

불임여성중에 존재하는 투명대 자가항체의 측정과 이들 항체가 생쥐난자의 체외수정에 미치는 영향

정형민, 조인제*, 김종배, 이훈택, 정길생

건국대학교 축산대학

Detection of Autoantibodies to Zona Pellucida in Infertile Women and Their Effect on *In Vitro* Fertilization of Mouse Eggs

Chung, H.M., I.J. Cho*, J.B. Kim, H.T. Lee, and K.S. Chung

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were carried out to detect autoantibodies to zona pellucida in sera from infertile women using indirect ELISA and IFA and to investigate their effect on *in vitro* fertilization of mouse ova.

In indirect ELISA test, 12 of 116 (10.3%) serum samples from infertile women gave positive reaction whereas all of 16 samples from fertile women and men were negative. Furthermore, in indirect IFA test, 17 of 116 (14.7%) serum samples from infertile women gave positive fluorescence whereas all of control sera were negative fluorescence. The fertilization rates (15.9%) of mouse eggs treated with positive sera were significantly lower than those (51.9~71.2%) of eggs treated with control sera. From those results it could be suggested that the autoantibodies to zona pellucida are responsible for infertility in unexplained infertile women, presumably by preventing sperm attachment and penetration.

I. 서론

투명대는 포유동물의 난자를 둘러싸고 있는 extracellular matrix로서 정자의 수용체 (receptor)가 존재하며 수정 및 배발달에 중요한 역할을 수행한다 (Bleil과 Wassarman, 1980; Dunbar 등, 1980). 또한 투명대는 난소에 대하여 최소 한개 이상의 항원을 가지고 있어서 동물의 면역기전에 의해서 이에 대한 항체를 생산할 수 있다 (Shivers 등, 1978; Gwatkin 등, 1977). 이러한 항체는 조직특이성 (tissue specificity)은 가지고 있지만 종간의 특이성 (species specificity)은 존재하지 않는 것으로 알려져 있는데

(Dunbar 등, 1980) 어떤 종의 투명대에 대한 항체는 인간 포함한 다수의 포유동물의 난자의 투명대와 교차 반응 (cross reaction)을 하며 (Sacco 등, 1981), 특히 투명대에 침전층을 형성하여 체내 혹은 체외수정시 정자의 부착과 침입을 억제함으로써 불임을 유도한다고 보고되어 있다 (Sacco, 1976; Gwatkin 등, 1977; Kamada 등, 1984). 따라서 지금까지 인간에 있어서 이러한 투명대항체를 측정하고자 하는 여러 가지 방법 즉, 간접면역형광 분석법 (indirect immunofluorescence assay; IFA) (Nayadu 등, 1982a, b; Nishimoto 등, 1980), 방사선면역분석법 (radio-immunoassay; RIA) (Kurachi 등, 1984; Sub-

*건국대학교 의과대학 (College of Medicine, Kon-Kuk University)

ramanian 등, 1979) 등을 이용하여 여성의 혈청에서 투명대 항체를 측정함으로써 불임증의 진단 혹은 피임 vaccine의 개발 등을 연구하고 있다. 그러나 상기 서술된 방법들은 비특이적 반응(nonspecific binding; NSB)이 높고 재현성에 문제가 제기되고 있는 실정이라서 투명대항체를 이용하는 임상적 연구가 지연되고 있는 실정이다.

이에 본 연구에서는, 투명대 항체 측정방법을 좀더 개량하고 또한 이들 투명대 항체의 생물학적 작용을 검토하기 위하여 생쥐와 돼지의 투명대를 항원으로 하여 생산한 항체를 이용하여 간접효소면역분석법과 간접형 광분석법을 병용하여 불임여성중의 투명대 자가항체의 빈도를 조사함과 아울러 이들 항체의 생물학적 검증을 위하여 생쥐난자의 체외수정을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 투명대 항체의 생산

1) 투명대의 분리와 면역원의 준비

면역원(immunogen)으로 생쥐와 돼지의 투명대를 공시하였다. 먼저 생쥐의 투명대는 ICR 계통의 자성 생쥐에 다배란을 유도한 후, 난자를 회수하여 0.1% hyaluronidase 용액으로 난구세포를 제거한 후, 직경이 50~60 μ m인 micropipette으로 강한 pipetting 조작을 통하여 투명대만을 분리하였다. 한편, 돼지의 투명대는 도축장에서 적절한 난소에 존재하는 가시난포의 난포란을 10ml 주사기로 흡인, 분출하므로 난구세포를 제거한 다음 70 μ m의 micropipette으로 전술한 방법에 준하여 투명대만을 순수 분리하였다. 회수된 투명대는 0.05M Carbonate-bicarbonate buffer로 3회 세척한 다음, 각각의 시험관에 900개씩 넣고 65°C에서 90분간 처리하여 얻은 투명대 용액을 Freund's Adjuvant(Rharmacia Co., USA)와 1:1의 비율로 혼합한 것을 면역원으로 사용하였다.

2) 투명대 항체의 생산

제조된 면역원을 Japanese giant 웅성가토에 1주 간격으로 4회 피내주사하여 면역화를 유도하였다. 3회 피내주사한 후, 가토의 이정맥에서 혈액을 채취하여 항체의 형성 유무를 확인한 다음, 최종 면역후 5일째에 전채혈을 실시하고, 채취된 혈액은 즉시 혈청만 분리한 후, 56°C에서 30분간 처리하여 비동화시키고 0.22 μ m

의 milipore filter로 여과하여 -20°C에서 보존하면서 사용하였다. 한편, 대조혈청으로는 면역화 직전에 채취한 가토혈청을 사용하였다. 그리고 항체의 형성 유무를 확인하기 위한 방법으로는 간접효소면역분석법으로 실시하였다(서 등, 1991).

2. 불임여성 혈청의 준비

불임여성의 혈청은 건국대학교 부속 민중병원 불임클리닉에 내원하는 불임여성 116명을 대상으로 채취하였으며, 불임의 원인이 명료한 경우(87명)와 불명료한 경우(29명)으로 분류하였다. 대조혈청으로는, 태아제대혈청(Fetal cord serum; FCS), 임신중의 여성의 혈청(Pregnant women's serum; PWS) 및 생식능력이 2년 이내에 확인된 남성의 혈청의 혈청(Normal men's serum; NMS)을 사용하였다. 채취된 모든 혈청은 모두 56°C에서 30분간 처리하므로서 filter로 여과한 후, -20°C에서 보존하면서 사용하였다.

3. 투명대 자가항체의 측정

1) 간접 효소면역 분석법에 의한 투명대 자가항체의 측정

항체를 측정하기 위하여, 생쥐와 돼지의 투명대를 65°C에서 90분간 처리하여 얻은 투명대 용액을 0.05M Carbonate-bicarbonate buffer(pH: 9.6)에, ml 당 투명대 3개가 되도록 조정된 용액 150 μ l를 96-well polystyrene microtiter plate에 분주하여 4°C에서 overnight 배양함으로써, 투명대를 plate에 고정시키고, 3% BSA가 함유된 PBS로 blocking을 실시한 후, PBS로 5회 세척하였다. 이후 대조혈청과 처리혈청을 1:200, 1:400 및 1:800으로 희석하여, 150 μ l씩 well에 분주한 다음 37°C에서 2시간 동안 반응을 유도시켰다. 이후 0.05% Tween-20을 함유한 PBS 용액으로 세척한 후, Horesradish peroxidase (HRP)가 conjugation된 2차항체 즉 Goat anti-Human IgG(Biodyda, Israel)와 Goat anti-Rabbit IgG(Biodyda, Israel)를 1:500으로 희석하여, 처리된 혈청의 종류에 따라 각각 150 μ l씩 분주한 다음, 37°C에서 재차 반응을 유도하였다.

반응을 유도한 후 PBS-0.05% Tween 20용액으로 세척하고, 0.05% H₂O₂(v/v)와 0.04% O-phenylene diamine(Sigma Co. USA)를 함유한 0.15M Citrate-phosphate buffer(pH: 5.0)을 기질 용액으로 각 well에 150 μ l씩 분주하여 37°C에서 효소

와 기질의 반응을 유도한 후, 2.5M H₂SO₄로 반응을 정지시켜서 ELISA reader (Dynatech, USA)로 492 nm에서 Optical Density (O.D)를 측정하였다. 투명대 자가항체의 유무는 생쥐 및 돼지 투명대에 대한 O.D 값이 대조혈청의 O.D 값에 비해 유의하게 높은 수치를 나타낸 것을 양성반응으로 판정하였다.

2) 간접면역형광 분석법에 의한 투명대 자가항체의 측정

한편, 투명대 자가항체를 측정하기 위한 다른 방법으로서 간접면역 형광분석법을 사용하였다. 먼저 생쥐와 돼지의 미수정란을 회수한 후 대조혈청 혹은 처리혈청이 함유된 배양액에 난자를 침지하여 37°C 조건의 CO₂ 배양기내에서 1시간 동안 배양한 후, 신선 배양액으로 3회 세척한 다음 형광물질인 FITC 가 함유된 2차항체 즉, Goat anti-Human IgG-FITC와 Goat anti-Rabbit IgG-FITC 를 1 : 200으로 희석된 배양액으로 옮겨 1시간 동안 재차 37°C의 CO₂배양기에서 배양한 후 신선배양액으로 5회 세척한 다음 이들 난자를 형광 현미경하에서 관찰하였다. 항체의 존재 유무는 난자의 투명대 부분에 밝은 형광이 나타나는 것을 양성반응으로 판정하였다.

4. 투명대항체가 생쥐난자의 체외수정에 미치는 효과

상기 전술한 간접 효소면역분석법과 간접면역형광분석법에 의하여 양성반응을 나타냈던 불임여성의 혈청과 대조혈청을 이용하여 생쥐난자의 체외수정을 실시하였다.

1) 배양액의 준비

생쥐난자의 체외수정을 위해 사용한 배양액은 수정 Whitten 배양액을 사용하였다. 이들 배양액은 pH 7.2~7.4, 삼투압은 280mOsmol/kg으로 조정하였으며, 사용직전에 여과한 후 4°C에 보존하면서 사용하였다.

실험의 특성상, 배양액에 대한 첨가물로서 상기 항체 측정법에 의해 양성반응을 나타냈던 불임여성 혈청과 대조혈청으로 태아체대혈청 및 정상남성 혈청 각 10%와 0.3% BSA를 사용하였다. 이들 제작된 배양액은 50μl의 배양소적을 제작하여 37°C의 CO₂배양기에서 12시간 이상 전배양을 실시하였다.

2) 체외수정 및 판정

정자의 준비는 생식능력이 확인된 우성 생쥐를 도살하여 정소상체미부로부터 정액을 회수한 다음 37°C의

CO₂배양기에서 1시간 동안 배양시키므로서 수정능 획득을 유도하였다. 한편 난자는 다배란이 유도된 자성생쥐의 난관으로부터 난구세포에 둘러싸인 미수정란을 회수한 다음 이미 준비된 배양 소적으로 옮겨 1시간 동안 전배양을 실시한 다음 수정능이 획득된 정액을 이용하여 수정을 실시하였다. 수정후 8시간째에 난자를 회수한 다음 부착된 정자와 난구세포를 제거한 다음 고정, 염색을 하여 위상차 현미경하에서 수정 여부를 확인하였다. 수정의 판정은 난세포질내에 두개의 전핵과 제2극체의 방출이 확인되는 것만을 수정란으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 간접효소면역 분석법에 의한 투명대 항체의 측정

불임여성의 혈청에서, 투명대 자가항체를 측정하기 위하여, 생쥐와 돼지의 투명대를 항원으로 하여 생산된 항혈청과 인간의 정상혈청에 대한 간접효소면역분석법을

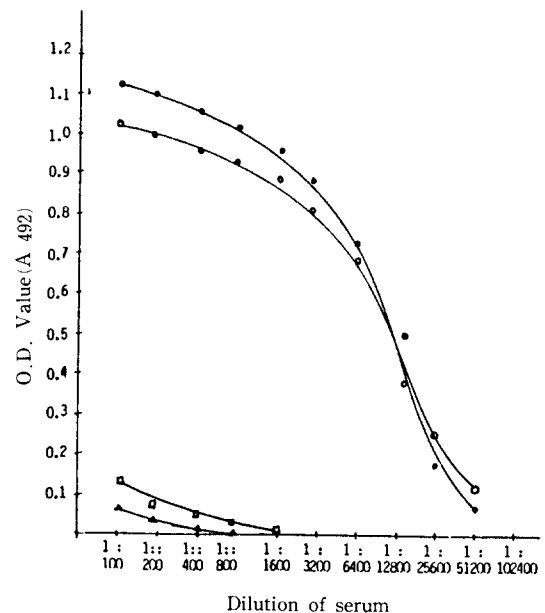


Fig. 1. Dilution curve of anti-zona pellucida antiserum and control serum

- Rabbit anti porcine zona pellucida antiserum
- Rabbit anti mouse zona pellucida antiserum
- Fetal cord serum
- △-△ Pregnant women's serum

실시하였는 바 그 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같았다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이, 생산된 생쥐 및 돼지 투명대 항혈청은 모두, 항원인 생쥐와 돼지의 투명대와 상당히 높은 반응을 나타냄으로서, 본 연구에서 생산한 항혈청이 투명대에 대한 항혈청이라는 것을 확인할 수 있었고, 또한, 희석농도 1:15,200까지 측정이 가능하였다. 그리고, 대조혈청으로 사용한 태아제대혈청 및 임신여성혈청의 경우에는, 희석배율이 1:100에서 투명대와 반응하는 것으로 보아, 생쥐와 돼지의 투명대는 인간의 혈청과 교차반응을 한다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 희석배율이 증가함에 따라서 반응정도는 낮아졌으며, 특히, 희석배율이 1:1,600에서는 반응이 나타나지 않았다. 이러한 결과를 기초로 하여, 불임여성의 혈청 116개와 대조혈청인 태아제대혈청, 임신여성혈청 및 정산남성혈청 각 5개와 면역화 직전에 채혈한 가토혈청을 1:200, 1:400 및 1:800으로 희석하여 간접효소면역분석법으로 투명대 자가항체를 측정할 때 Table 1에서 보는 바와 같았다.

상기 Table 1에서 보는 바와 같이 총 116명의 불임여성의 혈청에 대한 투명대항체의 빈도를 조사한 결과 12명(10.3%)에서 투명대 항체의 존재가 확인되었다. 이를 불임의 원인에 따라 분석하면, 불임의 원인이 명료한 경우 87명중 5건(5.7%)가 불임의 원인이 불명료

한 경우 29명중 7명에서 투명대 항체가 존재하는 것으로 나타나 투명대항체 빈도율은 24.1%로서 원인불명의 불임여성에 있어서 상당히 높은 비율의 투명대 자가항체가 존재한다는 것을 알 수 있었다($P<0.05$). 그러나 대조혈청군에서는 어떤 군에서도 투명대 항체는 검출되지 않았으며 불임여성의 혈청과 대조혈청 사이에는 유의한 차이가 인정되었다($P<0.01$).

2. 간접면역형광분석법에 의한 투명대 자가항체의 측정

한편 간접 효소면역법과 더불어 다른 투명대 항체를 검정하기 위한 방법으로서 간접면역형광분석법을 실시하여 Table 2와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

상기 표에서 보는 바와 같이 간접면역형광분석법을 실시한 결과 총 116명의 불임여성 혈청중 양성반응이 나타난 것은 14.7%인 17명으로서 간접효소면역 분석법의 결과와 대체로 유사한 결과를 얻었다. 이를 구체적으로 살펴보면 불임의 원인이 명료한 경우 87명중 7(8.0%)명이었으며 불임의 원인이 불명한 경우는 29명중 34.5%인 10명으로서 원인불명의 군에서 유의적으로 높은 투명대 자가항체가 존재한다는 것을 알 수 있었다($P<0.01$).

한편 대조혈청의 경우 어느 혈청에서도 투명대 항체는 나타나지 않으므로 본 연구에서 사용한 간접효소면

Table 1. Incidence of anti-zona pellucida activity in sera from infertile and control subjects by indirect ELISA

Serum subject	No. of serum samples examined	Indirect ELISA	
		No. of positive sera	% of positive sera
INFERTILE WOMEN			
Explained infertile	87	5	5.7*
Unexplained infertile	29	7	24.1**
Total	116	12	1003*
CONTROL SUBJECTS			
Fetal cord serum	5	0	0
Pregnant women serum	5	0	0
Normal man serum	5	0	0
Normal rabbit serum	1	0	0
Total	16	0	0

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

Table 2. Incidence of anti-zona pellucida activity in sera from infertile and control subjects by indirect IFA

Serum Subject	No. of serum samples examined	Indirect IFA	
		No. of positive sera	% of positive sera
INFERTILE WOMEN			
Explained infert.	87	7	8.0*
Unexplained infert.	29	10	34.5**
Total	116	17	14.7*
CONTROL SUBJECTS			
Fetal cord serum	5	0	0
Pregnant women serum	5	0	0
Normal man serum	5	0	0
Normal rabbit serum	1	0	0
Total	16	0	1

*P<0.05, **P<0.01

역분석법이나 간접면역형광분석법이 상당히 투명대 항체를 검정하기 위한 안정된 방법이라는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과는 Shivers와 Ownby(1977)가 원인불명 불임여성의 혈청에 대하여 간접형광분석법을 이용하여 투명대 자가항체를 조사한 결과 27.3%에서 항체가 존재한다는 보고와 대체적으로 일치되는 결과라 하겠다.

3. 생쥐난자의 체외수정

투명대 항체의 생물학적 작용을 규명하기 위한 방법

으로서 상기 두가지 면역분석법을 이용하여 양성반응을 나타낸 17명의 불임여성 혈청과 대조혈청이 첨가된 배양액으로 생쥐의 체외수정을 실시하여 Table 3과 같은 결과를 얻었다.

Table 3에서 보는 바와 같이, 투명대 항체에 대하여 양성반응을 나타낸 불임여성 17명에 대한 생쥐난자의 체외수정율은 평균 15.9%(0.7~24.5%)였고, 대조혈청 즉 태아제대혈청, 정상남성혈청 및 0.3% BSA가 함유된 배양액에서의 체외수정율은 각각 60.0%, 51.9% 및 71.2%로 투명대 자가항체 혈청 처리군의 수정

Table 3. Effect of sera positively reacted with infertile women's autoantibodies to zona pellucida or rabbit antiserum on in vitro fertilization of mouse ova

Serum source	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized	% of eggs fertilized
Autoantibody positive serum	439	63	15.9*
Rabbit anti-porcine Z.P antiserum	93	0	0*
Fetal cord serum	165	99	60.0
Normal men serum	114	70	51.9
0.3% BSA	146	104	71.2

*P<0.05

율에 비해 유의적으로 높은 수정율을 나타내었다($P < 0.05$). 그러나 돼지 투명대를 항원으로 사용하여 생산된 항혈청의 경우 수정된 난자는 관찰되지 않았다. 이와 같이 투명대 항체에 대하여 양성반응을 나타낸 불임 여성의 혈청과 가토의 항혈청을 사용했을 때의 체외수정율이 대조혈청의 그것보다 현저히 떨어지거나 수정이 100%억제된 이유는 많은 연구자들의 보고에서도 제시된 바와 같이 수정과정에서 투명대 항체가 항원인 투명대와 반응하여 투명대에 침전층을 형성함으로써 정자는 부착과 침입을 방해하여 수정을 억제시키고 나아가서는 수정란의 발생과 부화를 저지하여 착상에 이르지 못하게 함으로서 나타나는 결과라고 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 고찰하여 볼 때 불임여성, 특히 불임의 원인이 불명한 여성의 혈청에는 상당히 높은 양의 투명대 항체가 존재하며 이러한 항체의 존재가 불임을 유도하는 한가지 원인이 되는 것으로 생각된다. 또 본 연구에서 사용한 간접효소면역분석법과 간접면역형광분석법 및 생물학적 검정을 위한 생쥐난자의 체외수정법도 투명대 자가항체를 측정하여 불임증의 원인을 규명하는 유용한 수단이 될 수 있다고 사료된다.

IV. 적 요

본 연구에서는 불임여성의 혈청중에 존재하는 투명대에 대한 자가항체를 측정하기 위하여 간접효소면역분석법(Indirect ELISA)과 간접면역형광분석법(Indirect IFA)을 실시하였고 이들 자가항체가 생쥐난자의 체외수정에 미치는 영향을 조사하였다.

간접효소면역분석법의 결과 불임여성 116명의 혈청 중 10.3%에서 투명대 항체가 존재하였으며, 간접면역형광분석법의 경우 14.7%에서 투명대 자가항체가 검출되었다. 이들 분석법에 의해서 항체 양성반응을 보인 혈청과 대조혈청에 대해 생쥐난자의 체외수정을 실시한 결과, 투명대 항체가 존재하는 것으로 판명된 혈청의 경우 수정율을 15.9%로서 대조혈청의 수정율 51.9%~71.2%에 비해 유의하게 낮은 수정율을 나타냈다.

이러한 결과를 종합하여 고찰하여 볼 때 불임여성 특히 원인불명 불임여성에 있어 투명대 자가항체가 높은 비율로 출현되며 이들 항체는 수정과정시 정자의 부착과 침입을 억제함으로써 불임을 유발하는 것을 사료된다.

V. 인용문헌

1. Blandau, R.J. 1980. *In vitro* fertilization and embryo transfer. *Fert. & Steril.* 23: 3-11.
2. Bleil, J.D. & P.M. Wassarman. 1980. Structure and function of the zona pellucida; Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76: 189-202.
3. Dulciewicz, A.B., R.G. Noske, & C.A. Shivers. 1975. Inhibition of implantation in the golden hamster by zona precipitation antibody. *Fert. & Steril.* 26: 686-694.
4. Dunbar, B.S., N.J. Wardrip, & J.L. Hedrick. 1980. Isolation, physicochemical properties and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochem.* 19: 356-365.
5. Garavagno, A.J., C. Posada, Barros, & C. A. Shivers 1974. Some characteristics of the zona pellucida antigen in the hamster. *J. exp. Zool.* 189: 37-50.
6. Gwatkin, R.B.L., & D.T. Williams. 1977. Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. *J. Reprod. Fert.* 49: 55-59.
7. Gwatkin, R.B.L., D.T. Williams, & D.J. Carlo. 1977. Immunization of mice with heat-solubilized hamster zonae; Production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. *Fert. & Steril.* 28: 871-877.
8. Kamada, M., H. Hasebe, M. Isahana, T. Kinoshita, O. Naka & T. Mori. 1984. Detection of anti-zona pellucida activities in human sera by the passive hemaagglutination reaction. *Fert. & Steril.* 41: 901-906.
9. Kurachi, H., H. Wakimoto, T. Sakumoto, T. Ano & K. Kurachi. 1984. Specific

- antibodies to porcine zona pellucida detected by quantitative radioimmunoassay in both fertile and infertile women. *Fert. & Steril.* 41 : 67-72.
10. Mori, T., T. Nishimoto, H. Kobita, I. Takai, T. Nishimura & T. Okiwa. 1979. A method for specific detection of autoantibodies to the zona pellucida in infertile women. *Fert. & Steril.* 32 : 67-72.
 11. Nayudu, P.L., L.E. Freeman & A.O. Trounson. 1982. A quantitative indirect immunofluorescence assay for zona pellucida antibodies. *J. Reprod. Fert.* 65 : 65-75.
 12. Nuyudu, P.L., L.E. Freeman & A.O. Trounson. 1982. Zona pellucida antibodies in human sera. *J. Reprod. Fert.* 65 : 77-84.
 13. Nishimoto, T., T. Mori, I. Yamada & T. Nishimura. 1980. Autoantibodies to zona pellucida in infertile and aged women. *Fert. & Steril.* 34 : 552-556.
 14. Ownby, C.S. & C.A. Shivers. 1972. Antigens of the hamster ovary and effects of anti-ovary serum on eggs. *Biol. Reprod.* 6 : 310-314.
 15. Sacco, A.G. 1976. Inhibition of fertility in mice by passive immunization with antibodies to isolated zona pellucida. *J. Reprod. Fert.* 56 : 533-537.
 16. Sacco, A. G., E.C. Yurewicz, M.G. Subramanian & F.L. DeMayo. 1981. Zona pellucida composition : Species cross reactivity and contraceptive potential of antiserum to a purified pig zona antigen PPZA. *Biol. Reprod.* 25 : 997-1008.
 17. Shivers, C. A., N. Gengozian, S. Franklin & C.L. McLaughlin. 1978. Antigenic crossreactivity between human and marmoset zona pellucida, a potential target for immunocontraception. *J. Med. Primatol.* 7 : 242.
 18. Shivers, C. A. & B.S. Dunbar. 1977. Autoantibodies to zona pellucida : A possible cause for infertility in women. *Science.* 197 : 1082-1084.
 19. Subramanian, M.G., E.C. Yurewicz & A. G. Sacco. 1981. Specific radioimmunoassay for the detection of a purified porcine zona pellucida antigen (PPZA). *Biol. Reprod.* 24 : 933-943.
 20. 서광영, 이승배, 최경호, 김창규, 정길생, 김종배. 1991. 생쥐난자의 투명대에 대한 항체의 생상과 이 항체가 수정에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 151. : 67-77.