

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-507024

(P2012-507024A)

(43) 公表日 平成24年3月22日(2012.3.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	
	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
	GO 1 N 33/543 5 4 5 J	
	GO 1 N 33/543 5 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)		

(21) 出願番号	特願2011-533686 (P2011-533686)	(71) 出願人	508159123 ユストゥス-リービッヒ-ユニヴェルジテ- ート・ギーセン
(86) (22) 出願日	平成21年10月22日 (2009.10.22)		
(85) 翻訳文提出日	平成23年6月28日 (2011.6.28)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/063878		ドイツ連邦共和国、35390 ギーセン 、ルートヴィヒストラ-セ、23
(87) 国際公開番号	W02010/049340	(74) 代理人	110000578 名古屋国際特許業務法人
(87) 国際公開日	平成22年5月6日 (2010.5.6)		
(31) 優先権主張番号	102008053503.6	(72) 発明者	マインハルト アンドレアス ドイツ連邦共和国 35037 マーブル ク アム グラッセンベルク 123
(32) 優先日	平成20年10月28日 (2008.10.28)	(72) 発明者	フィヤク モニカ ドイツ連邦共和国 35037 マーブル ク ギッセルベルガー シュトラ-セ 2
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 精巢抗原に対する自己抗体検出のための免疫検査

(57) 【要約】

本発明は、男性哺乳類の生体試料における男性哺乳類の炎症関連の生殖能力障害に関連する精巢抗原に対する自己抗体の検出および特異的定量のための免疫検査、具体的には精巢 E R - 6 0 自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体の検出、を開示する。免疫検査は、男性哺乳類、具体的にはヒトの免疫に起因した不妊症および感染症に関連した不妊症の存在を検出するために利用される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

男性哺乳類の生体試料中、男性哺乳類の炎症関連の生殖能力障害と関連する精巢抗原に対する自己抗体の検出および特異的定量のための免疫検査であって、前記免疫検査は、特異的な精巢抗原に対して前記自己抗体を結合することを含むことを特徴とする免疫検査。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の免疫検査であって、精巢抗原に対する自己抗体として、ER - 60 自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体が特異的に判定されることを特徴とする免疫検査。

10

【請求項 3】

請求項 1 に記載の免疫検査であって、前記特異的な精巢抗原は、ER - 60 および/またはトランスフェリンであることを特徴とする免疫検査。

【請求項 4】

前記請求項に記載の免疫検査であって、精巢抗原に対する自己抗体の前記検出は、放射免疫測定法 (RIA) または酵素結合免疫吸着法 (ELISA) によって免疫細胞化学的に行われることを特徴とする免疫検査。

20

【請求項 5】

前記請求項に記載の免疫検査であって、精巢抗原に対する自己抗体の前記検出は、少量の必要量でテストストリップ上で行われることを特徴とする免疫検査。

【請求項 6】

前記請求項に記載の免疫検査であって、精巢抗原に対する自己抗体の決定された含有量は、基準値と比較されることを特徴とする免疫検査。

【請求項 7】

前記請求項に記載の免疫検査であって、前記検査を行うことは、精巢抗原に対する自己抗体の含有量が判定される、男性哺乳類からの血液試料または他の生体試料を、吸着された特異的な精巢抗原と接触させることと、非吸着成分を取除くための少なくとも 1 回の洗浄ステップと、IgG 抗体の調製物を用いて前記吸着された抗原に結合した精巢抗原に対する自己抗体の前記検出であって、前記 IgG 抗体の調製物は、調査される前記男性哺乳類に種特異的であり、精巢抗原に対する自己抗体に種特異的に結合することができ、そして、ビオチン - ストレプトアビジン - パーオキシダーゼ型またはビオチン - アルカリフォスファターゼ型の反応のカスケードにより検出されるような方法で標識される、IgG 抗体の調製物を用いて前記吸着された抗原に結合した精巢抗原に対する自己抗体の前記検出とを含むことを特徴とする免疫検査。

30

40

【請求項 8】

前記請求項に記載の免疫検査の利用であって、男性哺乳類において免疫学的な原因による不妊症及び感染症により誘導された不妊症の存在を判定する生体試料中で、男性哺乳類の炎症関連の生殖能力障害と関連する精巢抗原に対する自己抗体の内容物を測定するための免疫検査の利用。

【請求項 9】

前記請求項のうちの一項に記載の免疫検査を行うキットであって、前記キットは、

50

担体に吸着された特異的な精巢抗原と、

調査される前記男性哺乳類に種特異的であり、精巢抗原に対する自己抗体に種特異的に結合することができ、そして、ビオチン - ストレプトアビジン - パーオキシダーゼ型またはビオチン - アルカリフォスファターゼ型の反応のカスケードにより検出されるように標識される、I g G 抗体の調製物と

を含むことを特徴とするキット。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のキットであって、

前記特異的な精巢抗原は、E R - 60 および/またはトランスフェリンであることを特徴とするキット。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、男性(雄)哺乳類における免疫学的な原因、及び感染症に関係した不妊の形態に大いに関連性があるとして同定された精巢抗原に対する自己抗体の検出のための免疫検査に関する。免疫検査は、精巢抗原に対する自己抗体の上昇と関連される病気、例えば精巢及び関連する男性生殖器官の無症状、症候性の炎症も、炎症関連の男性生殖能力障害、の診断及び治療管理に利用される。

[技術水準]

ドイツではおおよそ7組に1組の夫婦が不随意の子供がいない病気に冒されており、その原因は男性と女性との間にほぼ等しく分けられる。男性側においては、特発性不妊症(約30%)に加えて、泌尿生殖器感染症または他の免疫因子(両者を合わせると12 - 15%)も生殖能力を制限する最も重要な原因と見なされている。急性全身性炎症性疾患及び慢性炎症性疾患と同様に男性の生殖器官の局部感染及び炎症も、いずれも単独でも男性生殖能力障害の関連する原因としても、いつも重視されている。精巢において慢性炎症性変化(精巢炎症または精巢炎)は精子形成の停止及び精子の数と質に本質的な変化をもたらし得る。例えば米国でおおよそ年間発生が60万件を超える精巢上体の炎症(精巢上体炎)は、しばしば睾丸副睾丸炎として結合して現れる。生殖能力障害の臨床的関連については、精子不動化抗体および/または精子凝集化抗体もある。免疫学的な原因による男性不妊症の関連性及びその影響の評価は、具体的に、無症候性の進行を伴う多数の事例が予想されるという事実によって阻まれる。

20

30

【0002】

輸精管の感染の診断は病原、射出精液における白血球および/または炎症メディエーターの上昇した発現や付属腺の減少した分泌活性の検出に基づかれており、満足させるものではない。精巢の無症候性炎症障害は、通常精巢生検によってのみ確実に診断可能であり、従って往々にして生殖能力障害の原因または寄与因子は認識されないままである。炎症は特発性不妊症の多数の患者全体の一部の原因ともなり、炎症性の原因が、事前に推定されたよりも高く関連性があると結果として考えられる。

【0003】

そのため、精巢生検の必要性を減らすために、精巢および関連の男性生殖器官において、例えば無症状、症候性の炎症も、炎症関連の男性生殖能力障害の特定のために、体液または生体試料を使用する適切な検査に対する要求が存在する。顆粒球エラストラーゼおよびIL - 6は、残念ながら両者とも非特異的であり、従ってマーカーとしての利用には適さない。現在に至るまで、炎症関連の男性生殖能力障害の特異的な検出、ひいてはアッセイに使用することができる好適なマーカーは知られていない。

40

[課題]

本発明の課題は、炎症関連の男性生殖能力障害の特異的な検出に適したマーカーを提供するとともに、このマーカーの検出のための非侵襲的な方法を生体試料において実施することを容易にすることである。さらに本発明の課題は、この方法を実施するための検査キットを提供することである。

50

[課題の解決法]

本発明によれば、この課題は、特許請求の範囲に従って、生体試料中で炎症関連の男性生殖能力障害に特異的な精巣抗原に対する自己抗体の検出および特異的定量的ための免疫検査によって解決される。

【 0 0 0 4 】

この独自の検査によって、驚くべきことに、男性の免疫学的原因の不妊症の形態に高い関連性をもつ精巣抗原に対する特異的な自己抗体が生体試料中で確認された。

これらの結果は、種々の形態の精巣炎症を持つ患者からの例えば血清などのような生体試料が、非常に多くの場合 ER - 6 0 自己抗体の高力価およびトランスフェリン抗体の力価を示し、健康な被験者あるいは(例えばセルトリ細胞単独症候群、精子形成の停止、オリゴ - アセノ - テラトズスペルミア (O l i g o - A s t h e n o - T e r a t o z o o s p e r m i e) といった)非炎症性の精子形成不全と区別することができることを実証している。この目的のために通常の精子形成患者の精巣抽出物は、当業者にとっては周知の技術である 2 D - S D S - P A G E によって分離され、例えばジャーナル オブ パソロジー (J o u r n a l o f P a t h o l o g y) (2 0 0 5 ; 2 0 7 , 1 2 7 - 1 3 8) に開示されたようにニトロセルロース膜に移される。プロットメンブレンは、女性からの、または健康な被験者からのコントロール血清、または男性病学検査後種々の病巣の形態または稀ではあるが完全に発展した精巣の炎症と診断された患者からの血清サンプルでインキュベートされる。自己反応性スポットは質量分析法 (M A L D I - M S) を使用して調査され、しばしば抗体が炎症関連の不妊症を持つ男性の血清中に向けられて蛋白質が同定された。

10

20

【 0 0 0 5 】

【表 1】

陽性血清数/全血清数 (反応度%)	同定された蛋白質
12/13 (92%)	ジスルフィドイソメラーゼ ER-60 (異名 Erp60、ERp57)
8/13 (61%)	トランスフェリン(シデロフィリン)

30

【 0 0 0 6 】

コントロール血清は同定された蛋白質スポットとは反応しなかった。

意外なことに、92%のジスルフィドイソメラーゼ ER - 6 0 蛋白質(異名: ERp57、p58、登録名: PDIA3#HUMAN)および61%のトランスフェリン(シデロフィリン)のそれぞれは、両者とも精巣炎症の異なる形態を持つ患者から血清と高い特異的な自己反応性を示した。

【 0 0 0 7 】

この理由から、蛋白質ジスルフィドイソメラーゼ ER - 6 0 (異名: ERp57、p58、登録名: PDIA3#HUMAN)およびトランスフェリン(シデロフィリン)は男性哺乳類における精巣炎症の特異的なマーカーとして同定された。

40

【 0 0 0 8 】

これらのマーカー蛋白質の核酸配列および/またはアミノ酸配列を利用して、免疫検査が提供され、免疫検査により、生体試料中で炎症性の男性生殖能力障害に関連した精巣抗原に対する自己抗体、具体的には ER - 6 0 自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体、の特異的な検出が可能になる。

【 0 0 0 9 】

生体試料中で炎症性の男性生殖能力障害に関連した精巣抗原に対する自己抗体の検出お

50

よび特異的定量のための免疫検査は、精巢抗原に対する自己抗体を、具体的には、ER - 60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体を、特異的な精巢抗原に、具体的にはER - 60またはトランスフェリンに結合することを含んでいる。本発明による検査は、無症状の炎症の診断および治療管理だけでなく、精巢および関連する男性哺乳類の生殖器官の症候的に進行する炎症の診断および治療管理のためにも用いられる。

【0010】

精巢抗原に対する自己抗体の含有量、具体的には、精巢炎症の種々の形態で非常に頻繁に生じるER - 60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体の含有量は、この目的のために男性哺乳類からの生体試料で決定される。精巢抗体に対する自己抗体の決定された含有量は次に基準値と比較される。

10

【0011】

本発明の好ましい実施態様においては、本発明による検査は、生体試料、具体的には血清、中にER - 60自己抗体の含有量の決定を含む。この目的のために、精巢抗原、具体的にはER - 60蛋白質、は遺伝子組み換え型でマーカーとして供給される。本発明による検査は、配列番号1に示されるER - 60蛋白質の核酸配列に基づいて遺伝子組み換えの手段によって、一般的に知られている遺伝子工学手法、例えば、大腸菌の発現及び最先端の例えばHPLC精製を用いることによって、行われる。

【0012】

本発明によれば、配列番号1として開示される蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER - 60(同体異名: ERp57、ERp58、登録名: PDIA3#HUMAN)の核酸配列に加えて、翻訳された蛋白質の機能がER - 60自己抗体の結合によって実質的に影響されないという条件で、核酸配列の僅かの改変、付加、欠失及び/又は置換の結果として生じる蛋白質も含まれる。

20

【0013】

本発明によれば、蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER - 60の開示される核酸配列に加えて、異名や相同の蛋白質、例えばERp57、p58、登録名: PDIA3#HUMANなど、も含まれる。

【0014】

生体試料は哺乳類、具体的にはヒト、から得られるあらゆる生体物質であり、あらゆる生体物質は、例えば、全血液、血清または血漿、清漿、脊髄液、腹膜液、唾液、涙液または尿液などのような体液、さらに生検物質または組織といった、自己抗体を含む。

30

【0015】

生体試料に存在する精巢抗原に対する自己抗体、具体的にはER - 60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体は、それぞれの精巢抗原、具体的にはER - 60蛋白質およびトランスフェリンにそれぞれ特異的に結合し、続いて適切な検出方法を用いて検出することによって同定される。

【0016】

本発明の好ましい実施態様によれば、精巢抗原に対する自己抗体の決定、具体的にはER - 60自己抗体の決定および/またはトランスフェリン自己抗体の決定は、免疫学的手段により行われる。特に免疫細胞化学的手段として放射免疫測定法(RIA)による決定、または酵素結合免疫吸着法(ELISA)を用いての決定が、特によく適しているのを実証した。あるいは、検査は、最小限の必要量の検査キャリア上、例えばテストストリップ上で行われる。

40

【0017】

免疫検査の実施は、精巢抗原に対する自己抗体の含有量が決定される、男性哺乳類の血液サンプルまたは他の生体試料を、吸着した特異的な精巢抗原と接触させることと、非吸着成分を取除くための少なくとも1回の洗浄ステップと、IgG抗体の調製物を使用して、吸着された抗原に結合した自己抗体の検出であって、IgG抗体の調製物は、検査される男性哺乳類に種特異的であり、また種特異的に自己抗体に結合することができるIgG抗体の調製物であり、例えばヒトの場合には、抗ヒトIgG抗体の調製物であって、これ

50

らの自己抗体が、ビオチン - ストレプトアビジン - パーオキシダーゼ型またはビオチン - アルカリフォスファターゼ型の反応のカスケードを用いて検出され得るような方法で標識される抗ヒト I g G 抗体の調製物である、I g G 抗体の調製物を使用して、吸着された抗原に結合した自己抗体の検出とを含んでいる。

【 0 0 1 8 】

好ましい実施態様においては、免疫検査は、結合されるためのマーカー蛋白質、具体的には精巢抗原、例えば蛋白質 E R - 6 0 またはトランスフェリンなどを、例えば微量定量プレート、塩化ポリビニルプレート、または適切な組織プレートまたはテストストリップなどのような表面上で固定化することと、非特異的結合部位の飽和とによって実施される。次に、検査される生体試料が好ましくは液体の形態で加えられることにより、生体試料に含まれる自己抗体が精巢抗原と結合し、例えば E R - 6 0 自己抗体が、固定化された E R - 6 0 蛋白質と結合し、そして、トランスフェリン自己抗体が、固定化されたトランスフェリンと結合する。あるいは、免疫検査は、蛋白質 E R - 6 0 またはトランスフェリンが表面上に固定化されているのであれば、E R - 6 0 自己抗体及びトランスフェリン自己抗体も検出する。少なくとも 1 回の洗浄ステップの後に、二次抗体が加えられ、二次抗体は、精巢抗原に対する自己抗体に結合し、酵素、例えばアルカリ性ホスファターゼまたはペルオキシターゼと結合する。さらに少なくとも 1 回の洗浄ステップの後に、二次抗体に結合した酵素の無色または非蛍光の基質が試料に最終的に加えられる。この酵素は基質を有色のまたは蛍光色の産物に変え、この産物の濃度はフォトメータなどの適切な検出器で決定されることが可能になる。

10

20

【 0 0 1 9 】

この免疫学的 E L I S A 法であれば、精巢抗原に対する自己抗体、具体的には E R - 6 0 自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体を、たとえ少量であっても迅速、且つ確実に検出することが可能である。この検査の更なる利点は、この検査が、一般的に使用されている E L I S A 装置を使用し、かつ 9 6 , 2 5 6 少なくとも 1 0 2 4 のウエルの市販の微量定量プレートを用いて実施されることが可能になるので、同時に多数の分析を実施することができることである。

【 0 0 2 0 】

R I S 法では、適切な酵素に結合する二次抗体の代わりに、放射性標識された二次抗体が使用されることを除いては、原則的には E L I S A 法に記載された場合と同様のステップが実施される。定量的な検出は、この場合、シンチレーションカウンタで行われる。

30

【 0 0 2 1 】

上記の方法とは別に、マーカー蛋白質への結合による精巢抗原に対する自己抗体の決定、すなわち、固定化された蛋白質 E R - 6 0 への E R - 6 0 自己抗体の結合、および固定化されたトランスフェリンへのトランスフェリン自己抗体の結合は、それぞれ当業者に知られている他の免疫学的方法で定性的および定量的に評価されることが可能になり、そのうちウエスタンブロット法およびドットブロット法のみをここに述べる。

【 0 0 2 2 】

あるいは、精巢抗原、具体的には蛋白質 E R - 6 0 および/またはトランスフェリンが、最小限の必要な検査キャリア、例えば、適切なキャリア物質上に 1 つ又は複数の吸着物質を備えるテストストリップにアプライされ、次いで、可能であれば液体の形態で、生体試料と接触させて、生体試料に含まれる精巢抗原に対する自己抗体が、結合することができ、続いて、適切な検出システム、例えば可視線の形成など、により検出されることが可能になる。

40

【 0 0 2 3 】

精巢抗原に対する自己抗体の定性的または定量的な検出、具体的には固定化された蛋白質 E R - 6 0 への E R - 6 0 自己抗体の結合または固定化されたトランスフェリンへのトランスフェリン自己抗体の結合が、好ましくは、例えば個体からの血清または血漿などのような体液で行われることにより、結合の測定として、蛍光が例えば 4 5 0 n m および 5 7 0 n m の波長における吸光度 (O D) として決定される。吸光度値は 4 5 0 n m および

50

570 nmの波長の間の違いから計算される。

【0024】

この値は基準値と比較される。この基準値は、例えば、健康な男性哺乳類および/または精巣炎症と診断された哺乳類からの生体試料の測定データから計算される。

あるいは、定義された濃度の精巣抗原、具体的にはER-60またはトランスフェリン、の試料が用いられ、基準値は、例えば標準曲線から、または標準表から、または比較値形態で、計算され、基準として使用される。

【0025】

基準値は、試料の解析と併行して決定されることが好ましい。

基準値及び試料の二つの決定が別々に可能である。基準値が、例えば健康な提供者からの生体試料の測定データを用いて計算されることにより、この場合には、基準値がOD値0.35より低いことが好ましい。基準値が、例えば、無症状または症候的に進行する精巣炎症と診断された提供者からの生体試料の測定データを用いて計算されることにより、基準値は、この場合には、OD値0.35、好ましくは0.4を超える。

【0026】

生体試料の精巣抗原に対する自己抗体、具体的にはER-60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体の含有量が、0.35を超えるOD値、好ましくは0.4を超えるOD値ならば、この含有量は、炎症関連の生殖能力障害不全の存在を暗示するものである。

【0027】

免疫検査によって、具体的には無症状または症候的な炎症性生殖能力障害の患者からの生体試料の場合には、改良された非侵襲性の診断が可能になり、精巣生検の実施が回避される。

【0028】

具体的には、ER-60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体は、本発明による免疫検査で検出される。ER-60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体が本発明による免疫検査で検出されることにより、精巣炎症を炎症性精子形成欠陥(セルトリ細胞単独症候群)と区別して診断することが可能になる。本発明による免疫検査は、例えば播種性及び低密度のリンパ球などの個別変化も考慮に入れた新しい組織的な分析である。本発明による免疫検査は、炎症関連の生殖能力障害の治療の成功度を評価するためにも用いられる。

【0029】

本発明による免疫検査は容易に標準化されることが可能であるので、人間医学、具体的に*in vitro*授精のモニタリングや受精診断と、専門家意見との双方に利用可能であり、そして、近代的な家畜の繁殖の範囲内でも利用可能である。

【0030】

本発明による生体試料は男性哺乳類、具体的には、ヒトに由来することが好ましい。

本発明による免疫検査は、即時使用可能な「キット」の形態で容易に提供されることができ、キットは、キャリアの表面に吸着されるER-60および/またはトランスフェリン抗原と、検査される男性哺乳類に種特異的で、自己抗体に種特異的に結合できるIgG抗体の調製物、例えば、ヒトの場合においては、ビオチン-ストレプトアビジン-パーオキシダーゼ、またはビオチン-アルカリフォスファターゼ型の反応カスケードで検出されることができるよう方法で標識される抗ヒトIgG抗体の調製物などと、を含んでいる。

【0031】

あるいは、キットは、担体、そして緩衝液と、試薬、例えば、発色反応が起こるマーカ-に結合する、例えばストレプトアビジンなどのように反応の検出に必要とされる試薬と、を含む。

【0032】

あるいは、キットが、さらに、キットを校正するためにER-60自己抗体またはトラ

10

20

30

40

50

ンスフェリン自己抗体の標準試料を含むことによって、ER-60自己抗体の標準試料がER-60自己抗体の検出のために用いられ、トランスフェリン自己抗体の標準試料がトランスフェリン自己抗体の検出のために用いられる。

[実施例]

1. ER-60の提供

好ましくは組換え蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER-60(異名: ERp57、p58、登録名: PDIA3#HUMAN)は大腸菌内で発現、提供される。組換え蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER-60の発現は、例えば、ヒトER-60のDNA配列を含む発現クローン、例えばUrade他、J. Biochem. 122、834-842; 1997に記載されているような、例えばpET-hER-60発現クローンなど、を用いて行われる。蛋白質は、例えば、Urade他、J. Biol Chem. 267(21): 15152-15159のプロトコルによれば、例えば大腸菌BL21(DE3)で発現され、例えばHPLCを用いて精製される。

10

【0033】

この目的のために、発現プラスミドpET-hER60は、大腸菌BL21(DE3)中に転換され、適切な条件下、例えばアンピシリン(500 μ g/ml)存在下、400ml培地、例えばLB培地(1%のトリプトン、0.5%の酵母抽出液、1%のNaCl(pH7.0))で、30で培養される。蛋白質の発現は、適切なOD_{600nm}値、例えばOD_{600nm}値=0.5で、例えば0.5mMイソ-プロピル-1-チオ-D-ガラクトピラノシド(IPTG)を用いて、30で約2時間誘導される。次に、バクテリア培養物が採取され、ペレットは適切な緩衝液で再懸濁及び沈殿される、例えば、10ml緩衝液、例えば20mMのHEPES-水酸化カリウム(pH6.8)、50mMのKCl、5mMのEDTA(pH8.0)、1mMPMSFで再懸濁させて超音波処理される。

20

【0034】

細胞溶解物を5000xgで4で約30分間遠心分離し、上清は60%および70%の飽和硫酸アンモニウムで30分間、4で沈殿させ、次いで5000xgで30分間遠心分離する。蛋白質ペレットを500 μ lの緩衝液、例えば20mMHEPES-水酸化カリウム(pH6.8)、50mMKCl、5mMのEDTA(pH8.0)、1mMのDTTで再懸濁させ、例えば、HPLCにおけるゲル濾過(Superdex 200 HR)などを用いて精製する。他に取り得るステップでは、hER-60を含むこれらフラクションを、例えばMono Qカラムを使って、例えば10mlの緩衝液、例えば20mMのHEPES-KOH(pH6.8)、50mMKCl、5mMEDTA(pH8.0)、1mMDTT、でさらに精製する。

30

【0035】

蛋白質の純度は、例えばSDS-PAGEゲルで評価される。

2. 免疫検査

例えばマキシソープ(MaxiSorp)ELISAプレート(Nunk)といったELISAプレートを0.1M炭酸ナトリウム(pH9.5)中4で一晩、組換え型ER-60、例えば2.5 μ g/ml、で被覆し、適切な緩衝液、例えばリン酸緩衝液(PBS、pH7.2+0.05%のTween-20)で洗浄し、例えば2.5時間室温(RT)で、PBS中の2%のスキムミルク粉末でブロッキング処理した。非特異的結合部位をブロッキングした後、検査されるコントロール試料及び血清試料の希釈系列(ブロッキング溶液を原液(非希釈液)から1:1000希釈まで)を、繰り返して被覆プレートにアプライして室温で1時間培養する。この培養時間の後、ウェルを少なくとも1回洗浄し、次いで第2の種特異的な抗体、例えば抗ヒトIgG-ビオチン(ブロッキング溶液で1:10000)と、室温で少なくとも1時間培養する。少なくとも1回の洗浄ステップの後、試料はストレプトアビジン-ホースラディッシュ-パーオキシダーゼ(Streptavidin-Meerrettichperoxidase)(GEヘルスケア)1:4000と、洗浄緩衝液中で20分室温で培養する。少なくとも1回の洗浄ステップの後、発色反応を20分間、例えばTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン;

40

50

B D (バイオサイエンス社製)を用いて展開される。発色反応は例えば $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ で停止される。吸着(OD値)は 450 nm および 570 nm の波長で測定される。吸着値は波長 450 nm および 570 nm の間の違いから得られる。

3. データ解析

免疫検査の評価は、生体試料、好ましくは血清又は血漿中における ER - 60 自己抗体の定量によって行われるのが好ましい。測定値は基準値と比較される。基準値は、例えば健康な提供者からの試料の測定データから算出され、この場合には OD 値が 0.35 よりも低いことが好ましい。あるいは、基準値が、精巣炎症と診断された提供者からの試料の測定データから決定され得るので、この場合には、基準値は、 0.35 の OD 値を超える、好ましくは 0.4 を超える。あるいは、ER - 60 の定義された濃度の試料が、使われて、その基準値は、例えば比較曲線または比較表から算出されるか、または比較値に基づいて算出される。基準値は、好ましくは試料の解析と併行して決定される。

【0036】

試料中における ER - 60 自己抗体の含有量が、OD 値 0.35 、好ましくは 0.4 を超えると、男性哺乳類の炎症関連生殖能力障害の存在の兆しである。

4. 有効性

本発明による免疫検査の正当性を立証するためには、広範な一連の検査が実施されることによって、男性病関連の既存の症状のないヒト血清及び正常な射出精液を用いてコントロール群における ER - 60 自己抗体の検出が他の患者グループと比較される。これらの患者グループは

1. 限られた生殖能力の男性からの血清。含まれる基準が $1\text{ 千万}/\text{ml}$ 未満の精子濃度である一方で、感染症または炎症の証拠がないこと。

【0037】

2. 射出精液検査に基づく輸精管の炎症の基準を満たす男性からの血清であること。

3. 精巣生検手段によって検出され、精巣炎症の男性からの血清であること。

4. ER - 60 自己抗体価が治療成功と関係するかを評価するために、ジクロフェナックで処理された精巣および/または輸精管の炎症と診断された男性からの血清であること。

を含む。

【手続補正書】

【提出日】平成23年7月1日(2011.7.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

男性哺乳類の生体試料中、男性哺乳類の炎症関連の生殖能力障害と関連する精巣抗原に対する自己抗体の検出および特異的定量のための免疫検査方法であって、前記免疫検査方法は、特異的な精巣抗原に対して前記自己抗体を結合することを含む

ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項2】

請求項1に記載の免疫検査方法であって、

前記精巣抗原が ER - 60 であって前記自己抗体として ER - 60 自己抗体が特異的に判定されること、及び前記精巣抗原がトランスフェリンであって前記自己抗体としてトランスフェリン自己抗体が特異的に判定されることのうちの少なくとも一方を含む

ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項3】

請求項1又は請求項2に記載の免疫検査方法であって、

精巢抗原に対する自己抗体の前記検出は、放射免疫測定法（R I A）または酵素結合免疫吸着法（E L I S A）によって行われる

ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項 4】

請求項 1～請求項 3 のいずれか一項に記載の免疫検査方法であって、

精巢抗原に対する自己抗体の前記検出は、テストストリップ上で行われる

ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項 5】

請求項 1～請求項 4 のいずれか一項に記載の免疫検査方法であって、

精巢抗原に対する自己抗体の決定された含有量は、精巢抗原に結合する自己抗体の結合尺度に基づいて設定される基準値と比較される

ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項 6】

請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載の免疫検査方法であって、

前記検査を行うことは、

精巢抗原に対する自己抗体の含有量が判定される、男性哺乳類からの血液試料を少なくとも含む生体試料を、吸着された特異的な精巢抗原と接触させることと、

非吸着成分を取除くための少なくとも 1 回の洗浄ステップと、

I g G 抗体の調製物を用いて前記吸着された抗原に結合した精巢抗原に対する自己抗体の前記検出であって、前記 I g G 抗体の調製物は、調査される前記男性哺乳類に種特異的であり、精巢抗原に対する自己抗体に種特異的に結合することができ、そして、ビオチン - ストレプトアビジン - パーオキシダーゼ型またはビオチン - アルカリフォスファターゼ型の反応のカスケードにより検出されるような方法で標識される、I g G 抗体の調製物を用いて前記吸着された抗原に結合した精巢抗原に対する自己抗体の前記検出と

を含むことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項 7】

請求項 1～請求項 6 のいずれか一項に記載の免疫検査方法を行うキットであって、

前記キットは、

担体に吸着された特異的な精巢抗原と、

調査される前記男性哺乳類に種特異的であり、精巢抗原に対する自己抗体に種特異的に結合することができ、そして、ビオチン - ストレプトアビジン - パーオキシダーゼ型またはビオチン - アルカリフォスファターゼ型の反応のカスケードにより検出されるように標識される、I g G 抗体の調製物と

を含むことを特徴とするキット。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のキットであって、

前記特異的な精巢抗原は、E R - 6 0 およびトランスフェリンのうちの少なくとも一方である

ことを特徴とするキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 1】

本発明の好ましい実施態様においては、本発明による検査は、生体試料、具体的には血清、中に E R - 6 0 自己抗体の含有量の決定を含む。この目的のために、精巢抗原、具体的には E R - 6 0 蛋白質、は遺伝子組み換え型でマーカーとして供給される。本発明による検査は、E R - 6 0 蛋白質の核酸配列に基づいて遺伝子組み換えの手段によって、一般的に知られている遺伝子工学手法、例えば、大腸菌の発現及び最先端の例えば H P L C 精

製を用いることによって、行われる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

本発明によれば、蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER - 60 (同体異名：ERp57、ERp58、登録名：PDI A3#HUMAN)の核酸配列に加えて、翻訳された蛋白質の機能がER - 60自己抗体の結合によって実質的に影響されないという条件で、核酸配列の僅かの改変、付加、欠失及び/又は置換の結果として生じる蛋白質も含まれる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

本発明によれば、蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER - 60の核酸配列に加えて、異名や相同の蛋白質、例えばERp57、p58、登録名：PDI A3#HUMANなど、も含まれる。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2009/063878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 C12N9/90		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/046108 A2 (AMERICAN DIAGNOSTICA INC [US]; LWALEED BASHIR [GB]; COOPER ALAN [GB];) 4 May 2006 (2006-05-04) Anspruch 1	1-8
Y	BOHRING C ET AL: "Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease." MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION FEB 2001, vol. 7, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 113-118, XP002564628 ISSN: 1360-9947 Zusammenfassung, S 114, Spalte 1, Abs 2	1-8
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 January 2010		Date of mailing of the international search report 09/02/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bigot-Maucher, Cora

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/063878

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MATHUR SUBBI P: "Autoimmunity in endometriosis: Relevance to infertility" AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY, vol. 44, no. 2, August 2000 (2000-08), pages 89-95, XP002564625 ISSN: 1046-7408 Zusammenfassung; S 93, Spalte 1, Abs 2; S 91, Spalte 2, Abs 2 ff; S 92, Spalte 1, Abs 3</p>	9-10
A	<p>FIJAK MONIKA ET AL: "Identification of immunodominant autoantigens in rat autoimmune orchitis" JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 207, no. 2, October 2005 (2005-10), pages 127-138, XP002564626 ISSN: 0022-3417 Zusammenfassung; S 130, Spalte 2, Abs 2 und letzter Abs ff; S 136, Spalte 2, Abs 2</p>	1-10
A	<p>ZHANG JINGJING ET AL: "Erp57 is a potential biomarker for human fertilization capability" MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION, vol. 13, no. 9, September 2007 (2007-09), pages 633-639, XP002564627 ISSN: 1360-9947 Zusammenfassung; S 637, Spalte 1, letzter Abs; S 638, Spalte 2, Abs 3</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/063878

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006046108	A2	NONE	04-05-2006

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/063878

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/68 C12N9/90		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N C12N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Batr. Anspruch Nr.
Y	WO 2006/046108 A2 (AMERICAN DIAGNOSTICA INC [US]; LWALEED BASHIR [GB]; COOPER ALAN [GB];) 4. Mai 2006 (2006-05-04) Anspruch 1	1-8
Y	BOHRING C ET AL: "Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease." MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION FEB 2001, Bd. 7, Nr. 2, Februar 2001 (2001-02), Seiten 113-118, XP002564628 ISSN: 1360-9947 Zusammenfassung, S 114, Spalte 1, Abs 2 ----- -/--	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen. <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)		"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29. Januar 2010		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 09/02/2010
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Bigot-Maucher, Cora

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2009/063878

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MATHUR SUBBI P: "Autoimmunity in endometriosis: Relevance to infertility" AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY, Bd. 44, Nr. 2, August 2000 (2000-08), Seiten 89-95, XP002564625 ISSN: 1046-7408 Zusammenfassung; S 93, Spalte 1, Abs 2; S 91, Spalte 2, Abs 2 ff; S 92, Spalte 1, Abs 3	9-10
A	FIJAK MONIKA ET AL: "Identification of immunodominant autoantigens in rat autoimmune orchitis" JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 207, Nr. 2, Oktober 2005 (2005-10), Seiten 127-138, XP002564626 ISSN: 0022-3417 Zusammenfassung; S 130, Spalte 2, Abs 2 und letzter Abs ff; S 136, Spalte 2, Abs 2	1-10
A	ZHANG JINGJING ET AL: "Erp57 is a potential biomarker for human fertilization capability" MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION, Bd. 13, Nr. 9, September 2007 (2007-09), Seiten 633-639, XP002564627 ISSN: 1360-9947 Zusammenfassung; S 637, Spalte 1, letzter Abs; S 638, Spalte 2, Abs 3	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales AK-Zeichen

PCT/EP2009/063878

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2006046108	A2	04-05-2006	KEINE

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

专利名称(译)	用于检测针对睾丸抗原的自身抗体的免疫学试验		
公开(公告)号	JP2012507024A	公开(公告)日	2012-03-22
申请号	JP2011533686	申请日	2009-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	德国杰特贝林生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	尤斯图斯 - 李比希 - 海胆韦利济泰特吉森		
[标]发明人	マインハルトアンドレアス フィヤクモニカ		
发明人	マインハルト アンドレアス フィヤク モニカ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/689 G01N2333/79 G01N2800/367		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.541.B G01N33/543.545.A G01N33/543.545.J G01N33/543.521		
优先权	102008053503 2008-10-28 DE		
其他公开文献	JP5453443B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

技术领域本发明涉及用于检测和特异性定量雄性哺乳动物生物样品中雄性哺乳动物的炎症相关生殖功能障碍的睾丸抗原自身抗体的免疫学试验，特别是睾丸ER-60自身抗体和/或检测转铁蛋白自身抗体。免疫学试验用于检测由雄性哺乳动物，特别是人类的免疫和与感染相关的生育引起的不育症的存在。

		特表2012-507 (P2012-5070) (43) 公表日 平成24年3月22日 (2012.3)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 1 B	
	G O 1 N 33/543 5 4 5 A	
	G O 1 N 33/543 5 4 5 J	
	G O 1 N 33/543 5 2 1	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18)	
(21) 出願番号	特願2011-533686 (P2011-533686)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成21年10月22日 (2009.10.22)	ユストゥス-リービヒウニヴェルシ ート・ギーゼン
(85) 翻訳文提出日	平成23年6月28日 (2011.6.28)	ドイツ連邦共和国 35390 ギーナ 、ルートヴィヒストラッセ、23
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/063878	(74) 代理人
(87) 国際公開番号	WO2010/049340	110000578
(87) 国際公開日	平成22年5月6日 (2010.5.6)	名古屋国際特許業務法人
(31) 優先権主張番号	102008053503.6	(72) 発明者
(32) 優先日	平成20年10月28日 (2008.10.28)	マインハルト アンドレアス ドイツ連邦共和国 35037 マー ク アム グラッセンベルク 123
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(72) 発明者
		フィヤク モニカ ドイツ連邦共和国 35037 マー ク ギッセルベルガー シュトラッセ
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍標識に対する自己抗体検出のための免疫学検査