

(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2015-513103****(P2015-513103A)**(43) 公表日 **平成27年4月30日(2015.4.30)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569	G 2GO45
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569	A
<b>GO 1 N 33/536 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48	A
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/536	D
	GO 1 N 33/543 597	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-502463 (P2015-502463)	(71) 出願人	514241799 ツィルヴァコス, ヴァシリオス TSILIVAKOS, Vassilio s
(86) (22) 出願日	平成25年3月29日 (2013. 3. 29)		
(85) 翻訳文提出日	平成26年11月10日 (2014. 11. 10)		
(86) 国際出願番号	PCT/GR2013/000016		
(87) 国際公開番号	W02013/144662		ギリシャ共和国 ジーアール-11525 アテネ, ソフィア スリマンストリート 4
(87) 国際公開日	平成25年10月3日 (2013. 10. 3)		
(31) 優先権主張番号	20120100185	(71) 出願人	514241803 グリツァピス, アゲロス GRITZAPIS, Aggelos
(32) 優先日	平成24年3月29日 (2012. 3. 29)		ギリシャ共和国 ジーアール-11525 アテネ, ソフィア スリマンストリート 4
(33) 優先権主張国	ギリシャ (GR)	(74) 代理人	110001302 特許業務法人北青山インターナショナル 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精細胞中の細胞内感染因子の検出方法

## (57) 【要約】

本発明は、精子中のクラミジア、ウイルスおよび他の感染因子の存在を調査するために、免疫蛍光法をフローサイトメトリーと組み合わせて使用する方法について記載する。本方法は、DNA弛緩手法を使用して精細胞内の微生物を細胞内検出するため、ならびに精子の表面に付着している微生物を検出するために使用される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

精子の細胞内のウイルス、クラミジア、寄生虫および他の感染性病原体の存在を調査する方法において、

- 精子を含む精細胞のDNAの高密度構造を弛緩させるステップと、
- 直接的もしくは間接的精子内細胞免疫蛍光法と、
- フローサイトメトリーによる結果の視認および評価とのための手法を含み、

および前記DNAの高密度構造を弛緩させるステップが免疫蛍光法の前に必ず実施されなければならない事実を特徴とする方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、フローサイトメトリーにより結果を視認および評価する前記ステップは、1Nおよび2N細胞間の識別を可能にするためにWB内での細胞ペレットと7-アミノアクチノマイシンD(7AAD)とのインキュベーションを含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法において、不妊症、早期妊娠不成功の流産または胎児消失の原因を決定するため、および先天性感染症の予防もしくは垂直伝播の予防のため、さらに男性生殖器系の炎症および感染症を調査するために使用されることを特徴とする方法。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法において、特に以下の感染因子：サイトメガロウイルス(CMV)、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、HHV-6、HHV-7、HHV-8、パルボウイルス19、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、コクサッキーウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV-1、HIV-2)、アデノ随伴ウイルス(AAV)、風疹ウイルス、HPV、クラミジア、トキソプラズマおよびノロウイルスのうちの1つを調査するために使用されることを特徴とする方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法において、スペルミオグラムおよび精子中のクラミジアの存在について同一サンプル上もしくは相違するサンプル上の培養と組み合わせるために使用されることを特徴とする方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法において、精子DNAの超高密度DNA構造を弛緩させるステップがDNA消化を用いて実施されることを特徴とする方法。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法において、DNA消化がDNAを切断する酵素を用いて実施されることを特徴とする方法。

## 【請求項 8】

請求項 6 または 7 のいずれか一項に記載の方法において、DNAを切断する前記酵素はDNase Iであることを特徴とする方法。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法において、任意の適切な標識抗体を蛍光法のために使用できることを特徴とする方法。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法において、蛍光法のために任意の蛍光体、特に以下の：フルオレセイン-5-イソチオシアネート(FITC)、アミノメチルクマリナーセテート(AMCA 350)、6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシクマリナー誘導体(Marina Blue)、Cascade Blue、Alexa fluor 405、6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシクマリナー誘導体(Pacific Blue)、Alexa Fluor 430、Cascade Yellow、Alexa Fluor 488

10

20

30

40

50

、フィコエリトリン ( P E )、フィコエリトリン T e x a s R e d ( P E - T e x a s R e d )、フィコエリトリン - シアニン 5 ( P E - C y 5 )、ペリジニククロフィルタンパク質 ( P e r C P )、ペリジニククロフィルタンパク質 - シアニン 5 . 5 ( P e r C P - C y 5 . 5 )、フィコエリトリン - シアニン 7 ( P E - C y 7 )、ローダミン T R、アロフィコシアニン ( A P C )、A L e x a F l u o r 6 4 7、アロフィコシアニンシアニン 7 ( A P C - C y 7 )、B D A P C - H 7、A l e x a F l u o r 7 0 0 のうちのいずれか 1 つを使用できることを特徴とする方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法において、外面免疫蛍光法 ( e x t e r n a l i m m u n o f l u o r e s c e n s e ) の 1 つの追加ステップが含まれることを特徴とする方法。

10

【請求項 1 2】

精子の内部に存在するウイルス、クラミジア、寄生虫および他の病原体を調査するためのキットにおいて、少なくとも以下の：

- 精子細胞の D N A を弛緩させることができる物質と、
  - 対象の感染因子に対して使用するのに適切な 1 つ以上の抗体と
- を含むことを特徴とするキット。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載のキットにおいて、前記 D N A 消化物質が任意の D N A 消化酵素であることを特徴とするキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、低妊孕性および不妊症の病因を調査および決定すること、ならびに先天性感染症を予防することを企図して、精子中の細胞内ウイルス、クラミジア、寄生虫および他の微生物を検出するために、精液、つまり精細胞集団を分析する方法について記載する。手法全ては、D N A 構造を弛緩させる特殊方法、抗体を用いる微生物の標的化、フローサイトメトリーを用いた結果の評価を使用して実施する。

【背景技術】

【0002】

低妊孕性は、現在、発生頻度がますます上昇しつつある問題であり、多数の家族に影響を及ぼしている。そこでこの問題に対処するため、体外受精 ( I V F ) を含む数多くのアプローチが開発されてきた。

30

【0003】

卵管閉塞、無精子症および閉経が低妊孕性の原因であることは議論の余地がない。無精子症と閉経の初期段階である精子過少症と閉経前期もまた、低妊孕性を引き起こす、ますます重要性の高まっている因子であるので、同様に関心が高い。特に精子過少症は、受胎するためには精子がたった 1 個あれば十分なので、I V F を介して容易に解決されるはずの問題である。しかし、実際にはそうではない。

【0004】

精子については、これまで集中的に研究されてきた、精子の品質に関する形態および運動性という 2 種の評価パラメータに特に影響を及ぼす様々な質的欠陥が存在する。運動性は、I V F を試みるエンブリオロジスト ( 胚培養士 ) に、精子の顕微受精への適合性に関して近似情報しか提供しない。他方、精子形態は、精子が受精に適するか否かに関して評価するためにはるかに正確な基準である。しかし精子形態は、精子サンプルの形態学的特性解析に使用される精子が解析過程において破壊されるので、I V F に使用できる良好な精子を選択するための尺度として直接的に使用することはできない。上記によれば、低妊孕性カップルを観察する際に考慮に入れられる、精液サンプルを評価する多数の方法 ( W o r l d H e a l t h O r g a n i z a t i o n r e f e r e n c e v a l u e s f o r h u m a n s e m e n c h a r a c t e r i s t i c s , H u m a n

40

50

Reproduction Update 2009)があり、それらのカップルの多くはIVF法の使用へ進むことになる。

【0005】

精液サンプルの最終特性解析は、検査対象の各精子上で検出された特異的な形態学的異常全ての評価を結合した結果となる。これらの異常が存在しないことを特徴とする精子は、「適合」または「正常」と分類される。さらに、生理学的数値も異常な精子1個当たりの形態学的異常の平均値を計測する奇形精子指数(TZI)を通して与えられてきた。精子の品質を、プログラム細胞死の過程に入ってしまった精子であるサンプル中のアポトーシス性精子のパーセンテージを計測することによって評価することもまた可能である。

【0006】

しかし、あらゆる精子異常は特定の原因に帰せることができる。そのような原因は、例えば慢性前立腺炎の症例では、微生物、または例えば喫煙、肥満、過剰な身体運動、高温などの他の因子であろう。

【0007】

これに反して、男性低妊孕性の原因としてのウイルス因子は、医学界では現在まで重要であるとは見なされていなかった。2004年および2005年に、米国の2誌の生殖免疫学雑誌において、Locus Medicus S.A.の研究者ら(本発明の発明者であるV. Tsilivakosを含む)は、低妊孕性および/または流産(miscarriages)の病歴を持つ女性の血液中のナチュラルキラー(以下ではNKと呼ぶ)リンパ球の高い数値と無症候性ヘルペスウイルス血症(HSV1~2型、EBV、CMV、HHV6およびHHV7)の存在との相関について報告している。

【0008】

その後、本発明者らは、流産胎児中ではNKリンパ球の大多数が着床部位に集合していたが、他方これらの女性の血中NKレベルは正常であることを観察した。本発明者らの理論によれば、これは、これらの症例における胚が精子を含む精細胞を通して男性に遡ることができる(少なくともヘルペス性の)ウイルス抗原の存在に起因して胚自体が抗原性であるかどうかで説明できる。これらの抗原は、NK応答を引き起こす胎児細胞によって女性の免疫系に発現および提示されることになる。

【0009】

しかし、本発明者らは、精子形態または精液分析の他のパラメータなどの伝統的診断法を通してウイルス要素の存在を確定しようと試みたが、それが実現不可能であることを見いだした。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

カップルが不妊症クリニックを受診した場合の適正なアプローチは、この問題の原因を調査することである。多数の症状や徴候が不妊症に関係する因子であると見なされてきたが、それらの多くは主要原因ではなく、それら自体が、通常は実際上感染性である他の因子の結果であり、これらの根絶または抑制が治療に役立つ可能性がある。例えば、本発明者らは、卵管内のクラミジアもしくは他の微生物の存在が卵管閉塞をもたらすことがあり、この卵管閉塞は、最初は一時的だが、治療的介入を行わないと永続性になる可能性があることを知っている。同様に、細胞アポトーシスを原因とする精子を含む精細胞のDNA断片化は、男性生殖器官の様々な部分の細菌性もしくは場合によりウイルス性感染症ならびに例えば酸化ストレスなどの他の因子の結果であることが多い。

【0011】

カップルが抱える不妊症問題への対応が成功するか否かは、この問題の主要原因に関する解明の絶対精度、カップルが自然妊娠を達成するか、または何らかの種類の介助生殖を使用するかに左右される。残念なことに、実際に精液中にウイルスが存在することの臨床的重要性が個々の研究者らに認識されたのは近年に過ぎない(しかし、医学界全体では未だ認識されていない)が、最終的に未受精卵を受精させる精子内にウイルスが含まれてい

10

20

30

40

50

れば、臨床的により一層重要になる事実である。この場合、ウイルス感染症は、精子から受精卵へ垂直伝播を通して感染することができ、結果として胎児およびウイルス細胞の同時増殖を生じさせ、ウイルス細胞は次に、例えば神経系におけるヘルペスウイルスまたは心血管系における他のウイルスの場合のように、先天性欠損を誘発することが公知である器官や組織内に生息することになろう。本発明者らの見解では、感染性（ウイルス）因子の存在が有害作用を引き起こすために、免疫系はその感染との闘いに失敗する。これとは対照的に、女性の防御機構がウイルス抗原を認識することによって感染（ウイルス）因子に対向できれば、ウイルス感染胎児細胞の破壊がもたらされることになる。

#### 【0012】

胚細胞拒絶の機序は、NK細胞を介して発生する機序を含むことができ、この機序に対しては、免疫学的病因が第一三半期流産の経過において果たす役割に関して過去25年以上にわたり極めて大きな議論が起こってきた。これは、少なくともそれに対するNK細胞の活性化が後続反応であるヘルペスウイルスの場合には真実であろう。さらに、近年の刊行物において、本発明者らは、ギリシャ人教師の間での不妊症の高い発生率について報告した。この原因は、小児期のウイルス感染症への彼らの曝露率が高かったこと、つまりウイルス濃度が高かったことに求めることができよう。さらに本発明者らは、長期にわたり関係があるカップルでは流産の発生率が高いことを観察したが、これは女性の側に強度の免疫記憶が存在することを指していると思われる。この免疫記憶は、女性の免疫系から男性パートナーの「周知」ウイルスに対する強度の免疫学的応答を導き、結果として感染胚細胞の急速な破壊を生じさせることになる。残念なことに、胚抗原性に関して国際的に実施された試験は未だ存在していない。しかし本発明者らは、発達中の胚は、男性によって生み出される抗原である、およびそれらを自分自身と認識できるように女性器官がその抗原を作り出すことはない男性限定抗原を、少なくとも第一三半期終了時まで、ほとんどもしくは全く発現しないと考える。

#### 【0013】

配偶者間で異なるHLA分子に関して、本発明者らは、それらの発現が女性の免疫系と直接接触するようになる胎児細胞中ではダウンレギュレートされると認識している。そこで第一三半期流産中または極めて早期に発生する、このため月経の遅延を通して感知できない流産中には、どの異種抗原が女性器官を攻撃するのかという疑問が生じる。今後は、国際的科学的コミュニティが、胎児へのウイルス抗原の直接伝播を生じさせるであろう、男性の無症候性ウイルス感染症の臨床的有意性度ならびに各症例の適切な治療に取り組むことが必要である。

#### 【0014】

本発明者らがこの因子を考察に含めたことから、精子を含む精細胞中の非ウイルスおよび他の汚染因子を考察することの失敗は、不妊症に関する不適切で不十分な研究と一致するという本発明者らの見解が生じた。

#### 【0015】

このため、高度の感受性および特異性で精子を含む精細胞中の感染因子を検出する方法に対する大きな必要があるが、残念なことに、現在まで、これは技術的に不可能であった。

#### 【0016】

その他のアプローチ

現在まで、精液中の例えばクラミジアなどの微生物を検出する方法は免疫蛍光法（スライド載荷細胞懸濁液）を使用してきたが、この方法の感受性は極めて低い。血液中の循環抗体を検出する血清学的ELISA法もまた頻回に使用されてきたが、感染の位置確認に関する情報は全く得られていない。

#### 【0017】

現在は、マイコプラズマ属を含む微生物が精液培養によって検出されている。しかし細胞内感染因子を培養するためには、特殊細胞系および細胞培養装置の使用ならびに厳密な実験に関する安全性基準が必要とされる。これらの要件の増加は、この技術を日常的に適

10

20

30

40

50

用することをほぼ不可能にしている。

【0018】

近年は、分子技術（主としてポリメラーゼ連鎖反応もしくはPCR）を使用すると、精子または精液の洗浄済み細胞成分からDNA抽出後にクラミジアおよび感染因子を検出することができる。しかし走査型電子顕微鏡による精子を含む精細胞内部での細胞内病原体の検出については、これまで報告されていない。

【0019】

最後に、電子顕微鏡は、細胞膜の外面に付着した微生物またはウイルスの存在しか検出できない。

【0020】

精液中のウイルスを検出するために高度の感度および特異性を特徴とする現在利用可能な最も有効なアプローチは、精液の洗浄細胞成分のPCRである。しかしこの技術の主要な欠点は、細胞外または細胞内の寄生虫を、つまり検出された微生物が精子の外側または内側のどちらに位置するのか識別できないことであり、さらにこの技術は、感染した特定細胞型が、精子であるのか、または精液中に含有される他の細胞型、例えば白血球もしくは精細胞前駆細胞であるのかを指定することができない。

【0021】

さらに、ウイルスおよび/またはトキソプラズマに対する抗体の血清学的検出は、精細胞の内側もしくは外側上または精液の任意の他の細胞成分上での感染因子の位置確認に関する情報を全く提供しない。

【0022】

最後に、細胞内の微生物の検出は、蛍光性または発色性 *in situ* ハイブリダイゼーションを通して可能である。しかしこの方法は、本発明において記載する方法より感受性が低く、所要時間が長く、要する費用も高額である。

【0023】

本発明において開示および記載する方法は、初めて、感染因子の、つまり精子を含む精細胞内（内側上）に位置する感染因子の細胞内検出を可能にする。

【0024】

“Detection and quantification of intracellular pathogens” と題するStuartらの米国特許出願公開第2006/0099661A1号明細書の特許出願は、大多数は末梢血液中であるが、さらに精液を含む他の生体液の細胞上でも、細胞の表面ならびに細胞内の両方でのクラミジアの検出に焦点を当てている。この特許では、発明者らは、下記の3つの基本的な

a) 生体液を入手するステップと、  
b) 細胞表面上もしくは細胞内でクラミジア抗原を特異的に認識するために一次抗体を使用するステップと、  
c) フローサイトメトリーを使用してサンプルを分析するステップと  
について記載しており、

さらに彼らは、この特許に記載した提案方法を使用することによって、末梢血中でクラミジアを検出することに成功できると報告している。

【0025】

さらに、化学物質TRITON-Xを使用するリンパ球内でのクラミジア検出法によると、“Detection and quantification of intracellular pathogens” と題する米国特許出願公開第2006/0099661A1号明細書の著者らは、この方法が胚細胞を含む他の細胞内でのクラミジアの検出にも拡大できると主張している。

【0026】

前記先行技術文献において記載された前提条件を試験するために、本発明者らは、発明者Elizabeth S. StuartおよびLloyd H. Semprevivoによって提案された実験方法にしたがって、米国特許出願公開第2006/009966

10

20

30

40

50

1 A 1号明細書に記載された実験を実施した。しかし精細胞内のクラミジア検出への本方法の拡大に関して米国特許出願公開第2006/0099661 A 1号明細書に表示された主張にもかかわらず、本発明者らが下記の図1におけるヒストグラムに示したように、本発明者らは、胚細胞内での細胞内クラミジア検出がStuartおよびSemprevivoによって記載された試験技術にしたがうと不可能であることを見いだしたが、これは本発明において本発明者らが開示した方法によりクラミジアの存在に対して「強陽性」と特徴付けられた公知のサンプル上でのことであった。

【0027】

本発明者らの結果によると、StuartおよびSemprevivoによって報告された手法によるクラミジア検出に使用された精液サンプルを表示する曲線は、コントロールと比較して右方へのシフトを示さなかった(図1B) - 2つの曲線は識別不能である。これは、この方法がサンプル中のクラミジアの存在を検出しなかったことを意味する。本発明の発明者らは、StuartおよびSemprevivoによる方法が精細胞内でのクラミジア検出に失敗した原因が細胞の(DNAaseを用いる)酵素処理が行われなかったことにあると考えており、この処理こそ本発明者らが提案する処理であり、精細胞内部の(細菌性もしくはウイルス性)感染因子を検出する手法にとって必須のステップであることが明らかになり、この手法は本発明の方法の中心で必須要素である。

10

【0028】

さらに、本発明者らの結果は、StuartおよびSemprevivoの方法が、特に直接蛍光法を使用した場合は、精液の試験に関する限り、感受性が低く特異性も低いことを証明した。これは、StuartおよびSemprevivoの特許出願において提案されたプロトコールを使用することによって、陰性コントロール精液サンプル内でマウス抗原に対する特異性を備える抗CD3抗体が検出されるが、他方この抗体は理論的には精細胞内の抗原に結合するはずがない(低特異性)ことを示している図2に示されている。つまり、StuartおよびSemprevivoの提案方法は、誤った誤解を招く結果を作り出す。

20

【0029】

上記の結果は、Stuartらの米国特許出願公開第2006/0099661 A 1号明細書によって提案された、精細胞内で細胞内クラミジアを検出する方法が本発明によって記載された課題の解決を提供しないことを実証している。

30

【課題を解決するための手段】

【0030】

本発明者らの見解によると、精液中の推定感染因子に関する付随的試験は、以下の：早期妊娠不成功、生化学的妊娠、精子過少症、精子無力症もしくは奇形精子症、IVF試行の不成功、低妊孕性の内の1つ以上の病歴がある場合は必ず、または一般に低妊孕を予防するために絶対必要である。

【0031】

特に低妊孕を予防するための第一の焦点は精子中のクラミジア検出であり、本発明者らは、他の微生物の存在もまた検出する目的で、スペルミオグラム(spermioqram(精子発育系図))と精液培養とを組み合わせる精子中のクラミジア検出を実施することを選択した。

40

【0032】

本発明は、精子内部のウイルス、クラミジア、寄生虫および他の微生物の存在を検出および試験する方法において、直接的もしくは間接的免疫蛍光法を使用するステップと、その後フローサイトメトリーを用いて視認および評価するステップとによる方法について記載する。

【0033】

本発明は、この検出が、精子の内部に存在する微生物を検出するために細胞内で実施されることについて記載する。本発明で提案する方法は、例えばDNAを弛緩させる特殊処理、例えばDNA消化を用いて、フローサイトメトリーの結果の評価と組み合わせた免疫

50

蛍光法である。

【0034】

本発明の特徴は、精子の細胞内のウイルス、クラミジア、寄生虫および他の感染性病原体の存在を調査するために記載した方法が以下の：

- 精子を含む精細胞のDNAの高密度構造を弛緩させるステップと、
- 直接的もしくは間接的精細胞内免疫蛍光法と、
- フローサイトメトリーを用いた結果の視認および評価と

を含む点にある。

【0035】

本発明者らは、標的抗原を特異的抗体によって検出可能にするためには、免疫蛍光法の前にDNAの高密度構造のDNA弛緩を行うことが極めて重要であることを強調しておきたい。

10

【0036】

フローサイトメトリーによって結果を視認および評価するステップは、1Nおよび2N細胞間を識別可能にするためにWB内での細胞ペレットと7-アミノアクチノマイシンD(7AAD)とのインキュベーションを含むことが有益である。

【0037】

好ましくは、本発明で記載した方法は、低妊孕性、早期の妊娠不成功もしくは流産または胎児消失の原因を決定するために実施される。さらに、本方法は、先天性感染症を予防および研究するため、または垂直伝播を予防するため、ならびに男性生殖器系の炎症や感染症、例えば精巣上体炎(epididymitis)を検出するために使用できる。

20

【0038】

本発明の方法は、さらに以下の病原体：サイトメガロウイルス(CMV)、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、HHV(ヒトヘルペスウイルス)-6、HHV-7、HHV-8、パルボウイルス19、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、コクサッキーウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV-1、HIV-2)、アデノ随伴ウイルス(AAV)、風疹ウイルス、HPV(ヒト乳頭腫ウイルス)、クラミジア、トキソプラズマおよびノロウイルスのうちの1つの特異的存在を検出することもできる。

30

【0039】

特に、精子中のクラミジアの検出に関して、本方法は、他の病原体を検出するためにスベルミオグラムおよび精液培養と組み合わせることができ、これらの方法が同一サンプル上または異なるサンプル上で実施できることは有意な利点である。

【0040】

好ましくは、極めて高密度である精子DNAのDNA構造の弛緩は、DNA消化を用いて実施され、DNA断片化を生じさせる。

【0041】

DNA消化は、DNAを切断する酵素を用いて実施することが有益である。

【0042】

例えば、この酵素は、DNase Iであろう。

40

【0043】

免疫蛍光法のためには、任意の適切な蛍光抗体または抗抗体を使用できる。このために、現在知られている以下の：フルオレセイン-5-イソチオシアネート(FITC)、アミノメチルクマリンアセテート(AMCA 350)、6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシクマリン誘導体(Marina Blue)、Cascade Blue、Alexa fluor 405、6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシクマリン誘導体(Pacific Blue)、Alexa Fluor 430、Cascade Yellow、Alexa Fluor 488、フィコエリトリン(PE)、フィコエリトリンTexas Red(PE-Texas Red)、フィコエリトリン-シアニン5(PE

50

- Cy 5)、ペリジニクロロフィルタンパク質 (PerCP)、ペリジニクロロフィルタンパク質 - シアニン 5.5 (PerCP - Cy 5.5)、フィコエリトリン - シアニン 7 (PE - Cy 7)、ローダミン TR、アロフィコシアニン (APC)、Alexa Fluor 647、アロフィコシアニンシアニン 7 (APC - Cy 7)、BD APC - H7 または Alexa Fluor 700 のうちのいずれか 1 つを含む任意の蛍光色素を使用できる。

【0044】

本発明の方法は、表面抗原を検出するための追加のステップを含むことができる。

【0045】

本発明は、本発明の方法を使用して精子の内部のクラミジア、ウイルス、寄生虫および他の病原体を精子内検出するためのキットの開発および使用をさらに含んでいる。本キットは、精子細胞の DNA を弛緩させることができる物質を必ず含んでいなければならない。この物質は、例えば DNA を消化する酵素であろう；例えば、この酵素は DNase I であろう。さらに、本発明に開示したキットは、その存在を同定することが要求される特異的病原体に対する 1 つ以上の抗体を含まなければならない。上記の抗体は、例えば上述したような蛍光色素を用いて直接標識できる。病原体に対する特異的抗体が標識されない場合は、第一蛍光色素を認識する第二蛍光色素標識もしくはビオチン化抗体を含めなければならない。

【0046】

以下の図面を使用すると本発明を例示することができる。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図 1】図 1 は、Stuart らによる (他の細胞型に対する) 米国特許出願公開第 2006/0099661 A1 号明細書に記載されたプロトコールによる精子内のクラミジア検出の不成功を示す図である。同一サンプルは、本発明による DNA 消化後には強陽性と特徴付けられる (データは示していない)。

【図 2】図 2 は、Stuart らによる (他の細胞型に対する) 米国特許出願公開第 2006/0099661 A1 号明細書に記載されたプロトコールによる抗体特異性の消失を示す図である。マウス CD3 に対する抗体が結合し、精子に非特異的に結合し、右方への蛍光シフトを引き起こす。

【図 3】図 3 は、フローサイトメトリーを用いた C. トラコマチス (C. trachomatis) および HSV 抗原の精子内検出を示す図である。図 3 A は、特異的抗原の検出が DNase I 消化後に観察されることを示し、図 3 B は、特異的抗原の検出が DNase I 消化後に観察されることを示し、図 3 C は、特異的抗原の検出が DNase I 消化後に観察されることを示している。これとは対照的に、図 3 D は、DNase I 消化が先行しないとそのような検出が行われないことを示し、図 3 F は、DNase I 消化が先行しないとそのような検出が行われないことを示し、図 3 G は、DNase I 消化が先行しないとそのような検出が行われないことを示している。

【発明を実施するための形態】

【0048】

下記に本発明の実施形態の実施例を示す。

【実施例】

【0049】

1. 精子を含む精細胞の固定

精液の収集および流動化後に、精子を沈降させ、4 で 30 分間にわたり 4% パラホルムアルデヒド (PFA) を用いて固定した。PFA は、タンパク質を架橋し、これにより病原体を不活性化して、精子に既に結合している推定自己抗体を固定化することによって機能し、所望であれば検出可能にさせる。一部のまれな場合には、一部の抗原性エピトープが変化もしくは破壊され、所定の抗体によって検出不能にさせられることがある。このような場合には、固定に先行して表面染色が実施されてよい。さらに、PFA 固定は、細

10

20

30

40

50

胞の物理的特性を保存する。つまり、固定後には、細胞はフローサイトメトリーを用いて実施される解析中に、証明された同一散乱特性を示す。さらにPFA固定は、細胞外または細胞内いずれかのその後の染色手法の適用を可能にする。

#### 【0050】

##### 2. 重要な注意

特定抗体をこの特定抗体が認識して結合する病原体とともにインキュベートする前に、精子の高密度DNA構造を弛緩させる、または緩めるステップを最初を実施することは、この手法にとって極めて重要であって不可欠である。この方法は、DNA構造を緩めることができる任意の方法、特に精子DNAの高密度構造を緩める能力を有するDNA消化法によって達成できる。DNAを緩めるこの方法は、同一結果を達成できる、機械的、熱的、電解的方法いずれか、または例えばメルカプトエタノール、ジチオスレイトール、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンなどの還元剤を使用するなどの任意の他の手段を用いて実施できる。このような手段は、DNA消化のための酵素の使用であってよい。本明細書に提示した特定の実施例では、このような物質の例は、DNA消化酵素である。本明細書で使用する特定の実施例では、本発明者らは、このようなDNA消化物質として酵素DNase Iを使用した。図3は、DNase I消化のステップを使用しなかった場合の病原体検出の不成功を例示している。

10

#### 【0051】

##### 3. 精子内染色(間接的)

本発明者らの実施例において間接染色を使用するのは、コストが直接染色より安価なためである。しかし本発明は、以下に記載するように、代わりに直接共役抗体を利用しても機能できる。

20

#### 【0052】

A. 細胞分画を沈降させ、再懸濁させ、30分間にわたって4%のPFAおよび0.1%のサポニン(培地A)を含有する100~500 $\mu$ Lのリン酸緩衝食塩液(PBS)とともにインキュベートする。これらの細胞は、次に0.1%のサポニンおよび2%のウシ胎児血清(FCS)(洗浄バッファー(WB))を含有する2mLのPBSで洗浄する。上清を廃棄し、ペレットは、10%のジメチルスルホキシド(DMSO)および0.1%のサポニンを含有する100~500 $\mu$ LのPBSとともに10分間インキュベートする。WBを用いた洗浄後、ペレットは4 $\times$ で100~500 $\mu$ Lの培地Aを用いて固定する。10分間のインキュベーション後、細胞をWBで洗浄し、上清を廃棄し、ペレットは再懸濁させ、37 $^{\circ}$ CでDNase I(500 $\mu$ g/mL)とともに30分間インキュベートする。最後に、細胞をWBで洗浄し、上清を廃棄し、ペレットは、以下の病原体:

30

- a. サイトメガロウイルス(CMV)
- b. 単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)および/または単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)
- c. エプスタイン・バーウイルス(EBV)
- d. HHV-6
- e. HHV-7
- f. HHV-8
- g. パルボウイルス19
- h. B型肝炎ウイルス
- i. C型肝炎ウイルス
- j. コクサッキーウイルス
- k. HIV(HIV-1、HIV-2)
- l. アデノ随伴ウイルス(AAV)
- m. 風疹ウイルス
- n. HPV(ヒト乳頭腫ウイルス)
- o. ノロウイルス
- p. クラミジア

40

50

q. トキソプラズマのうちの1つに対して特異的な滴定量の特定抗体とともにインキュベートする。

【0053】

細胞の抗体とのインキュベーションは、各1種の病原体につき別個の試験管内、または相互に対照的に発色する別個の蛍光体と直接共役した抗体が存在することを前提に、病原体の同時検出を可能にする同一試験管内のいずれかで行われる。

【0054】

4 での30分間のインキュベーション後、細胞をWBで洗浄し、上清を廃棄する。

【0055】

B. 細胞ペレットを再懸濁させ、その後、それから一次抗体が開発された動物由来の免疫グロブリンに対する50 $\mu$ Lのポリクローマル蛍光体共役抗体との新規インキュベーションを実施する。任意の蛍光体を使用できる。以下は、指示的に言及した現時点で最も知られている蛍光体であるが、これらが本発明者らの蛍光体の選択を制限すると見なすべきではない：

フルオレセイン-5-イソチオシアネート(FITC)、アミノメチルクマリンアセテート(AMCA 350)、6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシクマリン誘導体(Marina Blue)、Cascade Blue、Alexa fluor 405、6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシクマリン誘導体(Pacific Blue)、Alexa Fluor 430、Cascade Yellow、Alexa Fluor 488、フィコエリトリン(PE)、フィコエリトリンTexas Red(PE-Texas Red)、フィコエリトリン-シアニン5(PE-Cy5)、ペリジニクロロフィルタンパク質(PerCP)、ペリジニクロロフィルタンパク質-シアニン5.5(PerCP-Cy5.5)、フィコエリトリン-シアニン7(PE-Cy7)、ローダミンTR、アロフィコシアニン(APC)、Alexa Fluor 647、アロフィコシアニンシアニン7(APC-Cy7)、BD APC-H7、Alexa Fluor 700。

【0056】

次に細胞の4 での30分間のわたるインキュベーションを行い、その後細胞を2mLのWBで洗浄する。白血球試験が必要であれば、その手法を次のステップで実施する。または、この手法は、細胞を採取するステップに進む。

【0057】

任意選択の白血球染色のステップ

本発明者らが精液の白血球中に微生物が存在するか否かという疑問に直面した場合は、サンプルは、白血球内に病原体が存在する可能性を評価するために白血球抗原に対する直接共役抗体とともにインキュベートされることになる。この抗体に付着させる蛍光体は、病原体検出のために使用される他の蛍光体とは相違しなければならない。次に4 での30分間のインキュベーションを行い、さらに別の2mLのWBで洗浄する。上清を廃棄し、次に細胞を再懸濁させる。さらに、1Nおよび2N細胞間の識別は、WB中での細胞ペレットと7-アミノアクチノマイシンD(7AAD)とのインキュベーション後に実現できる。5分間のインキュベーション後、細胞はフローサイトメーターで捕捉する準備が整う。

【0058】

病原体の直接免疫表現型検査

または、推定病原体に対する特異的抗体が蛍光体と直接共役した場合は、上述したステージBを省略することができる。さらに、各特異的抗体はビオチンと共役させることができ、それらの検出は、その後のストレプトアビジン-蛍光体複合体とのインキュベーションによって達成できる。ビオチンの代りとして、任意の他の様式の蛍光体共役を使用できる。以下の公知の蛍光体：フルオレセイン-5-イソチオシアネート(FITC)、アミノメチルクマリンアセテート(AMCA 350)、6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシクマリン誘導体(Marina Blue)、Cascade Blue、Alexa

10

20

30

40

50

fluor 405、6、8 - ジフルオロ - 7 - ヒドロキシクマリン誘導体 (Pacific Blue)、Alexa Fluor 430、Cascade Yellow、Alexa Fluor 488、フィコエリトリン (PE)、フィコエリトリン Texas Red (PE - Texas Red)、フィコエリトリン - シアニン 5 (PE - Cy5)、ペリジニククロフィルタンパク質 (PerCP)、ペリジニククロフィルタンパク質 - シアニン 5.5 (PerCP - Cy5.5)、フィコエリトリン - シアニン 7 (PE - Cy7)、ローダミン TR、アロフィコシアニン (APC)、Alexa Fluor 647、アロフィコシアニンシアニン 7 (APC - Cy7)、BD APC - H7、Alexa Fluor 700 を含むがそれらに限定されない任意の蛍光体を使用できる。

10

【0059】

#### 4. 捕捉および結果の評価

フローサイトメトリー装置でサンプルを捕捉し、適切なソフトウェアを使用してデータ分析を実施する。細胞は、細胞のサイズおよび複雑性および/または抗原 (例えば白血球抗原) の発現に基づく領域組み合わせを用いてゲーティングされる。この分析は、精子内または精液の他の細胞成分内の病原体の推定存在に焦点を当てる。さらに、白血球中のそのような病原体の検出は、白血球抗原の発現に基づく適切な領域を使用すると実現可能である。

【0060】

#### B. 表面免疫染色

精子内染色に加えて、推定細胞外病原体の検出もまた実現可能である。細胞の第二分画を遠心にかき、上清を廃棄し、細胞を各病原体に対して特異的な滴定量の特定抗体を含有する試験管に同等に分配する。4 での 30 分間のインキュベーション後に、試験管は 2 % の FCS を含有する PBS (PBS - 2 % の FCS) で洗浄し、上清を廃棄する。次に、細胞は、再懸濁させ、それから一次抗体が開発された動物由来の免疫グロブリンに対する 50  $\mu$ L のポリクローナル蛍光体共役抗体中で再度インキュベートする。4 での 30 分間のインキュベーション後に、試験管は 2 % の FCS を含有する PBS (PBS - 2 % の FCS) で洗浄し、上清を廃棄する。細胞は再懸濁させ、捕捉および分析のためにフローサイトメトリー装置に配置する。

20

【0061】

#### 図面の詳細な説明

詳細には、

図 3 の二次元散布図では、精子のサイズ (FSC - H) は、それらの複雑性 (SSC - H) に関して示されているが、このとき精子富裕細胞集団を調査できるように囲み領域 R が規定されている。

30

【0062】

DNAse を使用しない上記の手法によって、1 つのクラミジア抗原および 1 つのヘルペス抗原各々を検出する抗体の特異的蛍光を図 1 のヒストグラム 3E および 3F に提示した。さらに、同一ヒストグラムにおいて、標識抗体によるコントロールの蛍光もまた示した。これら 2 本の曲線を比較すると、抗原が検出されない、つまり感染因子が検出されないことが明らかである。

40

【0063】

同一囲み領域 R 内での精子の試験からの同一パラメータを図 3 のヒストグラム 3A、3B および 3C に示したが、この場合には上記で詳述したように DNAase インキュベーションを含んでいた。データ解析は、DNAase の存在下では、コントロール (感染因子特異的抗体の使用を排除した同一手法によって処理されている) と比較して右方への蛍光シフトによって明らかのように、精子中の感染因子の検出が実現可能であることを証明している。

【0064】

図 1 および 2 については、本明細書の先行技術の章において上記で詳細に説明した。

50

## 【 0 0 6 5 】

本発明の方法の利点

・ 本発明に記載したように精子を含む精細胞の内部で感染因子を検出する方法の主要な利点は、細胞固定、膜透過化、および最も重要にはDNA消化酵素を用いたDNAの高密度構造の酵素的弛緩のための技術および条件が満たされることを前提に、高度の感受性である。本発明者らが実施した並行調査では、同一サンプル上の分子（PCR）検出試験結果が陰性である場合でさえ、本方法が感染因子の存在を検出することが見いだされた。さらに、特殊ビーズを使用し、抗原の数に蛍光レベルを適合させられる技術を使用することによって、精子を含む感染精細胞当たりの微生物もしくはウイルス数と蛍光強度を相関させる曲線を作成することが可能になる。本発明が提案する方法は、1サンプル当たり極めて多数（例、20,000個）の細胞の試験およびサンプルのレトロスペクティブ再試験を可能にする。提案方法によって提供されるこの量的優位性は、偽陰性（感染因子の検出の不成功）結果の可能性を最小限に抑える。

10

## 【 0 0 6 6 】

・ 本方法の高度の特異性は確立されており、陰性コントロールの使用、および当然ながらモノクローナル抗体（各微生物もしくはウイルスに対する特定分子の単一特異的部位を特異的に検出して反応する物質）の使用を通して保証される。さらに、散乱特性の評価を通して、および/または補助抗体（つまり、抗CD45）を用いると、精子を含む精細胞中の微生物の存在を確証できる。さらに、感染因子は細胞膜の外面に付着しているが、精子を含む精細胞の内部には付着していないこともまた明白に証明されている；このような情報は臨床的有意性が極めて大きい。

20

## 【 0 0 6 7 】

・ 本方法は、抗生物質もしくは抗ウイルスによる治療の有効性の評価を可能にする。サンプル中で検出される微生物（例、テトラサイクリンによる治療後のクラミジア）数の減少によって指示される、感染の退行を決定することによって病原体を監視することは有用である。

## 【 0 0 6 8 】

・ 固定サンプルは、試験時まで長期間にわたって安全に貯蔵できる。固定サンプルの輸送もまた実現可能である。本発明において精液を試験するために記載した方法はフローサイトメトリーの使用を必要とするので、この技術を持たない研究室がフローサイトメトリーを利用することは不可能である。この問題に対処するために、本発明において記載した方法は、感受性もしくは特異性を消失させずに固定サンプルの（様々な場所や研究室間の）安全な移動もしくは輸送を可能にする。さらに、安全なサンプル輸送能力は、フローサイトメトリーの技術的失敗が生じた場合に、別の研究室でのサンプルの再試験を可能にする。最後に、結果として生じたデータは、装置によって電子的に保存されるので、再評価のためにいつでも利用できる。

30

## 【 0 0 6 9 】

・ 本明細書に記載した方法は、同等のPCR試験のコストより確実に安価な極めて低いコストを特徴とする。

## 【 0 0 7 0 】

・ 本明細書に記載した方法は、試験結果を試験当日に入手できるので、極めて迅速な研究室ターンアラウンドタイムを特徴とする。

40

## 【 0 0 7 1 】

さらに、本発明は、精子を含む精細胞内の細胞内感染因子を検出する方法において、特異的免疫蛍光法を使用するステップとフローサイトメトリーによって試験結果を評価するステップとを含む方法について初めて記載する。

- 精子の細胞内分析は、細胞内部のDNA構造を「緩める」DNA消化酵素を使用することで可能になる。本発明者らは、現在までの試薬（抗体）が精子頭部内の微生物（標的抗原）を検出できなかったことの原因は、細胞のその領域内に存在するDNAの特定の極めて高い濃度にあると考えた。その結果、本発明者らは、抗体が標的抗原（微生物）に接

50

触して結合する経路を明確にするためには消化を通してDNAを「緩める」ことが必要と考える。

- 細胞内または細胞膜の外面上の微生物の検出に関する限り、本発明者らは、これらは臨床的解釈が異なる、2種の異なる種類のアプローチであると考え。例えば、本発明者らは、非顕性ウイルス血症およびクラミジア血症の原因は血液精巣閉門の透過を通した前駆胚細胞感染にあると考える。他方、微生物の膜局在は、主として精液放出経路（精巣上体、前立腺、尿道）の感染に関連している。

【0072】

自然妊娠に関しては、接合子細胞は細胞内感染因子の垂直伝播、つまり、精子による胎児への感染因子の直接伝播に対して保護されると思われないが、他方膜結合感染因子の伝播はより容易に阻止できる。例えば、Aynaud et al. (Frequency of herpes simplex virus, cytomegalovirus and human papillomavirus DNA in semen. Aynaud O et al. Int J STD AIDS. 2002 Aug; 13(8): 547-50)によると、精漿は細胞膜へのウイルス付着を予防する。

10

【0073】

本発明者らは、細胞表面上の感染因子は、精漿、抗体、前立腺などの要素の作用に起因して、垂直伝播については相当に小さなリスク因子であると考え。これとは対照的に、本発明者らは、胎児への無傷の細胞内感染因子の垂直伝播は、例えば先天性疾患、不妊症もしくは早期流産などの問題の発生にとって大きなリスクであると考え。

20

【0074】

特に自然妊娠中（卵細胞質内精子注入法なし）には、精子頭部のみが卵子内に進入し、残りの細胞（精細胞表面の大部分を占める）は排除される。その結果、細胞内感染因子は不可避的に卵子内に進入するが、他方、細胞膜結合微生物に関しては、精細胞膜は受精中は受精卵の外側に留まるので、これは当てはまらない。

【0075】

その結果、本発明者らは、精子から胎児への垂直伝播の試験において、細胞内感染因子の調査は最重要であると考え。

【0076】

以下の表1では、LOCUS MEDICUS S.A.の研究室において試験したサンプルならびにLOCUS MEDICUS S.A.の細胞生物学・免疫学研究室からの5カ月間の予備試験結果のデータを提示した。

30

	サンプルの総数	陽性		強陽性	
		(N)	(%)	(N)	(%)
sCT	310	204	65,81	14	6,86
cCT	329	219	66,57	49	22,37
CMV	273	125	45,79	19	15,20
EBV	243	59	24,28	1	1,69
HSV I/II	242	103	42,56	7	6,80

40

表1は、精液サンプル上でのフローサイトメトリーを使用した感染因子の検出を示している。

sCT:膜結合 C.トラコマチス(C.trachomatis)、cCT:細胞内 C.トラコマチス

(C.trachomatis)、CMV:サイトメガロウイルス、EBV:エプスタイン・バーウイルス、HSV

I/II:単純ヘルペスウイルス

50

## 【 0 0 7 7 】

本発明者らは、サンプルの 5 % 超で陽性精子が検出されたサンプルを「強陽性」と見なす。

## 【 0 0 7 8 】

上記の結果は、試験した有意な割合（%）のサンプルが細胞内クラミジアおよび/またはウイルスに感染しているのが見いだされたことを示している。検出された細胞内感染は、他の方法では見つけることができなかった。陽性結果（つまり、感染の検出）は、以下の表 2 に示したように、適切な抗生物質を用いて感染を即時に治療することを可能にする。

	症例の総数	クラミジア量の有意な減少	
		(症例数)	%
sCT	37	20	54,05
cCT	37	27	72,97

10

**表 2. 「強陽性」サンプルにおける C.トラコマチス(C.trachomatis)感染症に対する抗生物質治療の前後のフローサイトメトリーによりクラミジア量の有意な減少を示している症例数。sCT: 膜結合 C.トラコマチス(C.trachomatis)、cCT:細胞内 C.トラコマチス(C.trachomatis)**

20

## 【 0 0 7 9 】

より詳細には、表 2 は、「強陽性」（膜結合 C . トラコマチス（ C . t r a c h o m a t i s ）が検出された）サンプル計 3 7 例中 2 0 例（ 5 4 . 0 5 % ）において、抗生物質による治療後にクラミジア量が減少したことを示している。さらに表 2 は、 C . トラコマチス（ C . t r a c h o m a t i s ）が細胞内検出された場合、抗生物質による治療後に 3 7 例中 2 7 例（ 7 2 . 9 7 % ）が改善を示したので、クラミジア量の減少を示したサンプルの割合（%）がいっそう高かったことを示している。

【 図 1 】

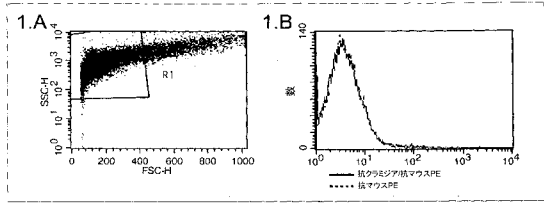


図1

【 図 2 】

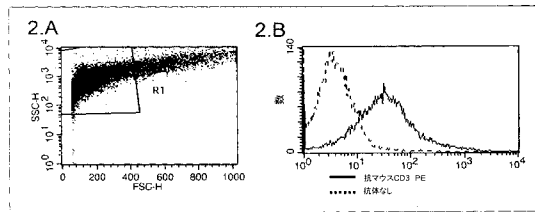


図2

【 図 3 】

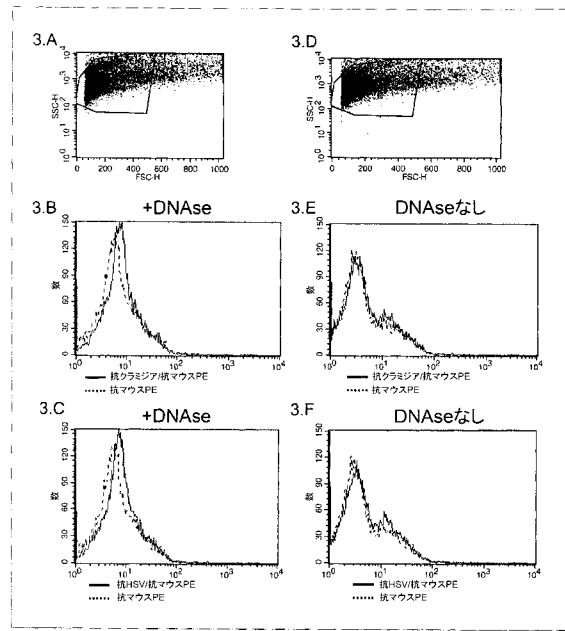


図3

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GR2013/000016
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/099661 A1 (STUART ELIZABETH S [US] ET AL) 11 May 2006 (2006-05-11) cited in the application paragraph [0038]; claims 1,5,12 paragraph [0056] - paragraph [0058]	1-13
X	WO 03/060520 A2 (LEE HELEN [GB]; HUANG LING [GB]; NADALA ELPIDIO CESAR JR [GB]; BUTTRES) 24 July 2003 (2003-07-24) page 4 - page 5; claim 18; figure 4 ----- -/--	12,13
<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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 June 2013		02/07/2013
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  Reuter, Uwe

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GR2013/000016
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	L. A. MITCHELL ET AL: "The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology", INTERNATIONAL JOURNAL OF ANDROLOGY, vol. 34, no. 1, 11 February 2011 (2011-02-11), pages 2-13, XP055067917, ISSN: 0105-6263, DOI: 10.1111/j.1365-2605.2009.01042.x abstract; figure 3 -----	1-13
A	WO 02/04666 A2 (UNIV CAMBRIDGE TECH [GB]; RENS WILLEM [GB]; FERGUSON SMITH MALCOLM AND) 17 January 2002 (2002-01-17) abstract; claims 1,19 -----	1-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GR2013/000016

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006099661 A1	11-05-2006	AU 2005248300 A1	08-12-2005
		CA 2562241 A1	08-12-2005
		EP 1743172 A2	17-01-2007
		JP 2007532913 A	15-11-2007
		US 2006099661 A1	11-05-2006
		WO 2005116234 A2	08-12-2005
WO 03060520 A2	24-07-2003	AU 2002356325 A1	30-07-2003
		CA 2473159 A1	24-07-2003
		CN 1620611 A	25-05-2005
		EP 1459069 A2	22-09-2004
		US 2005084862 A1	21-04-2005
		WO 03060520 A2	24-07-2003
WO 0204666 A2	17-01-2002	AU 6622501 A	21-01-2002
		WO 0204666 A2	17-01-2002

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード ( 参考 )  
G 0 1 N 33/569 L

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, 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, RS, 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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 ツィルヴァコス, ヴァシリオス

ギリシャ共和国 ジーアール - 1 1 5 2 5 アテネ, ソフィア スリマンストリート 4

(72) 発明者 グリツァピス, アゲロス

ギリシャ共和国 ジーアール - 1 1 5 2 5 アテネ, ソフィア スリマンストリート 4

Fターム(参考) 2G045 BA13 BB36 CB14 DA80 FA37 FB12 GC15

专利名称(译)	检测精液细胞内细胞内感染因子的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015513103A</a>	公开(公告)日	2015-04-30
申请号	JP2015502463	申请日	2013-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	梓勒瓦卢瓦 - 成本科尔多瓦男性的Siri TSILIVAKOS由Vassilios 格里斯祖尔髓阿盖损失 GRITZAPIS AGGELOS		
申请(专利权)人(译)	Tsuiruvakosu , Vashiriosu Guritsuapisu , Agerosu		
[标]发明人	ツイルヴァコスヴァシリ奥斯 グリツァピスアゲロス		
发明人	ツイルヴァコス,ヴァシリ奥斯 グリツァピス,アゲロス		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/48 G01N33/536 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/56994 G01N33/56905 G01N33/56927 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N2800/367		
FI分类号	G01N33/569.G G01N33/569.A G01N33/48.A G01N33/536.D G01N33/543.597 G01N33/569.L		
F-TERM分类号	2G045/BA13 2G045/BB36 2G045/CB14 2G045/DA80 2G045/FA37 2G045/FB12 2G045/GC15		
优先权	20120100185 2012-03-29 GR		
其他公开文献	JP6301310B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明描述了一种使用免疫荧光结合流式细胞术来研究精子中衣原体，病毒和其他感染因子的存在的方法。该方法用于使用DNA弛豫技术细胞内检测精子细胞中的微生物，并用于检测附着于精子表面的微生物。

	サンプルの総数	陽性		強陽性	
		(N)	(%)	(N)	(%)
sCT	310	204	65,81	14	6,86
cCT	329	219	66,57	49	22,37
CMV	273	125	45,79	19	15,20
EBV	243	59	24,28	1	1,69
HSV I/II	242	103	42,56	7	6,80