大韓獸醫學會誌 (1991) 第31卷 第4號
Korean J Vet Res (1991) 31(4) : 397~402

馬匹 血液型 分類를 爲한 標準抗血淸生産에 關한 硏究

林英在・李始永・三浦信義*・藤井仙二*・茂木一重*
韓國馬事會 馬匹保健所・*日本 競走馬理化學硏究所

(1991. 6. 22 접수)

Production of the standard antisera for blood typing of horses

Young-jae Lim, Shi-young Lee, N Miura,* S Fujii,* K Mogi*
*Korean Horse Affairs Association. *Laboratory of Racing Chemistry, Japan*

(Received June 22, 1991)

Abstract: The present experiments were undertaken to produce the standard antiserum for equine blood typing. The following results were obtained through ISO and Hetero Immunizations of the horses whose blood typing was analysed in the Laboratory of Racing Chemistry of Japan.

1. Of the 21 combinations of ISO-immune, 17 horses were produced antibody (about 80%)
2. Antibody titers were increased from early 1 week to late 5 weeks and any antibody titers were not be obtained in spite of the using of adjuvant and 10 repeated injections in the other 4 horses.
3. High antibody titers were obtained within the earliest period in the Dd antigen but were not increased over 32 times in spite of 8~10 repeated injections in the antigen.
4. Antibody were easily produced in the Ca antigen of ISO-Immune but production of antisera were failed due to abscence of absorbed blood cell.
5. Antibody titers of 1,024 times were obtained through 5 injections in the Ca of Hetero-Immune
6. Of the produced 15 antisera (16 system), 13 antigen (5 system) were absorbed.

序 論

말의 血液型 硏究는 1902년 Klein[1] A.B.AB 및 O型으로 分類한 後 Hektoen[2]은 馬의 血液에서 赤血球를 凝集시키는 正常抗體는 存在하지 않는다고 하였으며 Dungern 等[3]은 사람의 ABO式과 같이 3型으로 分類하는 등 主로 1930年代에는 正常抗體에 의한 分類를 實施하였으나 이들 正常抗體는 抗原과 反應하는 力價가 낮아 馬匹血液型의 分類가 事實上 어려운 狀態였다.

그러나 1940年代에 들어와서 免疫抗體에 의한 分類가實施되어 많은 硏究가 進行되었다.[4] 1987年度에는 I.S.A.B.R(International Socity for Animal Blood Group Reserch; 現 I.S.A.G; International Society for Animal Genetics)에서 比較同定試驗을 거쳐 A.C. D.K.P.Q 및 U의 7 System에 의한 32 factors가 分類되어 國際的으로 公認 分類되고 있다. 이 抗體는 馬血淸 또는 初乳의 自然抗體, 馬赤血球에 의한 家兎免疫抗體 및 馬同種免疫抗體 등이며 最近에는 馬赤血球에 의한 monoclonal 抗體 等도 國際的으로 開發使用中에 있다. 그러나 아직까지는 同種免疫에 의한 免疫抗體가 一般的으로 가장 많이 사용되고 있으며 이 同種免疫에 의한 抗血淸의 製作은 Osterhoff[5]에 의하면 供血馬赤血球 50% 浮遊液 50ml을 1週 間隔으로 2回 靜脈注射하는 方法으로 1162 組에 대한 免疫으로 34組에서 抗體가 形成되어 約 3%의 抗體生成을 報告 하였고 또 Suzuki[6]는 50% 馬赤血球 浮遊液 50ml을 週 1回 靜脈注

射하는 方法으로 4~5週 免疫을 實施 한 結果 147組의 免疫에서 43組가 抗體를 形成하여 約 29%의 抗體를 形成하였다고 報告 하는 等 抗體形成率이 상당히 낮은 것으로 報告 되었으며 또한 말에 있어서 血液型分類를 위한 各 實驗室의 Know-how에 의해 生產된 抗血淸 즉 標準抗血淸은 購入이 어려워 馬匹 血液型 分類에 있어서 어려움이 많은 實情이였다. 國內에서도 韓等[7]에 의해 濟州馬의 血液型 分類를 위한 抗血淸이 生產되었으나 競走馬의 血液型 分類를 위한 抗血淸生產에 關한 硏究는 찾아볼 수가 없는 實情이다.

레저산업의 發達로 競馬產業 또한 發展을 거듭하고 있으며 앞으로 이 분야의 國際的인 水準向上을 위해서는 馬匹의 血統登錄과 關聯된 血液型分野의 國際的인 水準向上이 뒤따라야 한다. 이러한 馬匹血液型 分野의 接近을 위하여 標準抗血淸生產을 위해 I.S.A.G.에 의한 血液型 分類法을 採擇하고 있으며 國際的으로 公認된 日本 競走馬理化學硏究所에서 血液型을 分類한 馬匹을 基準으로 同種 및 異種免疫에 의하여 馬匹血液型分類를 위한 抗血淸을 生產하였기에 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

免 疫

同種免疫：日本 競走馬 理化學 硏究所에서 標準抗血淸에 의해 血液型을 分類한 24頭의 馬匹을 利用하여 表 1에서와 같이 血液型別로 供血馬는 陽性인 것과 輸血馬는 陰性인 것을 組合하여 必要로 하는 抗體를 生成하도록 組를 짜서 週 1回 50% 洗滌赤血球 30ml씩을 筋肉注射 하였으며 抗體形成이 잘 안되는 組는 Adjuvant complete (Difco)를 利用하여 emulsion 狀態로 1回 接種後 繼續 注射하였다.

異種免疫：健康하고 體重 約 2kg 內外의 白色家兎으로서 馬의 血球와 自然凝集 및 溶血素가 없는 것을 確認한 後 50% 馬 洗滌赤血球 10ml 씩을 2일 間隔으로 9次에 걸쳐 免疫을 實施하였으며 最終 免疫 1週後 大量 採血하여 血淸을 分離하였다.

抗血淸의 不活化

抗血淸의 非動化는 未吸收抗血淸을 56°C 溫水槽에 30분간 放置하여 補體와 酵素를 破壞하였다.

抗血淸의 吸收

抗血淸의 吸收는 馬洗滌赤血球와 抗血淸을 同量 混合하여 室溫에 1時間 放置後 遠心分離 하였으며 吸收가 不充分할 경우 上記 方法을 反復하여 充分히 吸收를 實施 하였으며 最終 吸收後에는 4°C 冷藏庫에 1夜 放置後 寒冷凝集素를 除去 하였다.

補體의 製作

補體는 新鮮한 白色家兎血淸으로 馬赤血球에 對하여 溶血素를 가지고 있지 않은 것으로서 20餘頭의 血淸을 混合하여 3頭 以上의 馬洗滌 赤血球를 混合하여 4°C에 約 2時間 放置 하여 馬赤血球에 對應하는 抗體 및 寒冷抗體를 除去한 後 4倍의 力價가 되도록 稀釋하여 使用하였다.

抗體價의 測定

倍數稀釋의 方法으로 다음과 같이 凝集 및 溶血反應을 實施 하였다.

凝集反應

凝集反應은 抗血淸 20μl과 2% 馬赤血球 浮遊液 20μl을 各各 混合한 後 室溫에서 15分, 30分, 60分, 3回 凝集程度를 判定하여 最終決定 하였다.

溶血反應

溶血反應은 抗血淸 20μl과 補體 20μl을 混合한 後 2% 赤血球 浮遊液 20μl을 넣고 混合하여 37°C에 30分, 1時間, 1時間 30분, 3回에 걸쳐 溶血程度를 把握하여 最終決定 하였다.

結 果

表 1에 의한 免疫 結果 抗體價는 表 2와 같이 Aa는 5回 注射後에 64倍의 抗體價가를 보였으며 9回 注射後에는 1,024倍의 力價를 나타내었다.

Ac는 5回 接種에서도 抗體價의 增加가 보이지 않아 Adjuvant를 使用하였다. 그후 1週後부터 抗體價가 上昇하기 始作하여 9回 注射後에는 1,024倍의 力價를 보였다.

Ca는 3回 接種으로 1,024倍의 力價를 나타내었다가 4~5회 接種後에는 力價가 若干減少하였다가 6回接種以後에는 1,024倍를 維持하였다.

Da는 k-8(供血馬)과 k-13(輸血馬) 組에서는 Adjuvant 사용이나 10회의 주사에서도 抗體形成이 없어 輸血馬를 交替하여 免疫시킨 結果 1週後 8倍. 4週後, 1,024倍의 力價를 나타내었다.

Db는 2週後 8倍의 力價를 보였으나 3~8週後의 力價에는 特別한 抗體의 增加를 나타내지 않았다가 9回 接種後 32倍의 力價를 보였던 것이 10回 注射後에는 1,024倍의 抗體價를 나타내었다.

Dc, Dk, Dg, Df, Pa는 1~2回 接種에서 0~16倍의 力價였고 10回 接種에서도 64倍以上의 力價 上昇은 없었다.

Dd, Dl 및 Pd, Da와 같이 처음 免疫組에서는 全然 免疫形成이 없었고 再組合에서 4回接種後 1,024倍. 128倍 및 128倍의 力價를 나타내었다.

Table 1. Doner-recipient combination of isoimmunization for the production of antiserum

	Aa	Ac	Ca	Da	Db	Dc	Dd	Df	Dg	Dk	Dl	Pa	Pd	Qa	Ua
Doner (K-1)	+		+				+				+				+
Recipient (K-8)	*		+	+	+	+	+				+				+
Doner (K-16)	+	+	+		+	+									+
Recipient (K-19)	+	*	+		+	+			+					+	+
Doner (K-15)	+		+				+		+	+	+				+
Recipient (K-9)	*	+	*			+	+	+	+	+	+				+
Doner (K-8)			+	+	+	+	+				+				+
Recipient (K-13)			+	*	+	+	+				+	±	+		+
Doner (K-2)	+		+	+	+	+	+				+	+			+
Recipient (K-20)	+		+	*	+	+	*				*	+		+	*
Doner (K-28)	+		+			+	+		+		+				+
Recipient (K-24)	+		+			*	+	+	*	+	+			+	*
Doner (K-17)	+		+			+	+		+			+			
Recipient (K-12)	*	+	+		+	+	*		+			+	+		
Recipient (K-4)	+		+		+	+	*		+			+			+
Doner (K-24)	+		+				+	+		+	+			+	
Recipient (K-25)	+		+		+	+	+	*		*	+			+	
Doner (K-20)	+		+		+	+						+		+	
Recipient (K-21)	+		+		*	+	+		+	+	+	*		+	
Doner (K-7)	+		+	+			+				+	+	+		+
Recipient (K-2)	+		+	+	+	+	+				+	+	*		+
Doner (K-13)		+	+		+	+	+				+	±	+		+
Recipient (K-26)	+	*	+		+	+	+			+	+		*	+	+
Doner (K-26)	+		+		+	+	+			+	+			+	
Recipient (K-27)	+		+		*	+	+		+	+	+			+	
Doner (K-5)	+		+				+				+	+			+
Recipient (K-17)	+		+			+	+		+		*	+			*
Doner (K-1)	+		+				+				+				+
Recipient (K-4)	+		+		+	+	*		+		*	+			+
Doner (K-20)	+		+		+	+						+		+	
Recipient (K-10)	+		+		+	+			+			+		*	
Doner (K-19)	+		+		+	+			+					+	+
Recipent (K-28)	+		+		*	+	+		+		+			*	+
Doner (K-19)	+		+		+	+			+					+	+
Doner (K-28)	+		+			+	+		+		+				+
Recipient (K-27)	+		+		*	+	+		+	+	+			+	*

* Expected antibodies

Table 2. Agglutinin and hemolysin titers of horse isoimmune sera

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aa(K-8)	0	0	0	0	64	64	256	256	1,024	
Ac(K-19)	0	0	0	0	A	16	512	512	1,024	
Ca(K-6)	0	4	1,024	512	128	1,024	1,024	1,024	1,024	
Da(K-13)	0	0	0	0	A	0	0	0	0	0
(K-20)	8	4	32	1,024						
Db(K-27)	2	8	—	—	—	—	—	—	32	1,024
Dc(K-24)	4	16	—	—	—	—	—	—	16	64
Dd(K-4)	0	0	0	0	A	0	0	0	2	0
(K-12)	128	128	512	1,024						
Dk(K-25)	2	8	—	—	—	—	—	—	—	64
Dg(K-24)	4	16	—	—	—	—	—	—	16	64
Df(K-25)	2	8	—	—	—	—	—	—	—	64
Dl(K-17)	0	0	0	0	0	2	0	A	2	0
(K-4)	2	4	16	128						
Pa(K-21)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64
Pd(K-2)	0	2	2	0	2	16	2	4	A	0
(K-26)	0	0	64	128						
Qa(K-10)	0	0	A	0	A	0	16	8	4	32
(K-28)	0	8	8	16	32	32	32	32	—	—
Ua(K-24)	0	0	32	32						
(K-27)	0	0	64	256						

A: Adjuvant complete

Qa 抗體는 2回에 걸친 Adjuvant의 사용으로 10回 免疫에서도 또 再組合에서도 그 力價가 32倍以上 올라가지 않았다.

Ua抗體는 쉽게 32倍까지 力價의 上昇이 있었으나 더 以上 抗體價의 上昇이 없어 再組合으로 4回 免疫後 256倍의 抗體價를 보였다. 同種免疫시킨 21頭 中에서 17頭가 抗體形成을 보였으며 4頭에서는 Adjuvant의 使用이나 10回 以上 接種에서도 抗體價의 上昇이 없었다 토끼를 利用한 異種免疫에 의한 抗體價의 上昇은 5回 注射로서 1,024倍의 抗體價를 나타내었다. 生成된 抗血淸의 精製(吸收結果)는 5 system(A, C, D, Q, U) 13種(Aa, Ac, Ca, Da, Db, Dc, Dd, Df, Dg, Dk, Dl, Qa, Ua)이였다.

考 察

馬匹 血液型 判定을 위한 標準 抗血淸 生產을 爲하여 日本 競走馬 理化學 硏究所에서 國際 標準 抗血淸에 의해 血液型을 分類한 30頭의 馬匹을 基準으로 各 抗血淸別 必要한 抗體의 生成을 目標로 21개組에 免疫을 實施하여 17개組에서 抗體를 形成하였고 4개組에서 抗體形成이 없었다.

이 抗體 形成이 없었던 것은 供血馬와 輸血馬 사이에 赤血球 抗原이 免疫原으로서 否適切하였거나 輸血馬의 體內에서 抗體 形成이 不可能한 어떤 要人이 作用하였다고 推測할 수 있다. 그러나 4개組中 1개組 즉 Dd 抗原에서는 同一한 供血馬에 輸血馬만 바꾸므로서 1週만에 128倍의 높은 力價를 나타내었다. 이는 1次 輸血馬(k-4)에서 Dd 抗體形成이 不可能한 條件 즉 供血馬(k-17)의 抗原이 k-4에 刺戟할 수 없는 어떤 條件이었을 것으로 推測된다. 또 2次 再組合에 의한 免疫에서 1回免疫 (1週後)後에 128倍의 높은 力價를 보인 것은 日本 競走馬理化學 硏究所에서 報告[8] 한 바와 같이 輸血馬(k-12)가 Dd 抗原에 露出된 後 抗體가 消失된 狀態에서 Dd 抗原이 體內에 들어감으로서 Booster 役割을 하였거나 이와 비슷한 狀態의 어떤 敏感한 反應狀態 였을 것으로 推測된다.

이상의 結果로서 馬匹 血液型 分類用 抗體의 生成은 馬匹의 選擇 즉 抗原으로서 充分한 役割과 輸血馬의

Table 3. Production of antiserum by absorption with RBC of horses

Antibodies	Absorbed horses	Aa	Ac	Ca	Da	Db	Dc	Dd	Df	Dg	Dk	Dl	Pa	Pd	Qa	Ua
Aa(K-8)		*														
	K-13	−	+	+	−	+	+	+	−	−	−	+	±	+	−	+
Ac(K-19)			*													
	K-25	+	−	+	−	+	+	+	−	−	−	+	−	−	+	−
	K-26	+	−	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+	−
Ca(hetero antiserum)				*												
	K-6	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+
Da, Dd, Dl, Ua(K-20)					*			+								+
	K-3	+	+	+	−	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+
Db(K-27)						*										
	K-7	+	−	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	+	−	+
Dc, Dg, Ua(K-24)							*									
	K-3	+	+	+	−	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+
	K-5	+	−	+	−	−	−	+	−	−	−	+	+	−	−	+
Aa, Dd(K-12)								*								
	K-20	+	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−
Df, Dk(K-25)									*							
	K-26	+	−	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+	−
	K-16	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Dc, Dg, Ua(K-24)										*						
	K-5	+	−	+	−	−	−	+	−	−	−	+	+	−	−	+
	K-26	+	−	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+	−
Df, Da(K-25)											*					
	K-17	+	−	+	−	−	+	+	−	+	−	−	+	−	−	−
Dd, Dl(K-4)												*				
	K-17	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	−
	K-19	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	+
Db, Qa(K-28)															*	
	K-10	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	−
	K-17	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	−
	K-8	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+
Db, Ua(K-27)																*
	K-26	+	−	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+	−
	K-23	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	−	−	−

* Expected antisera

抗體生成 能力과 密接한 關係가 있다고 생각된다. 또 抗原의 種類와 個體에 따라 力價의 上昇에 顯著한 差異를 보이고 있다.

이것 亦是 各 個體의 差異로서 目標로 하는 抗體生成을 爲한 供血馬와 輸血馬의 選擇은 여러가지 側面에서 신중히 檢討되어야 할 것이며 抗體形成이 不可한 原因은 많은 要人이 關與한다고 하겠다. 한편, 抗體形成率은 韓等[7]에 따르면 16組의 免疫에서 16頭가 免疫을

形成하여 100%의 抗體形成을 보였다고 하였으며, Osterhoff[5]는 1,162組의 免疫에서 34組조의 免疫 抗體形成으로 3%, Suzuki[6]는 147組의 免疫에서 43組조의 免疫 抗體形成으로 29%의 抗體形成率을 보여 學者에 따라 3~100%까지 多樣한 抗體形成을 보이는 樣相을 나타내고 있다. 그 原因은 免疫方法, 免疫個體의 選擇等 많은 原因이 있다고 할 수 있을 것이다. 本 試驗에서의 免疫 抗體形成은 事前 血液型 檢査에 의한 充分한 檢討를 거쳐 供血馬 및 輸血馬間에 抗體形成 可能性을 豫測한 後 免疫을 實施하여 Osterhoff[5]와 같이 2회 免疫後의 抗體形成率은 21頭中 10頭로서 47.6%의 抗體形成率을 나타내었으며 Suzuki[6]와 같이 4~5회 注射後에는 21頭中 13頭로 61.9%의 免疫形成率을 나타내었다. 이 結果는 免疫方法의 差異는 있으나 이들 硏究者들의 結果보다는 越等히 높은 抗體形成率을 나타내었으며 4~10回의 免疫에서 17頭가 抗體를 形成하여 80.9%의 抗體形成率을 나타내었다. 이 結果는 外國學者들의 3~29% 보다는 월등히 높은 抗體形成率을 보였으나 韓等[7]의 結果에 比하면 낮은 抗體形成率을 보이고 있었다. 이것은 競走馬 에서보다 在來馬에서 보다 높은 抗體形成率을 나타낸 것이 아닌가 생각된다.

生産 抗血淸에 대한 吸收試驗은 表 3과 같이 目標로 하는 抗體를 除外한 그 外의 모든 抗體를 吸收除去하기 위하여 可能한 限 目標로하는 抗體의 抗原외에 많은 種類의 血液型 抗原을 갖은 血球를 選擇하여 吸收를 實施하였다.

吸收에 있어서 反復吸收나 여러 馬匹의 血球로 吸收함으로서 抗體價의 消失이나 弱化現象이 있었다. 馬匹血液型分類를 위한 抗血淸 生産에 있어서 目標로하는 한 種類의 表面抗原만 있다면, 즉 그 目標抗原에 대한 抗體만 있다면 吸收없이 그대로 使用할 수 있다고 하겠으나 吸收過程에 있어서 많은 隘路를 느꼈다.

특히 P system의 境遇 吸收後, 目標抗體의 弱化 또는 消失이 있었고 Ca 抗體의 境遇 30頭 血液型檢査 中에서 1頭에서만 陰性이였으므로 Ca의 抗體는 쉽게 生産할 수 있었으나 吸收血球의 不在로 同種免疫에 의한 抗血淸의 使用은 不可하였고 異種免疫에 의한 抗血淸으로 1頭의 馬赤血球로 吸收하였기 때문에 未知의 抗體가 包含되어 있을 것으로 推定할 수도 있을 것이다.

以上에서 만들어진 抗血淸은 5 System 13種(Aa, Ac, Ca, Da, Db, Dc, Dd, Df, Dg, Dk, Dl, Qa, Ua)으로서 日本 競走馬理化學 硏究所에서 血液型分析을 實施한 30頭의 血液型 檢査에서는 完全히 同一한 結果를 나타내고 있어 抗血淸生産에 成功한 것으로 생각되나 더 많은 馬匹을 檢査함으로서 多少差異가 있을 것으로 생각된다.

結 論

總 21組의 同種免疫에에 17頭가 抗體를 形成하여 約 80%의 抗體形成率을 나타내었다.

抗體의 生産이 빠른 것은 1週에서 부터 늦은 것은 5週였으며, 抗體形成이 없는 것은 Adjuvant의 使用이나 10回의 反復注射에서도 抗體의 形成이 없었다.

抗原의 種類別로는 Dd가 가장 빨리 높은 抗體價를 나타내었으나 Qa는 8~10回의 反復注射로도 32倍 程度밖에 抗體價를 나타내지 않았다.

同種免疫에서 Ca 抗原은 쉽게 抗體를 形成하였으나 吸收血球의 不在로 抗血淸製作에 失敗하였다.

異種免疫에 의한 Ca의 抗體 形成은 5回 注射로 1,024倍의 抗體價를 나타내었다.

生成抗體 6 system 15種中에서 精製 抗血淸은 5 system 13種 이었다.

參 考 文 獻

1. Klein A. wien woch 1902;16:413~418(馬の 科學 1987;24(4) 185~191 引用)
2. Hektoen L. Isoagglutination of human corpuscles. *J Inf Dis* 1907;4:297~303.
3. Dungern EV, Hirschfeld. Uber vererbung gruppenspeszifischer struktaren des Blutes. *Ztschrf Imm und EXP Ther* 1910;6:284~292.
4. 横濱道成, 馬の 血液型による 親子 判定の 歷史と 現狀. 馬の 科學 1987;24(4):185~191.
5. Osterhoff DR. Blood groupsin horses. Lecture delivered at the Biennial Scientific Bongress of the south African Veterinary Association 1973: 191~194.
6. Suzuki Y. studies on blood groups of horses. Reprinted from Memoirs of the Tokyo university of Agriculture 1978:20:1~50.
7. 韓邦根, 松本寬, 張德支, Preparation of equine blood typing reagents by isoimmunization. 大韓獸醫學會誌 1990;30(2):145~156.
8. 日本 中央競馬會 (競走馬 理化學 硏究所) 馬の 血液型 檢査の 判定 效率 向上および省力化に 關する 硏究 1. 溶血反應 および凝集反應による 赤血球抗原型の 分類, 委託硏究成績 1986:33-56.