

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5453443号
(P5453443)

(45) 発行日 平成26年3月26日 (2014.3.26)

(24) 登録日 平成26年1月10日 (2014.1.10)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1
GO 1 N 33/564 (2006.01)	GO 1 N 33/564 Z

請求項の数 8 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2011-533686 (P2011-533686)	(73) 特許権者	508159123
(86) (22) 出願日	平成21年10月22日 (2009.10.22)		ユストゥス-リービッヒ-ユニヴェルジテ ート・ギーセン
(65) 公表番号	特表2012-507024 (P2012-507024A)		ドイツ連邦共和国、35390 ギーセン 、ルートヴィヒストラーセ、23
(43) 公表日	平成24年3月22日 (2012.3.22)	(74) 代理人	110000578
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/063878		名古屋国際特許業務法人
(87) 国際公開番号	W02010/049340	(72) 発明者	マインハルト アンドレアス
(87) 国際公開日	平成22年5月6日 (2010.5.6)		ドイツ連邦共和国 35037 マーブル ク アム グラッセンベルク 123
審査請求日	平成24年10月19日 (2012.10.19)	(72) 発明者	フィヤク モニカ
(31) 優先権主張番号	102008053503.6		ドイツ連邦共和国 35037 マーブル ク ギッセルベルガー シュトラーセ 2
(32) 優先日	平成20年10月28日 (2008.10.28)	審査官	加々美 一恵
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精巢抗原に対する自己抗体検出のための免疫検査

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

男性哺乳類の生体試料中、男性哺乳類の炎症関連の生殖能力障害と関連する精巢抗原に対する自己抗体の検出および特異的定量的ための免疫検査方法であって、前記免疫検査方法は、特異的な精巢抗原に対して前記自己抗体を結合することを含む

ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の免疫検査方法であって、

前記精巢抗原が ER - 60 であって前記自己抗体として ER - 60 自己抗体が特異的に判定されること、及び前記精巢抗原がトランスフェリンであって前記自己抗体としてトランスフェリン自己抗体が特異的に判定されることのうちの少なくとも一方を含む

ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は請求項 2 に記載の免疫検査方法であって、

精巢抗原に対する自己抗体の前記検出は、放射免疫測定法 (RIA) または酵素結合免疫吸着法 (ELISA) によって行われる

ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか一項に記載の免疫検査方法であって、

精巢抗原に対する自己抗体の前記検出は、テストストリップ上で行われる

10

20

ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか一項に記載の免疫検査方法であって、
精巢抗原に対する自己抗体の決定された含有量は、精巢抗原に結合する自己抗体の結合
尺度に基づいて設定される基準値と比較される
ことを特徴とする免疫検査方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 請求項 5 のいずれか一項に記載の免疫検査方法であって、
前記検査を行うことは、
精巢抗原に対する自己抗体の含有量が判定される、男性哺乳類からの血液試料を少なく
とも含む生体試料を、吸着された特異的な精巢抗原と接触させることと、
非吸着成分を取除くための少なくとも 1 回の洗浄ステップと、
I g G 抗体の調製物を用いて前記吸着された抗原に結合した精巢抗原に対する自己抗体
の前記検出であって、前記 I g G 抗体の調製物は、調査される前記男性哺乳類に種特異的
であり、精巢抗原に対する自己抗体に種特異的に結合することができ、そして、ビオチン
- ストレプトアビジン - パーオキシダーゼまたはビオチン - ストレプトアビジン - アルカ
リフォスファターゼの反応のカスケードにより検出されるような方法でビオチン標識され
る、I g G 抗体の調製物を用いて前記吸着された抗原に結合した精巢抗原に対する自己抗
体の前記検出と
を含むことを特徴とする免疫検査方法。 10

【請求項 7】

請求項 1 ~ 請求項 6 のいずれか一項に記載の免疫検査方法を行うキットであって、
前記キットは、
担体に吸着された特異的な精巢抗原と、
調査される前記男性哺乳類に種特異的であり、精巢抗原に対する自己抗体に種特異的に
結合することができ、そして、ビオチン - ストレプトアビジン - パーオキシダーゼまたは
ビオチン - ストレプトアビジン - アルカリフォスファターゼの反応のカスケードにより検
出されるようにビオチン標識される、I g G 抗体の調製物と
を含むことを特徴とするキット。 20

【請求項 8】

請求項 7 に記載のキットであって、
前記特異的な精巢抗原は、E R - 6 0 およびトランスフェリンのうちの少なくとも一方
である
ことを特徴とするキット。 30

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、男性(雄)哺乳類における免疫学的な原因、及び感染症に関係した不妊の形態
に大いに関連性があるとして同定された精巢抗原に対する自己抗体の検出のための免疫検
査に関する。免疫検査は、精巢抗原に対する自己抗体の上昇と関連される病気、例えば精
巢及び関連する男性生殖器官の無症状、症候性の炎症も、炎症関連の男性生殖能力障害、
の診断及び治療管理に利用される。 40

[技術水準]

ドイツではおおよそ 7 組に 1 組の夫婦が不随意の子供がいない病気に冒されており、そ
の原因は男性と女性との間にほぼ等しく分けられる。男性側においては、特発性不妊症(
約 3 0 %)に加えて、泌尿生殖器感染症または他の免疫因子(両者を合わせると 1 2 - 1 5
%)も生殖能力を制限する最も重要な原因と見なされている。急性全身性炎症性疾患及び
慢性炎症性疾患と同様に男性の生殖器官の局部感染及び炎症も、いずれも単独でも男性生
殖能力障害の関連する原因としても、いつも重視されている。精巢において慢性炎症性変
化(精巢炎症または精巢炎)は精子形成の停止及び精子の数と質に本質的な変化をもたらし 50

得る。例えば米国でおよそ年間発生が60万件を超える精巣上体の炎症(精巣上体炎)は、しばしば睾丸副睾丸炎として結合して現れる。生殖能力障害の臨床的関連については、精子不動化抗体および/または精子凝集化抗体もある。免疫学的な原因による男性不妊症の関連性及びその影響の評価は、具体的に、無症候性の進行を伴う多数の事例が予想されるという事実によって阻まれる。

【0002】

輸精管の感染の診断は病原、射出精液における白血球および/または炎症メディエーターの上昇した発現や付属腺の減少した分泌活性の検出に基づかれており、満足させるものではない。精巣の無症候性炎症障害は、通常精巣生検によってのみ確実に診断可能であり、従って往々にして生殖能力障害の原因または寄与因子は認識されないままである。炎症は特発性不妊症の多数の患者全体の一部の原因ともなり、炎症性の原因が、事前に推定されたよりも高く関連性があると結果として考えられる。

10

【0003】

そのため、精巣生検の必要性を減らすために、精巣および関連の男性生殖器官において、例えば無症状、症候性の炎症も、炎症関連の男性生殖能力障害の特定のために、体液または生体試料を使用する適切な検査に対する要求が存在する。顆粒球エラストラーゼおよびIL-6は、残念ながら両者とも非特異的であり、従ってマーカーとしての利用には適さない。現在に至るまで、炎症関連の男性生殖能力障害の特異的な検出、ひいてはアッセイに使用することができる好適なマーカーは知られていない。

[課題]

本発明の課題は、炎症関連の男性生殖能力障害の特異的な検出に適したマーカーを提供するとともに、このマーカーの検出のための非侵襲的な方法を生体試料において実施することを容易にすることである。さらに本発明の課題は、この方法を実施するための検査キットを提供することである。

20

[課題の解決法]

本発明によれば、この課題は、特許請求の範囲に従って、生体試料中で炎症関連の男性生殖能力障害に特異的な精巣抗原に対する自己抗体の検出および特異的定量的ための免疫検査によって解決される。

【0004】

この独自の検査によって、驚くべきことに、男性の免疫学的原因の不妊症の形態に高い関連性をもつ精巣抗原に対する特異的な自己抗体が生体試料中で確認された。

30

これらの結果は、種々の形態の精巣炎症を持つ患者からの例えば血清などのような生体試料が、非常に多くの場合ER-60自己抗体の高力価およびトランスフェリン抗体の力価を示し、健康な被験者あるいは(例えばセルトリ細胞単独症候群、精子形成の停止、オリゴ-アセノ-テラトゾスペルミア(Oligo-Asthenozoospermie)といった)非炎症性の精子形成不全と区別することができることを実証している。この目的のために通常の精子形成患者の精巣抽出物は、当業者にとっては周知の技術である2D-SDS-PAGEによって分離され、例えばジャーナル オブ パソロジー(Journal of Pathology)(2005;207,127-138)に開示されたようにニトロセルロース膜に移される。プロットメンブレンは、女性からの、または健康な被験者からのコントロール血清、または男性病学検査後種々の病巣の形態または稀ではあるが完全に発展した精巣の炎症と診断された患者からの血清サンプルでインキュベートされる。自己反応性スポットは質量分析法(MALDI-MS)を使用して調査され、しばしば抗体が炎症関連の不妊症を持つ男性の血清中に向けられて蛋白質が同定された。

40

【0005】

【表 1】

陽性血清数/全血清数 (反応度%)	同定された蛋白質
12/13 (92%)	ジスルフィドイソメラーゼER-60 (異名 Erp60、Erp57)
8/13 (61%)	トランスフェリン(シデロフィリン)

10

【0006】

コントロール血清は同定された蛋白質スポットとは反応しなかった。

意外なことに、92%のジスルフィドイソメラーゼER-60蛋白質(異名: Erp57、p58、登録名: PDIA3#HUMAN)および61%のトランスフェリン(シデロフィリン)のそれぞれは、両者とも精巣炎症の異なる形態を持つ患者から血清と高い特異的な自己反応性を示した。

【0007】

この理由から、蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER-60(異名: Erp57、p58、登録名: PDIA3#HUMAN)およびトランスフェリン(シデロフィリン)は男性哺乳類における精巣炎症の特異的なマーカーとして同定された。

20

【0008】

これらのマーカー蛋白質の核酸配列および/またはアミノ酸配列を利用して、免疫検査が提供され、免疫検査により、生体試料中で炎症性の男性生殖能力障害に関連した精巣抗原に対する自己抗体、具体的にはER-60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体、の特異的な検出が可能になる。

【0009】

生体試料中で炎症性の男性生殖能力障害に関連した精巣抗原に対する自己抗体の検出および特異的定量のための免疫検査は、精巣抗原に対する自己抗体を、具体的には、ER-60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体を、特異的な精巣抗原に、具体的にはER-60またはトランスフェリンに結合することを含んでいる。本発明による検査は、無症状の炎症の診断および治療管理だけでなく、精巣および関連する男性哺乳類の生殖器官の症候的に進行する炎症の診断および治療管理のためにも用いられる。

30

【0010】

精巣抗原に対する自己抗体の含有量、具体的には、精巣炎症の種々の形態で非常に頻繁に生じるER-60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体の含有量は、この目的のために男性哺乳類からの生体試料で決定される。精巣抗体に対する自己抗体の決定された含有量は次に基準値と比較される。

【0011】

本発明の好ましい実施態様においては、本発明による検査は、生体試料、具体的には血清、中にER-60自己抗体の含有量の決定を含む。この目的のために、精巣抗原、具体的にはER-60蛋白質、は遺伝子組み換え型でマーカーとして供給される。本発明による検査は、ER-60蛋白質の核酸配列に基づいて遺伝子組み換えの手段によって、一般的に知られている遺伝子工学手法、例えば、大腸菌の発現及び最先端の例えばHPLC精製を用いることによって、行われる。

40

【0012】

本発明によれば、蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER-60(同体異名: Erp57、Erp58、登録名: PDIA3#HUMAN)の核酸配列に加えて、翻訳された蛋白質の機能がER-60自己抗体の結合によって実質的に影響されないという条件で、核酸配列の僅かの改変、付加、欠失及び/又は置換の結果として生じる蛋白質も含まれる。

【0013】

50

本発明によれば、蛋白質ジスルフィドイソメラーゼ E R - 6 0 の核酸配列に加えて、異名や相同の蛋白質、例えば E R p 5 7、p 5 8、登録名：P D I A 3 # H U M A N など、も含まれる。

【 0 0 1 4 】

生体試料は哺乳類、具体的にはヒト、から得られるあらゆる生体物質であり、あらゆる生体物質は、例えば、全血液、血清または血漿、清漿、脊髄液、腹膜液、唾液、涙液または尿液などのような体液、さらに生検物質または組織といった、自己抗体を含む。

【 0 0 1 5 】

生体試料に存在する精巢抗原に対する自己抗体、具体的には E R - 6 0 自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体は、それぞれの精巢抗原、具体的には E R - 6 0 蛋白質およびトランスフェリンにそれぞれ特異的に結合し、続いて適切な検出方法を用いて検出することによって同定される。

10

【 0 0 1 6 】

本発明の好ましい実施態様によれば、精巢抗原に対する自己抗体の決定、具体的には E R - 6 0 自己抗体の決定および/またはトランスフェリン自己抗体の決定は、免疫学的手段により行われる。特に免疫細胞化学的手段として放射免疫測定法 (R I A) による決定、または酵素結合免疫吸着法 (E L I S A) を用いての決定が、特によく適しているのを実証した。あるいは、検査は、最小限の必要量の検査キャリア上、例えばテストストリップ上で行われる。

【 0 0 1 7 】

20

免疫検査の実施は、精巢抗原に対する自己抗体の含有量が決定される、男性哺乳類の血液サンプルまたは他の生体試料を、吸着した特異的な精巢抗原と接触させることと、非吸着成分を取除くための少なくとも 1 回の洗浄ステップと、I g G 抗体の調製物を使用して、吸着された抗原に結合した自己抗体の検出であって、I g G 抗体の調製物は、検査される男性哺乳類に種特異的であり、また種特異的に自己抗体に結合することができる I g G 抗体の調製物であり、例えばヒトの場合には、抗ヒト I g G 抗体の調製物であって、これらの自己抗体が、ビオチン - ストレプトアビジン - パーオキシダーゼ型またはビオチン - アルカリフォスファターゼ型の反応のカスケードを用いて検出され得るような方法で標識される抗ヒト I g G 抗体の調製物である、I g G 抗体の調製物を使用して、吸着された抗原に結合した自己抗体の検出とを含んでいる。

30

【 0 0 1 8 】

好ましい実施態様においては、免疫検査は、結合されるためのマーカー蛋白質、具体的には精巢抗原、例えば蛋白質 E R - 6 0 またはトランスフェリンなどを、例えば微量定量プレート、塩化ポリビニルプレート、または適切な組織プレートまたはテストストリップなどのような表面上で固定化することと、非特異的結合部位の飽和とによって実施される。次に、検査される生体試料が好ましくは液体の形態で加えられることにより、生体試料に含まれる自己抗体が精巢抗原と結合し、例えば E R - 6 0 自己抗体が、固定化された E R - 6 0 蛋白質と結合し、そして、トランスフェリン自己抗体が、固定化されたトランスフェリンと結合する。あるいは、免疫検査は、蛋白質 E R - 6 0 またはトランスフェリンが表面上に固定化されているのであれば、E R - 6 0 自己抗体及びトランスフェリン自己抗体も検出する。少なくとも 1 回の洗浄ステップの後に、二次抗体が加えられ、二次抗体は、精巢抗原に対する自己抗体に結合し、酵素、例えばアルカリ性ホスファターゼまたはペルオキシターゼと結合する。さらに少なくとも 1 回の洗浄ステップの後に、二次抗体に結合した酵素の無色または非蛍光の基質が試料に最終的に加えられる。この酵素は基質を有色のまたは蛍光色の産物に変え、この産物の濃度はフォトメータなどの適切な検出器で決定されることが可能になる。

40

【 0 0 1 9 】

この免疫学的 E L I S A 法であれば、精巢抗原に対する自己抗体、具体的には E R - 6 0 自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体を、たとえ少量であっても迅速、且つ確実に検出することが可能である。この検査の更なる利点は、この検査が、一般的に使

50

用されているELISA装置を使用し、かつ96, 256少なくとも1024のウエルの市販の微量定量プレートを用いて実施されることが可能になるので、同時に多数の分析を実施することができることである。

【0020】

RIS法では、適切な酵素に結合する二次抗体の代わりに、放射性標識された二次抗体が使用されることを除いては、原則的にはELISA法に記載された場合と同様のステップが実施される。定量的な検出は、この場合、シンチレーションカウンタで行われる。

【0021】

上記の方法とは別に、マーカー蛋白質への結合による精巢抗原に対する自己抗体の決定、すなわち、固定化された蛋白質ER-60へのER-60自己抗体の結合、および固定化されたトランスフェリンへのトランスフェリン自己抗体の結合は、それぞれ当業者に知られている他の免疫学的方法で定性的および定量的に評価されることが可能になり、そのうちウエスタンブロット法およびドットブロット法のみをここに述べる。

10

【0022】

あるいは、精巢抗原、具体的には蛋白質ER-60および/またはトランスフェリンが、最小限の必要な検査キャリア、例えば、適切なキャリア物質上に1つ又は複数の吸着物質を備えるテストストリップにアプライされ、次いで、可能であれば液体の形態で、生体試料と接触させて、生体試料に含まれる精巢抗原に対する自己抗体が、結合することができ、続いて、適切な検出システム、例えば可視線の形成など、により検出されることが可能になる。

20

【0023】

精巢抗原に対する自己抗体の定性的または定量的な検出、具体的には固定化された蛋白質ER-60へのER-60自己抗体の結合または固定化されたトランスフェリンへのトランスフェリン自己抗体の結合が、好ましくは、例えば個体からの血清または血漿などのような体液で行われることにより、結合の測定として、蛍光が例えば450nmおよび570nmの波長における吸光度(OD)として決定される。吸光度値は450nmおよび570nmの波長の間の違いから計算される。

【0024】

この値は基準値と比較される。この基準値は、例えば、健康な男性哺乳類および/または精巢炎症と診断された哺乳類からの生体試料の測定データから計算される。

30

あるいは、定義された濃度の精巢抗原、具体的にはER-60またはトランスフェリン、の試料が用いられ、基準値は、例えば標準曲線から、または標準表から、または比較値形態で、計算され、基準として使用される。

【0025】

基準値は、試料の解析と併行して決定されることが好ましい。

基準値及び試料の二つの決定が別々に可能である。基準値が、例えば健康な提供者からの生体試料の測定データを用いて計算されることにより、この場合には、基準値がOD値0.35より低いことが好ましい。基準値が、例えば、無症状または症候的に進行する精巢炎症と診断された提供者からの生体試料の測定データを用いて計算されることにより、基準値は、この場合には、OD値0.35、好ましくは0.4を超える。

40

【0026】

生体試料の精巢抗原に対する自己抗体、具体的にはER-60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体の含有量が、0.35を超えるOD値、好ましくは0.4を超えるOD値ならば、この含有量は、炎症関連の生殖能力障害不全の存在を暗示するものである。

【0027】

免疫検査によって、具体的には無症状または症候的な炎症性生殖能力障害の患者からの生体試料の場合には、改良された非侵襲性の診断が可能になり、精巢生検の実施が回避される。

【0028】

50

具体的には、ER-60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体は、本発明による免疫検査で検出される。ER-60自己抗体および/またはトランスフェリン自己抗体が本発明による免疫検査で検出されることによって、精巣炎症を炎症性精子形成欠陥(セルトリ細胞単独症候群)と区別して診断することが可能になる。本発明による免疫検査は、例えば播種性及び低密度のリンパ球などの個別変化も考慮に入れた新しい組織的な分析である。本発明による免疫検査は、炎症関連の生殖能力障害の治療の成功度を評価するためにも用いられる。

【0029】

本発明による免疫検査は容易に標準化されることが可能であるので、人間医学、具体的に *in vitro* 授精のモニタリングや受精診断と、専門家意見との双方に利用可能であり、そして、近代的な家畜の繁殖の範囲内でも利用可能である。

10

【0030】

本発明による生体試料は男性哺乳類、具体的には、ヒトに由来することが好ましい。

本発明による免疫検査は、即時使用可能な「キット」の形態で容易に提供されることができ、キットは、キャリアの表面に吸着されるER-60および/またはトランスフェリン抗原と、検査される男性哺乳類に種特異的で、自己抗体に種特異的に結合できるIgG抗体の調製物、例えば、ヒトの場合においては、ビオチン-ストレプトアビジン-パーオキシダーゼ、またはビオチン-アルカリフォスファターゼ型の反応カスケードで検出されることができるよう方法で標識される抗ヒトIgG抗体の調製物などと、を含んでいる。

20

【0031】

あるいは、キットは、担体、そして緩衝液と、試薬、例えば、発色反応が起こるマーカーに結合する、例えばストレプトアビジンなどのように反応の検出に必要とされる試薬と、を含む。

【0032】

あるいは、キットが、さらに、キットを較正するためにER-60自己抗体またはトランスフェリン自己抗体の標準試料を含むことによって、ER-60自己抗体の標準試料がER-60自己抗体の検出のために用いられ、トランスフェリン自己抗体の標準試料がトランスフェリン自己抗体の検出のために用いられる。

【実施例】

30

1. ER-60の提供

好ましくは組換え蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER-60(異名: ERp57、p58、登録名: PDIA3#HUMAN)は大腸菌内で発現、提供される。組換え蛋白質ジスルフィドイソメラーゼER-60の発現は、例えば、ヒトER-60のDNA配列を含む発現クローン、例えばUrade他、J. Biochem. 122、834-842; 1997に記載されているような、例えばpET-hER-60発現クローンなど、を用いて行われる。蛋白質は、例えば、Urade他、J. Biol. Chem. 267(21): 15152-15159のプロトコルによれば、例えば大腸菌BL21(DE3)で発現され、例えばHPLCを用いて精製される。

【0033】

40

この目的のために、発現プラスミドpET-hER60は、大腸菌BL21(DE3)中に転換され、適切な条件下、例えばアンピシリン(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)存在下、400 ml培地、例えばLB培地(1%のトリプトン、0.5%の酵母抽出液、1%のNaCl(pH 7.0))で、30 で培養される。蛋白質の発現は、適切なOD_{600nm}値、例えばOD_{600nm}値 = 0.5で、例えば0.5 mMイソ-プロピル-1-チオ-D-ガラクトピラノシド(IPTG)を用いて、30 で約2時間誘導される。次に、バクテリア培養物が採取され、ペレットは適切な緩衝液で再懸濁及び沈殿される、例えば、10 ml緩衝液、例えば20 mMのHEPES-水酸化カリウム(pH 6.8)、50 mMのKCl、5 mMのEDTA(pH 8.0)、1 mM PMSFで再懸濁させて超音波処理される。

【0034】

50

細胞溶解物を5000×gで4分で約30分間遠心分離し、上清は60%および70%の飽和硫酸アンモニウムで30分間、4分で沈殿させ、次いで5000×gで30分間遠心分離する。蛋白質ペレットを500μlの緩衝液、例えば20mMHEPES-水酸化カリウム(pH6.8)、50mMKCl、5mMのEDTA(pH8.0)、1mMのDTTで再懸濁させ、例えば、HPLCにおけるゲル濾過(Superdex 200 HR)などを用いて精製する。他に取り得るステップでは、hER-60を含むこれらフラクションを、例えばMono Qカラムを使って、例えば10mlの緩衝液、例えば20mMのHEPES-KOH(pH6.8)、50mMKCl、5mMEDTA(pH8.0)、1mMDTT、でさらに精製する。

【0035】

蛋白質の純度は、例えばSDS-PAGEゲルで評価される。

2. 免疫検査

例えばマキシソープ(MaxiSorp)ELISAプレート(Nunk)といったELISAプレートを0.1M炭酸ナトリウム(pH9.5)中4で一晩、組換え型ER-60、例えば2.5μg/ml、で被覆し、適切な緩衝液、例えばリン酸緩衝液(PBS、pH7.2+0.05%のTween-20)で洗浄し、例えば2.5時間室温(RT)で、PBS中の2%のスキムミルク粉末でブロッキング処理した。非特異的結合部位をブロッキングした後、検査されるコントロール試料及び血清試料の希釈系列(ブロッキング溶液を原液(非希釈液)から1:1000希釈まで)を、繰り返して被覆プレートにアプライして室温で1時間培養する。この培養時間の後、ウエルを少なくとも1回洗浄し、次いで第2の種特異的な抗体、例えば抗ヒトIgG-ビオチン(ブロッキング溶液で1:10000)と、室温で少なくとも1時間培養する。少なくとも1回の洗浄ステップの後、試料はストレプトアビジン-ホースラディッシュ-パーオキシダーゼ(Streptavidin-Meerrettichperoxidase)(GEヘルスケア)1:4000と、洗浄緩衝液中で20分室温で培養する。少なくとも1回の洗浄ステップの後、発色反応を20分間、例えばTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン; BD バイオサイエンス社製)を用いて展開される。発色反応は例えば2N H₂SO₄で停止される。吸着(OD値)は450nmおよび570nmの波長で測定される。吸着値は波長450nmおよび570nmの間の違いから得られる。

3. データ解析

免疫検査の評価は、生体試料、好ましくは血清又は血漿中におけるER-60自己抗体の定量によって行われるのが好ましい。測定値は基準値と比較される。基準値は、例えば健康な提供者からの試料の測定データから算出され、この場合にはOD値が0.35よりも低いことが好ましい。あるいは、基準値が、精巣炎症と診断された提供者からの試料の測定データから決定され得るので、この場合には、基準値は、0.35のOD値を超える、好ましくは0.4を超える。あるいは、ER-60の定義された濃度の試料が、使われて、その基準値は、例えば比較曲線または比較表から算出されるか、または比較値に基づいて算出される。基準値は、好ましくは試料の解析と併行して決定される。

【0036】

試料中におけるER-60自己抗体の含有量が、OD値0.35、好ましくは0.4を超えると、男性哺乳類の炎症関連生殖能力障害の存在の兆しである。

4. 有効性

本発明による免疫検査の正当性を立証するためには、広範な一連の検査が実施されることによって、男性病関連の既存の症状のないヒト血清及び正常な射出精液を用いてコントロール群におけるER-60自己抗体の検出が他の患者グループと比較される。これらの患者グループは

1. 限られた生殖能力の男性からの血清。含まれる基準が1千万/ml未満の精子濃度である一方で、感染症または炎症の証拠がないこと。

【0037】

2. 射出精液検査に基づく輸精管の炎症の基準を満たす男性からの血清であること。

3. 精巣生検手段によって検出され、精巣炎症の男性からの血清であること。

4. ER - 60 自己抗体価が治療成功と関係するかを評価するために、ジクロフェナックで処理された精巣および/または輸精管の炎症と診断された男性からの血清であること
を含む。

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2006/046108(WO, A1)

特表2010-517048(JP, A)

特表2002-539223(JP, A)

BOHRING C, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SPERM MEMBRANE ANTIGENS RECOGNIZED 以下備考
, MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION, 2001年 2月, V7 N2, P113-118, BY ANTISPERM ANTIBO
DIES, AND THEIR POSSIBLE ROLE IN IMMUNOLOGICAL INFERTILITY DISEASE

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	用于检测针对睾丸抗原的自身抗体的免疫学试验		
公开(公告)号	JP5453443B2	公开(公告)日	2014-03-26
申请号	JP2011533686	申请日	2009-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	德国杰特贝林生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	尤斯图斯 - 李比希 - 海胆韦利济泰特吉森		
当前申请(专利权)人(译)	尤斯图斯 - 李比希 - 海胆韦利济泰特吉森		
[标]发明人	マインハルトアンドレアス フィヤクモニカ		
发明人	マインハルト アンドレアス フィヤク モニカ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/564		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/689 G01N2333/79 G01N2800/367		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.521 G01N33/564.Z		
优先权	102008053503 2008-10-28 DE		
其他公开文献	JP2012507024A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了用于检测和特异性测定针对睾丸抗原的自身抗体的免疫学试验，所述睾丸抗原与雄性哺乳动物的生物样品中与雄性哺乳动物的炎症相关的生育障碍有关，特别是检测睾丸ER-60自身抗体和/或转铁蛋白自身抗体。免疫学试验用于检测雄性哺乳动物，特别是人类中免疫学引起的和感染相关的不育症的存在。

陽性血清数/全血清数 (反応度%)	同定された蛋白質
12/13 (92%)	ジスルフィドイソメラーゼER-60 (異名 Erp60、Erp57)
8/13 (61%)	トランスフェリン(シデロフィリン)