

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4216184号  
(P4216184)

(45) 発行日 平成21年1月28日(2009.1.28)

(24) 登録日 平成20年11月14日(2008.11.14)

(51) Int.Cl.	F I	
<b>GO 1 N 33/68</b> (2006.01)	GO 1 N 33/68	
<b>C 1 2 Q 1/02</b> (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
<b>C 1 2 Q 1/68</b> (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
<b>GO 1 N 33/52</b> (2006.01)	GO 1 N 33/52	A
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53	D

請求項の数 26 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-505617 (P2003-505617)	(73) 特許権者	503454056
(86) (22) 出願日	平成14年6月10日(2002.6.10)		アイダホ リサーチ ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2004-534224 (P2004-534224A)		アメリカ合衆国, アイダホ州 83844
(43) 公表日	平成16年11月11日(2004.11.11)		-3003, モスクワ, ユニヴァーシティ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/018479		オブ アイダホ, モリル ホール 10
(87) 国際公開番号	W02002/103352		3
(87) 国際公開日	平成14年12月27日(2002.12.27)	(74) 代理人	100072349
審査請求日	平成16年12月7日(2004.12.7)		弁理士 八田 幹雄
審判番号	不服2007-3180 (P2007-3180/J1)	(74) 代理人	100110995
審判請求日	平成19年1月29日(2007.1.29)		弁理士 奈良 泰男
(31) 優先権主張番号	60/299,553	(74) 代理人	100114649
(32) 優先日	平成13年6月19日(2001.6.19)		弁理士 宇谷 勝幸
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 妊娠状態の決定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物の交配後の妊娠初期期間中の動物から集めた血液中の、M×タンパク質及びユビキチン交差反応性タンパク質 (ISG-17) から選ばれる妊娠誘導タンパク質の子宮外での発現のレベルを測定し、さらに動物における該タンパク質の発現のレベルを同種の妊娠していない動物のレベルと比較することを有する有蹄動物または有蹄動物以外の反芻動物の妊娠状態の決定方法。

【請求項 2】

妊娠誘導タンパク質はユビキチン交差反応性タンパク質 (ISG-17) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

妊娠誘導タンパク質は M×タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

動物は反芻動物である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

有蹄動物以外の反芻動物は、フタコブラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、及びビクーナから選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

動物は有蹄動物である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ヤク、水牛、バイソン、アンテロープ、及びシカから選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

有蹄動物は、雌ヒツジまたは雌ウシである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

動物は有蹄動物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

有蹄動物は、ウマまたはブタである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

タンパク質の発現レベルは、タンパク質をコードする mRNA のレベルを測定することによって測定される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 12】

mRNA の測定は、ノーザンブロット分析、スロット - ブロット分析、またはポリメラーゼ連鎖反応による、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

タンパク質の発現レベルは、タンパク質のレベルを測定することによって測定される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

タンパク質の発現のレベルの測定は、タンパク質への抗体の結合を評価することによるまたはタンパク質の機能に基づくアッセイによる、請求項 13 に記載の方法。 20

【請求項 15】

タンパク質の発現のレベルは、比色アッセイによって検出される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

タンパク質の発現レベルは、動物の血液細胞におけるタンパク質の発現を測定することによって測定される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

細胞は末梢血単核細胞である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

動物は、妊娠初期期間中の動物のタンパク質の発現のレベルが同種の妊娠していない動物のタンパク質の発現のレベルに比して上昇していない場合には妊娠していないと決定される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 19】

動物は、妊娠初期期間中の動物のタンパク質の発現のレベルが同種の妊娠していない動物のタンパク質の発現のレベルの 2 倍以上である場合には妊娠していると決定される、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

動物は、妊娠初期期間中の動物のタンパク質の発現のレベルが同種の妊娠していない動物のタンパク質の発現のレベルの 4 倍以上である場合には妊娠していると決定される、請求項 19 に記載の方法。 40

【請求項 21】

比較は、動物におけるタンパク質の発現のレベル及び妊娠しているまたは妊娠していないことが知られている動物の発現のレベルの並列比較(side-by-side comparison)による、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

比較は履歴コントロール(historical control)を用いることによる、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

妊娠認識シグナル伝達の期間中に行なわれる、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。 50

## 【請求項 2 4】

動物の交配から 1 2 ~ 3 0 日の間の期間中に行なわれる、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

動物の交配から 1 2 ~ 2 1 日の間の期間中に行なわれる、請求項 2 4 に記載の方法。

## 【請求項 2 6】

動物の交配から 1 8 ~ 2 1 日の間の期間中に行なわれる、請求項 2 5 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、動物の妊娠状態の決定方法に関するものである。特に、本発明は、有蹄動物以外の動物(non-ungulate)、有蹄動物、及び反芻動物の妊娠状態の決定方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

発明の背景

家畜の育成において、交配した動物の妊娠状態を正確に決定することは非常に重要である。特に、交配した動物が妊娠していないことを正確にかつ早期に同定することは経済上重要である。現在、動物、例えば、ウシを交配すると、妊娠状態が触診等の方法によって決定されるが、この方法は交配してから 3 0 日後までは正確な妊娠状態の決定ができない。ウシは約 2 1 日の発情周期を有するため、これは、現在利用されている方法では、妊娠しそこなった動物を交配する機会、即ち、交配を失敗した直後の発情期間を少なくとも 1 回失うであろうことを意味する。

## 【0 0 0 3】

これは、ウシの交配工業、特に酪農工業では重要な経済的な結果を有する。効率よく牛乳を生産する農業には、ウシが自然分娩してから 8 0 ~ 1 0 0 日で妊娠するようにうまく交配することが必要である。しかしながら、酪農用のウシは、人工受精では受精率が低く、平均で 1 回の妊娠に 2 . 5 ~ 3 回受精が必要である。したがって、酪農家が、交配に失敗した後の次の発情期間に動物を再交配する機会を失うことなく動物が妊娠していないことを正確に決定する方法に対する必要性がかなりある。

## 【0 0 0 4】

参考によって本明細書中に引用される、Sasser、米国特許第 4 , 7 0 5 , 7 4 8 号には、受胎動物によって生産されるタンパク質を検出することによって妊娠を決定する方法が開示される。この方法によって、ウシは、交配してから 2 7 日という初期に妊娠していることが決定された。Sasserは、次の発情期間が妊娠していないウシで始まるであろう時期前の妊娠の診断は開示しておらず、また、妊娠していないことの初期の決定をも開示していない。

## 【0 0 0 5】

有蹄動物の妊娠の母体の認識は、黄体退行シグナル、プロスタグランジン F 2 ( ( P G F 2 ) ) ; Yankey et al., Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. Journal of Endocrinology 170, R7-R11 (2001); Bazer et al., Regulation of endometrial responsiveness to estrogen and progesterone by pregnancy recognition signals during the peri-implantation period. In Molecular and Cellular Aspects of Peri-implantation Processes, pp 27-47. Ed S.K. Dey. Springer-Verlag, New York, Inc. (1995) の生産が減少または変化する、受胎動物による局所的な及び全身の遺伝子の調節を伴う。これは、受胎動物が生産する絨毛性性腺刺激ホルモンによる黄体 ( C L ) への直接的な黄体刺激効果を有する、霊長動物における妊娠の認識と反対である(Bazer et al. 1995)。有蹄動物における母体認識に関するシグナルは、妊娠の第 2 ~ 第 3 週のインターフェロン - タ

10

20

30

40

50

ウ(Interferon-tau) (IFN $\tau$ ) の受胎動物による分泌物である(Bazer et al., 1995; Godkin et al., J. Reprod. Fert. 65:141-150(1982))。IFN $\tau$  は、子宮内膜のエストロゲン及びオキシトシンレセプターの増加を防止し、PGF $_{2\alpha}$  のオキシトシン誘導性黄体退行パルス除去して、CL機能を維持する(Spencer et al., Endocrinology 136:4932-4944 (1995))。

#### 【0006】

IFN $\tau$  は、IFN $\alpha$ 、 $\beta$ 、及び $\gamma$  (Samuel, Virology 183:1-11 (1991))、ならびにさらに最近では、インターフェロン (Lefevre, F., et al., Biochimie 80:779-788 (1998))をも含む、タイプI IFN群のひとつである。タイプI IFNレセプターならびにヤヌスキナーゼ(JAK) - シグナルトランスデューサー及び転写の活性化因子(STAT)シグナル伝達経路を介したIFN $\tau$  のシグナル伝達(Stewart et al., Endocrinology 142:98-107 (2001))は、2', 5' - オリゴアデニレートシンターゼ(2',5' oligoadenylate synthetase)(Johnson et al., Biol. Reprod. 64:1392-1399 (2001))、2 - ミクログロブリン(Vallet et al., J. Endocrinol. 130:R1-4 (1991))、IFN調節因子1(Spencer et al., 1998)、ユビキチン交差反応性タンパク質(Johnson et al., Biol. Reprod. 62:622-627(2000))、及びMxタンパク質(Charleston and Stewart, Gene 137:327-331(1993); Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998))等のヒツジの子宮で数多くの遺伝子を誘導する。抗ウイルス応答におけるこれらのタンパク質の多くの機能の特徴がかなり明らかであるものの、妊娠初期中のその役割は明らかではない。

#### 【0007】

Mxタンパク質は、単量体のGTPaseであり、動物の種及びウイルスのタイプによって、ウイルスの複製の強力な阻害剤となる(Samuel, Virology 183:1-11 (1991))。ヒツジ、ウシ、ブタ、及びウマ等の、様々な種由来のMxタンパク質の配列がGenBankにより公的に利用でき、それぞれ、GenBankの受託番号X66093、U88329、M65087、及びU55216で寄託されている。Mxの抗ウイルス効果は、通常、マイナス鎖RNAウイルス(例えば、オルトミキソウイルス(orthomyxovirus))に対するものであるが、その発現はタイプI IFNレセプターを有する全ての細胞中で誘導され、細菌及びウイルス感染を区別するのに使用されてきた(Haller et al., Rev. Sci. Tech. 17:220-230 (1998))。近年、MxのmRNA及びタンパク質は、妊娠した雌ヒツジの子宮壁内で上皮(13日まで)から子宮筋層(15日まで)まで上昇することが示され、レベルは25日をとおして上昇したままだった(Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998))。加えて、MxのmRNAレベルは、子宮腔中にroIFN $\tau$  を注射したことに応答して黄体中で上昇した(Spencer et al., Biol. Reprod. 61:464-470 (1999))。

#### 【0008】

これらの結果から、IFN $\tau$  は、1)すべての子宮細胞型(即ち、上皮、間質及び子宮筋層)でならびにCLで直接作用する;または2)子宮の細胞及び卵巣等の他の器官でパラクリン/内分泌効果を有する物質(サイトカイン)を誘導する;または3)子宮粘膜の成分に影響を及ぼして、免疫系を循環した後、様々な子宮細胞及びCLに影響を与えることが示された。

#### 【0009】

しかしながら、妊娠状態を評価する試験として子宮組織中のMxタンパク質のレベルを測定することは実用的でない。侵襲性でかつ時間と手間がかかるプロセスである上、Mxの子宮レベルを測定するのに必要である子宮組織の破壊が妊娠に有害な影響を与える傾向がある。

#### 【0010】

家畜の妊娠または妊娠していないことを決定する信頼性の高い、再現性のある及び非侵襲性的方法に対する必要性がかなりある。

#### 【発明の開示】

#### 【0011】

発明の要約

10

20

30

40

50

2', 5' - オリゴアデニレートシンテターゼ、2 - ミクログロブリン、IFN調節因子1、ユビキチン交差反応性タンパク質(「インターフェロン刺激遺伝子因子17(interferon stimulated gene factor 17)」(「ISG-17」))としても知られている)、及びMxタンパク質などの、本明細書中では「妊娠誘導タンパク質(pregnancy-induced protein)」と称される、いくつかのタンパク質をコードする遺伝子の発現が妊娠の初めの1ヶ月の間、特定の動物で有意に増加することを発見した。さらに、妊娠誘導タンパク質の発現の増加が妊娠していない動物では起こらないことを発見した。

【0012】

多くの動物では、妊娠誘導タンパク質の発現の増加は、妊娠の母体認識に関するシグナルと称される、その存在の胚からの母親へのシグナルである、ホルモン、タイプIインターフェロンの胚による分泌によるものである。インターフェロンアルファ(IFN)、インターフェロンベータ(IFN)、インターフェロンオメガ(IFN)、インターフェロンドelta(IFN)、及びインターフェロンタウ(IFN)等の、様々なタイプIインターフェロンは、様々な種の胚によって分泌される。例えば、IFNは反芻動物で妊娠認識ホルモンとして分泌され、INFはブタで分泌される。ウマ及び他のウマ科等の、他の種では、妊娠誘導タンパク質であるMxタンパク質が妊娠初期中に子宮で検出できるものの、現在まで、タイプIインターフェロンのウマの受胎動物による分泌は示されていなかった。むしろ、ウマや受胎動物がタイプI IFNを産生しない他の種では、子宮が胚の存在に反応してタイプIインターフェロンを産生することが可能である。

【0013】

一実施態様においては、本発明は、動物の妊娠状態を決定する方法である。本発明のこの実施態様によると、妊娠初期中の妊娠誘導タンパク質(pregnancy induced protein)の発現のレベルを測定し、同種の妊娠していない雌動物における同じ期間中の妊娠誘導タンパク質の発現のレベルと比較する。好ましくは、測定、比較される妊娠誘導タンパク質は、タイプIインターフェロン誘導タンパク質である。最も好ましくは、妊娠誘導タンパク質は、Mxタンパク質またはISG-17である。

【0014】

本明細書中で使用される、「妊娠誘導タンパク質(pregnancy-induced protein)」ということばは、母体遺伝子によって発現し、その発現が妊娠の存在に反応して誘導されるタンパク質を意味する。妊娠誘導タンパク質は、このようなタンパク質が母体遺伝子によっても発現し、この母体の発現が妊娠の存在に反応して誘導される場合でなければ、受胎動物によって生産されるタンパク質とは区別される。

【0015】

本明細書中で使用される、「妊娠初期」ということばは、妊娠誘導タンパク質のレベルが同種の妊娠していない動物に比して妊娠動物では上昇する妊娠認識シグナル伝達(pregnancy recognition signaling)期間中または後の時期を意味する。交配がうまくいかない、即ち、妊娠しなかった動物が妊娠認識シグナル伝達の期間を経るか経ないかにかかわらず、「妊娠初期」ということばは、妊娠していない動物に関しては、交配がうまくいった場合には妊娠初期がある期間を意味するように本明細書中で使用される。具体的には、本発明の方法に関して使用される、妊娠初期の期間は、受胎してから最初の約1ヶ月末で終了する。

【0016】

本明細書中で使用される、「妊娠認識シグナル伝達の期間」ということばは、胚が、その分泌により胚の存在を母体に認識させる、タンパク質またはホルモンを分泌する間の期間を意味する。交配がうまくいかない、即ち、妊娠しなかった動物が妊娠認識シグナル伝達期間を経るか経ないかにかかわらず、このことばは、妊娠していない動物に関しては、交配がうまくいった場合には、生化学的なシグナル伝達が受胎動物及び子宮間で起こる期間を意味するように本明細書中で使用される。

【0017】

本発明によると、妊娠した動物は、同種の妊娠していない動物に比べて、妊娠認識シグ

10

20

30

40

50

ナル伝達の期間中などの、妊娠初期中の、Mxタンパク質またはISG-17などの、一以上の妊娠誘導タンパク質の発現のレベルが顕著に高くなるであろう。妊娠していない動物は、その動物が交配したか否かにかかわらず、この期間中に、Mxタンパク質等の、妊娠誘導タンパク質の発現の基準レベル付近を示すであろう。

【0018】

他の実施態様においては、本発明は、受胎動物が妊娠の母体の認識に関するシグナルとしてタンパク質またはホルモンを分泌する種の動物の生殖状態を決定するためのキットである。本発明のこの実施態様によると、キットは、試験サンプルを保持するための容器、試験サンプルと混合されると、オペレーターが、試験サンプル中の、Mxタンパク質またはISG-17等の、一以上の妊娠誘導タンパク質のレベルを目視で測定できるような、一以上の試薬、およびサンプル中のタンパク質のレベルを決定するための指示書を有する。好ましくは、キットは、オペレーターが、サンプル中の測定されたタンパク質のレベルに基づいて動物の妊娠状態を決定できるような指示書をさらに含む。

10

【0019】

本発明を、Mxタンパク質を参照しながら以下にさらに詳細に説明する。当業者は、下記開示が、詳細に説明されるMxタンパク質に加えて、2',5'-オリゴアデニレートシンターゼ、2-ミクログロブリン、IFN調節因子1、及びユビキチン交差反応性タンパク質等の、IFN誘導タンパク質などの、他のタイプIインターフェロン誘導タンパク質等の、他の妊娠誘導タンパク質に適用できることを理解するであろう。したがって、下記開示において、「Mxタンパク質」ということばに言及すると、他の妊娠誘導タンパク質を代わりに使用してもよい。

20

【0020】

図面の簡単な説明

図1は、雌ヒツジを人工授精してから26日目のPBMC(抹消血単核細胞)のMxmRNAのノーザンブロット分析である。レーン1~6は、妊娠した雌ヒツジを表わし、およびレーン8~13は、妊娠していない雌ヒツジを表わす。MxmRNAは、約2.5kbで泳動された。

【0021】

図2は、雌ヒツジを人工授精してから26日目のPBMCから単離された全細胞RNAのスロット-プロット分析の結果を示すグラフである。MxmRNAレベルは、D26で交配したが妊娠しなかった雌ヒツジに対して妊娠した雌ヒツジで約4倍より大きかった( $P < 0.01$ )。PSPB(妊娠に特異的なタンパク質B)レベル( )から、妊娠状態が確認され、これは誕生した子羊の数と相関した。(図2のCNTSは、化学発光ノーザンブロットの光子計測数を示す。)

30

図3は、人工授精してから0~30日での人工授精された妊娠した及び妊娠しなかった雌ヒツジのPBMC中のMxmRNAの発現を示す棒グラフである。(図3のCNTSは、化学発光スロット-プロットの光子計測数を示す。)

図4は、人工授精してから15及び18日の妊娠した及び妊娠しなかった雌ヒツジのPBMCのMxタンパク質発現のウェスタンブロット分析である。

【0022】

発明の詳細な説明

本発明は、妊娠初期中に増加したレベルの一以上の妊娠誘導タンパク質を分泌する動物種に適用できる。好ましくは、動物種は、妊娠の母体認識に関するシグナルとしてタイプIインターフェロンを分泌するものである。最も好ましくは、動物種は、妊娠の母体認識に関するシグナルとしてホルモンIFNを分泌するものである。これらの動物では、増加したレベルの、IFN等の、タイプIインターフェロンは、妊娠認識シグナル伝達の期間中Mxタンパク質の発現の促進を誘導する。本発明によると、妊娠初期中に、好ましくは交配後の妊娠認識シグナル伝達の期間中を含む期間中に、適当な動物で、Mxタンパク質等の、妊娠誘導タンパク質の発現が増加しないことは、動物が妊娠していないという陽性の表示である。これに対して、この期間中にタンパク質の発現が増加する、陰性の結

40

50

果は、動物が妊娠していることを示す。

【0023】

本願では、M×タンパク質等の、妊娠誘導タンパク質の発現が増加しないことを陽性結果と称し、タンパク質の発現が増加することを陰性結果と称する。農場主または牧場主または動物育種に携わる他の人に最も関心があるのは、妊娠ではなくむしろ、妊娠していないことを発見することであるため、最初は「陽性」及び「陰性」結果ということばの一般的な使用とは逆であるように見える、この用語が本明細書中では使用される。動物が妊娠していると決定されたら、妊娠が終了した兆候を探すために雌を見る以外には、確かに妊娠していることを確かめる作業をさらに行なうことはない。これに対して、動物が妊娠していないと決定されたら、次の発情の開始についてさらに評価されなければならない、さらに再度交配させるであろう。したがって、確実に妊娠させるために動物に労力がさらに払われる起動力を提供するのは妊娠をしていないものを見つけることである。

10

【0024】

上述したように、本発明は、IFN等のタイプインターフェロンが妊娠の母体認識に関する単一のシグナルまたは一以上のシグナルのうちの一である種の動物等の、妊娠初期中に増加したレベルの妊娠誘導タンパク質を産生する種に属する雌動物に適用できる。本発明の方法に適する動物としては、有蹄動物及び有蹄動物以外の反芻動物がある。有蹄動物は、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ヤク、水牛、及びバイソン等の、反芻動物であってもよい。また、アンテロープ、ガゼル、ヘラジカ、トナカイ、ムース、オオツノヒツジ、キリン、及びウシ、ヒツジ、及びヤギ科の他のものなどの家畜化されていない有蹄動物もまた、本発明に適する有蹄の反芻動物に含まれる。本発明の方法に適する有蹄動物以外の反芻動物としては、フタコブラクダ及びヒトコブラクダならびにラマ、アルパカ、及びビクーナ等の他のラクダ科(camelids)が挙げられる。本発明に適する反芻動物以外の有蹄動物としては、家畜化された及び家畜化されていないブタ及びウマがある。本発明の方法に適する動物には、有蹄動物及び有蹄動物以外の反芻動物以外の動物が包含される。例えば、ヒト等の霊長類、さらにはイヌ及びネコが、本発明の方法に適すると考えられる。

20

【0025】

本発明の方法によると、交配後の適当な期間中に、動物を、以降、M×タンパク質で具体的に説明される、妊娠誘導タンパク質の増加した発現の、存在に関して、またはより正確には存在しないことに関して試験される。試験は、M×タンパク質が発現する細胞を利用してまたはM×タンパク質が検出される体液中で行なわれてもよい。

30

【0026】

動物がM×タンパク質の発現を増加するまたは増加しないかを決定する際に、妊娠していないことが知られている動物における発現のレベルとの比較がなされる。この比較は、例えば、交配されたが妊娠状態が不明である動物からの試験サンプルの並列比較(side-by-side comparison)を行なうことによってなされてもよい。またはおよび好ましくは、比較は、交配されたが妊娠状態が不明である動物からのサンプルを試験し、このサンプル中のM×タンパク質のレベルを妊娠していない動物に存在することが知られているM×タンパク質のレベルと比較する、すなわち履歴コントロール(historical control)を用いることによってなされてもよい。

40

【0027】

本発明を、抹消血単核細胞(PBMC)でのM×タンパク質の向上した発現の測定について本明細書で詳述する。しかしながら、血流中に存在する他の有核細胞等の、M×タンパク質を発現するいずれの細胞がPBMCの代わりに使用されてもよい。同様にして、本発明による向上したM×の発現は、乳汁、唾液、尿または鼻、眼、若しくは膺の分泌物、または全血、血漿若しくは血清等の体液の分析によって測定されてもよい。

【0028】

ほとんどの種での母体認識の期間はほとんど同時、例えば、雌ヒツジでは交配してから12~14日目及び雌ウシでは15~18日目に起こるが、妊娠の母体認識が起こる胚のシグナル伝達の期間は異なる種によって幾分異なる。したがって、本発明の方法が有効に

50

実施される交配後の実際の日には異なるであろう。例えば、家畜化されたヒツジでの妊娠シグナル伝達の母体認識の期間は、具体的には、交配してから約11日から始まり、約21日目まで続く。ウシでは、この期間は、具体的には、交配してから約13日から始まり、約35日目まで続く。

【0029】

試験サンプルにおけるM×タンパク質発現のレベルをM×タンパク質発現の基準の（妊娠していない）レベルと比較する際には、基準より具体的に2倍以上高いM×タンパク質発現が陰性試験結果であり、即ち、その動物は妊娠していないとは決定されない。一般的に、妊娠認識シグナル伝達の期間中のM×タンパク質発現のピークレベルでは、妊娠した動物は、基準の4若しくは5倍、またはそれ以上までのM×タンパク質発現のレベルを有するであろう。

10

【0030】

本発明によると、方法は、妊娠誘導タンパク質のレベルが同種の妊娠していない動物と比較して妊娠している動物でもはや上昇しなくなるまでシグナル伝達の期間の始まりから開始していずれの時期に行なってもよい。妊娠した動物が妊娠していない動物に比べて高いM×タンパク質発現を有するのはこの期間中である。ゆえに、ヒツジやウシでは、妊娠状態を決定するためにM×タンパク質発現のレベルを比較するのに好ましい期間は、交配後12～30日の間である。より好ましい期間は、交配後12～21日の間である。最も好ましい期間は交配後15～21日の間であり、最も好ましい時期はウシでは18日であり、ヒツジでは15日である。

20

【0031】

M×タンパク質発現のレベルは、この測定がなされるいずれの方法によって測定されてもよい。適当な方法としては、ELISA試験、M×タンパク質の機能に基づくアッセイ、またはウェスタンブロットによるなど、M×タンパク質自身を検出することがある。また、適当な方法としては、ノーザンブロット、スロットブロット、またはPCRによるなど、M×mRNAのレベルの増加を検出することがある。好ましい実施態様においては、M×タンパク質発現のレベルは、ヒト家庭での妊娠診断キットで使用される方法と同様の、例えば、M×タンパク質への抗体の結合に基づいた、比色アッセイによってサンプル中に存在するM×タンパク質のレベルを検出することによって測定される。

【0032】

本発明の方法は、動物が妊娠していないことを予想どおりに決定する正確で再現性のある試験であり、また、動物が妊娠していることを決定するのに同様に使用されてもよい。必ずしも他の妊娠誘導タンパク質ではそうではないが、特にM×タンパク質に関しては、動物が妊娠していることを誤って示す、M×タンパク質発現のレベルが増加する偽陰性結果の源が動物が重篤なウィルス感染にかかっている場合にある。

30

【0033】

本発明のキットは、「免疫測定(immunometric)」または「サンドイッチ」アッセイとして知られているもの等の、酵素様免疫吸着法(ELISA)に基づくことが好ましい。このようなアッセイは、リガンド(抗原等)を、干渉しないようにかつ異なるエピトープ部位でリガンドと複合体を形成する2以上のレセプター分子(抗体等)で「サンドイッチ」することを含む。このようなアッセイの例は、David et al.、米国特許第4,486,530号に記載される。または、キットは、化学発光アッセイ、強化発光アッセイ(enhanced luminescence assay)、及びラジオイムノアッセイに基づくものであってもよい。好ましい実施態様においては、キットは、M×タンパク質等の、有益なタンパク質のエピトープに結合する抗体が結合する、スライドまたは複数の試験ウェル等の、試験表面を有するパッケージ、タンパク質の第二のエピトープに結合する第二の標識された抗体を有する容器、タンパク質の基準濃度を有する標準サンプルを有する容器、標識された第二の抗体と接触すると、存在するタンパク質の相対的な量が目視できるような試薬、および試験サンプルが妊娠または妊娠していない状態を示すM×タンパク質の量を含むかどうかを決定するためのキットの使用に関する指示書を有する。

40

50

## 【0034】

コントロールに比べた試験サンプル中の、M×タンパク質等の、妊娠誘導タンパク質の相対的な量を測定することによる妊娠状態の決定のための本発明のキットは、多くの様々な様式で配合されてもよく、これは本明細書の記載を読めば当業者には明らかであろう。本発明のキットのこれらの様々な配合は本発明に包含されるものである。

## 【0035】

本発明を、下記詳細な実施例でさらに記載するが、本発明を限定するものではない。実施例では、M×タンパク質を参照しながら本発明の方法を説明する。しかしながら、本発明の方法は、他の妊娠誘導タンパク質にも適用できる。

## 【0036】

## 実施例1 動物モデル

60匹のU.S. Sheep Experiment Station(USSES, Dubois ID)の成熟した、顔の白い雌ヒツジ(white-faced, ewe)を、同調させて、経子宮頸部による(transcervical)または腹腔鏡による人工授精(「AI」)のいずれかによって交配した。腹腔鏡によるAIは、Stellflug et al., J. Anim. Sci. 79:568-573 (2001)に開示される方法に従って行なった。人工授精の日を0日(D0)と称した。AIから26日目(D26)に、血液(10ml)を、EDTA含有真空管(vacutainer tube)(Sherwood Medical, St. Louis MO)中に頸静脈穿刺によって集めた。PBMCを以下の実施例2に記載されるのと同様にして単離した。妊娠を、妊娠に特異的なタンパク質B(PSPB; Biotracking Inc, Moscow ID)について血清をアッセイすることによって決定し、子羊が生まれた日(lambing date)及び生まれた子羊の数を記録した。

## 【0037】

## 実施例2 PBMCの単離

血液を処理するまで氷上に保存した。サンプルを、4で300×gで20分間、遠心した。パフコートを除き、5に対して1の割合で、0.87% Tris-NH<sub>4</sub>Cl溶解バッファーに再懸濁した。サンプルを37で5分間インキュベートし、300×gで10分間、遠心した。上清を除去し、ペレットを10mlの1×PBSで洗浄し、300×gで10分間、遠心した。上清を除去した後、細胞ペレットをタンパク質の抽出のために-80で凍結した、または2ml TRIzol(Life Technologies, Grand Island NY)で溶解して、RNAの抽出のために-80で貯蔵した。

## 【0038】

## 実施例3 RNAの抽出、ノーザン及びスロット-プロット分析

全細胞RNAを、製造社の指示に従ってTRIzolを用いて抽出した。RNAを、A260:280比によって定量した。PBMC中のM×転写物の大きさ及び数を確立するために、RNA(5µg)を1%アガロース/0.615Mホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、キャピラリープロットティング(capillary blotting)によってナイロン膜(Nytran, Schleicher & Schuell, Keene NH)に移した。PBMC中のM× mRNAレベルの定量を目的として、RNA(5µg)を真空濾過(Minifold II, Schleicher & Schuell, Keene NH)によってナイロン膜に移した。プロットを、ノース2サウスハイブリダイゼーションキット(North2South Hybridization kit)(Pierce, Rockford IL)を用いてピオチン標識ヒツジM×アンチセンスcRNAプローブ(Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998))で調べ、化学発光シグナルをバイオ-ラッド フルオール-S マルチイメージャーシステム(Bio-Rad Fluor-S Multilmager system)及びクオンティティワンソフトウェア(Quantity One software)(Bio-Rad, Hercules CA)を用いて定量した。スロット-プロットをはずして、ヒツジの18srRNA cDNAプローブで再度調べて、RNAローディングでの変動を修正した。

## 【0039】

ノーザンプロット分析では、図1に示されるように、妊娠したおよび交配したが妊娠しなかった雌ヒツジから単離されたPBMC中に、単一の、約2.5kDのバンドが検出され、これはヒツジの子宮のM× cDNAの既知のサイズと一致する(Charleston and St

10

20

30

40

50

ewart, Gene 137:327-331(1993); Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998))。

【 0 0 4 0 】

A I 後の D 2 6 に集められた P B M C から単離された全細胞 R N A の、図 2 に示されるような、スロットプロット分析から、交配したが妊娠しなかった ( $n = 26$ ) 雌ヒツジに対して妊娠した雌ヒツジでは M x m R N A レベルが 4 倍増加したことが示された ( $P < 0.01$ )。加えて、複数個 (3 個または 4 個;  $n = 10$ ) を有する雌ヒツジは、1 個 ( $n = 10$ ) または 2 個 ( $n = 9$ ;  $P < 0.05$ ) を有するものに比べて M x m R N A レベルがより高かった。P S P B (妊娠に特異的なタンパク質 B) アッセイの結果から妊娠の状態が決定され、さらに従来報告されているのと同様に、P S P B のレベルが生まれた子羊の数と相関した (Willard et al., J. Anim. Sci. 73:960-966 (1995))。

10

【 0 0 4 1 】

実施例 4 ヒツジの妊娠初期中の M x タンパク質 m R N A の経時的な発現

第二の研究では、図 3 に示されるように、ヒツジの妊娠初期中の M x m R N A の経時的な発現を調べた。34 匹の成熟したサフォーク雌ヒツジ (Suffolk ewe) を、同調させて、腹腔鏡による A I によって交配した。血液 (20 ml) を D 0、及び D 9 ~ D 30 までは 3 日毎に頸静脈穿刺によって集め、P B M C を単離した。妊娠を、D 30 でリアルタイム超音波検査及び P S P B アッセイによって確認した。図 3 に示される結果は、すべての雌ヒツジの代表的なサブセットであり、受精してからはじめの 30 日の間の 4 匹の妊娠したおよび 4 匹の交配したが妊娠しなかった雌ヒツジの結果を示すものである。これから、1 回のプロットですべての複製物が分析でき、プロット間のシグナル強度に関連する問題を排除できた。結果から、妊娠した雌ヒツジで増加した M x m R N A レベルが D 15 で始まる ( $P < 0.01$ ) ことが示された。レベルは D 21 でピークに達し、それ以降は徐々に減少した。D 30 で、妊娠した雌ヒツジでの M x レベルは、交配したが妊娠しなかった雌ヒツジに比べて 2 倍高いままであった ( $P < 0.01$ )。

20

【 0 0 4 2 】

実施例 5 タンパク質の単離およびウェスタンプロット分析

全細胞タンパク質を、製造社の指示に従って、M - P E R 試薬 (M-PER reagent) (Pierce, Rockford IL) を用いて抽出した。サンプルのタンパク質濃度を、ウシ血清アルブメン (albumen) を標準物質として使用した B C A アッセイ (Pierce, Rockford IL) によって定量した。D 15 及び D 18 で妊娠したおよび交配したが妊娠しなかった雌ヒツジから単離された P M B C のタンパク質 (8  $\mu$ g / サンプル) を 12% S D S - P A G E によって分離し、電気泳動によりニトロセルロース膜 (BA83, Schleicher & Schuell, Keene NH) に移した。25 で 2 時間、トリス緩衝化生理食塩水 (Tris-buffered saline) 及び T w e e n 20 (T B S T) における 5% 脱脂粉乳中で非特異的な結合部位をブロックした後、膜を、4 で一晩、ポリクロ - ナルウサギヒツジ M x ペプチド抗血清 (#90618-2; 0.7  $\mu$ g/ml) の 1 : 1000 希釈液と共にインキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗ウサギ I g G (0.8  $\mu$ g/ml) を、第 2 の抗体として 1 : 200, 000 の希釈率で使用した。化学発光シグナルを、ウェスト フェムト マキシマム センシティビティー サブストレート (West Femto Maximum Sensitivity Substrate) (Pierce, Rockford IL) を用いて発色させ、フルオル - S マルチイメージャーシステム (Fluor-S MultiImager system) 及びクオンティティー ワンソフトウェア (Quantity One software) を用いて定量した。

30

40

【 0 0 4 3 】

図 4 に示されるように、M x タンパク質 (約 75 kDa) は D 15 または D 18 のオープンな (妊娠していない) 雌ヒツジのいずれでも検出されなかったが、双方の日にちで妊娠した雌ヒツジの P B M C ではかなりアップレギュレートされた。別の 2 つのバンド (約 48 及び 36 kDa) が妊娠した雌ヒツジの P B M C で検出された。

【 0 0 4 4 】

実施例 6 分析

化学発光シグナルを S A S の G L M 方法 (Version 8.1, SAS Inc, Gary NC) を用いて分

50

析した。このモデルは、必要であれば、状態（妊娠対交配したが妊娠しなかった）、状態に入る(nested within status)雌ヒツジ、日数（0、9、12、15、18、21、24、27、及び30）および適当な相互作用を含んだ。F検定での誤差項は、誤差に関する平均2乗の期待値にしたがった。18s rRNAに関するシグナルは、モデルの同時変量(covariate)として泳動して、ローディングでの変動を修正した。結果は、調節された最小二乗手段(adjusted Least Squares Means) (LSM)及びこみにした標準誤差(pooled standard error)として報告した。

#### 【0045】

##### 実施例7 ウシ

33匹の家畜用雌ウシを人工授精によって交配し、Mx mRNAのレベルを上記実施例2及び3に記載される方法によって測定した。15日目では、Mx mRNAのレベルは、後に妊娠したことが決定した雌ウシでおよび後に妊娠していなかったことが決定した雌ウシでほぼ同じであることが分かった。18日目では、Mx mRNAのレベルは、後に妊娠していなかったことが決定した雌ウシで検出された値の約3倍と、後に妊娠したことが決定した雌ウシでは顕著に増加していることが分かった。

#### 【0046】

これらの結果から、妊娠認識シグナル伝達に応答してMx遺伝子発現が迅速にかつ持続して活性化されることが示され、さらに、IFNの局所的な効果に加えて、ヒツジ及びウシでは迅速な全身応答があることが示される。加えて、Mx発現は、妊娠が確立されない際（交配したが妊娠しなかった動物）にはPBMCで増加しなかった。IFNによる妊娠認識シグナル伝達は従来子宮内膜の遺伝子発現の局所的な調節(Stewart et al., Endocrinology 142:98-107 (2001); Johnson et al., Biol. Reprod. 64:1392-1399 (2001); Vallet et al., J. Endocrinol. 130:R1-4 (1991); Spencer et al., Biol. Reprod. 58:1154-1162 (1998); Johnson et al., Biol. Reprod. 62:622-627 (2000); Charleston and Stewart, Gene 137:327-331(1993); Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998); Spencer et al., Biol. Reprod. 61:464-470 (1999))およびPGF<sub>2</sub>の黄体退行パルス除去するためのエストロゲン及びオキシトシンレセプター発現の抑制からのみ起こると考えられたので、これらの知見は重要である。したがって、本発明の方法およびキットは、家畜の妊娠していない、及び妊娠していることの決定の新規でかつ経済上重要な方法を提供するものである。

#### 【0047】

本願で列挙されたすべての文献及び特許は、参考によって本明細書中に引用される。

#### 【0048】

本明細書に記載される本発明のさらなる修飾、使用、および用途は、当業者には明らかであろう。このような修飾は下記特許請求の範囲に包含されるものである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0049】

【図1】雌ヒツジを人工授精してから26日目のPBMC（抹消血単核細胞）のMx mRNAのノーザンプロット分析である。レーン1～6は、妊娠した雌ヒツジを表わし、およびレーン8～13は、妊娠していない雌ヒツジを表わす。Mx mRNAは、約2.5kbで泳動された。

【図2】雌ヒツジを人工授精してから26日目のPBMCから単離された全細胞RNAのスロット-プロット分析の結果を示すグラフである。Mx mRNAレベルは、D26で交配したが妊娠しなかった雌ヒツジに対して妊娠した雌ヒツジで約4倍以上であった（ $P < 0.01$ ）。PSPB（妊娠に特異的なタンパク質B）レベル（ ）から、妊娠状態が確認され、これは誕生した子羊の数と相関した。（図2のCNTSは、化学発光ノーザンプロットの光子計測数を示す。）

【図3】人工授精してから0～30日での人工授精された妊娠した及び妊娠しなかった雌ヒツジのPBMC中のMx mRNAの発現を示す棒グラフである。（図3のCNTSは、化学発光スロット-プロットの光子計測数を示す。）

10

20

30

40

50

【図4】人工授精してから15及び18日の妊娠した及び妊娠しなかった雌ヒツジのPBM CのMxタンパク質発現のノーザンブロット分析である。

【図2】

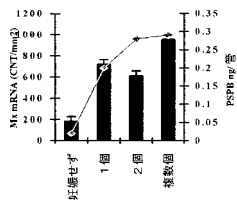


図2

【図3】

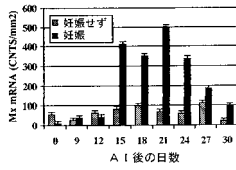


図3

【 図 1 】

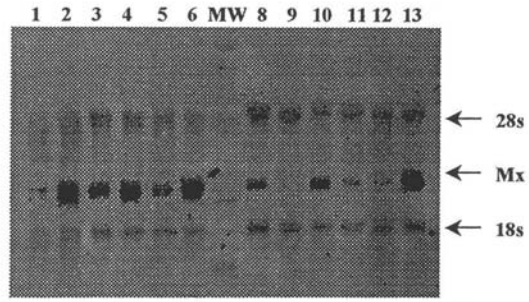


図 1

【 図 4 】

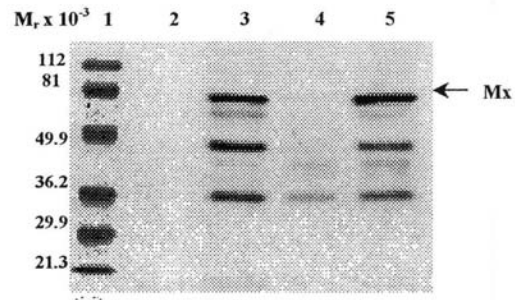


図 4

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/566 (2006.01) G 0 1 N 33/53 M  
G 0 1 N 33/566

(72)発明者 オット, トロイ, エル.  
アメリカ合衆国, アイダホ州 8 3 8 4 3, モスクワ, ヴァンダル ドライブ 2 1 2 1

合議体

審判長 秋月 美紀子

審判官 松本 征二

審判官 岡田 孝博

(56)参考文献 Endocrinology, Vol. 138, No. 11 (1997) p. 5079 - 508  
2  
BIOLOGY OF REPRODUCTION 61, 464 - 470 (1999)  
BIOLOGY OF REPRODUCTION 61, 312 - 318 (1999)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N33/48-33/98

专利名称(译)	如何确定怀孕状况		
公开(公告)号	<a href="#">JP4216184B2</a>	公开(公告)日	2009-01-28
申请号	JP2003505617	申请日	2002-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	爱达荷研究基金会		
申请(专利权)人(译)	爱达荷研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	爱达荷研究基金会		
[标]发明人	オットロイエル		
发明人	オット, トロイ, エル.		
IPC分类号	G01N33/68 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/48 C12Q1/6876		
CPC分类号	C12Q1/6876 C12Q2600/158 G01N33/689 G01N2333/4715 G01N2800/368		
FI分类号	G01N33/68 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/52.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
代理人(译)	宇谷 胜幸		
助理审查员(译)	松本 征二 冈田孝弘		
优先权	60/299553 2001-06-19 US		
其他公开文献	JP2004534224A JP2004534224A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于确定动物在交配后是否未怀孕或怀孕的方法和试剂盒。在需要妊娠状态信息的动物中测量妊娠诱导蛋白的表达水平，并将其水平与非妊娠动物的水平进行比较。

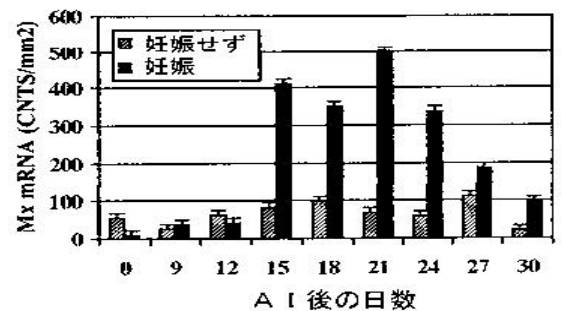


図 3