

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4610149号
(P4610149)

(45) 発行日 平成23年1月12日(2011.1.12)

(24) 登録日 平成22年10月22日(2010.10.22)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18
C12N 5/07 (2010.01)	C12N 5/00 202
G01N 33/15 (2006.01)	G01N 33/15 Z
G01N 33/50 (2006.01)	G01N 33/50 Z
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 S

請求項の数 11 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-533850 (P2001-533850)	(73) 特許権者	000238201
(86) (22) 出願日	平成12年10月23日(2000.10.23)		扶桑薬品工業株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2000/007374		大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
(87) 国際公開番号	W02001/030853	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成13年5月3日(2001.5.3)		弁理士 青山 稜
審査請求日	平成19年10月22日(2007.10.22)	(74) 代理人	100068526
(31) 優先権主張番号	特願平11-304530		弁理士 田村 恭生
(32) 優先日	平成11年10月26日(1999.10.26)	(72) 発明者	桑原 良弘
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		大阪府大阪市住之江区西加賀屋3-15-11
微生物の受託番号	FERM FERM BP-7401	(72) 発明者	長谷川 通規
微生物の受託番号	FERM FERM BP-7402		兵庫県神戸市北区大原2-9-1
		(72) 発明者	位坂 清継
			大阪府堺市陶器北1691-1-1014
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラット先体反応後精子に対する抗体およびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

寄託番号がFERM BP-7401であるハイブリドーマ。

【請求項2】

寄託番号がFERM BP-7402であるハイブリドーマ。

【請求項3】

請求項1記載のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項4】

請求項2記載のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項5】

サブクラスがIgG₁に分類される請求項3に記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】

サブクラスがIgG_{2b}に分類される請求項4に記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】

ヒト凍結融解精子とは免疫反応性を有さない請求項3～6の何れかに記載の抗体。

【請求項8】

請求項3～7の何れかに記載の抗体を用いることを特徴とする、ラット精子の受精能評価方法。

【請求項9】

請求項3～7の何れかに記載の抗体を含むことを特徴とする、ラット精子の受精能測定

組成物。

【請求項 10】

請求項 3 ~ 7 の何れかに記載の抗体を用いることを特徴とする、受精能に影響を与える物質のスクリーニング方法。

【請求項 11】

請求項 3 ~ 7 の何れかに記載の抗体もしくは請求項 9 記載の組成物を含むことを特徴とする請求項 8 または 10 記載の方法において使用する受精能評価用キット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、先体反応後ラット精子に対して選択的に結合するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、および該モノクローナル抗体を用いるラット精子の受精能評価方法に関する。本発明は、さらに、該受精能評価方法を用いることを特徴とする、ラット受精能に影響を及ぼす物質のスクリーニング方法に関する。

10

背景技術

現在、医薬品の製造承認申請の際の安全性に関する試験において、生殖発生毒性試験を行うことが義務付けられている。生殖発生毒性試験とは、医薬品の生体への適用がその生殖発生過程において何らかの悪影響を誘発する可能性があるかどうかに関する情報を得ることを目的として行う動物試験であり、得られた試験結果はヒトへ外挿され、ヒトの生殖発生に対する医薬品の安全性（危険性）の評価に利用することができる。1997年に公布された生殖発生毒性試験法ガイドラインは、1994年に通知されたICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: 日・米・EU 三極医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議) ガイドラインとの整合を図って改正されたものである。本ガイドラインでは、受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験において、雄の受胎能の評価に関し、反復投与毒性試験での生殖器官の病理組織学的検査および精子検査を行うことが記載されている。

20

しかしながら、雄の生殖器官の病理組織学的検査を行うには熟練した技術が必要であり、また病理組織学的検査では検出できないような精子への影響が存在する場合もある。ゆえに、受精能を正確に評価し、あるいは薬物の精子に及ぼす影響を的確に検査するためには、病理組織学的検査を行うことと共に精子本体の受精能検査を行うことが必要である。

30

現在、生殖発生毒性試験においては、ヒト精子検査で行われている精子濃度、精子運動性、および精子形態等の検査は行われておらず、精子運動性に関する評価法の確立に向けて、検討が為されている段階である。よって、受精能の評価法はまだ確立されていない。

ヒトの精子受精能検査として、ハムスターテスト、保存透明帯通過試験および triple-stain 法等が開発されている。ハムスターテストとは、受精能獲得と先体反応を完了した精子のみが透明帯除去ハムスター卵に進入できることを利用して受精能を評価する方法である。保存透明帯通過試験とは、受精能獲得および先体反応を完了し、さらに運動性が十分に保たれている精子のみが保存透明帯を通過できるという特徴を利用した方法である。また、triple-stain法とは、三種類の染色法を組み合わせることにより、死滅精子、生存精子および先体反応前精子を染色し、分けることを可能とした方法である。

40

上記に示した従来のヒトの精子検査法を生殖発生毒性試験に応用する場合、採卵して透明帯を除去したり、未熟卵を採取して *in vitro* で成熟させ、特殊な高濃度塩溶液中で保存して透明帯を調製したりすることが必要であり、いずれも熟練した技術や煩雑な操作を必要とし、高価な実験器具を必要とする。また、薬物あるいは環境ホルモン等の化学物質が精子の受精能に及ぼす影響について検討する場合、現状の生殖発生毒性試験においては、試験動物が受精したか否かの判断は交配後胎児がある程度成長しなければ外観から判断できず、時間および費用を要した。さらに、精子量、運動性および形態等、受精に多少の影響を及ぼす項目を多く検査しても、受精時の必須要件となる先体反応の有無を調べ

50

なければ正確な受精能を検査することは不可能である。

発明の開示

(発明が解決しようとする技術的課題)

現在、生殖発生毒性試験において短期間で検査が終了し、かつ正確で操作が簡便な精子受精能評価法の開発が必要とされている。また、当該評価法による試験結果がヒトに外挿し得るものでなければならない。

(その解決方法)

本発明者らは、上記課題解決のために、抗原抗体反応を利用することに着目した。

そして、本発明者らは、非ヒト動物の先体反応後精子に特異的なモノクローナル抗体およびそのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製に成功した。同時に、このモノクローナル抗体により、得られる試験結果がヒトに外挿し得る精子の受精能評価法を確立し、受精能測定用組成物を作製した。さらに、本発明者らは、受精能に影響を及ぼす物質のスクリーニング方法をも確立した。

これらの発明によって、短期間で検査が終了し、かつ正確で操作が簡便な精子受精能評価を可能とするものである。

本発明の受精能評価の原理は以下の通りである。哺乳動物の精子は、射精直後は卵と融合(受精)する能力はない。まず、雌性生殖管内で精子を保護するために精子の原形質膜表面を覆っている精巣上体分泌液や精漿中に含まれる糖タンパク質や糖脂質等の吸着物質が除去され、あるいは変性する「受精能獲得」と呼ばれる生理的变化を経る。その後、受精の場である卵管膨大部に到達した精子は、卵に接近して「先体反応」を起こす。先体反応とは、精子の最外表の原形質膜と先体の外側を包んでいる先体外膜が融合して小孔が開き、先体内にある先体酵素が放出される現象である。先体反応をおこした精子のみが、先体酵素による卵周囲透明帯の溶解により卵と融合(受精)することができる。ゆえに、受精には先体反応の惹起が必須要件であり、先体反応の有無を確認することが、精子の受精能を直接的に評価できる方法なのである。従って、本発明の方法は、生殖発生毒性試験等のため、得られた試験結果をヒトへ外挿することを前提としてラットにて行われる精子受精能評価法である。

なお、ヒトに外挿させるための受精能評価を行うには、ヒトの生理状態と近似する実験動物を選ばなければならない。現在までに、非ヒト動物の先体反応後精子に対するモノクローナル抗体はマウス(Masaru Okabe et al; Journal of Reproductive Immunology, 11(2), 91-100, 1987)で報告されているが、ヒトに外挿させる実験動物としては一般的な代謝様式がよく知られているラットが広く用いられている。

そこで、生殖発生に用いられた経験が最も豊富な動物種であり、ヒトの生理状態に近似しているラットを用いて、ラット精子の先体反応の有無を区別できるモノクローナル抗体の作製を行った。

現在、ヒト精子の先体反応を阻害する薬物として、bicuculline(Calogero A.E. et al; Fertility and Sterility, 71(5), 930-936, 1999)、wortmannin(Fisher H.M. et al; Molecular Human Reproduction, 4(9), 849-855, 1998)、cysteamine(Sengoku K. et al; Journal of Andrology, 19(1), 37-49, 1998)、anantinin(Rotem R. et al; American Journal of physiology, 274(2 Pt 1), E218-223, 1998)、chlordanneおよびendosulfan(Turner K.O. et al; Journal of Andrology, 18(6), 571-575, 1997)等が報告されている。今後、生殖発生毒性試験において、薬物の精子先体反応に及ぼす影響について検討する場合に、先体反応後精子に対するモノクローナル抗体が有用である。

発明を実施するための最良の形態

本発明により、先体反応後ラット精子に対するモノクローナル抗体、および該抗体を産生

10

20

30

40

50

するハイブリドーマFARS-91およびFARS-92の2種が得られた。これらの各ハイブリドーマ細胞は、1999年10月13日に日本国〒305-8566茨城県つくば市東1丁目1-3に所在の通商産業省・工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に対して、それぞれ受託番号FERM BP-7401およびFERM BP-7402として寄託されている。

上記抗体の作製は、まず、射精、あるいは精巢上体尾部または精管を摘出して採取した先体反応を起こしていない新鮮ラット精子(以下、新鮮ラット精子と称する)を取得し、先体反応を惹起させる。次に、該先体反応後ラット精子を免疫原として哺乳動物に免疫することにより行う。先体反応後ラット精子は、化学的手法により先体反応を惹起させる方法、擬似的に先体反応を惹起させる方法、培養により先体反応を惹起させる方法またはこれら

10

の併用方法等を用いることにより得ることができる。新鮮精子は、例えば、精巢上体尾部あるいは精管を摘出して、精巢上体尾部から取得する場合は3~4カ所に割を入れ、精管の場合は1本を3~5分割して、0.4%BSA含有TYH培地あるいは0.5%BSA含有m-KRB等の培地中で軽く攪拌し、30~40

で、例えば10分間、精子が遊走するのを待つことにより得られる。また、精巢上体尾部から取得する場合は、精巢上体尾部より取り出した精細管の一部を切り、先端を丸めたパスツールピペットですくって取得することもできる。化学的に先体反応を惹起させる方法としては、新鮮ラット精子をA23187のようなカルシウムイオノフォアで処理する方法等が挙げられる。その他、デオキシコール酸ナトリウムのような陰イオン界面活性剤、または陽イオン、非イオン、両性等の界面活性剤で

20

処理する方法も用いることができる。擬似的に先体反応を惹起させる方法としては、物理的に先体外膜を破壊し先体内膜を露出させる方法が挙げられる。本明細書中では、この方法による先体反応を「擬似的先体反応」と称する。擬似的先体反応を起こす方法としては、例えば新鮮ラット精子を-20℃付近で凍結した後融解する方法を挙げることができる。また、エレクトロポレーションや超音波等による方法も利用できる。

培養により先体反応を惹起させる方法としては、カルシウムを含有する培地中で新鮮精子を培養する方法が挙げられる。培地中のカルシウム濃度は0.5~5mMの範囲に調製するのが好ましく、特に1.8mMになるよう調製するのが好ましい。カルシウム源には、塩化カルシウム、硝酸カルシウム、乳酸カルシウムおよびグルコン酸カルシウム等を用いることができる。使用する培地としては、例えばm-KRB、M-199およびTYH培地等が挙げられる。なお、TYH培地の組成は、塩化ナトリウム 6.976g/L、塩化カリウム 0.356g/L、塩化カルシウム・2水和物 0.251g/L、硫酸マグネシウム・7水和物 0.293g/L、リン酸水素カリウム 0.162g/L、炭酸水素ナトリウム 2.160g/L、ピルビン酸ナトリウム 0.111g/L、グルコース 1.000g/L、ウシ血清アルブミン 4.0g/L、乳酸ナトリウム50%シロップ 4.8mLである。さらに、培地には、例えばペニシリン、ストレプトマイシンおよびアンホテリシンB等の抗生物質あるいは抗真菌剤を加えることができる。

30

さらに、上に述べた先体反応を惹起させる方法を併用することができる。例えば、A23187処理した後凍結融解する方法も利用できる。その他、カルシウム含有培地中で新鮮精子を培養し、培養期間中にA23187を添加する方法も利用できる。この場合、A23187の濃度は、A23187単独で先体反応を惹起させる濃度よりも低い濃度を添加するのが好ましい。

40

免疫は、例えばマウス、ラット等の哺乳動物で行う。哺乳動物は、細胞融合する際の相手の永久増殖性細胞と同系統の動物の方が望ましく、性は雌雄どちらでもよく、週齢は、例えばマウスでは3~10週齢がよい。免疫に用いるラット精子の数は、例えばマウスに免疫する場合1匹あたり、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$ 個が好ましい。精子は、例えばフロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、アルミニウムアジュバント、百日咳菌アジュバント、グラム陰性細菌(大腸菌やサルモネラ菌)のエンドトキシン、ミョウバン沈殿粒、粘土粒(ベントナイト)、アルミニウム化合物、油、ビタミン、植物多糖

50

体等と混合してエマルジョンにし、動物の腹腔内、静脈内、皮下、皮内等に投与するのが好ましい。この免疫操作を1～3週間隔で1～5回行う。このようにして免疫した動物の体液または体液に含まれる抗体産生細胞からは、先体反応後ラット精子に対するポリクローナル抗体が得られる。動物の抗体価を測定し、充分上昇したとき抗体または抗体産生細胞を採取する。

先体反応後ラット精子に対するモノクローナル抗体を得るには、抗体産生細胞と永久増殖性細胞とを融合させたハイブリドーマを作成する必要がある。ハイブリドーマの作成は、例えば以下のように行う。

抗体産生細胞は、脾臓、リンパ節、末梢血等から得られるが、脾臓が好ましい。免疫された哺乳動物の脾臓を最終免疫の2～5日後に無菌的に摘出し、脾臓細胞懸濁液を得る。融合する相手の永久増殖性細胞は、永久増殖性を有する当業者に既知の任意の細胞を用いることができるが、汎用されるのは骨髄腫細胞である。永久増殖性細胞は抗体産生細胞と同種の動物由来のものが好ましい。例えばマウスの場合、P3U1P3X63-Ag8・U1(P3U1)、P3/NS1/1-Ag4-1(NS-1)、SP2/0-Ag14(SP-2)、P3X63Ag8(X63)、P3X63-Ag8.653(653)等が用いられる。また、永久増殖性細胞としては、8-アザグアニン耐性細胞株、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損細胞株のような、選別の際のマーカーとなり得る特性を有するものが好ましい。これらの細胞株は、例えばアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)より入手可能である。

融合に際しては、これらの永久増殖性細胞のいずれかを増殖培地中で培養し、融合の前に例えばDMEM培地で洗浄後遠心分離により集める。融合は、抗体産生細胞と永久増殖性細胞をMEM、DMEMまたはRPMI1640等の培地中で混合し、ポリエチレングリコール等の細胞融合剤を添加する。必要に応じて、ジメチルスルホキシドを少量加え、細胞融合を促進させることもできる。この様にして得られたハイブリドーマを、ヒポキサンチン、アミノプテリン、サイミジンを含むFCSを含有したMEM培地またはRPMI1640培地等で培養する。約1週間後、培地をヒポキサンチンおよびサイミジンを含むFCSを含有したMEM培地またはRPMI1640培地等に変える。

次に、ハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。スクリーニングは、ハイブリドーマの培養上清をとり、例えばラジオイムノアッセイ、酵素抗体法、蛍光抗体法等の公知の標識抗体法を用いて、先体反応後ラット精子を抗原として行う。次に、例えば限界希釈法や軟寒天法等の公知の技術を用いてクローニングすることにより、単一のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの集団を選択する。スクリーニングおよびクローニングは2回以上繰り返すことが望ましい。

上記のようにして得られたハイブリドーマをインビトロ(培養器具内または栄養培地中)またはインビボ(生体内または動物組織中)で培養することにより、モノクローナル抗体を産生させることができる。インビトロでハイブリドーマを培養する場合、FCS含有MEM培地、RPMI1640培地等の適当な培地を用いてハイブリドーマを培養し、その培養上清から所望のモノクローナル抗体を得ることができる。また、インビボでハイブリドーマを培養する場合、永久増殖性細胞由来の動物と同系の組織適合性のある動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、あるいはヌードマウスなどに各ハイブリドーマを移植し、腹水中に産生されたモノクローナル抗体を得ることができる。動物は、ハイブリドーマを移植する前に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(プリスタン)などの鉱物油を腹腔内に投与しておくことが好ましい。

培養上清あるいは腹水中のモノクローナル抗体は、目的によっては精製せずに用いることも可能であるが、当業者に既知の常法により精製することができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿法等の塩析、セファデックス等によるゲル濾過法、0.02Mリン酸緩衝液(pH7.2)等による透析、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、限外濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法等により精製することができる。

本発明での実施態様として、本発明の抗体を、免疫染色、免疫沈降、イムノプロット等の

10

20

30

40

50

イムノアッセイ、例えば競合型または非競合型イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、E L I S A、ラテックス凝集法、アフィニティーカラム等において使用することができる。E L I S A法による場合は好ましくはサンドイッチ型アッセイがよい。なお、イムノアッセイには、免疫組織学的検討、イムノプロット、免疫沈降等の免疫反応を利用した方法全てを含有する。本発明の抗体が上記方法に利用できることにより、先体反応後ラット精子の取得・精製に使用できる。

本発明の抗体は、例えば、安全性に関する試験における生殖発生毒性試験でラット精子の受精能の評価に用いることができる。この方法は、評価すべき精子を、標識を付した本発明の抗体と接触させた後、標識検知手段によって精子に付着した標識を検索するか、または標識を付していない本発明の抗体と接触させた後、標識を付した二次抗体（本発明の抗体と結合し得る抗体）と接触させ、標識検知手段によって精子に付着した標識を検索することによって行われる。

抗体を標識化するものとして、例えばF I T C（フルオレセインイソチオシアネート）およびR I T C（テトラメチルローダミンイソチオシアネート）等の蛍光物質、例えば放射性ヨード、ラジオカーボン、トリチウム、ラジウム、ストロンチウム等の放射性物質、ペルオキシダーゼ等の酵素、酵素基質、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子等を用いることができる。二次抗体の製造、および抗体に対する標識の付着は当業者に既知の常法によって行われる。また、蛍光物質を測定する方法としては、例えば、紫外線で励起させた蛍光を蛍光顕微鏡で観察する方法、あるいは一定の励起光を照射して蛍光強度を定量的に測定する方法等がある。放射性物質を測定する方法としては、例えば線スペクトロメーター、シンチレーションカウンター、電離箱、計数管等を用いて放射線量を測定することにより先体反応後ラット精子の定量を行うことができる。ペルオキシダーゼ活性を測定する方法としては、例えば基質であるO - フェニレンジアミン等を用いて発色させ、吸光度を測定することにより先体反応後ラット精子の定量を行うことができる。

本発明の抗体を用いた受精能測定組成物として、例えばビーズ（顆粒）に本抗体を担持させた組成物がある。本抗体を担持させるべきビーズとしては、ガラス、アガロース、セファロース、アガロース充填孔性けいそう土、親水性共重合アクリルゲル、ポリスチレン等からなる担体が用いられるが、好ましいのは可磁化物質（例えば Fe_2O_3 ）を例えばコア内に含ませることにより超常磁性をもたせた担体である。顆粒の形状は球形、不定破砕形等任意であるが、球形が好ましい。粒径は特に制限されず、例えば数～数百マイクロメートルであり得る。

また、例えば、上記抗体担持ビーズと精子の結合によって生じる凝集を観察することにより、ラット精子の受精能を検査することができる。原理は、ビーズと一定数の新鮮精子をマイクロプレート上のウェル内で一定時間共培養する。一定時間培養すると先体反応が惹起し始めるため、抗原抗体反応による精子とビーズの結合が起こる。さらに培養すると、先体反応を惹起した精子数が増加するため、ビーズに結合する精子数が増え、結合した精子の運動によりビーズの凝集が起こる。一定数の精子と一定数のビーズを共培養した時、ビーズへの精子結合量により先体反応の惹起能を推定することができる。尚、精子とビーズの結合状態の観察は任意の時間に実施できるが、1～2時間培養後と6～8時間培養後の2点で実施した場合、1～2時間値により先体反応惹起速度が判定でき、6～8時間値により累積先体反応惹起精子量を判定することができる。また、受精能を有する精子が、一定数以上存在すると、顆粒と精子の多結合が誘発され、やがて顆粒が凝集し、かつ精子結合のない顆粒または顆粒群が存在しなくなる。一定数の顆粒を凝集させることができる精子濃度を調べることにより受精能を有する精子の比率を調べるることができる。

また、上記抗体担持ビーズ（一次抗体担持ビーズ）と精子との複合体を磁石で集めて洗浄した後、例えば、蛍光で標識した二次抗体を添加することにより、先体反応後ラット精子の定量を行うことができる。上記二次抗体としては、ラット精子を認識するものであっても、先体反応後ラット精子を認識するものであっても良い。

ただし、二次抗体が先体反応後ラット精子を認識するものである場合には、二次抗体が認

10

20

30

40

50

識するエピトープは、一次抗体のそれと異なったものであることが望ましい。

また、上記の検査を実施するには、実施に必要な材料をキットにしておくのが便利である。この様なキットは、試験用顆粒、ウエル付きプレートおよび精子培養用培地等を含み得る。培地には、無機塩、有機酸塩、糖、血清アルブミン、抗生物質、指示薬等を含み得る。そのほか、キットには、試験管、遠心管、その他類似のガラス容器、ピペットまたは類似の吸引器具、顕微鏡等を含ませることができる。なお、上記試験用顆粒の代わりに、その製造原料となる固体顆粒と抗体を組み合わせることができる。

本発明で使用するウエル付きプレートは、プラスチック製、磁性、ガラス製、ほうろう製等の何れであっても良い。ウエルは平底、U底、V底の何れでも良いが平底が望ましい。垂直断面形状は、通常は円形である。プレートの存在するウエルの数は任意であり、例えば96ウエルで良い。観察法としては、通常、顕微鏡を用い、拡大率100~400倍で観察するのが望ましい。

より具体的には、例えば、炭酸水素ナトリウムおよびウシ血清アルブミンを含まないTYH培養液、2~15%炭酸水素ナトリウム溶液、凍結乾燥ウシ血清アルブミン、FARS-91またはFARS-92抗体結合ビーズ、20~70%グリセリン溶液を使用する。まず、TYH培養液2mLに好ましくは7%炭酸水素ナトリウム溶液1mLを加え混和する。その後、凍結乾燥ウシ血清アルブミンを加え、泡立てないように溶解し、0.4%ウシ血清アルブミン含有TYH培養液を調製する。培養液が入ったバイアルの瓶口を火炎滅菌したアルミホイルでフタをし、37℃、5%炭酸ガスインキュベーター内で1~18時間平衡化した後、検査に使用すればよい。また、FARS-91抗体またはFARS-92抗体結合ビーズを約30秒間試験管ミキサーでよく混和した後、直ちに0.5mLの滅菌マイクロチューブに20μLを分取し、この中に培養液を正確に380μL加える。この時のビーズの濃度は $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^{10}$ 個/mL、好ましくは 0.5×10^6 個/mL(ビーズ懸濁液)に調製すればよい。調整後は冷蔵保存するのが好ましい。50%グリセリン溶液は、精子数計測の際に精子懸濁液と等量加えることにより、計測しやすくすることができる。

次に、培養液を加えた試験管を準備し、新鮮ラット精子を加え、数分間、軽く分散させた後、精子濃度を計測する。精子数を 1×10^6 個/mLの濃度に培養液を用いて調製(精子懸濁液)するのが好ましい。この時、50%グリセリン溶液を加えることにより精子数をカウントしやすくなる。

次に、滅菌96ウエルマイクロプレートを用意する。該プレートの4穴を用いることにより検査が実施できる。すなわち、培養液100μLを第2,3および4のウエルに加え、調製した精子懸濁液を第1および2のウエルに加える。第2のウエルをピペティングにて混和した後、100μLを第3のウエルに加える。同様の操作を第4のウエルまで繰り返し、第4のウエルから100μLを除去する。これまでの操作により精子懸濁液の1,2,4および8倍の希釈段階が作成される。第1ウエルが1倍希釈、第2ウエルが2倍希釈、第3ウエルが4倍希釈、第4ウエルが8倍希釈である。ビーズ懸濁液をミキサーにて懸濁させた後、各ウエルに100μLずつ添加する。直ちに各ウエルを第4から第1ウエルの順にピペットの先端にて軽く混和させる。次に、37℃、5%炭酸ガス存在下で静置培養させる。その後、ウエル内の凝集を判定することにより、受精能を判定することができる。

E L I S A法(ダブルレイヤー法)は、例えば以下のように行う。例えば先体反応を起こすのに十分な時間培養したラット精子をプラスチック製プレートのウエルの底に固着させ、そこに先体反応後ラット精子に特異的な抗体(一次抗体)を添加する。被検精子のウエルへの固着は、例えば、パラホルムアルデヒド等により固定した後、例えば37℃にて約24時間乾燥することにより実施できる。もし、先体反応を惹起したラット精子が存在すれば、それに抗体が結合する。次にそのウエルを洗浄した後、例えば、酵素で標識した二次抗体を添加し、一次抗体に結合させる。この酵素を例えば発色する基質と反応させ、吸光度を測定することにより、先体反応後ラット精子の定量を行うことができる。

E L I S A法(サンドイッチ法)は、例えば以下のように行う。先体反応後ラット精子に

10

20

30

40

50

特異的な抗体（一次抗体）をプラスチック製プレートのウェルの底に付着させ、そこに例えば先体反応を起こすのに十分な時間培養したラット精子を添加する。もし、先体反応を惹起したラット精子が存在すれば、それは抗体と結合する。次にそのウェルを洗浄した後、例えば、蛍光で標識した二次抗体を添加し、先体反応後ラット精子に結合させる。この蛍光の蛍光強度を測定することにより、先体反応後ラット精子の定量を行うことができる。また、一次および二次抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかを組み合わせて用いることができる。ただし、モノクローナル抗体とモノクローナル抗体の組合せの場合は、それぞれの抗体のエピトープは異なっているのが好ましい。

蛍光抗体法としては、例えば先体反応後ラット精子に対する抗体を直接蛍光標識する方法（直接法）、先体反応後ラット精子に対する抗体を認識する抗体（二次抗体）を標識する

10

方法（間接法）、および補体を介して第二蛍光標識抗体を結合させる方法等がある。間接法の具体例として、新鮮ラット精子を0.1%～5.0%、好ましくは0.4～2.0% BSA含有TYH培養液にて 1.0×10^3 個/mL～ 1.0×10^{10} 個/mL、好ましくは 0.2×10^6 個/mL～ 1.5×10^6 個/mLとなるよう調製する。次に、先体反応を起こすのに十分な時間培養した後、先体反応後ラット精子に対する抗体を添加し、30～40にて5～60分間反応させる。反応液を培養液にて遠心により洗浄し、FITC標識抗マウスIgGを加え、30～40にて5～60分間反応させる。反応後、0.001～0.5% NaN₃含有PBS (Ca, Mg free) で数回遠心により洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察することができる。精子頭部に蛍光を認める精子の割合を計測することができる

20

また、検体として使用するラット精子は、精製等の処理を施していない精液としての状態でも良く、スイムアップにより生存精子を単離した状態でも良く、精液にプロテアーゼ等の薬物を加えることにより抗体との反応性を高めた状態であっても良い。また、検体は培養液に浮遊した状態でも良く、ガラスまたはプラスチック製のプレートやシャーレに固定・固着させた状態でも良く、パラホルムアルデヒドにより固定させた状態でも良い。パラホルムアルデヒドにて固定する場合には、0.5～15%、好ましくは3%～10%の濃度を使用するのが好ましい。

本抗体は、ラット精子の受精能に影響を及ぼす可能性のある物質、例えば薬物あるいは環境ホルモン等のin vivoにおけるスクリーニング試験に用いることができる。スクリーニング試験は例えば以下のように行う。例えば、成熟した週齢の雄性ラットに被検物質を、例えば1日1回、例えば精子形成の全過程および精子の成熟に要する期間を十分にカバーし得る期間、例えば経口、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、腹腔内投与あるいは局所適用（皮膚、点眼、点耳、噴霧、坐剤等）した後、精子を例えば精巣上部尾部より採取する。採取した精子を例えば先体反応を起こすのに十分な時間培養し、例えば間接蛍光抗体法により受精能を測定する。

30

また、本抗体は、例えば、in vitroにおいてラット精子の受精能に影響を及ぼす可能性のある物質のスクリーニング試験に用いることができる。スクリーニング試験は例えば以下のように行う。十分に成熟した週齢の雄性ラットの例えば精巣上部尾部より採取した精子に例えば薬物等の被検物質を添加して培養し、例えば数分～数時間培養後、例えば間接蛍光抗体法により受精能を測定する。

40

実施例

以下に、本発明の理解を高めるためにその実施例を示すが、本発明の技術的範囲はこの実施例に限定して解釈されるべきではない。

実施例1（免疫原の取得方法）

Wistar系雄性ラット（14週齢）をエーテル麻酔下に放血致死させた後、精巣上部尾部を摘出し、直ちに37に保温してある1%BSA（ウシ血清アルブミン、Baye r）含有m-KRB（modified Krebs-Ringer bicarbonate medium）10mLの入ったシャーレに移し（尾部1個につきシャーレ1枚）、2～3か所に割を入れ軽く攪拌し、約5分間放置して精子を遊出させた。その精子懸濁液を50mL用チューブに移し、終濃度が10μMになるようにカルシウムイオノフォ

50

A 23187 (sigma) を添加してCO₂ インキュベーター内で約15時間培養した。培養終了後、処理した精子をPBS (-) で2回洗浄し、所定の濃度に調製した後、-20 で保存した。

実施例2 (マウスへの免疫)

Jc1系雌性マウス(6週齢)に初回免疫日を0日目として、14、21、28日目に追加免疫を実施した。免疫は上記処理を施したラット精子を1回当たり約 1×10^7 個用い、0日目および14日目はそれぞれフロイント完全アジュバントとの等量混合物およびフロイント不完全アジュバントとの等量混合物を背部皮下に、21、28日目は精子のみを腹腔内に投与して行った。

実施例3 (ハイブリドーマの作製方法)

最終免疫の3日後に免疫マウスより脾臓を摘出し、細胞融合を実施した。

RPMI 1640 メディウム (GIBCO) で調製した脾細胞浮遊液とSP-2細胞(マウス骨髄腫細胞)を約4:1の割合で混合しポリエチレングリコール2000 (sigma) を用いて細胞を融合させ、RPMI 1640 メディウムにて洗浄した。その後、15% FCS (ウシ胎仔血清、三菱化成) 含有RPMI 1640 メディウムにて細胞数が約 2×10^6 個/mL なるように調製し、1匹当たり6枚の96穴マイクロプレートの各well に100 μ L ずつ分注した。翌日、各well にHAT メディウム (ヒポキサンチン、アミノプテリン、サイミジン、15% FCS 含有RPMI 1640 メディウム) を100 μ L 添加した。2、3、5、8日目に半量のメディウムをHAT メディウムで交換し、10、13日目には半量のメディウムをHT メディウム (ヒポキサンチン、サイミジン、15% FCS 含有RPMI 1640 メディウム) で交換した。

実施例4 (ELISA法によるスクリーニング)

A 23187 処理後凍結融解した精子を 1×10^6 個/mL に調製して50 μ L ずつ96穴平底マイクロプレートの各well に分注し37 で約24時間乾燥して精子を固着させた。固着後、2% BSA 含有PBS (-) 250 μ L でブロッキングし、シールして使用まで4 で保存し、作製後5日以内に使用した。

精子固定プレートのブロッキング液を捨て、陰性(20倍希釈正常マウス血清)および陽性(1000倍希釈精子免疫マウス血清)対照並びに培養13日目の各well の細胞培養上清をそれぞれ50 μ L ずつ各well に分注し、37 で2時間反応させた。反応後、0.05% Tween 20 含有PBS (-) にて2回洗浄後、10万倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG (TAGO) 50 μ L / well 添加し、室温で2時間反応させた後、同様に洗浄し、基質液(o-フェニレンジアミン溶液60 mg / dL、0.006% H₂O₂ 添加)を100 μ L / well 添加し、37、遮光下で約20分間反応させた。反応後、0.5 M 硫酸(50 μ L / well) で反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(490 nm - 650 nm) にて吸光度を測定した。陽性対照と同等以上の吸光度を示すものを陽性と判定した。

実施例5 (間接蛍光抗体法によるスクリーニング)

A 23187 処理後凍結融解した精子を 1×10^6 個/mL に調製して20 μ L に陰性(20倍希釈正常マウス血清)および陽性(1000倍希釈精子免疫マウス血清)対照並びに上記ELISA法によるスクリーニングで陽性を示したwell の培養14日目の細胞培養上清50 μ L を加え軽く攪拌し、4 で1夜あるいは37 で2時間反応させた。反応後、0.02% NaN₃ 含有PBS (-) で2回洗浄し、400倍希釈したFITC標識抗マウスIgGを20 μ L 加え軽く攪拌した後、37 で1時間反応させた。反応後、同様に洗浄し蛍光顕微鏡にて観察した。精子頭部に蛍光が認められたものを陽性と判定した。

実施例6 (融合細胞のクローニング)

クローニングは限界希釈法にて実施した。

陽性well の細胞をクローニングメディウム(10% ブライクローン含有HT メディウム)にて5~100個/mL の細胞濃度に調製し、96穴マイクロプレートの各well に100 μ L ずつ分注し、直ちにクローニングメディウムを各well に100 μ L 添加

10

20

30

40

50

した。

クローニングを行った細胞は、2～3回/週培地交換（半量を新しいクローニングメEDIUMに交換）を行い、細胞の増殖にあわせてスクリーニングを実施した。スクリーニングとクローニングを繰り返して、ハイブリドーマ（FARS-91およびFARS-92）を樹立した。

（以下、本明細書中、マウス-マウス融合細胞FARS-91により産生されるモノクローナル抗体をFARS-91抗体、マウス-マウス融合細胞FARS-92により産生されるモノクローナル抗体をFARS-92抗体と称する）

実施例7（FARS-91およびFARS-92抗体のサブクラスの特定）

Mouse monoclonal antibody isotyping kit（アマシャム）を用いて、抗体のサブクラスを特定した。

FARS-91抗体を含んだ腹水またはFARS-92抗体を含んだ腹水3mLとtyping sticを室温で15分間反応させた後、5mLのTris buffer salineでtyping sticを3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体3mLを加え、室温で15分間反応させて同様に洗浄した後、基質液3mLを添加して室温で15分間反応後、蒸留水にてtyping sticを3回洗浄した。乾燥後、stic上に認められるサインにより抗体のサブクラスを特定した。

その結果、FARS-91抗体のサブクラスはIgG₁、FARS-92抗体のサブクラスはIgG_{2b}であることがわかった。

実施例8（FARS-91およびFARS-92抗体の先体反応後精子に対する反応性）
上記に述べたように、先体反応を起こした精子であるか否かを確認することにより、精子の受精能を測定することが出来る。ゆえに、実施例6で得られたモノクローナル抗体が該確認に利用できるかどうかについて検討した。

新鮮精子をカルシウムイオノフォアA23187で処理することにより、先体反応が惹起されることがマウス（Lynn R. Fraser; Journal of Andrology, 3, 412-419, 1982）およびヒト（Green et al.; Journal of Cell Science, 32, 321, 1978）において報告されている。

そこで、A23187処理したラット精子（先体反応後精子）と新鮮精子に対するFARS-91抗体およびFARS-92抗体の反応性を間接蛍光抗体法により検討した。

Jcl:SD系雄性ラット精巢上体尾部より採取した精子を0.4%BSA含有TYH培養液で 1×10^6 /mLに調製した。DMSOに溶解したA23187を終濃度が2μMとなるように加え、37℃で20分間反応させた。対照として、A23187の溶媒であるDMSOを加え、同様に反応させた。反応後、FARS-91抗体を含んだ腹水またはFARS-92抗体を含んだ腹水を添加し、37℃で30分間反応させた後、0.4%BSA含有TYH培養液で遠心（37℃、2800rpm、5min）により2回洗浄し、FITC標識抗マウスIgGを加え、37℃で60分間反応させた。反応後、0.02%NaN₃含有PBS（-）で遠心（室温、2800rpm、5min）により2回洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察し、精子頭部に蛍光を認める精子の割合を計測した。

その結果、A23187処理精子（図2AおよびB）の65.5±3.7%がFARS-91抗体と反応し（対照精子（図1AおよびB）では12.5±3.1%）、A23187処理精子（図4AおよびB）の59.8±3.8%がFARS-92抗体と反応した（対照精子（図3AおよびB）では8.5±1.7%）。以上のことから、FARS-91抗体およびFARS-92抗体は、先体反応を起こした精子に対して特異的に反応することが証明された。

実施例9（FITC-PSA染色法による凍結融解精子の観察）

精子を凍結融解すると、物理的に原形質膜および/または先体外膜が破壊されることにより先体反応を起こした状態（以下、擬似的先体反応と称する）になると言われている。そこで、先体反応前の精子先体内に存在する先体顆粒内容物に特異性を示す蛍光色素FITC-PSAを用いて凍結融解精子が擬似的先体反応を惹起しているかを確認した。通常、

10

20

30

40

50

先体反応を惹起していない精子では、先体内の先体顆粒内容物に蛍光色素 F I T C - P S A が結合するため、精子頭部に蛍光が認められる。

新鮮精子および凍結融解精子の塗抹標本を作製し、室温で2時間以上放置して乾燥させた後、95%メタノール中で2時間固定後、蒸留水に10分間ずつ3回浸して洗浄した。洗浄後、室温で遮光下に F I T C - P S A (5 0 m g / m L) 液と3時間反応させ、蒸留水で洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。精子頭部に蛍光が認められるものを陽性と判定した。

その結果、新鮮精子(図5A)の頭部では蛍光が認められたが、凍結融解精子(図5B)ではほとんどの精子頭部で蛍光が認められなかった。すなわち、新鮮精子では先体反応は起こしておらず、凍結融解精子では擬似的先体反応を起こしているということが証明された。

10

実施例10(FARS-91およびFARS-92抗体の凍結融解精子に対する反応性)実施例9により、凍結融解精子では擬似的先体反応を起こしていることが証明されたため、次に、FARS-91抗体およびFARS-92抗体が擬似的先体反応を起こした精子、すなわち凍結融解精子に対し特異的に反応するか否かについて検討した。

新鮮精子および凍結融解精子($1 \times 10^6 / \text{mL}$) $30 \mu\text{L}$ に F A R S - 9 1 抗体を含んだ腹水または F A R S - 9 2 抗体を含んだ腹水 $50 \mu\text{L}$ を加えて軽く攪拌し、 37°C で30分反応させ、0.4% B S A 含有 T Y H 培養液で遠心(37°C 、 2800rpm 、 5min)により洗浄した。洗浄後、400倍希釈 F I T C 標識抗マウス I g G を $30 \mu\text{L}$ 加えて 37°C で1時間反応させ、0.02% NaN_3 含有 P B S (-) にて遠心(室温、 2800rpm 、 5min)により2回洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察した。

20

その結果、FARS-91抗体およびFARS-92抗体ともに、凍結融解精子においては、ほとんどの精子頭部に蛍光が認められたが(図6Bおよび図7B)、新鮮精子においては、蛍光を発する精子の割合が激減した(図6Aおよび図7A)。実施例9および10により、FARS-91抗体およびFARS-92抗体は擬似的先体反応を起こした精子に対しても特異的に反応することが証明された。

実施例11(FARS-91およびFARS-92抗体のA23187処理後凍結融解した精子に対する反応性)

A23187により先体反応を惹起させ、さらに凍結融解することにより化学的にも物理的にも先体反応を起こした精子に対する、FARS-91抗体およびFARS-92抗体の反応性について検討した。

30

Jc1:SD系雄性ラット精巣上体尾部より採取した精子を0.4% B S A 含有 T Y H 培養液で $1 \times 10^6 / \text{mL}$ に調製した。DMSOに溶解したA23187を終濃度が $2 \mu\text{M}$ となるように加え、 37°C で20分間反応させた。反応後、処理した精子を P B S (-) で2回洗浄し、所定の濃度に調製した後、 -20°C で凍結した。融解後、FARS-91抗体を含んだ腹水またはFARS-92抗体を含んだ腹水を添加し、 37°C で30分間反応させた後、0.4% B S A 含有 T Y H 培養液で遠心(37°C 、 2800rpm 、 5min)により2回洗浄し、F I T C 標識抗マウス I g G $30 \mu\text{L}$ を加え、 37°C で60分間反応させ、0.02% NaN_3 含有 P B S (-) で遠心(室温、 2800rpm 、 5min)により2回洗浄し、蛍光顕微鏡にて観察した。

40

その結果、FARS-91(図8AおよびB)およびFARS-92(図9AおよびB)抗体は、ほぼ100%のA23187処理後凍結融解した精子頭部において、蛍光が認められた。

実施例12(FARS-91およびFARS-92抗体のヒト凍結融解精子に対する反応性)

FARS-91抗体およびFARS-92抗体がヒト凍結融解精子と反応するかを間接蛍光抗体法により検討した。

凍結融解したヒト精子($1 \times 10^6 / \text{mL}$) $30 \mu\text{L}$ に F A R S - 9 1 抗体を含んだ腹水または F A R S - 9 2 抗体を含んだ腹水 $50 \mu\text{L}$ を加え、 37°C で30分間反応させた後、0.02% NaN_3 含有 P B S (-) で遠心(37°C 、 2800rpm 、 5min)に

50

より2回洗浄し、400倍希釈FITC標識抗マウスIgGを30 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、同様に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。

その結果、FARS-91(図10A)およびFARS-92(図10B)抗体ともに、ヒト凍結融解精子との反応において蛍光を発せず、これらの抗体はヒト凍結融解精子に結合しないことが示された。

実施例13(受精能評価用キットの作製)

ダイナビーズM-450sheep抗マウスIgG(FC)懸濁液をよく振盪して懸濁化させた後、必要量をクリーンベンチ内で遠心管に採取し、4 $^{\circ}$ C、2000rpm、5分間遠心分離した。上清を取り除いた後、採取したダイナビーズと等量の非特異吸着防止剤であるブロックエース(雪印)を加え、振盪下37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションした。インキュベーション終了後に4 $^{\circ}$ C、2000rpmで5分間遠心分離し上清を取り除いた。

次いで採取したダイナビーズの2倍量の滅菌したPBS(-)を加え、よく攪拌した後4 $^{\circ}$ C、2000rpmで5分間遠心分離し上清を取り除いた。この操作をあと2回繰り返すことにより非特異吸着防止剤を完全に除去した。最後に得られた沈渣に採取したダイナビーズと等量のPBS(-)を加えた後、FARS-91抗体を含んだ腹水またはFARS-92抗体を含んだ腹水を加え、よく混和した後振盪下37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。ビーズは比重が重いいため振盪下に置いて分散が十分でないので、反応中は時々取り出しミキサー等でよく混和した。反応終了後、4 $^{\circ}$ C、2000rpmで5分間遠心分離し、上清を取り除いた。

次いで採取したダイナビーズの2倍量の滅菌したPBS(-)を加えよく混和した後4 $^{\circ}$ C、2000rpmで5分間遠心分離し、上清を取り除いた。この洗浄操作をあと3回繰り返すことにより未反応のFARS-91抗体あるいはFARS-92抗体を完全に除去した。最後に得られた沈渣に採取したダイナビーズの10倍量の0.02%NaN₃、2%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBS(-)を加えた。このビーズ懸濁液をよく混和し20 μ Lをマイクロチューブに採取し380 μ Lの2%BSAを含むPBS(-)を加えて、ビーズ数をトーマの血球盤でカウントし、0.5 \times 10⁶/mLとなるように調製した。また、Jcl:SD系雄性ラット精巣上体尾部より採取した精子を0.4%BSA含有TYH培養液で1 \times 10⁶/mLに調製した。0.5 \times 10⁶/mLの抗体結合ビーズ10 μ Lに1 \times 10⁶/mLに調製したラット新鮮精子100 μ Lを添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で反応させた。

その結果、FARS-91およびFARS-92抗体ともに、ラット精子添加直後ではビーズの凝集は見られなかったが、6時間後ではビーズの凝集が見られた。

実施例14(キット)

下記要素を組み合わせたキットを作製した:

炭酸水素ナトリウムおよびウシ血清アルブミンを含まないTYH液

7%炭酸水素ナトリウム

ウシ血清アルブミン

FARS-91ビーズまたはFARS-92ビーズ。

産業上の利用の可能性

本発明は、先体反応後ラット精子に特異的に反応するモノクローナル抗体を提供する。また、当該抗体を用いることにより、熟練した技術や煩雑な操作を必要とせず、短時間で簡便に受精能を評価せしめる受精能評価用キットを提供する。

【図面の簡単な説明】

図1は、FARS-91抗体の先体反応後精子(A23187処理対照精子)に対する反応性を示す顕微鏡写真である。

A) FARS-91抗体と対照精子との反応性(明視野、100倍)

B) FARS-91抗体と対照精子との反応性(FITC励起、100倍)

AおよびBは同一視野を示す。

図2は、FARS-91抗体の先体反応後精子(A23187処理精子)に対する反応性を示す顕微鏡写真である。

A) FARS-91抗体とA23187処理精子との反応性(明視野、100倍)

10

20

30

40

50

B) FARS - 91 抗体と A23187 処理精子との反応性 (FITC 励起、100 倍)
A および B は同一視野を示す。

図3は、FARS - 92 抗体の先体反応後精子 (A23187 処理対照精子) に対する反応性を示す顕微鏡写真である。

A) FARS - 92 抗体と対照精子との反応性 (明視野、100 倍)

B) FARS - 92 抗体と対照精子との反応性 (FITC 励起、100 倍)

A および B は同一視野を示す。

図4は、FARS - 92 抗体の先体反応後精子 (A23187 処理精子) に対する反応性を示す顕微鏡写真である。

A) FARS - 92 抗体と A23187 処理精子との反応性 (明視野、100 倍)

B) FARS - 92 抗体と A23187 処理精子との反応性 (FITC 励起、100 倍)

A および B は同一視野を示す。

図5は、FITC - PSA 染色法による凍結融解精子を観察した顕微鏡写真である。

A) 新鮮精子 (陽性、400 倍)

B) 凍結融解精子 (陰性、400 倍)

図6は、FARS - 91 抗体の凍結融解精子に対する反応性を示す顕微鏡写真である。

A) FARS - 91 抗体と新鮮精子との反応性 (陰性、200 倍)

B) FARS - 91 抗体と凍結融解精子との反応性 (陽性、200 倍)

図7は、FARS - 92 抗体の凍結融解精子に対する反応性を示す顕微鏡写真である。

A) FARS - 92 抗体と新鮮精子との反応性 (陰性、200 倍)

B) FARS - 92 抗体と凍結融解精子との反応性 (陽性、200 倍)

図8は、FARS - 91 抗体の A23187 処理後凍結融解精子に対する反応性を示す顕微鏡写真である。

A) FARS - 91 抗体と A23187 処理後凍結融解精子との反応性 (明視野、100 倍)

B) FARS - 91 抗体と A23187 処理後凍結融解精子との反応性 (FITC 励起、100 倍)

A および B は同一視野を示す。

図9は、FARS - 92 抗体の A23187 処理後凍結融解精子に対する反応性を示す顕微鏡写真である。

A) FARS - 92 抗体と A23187 処理後凍結融解精子との反応性 (明視野、100 倍)

B) FARS - 92 抗体と A23187 処理後凍結融解精子との反応性 (FITC 励起、100 倍)

A および B は同一視野を示す。

図10は、FARS - 91 および FARS - 92 抗体のヒト凍結融解精子に対する反応性を示す顕微鏡写真である。

A) FARS - 91 抗体とヒト凍結融解精子との反応性 (FITC 励起、200 倍)

B) FARS - 92 抗体とヒト凍結融解精子との反応性 (FITC 励起、200 倍)

10

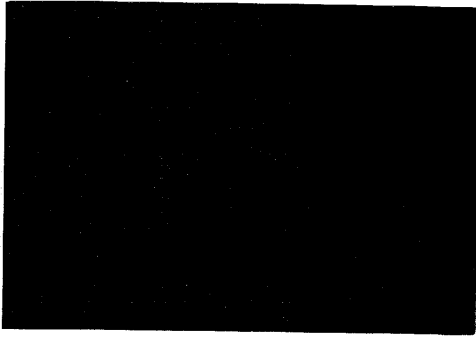
20

30

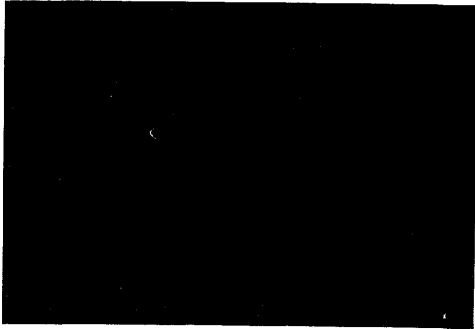
【 図 1 】

図 1

A)



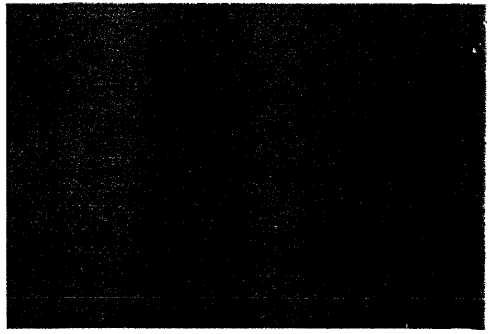
B)



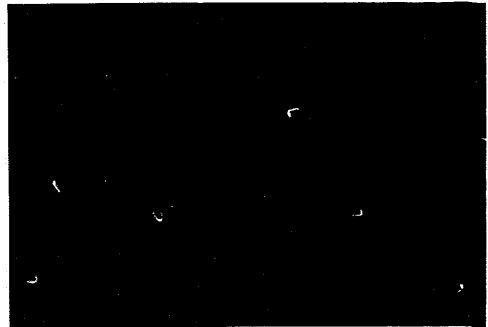
【 図 2 】

図 2

A)



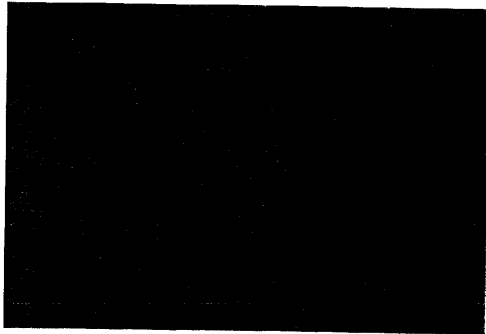
B)



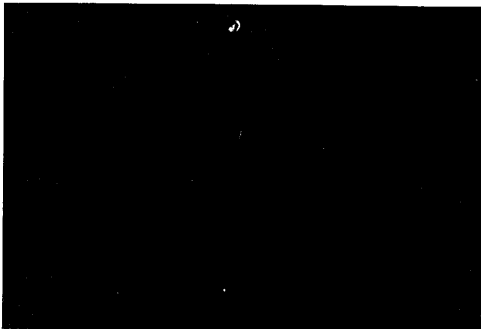
【 図 3 】

図 3

A)



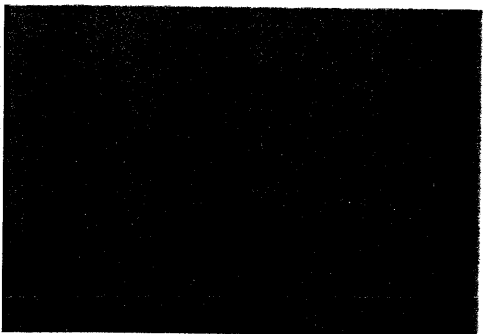
B)



【 図 4 】

図 4

A)



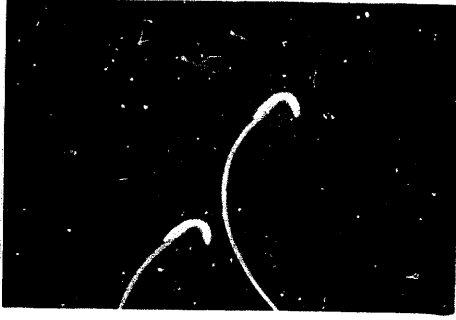
B)



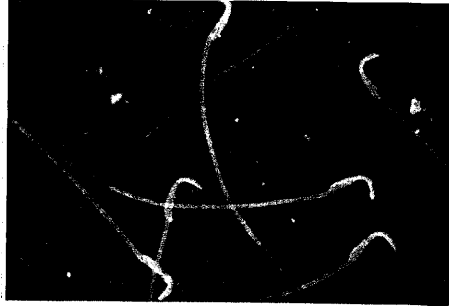
【 5 】

5

A)



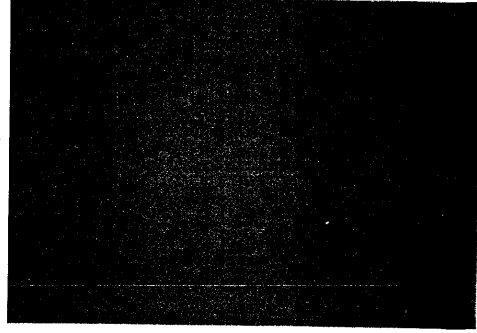
B)



【 6 】

6

A)



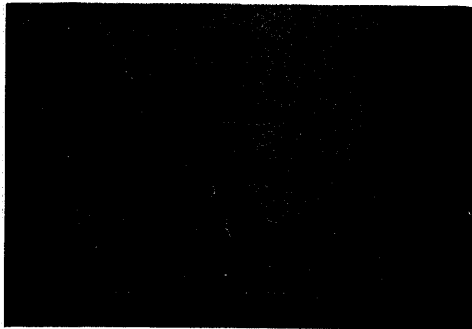
B)



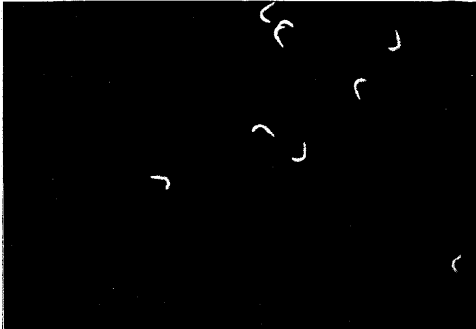
【 7 】

7

A)



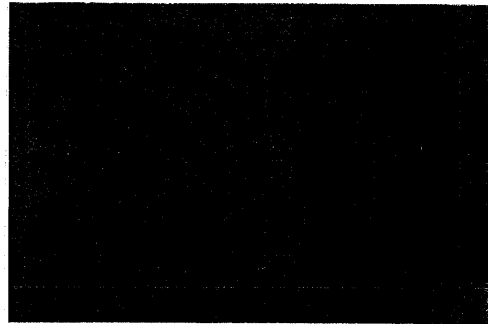
B)



【 8 】

8

A)



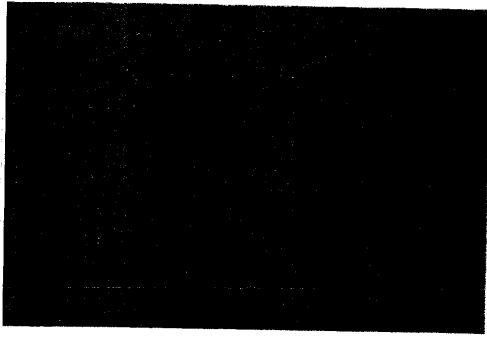
B)



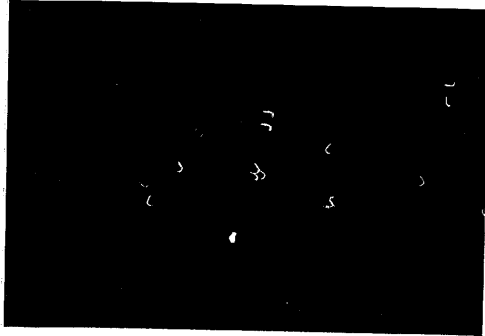
【 9】

9

A)



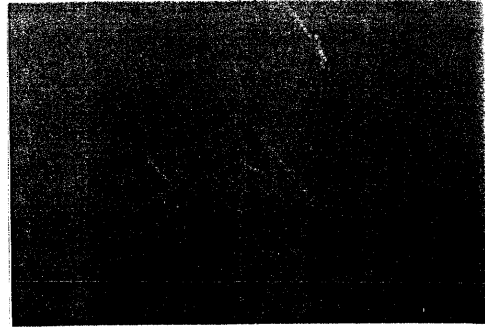
B)



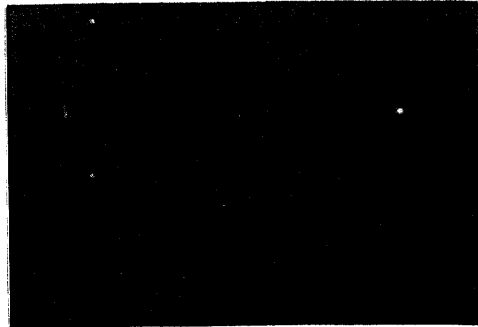
【 10】

10

A)



B)



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 N 15/02 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 荒木 宏昌
奈良県大和郡山市藤原町1 - 1 2

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第95 / 0 0 8 5 6 9 (W O , A 1)
特表平04 - 5 0 5 0 0 8 (J P , A)
J.Reprod.Immunol.,Vol.11,No.2(1987)p.91-100
J.Reprod.Immunol.,Vol.16,No.1(1989)p.71-82
J.Reprod.Immunol.,Vol.36,No.1-2(1997)p.61-75
Dev.Biol.,Vol.139,No.2(1990)p.349-362
Mol.Reprod.Dev.,Vol.25,No.3(1990)p.286-296

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
CA/REGISTRY(STN)
BIOSIS/WPIDS(STN)
PubMed
JSTPlus(JDreamII)

专利名称(译)	大鼠前体反应后抗精子抗体及其用途		
公开(公告)号	JP4610149B2	公开(公告)日	2011-01-12
申请号	JP2001533850	申请日	2000-10-23
申请(专利权)人(译)	扶桑制药工业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	扶桑制药工业有限公司		
[标]发明人	桑原良弘 長谷川通規 位坂清繼 荒木宏昌		
发明人	桑原 良弘 長谷川 通規 位坂 清繼 荒木 宏昌		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/07 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577 C12N15/02 C12P21/08 C12N5/20 C12N15/06 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/689 G01N2800/367 Y10S435/806 Y10S435/975		
FI分类号	C07K16/18 C12N5/00.202 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.S G01N33/577.B C12N15/00.C C12P21/08		
优先权	1999304530 1999-10-26 JP		
其他公开文献	JPWO2001030853A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

产生特异性结合大鼠顶体反应精子的抗体，通过将具有高抗体滴度的小鼠脾细胞与大鼠顶体反应的精子与小鼠来源的骨髓瘤细胞融合，获得能够稳定增殖的杂交瘤 (FARS-91和FARS-92菌株)。并筛选融合细胞与大鼠顶体反应的精子强烈反应。从这些杂交瘤中，可以获得选择性结合大鼠顶体反应精子的单克隆抗体。因此，提出了一种评估大鼠精子生育力的诊断方法。

