

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7320353号  
(P7320353)

(45)発行日 令和5年8月3日(2023.8.3)

(24)登録日 令和5年7月26日(2023.7.26)

(51)国際特許分類 F I  
G 0 1 N 27/62 (2021.01) G 0 1 N 27/62 V  
G 0 1 N 33/68 (2006.01) G 0 1 N 33/68

請求項の数 19 (全32頁)

(21)出願番号	特願2018-561609(P2018-561609)	(73)特許権者	515026199 イン オーヴォ ホールディング ベスロ ーデン フェンノートシャップ オランダ, ライデン, ベストハイスラー ン 8
(86)(22)出願日	平成29年5月24日(2017.5.24)	(74)代理人	110000671 I B C 一番町弁理士法人
(65)公表番号	特表2019-518213(P2019-518213 A)	(72)発明者	ブルーインズ, ヴァウテル セバステ アーン オランダ, ライデン, シーノオー ベス トハイスラーン 8
(43)公表日	令和1年6月27日(2019.6.27)	(72)発明者	ストウツテルハイム, ヴィル マライン オランダ, ライデン, シーノオー ベス トハイスラーン 8
(86)国際出願番号	PCT/NL2017/050330	審査官	谷垣 圭二
(87)国際公開番号	WO2017/204636		
(87)国際公開日	平成29年11月30日(2017.11.30)		
審査請求日	令和2年5月21日(2020.5.21)		
(31)優先権主張番号	2016818		
(32)優先日	平成28年5月24日(2016.5.24)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	オランダ(NL)		
(31)優先権主張番号	2016819		
(32)優先日	平成28年5月24日(2016.5.24)		

最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 家禽性別を非破壊卵内決定するための方法およびシステム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ガルス・ガルス・ドメスティクス胚の特徴を卵内で非破壊的に特定するための方法であって、

(a) 前記胚を含む卵に関連する物質の試料を得ること、および

(b) 前記胚の特徴を示す前記試料中の少なくとも第1のバイオマーカーの存在および濃度のスコア値を測定すること、および

(c) (b) で得られた前記スコア値および前記濃度に閾値を適用し、前記バイオマーカーの存在および濃度に関連する前記胚の前記特徴を特定することを含み、

少なくとも第1のバイオマーカーが、140から190g/molまでの範囲中の分子量を有するアミノ化合物を含み、ステップ(c)が、

(i) 類似性尺度を使用して、各相関シグナルのスペクトラムを、相関する参照バイオマーカーの予想スペクトラムとマッチングして、少なくとも1つの正相関シグナルを規定することにより、各関連バイオマーカーシグナルを、前記参照バイオマーカーと相関させること、

(ii) 各正相関シグナルの強度を測定し、その絶対および/または相対シグナル強度をスコア化すること、および

(iii) 類似性関数から得られた前記スコア値に閾値を適用して、相関する胚特徴を決定することをさらに含み、

前記バイオマーカーの存在および濃度が、胚が雄成体へと発生する可能性が高いこと、

10

20

または雌成体へと発生する可能性が高いことに相関し、前記少なくとも第1のバイオマーカーが3-[ (2-アミノエチル)スルファニル]ブタン酸である、方法。

【請求項2】

尿膜腔液中の3-[ (2-アミノエチル)スルファニル]ブタン酸の濃度が、7、8、または9日目に50 ng/ml以上の量であることが、雌胚と相関し、前記バイオマーカーが50 ng/ml未満で存在することが、雄胚と相関する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

少なくとも第1および第2のバイオマーカーが検出および分析され、前記少なくとも第1および第2のバイオマーカーの絶対量および相対量を使用して、1つまたは複数の特徴が決定される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

選択される特徴が、胚が十分に成長して孵化を達成する成育能または成育不能の可能性である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

選択される特徴が、胚が孵卵条件下で孵化へと進行するのに必要である可能性が高い発生段階および時間の経過予想である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

磁気共鳴画像法、スペクトル共鳴法、1つまたは複数の好適な検出器と接続された分析クロマトグラフ法、蛍光分光法、および/または前記1つもしくは複数のバイオマーカーの存在および濃度を測定するためのバイオマーカー選択的試薬を含むアッセイ法の1つまたは複数を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

質量分光分析が、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析法、または表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型(SELDI-TOF)質量分析法、SPE/MS/MS、LDTD(レーザーダイオード熱脱離)イオン源、および/またはイオン移動度センサー(IMS)を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記試料が、分析前に処理される、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記処理が、固相抽出(SPE)、ガスクロマトグラフィー、単相または多相高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)による試料分離を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

参照バイオマーカーの1つまたは複数の内部標準物質が、質量分析法による分析の前に、前記試料に添加される、請求項7～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記絶対シグナル強度が、バイオマーカーシグナル強度を測定し、それを1つまたは複数の既知内部標準物質のシグナル強度と比較することによりスコア化される、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

多数の卵が、1つまたは複数の胚特徴について検査される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

完全に自動化されている、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

卵中の胚が成育可能であり雄であるかまたは成育可能で雌であるかまたは成育不能であるかを決定すること、ならびに多数の成育可能な雄卵と多数の成育可能な雌卵と1つまたは複数の成育不能な卵とを分離することをさらに含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

10

20

30

40

50

前記胚が孵化する可能性が高いと考えられる時間により成育可能な卵を選別することをさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

特定の特徴を有する卵生種の幼体を選択的に孵卵するためのプロセスであって、

- a . 前記種から多数の卵を準備すること、および
- b . 前記卵を請求項 1 ~ 1 5 に記載の方法に供して、前記胚の特徴を決定すること、および
- c . 所望の特徴を有する卵を選択して、選択された多数の卵を形成すること、および
- d . 前記幼体の 1 つまたは複数が孵化するまで、前記選択された卵を孵卵することを含むプロセス。

10

【請求項 1 7】

前記試料中の前記少なくとも 1 つのバイオマーカーのより高いかまたはより低い濃度が、選択結果を示す、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記少なくとも 1 つのバイオマーカーの濃度が、対象が雄または雌である可能性が高いことを示す、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】

動物および/もしくはヒトの食料生産のための、化粧用、医療用、および/もしくは栄養用化合物の生産および/もしくは単離のための、発酵によるメタン生産のための、ワクチン生産のための、ならびに/または高品質肥料生産のための、請求項 1 ~ 1 5、1 7 および 1 8 のいずれか一項に記載の方法を用いて卵を取得する使用方法であって、前記卵を取得することは、雄成体または雌成体へと発育する可能性があるとして特定された胚のいずれかを含む卵を選択して、卵選択群を得、前記卵選択群を使用することを含む、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、オビパリアン ( o v i p a r i a n ) 種、特にトリ種、より詳細にはガルス・ガルス ( G a l l u s G a l l u s ) 種の性別を卵内で非破壊決定するためのプロセスに関する。本プロセスは、雄卵および雌卵を選択すること、およびそれら選択した卵を使用して生動物の群を生産することに関する。

30

【0 0 0 2】

卵生 ( o v i p a r o u s ) 動物は卵を産み、母親内での他の胚発生は、ほとんどまたはまったくない。オビパリアン動物およびそれらの卵の養殖飼育は、世界的なタンパク質供給のかつてなく増え続ける部分、ならびにワクチンの生産などの種々の他の大規模工業プロセスをまかなっている。現在、オビパリアン動物の養殖飼育の最も重要なプロセスは、家禽などのトリ種の飼育、ならびに水産養殖、つまり魚類、甲殻類、および軟体類などの水生生物の養殖を含む。特に家禽、より詳しくは、つまりガルス・ガルス・ドメスティクス ( G a l l u s G a l l u s D o m e s t i c u s ) 種のセキショクヤケイは、世界で最も飼育されているオビパリアン種である。

【背景技術】

40

【0 0 0 3】

受精鶏卵は、ほぼ等しい配分の雄および雌動物をもたらす傾向がある。しかしながら、種々の理由により、孵卵場での管理では、種々の特性、特に性別に基づいて動物を分離することが望ましい場合がある。商業的家畜ニワトリおよび卵生産では、例えば、雄ヒナの孵卵および飼育は、非常に望ましくないものであり、毎年、何十億羽もの雄ヒナの間引きに結び付いている。

【0 0 0 4】

現在、いずれの場合でも、孵化したヒナの混合集団は、若年動物を、若年時に好適な形質がない場合は時にはさらに成体集団を視覚的に評価することによる雌雄鑑別かけられる。いずれにしても、それは、非常に時間のかかるプロセスであり、高度に熟練した作業

50

者を必要とし、典型的には、動物にとって非常にストレスがかかるものである。

【 0 0 0 5 】

またさらに、商業的卵生産では、雄ヒナの孵卵および飼育は、非常に望ましくないものであり、毎年、何十億羽もの雄ヒナの間引きに結び付いている。さらに、ある割合の卵は、未受精であるか、または孵卵期間の開始時に成育可能な胚を含まず、孵卵場での孵卵能力が大幅に低減される。

【 0 0 0 6 】

また、成体動物が雄雌鑑別される場合、集団全体を最低限の年齢まで飼育する必要があり、そのように飼育された動物の半分のみが、分離後に繁殖に使用される。例えば雄集団が存在すると、例えば共食いおよび飼育密度の低減による生産性低減がもたらされる場合

10

【 0 0 0 7 】

さらに、ある割合の卵は、未受精であるか、または孵卵期間の開始時に成育可能な胚を含まず、特に家禽卵の場合は孵卵場で使用される孵卵器の収容能力が大幅に低減される。

【 0 0 0 8 】

その結果、主に雄胚のみまたは雌胚のみの選択を可能にする初期性別選択が利用可能である場合に必要とされるものよりも少なくとも2倍の孵卵能力が必要とされる。

【 0 0 0 9 】

したがって、孵卵期前にトリ胚の性別決定を可能にし、また孵卵場収容能力の著しい増加を可能にする初期段階法が利用可能であれば、必要とされるエネルギーおよび他の資源の量が低減されるため環境にとって非常に有益であるだけでなく、同様に間引きされる不必要な動物をなくするために非常に有益であり、また新たに孵化した動物のストレスを低減するために非常に有益であろう。また、その方法が、未受精および/またはそうでなければ成育不能な胚から、成育可能な胚を選択することを可能にし、孵化プロセスの効率をさらに増加させることが可能であれば、さらに有益であろう。

20

【 0 0 1 0 】

文献には、卵のある代謝物質を検出することにより、例えば、NMR分光法により、例えば、Y. Fengら、Appl. Magn. Reson. (2007年)、32巻、257~268頁; HPLC解析により、Gu D.-Cら、Chinese Journal of Animal Science、7巻、23~25頁を参照)、および定量蛍光顕微鏡法を可能にするバイオマーカーと標的分子との特異的結合を使用することにより、例えば、マーカーとしてのエストロゲンステロイド化合物の存在を決定する場合は国際公開第2006/124456号を参照することにより、トリ胚の性別を決定することに関する種々の方法が開示されている。なお、一般的には、ステロイドは、かなり大きな分子であり、容易に揮発(volatize)しない。

30

【 0 0 1 1 】

本明細書の上記で言及されているほとんどの方法の欠点は、大量の代謝物質が必要であり、試料を採取すると胚の生存および十分な発生が可能でなくなってしまう場合があるため、ニワトリ性別の非破壊決定を可能することができないことである。また、こうした方法は、商業的ニワトリ飼育に適切な処理量の提供は言うまでもなく、コストまたは複雑さのため、養鶏場では典型的には使用されない装置の使用を必要とする。

40

【 0 0 1 2 】

国際公開第2014/021715号には、卵中のトリ胚の性別、発生段階、および/または成育能を非破壊決定するためのプロセスであって、(a)卵中の糖および/またはアミノ酸、それらの前駆体および代謝物質から選択される少なくとも第1の発生マーカー化合物を、卵の孵卵の開始時から孵化までの期間に検出すること、(b)少なくとも第1の検出された発生マーカー化合物の量を検出すること、および(c)その量を、雄および雌の胚の発生段階、ならびに/または生胚および死亡胚もしくは非発生胚で確立された基線と比較して、胚が成育可能であるか否かを、雄もしくは雌であるかを、および/または胚の発生段階を決定することを含む方法が開示されている。この開示されている方法は、

50

胚の性別、年齢、および発生段階の決定には非常に有用であるが、定量的測度方法の幾つかは感度が低いため、比較的より大量の試料が必要とされる。また、例えば、核共鳴法またはラマン分光法を含むスペクトル共鳴法を使用する自動化法の幾つかは、リアルタイム連続孵化プロセスで実施することが難しい。他の方法は、迅速ではあるが、比較的高価な装置の存在、および/または特定のバイオマーカー分子のための蛍光マーカーなどの特殊な化学薬品の使用を必要とする。

【0013】

したがって、オビパリアン動物胚の性別ならびに発生段階および/または成育能を非破壊決定するための、より迅速でより高感度な方法が依然として必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【文献】国際公開第2006/124456号

国際公開第2014/021715号

【非特許文献】

【0015】

【文献】Y. Fengら、Appl. Magn. Reson. (2007年)、32巻、257~268頁

Gu D.-Cら、Chinese Journal of Animal Science、7巻、23~25頁

【発明の概要】

【0016】

したがって、本発明の目的は、ガルス・ガルス・ドメスティクス胚の特徴を卵内で非破壊的に特定するための方法であって、

(a) 胚を含む卵に関連する物質の試料を得ること、および

(b) 胚の特徴を示す試料中の少なくとも第1のバイオマーカーの存在および濃度に関するスコア値を測定すること、および

(c) (b) で得られたスコア値および量に閾値を適用し、バイオマーカーの存在および濃度に関連する胚の特徴を特定することを含み、

少なくとも第1のバイオマーカーが、140から190 g / モルまでの範囲の分子量を有するアミノ化合物を含み、バイオマーカーの存在および濃度が、胚が雄成体または雌成体へと発育する可能性に相関する方法を提供することである。

【0017】

さらなる目的は、孵卵場または水産養殖場などの遠隔地で、卵のリアルタイムオンライン分析を実施することが可能なシステムを提供することである。これらおよび他の目的は、本発明の装置およびプロセスにより取り込まれる。

【0018】

さらなる態様では、主題のプロセスは、多数の成育可能な雌卵に関し、雄卵が圧倒的に多い選択群または雌卵が圧倒的に多い選択群を形成する。またさらなる態様では、主題のプロセスは、本発明による方法によって得ることができる若年動物集団にも関する。またさらなる態様では、主題のプロセスは、動物および/もしくはヒト食料生産のための、化粧用、医療用、および/もしくは栄養用化合物の生産および/もしくは単離のための、発酵によるメタン生産のための、ワクチン生産のための、ならびに/または高品質肥料生産のための、本プロセスから得ることができる多数の卵の使用にも関する。

【0019】

またさらなる態様では、主題のプロセスは、主題の方法を実施するための好ましくは完全に自動化された装置を含む、オビパリアン動物胚性別検出および分析システムにも関する。

【0020】

また、本発明は、性別識別機能が、分光システムと接続されている電子デバイスのソフ

10

20

30

40

50

トウェアに実装されており、識別機能が、好ましくはコンピューターに内在するソフトウェア手段を含むシステムに関する。

【0021】

ここでは、本発明の好ましい実施形態が示されている添付の図面を参照して、本発明をより完全に以下の通り説明する。しかしながら、本発明は、多数の異なる形態で使用することができ、本明細書に示されている実施形態に限定されると解釈されるべきではなく、むしろそうした実施形態は、本開示が十分および完全となり、本発明の範囲を当業者に十分に伝達することになるように提供されている。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1Aは、単一特徴に関するロジスティック回帰分類モデルであり、単一特徴は、3-[ (2-アミノエチル)スルファニル]ブタン酸の濃度であり、性別予想の正確性は、90%よりも高いことを示す図である。図1Bは、2つの特徴に関するロジスティック回帰であり、ロジスティック回帰モデルを2つのバイオマーカーに適用すると、10日目から正確性を>95%に増加させることができることを示す図である。

【図2】連続試験自動化ハイスルーブット試験における、本発明によるバイオマーカーのLDPDスペクトルを示す図である。本方法は、個々の試料1つ当たり10秒未満で、バイオマーカーの存在を測定するだけでなく、絶対濃度も測定することが可能である。

【図3】雄（暗灰色）および雌（明灰色）試料から850秒で抽出された、220から145までの範囲の種々の質量ピークを有する化合物のクロマトグラムを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

別様に定義されていない限り、本明細書で使用される技術的および科学的用語はすべて、本発明が属する当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本発明を説明するために本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を記載するためのものであり、本発明を限定することは意図されていない。

【0024】

「トリ」および「鳥」という用語は、本明細書で使用される場合、任意のトリ種の雄または雌を含むが、主に、卵または肉のために商業的に飼育される家禽を包含することが意図されている。したがって、「鳥」および「トリ」という用語は、特に、セキショクヤケイ、ハイロヤケイ、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、ハト、ダチョウ、エミュー、およびキジを包含することが意図されている。

【0025】

「孵卵」という用語は、鳥が卵を孵化させるプロセス、および雌鳥の管を出た後の卵内部での胚発生を指す。孵卵期間は、本明細書では、特定の卵を、孵化するまで、つまり鳥が出現するまで、鳥の発生が停止しない限り、任意の取り扱いまたは例えば孵卵器から孵卵場ユニットへの移動を含む、抱卵を模倣する条件に置いておく連続した期間を指す。

【0026】

「卵内」という用語は、本明細書で使用される場合、孵化前の卵内部に含まれている胚を指す。本発明は、これらに限定されないが、（家畜化）ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、およびキジ卵を含む、任意のタイプの鳥で実施することができる。

【0027】

本明細書では、「注入」および「注入する」という用語は、卵もしくは胚内に物質を送達もしくは放出するための方法、卵もしくは胚から物質（つまり試料）を取り出すための方法、および/または卵もしくは胚内に検出器デバイスを挿入するための方法を含む、卵もしくは胚内にデバイス（典型的には細長いデバイス）を挿入するための方法を包含する。

【0028】

本明細書では、「質量分光分析法」という用語は、質量に基づいてイオンを選別する分析技法を指す。質量分光分析法は、典型的には、多数の状況下で化学分析に使用されてお

10

20

30

40

50

り、石油の複雑な混合物から遺伝子工学の産物まで、任意の試料に適用することができる。簡単に言えば、質量スペクトルは、試料の正確な化学的組成の全体像をもたらすことになる。

【0029】

本出願は、第1の態様では、140から190 g / モルまでの、好ましくは150から170 g / モルまでの範囲の分子量を有する1つまたは複数のアミノ化合物の決定に関する。

【0030】

本出願人らは、驚くべきことに、特定の代謝物質、エチオニンの構造異性体が、胚が雄または雌幼体のいずれに発生することになるかを示すことを見出した。好ましくは、バイオマーカー化合物は、式  $R^3SCR^1HCR^2HCOOH$  (I) またはその構造異性体であり、式中、好ましくは、 $R^1$  は、 $CH_3$ 、 $H$ 、 $NH_2$  を表し、 $R^2$  は、 $CH_3$ 、 $H$ 、 $NH_2$  を表し、 $R^3$  は、 $-(CH_2)_2-NH_2$  を表わす。より好ましくは、バイオマーカー化合物は、式  $C_6H_{13}NO_2S$  である。より好ましくは、バイオマーカー化合物は、有利にはこれらに限定されないが、4 - (メチルスルファニル) イソパリン、4 - (メチルスルファニル) イソパリン (2 - アミノ - 2 - メチル - 4 - (メチルスルファニル) ブタン酸としても知られている)、N - またはイソプロピルシステイン、3 - (メチル - スルファニル) パリン、4 - (メチルスルファニル) パリン、3 - メチル - 3 - スルファニル - イソパリン、4 - (メチルスルファニル) イソパリン、2 - アミノ - 3 - メチル - 4 - メチルスルファニル - 酪酸、5 - (メチルスルファニル) ノルパリン、2 - アミノ - 3 - メチル - 3 - スルファニルペンタン酸、メチル 3 - スルファニル - パリナート、メチルスルホニウムメチオニン、N - メチル - D - メチオニン、または 5 - アミノ - 6 - スルファニルヘキサン酸などを含む、2 - アミノ - 4 - エチルスルファニルブタン酸 (エチオニンとも呼ばれる) またはその構造異性体などのアミノ酸から選択され; メチル 2 - アミノ - 4 - メチルスルファニル) ブタノアート (メチルメチオニナートとしても知られている) またはその構造異性体、例えば、エチルメチル - システイナート、イソプロピル - システイナート、N - プロピルシステイナート、または 2 - [(2 - ヒドロキシ - エチル) スルファニル] - N - メチルプロパンアミドなどの関連化合物、エチルホモシステイナート、2 - イソプロピル - 1, 2 - チアゾリジン 1, 1 - ジオキシド、1 - アミノ - 2, 2 - ジエトキシエタン - 1 - チオン、

3 - [(2 - ヒドロキシエチル) スルファニル] - N - メチルプロパンアミド、プロピル 2 - アミノ - 3 - スルファニルプロパノアート、2 - (メチルアミノ) - 4 - (メチルスルファニル) ブタン酸、2 - [(2 - アミノエチル) スルファニル] - 2 - メチルプロパン酸、3 - [(2 - アミノエチル) スルファニル] - 2 - メチルプロパン酸、3 - [(2 - アミノエチル) スルファニル] ブタン酸、4 - [(2 - アミノエチル) スルファニル] ブタン酸、2 - アミノ - 3 - (プロピルスルファニル) プロパン酸、2 - アミノ - 3 - (プロパン - 2 - イルスルファニル) プロパン酸、および 3 - [(2 - アミノエチル) スルファニル] ブタン酸などのアミノ酸エステルから選択することができる。化合物または異性体は、ラセミであってもよく、またはエナンチオマーもしくは立体異性体を好適な比および量で含んでいてもよい。

【0031】

好ましくは、本化合物は、分子式  $C_6H_{13}NO_2S$  および 163.0690 のモノアイソトピック質量  $M_W$  を有する。現在、本化合物は、以下の一般式 I による構造を有する (3 - [(2 - アミノエチル) スルファニル] ブタン酸) と特定されていると考えられる。

【0032】

10

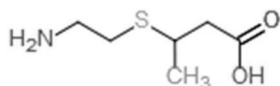
20

30

40

50

## 【化1】



(I)

## 【0033】

本出願人らは、非タンパク新生アミノ酸であるとみなすことができる化合物(I)またはその構造異性体の、孵卵期間中の尿膜腔液中の濃度を使用して、卵中の胚の性別を非常に高い確実性で有利に決定することができることを見出した。さらなる利益として、このバイオマーカーは、抽出および/または揮発が比較的容易であり、したがって、例えばステロイド化合物と比較して比較的容易に分析することができる。

10

## 【0034】

ステップ(a)は、胚を含む卵に関連する物質の試料を得ることを含む。

## 【0035】

本発明の実施形態による方法および装置は、その孵卵期間とも呼ばれる胚発生期間中の任意の時点で卵の1つまたは複数の特徴を特定するために使用することができる。本発明の実施形態は、胚発生期間中の特定の日に限定されない。

## 【0036】

本発明によるプロセスは、好ましくは、(a1)卵流体を含む試料を準備すること、および(a2)試料からスペクトラムを得ることを含む。任意選択のステップ(a3)では、好ましくは、限外ろ過または遠心分離などの好適な方法により、試料から濁りが除去される。上記に記載されているように、侵襲的な方法では、試料を直接的に採取し、試料採取した流体を分析に供することが可能であるが、好ましくは、本分析は、そのような分析方法が効率的であるため、ならびに卵殻およびその中の膜が無孔のままであるという事実のため、非侵襲的に実施される。任意の好適な方法を使用して、そのような非侵襲的分析を実施することができる。

20

## 【0037】

非侵襲的方法が使用される場合、本明細書中の「流体」という用語は、卵殻を穿孔せずに卵から取り出すことができる揮発性化合物を指す場合がある。これは、任意選択で卵をわずかに減圧力下の検出チャンパーに設置することにより、および放出された揮発性化合物を好適な識別および定量方法に供することにより、有利に実施することができる。その場合、イオン移動度分光計(Ion Mobility Sensor, IMS)を使用することを含む、上記で引用した質量分析(MS)法を適用してもよい。

30

## 【0038】

分析が侵襲的に実施される場合、これは、典型的には、卵物質の試料を抽出することを含む。試料は、胚に対して最も有害ではない可能性が高いため、好ましくは胚流体から、トリ種の場合は好ましくは尿膜腔液から採取される。尿膜腔液は、典型的には、トリ胚の窒素含有代謝物質の排泄媒体である。

## 【0039】

卵の貫通および卵物質の侵略的試料採取に好適な方法および装置は、例えば、米国特許出願公開第20070137577号、国際公開第00/22921号、または国際公開第99/34667号に開示されている。その後、このように得られた試料は、好ましくは、発生マーカーの検出、ならびに存在する発生マーカーの相対量および/または絶対量の分析を可能にするための好適なプロトコールに供される。

40

## 【0040】

尿膜腔液は、Hamburger, VおよびHamilton, HL(1951年)、「A series of normal stages in the development of the chick embryo」、Journal of Morphology、88巻(1号):49~92頁に記載されているように、孵卵の3日目頃に生

50

じ始める。この文献には、尿膜は、短い厚壁ポケットとして孵卵の65時間後に識別可能であったが、まだ小胞にはなっていないことが示されている。72時間後、尿膜は、平均して中脳の大きさの、大きさが様々な小胞だった。これは、尿膜および尿膜腔液が、3日目時点で存在することを示す。したがって、尿膜腔液を検査する場合、本方法は、3日目時点で適用することができる。

【0041】

尿膜は、孵卵の約13日目に最大容積に到達し、その後容積は、水分喪失および流体再吸収により孵卵が進行すると共に減少するが、かなり容積が孵卵の18日目に依然として存在する。

【0042】

尿膜腔液は、内殻膜および外殻膜ならびに漿尿膜により卵殻から分離されている。尿膜腔液は、有胚卵の周囲全体を取り囲んでいるが、典型的には、卵最上部の気室を覆う膜の真下に蓄積する。

【0043】

卵の最上部に尿膜腔液が蓄積するのは、重力、ならびに高密度の胚および卵黄嚢による押出しによるものである。卵が直立している間に、卵の最上部から尿膜腔液の正確な試料採取を試みることは、空気空間が卵毎に様々であるため困難な場合がある。重力を使用して、局所部位の尿膜腔液をプールすることができる。卵をその縦軸で回転させると、尿膜腔液は、卵の最上部側の殻の真下にプールされることになるだろう。尿膜腔液は、卵をその縦軸に沿って配置することにより試料の抽出に有用となる。

【0044】

尿膜腔液などの物質の卵からの抽出は、卵殻を貫通し、試料採取カニューレトラフを膜から挿入することを含む、種々の方法で実施することができる。その後、試料採取しようとする流体の試料を回収し、膜および/または殻を好適な封止材で能動的に密封するか、または自然に密封されることを可能にする。

【0045】

上記で述べられているように、任意の好適な方法を使用して、非侵襲的分析を実施することができる。本発明の異なる好ましい実施形態では、本非侵襲的方法は、好適な分析装置と接続されている固相マイクロ抽出(SPME)を含んでもよい。SPMEは、液相または気相であってもよい異なる種類の媒体から異なる種類の分析物(揮発物および非揮発物を両方とも含む)を抽出する、液体(ポリマー)または固形物(吸着剤)であってもよい抽出相でコーティングされているファイバーを使用することを含む固相抽出試料採取技法を指す。ファイバーにより抽出される分析物の量は、平衡に到達している限り、または短時間前平衡の場合には対流または攪拌の支援により、試料中のその濃度と均衡している。この技法は、好ましくは、揮発物を直接測定できるようにIMSと組み合わせてもよい。

【0046】

幾つかの刊行物、例えば、米国特許出願公開第2011/144473号および米国特許第7950349号には、非侵襲的方法の使用が一般的に開示されているが、これら刊行物には、全体的な発光スペクトルが漠然と記載されているに過ぎず、実際には胚の性別を選択することは可能ではない。本プロセスは、特に、卵中の特定成分の存在が決定される点で、こうした開示されている方法とは異なり、この決定は、1つまたは複数の発生マーカー化合物の絶対量および相対量を選択的に求めることを可能にする二次微分スペクトルを使用することにより有利に実施することができる。

【0047】

雄胚および雌胚を含む卵は、化学的組成が分子レベルで異なる。肉眼的レベルでは、胚は、大きさ、形状、および細胞形態も異なる。

【0048】

本プロセスは、有利には、胚の性別を決定することを可能にする。好ましくは、決定は、好ましくは卵の孵卵開始後の6から12日までの期間にステップa)を実施するなど、

10

20

30

40

50

孵卵の開始後の1から15日まで、より好ましくは2から14まで、さらにより好ましくは3から13まで、およびさらにより好ましくは4から12日までの期間に実施される。

【0049】

これにより、成育可能でないかおよび/または所望の性別でないかのいずれかである卵の孵卵に伴うコストを回避することが可能になる。さらに、卵の実際の発生段階を決定することができる。家畜化ニワトリの孵卵時間よりも短いまたは長い孵卵時間を有する種の場合、それに応じて好適に他の期間を適用することができる。

【0050】

試料は、任意の目的の生物学的物質であってもよいが、生物学的組織および好ましくは血液または血漿などの生物学的流体であることが有利である。

【0051】

ステップ(b)は、胚の特徴を示す試料中の少なくとも第1のバイオマーカの存在および濃度のスコア値を測定することを含む。

【0052】

本発明の方法は、観察された質量シグナルと、既知のバイオマーカの参照質量およびスペクトルとの相関性に依存する。参照データは、好ましくはコンピューターサーバーに保存されており、それにより、手順全体をコンピューター制御下で実施することが可能になる。シグナルは、例えば、本明細書に記載の計算機能を使用して比較することにより、参照標準物質と関連される。

【0053】

好ましくは、シグナルは、類似性の閾値レベルが達成されるか否かにより「陽性」または「陰性」であると特徴付けられる。本プロセスでは、陰性であり、類似性の閾値レベルを達成しないシグナルは破棄されるが、陽性であり、バイオマーカと一致するシグナルは、生物学的試料にそのバイオマーカが存在するという診断をもたらす。

【0054】

標準物質を用いた実施の場合、バイオマーカシグナルのスコアは、試料中に存在するバイオマーカのシグナルと、試料に添加された内部標準物質との比により算出することができる。複数のバイオマーカを、同様に分析して、最終スコアファクターを得ることができる。

【0055】

好ましくは、質量分光分析法による分析の前に、原子タグで標識された参照バイオマーカの1つまたは複数の内部標準物質が、試料に添加される。これにより、バイオマーカシグナル強度を測定し、それを1つまたは複数の既知内部標準物質のシグナル強度と比較することにより、絶対シグナル強度を決定およびスコア化することが可能になる。そのような標準物質を例えば同位体で標識すると、アッセイ読出しが、絶対的定量化の点で高度に正確ならびに有利になり得る。スクリーニングの較正手順に組み込むと、試料中の絶対的バイオマーカレベルの測定が可能になるだろう。

【0056】

本発明の方法は、好ましくは、内部標準物質を使用して、シグナル強度を定量化するための参照を提供する標準物質を使用する様式、およびそのような標準物質を用いない様式の、2つの様式で実施することができる。したがって、1つの実施形態では、質量分析法による分析の前に、1つまたは複数の内部標準物質が、試料に添加される。好ましくは、内部標準物質は、標識されている。有利には、その後、バイオマーカシグナル強度を測定し、それを1つまたは複数の既知内部標準物質のシグナル強度と比較することにより、各バイオマーカシグナルの絶対シグナル強度をスコア化することができる。代替的な実施では、試料は、内部標準物質を添加せずに処理される。そのような実施形態では、試料中の個々のバイオマーカシグナル強度と、試料群の参照シグナル強度との比を測定することにより、相対シグナル強度がスコア化される。

【0057】

好ましくは、選択される特徴は、孵化するために十分な成長を達成する胚の成育能また

10

20

30

40

50

は成育不能の可能性であってもよい。さらに好ましい選択される特徴は、胚が孵卵条件下で孵化へと進行するのに必要である可能性が高い発生段階および時間の経過予想である。好ましくは、本方法は、磁気共鳴画像法、スペクトル共鳴法、1つまたは複数の好適な検出器と接続された分析クロマトグラフ法、蛍光分光法、および/またはバイオマーカー選択的試薬を含むアッセイ法の1つまたは複数を含む。

【0058】

1つまたは複数のバイオマーカーの識別および定量化は、任意の好適な方法により実施することができる。有利には、これは、核共鳴法を含む磁気共鳴画像法、UV/VIS、赤外線、またはラマン分光法を含むスペクトル共鳴法、好適な検出器と接続されたGCまたはHPLCなどの分析方法、蛍光分光法、ディップスティック法の使用などの湿式および乾式法を含む酵素結合免疫吸着測定法、ならびに適切に準備された選択的アプタマーまたは同様の選択的試薬の使用により実施することができる。

10

【0059】

典型的には、好ましくは、卵中に存在する発生マーカーの存在ならびに絶対量および/または相対量を決定するために二次スペクトルが使用される、赤外線またはラマン分光法を含む定量的スペクトル共鳴法も利用することができる。幾つかの刊行物、例えば、米国特許出願公開第2011/144473号および米国特許第7950349号には、非侵襲的方法の使用が開示されているが、これら刊行物には、全体的な発光スペクトルが漠然と記載されているに過ぎず、実際には胚の発生段階、成育能、および/または性別を選択することは可能ではない。本プロセスは、特に、卵中の特定成分の存在が決定される点で、このような開示されている方法とは異なり、この決定は、1つまたは複数の発生マーカー化合物の絶対量および相対量を選択的に求めることを可能にする二次微分スペクトルを使用することにより有利に実施することができる。特に、有利には、示差二次微分フーリエ変換赤外分光法(F<sub>2</sub>IR、*differential second-derivative Fourier transform infrared*)およびFTラマン分光法またはそれらの組合せを使用して、必要な正確性および再現性を達成することができ、好適には、核磁気共鳴法を使用して、発生マーカーの性質を決定し、システムを校正するための基線を確立することができる。本プロセスは、有利には、胚の成育能、および/または性別、および/または好ましくは卵の孵卵開始から孵化するまでの発生段階を決定することを可能にする。好ましい実施形態では、試料は、試料に存在するバイオマーカーを特定し、絶対量および相対量を定量化するスペクトルを検出および獲得するのに好適な任意の質量分析法により分析することができる。好ましくは、試料は、1試料当たり20秒未満、より好ましくは15秒未満でのリアルタイム分析を可能にする方法により分析することができる。

20

30

【0060】

例としては、静的ナノエレクトロスプレー原理、フローインジェクション分析、または試料を濃縮したフローインジェクションを用いた直接注入が挙げられる。好ましくは、質量分光分析は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析法、または表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型(SELDI-TOF)質量分析法を含む。質量分析計は、好ましくは、タンデムおよび/またはサーベイモードで操作される。

40

【0061】

有利には、試料は、質量分析の前に処理されていてもよい。試料処理は、固相抽出(SPE)、ガスクロマトグラフィー、単相または多相高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)による試料分離を含む。

【0062】

あるいは、バイオマーカー化合物を外部的に測定することができる場合、卵全体を非侵襲的に直接測定することによる直接非侵襲的分析を、例えば上記に示されているIMS技術を使用して実施することができる。

【0063】

50

バイオマーカーを質量分光分析特徴付けするための好ましい方法としては、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)およびエレクトロスプレーイオン化法(ESI)が挙げられる。いずれも、有利には、飛行時間型(TOF)または他のタイプの質量分析センサーと組み合わせて、バイオマーカーの質量および/または断片化パターンを決定することができる。好ましくは、質量分析法は、クロマトグラフィー技法および本明細書中の他の分離技法とタンデムで使用することができる。MALDIは、試料をレーザーでパルスすることにより作用する。この処理により、試料が、気化およびイオン化される。その後、荷電イオンの分子量(質量)が、TOF分析機で決定される。このデバイスでは、電場により、荷電分子が検出器に向けて加速され、イオン化された断片が検出器に到達するまでにかかる時間の長さ、つまり飛行時間の差により、バイオマーカーの分子量が明らかになる。この場合、より小さな分子がより速く検出器に到達する。この方法では、試料の質量プロファイル、つまり混合物中の化合物の分子量および量のプロファイルが生成される。その後、こうしたプロファイルを使用して、バイオマーカーデータベースから既知のバイオマーカーを特定することができる。

10

**【0064】**

ESI-MSが液体クロマトグラフィーと接続されている場合(LC/MS/MS)、LCカラムから溶出する化合物が、質量分光分析計のイオン源内に導入される。細針に電圧が印加される。その後、針により液滴が質量分光分析機内に噴霧され、そこで液滴が気化され、バイオマーカーイオンが、断片化された様々な電荷状態に応じて放出され、それにより組成物を決定することができる。あるいは、SPE(固相抽出法)またはガスクロマトグラフィーは、質量分光分析計と接続されていてもよい。

20

**【0065】**

特に、SPE/MS/MSは、Agilent Rapidfire MS装置(Rapidfireは、Agilent Inc.社の登録商標である)、Phytronics LD TD(レーザーダイオード熱脱離)イオン源(LD TDは、Phytronics Inc.社の登録商標である)の使用など、本方法の自動化ハイスループット工業応用に有用であることが見出された。

**【0066】**

電場におけるイオンの気相移動度に基づく、較正されたイオン移動度分光計(IMS)を使用した装置がさらに有用であることが見出された。その場合、いわゆるイオン化チャンバー内部の部分放電UVランプまたは $^{63}\text{Ni}$ 源により生成された物質のイオンは、それらがドリフト管を通る過程で分子量および/または幾何学的構造に応じて互いに分離される。その後、装置は、イオンがこの管をドリフトする特徴的な時間を測定し、超高感度で、1試料当たり数秒間で、物質の迅速な検出、特定、ならびに定量化を可能にする。

30

**【0067】**

好ましくは、質量分光分析は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析法、または表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型(SELDI-TOF)質量分析法、SPE/MS/MS、LD TD(レーザーダイオード熱脱離)イオン源、および/またはイオン移動度センサー(IMS)を含む。

40

**【0068】**

質量分光分析システムは、好ましくは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)MS、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)MS、または表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型(SELDI-TOF)MS、またはレーザーダイオードイオン化脱離(LDID)MSである。特に、SPE/MS/MSは、Agilent Rapidfire MS装置(Rapidfireは、Agilent Inc.社の登録商標である)、Phytronics LD TD(レーザーダイオード熱脱離)イオン源(LD TDは、Phytronics Inc.社の登録商標である)の使用など、本方法の自動化ハイスループット工業応用に有用であることが見出された。

**【0069】**

50

電場におけるイオンの気相移動度に基づく、較正されたイオン移動度分光計 (IMS) を使用した装置がさらに有用であることが見出された。その場合、いわゆるイオン化チャンバー内部の部分放電UVランプまたは $^{63}\text{Ni}$ 源により生成された物質のイオンは、それらがドリフト管を通る過程で分子量および/または幾何学的構造に応じて互いに分離される。その後、装置は、イオンがこの管をドリフトする特徴的な時間を測定し、超高感度で、1試料当たり数秒間で、物質の迅速な検出、特定、および定量化を可能にする。

【0070】

好ましくは、試験試料は、分析の前に処理されていてもよい。好ましくは、試料処理は、固相抽出 (SPE)、ガスクロマトグラフィー、単相または多相高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) による試料分離を含む。好ましくは、分析の前に、参照バイオマーカーの1つまたは複数の内部標準物質が、試料に添加される。好ましくは、バイオマーカーシグナル強度を測定し、それを1つまたは複数の既知内部標準物質のシグナル強度と比較することにより、絶対シグナル強度がスコア化される。好ましくは、本方法は、完全自動化される。

10

【0071】

好ましくは、多数の卵が、1つまたは複数の胚特徴について検査される。

【0072】

好ましくは、本方法は、卵中の胚が成育可能であり雄であるかまたは成育可能で雌であるかを決定すること、および多数の成育可能な雄卵と多数の成育可能な雌卵と1つまたは複数の成育不能な卵とを分離することをさらに含む。

20

【0073】

好ましくは、本方法は、試料に由来する複数のバイオマーカーから少なくとも1つのバイオマーカーを特定すること、および上記少なくとも1つのバイオマーカーの濃度を、既知の特徴を有する個々のニワトリ胚中の同じバイオマーカーの値と比較することをさらに含み、1つまたは複数のバイオマーカーの閾値に対してより高いかまたはより低い濃度が、胚が雄であるかもしくは雌であるか、成育可能であるかもしくは成育不能であるか、および/または胚の発生段階を示す。

【0074】

ステップ(c)は、(b)で得られたスコア値および量に閾値を適用し、バイオマーカーの存在および濃度に関連する胚の特徴を特定することを含む。好ましくは、ステップ(c)は、(i)類似性尺度を使用して、各相関シグナルのスペクトラムを、相関する参照バイオマーカーの予想スペクトラムとマッチングし、少なくとも1つの正相関シグナルを規定することにより、各関連バイオマーカーシグナルまたは識別特徴を、参照バイオマーカーと相関させること、(ii)各正相関シグナルの強度を測定し、その絶対および/または相対シグナル強度をスコア化すること、および(iii)類似性関数から得られたスコア値に閾値を適用して、相関するバイオマーカーの存在および濃度に関連する胚の特徴を決定することをさらに含む。

30

【0075】

本出願人は、3 - [(2 - アミノエチル)スルファニル]ブタン酸が、7、8、または9日目に50 ng/ml以上の量で尿膜腔液に存在することが、雌胚と相関し、50 ng/ml未満で存在するこのバイオマーカーの存在が、雄胚と相関することを見出した。好ましくは、3 - [(2 - アミノエチル)スルファニル]ブタン酸は、雄卵には、7、8日目に、または、0.1から45 ng/mlまでの量で、より好ましくは1から40 ng/mlまでの量で存在する。好ましくは、3 - [(2 - アミノエチル)スルファニル]ブタン酸は、雌卵には、7、8、または9日目に、50.1から150 ng/mlまでの量で、より好ましくは55から140 ng/mlまでの量で存在する。

40

【0076】

この単一バイオマーカーは、所望の特徴に関してほとんど完全な確実性を既にもたすことができるが、有利には、少なくとも第1および第2のバイオマーカー、またはさらにより多くのバイオマーカーを同時に検出および分析することができる。その後、少なくとも

50

も第1および第2のマーカの絶対量および/または相対量を使用して、さらに増加した確実性で1つまたは複数の特徴を決定することができる。

【0077】

また、本発明は、好ましくは、特定の特徴を有するオビパリアン種の幼体を選択的に孵卵するためのプロセスであって、その種に由来する多数の卵を準備すること、および卵を、本明細書で開示した方法に供して、胚の特徴を決定すること、および所望の特徴を有する卵を選択して、選択された多数の卵を形成すること、および1つまたは複数の幼体が孵化するまで、選択された卵を孵卵することを含むプロセスに関する。

【0078】

また、本発明は、好ましくは、オビパリアン種胚性別検出および分析システムであって、

(i) 個々の卵から試料を採取するための試料採取システム、

(ii) スペクトルを収集するための分析システム、

(iii) 分析システムにより分析された1つまたは複数の試料に由来する1つまたは複数のバイオマーカーに関連するシグナルをプログラムに基づいて特定する性別および/または成育能識別機能であり、シグナルを、試料データに関して収集された対照スペクトルの保存されているライブラリーとおよび/または内部基準物質と比較して胚特徴を特定することを含む分析をさらに実施する成育能識別機能、ならびに

(iv) 1つまたは複数の胚特徴情報を、試料および/または分析した卵と結び付ける出力手段を含むシステムに関する。

【0079】

好ましくは、識別機能は、分析システムと接続されている電子デバイスのソフトウェアに実装されている。

【0080】

また、本発明は、動物および/もしくはヒト食料生産のための、化粧用、医療用、および/もしくは栄養用化合物の生産および/もしくは単離のための、発酵によるメタン生産のための、ならびに/または高品質肥料生産のための、本発明による方法から得ることができる多数の卵の使用に関する。

【0081】

本明細書では、「尿膜腔液」という用語は、トリ卵に由来するような他の卵物質が存在するまたは存在しない尿膜腔液を包含する。例えば、尿膜腔液という用語は、血液および尿膜腔液の混合物を含む場合がある。本発明の実施形態は、尿膜腔液から、または卵の上部表面付近の領域から物質を抽出することに限定されない。本明細書に記載のように尿膜腔液から物質を取り出すことは、本発明の考え得る実施形態の1つの例として提供されているに過ぎない。これらに限定されないが、羊膜、卵黄、殻、卵白、組織、膜、および/または血液を含む種々の物質を卵から抽出し、アッセイし、分光光度分析に供して、下記に記載されているように胚の性別を特定することができる。

【0082】

所望の場合、物質は、事実上任意の配向性を有する卵から抽出することができる。本明細書中の「所定の場所」という用語は、卵内部の一定の位置または深さを示す。例えば、デバイスを、卵の一定の深さおよび/または一定の位置へと卵に注入することができる。代替的な実施形態では、注入は、卵から得られる情報、例えば卵内部の胚または胚下腔の位置に関する情報に基づいて実施することができる。

【0083】

本プロセスでは、発生マーカーは、好ましくは、侵襲的または非侵襲的に分析することができる。

【0084】

好ましくは、決定は、例えば、好ましくは卵の孵卵開始後の6から12日までの期間にステップa)を実施するなど、孵卵開始後の1から15日まで、より好ましくは2から14まで、さらにより好ましくは3から13まで、およびさらにより好ましくは4から12日までの期間に実施される。さらに、卵の実際の発生段階を決定することができる。

## 【 0 0 8 5 】

好ましくは、本発明による胚特徴の決定は、非破壊方法として実施される。つまり、所望の場合、そのようにして試験した胚を成長させることができるか、または胚が成育可能である場合は、卵内ワクチン生産などのさらなるステップに供することができるか、または例えば肉生産のために雄卵のみを成長させて排他的に雄のニワトリ集団にすることができるが、またはそのようにして飼育したヒナを他の目的のために使用することができる。

## 【 0 0 8 6 】

「スペクトルを比較する」という用語は、有利には、測定したスペクトルの単変量または好ましくは多変量分析、およびトリ胚とある集団との関連性の決定を含んでいてもよい。このステップは、スペクトルデータの多変量統計分析により、あるシグナルピークがスペクトラムに存在することを決定することを含んでいてもよい。多変量統計分析プログラムは、好ましくは、主成分分析プログラムおよび/または部分最小二乗回帰分析プログラムを含む。したがって、主題の発明は、トリ胚の性別および/または成育能を卵内で決定するためのプロセス、装置、およびシステムであって、多変量統計分析プログラムならびにそれらを決定するためのマイクロプロセッサ実施プロセスを含む、プロセス、装置、およびシステムにも関する。好ましくは、ステップ ( b ) は、任意の 2 つの試料間の濃度差による強度効果を正規化するステップをさらに含む。

## 【 0 0 8 7 】

したがって、比較は、好ましくは、測定されたスペクトルの多変量分析を使用して試料の性別の可能性を評価すること、およびトリ胚とある集団との関連性を決定することを含む。これは、有利には、部分最小二乗判別分析法 ( P L S - D A ) を使用して実施される。このプロセスは、好ましくは、トレーサー化合物データの数学的処理を含み、PCA ( 主成分分析 ( P r i n c i p l e C o m p o n e n t A n a l y s i s ) ) などの多変量分析、好ましくはその後の教師付分析、より好ましくは P L S - D A ( 部分最小二乗判別分析 ) 、またはさらにより好ましくは直交性 P L S D A 、または類似の好適な統計手法を含む。主題のプロセスのパターンマッチングステップは、ある類似性尺度を特定することになる。その類似性尺度を使用して、バイオマーカーの正しい構造が確認される。この確認は、スペクトルマッチングによりなされる。スペクトルマッチングは、試料スペクトルおよびデータベース中の参照スペクトルを比較することにより実施される。この段階での陽性特定には、正確な決定を確認するために、好適な相関性が必要とされる。好適な閾値および類似性尺度は、当業者であれば明白であろう。このプロセスでは、大量のデータを扱いやすいサイズに低減すること、および観察されたデータ間の隠れた関係性を示す潜在変数を決定するために、統計的に駆動されるモデルを適用することが試みられる。

## 【 0 0 8 8 】

その後、特徴識別機能は、試料データにフィルターをかけ、それにより試料間にわたって目的クラスターが特定されることになる。このクラスターは、試料間にわたる類似性を表わし、性別プロファイルを特定するために使用される。好ましくは、分析は、主成分分析 ( P C A ) および P L S - D A を含む。PCA では、数学的なアルゴリズムを使用して、データセット内の差異および類似性が決定される。PCA では、多数の関連する可能性のある変数が、プリンシプル ( p r i n c i p l e ) 成分と呼ばれる少数の無関連変数に変換される。第 1 のプリンシプル成分は、データの多様性をできるだけ反映する。各追加成分は、データの残りの多様性をできるだけ反映することを試みる。収集したデータは行列に方形配置することができ、PCA は、平方和および外積により正方対称行列の「固有値」および「固有ベクトル」を解く。最大固有値に関連する固有ベクトルは、第 1 のプリンシプル成分と同じ方向を有する。2 番目に大きな固有値に関連する固有ベクトルは、第 2 のプリンシプル成分の方向を決定する。固有値の合計は、正方行列のトレースと等しく、固有ベクトルの最大数は、この行列の行 ( または列 ) の数と等しい。決定後、算出した固有値のスクリーンプロットを図示することが可能である。当業者であれば、多数の異なるアルゴリズムを使用して、固有値および固有ベクトルを計算することができることを認識するだろう。データは、以下の 2 つのプロットを使用して表示される。i ) グループク

10

20

30

40

50

ラストリングを示すスコアプロット、および  $i i$ ) グループクラスタリングをもたらすスペクトルデータが、原点から最大距離にあるものとして特定されるローディングプロット。

【0089】

本方法は、有利には、卵中の胚が成育可能で雄であるか、または成育可能で雌であるかを決定すること、および試験した卵を多数の成育可能な雌卵と多数の成育可能な雄卵と多数の成育不能な卵とに分離して、雄卵が圧倒的に多い選択群または雌卵が圧倒的に多い選択群または成育不能な卵が圧倒的に多い選択群を形成することができる。所望の場合、成育可能な雌卵または雄卵の選択群を、孵卵および孵化プロセスに供して、雌動物が圧倒的に多い集団または雄動物が圧倒的に多い集団を形成することができる。

【0090】

卵は、例えば、好ましくはウイルスまたはウイルス様物質を、生胚を含み、雄または雌であることが特定された各卵に注入することによるワクチン生産などの、種々の応用に使用することができる。その後、このように注入された卵を好適に孵卵した後、ワクチンまたはワクチン素材を、孵卵した卵から単離することができる。本発明のさらなる好ましい実施形態は、卵流体試料中の物質の存在を検出するための方法であって、一般的に  $0.1 \sim 35 \mu\text{l}$  の範囲の試料があれば十分であり得る方法である。

【0091】

類似性尺度は、好ましくは、滞留指標および正相関シグナルと関連する断片化パターンを関連させることを含む。

【0092】

さらに、統計的に有意な類似性は、関連バイオマーカー同一性または複数バイオマーカー同一性として検出および登録することができる。統計的に有意な類似性の決定は、データベース、ならびに本方法論の要求を満たすように開発されたアルゴリズムを使用することを含む。

【0093】

これは、特に、新しい種のバイオマーカーの有用性を決定する場合、管理下 (supervised) 多変量分析、好ましくは部分最小二乗判別分析、PLS-DA、または直交性部分最小二乗判別分析をデータに適用することを含む。

【0094】

好ましくは、決定しようとする特徴は、卵中の胚の性別、年齢、発生段階、および/または成育能を含む。工業応用の場合、多数の卵が、1つまたは複数の胚特徴について検査される。

【0095】

本方法は、好ましくは完全自動化され、それにより卵に関連する試料中のバイオマーカーの自動化された正確なアッセイが提供される。したがって、アッセイは、バイオマーカーを特定するために質量分析法に依存する。有利には、本方法では、試料中のある特定されたバイオマーカーに関連する電荷、質量、および断片化パターンの固有特性の各々に基づくデータセットの質量および同一性がフィルターにかけられ、スクリーニングされる。

【0096】

有利には、トレーサー化合物データの分析を、性別が既知の試料のライブラリーと関連させることにより、性別の決定の選択性をさらに向上させることができる。本プロセスは、有利には、卵中の胚が成育可能で雄であるか、または成育可能で雌であるかを決定することをさらに含み、また、多数の成育可能な雌卵と多数の成育可能な雄卵とを分離して、雄卵が圧倒的に多い選択群または雌卵が圧倒的に多い選択群を形成することができる。このようにして形成された成育可能な雌卵または雄卵の選択群を、孵卵および孵化プロセスに供して、雌ヒナが圧倒的に多い集団または雄ヒナが圧倒的に多い集団を形成することができる。

【0097】

本発明による方法は、何百または何千個もの卵、および各卵から採取した試料中の何百または何千個ものバイオマーカーを同時に分析することを可能にする。本方法は、特徴と

10

20

30

40

50

関連することが示されているバイオマーカーのデータベースであって、バイオマーカーの各々の質量およびスペクトルデータを含むデータベースに依存し、所与の試料中のバイオマーカーを好適なソフトウェアにより正確に特定することを可能にする。

【0098】

加えて、ある種に関するデータベースは、試料に存在するバイオマーカーをスクリーニングし、化合物が質量検出器に到達する時間と相関する滞留時間指標に基づいて不要なシグナルを除去することにより確立することができる。したがって、多数の配列を数分で分析し、所与のバイオマーカーを、高い信頼性で特定することができる。したがって、本方法は、自動化可能でハイスループットであり、比較的未熟練の技術者により運用可能であり、したがって、遠隔地、例えば孵卵場、養鶏場、または養魚場での使用に好適である。

10

【0099】

試料は、前分離手順を行わずに質量分析に供してもよい。そのような実施形態では、試料は、好ましくは、例えば静的ナノエレクトロスプレー原理、フローインジェクション分析、または試料を濃縮したフローインジェクションを用いた直接注入により分析される。

【0100】

質量分析前に試料を処理して、好ましくは質量分析計に負荷する前に試料成分を分離することが有利である。例えば、試料処理は、単相または多相高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、ガスクロマトグラフィー（GC）、または固相抽出（SPE）による試料分離を含む。

【0101】

質量分光分析計システムは、好ましくは、エレクトロスプレーイオン化（ESI）MS、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型（MALDI-TOF）MS、または表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型（SELDI-TOF）MS、またはレーザーダイオードイオン化脱離（LDID）MSである。

20

【0102】

本発明による方法は、有利には、自動化され、コンピューター制御下で実施される。試料中のバイオマーカーの特定は、バイオマーカーの参照データと比較することにより行われ、好ましくは、複数のバイオマーカーの参照質量およびスペクトルデータはコンピューターに保存されている。規定のバイオマーカーの参照質量スペクトルは、好ましくは、下記に示されるようなクラスタリング計算により得られる実際の測定データから得られる平均スペクトルである。バイオマーカーは、客観的に測定され、性別、年齢、および成育能、または栄養ステータスなどの条件の指標として評価される特徴について関連するものを、単独で、他のマーカーと組み合わせて使用することができる。有用なバイオマーカーは、バイオマーカーの存在またはレベルと発生段階の存在を含む条件のある局面と間に相関性が存在する特定の状態または疾患と関連する任意の特定可能で測定可能な指標であってもよい。相関性は、定性的であってもよく、定量的であってもよく、または定性的および定量的の両方であってもよい。典型的には、バイオマーカーは、化合物、化合物断片、または化合物の群である。そのような化合物は、タンパク質およびペプチド、核酸、アミノ酸、糖、ならびに他の化合物を含む、生物中に見出されるか、または生物により産生される任意の化合物であってもよい。バイオマーカーは、「客観的に測定され、性別、年齢、および成育能、または栄養ステータスなどの条件の指標として評価される特徴」と記載することができる。有用なバイオマーカーは、バイオマーカーの存在またはレベルと、発生段階の存在を含む条件のある局面と間に相関性が存在する特定の状態または疾患と関連する任意の特定可能で測定可能な指標であってもよい。相関性は、定性的であってもよく、定量的であってもよく、または定性的および定量的の両方であってもよい。また、バイオマーカーは、排卵親に導入され、その後その発生中に胚により代謝され、トレーサー代謝物質をバイオマーカーとして排泄するトレーサー前駆体分子の代謝物質である化合物を含んでいてもよい。

30

40

【0103】

対照試料から収集した対照スペクトルのデータベースセットは、好ましくは、まず、所

50

与のニワトリ品種の特定の性別の試料を選択することにより集積される。完全なライブラリーまたはデータベースは、両性別の試料を含むことが企図された。

【0104】

具体的には、分類は、紫外および可視範囲の両方の部分にわたって出現するスペクトル差異に基づく。現在、こうした差異の由来は分かっていないが、分子レベルでの内因性吸収差によるものである可能性がある。

【0105】

加えて、計算手段は、コンピューターに内在するソフトウェア手段を含む。

【0106】

当業者であれば、これらに限定されないが、尿膜腔液、卵黄、卵白、および卵殻などの他の卵部分およびそれらの成分を特徴付けるためのシステムおよび方法を含む、さらなる実施形態が企図され得ることを理解することができる。

10

【0107】

また、本発明は、本プロセスにより得ることができる卵選択群、および孵化後のヒナまたはヒナ集団に関する。

【0108】

また、本発明は、オビパリアン種、より一般的な用語では、これに限定されないが家禽、またはさらにより詳しくはガルス・ガルス・ドメスティクスの胚の性別、成育能、および/または発生段階を卵内決定するための方法、システム、および餌製品に関する。

【0109】

したがって、本発明は、オビパリアン種の胚の性別、成育能、および/または発生段階を卵内で決定するためのプロセスにも関する。本プロセスは、雄卵および雌卵を選択すること、およびそれら選択した卵を使用して生動物の群を生産することにさらに関する。卵生動物は卵を産み、母親内での他の胚発生は、ほとんどまたはまったくない。これは、ほとんどの魚類、両生類、爬虫類、すべての鳥類、ならびにほとんどの昆虫類、軟体類、およびクモ類の生殖方法である。オビパリアン動物およびそれらの卵の養殖飼育は、世界的なタンパク質供給のかつてなく増え続ける部分、ならびにワクチンの生産などの種々の他の大規模工業プロセスをまかなっている。現在、オビパリアン動物の養殖飼育の最も重要なプロセスは、家禽などのトリ種の飼育、ならびに水産養殖、つまり魚類、甲殻類、および軟体類などの水生生物の養殖を含む。

20

【0110】

また、本発明は、オビパリアン胚の性別、成育能、および/または発生段階を卵内で特定するための方法であって、a. 排卵親の餌中の添加剤として使用することが許容される少なくとも1つのトレーサー前駆体化合物を含むトレーサー前駆体物質を含む餌製品を準備すること、およびb. 卵を好適な期間にわたって孵卵し、トレーサー前駆体化合物の代謝を可能にして、好適量の少なくとも1つのトレーサー化合物を形成すること、およびc. 卵または卵に由来する試料を分析に供して、1つまたは複数のトレーサー化合物の存在および量を決定すること、およびd. ステップ(c)で得られたデータから、オビパリアン胚の性別、成育能、および/または発生段階を決定することを含む方法に関する。

30

【0111】

ほとんどのオビパリアン種の受精卵は、ほぼ等しい配分の雄および雌動物をもたらす傾向がある。しかしながら、種々の理由により、孵卵場での管理では、種々の特性、特に性別に基づいて動物を分離することが望ましい場合がある。商業的家畜ニワトリおよび卵生産では、例えば、雄ヒナの孵卵および飼育は、非常に望ましくないものであり、毎年、何十億羽もの雄ヒナの間引きに結び付いている。エビおよび中型エビの生産では、卵の成熟を誘導するプロセスが必要であるため、排他的に雌の集団を作り上げることが望ましい。

40

【0112】

現在、いずれの場合でも、孵化した動物の混合集団は、若年動物を、若年時に好適な特徴がない場合は時にはさらに成体集団を視覚的に評価することによる雌雄鑑別にかけられる。いずれにしても、それは、非常に時間のかかるプロセスであり、高度に熟練した作業

50

者を必要とし、典型的には、動物にとって非常にストレスがかかるものである。また、成体動物が雄雌鑑別される場合、集団全体を最低限の年齢まで飼育する必要があり、そのように飼育された動物の半分のみが、分離後に繁殖に使用される。例えば雄集団が存在すると、例えば共食いおよび飼育密度の低減による生産性低減がもたらされる場合があるというさらなる問題が生じる場合がある。これは、例えば淡水中型エビ *M. ロゼンベルギイ* (*M. Rosenbergii*) で報告されている。

【0113】

また、養魚業では、魚の性別または雄雌の決定は、圧倒的に雄が多い単一性の集団または圧倒的に雌が多い単一性の集団の飼育を可能にし、それにより、好ましくは全雄集団として養殖されるニルティラピアで現在実施されているように、集団の成長および健康をより特異的に目指すことが可能になるだろう。この場合も、ほとんどの魚類では、後期若年または成体段階でしか、性別を目視検査により決定することができず、そのため「超雄」ハイブリッドを用いた複雑な繁殖パターンおよび特定の集団が確立されなければならない。「超雄」ハイブリッドは、遺伝障害の存在を増強し易い場合があり、また、遺伝的に非常に小さな集団蔓延に関連するある疾患に罹り易い場合がある。

10

【0114】

さらに、ある割合の卵は、未受精であるか、または孵卵期間の開始時に成育可能な胚を含まず、特に家禽卵用に孵卵場で使用される孵卵器の収容能力が大幅に低減される。

【0115】

その結果、主に雄胚または雌胚のみの選択を可能にする初期性別選択が利用可能である場合に必要とされるものよりも少なくとも2倍の孵卵能力が必要とされる。

20

【0116】

したがって、孵卵期前にトリ胚の性別決定を可能にし、また孵卵場収容能力の著しい増加を可能にする初期段階方法が利用可能であれば、必要なエネルギーおよび他の資源の量が低減されるため環境にとって非常に有益であるだけでなく、同様に間引きされる不必要な動物をなくするために非常に有益であり、ならびに新たに孵化した動物のストレスを低減するために非常に有益であろう。その方法が、未受精および/またはそうでなければ成育不能な胚から成育可能な胚を選択することを可能にし、孵化プロセスの効率をさらに増加させることも可能であれば、さらに有益であろう。

【0117】

魚またはエビの場合、種々の主にPCRまたは抗体に基づく方法が公開されている。しかしながら、それらは、かなり高価で複雑である。

30

【0118】

したがって、オビパリアン動物胚の性別、発生段階、および/または成育能を卵内で非破壊決定するための、より迅速で適用がより容易な方法が依然として必要とされている。

【0119】

したがって、本発明のさらなる目的は、オビパリアン種の胚の特徴を卵内で特定するための方法であって、(a) 胚を含む卵に関連する物質の試料を質量分析に供し、滞留時間指標および対応する質量ならびに検出された各シグナルの質量を記録すること、(b) 各シグナルに対応する質量を、その種に特異的なバイオマーカー質量の参照データベースと相関させて、1つまたは複数のシグナルと1つまたは複数の参照バイオマーカーとの相関性を形成すること、(c) 類似性尺度を使用して、各対応するシグナルの質量スペクトラムを、対応する参照バイオマーカーの質量スペクトラムとマッチングすることにより、各対応するシグナルと参照バイオマーカーとの相関性を確認して、少なくとも1つの正相関シグナルを規定すること、および(d) 各正相関シグナルの強度を測定し、その絶対または相対シグナル強度をスコア化すること、および(e) 判別関数から得られたスコア値に閾値を適用して、相関するバイオマーカーの存在および濃度に関連する胚の特徴を決定することを含む方法を提供することである。

40

【0120】

さらなる目的は、孵卵場で使用するためのそのような機器装備を提供することである。

50

またさらなる目的は、孵卵場または水産養殖場などの遠隔地で、卵のリアルタイムオンライン分析を実施することが可能なシステムを提供することである。これらおよび他の目的は、本発明の装置およびプロセスにより取り込まれる。したがって、本発明は、オビパリアン種の胚の特徴に関連する1つまたは複数のバイオマーカーを卵内で特定するための方法であって、性別が既知の種の多数の卵に由来する多数の試料を質量分析計で分析して、バイオマーカーパターンを確立するために多数の質量スペクトルを得ること、および質量スペクトルにパターン認識を実施して、バイオマーカーパターンを得ること、およびバイオマーカーパターンに基づき、胚の少なくとも1つの特徴と関連するバイオマーカーおよびバイオマーカーレベル決定することを含む方法に関する。

#### 【0121】

さらなる態様では、主題のプロセスは、多数の成育可能な雌卵にも関し、雄卵が圧倒的に多い選択群または雌卵が圧倒的に多い選択群を形成する。またさらなる態様では、主題のプロセスは、本発明による方法により得ることができる若年動物集団にも関する。またさらなる態様では、主題のプロセスは、動物および/もしくはヒト食料生産のための、化粧用、医療用、および/もしくは栄養用化合物の生産および/もしくは単離のための、発酵によるメタン生産のための、ワクチン生産のための、ならびに/または高品質肥料生産のための、本プロセスから得ることができる多数の卵の使用にも関する。

#### 【0122】

またさらなる態様では、主題のプロセスは、主題の方法を実施するための好ましくは完全に自動化された装置を含む、オビパリアン動物胚性別検出および分析システムにも関する。

#### 【0123】

またさらなる態様では、本発明は、オビパリアン胚の性別、成育能、および/または発生段階を卵内で特定するための方法であって、(a) 排卵親の餌中の添加剤として使用することが許容される少なくとも1つのトレーサー前駆体化合物を含むトレーサー前駆体物質を含む餌製品を準備すること、および(b) 卵を好適な期間にわたって孵卵し、トレーサー前駆体化合物の代謝を可能にして、好適な量の少なくとも1つのトレーサー化合物を形成すること、および(c) 卵または卵に由来する試料を分析に供して、一以上のトレーサー化合物の存在および量を決定すること、および(d) ステップ(c) で得られたデータから、オビパリアン胚の性別、成育能、および/または発生段階を決定することを含む方法に関する。

#### 【0124】

さらなる態様では、本発明は、胚の性別、成育能、および/または発生段階を決定するための餌製品、ならびに動物餌中のトレーサー前駆体化合物の使用にも関する。

#### 【0125】

また、本発明は、性別識別機能が、分光システムと接続されている電子デバイスのソフトウェアに実装されており、好ましくは識別機能が、コンピューターに内在するソフトウェア手段を含むシステムに関する。

#### 【0126】

図1には、A) 単一特徴に関するロジスティック回帰分類モデルが示されている。測定した特徴すべてについて単一予測因子モデルを評価したところ、特徴1599を使用した場合に最良の正確性が観察された。この場合、9日目から>90%の正確性がもたらされた。B) 2つの特徴に関するロジスティック回帰分析。測定した特徴のすべての考え得る対について、ロジスティック回帰モデルを評価した。測定のロバスト性を検証した後、特徴1599および507の組合せにより、最良の性能が達成された。これは、10日目から>95%の正確性をもたらした。

#### 【0127】

したがって、本方法は、性別などの特性の相対的決定に関する。これは、さらなる特徴を追加することにより、および例えば外れ値または曖昧な特徴を有する卵を除外することにより著しく増加し、それにより正確性を著しく増加させることができる。

10

20

30

40

50

## 【0128】

図3には、雄（暗灰色）および雌（明灰色）試料から850秒で抽出された、220から145までの範囲の種々の質量ピークを有する化合物のクロマトグラムが示されている。

## 【0129】

別様に定義されていない限り、本明細書で使用される技術的および科学的用語はすべて、本発明が属する当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本発明を説明するために本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を記載するためのものであり、本発明を限定することは意図されていない。多数のオビパリアン種が商業的に飼育されている。

## 【0130】

「水産養殖」は、管理された条件下で淡水および海水集団を養殖することを含み、野生の魚および他の海洋動物の水揚げである商業的漁業と対比させることができる。

## 【0131】

本明細書での「魚類」種は、指を有する四肢を欠如し、えらを有する水生脊椎動物をすべて含む。海洋魚または塩水魚（*salt water fish*）に関わらず、現在生息しているメクラウナギ、ヤツメウナギ、ならびに軟骨および硬骨魚類種がこの定義に含まれる。商業的に養殖される重要な魚種または科としては、以下のものが挙げられる：コイ、真ミノ（*true minnow*）、およびそれらの近縁種、例えばバーブ（*barb*）、バーベル（*barbel*）、およびナマズ、およびパンガシウス科（*Pangasidae*）、ソウギョ、コイ（*common carp*）、コクレン（*Bighead carp*）、ハクレン（*Silver carp*）、カトラ（*Catla*）、およびフナ（*Crucian Carp*）などのコイ科（*Cyprinidae*）のメンバー；サケ、マス、イワナ、淡水ホワイトフィッシュ、およびカワヒメマスを含むサケ科（*Salmonidae*）、例えば、タイセイヨウサケ、ブラウンマス（*Sea trout*）、およびニジマス；バラマンディ（*barramundi*）、またはアジアシーバス、ニホンシーバス、ヨーロッパシーバスなどのハタ科（*Serranidae*）；アカメ科（*Latidae*）；シーブリーム（*sea bream*）およびボーギ（*porgy*）などのタイ科（*Sparidae*）；ナイルティラピアまたはモザンビークティラピアなどのカワズメ科（*Cichlidae*）；ならびにタイセイヨウチョウザメまたはベルーガチョウザメなどのチョウザメ科（*Acipenseridae*）。

## 【0132】

本明細書では、「甲殻類」は、個別の雄雌を有し、性的に生殖する節足動物種の群を指し、カニ、ロブスター、ザリガニ、エビのようなよく知られている動物を含む。

## 【0133】

本明細書では「カニ」は、短尾下目の十脚類甲殻類である。

## 【0134】

本明細書では、「エビ」および/または「中型エビ」は、塩水または汽水水産養殖されるクルマエビ科（*Penaeidae*）、好ましくはクルマエビ（*Penaeus*）属の中型エビ、ウシエビ（*giant tiger prawn*）、P. モノドン（*P. monodon*）、タイヘイヨウホワイトシュリンプ（*Pacific white shrimp*）、パナメイエビ（*Litopenaeus vannamei*）、西洋ブルーシュリンプ（*P. stylirostris*）、チュウゴクホワイトシュリンプ（*P. chinensis*）、クルマエビ（*P. japonicus*）、インドホワイトシュリンプ（*P. indicus*）、バナナエビ（*P. merguensis*）、およびコエビ族（*Caridea*）または根鰓亜目（*Dendrobranchiata*）科の他のメンバー；ならびに例えば、オニテナガエビ（*Macrobrachium rosenbergii*）、M. ニッポニーズ（*M. nipponense*）およびM. マルコルムソニイ（*M. malcolmsoni*）などの淡水水産養殖される甲殻類；アメリカザリガニ（*Procambarus clarkii*）などのザリガニ上科（*Astacoidea*）およびミナミザリガニ科（*Parastacoidea*）の属に由来するザリガニ；な

10

20

30

40

50

らびにイセエビ科 (Palinuridae) に由来するイセエビだけでなく、アカザエビ科 (Nephropidae) およびウミザリガニ科 (Homaridae) に由来する養殖可能なロブスター種などの任意の種類の養殖可能な甲殻類を指す。

【0135】

本明細書では、「軟体類」は、個別の雄雌を有し、受精が外部的である、イカ、コウイカ、およびタコなどの頭足類軟体類；多板綱 (polyplacophora)、堀足類 (scaphopod)、およびツノガイ (tusk shell) などの二枚貝を含む、軟体動物目として知られている無脊椎動物の大きな門を指す。

【0136】

「トリ」および「鳥」という用語は、本明細書で使用される場合、任意のトリ種の雄または雌を含むが、主に、卵または肉のために商業的に飼育される家禽を包含することが意図されている。したがって、「鳥」および「トリ」という用語は、特に、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、ハト、ダチョウ、エミュー、およびキジを包含することが意図されている。

10

【0137】

本明細書では、「孵卵」という用語は、鳥などのオビパリアン動物が卵を孵化させるプロセス、および成体の管を出た後の卵内での胚発生を指す。本明細書では、「孵卵期間」は、特定の卵を、孵化するまで、つまり、幼体が出現するまで、動物の発生が停止しない限り、任意の取り扱いまたは例えば孵卵器から孵卵場ユニットへの移動を含む、抱卵を模倣する条件にかけておく連続した期間を指す。

20

【0138】

「卵内」という用語は、本明細書で使用される場合、孵化前の卵内に含まれている胚を指す。本発明は、これらに限定されないが、(家畜化)ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、およびキジ卵、コイ、サケ科、またはティラピア卵などの魚、エビまたは中型エビ卵、および軟体類卵を含む、任意のタイプの鳥類、魚類、軟体類、爬虫類、または甲殻類卵で実施することができる。

【0139】

本明細書では、「注入」および「注入する」という用語は、卵もしくは胚内に物質を送達または放出するための方法、卵もしくは胚から物質(つまり試料)を取り出すための方法、および/または卵もしくは胚内に検出器デバイスを挿入するための方法を含む、卵もしくは胚内にデバイス(典型的には細長いデバイス)を挿入するための方法を包含する。

30

【0140】

本明細書では、「質量分光分析法」という用語は、質量に基づいてイオンを選別する分析技法を指す。質量分光分析法は、典型的には、多数の状況下で化学分析に使用され、石油の複雑な混合物から遺伝子工学の産物まで、任意の試料に適用することができる。簡単に言えば、質量スペクトルは、試料の正確な化学的組成の全体像をもたらすことになる。

【0141】

質量スペクトラムは、質量対電荷比の関数としてのイオンシグナルのプロットである。こうしたスペクトルは、試料の元素または同位体識別特徴、粒子および分子の質量を決定するために、ならびに分子の化学構造を解明するために使用される。質量分光分析法では、化学化合物をイオン化して、荷電分子または分子断片を生成し、それらの質量対電荷比が測定される。

40

【0142】

典型的なMS手順では、固体、液体、または気体であってもよい試料を、例えば電子で衝撃を加えることによりイオン化する。これにより、一部の分子が破壊されて荷電断片になる。その後、典型的には、こうしたイオンを加速させ、それらを電場または磁場に曝すことにより、こうしたイオンをそれらの質量対電荷比に応じて分離する。同じ質量対電荷比のイオンは、同じ量の偏向を起こすことになる。

【0143】

イオンは、電子増倍管などの、荷電粒子を検出することが可能な好適な機構により検出

50

される。結果は、質量対電荷比の関数としての、検出イオンの相対存在量のスペクトルとして表示される。既知の質量を、特定された質量と相関させることにより、または特徴的な断片化パターンにより、試料中の原子または分子を特定することができる。本状況では、質量分析法を適用して、好適なバイオマーカーを特定および検出する。質量分析法(MS)は、分子の固有特性である質量を非常に高い感度で測定するため、価値のある分析技法である。したがって、MSは、広範なバイオマーカー分子および広範な試料採取した物質を測定するために使用することができる。MSシグナル生成およびスペクトル分解および感度には、正しい試料調製が重要であることが知られている。したがって、試料調製は、分析の全体的な実現可能性および感度の重要な領域である。

#### 【0144】

バイオマーカーを質量分析特徴付けするための好ましい方法としては、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)およびエレクトロスプレーイオン化法(ESI)が挙げられる。いずれも、有利には、飛行時間型(TOF)または他のタイプの質量分析センサーと組み合わせて、バイオマーカーの質量および/または断片化パターンを決定することができる。好ましくは、質量分析法は、クロマトグラフィー技法および本明細書中の他の分離技法とタンデムで使用することができる。

#### 【0145】

MALDIは、試料をレーザーでパルスすることにより作用する。この処理により、試料が気化およびイオン化される。その後、荷電イオンの分子量(質量)が、TOF分析機で決定される。このデバイスでは、電場により、荷電分子が検出器に向けて加速され、イオン化された断片が検出器に到達するまでにかかる時間の長さ、つまり飛行時間の差により、バイオマーカーの分子量が明らかになる。この場合、より小さな分子がより速く検出器に到達する。

#### 【0146】

この方法では、試料の質量プロファイル、つまり混合物中の化合物の分子量および量のプロファイルが生成される。その後、こうしたプロファイルを使用して、バイオマーカーデータベースから既知のバイオマーカーを特定することができる。

#### 【0147】

ESI-MSが液体クロマトグラフィーと接続されている場合(LC/MS/MS)、LCカラムから溶出する化合物が、質量分析計のイオン源内に導入される。細針に電圧が印加される。その後、針により液滴が質量分析機内に噴霧され、そこで液滴が気化され、バイオマーカーイオンが、断片化された様々な電荷状態に応じて放出され、それにより組成物を決定することができる。あるいは、SPE(固相抽出法)またはガスクロマトグラフィーを、質量分析計と接続してもよい。特に、SPE/MS/MSは、Agilent Rapidfire MS装置(Rapidfireは、Agilent Inc.社の登録商標である)、またはレーザーダイオードもしくは熱イオン脱離LDID装置の使用など、本方法の自動化ハイスループット工業応用に有用であることが見出された。

#### 【0148】

タンデム型質量分析法(MS/MS)は、標的ガスと衝突させることにより前駆イオンを活性化することを含み、荷電および中性断片を生成することができる。断片イオンの性質ならびにそれらの強度は、前駆イオンの構造を示すことが多く、したがって、未知分析物を特定するための有用な情報をもたらす、ならびに異なるクラスの分析物の有用なスクリーニング技法を提供することができる。複数の衝突による活性化は、活性化時間を延長し、かつより大きなエネルギーが前駆イオンに付与されることを可能にする。また、より高い衝突ガス圧力は、より高い衝突緩和速度を意味する。

#### 【0149】

好ましくは、本発明による胚特徴の決定は、非破壊方法として実施される。つまり、所望の場合、そのようにして試験した胚を成長させることができるか、または胚が成育可能である場合は、卵内ワクチン生産などのさらなるステップに供することができる。

#### 【0150】

10

20

30

40

50

本明細書では、「尿膜腔液」という用語は、トリ卵に由来するような他の卵物質が存在するまたは存在しない尿膜腔液を包含する。例えば、尿膜腔液という用語は、血液および尿膜腔液の混合物を含んでいてもよい。本発明の実施形態は、尿膜腔液から、または卵の上部表面付近の領域から物質を抽出することに限定されない。本明細書に記載のように尿膜腔液から物質を取り出すことは、本発明の考え得る実施形態の1つの例として提供されているに過ぎない。これらに限定されないが、羊膜、卵黄、殻、卵白、組織、膜、および/または血液を含む種々の物質を卵から抽出し、アッセイし、分光光度分析に供して、下記に記載されているように胚の性別を特定することができる。

【0151】

所望の場合、物質は、事実上任意の配向性を有する卵から抽出することができる。本明細書では、「所定の場所」という用語は、卵内の一定の位置または深さを示す。例えば、デバイスは、卵の一定の深さおよび/または一定の位置へと卵に注入することができる。代替的な実施形態では、注入は、卵から得られる情報、例えば卵内部の胚または胚下腔の位置に関する情報に基づいて実施することができる。

10

【0152】

あるいは、特に、軟体類、魚、またはエビ卵の場合、そのような卵は、トリ卵と比較して高度に半透明であり、ならびに比較的小型であるため、卵全体の直接非侵襲的測定により直接非侵襲的分析することが可能な場合がある。

【0153】

「スペクトルを比較する」という用語は、有利には、測定したスペクトルの単変量または好ましくは多変量分析、およびトリ胚とある集団との関連性の決定を含んでいてもよい。このステップは、スペクトルデータの多変量統計分析により、あるシグナルピークがスペクトラムに存在することを決定することを含んでいてもよい。多変量統計分析プログラムは、好ましくは、主成分分析プログラムおよび/または部分最小二乗回帰分析プログラムを含む。したがって、主題の発明は、トリ胚の性別および/または成育能を卵内で決定するためのプロセス、装置、およびシステムであって、多変量統計分析プログラムならびにそれらを決定するためのマイクロプロセッサ実施プロセスを含む、プロセス、装置、およびシステムにも関する。

20

【0154】

したがって、比較は、好ましくは、測定されたスペクトルの多変量分析を使用して試料の性別の可能性を評価すること、およびトリ胚とある集団との関連性を決定することを含む。これは、部分最小二乗判別分析法(PLS-DA)を使用して実施されることが有利である。

30

【0155】

このプロセスは、好ましくは、トレーサー化合物データの数学的処理を含み、PCA(プリンシプル成分分析)などの多変量分析、好ましくはその後の管理下分析、より好ましくはPLS-DA(部分最小二乗判別分析)、またはさらにより好ましくは直交性PLS-DA、または類似の好適な統計手法を含む。

【0156】

主題のプロセスのパターンマッチングステップは、ある類似性尺度を特定することになる。その類似性尺度を使用して、バイオマーカーの正しい構造を確認する。この確認は、スペクトルマッチングによりなされる。スペクトルマッチングは、試料スペクトルおよびデータベース中の参照スペクトルを比較することにより実施される。この段階での陽性特定には、正確な決定を確認するために、好適な相関性が必要とされる。好適な閾値および類似性尺度は、当業者であれば明白であろう。

40

【0157】

このプロセスでは、大量のデータを扱いやすいサイズに低減し、観察されたデータ間の隠れた関係性を示す潜在的変数を決定するために、統計的に駆動されるモデルを適用することが試みられる。

【0158】

50

その後、性別識別機能は、試料データにフィルターをかけ、それにより試料間にわたって目的クラスターが特定されることになる。このクラスターは、試料間にわたる類似性を表わし、性別プロファイルを特定するために使用される。好ましくは、分析は、主成分分析（PCA）およびPLS-DAを含む。

【0159】

PCAでは、数学的なアルゴリズムを使用して、データセット内の差異および類似性が決定される。PCAでは、多数の関連する可能性のある変数が、プリンシプル成分と呼ばれる少数の無関連変数に変換される。第1のプリンシプル成分は、データの多様性をできるだけ反映する。各追加成分は、データ中の残りの多様性をできるだけ反映することを試みる。収集したデータは行列に方形配置することができ、PCAは、平方和および外積により正方対称行列の「固有値」および「固有ベクトル」を解く。

10

【0160】

最大固有値に関連する固有ベクトルは、第1のプリンシプル成分と同じ方向を有する。2番目に大きな固有値に関連する固有ベクトルは、第2のプリンシプル成分の方向を決定する。固有値の合計は、正方行列のトレースと等しく、固有ベクトルの最大数は、この行列の行（または列）の数と等しい。決定後、算出した固有値のスクリーンプロットを図示することが可能である。当業者であれば、多数の異なるアルゴリズムを使用して、固有値および固有ベクトルを計算することができることを認識するだろう。データは、以下の2つのプロットを使用して表示される。i) グループクラスタリングを示すスコアプロット、およびii) グループクラスタリングをもたらすスペクトルデータが、原点から最大距離にあるものとして特定されるローディングプロット。

20

【0161】

本発明によるプロセスは、好ましくは、(a1) 卵流体を含む試料を準備すること、および(a2) 試料からスペクトルを得ることを含む。好ましくは、ステップ(b)は、任意の2つの試料間の濃度差による強度効果を正規化するステップをさらに含む。任意選択のステップ(a3)では、好ましくは、限外ろ過または遠心分離などの好適な方法により、試料から濁りが除去される。

【0162】

好ましくは、胚は、トリ胚、爬虫類胚、甲殻類、魚類、または軟体類である。最も好ましくは、家禽飼育は重要性が高いため、およびその卵が比較的大型であり、つまり試料採取が可能であるため、トリ胚が試験に供される。

30

【0163】

本方法は、有利には、卵中の胚が成育可能で雄であるか、または成育可能で雌であるかを決定すること、および試験した卵を多数の成育可能な雌卵と多数の成育可能な雄卵と多数の成育不能な卵とに分離して、雄卵が圧倒的に多い選択群または雌卵が圧倒的に多い選択群または成育不能な卵が圧倒的に多い選択群を形成することができる。所望の場合、成育可能な雌卵または雄卵の選択群を、孵卵および孵化プロセスに供して、雌動物が圧倒的に多い集団または雄動物が圧倒的に多い集団を形成することができる。

【0164】

構成および作業方法の両方に関して本発明を特徴付ける特徴、ならびにそのさらなる目的および利点は、添付の図面と共に使用される以下の説明からより良好に理解されるだろう。図面は、図示および説明のためのものであり、本発明の範囲を規定することは意図されていないことが明示的に理解されるべきである。本発明により達成されるこれらおよび他の目的ならびに提供される利点は、これより下記の説明を添付の図面と共に読むと、より完全に明白になるだろう。

40

【0165】

本発明の実施形態による方法および装置は、その孵卵期間とも呼ばれる胚発生期間中の任意の期間に卵の1つまたは複数の特徴を特定するために使用することができる。本発明の実施形態は、胚発生期間中の特定の日に限定されない。

【0166】

50

本発明の方法は、内部標準物質を使用して、シグナル強度を定量化するための参照を提供する様式、およびそのような標準物質を用いない様式の、2つの様式で実施することができる。したがって、1つの実施形態では、質量分析法による分析の前に、1つまたは複数の内部標準物質が試料に添加される。好ましくは、内部標準物質は、標識されている。有利には、その後、バイオマーカーシグナル強度を測定し、それを1つまたは複数の既知内部標準物質のシグナル強度と比較することにより、各バイオマーカーシグナルの絶対シグナル強度をスコア化することができる。代替的な実施では、試料は、内部標準物質を添加せずに処理される。そのような実施形態では、試料中の個々のバイオマーカーシグナル強度と、試料群の参照シグナル強度との比を測定することにより、相対シグナル強度がスコア化される。

10

【0167】

類似性尺度は、好ましくは、滞留指標および正相関シグナルと関連する断片化パターンを関連させることを含む。

【0168】

さらに、統計的に有意な類似性は、関連バイオマーカー同一性または複数バイオマーカー同一性として検出および登録することができる。統計的に有意な類似性の決定は、データベース、ならびに本方法論の要求を満たすように開発されたアルゴリズムを使用することを含む。

【0169】

これは、特に、新しい種のバイオマーカーの有用性を決定する場合、管理下多変量分析、好ましくは部分的最小二乗判別分析、PLS-DA、または直交性部分最小二乗判別分析をデータに適用することを含む。

20

【0170】

好ましくは、決定しようとする特徴は、卵中の胚の性別、年齢、発生段階、および/または成育能を含む。工業応用の場合、多数の卵が、1つまたは複数の胚の特徴について検査される。

【0171】

本発明による方法では、ある種に関するデータベースは、試料に存在するバイオマーカーをスクリーニングし、化合物が質量検出器に到達する時間と相関する滞留時間指標に基づいて不要なシグナルを除去することにより確立することができる。したがって、多数の配列を数分で分析し、所与のバイオマーカーを、高い信頼性で特定することができる。したがって、本方法は、自動化可能でハイスループットであり、比較的未熟練の技術者により運用可能であり、したがって、遠隔地、例えば孵卵場、養鶏場、または養魚場での使用に好適である。

30

【0172】

試料は、前分離手順を行わずに質量分析に供してもよい。そのような実施形態では、試料は、好ましくは、例えば静的ナノエレクトロスプレー原理、フローインジェクション分析、または試料を濃縮したフローインジェクションを用いた直接注入により分析される。

【0173】

質量分光分析システムは、好ましくは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)MS、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)MS、または表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型(SELDI-TOF)MS、またはレーザーダイオードイオン化脱離(LDID)MSである。

40

【0174】

特に、SPE/MS/MSは、Agilent Rapidfire MS装置(Rapidfireは、Agilent Inc.社の登録商標である)、Phytronics LDTD(レーザーダイオード熱脱離)イオン源(LDTDは、Phytronics Inc.社の登録商標である)の使用などの、本方法の自動化ハイスループット工業応用に有用であることが見出された。

【0175】

50

上記に示されているように、本発明は、胚の性別、成育能、および/または発生段階を決定するための餌製品、ならびに動物餌中のトレーサー前駆体化合物の使用にも関する。本出願人は、驚くべきことに、排卵親の餌に好適な前駆体化合物を添加することにより、胚発生中の卵内での前駆体化合物の代謝物質の発現が異なることを見出した。

#### 【0176】

その結果、卵は、胚の性別などの胚の特徴に応じて、ある代謝物質の測定可能な変化を示す。好ましくは、少なくとも1つのトレーサー前駆体化合物は、米国食品医薬品局(FDA)および/または欧州委員会により許容可能な食品添加物として列挙されている化合物から選択される。特に好適なトレーサー前駆体化合物は、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)および/または関連化合物ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)から選択してもよい。これらは、脂肪を保存するために食品に好適に添加されるフェノール化合物である。BHAは、本明細書では、異性体3-tert-ブチル-4-ヒドロキシアニソールおよび2-tert-ブチル-4-ヒドロキシアニソールの混合物を指し、BHTは、メチル-ジ-tert-ブチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチル-パラ-クレゾールとしても知られている3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシトルエンを指す。BHAおよびBHTは、公知の酸化防止剤であり、酸素が、酸化され易い油脂ではなく、BHAまたはBHTと優先的に反応し、それにより油脂の劣化が防止されると考えられている。酸化可能なことに加えて、BHAおよびBHTは脂溶性である。トレーサー前駆体物質は、好ましくは、製品中のトレーサー化合物または各トレーサー化合物が所定の濃度になるように計算された量で餌製品に添加される。好ましくは、トレーサー前駆体物質は、卵または卵試料中のトレーサー化合物または各トレーサー化合物が、5ppb~5ppmの範囲の、より好ましくは約10~1000ppbの範囲の、さらにより好ましくは50~500ppbの濃度になるように計算された量で製品に添加される。

#### 【0177】

トレーサー物質は、有利には、1つよりも多くのトレーサー化合物を含んでいてもよく、トレーサー化合物の相対量は、オビパリアン胚の、性別、成育能、および/または発生段階の特定可能な特徴を提供するように選択され、卵または卵の試料の分析は、トレーサー化合物の特徴的な相対量を特定するために実施される。分析は、好ましくは、例えばイオン移動度センサーなどの質量分析計を使用して実施される。まず、試料を、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、または好ましくは好適なセンサーと接続されているガスクロマトグラフィーの組合せに供してもよい。MSセンサーの代替品は、炎光光度検出器であってもよい。

#### 【0178】

好ましくは、卵流体を侵襲的にまたは非侵襲的に分析するステップ後、卵から採取された試料に存在するトレーサー化合物の少なくとも1つを、分析の前に分離、誘導體化、または濃縮してもよい。好ましくは、特徴が調査される胚は、トリ胚、爬虫類胚、甲殻類胚、魚類胚、または軟体類胚である。より好ましくは、胚は、好ましくはガルス・ガルス・ドメスティクス種のトリ胚であるか、または胚は、クルマエビ科(Peneidae)、ザリガニ上科、およびミナミザリガニ科、テナガエビ科(Macrobriachiaea)、ザリガニ上科、ミナミザリガニ科、アカザエビ科、およびウミザリガニ科を含む群から選択される甲殻類種の胚であるか、または胚は、好ましくは、コイ、ティラピア、ナマズ、シーブリーム、シーバス、マグロ、サバ、カツオ、またはブリ(yellowtail)から選択される魚類種の胚である。

#### 【0179】

また、本発明は、好適な量のトレーサー前駆体化合物を含む、排卵親動物に使用される餌製品に関連する。

#### 【0180】

試料に関する性別の可能性の評価は、好ましくは、管理下多変量分析、好ましくは、部分最小二乗判別分析、PLS-DA、または直交性部分最小二乗判別分析法をデータに適用することを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 8 1 】

有利には、外れ値を集団から除外し、それにより決定の確実性をさらにより増加させると共に、他の目的に使用される卵の流動に寄与することができる。

## 【 0 1 8 2 】

本方法は、有利には、卵を多数の雄卵または雌卵に分離することをさらにも含み、また、有利には、胚の成育能を決定し、卵を1つまたは複数の、好ましくは多数の成育可能な卵および成育不能な卵に分離することをさらにも含んでいてもよい。

## 【 0 1 8 3 】

本方法は、外れ値が集団から除外され、有利には、卵中の胚が成育可能で雄であるか、または成育可能で雌であるかを決定すること、および多数の成育可能な雌卵と多数の成育可能な雄卵と外れ値とを分離して、雄卵が圧倒的に多い選択群または雌卵が圧倒的に多い選択群を形成することをさらにも含む。

10

## 【 0 1 8 4 】

本方法は、有利には、成育可能な雌卵または雄卵の選択群を、孵卵および孵化プロセスに供して、雌動物が圧倒的に多い集団または雄動物が圧倒的に多い集団を形成することをさらにも含む。

## 【 0 1 8 5 】

胚の成育能は、有利には、測定されたバイオマーカーを使用して決定することができる。不受精卵、ならびにある期間後（つまり代謝終了後の数分間に死滅した胚の場合、測定結果は、完全に測定窓の外側にあることが明らかであり、成育可能な卵から除外される外れ値に結び付く。同様に、少なくともトリ胚の場合、例えば尿膜試料を使用すると、こうした非常に迅速な代謝終了後の活性が攪乱され、卵黄の分離を維持する膜が溶解することにより最終的に黄色になるだろう。加えて、心拍動または血流を測定して、胚の代謝活性を決定することができる。

20

## 【 0 1 8 6 】

また、本発明は、動物および/もしくはヒト食料生産のための、化粧用、医療用、および/もしくは栄養用化合物の生産および/もしくは単離のための、発酵によるメタン生産のための、ワクチン生産のための、ならびに/または高品質肥料生産のための、本明細書で開示された方法から得ることができる多数の卵の使用に関する。

## 【 0 1 8 7 】

以下の非限定的な例は、本発明を例示するために提供されている。

30

## 【実施例】

## 【 0 1 8 8 】

## [実施例 1]

## 試料発送および保管

バイオマーカー発見のために、複数の分析的代謝物質プロファイリングプラットフォームを使用した。それらは、生体アミン、陰極性脂質、非標的グローバルプロファイリング、およびGC - MSだった。

## 【 0 1 8 9 】

発見局面では、100個の試料を分析した。栄養および品種の背景が異なる卵に由来する350個の試料の別のセットを、確認局面で分析し、性別および年齢のバイオマーカーが、少なくとも2つのプラットフォームで見出されたことが判明した。

40

## 【 0 1 9 0 】

尿膜腔液（ブラウンニワトリ（brown chicken）に由来する）の第1の150個の試料を、孵卵7～11日目に収集し、-80 で保管した。

## 【 0 1 9 1 】

PCR法を使用して、これら試料の遺伝的性別決定データを準備した。日毎性別毎に試料を選択し、現セットの過剰試料をNMR分析に使用した。その後、これら試料の代謝プロファイルを、アミン、極性陰性脂質、CG - MS（糖化合物用）、およびグローバルプロファイリングプラットフォームを使用して分析した。

50

## 【0192】

さらに300個の尿膜腔液試料を、ブラウンニワトリの孵卵7～11日目に孵卵場で収集した。

## 【0193】

遺伝的性別分析がもたらされたが、統計モデル構築まで使用しなかった。これら試料を使用して、以前のグローバルプロファイリング分析で見出された特徴を確認した。加えて、白卵(Hey系CV24)から59個の試料を収集し、それらもこの確認研究に使用した。

## 【0194】

## アリコート

アリコートする前に、試料を4で一晚解凍した。試料をボルテックスし、以下の通り手作業でアリコートした。アミノプロファイリング用に5 $\mu$ L、極性陰性脂質プロファイリング用に50 $\mu$ L、およびGC-MS(糖化合物分析)用に100 $\mu$ L。各試料から等量を取り、その後よく混合することにより、品質管理(QC)プールを生成した。

## 【0195】

## バッチ設計

発見局面では、試料を無作為化し、アミン測定用に2つのバッチへと分配した。陰性脂質およびグローバルなプロファイリングの場合、試料を1つのバッチで分析した。7試料毎に重複試料を選択した。較正系、QC、およびブランクも含まれていた。10試料毎にQCを分析した。それらを使用して、データ品質を評価し、機器応答を補正した。ブランクを使用して、研究試料からバックグラウンドレベルを差し引いた。

## 【0196】

生データを、Agilent MassHunter定量分析ソフトウェア(Agilent社、バージョンB.05.01)を使用して前処理した。

## 【0197】

## アミノプロファイリング

言及されている装置、補給品、およびソフトウェアはすべて、別様の指示がない限り、Waters社(Etten-Leur、オランダ)からのものである。Waters社からのものを適用したAccQタグ誘導体化戦略が使用されるアミノプラットフォームは、アミノ酸および生体アミンをカバーする。手短かに言えば、尿膜腔液試料(各5 $\mu$ L)を、内部標準溶液でスパイクし(表1)、その後MeOH(Actu-All Chemicals社)除タンパク質を行った。上清(10,000rpm、10、10分間)を、真空条件下で乾燥した。残留物を、6-アミノキノリル-N-ヒドロキシサクシニミジルカルバマート(AQC)試薬を有するホウ酸緩衝液(pH8.5)に再構成した。誘導体化反応を、10 $\mu$ Lの20%ギ酸(Acros Organics社)で中和した。上清(10,000rpm、10、10分間)をバイアルに移し、UPLC-MS/MSシステムへの注入(1 $\mu$ L)まで、冷却(10)オートサンプラートレーに入れておいた。

## 【0198】

## データ分析

獲得したデータを評価し、帰属させたMRMピークを、TargetLynxソフトウェアを使用して統合した。適切な内部標準物質を使用してMRMピークを正規化し、アミノ酸の分析には、それらの13C15N標識類似体を使用し、他のアミンには、最も近くに溶出した内部標準物質を使用した。ブランク試料を使用して、バックグラウンドを補正した。自己開発したアルゴリズムを、プールしたQC試料を使用して適用し、質量分析計の感度の変化をバッチにわたって補正した。

## 【0199】

探索的データ分析を実施して、性別的特徴を発見することができたか否かを調査した。この単変量および多変量の場合、標準的データ分析法を、本発明者らがバイオマーカーを発見するために通常使用するBMFLに適用した。

10

20

30

40

50

## 【0200】

その後、試料を、自動化ハイスループット接続SPE/MS/MS Rapidfire装置、ならびにLDPD Phytrolix装置での試験に供した。結果は、成育可能な卵の性別が、95%を超える正確性で、1試料当たり10秒未満で決定されることを示す。図1には、得られた性別決定の確実性が示されており、確実性は、2つのバイオマーカーを共に考慮した場合、9または10日目に95%超に達した。

## 【0201】

## 孵化

上記に示されている試料採取に供され、雄または雌とみなされた一連の25個の卵は、試験を、市販の孵卵装置および典型的な孵卵条件を使用した孵化へと進めた。幼体はすべて効果的に卵から出現し、試料採取の成育能を示した。孵化したヒナは、完全に雄の集団または完全に雌の集団のいずれかだった。

## [実施例2]

## 揮発物および固相マイクロ抽出(SPME)を使用した非侵襲的決定

揮発性試料収集は、アルミニウムホイルおよび金属蓋で密封されたガラスジャーに単一の卵を移すことにより実施した。その後、ジャーを加温板に置いて、ジャー内部の温度を37に維持した。ジャー内の卵を15分間静置して、ジャーの上部空間を平衡状態に到達させた。回収ファイバー材料を、製造業者の説明書に従って使用前に前処理した。その後、ファイバーを挿入し、50分間にわたって抽出を実行した。抽出後、ファイバーを、ガスクロマトグラフィンジェクターに5分間にわたって導入し、スプリットレスモードで250にて分析物を離脱させた。揮発物収集後直ちに、卵を孵卵器に戻した。空のジャーに対してSPMEを行うことによりブランクを製作し、分析前にファイバー前処理を実施して、ピークの非存在およびSPME手順の良好な品質を保証した。

## 【0202】

その後、卵から放出された揮発物を、Agilent Technologies社製質量選択的検出器(MSD5975C)を装備したAgilent Technologies社製(ウィルミントン、デラウェア州、USA)7890Aでのガスクロマトグラフィーにより測定した。クロマトグラフ分離は、流速が1mL/分のヘリウムをキャリアガスとして使用して、25mの膜厚を有するHP-5MS UI(5%Phenyl Methyl Silox)30m×0.25mm IDカラム(Agilent社)で実施した。シングル四重極質量分析計を電子イオン化(EI、70eV)で使用した。質量分析計は、SCANモードで操作した。揮発性化合物の抽出は、ホルダー付きの60µm PDMS/DVB Stableflex 24ゲージ固相マイクロ抽出(SPME)ファイバーを使用した。生データを、MSD Chemstation F.01.00.1903を使用してCDF形式に変換した。ピーク選択を実施するために、XCMSスクリプトを設計し、Rソフトウェア(Rバージョン3.2.0)に適用した。そのために使用した方法は、' 'matchedFilterであり、fwhm=4(ピーク幅)、ステップ=0.5(質量窓)、およびsnthresh=5(S/N)だった。Metaboanalyst 3.0を統計分析に使用した。最後に、MassHunter Qualitative Analysis B.005.00を使用して、得られた結果に従って最も重要な特徴を手作業で確認した。NIST質量スペクトルライブラリーバージョン2.0を使用して、特定を行った。

## 【0203】

このプロセスでは、滞留時間が異なり質量が異なる1486個の特徴が、各試料のTICから得られた。これら特徴は、抽出された後、metaboanalyst 3.0を使用して単変量法を試験に適用し、99%の信頼性で性別識別特徴を特定することにより処理した。

## 【0204】

本出願人は、雄卵と雌卵とで統計的に有意な差を示す特に関連するバイオマーカーは、前駆体であるBHTの誘導体であるブチル化ヒドロキシルエンであることを見出した。

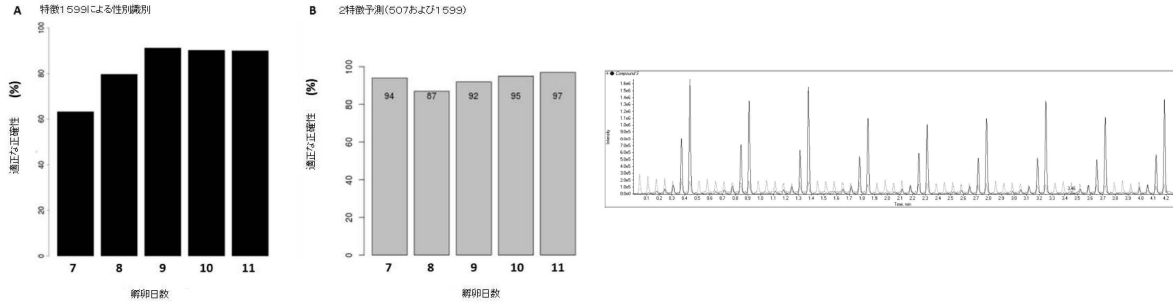
【 0 2 0 5 】

雌卵は、雄卵と比較して、著しくより高い濃度のブチル化ヒドロキシトルエンを示した。このように、トレーサー前駆体の使用は、完全に非侵襲的な様式により高い確実性で、雄および雌二ワトリ胚を卵内で識別することを可能にしたバイオマーカーに結び付いた。

【 図 面 】

【 図 1 】

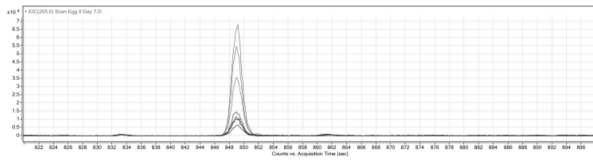
【 図 2 】



10

20

【 図 3 】



30

40

50

---

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

オランダ(NL)

(31)優先権主張番号 2017382

(32)優先日 平成28年8月29日(2016.8.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

オランダ(NL)

(56)参考文献 国際公開第98/014781(WO, A1)

特表2015-523097(JP, A)

特表2009-540319(JP, A)

特開2012-042471(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G01N 27/60 - G01N 27/70

G01N 33/48 - G01N 33/98