

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 508731

(P2003 - 508731A)

(43)公表日 平成15年3月4日(2003.3.4)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド ( 参考 )
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	J
33/53		33/53	D
33/577		33/577	B
33/82		33/82	

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 19数 )

(21)出願番号 特願2001 - 507101(P2001 - 507101)

(86) (22)出願日 平成12年6月21日(2000.6.21)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月25日(2001.12.25)

(86)国際出願番号 PCT/AT00/00171

(87)国際公開番号 WO01/001148

(87)国際公開日 平成13年1月4日(2001.1.4)

(31)優先権主張番号 A 1119/99

(32)優先日 平成11年6月25日(1999.6.25)

(33)優先権主張国 オーストリア(AT)

(71)出願人 ヴィタテク・パオテクノロジー・ゲーエム  
ベ-ハ-

オーストリア国アー - 6020 インスブルッ  
ク,インライン 66

(72)発明者 イルメンセー, カ-ル・オスカル

オーストリア国アー - 6020 インスブルッ  
ク,インライン 36ベ-

(72)発明者 ディ-プリンガー, ハンス

オーストリア国アー - 6020 インスブルッ  
ク,インライン 36ベ-

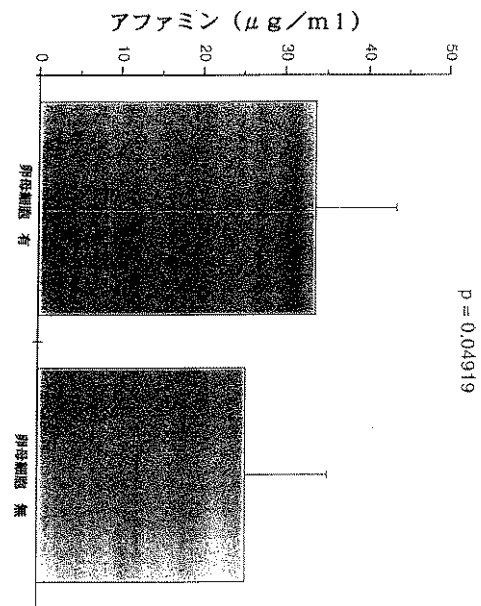
(74)代理人 弁理士 社本 一夫 ( 外 4 名 )

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)【要約】

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  
する方法を開示する。さらに、哺乳動物の受精能を測定  
するためのアファミンの使用、及び該方法を実施するた  
めのキットを開示する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 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。

【請求項2】 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に記載の方法。

【請求項3】 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又は2に記載の方法。

【請求項4】 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1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 該アファミン含有量を免疫学的方法、特に単クローン性抗体を用いることにより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】 更に体液又は器官液中のビタミンE含有量を測定し、任意に基準値と比較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。

【請求項7】 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8】 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。

【請求項9】 アファミン含有量を測定するための該試薬が抗体、特に単クローン性抗体を含むことを特徴とする請求項8に記載のキット。

【請求項10】 該アファミンの基準手段が標準化された量のアファミンを含むことを特徴とする請求項8又は9に記載のキット。

【請求項11】 該アファミンの基準手段が一連の標準化されたアファミン

試料であることを特徴とする請求項8～10のいずれか1項に記載のキット。

【請求項12】 受精方法の範囲内、特に体外受精及び細胞質内精子注入において患者をモニターするための請求項1～7のいずれか1項に記載の方法の使用又は請求項8～11のいずれか1項に記載のキットの使用。

【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1～7のいずれか1項に記載の方法の使用又は請求項8～11のいずれか1項に記載のキットの使用。

【請求項14】 受精能及び生殖障害を調べるための請求項1～7のいずれか1項に記載の方法の使用又は請求項8～11のいずれか1項に記載のキットの使用。

【請求項15】 妊娠をモニターするための請求項1～7のいずれか1項に記載の方法の使用又は請求項8～11のいずれか1項に記載のキットの使用。

**【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】**

アフアミンは、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87kDaのタンパク質である。アフア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(WO95/27059)。

**【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。アフア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ア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ア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、アフアミンが存在する種々の体液又は器官液においてアフア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、アフアミン含有量を測定する本発明に記載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。

#### 【0007】

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。

#### 【0008】

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。

#### 【0009】

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ー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に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。

#### 【0010】

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。

#### 【0011】

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。

#### 【0012】

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。

#### 【0013】

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。

#### 【0014】

本発明によれば、特に精液及び卵胞液において、アフアミン含有量の他にピタ

ミンE含有量も受精能の性状と直接相関するため、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。

#### 【0015】

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ア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。

#### 【0016】

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ア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のための容器、
  - ・該試料中のアフアミン含有量を測定するための試薬、及び
  - ・アフアミンの基準手段、
- を含むキットに関する。

#### 【0017】

上記したように、アフア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、アフアミン含有量の測定用試薬はアフアミンに対する抗体、特に単クローン性抗体を含むことが好ましい。好適には、このアフアミン抗体はまた、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。

#### 【0018】

アフアミンの基準手段は、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アミンを含む。しかしながら一方で、アフアミンの基

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、

#### 【0019】

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ア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。

#### 【0020】

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。

#### 【0021】

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。

#### 【0022】

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。

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。

#### 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ァミン濃度を（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ァミンの定量分析はSDS-PAGE及びイムノブロットにより行なった。

#### 【0025】

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、アファ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ァミン濃度が $38.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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ァミン濃度は「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、卵胞サイズがアファ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ァミン濃度に対してプロットした。この例では、アファ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。

#### 【0027】

図3から、卵胞液中のビタミンE濃度とアファミン濃度との間にも明白な相関

があること、すなわち、アファ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ァミン含有量によって測定することができる。

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ブロットにより図示している。この例では、アファミンの測定は(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、アファ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ァミンの相関を示す。

【図2】 図2は、アファミン濃度と卵胞サイズの相関を示す。

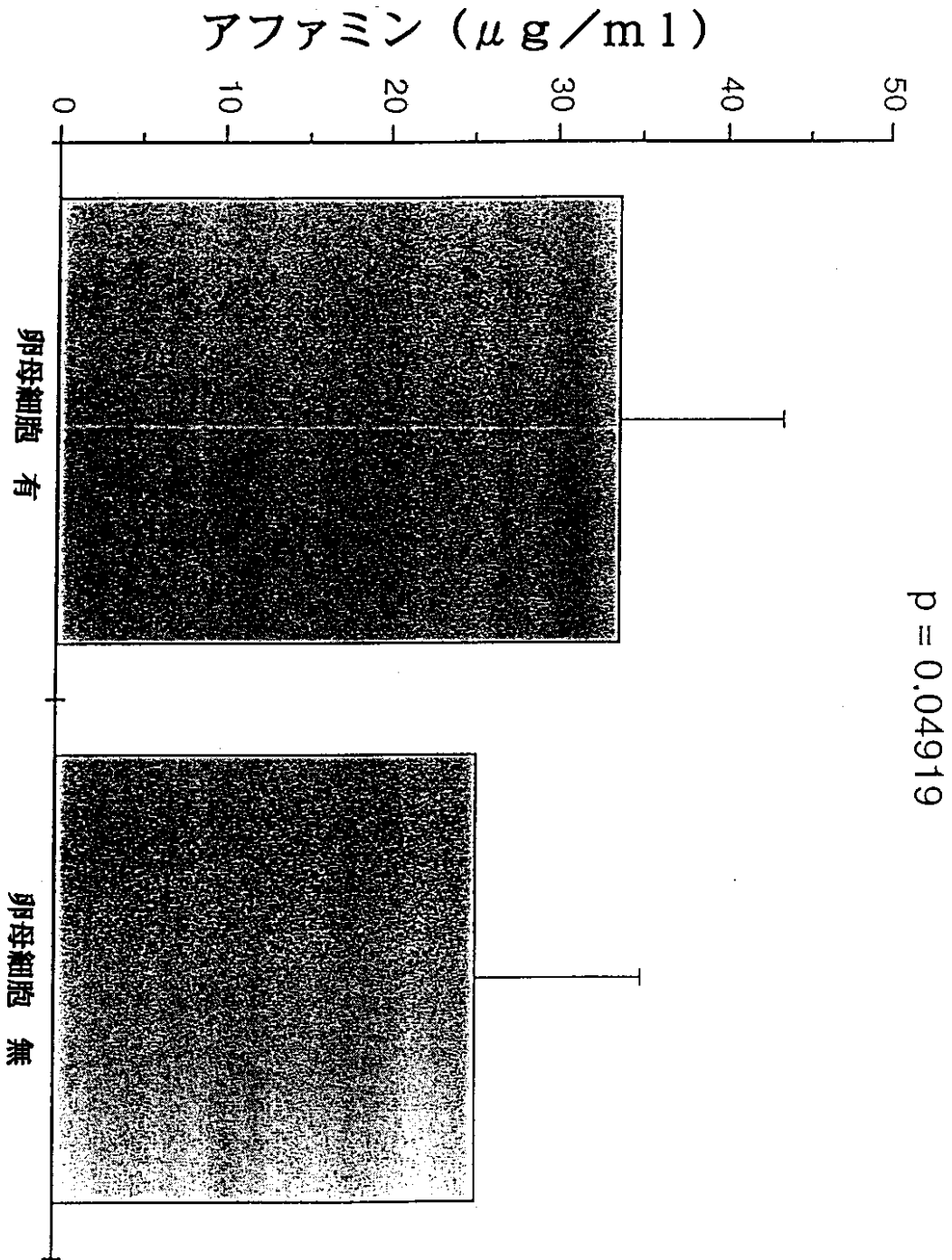
【図3】 図3は、卵胞液中のアファミンと - トコフェノール濃度との相関を示す。

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

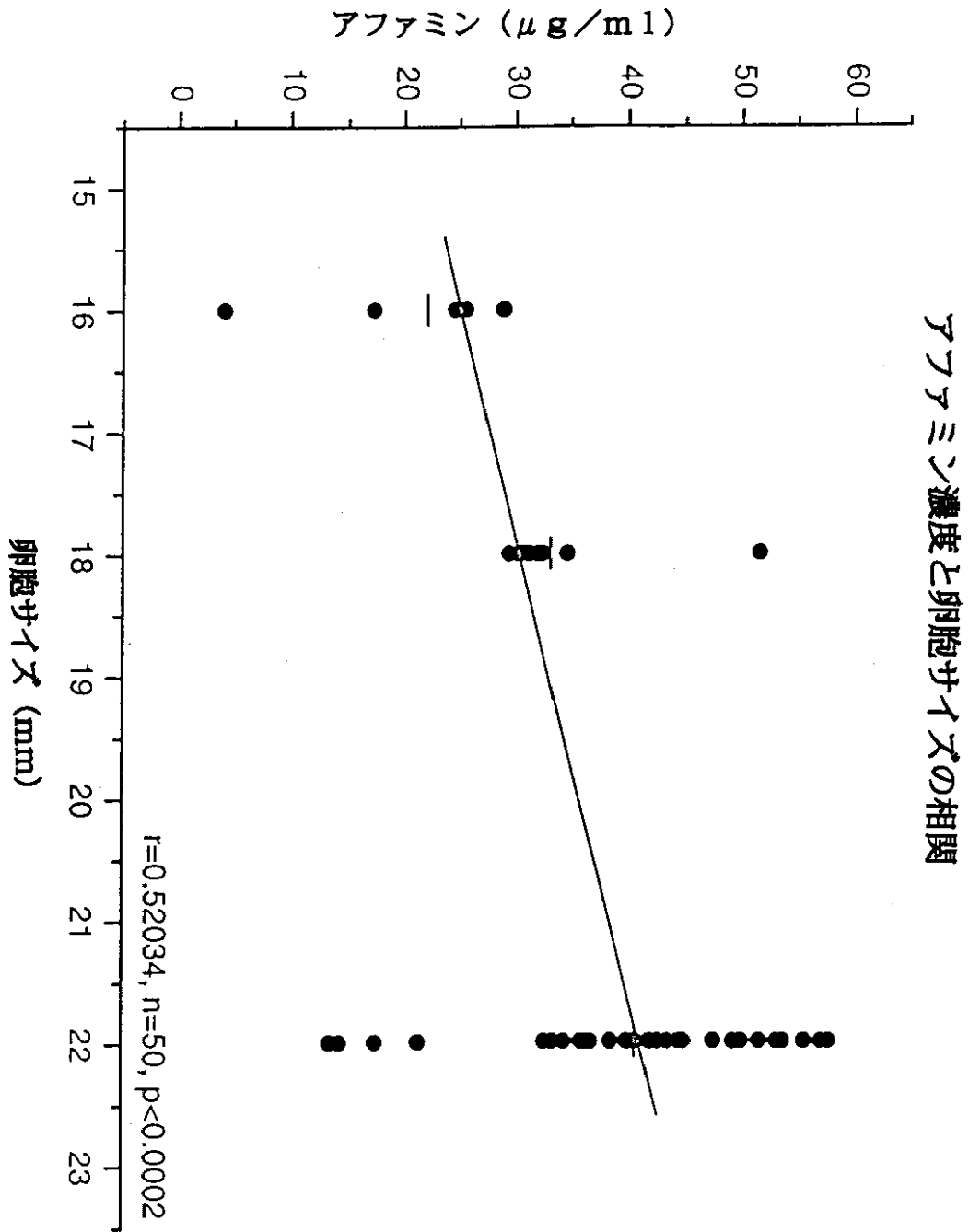
【図5】 図5は、9個の卵胞液試料のSDS-PAGEとそのイムノブロットである。

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

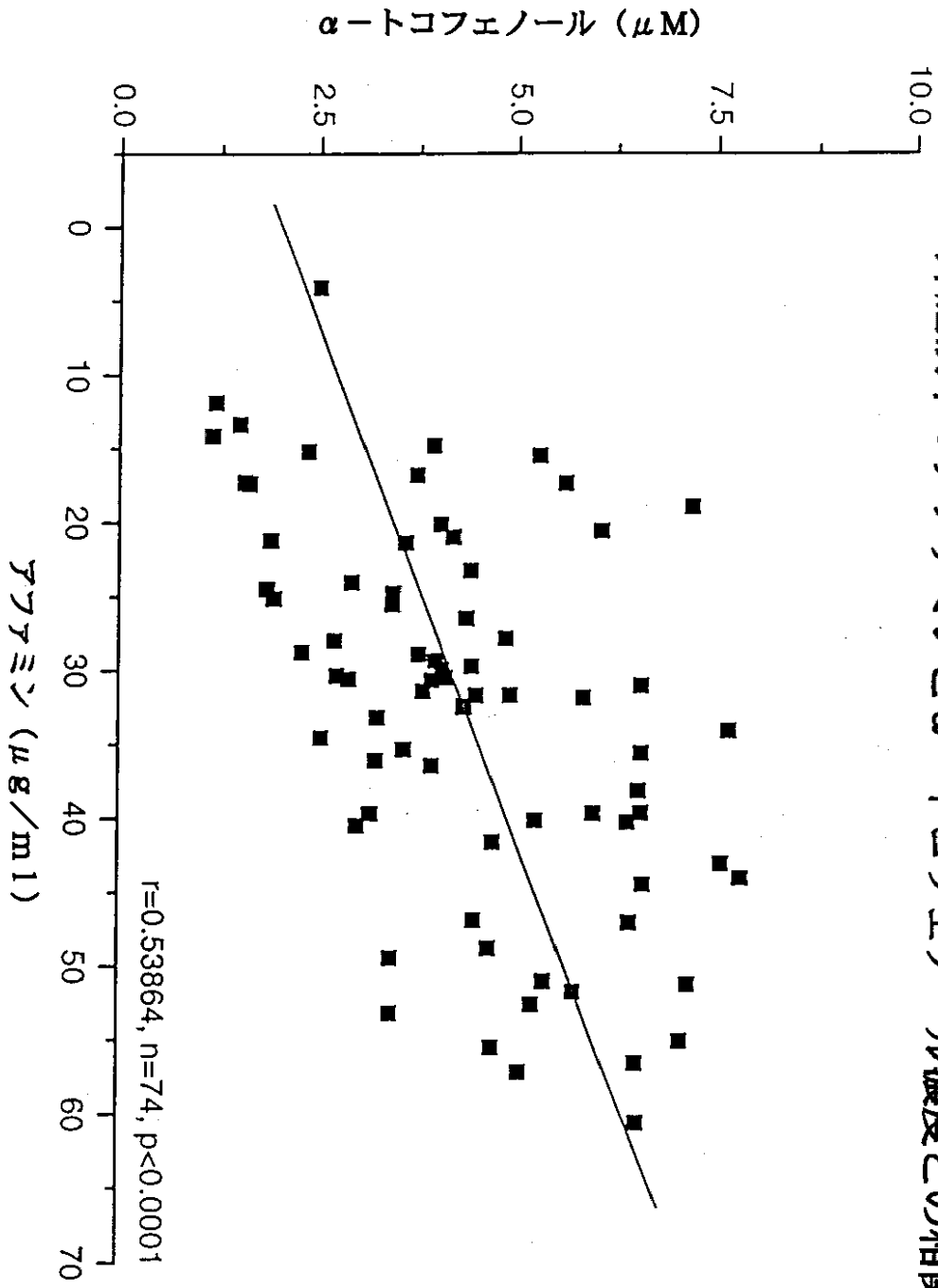
【図1】



【図2】

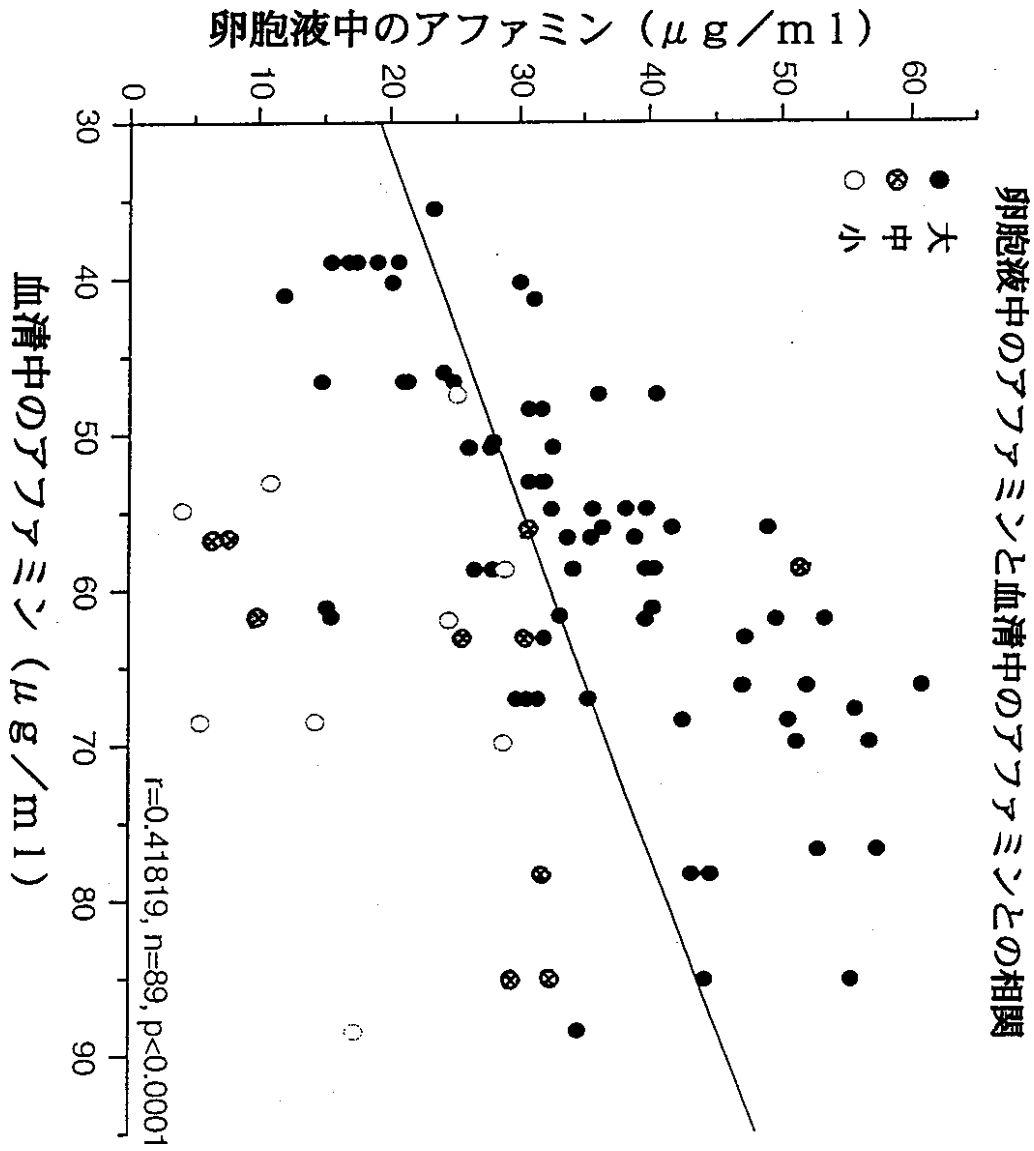


卵胞液中のアファミンと $\alpha$ -トコフェノール濃度との相関

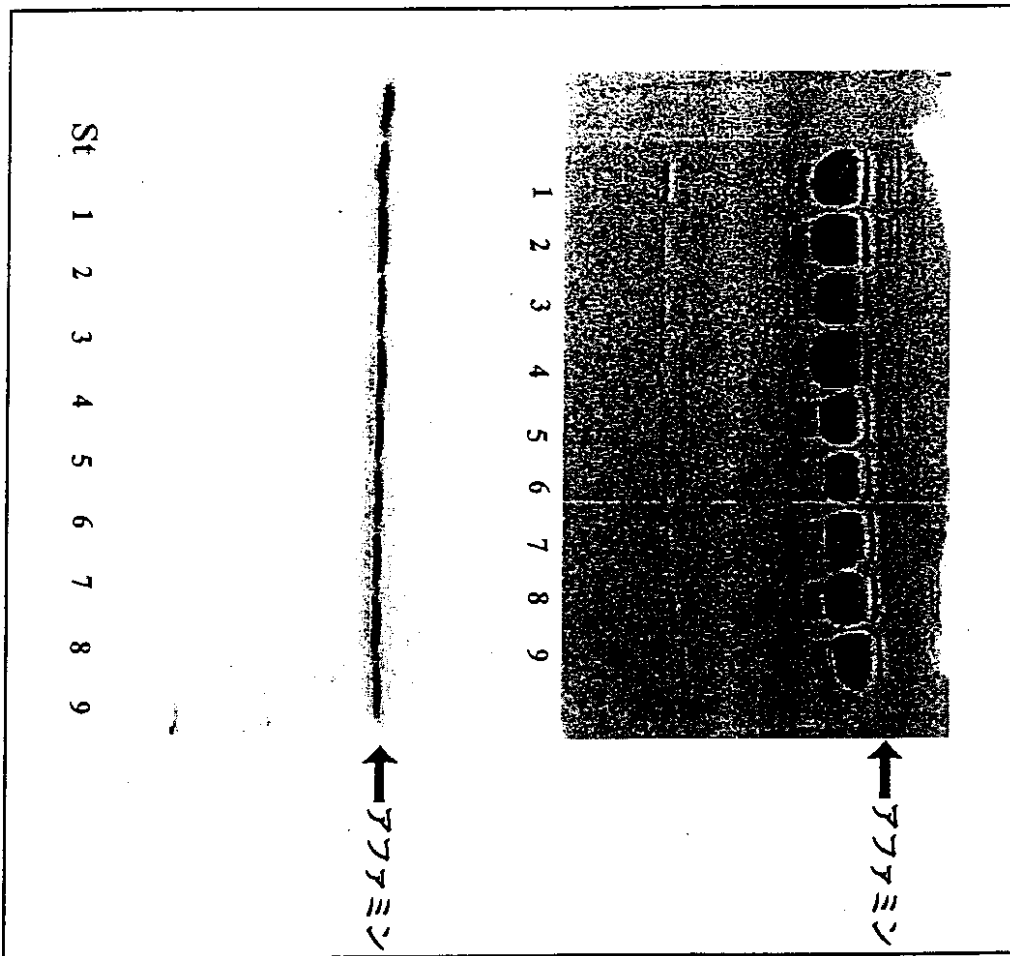


【図3】

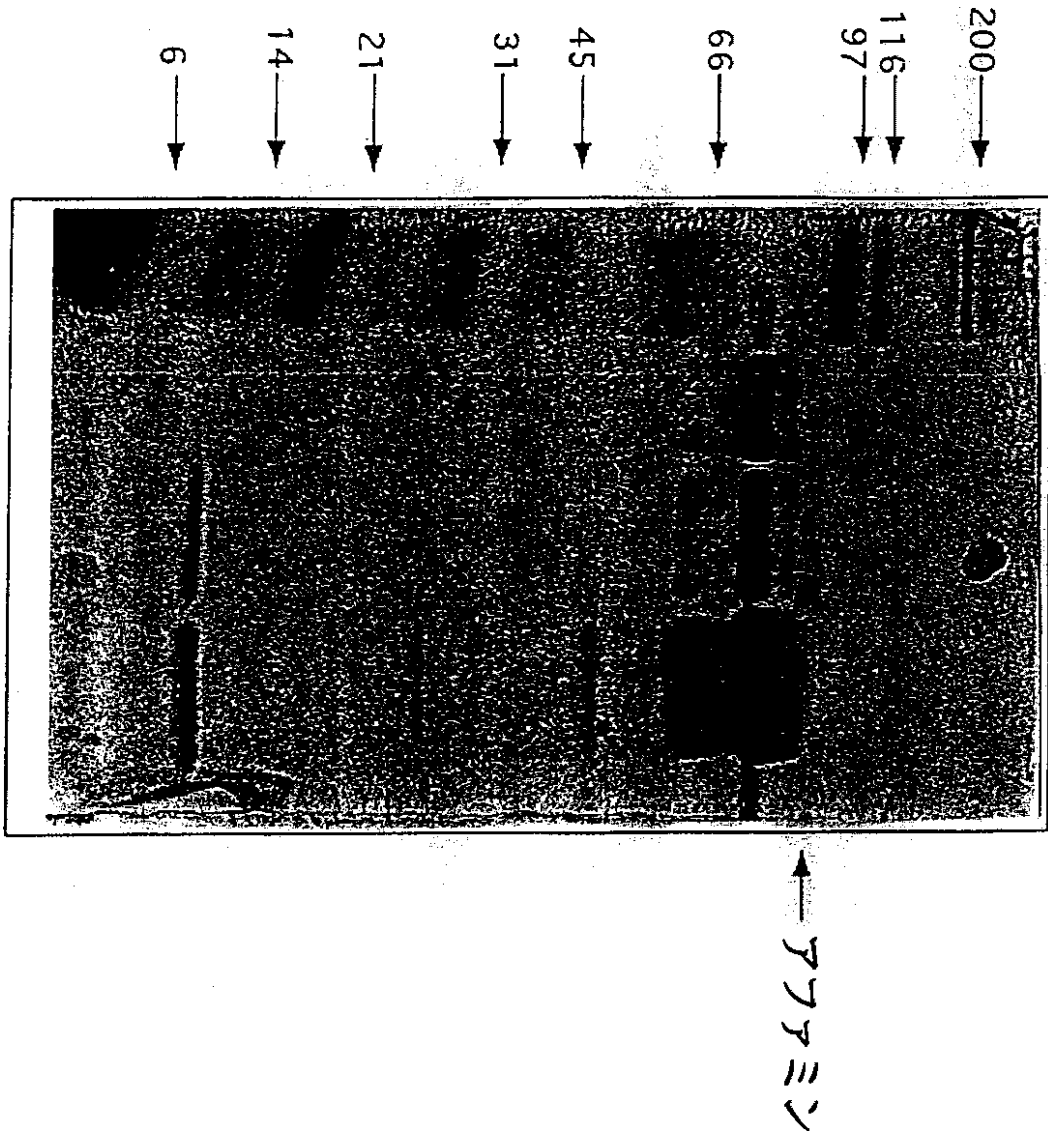
【図4】



【図5】



【図6】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/AT 00/00171
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C07K14/47		
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) IPC 7 G01N C07K		
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) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia PA USA; abstract no. PREV199900389820, abstract XP002153018 & L. JERKOVIC L ET AL: "Afamin and vitamin E in follicular fluid of patients undergoing IVF" HUMAN REPRODUCTION , vol. 14, no. Abstr. Book 1, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 203-204, Oxford UK	1-15
A	WO 95 27059 A (AMGEN INCORPORATED & ROCKEFELLER UNIVERSITY) 12 October 1995 (1995-10-12) cited in the application page 1, line 6 - line 24; example 5	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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  16 November 2000		Date of mailing of the international search report  30/11/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer  Van Bohemen, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/AT 00/00171

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9527059 A	12-10-1995	US 5652352 A	29-07-1997
		AT 173014 T	15-11-1998
		AU 691607 B	21-05-1998
		AU 2236795 A	23-10-1995
		CA 2186516 A	12-10-1995
		DE 69505804 D	10-12-1998
		DE 69505804 T	08-07-1999
		DK 754229 T	19-07-1999
		EP 0754229 A	22-01-1997
		ES 2123973 T	16-01-1999
		JP 9511399 T	18-11-1997
		US 5767243 A	16-06-1998

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

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="#">JP2003508731A</a>	公开(公告)日	2003-03-04
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		
[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 G01N33/68 G01N33/82		
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		
优先权	1999001119 1999-06-25 AT		
其他公开文献	JP4583685B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种用于测量哺乳动物，特别是人类的生育力的方法，该方法包括从哺乳动物收集体液或器官液，测量体液或器官液中的Afamin含量，并测量生育率。公开了一种将获得的阿法胺含量与参考值进行比较的方法。进一步公开了阿法明在测量哺乳动物的生育力中的用途，以及用于实施该方法的试剂盒。

