

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7005498号

(P7005498)

(45)発行日 令和4年1月21日(2022.1.21)

(24)登録日 令和4年1月7日(2022.1.7)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/076(2010.01)

C 1 2 N 5/076

G 0 1 N 33/543(2006.01)

G 0 1 N 33/543

G 0 1 N 33/563(2006.01)

G 0 1 N 33/563

請求項の数 16 (全12頁)

(21)出願番号 特願2018-532104(P2018-532104)
 (86)(22)出願日 平成29年1月4日(2017.1.4)
 (65)公表番号 特表2019-503169(P2019-503169
 A)
 (43)公表日 平成31年2月7日(2019.2.7)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/012104
 (87)国際公開番号 WO2017/120173
 (87)国際公開日 平成29年7月13日(2017.7.13)
 審査請求日 令和1年12月27日(2019.12.27)
 (31)優先権主張番号 62/274,466
 (32)優先日 平成28年1月4日(2016.1.4)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 516243526
 ユニヴァーシティ オブ テネシー リサ
 ーチ ファウンデーション
 UNIVERSITY OF TENNE
 SSEE RESEARCH FOUND
 ATION
 アメリカ合衆国 テネシー州 3 7 9 9 6
 , ノックスビル, コンフェレンス セ
 ンター 2 1 1 , ヘンリー ストリート
 6 0 0
 6 0 0 Henley Street , 2
 1 1 Conference Cente
 r , Knoxville , TN 3 7 9
 9 6 USA
 (74)代理人 100079980

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 精液特性の改善方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト及びウサギ以外の哺乳動物の精液サンプルの膜の完全性および／または自動性を改善する方法であって、

少なくとも一つの抗ウサギ Ig G を担持した不溶性担体、または、前記少なくとも一つの抗ウサギ Ig G 及びこの少なくとも一つの抗ウサギ Ig G に結合できる少なくとも一つの分子を担持した不溶性担体を準備し、

前記精液サンプルと前記不溶性担体とを接触させて、結合精子細胞集団および結合していない健康な精子細胞集団を形成し、そして

不溶性担体を分離することにより改善された膜の完全性および／または自動性を有するヒト及びウサギ以外の哺乳動物の精子細胞集団を準備し、前記の結合していない健康な精子細胞集団から前記の結合精子細胞集団を分離することを特徴とする改善方法。

【請求項 2】

前記不溶性担体が複数のビーズを有し、各ビーズが前記の少なくとも一つの抗ウサギ Ig G あるいは前記の少なくとも一つの分子を有する請求項 1 に記載の改善方法。

【請求項 3】

前記精液サンプルと前記不溶性担体とを混合によって接触させる請求項 2 に記載の改善方法。

【請求項 4】

サイズ排除ろ過によって前記の結合精子細胞集団を分離するステップを有する請求項 3 に

記載の改善方法。

【請求項 5】

前記複数のビーズが B i o M a g (登録商標) 粒子、M A C S (登録商標) M i c r o B e a d s、あるいは F l o w C o m p (登録商標) ビーズであり、そして磁気分離によって前記の結合精子細胞集団を分離するステップを有する請求項 2 に記載の改善方法。

【請求項 6】

プロテイン A および抗ウサギ I g G に結合する抗体からなる群から前記分子を選択する請求項 1 に記載の改善方法。

【請求項 7】

精液原形質および / またはエクステンダーが存在する場合、準備ステップ、混合ステップおよび分離ステップの前にこれらを取り除くステップを有する請求項 1 に記載の改善方法。

10

【請求項 8】

ウマ、ウシ、ヒツジ、およびブタからなる群から前記ヒト及びウサギ以外の哺乳動物を選択する請求項 1 に記載の改善方法。

【請求項 9】

前記ヒト及びウサギ以外の哺乳動物がウシである請求項 8 に記載の改善方法。

【請求項 10】

新たに回収した精液サンプル、冷却精液サンプル、凍結 - 解凍精液サンプル、ニートな精液サンプル、および希釈精液サンプルの一つかそれ以上として前記精液サンプルを準備する請求項 1 に記載の改善方法。

20

【請求項 11】

ヒト及びウサギ以外の哺乳動物の精液サンプルの膜の完全性および / または自動性を改善する試剤を含有するキットであって、

i) 少なくとも一つの抗ウサギ I g G を担持した不溶性担体、または

i i) 少なくとも一つの抗ウサギ I g G およびこの少なくとも一つの抗ウサギ I g G に結合できる少なくとも一つの分子を担持した不溶性担体

のうち一種から選択する結合試剤を有し、

そして、前記の少なくとも一つの抗ウサギ I g G を担持した前記不溶性担体、あるいは前記の少なくとも一つの抗ウサギ I g G および前記の少なくとも一つの抗ウサギ I g G に結合できる少なくとも一つの分子を担持した不溶性担体に関する使用説明書、他の試剤、および、ガラス容器および / またはプラスチック容器を適宜有し、前記の少なくとも一つの抗ウサギ I g G を毀損された膜完全性および / または毀損された自動性をもつ精子に結合し、結合精子細胞集団および結合していない健康な精子細胞集団を形成し、そして不溶性担体を分離することにより改善された膜の完全性および / または自動性を有するヒト及びウサギ以外の哺乳動物の精子細胞集団を準備し、前記の結合していない健康な精子細胞集団から前記の結合精子細胞集団を分離し、それにより改善された膜の完全性および / または自動性を有するヒト及びウサギ以外の哺乳動物の精液細胞サンプルを提供するためのキット。

30

【請求項 12】

前記不溶性担体が複数のビーズを有し、各ビーズが前記の少なくとも一つの抗ウサギ I g G あるいは前記の少なくとも一つの分子を有する請求項 11 に記載のキット。

40

【請求項 13】

さらにサイズ排除フィルターを有する請求項 12 に記載のキット。

【請求項 14】

前記複数のビーズが B i o M a g (登録商標) 粒子、M A C S (登録商標) M i c r o B e a d s、あるいは F l o w C o m p (登録商標) ビーズである請求項 12 に記載のキット。

【請求項 15】

さらに、結合していない精子細胞集団から前記不溶性担体および結合精子細胞集団を磁気分離する磁気分離装置を有する請求項 14 に記載のキット。

50

【請求項 16】

プロテイン A および抗ウサギ Ig G に結合する抗体からなる群から前記分子を選択する請求項 11 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2016 年 1 月 4 日を出願日とする米国特許出願第 62 / 274 , 466 号の優先権を主張する出願であり、この米国特許出願明細書の全体を援用する出願である。本発明は、精液サンプルから有害な精子を取り除くことによって精液特性を改善する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

牛の人工授精によって、米国の畜牛業および酪農業では世界中の遺伝学的にすぐれた雄親から多数の子孫を得ることが可能になってきたが、高い遺伝的メリットをもつ一部の雄牛の場合、人工受精後雌牛が受胎しないことがある。雄牛の精液の受精能力は、この精液に含まれる健全な精子の個数に依存し、劣弱な自動性 (motility、運動性) および / または易感染性膜を有する精子数が増えるに従って受精能力が低下する (Pace et al. 1981; Januskauskas et al. 2003; Dogan et al. 2013)。これは、セルトリ細胞が射精前の精子形成中に退化精子を取り除けなかったためであり、あるいは射精精液の凍結保存に対する敏感性が強くなる結果、解凍後の精子の自動性および / または膜完全性が低下するためと考えられる。この結果、受胎率および出産率が低下し、また離乳時の体重減少および牛乳産生量の低下が生じる。

20

【0003】

この問題やその他の問題を解決するために、本明細書には、精液の凍結保存前後において有害な精子を取り除き、選択的に健全な精子を増やすことによって精液特性を改善する方法を開示する。本発明方法によると、健全な精子の個数が増加し、受精能力が高くなり、人工授精や体外受精などの処置後の生殖結果 (体外胚生産、受精、妊娠、子牛の誕生など) に改善が見られる。もう一つの非限定的な例として、選別によって雌雄を決定した哺乳動物精液の場合、未選別精液よりも特性が低くなることも知られている。本発明方法は、同時係属出願である米国公開特許出願第 2015 / 0233920 号および PCT 特許出願第 PCT / US 2015 / 16589 号に開示されている方法などの任意の適当な方法によって雌雄を決定した精液特性を改善するために有効である。なお、これら両出願明細書はここに全体を援用し、発明の名称が “雌雄比のスキューイング用抗体およびその使用方法” であり、また出願日はいずれも 2015 年 2 月 14 日である。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】米国公開特許出願第 2015 / 0233920 号

PCT / US 2015 / 16589

【非特許文献】

40

【0005】

【文献】Dogan, S., et al. (2013). J Reprod Dev 59 : 18 - 26

Januskauskas, A., et al. (2003). Theriogenology 60 : 743 - 58

Nagy, S., et al. (2004). Anim Reprod Sci 80 : 225 - 35

Pace, M.M., et al. (1981). J Anim Sci 53 : 693 - 701

【発明の概要】

50

【 0 0 0 6 】

本発明の目的および作用効果に従って、本発明の一つの態様は、毀損された精子膜完全性を示す指示薬に結合する少なくとも一つの配位子か、あるいはこの少なくとも一つの配位子に結合できる少なくとも一つの分子を有する不溶性担体を使用して、有害な精子を取り除くことによって精液特性を改善する方法を提供するものである。指示薬は、毀損された精子先体完全性 (sperm acrosome integrity) および毀損された精子原形質膜完全性 (sperm plasma membrane integrity) の一方か、あるいは両方に対応するものであればよい。実施態様においては、上記分子はストレプトアビジン、プロテイン A および抗体からなる群から選択する。実施態様においては、指示薬はビオチンであればよく、また配位子は抗体であればよい。実施態様においては、抗体は抗ウサギ IgG か、あるいはその結合フラグメントであればよい。抗体はポリクロナール抗体か、あるいはモノクロナール抗体であればよい。

10

【 0 0 0 7 】

本発明の方法は、さらに配位子の自動性および / または膜完全性が毀損された精子への結合に好ましい条件下で精液サンプルと不溶性担体とを接触させ、不溶性担体結合精子細胞集団および結合していない精子細胞集団を準備するステップを有する。さらに、本発明の方法は結合していない精子細胞集団から結合した精子細胞集団を分離するステップを有する。実施態様においては、不溶性担体は少なくとも一つの配位子または少なくとも一つの分子で被覆された複数のビーズを有し、この場合本発明方法は精液サンプルとこの複数の被覆ビーズとを混合するステップを有する。実施態様においては、本発明の方法はサイズ排除ろ過によってビーズが結合している精子細胞集団を分離するステップを有する。他の実施態様においては、本発明の方法は磁気ビーズである不溶性担体を供給するステップ、および、磁気分離によってビーズ結合精子細胞集団を分離するステップを有する。

20

【 0 0 0 8 】

本発明のもう一つの態様は、本発明は試剤を有し、また適宜ガラス容器および / またはプラスチック容器を有し、そして上記方法の使用説明書を含むキットを提供するものである。

【 0 0 0 9 】

以下、精液特性の改善方法の実施態様を説明する。なお、本発明の方法は他の異なる態様でも実施可能であり、その細部については、特許請求の範囲に記載した方法から逸脱せずに、各種の自明な態様で変更可能であることが理解されるべきである。即ち、添付図面および説明は本質的に例示を目的とし、制限を加えるものではない。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 0 】

明細書の一部を構成する添付図面は精液特性を改善する方法のいくつかの態様を図示するもので、明細書の説明と相俟って本発明のいくつかの原理の説明に資するものである。

【 図 1 】 各種の被覆された不溶性担体での培養後の自動性精子のパーセント (%) を示す図である。

【 図 2 】 各種の被覆された不溶性担体での培養後の無毀損先体および原形質膜をもつ精子のパーセントを示す図である。

【 0 0 1 1 】

40

以下、本発明の精液特性改善方法の実施態様を詳しく説明する。なお、実施例を添付図面に示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 2 】

実施例 1 : エクステンダー除去後の被覆ビーズによる凍結-解凍雄牛精液の特性改善

異なるタイプの被覆ビーズ (表 1) に個別に雄牛精子をインキュベートした。被覆ビーズによるインキュベーションに先立って、HEPES / TALP クエン酸緩衝液 (予め 25 ~ 30 に加温された緩衝液で、114 mM の NaCl、3.2 mM の KCl、0.3 mM の NaH₂PO₄、10 mM の乳酸、2 mM の CaCl₂、0.5 mM の MgCl₂、10 mM の HEPES、2 mM の NaHCO₃、0.2 mM のピルビン酸ナトリウム、0.

50

5 % の B S A、0 . 6 % のクエン酸ナトリウムを有する緩衝液) で希釈後に、2 頭の雄牛 (ホルスタイン) から採取した凍結-解凍精液を遠心分離し、エクステンダーを除去した。H E P E S / T A L P クエン酸緩衝液を使用して、得られた精子ペレットを 20×10^6 細胞 / mL の濃度に再懸濁した。精子懸濁液を 0 . 5 mL の容量で 2 mL の丸底管に移した。(表 1 に示す容量の) 被覆ビーズを H E P E S / T A L P クエン酸緩衝液とともに精子を含有する各管に個別に加え、1 mL の最終容量に調整した。ビーズ保存緩衝液を (表 1 に示す) 細胞に加える前に除去することがメーカーによって勧められている場合には、メーカーの勧めに従ってビーズを H E P E S / T A L P クエン酸緩衝液で洗浄した。対照サンプル (ビーズなし) は H E P E S / T A L P クエン酸緩衝液のみを加えた精子からなる。室温において 30 分間丸底管を緩やかに混合した。

10

【0013】

表 1 : 有害な精子を取り除くことによって評価される被覆ビーズの説明

使用ビーズ	メーカー	被覆	ビーズの容量(μ L)	洗浄
S-pluribead®	pluriSelect USA, San Diego, CA, USA	ポリクロナール抗ウサギ I g G (重鎖および軽鎖)	100	無
M-pluribead®	pluriSelect USA, San Diego, CA, USA	ポリクロナール抗ウサギ I g G (重鎖および軽鎖)	100	無
FlowComp™ ビーズ	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA	ストレプトアビジン	20	有
Dynabead®	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA	プロテイン A	10	有
BioMag® 粒子	Bangs Laboratories Inc, Fishers, IN, USA	ポリクロナール抗ウサギ I g G (重鎖および軽鎖)	150	有
MACS® MicroBead	Miltenyi Biotec Inc, San Diego, CA, USA	F(ab') ₂ ポリクロナール抗ウサギ I g G (重鎖および軽鎖) のフラグメント	80	無

20

30

【0014】

適正な装置を使用して、結合していない細胞をビーズおよびビーズ結合精子から分離した。S - p l u r i b e a d s (登録商標) および M - p l u r i b e a d s (登録商標) については、それぞれ、サイズが $30 \mu\text{m}$ および $60 \mu\text{m}$ の排除篩 (p l u r i S e l e c t (登録商標)) を使用して非磁気分離を行った。即ち、結合していない細胞は篩のメッシュを通過し、下の別な新しい管に集まり、ビーズ結合精子はメッシュ上に残った。F l o w C o m p (登録商標) ビーズ、D y n a b e a d s (登録商標) および B i o M a g (登録商標) 粒子については、6 本の管からなる磁気分離ラックを使用して、ビーズおよびビーズ結合精子を管の側部に押し付け、上澄み液に懸濁している結合していない細胞を別な新しい管に移した。M A C S (登録商標) M i c r o B e a d s については、M A C S (登録商標) マルチスタンド (M i l t e n y i B i o t e c) に取り付けた M i n i M A C S (登録商標) 分離装置 (M i l t e n y i B i o t e c) の磁気 M S カラム (M i l t e n y i B i o t e c) を使用して、磁気分離を行った。即ち、ビーズお

40

50

よびビーズ結合精子はカラムの磁場内に残り、結合していない細胞はカラムを通過して、別な新しい管に集まった。

【0015】

対照精子に対して結合していない精子の健全性を比較評価するために、自動性および膜状態を評価した。コンピュータ補助式精子分析装置 (CASA、Hamilton Thorne、Boston、MA、USA) を使用して、精子の自動性を求めた。精子の先体および原形質膜 (acrosomal and plasma membranes) の状態を評価するために、Nagy et al (2004) に記載されている手順を一部変更して、結合していない細胞の一部を SYBR-14 (Molecular Probes、division of Thermo Fischer Scientific) で同時染色し、サンプル中の非精子物から精子を識別し、またフィコエリスリン結合ピーナツアグルチニン (PE-PNA; GeneTex Inc、Irvine、CA、USA) で同時染色し、精子を非完全な先体で標識化し、そして DRAQ7 (Abcam (登録商標)、Cambridge、MA、USA) で同時染色し、易感染性の原形質膜で精子を標識化した。具体的には、Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Gibco (登録商標) Life Technologies、division of Thermo Fischer Scientific) で希釈した精子を 10 nM の SYBR-14、2.5 μg/mL の PE-PNA および 3 μM の DRAQ7 で 10 分間 35 °C において染色してから、BD Accuri C6 フローサイトメーター (BD Biosciences、San Jose、CA、USA) で評価した。各サンプルにつき、最小で 50,000 個の細胞を評価した。

【0016】

ビーズ試験の結果が示唆するところによれば、使用するビーズのタイプに応じて (自動性および膜状態に基づいて) 健全な精子を強化 (enrichment) することは実行可能であった。図 1 を参照すると、ビーズ処置後の結合していない精子の自動性と (ビーズに全く暴露していない) 対照精子の自動性との比較から、FlowComp (登録商標) ビーズ、BioMag (登録商標) 粒子または MACS (登録商標) MicroBeads のいずれかに暴露したサンプルでは自動性精子のパーセントは 20% 以上も増加したが、S-pluribeads (登録商標)、M-pluribeads (登録商標) または Dynabeads (登録商標) とともに同時インキュベートした精子の場合、結合していない精子集団における自動性に対してはほとんど効果がないことがわかった。結合していない精子の膜状態の評価結果 (表 2 を参照) からは、精子が S-pluribeads (登録商標)、FlowComp (登録商標) ビーズ、BioMag (登録商標) 粒子または MACS (登録商標) MicroBeads のいずれかに暴露した後、無傷の先体および原形質膜をもつ精子のパーセントは 14% 以上高くなったが、M-pluribeads (登録商標) または Dynabeads (登録商標) の場合、ほとんど効果がなかったことがわかった。

【0017】

実施例 2: エクステンダーの存在下で MACS (登録商標) MicroBeads を使用した場合における凍結 - 解凍精液の特性改善

MACS (登録商標) MicroBeads を使用して有害な精子を除去できる効能をさらに試験するために、二種類の被膜、アネキシン V または抗ウサギ IgG を 4 頭の異なる雄牛の精子に使用して試験を行った。MACS (登録商標) MicroBeads を使用するインキュベーションを行う前に、個別の雄牛 (ホルスタインまたはセネポル) から採取した凍結 - 解凍精液を等容量の HEPES/TALP クエン酸緩衝液と混合した。精子懸濁液を 1 mL 容量で 2 mL の丸底管に移した。MACS (登録商標) MicroBeads を各精子管に 4 通りの異なる組み合わせで加えた。即ち、1) ビーズなし、2) 100 μL のアネキシン V 被覆ビーズ、3) 100 μL の抗ウサギ IgG 被覆ビーズ、および 4) 100 μL のアネキシン V 被覆ビーズ + 100 μL の抗ウサギ IgG 被覆ビーズである。サンプルに緩衝液を加え、処理間における最終容量が確実に同じになるようにした。管

を室温において30分間緩やかに混合した。

【0018】

MACS（登録商標）マルチスタンド（Miltenyi Biotec）に取り付けた MiniMACS（登録商標）分離装置（Miltenyi Biotec）の磁気MSカラム（Miltenyi Biotec）に精子-ビーズ懸濁液を装填した。結合していない細胞はカラムを通過し、別な新しい管に集まった。分離装置からカラムを取り外し、磁場からビーズおよびビーズ結合精子を放出した。1.2 mLのHEPES-TALP緩衝液を使用してカラムを洗浄し、ビーズ結合精子を回収した。処理後、および結合していないフラクションおよび結合したフラクションに分離後精子の健全性を評価するために、上記のCASA装置を使用して、VIADENT（Hamilton Thorne；易感染性の原形質膜をもつラベル精子）で染色した精子細胞の自動性および原形質膜状態を評価した。それぞれ異なる雄牛を使用して、実験を異なる時間で4回繰り返した。二項分布と一般化線形混合モデル（PROC GLIMMIX：SAS 9.4、SAS Inst. , Inc、Cary、NC、USA）を使用して、データを乱塊法（ランダム化ブロックデザイン）として分析した。プロテクト付き最小有意差法（protected least significant differences）を使用して処理差を求め、逆リンクオプション（inverse link option）を使用して最小二乗平均±SEMとして示す。

10

【0019】

それぞれ異なる雄牛の精子を使用して4回再現したMACS（登録商標）MicroBeads実験の結果から、自動性が劣弱か、あるいは易感染性の原形質膜をもつ精子を取り除く効力は使用したビーズの被覆に依存することがわかった。抗ウサギIgG被覆ビーズに暴露後の精子の結合していないフラクションの場合、対照（表2）よりも無傷の原形質膜（ $P < 0.0001$ ）をもつ自動性精子が多かった（ $P < 0.0001$ ）が、アネキシンV被覆ビーズとともに同時インキュベートした精子は、対照と比較して、結合していないフラクションにおける自動性または原形質膜状態に改善は認められなかった。2種類の被覆ビーズを併用した場合、結合していないフラクションにおける健全な精子強化に対する相乗効果は認められなかった（表2に示す通り、自動性および原形質膜状態：アネキシンV 対照<抗ウサギIgG=両方）。ビーズ種間差については、劣弱な自動性または易感染性の原形質膜をもつ精子のビーズへの結合によって取り除かれる程度に反映されていた（結合フラクション；表2を参照）。ビーズに結合した精子の場合、自動性は結合していないフラクションや対照と比べて小さく、この効果は抗ウサギIgG被覆ビーズに暴露された精子においてより明らかであった（対照>アネキシンV>抗ウサギIgG；表2を参照）。膜状態については、（アネキシンV被覆ビーズを併用した、あるいは併用しない）抗ウサギIgG被覆ビーズに暴露された精子の結合フラクションは、対照と比較した場合、無傷の原形質膜をもつ精子が少なかった（表2）。

20

30

【0020】

表2：結合していない精子およびビーズ結合精子の分離されていないフラクションおよびMACS（登録商標）MicroBeads分離フラクションにおける精子自動性および原形質膜状態の結果

40

MACS® MicroBeads	自動性（自動性パーセント）＊		原形質膜状態（無傷パーセント）＊	
	未結合	結合	未結合	結合
無	34 ^b ±7		74 ^b ±3	
アネキシンV	31 ^b ±7	17 ^c ±6	71 ^c ±3	70 ^{bc} ±6
抗ウサギ I g G	42 ^a ±7	6 ^d ±2	92 ^a ±1	20 ^d ±3
両方	41 ^a ±7	7 ^d ±2	93 ^a ±1	19 ^d ±3
P値**	<0.0001		<0.0001	
＊：結果は最小二乗平均±SEMとして示す。				
**：異なる上つき小文字を付けた平均は統計的な差を示す。				

10

【0021】

実施例3：エクステンダーの存在下でBioMag（登録商標）粒子を使用した場合における凍結 - 解凍精液の特性改善

BioMag（登録商標）粒子を使用するインキュベーションを行う前に、個別の雄牛（ホルスタインまたはセネポル）から採取した凍結 - 解凍精液を等容量のHEPES/TALPクエン酸緩衝液と混合した。精子懸濁液を1mL容量で2mLの丸底管に移した。精子に加える前に、抗ウサギIgGを被覆したBioMag（登録商標）粒子（150μL）をHEPES - TALP/クエン酸緩衝液で洗浄した。対照サンプルに緩衝液を加え、処理間における最終容量が確実に同じになるようにした。室温において30分間穏やかに混合した後、丸底管を7分間6本の管からなる磁気分離ラックに載置した。上澄み液に懸濁した結合していないフラクションを別な新しい管に移した。次に、HEPES/TALPクエン酸緩衝液を管に加え、ラックから管を取り外した。ビーズおよびビーズ結合精子（結合フラクション）を穏やかにピペットで取り上げ、均質な懸濁液を得た。処理後および結合していないフラクションおよび結合したフラクションの分離後、精子の健全性を評価するために、CASA装置を使用して、VIADENT（Hamilton Thorne）で染色した精子細胞中で自動性および原形質膜状態を評価した。それぞれ異なる雄牛を使用して、実験を異なる時間で4回繰り返した。二項分布と一般化線形混合モデル（PROC GLIMMIX：SAS9.4、SAS Inst., Inc、Cary、NC、USA）を使用して、データを乱塊法として分析した。プロテクト付き最小有意差法を使用して処理差を求め、逆リンクオプションを使用して最小二乗平均±SEMとして示す。

20

30

【0022】

それぞれ異なる雄牛に対してBioMag（登録商標）粒子を使用して行った4回の再現試験の結果から、劣弱な自動性をもつ精子を取り除いても、結合していないフラクションの特性に格別な改善が見られなかったことがわかった。抗ウサギIgGビーズに暴露後の精子の結合していないフラクションの自動性および無傷の原形質膜の程度は対照と同様であった（表3を参照）。ビーズに結合した精子の自動性は結合していないフラクションおよび対照よりも低い（ $P < 0.0001$ ）が、グループ間には無傷の原形質膜をもつ精子のパーセントに相違は認められなかった（ $P = 0.4563$ ；表3）。

40

【0023】

表3：結合していない精子およびビーズ結合精子の分離されていないフラクションおよびBioMag（登録商標）粒子分離フラクションにおける精子自動性および原形質膜状態の結果

50

BigMag® 粒子	自動性（自動性パーセント）*		原形質膜状態（無傷パーセント）*	
	未結合	結合	未結合	結合
無	39 ^a ±1		73±4	
抗ウサギ I g G	42 ^a ±1	10 ^b ±1	79±3	72±8
P 値**	<0.0001		0.4563	
*：結果は最小二乗平均± S E Mとして示す。				
**：異なる上つき小文字を付けた平均は統計的な差を示す。				

10

【0024】

特に断らない限り、本明細書で使用した技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味をもつ。本明細書に記載したのと同様な、あるいは等価な方法、装置および物質はいずれも本明細書に開示した要旨の実施または試験に使用できるが、代表的な方法、装置および物質を記載した。

【0025】

長年の特許法実施慣習に従って、特許請求の範囲を含む本願において使用される場合、単数表現は“一つかそれ以上”を意味するものとする。従って、例えば“細胞”と表現する場合、このような細胞などを複数含意するものとする。 20

【0026】

特に断らない限り、本明細書および特許請求の範囲に使用する成分量を表すすべての数値、反応条件などの特性については、いずれもその前に“約”が付くものとする。従って、逆の趣旨を述べない限り、本明細書および特許請求の範囲に記載する数値パラメーターは近似値であり、本発明要旨の目的である所望特性に応じて変わるものである。

【0027】

また、組成物量、投与量、配列同一性の値や量値に言及する場合（例えば2つかそれ以上のヌクレオチドやアミノ酸配列を比較する場合）、その前に付けた“約”は、質量、重量、温度、時間、容量、濃度、パーセントなどが具体的に記載した量から一部の実施態様では±20%、一部の実施態様では±10%、一部の実施態様では±5%、一部の実施態様では±1%、一部の実施態様では±0.5%、そして一部の実施態様では±0.1%の幅があることを意味する。このような幅において本発明の方法を実施でき、あるいは本発明組成物を使用できる。 30

【0028】

“含む”、“含有する”、あるいは“特徴とする”と同義な用語“有する”は包括的な、換言すると“制限のない”用語であり、付加的な、言及していない要素または方法ステップを排除するものではない。“有する”は特許請求の範囲に記載するさいに使用される用語であり、記載した要素が絶対に必要な要素ではあるが、他の要素も付加でき、特許請求の範囲内に含まれる構成を提供できることを意味する用語である。 40

【0029】

一方、用語“からなる（consisting of）”は特許請求の範囲に記載されていない要素、ステップまたは成分のいずれをも排除する用語である。この用語“からなる”がある請求項のプリアンブル（preamble）直後ではなく、本文（body）の一節に出てくる場合、この一節に記載されている要素のみを制限するものであり、全体として当該請求項から他の要素を排除するものではない。

【0030】

また、用語“本質的にからなる”は具体的に記載された物質またはステップにある請求項の範囲を制限するだけでなく、特許請求の範囲に記載された要旨の基本的かつ新規な特徴に重要な影響を与えない物質またはステップに制限するものである。用語“有する”、“からな 50

る”および“本質的にからなる”に関して、これら3つの用語の一つが使用されている場合、本明細書に開示し、かつ特許請求の範囲に記載した要旨は、他の2つの用語の何れかの使用も包摂できる。

【0031】

また、用語“および/または”は、実在物をリストする文脈で使用される場合、単独で存在する実在物または組み合わせた状態で存在する実在物を指すものである。即ち、例えば“A、S、C、および/またはO”はA、S、C、およびOが単独で存在する場合を包含するだけでなく、A、S、C、およびOが任意の組み合わせ、すべての組み合わせおよびいくつかの組み合わせで存在する場合も包含するものである。

【0032】

本明細書で使用する用語“抗体”(Ab)は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体および抗体フラグメントを意味するが、これらが目的の生物学的活性および結合特性を示す限りにおいてである。本明細書で使用する用語“ポリクローナル抗体”は異種抗体の集団から得られた抗体を指す。即ち、これらは体内の異なるB細胞系列(B cell lineages)によって分泌されるものである。また、用語“モノクローナル抗体”は実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指す。即ち、集団を構成する個々の抗体が、自然に発生する考えられる突然変異を除いて、同一である。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一の抗原部位(antigenic site)のみに結合する抗体である。

【0033】

また、本明細書で使用する用語“抗体”(Ab)は、抗体フラグメントも含む用語である。“抗体フラグメント”は無傷の抗体の一部であり、好ましくはこの無傷の抗体の抗原結合領域または抗原可変領域である。制限するわけではないが、抗原フラグメントの実例を挙げると、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、およびFvフラグメント；二重特異性抗体；線形抗体(linear antibodies)；単鎖抗体(一本鎖抗体、single-chain antibody)分子；および抗体フラグメントから形成された多特異性抗体がある。

【0034】

本明細書で使用する用語“精液”は、哺乳動物の精子細胞を含有する流体を指す。本明細書で使用する“精液”はニート(希釈していない、neat)な精液および希釈精液を含む。本発明方法は、新鮮な精液、凍結(凍結保存)精液、および冷却精液の特性を改善するのに有効である。

【0035】

本発明の好適な実施態様に関する上記説明は、例示を目的とするものである。徹底的な説明を意図せず、また本発明を正確な開示形態に限定することも意図していない。上記の説明に照らせば、一部変更や変型などは容易に実施することができる。実施態様については、本発明の原理およびその実際上の応用の最善の説明を与え、当業者が本発明を各種実施態様において利用できるように、また各種変更を利用できるように選択し、かつ記述した。また、これら実施態様および変更は意図する具体的な用途に適用することができる。これら一部変更および変型の全ては、公正、合法的かつ公平の範囲に従って解釈した場合に、特許請求の範囲に記載された本発明の範囲内に包摂されるものである。本明細書において言及した参考文献などはその全体を援用するものとする。

10

20

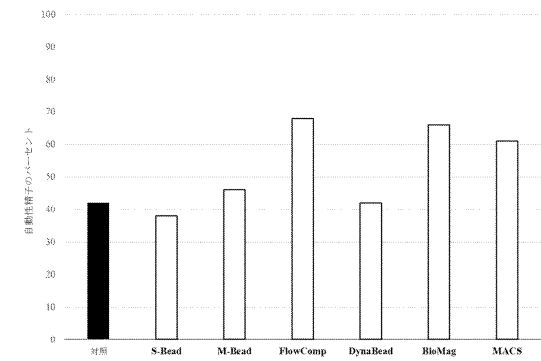
30

40

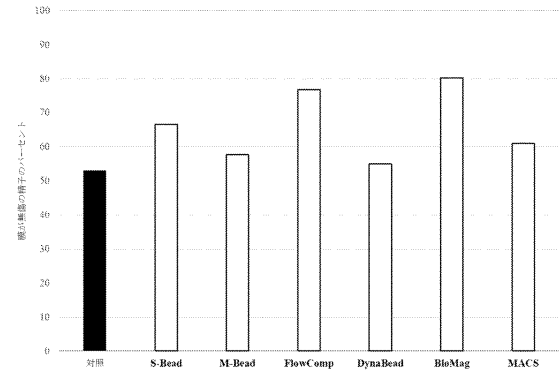
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 飯田 伸行
 (74)代理人 100167139
 弁理士 飯田 和彦
 (72)発明者 エドワーズ, ジェイ. ラネット
 アメリカ合衆国 テネシー州 3 7 8 7 6 , セヴィアヴィル, ボイズ クリーク チャーチ ロード
 1 1 1 8
 (72)発明者 リスボリ, ルイーザ, エイ.
 アメリカ合衆国 テネシー州 3 7 8 0 7 , メイナードヴィル, ヒッコリー ドライブ 1 6 1
 (72)発明者 シュリック, エフ. ニール
 アメリカ合衆国 テネシー州 3 7 8 7 6 , セヴィアヴィル, ボイズ クリーク チャーチ ロード
 1 1 1 8
 審査官 宮岡 真衣
 (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 7 0 2 0 4 (U S , A 1)
 特表平 1 1 - 5 1 1 2 5 2 (J P , A)
 FORESTA C. et al. , Archives of Andrology , 1990年 , 24 , p.221-225
 ARRIGHI C. et al. , Reproductive Biology and Endocrinology , 2009年 , 7:1 , doi:10.1186/
 1477-7827-7-1
 FORESTA C. et al. , Archives of Andrology , 24 (1990) , p.221-225
 (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
 C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8
 G 0 1 N 3 3 / 0 0 - 3 3 / 9 8
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)