

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 328127

(P2002 - 328127A)

(43)公開日 平成14年11月15日(2002.11.15)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	A
A 0 1 K 67/02			A 0 1 K 67/02	
G 0 1 N 33/50			G 0 1 N 33/50	J
	33/543	521	33/543	521
		541		541 Z

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 6 数)

(21)出願番号 特願2001 - 387409(P2001 - 387409)

(22)出願日 平成13年12月20日(2001.12.20)

(31)優先権主張番号 2001 - 17863

(32)優先日 平成13年4月4日(2001.4.4)

(33)優先権主張国 韓国(KR)

(71)出願人 591270899

株式会社緑十字

大韓民国京畿道龍仁市器興邑舊葛里227番地

(71)出願人 595109845

大韓民国

大韓民国京畿道水原市勸善區西屯洞250番地

(72)発明者 セオング ファンホー

大韓民国ソウル特別市江南區開浦洞12番地

大清アパート303 - 301

(74)代理人 100086324

弁理士 小野 信夫 (外1名)

最終頁に続く

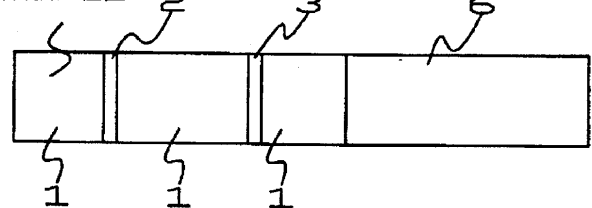
(54)【発明の名称】 非妊娠診断キットおよびこれを利用した動物における非妊娠診断方法

(57)【要約】

【課題】 血液ならびに牛乳などに存在するプロゲステロン濃度を検査し、ウシの妊娠の成否を受精後20日前後に容易に判定することができ、また簡単な操作でより迅速で且つ正確に判定できる非妊娠診断キットおよび非妊娠診断方法を提供すること。

【解決手段】 内部に所定の大きさの多孔が形成されたペーパーの一方の末段部に検査線としてプロゲステロン - ウシ血清アルブミン結合体を所定領域にコートし、また、他方の末段部に対照線としてヒツジ由来の抗マウス免疫グロブリンGを固定した分析ストリップ；及び、検査試料の血清あるいは脱脂牛乳と反応させる抗プロゲステロンマウス免疫グロブリンG - 金ラベル結合体を含む非妊娠診断キットは、ウシの非妊娠の成否を人工受精後20日前後に別の装備なしで簡単な操作により判定可能であり、特に、対照線を基準として検査線の色変化と比較し非妊娠の成否を判定することによって、より正確な検査を行うことができる。

試料投入位置



【特許請求の範囲】

【請求項1】 多孔が形成された薄膜形ペーパーの一方の末端部に、プロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体がコートされ、また、他方の末端部に対照線として免疫グロブリンGを固定させた分析ストリップ；及び抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体からなる動物における非妊娠診断キット。

【請求項2】 対照線の免疫グロブリンGは、マウス、ヤギ、ヒツジからなる群より選ばれるいずれか一種の動物由来の免疫グロブリンGであることを特徴とする請求項1記載の非妊娠診断キット。

【請求項3】 対照線の免疫グロブリンGは、抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体の免疫グロブリンGと同じ種由来の免疫グロブリンGを免疫して得たことを特徴とする請求項2記載の非妊娠診断キット。

【請求項4】 抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体は、非イオン性界面活性剤を含有するリン酸生理食塩緩衝液で溶解することによって使用することを特徴とする請求項1記載の非妊娠診断キット。

【請求項5】 上記薄膜形ペーパーは、5 μmないし12 μmの直径を有する微細気孔が多数形成されていることを特徴とする請求項1記載の非妊娠診断キット。

【請求項6】 上記薄膜形ペーパーは、ニトロセルロースメンブレンからなることを特徴とする請求項1記載の非妊娠診断キット。

【請求項7】 抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体を、分析用試料と混合する段階；薄膜形ペーパーの一方の末端部にプロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体がコートされ、また、他方の末端部に免疫グロブリンGが対象線としてコートされた分析ストリップの検査線が、コートされた末段を当該混合溶液に沈積する段階；及び当該プロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体と当該対照線との発色程度の濃薄を比較して動物における非妊娠の成否を判定する段階を含む動物における非妊娠診断方法。

【請求項8】 上記分析用試料中のプロゲステロンおよび上記プロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体のプロゲステロンが、上記抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体と競争的に反応することを特徴とする請求項7記載の動物における妊娠診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、非妊娠診断キット及びこれを利用した動物における非妊娠診断方法に関するものであり、より詳しくは、血液あるいは牛乳などに存在するプロゲステロン濃度を検査することにより、早期に妊娠の成否が容易に判定可能な非妊娠診断キット及びこれを利用した動物における非妊娠診断方法に関する。

【0002】

【従来の技術】正常なウシにおける発情周期は19日ないし22日であり、発情日には牛乳のプロゲステロン濃度が0に近く、その後徐々に増加して発情日後19日目には、再びプロゲステロン濃度が0に近く低下するが、ウシの妊娠が成立した場合にはプロゲステロン濃度が低下しない。したがって、19日ないし22日の間に血液あるいは牛乳を採取してプロゲステロン濃度を測ることにより、ウシの非妊娠の成否を判定することができる。

【0003】1990年代以前には、人工受精したウシの妊娠の成否を判定するために、ウシの人工受精あるいは交配を行った後、50日ないし60日が経過した状態で、獣医が直腸検査を直接行うことによって妊娠の成否を判定してきた。しかしながら、この方法は、熟練の人工受精師や獣医などが必要であり、ウシの長期空胎期の発生に従って経済的に大損をするようになる。また、妊娠鑑定の際、直腸で卵巣ならびに胎児を触診すると卵巣疾患や流産など不作用をもたらす可能性があり、さらにはウシにおいてストレスに受けられる。また更に、上記方法によっては、受精後50日ないし60日が経過した場合にだけ正確な妊娠の成否が判断されるため、この期間に、もしかして妊娠しなかったと確認された場合には、以後、再び発情の徴候を確認して受精を行わなければならない煩わしさがあった。

【0004】したがって、1990年代以来は、ウシあるいは乳牛における受精適期、早期妊娠ならびに繁殖障害がより正確かつ簡単に判定可能な方法が開発されつつあり、その一例として超音波診断器を使用して診断する方法がある。しかし、ウシの妊娠診断は、主として現場で非専門家により行われることが多く、このため超音波診断器はごく堅固に製作されるべきであり、また、装備が大きく重過ぎるため現場において適用が困難だという欠点がある。

【0005】以後、血液中のプロゲステロン濃度を酵素免疫診断法により測定してウシの妊娠の成否が診断されるキットが開発され、受精後約19日から22日の間に妊娠の成否を判定することができたのに対し、この診断キットも検査のためには高価の分析装置が必要であり、また、複雑な検査過程のため、家畜の所有者が現場において直接使用し難い欠点があった。

【0006】このような欠点を補うことができ、さらには簡単な操作により妊娠の成否を判定する方法として、分析ストリップを使用する方法がLaitinenらによって報告され(Acta Chemica Scandinavia, 1996:50:141-145)、この分析ストリップは、プロゲステロンの単クローン抗体をニトロセルロースメンブレンに固定させ、ウシより抽出した試料(牛乳など)をこのメンブレン上で毛細管現象により移動させて、次いでコロイド性金粒子が結合されたプロゲステロン-卵白アルブミンコンジュゲート(以下、「金粒子」という)をこのメンブレン上で移動させることになっている。

【0007】この際、上記試料中にプロゲステロンが多量存在すると、試料中のプロゲステロンが、まず上記プロゲステロンの単クローン抗体と結合するようになり、したがって、上記金粒子は当該プロゲステロンの単クローン抗体と結合しない状態で通過するため、分析ストリップの色が変わらない反面、当該試料中にプロゲステロンが少量存在すると、当該プロゲステロンの単クローン抗体の一部のみ試料中のプロゲステロンと結合し、後に移動する金粒子が当該プロゲステロンの単クローン抗体と結合するため、分析ストリップの色が変わるようになる。したがって、分析ストリップの変わった色の濃度を観察したり、あるいはクロマトグラフィースキャナーを使ってウシの妊娠の成否を判定することができる。

【0008】しかしながら、上記方法においては、検体の妊娠の成否を分析するために試料ならびに金粒子をそれぞれ別途にして上記分析ストリップ上で移動させるべきであるため、操作が複雑であり、また、ウシの妊娠が成立した場合(すなわち、試料中のプロゲステロンが多量存在する場合)には、診断の終了後においても分析ストリップに色の変化が認められないため、分析ストリップの欠陥による誤診断の防止ができず、さらには肉眼観察の際、色の変化から妊娠の成否を判定すべき客観的な基準もなく観察者自身が妊娠の成否を判断しなければならない問題点がある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記問題点を解決するために案出されたもので、血液ならびに牛乳などに存在するプロゲステロン濃度を検査し、ウシの妊娠の成否を受精後20日前後に容易に判定することができ、また妊娠の成否を簡単な操作でより迅速で且つ正確に判定するために案出された非妊娠診断キットおよび非妊娠診断方法を提供することに目的がある。

【0010】また、本発明の他の目的は、分析ストリップの欠陥によって生じうる誤診断の予防が可能な診断キットおよび非妊娠診断方法を提供することにある。さらに、本発明は、非妊娠の状態が高い信頼度をもって確認できるように基準点を設けた非妊娠診断キットおよび動物における非妊娠診断方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、内部に所定の大きさの多孔が形成された薄膜形ペーパーの一方の末端部に、検査線としてプロゲステロン - ウシ血清アルブミン結合体を所定領域コートし、また、他方の末端部に対照線として免疫グロブリンG(IgG)を固定させた分析ストリップ;及び、検査試料の血清あるいは脱脂牛乳と反応させる抗プロゲステロン免疫グロブリンG - 金ラベル結合体を有する非妊娠診断キットを提供する。ここで、上記抗プロゲステロン免疫グロブリンG - 金ラベル結合体は、凍結乾燥物として非

イオン性界面活性剤を含有するリン酸生理食塩緩衝液で溶解させた後に使用することが好ましく、上記対照線は、ヒツジ由来の抗 - マウス免疫グロブリンGが上記薄膜形ペーパーに固定されているものが好ましい。

【0012】更に、本発明は、抗プロゲステロン免疫グロブリンG - 金ラベル結合体および検体より抽出した分析試料を混合する過程;プロゲステロン - ウシ血清アルブミン結合体層および上記プロゲステロン - ウシ血清アルブミン結合体層から所定距離を置き、免疫グロブリンGがコートされている薄膜形ペーパーの末段を、上記分析試料が混合された溶液に沈積させる過程;及び、当該プロゲステロン - ウシ血清アルブミン結合体層と上記対照線との発色程度の濃薄を比較して、対照線より検査線の発色程度が濃い場合に非妊娠と判定する過程を含む動物における非妊娠診断方法を提供する。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施例を、図面を参照しながら詳しく説明する。本発明に係る非妊娠診断キットは、ウシなどが発情日に人工受精した後、約20日が経過したとき、妊娠が成立した場合には、血清、血漿、牛乳などのプロゲステロン濃度は減少しない反面、妊娠しなかった場合には、プロゲステロン濃度が著しく減少する現象を利用することによりウシの妊娠の成否を判定するためのもので、乳牛、ウシなど検査対象の血清、血漿、牛乳などの分析試料と混合する抗プロゲステロン免疫グロブリンG - 金ラベル結合体、及び上記分析試料中のプロゲステロン濃度を肉眼的に確認するための分析ストリップからなる。このような非妊娠診断方法によってウシなどの非妊娠が判定した場合には、迅速に人工受精を再実施して空胎期を縮めることができる。

【0014】図1は、本発明に係る非妊娠診断キットを構成する分析ストリップの一例を示すものとして、図1に示したように、上記分析ストリップは、分析試料が毛細管現象により一方の末端から他方の末端へ移動可能な薄膜形ペーパー(1)と、この薄膜形ペーパー(1)とが結合しており、当該薄膜形ペーパー(1)を通過した液状の試料を吸水する役割を演ずる検体吸水紙(6)からなり、また、ストリップ形態を有する。

【0015】上記分析ストリップの大きさは、適量量の分析試料を毛細管現象によって移送させ、分析試料中の検体と分析ストリップとの反応程度を観察することができれば、特に制限されていないが、約4mm×50mmの大きさが好ましく、当該薄膜形ペーパー(1)の内部には、5µmないし12µmの直径を有する微細気孔が多数形成しており、試料、例えば血清、血漿、又は牛乳などの流体が抗プロゲステロン免疫グロブリンG - 金ラベル結合体と共に薄膜形ペーパー(1)へ容易に吸水、移動することのできるようになっているものが好ましい。

【0016】上記微細気孔の直径が5µm未満の場合には、試料がペーパー(1)の表面から内部へ吸水すると

き、毛細管現象による吸水および移動の速度が遅すぎるため非実用的であり、更にこの微細気孔の直径が12 μmを超える場合には、試料の移動速度が速すぎるため妊娠の成否の診断が不正確になる欠点がある。したがって、当該微細気孔の大きさを適宜調節することにより、試料の中で診断反応に必要な成分、例えば、プロゲステロンのようなステロイド系ホルモンが検査線を通過する速度を調節することができ、また、診断の所要時間を適宜調節することもできる。当該薄膜形ペーパー(1)の材質は特に限定されていないが、ニトロセルロースメンブレンからなるものが好ましく、上記検体吸水紙(6)は、セルロースペーパーからなるものが好ましい。

【0017】上記薄膜形ペーパー(1)のいずれかの面においては、末段と所定距離、好ましくは、約10mmの距離を置いてプロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体(progesterone-BSA conjugate:2)が検査線として所定領域にコートされており、また、免疫グロブリンG層(IgG:3)のような対照線がこのプロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体層(2)検査線と所定距離を置いてコートされている。上記対照線を構成する免疫グロブリンGは、マウス、ヤギ、ヒツジからなる群より選ばれるいずれか一種の動物由来の免疫グロブリンGであるものが好ましく、より好ましくは、当該対照線の免疫グロブリンGとして抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体の免疫グロブリンGと同じ種由来の免疫グロブリンGを免疫して得たものを使用することができる。

【0018】本発明に係る非妊娠診断キットを構成する抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体は、対照線の免疫グロブリンGと特異的に反応可能な種由来のものとして、好ましくは、抗プロゲステロンマウス免疫グロブリンG-金ラベル結合体を使い、必要に応じて通用可能な安定剤を添加することができる。上記結合体に使用する安定剤としては、特に限定されていないが、ウシ血清アルブミン、蔗糖などが挙げられ、このような安定剤の使用量は使用するべき安定剤の種類によって異なるが、一般的に診断試薬の総量を基準として、1ないし5重量%使用することが好ましい。当該抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体は、安定剤を添加、凍結乾燥して製造し、そしてこのように凍結乾燥した結合体に1% ツイーン20 (Hayashi Purechemical Industries Ltd., Osaka)など非イオン性界面活性剤を含有するリン酸生理食塩緩衝液を一定量加えて溶解した後、ウシなど検査対象の血清、血漿、牛乳などと混合して非妊娠診断の試薬として使用する。

【0019】上記構成を有する本発明に係る非妊娠診断キットにおける作用および非妊娠の診断原理は次の通りである。まず、凍結乾燥した結合体を、一定量の緩衝液で溶解し製造した抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体溶液一滴(約0.025mL)に、人工受精後9日ないし21日が経過したウシなどの検査対象から採取

した血清、血漿、又は牛乳などの試料一滴(0.04mL)を滴下し、混合後得られた混合液に分析ストリップの末段を沈積させる。このように分析ストリップが混合液に沈積すると、分析用試料を含む結合体が毛細管現象により分析ストリップを沿って上部へ移動し、検査線のプロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体層を通過しながら、抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体が、抗原-抗体反応により当該プロゲステロン-ウシ血清アルブミン層に結合することによって発色現象が現われる。

【0020】図2は、このような本発明に係る非妊娠診断キットの発色原理を説明するための図面として、図2に示したように、分析ストリップの薄膜形ペーパー(1)の上部一面には、プロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体層(2)が形成しており、上記抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体(10)を含む診断試薬が、上記結合体層(2)を通過しながら当該抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体(10)が当該プロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体層(2)と反応、結合する。

【0021】この際、ウシなどの妊娠が成立した場合には、診断試薬内部のプロゲステロン(20)濃度が5ng/ml以上で高いため、ほとんどの抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体(10)が、試料中に存在するプロゲステロン(20)と結合し、薄膜形ペーパー(1)上部のプロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体層(2)とは結合しないため、検査線の発色は対照線より薄くなる。逆に、妊娠しなかった場合には、診断試薬内部のプロゲステロン(20)濃度が1ng/ml以下に低くなるため、ほとんどの抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体(10)が、薄膜形ペーパー(1)上部のプロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体層(2)と結合して発色現象が現われるため、検査線の発色は対照線より濃くなる。このように検査線と対照線の相対的な発色の濃薄を観察することによって、容易に検体の妊娠の成否を判定することができる。すなわち、血液中に存在するプロゲステロン(20)などのステロイド系ホルモンは、抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体(10)と結合し、これらが徐々にプロゲステロンの固定位置(2)へ到達すると、検査試料中のプロゲステロン(20)、および薄膜に固定されたプロゲステロン-ウシ血清アルブミンが、抗プロゲステロン免疫グロブリンG-金ラベル結合体(10)と競争的反応(competitive assay)により結合するため、分析試料の中に含有しているプロゲステロンの含量に逆比例して検査線の鮮紅色の発色程度が相違する。したがって、プロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体層(2)の発色程度を肉眼的に把握して検体の妊娠の成否を判定することができる。

【0022】上記プロゲステロン-ウシ血清アルブミン結合体層(2)と結合せず通過した抗プロゲステロン免疫

グロブリンG - 金ラベル結合体(10)は、ヒツジ抗 - マウス免疫グロブリンG(3)が固定された対照線で抗 - マウス抗体と結合して発色することにより検出される。上記ヒツジ抗 - マウス免疫グロブリンG(3)が固定された部位より検出される金コロイド結合体の量は、分析試料中のプロゲステロンの量に正比例する。したがって、家畜の所有者は、ストリップのプロゲステロン - ウシ血清アルブミン結合体層(2)と、抗 - マウス免疫グロブリンG(3)が固定された対照線から発色した鮮紅色のバンド色*

*又は発色程度を、相対的に比較して家畜の非妊娠の成否を判定する。この際、対照線に比べ検査線の発色程度が薄い場合は妊娠と判定する。

【0023】 以上のような本発明に係る非妊娠診断キットを使い、人工受精後、19日、20日、及び21日目になる日をもってウシの妊娠の成否を判定して以下の表1に表す。

【0024】

【表1】

繁殖状態	妊 娠	非妊娠
人工受精後の経過日	陽性反応/妊娠したウシの頭数(%)	陰性反応/妊娠しなかったウシの頭数(%)
19日	17/20(88.2)	—
20日	184/195(94.2)	82/85(96.2)
21日	73/75(97.3)	32/33(97.1)
合計	274/290(93.2)	114/118(96.7)

【0025】 上記表1から明らかにしたように、本発明に係る非妊娠診断キットは、妊娠した診断テストのウシの場合に、93.2%の診断正確率(敏感度)が認められ、また、妊娠しなかった非診断テストのウシの場合には、96.6%の診断正確率が認められた。したがって、本発明の非妊娠診断キットは、妊娠の成否を高い正確率をもって判定することができ、特に、非妊娠の診断において有用である。このように本発明の非妊娠診断キットは、人工受精後、受精に失敗した動物を、高い正確率をもって判定することができるため、妊娠診断率の高い診断キットに比べ相対的に優れた経済性を有する。

*テロン濃度を利用して乳牛ならびに和牛などウシの妊娠の成否、特に、非妊娠を簡単な方法で早期に判定することができる。更に、本発明の非妊娠診断キットは、検査線に対比する対照線を有するため、分析ストリップの欠陥を確認することができ、また対照線と検査線との色の濃度を比較する客観的な基準により非妊娠を高い正確率をもって容易に判定することのできる長所がある。

【0027】

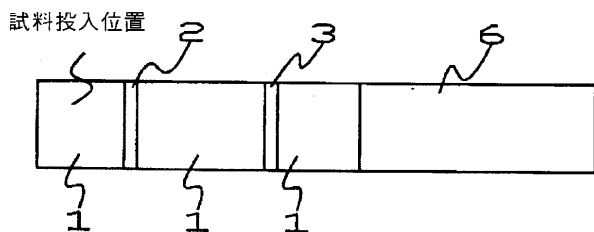
【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施例による非妊娠診断キットを構成する分析ストリップの平面図である。

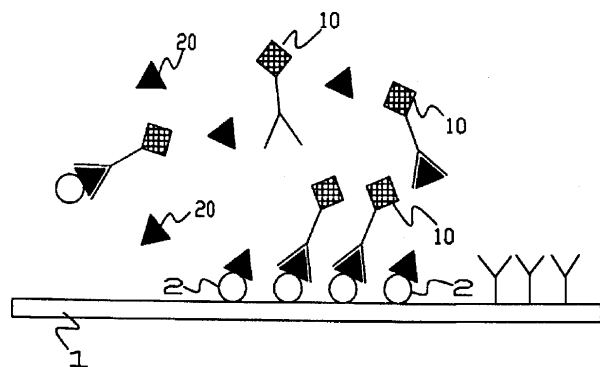
【図2】 本発明に係る非妊娠診断キットの発色原理を説明する図面である。

【0026】
【発明の効果】 以上述べたように、本発明に係る非妊娠診断キットは、血液あるいは牛乳中に存在するプロゲス*

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 チョウ ミン

大韓民国京畿道安養市博達洞 金湖アパー
ト101 - 1602

(72)発明者 ウォン ユウドク

大韓民国京畿道龍仁市器興邑舊葛里 斗元
アパート101 - 501

(72)発明者 キム インウーク

大韓民国京畿道城南市盆唐區亭子洞 ライ
フアパート103 - 1002

专利名称(译)	非妊娠诊断试剂盒和使用其的动物的非妊娠诊断方法		
公开(公告)号	JP2002328127A	公开(公告)日	2002-11-15
申请号	JP2001387409	申请日	2001-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	有限公司绿十字 大韩民国		
申请(专利权)人(译)	有限公司绿十字 韩国		
[标]发明人	セオングファンホー チョウミン ウォンユウドク キムインウーク		
发明人	セオング ファンホー チョウ ミン ウォン ユウドク キム インウーク		
IPC分类号	A01K67/02 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/54386 G01N33/743		
FI分类号	G01N33/53.A A01K67/02 G01N33/50.J G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA27 2G045/AA29 2G045/BB02 2G045/BB29 2G045/BB52 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB17 2G045/CB30 2G045/DA54 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB11 2G045/FB17 2G045/GC12 2G045/HA10		
优先权	1020010017863 2001-04-04 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：检查血液，牛奶等中孕酮的浓度，以便在受精后约20天轻松确定牛妊娠的成败，并通过简单的操作进行更快更准确的不孕。提供诊断试剂盒和非妊娠诊断方法。解决方案：将黄体酮-牛血清白蛋白偶联物涂在预定区域上，作为测试线，在纸张的一端形成有预定尺寸的孔，另一端作为对照。非妊娠诊断试剂盒，包含一个分析条，固定有绵羊来源的抗小鼠免疫球蛋白G作为品系；以及抗孕激素小鼠免疫球蛋白G-金标记结合物，可与测试样品的血清或脱脂乳反应，无需任何额外设备，就可以通过简单的操作来确定人工受精后约20天的怀孕成败，特别是通过比较检查线的颜色变化和参考线作为确定非怀孕成败的参考，可以进行准确的检查。

