

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-532276

(P2013-532276A)

(43) 公表日 平成25年8月15日(2013.8.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	2 G O 5 2
GO 1 N 1/28 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4 B O 6 4
C 1 2 P 19/04 (2006.01)	GO 1 N 1/28 J	4 C O 8 5
CO 7 K 16/14 (2006.01)	C 1 2 P 19/04 A	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	CO 7 K 16/14	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-510349 (P2013-510349)	(71) 出願人	505404655 オルテック インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ケンタッキー州 ニコラスビル キャットニップ ヒル パイク 3031
(86) (22) 出願日	平成23年5月13日 (2011.5.13)	(74) 代理人	110000338 特許業務法人原謙三国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月10日 (2013.1.10)	(72) 発明者	モーラン, コルム フランス, ラ シオタ 13600, シュマンド グループド 10
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/036518	(72) 発明者	クファトコフスキ, ステファン アメリカ合衆国, 40511 ケンタッキー州, レキシントン, ボイリング スプリングス ドライブ 229
(87) 国際公開番号	W02011/143613		
(87) 国際公開日	平成23年11月17日 (2011.11.17)		
(31) 優先権主張番号	61/334, 995		
(32) 優先日	平成22年5月14日 (2010.5.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵母細胞壁の成分およびその検出

(57) 【要約】

本発明は、動物飼料用添加剤、および、飼料製品中における動物飼料用添加剤の検出に関する。本発明は、さらに、酵母細胞壁の成分、その単離方法、ならびに、該成分を免疫学的に検出するための組成物および方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料を準備し、
 該試料を、(14) - D - グルカン、(16) - D - グルカン、および、
 (14) - / (16) - D - グルカンからなる群より選択される抗原に結合
 することができる一次抗体に曝露させ、それによって一次抗体 - 抗原の複合体を形成し、
 該一次抗体と抗原との結合度を、二次抗体を用いて検出する、試料中の酵母細胞壁を検
 出する方法。

【請求項 2】

上記試料が、家畜用飼料、ペット用飼料、一般動物用飼料、完全混合飼料("TMR";
 Total Mixed Ration)、飼料(forage)、ペレット状飼料、
 飼料用濃縮物、飼料用事前混合副産物、穀物、醸造粕、糖蜜、食物繊維、飼料(fodder)、
 牧草、乾草、穀粒、葉、粗粉、可溶性飼料、飼料用栄養補助剤、および、これら
 の製造時に生成する各種中間体からなる群より選択される物質から導出される、請求項 1
 に記載の方法。

10

【請求項 3】

上記導出が、上記物質を抽出して試料を産生することによって達成される、請求項 2 に
 記載の方法。

【請求項 4】

上記抽出が、酸抽出、アルカリ抽出、有機抽出、物理的処理、および、これらの組み合
 わせからなる群より選択されるステップを用いて実施される、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

上記抽出が、有機溶剤および酸を用いて実施される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

上記抽出が、ジメチルスルホキシドおよび塩酸を用いて実施される、請求項 5 に記載の
 方法。

【請求項 7】

上記抽出のステップにおいて、室温より高い温度でインキュベーションを実施する、請
 求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

上記インキュベーションが 75 ~ 85 で実施される、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

上記一次抗体が上記抗原に対して単一特異性を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

上記一次抗体が多クローン性抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

抗体と抗原との結合度の検出が、酵素、蛍光発生物質、発色物質、および、放射標識さ
 れた同位元素からなる群より選択される物質に接合する二次抗体を補助的に用いて実施さ
 れる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

上記二次抗体が、上記一次抗体との複合体を形成することができる、請求項 1 に記載の
 方法。

40

【請求項 13】

上記試料が、硬い支持部上に固定されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

硬い支持部が、多壁プレート(multiwell)のウェルを備えている、請求項 1
 3 に記載の方法。

【請求項 15】

上記一次抗体と抗原との結合の検出が、上記一次抗体 - 抗原の複合体に結合した二次抗
 体が試料中に存在することに対応するシグナルのレベルを判定することによって達成され

50

る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

上記シグナルが、発色シグナル、蛍光シグナル、サイズに基づいて検出される分子、吸光度に基づいて検出される分子、放射、および、同位体シグナルからなる群より選択される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

上記検出が、ELISA イムノアッセイを用いて実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

酵母細胞壁を包含する試料を準備し、

該試料から、酵母細胞壁の炭水化物を、酸の処理、アルカリ処理、および、物理的処理からなる群より選択される作用を用いて抽出し、

該酵母細胞壁の炭水化物を試料から分離し、該酵母細胞壁の炭水化物が、(1-4)-D-グルカン、(1-6)-D-グルカン、および、(1-4)-D-グルカンからなる群より選択される炭水化物である、酵母細胞壁の炭水化物を包含する免疫原性組成物を調製する方法。

【請求項 19】

上記抽出が、酸処理を用いて実施される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

上記酸が塩酸である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

さらに、分離後の酵母細胞壁の炭水化物を精製する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

上記精製が、サイズに基づく分離、電荷に基づく分離、疎水性に基づく分離、結合分子に対する親和性に基づく分離、および、分子の立体構造に基づく分離からなる群より選択されるステップによって達成される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

さらに、分離後の酵母細胞壁の炭水化物の軽度な酸化を行う、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 24】

上記軽度な酸化が、酸化剤で処理することによって達成される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

上記軽度の酸化が、酵母細胞壁の炭水化物をジメチルスルホキシドおよび無水酢酸で処理することによって達成される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

上記軽度の酸化の結果、酵母細胞壁の炭水化物が活性化される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

上記活性化が、酵母細胞壁の炭水化物の C6 部位で起こる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

上記活性化の結果、アルデヒド基が形成される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

活性化後の酵母細胞壁の炭水化物を、さらに、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン、および、ウシサイログロブリンからなる群より選択されるキャリア分子に曝露させる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

上記キャリア分子がウシ血清アルブミンである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

タンパク質に共有結合によってリンクする(1-4)-D-グルカンを含む免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

上記免疫原性組成物が、*Saccharomyces cerevisiae* に属する酵母生物から生成される、請求項 3 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3 3】

共有結合性リンクが、炭水化物の C 6 原子を介して発生する、請求項 3 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3 4】

(1 4) - - D - グルカン、(1 6) - - D - グルカン、および、(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカンからなる群より選択される酵母細胞壁の炭水化物に結合することができる抗体を包含する組成物。

10

【請求項 3 5】

上記抗体が単クローン性抗体である、請求項 3 4 に記載の抗体。

【請求項 3 6】

上記抗体が多クローン性抗体である、請求項 3 4 に記載の抗体。

【請求項 3 7】

上記抗体が (1 4) - - D - グルカンに結合することができる、請求項 3 4 に記載の抗体。

【請求項 3 8】

上記抗体が (1 6) - - D - グルカンに結合することができる、請求項 3 4 に記載の抗体。

20

【請求項 3 9】

宿主動物を請求項 3 1 に記載の免疫原性組成物で免疫化する、試料中の酵母細胞壁を検出するための抗体を調製する方法。

【請求項 4 0】

(1 4) - - D - グルカン、(1 6) - - D - グルカン、および、(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカンからなる群より選択される酵母細胞壁の炭水化物を放出する抽出ステップを実施するための試薬と、

該抽出ステップにおいて抽出される酵母細胞壁の炭水化物に結合することができ、それによって一次抗体 - 抗原の複合体を形成する一次抗体と、

該一次抗体 - 抗原の複合体に付着することができ、それによって一次抗体 - 抗原 - 二次抗体の複合体を形成する二次抗体とを備えた、試料中の酵母細胞壁を検出するためのキット。

30

【請求項 4 1】

上記二次抗体が、酵素、蛍光発生物質、発色物質、および、放射標識された同位元素からなる群より選択される物質に接合する、請求項 4 0 に記載のキット。

【請求項 4 2】

試料を準備し、

(1 4) - - D - グルカン、(1 6) - - D - グルカン、および、(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカンからなる群より選択される化合物の存在を検出する免疫アッセイを、該試料に対して実施し、

40

該免疫アッセイの結果を伝達する、試料中における酵母細胞壁の成分の存在を判定するプロセス。

【請求項 4 3】

上記試料が、家畜用飼料、ペット用飼料、一般動物用飼料、完全混合飼料 (" T M R " ; Total Mixed Ration)、飼料 (f o r a g e)、ペレット状飼料、飼料用濃縮物、飼料用事前混合副産物、穀物、醸造粕、糖蜜、食物繊維、飼料 (f o d d e r)、牧草、乾草、穀粒、葉、粗粉、可溶性飼料、飼料用栄養補助剤、および、これらの製造時に生成する各種中間体からなる群より選択される物質から導出される、請求項 4 2 に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

50

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、米国特許仮出願第61/334,995（出願日2010年5月14日）に基づいて優先権を主張し、該特許仮出願の内容全体が参照によって引用されるものとする。

【0002】

〔技術分野〕

本発明は、動物飼料用添加剤、および、飼料製品中における動物飼料用添加剤の検出に関する。本発明は、さらに、酵母細胞壁の成分、その単離方法、ならびに、該成分を免疫学的に検出するための組成物および方法に関する。

【0003】

〔背景技術〕

動物の栄養に関連する分野では、家畜の効率を向上させるために、多様な添加剤および栄養補助剤が採用されてきた。場合によっては、酵母細胞壁の成分が、動物飼料用添加剤として使用されることもある。その一例が、飼料用添加剤MYCOSORB（商標、ALLETECH, Inc.社製）である。MYCOSORBは、食品や飼料中のマイコトキシンである汚染物質に結合し、こうすることによって、マイコトキシンを消化不可能な状態で隔離する。このようなマイコトキシンである汚染物質は、一般に、飼料原料の成分として使用される穀物、穀物の副生成物、および、貯蔵トウモロコシにおける、農場での真菌の成長および収穫後の真菌の成長の両方が原因となって発生する。市販の未加工の飼料成分および加工済み飼料成分は、マイコトキシンの存在について必要とされる監視を受けるが、100%効果的な監視システムは存在しない。世界中では、マイコトキシンの汚染によって、作物全体の約25%が影響を受けていると推定される（Council for Agricultural Science and Technology (1989) "Mycotoxins: Economics and Health Risks", Task Force Report No.116, Ames, IA）。したがって、汚染物質が家畜およびペットの飼料のサプライチェーンに混入することは、ほとんど回避不可能である。家畜がマイコトキシンで汚染された飼料を摂食した結果としては、食欲減退、成長不良、性機能および乳生産量の低下、免疫不良、消化不良などがあるが、深刻なケースでは死に到ることもある。したがって、マイコトキシンを隔離することは、自然発生する毒素が持つ、動物およびヒトの健康に悪影響を及ぼす危険性を抑制するための、有用な戦略であることが示されている。

【0004】

飼料用添加剤を定性的および定量的に検出するための、強力かつ特異的な分析法およびキットの開発は、動物がそのまま摂食できる飼料中に干渉する化合物が多数存在すること、および、該飼料において使用される飼料用添加剤が比較的低濃度であることによって複雑になる。

【0005】

〔発明の概要〕

本発明は、動物飼料用添加剤、および、飼料製品中における動物飼料用添加剤の検出に関する。本発明は、さらに、酵母細胞壁の成分、その単離方法、ならびに、該成分を免疫学的に検出するための組成物および方法に関する。一部の実施形態では、試料（例えば、飼料の試料、食品である試料、または、これらの抽出物など）中の酵母細胞壁の成分および/または該成分のフラグメントを検出する方法を提供する。このような方法は、例えば、酵母細胞壁の成分（例えば、酵母グルカン、酵母（1 4）-D-グルカン、酵母（1 6）-D-グルカン、酵母（1 4）- /（1 6）-D-グルカン、飼料用添加剤「MYCOSORB」、飼料用添加剤「BIOMOSS」、飼料用添加剤「ACTIGEN」など）を包含する食品用添加剤および飼料用添加剤の存在を、飼料製品（例えば、家畜用飼料、ペット用飼料、または、これらの製造時に生成する各種中間体）中において判定する際に使用可能である。一部の実施形態では、本発明は、酵母細胞壁の成分（例えば、酵母グルカン、酵母（1 4）-D-グルカン、酵母（1 6）-D-グルカン、酵母（1 4）- /（1 6）-D-グルカン、飼料用添加剤「MYCOSORB」など）を、飼料製品（例えば、家畜用飼料、ペット用飼料、また

10

20

30

40

50

は、これらの製造時に生成する各種中間体)から抽出するための方法に関する。一部の実施形態では、本発明は、特定の酵母細胞壁の成分(例えば、酵母(1 4) - - D - グルカン、酵母(1 6) - - D - グルカン、酵母(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン、および/または、これらの接合体)に対する抗体を産生させる際に使用可能な抗原を提供する。好適な実施形態では、この抗原をタンパク質キャリア(例えば、ウシ血清アルブミン(BSA))などのキャリアに接合させる。一部の実施形態では、本発明は、C 6 - OH部位の炭水化物(例えば、グルコピラノース環を有する炭水化物、グルカン類、酵母(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン)を活性化する方法を提供する。一部の実施形態では、この活性化に際して、(例えば、ジメチルスルホキシド/無水酢酸を用いて)軽度の酸化をさせる。一部の実施形態では、本発明は、酵母細胞壁抗原を認識することができる抗体(例えば、酵母(1 4) - - D - グルカン、酵母(1 6) - - D - グルカン、酵母(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン、または、これらの接合体を認識することができる単クローン性抗体または多クローン性抗体; (1 4) - - D - グルカン / (1, 6) - - D - グルカン / BSA 抗原に対して産生させた単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 または 5 1 3 A 4 3 1 . 1 ; (1 4) - - D - グルカン / (1 6) - - D - グルカン / BSA 抗原に対して産生させた多クローン性抗体; または、これらの精製後の形態、希釈後の形態、接合後の形態、および/または、単一特異性を有する形態)を提供する。一部の実施形態では、本発明は、試料(例えば、飼料の試料、食品である試料、または、これらの抽出物)中の酵母細胞壁の成分(例えば、酵母グルカン、酵母(1 4) - - D - グルカン、酵母(1 6) - - D - グルカン、酵母(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン、飼料用添加剤「MYCOSORB」など)を検出するための試薬を備えたキットを提供する。

10

20

30

40

50

【0006】

本発明は、分析に使用される試料の種類にも特質にも限定されない。一部の好適な実施形態では、上記試料は、食料品または飼料製品であるか、または、食料品または飼料製品から導出されるかのいずれかである。食料品または飼料製品は、エネルギーおよび/または栄養分を食事に与え、(例えば、動物によって)摂食される任意の物質を包含する。飼料の例としては、完全混合飼料("TMR"; Total Mixed Ration)、飼料(forage)、ペレット状飼料、飼料用濃縮物、事前混合副産物、穀物、醸造粕、糖蜜、食物繊維、飼料(fodder)、牧草、乾草、穀粒、葉、粗粉、可溶性飼料、栄養補助剤などがあげられるが、これらの例に限定されるものではない。飼料および食糧は物理的な形状によって限定されるものではない。飼料および食糧は、より小さな粒径になるまで処理してもよい(例えば、チップ状に切っても、粗切りにしても、粉碎しても、挽いてもよい)。また、飼料および食糧は液体状にしてもよい(例えば、抽出しても、煮ても、濃縮しても、シロップなどの粘稠性を有する形態に転化してもよい)。さらに、飼料および食糧は、より大きな粒径になるように処理されてもよい(例えば、まとめても、固めても、圧縮しても、ペレット状、ブロック状、正形状、フレーク状などの複合形状に加工してもよい)。

【0007】

本発明は、分析用試料を得るために使用する抽出方法の種類にも特質にも限定されない。一部の実施形態では、分析対象となる元の物質(例えば、食料品または飼料製品、一般動物用飼料)に対してある抽出法が実施されることによって、分析用試料が得られる。抽出法としては、酸抽出法、アルカリ抽出法、有機溶剤を用いた抽出法、バッファを用いた抽出法、塩を用いた抽出法、洗剤を用いた抽出法、物理的抽出法(例えば、沸騰、蒸気抽出、低温抽出、粉碎、または、これらの組み合わせ)などがあげられるが、これらの例に限定されるものではない。一部の実施形態では、分析対象となる物質(例えば、食料品または飼料製品、一般動物用飼料)が、有機溶剤と酸溶液との組み合わせを用いて抽出される。一部の実施形態では、分析対象となる物質(例えば、食料品または飼料製品、一般動物用飼料)が、ジメチルスルホキシド(DMSO)と塩酸(HCl)の溶液を用いて抽出される。

【0008】

本発明は、元の試料中に存在する分析物（例えば、抗原、酵母細胞壁の成分、酵母グルカン、酵母（1 4）- - D - グルカン、酵母（1 6）- - D - グルカン、酵母（1 4）- - /（1 6）- - D - グルカン、飼料用添加剤「MYCORSORB」など）の量によって限定されるものではない。分析物の量は、0.005 mg 未満、0.005 mg ~ 0.05 mg、0.05 mg ~ 0.5 mg、0.5 mg ~ 1 mg、1 mg ~ 5 mg、5 mg ~ 10 mg、10 mg ~ 25 mg、または、25 mg 以上であってもよい。本発明は、検査対象となる元の物質中に存在する分析物（例えば、抗原、酵母細胞壁の成分、酵母グルカン、酵母（1 4）- - D - グルカン、酵母（1 6）- - D - グルカン、酵母（1 4）- - /（1 6）- - D - グルカン、飼料用添加剤「MYCORSORB」など）の量によって限定されるものではない。検出される分析物の量は、1トン当たり0.05 kg 未満、1トン当たり0.05 kg ~ 0.5 kg、1トン当たり0.5 kg ~ 1 kg、1トン当たり1.0 kg ~ 2.0 kg、1トン当たり2.0 kg ~ 3.0 kg、1トン当たり3.0 kg ~ 4.0 kg、1トン当たり4.0 kg ~ 5.0 kg、1トン当たり5.0 kg ~ 6.0 kg、1トン当たり6.0 kg ~ 10.0 kg、または、1トン当たり10 kg 以上であってもよい。

10

【0009】

本発明は、分析物（例えば、抗原、酵母細胞壁の成分、酵母グルカン、酵母（1 4）- - D - グルカン、酵母（1 6）- - D - グルカン、酵母（1 4）- - /（1 6）- - D - グルカン、飼料用添加剤「MYCORSORB」など）の検出に使用する抗体の作業濃度によって限定されるものではない。抗体（例えば、酵母（1 4）- - D - グルカン、酵母（1 6）- - D - グルカン、酵母（1 4）- - /（1 6）- - D - グルカン、または、これらの接合体を認識することができる単クローン性抗体または多クローン性抗体；（1 4）- - D - グルカン /（1 6）- - D - グルカン / BSA 抗原に対して産生させた単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 または 5 1 3 A 4 3 1 . 1 ；（1 4）- - D - グルカン /（1 6）- - D - グルカン / BSA 抗原に対して産生させた多クローン性抗体；または、これらの精製後の形態、希釈後の形態、接合後の形態、および / または、単一特異性を有する形態）の作業希釈度は、1 : 1 0 0 , 0 0 0 未満、1 : 5 0 , 0 0 0 ~ 1 : 1 0 0 , 0 0 0 , 1 : 2 0 , 0 0 0 ~ 1 : 5 0 , 0 0 0 , 1 : 1 0 , 0 0 0 ~ 1 : 2 0 , 0 0 0 , 1 : 5 , 0 0 0 ~ 1 : 1 0 , 0 0 0 , 1 : 1 , 0 0 0 ~ 1 : 5 , 0 0 0 , 1 : 5 0 0 ~ 1 : 1 , 0 0 0 , 1 : 1 0 0 ~ 1 : 5 0 0 , 1 : 5 0 ~ 1 : 1 0 0 , 1 : 1 0 ~ 1 : 5 0 , 1 : 1 ~ 1 : 1 0 , 2 : 1 ~ 1 : 1 , または、2 : 1 を超えてもよい。

20

30

【0010】

一部の実施形態では、本発明は、酵母細胞壁の成分を包含する免疫原性組成物を提供する。一部の実施形態では、酵母細胞壁の成分が酵母グルカンを包含する。一部の実施形態では、グルカンは、酵母（1 4）- - D - グルカン、酵母（1 6）- - D - グルカン、酵母（1 4）- - /（1 6）- - D - グルカン、または、これらの接合体もしくは誘導体を包含する。一部の実施形態では、本発明は、キャリア（例えば、タンパク質キャリア）に接合する、酵母（1 6）- - D - グルカンおよび酵母（1 4）- - /（1 6）- - D - グルカンを提供する。キャリアが、宿主動物において免疫原性および / または安定性を促進してもよい。キャリアの例としては、ウシ血清アルブミン（BSA）、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、卵白アルブミン（OVA）、ウシサイログロブリン（THY）、および、アヒルB型肝炎核抗原（DHBcAg）などがあげられるが、これらの例に限定されるものではない（Gathuru et al. (2005) Vaccine 23:4727-4733）。本発明は、抗原とキャリアとの間のリンクの位置によって限定されない。一部の好適な実施形態では、抗原（例えば、炭水化物抗原、グルカン、グルコピラノース環を有する炭水化物、酵母（1 4）- - D - グルカン、酵母（1 6）- - D - グルカン、酵母（1 4）- - /（1 6）- - D - グルカン）は、抗原を基準とする1つ以上のO6部位でキャリアに接合する。一部の実施形態では、抗原は、C6部

40

50

位でBSAに接合する酵母(14) - - / (16) - - D - グルカンである。

【0011】

本発明の抗体は、抗体を産生させる宿主の種によって限定されるものではない。宿主の種としては、ラット種、マウス種、モルモット種、ハムスター種、ウサギ種、ヤギ種、ヒツジ種、ニワトリ種、ロバ種、ウマ種、ウシ種、イヌ種、ネコ種、ブタ種、サル種、ヒト種、または、その他の任意の種などがあげられる。本発明の抗体は、抗体を産生させるために使用される接種計画、抗原の調製方法、および、抗原のデリバリー方法のいずれによっても限定されるものではない。抗原は、免疫刺激剤(例えばアジュバント)、バッファ、塩、溶媒、溶解度向上性化合物などの存在または非存在下で提示されてもよい。宿主の種は、抗原で1回、2回、3回、4回、5回、5回~10回、10回~20回、または、21回以上免疫化されてもよい。本発明の抗体は、クローン性(例えば、単クローン性、多クローン性)によって限定されるものではない。抗体は粗抗体の形態で使用されても、精製抗体の形態で使用されてもよい。抗体は多特異性を有していても、単一特異性を有していてもよい。好適な実施形態では、抗体は、抗体を産生させるために使用される抗原を特異的認識することができる。一部の好適な実施形態では、本発明の抗体は、酵母(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*)細胞壁から抽出される(14) - - D - グルカン / (16) - - D - グルカンを特異的認識することができる。一部の好適な実施形態では、本発明の抗体は、多クローン性抗体を包含する。一部の実施形態では、本発明は、酵母(14) - - D - グルカン、酵母(16) - - D - グルカン、酵母(14) - - / (16) - - D - グルカン、または、これらのフラグメント、変異株、もしくは、接合体を認識することができる単クローン性抗体または多クローン性抗体を提供する。一部の実施形態では、本発明の抗体組成物は、酵母細胞壁(14) - - D - グルカンには結合するが、酵母細胞壁(14) - - D - グルカン含有重合体(例えば、酵母細胞壁(14) - - D - グルカン、酵母細胞壁(14) - - / (16) - - D - グルカン、または、これらのフラグメント、変異株、もしくは、接合体)以外の物質中に存在する(14) - - D - グルカン含有部には結合しない。一部の実施形態では、本発明の抗体組成物は、酵母細胞壁(16) - - D - グルカンには結合するが、酵母細胞壁(16) - - D - グルカン含有重合体(例えば、酵母細胞壁(16) - - D - グルカン、酵母細胞壁(14) - - / (16) - - D - グルカン、または、これらのフラグメント、変異株、もしくは、接合体)以外の物質中に存在する(16) - - D - グルカン含有部には結合しない。一部の実施形態では、本発明の抗体組成物は、酵母細胞壁(14) - - / (16) - - D - グルカンには結合するが、酵母細胞壁(例えば、酵母細胞壁(14) - - / (16) - - D - グルカン、または、これらのフラグメント、変異株、もしくは、接合体)以外の物質中に存在する(14) - - / (16) - - D - グルカン含有部には結合しない。

【0012】

本発明の一部の抗原検出法は免疫検出方法を包含する。一部の好適な実施形態では、免疫検出方法がELISAを包含する。一部の実施形態では、ELISAが、分析対象となる元の物質(例えば、食料品または飼料製品、一般動物用飼料、これらの抽出物など)、および、一次抗体(例えば、酵母細胞壁の成分を認識することができる抗体、酵母グルカンを認識することができる抗体、酵母(14) - - D - グルカン、酵母(16) - - D - グルカン、および/または、酵母(14) - - / (16) - - D - グルカンを認識することができる抗体)から導出される試料を用いて実施される。一部の実施形態では、抗体は、検出可能なシグナルを生成することができる物質(例えば、発色物質、蛍光発生物質、放射標識された同位元素など)に直接リンクされている。一部の実施形態では、抗体は、検出可能なシグナルを生成することができる別の薬剤(例えば、発色物質、蛍光発生物質、放射標識、同位元素など)と直接または間接的に関連する。

【0013】

一部の実施形態では、本発明は、試料(例えば、食料品または飼料製品、一般動物用飼

10

20

30

40

50

料、これらの抽出物など)中の分析物(例えば、抗原、酵母細胞壁の成分、酵母グルカン、酵母(1 4) - - D - グルカン、酵母(1 6) - - D - グルカン、および/または、酵母(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン)を検出するためのキットを提供する。キットの成分としては、各種の試薬、抽出用パuffア、溶媒、洗剤、遮断薬、チューブ、抗体、標準品、説明書、および、これらの任意の組み合わせなどがあげられるが、これらの例に限定されるものではない。

【0014】

一部の実施形態では、本発明は、分析対象となる元の物質(例えば、食料品または飼料製品、一般動物用飼料、これらの抽出物など)について、分析物(例えば、抗原、酵母細胞壁の成分、酵母グルカン、酵母(1 4) - - D - グルカン、酵母(1 6) - - D - グルカン、および/または、酵母(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン)の濃度に関する情報が得られるサービスを提供する。一部の実施形態では、分析は、エンドユーザ(例えば、農業家、家畜の所有者、家畜取扱業者、畜産家、ペットの所有者、ペット取扱業者、ペットの飼育者、獣医師、飼料または食料品製造業者、飼料または食料品流通業者、監督担当官)によって実施される。一部の実施形態では、試料または元の物質が、エンドユーザ(例えば、農業家、家畜の所有者、家畜取扱業者、畜産家、ペットの所有者、ペット取扱業者、ペットの飼育者、獣医師、飼料または食料品製造業者、飼料または食料品流通業者、監督担当官)から第三者に提出されて、第三者が分析を実施する。一部の実施形態では、第三者は、解析結果に関する情報をエンドユーザ(例えば、農業家、家畜の所有者、家畜取扱業者、畜産家、ペットの所有者、ペット取扱業者、ペットの飼育者、獣医師、飼料または食料品製造業者、飼料または食料品流通業者、監督担当官)へ伝達する。一部の実施形態では、第三者は、分析結果についての情報をさらに別の第三者へ伝送する。

10

20

【0015】

さらに他の実施形態は、関連分野の当業者にとって、本明細書の開示内容から明らかであろう。

【0016】

〔図面の簡単な説明〕

図1は、グルカン画分P1、P2、P3、および、S1、S2、および、S3の生成の概略図を示している(例えば、実施例1を参照)。

30

【0017】

図2は、元のウサギの抗血清の応答性、および、親和性精製済み抗血清の4つの上清の応答性を示している。親和性精製済み抗血清は、(1, 6) - グルカンに特異的な(Gab1 ~ Gab4)抗体を、BSAでコーティングされたマイクロウェルプレートに分離することによって得られた(例えば、実施例3を参照)。

【0018】

図3は、本明細書記載する方法で生成した、精製済みの抗(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン - BSA多クローン性ウサギ抗体を使用して作成した校正曲線を示している(例えば、実施例2および3を参照)。

【0019】

図4は、MYCOSORBの6つの含有レベルを用いて乳業用飼料物質において実施した、5つのアッセイから得られた平均検量線を示している。右側のy軸は、検量線に対する、日内(%CV_{intra})併行精度および日間(%CV_{inter})併行精度を示す。

40

【0020】

図5は、MYCOSORBの6つの含有レベルを用いてニワトリ用飼料物質において実施した、5つのアッセイから得られた平均検量線を示している。右側のy軸は、検量線に対する、日内(%CV_{intra})併行精度および日間(%CV_{inter})併行精度を示す。

【0021】

50

図6は、MYCOSORBの6つの含有レベルを用いてブタ用飼料物質において実施した、5つのアッセイから得られた平均検量線を示している。右側のy軸は、検量線に対する、日内(%CV_{intra})併行精度および日間(%CV_{inter})併行精度を示す。

【0022】

図7は、複数のマイクロタイタープレートを分散配置した場合において、干渉物の平均の光学濃度読み取り値(OD₄₅₀)の差を、ニワトリ用飼料において得られるMYCOSORB生成物のシグナルから減じた値を示している(実施例7)。干渉物は、MYCOSORB生成物(100%、1.0kg/T)とともに、50%、100%、200%(w/w)の割合で加えた。

10

【0023】

図8は、単一のマイクロタイタープレートを配置した場合において、干渉物の平均の光学濃度読み取り値(OD₄₅₀)の差を、ニワトリ用飼料において得られるMYCOSORB生成物のシグナルから減じた値を示している(実施例7)。干渉物は、MYCOSORB生成物(100%、1.0kg/T)とともに、50%、100%、200%(w/w)の割合で加えた。

【0024】

図9は、濃度が1:100(上側のグラフ)および1:200(下側のグラフ)である各場合の、単クローン性抗体513A161.1の交差反応性を示唆する、ELISAアッセイの結果を示している。

20

【0025】

図10は、濃度が1:500(上側のグラフ)および1:1000(下側のグラフ)である各場合の、単クローン性抗体513A161.1の交差反応性を示唆する、ELISAアッセイの結果を示している。

【0026】

図11は、濃度が1:1500(上側のグラフ)および1:2000(下側のグラフ)である各場合の、単クローン性抗体513A161.1の交差反応性を示唆する、ELISAアッセイの結果を示している。

【0027】

図12は、濃度が1:100(上側のグラフ)および1:200(下側のグラフ)である各場合の、単クローン性抗体513A431.1の交差反応性を示唆する、ELISAアッセイの結果を示している。

30

【0028】

図13は、濃度が1:500(上側のグラフ)および1:1000(下側のグラフ)である各場合の、単クローン性抗体513A431.1の交差反応性を示唆する、ELISAアッセイの結果を示している。

【0029】

図14は、濃度が1:1500(上側のグラフ)および1:2000(下側のグラフ)である各場合の、単クローン性抗体513A431.1の交差反応性を示唆する、ELISAアッセイの結果を示している。

40

【0030】

図15は、希釈せずに、または、PBSもしくはPBS+3%脱脂乾燥乳で1:1に希釈してプレートにセットした、平均のELISAアッセイ吸光度読み取り値と、3つの酵母細胞壁抽出標準品の標準偏差とを示している(実施例6)。

【0031】

図16は、実施例6に記載のELISAマイクロプレート用コーティング時間および温度によって実施したインキュベーションについて、飼料抽出物の検量線のグラフを示している。

【0032】

〔定義〕

50

本発明の理解の一助として、いくつかの用語および表現について以下のように定義する。

【0033】

本明細書では、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および、「タンパク質」という用語は、全て、共有結合性「ペプチド結合」によって繋がっているアミノ酸の一次配列を指す。一般にペプチドは数個のアミノ酸からなり、通常は2個～50個のアミノ酸からなり、タンパク質に比べて短い。「ポリペプチド」という用語には、ペプチドおよびタンパク質を含める。一部の実施形態では、ペプチド、ポリペプチド、または、タンパク質は合成されたものであるが、一方で、別の実施形態では、ペプチド、ポリペプチド、または、タンパク質は組換え型であっても、天然型であってもよい。合成ペプチドとは、人工的な手段によってインビトロで生成される（つまり、インビボで生成されたのではない）ペプチドである。

10

【0034】

「糖タンパク質」および「糖ペプチド」という用語は、それぞれ、ポリペプチド鎖に共有結合によって結合した1つ以上の炭水化物残基を有する、タンパク質およびペプチドをそれぞれ指す。「セレン含有タンパク質」および「セレノペプチド」という用語は、それぞれ、1つ以上のセレン原子を有するタンパク質およびペプチドを指す。通常、セレン原子は、セレノシステインやセレノメチオニンなどのセレン含有アミノ酸内では、タンパク質に取り込まれる。

20

【0035】

「セレノ糖タンパク質」および「セレノ糖ペプチド」という用語（「SGP」と略記することもある）は、それぞれ、1つ以上のセレン原子を取り込んだ糖タンパク質および糖ペプチドを指す。通常、「セレノ糖タンパク質」は1つ以上のセレン含有アミノ酸を有する。「セレノ糖タンパク質」は、任意の数の互いに異なる形態で、複数の炭水化物を有していてもよい。

30

【0036】

「試料」および「標本」という用語は、各用語の最も広い意味で使用し、任意の供給源から得られる試料および標本を含む。本明細書では、「試料」という用語は、（ヒトを含めた）動物から得られる生物学的試料を指すために使用し、各種の流体、固形物、組織、および、気体を含む。本発明の一部の実施形態において、試料には、植物から導出される物質（貯蔵物、穀物、処理済み家畜用飼料、製造の中間段階における飼料製品）を含有する試料を含める。ただし、これらの例は、本発明において使用可能な試料の種類を限定するものであると解釈すべきではない。

40

【0037】

本明細書では、「酵母」および「酵母細胞」という用語は、真菌界に分類される真核微生物を指し、細胞壁、細胞膜、および、細胞内の成分を有する。酵母は、分類学上または系統発学上の特定のグループを構成しない。現在、約1,500種が知られており、全ての酵母種のわずか1%しか文献に記載されていないと推定される。「酵母」という用語は、*S. cerevisiae*の異名であると見なされることが多いが、酵母が持つ系統発生上の多様性は、子囊菌門に属する酵母も、担子菌門に属する酵母も両方が存在することによって示される。「酵母」という用語には、ビール酵母、醸造酵母、および、パン酵母を含める。出芽酵母（「真性酵母」）は、サッカロミセス目に分類される。酵母種の一部は二分裂によって繁殖するが、大半は出芽によって無性生殖的に繁殖する。酵母は単細胞である。ただし、一部の種は、仮性菌糸、つまり偽の菌糸（false hyphae）として知られている、一繋がり出芽細胞を形成することによって多細胞になる。酵母のサイズは種によって大きく異なるが、通常は直径が3 μm～4 μmである。ただし、中には40 μmを超える酵母もある。本明細書では、「YCW」とも称される「酵母細胞壁」という用語は、酵母の原形質膜および細胞内の成分を囲む酵母生物の細胞壁を指す。酵母細胞壁には、酵母細胞壁の外層（主にマンナン）も内層（主にグルカンおよびキチン）も含める。細胞壁の一つの機能は、構造を提供し、酵母内部（酵母の代謝活性の中心）を保

50

護することである。シグナル伝達経路および認識経路は、酵母細胞壁において発生する。酵母細胞壁の組成は、個々の株ごとに、かつ、酵母の増殖条件によって異なる。

【0038】

本明細書では、「酵母細胞壁抽出物」という用語は、(例えば、破裂段階および溶解段階において)破裂または「溶解」し、酵母細胞の可溶性細胞内の成分から分離された酵母の酵母細胞壁を指す。

【0039】

本明細書では、w/w(重量/重量)という用語は、組成物中において、重量に基づいて示した、ある任意の物質の含有量を指す。例えば、動物飼料が本発明の食餌飼料用栄養補助剤を0.02%w/w含むとは、食餌飼料用栄養補助剤の質量が動物飼料の全質量の0.02%である(例えば、動物飼料907,200g中に、本発明の食餌飼料用栄養補助剤である組成物が200g含まれている)ことを意味する。

10

【0040】

本明細書では、「精製」という用語は、試料から各成分を除去することを指す。例えば、酵母細胞壁または酵母細胞壁抽出物は、酵母細胞壁の成分ではない成分(例えば、細胞膜および/または酵母の細胞内の成分)を除去することによって精製される。また、酵母細胞壁または酵母細胞壁抽出物は、汚染物質、つまり、酵母細胞壁以外の物質を除去することによっても精製される。酵母細胞壁ではない成分および/または酵母細胞壁ではない汚染物質を除去することによって、試料中の酵母細胞壁または酵母細胞壁の成分が占める割合が増加する。分子レベルでは、「精製された」、「精製した」、「精製済みの」という用語は、自然環境から切り離された、単離された、または、分離された分子(例えば、炭水化物、糖タンパク質など)を指す。したがって、「単離済み炭水化物」とは、精製済みの炭水化物のことである。分子が「実質的に精製済み」とあるとは、その少なくとも60%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%が、自然環境であれば関連する他の成分を含まないということである。本明細書では、「精製」という用語は、さらに、試料から汚染物質を除去することをも指す。汚染するタンパク質を除去することによって、試料中の注目しているポリペプチドの割合が増加する。さらに、組換え型ポリペプチド(例えば、糖タンパク質)は植物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、または、哺乳類宿主細胞において発現する、あるいは、これらの宿主細胞から精製され、このポリペプチドが宿主細胞のタンパク質を除去することによって精製される。こうすることによって、試料中の組換え型ポリペプチドの割合が増加する。本明細書では、「動物」という用語は、動物界に属していることを意味する。動物には、家畜、農畜用動物、牧畜動物、ペット動物、海洋性動物および淡水性動物、ならびに、野生動物を含めるが、これらの例に限定されるものではない。

20

30

【0041】

本明細書では、「家畜」は「家畜種」とも、「農畜用動物」とも、「商用目的で飼育される動物」とも称され、この用語は、食物または繊維を生産するために、または、労働力もしくはペットとして、農業の環境または水産養殖環境において意図的に飼育される飼いや慣らされた動物を指す。

【0042】

本明細書では、「栄養補助食品」や「栄養補助食品組成物」などの用語は、食餌の一部として(例えば、動物飼料に加えるものとして)使用される食餌補助食品または栄養補助食品として配合される食品を指す。本発明では、栄養補助食品組成物の複数の例について記載する。

40

【0043】

本明細書では、「キット」という用語は、試薬や書類などを組み合わせたものを指して使用する。キットが、抽出用溶液、抗体、検出用試薬などの試薬を備えていてもかまわない。「キット」という用語は、試薬および/または書類の特定の組み合わせに限定されるものではない。

【0044】

50

本明細書では、「有毒」という用語は、被験体、細胞、または、組織に対して、毒物投与前の同一細胞または組織と比較して、任意の害を及ぼすまたは有害な効果を指す。

【0045】

本明細書では、「フリーズドライ」、「凍結乾燥」、および、「低温乾燥」という用語は、凍結状態にある物質から昇華によって溶媒を除去することを指す。これは、共融点より低い温度で乾燥するように物質を凍結させた後に、昇華潜熱を与えることによって達成される。熱供給を精密に制御することによって、生成物を再度融解させずに凍結状態で乾燥させることができる。実用的な応用では、このプロセスは減圧条件下で加速され、かつ、精密に制御される。

【0046】

本明細書では、「乾燥自由流動粉末」という用語は、例えば、器、袋、容器などから障害となる大きな凝集塊を形成せずに注ぐことができる粉末などの、自由流動する乾燥粉末を指す。

【0047】

本明細書では、「粉碎」という用語は、衝撃、剪断、または、摩擦によって粒径を小さくすることを指す。

【0048】

本明細書では、「洗浄」という用語は、不純物または調製物の不所望の可溶性成分を（例えば、任意の種類、溶質（例えば、蒸留水、バッファ、または、溶媒）または混合物を用いて）除去または洗い落とすことを指す（例えば、酵母細胞壁抽出物を洗浄して、酵母細胞壁の成分ではない成分を試料から除去したり、マイクロタイタープレートのウェルを洗浄して、非結合性または非特異的に結合する成分を除去したりする）。

【0049】

「抗体」または「免疫グロブリン」という用語は、特異抗原に結合するタンパク質を指す。免疫グロブリンとしては、多クローン性抗体、単クローン性抗体、キメラ性抗体、および、ヒト化抗体、抗原結合性フラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメントなどがあげられるが、これらの例に限定されるものではなく、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE、および、分泌免疫グロブリン(sIg)の各綱の免疫グロブリンを含める。免疫グロブリンは、一般に、2つの同一重鎖および2つの軽鎖を有する。ただし、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語には、さらに、単鎖抗体および二鎖抗体も含める。抗体は、公知の方法のいずれによって生成されてもよい（例えば、Current Protocols in Immunology (1998) John Wiley and Sons, Inc., N.Y. を参照）。

【0050】

「抗原」という用語は、抗原分子の一部に対して特異的な抗体と反応性を有する、炭水化物、タンパク質、糖タンパク質、リポ蛋白、脂質などの物質を指す。

【0051】

本明細書では、「分析物」という用語は、原子、分子、原子団および/または分子団、物質、または、化学的構成物質を指す。分析物はそれ自身を測定することはできないが、分析的手順（例えばHPLCやNMR）によって、分析物の持つ（例えば、物理的、化学的、生物学的）態様または性質を決定することはできる。例えて言えば、「椅子」（分析物としての成分）そのものを測定することはできないが、椅子の高さや幅は測定可能であることと同じである。これと同様に、マイコトキシンを測定することはできないが、マイコトキシンの濃度に関連するマイコトキシンシグナル（例えば、発色シグナル、蛍光シグナル）を測定することはできる。

【0052】

「免疫沈降」、「免疫精製」、および、「親和性精製」、という用語、ならびに、例えば動詞や形容詞などの文法的な変化形は、抗体を使用して、該抗体に対する抗原または抗原の一部を他の分子の混合物から分離することを指す。

【0053】

「免疫検出」という用語、および、文法的な変化形は、抗体を使用して、抗原または抗

10

20

30

40

50

原の一部の存在を他の分子の混合物から特定することを指す。

【 0 0 5 4 】

「染色」という用語は、ある物質（例えば、試料、飼料の試料、飼料の試料の抽出物、単数個の細胞、複数個の細胞）が持つ特定の成分および/または特徴をより良好に可視化、区別、または、特定するために使用される、当業者にとって公知の任意の数のプロセスを指す。

【 0 0 5 5 】

「免疫蛍光法」という用語は、当業者にとって公知の手順によって特定、マーキング、標識、可視化、または、可視化するために使用される染色法であって、配位子（通常は抗体）が受容体（通常は抗原）に結合し、この配位子が（抗体である場合には）蛍光分子に接合するか、あるいは、配位子が配位子に特異的な抗体に結合され、該抗体が蛍光分子に接合し、さらに、該蛍光分子が適切な機器（例えば、蛍光顕微鏡）を用いて視覚化可能である、染色法を指す。

10

【 0 0 5 6 】

「抗原決定基」という用語は、特定の抗体と接触する抗原の一部（例えば、エピトープ）を指す。タンパク質またはタンパク質のフラグメントを使用して宿主動物を免疫化すると、該タンパク質上の任意の領域または三次元構造に特異的に結合する抗体の生成を、該タンパク質の多数の領域が惹起することがあり、これらの領域または構造は、抗原決定基と称される。抗原決定基は、抗体に結合しようとする際に、インタクトな抗原（免疫応答を誘発するために用いる「免疫原」）と競合することもある。

20

【 0 0 5 7 】

本明細書では、「イムノアッセイ」という用語は、試料中の抗原の検出を可能にすることを意図する定性的または定量的な検査を指す。イムノアッセイは、通常、抗原を認識する抗体を使用する。抗原を認識する抗体を、例えば、発色性または蛍光発生性マーカーまたは酵素などの、可視化ステップに直接的または間接的に関連させてもよい。イムノアッセイの例としては、酵素結合免疫吸着測定法（「ELISA」）、側方流動試験、ウエスタンブロット、微小粒子系アッセイ（例えば、Luminex（登録商標）アッセイ）、磁気イムノアッセイ、ドットブロット、酵素免疫測定法（EIA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、化学発光イムノアッセイ（CLIA）、計数イムノアッセイ（CIA）などがあげられるが、これらの例に限定されるものではない。イムノアッセイは競合的であつてもよく、非競合的であつてもよい。

30

【 0 0 5 8 】

本明細書では、「酵素結合免疫吸着測定法」または「ELISA」（時には「サンドイッチアッセイ」とも称される）という用語は、特定の種類のイムノアッセイを指す。通常は、未知の量の抗原が、硬い表面上で吸収または固定化され、該抗原を認識することができる抗体に曝露する。結合する抗体の量は、蛍光発生性または発色性酵素への直接的または間接的なリンクによってほぼ決まる。ELISAの種類としては、直接ELISA、間接ELISA、サンドイッチELISA、競合ELISA、逆ELISAなどがあげられるが、これらの例に限定されるものではない。本明細書では、「ELISA」という用語は、酵素結合免疫吸着測定法（EIA）を指す。多数のELISA法および応用法が当該技術分野において知られており、多くの文献中に記載されている（例えば、Crowther, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)," in *Molecular Biomechanics Handbook*, Rapley et al. (eds.), pp. 595-617, Humana Press, Inc., Totowa, N.J. (1998); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Ch. 11, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994)を参照)。さらに、多数の市販のELISA検査システムも存在する。本明細書では、「食物」、「食糧」、「飼料」、「飼料製品」、「一般動物用飼料」などの用語は、エネルギーおよび/または栄養分を食事に供与する（例えば、動物が）摂食する任意の物質を指す。例としては、完全混合飼料（TMR）、飼料（forage）、ペレット、濃縮物、事前混合副産物、穀物、醸造粕、糖蜜、

40

50

食物繊維、飼料 (f o d d e r)、牧草、乾草、穀粒、葉、粗粉、可溶物、栄養補助剤などがあげられるが、これらの例に限定されるものではない。食糧はその物理的な形状によって限定されるものではない。食糧は、より小さな粒径になるまで処理されてもよい (例えば、チップ状に切っても、粗切りにしても、粉碎しても、挽いてもよい)。また、食糧は液体状にしてもよい (例えば、抽出しても、煮ても、濃縮しても、シロップなどの粘稠性を有する形態に転化してもよい)。さらに、食糧は、より大きな粒径になるように処理されてもよい (例えば、まとめても、固めても、圧縮しても、ペレット状、ブロック状、正形状、フレーク状などの複合形状に加工してもよい)。

【 0 0 5 9 】

本明細書では、「添加剤」または「栄養補助剤」は、名詞として使用した場合、別の物質またはものに加えられる、または、別の態様で含まれる物質またはものを指す。さらに、本明細書では、「添加剤」という言葉と「栄養補助剤」という言葉とは、名詞として使用した場合、動物に与えられる前に動物飼料に混ぜられる「添加剤」または「栄養補助剤」に言及する際には、互換的に使用可能である。

10

【 0 0 6 0 】

本明細書では、「グルカン」という用語は、任意のグルコースを含有する炭水化物の重合体を指す。一部の実施形態では、グルカンはD - グルコースの重合体であって、重合度も、他の重合体との共有結合性の関連または非共有結合性の関連も、正確な炭水化物の組成も限定されない。グルカン重合体の長さ全体にわたって、D - グルコース単位が、
- リンクおよび - リンクのいずれか一方または両方に関与している。

20

【 0 0 6 1 】

本明細書では、「炭水化物」という用語は、一般式 $C_m (H_2O)_n$ で表される有機化合物に言及するために使用される。炭水化物は、炭素原子、水素原子、および、酸素原子のみからなり、水素原子と酸素原子との原子比は 2 : 1 である。

【 0 0 6 2 】

本明細書では、「シグナル」という用語は、概ね、反応 (例えば、抗体の抗原との結合) が起こったことを示唆する任意の検出可能なプロセスに言及するために使用される。放射能や蛍光定量的または比色分析的生成物 / 試薬の形態のシグナルは、いずれも本発明において使用されてもかまわない。本発明の一部の実施形態ではシグナルが質的に評価されるが、別の実施形態ではシグナルが定量的に評価される。

30

【 0 0 6 3 】

本明細書では、「硬い支持部」という用語は、試薬 (例えば、抗体、抗原などの他の検査成分) を付着させる、任意の固体物質または動かない物質に言及するために使用される。例えば、E L I S A 法では、マイクロタイタープレートのウェルが、硬い支持部を提供する。硬い支持部の別の例としては、顕微鏡のスライド、カバーガラス、ビーズ、粒子、細胞培養用フラスコ、さらに多数のその他の適切な品目があげられる。

【 0 0 6 4 】

「特異的結合」および「特異的に結合」という用語は、抗体と抗原との間の相互作用に言及するために使用される場合、抗原上に特定の構造 (つまり、抗原決定基またはエピート) が存在することに依存する相互作用について説明する。換言すれば、抗体は、抗原に固有のタンパク質構造を認識してこれに結合するのであって、一般的に全てのタンパク質に結合 (つまり、非特異的結合) するのではない。

40

【 0 0 6 5 】

〔 発明の詳細な説明 〕

酵母細胞壁 (Y C W) は、(1 2) (1 3) (1 6) - - D - マンナンおよび (1 3) (1 6) - - D - グルカンという、2つの主な多糖である成分を含む複雑な構造を備えている。これらの多糖は、最近報告されたレビュー記事 (Lesage et al. (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:317-343. この記事の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする) において議論されているように、O - および N - グリコシジル (g l y c o s i d y l) 結合を介して Y C W タンパク質に接続されている。工業

50

規模であれば、Y C Wは、D.A. HowesとK.E. Newmanとが報告するように（例えば、米国特許第6,045,834号明細書を参照。この特許文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）、通常、溶解状態にある酵母生物から遠心分離および洗浄によって分離または抽出される。この段階では、Y C Wは水に可溶ではない。これに続く、一次Y C Wの酵素処理および化学的処理によって、多糖およびタンパク質の構造が改質され、こうすることによって、これらのY C Wの成分は少なくとも部分的に水およびジメチルスルホキシド（「DMSO」）に可溶になる。上記生成物の可溶部および不溶部の組成は、プロセスの条件に依存する。

【0066】

イムノアッセイは、このように複雑な非同種の混合物に対して使用可能な高感度分析法を包含する。本発明の一部の方法実施形態では、細胞壁の全ての主な構成成分を相互に接続する酵母(16)-D-グルカンを含む抗原で免疫化された動物から得られる抗体(Kollar et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:17762-17775を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)は、この多糖を認識し、強力かつ高感度のイムノアッセイを確立することを可能にする。本発明の一部の実施形態では、定量的イムノアッセイ(ELISA)が、動物飼料の試料において、Y C Wから導出される栄養添加剤であるMYCOSORB(ALLTECH, Inc.社)の分析を可能にする。Y C Wから(16)-D-グルカンを検出するアッセイは、(16)-D-グルカンが植物の炭水化物の中では非常に希少なため、Y C Wの定量化における特異性が非常に高い。したがって、このY C Wの多糖を標的とする抗体は、動物飼料中に存在する植物多糖と大きな相互作用は起こさず、アッセイのバックグラウンドが確実に低くなる。

【0067】

さらに、本発明の一部の実施形態は、(1)例えば、酵母(14)-/(16)-D-グルカンを認識する抗体を調製するための抗原として、可溶性(14)-/(16)-D-グルカンを酵母細胞壁から分離する方法(Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:1031、および、Arvindekar et al. (2002) Yeast 19:131-139を参照。いずれの文献も内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)；この多糖のヒドロキシル基をアルデヒド基に転化するために(Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)、該ヒドロキシル基をグルコピラノース環のC6部位でPfizer-Moffatt試薬を用いて酸化する方法(Pfizer et al. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)；および、多糖-タンパク質の接合体を生成するために、ウシ血清アルブミン(BSA)のリジン残基を用いて、この酸化型の(14)-/(16)-D-グルカンの、還元性アミノ化反応における使用方法(Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)も提供する。一部の実施形態では、本発明は、動物(例えば、ウサギ)の免疫化において可溶性免疫原として使用される(14)-/(16)-D-グルカン-BSA接合体を(例えば、イオン交換、DEAEセルロース、および、イオン強度が異なるNa₂HPO₄バッファを用いて)分離精製する方法を提供する(Howard et al. (2001) Basic Methods in Antibody Production and Characterization, CRC Press, pp. 11-18 and 31-50を参照)。一部の実施形態では、本発明は、BSAでコーティングされた親和相樹脂を調製する方法(Matejtschuk (1997) Affinity Separations: a Practical Approach, Oxford University Pressを参照)と、BSAに特異的な抗体および(14)-/(16)-D-グルカンに特異的な抗体をどちらも含有するウサギ血清からBSAに特異的な抗体を吸収する際に、この親和相樹脂を使用する方法とを提供する。本発明の一部の実施形態では、多糖をタンパク質に接合する方法が、ヒトワクチンおよび動物ワクチンを生成する際に使用可能である。これは、この接合方法では多糖の元の構造が保存され、典型的な接合方法とは異なり、多糖の還元末端が改質されないからで

10

20

30

40

50

ある（米国特許第6,596,861号明細書を参照。この特許文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）。

【0068】

〔*Saccharomyces cerevisiae*の細胞壁のグルカン〕

グルカンは、*Saccharomyces cerevisiae*細胞壁の多糖中に多く存在する（Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:151-158を参照）。酵母細胞壁の形状および剛性の維持における(1-3)-D-グルカンの役割（Klis et al. (2006) Yeast 23:185-202; Lesage et al. (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:317-343を参照。いずれの文献も内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）、および、全ての細胞壁の多糖をリンクする多糖としての(1-6)-D-グルカンについては、文献に記載されている（Aimaniada et al. (2009) J. Biol. Chem. 284:13401-13412; Kollar et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:17762-17777; Klis et al. (2002) FEMS Microbiology Rev. 26:239-256を参照。いずれの文献も内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）。好氣的に成長した*S. cerevisiae*細胞中における可溶性および不溶性グリコーゲン状の(1-4)-D-グルカンの存在については、初期の酵母に関する文献で頻りに言及されている（Gunja-Smith et al. (1974) Biochem. Biophys. Res. Com. 56:588-592; Grba et al. (1975) Appl. Microbiol. Biotechnol. 2:29-37を参照。いずれの文献も内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）。また、2つの形態のグリコーゲンシターゼが特定されている（Gunja-Smith et al. (1977) J. Bacteriol. 130:818-825; Rothman-Denes et al. (1970) PNAS 66:967-974を参照。いずれの文献も内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）。グリコーゲンは、*S. cerevisiae*によって蓄積される、エネルギーを貯蔵する炭水化物であって、酵母の餌の不足時に利用可能である。グリコーゲンは、1-4リンクによって繋がった10~14の-D-グルコースの残基を含む分岐鎖状構造を有する、分子量が約 10^8 の-D-グルコースの重合体である（Aklujkar et al. (2008) J. Instit. Brew. 114:205-208; Boulton et al. (2001) The Biochemistry of Fermentation. In: Brewing Yeast and Fermentation, Blackwell Science, Iowa, pp. 89-92を参照。いずれの文献も内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）。

10

20

30

40

50

【0069】

酵母細胞壁中の(1-4)-D-グルカンの含有率は、細胞の栄養状態、単離方法、環境条件、および、細胞を回収した時期次第で、乾燥重量の1%という低い値（Lille et al. (1980) J. Bacteriol. 143:1384-1394を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）から29%という高い値（Sedmak et al.、米国特許出願公開第2006/0263415を参照。この特許文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）まで、ばらつきがある（Lille et al. (1980) J. Bacteriol. 143:1384-1394を参照）。工業的に生成されたビール酵母細胞（Sedmak et al.、米国特許出願公開第2006/0263415を参照。この特許文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）は、グルカンを28.9%の乾燥重量（d.w.）濃度で含有し、そのうちの12.4% d.w.が(1-4)-D-グルカンであった。これらの細胞をアルカリプロテアーゼで処理すると、水不溶性の細胞壁の成分が54.5% d.w.のグルカンを含有し、また、(1-4)-D-グルカンの重量の半分を超える量（29.2% d.w.）を含有していた。

【0070】

2002年に、ArvindekarとPatilとが（Arvindekar et al. (2002) Yeast 19:131-139を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）、(1-4)-D-グルカンが(1-6)-D-グルカンに共有結合しているという自らの知見に基づいて、他の研究者が「洗い流すには困難」な酵母グリコーゲンであると規定した不溶性画分（Fleet et al. (1976) J. Gen. Microbiol. 94:180-192を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）が

酵母細胞壁内に存在することに対して、説明を提案した。しかしながら、これは、Kollarらが報告した1997年の論文とは矛盾していた(Kollar et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:17762-17775を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)。また、酵母細胞壁内の(1-6)-D-グルカンの役割および構造について、Aimaniadaらによる報告とも矛盾していた(Aimaniada et al. (2009) J. Biol. Chem. 184:13401-13412を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)。なお、ArvindekarとPatilとの知見については、両者が酵母細胞壁を酵素加水分解して得られた生成物の極微量の画分を用いて、分離した生成物の定量化にも構造決定にもNMRを採用しなかったため、構造的な検証が必要である。本発明の実施形態を実現する過程で実施された実験では、Saccharomyces細胞壁から得られる混合した状態の(1-4)-D-グルカン/(1-6)-D-グルカン多糖を単離するために、大規模な分離方法を開発し、この生成物の構造を、NMR分光法を用いて確定した。

【0071】

〔動物用食物および飼料〕

動物飼料とは、飼い慣らされた家畜(例えば、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、家禽類、水牛、アルパカ、ラマ、ロバ、ラバ、ウサギ、ニワトリ、ガチョウ、シチメンチョウ、ブタなど)に食べさせるという特定の目的で使用される任意の食糧である。動物飼料には、乾草、麦わら、貯蔵物、圧縮飼料およびペレット状飼料、油、混合飼料、さらに、発芽した穀物およびマメ科植物などが含まれることが多い。世界中の動物飼料産業は、2006年には63,500万トンの飼料を消費し、年間成長速度は約2%であった。人の食品ではなく飼料を育てるために農地を使用することには、議論の余地がある。ある種類の飼料(例えばトウモロコシ)は人の食品ともなるが、そうはならない種類の飼料(例えば牧草)もある。動物に対してエネルギー源を提供する以外に、動物飼料は、体が用いる栄養分(例えばセレン)をも提供する。動物飼料は、動物に与えられる前に、栄養補助剤および/または添加剤(例えば、MYCOSORB)と混合されることが多い。

【0072】

〔免疫検出方法〕

本発明は、免疫検出アッセイ(つまりイムノアッセイ)を包含する、試料中の物質を検出するための方法を提供する。イムノアッセイ(免疫検出アッセイ、免疫検出方法)は、抗体を使用して、抗体が結合する物質(例えば、抗原)を検出(可視化、定性的特定、定量的検出)することを包含する。抗体が認識する抗原は、巨大分子またはそのフラグメント(例えば、重合体、炭水化物、糖タンパク質、タンパク質、巨大分子の一部または単量体)であってもよい。例えば、本発明の一部の方法は、酵母細胞壁のグルカン(例えば、(1-4)-D-グルカン、(1-6)-D-グルカン、および/または、(1-4)-D-グルカン/(1-6)-D-グルカン)の検出において使用可能である。

【0073】

物質(例えば、低濃度で存在する物質、複雑な混合物中に存在する物質、炭水化物系物質、酵母(1-4)-D-グルカン、酵母(1-6)-D-グルカン、酵母(1-4)-D-グルカン/(1-6)-D-グルカン)の定性的または定量的検出において、様々なイムノアッセイが使用可能である。イムノアッセイの種類としては、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、側方流動試験、ウエスタンブロット、微小粒子系アッセイ(例えば、Luminex(登録商標)アッセイ)、磁気イムノアッセイ、ドットブロット、酵素免疫測定法(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、化学発光イムノアッセイ(CLIA)、計数イムノアッセイ(CIA)などがあげられるが、これらの例に限定されるものではない(例えば、Wild et al. (2005) "The Immunoassay Handbook, 3rd Ed.", Elsevier Ltd., Oxford, UKを参照)。イムノアッセイは競合的であってもよく、非競合的であってもよい。

【0074】

10

20

30

40

50

〔酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)〕

酵素結合免疫吸着測定法 (「ELISA」) は、各種工業分野において品質管理チェックに使用されるとともに、医学および植物病理学において診断上の道具として使用されている。典型的なELISAの1つの例では、プローブ分子を利用する。まず、このプローブ分子を、ポリスチレン製マイクロプレートまたはその他の表面上に固定化する。次に、例えばBSAなどの遮断薬を塗布およびインキュベーションする。未知の濃度を有する特定の標的分子 (タンパク質であることが多い) を含有する生物学的試料またはその他の試料を、固定化済みプローブ分子に接触させる。存在していれば、標的分子は、標的分子の濃度に比例してプローブによって捕捉される。次に、典型的には、表面を弱い洗剤溶液で洗浄して、特異的に結合していない分子をすべて除去する。次に、例えば第二抗体などの別の分子を塗布して、捕捉プローブ、標的分子、および、標識済み検出プローブを有する「サンドイッチ」状複合体を形成する。この2つ目の分子は、検出プローブまたは検出抗体と称されることが多く、一般的に、酵素、ハプテン、または、その他の標識化分子に共有結合によってリンクされている。

10

【0075】

最後の洗浄ステップ後に、上記標識済み検出抗体に結合し、酵素性基質、蛍光標識済み検出用試薬、または、その他の種々のレポーターを含有する接合体を加えることによって、プレートを処理する。レポーターは、試料中の対象となる抗原の量に比例する、検出可能なシグナルを生成する。典型的には、ELISAを比色分析または蛍光プレート読み取り装置を用いて読み取り、この結果、各ウェルについて、1つの対象分析物測定結果が得られる。ELISAアッセイのその他の変形例としては、間接ELISA、競合ELISA、逆ELISAなどがあげられるが、これらの例に限定されるものではない (例えば、Crowther et al. (2008) "The ELISA Guidebook, 2ndEd.", Humana Pressを参照)。

20

【0076】

多数の場合に、ELISAは、自動化機器を用いた処理を可能にする標準化フォーマットに合うように製作されたマイクロプレートにおいて実施される。これらの標準規格は、Society of Biomolecular Sciences (SBS) によって確立され、SBS規格として知られている。SBS規格によれば、マルチウェルプレートの所謂「フットプリント (設置面積)」は、約85mm x 125mmであり、ウェルはウェルの総数に応じて指定された位置フォーマットに配置される。米国国家規格協会 ("ANSI"; American National Standards Institute) は、マイクロプレート用のSBS規格について、「Footprint Dimensions」(ANSI/SBS1-2004)、「Height Dimensions」(ANSI/SBS2-2004)、「Bottom Outside Flange Dimensions」(ANSI/SBS3-2004)、「Well Positions」(ANSI/SBS4-2004) という印刷物として発行している。もっとも一般的には、ELISAのユーザは、単一のプレートに96個のウェルを採用する。あるいは、1回のアッセイに96個未満のウェルが必要なのであれば、9個のウェルを有する「ストリップ」を最大で12個まで採用し、1度に96個のウェルの一部だけを使用することが可能である。

30

40

【0077】

〔検査サービス〕

一部の実施形態では、コンピュータを用いた分析プログラムを使用して、アッセイ (例えば、免疫アッセイ、ELISA) によって生成した生データを翻訳して (例えば、抗原の存在、非存在、または、量) (例えば、酵母 (1 4) - - D - グルカン、酵母 (1 6) - - D - グルカン、酵母 (1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン) 、エンドユーザ (例えば、家畜またはペットの飼育者または取扱業者、獣医師、農業者、消費者) に提供する予測値のデータを得る。エンドユーザは、任意の適切な手段を用いて、この予測データにアクセスすることができる。こうすることによって、一部の実施形態では、本発明は、免疫アッセイ分析の訓練を受けていない可能性が高いエンドユーザが

50

、生データを理解する必要がないという、さらなる利点を提供する。データは、もっとも有用な形態でエンドユーザに直接提示される。したがって、エンドユーザは、情報をただちに使用して、被験体（例えば、家畜またはペット）の世話の仕方を最適化することができる。

【0078】

本発明には、アッセイを実施する研究室から、および、該研究室へ、試料に関する情報を受信、処理、および、伝送することができる任意の方法をも含む。例えば、本発明の一部の実施形態では、試料（例えば、飼料の試料、飼料の試料の抽出物など）が得られ、生データを生成するために、所在地が世界中のどこであってもよい（例えば、被験体が存在する国、または、情報が最終的に使用される国と一致する、または、それらの国とは別の国にあってもよい）プロファイリングサービス（例えば、研究室など）に提出される。エンドユーザは、第三者に試料（例えば、飼料抽出物）を取得してもらい、プロファイリングセンターへ送ってもらってもよい。あるいは、被験体が自ら試料を収集し、プロファイリングセンターへ直接送ってもよい。試料が以前に求めた情報を含んでいるのであれば、エンドユーザが、この情報をプロファイリングサービスへ直接送ってもよい（例えば、情報を記録した情報カードをコンピュータでスキャンし、電子通信システムを用いて、データをプロファイリングセンターのコンピュータへ伝送してもよい）。プロファイリングサービスは、試料を受け取ると、これを処理して、エンドユーザにとって望ましい診断情報または予後情報に特異性を有するプロファイリングを実施する（例えば、抗原の含有量を求める）。

10

20

【0079】

そして、プロファイリングデータを、エンドユーザが解釈できるように適切なフォーマットに整える。例えば、生データを提供するのではなく、フォーマットを調製することによって、エンドユーザにリスクアセスメント（例えば、抗原が存在する可能性）を提示したり、さらに、特定の家畜の世話の選択肢を勧める勧告を出したりすることができる。データは、任意の適切な方法によってエンドユーザに提示されればよい。例えば、一部の実施形態では、プロファイリングサービスは、エンドユーザのために（例えば、接触する場所や家畜を世話する場所において）印刷可能な報告書を作成、または、エンドユーザに対してコンピュータモニタ上に提示する。

【0080】

一部の実施形態では、情報は、家畜を世話する場所、または、地域の施設においてまず分析される。そして、さらに分析、および/または、生データをエンドユーザもしくは別の関係者にとって有用な情報に変換するために、生データは中央処理施設へ送られる。中央処理施設は、プライバシー（全てのデータが、一様なセキュリティプロトコルを用いて中央の施設で記憶される）、速度、および、データ解析の一様性という効果をもたらす。そして、中央処理施設は、エンドユーザとの通信後に、データの最終的な処理法を制御する。例えば、中央の施設は、電子通信システムを用いて、データをエンドユーザへ提供する。

30

【0081】

一部の実施形態では、エンドユーザは、電子通信システムを用いてデータに直接アクセスすることができる。エンドユーザは、結果に基づいて、さらにアドバイスを求めてもよい。一部の実施形態では、データは研究目的に使用される。例えば、データは、家畜またはペットの栄養摂取計画をさらに最適化するために使用されてもよい。

40

【0082】

〔組成物およびキット〕

一部の実施形態の方法において使用する（例えば、該方法にとって十分な、必要な、または、有用な）本発明の組成物は、特異抗原（例えば、酵母（1 4） - D - グルカン、酵母（1 6） - D - グルカン、酵母（1 4） - /（1 6） - D - グルカン）の存在または非存在を検出するための試薬を含む。これらの組成物のうちのいずれも、単独で、または、本発明の別の組成物と組み合わせて、キットの形態で提供され

50

てもよい。キットは、適切なコントロール用試薬および/または検出用試薬をさらに備えていてもよい。

【0083】

〔抗原 - キャリア接合〕

一部の実施形態では、本発明は、酵母細胞壁物質の分析（例えば、免疫学的分析、抗体調整のためなど）において使用可能な組成物（例えば、抗原）を提供する。一部の実施形態では、本発明は、可溶性の（1 4） - - /（1 6） - - D - グルカン、酵母（1 6） - - D - グルカンに対する抗原として、酵母細胞壁から分離するための方法を提供する（Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:1031; Arvindekar et al. (2002) Yeast 19:131-139を参照。いずれの文献も内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）。また、一部の実施形態では、本発明は、この多糖のヒドロキシル基を、Pfizer - Mof fat 試薬を用いてグルコピラノース環のC 6部位で酸化（Pfizer et al. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）させて、アルデヒド基に転化するための方法を提供する（Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）。さらに、一部の実施形態では、本発明は、この酸化型（1 4） - - /（1 6） - - D - グルカン、キャリア（例えば、BSAなどの担体タンパク質）のリジン残基との還元性アミノ化反応において使用し、多糖 - キャリア接合体を生成するための方法を提供する（Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）。一部の実施形態では、本発明は、動物（例えば、ウサギ）を免疫化するための可溶性免疫原として使用される、純粋な抗原（例えば、（1 4） - - /（1 6） - - D - グルカン - BSA接合体）の分離における分離法の応用（例えば、イオン交換、様々なイオン強度のDEAEセルロースおよびNa₂HPO₄のバッファ）に関する（Howard et al. (2001) "Basic Methods in Antibody Production and Characterization", CRC Press, pp. 11-18 and 31-50を参照）。一部の実施形態では、本発明は、さらに、BSAでコーティングされた親和相の調製（Matejtschuk (1997) "Affinity Separations: A Practical Approach", Oxford University Pressを参照）、および、キャリア（例えば、BSA）に対する抗体と抗原（例えば、（1 4） - - /（1 6） - - D - グルカン）とをどちらも含有する抗血清（例えば、ウサギ血清）からキャリアに特異的な（例えば、BSAに特異的な）抗体を吸収する際に該親和相を使用することによって、結果的に得られる抗体調整物の特異性を促進することにも関する。本発明の一部の実施形態における、多糖をキャリア（例えば、BSAなどのタンパク質キャリア）に接合させる方法は、典型的な接合法とは異なり、還元末端の改質を引き起こさず、多糖の構造を保存するので、ヒトワクチンおよび動物ワクチンの生成において使用可能である（Moreauら、米国特許第6,596,861号明細書を参照。この特許文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする）。

【0084】

多糖またはオリゴ糖の弱い抗原性は、抗原として使用する前に改質する必要があることが多い。本発明の一部の実施形態では、（（1 6） - - D - グルカンを含む）多糖抗原を、免疫化に使用する種とは異なる動物種に由来する、または、これから導出されるキャリア（例えば、BSAなどのタンパク質キャリア）に接合する合成法を開発した（Howard et al. (2001) "Basic Methods in Antibody Production and Characterization", CRC Press, pp. 11-18 and 31-50; Matejtschuk (1997) "Affinity Separations: A Practical Approach", Oxford University Pressを参照）。本発明は、使用されるキャリアの特質または種類によって限定されるものではないが、BSAが好適であり、これは、BSAが市販されていること、および、種々の化学的な方法によって多糖またはオリゴ糖に接合可能な遊離アミノ基をそれぞれ1つずつ有するリジン残基が5つ存在することが理由である（Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862; Lees et al. (1996) Vaccine 14:190-198; Pawlowski et al. (1999) Vaccine 17:1474-1483を参照。いずれの

文献も内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)。一部の好適な実施形態では、接合に使用される抗原およびキャリアの糖鎖は水溶性である。一部の実施形態では、抗原としての糖鎖(例えば、(1-4)-β-D-グルカン多糖)の還元末端のアルデヒド基は、キャリア(例えば、BSA)に対する直接的な接合には使用されないが、これは、使用すると、多糖である抗原が有する構造および結合能を大きく変化させてしまうからである。一部の実施形態では、本発明は、無水酢酸/ジメチルスルホキシド(Ac₂O/DMSO)系を用いて、最大限に保存された糖鎖の構造を可能にし(Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)、こうすることによって、C3以外の部位において酸化させることが可能になる。

10

【0085】

一部の実施形態では、本発明は、抗体(例えば、多クローン性抗体)を生成する際に使用する抗原(例えば、(1-4)-β-D-グルカン-BSA(ウシ血清アルブミン))接合体の合成において、酵母細胞壁の成分(例えば、Saccharomyces cerevisiae細胞壁から得られる可溶性の(1-4)-β-D-グルカン)を使用する方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、(1-4)-β-D-グルカンを含む免疫原性組成物、および/または、(1-4)-β-D-グルカンを含む接合体(例えば、タンパク質接合体または糖接合体)を提供する。一部の実施形態では、本発明の抗体組成物は、注目している試料(例えば、動物飼料の試料、または、その誘導体、画分、もしくは、抽出物)中の酵母細胞壁生成物の検出において使用可能である。一部の実施形態では、本発明の組成物は、例えば酸抽出物によって、グルカン濃縮物質またはグルカン濃縮生成物(GEM, ALLTECH, Inc.社, Nicholasville, KY, 米国)から抽出される(Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:1031を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)。一部の実施形態では、多糖(例えば、(1-4)-β-D-グルカン)を、ジメチルスルホキシド(DMSO)/無水酢酸(Ac₂O)混合物を用いてグルコピラノース環のC6部位で軽度(例えば、Pfizner et al. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)に酸化(-CH₂OH)基をアルデヒド(-CHO)基に転化(Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)し、さらに、酸化型の抗原(例えば、(1-4)-β-D-グルカン)をキャリア(例えば、BSA)と還元的アミノ化を起こすことができるようにする(Moreau et al., 米国特許第6,596,861号明細書、および、Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862を参照。いずれの文献も内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)。

20

30

【0086】

本発明の接合法(例えば、C6-OH部位における多糖の活性化を含む方法)は、多糖部の完全に保全された元の構造を提供し、したがって、抗原の調製にとって好適である。過ヨウ素酸酸化を含む(Hay et al. (1973) Methods Carb. Chem. 5:357-370を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)、または、CDAPの活性化を含む(Lees et al. (1996) Vaccine 14:190-198を参照)、多糖またはオリゴ糖を活性化する他の方法(ただし、これに限定されるものではない)では、かなり改質された多糖が産生され、多糖またはオリゴ糖の抗原としての有用性が弱くなる。

40

【0087】

〔抗体〕

本発明のもう一つの態様は、被験体を酵母細胞壁の成分(例えば、酵母(1-4)-β-D-グルカン、酵母(1-6)-β-D-グルカン、酵母(1-4)-β-D-グルカン、(1-4)-β-D-グルカン-BSA、ま

50

たは、これらの他のフラグメント、変異株、もしくは、接合体)で免疫化するステップと、免疫グロブリンをレシピエントから単離するステップとを含む、酵母細胞壁の成分(例えば、酵母(1 4) - - D - グルカン、酵母(1 6) - - D - グルカン、酵母(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン)を検出するアッセイにおいて使用するための免疫グロブリンを調製する方法である。この方法によって調製された免疫グロブリンが、本発明のさらにもう1つの態様である。

【0088】

多クローン性抗体を生成するための接種は、通常、抗原性組成物を生理的に容認できる希釈液(例えば、生理食塩水や他のアジュバント)中で分散させて、水性組成物を形成することによって調製される。免疫賦活性量の接種を被験体に投与し、次に、接種後の被験体を、抗原性組成物が感染防御抗体を惹起するために十分な時間維持する。

10

【0089】

抗体は、周知の手法、例えばアフィニティークロマトグラフィーによって所望の程度にまで単離可能である(例えば、Harlow and Lane, *Antibodies; a Laboratory Manual* (1988) Cold Springs Harbor Laboratory Pressを参照)。

【0090】

抗体は、種々の一般に使用される動物(例えば、ヤギ類、霊長類、ウサギ類、ロバ類、ブタ類、ウマ類、モルモット類、ラット類、または、ヒト)から得られる抗血清調製物を含む。動物から血液を採集し、血清を回収する。

20

【0091】

本発明にしたがって生成された免疫グロブリンは、抗体全体、抗体のフラグメント、または、抗体のサブフラグメントを含有していてもよい。抗体は、任意の綱の免疫グロブリン全体(例えばI g G、I g M、I g A、I g D、または、I g E)、キメラ性抗体、または、本発明の2つ以上の抗原に対して二重の特異性を有するハイブリッド抗体であってもよく、さらに、ハイブリッドフラグメントを含めた、例えばF(a b')₂、F a b'、F vなどのフラグメントであってもよい。

【0092】

あるいは、単鎖抗体の生成をするために説明した手法を、当該技術分野において公知の方法を用いて、特定の抗原に特異的に結合する単鎖抗体を生成するように適合させてもよい。関連する特異性を有するが、明確に異なるイデオタイプの組成を有する抗体を、ランダムに組み合わせた免疫グロブリンのライブラリーから、チェーンシャフリング法(chain shuffling)によって生成してもよい(例えば、Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991を参照)。

30

【0093】

単鎖抗体も、雑種細胞c D N Aをテンプレートとして用いて、例えばP C RなどのD N A増幅法で作製可能である(例えば、Thirion et al., 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11を参照)。単鎖抗体は単一特異性であっても二重特異性であってもよく、二価であっても四価であってもよい。二重特異性を有する四価の単鎖抗体の作製は、例えば、Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63に教唆されている。二重特異性を有する二価の単鎖抗体の作製は、例えば、Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206に教唆されている。

40

【0094】

単鎖抗体をコード化するヌクレオチド配列を、後述のように、手動または自動ヌクレオチド合成法を用いて作製し、組換え型D N A法を用いた標準的な方法でクローン化して発現作製物に組み込み、さらに、コード配列を発現させる細胞に導入してもよい。あるいは、単鎖抗体を、例えば繊維状ファージ技術を用いて直接生成してもよい(例えば、Verhaar et al., 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls et al., 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91を参照)。

【0095】

特定の抗原に特異的に結合する抗体は、リンパ球の集団においてインビボ生成を惹起す

50

ることによって、または、免疫グロブリンライブラリー、もしくは、文献（例えば、Orlando et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winter et al., Nature 349, 293-299, 1991を参照）に開示されている非常に特異的に結合する試薬のパネルをスクリーニングすることによっても生成可能である。

【0096】

キメラ性抗体は、WO 93/03151に開示されているように作製することができる。免疫グロブリンから導出され、多選択性を有する多価の結合タンパク質（例えば、WO 94/13804に記載の「二重特異性抗体」）も調製可能である。抗体は、当該技術分野において周知の方法で精製可能である。例えば、抗体は、適切な関連する抗原を結合させたカラム上を通過させることによって親和性精製可能である。この場合、結合した抗体を、高塩濃度のバッファを用いてカラムから溶出させることができる。

【0097】

本発明の免疫原性組成物は、特定の免疫原性組成物からの攻撃に反応して生成される免疫グロブリンの供給源として作用する被験体に投与可能である。このように処理された被験体は、従来 of 血漿分画法で過免疫性グロブリンがそこから得られると考えられる血漿を提供する。

【0098】

本発明の組成物としては、任意の網の免疫グロブリン全体（例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、または、IgE、キメラ性抗体）、または、本発明の2つ以上の抗原に対して特異性を有するハイブリッド抗体などの抗体（例えば、単クローン性抗体および/または多クローン性抗体）があげられるが、これらの例に限定されるものではない。さらに、本発明の組成物としては、ハイブリッドフラグメントを含めた、例えばF(ab')₂、Fab'、Fab、Fvなどのフラグメントであってもよい。

【0099】

単クローン性抗体の作製方法は、当該技術分野において周知であり、脾細胞を骨髓腫細胞に融合させることを含んでもよい（例えば、Kohler and Milstein 1975 Nature 256; 495; Harlow and Lane, Antibodies; a Laboratory Manual (1988) Cold Springs Harbor Laboratory Pressを参照）。あるいは、単クローン性Fvフラグメントは、適切なファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって得られる（例えば、Vaughan TJ et al 1998 Nature Biotechnology 16; 535を参照）。単クローン性抗体は、公知の方法でヒト化されても、部分的にヒト化されてもよい。

【0100】

本発明の一部の実施形態では、抗体組成物は、酵母細胞壁抗原を認識することができる（例えば、単クローン性抗体または多クローン性抗体は、酵母(1-4)-D-グルカン、酵母(1-6)-D-グルカン、酵母(1-4)-/(1-6)-D-グルカン、または、これらの他のフラグメント、変異株、もしくは、接合体を認識することができる）。一部の実施形態では、本発明の抗体組成物は、酵母細胞壁(1-4)-D-グルカンに結合するが、酵母細胞壁(1-4)-D-グルカンを含む重合体（例えば、酵母細胞壁(1-4)-D-グルカン、酵母細胞壁(1-4)-/(1-6)-D-グルカン、または、これらの他のフラグメント、変異株、もしくは、接合体）以外の物質中に存在する(1-4)-D-グルカンを含む部分には結合しない。一部の実施形態では、本発明の抗体組成物は、酵母細胞壁(1-6)-D-グルカンに結合するが、酵母細胞壁(1-6)-D-グルカンを含む重合体（例えば、酵母細胞壁(1-6)-D-グルカン、酵母細胞壁(1-4)-/(1-6)-D-グルカン、または、これらの他のフラグメント、変異株、もしくは、接合体）以外の物質中に存在する(1-6)-D-グルカンを含む部分には結合しない。一部の実施形態では、本発明の抗体組成物は、酵母細胞壁(1-4)-/(1-6)-D-グルカンに結合するが、酵母細胞壁（例えば、酵母細胞壁(1-4)-/(1-6)-D-グルカン、または、これらの他のフラグメント、変異株、もしくは、接合体）以外の物質中に存在する(1-4)-/(1-6)-D-グ

10

20

30

40

50

ルカンを含有する部分には結合しない。

【0101】

〔実施例〕

以下の実施例は、本発明のある好適な実施形態および態様を実証し、さらに説明するために提供されるものであって、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0102】

〔実施例1〕

〔食物グレードの *Saccharomyces cerevisiae* に属する酵母細胞壁 - グルカンからの (14) - - / (16) - - D - グルカンの抽出〕

10

〔酵母細胞壁のグルカンの調製〕

酵素 / アルカリ / 熱処理によって *S. cerevisiae* から生成した工業グレードの (16) - - D - グルカン (ALL-BGY、ALLTECH, Inc. 社、Nicholasville、KY、米国) を脱イオン水で4回洗浄して、可溶性残留物を全て除去した。フリーズドライした後に、「グルカン濃縮物質」(「GEM」) が得られた。

【0103】

〔酵母細胞壁のグルカンの酸性消化〕

図1は、各画分の調製を図示している。酵母細胞壁のグルカンの酸性消化を、Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:151-158に記載されているように実施した(該文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)。「グルカン濃縮物質」(「GEM」)(70g)を、100mMのHCl(pH値2.2)を700ml用いて80 で6時間加水分解した。この6時間の加水分解終了後に、混合物を13,500 × g / 10 / 10分で遠心分離し、上清を収集した。ペレットを150mlの脱イオン水で2回抽出し、凍結乾燥させると、57.9gの白色の非結晶生成物(P1)が得られた。

20

【0104】

これら2つの洗浄物を元の上清と合わせ、2NのNaOHで中和してpH値を7.0にした。形成した沈殿物を遠心分離から収集し(ペレットP1/7)(凍結乾燥後には1.82gであった)、37 未満の温度でBuch社真空ロータリーエバポレーターを用いて、上清を体積450mlまで濃縮した。この溶液を、5kDa AMICON 15型限外濾過遠心分離器(Millipore社、Delaware、米国)を用いてさらに濃縮した。この濃縮物(約150ml)を、同じ限外濾過器を用いて、2つの等しい体積の脱イオン水で遠心分離によって2回洗浄して、酸加水分解が原因となって生じる塩と低分子量成分とを除去した。洗浄済み濃縮物(S1)を凍結乾燥すると、7.5gの白色の非結晶生成物が得られた。ペレットP1の一部に対して、1回目の0.1NのHClを用いた抽出と同じ試薬比および条件で、2回目の抽出を実施した。これらの生成物を凍結乾燥すると、P2およびS2が得られた。この0.1NのHClを用いた2回目の抽出では、上清を中和した後も沈殿物は生成しなかった。ペレットP2の一部に対して、1回目の0.1NのHClを用いた抽出と同じ試薬比および条件で、3回目の抽出を実施し、生成物を凍結乾燥してP3およびS3を得た。0.1NのHClを用いた3回目の抽出では、上清を中和した後も沈殿物は生成しなかった。0.1NのHClを用いた抽出で得られた可溶性画分および非可溶性画分の炭水化物組成および多糖構造を、¹H NMR分光法によって確立した。試料中のマンノースおよびグルコースの含有量を、H₂SO₄-HPLC組成分析法で分析した(Dallies et al. (1998) Yeast 14:1297-1306を参照。この文献の内容全体が、参照によって本明細書に引用されるものとする)。タンパク質の推定含有量を、LECO燃焼分析法で、窒素の含有量に乗数6.25を乗じることによって算出した。

30

40

【0105】

〔実施例2〕

50

〔抗原の調製〕

〔(14) - - / (16) - - D - グルカン調製物の Ac₂O / DMSO 酸化〕

580 mg の「可溶性」グルカンを、磁気攪拌棒を備えゴム製中隔で蓋留めした 22 ml のガラス製バイアルに仕込んだ。このバイアル中に、10 ml の無水 DMSO および 110 μl の無水酢酸を、注射筒を用いて室温で攪拌しながら加えた。グルカンの懸濁液は、20 で攪拌を 4 時間続けると完全に溶解した。この混合物の攪拌を 24 時間継続した後、反応混合物を 40 ml の水で希釈した。得られた透明な溶液を、30 kDa Amicon (登録商標) 15 型限外濾過遠心分離器を用いて濃縮し、フィルタ上の残留物を 1 回につき 12 ml の脱イオン水で 5 回洗浄して、溶媒および反応物の酸化生成物を分離および精製した。遠心分離はどの回も 4,750 × g / 30 分 / 10 で実施した。フィルタ上の最終的な残留物を収集しフリーズドライすると、502 mg の酸化した (14) - - / (16) - - D - グルカンが白色粉末の形態で得られた。この生成物は水には部分可溶性であり、DMSO には完全可溶性であった。

10

【0106】

〔元素分析〕

酸化グルカンについて、C 40.05%、H 6.61% であった。C₆H₈O₅ × H₂O について、C 40.48%、H 5.66% が算出された。

【0107】

〔BSA を用いた、酸化 (14) - - / (16) - - D - グルカンの還元的アミノ化〕

20

酸化 (14) - - / (16) - - D - グルカンの試料 (412 mg) を、20 ml の脱イオン水に溶解させ、磁気攪拌しながら 2 ml の脱イオン水中で 256 mg の BSA の溶液と合わせた。次に、この混合物を、60 mg の固体シアノ水素化ホウ素ナトリウムで処理した。反応用バイアルをゴム製中隔で蓋留めし、混合物を 20 で 24 時間攪拌した。この 24 時間の攪拌終了後に、100 mg の水素化ホウ素ナトリウムを加え、混合物をさらに 22 時間攪拌した。その後、透明な溶液を、30 kDa Amicon (登録商標) 15 型限外濾過遠心分離器を用いて 4,750 × g / 30 分 / 10 で濾過した。残留物をフィルタ上で 1 回につき 12 ml の水で 4 回洗浄し、最終的な濃縮物を凍結乾燥すると、573 mg の白色粉末が得られた。

30

【0108】

〔元素分析〕

C 45.01%、H 6.40%、N 2.11% であった。

【0109】

〔(14) - - / (16) - - D - グルカン - BSA 接合体の、DEAE セルロースイオン交換クロマトグラフィーによる分離〕

未精製の上記接合体 (400 mg) を 5 mM の Na₂HPO₄ (5 ml) に溶かした溶液を、5 mM の Na₂HPO₄ に溶かした 50 g の DEAE セルロースを含有する 2 × 55 cm のガラス製クロマトグラフィー用カラムの最上部に導入した。溶出には、様々な濃度の Na₂HPO₄ を使用した。具体的には、40.1 mg の (14) - - / (16) - - D - グルカン (220 ml、5 mM) と、132.3 mg の純粋 (14) - - / (16) - - D - グルカン - BSA 接合体 (280 ml、55 mM) と、96.7 mg の BSA (80 ml、100 mM) とを用いた。純粋 (14) - - / (16) - - D - グルカン - BSA 接合体の溶液を、30 kDa AMICON 15 型限外濾過遠心分離器を用いて体積が 2 ml になるまで濃縮し、脱イオン水で洗浄し、凍結乾燥すると、132.3 mg (全収率は 24.4%) の白色粉末状の生成物が得られた。ゲル電気泳動を実施すると、クマシーブルー (Coomassie Blue) および PAS 染色によって、約 170 kDa を中央にして広いバンドが存在することが示された。電気泳動図では、遊離 BSA などの不純物が全く検出されなかった。

40

【0110】

50

〔元素分析〕

C 40.11%、H 6.23%、N 3.06% (BSAの20.44w%)であった。
計算によって求めた - グルカン : BSAの比は4 : 1であった。

【0111】

〔実施例3〕

〔多クローン性抗体の調整および精製〕

〔抗原の調製およびウサギの免疫化〕

実施例2の記載のように調製したBSA接合抗原(10mg)を凍結乾燥し、4で保存し、3羽のウサギの免疫化に使用した(1回の免疫化について抗原200 μ g)。免疫化プロトコールを表1に列挙する。

【0112】

【表1】

表1 ウサギにおいて抗(1 \rightarrow 4)- α -(1 \rightarrow 6)- β -D-グルカン-BSA多クローン性抗体を生成するための免疫化プロトコール

日	作業
0	準備、前採血、初回免疫
21	追加免疫
35	追加免疫
44~45	採血
49	追加免疫
58~59	採血
63	採血

【0113】

〔多クローン性抗体の親和相の精製〕

1gのエポキシ活性化アガロース(Sigma社、E6632)を、10mMのNa₂HPO₄(27ml)に溶かしたBSA(2.68g)(SIGMA社、A2153)の溶液中に懸濁し、混合物を氷水浴中で4で4時間攪拌した。この4時間の攪拌終了後に、混合物を2500 \times g/5分/10で遠心分離し、ペレットを洗浄し、各回について30mlの100mMのNa₂HPO₄/0.05w%のNaN₃を用いてさらに4回遠心分離した。

【0114】

BSAでコーティングされた親和相(前述)の最終回の遠心分離で得られたペレットを、10mMのNa₂HPO₄/0.05w%のNaN₃(20ml)に溶かした(「可溶性」グルカン-BSA接合体で免疫済みのウサギから収集した)750 μ lの血清の溶液中に懸濁し、2時間室温で転動(tumbling)し、そして1500 \times g/5分/10で遠心分離した。上清を収集し、ペレットを20mlの同じバッファでさらに3回洗浄すると、さらに3つの上清が得られた。これらの上清を、図2に示すように、BSAおよび「可溶性」グルカンに対する特異性について精査した。多量の抗体を含有する第1および第2の上清をともにプールし、10kDa AMICON Ultra-15 Centrifugal Filter Deviceを用いて5000 \times g/5分/10で遠心分離することによって、体積が2.5mlになるまで濃縮した。濃縮物をフィルタ上で10mMのNa₂HPO₄/0.05w%のNaN₃を用いて洗浄し、同じバッファで体積が6ml(6g)になるまで希釈した。この「親和性精製済み抗体」を1:800に希釈した溶液を、動物飼料におけるMYCOSORBのELISAアッセイにおいて使用した。得られた校正曲線を図3に示す。

【0115】

〔実施例4〕

〔ELISAによる酵母細胞壁の(14) - - / (16) - - D - グルカンの検出〕

〔物質および方法〕

〔試薬〕

特に明記しないかぎり認められている分析グレードの試薬を、脱イオン化または脱塩した水または等価の純度の水を使用した(18, 2M / cm、25)。

【0116】

試薬および試薬液の調製は、以下のようである。

- ・ 塩酸、12.1NのHCl
- ・ 希塩酸、1NのHCl。12.1NのHCl(41.3ml)を、400mlの脱イオン水にゆっくりと加え、攪拌プレート上で攪拌棒を用いて冷めるまで混合した。この溶液を500mlのメスフラスコに移し替え、脱イオン水で体積を調整し、その後、室温で保存した。 10
- ・ ジメチルスルホキシド。使用したDMSOは高純度であり、分光光度法、液体クロマトグラフィー、および、ガスクロマトグラフィーに適している。
- ・ 抽出用試薬。抽出用試薬を調製するために、900mlのDMSOを、98.75mlの脱イオン水および1.25mlのHCl(12, 1N)に混合した。この溶液を、攪拌プレート上で攪拌棒を用いて中程度の速度および室温で混合し、その後、20以上で保存した。
- ・ 塩化ナトリウム(「NaCl」) 20
- ・ 塩化カリウム(「KCl」)
- ・ リン酸水素二ナトリウム(「Na₂HPO₄」)
- ・ リン酸二水素カリウム(「KH₂PO₄」)
- ・ リン酸緩衝食塩水(「PBS」)(10x)。10xのPBSを調製するために、80.0gの塩化ナトリウム[NaCl]と、2.0gの塩化カリウム[KCl]と、14.2gのリン酸水素二ナトリウム[Na₂HPO₄]と、2.4gのリン酸二水素カリウム[KH₂PO₄]とを、約800mlの脱イオン水に混ぜた。この溶液を、固形物が完全に溶解するまで、攪拌プレート上で攪拌棒を用いて攪拌した。溶液を1000mlのメスフラスコに移し替え、脱イオン水で体積を調整し、その後、室温または2~8で保存した。最長保存期間は、2~8で無希釈液体として6ヶ月であった。溶液は、使用前に室温まで暖めた。 30
- ・ 希釈PBS(1x)。1xのPBSを調製するために、10x、1体積のPBSを9体積の脱イオン水で希釈した。この希釈物を攪拌プレート上で攪拌棒を用いて中程度の速度および室温で混合した。最長保存期間は1日であった。
- ・ ポリソルベート20
- ・ 0.05%のポリソルベート20(pH値7.4)を用いた0.01Mのリン酸緩衝食塩水。これを調製するために、1つのパウチの中味を、1000mlの脱イオン水中に溶解させた。この溶液を、完全に溶解するまで攪拌プレート上で攪拌し、その後、室温または2~8で保存した。最長保存期間は、2~8で無希釈液体として6ヶ月であった。溶液は、使用前に室温まで暖めた。 40
- ・ 乾燥脱脂乳
- ・ PBS中の乾燥脱脂乳が3%(w/v)の(1x)遮断薬。1xの遮断薬を調製するために、使用に先立って、乾燥乳を1xのPBS中に完全に溶解させた。各プレートを遮断するために、10mlの体積が必要であった。最長保存期間は1日であった。
- ・ ウサギ多クローン性抗体、一次抗体(抗体溶液1)。本明細書に記載するように調製した親和性精製済み抗体。使用するまで-80で保存した。
- ・ 希釈済みウサギ多クローン性抗体溶液。1μlの抗体溶液1を1xのPBS(X_iμl)に加えることによって、PBS中で1:X_iに希釈した。各マイクロタイタープレートについて、10mlの体積の溶液が必要であった。希釈済み抗体溶液を、使用前によく混合し、過剰な希釈済み抗体を捨てた。最長保存期間は1日であった。 50

・ ペルオキシダーゼ接合 AffiniPure Goat 抗 Rabbit IgG (H+L)、HRP二次抗体、参照番号 111-035-045 (Jackson ImmunoResearch, PA, 米国、抗体溶液 2)。1.5 ml の脱イオン水で再水和し、完全に透明な溶液が得られるまで遠心分離した。使用するまで、10 μ l の部分標本として -80 で保存した。最長保存期間は、2 ~ 8 で無希釈液体として 6 週間であった。

・ 希釈済みのヤギの抗ウサギ抗体。1 μ l の抗体溶液 2 を 1 x の PBS ($Y_i \mu$ l) に加えることによって、PBS 中で 1 : Y_i に希釈した。希釈済み抗体溶液を、使用前によく混合し、過剰な希釈済み抗体を捨てた。最長保存期間は 1 日であった。

・ SureBlue Reserve TMB マイクロウェル・ペルオキシダーゼ基質。必要な体積を、アンバー Nalgene HDPE および LDPE のボトルだけに再分注した。基質は、使用前に室温まで暖めた。蓋はぴったりと閉鎖したままにして、光から保護した。過剰な基質を捨て、試薬を 2 ~ 8 で保存した。最長保存期間は、8 で保存した場合、製造日から 24 ヶ月であった。

・ MYCOSORB 貯蔵物の試料、バッチ番号 285965 (ALLETECH, Inc. 社、KY、米国)。均質な MYCOSORB 試料を使用した。

・ 一般動物用飼料における MYCOSORB の希釈物。250 ml の遠心分離用ボトル中で、20 g の飼料物質と MYCOSORB 生成物とを、MYCOSORB 生成物の量を増やしながらか (0.01 g、0.02 g、0.08 g、0.10 g、0.12 g) 混合した。これらの混合物は、検量線を生成できるように 3 部作製した。このボトルを、オービタルシェーカーを用いて 400 rpm で 1 時間振盪した。飼料物質の重量を測定する精度は ± 0.025 g に等しく、MYCOSORB 生成物については ± 0.005 g に等しかった。

・ 一般動物用飼料中の大バッチの希釈済み MYCOSORB。飼料中の希釈済み MYCOSORB 生成物の大きな試料を、1.2 g の MYCOSORB 生成物と 300 g の飼料物質とを用いて、1000 ml の容器中で調製した。ボトルを、オービタルシェーカーを用いて 400 rpm で 1 時間振盪した。飼料物質中の MYCOSORB 生成物の最終濃度は 4.0 kg / T であった。大バッチ (300.0 g) の飼料と MYCOSORB 生成物との均質化した混合物 (20.0 g) を、250 ml の遠心分離用ボトルに移し替えた。この移し替えをさらに 9 回繰り返して、10 個の複製試料を得た。混合物は、3 つの部分標本を調製するたびに間欠的に振盪して、生成物がボトルの底に沈殿することを防止した。飼料物質の重量を測定する精度は ± 0.025 g に等しく、MYCOSORB 生成物の場合は ± 0.005 g に等しかった。

・ 一般動物用飼料中の未知量の MYCOSORB の希釈物。未知量の MYCOSORB 生成物と 20.0 g (± 0.025 g) の飼料物質とを 5 つの遠心分離用ボトル (各 250 ml) それぞれに移し替えることによって、未知の試料を調製した。ボトルを、400 rpm で 1 時間オービタルシェーカーを用いて振盪した。同時に、試料の検量線の試行作成を完了した。

【0117】

〔試料の配合〕

アッセイが正しく行われるように、3 つの飼料物質 (表 4、表 5、および、表 6 を参照) を使用した。飼料物質の配合は、当該技術分野において見られる組成物に合わせて選択した。試料のサイズは、研究室へ送る前に慎重に均質化した飼料物質が合計 15 kg であった。研究期間全体を通して、試料を 2 ~ 8 で保存した。

【0118】

〔試料の均質性の保証〕

飼料中の大バッチの希釈済み MYCOSORB 生成物を、飼料中の MYCOSORB 生成物の濃度を中程度の 4.0 kg / T として調製することによって、飼料物質中の MYCOSORB 生成物の希釈の均質性を保証した。この試料を 10 個の副試料に分割し、上記抽出手順にしたがってさらに抽出した。続いて、10 個の試料それぞれについて E L I S

10

20

30

40

50

Aアッセイを4回実施することによって、MYCOSORB生成物を検出するための変動係数を決定した。

【0119】

〔試料の調製〕

標準試料を本明細書に記載するように調製した。調製法については、検査対象となるMYCOSORB生成物とともに表2に示す。この場合、本明細書に記載するように、最初の貯蔵物を基準とした。未知の試料を前述の通り調製した。飼料の試料は、抽出手順を実施する前に粉砕することが必要であった（飼料物質がペレット状で提供されていれば、同様に粉砕することが必要になる）。飼料物質を粉砕すると、アッセイの最終的な信頼性に影響することがわかった。

10

【0120】

【表2】

表2 検量線を作成するための、MYCOSORB生成物の希釈ステップ

希釈度(kg/T) ^a	試料群の番号	試料(g) ^b	MYCOSORB(g) ^c	複製数×試料数
0	0	20.0	0	2×10
0.5	1	20.0	0.01	2×3
1.0	2	20.0	0.02	2×3
4.0	3	20.0	0.08	2×3
5.0	4	20.0	0.10	2×3
6.0	5	20.0	0.12	2×3
0~6.0	C ^d	20.0	0~0.12	4×10

20

^a飼料物質1トン当たりのMYCOSORB生成物のkg数で表わした希釈度

^b飼料の範囲=±0, 025g

^cMYCOSORB生成物の範囲=±0, 005g

^dCは、一般動物用飼料中のMYCOSORBの量が未知であることを示す

【0121】

〔抽出手順〕

全ての組のボトルを、オービタルシェーカーを用いて400rpmで1時間振盪した。一度に3本のボトルを取り出し、ボトル最上部の容積測定用ディスペンサーを用いて、抽出用試薬（体積80ml）を各ボトルに加えた。抽出用試薬がしっかりと完全に混合されるように、全ボトルに蓋をした。全ての試料を手で振盪した。飼料の溶液がしっかりと完全に浸されるように、全ボトルをサーモスタットで80℃に維持された水浴中に1時間置いた。インキュベーション後に、ボトルを水浴から取り出し、ボトルの中味を、高トルクラボ攪拌機を用いてロッド（NALGENE（商標））で混合した。混合物は完全に均質化された。各MYCOSORB含有レベルおよび各未知試料について、きれいなロッドを1本ずつ使用した。ボトルを、サーモスタットで80℃に維持された水浴中に1時間置いた。インキュベーション後に、ボトルを水浴から取り出し、ボトル最上部の容積測定用ディスペンサーを用いて各ボトルに80mlの脱イオン水を加え、次に、ボトルに蓋をした。完全に混合するまで、ボトルを手で振盪した。この際、必要に応じて、ロッド（NALGENE（商標））を高トルクラボ攪拌機とともに使用した。ボトルを8,000gで10分間の遠心分離にかけた。ガラス製ピペットを用いて、約10mlの上清を15mlの遠心分離用無菌チューブへ移し替えた。チューブを4,000gで10分間遠心分離し、適切に標識した新しい15mlの遠心分離用無菌チューブに、デカントすることによって移し替えた。ELISAアッセイに使用するまで、チューブを-20℃で一晩保存した。

30

40

【0122】

〔ELISA手順〕

SureBlue Reserve TMB マイクロウェル・ペルオキシダーゼ基質を使用して、希釈済みHRP二次抗体との反応を介して比色分析反応をトリガーし、さら

50

に、マイクロタイタープレート上に固定された希釈済みMYCOSORB生成物から抽出した、注目している基質と特異的に反応する希釈済み一次抗体自身と反応させた。比色分析反応を最後は20分後に1NのHClを用いて停止させて、吸光度を、プレート読み取り装置を用いて450nmの波長で読み取った。したがって、飼料マトリクスから発生して分光光度計上でバックグラウンドシグナルを与える可能性がある、比色分析のばらつきを考慮するために、飼料物質だけを含有するブランクについて測定を行った。計算には、ブランク値を、各試料から得られる吸光度の値から減じた。

【0123】

先に抽出して一晩保存した試料を解凍し、室温まで暖めた。マイクロタイタープレートのウェルをコーティングするために、ELISAにおいて使用する前に均質な試料を確実に作製しておけるよう、各試料をボルテックスした。

10

【0124】

各複製試料について、表3に示すように、96個のウェルを有するマイクロタイタープレート上の3つの各ウェルに、上清を100 μ lずつ移し替えた。プレート上の試料のランダムな分散配置は、プログラム済みのロボット化されたマイクロタイターウェルディスペンサーを備えた研究室で実施してもかまわない。検量線試料および複製試料を、全て、同じ1つのプレート上に分散配置した(つまり、全ての0kg/T複製試料を列/行E1~F10にセットした)。未知のMYCOSORB複製試料を同じプレート上に分散配置した(つまり、列/行A11~C12にセットした)。これらのマイクロタイタープレートをマイクロプレート用粘着フィルムで封止し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションした。インキュベーション後に、マイクロタイタープレートの各ウェル内の溶液を取り除き、250 μ lのPBS(1x)に置き換えて、1回洗浄した。このオペレーションを合計でさらに2回繰り返した。マイクロタイタープレートの各ウェルを、PBS溶液に溶かした希釈済み脱脂乳100 μ lで遮断し、室温で1時間インキュベーションした。インキュベーション後に、各ウェル内の溶液を取り除き、250 μ lのPBS(1x)に置き換えて1回洗浄し、続いて、ポリソルベート20を0.05%含有する250 μ lのPBSに置き換えて2回洗浄した。

20

【0125】

体積が100 μ lの希釈済み一次抗体を、各ウェルに加えた。マイクロタイタープレートを、室温で1時間インキュベーションした。インキュベーション後に、マイクロタイタープレートの各ウェル内の溶液を取り除き、ポリソルベート20を0.05%含有する250 μ lのPBS(1x)に置き換えて3回洗浄した。

30

【0126】

体積が100 μ lの希釈済み二次抗体を、各ウェルに加えた。マイクロタイタープレートを、室温で1時間インキュベーションした。インキュベーション後に、マイクロタイタープレートの各ウェル内の溶液を取り除き、ポリソルベート20を0.05%含有する250 μ lのPBS(1x)に置き換えて3回洗浄した。

【0127】

体積が100 μ lのTMB基質を予め室温まで暖めておき、これを各ウェルに加え、マイクロタイタープレートを室温で20分間インキュベーションした。TMB基質を用いてちょうど20分後に、体積が100 μ lのHCl(1N)をただちに各ウェルに加えて、比色分析反応の進行を停止させた。各マイクロタイタープレートを、マイクロタイタープレート読み取り装置を用いて450nmで読み取った。

40

【0128】

【表 3】

表 3 マイクロタイタープレート上の試料群の分散配置

**	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₁ *	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	-	-
B	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	-	-
C	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	-	-
D	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	5 ₁	5 ₁
E	0 ₁	0 ₂	0 ₃	0 ₄	0 ₅	0 ₆	0 ₇	0 ₈	0 ₉	0 ₁₀	5 ₂	5 ₂
F	0 ₁	0 ₂	0 ₃	0 ₄	0 ₅	0 ₆	0 ₇	0 ₈	0 ₉	0 ₁₀	5 ₃	5 ₃
G	1 ₁	1 ₂	1 ₃	2 ₁	2 ₂	2 ₃	3 ₁	3 ₂	3 ₃	4 ₁	4 ₂	4 ₃
H	1 ₁	1 ₂	1 ₃	2 ₁	2 ₂	2 ₃	3 ₁	3 ₂	3 ₃	4 ₁	4 ₂	4 ₃

10

*Cは、一般動物用飼料中のMYCOSORB生成物の含有レベルが未知であることを示す。

**試料群の特定については表2を参照。

【0129】

20

〔複製試料からのデータの排除〕

次式で定義されるディクソンのQ検定をパスせず、その結果、異常値であると特定される複製試料を除けば、全ての複製試料が類似性を有することを保証するために、統計学的なデータ解析が必要であった。

$$Q_n = |x_b - x_a| / R$$

ただし、Rは全てのデータ点の範囲であり、 x_a は異常値ではないかと疑われるデータ点であり、 x_b は x_a に最も近いデータ点である。 $Q_{calculated} > Q_{table}$ であれば、疑わしい点を95%の信頼区間で棄却する。

【0130】

30

〔検量線の作成〕

較正曲線を使用して定量化を行った。較正曲線は、上記Councilによる指示96/23に記載されているように、生成物の機能範囲内の少なくとも5つのレベル（ゼロを含む）を用いて、各飼料マトリクスについて作成する。各試料群の場合について、OD₄₅₀での3個のウェルの吸収度の平均値を算出した。ブランク飼料の試料の場合については、OD₄₅₀での10個のウェルの吸収度の平均値を算出した。次に、縦軸上で得られる差OD₄₅₀（OD₄₅₀の試料群 - OD₄₅₀のブランク飼料）と、横軸上の互いに異なるMYCOSORB生成物の濃度の各範囲（0.5、1.0、4.0、5.0、6.0 kg/T）とを用いて、検量線（つまり較正曲線）を作成した。

【0131】

40

平均のブランク値によって値を補正した後に、最もよく一致する線OD₄₅₀ = Ax（MYCOSORB）を用いて、OD₄₅₀での吸収度に対してプロットした含有レベルの回帰係数および等式を、直線回帰にしたがって算出した。較正曲線の受容可能範囲および直線性を、0.95より大きな相関係数（ r^2 ）値によって検証した。次に、較正曲線に対応する等式を解くことによって、未知の試料中のMYCOSORB生成物の含有レベルを求めた。

【0132】

〔内挿〕

$r^2 > 0.95$ となる相関係数が検量線に見られる場合には、補正した曲線に対応する等式F(x) = Ax（バックグラウンドシグナルから減算され、ゼロと交わる）を使用して、未知の試料中のMYCOSORB生成物の含有レベルを求める。MYCOSORB生

50

成物の未知の含有レベルについての OD_{450} での 10 個の平均値 (C) を算出する。先に算出したブランク飼料の試料については、得られた平均値を、 OD_{450} での 10 個のウェルの吸収度の平均値から減じる。次に、 OD_{450} での平均値を使用して、補正した曲線の等式 $F^{-1}(y_c)$ (ただし、 $y_c = A x_c$ であり、 $x_c = y_c / A$ 。ただし、 y_c は、未知の試料についての OD_{450} で得られる平均値 (C) からブランクの OD_{450} で得られる平均値を引いた値であり、 x_c は、MYCOSORB 生成物の対応する含有レベルであり、A は、 $kg / T_{OD_{450}}$ で表した検量線の勾配である) を解く。

【0133】

〔検出限界および定量化限界〕

検出限界 ($L_D = 3 \text{ blank}$) および定量化限界 ($L_Q = 10 \text{ blank}$) を、IUPAC の命名法にしたがって測定し、 OD_{450} とする。

10

【0134】

検出限界 (L_D) および定量化限界 (L_Q) をマトリクス of ブランクの分析から求め、これから、次式にしたがって解いた校正曲線 $F(x) = Ax$ を利用して、平均バックグラウンド OD_{450} 値から補正した直線回帰に基づいて濃度を算出した。

$$L_D = 3 \text{ blank} / A$$

$$L_Q = 10 \text{ blank} / A$$

ただし、 L_D は、生成物の最小検出可能濃度、つまり、検出限界であり、 L_Q は、生成物の最小定量化濃度、つまり定量化限界である。

20

【0135】

〔均質性〕

均質性の変動係数 ($RSD_H = CV_H$) を、同じ日に同じ技師によって同じ設備および方法を用いて同じ試料から得られる、10 個の独立した複製試料の平均の変動係数として定義した。

【0136】

〔精度、反復率〕

ラン内併行精度 ($RSD_{intra} = CV_{intra}$) を、同じ日に同じ技師によって同じ設備および方法を用いて同じランに対して同じ試料から得られる、反復の平均の変動係数として定義した。

30

【0137】

ラン間併行精度 ($RSD_{inter} = CV_{inter}$) とは、異なる日に同じ技師によって同じ設備および方法を用いて異なるランで同じ試料から得られる、独立した複数結果の平均の変動係数である。

【0138】

〔精度、全体的な精度〕

精度によって、同一量の連続測定間の一致度の分散 (つまり、近さ) が評価できる。1 組の測定値における分散 (近さ) は、通常標準偏差で表現される。したがって、同じ試料から同じ日に同じ技師によって同じ設備および方法を用いて得られる単一の含有レベルにおける個々の単一の実験の標準偏差、および、同じ技師によって同じ設備および方法を用いて個々のランを比較する標準偏差から、次式を用いて、精度を算出した。

40

【0139】

〔数 1〕

$$\sigma_{Total} = \sqrt{\left[\frac{\sigma_{intra}^2}{n} + \sigma_{inter}^2 \right]}$$

【0140】

ただし、 σ_{Total} は実験全体の集合の標準偏差であり、 σ_{intra} は個々の単一の

50

実験の標準偏差であり、 $I n t e r$ は複数の実験間の標準偏差であり、 n は複製数である。

【0141】

グループの平均値の分散とグループ内の分散の平均値との間で、F検定 (p 値 0.05) を用いた分散分析 (一方向 ANOVA) によって、標準偏差の比較を行った。

【0142】

〔正確さ〕

正確さとは、検査結果と測定対象である生成物の受容されている基準値との間で見られる一致の近さである。したがって、百分率で表した回収率の測定値から、正確さを評価した。この点で、回収率は、抽出されて測定に利用可能な、分析物中に存在している、または、混合された分析物の量の比率を表している。バイアスとは、検査結果と受容される基準値 (分析物の添加濃度) との差である。計算は次式にしたがって実施した。

$$\text{回収率 (\%)} = 100 \times (X_c - X_b) / X_{TH}$$

ただし、 X_c は、添加試料において測定された濃度であり、 X_b は非添加試料 (ブランク) において測定された濃度であり、 X_{TH} は理論濃度である。

【0143】

〔検証検査に使用する飼料物質〕

ALLTECH, Inc. 社 (KY、米国) にある Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition において、飼料物質と様々な含有レベルの MYCOSORB 生成物とを混合した、乳業用飼料配合物、ニワトリ用飼料配合物、および、ブタ用飼料配合物について、検査を実施した。飼料配合物の詳細な説明については後述する。

【0144】

〔乳業用飼料物質〕

飼料物質は、Coralis Vern 社 (Vern sur Seiche, France, 参照番号 111605) の "Spirit Lait 2L5" という名称の配合物を用意した (表 4)。試料のサイズは、全体で飼料物質が 15 kg であり、研究室へ送る前に、この飼料物質を慎重に均質化した。試料は、研究期間全体を通して 2 ~ 8 で保存した。乳業用飼料物質は、ペレット状の形態で提供した。抽出手順を実施する前に飼料の試料を粉砕する必要はなかった。

【0145】

10

20

30

【表 4】

表 4 方法を検証するために使用した乳業用飼料配合物

成分	割合	
コムギ標準品、%	20.00	
オオムギ、%	6.00	
アブラヤシ（実験用ケーキ）、%	12.00	
アブラナ（脱油済み）、%	8.10	
ダイズ油ケーキ 48 / ブラジル、%	4.20	
コムギ、微小ふすま、%	24.94	
コムギ amyplus（ライコムギ）、%	20.00	
糖蜜、%	1.00	10
Vinasse（発酵物からの抽出物）、%	1.50	
炭酸カルシウムの粗粉、%	1.06	
精製塩、%	0.50	
EMROD、%	0.20	
Super 26 Eco aa、%	0.50	
（ビタミンとミネラルとの事前混合物）		
合計%	100	
栄養分		
乾燥物、%	88.324	
粗タンパク質、%	17.002	
脂肪、%	3.144	
セルロース、%	8.378	
灰分、%	6.723	20
澱粉、%	24.955	
糖分合計、%	4.420	
澱粉および糖、%	29.376	
反芻胃内炭水化物、g / kg	352,926	
PDIN*、g / kg	117.260	
PDIE*、g / kg	103.028	
PDIA*、g / kg	49.723	
反芻胃内窒素、g / kg	124.906	
反芻胃中で消化可能なリジン、g / kg	6.794	
反芻胃中で消化可能なメチオニン、g / kg	1.873	
カルシウム、%	0.800	
亜リン酸合計、%	0.659	
ナトリウム、%	0.500	30
マグネシウム、%	0.236	
反芻胃中で消化可能なリン%	0.466	
構造値、%	0.220	
コムギのケーキ、%	20.000	
コムギのケーキ（ライコムギ）、%	20.000	
穀類のケーキ、%	26.000	
合計、小麦ふすま、%	44.940	
アブラナのケーキ、%	8.100	
合計、MP Granul+、	20.000	
顆粒の耐久性（durability）%		
ビタミンA、UI / kg	4000	
ビタミンD3、UI / kg	2000	40

*真のPDI（true Protein truly Digestible in the small Intestine）で表わされる、飼料のタンパク質価および動物のタンパク質の必要量を規定する役割をする。食事のPDI含有量とは、（i）PDIA画分、つまり、反芻胃では未分解であるが、小腸では本当に消化可能な食物蛋白と、（ii）PDIM画分、つまり、小腸で本当に消化可能な微生物性の真のタンパク質との合計である。各飼料が、分解可能な窒素（PDIMN）によっても、反芻胃微生物（PDIME）に対して飼料が供給する利用可能なエネルギーによっても、微生物性タンパク質の合成に寄与する。各飼料の値は、（1） $PDIN = PDIA + PDIMN$ 、および、（2） $PDIE = PDIA + PDIME$ の2つの等式を考慮して、PDIAとPDIMとの合計によって直接与えられる。

〔ニワトリ用飼料物質〕

飼料物質は、University of KentuckyとALLTECH, Inc.社（KY、米国）との共同研究機関であるColdstream University of Kentuckyにおいて配合した（表5）。調製は、当該技術分野において見られ、ヨーロッパ共同体、北アメリカ、ラテンアメリカなどにおいて一般に見られる配合物に対して一般化可能な組成物に合わせて行った。試料のサイズは、全体で飼料物質が15kgであり、研究室へ送る前に、この飼料物質を慎重に均質化した。試料は、研究期間全体を通して、2～8で保存した。

【0147】

【表5】

10

表5 方法を検証するために使用したニワトリ用飼料配合物

成分	飼育者向け配合割合、22日～42日	
	トウモロコシとダイズとを主原料とする	
トウモロコシ	62.15	
ダイズ豆の粗粉（48%）	31.31	
トウモロコシ油	3.10	
石灰石	1.37	
リン酸ジカルシウム	1.30	
塩	0.45	20
ビタミン／ミネラルミックス ^a	0.25	
DL-メチオニン	0.07	
L-リジン	—	
合計	100	
栄養分		
ME、kcal/kg	3120	
粗タンパク質、%	20	
カルシウム、%	0.90	
利用可能なリン、%	0.35	30
リジン、%	1.11	
メチオニン、%	0.39	
メチオニンとシステイン、%	0.72	
Na、%	0.20	

^a食事1kg当たりのビタミン供給量：ビタミンA 2200IU、ビタミンD3 720ICU、ビタミンE 27IU、ビタミンK3（2-メチル-1,4-ナフトキノン）0,91mg、チアミン 2mg、リボフラビン 8mg、ナイアシン 55mg、パントテン酸カルシウム 18mg、ビタミンB6（ピリドキシン）5mg、ビオチン 0,221mg、葉酸 1mg、コリン 478mg、ビタミンB12（シアノコバラミン）28μg。

40

【0148】

〔ブタ用飼料物質〕

飼料物質は、University of KentuckyとALLTECH, Inc.社（KY、米国）との共同研究機関であるColdstream University of Kentuckyにおいて配合した（表6）。調製は、当該技術分野において見られ、ヨーロッパ共同体、北アメリカ、ラテンアメリカなどにおいて一般に見られる配合物に対して一般化可能な組成物に合わせて行った。試料のサイズは、全体で飼料物質が15kgであり、研究室へ送る前に、この飼料物質を慎重に均質化した。試料は、研究

50

期間全体を通して、2 ~ 8 で保存した。

【0149】

【表6】

表6 方法を検証するために使用したブタ用飼料配合物

成分	懐胎中の出産経験のない雌ブタおよび出産経験のある雌ブタに対する配合割合		
	トウモロコシとダイズとを主原料とする		
トウモロコシ (粉碎済み、黄色)		81.540	
外皮を取り除いたダイズ豆の粗粉 (47.5%)		12.310	10
トウモロコシ油		2.000	
石灰石 (粉碎済み)		0.690	
リン酸ジカルシウム		2.630	
塩		0.500	
ビタミンミックス (BASF) *		0.050	
微量のミネラルミックス (Prince)		0.080	
**			
塩化コリン (60%)		0.150	
Chromax		0.050	
合計		100	20
栄養分			
ME、kcal/kg		3258	
CP、%		12.4	
Ca、%		0.54	
利用可能なP、%		0.60	
リジン、%		0.54	
*ビタミンミックスの組成:	BASF PREMIX (混合食1kg当たりの濃度)		
	混合食1kg当たりの濃度		
ビタミンA、IU		5500	
ビタミンD、IU		550	
ビタミンE、IU		33	30
ビタミンK、mg		1.1	
ビタミンB12、μg		15.125	
ナイアシン、mg		15.125	
パントテン酸、mg		13.75	
リボフラビン、mg		4.125	
ビオチン、mg		0.17875	
葉酸、mg		0.825	
ピリドキシン、mg		2.475	
チアミン、mg		0.825	
ミネラル	%	供給量 ppm(1.5#事前 混合物/トン)	供給源
鉄	13.33	100	硫酸塩
亜鉛	16.67	125	酸化物
マンガン	6.672	50	酸化物
銅	2.000	15	硫酸塩
ヨウ素	0.1709	1.28	EDDI
セレン	0.0402	0.30	亜セレン酸塩
カルシウム	4.815	36	—
			40

【0150】

〔乳業用飼料物質を用いた検証〕

50

ALLTECH, Inc. 社 (KY、米国) にある Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition において、固形のヨーロッパタイプの乳業用飼料配合物と5つの異なる濃度の MYCOSORB 生成物との混合物について、検査を実施した。

【0151】

同じマイクロタイタープレート上に分散配置した場合について、それぞれ 0.0 kg/T、0.5 kg/T、1.0 kg/T、4.0 kg/T、5.0 kg/T、6.0 kg/T の MYCOSORB 生成物と混合した各乳業用飼料物質を、未知のレベルの MYCOSORB 生成物と混合した同じ乳業用飼料物質の試料とともに分析した。

【0152】

〔適応可能性〕

複合一般動物用飼料における MYCOSORB 生成物を追跡することを目的とするトレーサビリティのエンドポイント過程として、MYCOSORB 生成物および代替物の特異的な分析を実施するために開発された ELISA アッセイの特性を確定するために、検証を行った。

【0153】

検証には、飼料の試料と混合する含有レベル (0.0 kg/T、0.5 kg/T、1.0 kg/T、4.0 kg/T、5.0 kg/T、6.0 kg/T) の機能範囲に対応する6つのレベルの MYCOSORB 生成物を使用した。

【0154】

希釈済みウサギ多クローン性抗体溶液。一次抗体の希釈物を、バックグラウンドレベルに合わせて調整した。1 μ l の抗体溶液 # 1 を 1.2 ml の PBS (1x) に加えることによって、抗体を PBS 中で 1:2, 500 まで希釈した。各マイクロタイタープレートには、体積が 10 ml の溶液が必要であった。

【0155】

希釈済みヤギの抗ウサギ抗体。二次抗体の希釈物を、バックグラウンドレベルに合わせて調整した。1 μ l の抗体溶液 # 2 を 20.0 ml PBS (1x) に加えることによって、抗体を PBS 中で 1:20, 000 まで希釈した。

【0156】

〔均質性〕

試料の均質性の検証を、実験計画において、MYCOSORB 生成物の含有レベルの中央値 (4.0 kg/T) について行った。この特定のレベルについてのアッセイを、各試料について4つの複製を用いて、10個の各試料に対して5回繰り返した。

【0157】

表7に詳細を示した算出値によれば、 CV_H は 4.53% であった。

【0158】

【表7】

表7 4つの複製試料において分析される10個の各試料調製に対して5回のランで ELISA 過程によって評価される、ヨーロッパタイプの乳業用食事と混合した MYCOSORB 生成物の単一の濃度 (4.0 kg/T) に対する均質性の評価

ラン番号	4	5	8	9	11	平均値
n	4×10	4×10	4×10	4×10	4×10	4×10
平均OD _{450nm}	1.155	1.055	0.833	1.166	1.044	1.051
σ_h	0.118	0.080	0.077	0.083	0.100	-
% CV_h	10.21	7.58	9.27	7.09	9.59	-
均質性、% CV_H	8.75					

【0159】

〔較正〕

本明細書に記載する既知の標準試料濃度で、0.0 kg/T ~ 6.0 kg/Tの範囲のMYCOSORB生成物と混合した飼料に対して、アッセイの較正を行った。線形曲線近似 (linear curve fit) ($y = Ax$) を利用して、濃度と応答性 (OD_{450}) との関係の規定した。5回のランから得られた平均検量線を図4に示す。

【0160】

〔線形性〕

ブランクを減算した後に、 OD_{450} での吸収度に対してプロットした含有レベルの等式にしたがって、切片がゼロである最もよく一致する線 ($OD_{450} = Ax$ (MYCOSORB)) を用いて、回帰係数の計算から、検量線の線形性を評価した。 r^2 が0.95を超える場合の相関係数の値を用いて、検量線の線形性を検証する (表8)。

10

【0161】

【表8】

表8 検量線の線形性

ラン番号	4	5	8	9	11	平均化した曲線から得られた平均値
年/月/日	2009/6/10	2009/6/17	2009/6/30	2009/7/14	2009/8/5	1/6異常値
n	50	50	50	50	50	-
勾配 (A)	0.2702	0.2249	0.2161	0.2179	0.2444	0.2347
平均二乗誤差 (MSE)*	0.0037	0.0005	0.0034	0.0008	0.0009	-
線形性 (r^2)	0.969	0.974	0.970	0.949	0.978	0.979

20

* 平均二乗誤差は、直線回帰モデルにおいて次式のように規定する。

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$$

(ただし、 $e_i = y_i - \hat{y}_i$ であり、 y_i は実験によって測定した y 値であり、 \hat{y}_i は、MYCOSORB生成物の期待される x_i の濃度の理論値である)

30

【0162】

〔反復率〕

反復率は、反復率の標準偏差の評価による内部分散の尺度である。同一ランの反復中における反復率の評価は、同じ試料から同じ日に同じランに対して同じ技師によって同じ設備および方法を用いて得られ、1ラン内の検出のばらつき CV_{intra} を表す (表9)。異なるラン間の反復率の評価は、同じ試料から異なる日に異なるランで同じ技師によって同じ設備および方法を用いて得られ、ラン間の検出のばらつき CV_{inter} を表す (表10)。

【0163】

40

結果は、0.0 kg/T ~ 6.0 kg/Tの検量線機能範囲に適用される場合、同じ日に得られる検量線も異なる日に得られる検量線もほとんどばらつきがなく、平均日内精度が5.70%であり、日間精度が7.86%であることを示している。全体的な精度は8.28%であった (表11)。

【0164】

【表 9】

表 9 検量線を作成するためのラン内併行精度

濃度 (k g / T)		0.0	0.5	1.0	4.0	5.0	6.0
1 日目 ラン番号 4	OD _{450nm}	1.022	1.221	1.425	2.284	2.292	2.564
	σ_{intra}	0.033	0.056	0.117	0.071	0.062	0.132
	%CV	3.26	4.60	8.20	3.11	2.69	5.14
2 日目 ラン番号 5	OD _{450nm}	1.024	1.238	1.335	2.039	2.076	2.335
	σ_{intra}	0.031	0.073	0.030	0.215	0.077	0.153
	%CV	3.03	5.91	2.21	10.54	3.72	6.55
3 日目 ラン番号 8	OD _{450nm}	0.871	1.066	1.231	1.807	1.953	2.088
	σ_{intra}	0.044	0.053	0.051	0.136	0.192	0.127
	%CV	5.06	4.96	4.17	7.53	9.82	6.08
4 日目 ラン番号 9	OD _{450nm}	1.049	1.218	1.468	2.026	2.138	2.247
	σ_{intra}	0.041	0.059	0.035	0.266	0.095	0.141
	%CV	3.93	4.86	2.39	13.12	4.44	6.26
5 日目 ラン番号 1 1	OD _{450nm}	0.915	1.053	1.284	1.787	2.251	2.336
	σ_{intra}	0.044	0.067	0.049	0.095	0.247	0.189
	%CV	4.79	6.34	3.85	5.30	10.98	8.09
%CV _{intra} (ラン内精度)		4.01	5.33	4.16	7.92	6.33	6.42
平均精度、%CV _{intra}		5.70					

10

20

30

【 0 1 6 5 】

【表 10】

表 10 検量線を作成するためのラン間併行精度

濃度 (kg/T)	0.0	0.5	1.0	4.0	5.0	6.0
OD _{450nm}	0.976	1.159	1.348	1.988	2.142	2.314
σ_{Inter}	0.078	0.091	0.098	0.203	0.136	0.172
%CV _{Inter}	8.01	7.88	7.27	10.22	6.36	7.45
平均精度、 %CV _{Inter} (ラン間精度)	7.86					

10

【0166】

【表 11】

表 11 検量線を作成するための全体的な精度

濃度 (kg/T)	0.0	0.5	1.0	4.0	5.0	6.0
n	30	30	30	30	30	30
σ_{Intra}	0.039	0.062	0.056	0.157	0.135	0.148
σ_{Inter}	0.078	0.091	0.098	0.203	0.136	0.172
σ_{Total}	0.080	0.095	0.101	0.215	0.149	0.185
精度、%CV _{Total}	8.20	8.23	7.50	10.81	6.95	7.98
全体的な精度、%CV _{Total}	8.28					

20

30

【0167】

〔L_D および L_Q (感度)〕

L_D 値および L_Q 値を表 12 に記載する。得られた各 L_Q 値は、飼料物質における定量化が可能になる、MYC OS OR B 生成物の最小推奨含有率 (2 kg/T) より低かった。

検出限界 L_D = 0.501 ± 0.103 kg/T

定量化限界 L_Q = 1.800 ± 0.389 kg/T

【0168】

【表 12】

表 12 L_D および L_Q の決定

ラン番号	n	OD ₄₅₀ blank		3 σ (Δ OD ₄₅₀)	10 σ (Δ OD ₄₅₀)	L _D (kg/T)	L _Q (kg/T)
		X _{b inter} - X _{b Intra}	σ_{blank}				
1 日目	10	0.046	0.033	0.100	0.334	0.370	1.323
2 日目	10	0.048	0.031	0.093	0.311	0.415	1.488
3 日目	10	-0.105	0.044	0.132	0.441	0.612	2.233
4 日目	10	0.072	0.041	0.124	0.412	0.568	2.100
5 日目	10	0.915	0.044	0.132	0.438	0.538	1.858
平均				0.116±0.018	0.387±0.061	0.501±0.103	1.800±0.389

40

50

【0169】

〔正確さ〕

飼料物質と混合した、濃度が4.0 kg/TであるMYCOSORB生成物について、各回につき10個の独立した試料を用いてそれぞれ4つの複製試料において実施した5回の独立した実験から、正確さを測定した。各試料の最終濃度を、上記等式にしたがって、均質性を計算するために得られる観測値を用いて算出した(表13)。次に、全てのランについて得られる平均の正確さから平均精度を算出し、飼料物質と混合した添加濃度が4.0 kg/TのMYCOSORB生成物と比較した。この一連の計算は、上記等式にしたがって実施した。

【0170】

結果は、回収率の評価が、MYCOSORB生成物の添加濃度中における飼料物質の実際の含有率を21%過剰評価する原因となったことを示している(表14)。

【0171】

【表13】

表13 飼料物質と混合した、濃度が4.0 kg/TであるMYCOSORB生成物について、各回につき10個の独立した試料を用いてそれぞれ4つの複製試料において実施した、5回の独立した実験から測定した正確さおよび精度

ラン番号	x_{TH} 、 添加率 (kg/T)	複製試料番号、 x_c (OD_{450})										\bar{x}_c	%CV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1日目	4.0	5.0	4.0	5.1	3.8	4.3	4.3	3.9	4.4	3.9	4.1	4.3	9.69
2日目	4.0	4.2	5.0	5.1	4.7	4.6	4.6	4.5	4.2	4.8	5.2	4.7	7.19
3日目	4.0	3.6	3.6	4.1	4.4	3.8	3.9	3.7	3.9	3.3	4.3	3.9	8.79
4日目	4.0	5.4	5.0	5.0	4.9	5.2	5.6	5.1	5.5	5.7	6.1	5.4	6.73
5日目	4.0	4.4	4.5	3.7	4.4	4.2	4.4	3.5	4.4	4.3	4.9	4.3	9.10
%CV _{intra} (ラン内精度)													8.30

【0172】

【表14】

表14 飼料物質と混合した、濃度が4.0 kg/TであるMYCOSORB生成物について、各回につき10個の独立した試料を用いてそれぞれ4つの複製試料において実施した、5回の独立した実験の平均値から測定した全体的な回収率

x_{TH} 添加率 (kg/T)	平均値 \bar{x}_c	σ_c
4.0	4.5	0.6
%CV _{inter} (ラン間精度)		12.62
全体的な回収率 (%、理論濃度)		112.21

【0173】

〔ニワトリ用飼料物質を用いた検証〕

ALLTECH, Inc.社(KY、米国)にあるCenter for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutritionにおいて、固形のニワトリ用飼料配合物と5つの異なる濃度のMYCOSORB生成物との混合物について、検査を実施した。

【0174】

同じマイクロタイタープレート上に分散配置した場合について、それぞれ 0.0 kg/T、0.5 kg/T、1.0 kg/T、4.0 kg/T、5.0 kg/T、6.0 kg/T の MYC OS OR B 生成物と混合したニワトリ用飼料物質を、未知のレベルの MYC OS OR B 生成物と混合した同じニワトリ用飼料物質の試料とともに分析した。

【0175】

〔適応可能性〕

複合一般動物用飼料における MYC OS OR B 生成物を追跡することを目的とするトレーサビリティのエンドポイント過程として、MYC OS OR B 生成物および代替物を分析するために開発された ELISA アッセイの特性を確定するために、検証を行った。

【0176】

検証には、飼料の試料と混合する含有レベル (0.0 kg/T、0.5 kg/T、1.0 kg/T、4.0 kg/T、5.0 kg/T、6.0 kg/T) の機能範囲に対応する 6 つのレベルの MYC OS OR B 生成物 (参照番号 285965) を使用した。

【0177】

希釈済みウサギ多クローン性抗体溶液。一次抗体の希釈物を、バックグラウンドレベルに合わせて調整した。1 μl の抗体溶液 # 1 (4.15) を 7.5 ml の PBS (1×) に加えることによって、抗体を PBS 中で 1:7,500 まで希釈した。各マイクロタイタープレートには、体積が 10 ml の溶液が必要であった。

【0178】

希釈済みヤギの抗ウサギ抗体。二次抗体の希釈物を、バックグラウンドレベルに合わせて調整した。1 μl の抗体溶液 # 2 を 30.0 ml の PBS (1×) に加えることによって、抗体を PBS 中で 1:30,000 まで希釈した。

【0179】

〔均質性〕

試料の均質性の検証を、実験計画において、MYC OS OR B 生成物の含有レベルの中央値 (4.0 kg/T) について行った。この特定のレベルについてのアッセイを、各試料について 4 つの複製を用いて、10 個の各試料に対して 5 回繰り返した (表 15)。

【0180】

【表 15】

表 15 4 つの複製試料において分析される 10 個の各試料調製に対して 5 回のランで ELISA 過程によって評価される、ニワトリ用飼料物質と混合した MYC OS OR B 生成物の単一の濃度 (4.0 kg/T) に対する均質性の評価

ラン番号	2	3	4	5	6	平均値
n	4×10	4×10	4×10	4×10	4×10	4×10
平均 OD _{450nm}	1.419	0.908	0.777	0.991	1.290	1.034
σ _h	0.048	0.060	0.081	0.060	0.069	-
% CV _h	3.08	6.11	10.38	5.65	6.39	-
均質性、%CV _H	6.32					

【0181】

〔校正〕

既知の標準試料濃度で、0.0 kg/T ~ 6.0 kg/T の範囲の MYC OS OR B 生成物と混合した飼料に対して、アッセイの校正を行った。線形曲線近似 ($y = Ax$) を利用して、濃度と応答性 (OD₄₅₀) との関係の規定した。5 回のランから得られた平均検量線を図 5 にまとめる。

【0182】

〔線形性〕

ブランクを減算した後に、OD₄₅₀ での吸収度に対してプロットした含有レベルの等式にしたがって、切片がゼロである最もよく一致する線 ($OD_{450} = Ax$ (MYC OS OR B 生成物濃度)) を用いて、濃度と応答性 (OD₄₅₀) との関係の規定した。

10

20

30

40

50

S O R B)) を用いて、回帰係数の計算から、検量線の線形性を評価した。 r^2 が 0.95 を超える場合の相関係数の値を用いて、検量線の線形性を検証する。各標準ラン曲線および平均標準ラン曲線について算出した回帰係数を、表 16 に記載する。

【 0 1 8 3 】

【 表 1 6 】

表 16 ニワトリ用飼料物質における検量線の線形性

ラン番号	2	3	4	5	6	平均化した 曲線から得 られた平均 値
年/月/日	2009/4/21	2009/4/22	2009/4/23	2009/4/24	2009/4/28	1/6異常値
n	50	50	50	50	50	-
勾配 (A)	0.2954	0.1904	0.1555	0.2282	0.2302	0.2199
平均二乗誤差 (MSE) *	0.0123	0.0018	0.0118	0.0003	0.0006	-
線形性 (r^2)	0.995	0.999	0.991	0.992	0.992	0.997

* 平均二乗誤差は、直線回帰モデルにおいて次式のように規定する。

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$$

(ただし、 $e_i^2 = y_i - \hat{y}_i$ であり、 y_i は実験によって測定した y 値であり、 \hat{y}_i は、MYC OSORB 生成物の期待される x_i の濃度の理論値である)

【 0 1 8 4 】

〔 反 復 率 〕

反復率は、反復率の標準偏差の評価による内部分散の尺度である。同一ランの反復中における反復率の評価は、同じ試料から同じ日に同じランに対して同じ技師によって同じ設備および方法を用いて得られ、1ラン内の検出のばらつき CV_{intra} を表す (表 17)。異なるラン間の反復率の評価は、同じ試料から異なる日に異なるランで同じ技師によって同じ設備および方法を用いて得られ、ラン間の検出のばらつき CV_{inter} を表す (表 18)。

【 0 1 8 5 】

結果は、同じ日に得られる検量線も異なる日に得られる検量線もほとんどばらつきがなく、平均日内精度が 6.00% であることを示している。ただし、試料間の差は、0.0 kg/T ~ 6.0 kg/T の検量線機能範囲に適用される場合、より顕著であり、日間精度は 21.52% であり、全体的な精度は 21.75% であった (表 19)。

【 0 1 8 6 】

【表 17】

表 17 検量線を作成するためのラン内併行精度

濃度 (k g / T)		0.0	0.5	1.0	4.0	5.0	6.0
1 日目 ラン番号 2	OD _{450nm}	0.380	0.606	0.728	1.622	1.837	2.114
	σ_{intra}	0.031	0.018	0.041	0.104	0.070	0.098
	%CV	8.17	3.01	5.59	6.40	3.82	4.62
2 日目 ラン番号 3	OD _{450nm}	0.310	0.401	0.492	1.092	1.237	1.463
	σ_{intra}	0.030	0.034	0.021	0.030	0.016	0.050
	%CV	9.55	8.44	4.30	2.77	1.32	3.40
3 日目 ラン番号 4	OD _{450nm}	0.227	0.344	0.418	0.856	0.950	1.192
	σ_{intra}	0.019	0.017	0.020	0.025	0.041	0.035
	%CV	8.14	5.08	4.86	2.89	4.31	2.97
4 日目 ラン番号 5	OD _{450nm}	0.343	0.457	0.617	1.338	1.491	1.644
	σ_{intra}	0.058	0.032	0.029	0.057	0.140	0.124
	%CV	17.01	6.96	4.70	4.23	9.42	7.52
5 日目 ラン番号 6	OD _{450nm}	0.361	0.517	0.588	1.341	1.561	1.661
	σ_{intra}	0.064	0.011	0.035	0.069	0.109	0.047
	%CV	17.61	2.09	5.99	5.12	6.99	2.84
%CV _{intra} (ラン内精度)		12.10	5.12	5.09	4.28	5.17	4.27
平均精度、%CV _{intra}		6.00					

10

20

30

【 0 1 8 7 】

【表 18】

表 18 検量線を作成するためのラン間併行精度

濃度 (k g / T)	0.0	0.5	1.0	4.0	5.0	6.0
OD_{450nm}	0.324	0.465	0.568	1.250	1.415	1.615
σ_{Inter}	0.060	0.102	0.119	0.289	0.337	0.337
$\%CV_{Inter}$	18.54	21.88	20.93	23.14	23.78	20.86
平均精度、 $\%CV_{Inter}$ (ラン間精度)	21.52					

10

【0188】

【表 19】

表 19 検量線を作成するための全体的な精度

濃度 (k g / T)	0.0	0.5	1.0	4.0	5.0	6.0
n	30	30	30	30	30	30
σ_{intra}	0.059	0.034	0.034	0.071	0.060	0.060
σ_{Inter}	0.060	0.102	0.119	0.289	0.337	0.337
σ_{Total}	0.063	0.102	0.120	0.290	0.338	0.338
精度、 $\%CV_{Total}$	19.35	21.99	21.05	23.22	23.90	20.96
全体的な精度、 $\%CV_{Total}$	21.75					

20

30

【0189】

〔 L_D および L_Q (感度)〕

L_D 値および L_Q 値を表 20 に記載する。得られた各 L_Q 値は、飼料物質における定量化が可能になる、MYCOSORB 生成物の推奨含有率より低かった。

検出限界 $L_D = 0.547 \pm 0.237$ k g / T

定量化限界 $L_Q = 1.864 \pm 0.806$ k g / T

【0190】

【表 2 0】

表 2 0 ニワトリ用飼料物質における L_D および L_Q の決定

	n	OD ₄₅₀ blank		$L_D(\Delta OD_{450})$	$L_Q(\Delta OD_{450})$	$X_D(\text{kg/T})$	$X_Q(\text{kg/T})$
		$\overline{X_{b \text{ inter}}} - \overline{X_{b \text{ Intra}}}$	σ_{blank}				
1 日目	10	0.056	0.031	0.093	0.311	0.316	1.093
2 日目	10	-0.014	0.030	0.089	0.297	0.467	1.552
3 日目	10	-0.097	0.019	0.056	0.185	0.357	1.228
4 日目	10	0.018	0.058	0.175	0.583	0.767	2.622
5 日目	10	0.037	0.064	0.191	0.636	0.829	2.827
平均					0.121±0.059	0.402±0.196	0.547±0.237

10

【 0 1 9 1】

〔正確さ〕

飼料物質と混合した、濃度が 4.0 kg/T である MYC OS OR B 生成物について、各回につき 10 個の独立した試料を用いてそれぞれ 4 つの複製試料において実施した 5 回の独立した実験から、正確さを測定した。各試料の最終濃度を、本明細書に記載するように、均質性を計算するために得られる観測値を用いて算出した (表 2 1)。次に、全てのランについて得られる平均の正確さから平均精度を算出し、飼料物質と混合した添加濃度が 4.0 kg/T の MYC OS OR B 生成物と比較した。この一連の計算は、上記等式にしたがって実施した。

20

【 0 1 9 2】

結果は、回収率が、MYC OS OR B 生成物の添加濃度中における飼料物質の実際の含有率を 18% 過剰評価する原因となったことを示している (表 2 2)。

【 0 1 9 3】

【表 2 1】

表 2 1 飼料物質と混合した、濃度が 4.0 kg/T である MYC OS OR B 生成物について、各回につき 10 個の独立した試料を用いてそれぞれ 4 つの複製試料において実施した、5 回の独立した実験から測定した正確さおよび精度

30

ラン番号	X_{TH} 、 添加率 (kg/T)	複製試料番号、 x_c (OD ₄₅₀)										$\overline{x_c}$	%CV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1 日目	4.0	4.8	5.2	4.8	4.7	4.8	4.6	5.0	4.8	4.7	4.7	4.8	2.92
2 日目	4.0	5.0	4.6	4.9	4.5	4.9	4.2	4.6	5.0	5.0	4.9	4.8	5.80
3 日目	4.0	4.9	6.2	4.6	5.5	4.9	5.0	4.7	5.0	5.0	4.3	5.0	9.84
4 日目	4.0	4.7	4.4	4.0	4.2	3.9	4.7	4.4	4.4	4.3	4.3	4.3	5.36
5 日目	4.0	4.1	4.3	4.8	4.4	4.8	4.6	4.8	5.0	5.0	5.0	4.7	6.060
%CV _{intra} (ラン内精度)													6.00

40

【 0 1 9 4】

【表 2 2】

表 2 2 飼料物質と混合した、濃度が 4.0 kg/T である MYCOSORB 生成物について、各回につき 10 個の独立した試料を用いてそれぞれ 4 つの複製試料において実施した、5 回の独立した実験の平均値から測定した全体的な回収率

x_{TH} 添加率 (kg/T)	平均値 \bar{x}_c	σ_c
4.0	4.7	0.2
%CV _{Inter} (ラン間精度)		5.07
全体的な回収率 (%、理論濃度)		117.95

10

【0195】

〔ブタ用飼料物質を用いた検証〕

ALLTECH, Inc. 社 (KY、米国) にある Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition において、固形のブタ用飼料配合物と 5 つの異なる濃度の MYCOSORB 生成物との混合物について、検査を実施した。

【0196】

同じマイクロタイタープレート上に分散配置した場合について、それぞれ 0.0 kg/T、0.5 kg/T、1.0 kg/T、4.0 kg/T、5.0 kg/T、6.0 kg/T の MYCOSORB 生成物と混合したブタ用飼料物質を、未知のレベルの MYCOSORB 生成物と混合した同じブタ用飼料物質の試料とともに分析した。

20

【0197】

〔適応可能性〕

複合一般動物用飼料における MYCOSORB 生成物を追跡することを目的とするトレーサビリティのエンドポイント過程として、MYCOSORB 生成物および代替物を分析するために開発された ELISA アッセイの特性を確定するために、検証を行った。

【0198】

検証には、飼料の試料と混合する含有レベル (0.0 kg/T、0.5 kg/T、1.0 kg/T、4.0 kg/T、5.0 kg/T、6.0 kg/T) の機能範囲に対応する 6 つのレベルの MYCOSORB 生成物を使用した。

30

【0199】

希釈済みウサギ多クローン性抗体溶液。一次抗体の希釈物を、バックグラウンドレベルに合わせて調整した。1 μ l の抗体溶液 # 1 を 3.5 ml の PBS (1x) に加えることによって、抗体を PBS 中で 1:3,500 まで希釈した。各マイクロタイタープレートには、体積が 10 ml の溶液が必要であった。

【0200】

希釈済みヤギの抗ウサギ抗体。二次抗体の希釈物を、バックグラウンドレベルに合わせて調整した。1 μ l の抗体溶液 # 2 を 30.0 ml の PBS (1x) に加えることによって、抗体を PBS 中で 1:30,000 まで希釈した。

【0201】

〔均質性〕

試料の均質性の検証を、実験計画において、MYCOSORB 生成物の含有レベルの中央値 (4.0 kg/T) について行った。この特定のレベルについてのアッセイを、各試料について 4 つの複製を用いて、10 個の各試料に対して 5 回繰り返した (表 2 3)。

40

【0202】

【表 2 3】

表 2 3 4つの複製試料において分析される10個の各試料調製に対して5回のランでELISA過程によって評価される、ブタ用飼料物質と混合したMYCOSORB生成物の単一の濃度(4.0kg/T)に対する均質性の評価

ラン番号	1	2	3	4	5	平均値
n	4×10	4×10	4×10	4×10	4×10	4×10
平均OD _{450nm}	1.091	1.533	1.486	1.845	0.856	1.362
σ _{intra}	0.109	0.161	0.077	0.199	0.048	-
%CV _h	10.02	10.51	5.15	10.76	5.57	-
均質性、%CV _H	8.40					

10

【0203】

〔校正〕

既知の標準試料濃度で、0.0kg/T～6.0kg/Tの範囲のMYCOSORB生成物と混合した飼料に対して、アッセイの校正を行った。切片をゼロに設定した線形曲線近似($y = Ax$)を利用して、濃度と応答性(OD₄₅₀)との間の関係を規定した、5回のランから得られた平均検量線を図6にまとめる。

20

【0204】

〔線形性〕

ブランクを減算した後に、OD₄₅₀での吸収度に対してプロットした含有レベルの等式にしたがって、切片がゼロである最もよく一致する線($OD_{450} = Ax$ (MYCOSORB))を用いて、回帰係数の計算から、検量線の線形性を評価した。 r^2 が0.95を超える場合の相関係数の値を用いて、検量線の線形性を検証する。各標準ラン曲線および平均標準ラン曲線について算出した回帰係数を、表24に記載する。

【0205】

【表 2 4】

表 2 4 ブタ用飼料物質における検量線の線形性

30

ラン番号	1	2	3	4	5	平均化した 曲線から得 られた平均 値
年/月/日	2009/5/7	2009/5/12	2009/5/13	2009/5/22	2009/8/18	1/6異常値
n	50	50	50	50	50	-
勾配 (A)	0.2522	0.2593	0.2620	0.2856	0.1818	0.1929
平均二乗誤差 (MSE) *	0.0017	0.0021	0.0020	0.0073	0.0181	-
線形性 (r^2)	0.996	0.995	0.990	0.974	0.987	0.997

40

平均二乗誤差は、直線回帰モデルにおいて次式のように規定する。

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$$

(ただし、 $e_i^2 = y_i - \hat{y}_i$ であり、 y_i は実験によって測定したy値であり、 \hat{y}_i は、MYCOSORB生成物の期待される x_i の濃度の理論値である)

50

【 0 2 0 6 】

〔 反 復 率 〕

反復率は、反復率の標準偏差の評価による内部分散の尺度である。同一ランの反復中における反復率の評価は、同じ試料から同じ日に同じランに対して同じ技師によって同じ設備および方法を用いて得られ、1ラン内の検出のばらつき $C_{i n t r a}$ を表す（表 2 5）。異なるラン間の反復率の評価は、同じ試料から異なる日に異なるランで同じ技師によって同じ設備および方法を用いて得られ、ラン間の検出のばらつき $C V_{I n t e r}$ を表す（表 2 6）。

【 0 2 0 7 】

結果は、 $0.0 \text{ kg} / \text{T} \sim 6.0 \text{ kg} / \text{T}$ の検量線機能範囲に適用される場合、同じ日に得られる検量線も異なる日に得られる検量線もほとんどばらつきがなく、平均日内精度が 7 % であり、日間精度が 2 0 % であることを示している。

【 0 2 0 8 】

【 表 2 5 】

表 2 5 検量線を作成するためのラン内併行精度

濃度 (k g / T)		0.0	0.5	1.0	4.0	5.0	6.0
1 日 目 ラン番号 1	OD _{450nm}	0.284	0.430	0.540	1.372	1.542	1.757
	$\sigma_{i n t r a}$	0.012	0.040	0.055	0.051	0.111	0.121
	%CV	4.29	9.35	10.19	3.70	7.22	6.90
2 日 目 ラン番号 2	OD _{450nm}	0.279	0.419	0.598	1.376	1.510	1.839
	$\sigma_{i n t r a}$	0.035	0.028	0.011	0.040	0.201	0.137
	%CV	12.59	6.61	1.79	2.92	13.35	7.46
3 日 目 ラン番号 3	OD _{450nm}	0.259	0.432	0.490	1.417	1.590	1.742
	$\sigma_{i n t r a}$	0.020	0.007	0.028	0.118	0.044	0.174
	%CV	7.91	1.56	5.67	8.34	2.75	10.02
4 日 目 ラン番号 4	OD _{450nm}	0.305	0.455	0.737	1.447	1.556	2.142
	$\sigma_{i n t r a}$	0.027	0.024	0.101	0.271	0.104	0.060
	%CV	9.01	5.17	13.70	18.73	6.70	2.81
5 日 目 ラン番号 5	OD _{450nm}	0.236	0.308	0.374	0.735	0.876	0.984
	$\sigma_{i n t r a}$	0.020	0.018	0.017	0.029	0.048	0.023
	%CV	8.39	5.87	4.58	3.99	5.52	2.31
%CV _{i n t r a} (ラン内精度)		8.44	5.71	7.18	7.53	7.10	5.90
全体的な% (CV _{i n t r a})		6.98					

【 0 2 0 9 】

10

20

30

40

【表 2 6】

表 2 6 検量線を作成するためのラン間併行精度

濃度 (k g / T)	0.0	0.5	1.0	4.0	5.0	6.0
OD _{450nm}	0.273	0.409	0.548	1.269	1.415	1.693
σ_{Inter}	0.026	0.058	0.134	0.300	0.302	0.428
%CV _{Inter}	9.62	14.16	24.45	23.67	21.38	25.28
平均精度、 %CV _{Inter} (ラン間精度)	19.76					

10

【0 2 1 0】

【表 2 7】

表 2 7 検量線を作成するための全体的な精度

濃度 (k g / T)	0.0	0.5	1.0	4.0	5.0	6.0
n	30	30	30	30	30	30
σ_{intra}	0.023	0.023	0.042	0.102	0.102	0.103
σ_{Inter}	0.026	0.058	0.134	0.300	0.302	0.428
σ_{Total}	0.028	0.059	0.135	0.304	0.306	0.430
精度、%CV _{Total}	10.33	14.39	24.70	23.94	21.63	25.42
全体的な精度、 %CV _{Total}	20.07					

20

30

【0 2 1 1】

〔L_D および L_Q (感度)〕

L_D 値および L_Q 値を表 2 8 に記載する。得られた各 L_Q 値は、飼料物質における定量化が可能になる、MYCOSORB 生成物の推奨含有率より低かった。

検出限界 L_D = 0.403 ± 0.150 k g / T

定量化限界 L_Q = 1.363 ± 0.498 k g / T

【0 2 1 2】

【表 2 8】

表 2 8 プタ用飼料物質における L_D および L_Q の決定

	n	OD ₄₅₀ blank		3σ(ΔOD ₄₅₀)	10σ(ΔOD ₄₅₀)	L _D (kg/T)	L _Q (kg/T)
		$\overline{X_{b \text{ inter}} - X_{b \text{ Intra}}}$	σ _{blank}				
1 日目	10	0.064	0.071	0.111	0.371	0.613	2.054
2 日目	10	-0.006	0.035	0.105	0.351	0.407	1.386
3 日目	10	-0.027	0.020	0.061	0.205	0.234	0.795
4 日目	10	0.019	0.027	0.082	0.275	0.289	0.991
5 日目	10	-0.050	0.020	0.059	0.198	0.471	1.591
平均				0.084±0.024	0.280±0.080	0.403±0.150	1.363±0.498

10

【0 2 1 3】

〔正確さ〕

飼料物質と混合した、濃度が 4.0 kg/T である MYC OS OR B 生成物について、各回につき 10 個の独立した試料を用いてそれぞれ 4 つの複製試料において実施した 5 回の独立した実験から、正確さを測定した。各試料の最終濃度を、本明細書に記載するように、均質性を計算するために得られる観測値を用いて算出した(表 2 9)。次に、全てのランについて得られる平均の正確さから平均精度を算出し、飼料物質と混合した添加濃度が 4.0 kg/T の MYC OS OR B 生成物と比較した。この一連の計算は、上記等式にしたがって実施した。

20

【0 2 1 4】

結果は、回収率の評価が、MYC OS OR B 生成物の添加濃度中における飼料物質の実際の含有率を 20% 過剰評価する原因となったことを示している(表 3 0)。

【0 2 1 5】

【表 2 9】

30

表 2 9 飼料物質と混合した、濃度が 4.0 kg/T である MYC OS OR B 生成物について、各回につき 10 個の独立した試料を用いてそれぞれ 4 つの複製試料において実施した、5 回の独立した実験から測定した正確さおよび精度

ラン番号	X _{TH} 、 添加率 (kg/T)	複製試料番号、x _c (OD ₄₅₀)										\bar{x}_c	%CV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1 日目	4.0	4.3	4.6	3.6	3.8	4.1	3.4	5.2	4.4	5.0	4.2	4.3	12.80
2 日目	4.0	6.1	4.9	4.1	4.5	4.6	4.5	4.7	4.2	5.2	5.7	4.8	12.50
3 日目	4.0	4.9	4.4	4.3	5.1	4.6	4.9	4.6	4.4	4.7	5.1	4.7	5.91
4 日目	4.0	5.0	4.2	5.9	4.3	5.6	5.4	5.4	5.6	6.6	5.6	5.4	12.64
5 日目	4.0	4.6	4.8	4.9	4.9	4.8	5.5	4.4	5.3	4.6	5.3	4.9	6.97
%CV _{intra} (ラン内精度)													10.16

40

50

【 0 2 1 6 】

【表 3 0】

表 3 0 飼料物質と混合した、濃度が 4.0 kg/T である MYC OS OR B 生成物について、各回につき 10 個の独立した試料を用いてそれぞれ 4 つの複製試料において実施した、5 回の独立した実験の平均値から測定した全体的な回収率

x_{TH} 添加率 (kg/T)	平均値 \bar{x}_c	σ_c
4.0	4.4	0.3
% CV _{Inter} (ラン間精度)		8.47
全体的な回収率 (%、理論濃度)		120.46

10

【 0 2 1 7 】

〔ニワトリ用飼料物質およびブタ用飼料物質を用いた検証〕

飼料のアッセイにおいて MYC OS OR B を検出するための ELISA を、ニワトリのマトリクスおよびブタのマトリクスにおいて実施し、独立した研究室で検証し、検証結果と比較した。アッセイは、Alimetrics, Ltd. 社 (Koskelontie 19 B, Espoo、フィンランド) において検証した。

【 0 2 1 8 】

アッセイの較正を、0.0 kg/T ~ 6.0 kg/T の範囲の既知の標準試料濃度の MYC OS OR B 生成物と混合した飼料に対して異なる日に 2 回実施した。切片がゼロである $y = Ax$ を用いた線形曲線近似を利用して、ブタ用飼料およびニワトリ用飼料における濃度と応答性 (OD_{450}) との関係の規定した。吸光度、および、その結果として得られる較正はラン毎に大幅に異なったが、既知の試料の絶対濃度および盲検試料の絶対濃度は同じである。

20

【 0 2 1 9 】

〔線形性〕

ブランクを減算した後に、 OD_{450} での吸収度に対してプロットした含有レベルの等式にしたがって、切片がゼロである最もよく一致する線 ($OD_{450} = Ax$ (MYC OS OR B)) を用いて、回帰係数の計算から、検量線の線形性を評価した。 r^2 が 0.95 を超える場合の相関係数の値を用いて、検量線の線形性を検証する。相関係数の範囲は 0.991 ~ 0.994 であった (表 3 1)。

30

【 0 2 2 0 】

【表 3 1】

表 3 1 ニワトリ用飼料物質およびブタ用飼料物質における検量線の線形性

ラン番号	1	2	3	4	平均化した曲線から 得られた平均値
マトリクス	ニワトリ用飼料		ブタ用飼料		—
年/月/日	2010/4/6	2010/4/7	2010/4/6	2010/4/6	—
n	15	15	15	15	—
勾配 (A)	0.0954	0.0775	0.0828	0.0809	—
線形性 (r^2)	0.991	0.994	0.993	0.992	0.997

平均二乗誤差は、直線回帰モデルにおいて次式のように規定する

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$$

(ただし、 $e_i^2 = y_i - \hat{y}_i$ であり、 y_i は実験によって測定した y 値であり、 \hat{y}_i は、MYC OSORB 生成物の期待される x_i の濃度の理論値である)

【0 2 2 1】

〔 L_D および L_Q (感度)〕

L_D 値および L_Q 値を、40%の塩酸マトリクスにおいて求めた。 L_D 値および L_Q 値の各推定値は、それぞれ、ニワトリ用飼料と混合したMYC OSORBの場合は0.35 kg/Tおよび1.20 kg/T、および、ブタ用飼料と混合したMYC OSORBの場合は0.27 kg/Tおよび0.91 kg/Tであった(それぞれ表32および表33を参照)。

【0 2 2 2】

【表 3 2】

表 3 2 検証ラボがニワトリ用飼料について1日間隔で実施した2つの別のランにおいて、ブランク試料に対して得られた結果

	年/月/日	試料 ID	試料摂取量(g)	結果(kg/T)
1日目	2010/4/6	0.3	20	0.230
		0.4	20	0.150
		0.6	20	0.010
2日目	2010/4/7	0.1	20	0.320
		0.4	20	0.110
		0.10	20	0.020
平均値			0.140	

【0 2 2 3】

【表 3 3】

表 3 3 検証ラボがブタ用飼料について 1 日間隔で実施した 2 つの別のランにおいて、ブランク試料に対して得られた結果

	年/月/日	試料 I D	試料摂取量 (g)	結果 (kg/T)
1 日目	2010/4/6	0.2	20	0.230
		0.3	20	0.290
		0.4	20	0.082
2 日目	2010/4/7	0.1	20	0.220
		0.3	20	0.110
		0.7	20	0.064
平均値			0.170	

10

【0 2 2 4】

〔「既知」の試料の正確さおよび精度〕

20

飼料物質と混合した、濃度が 4 . 0 k g / T である MYC O S O R B 生成物について、各回につき 6 つの複製試料において実施した 2 回の独立した実験から、正確さを測定した。全てのランについて得られる平均の正確さから平均精度を算出し、飼料物質と混合した添加濃度が 4 . 0 k g / T の MYC O S O R B 生成物と比較した。

【0 2 2 5】

得られた値は、後述するように、正確さおよび精度のどちらの判断基準も満たした。

【0 2 2 6】

同一ランの反復中における反復率の評価は、同じ試料から同じ日に同じランに対して同じ技師によって同じ設備および方法を用いて得られ、1 ラン内の検出のばらつき $C V_{i n t e r}$ を表す。異なるラン間の反復率の評価は、同じ試料から異なる日に異なるランで同じ技師によって同じ設備および方法を用いて得られ、ラン間の検出のばらつき $C V_{I n t e r}$ を表す。

30

【0 2 2 7】

得られた値は、後述するように、ニワトリ用マトリクスおよびブタ用マトリクスについて、正確さおよび精度のどちらの判断基準も満たした（表 3 4 および表 3 5）。

【0 2 2 8】

【表 3 4】

表 3 4 ニワトリ用飼料物質と混合したMYCOSORB生成物の既知の試料 (4.0 kg / T) を用いて、別の2日に実施した6つの複製試料の検査から測定した正確さおよび精度

	年/月/日	試料 I D	試料摂取量 (g)	結果 (kg/T)
1 日目	2010/3/4	H. 1	20	4.4
		H. 2	20	4.4
		H. 3	20	3.9
		H. 4	20	4.1
		H. 5	20	4.4
		H. 6	20	4.2
2 日目	2010/3/5	H. 7	20	3.8
		H. 8	20	3.3
		H. 9	20	3.7
		H. 10	20	3.4
		H. 11	20	3.8
		H. 12	20	4.1
平均値				4.0
%CV _{intra} (ラン内精度)			6.6	
%CV _{inter} (ラン間精度)			9.7	
全体的な回収率 (%、理論濃度)			99%	

10

20

【 0 2 2 9 】

30

【表 3 5】

表 3 5 ブタ用飼料物質と混合したMYC OS OR B生成物の既知の試料（4. 0 k g / T）を用いて、別の2日に実施した6つの複製試料の検査から測定した正確さおよび精度

	年/月/日	試料 I D	試料摂取量(g)	結果(kg/T)
1 日 目	2010/3/4	H. 1	20	4. 7
		H. 2	20	4. 1
		H. 3	20	4. 4
		H. 4	20	4. 6
		H. 5	20	3. 8
		H. 6	20	4. 3
2 日 目	2010/3/5	H. 7	20	3. 5
		H. 8	20	3. 7
		H. 9	20	3. 1
		H. 10	20	3. 2
		H. 11	20	3. 6
		H. 12	20	3. 5
平均値			3. 9	
% C V _{i n t r a} (ラン内精度)			7. 5	
% C V _{I n t e r} (ラン間精度)			14. 0	
全体的な回収率 (%、理論濃度)			96%	

10

20

【 0 2 3 0 】

〔「未知」の試料の正確さおよび精度〕

30

飼料物質と混合した、濃度が4. 0 k g / TであるMYC OS OR B生成物について、各回につき3つの複製試料について実施した2回の独立した実験から、盲検検査において正確さを測定した。得られた値は、後述するように、正確さおよび精度のどちらの判断基準も満たした（表 3 6 および表 3 7）。

【 0 2 3 1 】

【表 3 6】

表 3 6 ニワトリ用飼料物質と混合したMYCOSORB生成物の未知の試料（4.0 kg/T）に対して実施した、3つの複製試料の検査から測定した正確さおよび精度。

測定日	試料 I D (mL)	試料摂取量 (g)	結果 (kg/T)
2010/4/6	C. 6	20	4.0
	C. 7	20	3.8
	C. 8	20	4.1
平均値		4.0	
反復率の標準偏差		0.11	
RSD (%)		3.0%	

10

【 0 2 3 2】

【表 3 7】

表 3 7 ブタ用飼料物質と混合したMYCOSORB生成物の未知の試料（4.0 kg/T）に対して実施した、3つの複製試料の検査から測定した正確さおよび精度

測定日	試料 I D (mL)	試料摂取量 (g)	結果 (kg/T)
2010/4/6	C. 6	20	4.5
	C. 7	20	3.8
	C. 8	20	4.4
平均値		4.2	
反復率の標準偏差		0.36	
RSD (%)		8.5%	

20

30

【 0 2 3 3】

〔 耐久性〕

測定方法が持つ、環境および過程に関連する変数が微量な変化をした場合に結果に生じ得る変化に抵抗する能力を、耐久性分析によって評価する。

【 0 2 3 4】

一次抗体の希釈物および二次抗体の希釈物を変化させることによって、ELISAアッセイ法の安定性を調べ、さらに、検査対象となる異なる試料のマイクロタイタープレート上での分散配置を変更することによって、一次抗体の安定性を調べた（測定する全ての試料、ブランク試料、標準試料、および、未知の試料を備えた単一のプレートと、分析する試料1つ当たりにより多くの反復を備えているが、ブランク試料、標準試料、および、未知の試料が異なるマイクロタイタープレート上にある、複数のマイクロタイタープレート）。表 3 8 にばらつきを示す。この表は、たとえ変更を実施しても結果には一貫性があることを示しており、特に抗体の希釈におけるばらつきに対して上記検査方法が強力な耐久性を有すること示唆している。

40

【 0 2 3 5】

【表 3 8】

表 3 8 耐久性検査。標準状態を太字で示す。10%の変化があればハイライト表示する。

変更した条件	条件値	飼料の試料	x_c	回収率	CV_{intra}	CV_{inter}	CV_{Total}
一次抗体、 二次 A b 1:20,000	1:2000	乳業	4.45	120.98	7.90	10.85	12.06
	1:2500		4.47	121.06	8.98	13.86	15.13
	1:4000		4.44	121.01	10.54	10.18	14.12
	1:5000		4.49	123.30	9.57	13.42	16.14
一次抗体、 二次 A b 1:30,000	1:2000	乳業	4.37	119.56	10.03	9.39	12.70
	1:2500		4.55	121.75	8.86	14.58	15.73
	1:4000		4.30	115.85	10.66	11.11	14.10
	1:5000		4.35	117.29	9.91	14.55	16.33
一次抗体の 安定性	2°C~8°C、 1週間、 RT	ニワトリ	4.8	134.80	5.59	-	-
	4.9		138.10	6.85	-	-	
プレートの 分散配置	単一プレート	ニワトリ	4.72	120.68	6.13	5.19	8.07
	複数プレート		4.82	124.23	5.99	5.89	8.11

10

【0236】

20

〔実施例 5〕

〔単クローン性抗体特異性検査〕

〔方法〕

17個の化合物をPBS中で50 μ g/mlの濃度で検査し、酵母(14)-D-グルカン/(16)-D-グルカン-BSA接合体に対して産生させた単クローン性抗体による交差反応性について判定した。

【0237】

検査した化合物は、可溶性澱粉ジャガイモ、澱粉米、澱粉コムギ、澱粉トウモロコシ、BSA、(ウサギからの)グリコーゲン、(カキからの)グリコーゲン、(ウシの)グリコーゲン、マンナン、ラミナリン、ザイモシン(Zymosin)A、マルトリンQD、パン酵母から得られるグルカン、Eug. gracilisから得られる(13)-D-グルカン、Torula酵母、Ycw-02ビーズピーター(ビーズピーターで調製した酵母細胞壁画分)、オオムギから得られるグルカンであった。

30

【0238】

さらに、酵母細胞壁抽出物(MYCOSORB、バッチ番号08FS001)と、単クローン性抗体を産生させるために使用した(14)-D-グルカン/(16)-D-グルカン-BSA抗原とを、1 μ g/ml、2 μ g/ml、および、5 μ g/mlの濃度で検査した。どちらの単クローン性抗体(513A161.1および513A431.1)も、1:100、1:200、1:500、1:1000、1:1500、および、1:2000の希釈範囲でアッセイした。96個のウェルを備えたNunc社のマイクロタイタープレート(ロット番号0702013)を使用した。各プレートを100 μ l/ウェルの化合物でコーティングし、指先で8回~10回はじくことによって攪拌した。これらのプレートを封止用テープで被覆し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションした。溶液を取り除いて、多チャンネルピペットを用いて1回につき200 μ lのPBSで、プレートを3回洗浄した。洗浄溶液を各回において取り除く前に、プレートを指先8回~10回はじいた。各回の洗浄の次の回の洗浄との間には、プレートを紙タオルの上ではじくことによって、過剰な流体を取り除いた。ブロッキングするために、100 μ l/ウェル3%の(遠心分離にはかけていない)乳を加えた。各プレートを室温で1時間インキュベーションした。ブロッキング溶液を取り除き、ウェルを200 μ lのPBSで1回、200 μ lのPBSと0.05%のポリソルベート20とで2回洗浄した。洗浄溶液を各回

40

50

において取り除く前に、指先で8回～10回はじくことによって、プレートを攪拌した。各回の洗浄の次の回の洗浄との間には、プレートを紙タオルの上ではじくことによって、過剰な流体を取り除いた。

【0239】

適切な血清の希釈物を各ウェルに100 μ lずつ加えた。空白ウェルには、PBS (100 μ l/ウェル)を使用した。プレートを被覆した状態で、室温で1時間インキュベーションした。溶液を取り除き、ウェルを1回につき200 μ lのPBSと0.05%のポリソルベート20とで3回洗浄した。洗浄物を各回において取り除く前に、プレートを指先で8回～10回はじいて攪拌した。各回の洗浄の次の回の洗浄との間には、プレートを紙タオルの上ではじくことによって、過剰な流体を取り除いた。二次抗体(1:10,000のヤギ抗マウス、IgG-ペルオキシダーゼ接合体)を各ウェルに100 μ lずつ加えた。プレートを被覆した状態で、室温で1hインキュベーションした。溶液を取り除き、ウェルを1回につき200 μ lのPBSと0.05%のポリソルベート20とで3回洗浄した。洗浄物を各回において取り除く前に、プレートを指先で8回～10回はじいて攪拌した。各回の洗浄の次の回の洗浄との間には、プレートを紙タオルの上ではじくことによって、過剰な流体を取り除いた。

10

【0240】

室温のTMB基質を各ウェルに100 μ lずつを加えた。5分後に、100 μ l/ウェルの1NのHClを用いて反応を停止させた。プレートの底部を、指紋を残さないようにきれいに拭いた。さらに、10秒間振盪した後に、マイクロタイタープレート読み取り装置を用いて、450nmにおける吸光度を読み取った。

20

【0241】

〔結果〕

ELISAデータの棒グラフを図9～図14に示す。513A161.1と513A431.1とはどちらも、1 μ g/mlという低い濃度でも抗原499-73-3と非常に激しく反応し、2 μ g/mlで最も高い吸光度読み取り値を示した。抗体は、1 μ g/ml～5 μ g/mlの範囲の濃度で08FS001を認識することもでき、5 μ g/mlで最も高い吸光度読み取り値を示した。ただし、08FS001の場合には、抗原499-73-3の場合に比べて、吸光度が大幅に低かった。抗体513A161.1はラミナリンを認識し、これとかなり反応したが、513A431.1は認識しなかった。どちらの抗体も、ザイモシン(Zymosin)Aに対しては非常に高い吸光度読み取り値を示した。これは、抗原499-73-3の場合に見られる吸光度と同程度であり、時にはより高い吸光度であった。驚くべきことに、各抗体は、ザイモシン(Zymosin)A、マルチリンQD、パン酵母から得られるグルカン、Eug.gracilisから得られる(13)-D-グルカン、Torula酵母、および、Ycw-02ピーズピーターレットに対してかなりの交差反応を示したので、定量ELISAアッセイのために該抗体を使用することは制限された。

30

【0242】

〔実施例6〕

〔飼料から抽出された抗原が検出できるように、単クローン性抗体ELISAアッセイ条件を最適化する試み〕

40

〔PBSにおける希釈とPBS+3%脱脂乾燥乳との比較〕

単クローン性抗体513A161.1(実施例5)を使用して、飼料から抽出された抗原を定量ELISAアッセイにおいて検出しようとする、吸光度読み取り値が低かった。PBSではなく、3%の乳において抗体を希釈したことが吸光度読み取り値に影響したかどうかを(例えば、飼料抽出物成分と組み合わせた場合に過度なブロッキングを引き起こすことによって)判定するために、以下のプロトコールを実施した。

【0243】

酵母細胞壁抽出物(MYCOSORB、バッチ番号08FS001)を、0.5%のHClを含有する溶液にして、実施例4に記載の化学抽出プロセスにかけた。ELISAア

50

ッセイを、実施例 5 に記載のように、単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 を 1 : 4 0 0 の希釈度で一次抗体として用い、さらに、P B S または 3 % の乳のいずれかにおいて希釈したヤギ抗マウス I g G - H R P 抗体 (1 : 1 0 , 0 0 0) を二次抗体として用いて実施した。マイクロタイタープレートを、酵母細胞壁抽出物 (1 0 0 μ l / ウェル) または P B S で 1 : 1 に希釈した抽出物 (2 0 0 μ l / ウェル) でコーティングした。

【 0 2 4 4 】

図 1 5 に示した結果によって、抗体希釈液の持つ、軽微であって統計学的には有意でない効果が観察されることが確認された。また、試しに単クローン性抗体を使用して、抗原を 3 組、0 . 5 % の H C l で抽出した飼料標準品中において検出してみようとする、複製間の読み取り値のばらつきが大きく、標準偏差が大きく、吸光度読み取り値が異常に増大した。

10

【 0 2 4 5 】

〔抗原コーティングステップ、温度と時間〕

試しに単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 を使用 (実施例 5) して、飼料から抽出した抗原を定量 E L I S A アッセイにおいて検出すると、吸光度読み取り値が低かった。マウスの単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 を用いて E L I S A の吸光度読み取り値を大きくするために、後述の実験を実施し、抗原コーティング・インキュベーションステップの時間および温度を変更することによって、バックグラウンド / 非特異的結合を増加させずに、飼料から抽出した抗原の検出を改善できるかどうかを判断した。

20

【 0 2 4 6 】

プロトコールには、飼料抽出を上述のように実施して分析用試料を生成することを含めた。試料の部分標本は、プレート上でただちにコーティングするか、または、- 2 5 で一晩保存するかのいずれかの処理を行った。試料の調製を 3 回繰り返して、3 組の抽出物を生成した。ニワトリ用飼料調製物において抗原を使用して、6 点からなる検量線 (0 k g / T、0 . 4 k g / T、0 . 8 k g / T、1 . 2 k g / T、1 . 8 k g / T、2 . 4 k g / T) を作成した。プレートを飼料抽出物でコーティングして放置して、4 で一晩 (安置)、4 で一晩 (振盪)、または、3 7 で 1 時間 (安置) インキュベーションした。E L I S A アッセイを、実施例 5 に記載のように、3 % の乳で 1 : 4 0 0 に希釈した単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 を一次抗体として用い、さらに、3 % の乳で希釈したヤギ抗マウス I g G - H R P 抗体 (1 : 1 0 , 0 0 0) を二次抗体として用いて実施した。

30

【 0 2 4 7 】

図 1 6 に示す結果は、抗原をプレート上にコーティングする時間および温度を変更しても、吸光度を最適な範囲に達するまでには増加させなかったこと、さらに、このような変更が検量線の線形性に影響しなかったことを示唆している。また、バックグラウンドはインキュベーション時間からは独立的に増加した。

【 0 2 4 8 】

〔実施例 7〕

〔多クローン性抗体の選択性 (干渉) 検査〕

干渉度を求めるために、M Y C O S O R B 生成物 (参照番号 2 8 5 9 6 5) を 1 k g / T で含む本明細書に記載のニワトリ用飼料物質と、これを含まない該ニワトリ用飼料物質とを用いて、1 セットのアッセイを実施した。なお、この M Y C O S O R B 生成物を 1 k g / T で含むニワトリ用飼料物質については、飼料配合物中に見られる炭水化物または副生成物に属する、考え得る干渉物を複数の比率 (M Y C O S O R B 生成物の含有レベルに対して 5 0 %、1 0 0 %、2 0 0 % (w / w)) で含んだものと含んでいないものを用意した。この点において、以下の各生成物について調査および検査して、以下に規定する方法で M Y C O S O R B 生成物の検出に対する影響を評価した。

40

・ アミロース (ジャガイモ澱粉)。比が 3 0 : 1 の (1 4) : (1 6) - - D -
グルカン

・ マルトデキストリンおよびコーンシロップの固形物。自然のトウモロコシ澱粉から生

50

成される、容易に消化可能な炭水化物、ブドウ糖の重合体

- ・ (ウシの肝臓から得られるIX型の)グリコゲン。比が10:1の(1 4):(1 6) - - D - グルカン
- ・ (Laminaria digitataから得られる)ラミナリン。比が3:1の(1 3):(1 6) - - D - グルカン
- ・ 乾燥醸造粕。トウモロコシからバイオエタノールを生成する際の副生成物
- ・ (Saccharomyces bayanusから得られる)Red Star (登録商標) パスツール・シャンパーニュ活性乾燥ワイン酵母。酵母および酵母細胞壁(1 3):(1 6) - - D - グルカン、タンパク質にリンクした(1 4):(1 6) - - D - ポリマンノース、(1 2):(1 4) - - N - アセチルグルコスマミン(acetylglucosamine)から形成される複合糖質)。

10

【0249】

図7および図8に示すように、MYCOSORB生成物の場合に得られたシグナルと、50、100、200% (w/w)の干渉物質と混合したMYCOSORB生成物の場合に得られたシグナルとの間の差の合計は、約OD₄₅₀値で0であった。この結果は、干渉が欠如していることを説明しており、したがって、様々な炭水化物系干渉物質を含む複合飼料マトリクスにおいてMYCOSORB生成物を検出するためのアッセイが有する特異的な特徴を説明している。

【0250】

個々の干渉物質に関する詳細な結果、および、一方向ANOVA検査(信頼区間は95%)の制約については、表39~表44に示す。なお、表39~表44中では、標準偏差および変動係数だけでなく、光学濃度(450nm)の平均値および試料間の差も算出した。各干渉物質における分散の均等性を、レーベン検定、オプライエン検定、および、ブラウン・フォーサイス検定によって評価した。非一定の分散の場合には、ノンパラメトリックなクラスカル・ワーリスの一方向ANOVA法を、非正規性に対してより強力で異常値に対する耐性が高い検定を実現するランク変換とともに使用した。分析は、検査対象の干渉物質の濃度ごとに別々のプレート上で、または、単一の個々のプレート上で実施した。2つのプレートの調製物について、同一の結果が得られた。

20

【0251】

【表 3 9】

表 3 9 ニワトリ用飼料において0、50、100、200% (w/w) のアミロースと混合した場合に、MYCOSORB生成物について得られたOD₄₅₀平均値。平均値間の差は、一方向ANOVAおよび平均値比較統計的検定 (mean comparison statistical tests) によって、信頼区間を95%として分析した。

MYCOSORB 1kg/T		MYCOSORB/干渉物質の比 (w/w)		
		+50%	+100%	+200%
ANOVA		クラスカル・ワーリス、 一方向ノンパラメトリック		
アミロース	ブランク (飼料のみ)			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.3317	0.3538	0.3638
	平均ランク	20.396 ^C	40.479 ^C	48.625 ^C
	σ_{intra}	0.0157	0.0234	0.0242
	%CV _{intra}	4.7471	6.6116	6.6448
	コントロール			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.6601	0.7073	0.6294
	平均ランク	154.25 ^{AB}	196.48 ^A	113.17 ^B
	σ_{intra}	0.0348	0.0351	0.0206
	%CV _{intra}	5.2709	4.9578	3.2661
コントロール+アミロース				
N	24	24	24	
平均 (OD ₄₅₀)	0.6352 ^B	0.6561 ^{AB}	0.6365 ^B	
平均ランク	122.40 ^B	151.13 ^{AB}	129.58 ^B	
σ_{intra}	0.0200	0.0221	0.0346	
%CV _{intra}	3.1418	3.3738	5.4299	
平均 (OD ₄₅₀) の差	-0.0249	-0.0512	0.071	
平均ランクの差	-31.85	-45.35	16.41	
臨界Z値	3.197			
比較臨界値	57.678			

10

20

30

【 0 2 5 2 】

【表 40】

表 40 ニワトリ用飼料において0、50、100、200% (w/w) のマルトデキストリンと混合した場合に、MYCOSORB生成物について得られた OD_{450} 平均値。平均値間の差は、一方向ANOVAおよび平均値比較統計的検定によって、信頼区間を95%として分析した。

MYCOSORB 1kg/T		MYCOSORB/干渉物質の比 (w/w)		
		+50%	+100%	+200%
ANOVA		一方向パラメトリック、 チューキー比較検定		
マルトデキ ストリン	ブランク (飼料のみ)			
	N	24	24	24
	平均 (OD_{450})	0.3628 ^C	0.3818 ^B	0.3587 ^C
	σ_{intra}	0.0274	0.0288	0.0367
	% CV_{intra}	7.5505	7.5414	10.218
	コントロール			
	N	24	24	24
	平均 (OD_{450})	0.7022 ^A	0.6426 ^B	0.6822 ^A
	σ_{intra}	0.0276	0.0247	0.0276
	% CV_{intra}	3.9264	3.8422	4.0480
	コントロール+マルトデキストリン			
	N	24	24	24
平均 (OD_{450})	0.7088 ^A	0.6271 ^B	0.6407 ^B	
σ_{intra}	0.0490	0.0449	0.0342	
% CV_{intra}	6.9145	7.1518	5.3306	
差	0.0066	-0.0155	-0.0415*	
臨界値	0.0308			
比較用 σ	0.0099			

10

20

30

【0253】

【表 4 1】

表 4 1 ニワトリ用飼料において0、50、100、200% (w/w) のグリコーゲンと混合した場合に、MYCOSORB生成物について得られたOD₄₅₀平均値。平均値間の差は、一方向ANOVAおよび平均値比較統計的検定によって、信頼区間を95%として分析した。

MYCOSORB 1kg/T		MYCOSORB/干渉物質の比 (w/w)		
		+50%	+100%	+200%
ANOVA		クラスカル・ウォリス、 一方向ノンパラメトリック		
グリコーゲン	ブランク (飼料のみ)			
	N	24	24	16
	平均 (OD ₄₅₀)	0.4452	0.4414	0.4495
	平均ランク	35.604 ^B	33.458 ^B	40.437 ^B
	σ_{intra}	0.0311	0.0235	0.0270
	%CV _{intra}	6.9773	5.3259	6.0070
	コントロール			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.8522	0.8423	0.8339
	平均ランク	150.33 ^A	143.69 ^A	137.54 ^A
	σ_{intra}	0.0610	0.0433	0.0312
	%CV _{intra}	7.1611	5.1412	3.7443
	コントロール+グリコーゲン			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.8474	0.8367	0.8051
	平均ランク	149.94 ^A	140.06 ^A	124.58 ^A
	σ_{intra}	0.0358	0.0576	0.0584
	%CV _{intra}	4.2302	6.8847	7.2482
	平均 (OD ₄₅₀) の差	-0.0048	-0.0056	-0.0288
	平均ランクの差	0.39	-3.63	-12.96
	臨界Z値	3.197		
	比較臨界値	55.547~62.103		

10

20

30

【 0 2 5 4 】

【表 4 2】

表 4 2 ニワトリ用飼料において0、50、100、200% (w/w) のラミナリンと混合した場合に、MYCOSORB生成物について得られたOD₄₅₀平均値。平均値間の差は、一方向ANOVAおよび平均値比較統計的検定によって信頼区間を95%として分析した。

MYCOSORB 1kg/T		MYCOSORB/干渉物質の比 (w/w)		
		+50%	+100%	+200%
ANOVA		クラスカル・ワーリス、 一方向ノンパラメトリック		
ラミナリン	ブランク (飼料のみ)			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.3580	0.3478	0.3673
	平均ランク	37.88 ^{DE}	31.15 ^E	40.48 ^{DE}
	σ_{intra}	0.0428	0.0522	0.0553
	%CV _{intra}	11.951	14.998	15.063
	コントロール			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.5618	0.5981	0.5224
	平均ランク	126.96 ^{BC}	157.79 ^{AB}	94.708 ^{CD}
	σ_{intra}	0.0488	0.0229	0.0233
	%CV _{intra}	8.6916	3.8358	4.4521
	コントロール+ラミナリン			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.6288	0.5630	0.6155
	平均ランク	187.33 ^A	125.50 ^{BC}	174.21 ^{AB}
	σ_{intra}	0.0245	0.0341	0.0312
	%CV _{intra}	3.8924	6.0501	5.0624
平均 (OD ₄₅₀) の差	-0.0670	-0.0351	0.0931	
平均ランクの差	60.37*	-32.29	79.502*	
臨界Z値	3.197			
比較臨界値	57.68			

10

20

30

【 0 2 5 5 】

【表 4 3】

表 4 3 ニワトリ用飼料において0、50、100、200% (w/w) のRED STAR ワイン酵母と混合した場合に、MYCOSORB生成物について得られたOD₄₅₀平均値。平均値間の差は、一方向ANOVAおよび平均値比較統計的検定によって信頼区間を95%として分析した。

MYCOSORB 1kg/T		MYCOSORB/干渉物質の比 (w/w)		
		+50%	+100%	+200%
ANOVA		クラスカル・ワーリス、 一方向ノンパラメトリック		
ワイン酵母	ブランク (飼料のみ)			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.3533	0.3396	0.3490
	平均ランク	41.75 ^B	29.90 ^B	37.85 ^B
	σ_{intra}	0.0240	0.0205	0.0261
	%CV _{intra}	6.7991	6.0454	7.4902
	コントロール			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.6223	0.5566	0.5846
	平均ランク	169.90 ^A	117.38 ^A	135.13 ^A
	σ_{intra}	0.0534	0.0546	0.0413
	%CV _{intra}	8.5726	9.8003	7.0725
	コントロール+Red Star (登録商標) 酵母			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.5977	0.6098	0.5950
	平均ランク	145.65 ^A	156.17 ^A	142.79 ^A
	σ_{intra}	0.0257	0.0253	0.0274
	%CV _{intra}	4.2986	4.1468	4.6038
	平均 (OD ₄₅₀) の差	-0.0246	0.0532	0.0104
	平均ランクの差	-24.25	38.79	7.66
	臨界Z値		3.197	
	比較臨界値		57.68	

10

20

30

【 0 2 5 6 】

【表 4 4】

表 4 4 ニワトリ用飼料において 0、50、100、200% (w/w) の乾燥醸造粕と混合した場合に、MYCOSORB 生成物について得られた OD₄₅₀ 平均値。平均値間の差は、一方向 ANOVA および平均値比較統計的検定によって信頼区間を 95% として分析した。

MYCOSORB 1 kg/T		MYCOSORB/干渉物質の比 (w/w)		
		+50%	+100%	+200%
ANOVA		クラスカル・ワーリス、 一方向ノンパラメトリック		
DDG	ブランク (飼料のみ)			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.3504	0.3465	0.3458
	平均ランク	38.81 ^C	35.85 ^C	34.83 ^C
	σ_{intra}	0.0464	0.0515	0.0510
	%CV _{intra}	13.228	14.858	14.744
	コントロール			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.8338	0.7825	0.7793
	平均ランク	151.46 ^{AB}	108.19 ^B	129.58 ^{AB}
	σ_{intra}	0.0411	0.0240	0.0934
	%CV _{intra}	4.9341	3.0669	11.990
	コントロール+DDG			
	N	24	24	24
	平均 (OD ₄₅₀)	0.8476	0.8136	0.8741
	平均ランク	162.73 ^{AB}	134.40 ^{AB}	180.65 ^A
	σ_{intra}	0.0382	0.0489	0.0465
	%CV _{intra}	4.5019	6.0098	5.3191
差	0.0138	0.0311	0.0948	
	11.27	26.21	51.07	
臨界値	3.197			
比較用 σ	57.68			

10

20

30

【0257】

本明細書に記載の全ての出版物および特許文献は、参照によって本明細書に引用されるものとする。本発明の上記方法およびシステムの各種の変更および変形例は、当業者には明らかであり、本発明の技術的範囲および精神から逸脱するものではない。本発明については、特定の好適な実施形態との関連において記載してきたが、クレームに規定した本発明がこのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことは理解されるべきである。実際に、炭水化物化学分野、微生物学、動物飼料および栄養学、免疫学、または、これらに関連する分野の当業者には自明な、本発明を実施するための上記モードの各種変更は、以下に記す請求項の範囲内にあることを意図している。

40

【図面の簡単な説明】

【0258】

【図 1】グルカン画分 P1、P2、P3、および、S1、S2、および、S3 の生成の概略図を示している (例えば、実施例 1 を参照)。

【図 2】元のウサギの抗血清の応答性、および、親和性精製済み抗血清の 4 つの上清の応答性を示している。親和性精製済み抗血清は、-(1,6)-グルカンに特異的な (G a b 1 ~ G a b 4) 抗体を、BSA でコーティングされたマイクロウェルプレートに分離

50

することによって得られた（例えば、実施例 3 を参照）。

【図 3】本明細書記載する方法で生成した、精製済みの抗(1 4) - - / (1 6) - - D - グルカン - B S A 多クローン性ウサギ抗体を使用して作成した較正曲線を示している（例えば、実施例 2 および 3 を参照）。

【図 4】M Y C O S O R B の 6 つの含有レベルを用いて乳業用飼料物質において実施した、5 つのアッセイから得られた平均検量線を示している。右側の y 軸は、検量線に対する、日内 (% C V _{i n t r a}) 併行精度および日間 (% C V _{i n t e r}) 併行精度を示す。

【図 5】M Y C O S O R B の 6 つの含有レベルを用いてニワトリ用飼料物質において実施した、5 つのアッセイから得られた平均検量線を示している。右側の y 軸は、検量線に対する、日内 (% C V _{i n t r a}) 併行精度および日間 (% C V _{i n t e r}) 併行精度を示す。

【図 6】M Y C O S O R B の 6 つの含有レベルを用いてブタ用飼料物質において実施した、5 つのアッセイから得られた平均検量線を示している。右側の y 軸は、検量線に対する、日内 (% C V _{i n t r a}) 併行精度および日間 (% C V _{i n t e r}) 併行精度を示す。

【図 7】複数のマイクロタイタープレートを分散配置した場合において、干渉物の平均の光学濃度読み取り値 (O D _{4 5 0}) の差を、ニワトリ用飼料において得られる M Y C O S O R B 生成物のシグナルから減じた値を示している（実施例 7）。干渉物は、M Y C O S O R B 生成物 (1 0 0 %、1 . 0 k g / T) とともに、5 0 %、1 0 0 %、2 0 0 % (w / w) の割合で加えた。

【図 8】単一のマイクロタイタープレートを配置した場合において、干渉物の平均の光学濃度読み取り値 (O D _{4 5 0}) の差を、ニワトリ用飼料において得られる M Y C O S O R B 生成物のシグナルから減じた値を示している（実施例 7）。干渉物は、M Y C O S O R B 生成物 (1 0 0 %、1 . 0 k g / T) とともに、5 0 %、1 0 0 %、2 0 0 % (w / w) の割合で加えた。

【図 9 a】濃度が 1 : 1 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 9 b】濃度が 1 : 2 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 0 a】濃度が 1 : 5 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 0 b】濃度が 1 : 1 0 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 1 a】濃度が 1 : 1 5 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 1 b】濃度が 1 : 2 0 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 1 6 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 2 a】濃度が 1 : 1 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 4 3 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 2 b】濃度が 1 : 2 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 4 3 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 3 a】濃度が 1 : 5 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 4 3 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 3 b】濃度が 1 : 1 0 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 4 3 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 4 a】濃度が 1 : 1 5 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 4 3 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 4 b】濃度が 1 : 2 0 0 0 である場合の、単クローン性抗体 5 1 3 A 4 3 1 . 1 の交差反応性を示唆する、E L I S A アッセイの結果を示している。

【図 1 5】希釈せずに、または、P B S もしくは P B S + 3 % 脱脂乾燥乳で 1 : 1 に希釈してプレートにセットした、平均の E L I S A アッセイ吸光度読み取り値と、3 つの酵母

10

20

30

40

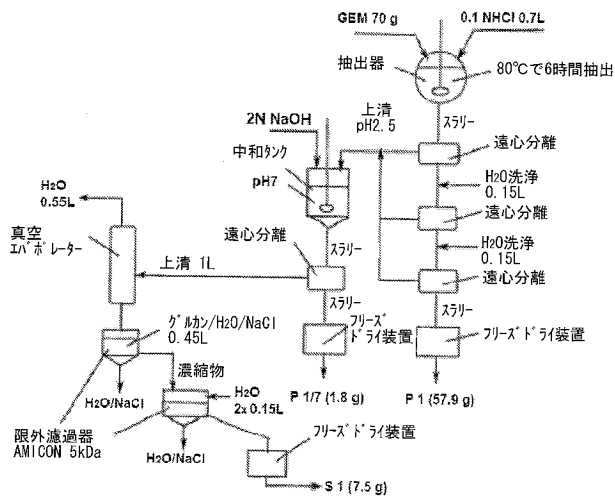
50

細胞壁抽出標準品の標準偏差とを示している（実施例6）。

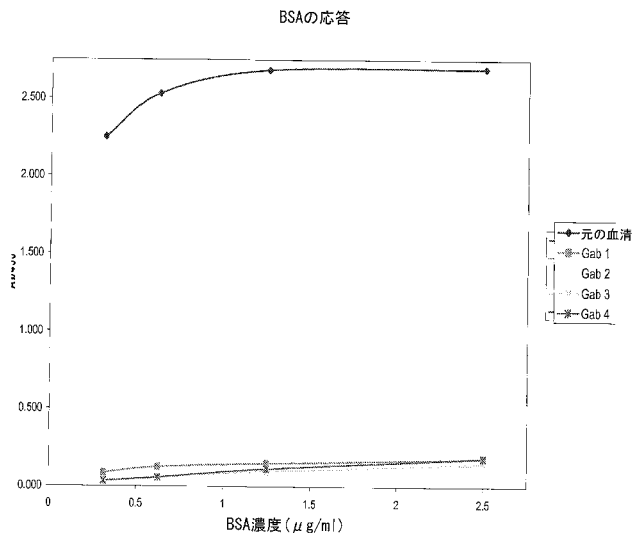
【図16】実施例6に記載のELISAマイクロプレート用コーティング時間および温度によって実施したインキュベーションについて、飼料抽出物の検量線のグラフを示している。

。

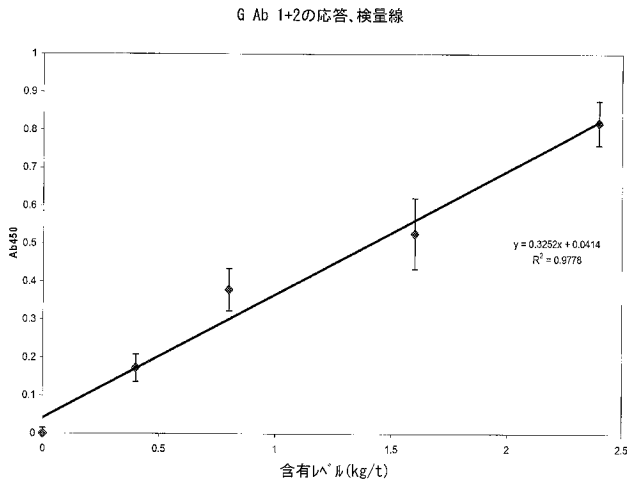
【図1】



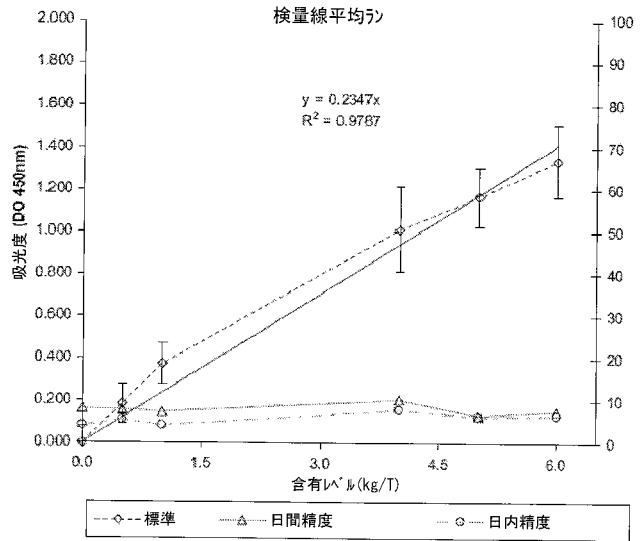
【図2】



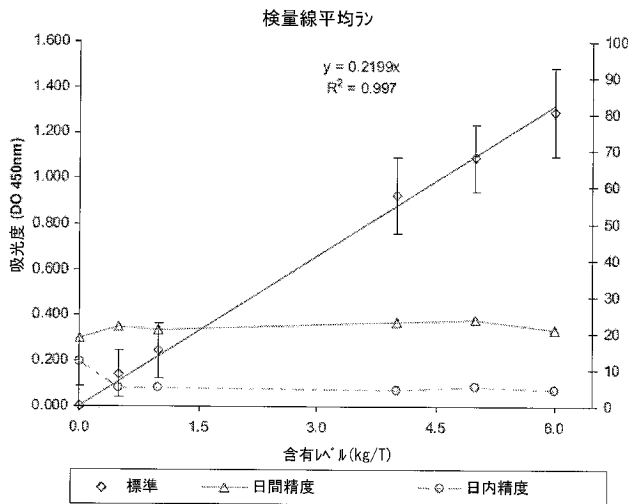
【 図 3 】



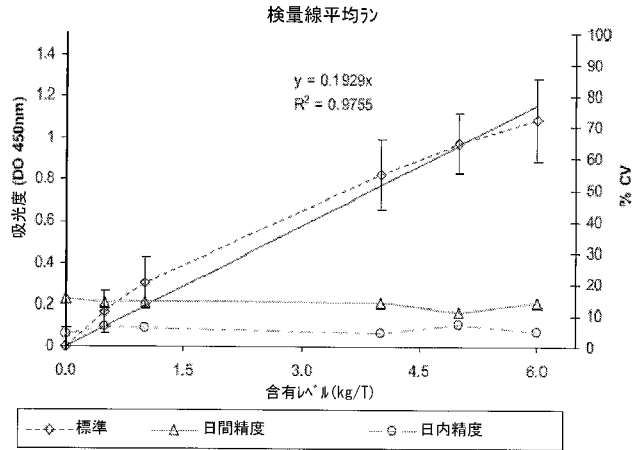
【 図 4 】



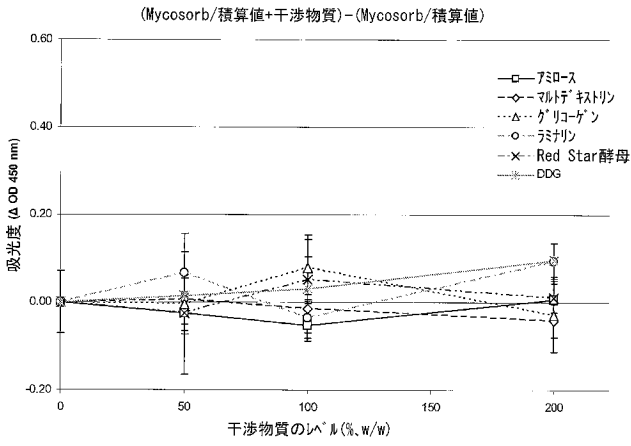
【 図 5 】



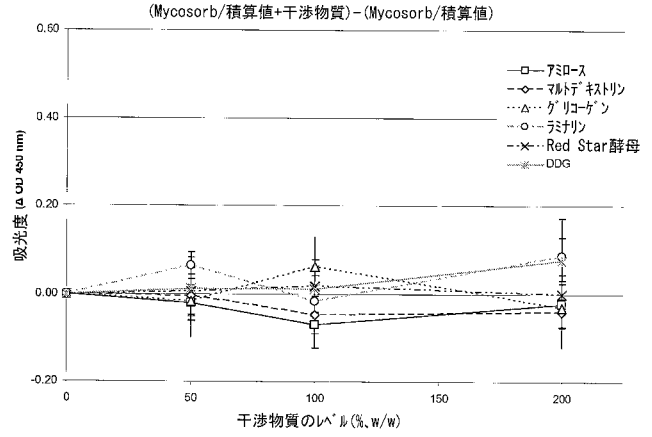
【 図 6 】



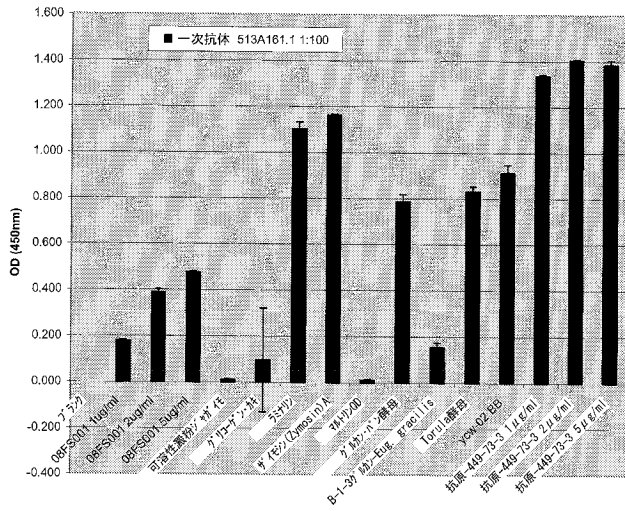
【 図 7 】



【 図 8 】

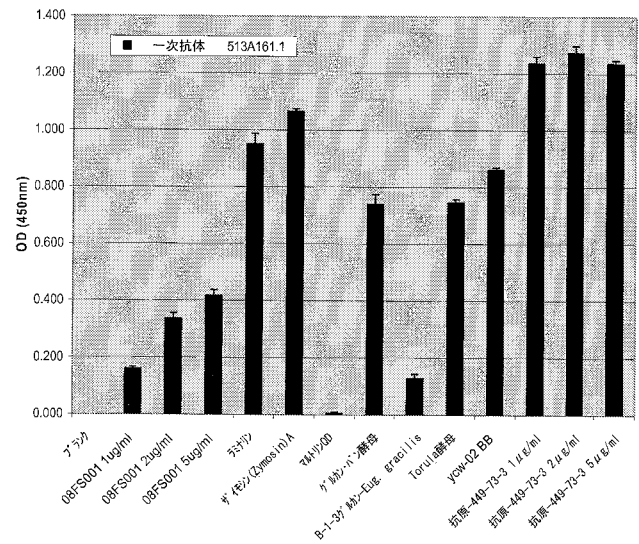


【 図 9 a 】



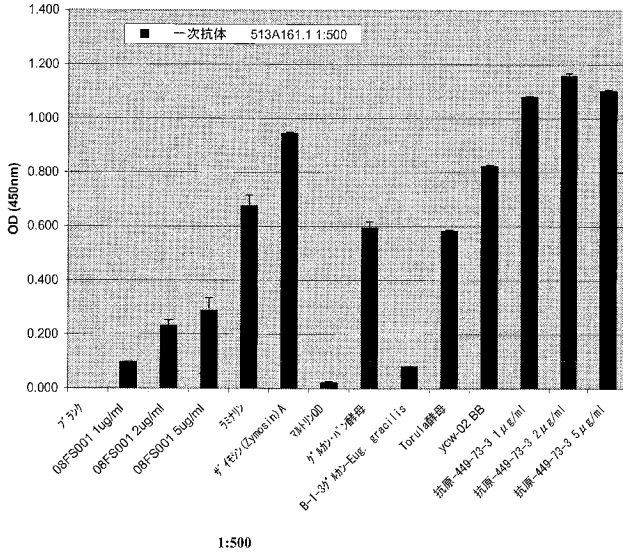
1:100

【 図 9 b 】

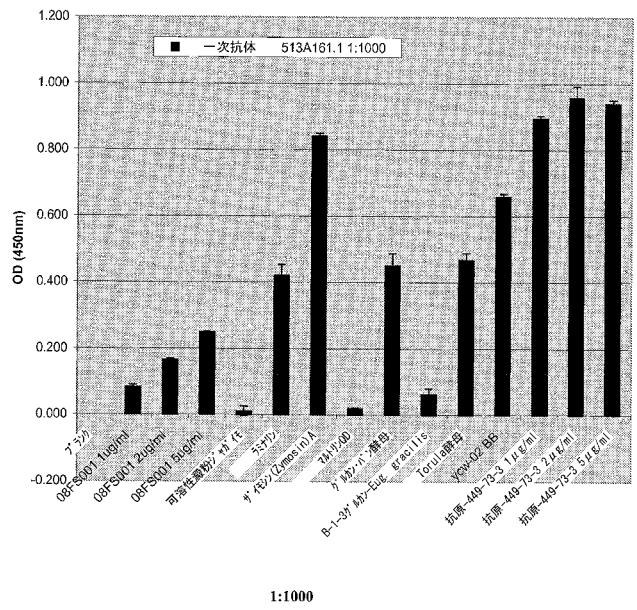


1:200

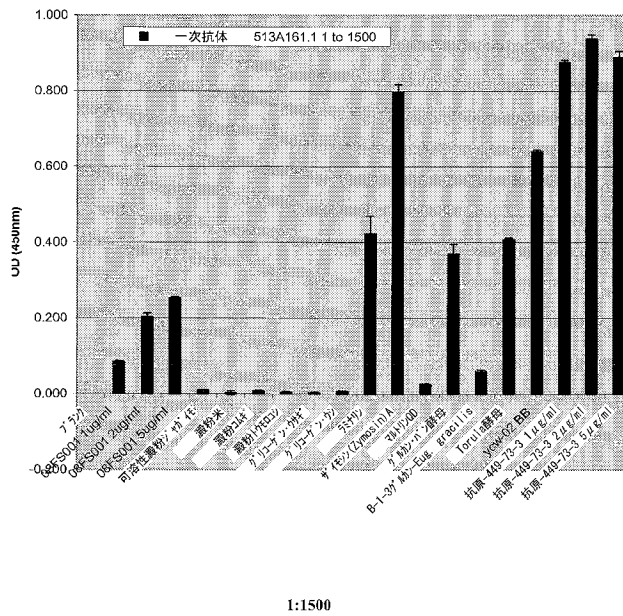
【 図 1 0 a 】



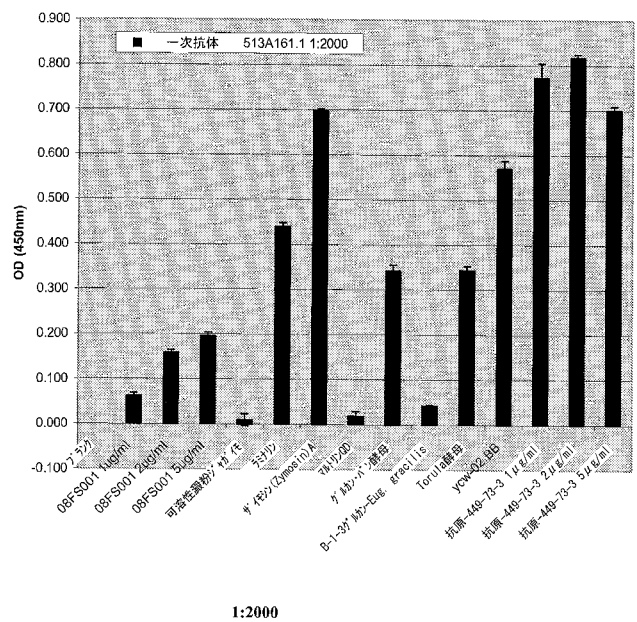
【 図 1 0 b 】



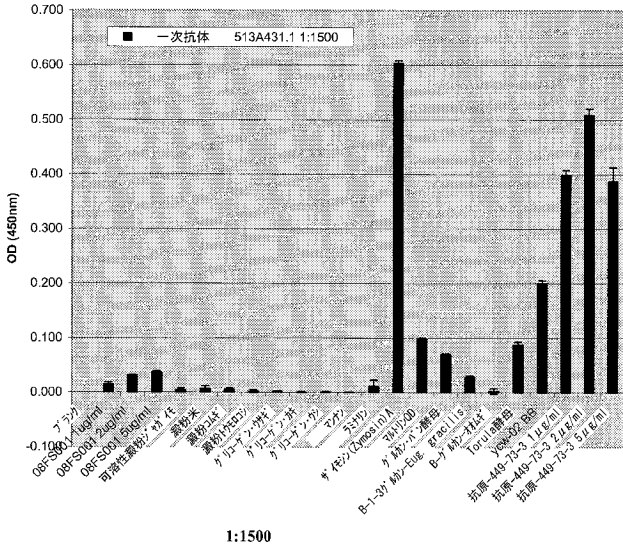
【 図 1 1 a 】



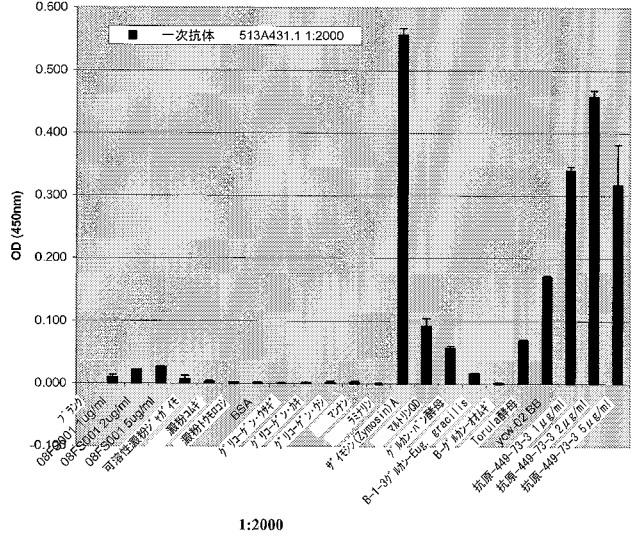
【 図 1 1 b 】



【 図 1 4 a 】

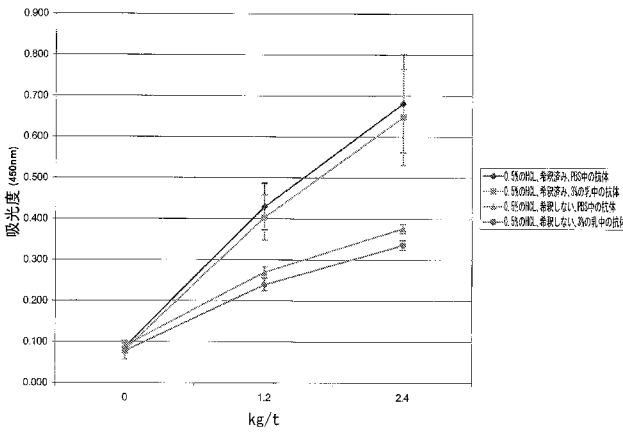


【 図 1 4 b 】



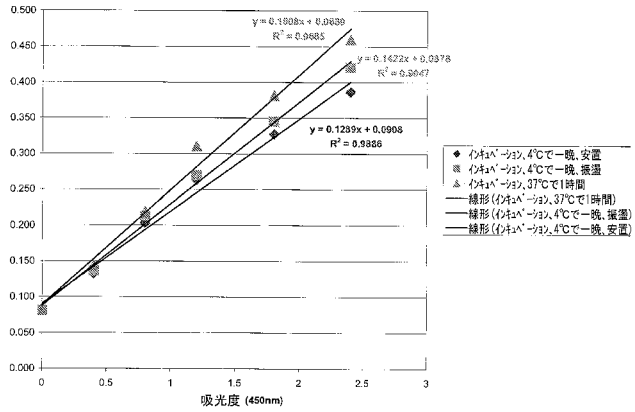
【 図 1 5 】

抗体希釈液の選択、および、抽出用溶液におけるpH値の変化



【 図 1 6 】

コニングの時間および温度のインキュベーションに対する最適化



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/36518
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53, A61K 31/716 (2011.01) USPC - 435/7.31, 514/54 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) USPC: 435/7.31, 514/54 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/7.31, 514/54; 435/7.2, 536/123.12, 536/124 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (PGPB, USPT, EPAB, JPAB); Google Scholar Search terms: animal feed additive, yeast cell wall extract, Saccharomyces cerevisiae, glucan, cell wall, detection, immunological detection, ELISA, antibody, monoclonal, beta-(1->6)-D-glucan, alpha-(1->4)-D-glucan		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----	KWIATKOWSKI et al., A Study of Saccharomyces cerevisiae Cell Wall Glucans. J Inst Brewing 2009, Vol 115, No 2, Pages 151-158. Especially pg 152 left col para 3 and right col para 2, pg 153 left col para 4 and right col para 3, pg 155 fig 4, pg 156 left col para 4-5 and right col, pg 156 fig 6.	1, 9-22, 31, 32, 34-42
Y	BRUSSAARD, Novel ingredients protect animals from mycotoxin. Feed Mix, 2008, Vol 16, No 2, Pages 22-25. Especially pg 23 right col para 2.	2-8, 23-30, 33, 43
Y	OHNO et al., Solubilization of yeast cell-wall beta-(1->3)-D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction. Carbohydr Res, 31 March 1999, Vol 316, No 1-4, Pages 161-72. Abstract only.	5-8
Y	ZEKOVIC et al., Mild Pfitzner-Moffat oxidation of the (1->3)-beta-D-glucan from Saccharomyces cerevisiae. Chemical Papers 2008, Vol 60, No 3, Pages 243-248. Abstract only.	23-30, 33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 26 July 2011 (26.07.2011)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">15 AUG 2011</div>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/39 (2006.01) A 6 1 K 39/00 H
 A 6 1 K 39/39

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ユイアニコリス, アレクサンドロス
 アメリカ合衆国, 4 0 5 1 3 ケンタッキー州, レキシントン, ダービー ランディング サーク
 ル 3 4 1 7

(72)発明者 シーレン, ウルスラ アン
 アメリカ合衆国, 4 0 5 0 3 ケンタッキー州, レキシントン, ストラットフォード ドライブ
 6 3 2

F ターム(参考) 2G052 AA33 AA40 AB17 EB11
 4B064 AF12 CA06 CB07 CD01 DA13
 4C085 AA03 AA38 BB24 EE01 EE06 FF13 FF24
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA50 FA71

专利名称(译)	酵母细胞壁成分及其检测		
公开(公告)号	JP2013532276A	公开(公告)日	2013-08-15
申请号	JP2013510349	申请日	2011-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	全面技术公司		
申请(专利权)人(译)	奥特奇公司		
[标]发明人	モーラン,コルム クファトコフスキステファン ユイアニコリスアレクサンドロス シーレンウルスラアン		
发明人	モーラン,コルム クファトコフスキ,ステファン ユイアニコリス,アレクサンドロス シーレン,ウルスラ アン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/28 C12P19/04 C07K16/14 A61K39/00 A61K39/39		
CPC分类号	C07K16/14 G01N33/56961 G01N2333/395 G01N2400/14 G01N2400/24		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/53.Y G01N1/28.J C12P19/04.A C07K16/14 A61K39/00.H A61K39/39		
F-TERM分类号	2G052/AA33 2G052/AA40 2G052/AB17 2G052/EB11 4B064/AF12 4B064/CA06 4B064/CB07 4B064/CD01 4B064/DA13 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BB24 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF13 4C085/FF24 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
优先权	61/334995 2010-05-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及动物饲料添加剂及其在饲料产品中的检测。另外，本发明涉及酵母细胞壁组分，它们的分离方法，以及用于其免疫学检测的组合物和方法。

ー性抗体を生成するための免疫化プロトコール

日	作業
0	準備、前採血、初回免疫
21	追加免疫
35	追加免疫
44~45	採血
49	追加免疫
58~59	採血
63	採血