

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 510572

(P2003 - 510572A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	F 2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/02		A 0 1 K 67/02	4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 15/08	4 C 0 8 4
A 6 1 P 15/08		C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/50	J

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 26数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 525410(P2001 - 525410)

(86) (22)出願日 平成12年9月25日(2000.9.25)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月14日(2002.3.14)

(86)国際出願番号 PCT/AT00/00256

(87)国際公開番号 W001/022091

(87)国際公開日 平成13年3月29日(2001.3.29)

(31)優先権主張番号 A 1626/99

(32)優先日 平成11年9月23日(1999.9.23)

(33)優先権主張国 オーストリア(AT)

(71)出願人 ヴィタテク・パオテクノロジー・ゲーエム  
ベ-ハー

オーストリア国アー - 6020 インスブルック,  
インライン 66

(72)発明者 イルメンセー, カール・オスカ

オーストリア国アー - 6020 インスブルック,  
インライン 36ベ-

(72)発明者 ディ-プリンガー, ハンス

オーストリア国アー - 6020 インスブルック,  
インライン 36ベ-

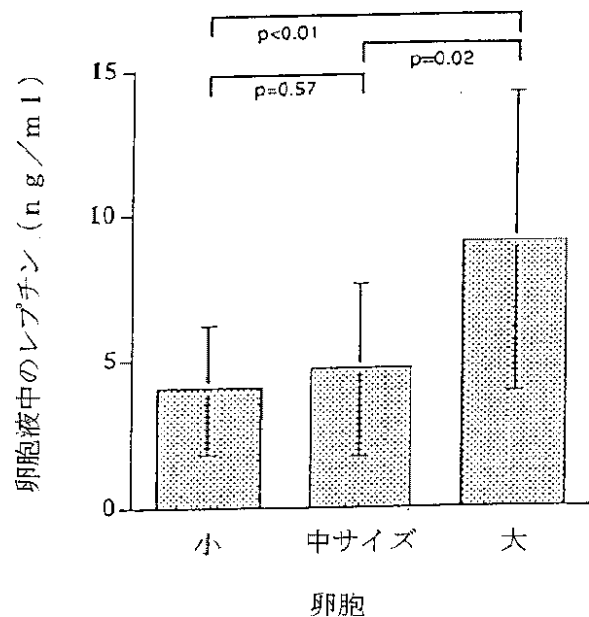
(74)代理人 弁理士 社本 一夫 ( 外 4 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 哺乳動物の、特にヒトの受精能を測定する方法

(57)【要約】

本発明は、哺乳動物、特にヒトの受精能を測定する方法であって、体液又は器官液を哺乳動物から採取し、この体液又は器官液中のレプチン含有量を測定し、そして、測定したレプチン含有量を基準値と比較して受精能を測定する方法に関する。さらに、本発明は、哺乳動物の受精能を測定するためのレプチンの使用、及び該方法を実施するためのキットに関する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 哺乳動物、特にヒトの受精能を測定する方法であって、

- ・体液又は器官液を哺乳動物から採取し、
- ・この体液又は器官液中のレプチン含有量を測定し、そして
- ・測定したレプチン含有量を基準値と比較して受精能を測定する、

ことを特徴とする方法。

【請求項2】 該体液又は器官液が血清、卵胞液又は精液であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該基準値が、正常な患者の対応する体液又は器官液中のレプチン含有量であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 該基準値を受精能の測定と並行して測定することを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 該レプチン含有量を免疫学的方法、特に単クローン性抗体を用いることにより測定することを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 遊離レプチン含有量を測定することを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 哺乳動物の受精能を測定するためのキットであって、

- ・哺乳動物から採取した体液若しくは器官液の試料、又は体液若しくは器官液を受け取るための容器、
- ・該試料中のレプチン含有量を測定するための試薬、及び
- ・レプチンの基準手段、

を含むキット。

【請求項8】 レプチン含有量を測定するための該試薬が抗体、特に単クローン性抗体を含むことを特徴とする請求項7に記載のキット。

【請求項9】 該レプチンの基準手段が標準化された量のレプチンを含むことを特徴とする請求項7又は8に記載のキット。

【請求項10】 該レプチンの基準手段が一連の標準化されたレプチン試料であることを特徴とする請求項7～9のいずれか1項に記載のキット。

【請求項11】 受精方法の範囲内、特に体外受精及び卵細胞質内精子注入において患者をモニターするための請求項1～6のいずれか1項に記載の方法の使用又は請求項7～10のいずれか1項に記載のキットの使用。

【請求項12】 卵母細胞又は精子の成熟度を測定するための請求項1～6のいずれか1項に記載の方法の使用又は請求項7～10のいずれか1項に記載のキットの使用。

【請求項13】 受精能及び生殖障害を調べるための請求項1～6のいずれか1項に記載の方法の使用又は請求項7～10のいずれか1項に記載のキットの使用。

【請求項14】 自然周期又は不規則周期における受精能を測定するための請求項1～6のいずれか1項に記載の方法の使用又は請求項7～10のいずれか1項に記載のキットの使用。

【請求項15】 生殖補助医療方法の範囲内で胚のネスティングをチェックするための請求項1～6のいずれか1項に記載の方法の使用又は請求項7～10のいずれか1項に記載のキットの使用。

【請求項16】 受精能を改善する薬剤を調製するためのレプチンの使用。

【請求項17】 有効量のレプチンをヒト又は動物へ投与することを含む受精能の改善方法。

【請求項18】 受精能を改善する薬剤としてのレプチン。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、哺乳動物、特にヒトの受精能を測定する方法に関するものである。

体外受精の技術に関する知識及び能力の向上により、信頼性がありかつ安価な受精能測定法に対する要求が非常に強まってきている。それには、単に受精障害の基礎診断だけではなく、さらに受精能の程度の検出並びに受精及び/又は受精卵の着床の測定も含まれる。

**【0002】**

レプチンは主要な飢餓制御代謝ホルモンとして1994年に発見され、またさらに多様な機能とも関連している。次に述べるように、生殖の範囲におけるレプチンの機能及び制御についての詳細は明らかにされていないが、哺乳動物及びヒトの生殖に対するこのホルモンの重要性が一連の試験において示される。

**【0003】**

レプチンはサイトカインファミリーに属する16kDaのタンパク質であり (Zhang Y. et al., Nature 1994, 372, pp. 425-432)、脂肪細胞で合成され分泌される (R. V. Considine et al., J. Clin. Invest 1995, 95, 2986-2988)。レプチンは血中を循環し、その可溶性受容体に結合する (G. H. Lee et al., Nature 1996, 379, 632-635)。さらなるもう一つの受容体であるOB-Rsは血管脳関門を通したレプチンの輸送に参与する (L. A. Tartaglia, Cell 1995, 83, 1263-1271)。視床下部の飢餓中枢で、レプチンは長いシグナル伝達受容体、OB-R<sub>L</sub>に結合し (H. Chen et al., Cell 1996, 84, 491-495)、そこでニューロペプチドY (NPY)の産生を阻害する (T. W. Stephens et al., Nature 1995, 377, 530-532)。これにより、空腹感が減少し、また体中での基礎代謝率が上昇する。最終的に、体重減少が起き、主として体脂肪率が減少する (M. A. Pelleymounter et al., Science 1995, 269, 540-543、及びJ. L. Halaas et al., Science 1995, 269, 543-546)。

**【0004】**

1994年にレプチンが発見されて以来、このホルモンが生殖分野でもまた重要であると考えられている。マウスモデルでは、レプチンを産生しない雌動物は

不妊である (A. M. Ingalls et al., J. Hered 1950, 41, 317-318)。しかしながら、レプチンを与えると、解剖学的且つ機能的に正常な生殖器官が発達する (F. F. Chehab et al., Nature Genet. 1996, 12, 318-320、及びK. Mounzih et al., Endocrinol. 1997, 138, 1190-1193)。排卵と受精が規則的に起こるように正常周期が発達する。妊娠は再度何の問題もなく全期間継続される。今日まで、レプチンが視床下部下垂体軸を介してどの程度直接又は間接的に生殖器官に影響するかは不明である。同様に、ヒトの生殖に対するレプチンの重要性も未だ全く不明である。レプチン受容体OB-Rは、1996年にノーザンブロット解析により卵巣中で初めて検出され (J. A. Cioffi et al., Nature Med. 1996, 2, 585-589)、ヒトの生殖に対するこのホルモンのあり得る重要性が想定された。その後、短いレプチン受容体であるOB-Rsが顆粒膜細胞及び卵丘細胞中に見出された。RT-PCR解析及び免疫蛍光法によりレプチン及びレプチンmRNAの両方が卵巣の顆粒膜細胞及び卵丘細胞中に検出された。対照的に、成熟したヒト卵細胞ではレプチンのみが見出され、レプチンmRNAは検出されなかった (J. A. Cioffi et al., Mol. Hum. Reprod. 1997, 3, 467-472)。卵巣中の顆粒膜細胞で産生されたレプチンが卵細胞中に飲作用により取り込まれ、局所的且つ分極してある領域に濃縮されることが想定されている。受精及びその後の発育の後、レプチンが細胞内シグナル伝達及び転写の鍵タンパク質であるSTAT3と共に着床前胚のある細胞中に局在しているのが見出されている。レプチンがこの転写因子の活性化に関与し、胚の遺伝子発現に影響することが推定されている (M. Antzacak et al., Mol. Hum. Reprod. 1997, 3, 1067-1086)。レプチンの他の重要な生理的機能は、高濃度のレプチンが顆粒膜細胞での17 $\beta$ -エストロジオールの合成を阻害し、そのため卵巣の正常な機能を害するという、卵巣のステロイドホルモン合成に対するその効果に基づいている (R. J. Zachow et al., Endocrinol. 1997, 138(2), 847-850)。多嚢胞性卵巣症候群(PCO)を患う患者では、不妊症及び過体重がレプチンレベルの増加と機能的及び因果的に関連している (D. Micic et al., Gynecol. Endocrinol. 1997, 11(5), 315-320)。

#### 【0005】

WO98/33865においては、非脂肪組織由来のレプチンを測定すること

による疾病、特にがんに対するスクリーニング法が提唱されている。さらに、妊娠女性の血漿中レプチン量が非妊娠女性の肥満度指数（BMI）を基に予想される量と比較して顕著に増加しており、過体重患者の血漿中レプチン量にほぼ匹敵するレベルを示すことがこのWO公報において判明している。従って、妊娠8週目から36週目の女性から非脂肪組織サンプルを採取し、そこに含まれるレプチン量を測定する妊娠検査が示唆される。その場合には、妊娠していることを確認するために、測定したレプチン含有量が同年齢で同肥満度指数である非妊娠女性のレプチン含有量と比較される。

【0006】

特に生殖医療の分野においては、厳密な意味での妊娠以前であっても、例えば胚移植成功の可能性と展望のために受精能に関するデータを得ることが必要である。さらに、生殖補助医療の処置期間がモニターできる方法が求められている。

【0007】

従って、本発明は、正常周期の範囲内の「自然な」受精能の測定以外に、これらのデータが立証できまたそのようなモニタリングが保障される全く新規の受精能測定方法を提供することを目的とする。

【0008】

本発明によれば、この目的は、哺乳動物、特にヒトの受精能を測定する方法であって、

- ・体液又は器官液を哺乳動物から採取し、
- ・この体液又は器官液中のレプチン含有量を測定し、そして
- ・測定したレプチン含有量を基準値と比較して受精能を測定する、

ことを特徴とする方法により達成される。

【0009】

本発明は、レプチンが存在する種々の体液又は器官液においてレプチン濃度が受精能の性状（fertility properties）と直接相関するという驚くべき発見に基づいている。この相関は、単に受精障害の存在に限定されるものではなく、受精能の周期的変動の診断又は体外受精過程における胚のネスティング（nesting）の首尾をチェックすることに対しても成り立つ。本発明によれば、レプチン含有

量を測定する本発明に記載の方法論による卵母細胞の有無の検出ばかりでなく、卵母細胞の成熟度の評価でさえも可能であることが示されている。

【0010】

WO98/55865に記載の妊娠検査と対照的に、本発明は受精能の性状（妊娠そのものではない）がレプチン含有量と直接相関するという発見に基づいており、WO98/55865に記載の方法よりもっと早い時期に始められる：WO98/55865に記載の妊娠検査は妊娠8週目から始めることが可能であると記載されているが、本発明に記載の検査は、例えば周期の通常のモニタリング又は生殖補助医療の範囲内で、妊娠開始のずっと前に始められ、胚着床の成功にともない終了する（即ち、妊娠0週、1週目又は2週目）。

【0011】

本発明は、人間医学、特に体外受精のモニタリング又は受精診断及び専門的評価（expert opinions）に用いることができる。さらにこれは、規格化することが容易であり、また検査を行なうための複雑な実験設備を必要としないために、最新の動物育種の領域においても非常に大きな可能性を秘めている。

【0012】

レプチンは多くの異なる体液及び器官液中に存在し、また本発明によれば、これら全ての液中のレプチン含有量が受精能の性状と相関することが示されている。しかしながら、本発明の好ましい実施態様によれば、例えば血清、卵胞液又は精液などの生理的にレプチン含有量が多いことを特徴とする体液又は器官液中のレプチン含有量が主に測定される。さらに、本発明に記載の方法を脳脊髄液等の体液又は器官液を用いて実施することも当然可能であり、これはこれらの他の液中のレプチン含有量もまた、概して、可能なレプチン検出限界の点で何ら問題のない測定範囲内にあるからである。

【0013】

実際には、主として体液又は器官液の採取法に関して、又はレプチン含有量の測定に関しては、本発明に記載の方法は所望する何れの方法においても実施することができる。レプチン含有量は、例えば、免疫学的に、電気泳動的に、又はクロマトグラフィー的に測定される。本発明によれば、レプチンに対しては免疫学

的測定法が好適な場合が多いが、これはレプチンの異なるエピトープに対する一連の異なる単クローン性抗体が利用可能であるばかりでなく、特にそれが、（例えば比色検出法と組み合わせたような）複雑な実験機器を用いることなく実施や評価ができるように容易に設計される、標準的ELISA試験の形態のような免疫学的検査であるためである。この様式で、一般人でも実施が容易な形態で本発明に記載の測定方法を提供することも可能である。好適には、本発明によれば試料中の遊離レプチンが測定される。

#### 【0014】

基準値として、通常はそれぞれの体液又は器官液に対するレプチンの正常値が使用される。本方法では、これは、例えば比較値、比較曲線若しくは比較表の形で得られるか、又は通常好まれるように、採取した体液又は器官液の試料と一緒に基準試料（決まったレプチン含有量を有する）を同時に測定することにより得られる。後者の例では、異なる測定方法又は異なる測定条件を使用することに起因するおそらく完全には除去することができない体系的な誤差が極初期から回避される。このことは、単に（例えば卵母細胞の成熟度を測定する際の）レプチン含有量の漸進的な差違が問題となる測定において特に重要である。

#### 【0015】

好適には、本発明により測定される試料は1つの基準値と比較されるばかりでなく、2つ又はそれ以上の基準値と比較される。従って、例えば「正常値」に加えて、例えば「病理学的」基準又は「妊娠」基準などの異なった基準値又は基準試料を提供することも可能である。

#### 【0016】

しかしながら、本発明によれば、正常患者のレプチン含有量に相当する（又は、動物育種の場合には、正常動物の試料に相当する）基準値を対応する体液又は器官液中のレプチン含有量に対して提供することが好ましい。

#### 【0017】

本発明に記載の方法を実施するにあたっては、基準試料のレプチン含有量を試料の受精能の測定と並行して測定する際にこの基準値を得ることが好ましい。

本発明によれば、レプチン含有量の測定は、好適には免疫学的方法、特に単

クローン性抗体を使用して行なわれるが、それはこれにより標準化が極めて効率よく行なえ、そしてまた最もばらついた測定キットのロットにおいても、それらの中で検出したデータに適合性があるからである。

#### 【0018】

WO98/55865にまさに記載されているような、着床前の発育ではなく妊娠約3週目以降しか検査することも立証することもできない(最後の期間が欠けているために妊娠の始まりが単に推定されるにすぎない)妊娠検査と対照的に、本発明に記載の検査を用いることによりネスティングの順調な経過をかなり初期段階で、例えば0週、1週目又は2週目で、すでに立証することができる。本発明によればこの立証はすでに正確であるが、上記の推定に基づいた妊娠検査では常に1週間も遅く推定される(これは次に超音波検査により補正される)。本発明に記載の方法ではそのような補正はもはや必要ではなく、それはここでは胚着床又は胚移植の時期が判っているからである。

#### 【0019】

さらなる態様において、本発明は哺乳動物の受精能の性状を測定するためのレプチンの使用に関する。

本発明のさらなる態様は、哺乳動物の受精能を測定するためのキットであって、

- ・哺乳動物から採取した体液若しくは器官液の試料、又は体液若しくは器官液を受け取るための容器、
  - ・該試料中のレプチン含有量を測定するための試薬、及び
  - ・レプチンの基準手段、
- を含むキットに関する。

#### 【0020】

上記したように、レプチン含有量の測定用試薬の選択は、当然使用するそれぞれの検出技術に依存している。例えば、レプチン含有量の測定用試薬はレプチンに対する抗体、特に単クローン性抗体を含むことが好ましい。好適には、このレプチン抗体はまた、蛍光性、放射性若しくは色素産生性基などのさらなる検出手段を含むか、又は他の検出手段(例えば2次抗体)により結合される。

## 【0021】

レプチンの基準手段は、好適には、それぞれの体液又は器官液の基準試料などの標準化された量のレプチンを含む。しかしながら一方で、レプチンの基準手段は、好適にはそれぞれの体液又は器官及びそれぞれの検出方法論に対して標準化された単一比較値、比較表又は比較曲線でそれぞれ構成されることができる。

## 【0022】

本発明に記載のキットは、例えば、較正直線を定義する、又はある受精能の性状を代表する、一連の標準化されたレプチン試料を含むことが特に好ましい。

本発明に記載の方法及び本発明に記載のキットはそれぞれ、受精方法の範囲、特に体外受精及び卵細胞質内精子注入の場合において、患者をモニターするために使用されることが好ましい。受精を成功させるためには、被験者における卵母細胞の有無とその質を極めて正確に、及び精子の機能性を定期的に、それぞれ簡単な検査でモニターすることが必要である。

## 【0023】

本発明を生殖補助医療の範囲内で用いる場合、ダウンレギュレーションから成功した胚のネスティングの検査までの期間のモニタリングが特に必須である。この期間（ダウンレギュレーション 刺激 穿刺 胚培養 子宮内胚移植 胚のネスティング）（すなわち、胚移植のほぼ4週前から2週間後まで）は、本発明に記載の方法により確実に及び明瞭に検査及び観察することができる。

## 【0024】

これにより、ある体外受精プログラム過程における診断に対して断定的かつ予後的モニタリング及び断定的かつ予後的指標をそれぞれ初めて可能とした提供することができる。特に、本発明により成功の見込みに関する予測もホルモン刺激処置の間にすでに行なうことが可能である。

## 【0025】

従って、本発明の方法はWO 98/55865に記載されている妊娠検査よりもっと早くに適用され、完全に異なる開始点、すなわち受精能試験の時点から始めることができる。特に、本発明に記載の体外受精のモニタリングの範囲内では、どの時点で胚が移植されるかも正確に判るが、妊娠検査ではこれは不明であ

る。

【0026】

さらなる態様によれば、自然周期又は不規則周期の場合における受精能もまた本発明により測定できる。好適には、受精の場合には、主に正常周期のデータが基準として用いられる。

【0027】

本発明に記載の検査又は本発明に記載のキットのさらに好適な使用は、卵母細胞又は精子の成熟度をそれぞれ測定することにある。

さらに、本発明に記載の方法及び本発明に記載のキットはそれぞれ、受精能及び生殖障害を調べるために使用することができ、それは大集団の人を広範囲にスクリーニングすること及び体系的に検査することに非常に適している。

【0028】

本発明のさらなる態様は受精能の性状を支持するためにレプチンを治療用を使用することにある。この場合は、例えばある体外受精プログラムにおける本発明のモニタリング工程の過程で、測定されたレプチン量がそのプログラムの有望な経過のために十分でないと考えられる場合に（例えば、レプチン量が発育の成功に必要なとされる正常値よりも10%以上、特に30%以上低い場合に）レプチンが適用される。

【0029】

従って、本発明は受精能を高める薬剤を製造するためのレプチンの使用にも関する。レプチンを使用する際は、有効量のレプチンをヒト又は動物（哺乳動物）に投与して必要なレベルにまでレプチン含有量を増加させる。当然、これは体外受精においてのみではなく自然受精及び自然妊娠のモニタリング過程においても可能である。

【0030】

次に本発明を以下の実施例及び図面に沿って詳細に説明する。

実施例

卵胞液及び血清：

I V F 又は I C S I（卵細胞質内精子注入）処置のために、31名の女性患者

を周期の21日目にGnRHアナログであるロイプロレリンアセテート(3.75mg皮下; Enantone Gyn, Takeda)でダウンレギュレーションし、引き続き組換えFSH(Gonal-F, Serono and Puregon, Organon)でホルモン刺激した。それぞれのFSH投与量は超音波検査及びエストラジオール測定により個々に加減した。少なくとも2個の卵胞が直径20mmに達した時、hCG(10,000 IU, Profasi, Serono)の筋肉内投与により排卵を誘発した。hCG投与約36時間後に、経膈超音波制御卵胞穿刺を実施し、続いて吸引した卵胞液中に卵母細胞があるかどうかを顕微鏡検査した。卵母細胞を回収した後、それぞれの卵胞液を遠心分離し、上清を以降の検査のために-196で保存した。血清検査のためには、卵胞穿刺時に採取した血液試料を遠心分離し、血清を同様に-196で保存した。

#### 【0031】

レプチン測定:

レプチン濃度は、ヒトインシュリン、プロインシュリン、ラットインシュリン、C-ペプチド、グルカゴン、膵臓プロペプチド又はソマトスタチンと交差反応しない抗血清を用いて放射線免疫測定法により測定した(Linco Research, St. Charles, MO, USA)。検出限界は0.5~100ng/mlである。

#### 【0032】

ホルモン測定:

エストラジオールは放射線免疫測定法により測定した(Estradiol MAIA, Bio Chem Immuno Systems, Bologna, Italy)。卵胞液は閉経後の女性の血清で1:100に希釈した。これらの血清中のエストラジオールレベルは卵胞液中の濃度から差し引いた。

#### 【0033】

プロゲステロンもまた放射線免疫測定法により測定した(Orion Diagnostica, Espoo, Finland)。卵胞液は上記血清で1:1000に希釈した。プロラクチンはRIA-kit(Bio Chem Immuno Systems, Bologna, Italy)を用いて放射線免疫測定法により測定した。試料及び標準に対してほぼ同一のマトリクスにするために卵胞液はゼロ標準で1:5に希釈した。エストラジオール、プロゲス

テロン及びプロラクチンレベルの測定は商品生産者の使用説明書に従って行なった。穿刺日に採取した血清中のFSHは放射線免疫測定法により測定した (FSH Maioclon, Bio Chem Immuno Systems, Bologna, Italy)。

#### 【0034】

タンパク質測定：

卵胞液及び血清中のタンパク質量は、既知濃度 (1 mg/ml) のBSAを標準として用いたローリー法 (O. H. Lowry et al., J. Biol. Chem. 1951, 193, 265-275) により測定した。すべての試料はリン酸緩衝液 (PBS) で希釈し、分光光度計 (Beckman DU 62) で励起波長750 nmの吸光度を測定し、基準値と比較した。

#### 【0035】

統計：

統計計算はマイクロソフトエクセルバージョン5.0a及びオリジンV4.1を用いて実施した。パラメトリカルデータは両側t検定によって検定し、また相関はピアソン相関係数により検定し、p値が<0.05のものを有意とした。

#### 【0036】

結果：

女性患者の臨床データを表1に示す。これらの患者の種々のサイズの卵胞から採取した卵胞液を個々に検討した。さらに、回収した卵胞液中の卵母細胞の有無を考慮した。大卵胞 (径>19 mm) 中のレプチン濃度は平均  $9.03 \pm 5.15$  ng/ml、中サイズの卵胞 (径16 - 19 mm) 中では  $4.67 \pm 2.96$  ng/ml、また小卵胞 (径<16 mm) 中では  $3.99 \pm 2.19$  ng/ml であり、大卵胞中と中サイズの卵胞とのレプチン濃度の差 ( $p = 0.02$ ) 及び小卵胞との差 ( $p < 0.01$ ) は統計的に有意であった (図1)。卵母細胞を有する大卵胞における卵胞液中のレプチン濃度は、卵母細胞を有しない大卵胞におけるものよりも高いものであった ( $10.12 \pm 5.67$  ng/ml 対  $7.84 \pm 4.28$  ng/ml、 $p = 0.07$ ) (図2)。女性患者の血清において、卵胞穿刺日のレプチンは未刺激の女性に対して示されている標準レベルより約2倍高かった ( $12.68 \pm 8.98$  ng/ml 対  $5.5$  ng/ml、C. Schubring

et al., J. Clin. Endocrinol. Metabol. 1997, 82, 1480-1483を参照されたい)。血清中のレプチンと卵胞液中のレプチンを比較したところ、二つのパラメーター間に統計的に高い有意な相関 ( $r = 0.74$ 、 $p < 0.0001$ ) が認められた (図3)。卵胞液中のレプチン含有量がはたして全般的なタンパク質合成の増加と関連しているのかどうかを確かめるために、卵胞液中の全タンパク質含有量を測定した。その結果、レプチンとタンパク質レベルとの間には何の相関も認められなかった ( $r = 0.168$ 、 $p = 0.165$ ) (図4)。刺激処理下においてレプチン産生がホルモン制御を受け得るのかどうかを明らかにするために、ある調査において投与した組換えFSHの量と血清及び卵胞液の両方におけるレプチンレベルとを比較した。この結果は、これら2つのパラメーター間には何の相関も成立しないことを示した (図5)。さらに、血清中及び卵胞液中のエストラジオール、プロゲステロン及びプロラクチンを測定した。卵胞の直径が大きくなるに従って、これら3種類のホルモン濃度が増加することが判った (表1)。さらに、卵母細胞を有する卵胞では、穿刺卵胞液におけるそれぞれのホルモン値が卵母細胞を有しない卵胞液における値よりも高かった (表1)。しかしながら、個々の卵胞液で測定されたホルモン値はそれぞれのレプチン濃度とは相関しなかった (図5)。同様に、血清中エストラジオール ( $r = 0.063$ 、 $p = 0.60$ )、プロゲステロン ( $r = 0.058$ 、 $p = 0.63$ ) 及びプロラクチン ( $r = 0.172$ 、 $p = 0.15$ ) とそれぞれの卵胞液中レプチン値との間に何の相関も見出せなかった。

#### 【0037】

このように、レプチンがヒト卵胞液中に存在し、また卵巣の顆粒膜細胞により産生されることが明確に示されるであろう (J. A. Cioffi et al., Mol. Hum. Reprod. 1997, 3, 467-472)。レプチンの一部は卵胞液から成熟卵細胞中へ取り込まれ、細胞質中に局所的に及び分極した状態で貯蔵される (M. Antczak et al., Mol. Hum. Reprod. 1997, 3, 1067-1086)。調節ホルモン卵巣刺激の間に、女性患者では刺激周期の3日目から9日目まで血清中レプチンが顕著に増加し、それは排卵が誘発される時点までずっと上昇したままである (T. Strowitzki et al., Gynecol. Endocrinol. 1998, 12(3), 167-169)。希発月経及び無月経の

場合のレプチン欠乏に加えて女性患者の血清中レプチン量の正常月経周期における顕著な変動はヒト生殖に対するレプチンのさらなる生理的役割の可能性を示唆している (D. Macut et al., *Gynecol. Endocrinol.* 1998, 12(5), 321-326)。

【0038】

卵胞液中で測定されるレプチン量及びホルモン濃度の両方がサイズ及び、それ故に、卵胞の成熟度に従って増加することが判明している。しかしながら、レプチンとそれぞれのホルモン値 (組換え FSH による刺激; エストラジオール、プロゲステロン、プロラクチンの濃度) との間には何の相関も見出されないことより、これらのホルモンは卵胞液中のレプチン量には直接影響しないということが結論付けられる。検査した女性患者の血清中においてもまた、レプチン量は投与した組換え FSH の量並びにエストラジオール、プロゲステロン及びプロラクチンの濃度とは関係しないことが判った。これは血清中のレプチンとプロゲステロンの量が相関する自然周期の女性での検査とは対照的である (L. Hardie et al., *Clin. Endocrinol.* 1997, 47, 101-106)。さらに、他の著者らと一致して (J. A. Cioffi et al., *Mol. Hum. Reprod.* 1997, 3, 467-472)、調節ホルモン刺激後、検査した女性患者において血清レプチンと BMI とが何の相関も示さないということが判明し、このことはまたホルモン未刺激及び非妊娠女性においてこれら2つのパラメーターが非常に有意に一致する (L. Hardie et al., *Clin. Endocrinol.* 1997, 47, 101-106) という事実と対照的である。

【0039】

それにもかかわらず、大卵胞の卵胞液中レプチン濃度と血清中レプチン濃度との間に非常に有意な相関が見出されている。このことより、ホルモン刺激下ではレプチンの体系的な産生及び卵巣での産生の両方が促進されていると結論付けられる。一方、レプチンの体系的な産生だけがその濃縮の原因である場合には、1人の同一女性患者の全ての卵胞においてほぼ同じレプチンレベルが見出されるはずである。しかし、これは事実ではない。レプチンの増加が主として卵巣に関連している場合には、血清中よりも卵胞液中においてより高いレプチン値が期待されなければならない。この説明もまた本結果とは対照をなすであろう。

【0040】

卵母細胞を有する卵胞の穿刺卵胞液中でレプチン、エストラジオール、プロゲステロン及びプロラクチンレベルがより高いという顕著な傾向が観察される。さらに、検査した全てのホルモンについて、卵胞の直径とともに濃度が連続的に増加することが判った。これらの結果より、エストラジオール、プロゲステロン及びプロラクチンに加えてレプチンも卵巣濾胞の増殖と分化に重要であると結論付けられる。しかしながら、エストラジオール、プロゲステロン又はプロラクチンのレプチン合成への直接的な影響は見出されない。ホルモン刺激下では、体内でレプチンが合成されるのは極めて明らかであるが、自然周期とは異なる又は付加的な制御機構を受けていることも事実である。したがって本発明に記載の方法論は、受精能測定のためのさらに独立した信頼性のある手段として一般的に利用することができる。

【0041】

【表1】

卵胞の径

ホルモン	小 (<16mm)	中 (16-19mm)	大 (>19mm)	大、 卵母細胞有り	大、 卵母細胞無し
エストラジオール (ng/ml)	58 ± 22	72 ± 28	224 ± 43	276 ± 67	192 ± 46
プロゲステロン (ng/ml)	2575 ± 568	2348 ± 682	5718 ± 1365	6618 ± 1587	5139 ± 890
プロラクチン (ng/ml)	2.8 ± 0.8	4.4 ± 1.3	14.0 ± 3.7	17.2 ± 4.0	12.1 ± 3.1
レプチン (ng/ml)	3.99 ± 2.19	4.67 ± 2.96	9.03 ± 5.15	10.12 ± 5.67	7.84 ± 4.28

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、いろいろな大きさの卵胞の卵胞液中のレプチン濃度を示す。

【図2】 図2は、卵母細胞を有する卵胞液又は有しない卵胞液中のレプチン濃度を示す。

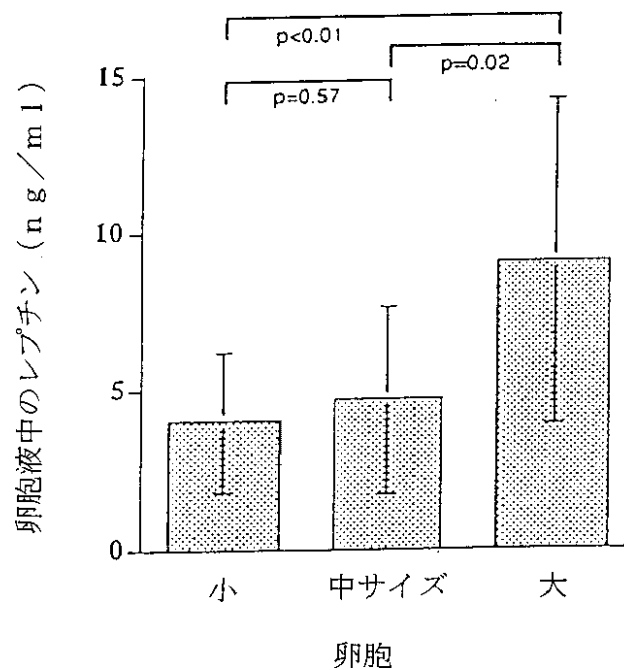
【図3】 図3は、卵胞穿刺日における女性患者の大卵胞の卵胞液中のレプチン濃度と血清中のレプチン濃度との相関を示す。

【図4】 図4は、大卵胞の卵胞液中のレプチン濃度とタンパク質含有量との相関を示す。

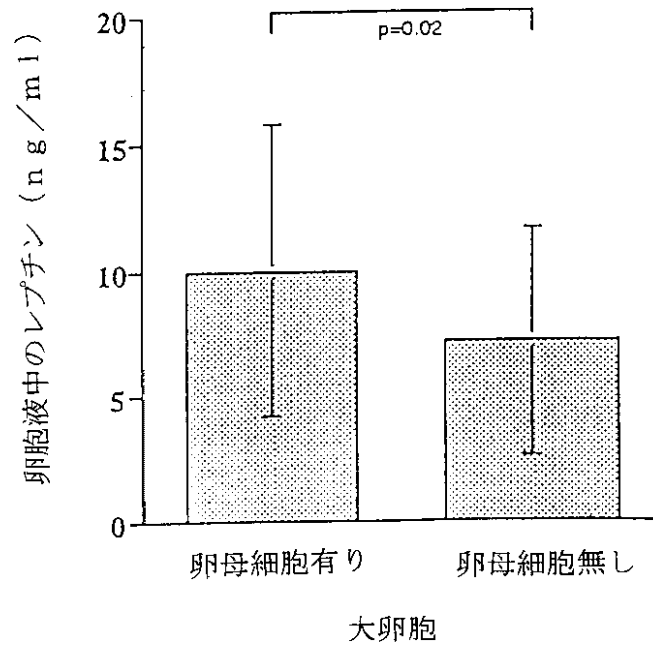
【図5】 図5は、組換えFSHによるホルモン刺激後の大卵胞の卵胞液中のレプチン濃度と血清中のFSHレベルとの相関を示す。

【図6】 図6は、大卵胞の卵胞液中におけるレプチン濃度とエストラジオール（黒丸）、プロゲステロン（黒三角）及びプロラクチン（黒四角）の濃度との相関を示す。

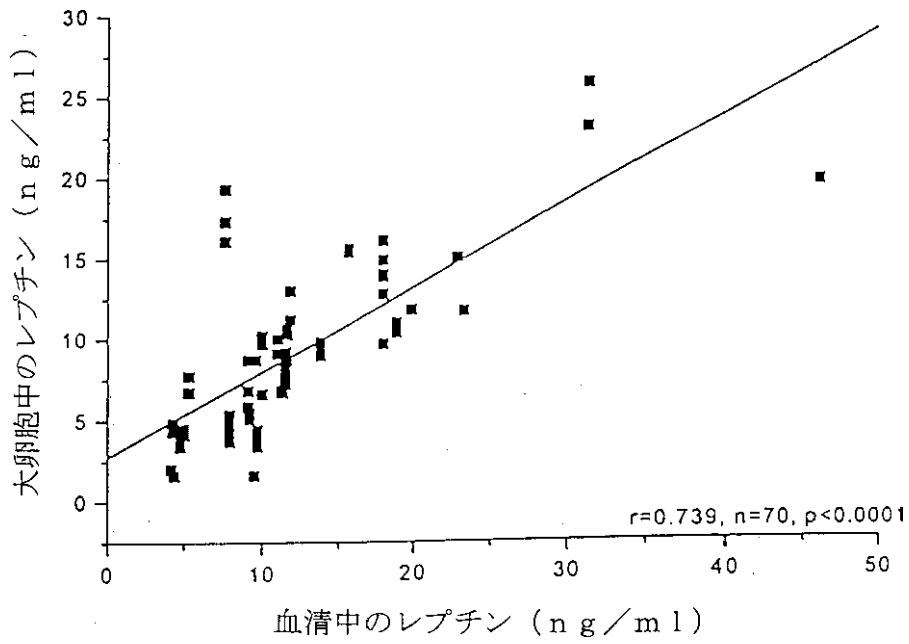
【図1】



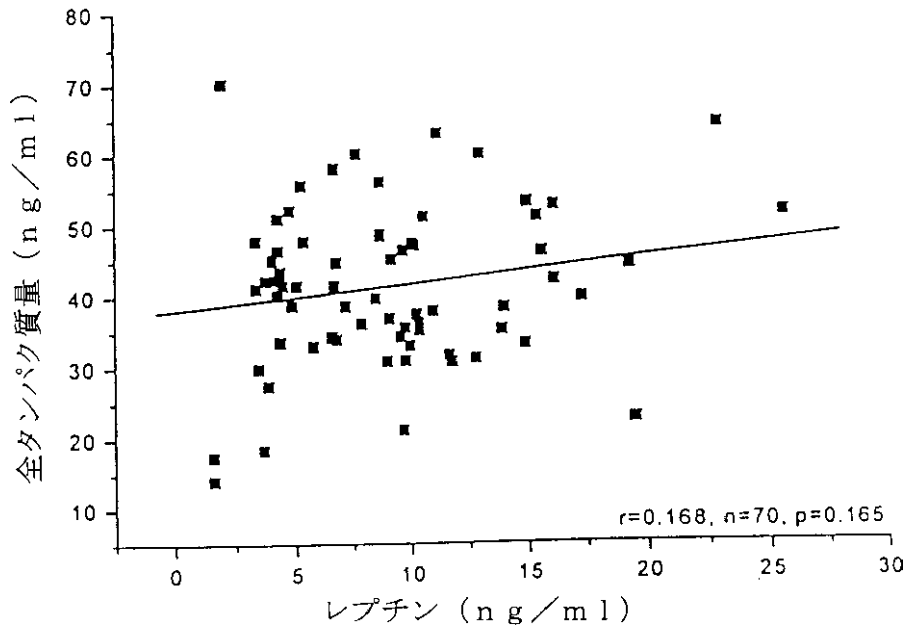
【図2】



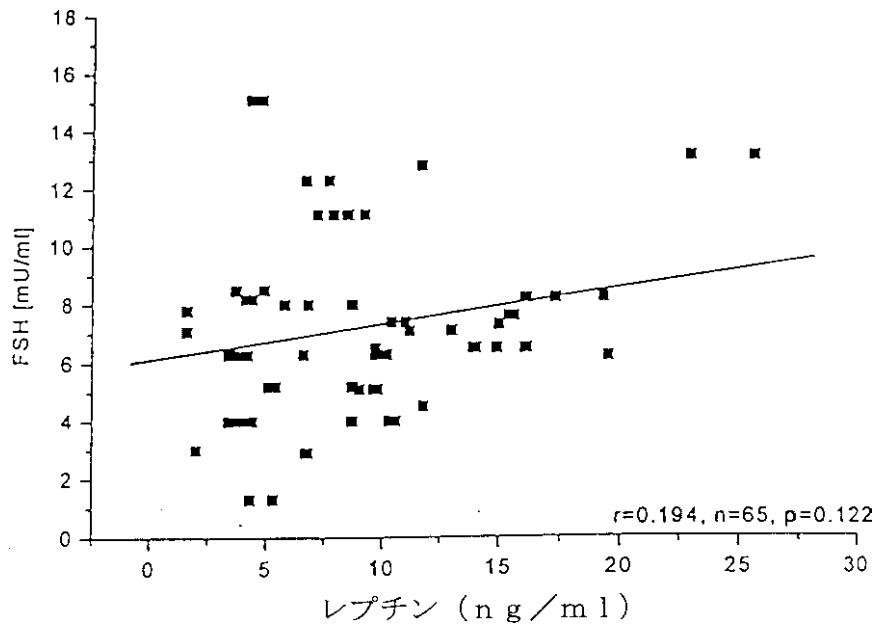
【図3】



【図4】

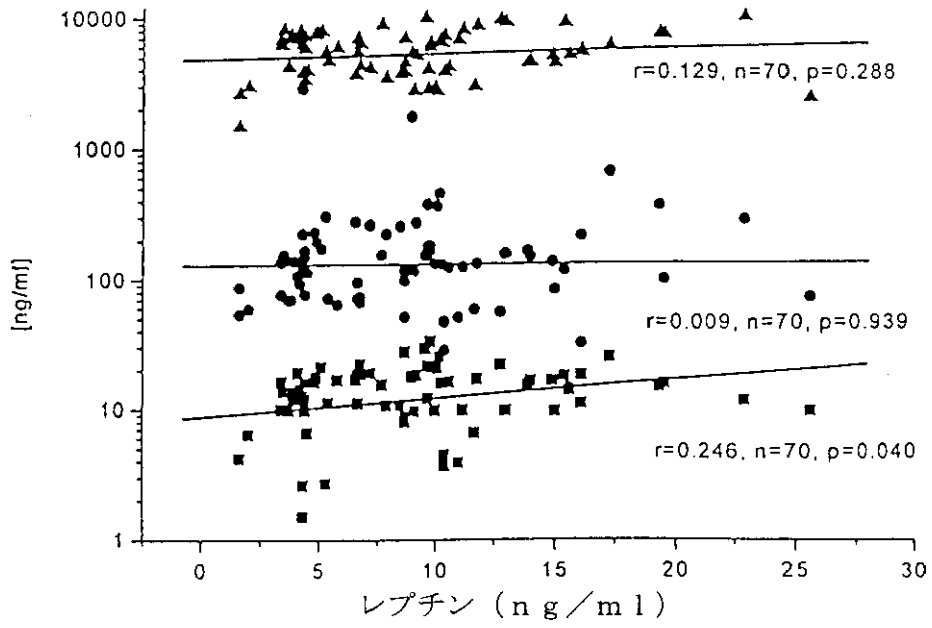


【図5】



【図6】

プロラクチン エストラジオール プロゲステロン



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年10月26日(2001.10.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生殖医療の範囲内で哺乳動物、特にヒトの受精能を測定する方法であって、

- ・体液又は器官液を哺乳動物から採取し、
- ・この体液又は器官液中のレプチン含有量を測定し、そして
- ・測定したレプチン含有量を基準値と比較して受精能を測定する、

ことを特徴とする方法。

【請求項2】 該体液又は器官液が血清、卵胞液又は精液であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該基準値が、正常な患者の対応する体液又は器官液中のレプチン含有量であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 該基準値を受精能の測定と並行して測定することを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 該レプチン含有量を免疫学的方法、特に単クローン性抗体を用いることにより測定することを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 遊離レプチン含有量を測定することを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 生殖医療の範囲内で哺乳動物、特にヒトの受精能を測定するためのキットであって、

・哺乳動物から採取した体液若しくは器官液の試料、又は体液若しくは器官液を受けるための容器、

- ・該試料中のレプチン含有量を測定するための試薬、及び
- ・レプチンの基準手段、

を含むキットの使用。

【請求項 8】 レプチン含有量を測定するための該試薬が抗体、特に単クローン性抗体を含むことを特徴とする請求項 7 に記載のキットの使用。

【請求項 9】 該レプチンの基準手段が標準化された量のレプチンを含むことを特徴とする請求項 7 又は 8 に記載のキットの使用。

【請求項 10】 該レプチンの基準手段が一連の標準化されたレプチン試料であることを特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

【請求項 11】 受精方法の範囲内、特に体外受精及び卵細胞質内精子注入において患者をモニターするための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法の使用又は請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

【請求項 12】 卵母細胞又は精子の成熟度を測定するための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法の使用又は請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

【請求項 13】 受精能及び生殖障害を調べるための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法の使用又は請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

【請求項 14】 自然周期又は不規則周期における受精能を測定するための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法の使用又は請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

【請求項 15】 生殖補助医療方法の範囲内で胚の着床をチェックするための請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法の使用又は請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/AT 00/00256
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/74 A61K38/22 A61P15/08		
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 7 G01N A61K C07K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P. R. BRZECHFFA ET AL.: "Serum immunoreactive Leptin concentrations in women with Polycystic Ovary Syndrome" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, vol. 81, no. 11, November 1996 (1996-11), pages 4166-4169, XP002910933 NEW YORK, NY, US ISSN: 0021-972X	1-6, 16-18
Y	the whole document	7-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 19 March 2001		Date of mailing of the international search report 29/03/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. S1 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griffith, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/AT 00/00256
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N. F. BUTTE ET AL.: "Leptin in human reproduction: serum Leptin levels in pregnant and lactating women" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, vol. 89, no. 2, February 1997 (1997-02), pages 585-589, XP002910927 NEW YORK, NY, US ISSN: 0021-972X	1-6, 16-18
Y	the whole document	7-15
X	F. F. CHEHAB ET AL.: "Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin" NATURE GENETICS, vol. 12, no. 3, March 1996 (1996-03), pages 318-320, XP002060725 NEW YORK, NY, US ISSN: 1061-4036 cited in the application the whole document	16-18
Y	F. F. CHEHAB ET AL.: "Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin" SCIENCE, vol. 275, 3 January 1997 (1997-01-03), pages 88-90, XP002060726 LANCASTER, PA US the whole document	11-15
Y	WO 96 35787 A (CHIRON CORPORATION) 14 November 1996 (1996-11-14) page 29, line 25 -page 33, line 9	7-10
X	WO 98 36769 A (ELI LILLY AND COMPANY) 27 August 1998 (1998-08-27) abstract; claims 1,2,11,12	16-18
A	WO 97 41263 A (PROGENITOR, INC) 6 November 1997 (1997-11-06) the whole document	1-18
A	H. MASUZAKI ET AL.: "Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans" NATURE MEDICINE, vol. 3, no. 9, September 1997 (1997-09), pages 1029-1033, XP002162851 NATURE PUBLISHING, CO., US ISSN: 1078-8956 the whole document	1-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

information on patent family members

International Application No  
PCT/AT 00/00256

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9635787 A	14-11-1996	AU 5737696 A	29-11-1996
		CA 2218529 A	14-11-1996
		EP 0826045 A	04-03-1998
		JP 2000507081 T	13-06-2000
WO 9836769 A	27-08-1998	US 5965521 A	12-10-1999
		AU 6326998 A	09-09-1998
		EP 0975356 A	02-02-2000
WO 9741263 A	06-11-1997	US 5912123 A	15-06-1999
		AU 2998097 A	19-11-1997

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/50 33/577		G 0 1 N 33/577 A 6 1 K 37/02	B
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
Fターム(参考)	2G045 AA13 AA27 CA25 CA26 CB14 CB30 DA36 DA54 FB03 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ79 QR48 QS15 QS20 QX07 4C084 AA02 BA44 CA17 CA36 DA31 NA14 ZA812		

专利名称(译)	测量哺乳动物，尤其是人类的生育力的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003510572A</a>	公开(公告)日	2003-03-18
申请号	JP2001525410	申请日	2000-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	伟宝科技的技术门EM型硬		
申请(专利权)人(译)	Vitateku宝科技有限公司		
[标]发明人	イルメンセーカールオスカル ディープリンガーハンス		
发明人	イルメンセー,カール・オスカル ディープリンガー,ハンス		
IPC分类号	A01K67/02 A61K38/00 A61K38/22 A61P15/08 C12Q1/02 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/74		
CPC分类号	A61K38/2264 A61P15/08 G01N33/74		
FI分类号	G01N33/53.F A01K67/02 A61P15/08 C12Q1/02 G01N33/50.J G01N33/577.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA27 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB14 2G045/CB30 2G045/DA36 2G045/DA54 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS15 4B063/QS20 4B063/QX07 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/CA17 4C084/CA36 4C084/DA31 4C084/NA14 4C084/ZA812		
优先权	1999001626 1999-09-23 AT		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明是一种用于测量哺乳动物特别是人类的生育力的方法，其中从哺乳动物中收集体液或器官液，测量体液或器官液中的瘦素含量，并测量所测定的瘦素。本发明涉及通过将含量与参考值进行比较来测量生育力的方法。此外，本发明涉及瘦蛋白在测量哺乳动物的生育力中的用途以及用于实施该方法的试剂盒。

