(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2006-525019

(P2006-525019A)

(43)公表日　平成18年11月9日(2006.11.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04		2G045
C12N 5/06	(2006.01)	C12N	5/00	E	2G054
G01N 33/48	(2006.01)	G01N	33/48	P	4B063
G01N 33/483	(2006.01)	G01N	33/483	C	4B065
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	21/78	C	4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 31 頁）　最終頁に続く

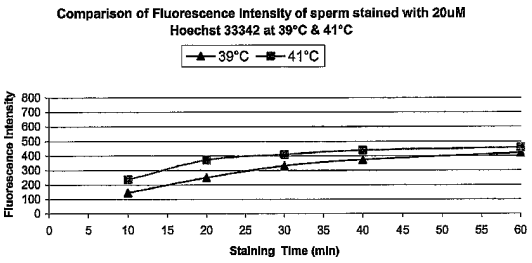
(21)出願番号　特願2006-509532 (P2006-509532)
(86)(22)出願日　平成16年3月29日 (2004.3.29)
(85)翻訳文提出日　平成17年11月10日 (2005.11.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/009903
(87)国際公開番号　WO2004/087177
(87)国際公開日　平成16年10月14日 (2004.10.14)
(31)優先権主張番号　60/458,731
(32)優先日　平成15年3月28日 (2003.3.28)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　501231613
モンサント　テクノロジー　エルエルシー
アメリカ合衆国　ミズーリ州　セントルイス　ノース　リンドバーグ　ブールバード　８００
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100106231
弁理士　矢野　正樹
(72)発明者　ムンハマド・アンザー
アメリカ合衆国６３０１７ミズーリ州チェスターフィールド、ティエンダ・ドライブ　１４５０６番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】精子の染色方法

(57)【要約】
精子細胞は、約４０℃を超える高温にて精子細胞と蛍光性のＤＮＡ選択的色素との組合せを含む方法により染色される。該方法は、染色時間の減少を可能とする。次いで、細胞は、フローサイトメトリーを含めた一般的な分離方法により効率的に選別され得る。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
無傷の精子生細胞およびＤＮＡ選択的蛍光色素を含む染色用混合物を形成し、次いで、該染色用混合物を４０℃を超える温度に付すことを特徴とする精子細胞を染色するための方法。
【請求項２】
色素が、ＵＶ励起または可視光励起色素であることを特徴とする請求項１記載の方法。
【請求項３】
色素が、ビスベンズイミド、ＳＹＢＲ－１４ならびにそのコンジュゲート、アナログおよび誘導体よりなる群から選択されることを特徴とする請求項２記載の方法。
【請求項４】
該色素が、Hoechst３３３４２、Hoechst３３２５８、ＳＹＢＲ－１４、および６－｛［３－（（２Ｚ）－２－｛［１－（ジフルオロボリル）－３,５－ジメチル－１Ｈ－ピロール－２－イル］メチレン｝－２Ｈ－ピロール－５－イル）プロパノイル］アミノ｝－Ｎ－［３－（メチル｛３－［（｛４－［６－（４－メチルピペラジン－１－イル）－１Ｈ,３’Ｈ－２,５’－ビベンゾイミダゾール－２’－イル］フェノキシ｝アセチル）アミノ］プロピル｝アミノ）プロピル］ヘキサンアミドよりなる群から選択されることを特徴とする請求項３記載の方法。
【請求項５】
染色用混合物が、ＸおよびＹを担う精子細胞が蛍光に基づいて区別して選別できるように色素がＤＮＡに結合するのを可能とするのに十分な期間にわたり該温度に付されることを特徴とする請求項１記載の方法。
【請求項６】
期間が、約１分～約１６０分であることを特徴とする請求項５記載の方法。
【請求項７】
期間が、約６０分未満であることを特徴とする請求項５記載の方法。
【請求項８】
期間が、約３０分未満であることを特徴とする請求項５記載の方法。
【請求項９】
色素濃度が、約０.１μＭ～約１０００μＭであることを特徴とする請求項５記載の方法。
【請求項１０】
色素濃度が、約１００μＭ～約６００μＭであることを特徴とする請求項９記載の方法。
【請求項１１】
染色用混合物が、約４１℃を超える温度に付されることを特徴とする請求項５記載の方法。
【請求項１２】
染色用混合物が、約４１℃～約５０℃の間の温度に付されることを特徴とする請求項１１記載の方法。
【請求項１３】
染色用混合物が、約４１℃～約４７℃の間の温度に付されることを特徴とする請求項１２記載の方法。
【請求項１４】
染色用混合物が、約４２℃～約４５℃の間の温度に付されることを特徴とする請求項１３記載の方法。
【請求項１５】
染色用混合物が、約４３℃を超える温度に付されることを特徴とする請求項１４記載の方法。
【請求項１６】

染色用混合物を形成する工程が、緩衝液と精子細胞とを組み合わせることを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項１７】

緩衝液を精子細胞と組み合わせて精子懸濁液を形成し、該精子懸濁液をＤＮＡ選択的色素と組み合わせて染色用混合物を形成することを特徴とする請求項１６記載の方法。

【請求項１８】

染色用混合物を形成する工程が、緩衝液とＤＮＡ選択的色素とを組み合わせて、緩衝された色素溶液を形成し、次いで、緩衝された該色素溶液と精子細胞とを組み合わせて、染色用混合物を形成することを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項１９】

消光物質と染色用混合物とを組み合わせる工程をさらに含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２０】

消光物質が、ＦＤ＆Ｃ　＃４０およびヨウ化プロピジウムよりなる群から選択されることを特徴とする請求項１９記載の方法。

【請求項２１】

消光物質が、ＦＤ＆Ｃ　＃４０であることを特徴とする請求項２０記載の方法。

【請求項２２】

消光物質が、ＦＤ＆Ｃ　＃４０であって、色素がHoechst３３３４２であることを特徴とする請求項２０記載の方法。

【請求項２３】

消光物質がヨウ化プロピジウムであって、色素がＳＹＢＲ－１４であることを特徴とする請求項２０記載の方法。

【請求項２４】

染色用混合物がさらに運動阻害剤を含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２５】

染色用混合物を形成する工程が、運動阻害剤と精子細胞とを組み合わせて阻害された精子懸濁液を形成し、次いで、阻害された該精子懸濁液とＤＮＡ選択的色素とを組み合わせて染色用混合物を形成することを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項２６】

運動阻害剤が、炭酸塩ベースの運動阻害剤を含むことを特徴とする請求項２５記載の方法。

【請求項２７】

炭酸塩ベースの運動阻害剤が、$NaHCO_3$、$KHCO_3$および$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$を含むことを特徴とする請求項２６記載の方法。

【請求項２８】

炭酸塩ベースの運動阻害剤が、水中の０．０９７モル／Ｌの$NaHCO_3$、０．１７３モル／Ｌの$KHCO_3$、０．０９０モル／Ｌの$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$を含むことを特徴とする請求項２７記載の方法。

【請求項２９】

染色用混合物が、細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物をさらに含むことを特徴とする請求項１記載の方法。

【請求項３０】

細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物が、ピルビン酸塩、ビタミンＫ、リポ酸、グルタチオン、フラビン、キノン、スーパーオキシドジスムターゼおよびスーパーオキシドジスムターゼミミックよりなる群から選択されることを特徴とする請求項２９記載の方法。

【請求項３１】

細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物が、ピルビン酸塩、ビタミンＫおよびリポ酸よりなる群から選択されることを特徴とする請求項３０記載の方法。

【請求項３２】
細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物が、約０．５μＭ～約５０ｍＭの濃度のピルビン酸塩を含むことを特徴とする請求項３１記載の方法。
【請求項３３】
細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物が、約１０ｍＭ～約１５ｍＭの濃度のピルビン酸塩を含むことを特徴とする請求項３２記載の方法。
【請求項３４】
細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物が、約１０ｍＭの濃度のピルビン酸塩を含むことを特徴とする請求項３３記載の方法。
【請求項３５】
細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物が、約１μＭ～約１００μＭの濃度のビタミンＫを含むことを特徴とする請求項３１記載の方法。
【請求項３６】
細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物が、約１００μＭの濃度のビタミンＫを含むことを特徴とする請求項３５記載の方法。
【請求項３７】
細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物が、約０．１ｍＭ～約１．０ｍＭの濃度のリポ酸を含むことを特徴とする請求項３１記載の方法。
【請求項３８】
細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物が、約１．０ｍＭの濃度のリポ酸を含むことを特徴とする請求項３１記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明の背景
本発明は、一般的には、性差富化精子（gender enriched sperm）を生成する目的で精子分離を可能にするための染色方法に関する。
【０００２】
人工授精（ＡＩ）および体外受精後の胚移植による動物の受精は、確立された操作である。家畜生産産業において、１以上の所望の特徴を有する子孫への繁殖の結果に影響を及ぼす能力は、明らかな長所を有する。例えば、酪農業において、乳牛の生産を保証する雌のために、子孫を予め選択する経済的利点が存在するであろう。性差富化精液または性差富化精子として知られるＸおよびＹ染色体を担う細胞が富化した集団への精子の分離は、予め選択された子孫を達成する１つの方法である。
【０００３】
Johnsonら（米国特許第５，１３５，７５９号）は、フローサイトメーター／細胞分画装置を用いるＤＮＡ含量による無傷のＸおよびＹ染色体を担う精子集団のＸおよびＹ染色体を担う精子富化した集団への分離を記載する。記載のごとく、その精子は、１時間（３９℃）～１．５時間（３０℃）の期間、３０～３９℃の温度にてＤＮＡ選択的色素と組み合わせる。次いで、フローサイトメーターを用いて、精子がレーザー光線を通過する場合に放出する蛍光量を測定する。Ｘ染色体を担う精子がＹ染色体を担う精子より種に依存して約３～５％多くのＤＮＡを含有するために、Ｘ染色体を担う精子はＹ染色体を担う精子より強い蛍光強度を与える。予め決定した蛍光強度の単一の精子を含む液滴に電荷を与え、回収容器へ静電気学的に偏向させる。次いで、その収集された性差富化精子集団を微量注入または人工授精に用いる。
【０００４】
また、Seidelら（ＷＯ０２／４３５７４）は、フローサイトメトリーを用いて、精子のＸおよびＹ染色体を担う細胞の性差富化集団への分離を記載している。Seidelらは３０℃と４０℃との間の温度にて細胞を染色することを記載している。
【０００５】

Didionら（ＷＯ０２／４１９０６）は、約１７℃～３０℃の温度にて精子細胞を染色することを記載している。Didionらによれば、これらの染色温度は、より高温での染色に起因し得るある種の影響、例えば、精子生存率および効率の低下を回避した。さらに、低温染色は、選別中に精子配向性に対して有利な効果を提供すると考えられている。

【０００６】

発明の概要

本発明の種々の態様において、精子細胞を染色する比較的迅速でかつ効率的な方法を提供し、色素の取り込みについて減少した期間が必要とされ、それにより、精液収集とＸおよびＹ染色体を担う精子細胞の性差富化集団の生成の時間との間の経過時間を減少させるかかる方法を提供する。

【０００７】

従って、略言すると、本発明は精子細胞を染色する方法に指向される。その方法は、無傷の精子生細胞およびＤＮＡ選択的蛍光色素を含有する染色用混合物を形成し、次いで、少なくとも約４０℃の温度に染色用混合物を付すことを含む。

【０００８】

本発明の他の態様は、以下に、部分的に明白になり、指摘されるであろう。

【０００９】

好ましい具体例の詳細な記載

驚くべきことに、精子細胞は、精子細胞生存率にかなりの衝撃なくしてより低温にて細胞を染色する必要があるより短時間で、高温、すなわち、４０℃を超える温度にてフローサイトメトリー・方法に用いるための色素で染色できると判断された。１つの具体例において、精子細胞は少なくとも４１℃の温度にて色素に曝露される。もう一つの具体例において、精子細胞は少なくとも４２℃の温度にて色素に曝露される。もう一つの具体例において、精子細胞は少なくとも４３℃の温度にて色素に曝露される。もう一つの具体例において、精子細胞は少なくとも４４℃の温度にて色素に曝露される。もう一つの具体例において、精子細胞は少なくとも４５℃の温度にて色素に曝露される。一般的には、いずれかのかなりの時間の期間、実質的に４５℃を超える温度にて精子細胞を曝露することは、細胞の生存率に有害に影響し得る。かくして、１つの具体例において、精子細胞は、少なくとも４１℃で５０℃を超えない温度にて色素に曝露される。もう一つの具体例において、精子細胞は、少なくとも４１℃で４８℃を超えない温度にて色素に曝露される。もう一つの具体例において、精子細胞は、少なくとも４１℃で４７℃を超えない温度にて色素に曝露される。例えば、１つの現在好ましい具体例において、精子細胞は、少なくとも４２℃で４７℃を超えない温度にて色素に曝露される。さらなる例として、もう一つの現在好ましい具体例において、精子細胞は、少なくとも４３℃で４５℃を超えない温度にて色素に曝露される。

【００１０】

本発明の方法は、新たに得られた精液試料または解凍済みの凍結保存された精液試料から由来する無傷のウシ、ブタ、ウマまたは他の哺乳動物の精子生細胞を染色するのに用いることもできる。生存精子の収集の種々の方法が知られ、それは、例えば、人工膣方法または手袋をはめた手作業方法を含む。典型的なウシの精液試料は、種およびその種内の特定の動物に依存してミリリットル当たり約０．５～約５０億個の精子細胞を含有するであろう。

【００１１】

一般的には、精子細胞は、精子細胞およびＤＮＡ選択的色素を含む染色用混合物を形成することにより本発明の１つの態様により染色される。精子細胞は、浸透圧およびｐＨにおけるかなりの変化にいくぶん感受性である。したがって、精子生存率への衝撃を最小化するために、染色用混合物をこれらを考慮して形成することが一般的に好ましい。これらの考慮と一致して、染色用混合物は、様々な方法で形成され得る。

【００１２】

１つの具体例において、そのままの精液はＤＮＡ選択的色素と組み合わせる。かくして

、例えば、自由流動（free-flowing）パウダーを含めたそのままの固体、または液状組成物の形態での色素は、そのままの精液と組み合わせ得る。あるいは、色素が溶解または分散している緩衝されていない液体をそのままの精液と組み合わせ得る。しかしながら、これらの各アプローチにおいて、染色用混合物の形成には、精子が、それらの生存率に悪影響を及ぼすのに十分な、そのままの精液に対する浸透圧またはｐＨにおけるかなりの変化に付されないことが一般的に好ましい。

【００１３】

もう一つの具体例において、そのままの精液は、色素が染色用混合物を形成するために溶解または分散している緩衝液と組み合わされる。有利なことには、その緩衝液は、混合物の形成の結果としてそれらの生存率に実質的に悪影響を及ぼすのに十分な、そのままの精液に対し、浸透圧またはｐＨのいずれかのかなりの変化の回避を援助するであろう。

【００１４】

もう一つの具体例において、精子源を緩衝液と組み合わせて精子懸濁液を形成し、その後、精子懸濁液を色素と組み合わせて染色用混合物を形成する。色素との接触に先立って緩衝液中に精子細胞を懸濁させることは、有利には、色素の添加に起因するｐＨおよび浸透圧のかなりの変化から精子細胞を保護し得る。この具体例において、精子源はそのままの精液であり得る。別法として、精子源は、遠心分離またはフラクションに精液を分ける他の手段の使用によって得られた精子含有精液誘導物であり得る。

【００１５】

もう一つの具体例において、ＤＮＡ選択的色素は、緩衝液と組み合わせるか、または緩衝液配合表の一部として含まれ、それによって、緩衝された色素溶液を形成する。かくして、例えば、自由流動パウダーを含めたそのままの固体または液状組成物の形態の色素は、緩衝液、またはその組み合わせに先立ち緩衝液配合表のいずれかの成分と組み合わせて、緩衝された色素溶液を形成でき、次いで、それはそのままの精液または精子懸濁液と組み合わせることもできる。

【００１６】

種々の生物学的緩衝液を個々にまたは組み合わせて用いて、ｐＨおよび浸透圧のかなりの変化から精子細胞を保護し得る。典型的には、これらの緩衝液は、約０．００１Ｍ～約１．０Ｍの濃度、および約４．５～約８．５の間のｐＨであろう。共通の生物学的緩衝液は、例えば、リン酸塩、二リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩および乳酸塩を含む。また、かかる緩衝液は、例えば、糖のごとき栄養源、および／またはストレプトマイシンのごとき抗生物質を含み得る。好ましい緩衝液は、ＴＣＡ、ＴＥＳＴ、クエン酸ナトリウム、ＴＬおよびＨＥＰＥＳを含む。本発明のある種の具体例において、精液試料は表Ｉに記載された１以上の緩衝液で希釈される。例えば、１つの具体例において、精液試料は表Ｉに記載された組成を有するＴＣＡ＃１緩衝液で希釈される。もう一つの具体例において、精液試料は、表Ｉに記載された組成を有するＴＣＡ＃２緩衝液で希釈される。もう一つの具体例において、精液試料は、表Ｉに記載された組成を有するＴＥＳＴ緩衝液で希釈される。もう一つの具体例において、精液試料は、表Ｉに記載された組成を有するクエン酸ナトリウム緩衝液で希釈される。さらにもう一つの具体例において、精液試料は表Ｉに記載された組成を有するＴＬ緩衝液で希釈される。もう一つの具体例において、精液試料は、表Ｉに記載された組成を有するＨＥＰＥＳ緩衝液で希釈される。さらなる具体例において、精子細胞は、２５ｍｌの純水当たり０．２０４ｇの$NaHCO_3$、０．４３３ｇの$KHCO_3$および０．４７３ｇの$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$（水中の０．０９７モル／Ｌの$NaHCO_3$、０．１７３モル／Ｌの$KHCO_3$および０．０９０モル／Ｌの$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$）を含む緩衝液で希釈して、精子懸濁液を形成し得る。

【００１７】

【表１】
表Ｉ

緩衝液配合表						
成分	TCA#1	TCA#2	TEST	クエン酸Ｎａ	HEPES	TL
塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）					7.6g	5.84g
塩化カリウム（ＫＣｌ）					0.3g	0.23g
炭酸水素ナトリウム（$NaHCO_3$）						2.1g
リン酸ナトリウム一塩基（$NaH_2PO_4-H_2O$）						0.04g
（＋）－２－ヒドロキシプロピオン酸（乳酸Ｎａ）						3.68ml
塩化マグネシウム（$MgCl_2$）					0.1g	0.08g
Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－Ｎ’－（２－エタンスルホン酸）（ＨＥＰＥＳ）					2.38g	2.38g
トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（ＴＲＩＳ塩基）	30.3g	32.02g	10.28g			
クエン酸一水和物	15.75g	18.68g				
クエン酸Ｎａ二水和物				29g		
２－［（２－ヒドロキシ－１，１－ビス［ヒドロキシメチル］エチル）アミノエタンスルホン酸（ＴＥＳ）			43.25g			
フルクトース	12.5g	2.67g		10g	2.52g	
Ｄ－グルコース			2g			
ステプタマイシン（Steptamycin）			0.25g			
ペニシリンＧ			0.15g			
水	1リットル	1リットル	1リットル	1リットル	1リットル	1リットル
標的ｐＨ	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35
標的重量モル浸透圧濃度（ミリオスモル／ｋｇ　H_2O）	~314	~300	~302	~316	~298	~296

【００１８】
使用した緩衝液の量は、いくつかの考慮、例えば、染色用混合物中の特定の緩衝液および所望の精子濃度（＃精子／ｍｌ）に一般的に依存する。したがって、所望の濃度の精子／ｍｌを達成するように、十分な量の緩衝液を用いるであろう。１つの具体例において、緩衝液を添加して、そのままの精液試料中のその濃度未満の精子を含む精子懸濁液を達成する。もう一つの具体例において、緩衝液を添加して、約１×１０^{6}精子／ｍｌ～約５×

10^9精子／ｍｌを含む精子懸濁液を達成する。もう一つの具体例において、緩衝液を添加して、約200×10^6精子／ｍｌ未満を含む精子懸濁液を達成する。さらにもう一つの具体例において、緩衝液を添加して、約1×10^6精子／ｍｌ～約200×10^6精子／ｍｌを含む精子懸濁液を達成する。依然としてもう一つの具体例において、緩衝液を添加して、約20×10^6～約200×10^6精子／ｍｌを含む精子懸濁液を達成する。もう一つの具体例において、緩衝液を添加して、約30×10^6精子／ｍｌ～約175×10^6精子／ｍｌを含む精子懸濁液を達成する。依然としてもう一つの具体例において、緩衝液を添加して、約50×10^6～約150×10^6精子／ｍｌを含む精子懸濁液を達成する。さらにもう一つの具体例において、緩衝液を添加して、約100×10^6精子／ｍｌ～約150×10^6精子／ｍｌを含む精子懸濁液を達成する。依然としてもう一つの具体例において、緩衝液を添加して、約150×10^6精子／ｍｌを含む精子懸濁液を達成する。

【００１９】

染色用混合物中の色素濃度は、ＸおよびＹ染色体を担う精子が、性差富化集団に選別されるのを可能にするのに十分な量の色素をＤＮＡに結合させために選択される。加えて、色素濃度は、意味があるように細胞生存率を衝撃せずに、合理的な短期間に精子細胞の定量的な染色を提供するのに好ましくは十分なものである。特定の適用のための所望の濃度に影響を及ぼす因子は、色素の性質、染色用混合物での精子濃度、染色用混合物のｐＨ、精子細胞による色素の取込みために許された時間の長さ、およびこの取込み期間中の温度を含む。しかしながら、一般的には、染色用混合物中の色素濃度は、典型的には、いずれかの範囲の濃度、一般的には、約０．１μＭ～１０００μＭの間で有り得るであろう。例えば、色素濃度は、「比較的低い」濃度範囲、すなわち、約０．１μＭ～約２５０μＭの濃度にて維持することもでき；この具体例内では、その濃度は、好ましくは約１００μＭ～約２００μＭ、より好ましくは約１００μＭ、依然としてより好ましくは約２００μＭ、さらに依然としてより好ましくは約１５０μＭである。別法として、色素濃度は、「中間の」濃度範囲内、すなわち、約２５０μＭ～約７００μＭの濃度にて維持することもでき；この具体例内では、その濃度は、好ましくは約３００μＭ～約７００μＭ、より好ましくは約３００μＭ、依然としてより好ましくは約４００μＭ、さらに依然としてより好ましくは約６００μＭである。加えて、色素濃度は、「比較的高い」濃度範囲、すなわち、約７００μＭ～約１０００μＭの濃度にて維持することもでき；この具体例内では、その濃度は、好ましくは約８００μＭ～約１０００μＭ、より好ましくは約８００μＭ、依然としてより好ましくは約９００μＭ、さらに依然としてより好ましくは約１０００μＭである。従って、１つの具体例において、色素濃度は約１００μＭ～約２００μＭである。もう一つの具体例において、色素濃度は約１０μＭ～約１００μＭである。依然としてもう一つの具体例において、染色用混合物中の色素濃度は約２０μＭ～約６０μＭである。加えて、大部分の種についての至適な染色濃度は、150×10^6精子当たり約４０μｇであり、それは約７０μＭであることが報告されている。例えば、L. A. JohnsonおよびGlenn Welch, Theriogenology (1999)参照。

【００２０】

染色用混合物のｐＨは、約６．０～約８．０の範囲に好ましくは維持される。より好ましくは、染色用混合物のｐＨは、約７．１～約７．６の範囲に維持される。依然として好ましくは、染色用混合物のｐＨは約７．３～７．４に維持される。依然として好ましくは、染色用混合物のｐＨは約７．３５に維持される。

【００２１】

ある種の色素は、細胞の浸透性を増加させるようなさらなる介入なくして、精子細胞に浸透し、ＤＮＡに特異的に結合できる。しかしながら、他の色素では、許容されない生存率または運動率を低下なくして、浸透速度を増加させるために染色に先立ち、精子を処理することは望ましいかもしれない。当業者に知られるいずれの適当な方法も用いることができる。かかる方法は、エレクトロポレーション、細胞浸透増強溶液、例えば、穏やかな界面活性剤の使用または化学的衝撃を含む。他のまたはよりストリンジェントな技術を用

いることが望ましいかまたは有利である場合、かかる処理は、、染色、色素、遺伝子またはベクターを生存細胞に誘導するリポソームまたは当業者により用いられる多数の技術の使用を含み得る。これらの方法には、限定されるものではないが、Gordonら (Proc. Natl. Acad. Sci., 1980)により用いられ、それ以来、ウサギ、ヒツジ、ウシおよびブタに拡張されたごとき微量注入；ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスファー；リン酸カルシウムでの共沈；および他の技術を含み、その全てが当業者によく知られている。さらに他の例において、その精子を遠心し、同一または実質的に同一な緩衝系にかかわらず、もう一つの培地中に遠心された精子を再懸濁させて後記の処理工程で干渉し得る（精子懸濁液に従前に添加されていてもよい）ある種の成分を取り出す。

【００２２】

染色用混合物での精子細胞による色素の取込みは、所望の度合のＤＮＡ染色を得るのに十分な期間継続することが可能である。一般的には、取込み期間が約１～約１６０分の間であろう。１つの具体例において、取込み期間は９０分未満である。もう一つの具体例において、取込み期間は６０分未満である。もう一つの具体例において、取込み期間は４０分未満である。もう一つの具体例において、取込み期間は２５分未満である。従前に記載のごとく、取込み期間は、取込み温度、色素の性質および色素濃度を含めたある範囲の他のパラメーターにいくらか依存する。ある種の具体例において、取込み期間は約２～約２５分である。他の具体例において、取込み期間は約５～２０分である。依然として他の具体例において、取込み期間は約２～約１０分である。もう一つの具体例において、取込み期間は約２分未満である。

【００２３】

染色用混合物は、取込み期間全体またはその一部分に本発明の高温に付すこともできる。かくして、例えば、染色用混合物は、少なくとも１％、５％、１０％、２０％またはより高いパーセントの取込み期間に４０℃を超える温度に維持され得る。１つの具体例において、染色用混合物の温度は取込み期間中に増大される。もう一つの具体例において、染色用混合物の温度は取込み期間に低下される。しかしながら、これらの各具体例において、温度変化の速度は、好ましくは精子細胞生存率へのいずれのかなりのネガティブな衝撃も回避するようにコントロールされる。

【００２４】

いずれの事象においても、取込み期間は、ＸおよびＹ染色体を担う精子細胞が、ＸおよびＹ染色体を担う精子の間の異なりかつ測定可能な蛍光強度に基づいて、選別できるように色素がＤＮＡに結合するのに十分なものである。１つの具体例において、染色の程度は、ＸおよびＹ染色体を担う精子が、それぞれの蛍光に基づいて、少なくとも約６０％の純度のＸおよびＹの集団に区別して選別されることを可能にするのに十分なものである。染色の程度は、ＸおよびＹ染色体を担う精子が、それぞれの蛍光に基づいて、少なくとも約７０％純度、より好ましくは少なくとも約８０％純度、さらにより好ましくは少なくとも約８５％純度、依然として少なくとも約９０％純度のＸおよびＹ染色体を担う精子集団に区別して選別されることを可能にするのに十分なものである。

【００２５】

ＤＮＡに結合し、ＵＶまたは可視光で励起されるに際して、本発明の色素は蛍光を発する。１つの具体例において、色素は、紫外線での励起に際して蛍光を発するものである。かかる色素は、例えば、Hoechst３３３４２およびHoechst３３２５８のごときビスベンズイミドを含み、その各々は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)から商業的に入手可能である。有利なことには、例えば、Hoechst３３３４２は、低毒性であり、十分に細胞浸透性であり、ＤＮＡに特異的であり、ＤＮＡに結合後に劇的に増強される蛍光を有し、蛍光の強度と、所与の細胞または試料中にあるＤＮＡの量との間の直線関係を示す。

【００２６】

もう一つの具体例において、色素は、可視光での励起に際して蛍光を発するものである。かかる色素は、例えば、可視光で励起できる色素のＳＹＢＲ－１４（Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR)から商業的に入手できる）およびＷＯ０２／４１９０６に記載され

たビスベンズイミド－ＢＯＤＩＰＹＲ^{R}コンジュゲートの６－｛［３－（２Ｚ）－２－｛［１－（ジフルオロボリル）－３,５－ジメチル－１Ｈ－ピロール－２－イル］メチレン｝－２Ｈ－ピロール－５－イル）プロパノイル］アミノ｝－Ｎ－［３－（メチル｛３－［（｛４－［６－（４－メチルピペラジン－１－イル）－１Ｈ,３’Ｈ－２,５’－ビベンゾイミダゾール－２’－イル］フェノキシ｝アセチル）アミノ］プロピル｝アミノ）プロピル］ヘキサンアミド（「ＢＢＣ」）を含む。

【００２７】

本発明の１つの具体例において、色素はもう一つの部位へのコンジュゲーションによって修飾され得る。例えば、本発明の特定の態様により、ビスベンズイミド（ビスベンゾイミダゾール）は、蛍光体の付加によって修飾する結果、可視光による励起に対するコンジュゲートにより蛍光応答を生じさせることができる。好ましくは、これらのコンジュゲートした分子は、ＤＮＡに対する結合がそれらの蛍光を増強する点でビスベンズイミド分子に類似し、コンジュゲートが可視光に応じて蛍光を発するという点でビスベンズイミド分子上の改良を表わす。

【００２８】

特に好ましい蛍光体は、可視光励起ジピロメテンボロンジフルオリド誘導体である。ジピロメテンボロンジフルオリド色素は、例えば、米国特許第５，３３８，８５４号および第４，７７４，３３９号に記載されたＢＯＤＩＰＹＯ商標下のMolecular Probes Inc.から入手可能な膜浸透性蛍光化合物である。例示的なビスベンズイミド－ジピロメテンボロンジフルオリド・コンジュゲートの調製はＷＯ０２／４１９０６に記載されている。例えば、フルオロセインおよびその誘導体のごとき前節に記載されたクラスの他の蛍光体も用いることができる。

【００２９】

当業者は、かかる蛍光体修飾色素は、それらは所望のｐＨおよび温度範囲において十分な細胞浸透性を有するので、他の適当な特性を持つコンジュゲートＤＮＡ染色を修飾または機能化することにより調製できることを理解するであろう。例えば、化学修飾は、（１）そのＤＮＡ色素のｐＫａを変化させる、（２）適当なリンカーを介して結合したカチオンまたはアニオンのいずれかのイオン浸透性増強基を添加する、または（３）エチレングリコールまたはポリエチレングリコール部位のごとき非イオン性浸透性増強基を添加することにより適当な細胞浸透性を増強するように成すことができる。

【００３０】

本発明の範囲内において、ビスベンズイミドおよび可視波長蛍光体は、多数の異なる方法で連結できる。ＷＯ０２／４１９０６は、それらを連結できる１つの方法を示す；しかしながら、当業者は、多数の他の蛍光体および連結方法を容易に選択できる。かかる選択を助ける供給およびコンサルテーションサービスは、例えば、Molecular Probes Inc., (Eugene, OR)のごとき蛍光体を製造および販売するビジネスでの商用実体から当業者は容易に入手できる。

【００３１】

好ましくは、ビスベンズイミドを可視波長蛍光体に連結する化学原子団は、生存率、浸透性、安定性、取込み、細胞貯蔵、フローサイトメトリー、処方または蛍光特性にかなりのネガティブな効果を生じさせないように選択されるであろう。好ましくは、連結原子団の化学的官能性は、安定性、浸透性、生存率、取込み、細胞貯蔵、フローサイトメトリー、処方または蛍光特性のごとき特性を増強するように選択されるであろう。

【００３２】

本明細書に開示された方法は、特定の源から最近得られた（すなわち、染色前の何分または何時間以内にウシ、ブタあるいは他の哺乳動物源から得られた）精子、または凍結保存され、引き続いて解凍された精子のいずれにも適用し得る。いずれの例においても、サイトメトリー選別の結果は、染色溶液への消去物質の添加により改善して、死滅した精子の蛍光を低下させ得る。種々の消光物質ならびにその使用は当該技術分野においてよく知られ、ヨウ化プロピジウム(Garnerら, Bio. of Reprod., 53: 276-84 (1995))およびFD&C

#40 (Johnsonら, Theriogenology, 52: 1323-1341 (1999))に関して示されている。低濃度で用いられるならばそれが無毒なので、FD&C #40はこの方法において特に有用である。同様に、ＳＹＢＲ－１４およびヨウ化プロピジウムの組合せは、これが瀕死および死滅した細胞からの生存している精子細胞の視覚化および分離を可能にするので、有利である。従って、本発明の１つの具体例において、精子細胞を色素および消光物質の双方と組み合わせて、染色用混合物を形成する。好ましい具体例において、精子細胞は、Hoechst３３３４２およびＦＤ＆Ｃ＃４０と組み合わせる。さらにもう一つの具体例において、精子細胞はＳＹＢＲ－１４およびヨウ化プロピジウムと組み合わせる。解凍した凍結保存精子試料を選別する場合に消光物質が有用であるが、それらの使用がそのようなものに単に制限されなく、それらが、最近得られた精子の試料に有利に用いてもよいと理解されるべきである。

【００３３】

緩衝液に加えて、精子の生存率または運動率を増強するために、他の添加剤を染色用混合物中に含有でき；これらの添加剤は精子源、色素源の一部として、または染色用混合物とは別に提供され得る。かかる添加剤は、エネルギー源、抗生物質、細胞内でまたは細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物、運動阻害剤および精漿を含む。

【００３４】

一般的には、運動阻害剤は、染色用混合物中の細胞が、哺乳動物の精巣上体または精巣上体の路の流体環境をシミュレーションすることにより、例えば、雄ウシのごとき哺乳動物の精巣上体の精子細胞をエミュレートするのを可能とし；かくして、例えば、（複数の）阻害剤が、精子の代謝活性および／または運動率を阻害する。阻害剤は、精子運動率に抑圧的な効果を有するある範囲の組成物のいずれかであり得る。例えば、染色用混合物中の比較的高濃度のカリウムイオンは、精子運動率を低下させる傾向にある。従って、１つの具体例において、染色用混合物はカリウムイオン源を含み、染色用混合物でのカリウム濃度が少なくとも約０.０５モル／Ｌであることが好ましい。より好ましくは、カリウム濃度は、少なくとも約０.０５モル／Ｌ～約０.５モル／Ｌである。さらに好ましくは、カリウム濃度は、少なくとも約０.１モル／Ｌ～約０.３モル／Ｌである。最も好ましいは、カリウム濃度は約０.１７３モル／Ｌである。また、かかる染色用混合物は、典型的には、必須ではないが、ナトリウムイオン源を含有するであろう。ナトリウムが存在する場合、カリウム－対－ナトリウムのモル比は、各々、１：１を超える。好ましくは、カリウム－対－ナトリウムのモル比は、少なくとも約１.２５：１である。さらに好ましくは、カリウム－対－ナトリウムのモル比は、少なくとも約１.５：１である。さらに好ましくは、カリウム－対－ナトリウムのモル比は、少なくとも約１.７５：１である。さらに好ましくは、カリウム－対－ナトリウムのモル比は、少なくとも約１.７８：１である。１つの特定の具体例において、カリウム－対－ナトリウムのモル比は、少なくとも約２：１である。

【００３５】

染色用混合物は、さらに炭水化物の取込みを下方調節できる二酸化炭素のイオンまたは源を含み得る。この具体例において、二酸化炭素源は、例えば、１以上の炭酸塩で有り得る。１つの具体例において、染色用混合物は、$NaHCO_3$および$KHCO_3$を含み、それによって、源のカリウムおよびナトリウムイオンならびに二酸化炭素の分圧を提供する。例えば、１つの具体例において、染色用混合物は、水溶液中の$NaHCO_3$および$KHCO_3$、好ましくは、水中の$NaHCO_3$および$KHCO_3$、ならびに$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$を含み；さらなる例では、染色用混合物は、Salisbury & Graves, J. Reprod. Fertil., 6:351-359 (1963)に開示された、水中の０.０９７モル／Ｌの$NaHCO_3$、０.１７３モル／Ｌの$KHCO_3$、０.０９０モル／Ｌの$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$を含む阻害緩衝液を用いて形成し得る。精子細胞は、一般的には、それらが運動阻害剤に曝露される限りは、静止したままであろう。

【００３６】

細胞内または細胞外で酸化／還元反応を調節するかかる組成物の例は、例えば、ピルビ

ン酸塩、ビタミンＫ、リポ酸、グルタチオン、フラビン、キノン、スーパーオキシドジスムターゼ（ＳＯＤ）およびＳＯＤミミックを含む。染色用混合物に含まれるならば、かかる組成物は、精子健康に有害に影響せずに、保護効果を達成するのに十分な濃度で存在し得る。典型的な濃度範囲は、用いるべき特定の組成物としてのかかる因子または染色混合物中の精子濃度に依存して、約１０μＭ～約５０ｍＭを含む。例えば、ピルビン酸塩が組成物中に含まれるならば、それは、約０．５μＭ～約５０ｍＭ、好ましくは約１ｍＭ～約４０ｍＭ、より好ましくは約２．５ｍＭ～約２５ｍＭ、さらにより好ましくは約１０ｍＭ～約２０ｍＭ、依然としてさらにより好ましくは約１５ｍＭ、最も好ましくは約１０ｍＭの濃度で染色用混合物中に存在し得る。ビタミンＫが組成物中に含まれるならば、それは、約１μＭ～約１００μＭ、好ましくは約１０μＭ～約１００μＭ、より好ましくは約５０μＭ～約１００μＭ、最も好ましくは約１００μＭの濃度で染色用混合物中に存在し得る。リポ酸が組成物中に含まれるならば、それは、約０．１ｍＭ～約１ｍＭ、好ましくは約０．５ｍＭ～約１ｍＭ、より好ましくは約０．５ｍＭ、最も好ましくは約１ｍＭの濃度で染色用混合物中に存在し得る。染色用混合物は、前記にリストされた濃度における前記にリストされた具体例のいずれか１つの組成物またはそのいずれかの組合せを含み得る。例えば、染色用混合物は、約１０ｍＭの濃度のピルビン酸塩および約１００μＭの濃度のビタミンＫを含む細胞内でまたは細胞外で酸化／還元反応を調節する組成物を含み得る。あるいは、染色用混合物は、約１０ｍＭの濃度のピルビン酸塩および約１ｍＭの濃度のポリ酸を含む組成物を含み得る。さらにもう一つの例は、約１０ｍＭの濃度のピルビン酸塩、約１００μＭの濃度のビタミンＫおよび約１ｍＭの濃度のポリ酸を含む組成物を含む染色用組成物を含む。

【００３７】

一旦精子が発明より染色されると、それらは蛍光に基づいた分離を可能とするいずれの公知の手段によっても選別のために調製し、次いで選別され得る。一般的に用いかつよく知られた方法は、米国特許番号５，１３５，７５９号、第５，９８５，２１６号、第６，０７１，６８９号、第６，１４９，８６７号および第６，２６３，７４５号ならびにＷＯ９９／３３９５６およびＷＯ０１／３７６５５に例示されたおよびそれらに記載されたフローサイトメトリーシステムを含む。１つの具体例において、例えば、染色された細胞は、鞘流体（sheath fluid）と結合でき、またはそうでなければ、本発明の高温に維持される間に選別するために調製され得る。もう一つの具体例において、例えば、染色された細胞は、色素の取込みが生じる高温から後の処理工程が行なわれるべき低温、例えば、室温に冷却され；しかしながら、この具体例において所望の程度の分離を可能とするために本発明の高温より低い温度にてかなりの量の色素取込みが生じないことが一般的には好ましい。

【００３８】

実施例

実施例１．

雄ウシ精液を人工膣を用いて性的に成熟した雄ウシから採取し、その試料を温度制御された容器中で３７℃にて染色施設に輸送した。受取に際して、精液を標準的でかつよく知られた手順(Farrellら Theriogenology, 49(4): 871-9 (Mar 1998))に従い、Hamilton-Thorn Motility Analyzer (IVOS)により、濃度、視覚的な運動率、ｐＨおよび膜完全性（membrane integrity）、運動率および前進運動率について分析した。精液濃度に基づいて、８×５ｍＬ精子懸濁液を調製した。１５０×１０^{6}精子／ｍＬの５ｍＬの４試料を、４１℃のｐＨ７．３５のＴＣＡ緩衝液中で精液のアリコートを懸濁することにより調製した。１５０×１０^{6}精子／ｍＬの５ｍＬのさらなる４試料を、３９℃のｐＨ７．３５のＴＣＡ緩衝液中で精液のアリコートを懸濁することにより調製した。精子懸濁液に、水中の１０ｍＭ Hoechst溶液のアリコートを添加し、表１（「Hoechstの標的濃度（μＭ）」）に見られる色素濃度を得た。精子懸濁液は、４１℃および３９℃水浴中で維持した。精子懸濁液は、精子懸濁液試料から５００μＬのアリコートを取り出し、フローサイトメトリーによって分析することにより分析し、色素の取込みを測定した（すなわち、蛍光強度を決定

した）。

【００３９】

【表２】

表１

試験管＃	温度（℃）	Hoechstの標的濃度（μＭ）	５ｍＬの精子懸濁液に添加されるべき１０ｍＭ Hoechst３３３４２　μＬ
1	39℃	20μＭ	10μＬ
2	41℃	20μＭ	10μＬ
3	39℃	30μＭ	15μＬ
4	41℃	30μＭ	15μＬ
5	39℃	57μＭ	28.5μＬ
6	41℃	57μＭ	28.5μＬ
7	39℃	85μＭ	42.5μＬ
8	41℃	85μＭ	42.5μＬ

【００４０】

分析結果を図１Ａ～１Ｄに要約する。

【００４１】

実施例２

精子試料は、精子を染色するために用いたHoechst３３３４２の色素濃度を除いて、実施例１と同一の方法で得て調製した。表２は、実施例２に用いた濃度をリストしている。懸濁液は４１℃および３９℃水浴中で維持した。５００μＬの試料アリコートを各試料から定期的に取り出し、フローサイトメトリーによって分析して、蛍光強度を決定した。

【００４２】

【表３】

表2

試験管＃	温度（℃）	Hoechstの標的濃度(μＭ)	５μＬの精子懸濁液に添加されるべき１０μＭ Hoechst３３３４２　μＬ
1	39℃	20μＭ	10μＬ
2	41℃	20μＭ	10μＬ
3	39℃	30μＭ	15μＬ
4	41℃	30μＭ	15μＬ
5	39℃	40μＭ	20μＬ
6	41℃	40μＭ	20μＬ
7	39℃	60μＭ	30μＬ
8	41℃	60μＭ	30μＬ

【００４３】

分析結果を図２Ａ～２Ｄに要約する。

実施例３

【００４４】

精子試料は、精子を染色するために用いたHoechst３３３４２の色素濃度ならびに染色温度を除いて、実施例１と同一の方法で得て、調製、染色、および分析した。表３は、実施例３に用いた濃度および温度をリストしている。

【００４５】
【表４】
表３

試験管＃	温度（℃）	Hoechstの標的濃度(μM)	５ｍＬの精子懸濁液に添加されるべき１０ｍＭ Hoechst３３３４２　μＬ
1	39°C	60μM	30μL
2	43°C	60μM	30μL
3	39°C	40μM	20μL
4	43°C	40μM	20μL
5	39°C	30μM	15μL
6	43°C	30μM	15μL
7	39°C	20μM	10μL
8	43°C	20μM	10μL

【００４６】
分析結果を図３Ａ～３Ｄに要約する。
実施例４
【００４７】
精子試料は、精子を染色するために用いたHoechst３３３４２の色素濃度ならびに染色温度を除いて、実施例１と同一の方法で得て、調製、染色、および分析した。表４は、実施例４に用いた濃度および温度をリストしている。
【００４８】
【表５】
表４

試験管＃	温度（℃）	Hoechstの標的濃度(μM)	５ｍＬの精子懸濁液に添加されるべき１０ｍＭ Hoechst３３３４２　μＬ
1	39°C	80μM	40μL
2	43°C	80μM	40μL
3	39°C	100μM	50μL
4	43°C	100μM	50μL

【００４９】
分析結果を図４Ａおよび４Ｂに要約する。
実施例５
【００５０】
精子試料は、精子を染色するために用いたHoechst３３３４２の色素濃度ならびに染色温度を除いて、実施例１と同一の方法で得て、調製、染色、および分析した。表５は、実施例５に用いた濃度および温度をリストしている。
【００５１】

【表６】
表５

試験管＃	温度（℃）	Hoechstの標的濃度(μM)	５ｍＬの精子懸濁液に添加されるべき１０ｍＭ Hoechst３３３４２　μＬ
5	39°C	80μM	40μL
6	45°C	80μM	40μL
7	39°C	100μM	50μL
8	45°C	100μM	50μL

【００５２】
分析結果を図５Ａおよび５Ｂに要約する。
実施例６
【００５３】
精子試料は、精子を染色するために用いたHoechst３３３４２の色素濃度ならびに染色温度を除いて、実施例１と同一の方法で得て、調製、染色、および分析した。表６は、実施例６に用いた濃度および温度をリストしている。
【００５４】
【表７】
表６

試験管＃	温度（℃）	Hoechstの標的濃度(μM)	５ｍＬの精子懸濁液に添加されるべき１０ｍＭ Hoechst３３３４２　μＬ
1	39°C	60μM	30μL
2	47°C	60μM	30μL
3	39°C	150μM	75μL
4	43°C	150μM	75μL

【００５５】
分析結果を図６Ａおよび６Ｂに要約する。
実施例７
【００５６】
雄ウシ精液を人工膣を用いて性的に成熟した雄ウシから採取し、その試料を温度制御された容器中で２５℃にて染色施設に輸送した。受取に際して、精液を、公知の分析方法により、濃度、視覚的な運動率、ＩＶＯＳ運動率および前進運動率、ｐＨならびに膜完全性について分析した。精液濃度に基づいて、４×１ｍＬの１５０×10^6精子／ｍＬ精子懸濁液を調製した。１５０×10^6精子／ｍＬの１ｍＬの２つの試料を、ｐＨ７.３５にて４１℃　ＴＣＡ緩衝液で精液のアリコートを懸濁することにより調製した。１５０×10^6精子／ｍＬの１ｍＬの２つのさらなるサンプルを、４３℃のｐＨ７.３５のＴＣＡ緩衝液中に精液のアリコートを懸濁することにより調製した。各温度の１つの試料に、６μＬの１０ｍＭ Hoechst溶液を添加して、６０μＭの色素濃度を得た。その懸濁液を４１℃および４３℃水浴中で維持した。定期的に、５０μＬアリコートを精子懸濁液試料から取り出し、円錐管に移し、２００μＬの適当な温度のＴＣＡ緩衝液を加えて、３０×10^6精子／ｍＬの最終精子懸濁液濃度を得た。３０×10^6精子／ｍＬ精子懸濁液試料をＩＶＯＳによって直ちに分析した。％運動率および％前進運動率（Prog Mot）についてのＩＶＯＳ結果を図７Ａおよび７Ｂに示す。
【００５７】

実施例８

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いで、ＩＶＯＳにより分析した。試料を６０μＭの濃度で染色し、３９℃および４５℃の温度にて維持した。ＩＶＯＳ分析の結果を図８Ａおよび８Ｂに示す。

【００５８】

実施例９

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いでＩＶＯＳにより分析した。試料を８０μＭの濃度で染色し、４１℃、４３℃および４５℃の温度にて維持した。ＩＶＯＳ分析の結果を図９Ａ－９Ｃに示す。

【００５９】

実施例１０

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いで、ＩＶＯＳにより分析した。試料を１００μＭの濃度で染色し、４１℃、４３℃および４５℃の温度にて維持した。ＩＶＯＳ分析の結果を図１０Ａ－１０Ｃに示す。

【００６０】

実施例１１

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いで、ＩＶＯＳにより分析した。試料を１００μＭの濃度で染色し、４７℃の温度にて維持した。ＩＶＯＳ分析の結果を図１１に示す。

【００６１】

実施例１２

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いで、ＩＶＯＳにより分析した。試料を１００μＭの濃度で染色し、４９℃の温度にて維持した。ＩＶＯＳ分析の結果を図１２に示す。

【００６２】

実施例１３

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いで、ＩＶＯＳにより分析した。試料を１２５μＭおよび１５０μＭの濃度で染色し、各々を水浴中で４３℃の温度にて維持した。ＩＶＯＳ分析の結果を図１３Ａおよび１３Ｂに示す。

【００６３】

実施例１４

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いで、ＩＶＯＳにより分析した。試料を２００μＭおよび２５０μＭの濃度で染色し、各々を水浴中で４３℃の温度にて維持した。ＩＶＯＳ分析の結果を図１４Ａおよび１４Ｂに示す。

【００６４】

実施例１５

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いで、ＩＶＯＳにより分析した。試料を１２５μＭおよび１５０μＭの濃度で染色し、各々を水浴中で４５℃の温度にて維持した。ＩＶＯＳ分析の結果を図１５Ａおよび１５Ｂに示す。

【００６５】

実施例１６

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いで、ＩＶＯＳにより分析した。試料を２００μＭ、２５０μＭおよび３００μＭの濃度で染色し、各々を水浴中で４５℃の温度にて維持した。

ＩＶＯＳ分析の結果を図１６Ａ－１６Ｃに示す。

【００６６】

実施例１７

雄ウシ精液を以下の例外を除いて実施例７のごとく、採取、分析し、緩衝液で懸濁し、Hoechst３３３４２で染色し、次いで、ＩＶＯＳにより分析した。試料を３００μＭ、３５０μＭおよび４００μＭの濃度割合で染色し、各々を水浴中で４３℃の温度にて維持した。ＩＶＯＳ分析の結果を図１７Ａ－１７Ｃに示す。

【００６７】

実施例１８

雄ウシ精液を人工膣を用いて性的に成熟した雄ウシから採取し、その試料を温度制御された容器中で２５℃にて染色施設に輸送した。受取に際して、精液を、公知の分析方法により、濃度、視覚的な運動率、ＩＶＯＳ運動率および前進運動率、ｐＨならびに膜完全性について分析した。精液濃度に基づいて、４×１ｍＬの１５０×10^6精子／ｍＬ精子懸濁液を調製した。１５０×10^6精子／ｍＬの１ｍＬの２つの試料を、４１℃のｐＨ７．３５のＴＣＡ緩衝液で精液のアリコートを懸濁することにより調製した。その試料のうち３つにＳＹＢＲ１４色素溶液を添加して、色素濃度０．６μＭ、６μＭおよび６０μＭを得た。その懸濁液を４３℃の水浴に維持した。定期的に、５０μＬの試料アリコートを円錐管に移し、２００μＬの適当な温度のＴＣＡ緩衝液を加えて、３０×10^6精子／ｍＬの最終精子懸濁液濃度を得た。３０×10^6精子／ｍＬ精子懸濁液試料をＩＶＯＳで直ちに分析した。％運動率および％前進運動率（Prog Mot）についてのＩＶＯＳ結果を図１８Ａ～１８Ｃに示す。

【００６８】

実施例１９

精子試料を、用いた色素および濃度を除いて実施例１と同一の方法にて、得て、調製、染色および分析した。濃度１００μＭのＢＢＣ、および濃度６μＭのＳＹＢＲ１４を用いて、精子懸濁液を染色し、温度を水浴中で４５℃に維持した。表７は、実施例１９に用いた濃度および温度の要約をリストしている。

【００６９】

【表８】

表７

試験管＃	温度（℃）	ＳＹＢＲ１４の標的濃度（μＭ）	５ｍＬの精子懸濁液に添加されるべき１ｍＭ ＳＹＢＲ１４ μＬ
1	39℃	6μM	30μL
2	45℃	6μM	30μL
		BBC	μL 10mM BBC
3	39℃	100μM	50μL
4	45℃	100μμM	50μL

【００７０】

分析結果を図１９Ａおよび１９Ｂに要約する。

【００７１】

実施例２０

雄ウシ精液を人工膣を用いて性的に成熟した雄ウシから採取し、その試料を温度制御された容器中で３７℃にて染色施設に輸送するために２部の炭酸塩緩衝液で希釈した。受取に際して、精液を、標準的でかつよく知られた手順(Farrellら Theriogenology, 49(4): 871-9 (Mar 1998))に従い、Hamilton-Thorn Motility Analyzer (IVOS)により、濃度、運動率および前進運動率について分析した。精液濃度に基づいて、１ｍＬの１５０×10^6精子／ｍＬ精子懸濁液を炭酸塩精子懸濁液のアリコートを取り出し、５００×ｇにて５分

間その精子懸濁液を遠心し、上清を取り出し、４１℃のｐＨ７.３５のＴＣＡ緩衝液中にそのペレットを再懸濁することにより調製した。１５０×１０^{6}精子／ｍＬのさらなる１ｍＬの１５０×１０^{6}精子／ｍｌを、ｐＨ７.３の１０ｍＭピルビン酸塩を含有する４１℃のＴＣＡ中に精液のアリコートを懸濁することにより調製した。その精液懸濁液に、水中の１０ｍＭ Hoechst溶液のアリコートを添加し、４００μＭ Hoechstの色素濃度を得た。精液懸濁液を４１℃水浴中に染色期間維持した。精液懸濁液を染色用の精液懸濁液から５０μＬアリコートを取り出し、同一温度にて２００μＬの同一緩衝液を添加し、次いで、ＩＶＯＳにより分析して、％前進運動率（％ Prog Mot）を測定した。ＩＶＯＳ分析結果を図２０に要約する。

【００７２】

実施例２１

精子試料を以下の例外を除いて、実施例２０と同一方法で得て調製した。染色およびＩＶＯＳ分析ために精液を懸濁するのに用いた緩衝液は、ＴＣＡおよび１０μＭビタミンＫを含有するＴＣＡであった。ＩＶＯＳ分析の結果を図２１に要約する。

【００７３】

実施例２２

精子試料を以下の例外を除いて、実施例２０と同一方法で得て調製した。染色およびＩＶＯＳ分析ために精液を懸濁するのに用いた緩衝液は、ＴＣＡおよび１００μＭビタミンＫを含有するＴＣＡであった。ＩＶＯＳ分析の結果を図２２に要約する。

【００７４】

実施例２３

精子試料を以下の例外を除いて、実施例２０と同一方法で得て調製した。染色およびＩＶＯＳ分析ために精液を懸濁するのに用いた緩衝液は、ＴＣＡおよび１ｍＭリポ酸を含有するＴＣＡであった。ＩＶＯＳ分析の結果を図２３に要約する。

【００７５】

実施例２４

雄ウシ精液を人工膣を用いて性的に成熟した雄ウシから採取し、その試料を温度制御された容器中で２５℃にて染色施設に輸送した。受取に際して、精液を、標準的でかつよく知られた手順(Farrellら Theriogenology, 49(4): 871-9 (Mar 1998))に従い、Hamilton-Thorn Motility Analyzer (IVOS)により、濃度、運動率および前進運動率について分析した。精液濃度に基づいて、４５０×１０^{6}精子／ｍＬ精子懸濁液のいくつかの試験管を、ＴＣＡ緩衝液または炭酸塩ベースの阻害剤のいずれかで精液を懸濁することにより調製した。以下の表ＩＩは、用いた組成および染色条件を示す。

【００７６】

【表９】

表ＩＩＩ

試料名	緩衝液	pH	Hoechst濃度(uM)	温度（℃）
ＴＣＡ中の１０ｍＭピルビン酸塩	TCA中の10mMピルビン酸塩	7.3	300μＭ	41℃
炭酸塩 6.2	炭酸塩ベースの阻害剤、 pH 6.2	6.2	300μＭ	41℃
炭酸塩 7.3	炭酸塩ベースの阻害剤、pH 7.3	7.3	300ΦμＭ	41℃

【００７７】

精子懸濁液に、水中の１０ｍＭ Hoechst溶液のアリコートを添加して、３００ｍＭ Hoechstの濃度を得た。精子懸濁液を４１℃水浴中で３０分間維持し、次いで、特に各図にお

いて、ソーティングについての典型的な濃度まで希釈することを示したｐＨ６．２のＴＣＡまたは炭酸塩ベースの阻害剤中の１０ｍＭピルビン酸塩で１５０×１０^{6}精子／ｍｌに希釈した。精子懸濁液を、各図に示した時間にて染色および希釈した精子懸濁液から５０μＬアリコートを取り出し、２００μＬの２５℃、ｐＨ７．３のＴＣＡ中の１０ｍＭピルビン酸塩を添加し、静止状態の反転を開始し、少なくとも５分間の平衡期間を可能とし、次いで、ＩＶＯＳにより分析して、パーセント前進運動率を測定した。ＩＶＯＳパーセント前進運動率の比較を図２４～２６に示す。

【図面の簡単な説明】

【００７８】

【図１】図１Ａ－１Ｄは、精子の蛍光強度が３９℃および４１℃にてHoechst３３３４２色素の濃度を変化させて染色した精子について測定される実施例１において行った試験結果をグラフとして示す。

【図２】図２Ａ－２Ｄは、精子の蛍光強度が３９℃および４１℃にてHoechst３３３４２色素の濃度を変化させて染色した精子について測定される実施例２において行った試験結果をグラフとして示す。

【図３】図３Ａ－３Ｄは、精子の蛍光強度が３９℃および４３℃にてHoechst３３３４２色素の濃度を変化させて染色した精子について測定される実施例３において行った試験結果をグラフとして示す。

【図４】図４Ａおよび４Ｂは、精子の蛍光強度が３９℃および４３℃にてHoechst３３３４２色素の濃度を変化させて染色した精子について測定される実施例４において行った試験結果をグラフとして示す。

【図５】図５Ａおよび５Ｂは、精子の蛍光強度が３９℃および４５℃にてHoechst３３３４２色素の濃度を変化させて染色した精子について測定される実施例５において行った試験結果をグラフとして示す。

【図６】図６Ａおよび６Ｂは、精子の蛍光強度が３９℃および４７℃にてHoechst３３３４２色素の濃度を変化させて染色した精子について測定される実施例６において行った試験結果をグラフとして示す。

【図７】図７Ａおよび７Ｂは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が３９℃および４３℃にて６０μＭ Hoechst３３３４２色素で染色していないか、または染色した精子について測定される実施例７において行った試験結果をグラフとして示す。

【図８】図８Ａおよび８Ｂは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が３９℃および４５℃にて６０μＭ Hoechst３３３４２色素で染色していないか、または染色した精子について測定される実施例８において行った試験結果をグラフとして示す。

【図９】図９Ａ－９Ｃは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４１℃、４３℃および４５℃にて８０μＭ Hoechst３３３４２色素で染色していないか、または染色した精子について測定される実施例９において行った試験結果をグラフとして示す。

【図１０】図１０Ａ－１０Ｃは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４１℃、４３℃および４５℃にて１００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色していないか、または染色した精子について測定される実施例１０において行った試験結果をグラフとして示す。

【図１１】図１１は、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４７℃にて１００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色していないか、または染色した精子について測定される実施例１１において行った試験結果をグラフとして示す。

【図１２】図１２は、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４９℃にて１００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色していないか、または染色した精子について測定される実施例１２において行った試験結果をグラフとして示す。

【図１３】図１３Ａおよび１３Ｂは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４３℃にて染色していないか、または１２５μＭ Hoechst３３３４２色素で染色したか、あるいは１５０μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子について測定される実施例１３において行った試験結果をグラフとして示す。

【図１４】図１４Ａおよび１４Ｂは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４３℃にて染色していないか、または２００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色したか、あるいは２５０μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子について測定される実施例１４において行った試験結果をグラフとして示す。
【図１５】図１５Ａおよび１５Ｂは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４５℃にて染色していないか、または１２５μＭ Hoechst３３３４２色素で染色したか、あるいは１５０μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子について測定される実施例１５において行った試験結果をグラフとして示す。
【図１６】図１６Ａ－１６Ｃは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４５℃にて、染色していないか、２００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色したか、２５０μＭ Hoechst３３３４２色素で染色したか、３５０μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子について測定される実施例１６において行った試験結果をグラフとして示す。
【図１７】図１７Ａ－１７Ｃは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４３℃にて、染色していないか、３００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色したか、３５０μＭ Hoechst３３３４２色素で染色したか、４００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子について測定される実施例１７において行った試験結果をグラフとして示す。
【図１８】図１８Ａ－１８Ｃは、精子のパーセント運動率およびパーセント前進運動率が４３℃にて、染色していないか、０.６μＭ ＳＹＢＲ１４で染色したか、６.０μＭ ＳＹＢＲ１４で染色したか、６０μＭ ＳＹＢＲ１４で染色した精子について測定される実施例１８において行った試験結果をグラフとして示す。
【図１９】図１９Ａ－１９Ｂは、精子の蛍光強度が、３９℃および４５℃にて１００μＭビスベンズイミドーＢＯＤＩＰＹコンジュゲート（ＢＢＣ）または６μＭ ＳＹＢＲ１４で染色された精子について測定される実施例１９において行った試験結果をグラフとして示す。
【図２０】図２０は、精子のパーセント前進運動率が、ＴＣＡ緩衝液または１０ｍＭピルビン酸塩を含有するＴＣＡ緩衝液のいずれかにおいて、４１℃にて、４００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子について測定される実施例２０において行った試験結果をグラフとして示す。
【図２１】図２１は、精子のパーセント前進運動率が、ＴＣＡ緩衝液または１０μＭビタミンＫを含有するＴＣＡ緩衝液のいずれかにおいて、４１℃にて、４００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子について測定される実施例２１において行った試験結果をグラフとして示す。
【図２２】図２２は、精子のパーセント前進運動率が、ＴＣＡ緩衝液または１００μＭビタミンＫを含有するＴＣＡ緩衝液のいずれかにおいて、４１℃にて、４００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子について測定される実施例２２において行った試験結果をグラフとして示す。
【図２３】図２３は、精子のパーセント前進運動率が、ＴＣＡ緩衝液または１ｍＭリポ酸を含有するＴＣＡ緩衝液のいずれかにおいて、４１℃にて、４００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子について測定される実施例２３において行った試験結果をグラフとして示す。
【図２４】図２４は、精子細胞のパーセント前進運動率が、１０ｍＭピルビン酸塩を含有するＴＣＡにおいて、４１℃にて、３００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色し、次いで、１０ｍＭピルビン酸塩または炭酸塩ベースの阻害剤のいずれかで１～３に希釈した精子について測定される実施例２４において行った試験結果をグラフとして示す。
【図２５】図２５は、精子細胞のパーセント前進運動率が、（１）１０ｍＭピルビン酸塩を含有するＴＣＡにおいて、４１℃にて、３００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色し、次いで、１０ｍＭピルビン酸塩を含有するＴＣＡで１～３に希釈するか、（２）ｐＨ７.３の炭酸ベースの緩衝液において、４１℃にて、３００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色し、次いで、ｐＨ６.２の炭酸ベースの阻害剤で１～３に希釈した精子について測定される実施例２４において行った試験結果をグラフとして示す。

【図２６】図２６は、精子細胞のパーセント前進運動率が、１０ｍＭピルビン酸塩またはｐＨ６．２の炭酸ベースの阻害剤を含有するＴＣＡにおいて、４１℃にて、３００μＭ Hoechst３３３４２色素で染色した精子細胞について測定される実施例２４において行った試験結果をグラフとして示す。

【図１】

FIG. 1A

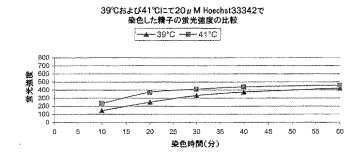


FIG. 1B

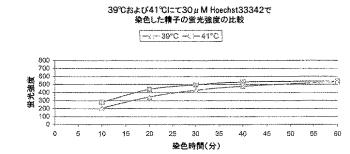


FIG. 1C

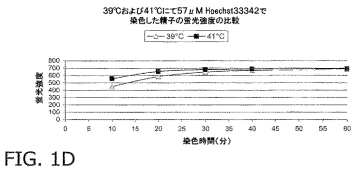
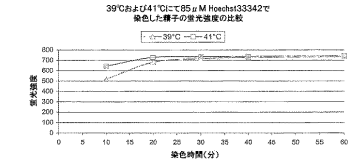


FIG. 1D



【図２】

FIG. 2A

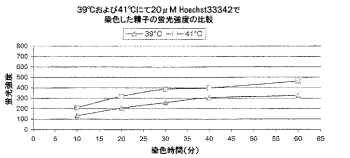


FIG. 2B

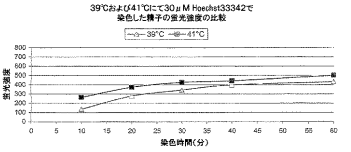


FIG. 2C

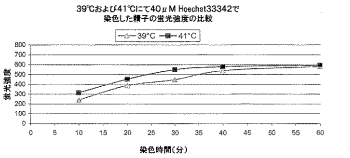
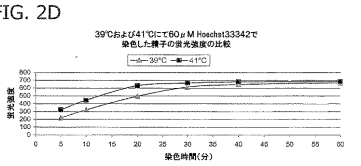


FIG. 2D



【図３】
FIG. 3A

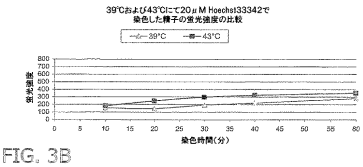


FIG. 3B

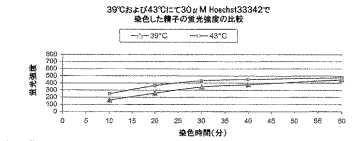


FIG. 3C

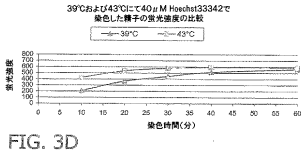
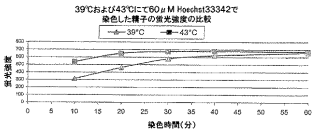


FIG. 3D



【図４】
FIG. 4A

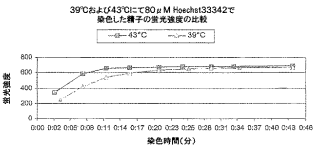
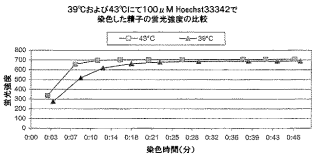


FIG. 4B



【図５】
FIG. 5A

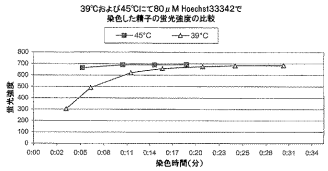
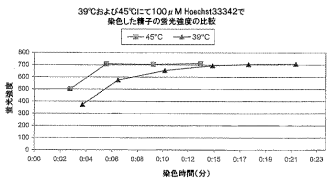


FIG. 5B



【図６】
FIG. 6A

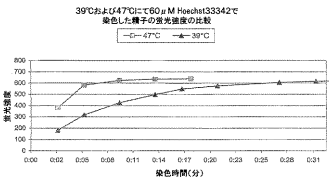
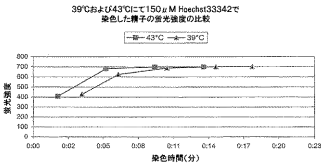


FIG. 6B



【図７】

FIG. 7A

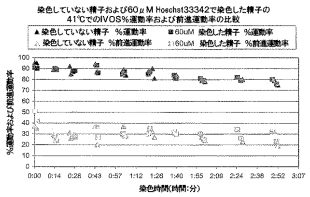
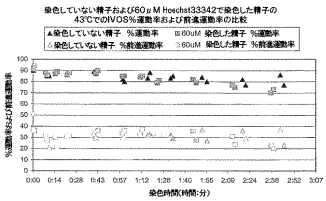


FIG. 7B



【図８】

FIG. 8A

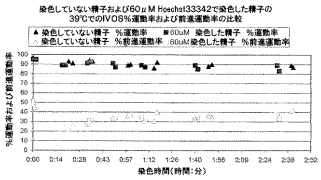
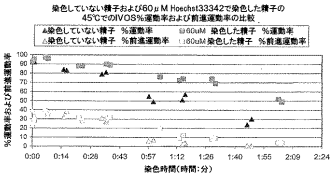


FIG. 8B



【図９】

FIG. 9A

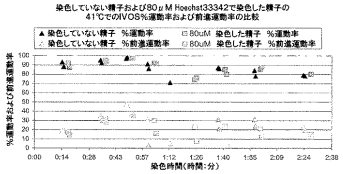


FIG. 9B

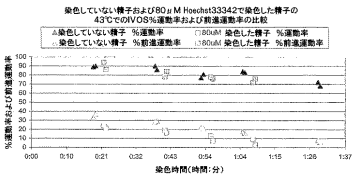
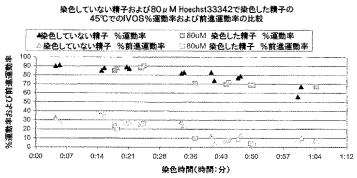


FIG. 9C



【図１０】

FIG. 10A

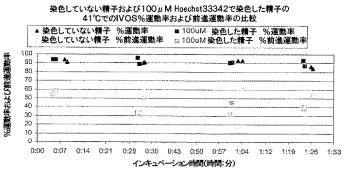


FIG. 10B

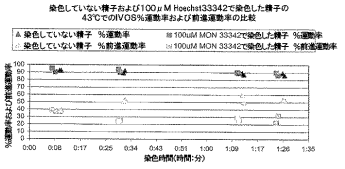
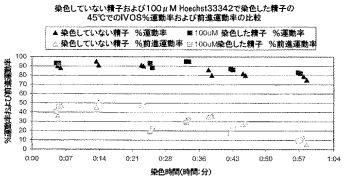
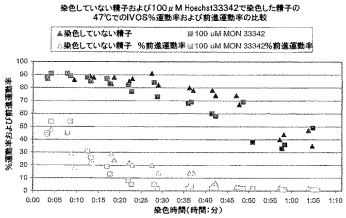


FIG. 10C

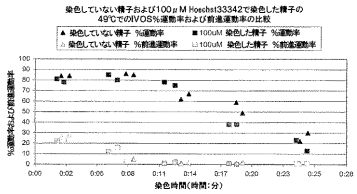


【図１１】

FIG. 11



【図１２】
FIG. 12



【図１３】
FIG. 13A

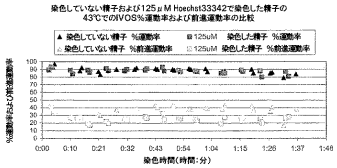
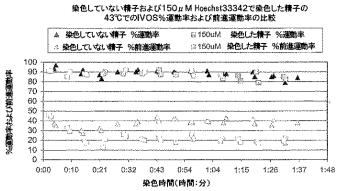


FIG. 13B



【図１４】
FIG. 14A

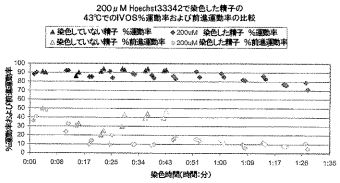
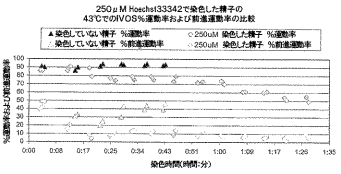


FIG. 14B



【図１５】
FIG. 15A

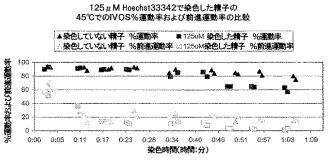
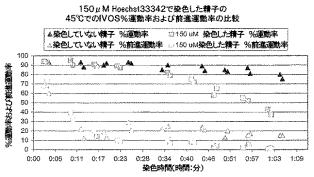


FIG. 15B



【図１６】
FIG. 16A

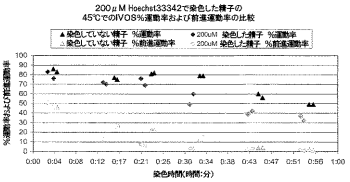


FIG. 16B

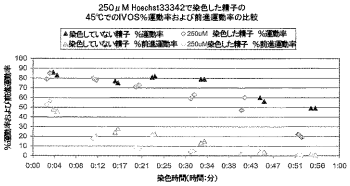
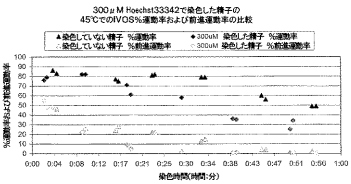


FIG. 16C



【図１７】

FIG. 17A

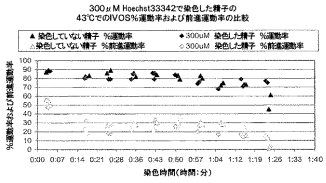


FIG. 17B

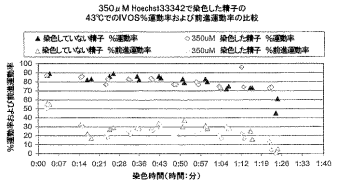
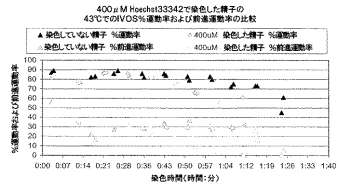


FIG. 17C



【図１８】

FIG. 18A

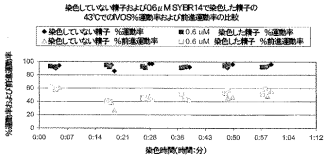


FIG. 18B

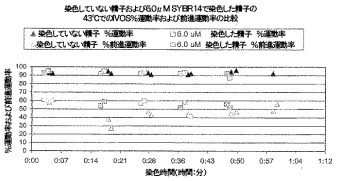
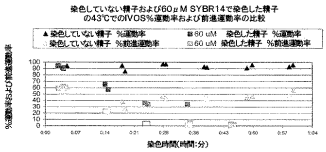


FIG. 18C



【図１９】

FIG. 19A

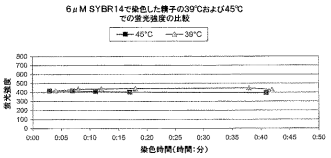
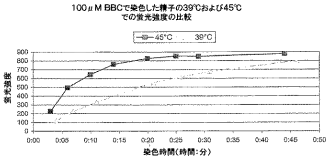
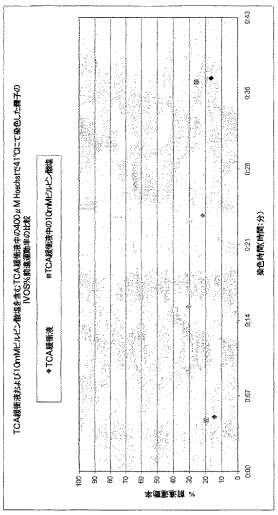


FIG. 19B



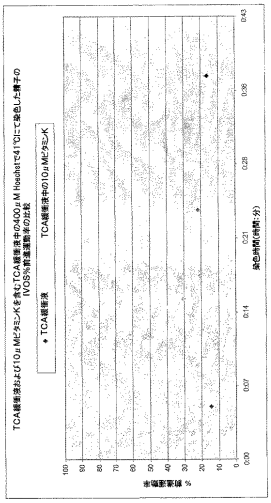
【図２０】

FIG. 20



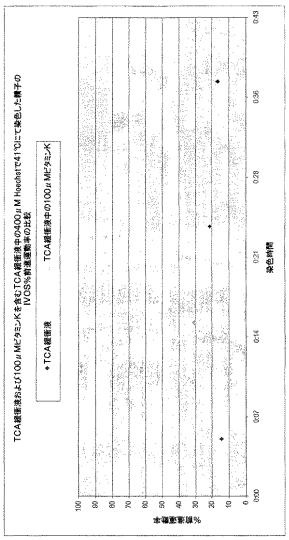
【図２１】

FIG. 21



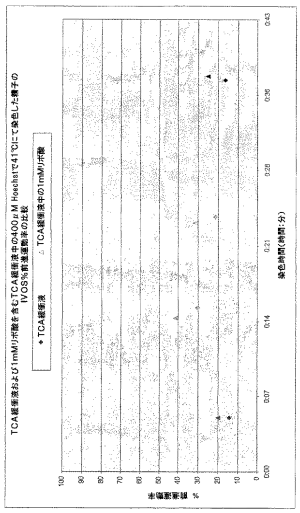
【図２２】

FIG. 22



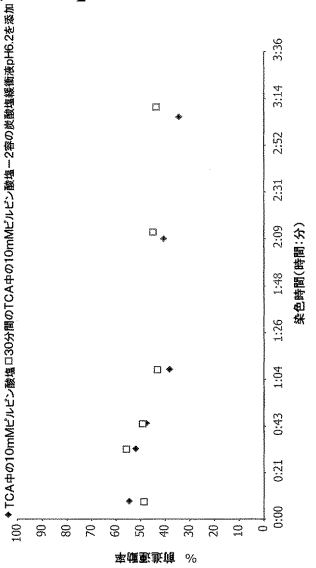
【図２３】

FIG. 23



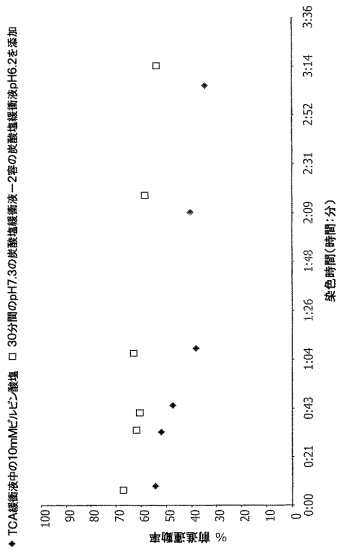
【図２４】

FIG. 24



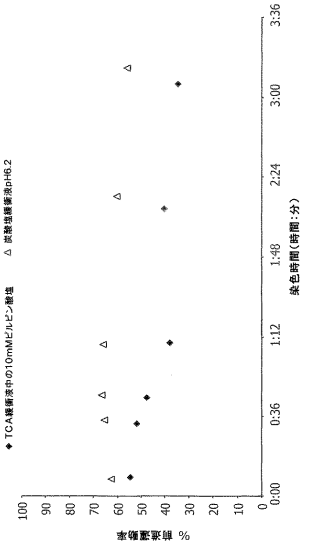
【図２５】

FIG. 25



【図２６】

FIG. 26



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/009903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K35/52 A61D19/00 C12N5/06

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 A61K A61D 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.
A	JOHNSON L A: "SEX PRESELECTION BY FLOW CYTOMETRIC SEPARATION OF X AND Y CHROMOSOME-BEARING SPERM BASED ON DNA DIFFERENCE: A REVIEW" REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT, CSIRO, EAST MELBOURNE, AU, vol. 7, no. 4, 1995, pages 893-903, XP002915903 ISSN: 1031-3613 page 900, column 1, line 14 - line 50	1-38
A	WO 01/51612 A (ALEANDRI RICCARDO ; GALLI ANDREA (IT); ISTITUTO SPERIMENTALE ITALIANO) 19 July 2001 (2001-07-19) p. 4, lines 6 - 32, p. 6, line 5 - p. 8, line 16, example 2, claims 6 - 8	1-38

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 July 2004	16/08/2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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) 340-3016	Hoesel, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/009903

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOHNSON L A ET AL: "SEX PRESELECTION: HIGH-SPEED FLOW CYTOMETRIC SORTING OF X AND Y SPERM FOR MAXIMUM EFFICIENCY" THERIOGENOLOGY, LOS ALTOS, CA, US, vol. 52, no. 8, 1999, pages 1323-1341, XP001023997 ISSN: 0093-691X p. 1327, lines 1 - 4, p. 1328, lines 18 - 38	1-38
A	WO 02/41906 A (WOODARD SCOTT ; BASKIN JAMES (US); DIDION BRADLEY (US); PHARMACIA CORP) 30 May 2002 (2002-05-30) p. 2, lines4 - 17p. 3, line 28 - p. 4, line 5, p. 15, lines 11 - 21, Examples 2 - 5	1-38

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

formation on patent family members

International Application No
PCT/US2004/009903

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0151612	A	19-07-2001	IT	MI20000030 A1	16-07-2001
			AU	3017601 A	24-07-2001
			WO	0151612 A1	19-07-2001
			EP	1255812 A1	13-11-2002
WO 0241906	A	30-05-2002	AU	1980202 A	03-06-2002
			CA	2454340 A1	30-05-2002
			WO	0241906 A2	30-05-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/52*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/52	
Ａ６１Ｐ	*15/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/00	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,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,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 シンディ・エル・ラドウィッグ
アメリカ合衆国６３１４６ミズーリ州セント・ルイス、ドーテル・レイン１４１２番
(72)発明者 ジェフリー・エイ・グレアム
アメリカ合衆国６３０１７ミズーリ州チェスターフィールド、ピカーディ・ヒル・ドライブ４９番
(72)発明者 ジャネット・エイ・グリーンザー
アメリカ合衆国６３１３０ミズーリ州ユニバーシティ・シティ、ウエストモアランド７１１２番

Ｆターム(参考) 2G045 BB24 CB01 CB14 FB12 GC15
2G054 AA08 CA22 CE02 EA03 EA07
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QR56 QR66 QS12 QS32 QS36 QX02
4B065 AA90X BA25 BD14 CA44 CA60
4C087 BB60 ZA81