

Progesterone 단일클론항체의 수동면역이 Mouse 수정란의 착상저해에 미치는 효과

김정우·김종배*·정길생*·고대환**

단국대학교 농과대학

Antifertility Effect of Passive Immunization against Progesterone Monoclonal Antibody in Mice

Kim, J.W., J.B. Kim*, K.S. Chung* and D.H. Ko**

College of Agriculture, Dankook University

SUMMARY

Anti-progesterone monoclonal antibody injected intraperitoneally as a single dose(100 μ g) 48 hours post coitum(p.c.) almostly blocked pregnancy in ICR mice. The blocking rate of pregnancy in mice treated with antibody were decreased proportionally according to dose of antibody injected; the rate were 60%, 57% and 17% as the antibody of 10 μ g, 50 μ g and 100 μ g were injected respectively.

Blood serum progesterone concentration was greatly increased(21 times) after treatment(100 μ g), by virtue of high-affinity binding by antibody in circulation of non-pregnant mice in compared with that of control group at day 10 p.c..

The concentration was about 1.6 times higher in the pregnant mice than in the non-pregnant mice in antibody treated group. In control group, the progesterone concentration was over 7 times higher in the pregnant mice than in non-pregnant mice at day 5 p.c..

I. 緒 論

지금까지 널리 사용되는 피임방법은 주로 도구를 이용하는 방법과 약품사용법이다. 그러나 사용상의 문제점 및 갖가지 부작용 등, 나름대로의 문제점을 갖고 있어(G.I.Zatuchni et al, 1984) 새로운 피임법이 연구되어 오고 있다. 이 중에서 현재 가장 큰 관심의 대상은 면역학적 피임방법(immunocontraception)이다(G.I.Zatuchni et al, 1985). 면역학적 피임방법은 아래와 같이 세 부분으로 대별하여 나눌 수 있다.

첫째, LH, FSH, LH, 또는 hCG와 같은 배란과 관련이 있는 peptide계 호르몬을 불활성화 시키기 위해 이와 같은 호르몬이나 그 유도체를 항원으로 사용하는 소위 항호르몬 vaccine(anti-hormone vaccines)법(Yamamoto et al, 1982; Thau et al, 1983a, 1983b; Yamamoto et al, 1984).

둘째, LDH-C₄ protamine, acrosin, hyaluronidase와 같은 정자의 항원이나 투명대(zona pellucida)와 같은 난자의 발달 및 수정과 관련되는 항원을 이용하는 방법(Drell & Dunbar, 1984; Sacco

1) 본 연구는 한국과학재단 지원연구비에 의하여 수행된 것임(1988-1990)

* 건국대학교 축산대학

** 상지전문대학

et al, 1981; Skinner et al, 1984).

셋째, 상기와 같은 항원을 유전공학적 방법에 의하여 대량 생산하여 vaccine 으로 사용하는 방법들이다.

위의 방법중 첫째방법은 '항 스테로이드 호르몬 백신 (anti-steroid hormone vaccines)법으로서 최근 그 연구가치는 크게 인정되고 있다. Wright 등(1982)과 Rider 등(1984, 1986)은 수정후 착상 및 임신 유지에 직접적으로 관련하는 progesterone 에 대한 단일클론 항체를 mice 에 수동면역하면 수정란의 발달과 착상이 저지된다고 보고하므로써 피임의 가능성을 이미 입증한 바 있다. 그러나 steroid 제 호르몬에 대한 항체를 이용한 방법에 관한 연구는 아직 초기단계이다.

따라서 본 연구는 progesterone 에 대한 affinity 와 특이성이 좋은 단일클론항체를 생산하여 이를 수동면역했을 시 착상저해 및 임신유에 미치는 영향을 조사하여 피임백신으로써의 이용 가능성을 검토함으로써 이에 관한 연구기반 확립을 위한 기초적 자료를 제공하고자 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 단일클론항체의 생산

Progesterone-3 (o carboxymethyl) oxime-Bovine Serum Albumin(P-3CMO BSA)의 합성은 Eshhar 등(1981)의 방법에 의거하여 활성화 된 N-hydroxysuccinimide ester 로 작성한 후, 이를 면역원으로 생후 6~8주 된 BALB/c mouse 의 복강내에 주사하였다. 최종 booster 실시 4일후에 항체 생성이 확인된 BALB/c 생쥐의 비장(spleen)으로부터 분리된 비장세포와 종양세포(SP2/O-Ag14)를 융합하여 잡종세포(hybridoma cell)군을 작성하였으며 항체의 검증(screening)은 RIA 법(Kim 등, 1985)으로 [1, 2, 6, 7- H^{3}]-progesterone 을 tracer 로 사용하여 실시하였다.

RIA 법으로 검증한 결과 강한 양성반응을 보인 hybridoma 군을 선택하여 cloning 을 실시하였다. 2 차 항체검증 결과 강한 양성반응을 보인 well 의 hybridoma 군을 선별하여 배양한 후 BALB/c mice 의 복강내에 주입하여 생성된 복수를 취하는 *in vivo* 법으로 항체를 대량 생산하였다. 복수로부터 단일클론 항체의 분리 정제는 먼저 Neoh 등(1986)의 방법에 따

라 지방제거 후, Protein A-Sepharose CL-4B Affinity Chromatography 법(Ex, 1978)으로 실시하였다.

생산된 단일클론항체의 특성조사에서 항체의 sensitivity 는 RIA 의 standard curve 의 결과를 이용 Kim(1983)의 방법에 의하여 결정하였고, Titer 의 결정은 tracer (3H -progesterone)와 50% 반응을 보이는 때의 항체희석치로써 실시하였다(Abraham, 1975). 항체의 specificity 는 Thorneycroft(1970)방법에 의하여 각종 관련 steroid hormone 들과의 교차 반응 정도로 조사하였다. 항체(Ig)의 isotype 은 Sandwich ELISA 법과 double immunodiffusion 법으로 결정하였다.

2. Progesterone 단일클론항체의 수동면역

수동면역은 상숙된 ICR mice 에 PMSG 와 hCG 를 주사하여 과배란을 유도한 후, plug test 에 수컷과의 교미가 확인된 암컷의 체내에 정제된 progesterone 단일클론항체(1.125mg/ml)를 각 처리별로 마리당 5 μ g, 20 μ g, 50 μ g, 100 μ g 씩 복강내 주사하고 교미후 10일 경에 자궁을 적출하여 수정란의 착상 여부를 조사하였다(Fig. 1). 이때 비교군으로 사용된 control mouse 에게는 항체대신 saline 을 동량 주사하여 상호 비교하였다.

Progesterone 단일클론항체의 수동면역에 대한

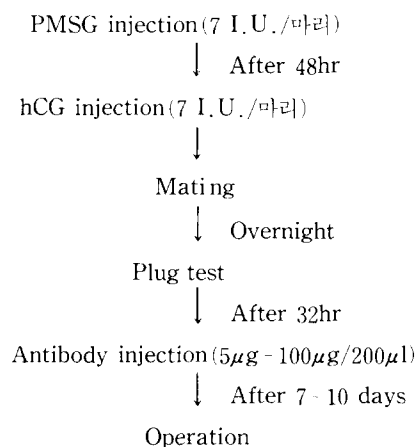


Fig.1. Schematic procedure of passive immunization with monoclonal antiprogestosterone.

mouse의 혈중 progesterone 농도의 변화양상을 조사하기 위하여 mouse의 꼬리 및 심장에서부터 혈액을 시기별로 항체의 주입 직전(plug test 후 30시간), 주입후 5일과 10일에 채취하여 serum을 분리하였다. 분리된 혈청은 RIA법에 의하여 progesterone의 농도를 측정하였다.

III. 結果 및 考察

1. Progesterone 단일클론항체의 특성

생산된 항체의 isotype을 결정하기 위하여 Sandwich ELISA 법과 double immunodiffusion 법을 사용하였다. Table 1에 나타난 Sandwich ELISA 법의 결과에서 볼 수 있듯이 AG71F2, BB71E3은 IgG₁ class, AG7은 IgM과 IgG₁ class의 혼합, BB7은 IgG₁과 IgG_{2a}의 혼합, BE51G5는 IgM과 IgG_{2b} class의 혼합 그리고 DC9는 IgM class를 분비하는 clone임이 확인되었다. ELISA 법에서 IgG₁으로 결정된 BB7, BB71B10, BB71E3을 다시 double immunodiffusion 법으로 확인한 결과 IgG₁으로 동일한 결과를 나타내었다.

항체의 역가를 RIA에 의한 항체희석곡선으로 결정한 결과, 1:3,100에서 1:3,800까지 각기 다른 항체 역가를 나타내었다. 이 중에서 IgG₁ class인 BB71E3과, IgM과 IgG_{2b}가 혼합되어 있는 BE51G5는 progesterone과의 경쟁성을 보기 위해서 항체희석곡선을 1ng의 progesterone 존재하에서와 없는 상태에서 작성하였던 바, 1ng의 progesterone 존재하에서는 두 항체 모두 [³H]-progesterone의 반응을 억제하

여 좋은 경쟁반응을 나타내었다.

생산된 항체의 특이성을 조사하기 위하여 우선, BE51G5와 BB71E3 항체를 선택하여 progesterone과 유사한 구조를 갖는 여러 steroid hormone들과의 교차반응 정도를 Thorneycroft 등(1970)의 방식에 의거 계산하였을 때, 특기할만한 사실은 일반적으로 progesterone에 대한 항체는 11 α -hydroxy-progesterone과 11 α -hydroxyprogesterone과 높은 교차반응을 나타내고 있으나(Kim et al, 1983; Wright et al, 1982), 본 연구에서 조사된 두 단일클론항체는 3% 미만으로 낮은 교차반응을 나타내었다.

또한 생리적 활성을 갖고 있는 주요 steroid hormone인 cortisol, testosterone, estradiol 등과는 0.1% 이하로 거의 교차반응을 나타내지 않았으나 20 α -hydroxyprogesterone과는 각각 12.5%, 33.9%로 다소 높게 나타났다. 그러나 20 α -hydroxyprogesterone은 혈액중에 거의 함유되어 있지 않으므로 BB71E3와 BE51G5 항체를 progesterone 측정을 위한 면역분석법에 사용할 때 문제가 되지 않는다고 사료된다. 따라서 본 연구에서 조사된 두 항체는 그 특이성이 매우 좋은 항체인 것으로 판단되며 progesterone 측정을 위한 면역분석법 개발이나 그의 관련연구에도 충분히 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

2. Progesterone 단일클론항체의 수동면역

Progesterone에 대한 단일클론항체가 착상 저하에 미치는 효과를 조사하기 위하여 PMSG와 HCG로 mouse를 과배란시킨 후 교배시켜 plug test로 교미여부를 확인하고 정제된 단일클론항체(BE51G5,

Table 1. Identification of monoclonal antibody isotype.

Cell line*	AG7	AG71F2	BB7	BB71B10	BB71E3	BE51G5	DC9
-anti-IgM	0.54	0.11	0.09	0.11	0.16	0.75	0.66
-anti-IgG ₁	0.48	0.51	0.50	0.52	0.51	0.17	0.14
-anti-IgG _{2a}	0.11	0.17	0.37	0.14	0.15	0.10	0.08
-anti-IgG _{2b}	0.36	0.34	0.13	0.17	0.24	0.71	0.19
-anti-IgG ₃	0.13	0.21	0.18	0.20	0.19	0.21	0.16
-anti-IgA	0.07	0.15	0.09	0.11	0.10	0.09	0.27
Blank	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Conclusion	M, G ₁	G ₁	G ₁ , G _{2a}	G ₁	G ₁	M, G _{2b}	M

*subtyping antisera

BB71E3)를 각각 10 μ g, 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g씩 복강내에 주사한 후 7~12일에 자궁을 적출하여 수정란의 착상 여부를 조사하였던 바, Fig. 2에 나타난 바와 같이 임신이 된 것과 안된 것을 확연히 구분할 수 있었다.

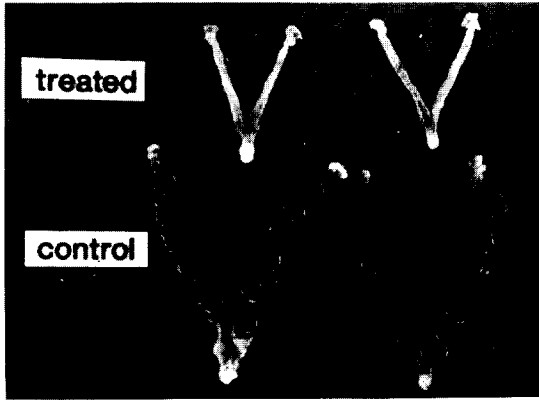


Fig. 2. The contraception effect of passive immunity with progesterone monoclonal antibody (McAb. BB7).

(1) 항체의 수동면역에 따른 수정란 착상의 저해효과
항체를 농도수준별로 ICR mice와 BALB/c mouse에 수동면역시킨 후 착상의 저해 여부를 조사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 대조구(0 μ g, saline 200 μ l)에서는 평균 84.6%가 착상이 되었는데 비하여 10 μ g 처리구는 60%, 50 μ g 처리구는 57%, 100 μ g 처리구는 17%이며 200 μ g 처리구에서는 12%의 착상율을 보였다. 즉 항체의 투여농도가 높아질수록 수정란의 자궁내 착상을 저해하는 정도는 높아지는 것으로 판명되었다.

한편 Yoon 등(1989)의 결과에 의하면 0.75 nmol (약 100 μ g) 및 1.5 nmol(약 200 μ g) 투여시의 착상율은 각각 15%와 29%로써 본 실험의 결과와 비슷하였으며, 4 nmol(약 600 μ g) 이상의 항체를 투여할 경우 수정란 착상의 저해효과는 100%라고 보고하였다.

Rider 등(1985)은 항체의 농도를 740 μ g(6 nmol)이상 투여시 피임효과가 100%라고 보고하였다.

Wang 등(1984)은 1,000 μ g 투여시에 BALB/c mice에서는 100%, CBA mice에서는 62.5%의 착상저해 효과를 얻었으며, 1,600 μ g(13 nmol) 투여시에 모든 strain에서 100%의 피임효과를 얻었다고 보고하였다. 따라서 항체의 투여농도를 적어도 600 μ g 이상으로 증가할 경우 피임의 효과를 100% 수준까지 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

한편 progesterone 단일클론항체를 rat에 수동면역시 임신에 미치는 영향을 조사해 보고자 실험과정을 mouse에서의 경우와 동일한 방법으로 실시하였다. 시험군의 경우 항체를 10 μ g과 20 μ g씩 주사하여 임신 여부를 조사한 결과, 대조군에서는 100% 임신되었고 시험군 중 10 μ g 군은 대조군과 동일한 결과인 100%가 임신되었으며 20 μ g 군에서도 75% 정도가 임신된 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 rat의 경우는 mouse에 비해 항체의 주입용량이 더욱 많이 필요할 것으로 추정된다.

(2) 항체의 수동면역이 mice의 혈중 progesterone 수준에 미치는 영향

Progesterone의 단일클론항체를 mouse에 투여후 혈중 progesterone의 농도수준의 시기별 변화상을 조사하기 위해 항체주입 직전, 주입후 5일과 10일에 각 개체로부터 혈액을 채취하여 분리된 혈청 sample에 대한 progesterone의 양적측정을 RIA법에 의하여

Table 2. The results of passive immunity against progesterone McAb.

Treatment	Strain	No. of mated	No. of pregnant	No. of non-pregnant	No. pregnant No. mated
control	ICR	21	18	3	86%
(0 μ g)	BALB/c	5	4	1	80%
10 μ g	ICR	30	18	12	60%
50 μ g	"	28	16	12	57%
100 μ g	"	24	4	20	17%
200 μ g	BALB/c	17	2	15	12%

Table 3. Progesterone concentration of blood serum in control- and Monoclonal antibody treated mice during 10 days after injection.

Treatment	Pregnant			Non-pregnant		
	day 0 ¹⁾	day 5	day 10	day 0	day 5	day 10
control	8.6 ± 2.6	31.2 ± 8.0	24.6 ± 9.5	4.8 ± 0.0	4.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0
10 μ g	7.7 ± 3.1	23.6 ± 8.2	18.7 ± 7.2	6.4 ± 5.0	11.9 ± 5.3	8.3 ± 14.1
50 μ g	9.3 ± 7.5	22.2 ± 0.7	14.8 ± 7.4	9.5 ± 3.3	10.1 ± 3.3	5.9 ± 6.9
100 μ g	7.1 ± 5.6	24.7 ± 3.0	14.0 ± 7.0	11.2 ± 10.7	22.1 ± 14.2	8.7 ± 9.0
Control 100 μ g	83%	78%	57%	233%	514%	2.175%

1) day 0 : on the day of antibody injection (32 hrs after plug test)

day 5 : 5 days after antibody injection

실시하였다.

수동면역 후 임신이 확인된 ICR mice의 혈청중 progesterone의 수준은 Table 3과 Fig. 3 및 Fig. 4에 나타난 바와 같이 투여된 항체의 농도가 높아질수록 progesterone의 농도는 대조군에 비하여 낮아지는 현상을 보였으며, 특히 투여 후 10일경의 수준은 대조군에 비하여 현저히 낮았다(57%). 이 기간에는 투여된 항체의 농도와 혈청중 progesterone의 수준 간에는 유의적인 부의 상관관계($r = -0.393$; $p < 0.02$)를

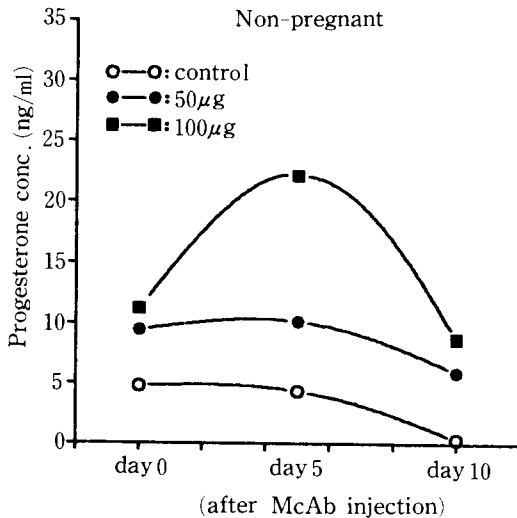


Fig. 3. Concentration of serum progesterone in control- and antibody treated non-pregnant mice.

보였다.

한편 Wang 등(1984)은 항체 투여 후 착상이 저해된 mice에 있어서, 교미 후 10일경의 plasma progesterone 농도는 임신이 확인된 대조군의 농도보다 4배나 높았다고 보고하였으며 Yoon 등(1989)의 연구결과도 유사한 경향을 나타내고 있다.

본 실험에서는 교미후 5일경 불임이 확인된 항체투여(100 μ g) mice의 serum progesterone 농도는 임신이 확인된 대조군의 농도와 유사한 수준을 나타내고

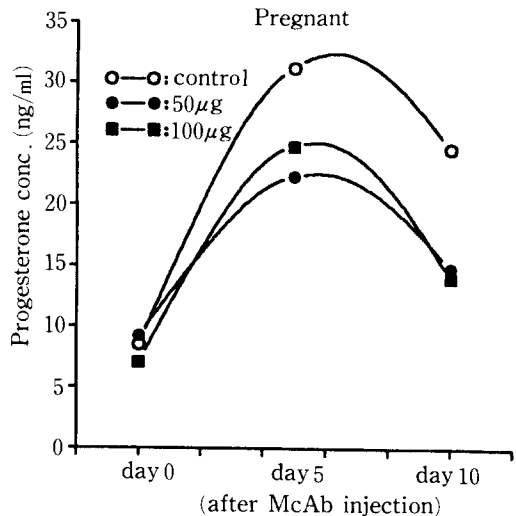


Fig. 4. Concentration of serum progesterone in control- and antibody treated pregnant mice.

있으며, 교미후 10일경에는 대조군보다 2배 이상 저하되는 현상을 보이고 있다. 이러한 결과의 차이는 본 실험에서 투여된 항체의 최고농도가 상기 연구자들이 사용한 농도의 1/6 정도로 낮은 수준이며 또한 progesterone 측정을 위해 채취된 sample 이 plasma 가 아닌 serum 이기 때문에 이들간에 함유된 progesterone 의 농도 차이에 기인된 것으로 사료된다.

한편 불임이 확인된 mice 의 경우, 시험군의 혈청중 progesterone 의 농도수준은 대조군에 비하여 전기간에 걸쳐 현저히 높게 나타났다. 특히 이러한 현상은 항체 투여후 5일경부터 더욱 뚜렷하게 나타나고 있으며 이 시기에 항체의 투여농도와 혈중 progesterone 농도 수준 간에는 유의적인 정의 상관관계($r=0.459$; $p<0.05$) 보이고 있다.

본 결과는 Yoon 등(1989)과 Wang 등(1984)의 결과와 일치되는 경향을 보이고 있다. 비임신중에도 혈중 progesterone 의 농도가 매우 높게 나타난 원인은 본 실험의 성격상 명백히 규명될 수는 없으나 Wright 등(1982)의 보고에 의하면 혈중 progesterone 중 95% 이상이 단일클론항체와 결합되므로 인하여 실질적으로는 표적수용체(target receptor)와 결합할 수 없는 상태로 되기 때문일 것으로 추측하고 있다.

(3) Progesterone 단일클론항체의 투여에 따른 태아의 착상부위와 퇴화현상

항체의 투여 후 착상된 태아의 수는 Table 4에 제시된 바와 같이 대조군에 비하여 다소 적었으며 퇴화된 태아의 숫자는 대조군에 비하여 많은 것으로 나타났다.

항체의 투여후 10일경에 자궁내 태아의 착상부위를 조사한 결과 대조군에서는 양쪽 자궁에 착상된 태아의 수가 비슷하였으나 항체 투여군에서는 Fig. 5에 나타난 바와 같이 오른쪽 자궁보다 왼쪽 자궁에 착상된 태아의 수가 많았으며 특히 100 μ g 수준의 항체를 투여한

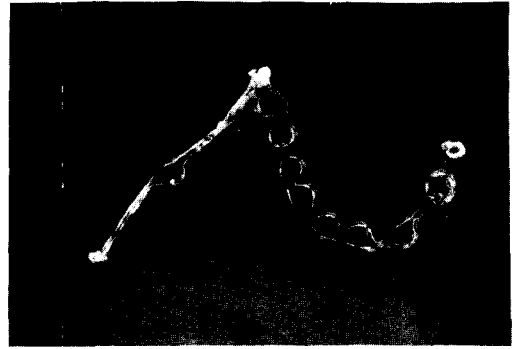


Fig. 5. Degeneration effect of fetus in case of pregnant mice treated with progesterone McAb.

mice 의 경우 착상된 태아의 수는 오른쪽 자궁에 4.3개, 왼쪽 자궁에 6.0개로서 대조군의 경우인 5.9개 및 6.1개에 비하여 착상된 태아의 수는 오른쪽 자궁에 현저히 적었으며 퇴화된 태아의 수도 많았다. 이와 같은 현상은 본 실험을 수행하는 과정에서 항체의 투여 부위를 오른쪽 자궁으로 선정함으로써 인하여 착상된 태아의 수도 오른쪽 자궁에서 적었고 또한 태아의 퇴화현상도 많이 발생된 것으로 추측된다.

실론적으로 위의 현상을 종합해 보면 항체의 수동면역은 태아의 착상을 저지하는 효과와 아울러 이미 착상된 태아도 퇴화시키는 효과가 있는 것으로 판단된다.

IV. 摘 要

Progesterone 단일클론항체의 수동면역이 mice 수정란의 착상저해에 미치는 효과를 조사한 결과 대조군에서는 86%가 착상되었는데 비하여 항체의 투여농도

Table 4. Effects of anti-progesterone antibody on the implanted number of fetus and degeneration of fetus.

Treatment	N	No. of fetus		No. of fetus degenerated	
		right	left	right	left
control	7	5.9	6.1	0	0
10 μ g	9	5.1	5.6	0.1	0.1
50 μ g	14	6.0	6.1	0.4	0.3
100 μ g	3	4.3	6.0	0.3	0

가 10 μ g 인 시험군에서는 60%, 50 μ g 투여군은 57%, 100 μ g 투여군은 17% 그리고 200 μ g 투여군은 12%의 착상율을 보였다. 즉 항체의 투여농도가 높아질수록 수정란의 자궁내 착상저해 효과는 높아지는 것으로 판명되었다.

항체의 수동면역 10일 후, 임신이 확인된 mice의 혈청중 progesterone의 수준은 투여된 항체의 농도가 높아질수록 대조군에 비하여 낮아지는 현상을 보였다. 한편, 착상저해가 확인된 mice의 경우, 항체 투여군의 혈청중 progesterone의 농도는 대조군에 비하여 전 기간에 걸쳐 현저히 높게 나타났다. 특히 이러한 현상은 항체 투여후 5일경 부터 더욱 뚜렷하였다.

항체 투여후 임신이 확인된 mice의 자궁내 수정란 착상부위를 조사한 결과 대조군에서는 좌우 자궁각에 착상된 수정란의 수는 동일하였으나 항체 투여군(100 μ g)의 경우 착상된 태아의 수는 우측 자궁각에 4.3개, 좌측 자궁각에는 6.0개로서 항체의 투여부위인 우측 자궁각 쪽에서 현저히 적었다. 이 현상은 항체의 수동면역이 태아의 착상을 저해하는 효과와 아울러 이미 착상된 태아도 퇴화시키는 효과도 있는 것으로 판단된다.

V. 引用文獻

1. Abraham, G.E. 1975. Characterization of anti-steroid antisera. In: Cameron, E.H. D., Hiller, S.G., Griffiths, K(eds). Steroid immunoassay, Alpha Omega Publishing Ltd 67-78.
2. Drell, D.W. and B.S. Dunbar. 1984. Monoclonal antibodies to rabbit and zonae pellucidae distinguish species-specific and shared antigenic determinants. Biol. Reprod., 30: 445-457.
3. Eshhar, Z., J.B. Kim, G. Barnard, W.P. Collins, S. Gilad, H.R. Linder, F. Kohen. 1981. Use of monoclonal antibodies to pregnanediol- α -glucuronide for the development of solid phase chemiluminescence immunoassay. Steroids, 38: 89-109.
4. Ey, D.L., S.J. Prowse and C.R. Jenkin. 1978. Isolation of pure IgC₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}

immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. Immunochemistry, 15: 429-436.

5. Eshhar, Z., J.B. Kim, G. Barnard, W.P. Collins, S. Gilad, H.R. Linder and F. Kohen. 1981. Use of monoclonal antibodies to pregnanediol- α -glucuronide for the development of solid phase chemiluminescence immunoassay. Steroids, 38: 89-109.
6. Kim, J. B. 1983. Development of chemiluminescence immunoassay for the measurement of plasma steroids and urinary metabolites. Ph.D. Thesis, London University.
7. Neoh, S.H., Colin Gordon, Angela Potter and Headdy Zola. 1986. The purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluids. J. of Immunol Methods, 91: 231-235.
8. Rider, V, A. McRae, R. B. Heap and A. Feinstein. 1985. Passive immunization against progesterone inhibits endometrial sensitization in pseudopregnant mice and has antifertility effects in pregnant mice which are reversible by steroid treatment. J. Endocr., 104: 153-158.
9. Rider, V. and R.B. Heap. 1986. Heterologous anti-progesterone monoclonal antibody arrests early embryonic development and implantation in the ferret. J. Reprod. Fert., 76: 459-470.
10. Sacco, A.G., E.C. Yurewicz, H.G. Subramanian, F.J. DeMayo. 1981. Zona pellucida composition, species cross-reactivity and contraceptive potential of antiserum to purified pig zona antigen. Biol. Reprod., 25: 997-1008.
11. Skinner, S.M., T. Mills, H.J. Kirchick, B.S. Dunbar. 1984. Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadoovarian injured steroid secre-

- tion. *Endocrinology* 115: 2418-2432.
12. Thau, R.B., Y. Yamamoto, K. Sundaram, P.G. Spinoda. 1983a. hCG stimulates luteal function in Rhesus monkeys immunized against the β -subunit of ovine LH. *Endocrinology* 112: 277-241.
 13. Thau, R.B., S.S. Witkin, M.G. Bond, J. K. Sawyer, Y. Yamamoto. 1983b. Effects of long-term immunization against the β -subunit of ovine luteinizing hormone on circulation immune complex formation and on arterial changes in Rhesus monkeys. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 3: 83-87.
 14. Thorneycroft, S., G.E. Tillson, R.J. Abraham, B.V. Scaramuzzi, Caldwell. 1970. In: Person, F.G. Caldwell, B.V. (eds) *Immunological methods in steroid determination*. Appletton-century-crofts. New York, 63-86.
 15. Wang, M.Y., V. Rider, R.B. Heap and A. Feinstein. 1984. Action of anti-progesterone antibody in blocking pregnancy after post-coital administration in mice. *J. Endocr.* 101: 95-100.
 16. Wright, L.J., A. Feinstein, R.B. Heap, J.C. Saunders, R.C. Bennett, M.Y. Wang. 1982. Progesterone monoclonal antibody blocks pregnancy in mice. *Nature* 295: 415-417.
 17. Yamamoto, Y., G.L. Gunsalus, K. Sundaram, R.B. Thau. 1984. Antibodies against the subunit of ovine luteinizing hormone can decrease the clearance of hCG in Rhesus monkeys. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 5: 167-169.
 18. Yoon, D.Y., J.W. Kim, S.W. Hwang., M.J. Choi, I.S. Choe, J.B. Kim and T. W. Chung. 1989. Antifertility effect of progesterone antibodies in mice. *Arch. Pharm. Res.* 12(4): 269-275.
 19. Zatuchni, G.I., A. Goldsmith., J.J. Sciarra. 1984. *Intrauterine contraception: advances & future prospects*. ib Harper & Row, Publishers, Philadelphia.
 20. Zatuchni, G.I., A. Goldsmith & J.M. Spieler. 1985. *Male contraception: advances & future prospects*, *ibid.*