

(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2017-536117

(P2017-536117A)

(43) 公表日 平成29年12月7日 (2017. 12. 7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
G O 1 N 27/416 (2006.01)	G O 1 N 27/416 3 8 6 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2017-526119 (P2017-526119)	(71) 出願人	515278879 アイトゥ バイオサイエンス インコーポ レイテッド A y t u B i o S c i e n c e , I n c . アメリカ合衆国 8 0 1 1 2 コロラド州 エングルウッド インバーネス パーク ウェイ 3 7 3 スイート 2 0 6
(86) (22) 出願日	平成27年11月24日 (2015. 11. 24)	(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠
(85) 翻訳文提出日	平成29年5月31日 (2017. 5. 31)	(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/062455	(74) 代理人	100142907 弁理士 本田 淳
(87) 国際公開番号	W02016/085997		
(87) 国際公開日	平成28年6月2日 (2016. 6. 2)		
(31) 優先権主張番号	62/084, 414		
(32) 優先日	平成26年11月25日 (2014. 11. 25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的サンプルの酸化還元電位に基づく受精能の判定方法

(57) 【要約】

生物学的サンプルの酸化還元電位 (O R P) を測定及び使用するための方法及びシステムが提供される。システムは、一般に、試験ストリップと、O R P を決定するためのリードアウトデバイスと、を含む。次いで、測定されたO R P は、サンプル又はサンプルの由来源の被験体の妊性に関連する特性を決定するために使用される。決定可能ないくつかの特性としては、精子サンプル、卵母細胞、又は受精卵の品質が挙げられる。測定されたO R P 値はまた、精虫サンプルの特定の特性、たとえば、精虫の形態、精虫の運動性、サンプル中の細胞の数、及びサンプル中の細胞の濃度を決定するためにも使用可能である。かかる特性及び受精能に関する知見は、特定の不妊治療が奏効しうる個体を同定するために使用可能である。

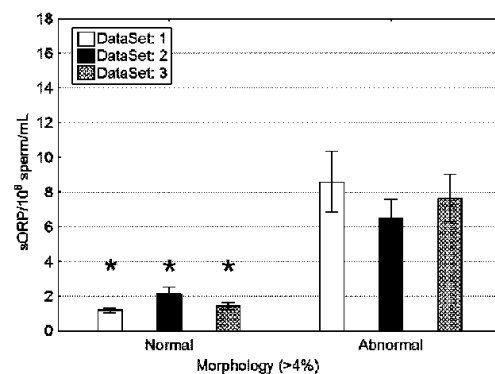


Figure 18

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体の精子サンプルの受精能を評価する方法において、

- a. 前記被験体のサンプルの静的酸化還元電位 (s O R P) 及び容量酸化還元電位 (c O R P) のうちの少なくとも一方を測定する工程と、
- b. 前記静的酸化還元電位及び前記容量酸化還元電位のうちの少なくとも一方の測定値と、参照値とを比較する工程と、
- c. 前記比較に基づいて前記精子サンプルの受精能を高い又は低いものとして分類する工程とを備える、方法。

【請求項 2】

高受精能を有するサンプルの参照値と比較して前記試験サンプルの静的酸化還元電位の値が有意に増加する場合、低受精能を有するものとして前記試験精子サンプルを特徴付け、かつ高受精能を有するサンプルの参照値と前記試験サンプルの酸化還元電位の値が本質的に同一である場合、高受精能を有するものとして前記試験精子サンプルを特徴付ける、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

被験体の精子サンプルの少なくとも 1 つの特性を決定する方法であって、

- a. 前記被験体のサンプルの静的酸化還元電位 (s O R P) 及び容量酸化還元電位 (c O R P) のうちの少なくとも一方を測定する工程と、
- b. 前記静的酸化還元電位及び前記容量酸化還元電位の少なくとも一方の測定値と参照値とを比較する工程と、
- c. 前記比較に基づいて前記精子の特性を判定する工程とを備え、

前記少なくとも 1 つの特性が、前記サンプル中の健常形態を有する精子細胞のパーセント、前記サンプル中の運動性精子細胞のパーセント、前記サンプル中の精子細胞の数、及び前記サンプル中の精子細胞の濃度からなる群から選択される、方法。

【請求項 4】

被験体の卵子のコンピテンスを評価する方法において、

- a. 前記被験体のサンプルの静的酸化還元電位 (s O R P) 及び容量酸化還元電位 (c O R P) のうちの少なくとも一方を測定する工程と、
- b. 前記静的酸化還元電位及び前記容量酸化還元電位のうちの少なくとも一方の測定値と参照値とを比較する工程と、
- c. 前記比較に基づいて前記卵子をコンピテント又はインコンピテントなものとして分類する工程とを備える、方法。

【請求項 5】

コンピテント卵子を示唆する参照値と比較して前記試験サンプルの酸化還元電位の値が有意に増加する場合、インコンピテントなものとして前記試験卵子を特徴付け、かつコンピテント卵子を示唆する参照値に前記試験サンプルの酸化還元電位の値が本質的に類似している場合、コンピテントなものとして前記試験卵子を特徴付ける、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

被験体の妊性状態の評価方法において、

- a. 前記被験体のサンプルの静的酸化還元電位 (s O R P) 及び容量酸化還元電位 (c O R P) のうちの少なくとも一方を測定する工程と、
- b. 前記静的酸化還元電位及び前記容量酸化還元電位のうちの少なくとも一方の測定値と参照値とを比較する工程と、
- c. 前記比較に基づいて前記被験体の妊性状態を判定する工程と、を備える、方法。

【請求項 7】

低減された妊性を示唆する参照値と比較して前記試験サンプルの酸化還元電位の値が有意

10

20

30

40

50

に増加する場合、低減された妊性を有するものとして前記被験体を同定し、かつ妊性を示唆する参照値に前記試験サンプルの酸化還元電位の値が本質的に類似している場合、妊性であるものとして前記被験体を同定する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

受精卵が妊娠の成立及び維持に成功する可能性の評価方法において、

- a. 前記受精卵が培養されている培地の静的酸化還元電位 (s O R P) 及び容量酸化還元電位 (c O R P) のうちの少なくとも一方を測定する工程と、
- b. 前記静的酸化還元電位及び前記容量酸化還元電位のうちの少なくとも一方の測定値と参照値とを比較する工程と、
- c. 前記比較に基づいて前記卵子が妊娠の成立及び維持に成功する能力を判定する工程とを備える、方法。

10

【請求項 9】

前記卵子が妊娠の成立及び維持に成功する見込みがあることを示唆する参照値と比較して前記試験サンプルの酸化還元電位の値が有意に増加する場合、妊娠の成立及び維持に成功する見込みがないものとして前記試験受精卵を同定し、

前記卵子が妊娠の成立及び維持に成功する見込みがあることを示唆する参照値に前記試験サンプルの酸化還元電位の値が本質的に類似している場合、妊娠の成立及び維持に成功する見込みがあるものとして前記試験受精卵を同定する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

受精卵が妊娠の成立及び維持に成功する可能性を向上させる方法において、

- a. 前記受精卵が培養されている培地の静的酸化還元電位 (s O R P) 及び容量酸化還元電位 (c O R P) のうちの少なくとも一方を測定する工程と、
- b. 前記静的酸化還元電位及び前記容量酸化還元電位のうちの少なくとも一方の測定値と参照値とを比較する工程と、
- c. 前記比較に基づいて前記受精卵を子宮に移す最適時間を判定する工程とを備える、方法。

20

【請求項 11】

閾値を用いた静的酸化還元電位及び容量酸化還元電位のうちの少なくとも一方のパリティーが、前記卵子を前記子宮に移すべきであることを示唆する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記閾値が静的酸化還元電位及び容量酸化還元電位のうちの少なくとも一方の値を表し、この値を超えると前記閾値以下の値を有する受精卵を移したときと比較して妊娠の成立及び維持に成功する可能性が有意に低減する、請求項 11 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、流体サンプルの酸化還元電位 (O R P) を測定するため、ならびにかかる O R P を用いてサンプル及び／又は被験体の受精能を判定するための方法及び装置に関する。

【背景技術】

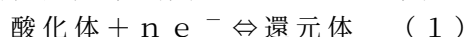
40

【0002】

全血、血漿、血清、精液、子宮液、腔液などの多くの生物学的流体は、酸化還元電位 (O R P) を有する。臨床的には、かかる流体の O R P は動物の酸化状態を提供する。より特定のには、かかる流体の O R P は、健康、疾患、及び生物学的プロセスの状態に関連する。

【0003】

酸化還元系 (又はレドックス系) は、次式：



に従って還元体から酸化体への電子の移動を含む。式中、 $n e^-$ は移動電子数に等しい。平衡時、レドックス電位 (E) (又は酸化還元電位) (O R P) は、ネルンスト・ペータ

50

ース (Nernst-Peters) の式：

$$E(ORP) = E_0 - RT/nF \ln [\text{還元体}] / [\text{酸化体}] \quad (2)$$

に従って計算される。式中、R (気体定数)、T (ケルビン度単位の温度)、及びF (ファラデー定数) は定数である。E₀ は、水素電極に対して測定されるレドックス系の標準電位であり、任意に0ボルトのE₀ が割り当てられ、かつnは移動電子数である。したがって、ORPは、還元体及び酸化体の全濃度に依存し、かつORPは、特定の系において全酸化体と全還元体との間の統合バランス尺度である。このため、ORPは、患者の体液又は組織の全体的酸化状態の尺度を提供する。

【0004】

酸化ストレスは、反応性酸素及び反応性窒素種がより多く産生されるか又は内因性保護抗酸化能が減少することにより引き起こされる。酸化ストレスは、種々の疾患及び老化に関連しており、すべてのタイプの病気で起こることが見いだされており、しかも受胎や妊娠をはじめとする多くの生物学的プロセスに影響することが示されている。たとえば、非特許文献1、非特許文献2、特許文献1、特許文献2、非特許文献3、非特許文献4を参照されたい。いくつかの研究では、患者の酸化状態と患者のアウトカムとの間の密接な関連が示されている。非特許文献2を参照されたい。

【0005】

患者における酸化ストレスは、種々の個別マーカーを測定することにより評価されてきた。たとえば、非特許文献1、非特許文献2、特許文献1及び特許文献2を参照されたい。しかしながら、かかる測定は、多くの場合、信頼性がなく、患者の酸化状態の矛盾する変動しやすい測定を提供する。非特許文献1、非特許文献2を参照されたい。患者の全体的酸化状態のスコア又は他の評価を提供すべく使用される複数のマーカーの測定は、単一のマーカーの測定に伴う問題を克服するために開発されてきた。非特許文献1、非特許文献2を参照されたい。かかる複合的方法は、単一のマーカーの測定よりも信頼性がありかつより高感度であるが、複雑でありかつ時間がかかる。したがって、患者の全体的酸化状態を確実に測定するより単純かつ迅速な方法に対する必要性が存在する。

【0006】

酸化／還元電位は電気化学的に測定可能である。血液、血液産物、及び他の生物学的流体のORPを測定するための電気化学デバイスは、典型的には、大きいサンプル体積（すなわち、十〜何百ミリリットル）及び長い平衡時間を必要とする。さらに、電気化学デバイスは、サンプル測定間でクリーニングを必要とする大きい嵩高い電極を有する。かかる電気化学デバイスは、ルーチン臨床診断試験にあまり適していない。バイオフィアウリングを防止する処理が施された電極を使用することが提案されている。しかしながら、かかるデバイスは、必然的に複雑な製造技術を必要とする。さらに、従来の電気化学デバイスは、臨床現場で使用するのに便利な方式を提供してこなかった。

【0007】

血漿及びその血液成分（たとえば、低密度リポタンパク質、血清アルブミン、及びアミノ酸）、精液（及びその成分）、子宮及び膣の分泌物などの生物学的流体の酸化特性及びラジカル特性は、熱開始フリーラジカル発生を用いて及び用いずに光化学発光によっても決定可能である。光化学発光系は、一般に、フリーラジカル発生剤と、抗酸化剤の存在下で化学発光変化を測定する検出器と、を含む。より具体的には、抗酸化剤の存在を測定するために、ある量の抗酸化剤を含有する生物学的サンプル（又はその成分の1つ）と既知量のフリーラジカルとを接触させて反応させる。生物学的サンプルとの接触後に残留するフリーラジカルは、化学発光測定により測定される。フリーラジカルは、サンプル中の内因性フリーラジカルに対して既知量の抗酸化剤を用いて同様に化学発光により測定される。こうしたタイプの測定及び検出システムは、ヒト又は動物の健康を評価又はモニターするために臨床現場で生物学的流体サンプルを迅速に大規模に測定するのに好適でない。

【0008】

近年、正常精子形態の基準を満たす男性の割合は実質的に低下している。確定ドナーから不妊ドナーを同定する精子形態の適中率は98.6%〜57.9%の範囲内である（非

10

20

30

40

50

特許文献5、非特許文献6、非特許文献7)。形態は、不妊ドナーを同定するうえで、精子運動性、濃度、全精子数、ハムスター卵子侵入試験(H E P T)、又は精子進入指数の尺度よりも良好であることが見いだされた(非特許文献8)。より重要なことに、形態は、妊娠と、着床及び妊娠の可能性の増加ならびに流産の減少を伴う体外受精(I V F)の好結果と、に強く関連する(非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11)。このパラメータは重要であるにもかかわらず、定性的形態尺度は、他の精子パラメータよりもさらに、技術的、手順的、及び主観的なエラーを生じやすい。通常の精液サンプルは、30%程度の変動を有する形態結果を生じる(非特許文献12、非特許文献13)。それゆえ、精子形態を表す不偏定量尺度は、不妊治療コミュニティに大きな利益をもたらすであろう。

10

【0009】

いくつかの試験では、酸化ストレスは、男性の不妊、とくに形態に関連している(非特許文献14、非特許文献15、非特許文献16、非特許文献17、非特許文献18、非特許文献19)。他の試験では、より不明確な関係が報告されている(非特許文献19、非特許文献20、非特許文献21)。これらの試験間の差がそれらの方法にあることは明らかである。ほとんどの試験は、酸化体すなわち反応性酸素種(R O S)の単一のファミリーを測定する。他のものは、酸化ストレスすなわち脂質過酸化の下で蓄積する事後損傷を測定する。最後に、抗酸化レベル又は活性の変化が使用されている。すなわち、全抗酸化能(T A C)又はスーパーオキシドジスムターゼ(S O D)が使用されている。「酸化ストレス」が単一の尺度により規定される多くの方法では、男性の妊性における酸化ストレスの役割を問題にすることは理不尽なことではない。酸化ストレスは、酸化体の活性がそれをクエンチする抗酸化剤の能力を超えている状態である。したがって、精子形態及び不妊性の予測因子として全酸化活性と全抗酸化活性とを比較する単純な尺度に対する必要性が存在する。本発明は、この必要性に対処するとともに他の関連する利益を提供する。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許第5, 290, 519号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2005/0142613号明細書

【非特許文献】

30

【0011】

【非特許文献1】ベグリア(V e g l i a)ら著、バイオマーカーズ(B i o m a r k e r s)、2006年、第11巻、第6号、p. 562~573

【非特許文献2】ロス(R o t h)ら著、カレント・オピニオン・イン・クリニカル・ニュートリション・アンド・メタボリック・ケア(C u r r e n t O p i n i o n i n C l i n i c a l N u t r i t i o n a n d M e t a b o l i c C a r e)、2004年、第7巻、p. 161~168

【非特許文献3】アガーワル(A g a r w a l)ら著、リプロダクティブ・バイオロジー・アンド・エンドクリノロジー(R e p r o d u c t i v e B i o l o g y a n d E n d o c r i n o l o g y)2005年、第3巻、第28号、p. 1~21

40

【非特許文献4】ラド(R a d)ら著、ジャーナル・オブ・ケアリング・サイエンス(J. C a r i n g S c i e n c e s)、2013年、第2巻、第4号、p. 287~294

【非特許文献5】アガーワル, A. (A g a r w a l, A.)ら著、リプロダクティブ・バイオロジー・アンド・エンドクリノロジー(R e p r o d B i o l E n d o c r i n o l)、2014年、第12巻、p. 33

【非特許文献6】メンクベルド, R. (M e n k v e l d, R.)ら著、ヒューマン・リプロダクション(H u m R e p r o d)、2001年、第16巻、p. 1165~1171

【非特許文献7】ホー, L. M. (H o, L. M.)ら著、ジャーナル・オブ・アンドロ

50

ロジー (J. Androl)、2007年、第28巻、p. 158~163

【非特許文献8】オムベレット, W. (Ombelet, W.) 著、ヒューマン・リプロダクション (Hum Reprod)、1997年、第12巻、p. 987~993

【非特許文献9】ファン・デン・ホーフェン, L. (van den Hoven, L.) 著、ファertiリティー・アンド・ステリリティー (Fertil Steril)、2015年、第103巻、p. 53~58

【非特許文献10】モーティマー, D. (Mortimer, D.) 及びメンクベルド, R. (Menkveld, R.) 著、ジャーナル・オブ・アンドロロジー (J. Androl)、2001年、第22巻、p. 192~205

【非特許文献11】アブ・ハッサン・アブ (Abu Hassan Abu) 著、アンドロロギア (Andrologia)、2012年、第44巻、補遺1、p. 571-577

【非特許文献12】ブラジル, C. (Brazil, C.) 著、アジア・ジャーナル・オブ・アンドロロジー (Asian Journal of Andrology)、2010年、第12巻、p. 14~20

【非特許文献13】オーガー, J. (Auger, J.) 著、アジア・ジャーナル・オブ・アンドロロジー (Asian Journal of Andrology)、2010年、第12巻、p. 36~46

【非特許文献14】アガーワル, A. (Agarwal, A.) 著、システムズ・バイオロジー・イン・リプロダクティブ・メディシン (Syst Biol Reprod Med)、2014年、第60巻、p. 206~216

【非特許文献15】ポンスーレジラジ, H. (Pons-Rejraji, H.) 著、ギネコロジー・オブ・ステトリク・フェルティリテ (Gynecol Obstet Fertil)、2009年、第37巻、p. 529~535

【非特許文献16】ベネデッティ, S. (Benedetti, S.) 著、リプロダクティブ・バイオメディシン・オンライン (Reprod Biomed Online)、2012年、第25巻、p. 300~306

【非特許文献17】ゾーン, B. (Zorn, B.) 著、インターナショナル・ジャーナル・オブ・アンドロロジー (Int J Androl)、2003年、第26巻、p. 279~285

【非特許文献18】マカノビック, B. (Macanovic, B.) 著、ディジーズ・マーカーズ (Dis Markers)、2015年、第2015巻、436236

【非特許文献19】スボドバ, M. (Svobodova, M.) 著、チェスカ・ギネコロジー (Ceska Gynecol)、2009年、第74巻、p. 399~403

【非特許文献20】ハギギャン, H. K. (Haghighian, H. K.) 著、ファertiリティー・アンド・ステリリティー (Fertil Steril.)、2015年

【非特許文献21】ベレスフォード, M. J. (Beresford, M. J.) 著、クリニカル・オンコロジー (Clinical Oncology)、2010年、第22巻、p. 46~55

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

一実施形態は、被験体の精子の受精能を評価する方法であり、この方法は、被験体のサンプルの酸化還元電位 (ORP) を測定する工程と、測定されたORPと参照値とを比較する工程と、比較に基づいて精子サンプルの受精能を決定する工程と、を含む。一実施形態では、測定工程は静的ORP (sORP) の測定を含む。一実施形態では、測定工程は容量ORP (cORP) の測定を含む。一実施形態では、測定工程はsORP及びcORPの測定を含む。一実施形態では、参照値は妊性精子品質パラメータに関連する値である

。一実施形態では、参照値は放電参照値である。一実施形態では、参照値は自己参照値である。一実施形態では、高受精能を有するサンプルの参照値と比較して試験サンプルのORP値が有意に増加する場合、低受精能を有するものとして精子試験サンプルを特徴付ける。一実施形態では、高受精能を有するサンプルの参照値と試験サンプルのORP値が本質的に同一である場合、高受精能を有するものとして精子試験サンプルを特徴付ける。

【0013】

本発明の一実施形態は、被験体の精子サンプルの少なくとも1つの特性を決定する方法であり、被験体のサンプルの静的酸化還元電位（sORP）及び／又は容量酸化還元電位（cORP）を測定する工程と、測定されたsORP及び／又はcORPと参照値とを比較する工程と、比較に基づいて精子の特性を決定する工程と、を含む。一実施形態では、測定工程はsORPの測定を含む。一実施形態では、測定工程はcORPの測定を含む。一実施形態では、測定工程はsORP及びcORPの測定を含む。一実施形態では、少なくとも1つの特性は、サンプル中の健常形態を有する精子細胞のパーセント、サンプル中の運動性精子細胞のパーセント、サンプル中の精子細胞の数、及びサンプル中の精子細胞の濃度からなる群から選択される。一実施形態では、参照値はカットオフ値である。一実施形態では、測定されたORPがカットオフ値よりも有意に高い場合、精子サンプルは、サンプル中の異常形態を有する精子細胞の高いパーセント、サンプル中の異常運動性（たとえば、低減された運動性）を有する精子細胞の高いパーセント、精子細胞の正常未満の数、及びサンプル中の精子細胞の異常に低い濃度からなる群から選択される1つ以上の特性を有すると称される。一実施形態では、測定されたORPがカットオフ値以下である場合、サンプルは、サンプル中の正常形態を有する精子細胞のパーセントが高いこと、サンプル中の正常運動性を有する精子細胞のパーセントが高いこと、精子細胞の数が少なくとも正常であること、及び精子細胞の濃度が少なくとも正常であることからなる群から選択される1つ以上の特性を有すると称される。一実施形態では、測定されたORPがカットオフ値以下である場合、サンプルは良品質であるか又は高受精能を有すると称される。

【0014】

本発明の一実施形態は、被験体の卵子のコンピテンスを評価する方法であり、被験体のサンプルの静的酸化還元電位（sORP）及び／又は容量酸化還元電位（cORP）を測定する工程と、測定されたsORP及び／又はcORPと参照値とを比較する工程と、比較に基づいて卵子をコンピテント又はインコンピテントなものとして分類する工程と、を含む。一実施形態では、測定工程はsORPの測定を含む。一実施形態では、測定工程はcORPの測定を含む。一実施形態では、測定工程はsORP及びcORPの測定を含む。一実施形態では、参照値は正常参照値である。一実施形態では、参照値は放電参照値である。一実施形態では、参照値は自己参照値である。一実施形態では、コンピテント卵子を示唆する参照値と比較して試験サンプルのsORP値が有意に増加する場合、インコンピテントなものとして試験卵子を特徴付ける。一実施形態では、コンピテント卵子を示唆する参照値に試験サンプルのORP値が本質的に類似している場合、コンピテントなものとして試験卵子を特徴付ける。一実施形態では、サンプルは、腔サンプル、卵胞サンプル、及び子宮サンプルからなる群から選択される。

【0015】

本発明の一実施形態は、被験体の妊性状態を評価する方法であり、被験体のサンプルの静的酸化還元電位（sORP）及び／又は容量酸化還元電位（cORP）を測定する工程と、測定されたsORP及び／又はcORPと参照値とを比較する工程と、比較に基づいて被験体の妊性状態を決定する工程と、を含む。一実施形態では、測定工程はsORPの測定を含む。一実施形態では、測定工程はcORPの測定を含む。一実施形態では、測定工程はsORP及びcORPの測定を含む。一実施形態では、参照値は正常参照値である。一実施形態では、参照値は放電参照値である。一実施形態では、参照値は自己参照値である。一実施形態では、低減された妊性を示唆する参照値と比較して試験サンプルのORP値が有意に増加する場合、低減された妊性を有するものとして被験体を同定する。一実施形態では、妊性を示唆する参照値に試験サンプルのORP値が本質的に類似している場

合、妊性であるか又は正常妊性を達成するものとして被験体を同定する。一実施形態では、サンプルは、精液サンプル、精漿サンプル、子宮サンプル、腔サンプル、又は卵胞サンプルからなる群から選択される。

【0016】

本発明の一実施形態は、受精卵が妊娠の成立及び維持に成功する可能性を評価する方法であり、受精卵が培養されている培地の静的酸化還元電位（s O R P）及び／又は容量酸化還元電位（c O R P）を測定する工程と、測定されたs O R P及び／又はc O R Pと参照値とを比較する工程と、比較に基づいて卵子が妊娠の成立及び維持に成功する可能性を決定する工程と、を含む。一実施形態では、測定工程はs O R Pの測定を含む。一実施形態では、測定工程はc O R Pの測定を含む。一実施形態では、測定工程はs O R P及びc O R Pの測定を含む。一実施形態では、参照値は正常参照値である。一実施形態では、参照値は放電参照値である。一実施形態では、参照値は自己参照値である。一実施形態では、卵子が妊娠の成立及び維持に成功する見込みがあることを示唆する参照値と比較して試験サンプルのO R P値が有意に増加する場合、試験受精卵は妊娠の成立及び維持に成功する見込みがないものとして同定される。一実施形態では、卵子が妊娠の成立及び維持に成功する見込みがあることを示唆する参照値に試験サンプルのO R P値が本質的に類似している場合、試験受精卵は妊娠の成立及び維持に成功する見込みがあるものとして同定される。

10

【0017】

本発明の一実施形態は、受精卵が妊娠の成立及び維持に成功する可能性を向上させる方法であり、受精卵が培養されている培地の静的酸化還元電位（s O R P）及び／又は容量酸化還元電位（c O R P）を測定する工程と、測定されたs O R P及び／又はc O R Pと参照値とを比較する工程と、比較に基づいて受精卵を子宮に移す時間を決定する工程と、を含む。一実施形態では、閾値を用いたs O R P及び／又はc O R Pのパリティは、卵子を子宮に移すべきであることを示唆する。一実施形態では、閾値はs O R P及び／又はc O R Pの値を表し、この値を超えると閾値以下の値を有する受精卵を移したときと比較して妊娠の成立及び維持に成功する可能性が有意に低減する。

20

【0018】

以上の実施形態のすべてにおいて、測定工程は、s O R Pの測定、c O R Pの測定、又はs O R P及びc O R Pの測定でありうる。そのほかに、以上の実施形態のすべてにおいて、参照値は、正常参照値、病態特異的参照値、及び自己参照値の1つ以上でありうる。

30

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明の実施形態に従って流体の酸化還元電位容量を測定するためのシステムのコンポーネントを示すブロック図。

【図2】本開示の実施形態に従ってリードアウトデバイスのコンポーネントを例示するブロック図。

【図3】本開示の実施形態に従ってリードアウトデバイスのさらなる態様を例示するブロック図。

【図4】本発明の実施形態に従って試験ストリップを示す上面図。

40

【図5】本開示の実施形態に従って酸化還元電位容量の測定方法の態様を表すフローチャート。

【図6】時間に対して供給電流及び測定電位差を表すグラフ。

【図7】s O R P／濃度（m V／10⁶精子／m L）に基づいて精液（X軸）として及び再び精漿（Y軸）として試験したサンプルで測定されたs O R P値間の比較を示すグラフ。

【図8】精液及び精漿の生のs O R P値（m V）間の比較を示すグラフ。

【図9】精液及び精漿のs O R P値に及ぼすサンプル凍結の影響を例示するグラフ。

【図10】精液（10 A）及び精漿（10 B）のs O R P／濃度値に及ぼす時間の影響を例示するグラフ（X軸は、0分の時点での精液（10 A）又は精漿（10 B）のs O R P

50

濃度値であり、Y軸は、120分の時点での精液(10A)又は精漿(10B)のsORP/濃度値である)。

【図11】精液(10A)及び精漿(10B)のsORP値(mV)に及ぼす時間の影響を例示するグラフ(各グラフの左の棒は0分の時点でのsORP値(mV)である。各グラフの右の棒は120分の時点でのsORP値(mV)である)。

【図12】妊性を予想するためのsORPカットオフ値の判定方法を示すグラフ。A)は、妊性に関してWHO基準に従って決定した妊性(左の棒)及び不妊性(右の棒)のサンプルのsORP/濃度値の比較を示している。B)は、妊性サンプルと不妊性サンプルとを最も良く分離するsORP値を同定するための受診者動作特性(ROC)分析を例示している。ギザギザの線は、種々のレベルの感度(y軸)及び特異度(x軸)に関連付けられたsORP値を表している。実線の直線は、統計的可能性に基づく予測能力を表している。2つの線間の領域はAUCを表している。

【図13】正常射精液体積($>1.5\text{ mL}$)を有するサンプルのsORP/濃度値と異常液体積を有するサンプルのsORP/濃度値との比較を示すグラフ。

【図14】正常精子細胞数($>39 \times 10^6$ 精子)を有するサンプルのsORP/濃度値と異常精子細胞数を有するサンプルのsORP/濃度値との比較を示すグラフ。

【図15】正常精子細胞濃度($>15 \times 10^6$ 精子/mL)を有するサンプルのsORP/濃度値と異常精子細胞濃度を有するサンプルのsORP/濃度値との比較を示すグラフ。

【図16】全運動性精子の正常パーセント($>40\%$)を有するサンプルのsORP/濃度値と異常精子細胞運動性を有するサンプルのsORP/濃度値との比較を示すグラフ。

【図17】前進運動性精子の正常パーセント($>32\%$)を有するサンプルのsORP/濃度値と異常前進運動性を有するサンプルのsORP/濃度値との比較を示すグラフ。

【図18】健常形態の精子の正常パーセント($>4\%$)を有するサンプルのsORP/濃度値と異常精子細胞形態を有するサンプルのsORP/濃度値との比較を示すグラフ。

【図19】sORP値に基づいて精子形態の予測度を評価するためのROC分析を示すグラフ。曲線は、精子形態を識別するために種々のレベルの感度(y軸)及び特異度(x軸)に関連付けられたsORP値を表している。実線の直線は、統計的可能性に基づく予測能力を表している。2つの線の間の領域は曲線下面積(AUC)を表している。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明の実施形態は、被験体の状態を評価又はモニターするシステムを使用する迅速ルーチン臨床診断試験及び方法に好適な、流体の酸化還元電位(ORP)特性(すなわち、静的酸化還元電位(sORP)及び/又は酸化還元容量(cORP))の測定システム及び方法を提供する。システムは、一般に、試験ストリップとリードアウトデバイスとを含む。より特定的には、本発明の実施形態は、患者の体液のORP特性を便利にかつ適時に決定可能である。発明の方法で使用可能な患者の生物学的サンプルは任意の体液でありうる。好適な体液としては、血液サンプル(たとえば、全血、血清、又は血漿)、尿、唾液、脳脊髄液(CSF)、涙液、精液、精漿、腔又は子宮の分泌液、卵胞液、羊水、及び臍帯血が挙げられる。また、洗浄液、組織ホモジネート、体液の成分(たとえば、血液細胞、精子など)、及び細胞溶解物を利用可能であり、本明細書で用いられる場合、「体液」はかかる調製液を含む。好適には、体液は、血液、血漿、精液もしくは精漿、腔液、子宮液、又は卵胞液である。いくつかの実施形態では、流体は、細胞培養液、たとえば、精子及び/又は卵細胞の培養に使用した細胞培養培地などでありうる。

【0021】

試験ストリップは、一般に、基材、参照セル、対向電極、作用電極、参照電極、及びサンプルチャンバーを含む。一般的には、流体サンプルをサンプルチャンバー内に配置することにより、参照セルと対向電極と作用電極と参照電極との間に電気接続が確立される。次いで、静的ORP値及びORP容量値を決定するために試験ストリップをリードアウトデバイスに接続可能である。

【0022】

リードアウトデバイスは、一般に、試験ストリップに含まれる種々の電極にリードアウトデバイスを電気相互接続するための接点を含む。本開示の実施形態によれば、リードアウトデバイスはアナログフロントエンドを含む。アナログフロントエンドは、一般に、電気接続を介してサンプルチャンバー内の流体を横切って対向電極及び作用電極に送ることが可能な制御電流を提供するように機能する。そのほかに、アナログフロントエンドは、参照電極と作用電極との間の電位差を表す電圧信号を生成するように動作可能である。アナログ-ディジタル（ADC）コンバータは、参照電極と作用電極との電位差を表す電圧信号をディジタル信号に変換するために提供される。ディジタル-アナログコンバータ（DAC）は、試験ストリップに制御電流を提供することに関連してディジタル制御信号をアナログ信号に変換するために提供される。コントローラはADC及びDACと連動する。さらに、コントローラは、限定されるものではないが、試験ストリップへの電流供給の制御及び電位差測定信号の処理をはじめとするリードアウトデバイスの種々の機能を制御するプログラムコードを実行するプロセッサを含むか又は構成する。コントローラはメモリと連携して動作可能である。そのほかに、リードアウトデバイスはユーザーインターフェースと電源とを含む。

10

【0023】

図1は、本開示の実施形態に従って、酸化還元電位（ORP）値、限定されるものではないが、流体サンプルの静的酸化還元値（sORP）及び／又は酸化還元容量値（cORP）を測定するためのシステム100のコンポーネントを表している。本明細書で用いられる場合、sORPは、流体サンプルを横切って測定される電位差又は電圧、たとえば、本明細書に記載されるように参照セルを含む試験ストリップ中に配置された流体サンプルを横切った測定される電位差又は電圧である。本明細書で用いられるcORPは、規定の時間にわたり流体サンプルに提供される電荷量の尺度であり、たとえば、本明細書に記載の試験ストリップで測定可能である。したがって、cORPは、ある規定の時間にわたり電流として供給される電荷を吸収する流体サンプルの能力とみなすことが可能である。たとえば、時間は、サンプルへの電流供給の開始に対応する始点と、変曲点や第1及び第2の変曲点間の midpoint などの終点と、により規定可能である。一般に、システム100は、ガルバノメータを実装可能なリードアウトデバイス104と試験ストリップ108とを含む。リードアウトデバイス104は、リードアウトデバイス104のリードアウト接点116を試験ストリップ108の一部として提供される電極接点120に電気相互接続するためにコネクタ又はリードアウトアパーチャ112を含む。リードアウトデバイス104はまた、ディスプレイなどのユーザアウトプット126とキーパッドなどのユーザインプット128とを含みうるユーザーインターフェース124を組込み可能である。さらに他の実施形態によれば、ユーザーインターフェース124は、タッチスクリーンインターフェースなどの一体化コンポーネントを含みうる。試験ストリップ108をリードアウトデバイス104に相互接続するために接点120を提供することに加えて、試験ストリップ108は、流体サンプルのORP値を決定することに関連して流体サンプルを受け取るために試験ストリップオーバーレイ136に形成されたサンプルチャンバーアパーチャ132を含む。

20

30

40

【0024】

図2は、本開示の実施形態に従ってリードアウトデバイス104の追加のコンポーネント及び特徴を例示している。示されるように、リードアウト接点116はアナログフロントエンド220に相互連結される。本明細書の他の箇所でもより詳細に記載したように、アナログフロントエンド220は、一般に、対向電極と試験ストリップ108の作用電極との間を通る制御電流を提供するように機能する。そのほかに、アナログフロントエンド220は、参照電極と試験ストリップ108の作用電極との間の電位差を表す電圧信号を提供するように機能する。またさらなる実施形態によれば、アナログフロントエンド220は、試験ストリップ108とリードアウトデバイス104との相互接続を表す信号を提供するためにストリップ検出回路を含みうる。

50

【0025】

アナログフロントエンド220は、一般に、ディジタルーアナログ(DAC)コンバータ224から制御信号を受け取る。アナログフロントエンド220による出力信号は、一般に、アナログーディジタルコンバータ(ADC)228に提供される。一方、DAC224及びADC228はコントローラ232に接続される。コントローラ232は、コントローラ232の一部として、又は個別のメモリーデバイス236としてメモリーに記憶された命令を実行するように動作可能なプロセッサを含みうる。たとえば、メモリー236に記憶された命令を実行するプロセッサは、試験ストリップ108に供給される電流を制御するプロセスを実行可能である。そのほかに、試験ストリップ108に供給される電流の量を記録し、試験ストリップ108の電極間の電圧電位の変曲点を検出し、そしてORP容量を計算するために、コントローラ232は、メモリー236に記憶された命令を実行可能である。メモリー236はまた、限定されるものではないが、中間及び／又は最終のORP値などのデータの記憶装置として機能しうる。コントローラ232は、たとえば、汎用のプログラマブルプロセッサもしくはコントローラ又は特別構成のアプリケーション集積回路(ASIC)を含みうる。

10

【0026】

ユーザーインターフェース124は、一般に、ユーザインプットをコントローラ232に提供するように動作する。そのほかに、ユーザーインターフェース124は、限定されるものではないが、リードアウトデバイス104又はシステム100全般の状態、sORP値、及びcORP値をはじめとする情報をユーザに表示するように動作可能である。

20

【0027】

リードアウトデバイス104はまた、一般に、電源240を含む。図には示されていないが、電源240は、一般に、電源バスを介して電力消費デバイスに相互接続される。電源240は、電池又は他のエネルギー貯蔵デバイス及び／又はライン電力に関連しうる。

【0028】

次に、図3を参照して、本開示の実施形態に従ってシステム100のさらなる特徴を示す。より特定的には、アナログフロントエンド220及び試験ストリップ108に関連する電気回路の詳細を示す。示されるように、リードアウト接点116は、電極リード又は接点120に相互接続してアナログフロントエンド220を試験ストリップ108に電気接続する。例示された実施形態では、アナログフロントエンド220は試験ストリップセンス回路304を含む。試験ストリップセンス回路304は、試験ストリップ検出サプライリード308及び試験ストリップ検出インプットリード312を含む。一般に、好適な試験ストリップ108がリードアウトデバイス104に作動的に接続される場合、試験ストリップ検出サプライリード308と試験ストリップ検出インプットリード312との間の連続性が確立されて試験ストリップ検出信号が可能になることから、試験ストリップ108がサプライリード308とインプットリード312との間を通過して存在することが示唆される。さらに、試験ストリップ108は、リードアウトデバイス104に相互連結された特定の試験ストリップ108の特性、たとえば、試験ストリップ108に組み込まれた参照セルの電圧値をリードアウトデバイス104に示すために試験ストリップ検出信号を調整するレジスター又は他のコンポーネントを組み込み可能である。試験ストリップ108の存在の感知に応答して、リードアウトデバイス104は、制御電流の形で問合せ信号を試験ストリップ108に提供するように動作可能である。

30

40

【0029】

電流は、対向電極リード316及び作用電極リード320を介して試験ストリップ108のサンプルチャンバー132にリードアウトデバイス104により提供される。より特定的には、電流は、電流フォロワー324のアウトプットから対向電極リード316に供給しうるとともに、電流フォロワー324へのインプットとして作用電極320を提供可能である。そのほかに、一セットの電流範囲選択レジスター328及び関連スイッチ332は、たとえば、相互接続試験ストリップ108の特性に依存して、コントローラ232により指示されてDAC224により制御可能である。そのほかに、DAC224は、コ

50

ントローラ 2 3 2 により指示されて電流フォロワー 3 2 4 へのインプットを制御し、ひいては電流電極リード 3 1 6 により試験ストリップ 1 0 8 に供給される電流の量を制御することが可能である。D A C 2 2 4 はまた、コントローラ 2 3 2 により指示されて、種々のスイッチ及び／又は増幅器を操作してアナログフロントエンド 2 2 0 の操作モードを制御することも可能である。

【0030】

アナログフロントエンド 2 2 0 は、参照電極リード 3 4 0 から第 1 のインプット信号を受け取りかつ作用電極リード 3 2 0 から第 2 のインプット信号を受け取る電位計 3 3 6 を追加的に含む。電位計 3 3 6 からのアウトプットは、一般に、参照電極リード 3 4 0 と作用電極リード 3 2 0 との間の電位差を表す。電位計 3 3 6 による信号出力は、利得回路 3 4 4 で増幅して A D C 2 2 8 に出力可能である。

10

【0031】

図 4 は、本発明の実施形態に従って試験ストリップ 1 0 8 の態様を示している。より特定のには、図 4 により提示された図は、試験ストリップオーバーレイ 1 3 6 を除去した状態で試験ストリップ 1 0 8 を示している。一般的には、試験ストリップ 1 0 8 は、作用電極 4 0 4 と参照電極 4 0 8 と対向電極 4 1 2 とを含む。そのほかに、試験ストリップ 1 0 8 は参照セル 4 1 6 を含む。流体サンプルをサンプルチャンバー領域 4 2 0 内に配置することにより、作用電極 4 0 4、参照電極 4 0 8、対向電極 4 1 2、及び参照セル 4 1 6 は互いに電気接触状態で配置される。さらに、対向電極 4 1 2、作用電極 4 0 4、及び参照電極 4 0 8 に対応する電極接点 1 2 0 を、対向電極リード 3 1 6、作用電極リード 3 2 0、及び参照電極リード 3 4 0 にそれぞれ対応するリードアウト接点 1 1 6 に接触させて配置することにより、試験ストリップ 1 0 8 はリードアウトデバイス 1 0 4 に作動的に接続される。したがって、試験ストリップ 1 0 8 に提供されるサプライ電流は、リードアウトデバイス 1 0 4 により流体サンプルを横切って対向電極 4 1 2 と作用電極 4 0 4 との間に送ることが可能である。さらに、参照電極 4 0 8 と作用電極 4 0 4 との間の電位差は、リードアウトデバイス 1 0 4 により感知可能である。本開示のさらなる実施形態によれば、試験ストリップ 1 0 8 は、インプット 4 2 8 とアウトプット 4 3 2 とを含む試験ストリップ検出回路 4 2 4 を含む。試験ストリップ検出回路 4 2 4 は、インプット 4 2 8 及びアウトプット 4 3 2 に加えて、リードアウトデバイス 1 0 4 により提供される試験ストリップセンス信号を調整して試験ストリップ 1 0 8 の識別をリードアウトデバイス 1 0 4 に示すべくレジスター又は他のコンポーネントを含む。

20

30

【0032】

c O R P 又は抗酸化剤保持量を測定するために、作用電極と参照電極との間の電圧をモニターしつつ対向電極と作用電極との間で酸化電流を線形増加させて作用電極で関連抗酸化剤を枯渇させることによりサンプルを滴定する。結果は、時間対電圧曲線及び時間対電流曲線である。時間対電圧曲線は、電圧が最も速く変化する変曲点を見いだすために使用される（抗酸化剤が枯渇するので系は新しい平衡を見いだそうとする）。最高速度（すなわち変曲点）の時間は遷移時間と呼ばれる。次に、容量又は c O R P は、開始から遷移時間までの電流プロファイルの積分であり、u C 単位を有する。

【0033】

遷移時間の計算は、ノイズフィルトレーション、カーブフィッティング、及び標準的数値微分技術をはじめとするいくつかの方法で達成しうる。通常、非フィルター数値微分はノイズが多いため、最大値を見いだすことは困難であるか又は信頼性がない。その目的のための技術の 1 つは、多項式（通常は 5 次～7 次で十分である）により時間対電圧プロファイルのカーブフィッティングを行って得られた多項式を解析的に直接微分することである。この方法は、非常に滑らかな導関数の利点を有するので、フィッティングが良好である限り遷移時間がロバストに決定される。

40

【0034】

図 5 は、本発明の実施形態に従って流体サンプルの O R P （限定されるものではないが c O R P を含む）を決定するためのシステム 1 0 0 の操作の態様を例示するフローチャー

50

トである。一般的には、この方法は、流体サンプルを取得する工程と、流体サンプルを試験ストリップ108のサンプルチャンバー420内に配置する工程（工程504）と、を含む。工程508では、試験ストリップ108はリードアウトデバイス104に接続される（工程508）。一般的には、リードアウトデバイス104がオンモード又はスタンバイモードにある間、電気信号は試験ストリップ検出アウトプットリード308により出力されうる。好適な試験ストリップ108をリードアウトデバイス104に接続することにより、試験ストリップ検出アウトプットリード308と試験ストリップ検出インプットリード312との間の連続性が確立される。そのほかに、試験ストリップ検出インプットリード312では受け取られた信号は、試験ストリップ108の特性の指標を提供可能であり、ひいてはこれを用いて試験ストリップ108に供給される電流の態様（たとえば電流範囲）を制御可能である。かかる特性としては、限定されるものではないが、試験ストリップ電極404、408、及び412のタイプ及び構成ならびに参照セル416の電位が挙げられうる。

【0035】

工程512では、電流は、リードアウトデバイス104により試験ストリップ108の対向電極412に供給可能である。より特定のには、電流は、対向電極リード316及び作用電極リード320により対向電極412と作用電極404との間に通すことが可能である。本開示の実施形態によれば、電流は、リードアウトデバイス104のコントローラ232により制御されて試験ストリップ108に供給される。より特定のには、電流は、選択された定常状態レベルで少なくとも第1の時間セグメントにわたり提供可能である。第1の時間セグメントは一定時間でありうる。代替的に、第1の時間セグメントは、参照電極408と作用電極404との間でリードアウトデバイス104により感知される電位差がある選択された量未満の変化率を有するとの決定が行われた後、失効しうる。さらに他の実施形態によれば、定常状態で電流を供給する時間を決定するためにパラメータの組合せを適用しうる。さらに、他の実施形態によれば、電流は第1の時間にわたり供給されない（すなわち、第1の時間セグメントの間に供給される電流はゼロである）。本開示の検討後の当業者であればわかるであろうが、電流が供給されない間かつその電位差の変化率がゼロであるか又はある選択された量未満である間、参照電極408と作用電極404との間でリードアウトデバイス104により測定される電位差は、流体サンプルのSORPに等しい。

【0036】

第1の時間セグメントが失効した後、電流は漸増速度で供給可能である（工程516）。たとえば、量は、異なるプロファイルの組合せに従って又は任意の他の方式で指数関数的にステップ関数として線形増加させることが可能である。たとえば、電流は、終点に達するまで指定速度で0アンペアから線形増加させることが可能である。他の例として、量は、0アンペアからゼロでないある値まで段階変化させることが可能であり、かつゼロでない値は、ある期間にわたり定常速度で提供可能であるか又はある関数に従って漸増速度で提供可能である。工程520では、決定は、参照電極408と作用電極404との間でモニターされた電位差の変曲点が検出されたかに関して行うことが可能である。より特定のには、参照電極リード340及び作用電極リード320は、参照電極408及び作用電極404をそれぞれ電位計336に接続し、参照電極408と作用電極404との間の電位差を表す信号を出力する。次いで、アナログーデジタルコンバータ228は、参照電極408と作用電極404との間の電位差を表す信号をコントローラ232に提供されるデジタル信号に変換する。変曲点が検出された場合、リードアウトデバイス104及びとくにコントローラ232は、電流が最初に供給された時間から変曲点に達成した時間までを記録可能である。そのほかに、コントローラ232は、電流信号を積分して、変曲点に達成した時間まで流体サンプルに供給された電荷量を決定可能である（工程524）。本開示の実施形態によれば、第1の変曲点（たとえば、電流を供給しつつ流体サンプルを横切って測定された電圧が極大変化率にある点）は、電流の積分を停止した点として使用される。しかしながら、測定された電圧に複数の変曲点が観測される可能性もある。した

がって、観測された第1の変曲点を積分終点としての使用するのではなく、後続の変曲点を使用可能である。さらに他の例として、複数の変曲点に対して決定される時間、たとえば、2つの観測された変曲点間の中点又は複数の観測された変曲点の平均時間は、流体サンプルのcORPを決定する目的での積分の終点として使用可能である。工程528では、決定された電荷量又は決定された電荷量から導かれる値は、たとえば、リードアウトデバイス104の一部として又はそれに相互接続して提供されるユーザーインターフェース124の出力デバイス128手段を介して流体サンプルのORP容量(cORP)値としてユーザに出力可能である。たとえば、cORP値は1を電荷量で除算したものととして定義可能である。次いで、プロセスを終了可能である。

【0037】

図6は、リードアウトデバイス104により相互接続試験ストリップ108に経時的に供給された線604として示される電流を表している。そのほかに、異なる例示的サンプルでサンプル測定された電位差値608a~cが表されている。本開示の検討後の当業者であれば分るように、3つの電位差値608が示されているが、電流604はORP値の決定時にただ1つの流体サンプルに提供される。同様に本開示の検討後の当業者であれば分るように、電流604の傾斜部分は、酸化電流を表すので下方向に傾斜して示されている。そのほかに、選択された時間にわたる電流曲線604とゼロの電流値との間の面積は、試験ストリップ108中に保持された流体サンプルに提供された電荷量を表すことが分かる。したがって、この電荷量は、流体サンプルのORP容量(cORP)の測定を提供するように使用可能である。さらに、電圧曲線608は、さまざまな時間点でそれぞれの流体サンプルの静的ORP(sORP)値を表している。cORPを決定するために使用される電流曲線604下の面積(それは曲線604の上側であり、その曲線と図6のゼロの電流との間である)は、第1の時間点の始点と第2の時間点の終点とを有しうる。例として、電流604の積分の始点は、観測されたsORP信号又は読み値が安定化した点として選択可能である。たとえば、図6の例では、電位差値は、50秒間経過した後で安定化された。さらに、この例では、電流は、電流が供給される始点になるまでの第1の時間セグメント時、リードアウトデバイス104によりサンプルに供給されていない。その始点はまた、電流604が漸増速度で印加され始める時間に対応可能である。本開示の実施形態によれば、曲線608が変曲点に達した場合(たとえば、測定された電位差の変化率が最大である点(すなわち、傾きが最大の点))、電流信号604の積分は停止される。たとえば、曲線608bを見ると、変曲点は約200秒間の時点で見ることが可能であり、それゆえ、電流604の積分は、50秒間で始まり200秒間で終わる時間時に実施可能である。代替的に、電流信号604の積分は、ある所定の時間後に停止が可能である。さらに他の選択肢として、電流信号604の積分は、変曲点の観測よりも早い時点又は所定の時間が失効した時点で停止可能である。

【0038】

本開示の検討後の当業者であれば分かるであろうが、sORP値の測定はボルト単位でありうるので、値604の電流信号の積分はクーロン単位の電荷量を表す値を与える。cORP値は、電荷量の尺度として、本明細書では1をクーロン単位の電荷量で除算したものととして表される。とくに、観測された電荷量の逆数をとることにより、より正規に近い分布が得られるので、観測されたORP値へのパラメトリック統計の適用が容易になる。本明細書で用いられる場合、ORP容量、逆容量レベル、逆容量ORP又はICLという用語はすべて、以上に定義されたcORPと等価である。1を電荷量で除算したものととしたcORPの表現が代替的な等価な表現を包含することは分かるであろう。

【0039】

以上に記載したように、sORP値が正常よりも高いことは酸化ストレスの指標となり、評価される被験体の否定的な指標であると一般に考えられる。cORPは、酸化傷害に耐える被験体の能力の尺度である。それゆえ、それは、一般に、被験体が酸化傷害に耐える能力が正常であるか又はそれよりも高いことを示す肯定的な指標である。cORPは電圧変曲点に達する電荷量の逆数として定義されるので、より高いcORP値は、酸化傷害

に耐える能力がより低いことを示唆し、同様に、より低い c O R P は、酸化傷害に耐える能力がより大きいことを示唆する。

【0040】

本発明は、患者の生物学的サンプルの O R P 特性を決定することにより、又はその生殖能（たとえば、妊性、受胎能など）に関して患者の健康をモニター又は評価する実施形態を含む。典型的には、患者の O R P 特性は、その患者に関連する 1 つ又は複数の O R P 特性参照値と比較される。本明細書で用いられる場合、参照値は、患者が対象の病態を有していなかった時点（たとえば、妊性であった時点）又は患者が対象の病態を有していたより初期の時点（病態のモニターもしくは評価又はその治療の目的で）での患者の O R P 特性でありうる。かかる参照値は自己参照値と呼ばれる。たとえば、参照値はまた、O R P 特性が時間枠にわたり評価されるときに初期、最大、及び終期の参照値、たとえば、患者が妊性であることが知られていた時点（初期）及び患者が低妊性又は不妊性であることが知られる時点（終期）での参照値を含みうる。代替的に、参照値は、関連健常集団（たとえば、種、年齢、性別、民族性などの 1 つ以上の特性が一致する妊性集団）の O R P 特性でありうる。かかる参照値は正常参照値と呼ばれる。さらに、参照値は、同じような患者である関連集団の O R P 特性でありうる（たとえば、患者として同一又は類似の病態（たとえば、低妊性又は不妊性）を有する集団であり、患者は治療中で、好適にはこの場合も種、年齢、性別、民族性などの 1 つ以上の特性が一致する）。かかる参照値は病態特異的参照値と呼ばれる。たとえば、病態特異的参照値は、低妊性もしくは不妊性の個体、インコンピテント卵子、又は低受精能を有する精子サンプルから取得した O R P 値でありうる。

10

20

【0041】

本明細書で用いられる場合、被験体は、生物学的サンプルが O R P 特性に関して試験される任意の個体である。被験体という用語は、被験体が医療専門家により治療される個体である場合は患者を含みうる。被験体及び患者という用語は、ヒト及び非ヒト動物、たとえば、伴侶動物（たとえば、ネコ、イヌ、ウマなど）及び家畜動物（すなわち、食品目的で飼育される動物、たとえば、ウシ、ヤギ、ニワトリなど）を含めて、任意の動物を意味しうる。好適な被験体としては、哺乳動物、最適にはヒトが挙げられる。

【0042】

本明細書で用いられる場合、卵子、卵母細胞、卵細胞などの用語は、まだ受精していない女性生殖細胞を意味するように同義的に用いられうる。同様に、精子及び精虫という用語は、男性生殖細胞を意味するように同義的に用いられうる。本開示によれば、精液、精液サンプルなどの用語は、当技術分野で用いられる標準的な意味を有する。すなわち、精液は、精虫を含む男性生殖流体及び精嚢に由来する流体及び前立腺や他の生殖腺に由来する流体である。

30

【0043】

本発明の種々の実施形態では、被験体の生物学的サンプルの O R P 特性が測定される。生物学的サンプルの O R P 特性の測定は、1 つ又は複数の時間点で実施可能である。かかる測定の頻度は、評価される病態に依存するであろう。たとえば、男性被験体の妊性の評価は単一の試験を必要としうる。これとは対照的に、女性被験体の妊性の評価は、たとえば、全月経周期にわたり定期的な試験を必要としうる。同様に、治療段階での卵子コンピテンス又は精子品質の決定は、定期的な試験を必要としうる。このため、たとえば、試験は、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、又は18時間ごとに実施可能である。代替的に、試験は、より慢性の病態に対して、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、又は1年ごとに実施可能である。

40

【0044】

本発明の種々の実施形態では、被験体の生物学的サンプルの O R P 特性は、精子品質の評価、卵細胞品質の評価、妊性の評価、着床のための卵細胞、接合体、又は胚の選択、受

50

精卵（たとえば、接合体、胚盤胞など）を女性に移した後の妊娠のモニターを目的として測定される。かかる実施形態では、この方法はまた、被験体において不妊性に対するリスク因子、たとえば、生活習慣又は遺伝的リスク因子を同定することを含みうる。

精子品質

受精に成功する重要な態様は、サンプル（たとえば精液サンプル）中の精虫の量及び品質である。それゆえ、妊性を評価する現在の方法は、正常な運動性（移動性）及び形態（形状）を有する精子細胞の数の計数ならびに精液の化学特性及び生化学特性（たとえば、pH、色、濁度、液化性、及び粘度）の評価を含む。しかしながら、精液の酸化状態が精子の品質に影響を及ぼすこともまた明らかになっている。たとえば、酸化ストレスはDNA断片化の主な原因であること（ライト（Wright）ら著、リプロダクティブ・バイオメディシン・オンライン（Reprod Biomed Online）、2014年6月、第28巻、第6号、p. 684～703；サレハ RA（Saleh RA）ら著、2003年6月、第7巻、補遺3、p. 1597～605）かつかかる断片化は従来の精液パラメータよりもさらに受精能の主要な指標であることが示されている。したがって、酸化ストレスを低減すれば精子品質が改善されうるとともに、その結果、受精に成功する可能性が向上しうる。それゆえ、本発明の一実施形態では、個体の精子品質は、個体のサンプルのORP特性を測定してORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価することにより決定される。測定されるORPはsORP及び／又はcORPでありうる。また、測定されたORP値を用いてORP／濃度（ORP／濃度）値（たとえば、mV／ 10^6 精子/mL）を決定可能である。次いで、この比較からサンプル及び／又は個体の受精能が決定される。かかる方法では、高受精能を有することが知られているサンプルのORP特性よりもORP特性が有意に増加した場合、サンプル又は個体は低受精能を有することが示唆される。同様に、低受精能を有することが知られているサンプルにORP値が類似している（ほぼ同じである）場合、試験サンプルは低受精能を有することが示唆される。本明細書で用いられる場合、とくに精虫に関して、受精能とは、卵子を受精させる個体の精虫の能力を意味する。かかる受精能は、精子が関与する受精の任意の態様、たとえば、女性生殖管を介する精子の移動、接触状態の卵子に精子が侵入する能力、卵子への精子細胞の進入と細胞分裂の開始を包含しうる。高受精能を有する精子は、女性生殖管を介する移動、卵子への侵入、ならびに細胞分裂及び胚発生のプロセスの開始に成功しうる。好適な実施形態では、サンプルは新たに採取されたサンプルである。

【0045】

考察したように、ORPは、精液又は精漿のサンプルの品質及び受精能を決定するために使用可能である。精子品質及び受精能は、卵子を受精して胚発生を開始させる精子細胞の能力に関連することが知られている任意の精虫特性に関連付け可能である。かかる特性の例としては、限定されるものではないが、射精液（すなわち精液）の粘度、射精液の液化能、射精液中の精子細胞の全数、射精液中の精子細胞の濃度、精子細胞の全体的運動性、精子細胞の前進運動性、及び精子細胞の形態が挙げられる。異常特性は、増加したORP値の存在により同定可能である。それゆえ、本発明の一実施形態では、個体の精子品質は、個体のサンプルのORP特性を測定してORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価することにより決定される。参照ORP値及びカットオフ値に関して本明細書で用いられる場合、有意差などの用語は、少なくとも10%、少なくとも15%、又は少なくとも20%の差を意味する。参照ORPが特定のカットオフ値である場合、四捨五入時にカットオフ値を超える値はいずれも、有意であるとみなされる。たとえば、カットオフ値が1.0である場合、測定されたORP値が1.06であれば四捨五入して1.1であり、有意であるとみなされよう。さらに、測定されたORP値が1.04であれば四捨五入して1.0であり、有意であるとみなされないであろう。一実施形態では、個体の精子の受精能は、個体のサンプルのORP特性を測定してORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価することにより決定される。一実施形態では、測定されたORP値が参照ORP値よりも有意に高い合、試験精子サンプルは低受精能を有すると称される。一実施形態では、測定されたORP値が参照ORP値とほぼ同一である

場合、試験精子サンプルは高受精能を有すると称される。

【0046】

本発明の一実施形態は、被験体のサンプル中の精子細胞の数が正常範囲内（したがって妊性範囲内）であるかを決定する方法であり、本方法は、サンプルのORP特性を測定する工程と、測定されたORP値と、サンプル中の精子細胞の数の予測因子となると決定された1つ以上の参照ORP値（たとえばカットオフ値）と、を比較する工程と、比較の結果を用いて、測定されたサンプル中の精子細胞の数が正常範囲内にあるかを決定する工程と、を含む。たとえば、精液又は精漿のサンプルから取得したORP値は、精子細胞の正常数の予測因子となると決定されたORPカットオフ値又はORP値の範囲と比較可能である。測定値が、精子細胞の正常数の予測因子となると決定されたORP値の範囲とほぼ同じもしくはそれ未満であるか又はその範囲内もしくはそれとほぼ同じである場合、サンプルは、正常数の精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、妊性であるか又は良好な受精能（良品質）を有するものとみなされよう。測定されたORP値がカットオフ値よりも有意に大きい又は精子細胞の正常数の予測因子となると決定されたORP値の範囲から有意に外れる場合、測定サンプルは、異常数（たとえば、少なすぎる）の精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、不妊性であるか又は不十分な受精能（低品質）を有するものとみなされよう。

10

【0047】

本発明の一実施形態は、被験体のサンプル中に精子細胞の濃度が正常濃度範囲内であるか（したがって、妊性濃度範囲内であるか）を決定する方法であり、本方法は、サンプルのORP特性を測定する工程と、測定されたORP値と、精子細胞濃度の予測因子となると決定された1つ以上の参照ORP値（たとえば、カットオフ値）と、を比較する工程と、比較の結果を用いて、測定されたサンプル中の精子細胞の濃度が正常範囲内にあるかを決定する工程と、を含む。たとえば、精液又は精漿のサンプルから取得したORP値は、精子細胞の正常濃度の予測因子となると決定されたORPカットオフ値又はORP値の範囲と比較可能である。測定値が、精子細胞の正常濃度の予測因子となると決定されたORP値の範囲内もしくはそれとほぼ同じである場合、サンプルは、正常濃度の精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、妊性であるか又は良好な受精能（良品質）を有するものとみなされよう。測定されたORP値がカットオフ値よりも有意に大きい又は精子細胞の正常濃度の予測因子となると決定されたORP値の範囲から有意に外れる場合、測定サンプルは、異常濃度の精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、不妊性であるか又は不十分な受精能（低品質）を有するものとみなされよう。

20

30

【0048】

本発明の一実施形態は、精液又は精漿のサンプルが正常パーセントの全運動性精子細胞を有する（したがって、妊性であるとみなされる）かを決定する方法であり、本方法は、サンプルのORP特性を測定する工程と、測定されたORP値と、正常パーセントの全運動性精子細胞の予測因子となると決定された1つ以上の参照ORP値（たとえばカットオフ値）と、を比較する工程と、比較の結果を用いて、測定されたサンプル中の全運動性精子細胞のパーセントが正常範囲内にあるかを決定する工程と、を含む。たとえば、精液又は精漿のサンプルから取得したORP値は、正常パーセントの全運動性精子細胞の予測因子となると決定されたORPカットオフ値又はORP値の範囲と比較可能である。測定値が、正常パーセントの全運動性精子細胞の予測因子となると決定されたORP値の範囲とほぼ同じもしくはそれ未満であるか又はその範囲内もしくはそれとほぼ同じである場合、サンプルは、正常パーセントの全運動性精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、妊性であるか又は良好な受精能（良品質）を有するものとみなされよう。測定されたORP値がカットオフ値よりも有意に大きい又は正常パーセントの全運動性精子細胞の予測因子となると決定されたORP値の範囲から有意に外れる場合、測定サンプルは、異常パーセント（たとえば、少なすぎる）の全運動性精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、不妊性であるか又は不十分な受精能（低品質）を有するものとみなされよう。

40

50

【0049】

本発明の一実施形態は、精液又は精漿のサンプルが正常パーセントの前進運動性精子細胞を有する（したがって、妊性であるとみなされる）かを決定する方法であり、本方法は、サンプルのORP特性を測定する工程と、測定されたORP値と、正常パーセントの前進運動性精子細胞を有するサンプルの予測因子となると決定された1つ以上の参照ORP値（たとえばカットオフ値）と、を比較する工程と、比較の結果を用いて、測定されたサンプル中の前進運動性精子細胞のパーセントが正常範囲内にあるかを決定する工程と、を含む。たとえば、精液又は精漿のサンプルから取得したORP値は、正常パーセントの前進運動性精子細胞を有するサンプルの予測因子となると決定されたORPカットオフ値又はORP値の範囲と比較可能である。測定値が、正常パーセントの前進運動性精子細胞を有するサンプルの予測因子となると決定されたORP値の範囲とほぼ同じもしくはそれ未満であるか又はその範囲内もしくはそれとほぼ同じである場合、サンプルは、正常パーセントの前進運動性精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、妊性であるか又は良好な受精能（良品質）を有するものとみなされよう。測定されたORP値がカットオフ値よりも有意に大きいか又は正常パーセントの前進運動性精子細胞の予測因子となると決定されたORP値の範囲から有意に外れる場合、測定サンプルは、異常パーセント（たとえば、少なすぎる）の前進運動性精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、不妊性であるか又は不十分な受精能（低品質）を有するものとみなされよう。

【0050】

本発明の一実施形態は、精液又は精漿のサンプルが健常形態を有する正常パーセントの精子細胞を有する（したがって、妊性であるとみなされる）かを決定する方法であり、本方法は、サンプルのORP特性を測定する工程と、測定されたORP値と、健常形態を有する正常パーセントの精子細胞を有するサンプルの予測因子となると決定された1つ以上の参照ORP値（たとえばカットオフ値）と、を比較する工程と、比較の結果を用いて、測定されたサンプル中の健常形態を有する精子細胞のパーセントが正常範囲内にあるかを決定する工程と、を含む。たとえば、精液又は精漿のサンプルから取得したORP値は、正常パーセントの精子細胞が健常形態を有するサンプルの予測因子となると決定されたORPカットオフ値又はORP値の範囲と比較可能である。測定値が、正常パーセントの精子細胞が健常形態を有するサンプルの予測因子となると決定されたORP値の範囲とほぼ同じもしくはそれ未満であるか又はその範囲内もしくはそれとほぼ同じである場合、サンプルは、健常形態を有する正常パーセントの精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、妊性であるか又は良好な受精能（良品質）を有するものとみなされよう。測定されたORP値がカットオフ値よりも有意に大きいか又は正常パーセントの精子細胞が健常形態を有するサンプルの予測因子となると決定されたORP値の範囲から有意に外れる場合、測定サンプルは、健常形態を有する異常パーセント（たとえば、少なすぎる）の精子細胞を有すると称される。それゆえ、サンプルは、不妊性であるか又は不十分な受精能（低品質）を有するものとみなされよう。本明細書で用いられる場合、健常形態という用語は、精子が卵子を受精させるように適切な物理的特性を有する精子細胞を意味する。かかる特性の例としては、限定されるものではないが、精虫の頭の平滑性、精虫の頭の形状、精虫の頭のサイズ、アクロソームのサイズ及び定義、頭又は尾の液胞の存在又は不在、尾の長さ、尾の欠損（たとえば、分裂又は二分された尾）及び精虫を適正に前進させる尾の能力の存在又は不在が挙げられる。精子細胞が卵子を受精させるのに適した物理的特性は当業者に公知である。

【0051】

以上に記載したように、本明細書に開示される方法は、高受精能を有する精子サンプルと低受精能を有するサンプルとを識別するのに有用である。その結果、本発明の方法はまた、卵子の受精に成功するために追加の工程又は治療がサンプルに必要とされるかを決定するのに有用である。それゆえ、ある特定の実施形態では、サンプルが良好な受精能を有することを決定した後、サンプル又は被験体は、サンプル又は被験体が卵子の受精に成功するためにさらなる治療を必要としないものとして指定することが可能である。ある特定

の実施形態では、サンプルが不十分な受精能を有することを決定した後（たとえば、少なすぎる精子細胞、低すぎる精子細胞濃度、不十分な運動性、劣悪で不健康又は異常な形態などに起因して）、サンプル又はサンプルを取得した被験体は、卵子の受精に成功するためにさらなる処理又は治療を必要とするものとして指定することが可能である。かかる指定は、医療専門家（たとえば、医者、医師助手、ナースプラクティショナー、又は検査技師）により実施可能であるか、又は比較の結果の決定後もしくは受領後に有用な治療のプロセスもしくはコースを決定するように（比較の結果と関連付けるように）プログラムされているコンピュータなどのデバイスにより決定可能である。受精に成功する可能性を増加させるのに有用な治療のプロセス及び方法は当業者に公知である。ある特定の実施形態では、個体、又は被験体（たとえば患者）に対して決定を行うか又は決定の結果を報告する任意の個体関連施設（たとえば、病院、クリニック、診療所など）はまた、有用な治療のプロセス又はコースを施しうる。ある特定の実施形態では、個体又は任意の個体関連施設（たとえば、病院、クリニック、診療所など）は、さらなる処理又は治療のためにサンプル又は被験体（たとえば患者）を第２の関係者又は施設（たとえば不妊治療クリニック）に回すことが可能である。本発明の一実施形態は、被験体の精子サンプルが卵子を受精させる能力を決定するためのシステムであり、本システムは、

10

本発明のサンプルのORP値を測定するための本発明の第１のデバイスと、

コンピュータ可読媒体に記憶されたコンピュータ命令セットと中央処理ユニット（CPU）とを含む第２のデバイスであって、コンピュータ命令がCPUにより実行可能である、第２のデバイスと、

20

を含み、第１のデバイスは、第１のデバイスからORP値を受け取ることが可能であり、かつ第１のデバイスからORP値を受け取ったら、第２のデバイスは、サンプルの品質又は受精能を決定する。一実施形態では、第１及び第２のデバイスは、第１のデバイスで測定されたORP値を第２のデバイスに転送可能な電気コンポーネントにより物理的に接続される。ある特定の実施形態では、電気コンポーネントは、ワイヤー、ケーブル、又はバスである。一実施形態では、品質又は受精能の決定は、測定されたORP値と、本明細書に開示されたように第１又は第２のデバイスに記憶されたカットオフORP値又はORP値の範囲と、を比較することにより行われる。さらなる実施形態では、サンプルの品質又は受精能の決定後、第２のデバイスは、サンプル又は被験体の品質又は受精能を高めるのに有用なプロセス又は治療を決定し、任意選択的に出力する。

30

【0052】

本開示によれば、参照ORP値又は値の範囲は、関連する品質、受精能、及び／又は他の特定の特徴（たとえば、精子細胞数、精子細胞濃度、運動性、形態）が経験的に決定されている任意のsORP値又は値の範囲でありうる。したがって、たとえば、参照sORP値又は値の範囲は、品質が低い、受精能が低い、精子細胞数が少ない、精子細胞濃度が低い、正常運動性を有する精子細胞のパーセントが低い、又は正常形態を有する精子細胞のパーセントが低いサンプルから得られうる。代替的に、参照sORP値又は値の範囲は、品質が高い、受精能が高い、精子細胞数が正常である、精子細胞濃度が正常である、正常運動性を有する精子細胞のパーセントが正常である、又は正常形態を有する精子細胞のパーセントが正常であるサンプルから得られうる。参照値は、試験サンプルのsORP値と同時に取得可能であるか、又は過去の参照sORP値（すなわち、以前の一群の臨床及び／又は実験データから取得したもの）でありうる。当業者であれば適切な参照sORP値を同定して適用することが可能である。

40

【0053】

参照sORPの一例は、妊性精子（すべての精液パラメータに関して正常値を達成するサンプル）と非妊性精子（１つ以上のパラメータが不合格のもの）を区別可能なカットオフ値である。本発明を特定の開示に限定しようとするものではないが、かかるカットオフ値の一例は本明細書に開示されている。それゆえ、本発明の一実施形態は、精子サンプルが妊性であるか又は不妊性であるかを決定する方法であり、本方法は、サンプルのsORP又はsORP／濃度を決定する工程と、測定されたsORP値又はsORP／濃度値と

50

カットオフ値とを比較する工程と、を含む。一実施形態では、カットオフ値は約 $1.635 \text{ mV} / 10^6 \text{ 細胞} / \text{mL}$ である。かかる臨床値が試験又は日によってわずかに変化することは、当業者であれば分かるであろう。それゆえ、「約」という用語に関して、当業者であれば約という用語にどの程度の変動が包含されるかを決定できよう。一般的には、かかる変動は1%、2%、3%、4%、又は5%である。一実施形態では、約 $1.635 \text{ mV} / 10^6 \text{ 細胞} / \text{mL}$ 未満の s O R P / 濃度値を有する精子サンプルは、妊性であるものとして同定される。一実施形態では、約 $1.635 \text{ mV} / 10^6 \text{ 細胞} / \text{mL}$ 超の s O R P / 濃度値を有する精子サンプルは、不妊性であるものとして同定される。

【0054】

参照 s O R P の第2の例は、正常精子形態を有する精液と異常精子形態を有するものとを区別可能なカットオフ値である。本発明を特定の開示に限定しようとするものではないが、かかるカットオフ値の一例は本明細書に開示されている。それゆえ、本発明の一実施形態は、精子サンプルが正常形態の精子を有するか又は異常形態のものであるかを決定する方法であり、本方法は、サンプルの s O R P 又は s O R P / 濃度を決定する工程と、測定された s O R P 値又は s O R P / 濃度値とカットオフ値とを比較する工程と、を含む。一実施形態では、カットオフ値は約 $3.29 \text{ mV} / 10^6 \text{ 精子} / \text{mL}$ である。かかる臨床値が試験又は日によってわずかに変化しうことは、当業者であれば分かるであろう。それゆえ、「約」という用語に関して、当業者であれば約という用語にどの程度の変動が包含されるかを決定できよう。一般的には、かかる変動は1%、2%、3%、4%、又は5%である。一実施形態では、約 $3.29 \text{ mV} / 10^6 \text{ 精子} / \text{mL}$ 未満の s O R P 値を有する精子サンプルは、正常精子形態を有するものとして同定される。一実施形態では、約 $3.29 \text{ mV} / 10^6 \text{ 精子} / \text{mL}$ 超の s O R P 値を有する精子サンプルは、異常精子形態を有するものとして同定される。

【0055】

個体の s O R P 特性は、限定されるものではないが、血液、血漿、血清、唾液、C S F、尿、陰茎分泌物（陰茎スワブを含む）、精液、精漿（たとえば、精虫を除いた精液）、又は前立腺液をはじめとする被験体の任意の生物学的サンプルから便利にかつ適時に取得しうる。被験体の s O R P はまた、被験体の組織からも取得しうる。サンプルが精液である実施形態では、サンプルは、さらなる処理、たとえば、精虫を除去して精漿を残す処理に付しうるが、その必要があるとは限らない。一実施形態では、精虫を精液から分離して分離された細胞の O R P を決定することが可能である。

【0056】

限定されるものではないが、個体の s O R P 特性の傾向を経時的に決定するために、生物学的サンプルを作製する物理的拘束によってのみ限定されて好適な間隔で個体の O R P 特性をチェックしうる。たとえば、O R P 特性は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、又は1年ごとにチェックしうる。

【0057】

試験個体は、関連分野で標準的な定義を用いて決定したときに不妊性であるものとしてすでに決定されたものでありうる。代替的に、試験前の個体の妊性状態は未知でありうる。

【0058】

関連実施形態では、受精能に関して分析される精子サンプルは保存サンプルでありうる。かかるサンプルは生殖生物学の分野で周知である。さらに、精虫は通常は極低温で保存されかつかかる保存はグリセロールやジメチルスルホキシドなどの凍結保護剤の使用を必要とすることが分かっている。最近の証拠から、異なる凍結保護剤は保存精虫のすぐ周りの環境に異なる影響を及ぼしかつ保存環境は保存サンプルの受精能に影響を及ぼしうることを示唆される。それゆえ、一実施形態では、サンプル中の精子の受精能を評価するために、精虫の保存サンプルの s O R P 特性が決定される。サンプルは精液サンプルでありうるか、又は保存前にさらなる処理（たとえば、遠心分離、洗浄、緩衝剤添加、凍結保護剤

添加、抗酸化剤添加など）が行われた精液サンプルでありうる。一実施形態では、s O R P特性は、精子の生存能及び／又は受精能に及ぼす種々の保存条件の影響を測定するために使用される。ある特定の実施形態では、保存条件は、たとえばアスコルビン酸や α -トコフェロールなどの抗酸化剤の添加により変化させる。

卵子品質

精子品質は受精（受胎）に成功するうえで重要であるが、受精卵子の品質も同じように重要である。卵子品質とは、卵子（卵細胞）の物理的特性及び受精して妊娠の成立及び維持に成功する能力との関係を意味する。本明細書で用いられる場合、妊娠の成功とは、胎児が母親の子宮外で生存できるように妊娠が十分に長く継続することを意味する。現在、卵子品質は、卵巣が複数の卵子の熟成及び放出を引き起こすホルモンの注射を必要とする経腔卵母細胞回収により採取された卵母細胞の目視検査により決定される。上述した目視検査は、透明帯の均一性及び厚さ、卵細胞質の色及び均一性、空胞化の程度（液胞の存在又は不在）などを含む。しかしながら、卵細胞の酸化状態及びその環境は、卵細胞が受精して妊娠の成立及び維持に成功する能力に影響を及ぼしうることが当該分野で分かっている（たとえば、アガーワル（Agarwal）著、リプロダクティブ・バイオロジー・アンド・エンドクリノロジー（Reproductive Biology and Endocrinology）、2005年、第3巻、p. 28を参照されたい）。それゆえ、本発明の一実施形態では、個体の卵子のコンピテンスは、個体のサンプルのO R P特性を測定してO R P特性が参照O R P値のO R P特性と有意に異なるかを評価することにより決定される。次いで、この比較から卵子及び／又は個体のコンピテンシーが決定される。かかる方法では、高いコンピテンシーを有することが知られているサンプルのO R P特性よりもO R P特性が増加した場合、サンプル又は個体の受精の確率又は妊娠の成立もしくは維持の確率が低いことが示唆される。同様に、低いコンピテンシーを有することが知られているサンプルのO R P特性に類似したO R P特性である場合、試験サンプル又は個体の受精の確率又は妊娠の成立もしくは維持の確率が低いことが示唆される。さらに、高いコンピテンシーを有することが知られているサンプルのO R P特性に類似したO R P特性である場合、試験サンプル又は個体の受精の確率又は妊娠の成立もしくは維持の確率が高いことが示唆される。

【0059】

本発明によれば、コンピテンシーとは、卵子の受精の能力又は生存可能な妊娠の成立及び維持の能力を意味する。このため、コンピテント卵子は、精虫により受精可能であり、適切に分裂可能であり、二倍体状態を維持可能であり、子宮の内膜に移植可能であり、かつ少なくとも胎児発生段階に進行可能である。これとは対照的に、インコンピテント卵子は、以上に列挙したステップの少なくとも1つを終了できない。インコンピテント卵子の受精は、多くの場合、胎児発生段階の前に自然妊娠中絶をもたらす。

【0060】

個体のO R P特性は、被験体の生物学的サンプル、たとえば、限定されるものではないが、血液、血漿、血清、唾液、C S F、尿、腔分泌物、又は卵胞液から便利にかつ適時に取得しうる。被験体のO R Pはまた、被験体の組織からも取得しうる。

【0061】

ある特定の状況下では（たとえばI V F）、さらなる使用の前に卵母細胞を培養可能であることは、当業者であれば分かるであろう。それゆえ、ある特定の実施形態では、O R Pが取得されるサンプルは、卵母細胞が培養される培地でありうる。かかる実施形態では、培地のO R Pは、培養前、培養時、及び培養の指定時間後に決定可能であり、そしてO R Pを適切な参照値と比較可能である。かかる実施形態では、高いコンピテンシーを有することが知られているサンプルのO R P特性と比較してO R P特性が増加した場合、卵子の受精の確率又は妊娠の成立もしくは維持の確率が低いことが示唆される。

【0062】

関連実施形態では、試験培地は、極低温保存、解凍、及び培養が行われた卵子に由来しうる。かかるサンプルは生殖生物学の分野で周知である。さらに、極低温保存はグリセロ

ールやジメチルスルホキシドなどの凍結保護剤の使用を必要とすることが分かっている。最近の証拠から、ある特定の凍結保護剤は保存細胞に影響を及ぼしうることが示唆される。それゆえ、本発明の方法はまた、卵子コンピテン스에及ぼす保存の影響を決定するために及びかかる保存に有用な方法及び組成物を同定するために使用可能である。一実施形態では、ORP特性は卵子コンピテン스에及ぼす種々の保存条件の影響を測定するために使用される。ある特定の実施形態では、保存条件は、たとえばアスコルビン酸や α -トコフェロールなどの抗酸化剤の添加により変化させる。

【0063】

限定されるものではないが、個体のORP特性の傾向を経時的に決定するために、好適な間隔で個体のORP特性をチェックしうる。たとえば、ORP特性は、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、又は18時間ごとにチェックしうる。代替的に、試験は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週、2週、3週、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、又は1年ごとに実施可能である。

【0064】

個体は、関連分野で標準的な定義を用いて決定したときに不妊性であるものとしてすでに決定されたものでありうる。同様に、個体の卵子のコンピテンシーは、他の方法を用いてすでに決定されたものでありうる。代替的に、個体の妊性状態又は個体の卵子のコンピテンシーは、試験前、未知でありうる。

妊性／不妊性の治療

精子品質又は卵子品質の低下は、個体の妊性の全体的低下として現われうる。かかる低下は低妊性又は不妊性でありうる。本発明の一実施形態は、妊性が低下した個体を同定する方法であり、本方法は、個体のサンプルのORP特性を測定する工程と、ORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価する工程と、を含む。次いで、この比較から個体の受精能が決定される。かかる方法では、妊性であることが知られている個体のサンプルのORPよりもORPが増加した場合、試験個体の妊性が低下していることが示唆される。

【0065】

本明細書で用いられる場合、低妊性とは、受胎が不可能ではないがその見込みが低い病態を個体が有していることを意味する。それゆえ、低妊性とは、長期間の望ましくない非受胎状態を有する妊性の低下した任意の形態を意味する。たとえば、PCOSでない女性と比較して生殖ホルモンのバランスが崩れている多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）の女性は、低妊性であるとみなされる。かかる女性は妊娠しうるが、通常、PCOSでない女性よりも長期間を要する。本明細書で用いられる場合、不妊性という用語は、避妊手段をとらずに12ヶ月間の性交渉を行った後でうまく妊娠に至らない個体を意味する。かかる用語は生殖医学分野の当業者には理解されている。

【0066】

低妊性及び不妊性は、さまざまな因子が原因で生じうる。以上で考察したように、低妊性又は不妊性は低品質の精子又は卵子が原因でありうる。しかしながら、他の因子もまた妊性に影響を及ぼしうる。たとえば、男性では、低妊性又は不妊性の理由として、限定されるものではないが、感染症、下垂体もしくは精巣のホルモンの問題、精巣傷害もしくは精巣不全、血精液症、癌治療（たとえば、化学療法、放射線療法など）、抗精子抗体（たとえば、精管切除もしくは傷害の後）、又は薬物使用（たとえば、タバコ、マリファナなど）が挙げられる。女性では、低妊性又は不妊性の理由として、限定されるものではないが、感染症、子宮もしくは卵管の癒痕化、子宮内膜症、嚢腫、類線維腫、子宮頸もしくは子宮の損傷（たとえば、D & Cなどの手術後）、ホルモンの問題、頸管粘液の異常、抗精子抗体、癌治療、甲状腺の問題、ストレス、又は薬物使用（たとえば、タバコ、マリファナなど）が挙げられる。

【0067】

低妊性及び不妊性という用語が受胎までの期間に基づく臨床的定義であることは、当業

者であれば理解されよう。その結果、かかる診断は相対的に見て異なることもありうる。たとえば、低妊性と診断された個体又はカップルは、後になって不妊性と診断されることもありうる。代替的に、不妊性と診断された個体又はカップルは、後になって低妊性と診断されることもありうる。対応するORPの変化もさまざまな程度になることは、当業者であれば理解されよう。たとえば、低妊性の個体のサンプルは、妊性の個体のサンプルのORPと比較して高いORPを有するであろうと予想される。さらに、不妊性の個体のサンプルのORPは、妊性の個体で観測されるものよりも高いだけでなく、低妊性の個体で観測されるものよりも高いこともありうる。それゆえ、ある特定の実施形態では、ORP値の増加の程度は妊性のレベルに対して直接的逆相関になることは明らかであろう。したがって、決定されたORP値は、妊性、低妊性、及び不妊性の個体に対応する過去のORP値の十分に確立されたセットと比較することが重要である。

10

【0068】

本発明の方法はまた、個体が受胎（すなわち、卵子の受精）を達成できる可能性を決定するためにも使用可能である。かかる情報は、受胎を達成する際の医療補助の必要性を決定するうえで有用である。それゆえ、本発明の一実施形態は、個体が受胎できる可能性を決定する方法であり、本方法は、個体のサンプルのORP特性を測定する工程と、ORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価する工程と、を含む。次いで、この比較から個体が受胎できる可能性が決定される。かかる方法では、医学的介入なしで受胎できることが知られている個体又は個体のプールのORP特性よりもORP特性が増加した場合、個体は受胎して妊娠を維持できる確率が低いことが示唆される。それゆえ、かかる情報は妊娠を達成する際の医療補助の必要性を決定するうえで非常に貴重である。一実施形態は、子供の受胎に関して医療補助が奏効すると思われる個体を同定する方法であり、本方法は、個体のサンプルのORP特性を測定する工程と、ORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価する工程と、を含む。次いで、この比較から受胎に関して医療補助が奏効する個体の可能性が決定される。かかる方法では、医学的介入なしで子供を受胎できることが知られている個体又は個体のプールのORP特性よりもORP特性が増加した場合、個体は受胎及び妊娠の維持に関して医療補助が奏効するであろうことが示唆される。これとは対照的に、医療補助なしで受胎できることが知られている個体のサンプルのORP特性に類似したORP特性である場合、試験個体は医療補助が奏功する見込みがないであろうことが示唆される。

20

30

【0069】

本発明の一実施形態は、妊娠を達成するための治療計画を決定する方法であり、本方法は、個体のサンプルのORP特性を測定する工程と、ORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価する工程と、を含む。かかる方法では、医療補助なしで受胎できることが知られている個体又は個体のプールのサンプルで観測された値とORP値が実質的に同一の場合、試験個体は低下した妊性に対する治療が奏功する見込みがないと診断される。代替的に、医療補助なしで受胎できることが知られている個体又は個体のプールのサンプルのORP値よりも試験サンプルのORP値が有意に高い場合、試験個体は低下した妊性に対する治療が奏効する見込みがあると診断される。

【0070】

個体の不妊性を治療するための方法が存在することは当技術分野で公知である。たとえば、低い精子品質は、たとえば、レスベラトロールやアスコルビン酸などの抗酸化剤の摂取により改善可能であることが当該分野で分かっている。それゆえ、一実施形態では、個体において精子品質、低妊性、及び／又は不妊性を治療する有効性は、個体のサンプルのORP特性を測定することによりモニターされる。かかる実施形態でのORP特性の測定は、治療前に、ならびに治療時及び治療後に好適な間隔で、達成しうる。かかる実施形態では、改善された精子品質をもたらす治療はまた、ORP値の減少をもたらすであろうことが期待されよう。その結果、ORP値を低下させ治療に失敗した場合又はORP値が増加した場合、治療は有効でなく再評価されるべきであることが示唆される。かかる再評価は、たとえば、投与量の増加、治療の中断、及び／又は新しい治療剤もしくは補助治療剤

40

50

の投与を含む。

体外受精（IVF）

精子品質、卵子品質、及び一般的な妊性を評価するために、本発明の方法の使用についてこれまで説明してきた。かかる方法を体外受精に関する特定の用途にも使用可能であることは、当業者には自明なはずである。体外受精のプロセスでは、卵巢は、2つ以上の卵子が成熟して放出されるようにホルモンで刺激される。放出された卵子（卵母細胞）は、採取され、培養培地中に維持され、そして最も有望なもの（すなわち、最もコンピテントなもの）は、採取されたサンプルから取得した精子と接触させることにより受精させる。次いで、受精卵（接合体）は、典型的には、さらに2日間（卵割期）～5日間（胚盤胞期）培養され、その時点で最も有望な接合体（又は胚盤胞）は、レシピエントの子宮に移され、そこで移植片は成長し続ける。この簡単な説明から、精子の品質の評価に加えて、本発明の方法を利用可能ないくつかの他の点がIVFプロセスに存在することが分かる。たとえば、先に記載したように、本発明の方法は、採取した卵子のコンピテンシーを決定するために使用可能である。

【0071】

本発明の一実施形態は、受精卵の品質を評価する方法であり、本方法は、受精卵が培養された培地のサンプルのORP特性を測定する工程と、ORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価する工程と、を含む。次いで、この比較から受精卵の品質が決定される。かかる方法では、高品質を有することが知られている卵子のサンプルのORP特性よりもORP特性が増加した場合、試験受精卵は低品質を有し妊娠の成立又は維持に成功する見込みがないことが示唆される。同様に、低品質を有することが知られている受精卵のサンプルのORP特性に類似したORP特性の場合、試験受精卵は妊娠の成立又は維持に成功する見込みがないことが示唆される。これとは対照的に、高品質を有することが知られている受精卵のサンプルのORP特性に類似したORP特性の場合、試験受精卵は妊娠の成立及び維持に成功する見込みがある。一実施形態では、試験受精卵は接合体である。一実施形態では、受精卵は胚盤胞である。

【0072】

限定されるものではないが、培養卵子のORP特性の傾向を経時的に決定するために、好適な間隔で培養培地のORP特性をチェックしうる。たとえば、ORP特性は、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、又は18時間ごとにチェックしうる。代替的に、試験は、1日、2日、又は3日ごとに実施可能である。

【0073】

本発明の一実施形態は、受精卵が妊娠の成功に至る可能性を改善する方法であり、本方法は、受精卵が培養される培地のサンプルのORP特性を測定する工程と、ORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるか及びORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価する工程と、培養培地を処理して受精卵のORP特性を改善する工程と、を含む。かかる実施形態では、培養受精卵の処理は、培養培地を処理して（たとえば抗酸化剤を用いて）培地のORP特性を改善する工程又は医薬化合物で卵子を処理して卵子の品質を改善する工程を含む。

【0074】

卵子品質の低下は、受精卵が妊娠の成立及び維持に成功する可能性を低下させるので、本発明の方法は、受精卵が妊娠の成立に成功する可能性を改善するために使用可能である。それゆえ、本発明の一実施形態は、受精卵が妊娠の成立に成功する可能性を改善する方法であり、本方法は、個体のサンプルのORP特性を測定する工程と、ORP特性が参照ORP値のORP特性と有意に異なるかを評価する工程と、を含む。次いで、この比較から受精卵を移す最適時間が決定される。かかる方法では、ORP特性が所定のORP閾値又はカットオフ値を超えて増加した場合、受精卵を子宮内に移す時間であることが示唆される。閾値ORP値はあるORP値を表し、この値を超えると、妊娠の成立及び維持に成功する可能性は、閾値以下のORP値で観測された妊娠の成立及び維持に成功する可能性と比較して、有意に低下する。閾値ORPは、たとえば、受精卵を移すときの以前の成

功又は失敗から得られた過去のORPデータから決定可能である。

妊娠／胎児の健康

妊娠は、胎盤ミトコンドリア活性の増加及び反応性酸素種の生成から生じる長期間の酸化ストレス状態である。ROSの過剰生成は、胎盤発生時ならびに病的妊娠時、たとえば、子癰前症及び／又はIUGRを伴う病的妊娠時、ある特定のウィンドウで起こりうるとともに、抗酸化防御を圧倒して有害なアウトカムを生じる。たとえば、妊娠初期では、絨毛間腔内への血流の確保は酸化ストレスのバーストを伴う。これに対抗する有効な抗酸化防御を開始できないと初期妊娠損失を生じるおそれがある。酸化ストレスは妊娠中期までにピークに達し、胎児の健康及び妊娠の進行の易損期と思われる時期を終える。妊娠後期、糖尿病、IUGR、及び子癰前症を伴う妊娠で酸化ストレスの増加が見られることもある。

10

【0075】

本発明の他の実施形態は、被験体の生物学的サンプルのORP特性を測定する工程と、次いで、ORP特性が非妊娠集団又は妊娠集団の生物学的サンプルなどの参照値のORP特性と有意に異なるかを評価して被験体の妊娠及び／又は胎児発生状態を決定することにより、被験者において妊娠を診断、評価、及び／又はモニターする方法、さらには胎児発生の進行又はリスクをモニターする方法である。次いで、被験体は、妊娠及び／又は胎児発生状態に基づいて治療される。これらの方法では、非妊娠被験体のORP特性よりも被験体のORP特性が増加した場合、被験体における妊娠の存在の指標となる。代替的又は追加的に、同一の妊娠期間の正常妊娠を有することが知られている妊娠被験体の参照値のORP特性よりも被験体のORP特性が増加した場合、被験体において母体リスク又は胎児リスク又はハイリスク妊娠を生じている可能性があることが示唆される。

20

【0076】

限定されるものではないが、かかる被験体のORP特性の傾向を経時的に決定するために、被験体のORP特性値は、被験体のORP特性値の傾向を比較及び決定すべく、最初の決定の後、1、2、3、4、5、もしくは6日、又は何週間かごとにチェックしうる。

【0077】

被験体のORP特性は、被験体の体液、たとえば、限定されるものではないが、血液、血漿、羊水、及び血清から取得しうる。被験体のORP特性はまた、被験体の組織、たとえば、限定されるものではないが、胎盤又は胎児組織から取得しうる。

30

【0078】

それゆえ、一実施形態では、妊娠被験体は、被験体における異常妊娠又は胎児リスク増加の指標となるORP特性値に関して評価しうる。同一の妊娠期間の正常妊娠を有することが知られている被験体のORP特性値に統計的に類似しているか又はそれ未満である被験体のORP特性値は、正常妊娠で進行する被験体の指標となる。同一の妊娠期間の正常妊娠を有することが知られている被験体のORP特性値に統計的に類似しているか又はそれを超える被験体のORP特性値は、正常妊娠に進行しないか、又は子癰前症もしくは子癰、妊娠糖尿病をはじめとする異常妊娠に進行する可能性があるか、又は流産もしくは胎児死亡のリスクが高い可能性がある被験体の指標となる。

【0079】

かかる被験体のORP特性値は、正常妊娠又は異常妊娠又は胎児発生又は発生進行の初期評価を再評価するために、初期決定後に定期的にチェックしうる。関連実施形態では、妊娠被験体は、正常胎児発生の指標となるORP特性値と比較して被験体のORP特性値を評価することにより、定期的にモニターしうる。被験体と比較して正常妊娠を有する被験体のORP特性値に類似しているか又はそれを超えるORP特性値に統計的に近づく被験体のORP特性値は、不健康又は異常妊娠に進行しうる被験体の指標となる。

40

【0080】

かかる被験体のORP特性値は、限定されるものではないが、被験体の妊娠進行及び／又は疾患予後予測を評価するために、初期決定後、1、2、3、4、5、もしくは6週、又は1、2、3、4、5、又は6ヶ月ごとにチェックしうる。

50

【0081】

いくつかの実施形態では、異常妊娠又はハイリスク妊娠の指標となる高いORP特性を有することが見いだされた被験体は、母体損傷及び初期胎児損傷を改善するために抗酸化レジメン及び／又は鉄過剰の回避レジメンが施される。

【0082】

以上に挙げた方法ではORP特性の決定に重点を置いてきたが、ある特定の実施形態では、ORP特性測定は、他の患者診断基準、たとえば、生命徴候、ECG、血糖レベル、CTスキャン（CATスキャン、コンピュータ横断断層撮影）、MRI（磁気共鳴イメージング、MR）、MRA（磁気共鳴血管造影）、脳動脈造影（大脳血管造影、デジタルサブトラクション血管造影術）、PT（プロトンビン時間）、又はPTT（部分 tromboplastin 時間）の1つ以上と組み合わせて行われる。そのほかに、ORP特性測定は、種々の介入療法の使用を評価するために単独で又は以上に記載の他の診断基準と組み合わせて使用しうる。

（実施例）

以下の実施例は、実施形態をいかに実施及び使用するかについての完全な開示及び説明を当業者に提供すべく提示されたものであり、本発明者らが自身の発明に対して意図した範囲を限定しようとするものでもなければ、以下の実験が実施される実験のすべてであること又はそれだけに限られることを表現しようとするものでもない。使用される数に関して正確を期すべく努力してきたが（たとえば、量、温度など）、いくらかの実験誤差及び偏差を考慮すべきである。

実施例1．精液及び精漿の酸化還元電位の確立

この実施例では、精液及び精漿のサンプルでORPを測定可能であることを実証する。

【0083】

不妊性の問題を抱えているカップルの男性パートナーは、単一の国際男性病学試験所（臨床試験）又は国立泌尿器学試験所（技術試験）から募集した。単一の精液サンプルが各参加者により供与された。精液サンプルは、液化のためのWHOガイドライン（第5版、2010年）に従って室温で約30分間かけて液化させた。液化後、サンプルを2つの画分に分けた。1つの画分は、精漿を単離するために300gで7分間遠心分離した。

精液分析

液化後、精子品質のためのWHOガイドライン（2010年、第5版）を用いて射精液体積、精子細胞数、精子濃度、形態、全体運動性及び前進運動性を測定した。精子形態の評価のためにディフ・クイック（Diff-Quick）キットを用いてスミアを染色した。白血球精子に関してもサンプルを試験した。すなわち、円形細胞濃度が $>1 \times 10^6$ で、ペルオキシダーゼ又はエンズ（Endtz）試験により確認されたとき、 $>1 \times 10^6$ WBC/mL。精子数及び運動性は手動で評価した。

酸化還元（ORP）測定

sORP（mV/ 10^6 精子/mL）は、RedoxSYSアナライザーMiOXSYS（アイトゥ・バイオサイエンス（Aytu Bioscience））センサー（MiOXSYS, アイトゥ・バイオサイエンス（Aytu Bioscience））で構成されたRedoxSYS試験を用いて両方の画分で測定した。センサーは、上向きにしてセンサー電極がMiOXSYSアナライザーに向き合うように挿入した。マイクロピペットを用いて、30 μ Lのサンプル（精液又は精漿）をセンサーの適用ポートに放出した。1回、サンプルは、センサーの参照セルを達成した。試験は自動で開始した。また、オーディブル信号音は、試験の終了を表した。sORP（ミリボルト又はmV単位）を記録した。トリプリケートで分析を行い、精子濃度で平均値を補正し、sORP（mV/ 10^6 精子）で表した。値は平均 $\pm$ SEMとして報告される。スピアマン相関及び受診者動作特性曲線（ROC）を統計解析に使用した。

統計解析

統計解析のためにスピアマン相関検定を用いて定性的変数を比較した。 <0.05 のp値は統計的に有意であるとみなした。

【0084】

これらの解析の結果は図7及び8に示されている。MiOXSYS試験は精液及び精漿のレベルでORPを正確に測定可能であり、かつ精液sORPは精漿で測定されたものに一致したことが、結果から実証される。

実施例2．新鮮な凍結サンプルを用いたsORP／濃度尺度の比較

精液サンプルは実施例1に記載したように取得し処理した。次いで、サンプルを－80℃で120分間保存し、その後、解凍して室温に戻し、sORPを測定した。この分析の結果は図9に示される。

【0085】

精液又は精漿のいずれでサンプルを凍結させてもsORP値は変化しないことが結果から実証され、さらに精液サンプルと精漿サンプルとの間に差がないことが確認される。

実施例3．精液及び精漿の酸化還元電位に及ぼす時間の影響

精液サンプルは実施例1に記載したように取得し処理した。sORPは液化直後（0分）に測定した。次いで、サンプルは室温で120分間放置して再試験した（120分間）。結果は図10及び11に示されている。

【0086】

直後に試験したサンプル及びより後の時点で測定したサンプルでsORP値に差はないことが結果から実証される。

実施例4．妊性精子と非妊性精子を区別するsORPカットオフ値

3つのデータセットを横切って採取した398名の参加者のサンプルは、実施例1に記載の精液パラメータに関して分析した。35個のサンプルは、WHOガイドライン（第5版、2010年）に準拠した妊性精子の6つの基準をすべて満たした。363個のサンプルは、1つ以上の基準を満たすことができなかったため「不妊性」とした。各サンプルのsORP／濃度値を決定して、妊性及び不妊性サンプルに対する平均sORP／濃度値を比較した。この比較の結果は図12Aに示されている。受診者動作特性（ROC）解析を用いて、妊性サンプルと不妊性サンプルとを区別して最もよく予想する最良sORP基準を同定した。これらの解析の結果は図12B及び以下の表1に示されている。

【0087】

【表1】

生殖能力のsORPカットオフ値	> 1.635 mV/10 ⁶ 個(細胞)/mL
濃度曲線下面積 (AUC, (95% CI))	0.78 (0.74-0.82) *
感度 (95% CI)	59.5 (54.2-64.5)
特異度 (95% CI)	91.4 (76.9-98.2)
陽性適中率 (95% CI)	98.6 (96.1-99.7)
陰性適中率 (95% CI)	17.8 (12.5-24.2)
* P<0.05で有意	

妊性に対するWHO基準をすべて満たした精液サンプルでは、sORP値（sORP／濃度）は、不妊性のものと比較してより低かったことが結果から実証される。1.635

のカットオフ値は、すべての妊性サンプルの 91.4% を正確に同定したことも、結果から実証される。それゆえ、1.635 超の sORP / 濃度値を有する精液サンプルは 98.6% の信頼度を不妊性であろう。

実施例 5. sORP 値及び精子形態

この実施例では、正常形態を有する精子と異常形態を有する精子を区別するための sORP カットオフ値の同定について実証する。

【0088】

不妊性の疑いのある男性の精液サンプルは合計で 400 名の参加者から採取した。選択基準は妊性評価を求める男性であった。除外基準は無精子サンプルの男性であった。各参加者により単一の精液サンプルが提供され、精子品質のための WHO ガイドライン (2010 年、第 5 版) を用いて、その射精液体積、精子細胞数、精子濃度、形態、全体運動性及び前進運動性が測定された。これらは以下の表 2 に示されている。

【0089】

【表 2】

特性	正常値の下限	WHO ガイドラインの引用セクション
体積 (mL)	> 1.5 mL	2.3.4.1
精子全数	> 39 × 10 ⁶	2.8.8
濃度 (100 万個/mL)	> 15 × 10 ⁶ / mL	2.8.6
全運動率	> 40%	2.5.4
前進運動率	> 32%	2.5.4
形態	> 4%	2.17.3

具体的には、細胞数はマクラー (Makler) チャンバーを用いて定量した。形態は、ディフ・クイック (Quick-Diff) 染色プロトコルにより作製スライドを用いて評価した。

sORP 測定

酸化ストレスは、MiOXSYS (商標) システム (アイトゥ・バイオサイエンス社 (Aytu Bioscience, Inc)) を用いてニートの液化精液サンプルの静的酸化還元電位 (sORP) を測定することにより評価した。MiOXSYS システムは MiOXSYS アナライザー及び使い捨て可能な試験センサーで構成される。これは定常低電圧還元電流下での還元体 (抗酸化剤) から酸化体への電子移動の定電流尺度であり、それゆえ、それはサンプル中のすべての現在の酸化活性及び抗酸化活性の合計尺度を提供する。より高い sORP 値 (ミリボルト、mV) は抗酸化活性に対してより高い酸化活性すなわちより大きい酸化ストレス状態を表す。

【0090】

簡潔に述べると、アナライザー内にあらかじめ挿入された試験センサーに 30 µL の室温のニートの精液を添加した。サンプルがセンサーの参照電極で検出されると試験は自動で開始された。各ランは 2 分間であり、サンプルはデュプリケートで試験した。デュプリ

ケートが10 mV超異なった場合、第3のサンプルで試験し、最も近い2つの値を使用した。サンプルの10パーセントはトリプリケートで試験した。ベストマッチングデュプリケート間の相関は0.98 ($R^2 = 0.95$)であり、平均値 $\pm$ SEM差は4.3 $\pm$ 0.16 mVであった。

統計解析

データは、3つのデータセット（データセット1 $n = 107$ 、データセット2 = 197、データセット3 = 96）で最初に受け取った。データセット1はすべての初期解析に使用した。データセット2～3は、個別確認データセットとして使用した。精子数差を制御するために、sORP値は各サンプルで精子の濃度に規格化した。sORP値はsORP/濃度 (mV/10⁶精子/mL) として提示される。群比較のために、サンプルは、正常パラメータに対するWHO参照に基づいて各パラメータに対して「正常」又は「異常」に群分けした。そのほかに、0.999 $\times$ 10⁶精子/mL超の濃度を有するサンプルのみを使用した。なぜなら、これよりも低い濃度ではsORP/濃度平均値が漸増し、人為的に有意な結果を生じたからである。sORPと精子品質の尺度との関係は群差に対するスチューデントのt検定を用いて決定した。受診者動作特性(ROC)解析は、精子形態に関するWHO基準により規定されるように、正常形態と異常形態とを区別して最もよく予想するsORP基準を同定するために使用した。この解析では、精子濃度にかかわらずすべてのデータ点を使用した。有意性は $p < 0.05$ で確定した。グラフは平均値 $\pm$ SEMを表す。

10

【0091】

20

参加者デモグラフィックス、ホルモンレベル、又は精液パラメータに関して、3つのデータセット間に有意差はなかったことが結果から示されることから、データセットはすべて、互いに比較可能であることが確認される。すべてのデータセットを組み合わせたときの記述統計量は以下の表3に示されている。

【0092】

【表 3】

	N	中間値	StDev	メジアン (IQR)
年齢	400	35.76	7.88	34 (9)
BMI	352	31.62	26.99	27.85 (5.94)
禁酒(日数)	400	4.35	2.21	4 (2)
体積(mL)	400	3.10	1.48	3.0 (2.0)
細胞の総数 ($\times 10^6$)	400	101.81	104.65	75.5 (130.75)
濃度(10^6 個精子/mL)	400	33.33	30.13	28.0 (42.0)
前進運動率 (%)	400	14.08	14.32	10.0 (25.5)
非前進運動率 (%)	400	28.82	14.62	30.0 (19.0)
非運動率 (%)	400	57.11	23.54	52.5 (38.0)
全運動率 (%)	400	42.90	23.59	47.5 (38.0)
正常な形態 (%)	400	7.00	8.44	4.00 (9.00)
sORP	400	51.65	21.95	49.33 (26.0)
sORP/ 10^6 個精子/mL (sORP/濃度)	400	24.06	82.51	1.90 (4.9)
sORP/100万個の細胞 (ORP/細胞)- 濃度 > 0.999 M/mL	366	4.54	8.20	1.64 (8.20)
ホルモンテスト				
エストラジオール (E2)	154	182.58	76.09	101.0 (52.0)
黄体形成ホルモン(LH)	243	4.41	2.71	4.0 (2.73)
卵胞刺激ホルモン(FSH)	241	6.15	17.83	3.02 (4.0)
プロラクチン(PRL)	242	235.15	175.67	195.0 (129.0)
テストステロン	248	31.62	219.16	16.34 (9.80)

データセット 1 の解析に基づいて、正常及び異常の精液パラメータ（図 13～18）間に有意差があった。有意に高い s O R P 値は、全細胞数（ $t(98) = 7.64$ 、 $p < 0.05$ ）（図 14）、濃度（ $t(98) = 7.74$ 、 $p < 0.05$ ）（図 15）、全運動性（ $t(98) = 3.52$ 、 $p < 0.05$ ）（図 16）、及び形態（ $t(98) = 4.43$ 、 $p < 0.05$ ）（図 18）に関して正常であったものと比較して、異常であったサンプルで測定された。精液量（ $t(98) = 1.24$ 、 $p > 0.05$ ）（図 13）又は前進運動性精子のパーセント（ $t(98) = 1.08$ 、 $p > 0.05$ ）（図 17）に関しては、有意差は見られなかった。全細胞数（図 14）、濃度（図 15）、全体運動性（図 16）、及び形態（図 18）に関する差は、データセット 2 及び 3 で確認した（すべて $p < 0.05$ ）。そのほかに、前進運動性の関数としての s O R P（図 17）は、残りの両方のデータセット（ $p < 0.05$ ）で有意な影響があるものとして現れた。体積は継続して有

意であった。

【0093】

R O C 解析は、異常形態を有するサンプルを予想するために信頼性をもって s O R P を使用できるか、それゆえ、高い特異度及び陽性的中率 (P P V) が強調されるか、を決定するために使用した。データセット 1 に基づいて、s O R P / 濃度カットオフ値は 3. 29 m V / 1 0 6 精子 / m L で同定された。曲線下面積 (A U C) のかなりの部分は s O R P 値により補償された (A U C = 0. 90 (95 % C I 0. 83 ~ 0. 95) (p < 0. 05))。3. 29 m V / 1 0 6 精子 / m L のカットオフ値では、特異度は 96. 2 % (95 % C I 86. 8 ~ 99. 5) であり、かつ P P V は 94. 1 % (95 % C I 80. 3 ~ 99. 3) であった。それゆえ、異常形態サンプルの 96. 2 % は適正に同定され、3. 29 m V / 濃度超の s O R P 値を有する精液は 94. 1 % の確実性で異常ものとすることが可能である。以下の表 4 に示されるように、このカットオフ値は、データセット 2 及び 3 を用いて確認したが、適中率はわずかに低かった。

【0094】

【表 4】

ORP Cut-Off = 3.29 mV	データセット1	データセット2	データセット3	データセットの 組み合わせ
AUC (* significant)	0.90 *	0.77 *	0.83 *	0.82 *
感度	58.2	51.0	62.5	55.6
特異度	96.2	87.0	85.0	89.1
PPV	94.1	82.1	83.0	85.7
NPV	68.5	60.2	65.9	63.1
精度	77 %	68 %	72 %	71 %

3 つのデータセットをすべて組み合わせると、特異度は 89. 1 % であり、かつ P P V は 85. 7 % であった。図 13 は、曲線下面積を示す R O C 解析グラフを例示している。図 19 の A U C は有意であったことから (p < 0. 05)、s O R P 値の予測能力は偶然によるものよりも有意に大きい。

【0095】

s O R P 値は、異常精液パラメータを有するサンプルで有意に高かったことが結果から示される。データセット 1 により決定された 3. 29 m V / 1 0 6 精子 / m l の s O R P カットオフ値は、正常形態を有するすべてサンプルの 96. 2 % を正確に同定したことも

結果から示される。それゆえ、3.29超のsORP／濃度を有するサンプルは、85.7％の確率で異常精子形態を有する。

【図 1】

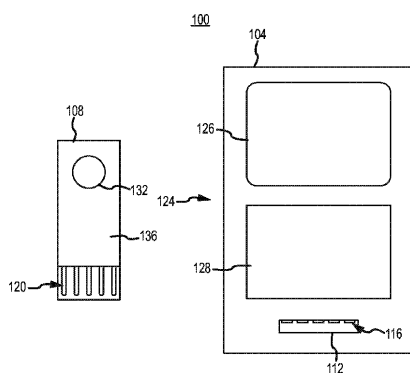
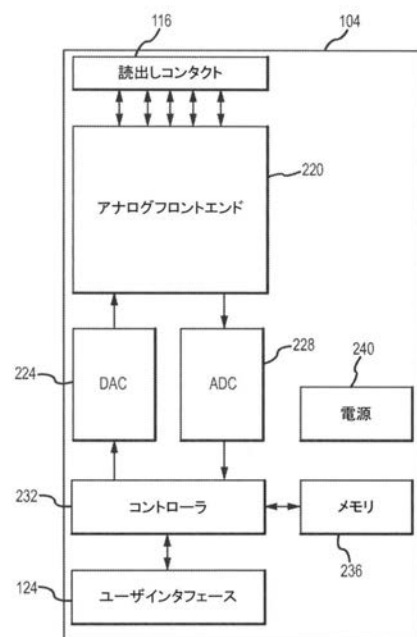
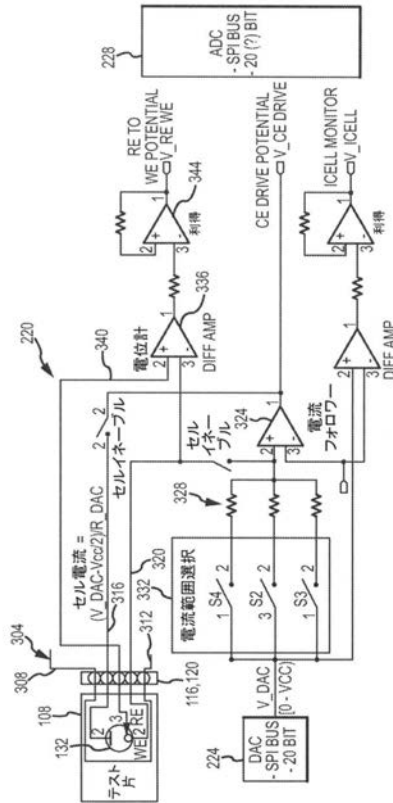


FIG.1

【図 2】



【図 3】



【図 4】

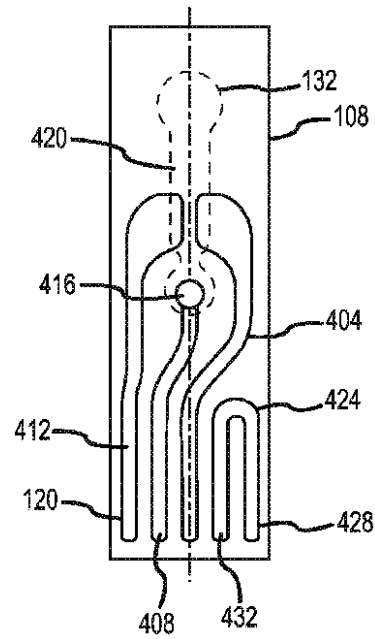
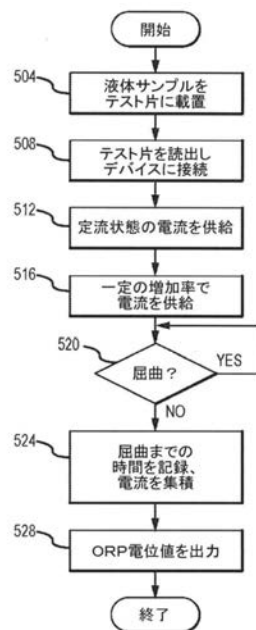
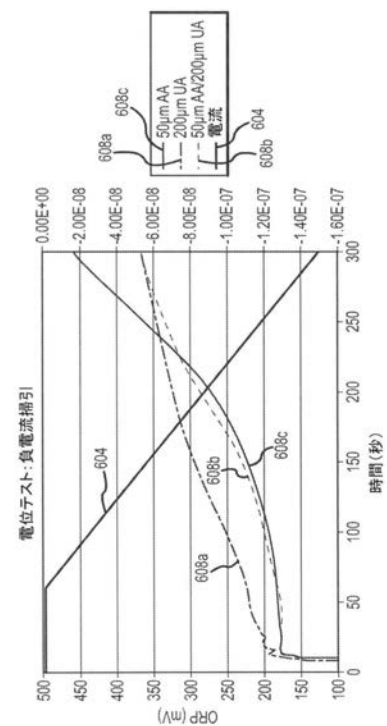


FIG.4

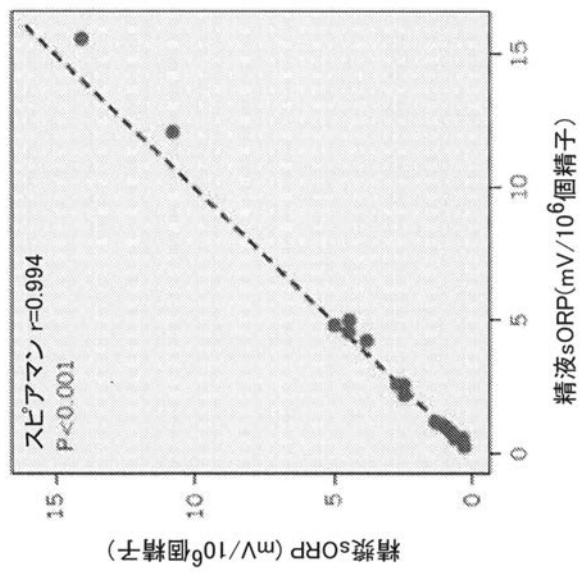
【図 5】



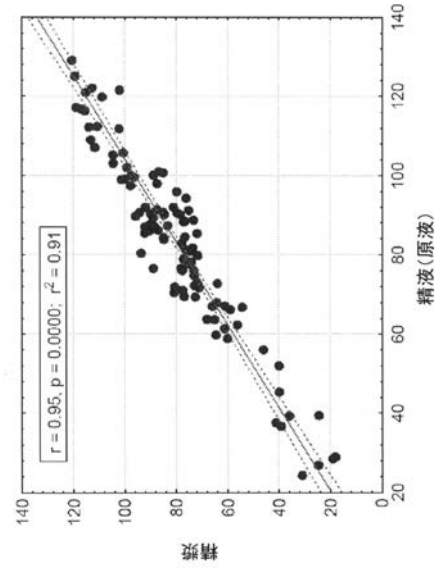
【図 6】



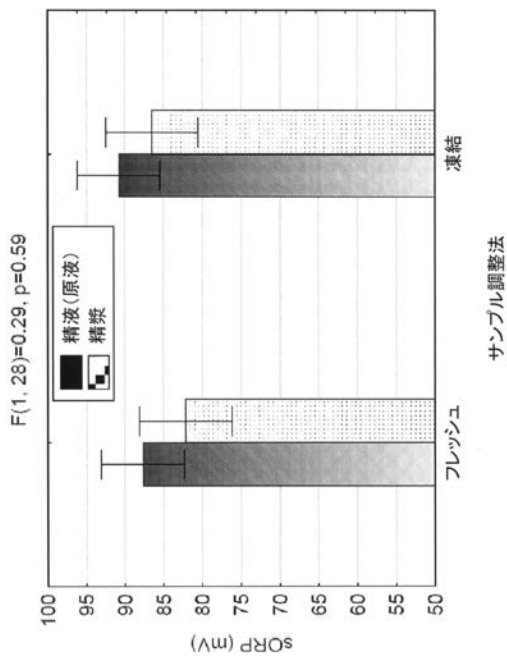
【図 7】



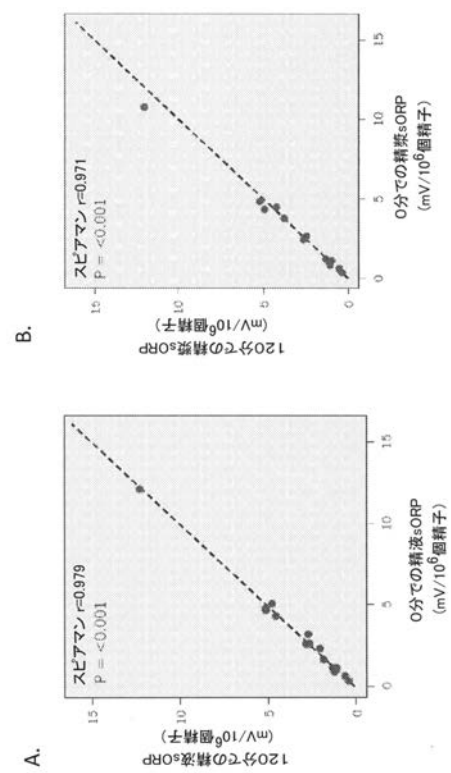
【図 8】



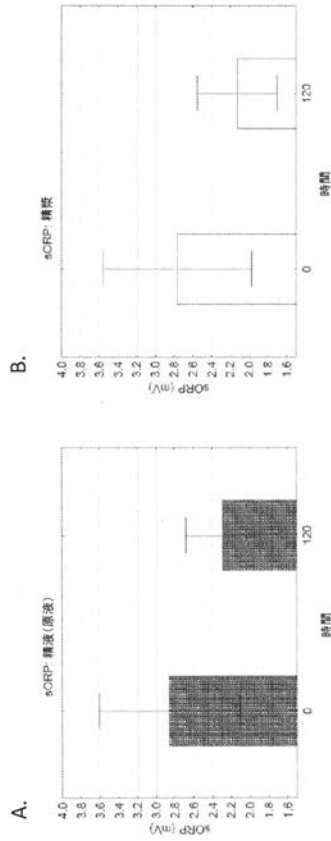
【図 9】



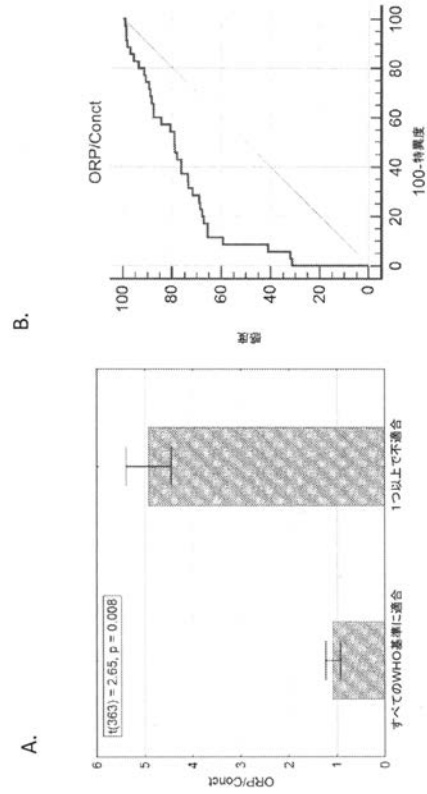
【図 10】



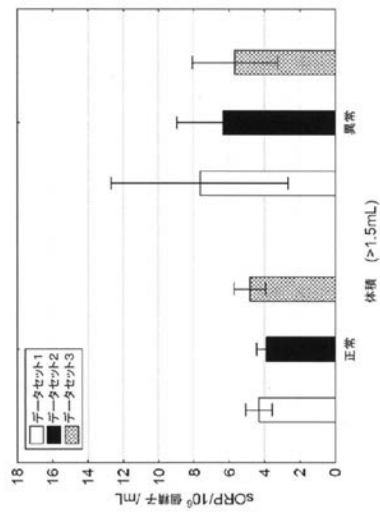
【図 1 1】



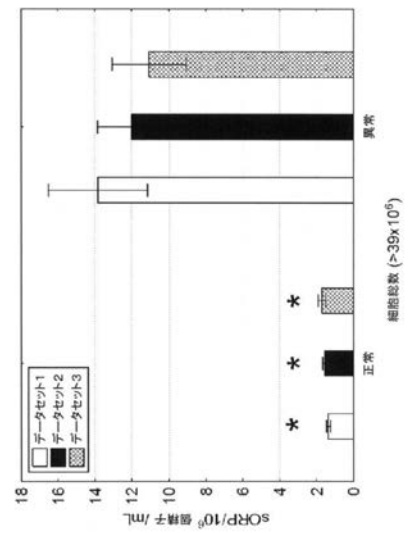
【図 1 2】



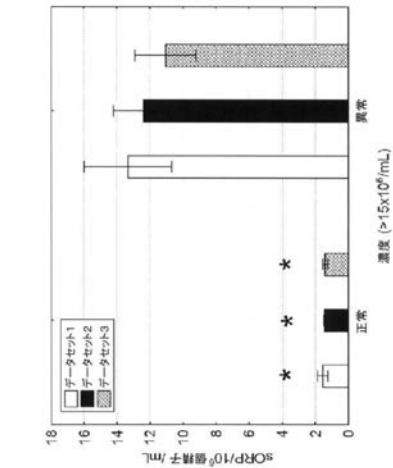
【図 1 3】



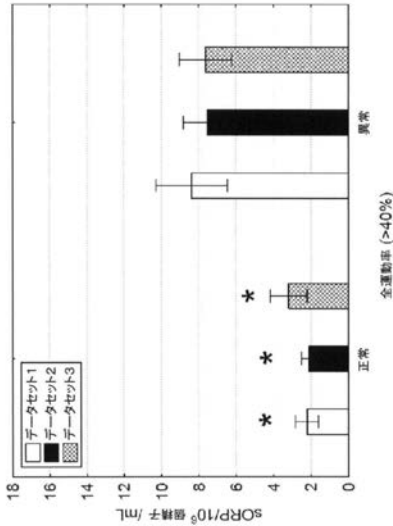
【図 1 4】



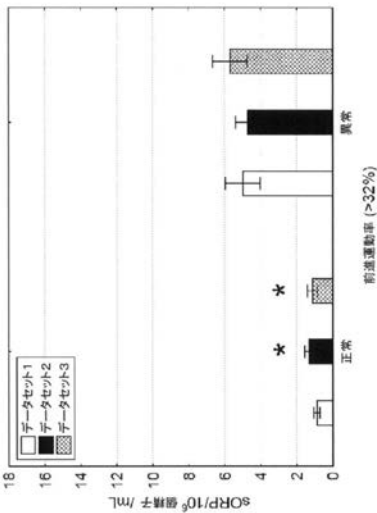
【図 1 5】



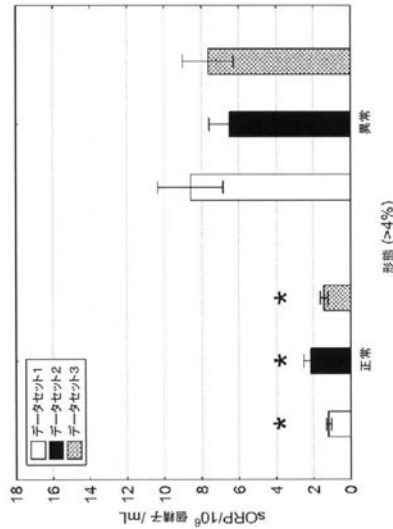
【図 1 6】



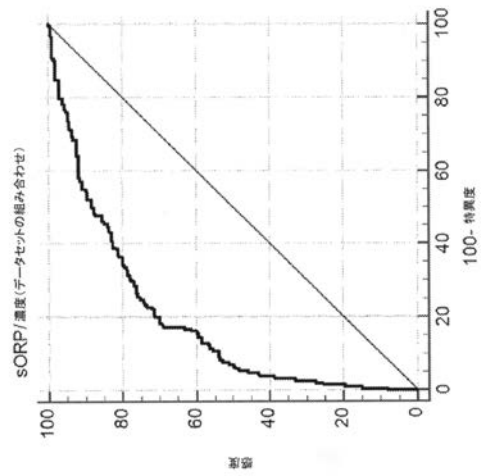
【図 1 7】



【図 1 8】



【図 19】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/62455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61D 19/00; G01N 33/92, 27/26 (2015.01) CPC - A61D 19/00; G01N 33/92, 27/26 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(8): A61D 19/00; G01N 33/92, 27/26 (2015.01) CPC: A61D 19/00; G01N 33/92, 27/26 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; IP.com; PubMed; EBSCO; Aytu Bioscience, Bar-Or, Bar-Or, Rael, Bjugstad, Sikka, fertility, potential, sperm, static, capacity, oxidation-reduction, redox, potential, reference, control, standard, value, egg											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X --- Y</td> <td>WO 2014/066533 A2 (LUOXIS DIAGNOSTICS) 1 May 2014; page 2, lines 30-33; page 8, lines 15-20; page 15, lines 24-25; page 28, lines 1-5; page 48, lines 30-32; claim 67</td> <td>6 --- 1-3, 7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CA 2,203,828 A (BETH ISRAEL HOSPITAL ASSOCIATION, US) 9 May 1996; abstract; page 3, lines 4-6, 20-25; page 4, lines 10-15; page 8, lines 14-20, 35-40; page 9, lines 1-5, 20-25</td> <td>1-3, 7</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X --- Y	WO 2014/066533 A2 (LUOXIS DIAGNOSTICS) 1 May 2014; page 2, lines 30-33; page 8, lines 15-20; page 15, lines 24-25; page 28, lines 1-5; page 48, lines 30-32; claim 67	6 --- 1-3, 7	Y	CA 2,203,828 A (BETH ISRAEL HOSPITAL ASSOCIATION, US) 9 May 1996; abstract; page 3, lines 4-6, 20-25; page 4, lines 10-15; page 8, lines 14-20, 35-40; page 9, lines 1-5, 20-25	1-3, 7
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X --- Y	WO 2014/066533 A2 (LUOXIS DIAGNOSTICS) 1 May 2014; page 2, lines 30-33; page 8, lines 15-20; page 15, lines 24-25; page 28, lines 1-5; page 48, lines 30-32; claim 67	6 --- 1-3, 7									
Y	CA 2,203,828 A (BETH ISRAEL HOSPITAL ASSOCIATION, US) 9 May 1996; abstract; page 3, lines 4-6, 20-25; page 4, lines 10-15; page 8, lines 14-20, 35-40; page 9, lines 1-5, 20-25	1-3, 7									
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 31 December 2015 (31.12.2015)		Date of mailing of the international search report 17 MAY 2016									
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774									

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/62455

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I: Claims 1-3 and 6-7 are directed toward methods of evaluating the fertility potential of sperm samples.

Group II: Claims 4-5 and 8-12 are directed toward methods of evaluating and improving the chances that a fertilized egg will establish and maintain a successful pregnancy.

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 8-7

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US15/82455

-----Continued from Box III: Observations where unity of invention is lacking -----

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include evaluating the fertility potential of a sperm sample from a subject; measuring the static oxidation-reduction potential (sORP) and/or the capacity oxidation-reduction potential (cORP) of a sample from the subject; classifying the fertility potential of the sperm sample as high or low; and determining the characteristic of the sperm based on the comparison; wherein the at least one characteristic is selected from the group consisting of the percentage of sperm cells in the sample having a healthy morphology, the percentage of motile sperm cells in the sample, the number of sperm cells in the sample and the concentration of sperm cells in the sample, which are not present in Group II; and the special technical features of Group II include evaluating the competence of an egg from a subject; measuring the static oxidation-reduction potential (sORP) and/or the capacity oxidation-reduction potential (cORP) of a sample from the subject; classifying the egg as competent or incompetent; determining the ability of the egg to establish and maintain a successful pregnancy; and determining the optimal time for transfer of the fertilized egg into the uterus, which are not present in Group I.

The common technical features of Groups I-II are a method of evaluating the fertility status of a subject, comprising: a. measuring the static oxidation-reduction potential (sORP) and/or the capacity oxidation-reduction potential (cORP) of a sample from the subject; b. comparing the measured sORP and/or cORP to a reference value; and c. determining the fertility status of the subject based on the comparison.

These common technical features are disclosed by WO 2014/088533 A2 to LUOXIS DIAGNOSTICS (hereinafter "Luoxis"). Luoxis discloses a method of evaluating the fertility status of a subject (evaluating pregnancy in a subject; page 8, lines 15-20; page 15, lines 24-25), comprising: a. measuring the static oxidation-reduction potential (sORP) and/or the capacity oxidation-reduction potential (cORP) of a sample from the subject (measuring the static oxidation-reduction potential sORP and/or the capacity oxidation-reduction potential cORP of the subject; claim 67); b. comparing the measured sORP and/or cORP to a reference value (comparing the measured sORP and/or cORP to a reference value; claim 67); and c. determining the fertility status of the subject based on the comparison (determine the pregnancy status of the subject based on comparison of the measured sORP and/or cORP to a reference value; claim 67).

Since the common technical features are previously disclosed by Luoxis, these common features are not special and so Groups I-II lack unity.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 バーナー、ラファエル

アメリカ合衆国 80202 コロラド州 デンバー ウィンクープ ストリート 1720 ユニット 214

(72)発明者 バーナー、デイビッド

アメリカ合衆国 80110 コロラド州 エングルウッド イー. オックスフォード レーン 900

(72)発明者 ラエル、レオナルド ティ.

アメリカ合衆国 80015 コロラド州 センテナリアル エス. リスボン ストリート 5509

(72)発明者 ブジャグスタッド、キンバリー ビー.

アメリカ合衆国 80124 コロラド州 ローレン ツリー エス. ロスト ヒル ドライブ 9212

Fターム(参考) 4B063 QA05 QQ08 QS40 QX05