

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4583685号  
(P4583685)

(45) 発行日 平成22年11月17日(2010.11.17)

(24) 登録日 平成22年9月10日(2010.9.10)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/50	J
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/577	(2006.01)	GO 1 N 33/577	B
GO 1 N 33/82	(2006.01)	GO 1 N 33/82	

請求項の数 15 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2001-507101 (P2001-507101)	(73) 特許権者	302013623
(86) (22) 出願日	平成12年6月21日(2000.6.21)		ヴィタテク・バイオテクノロジー・ゲーエムベーハー
(65) 公表番号	特表2003-508731 (P2003-508731A)		ムペーハー
(43) 公表日	平成15年3月4日(2003.3.4)		オーストリア国アー-6020 インスブルック, インライン 66
(86) 国際出願番号	PCT/AT2000/000171	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開番号	W02001/001148		弁理士 社本 一夫
(87) 国際公開日	平成13年1月4日(2001.1.4)	(74) 代理人	100071124
審査請求日	平成19年6月21日(2007.6.21)		弁理士 今井 庄亮
(31) 優先権主張番号	A 1119/99	(74) 代理人	100076691
(32) 優先日	平成11年6月25日(1999.6.25)		弁理士 増井 忠式
(33) 優先権主張国	オーストリア(AT)	(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳動物の、特にヒトの受精能を測定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の受精能を測定する方法であって、

- ・哺乳動物から採取した体液又は器官液中のアファミン含有量を測定し、そして
  - ・測定したアファミン含有量を基準値と比較して、受精能を測定する、
- ことを特徴とする方法。

【請求項 2】

該哺乳動物がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該体液又は器官液が血清、卵胞液又は精液であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

該基準値が、正常な患者の対応する体液又は器官液中のアファミン含有量であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

該基準値を受精能の測定と並行して測定することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

該アファミン含有量を免疫学的方法により測定することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

## 【請求項 7】

該免疫学的方法が単クローン性抗体を用いる方法である、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

更に体液又は器官液中のビタミン E 含有量を測定することを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

該ビタミン E 含有量をさらに基準値と比較する、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

哺乳動物の受精能を測定するためのアファミンの使用。

## 【請求項 11】

受精方法の範囲内において患者をモニターするための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

該受精方法が体外受精及び細胞質内精子注入である、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

卵母細胞又は精子の成熟度を測定するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 14】

受精能及び生殖障害を調べるための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 15】

妊娠をモニターするための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、哺乳動物、特にヒトの受精能を測定する方法に関するものである。

## 【0002】

体外受精の技術に関する知識及び能力の向上により、信頼性がありかつ安価な受精能測定法に対する要求が非常に強まってきている。それには、単に受精障害の基礎診断だけではなく、さらに受精能の程度の検出並びに受精及び/又は受精卵の着床の測定も含まれる。

## 【0003】

アファミンは、アルブミン群に属し、例えばヒト血清アルブミン、ヒト - フェトプロテイン又はヒトビタミン D 結合タンパク質などのこの群に属するタンパク質と構造的及び生化学的に共通した多くの性質を示す 87 kDa のタンパク質である。アファミンは既にその遺伝子がクローニングされ、またその塩基配列が決定されており、従って組換え体としても利用可能である (WO 95 / 27059)。

## 【0004】

さらに、生化学的及び生理学的な試験により、このタンパク質がビタミン E 結合特性を有することが示されている。アファミンが血中のみでなく、例えば脳脊髄液、卵胞液及び精液などの他の体液や器官液中にも存在することが証明されている。

## 【0005】

本発明は、全く新規の受精能測定方法を提供することを目的とする。

本発明によれば、この目的は、哺乳動物、特にヒトの受精能を測定する方法であって、

- ・ 体液又は器官液を哺乳動物から採取し、
  - ・ この体液又は器官液中のアファミン含有量を測定し、そして
  - ・ 受精能を測定するために測定したアファミン含有量を基準値と比較する、
- ことを特徴とする方法により達成される。

## 【0006】

本発明は、アファミンが存在する種々の体液又は器官液においてアファミン濃度が受精能の性状 (fertility properties) と直接相関するという驚くべく発見に基づいている。この相関は、単に受精障害の存在に限定されるものではなく、受精能の周期的変動又は妊娠の診断に対しても成り立つ。本発明によれば、アファミン含有量を測定する本発明に記載

10

20

30

40

50

の方法論による卵母細胞の有無の検出ばかりでなく、卵母細胞の成熟度の評価でさえも可能であることが示されている。

【 0 0 0 7 】

本発明は、人間医学、特に体外受精のモニタリング又は受精診断及び専門的評価 (expert opinions) に用いることができる。さらにこれは、規格化することが容易であり、また検査を行なうための複雑な実験設備を必要としないために、最新の動物育種の領域においても非常に大きな可能性を秘めている。

【 0 0 0 8 】

アフアミンは多くの異なる体液及び器官液中に存在し、また本発明によれば、これら全ての体液中のアフアミン含有量が受精能の性状と相関することが示されている。しかしながら、本発明の好ましい実施態様によれば、例えば血清、卵胞液又は精液などの生理的にアフアミン含有量が多いことを特徴とする体液又は器官液中のアフアミン含有量が主に測定される。さらに、本発明に記載の該方法を脳脊髄液などの他の体液又は器官液を用いて実施することも当然可能であり、これはこれらの他の体液中のアフアミン含有量もまた、概して、アフアミン検出限界の点で何ら問題のない測定範囲内にあるからである。

【 0 0 0 9 】

実際には、主として体液又は器官液の採取法に関して、又はアフアミン含有量の測定に関しては、本発明に記載の方法は所望する何れの方法においても実施することができる。アフアミン含有量は、例えば、免疫学的に、電気泳動的に、又はクロマトグラフィー的に測定される。本発明によれば、アフアミンに対しては免疫学的測定法が好適な場合が多いが、これはアフアミンの異なるエピトプに対する一連の異なる単クローン性抗体が利用可能であるばかりでなく、特にそれが、(例えば比色検出法と組み合わせたような) 複雑な実験機器を用いることなく実施や評価をすることができるよう容易に設計される標準的 E L I S A 試験の形態のような免疫学的検査であるためである。この様式で、一般人でも実施が容易な形態で本発明に記載の測定方法を提供することも可能である。

【 0 0 1 0 】

基準値として、通常はそれぞれの体液又は器官液に対するアフアミンの正常値が使用される。本方法では、これは、例えば比較値、比較曲線若しくは比較表の形で得られるか、又は通常好まれるように採取した体液又は器官液の試料と一緒に基準試料 (決まったアフアミン含有量を有する) を同時に測定することにより得られる。後者の例では、異なる測定条件の異なる測定方法を使用することに起因するおそらく完全には除去することができない体系的な誤差の発生が極初期から回避される。このことは、単に (例えば卵母細胞の成熟度を測定する際の) アフアミン含有量の漸進的な差違が問題となる測定において特に重要である。

【 0 0 1 1 】

好適には、本発明により測定される試料は1つの基準値と比較されるばかりでなく、2つ又はそれ以上の基準値と比較される。従って、例えば「正常値」に加えて、例えば「病理学的」基準又は「妊娠」基準などの異なった基準値又は基準試料を提供することも可能である。

【 0 0 1 2 】

しかしながら、本発明によれば、正常患者のアフアミン含有量に相当する (又は、動物育種の場合には、正常動物の試料に相当する) 基準値を対応する体液又は器官液中のアフアミン含有量に対して提供することが好ましい。

【 0 0 1 3 】

本発明に記載の方法を実施するにあたっては、基準試料のアフアミン含有量を試料の受精能の測定と並行して測定する際にこの基準値を得ることが好ましい。本発明によれば、アフアミン含有量の測定は、好適には免疫学的方法、特に単クローン性抗体を使用して行なわれるが、それはこれにより標準化が極めて効率よく行なえ、そしてまた最もばらついた測定キットのロットにおいても、それらの間で検出したデータに適合性があるからである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 4 】

本発明によれば、特に精液及び卵胞液において、アファミン含有量の他にビタミンE含有量も受精能の性状と直接関連するため、同様に本発明に記載の方法において使用し得ることが示されている。従って、本発明に記載の方法は、さらにそれぞれの体液又は器官液中のビタミンE含有量の測定と組み合わせられることが好ましく、その際ビタミンE含有量もまた任意に基準値と比較される。

## 【 0 0 1 5 】

体液又は器官液中のビタミンEを測定する多数の方法が記載されている。本発明の範囲におけるアファミン含有量の測定の場合のように、ビタミンE含有量を同様に測定する特別な方法は本発明にとって重大ではないが、HPLC又は他の生化学的方法がビタミンE濃度を測定する好適な方法である。

10

## 【 0 0 1 6 】

さらなる態様において、本発明は哺乳動物の受精能の性状を測定するためのアファミンの使用に関する。

本発明のさらなる態様は、哺乳動物の受精能を測定するためのキットであって、

・哺乳動物から採取した体液若しくは器官液の試料、又は体液若しくは器官液を受けるための容器、

・該試料中のアファミン含有量を測定するための試薬、及び

・アファミンの基準手段、

を含むキットに関する。

20

## 【 0 0 1 7 】

上記したように、アファミン含有量の測定用試薬の選択は、当然使用するそれぞれの検出方法論に依存している。例えば、アファミン含有量の測定用試薬はアファミンに対する抗体、特に単クローン性抗体を含むことが好ましい。好適には、このアファミン抗体はまた、蛍光性、放射性、若しくは色素産生性基などのさらなる検出手段を含むか、又は他の検出手段（例えば2次抗体）により結合される。

## 【 0 0 1 8 】

アファミンの基準手段は、好適には、それぞれの体液又は器官液の基準試料などの標準化された量のアファミンを含む。しかしながら一方で、アファミンの基準手段は、好適にはそれぞれの体液又は器官液及びそれぞれの検出方法論に対して標準化された単一比較値、比較表又は比較曲線でそれぞれ構成されることができる。

30

## 【 0 0 1 9 】

本発明に記載のキットは、例えば、較正曲線を定義する、又はある受精能の性状を代表する一連の標準化されたアファミン試料を含むことが特に好ましい。

それぞれの体液又は器官液中のビタミンE含有量を本発明に記載のキットを用いて測定する場合にも、この測定に必要な試薬及び基準手段（基準試料を提供する場合には後者は当然同一である）は当然必要である。

## 【 0 0 2 0 】

さらなる態様において、本発明は、精液及び卵胞液中のビタミンE含有量を測定し、この含有量に対応する基準値と比較することによる受精能の測定、及びこの方法の実施に対応するキットに関する。

40

## 【 0 0 2 1 】

本発明に記載の方法及び本発明に記載のキットはそれぞれ、受精方法の範囲、特に体外受精及び細胞質内精子注入の場合において患者をモニターするために使用されることが好ましい。受精を成功させるためには、被験者における卵母細胞の有無とその質を極めて正確に、及び精子の機能性を定期的に、それぞれ簡単な検査でモニターすることが必要である。

## 【 0 0 2 2 】

本発明に記載の検査又は本発明に記載のキットのさらに好適な使用は、それぞれ、卵母細胞又は精子の成熟度を測定することにある。

50

さらに、本発明に記載の方法及び本発明に記載のキットはそれぞれ、受精能及び生殖障害を調べるために使用することができ、それは大集団の人を広範囲にスクリーニングすること及び体系的に検査することに非常に適している。

#### 【0023】

本発明に記載の方法及び本発明に記載のキットのさらなる特定の応用分野は、それぞれ妊娠の診断（妊娠検査として）に始まる妊娠のモニタリング、及びその後の厳密な意味での妊娠のモニタリング、特にアフアミンおよびビタミンE含有量の減少によってそれぞれもたらされる酸化物質又はラジカル物質が示す負の効果の危険度のモニタリングにある。

#### 【0024】

次に本発明を以下の実施例及び図面に沿って詳細に説明する。

10

#### 実施例

体外受精（IVF）又は細胞質内精子注入（ICSI）のために排卵誘発を受けた患者から、種々のサイズの卵胞を超音波検査法によりそれぞれ穿刺採取した。個々の卵胞液試料について卵母細胞の有無を検査し、遠心後、以降の検査のために保存した。卵胞穿刺の日にこれらの患者から血液試料を採取し、血清処理のために収集した。卵胞液及び血清中のアフアミン濃度を（単クローン性抗体を用いた）サンドイッチ-ELISA法により定量した。これらの試料中のビタミンEの測定を、タンパク質沈澱及び逆相HPLCの後に行なった。卵胞液及び血清中のアフアミンの定量分析はSDS-PAGE及びイムノプロットにより行なった。

#### 【0025】

20

最初に、卵母細胞を有する患者と有しない患者それぞれから27個の試料を採取し、アフアミン含有量を測定した。卵母細胞を有する患者試料では平均のアフアミン濃度が $38.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ であるのに対して、卵母細胞を有しない患者試料では $30.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ にすぎないことが示された（図1）。卵母細胞を有する患者でのアフアミン濃度は「正常値」（即ち卵母細胞なし）よりも30%高いにすぎないことも示された。

#### 【0026】

続いて、卵胞サイズがアフアミン濃度と相関するのか、及びどのように相関するのかを調べた。この検査を行なうにあたり、卵胞をサイズの異なる3種類のタイプに分類し、図2に示したように、それを測定したアフアミン濃度に対してプロットした。この例では、アフアミン濃度が卵母細胞の成熟度の直接的な尺度になることを示す明瞭な相関が認められた。

30

#### 【0027】

図3から、卵胞液中のビタミンE濃度とアフアミン濃度との間にも明白な相関があること、すなわち、アフアミン濃度が高いほどビタミンE濃度が高いということが判った。

#### 【0028】

さらなる検査系列において、卵胞液に対して証明された卵母細胞の有無と卵母細胞の異なる成熟度との相関が、例えば血清においても認められるかどうかを調べた。

#### 【0029】

図4から明らかなように、血清中においても卵母細胞の種々の成熟度をアフアミン含有量によって測定することができる。

40

図5に、一連の9個の異なる試料を、SDS-PAGEと単クローン性抗体を用いたイムノプロットにより図示している。この例では、アフアミンの測定は（図5中の左端に位置する）標準によって行なうことができる。

#### 【0030】

最後に、本発明に記載のシステムが脳脊髄液についても使用できるかどうかを試験した（図6）。図6から判るように、アフアミン含有量の変動により受精能の性状を明瞭に測定することも可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、卵母細胞を有するヒト又は有しないヒトの卵胞液中におけるアフアミンの相関を示す。

50

【図2】 図2は、アフアミン濃度と卵胞サイズの相関を示す。

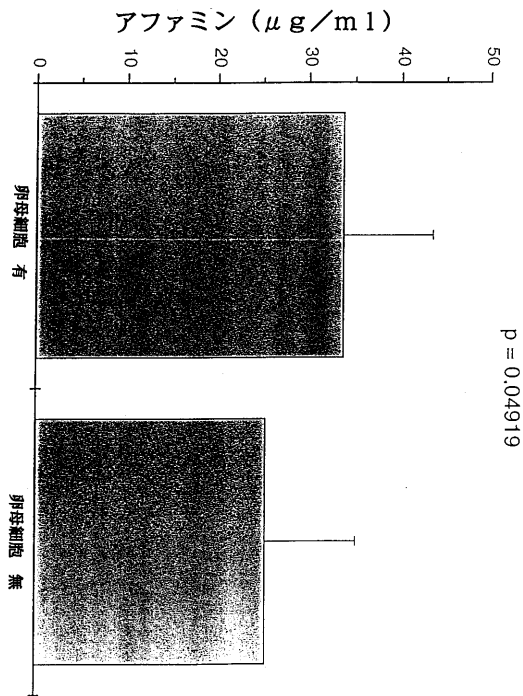
【図3】 図3は、卵胞液中のアフアミンと - トコフェノール濃度との相関を示す。

【図4】 図4は、卵胞液及び血清中におけるアフアミンと、大、中、小に分類した卵母細胞の成熟度との相関を示す。

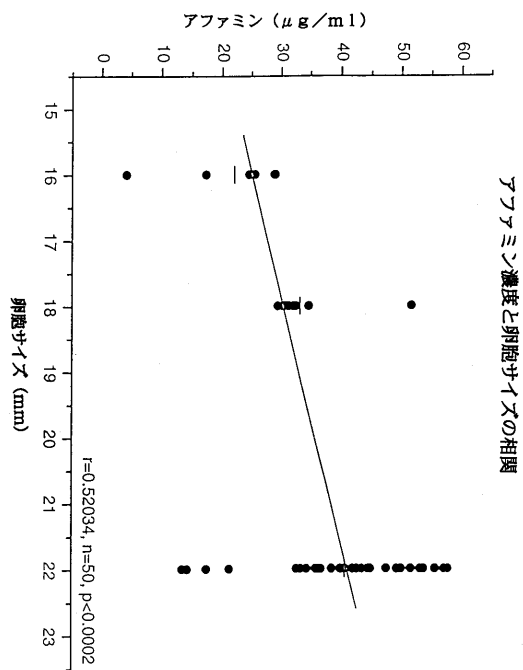
【図5】 図5は、9個の卵胞液試料のSDS-PAGEとそのイムノプロットである。

【図6】 図6は、3個の脳脊髄液試料のSDS-PAGEとそのイムノプロットである。

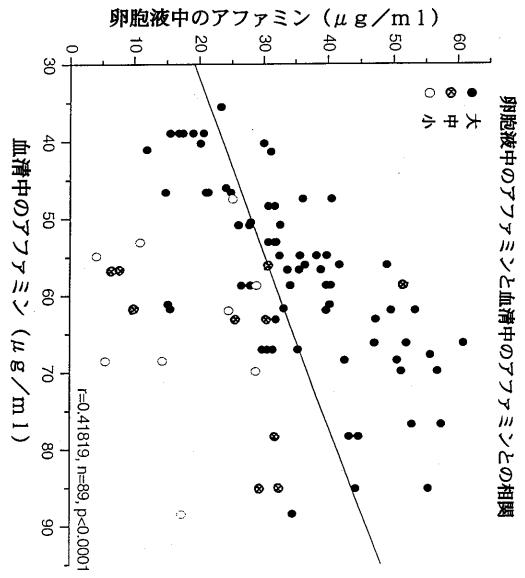
【図1】



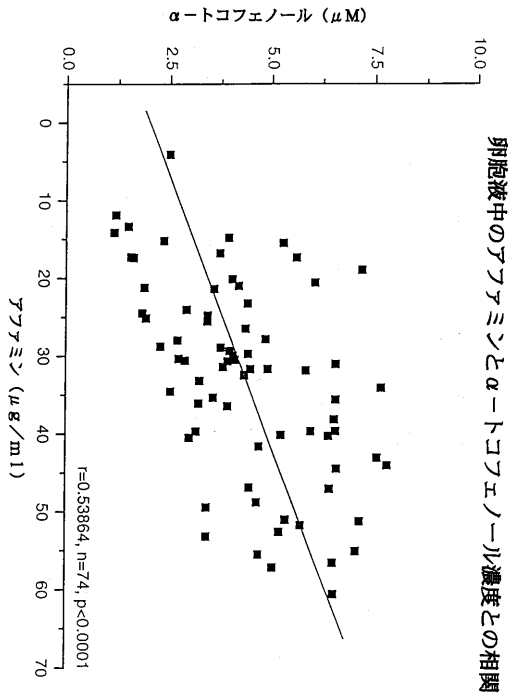
【図2】



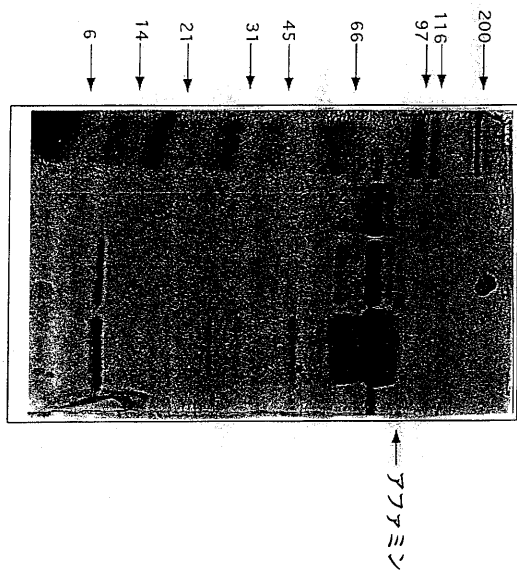
【図4】



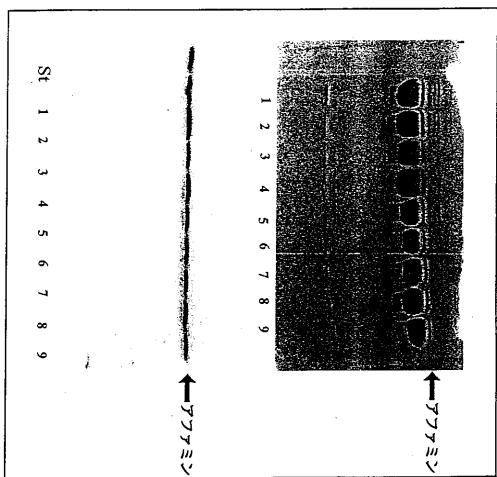
【図3】



【図6】



【図5】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 イルメンセー, カール・オスカル  
オーストリア国アー - 6 0 2 0 インスブルック, インライン 3 6 ペー
- (72)発明者 ディープリンガー, ハンス  
オーストリア国アー - 6 0 2 0 インスブルック, インライン 3 6 ペー

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表平09 - 5 1 1 3 9 9 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/50

G01N 33/53

G01N 33/577

G01N 33/82

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	测量哺乳动物，尤其是人类的生育力的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4583685B2</a>	公开(公告)日	2010-11-17
申请号	JP2001507101	申请日	2000-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	伟宝科技的技术门EM型硬		
申请(专利权)人(译)	Vitateku宝科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Vitateku生物技术有限公司		
[标]发明人	イルメンセーカールオスカル ディープリンガーハンス		
发明人	イルメンセー,カール・オスカル ディープリンガー,ハンス		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/82 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/689 G01N2800/367 Y10S436/808		
FI分类号	G01N33/50.J G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/82		
代理人(译)	小林 泰		
审查员(译)	三木隆		
优先权	1999001119 1999-06-25 AT		
其他公开文献	JP2003508731A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了一种用于确定哺乳动物，特别是人类的生育力的方法，其中从哺乳动物获取身体或器官流体，在该身体或器官流体中确定该afamin含量，并且将所确定的afamin含量与参考物进行比较。确定生育力的价值，用于确定哺乳动物生育力的afamin的用途，以及用于实施该方法的试剂盒。

