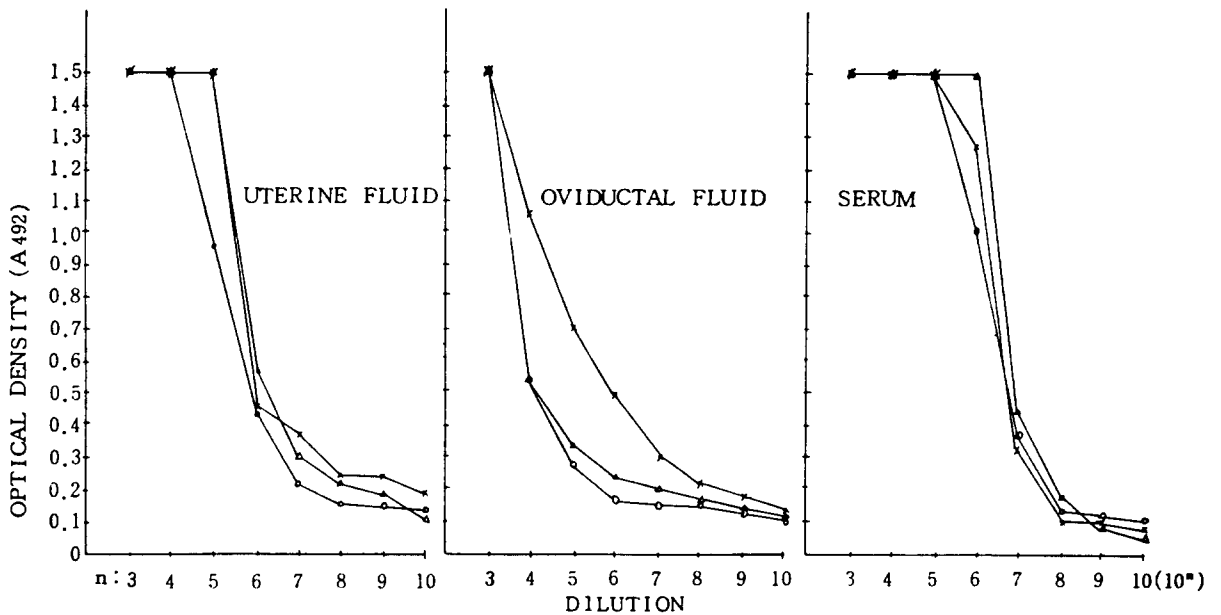


Fig. 3. Optical densities of peroxidase labelled anti-rabbit IgG to uterine fluid, oviductal fluid, serum of control and immune rabbit by Indirect ELISA (○—○:control, △—△:sperm, ×—×:se-minal plasma)

子宮과 卵管灌流液 및 血清中の IgA 의 농도는  
Fig. 4 에서 보는 바와 같다. 자궁과 난관관류액에

서는 免疫區와 對照區에서 모두 1:2×5<sup>7</sup> 稀釋倍數  
까지, 혈청중에서는 對照區와 精子免疫區가 1:2×

5<sup>3</sup> 稀釋倍數까지, 精漿免疫區가 1:2×5<sup>2</sup> 稀釋倍數까지 검출되었다. IgA의 最適抗原濃度는 자궁에서

1:50~6250, 난관에서 1:2~250, 그리고 혈청에서는 1:2~10이었다. 免疫區에서 子宮液中 IgA의

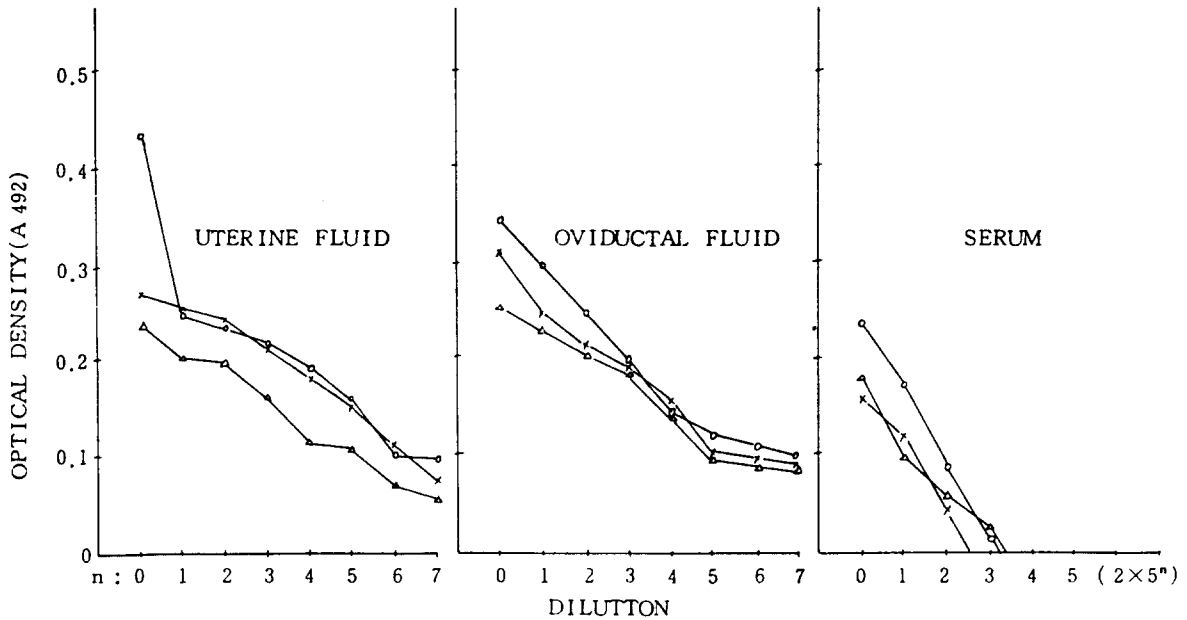


Fig. 4. Optical densities of peroxidase labelled anti-rabbit IgA to uterine fluid, oviductal fluid, serum of control and immune rabbit by Indirect ELISA (○—○:control, △—△:sperm, ×—×:semenal plasma)

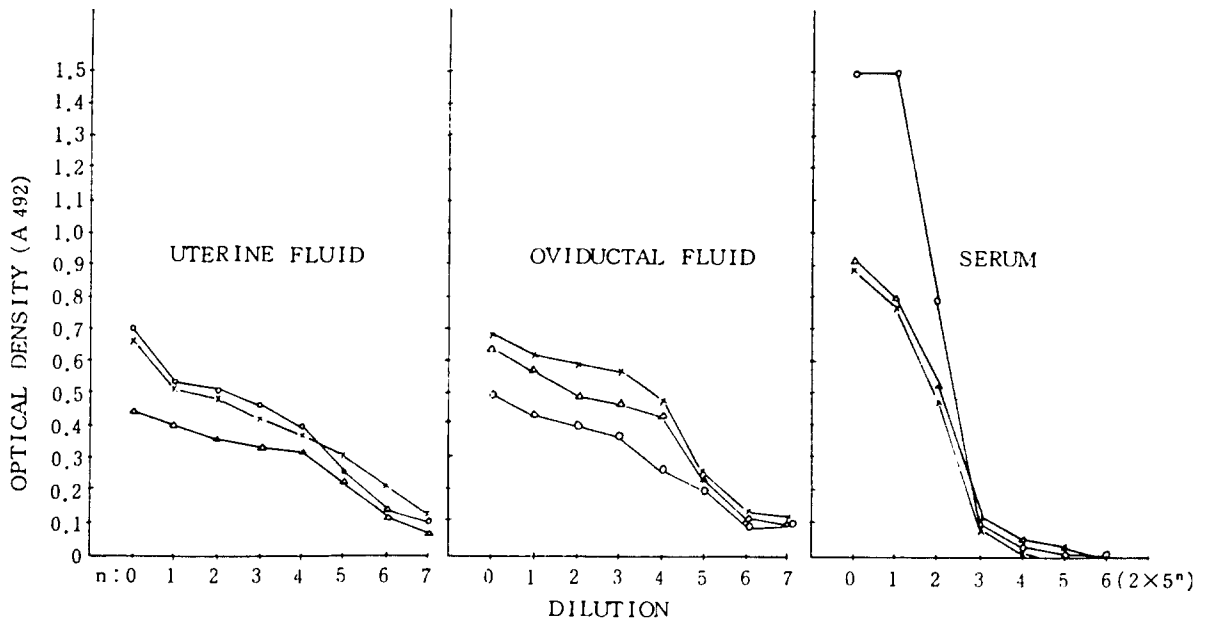


Fig. 5. Optical densities of peroxidase labelled anti-rabbit IgM to uterine fluid, oviductal fluid, serum of control and immune rabbit by Indirect ELISA (○—○:control, △—△:sperm, ×—×:semenal plasma)

농도는 對照區와 精漿免疫區 간에는 OD 값에서 차이가 없었으나 精子免疫區가 다른 처리구보다 OD 값이 낮았다. 난관액에 있어서 免疫區가 대조구보다 OD 값이 낮았으며, 精子免疫區보다 精漿免疫區의 OD 값이 높았다. 혈청에 있어서 免疫區가 대조구의 OD 값보다 낮았으며, 免疫區 간에는 OD 값의 차이가 없었다. 子宮, 卵管灌流液 및 血清간에 IgA의 OD 값은 生殖道液이 혈청보다 높았다.

#### 4) Immunoglobulin M (IgM)

자궁과 난관의 灌流液 및 血清中에 있는 IgM의 농도는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 자궁과 난관의 관류액에서의 IgM의 농도는 대조구와 면역구에서는 모두  $1:2 \times 5^7$  稀釋倍數까지 검출되었으나, 혈청 중에서는 대조구가  $1:2 \times 5^6$ , 免疫區가  $1:2 \times 5^5$  稀釋倍數까지 검출되었다. 그리고 IgM의 最適抗原濃度는 자궁과 난관액에서  $1:2 \sim 625$ 까지, 혈청에서는  $1:50$ 이었으며 이보다 높은 농도에서는 일정한 경향을 나타내지 않았다. 자궁과 혈청중에서 IgM의 농도는 면역구가 대조구보다 낮은 OD 값을 나타내었으며, 난관에 있어서는 免疫區가 對照區보다 높은 OD 값을 나타내었다. 자궁, 난관의 灌流液 및 혈청간에 IgM의 OD 값은 生殖道液보다 혈청이 높았다.

同種 免疫家兔의 자궁과 난관의 灌流液 및 혈청 중의 Igs, IgG, IgA 및 IgM의 농도를 Indirect ELISA法에 의해 조사한 위의 결과에서 免疫區와 對照區 모두의 자궁과 난관의 灌流液 및 혈청에서 Igs, IgG, IgA 및 IgM이 검출되었으며, Igs의 농도는 자궁과 난관 관류액 및 혈청에 있어서 精子和 精漿免疫區가 대조구에 비해 높았으며, IgG의 농도는 精子和 精漿免疫區가 자궁과 난관 관류액에서는 대조구보다 높았으나, 혈청중에서는 차이를 보여주지 않았다. IgA의 농도는 난관액과 혈청중에 있어서 대조구가 精子和 精漿免疫區보다 높았으나, 자궁액에서는 對照區와 精漿免疫區가 精子免疫區보다 높았다. IgM의 농도는 자궁액에서 대조구와 精漿免疫區가 精子免疫區보다 높았으며 난관액에서는 精子和 精漿免疫區가 대조구보다 높았으나, 혈청중에 있어서는 대조구가 精子和 精漿免疫區보다 높음을 알 수 있다.

Behrman(1969)은 정자로 同種免疫한 토끼의 난관액에서 抗體를 검출하지 못하였으며, Shapiro등(1971)도 模型抗原으로서 yeast alcohol dehydroge-

nase를 가지고 면역한 후 特異抗體를 검출할 수 없었다. 이들의 결과는 본 실험에서 자궁과 난관을 灌流液 및 혈청중에서 immunoglobulins이 검출된 것과는 다른 결과였다. 한편 Symons와 Herbert(1971)는 免疫電氣泳動으로 토끼 자궁과 난관액에서 IgG를 검출하였으며, Menge와 Lieberman(1974), Menge와 Fleming(1978)은 정자로 면역시킨 토끼의 자궁액에서 IgG와 IgA系 抗體를 검출하였다. 또한 McAnulty와 Morton(1978)도 horseadish peroxidase로 면역시킨 경우 자궁액에서 IgG系 抗體를 검출하였는데 이들의 결과는 본 실험결과와 유사한 결과였다.

자궁과 난관액 및 혈청중의 抗體濃度를 조사한 실험에서 Iritani등(1971)과 Oliphant등(1977)은 토끼 卵管漏斗部 분비액 중의 IgG, IgA 및 IgM의 수준이 혈청보다 낮았다고 하였으며, Kille등(1979)도 精製한 精子特異 lactate dehydrogenase로 면역시킨 토끼에서 항체를 검출하였는데 역시 抗體價는 낮았다고 하였다. Kille와 Goldberg(1979)는 LDH-C4로 면역시킨 토끼 卵管液中の Igs가 혈청농도의 3~27%이라고 보고하였다. 본 실험에서 IgA의 경우 生殖道液이 혈청보다 농도가 높았던 것은 이들의 실험결과와는 다른 결과였다. 그러나 Igs, IgG 그리고 IgM에 있어서는 이들의 결과가 본 실험의 결과와 유사하였다. 한편 Parr와 Parr(1985)는 正常 생쥐에서 IgM이 검출되지 않았다고 보고하였다.

## IV. 摘要

본 研究는 精子和 精漿으로 同種免疫시킨 토끼의 抗體가 生殖道液과 血清內의 Immunoglobulins의 농도에 미치는 영향을 究明코자 실시하였으며, 본 研究에서 얻어진 결과를 要約하면 다음과 같다.

1. 受動血球凝集反應試驗時 同種抗體價의 범위는 對照區의 혈청이  $1:4 \sim 1:8$ , 精子免疫區의 혈청이  $1:8 \sim 1:64$  그리고 精漿免疫區의 혈청이  $1:64 \sim 1:512$ 이었다.

2. 자궁과 난관灌流液 및 혈청내의 Igs, IgG, IgA 그리고 IgM의 농도를 Indirect ELISA法에 의해 조사한 결과 모든 處理區에서 검출되었다.

3. Igs와 IgG의 농도는 자궁액과 난관액에 있어서 對照區보다 免疫區가 높았으나 혈청중에서는

큰 차이를 보여주지 않았다.

4. IgA의 농도는 난관액과 혈청중에서 對照區가 免疫區보다 높았으나, 자궁액에서는 對照區와 精漿免疫區가 精子免疫區보다 높았다.

5. IgM의 농도는 자궁액에 있어서 對照區와 精漿免疫區가 精子免疫區보다 높았으며 난관액에 있어서는 免疫區가 對照區보다 높았으나, 혈청중에 있어서는 對照區가 免疫區보다 높았다.

## V. 引用文獻

1. Behrman, S.J. and M. Nakayama. 1965. Antitestis antibody: Its inhibition of pregnancy. *Fertil. Steril.*, 16: 38-44.
2. Behrman, S.J. 1969. Immunology of oviductal secretions. *In: The mammalian oviduct* (E.S.E. Hafez and R.J. Blandou, eds). The University of Chicago Press. pp. 357-372.
3. Beier, H.M. 1968. Riochemish-entwicklungs-physiologische untersuchungen am proteinmilieu fur die blastozystenentwicklung des kaninchens. *Zool. j.*, 85:72.
4. Daniel, J.C. 1968. Comparison of electrophoretic patterns of uterine fluid from rabbits and mammals having delayed implantation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24: 297.
5. Edwards, R.G. 1960. Complement-fixing activity of normal rabbit serum with rabbit spermatozoa and seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.*, 1:268-282.
6. Iritani, A., Y. Niskawa, W.R. Gomes and N.L. VanDemark. 1971. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits. *J. Anim. Sci.*, 33:820-835.
7. Katsh, S. 1959. Immunology, fertility and infertility: A historical survey. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 77:946.
8. Kille, J.W. and E. Goldberg. 1979. Female reproductive tract immunoglobulin responses to a purified sperm specific antigen. *Biol. Reprod.*, 20:863-871.
9. Kummerfeld, H.L. and R.H. Foote. 1976. Infertility and embryonic mortality in female rabbits immunized with different sperm preparations. *Biol. Reprod.*, 14: 300-305.
10. Kummerfeld, H.L., R.L. Hintz and R.H. Foote. 1976. Spermagglutinin titers and their relationship to fertility in isoimmunized female rabbits. *Steril. Fertil.*, 27:293-298.
11. Landsteiner, K. 1899. Zur kenntnis der spezifisch auf blutkorperchen wirkenden sera. *centralbl. f. Bakt.* 25:546. (cited in Hunter and Hafs. 1964. Antigenicity and cross-reactions of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 7:357-365.
12. Lee, Y.W. 1984. Studies on antigenicities of sperm and seminal plasma and effects of their antibodies on fertilization in rabbit. A thesis for the degree of Ph.D., Chung-Ang University, Seoul, Korea.
13. Lippes, J., R.G. Enders, D.A. Pragay and W.R. Bartholomew. 1972. Collection and analysis of human fallopian tube fluid. *Contraception*, 85:103.
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265.
15. McAnulty, P.A. and D.B. Morton. 1978. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 1:255-260.
16. Menge, A.C. and M.E. Lieberman. 1974. Antifertility effects of immunoglobulins from uterine fluids of semen-immunized rabbits. *Biol. Reprod.*, 10:422-428.
17. Menge, A.C. and C.H. Fleming. 1978. Detection of sperm antigens on mouse ova and early embryos. *Dev. Biol.*, 63: 111-117.

18. Metalnikoff, S. 1900. Studes sur la spermotoxine. *Ann Inst. Pasture*, 14:577-589. cited in: T. Albert. 1961. Approaches to the control of fertility based on immunological phenomena. *J. Reprod. Fertil.*, 2:473-506.
19. Moghissi, K.S. 1970. Human fallopian tube fluid I. protein composition. *Fertil. Steril.*, 21:821-829.
20. Oliphant, G., P. Randall and C.L. Cabot. 1977. Immunological components of rabbit fallopian tube fluid. *Biol. Reprod.*, 16: 463-469.
21. Parr, M.B. and E.L. Parr. 1985. Immunohistochemical localization of immunoglobulins A, G and M in the mouse female genital tract. *J. Reprod. Fertil.*, 74:361-370.
22. Schumacher, G.F.B. 1980. Hormonal immune factors in the female reproductive tract and their changes during the cycle. *In: Immunological Aspects of Infertility and Fertility Regulation* (D. Dhindsa and G. Schumacher, eds). Elsevier/North-Holland, New York, pp. 93-141.
23. Shapiro, S.S., J.P. Jentsch and A.S. Yard. 1971. Protein composition of rabbit oviductal fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 24:403-408.
24. Stavitsky, A.B. 1954. Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. procedures and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tennic acid and protein treated red blood cells. *J. Immunol.*, 72:360.
25. Stevens, K.R., H.D. Hafs and A.G. Hunter. 1964. Immunochemical and electrophoretic properties of oestrus rabbit uterine fluid proteins obtained by uterine ligation. *J. Reprod. Fertil.*, 8:319.
26. Symons, D.B.A. and J. Herbert. 1971. Incidence of Immunoglobulins in fluids of the rabbit genital tracts and the distribution of IgG-globulin in the tissues of the female tract. *J. Reprod. Fertil.*, 24:55-62.
27. Voller, A., D.E. Bidwell and A. Bartlett. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate application Nuffield laboratories of comparative medicine, the Zoological Society of London, Regent's Park, London, NW1.
28. Wegmann, T.G. and T.J. Gill III. 1983. Experimental models of autoimmunity and isoimmunity to sperm. *In: Immunology of Reproduction*, Oxford University Press, Inc., Oxford, pp. 404-423.