

(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2021-526793  
(P2021-526793A)

(43) 公表日 令和3年10月11日(2021.10.11)

| (51) Int.Cl.         | F I        | テーマコード (参考) |
|----------------------|------------|-------------|
| AO1K 61/13 (2017.01) | AO1K 61/13 | 2B104       |
| AO1N 51/00 (2006.01) | AO1N 51/00 | 4H011       |
| AO1N 43/40 (2006.01) | AO1N 43/40 | 101C        |
| AO1P 7/00 (2006.01)  | AO1P 7/00  |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)

|                    |                              |          |                       |
|--------------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2020-567594 (P2020-567594) | (71) 出願人 | 518274179             |
| (86) (22) 出願日      | 令和1年5月31日 (2019.5.31)        |          | ベンチマーク アニマル ヘルス リミテッド |
| (85) 翻訳文提出日        | 令和2年12月3日 (2020.12.3)        |          | イギリス エス35 1キューエヌ サウス  |
| (86) 国際出願番号        | PCT/GB2019/051519            |          | ヨークシャー シェフィールド スミシー   |
| (87) 国際公開番号        | WO2019/234396                |          | ウッド ドライブ 8 ベンチマーク     |
| (87) 国際公開日         | 令和1年12月12日 (2019.12.12)      |          | ハウス                   |
| (31) 優先権主張番号       | 1809374.0                    | (74) 代理人 | 100107766             |
| (32) 優先日           | 平成30年6月7日 (2018.6.7)         |          | 弁理士 伊東 忠重             |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 英国 (GB)                      | (74) 代理人 | 100070150             |
| (31) 優先権主張番号       | 1809620.6                    |          | 弁理士 伊東 忠彦             |
| (32) 優先日           | 平成30年6月12日 (2018.6.12)       | (74) 代理人 | 100135079             |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 英国 (GB)                      |          | 弁理士 宮崎 修              |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 魚類からの外部寄生虫類の除去処理

(57) 【要約】

水中の魚から、シラミ等の外部寄生虫を除去する方法であって、以下の：(i)ネオニコチノイドを投与して、前記魚から前記外部寄生虫を除去する工程；及び、(ii)除去された前記外部寄生虫を含む水を置換水で交換して、前記除去された外部寄生虫と魚を分離する工程；を含む方法が提供される。当該ネオニコチノイドは、イミダクロプリドではなく、かつ、飼料内投与用には構成又は処方されていない。当該魚は、サケ科魚、イワナ属魚、又は掃除魚であり、かつ、当該ネオニコチノイドは、致死未満量及び/若しくは致死未満時間、致死量及び/若しくは致死時間、又は、外部寄生虫をロックダウンする量で適用される。当該方法は、さらに、例えば、前記除去された外部寄生虫を含む水の試料から前記外部寄生虫を採取することにより、例えば、前記試料をフィルタ、好ましくはメッシュフィルタに通すことにより、前記除去された外部寄生虫の環境への放出を防ぐ工程を含む。本方法で使用するネオニコチノイドも提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

水中の魚から外部寄生虫を除去する方法であって、以下の：

( i ) ネオニコチノイドを投与して、前記魚から前記外部寄生虫を除去する工程；及び、

( i i ) 除去された前記外部寄生虫を含む水を置換水で交換して、前記除去された外部寄生虫と魚を分離する工程；を含む方法であって、ここで、

前記ネオニコチノイドは、イミダクロプリド、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではなく；かつ、

前記ネオニコチノイドは、飼料内投与用には構成又は処方されていない、方法。

10

## 【請求項 2】

前記ネオニコチノイドは、1 ~ 500 ppm、1 ~ 200 ppm、20 ~ 200 ppm、1 ~ 64 ppm、10 ~ 64 ppm、10 ~ 50 ppm、50 ppm以上、100 ppm以上、又は200 ppm以上の濃度 ( w / v ) で投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ネオニコチノイドは、180分以下、120分以下、60分以下、30分未満、20分未満、15分以下、10分未満、又は5分以下で適用される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記魚は、サケ科魚、イワナ属魚、又は掃除魚 ( cleaner fish ) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記ネオニコチノイドは、致死未満量及び / 若しくは致死未満時間で適用され、並びに / 又は、前記ネオニコチノイドは、外部寄生虫をノックダウンする量で適用される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記ネオニコチノイドは、投与される唯一の外部寄生虫駆除剤である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記ネオニコチノイドは、クロチアニジン、ジノテフラン、アセトアミプリド、イミダクロプリド、ニテンピラム、ニチアジン、チアクロプリド若しくはチアメトキサム、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 8】

前記ネオニコチノイドは、チアメトキサム、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではない、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記ネオニコチノイドは、クロチアニジン、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではない、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

さらに、以下の：

( i i i ) 前記除去された外部寄生虫の環境への放出を防ぐ工程；を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

前記除去された外部寄生虫の放出を防ぐ工程は、前記除去された外部寄生虫を含む水の試料から前記外部寄生虫を採取する工程を含む、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

外部寄生虫駆除剤及び外部寄生虫を含む水の除染方法であって、以下の：

( i ) 水の試料を採取する工程；

( i i ) 前記試料から前記外部寄生虫を採取する工程；

50

を含む、方法。

【請求項 13】

前記水の試料から前記外部寄生虫を採取する工程は、前記試料をフィルタ、好ましくはメッシュフィルタに通すことを含み、場合によっては、前記フィルタのサイズは、少なくとも  $0.2 \mu\text{m}$ 、少なくとも  $30 \mu\text{m}$ 、少なくとも  $60 \mu\text{m}$ 、又は少なくとも  $150 \mu\text{m}$  の孔又はギャップである、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記外部寄生虫は、船虫 (sea louse) である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

生存する前記外部寄生虫を、場合によっては、外部寄生虫駆除剤を適用して、死滅する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

魚の外部寄生虫の寄生の処理の使用のためのネオニコチノイドであって、前記ネオニコチノイドはイミダクロプリド、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではなく、前記ネオニコチノイドは飼料内投与用に構成又は処方されていない、使用のためのネオニコチノイド。

【請求項 17】

前記ネオニコチノイドは、180分以下、120分以下、60分以下、30分未満、20分未満、15分以下、10分未満、又は5分以下で投与される、請求項 16 に記載の使用のためのネオニコチノイド。

【請求項 18】

前記ネオニコチノイドは、1 ~ 500 ppm、1 ~ 200 ppm、20 ~ 200 ppm、1 ~ 64 ppm、10 ~ 64 ppm、10 ~ 50 ppm、50 ppm 以上、100 ppm 以上、又は 200 ppm 以上の濃度 (w/v) で投与される、請求項 16 又は 17 に記載の使用のためのネオニコチノイド。

【請求項 19】

前記外部寄生虫は、船虫である、請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の使用のためのネオニコチノイド。

【請求項 20】

前記魚は、サケ科魚、イワナ属魚、又は掃除魚である、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の使用のためのネオニコチノイド。

【請求項 21】

前記ネオニコチノイドは、クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド、アセトアミプリド、ニテンピラム、ニチアジン、チアクロプリド若しくはチアメトキサム、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルである、請求項 16 ~ 20 のいずれか一項に記載の使用のためのネオニコチノイド。

【請求項 22】

前記ネオニコチノイドは、チアメトキサム又はその医薬上有効な塩若しくはエステルでない、請求項 16 ~ 21 のいずれか一項に記載の使用のためのネオニコチノイド。

【請求項 23】

前記ネオニコチノイドは、クロチアニジン又はその医薬上有効な塩若しくはエステルでない、請求項 16 ~ 22 のいずれか一項に記載の使用のためのネオニコチノイド。

【請求項 24】

前記ネオニコチノイドは、致死未満量及び/若しくは致死未満時間で適用され、並びに/又は、前記ネオニコチノイドは、外部寄生虫をノックダウンする量で適用される、請求項 16 ~ 23 のいずれか一項に記載の使用のためのネオニコチノイド。

【請求項 25】

1 又はそれ以上の外部寄生虫駆除剤を含む魚の外部寄生虫の寄生の処理に用いる組成物であって、1 又はそれ以上の前記外部寄生虫駆除剤の1つが、請求項 16 ~ 24 のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に記載の使用のためのネオニコチノイドである、組成物。

【請求項 26】

前記組成物がわずか1つの外部寄生虫駆除剤を含む、請求項25に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ネオニコチノイドを用いて、水中の魚から外部寄生虫類を除去する方法、及び魚の外部寄生虫類の寄生の処理におけるネオニコチノイドの使用、1又はそれ以上の外部寄生虫駆除剤を含む、魚の外部寄生虫の寄生の処理用組成物であって、当該1又はそれ以上の外部寄生虫駆除剤の1つが、ネオニコチノイドである組成物に関する。 10

【背景技術】

【0002】

水産養殖における外部寄生虫の寄生は、商業的な関心が高い。さらに、養殖魚の寄生は野生魚種に影響を及ぼしうる。しかしながら、商業的に実行可能な処理数は制限されており、それは、例えば、化学療法剤の環境中への放出、かつ、当該薬剤に対する抵抗性又は他の感受性の低下を獲得する外部寄生虫の出現に関連する懸念のためである。

【0003】

ネオニコチノイドは、ニコチンと化学的に類似する神経活性殺虫剤の一種である。ネオニコチノイドファミリーには、アセトアミプリド、クロチアニジン、イミダクロプリド、ニテンピラム、ニチアジン、チアクロプリド及びチアメトキサムが含まれる。有機リン系殺虫剤やカルバミン酸系殺虫剤と比較して、ネオニコチノイドの鳥類や哺乳類に対する毒性は、昆虫類に対する毒性より低い。 20

【0004】

特許文献1は、ニコチン作動性アセチルコリン受容体のアゴニスト又はアンタゴニストの投与による、魚類の寄生虫の駆除方法に、漠然と関連する。特許文献1の唯一の実施例は、単離した船虫に対して、イミダクロプリドを水浴中で1ppm又は100ppmの濃度でインビトロで活性化する。しかし、特許文献1の試験では、実験室レベルでない、商業的環境下で魚類の単離された船虫(sea lice)にインビボで用いるのに適する用量の指示はない。 30

【0005】

実際、水浸投与法による商業的に実施可能な処理法の開発は、環境及び安全性の問題の観点から困難であった。特に、陸生昆虫への負の影響が認識されているため、ネオニコチノイドの環境中への放出を最小限に抑えることが重要であると考えられてきた。

【0006】

特許文献2は、カルバメート又は有機リン酸塩、ピレスロイド又はピレトリン、及び、場合によっては、以下のクラスの分子：クロロニコチニル；フェニルピラゾール；オキサジアジン；ピラゾール；又は有機塩素；から選択される他の殺生物剤、を含む併用処理を提案する。ただし、魚類処理の実施例の開示はない。

【0007】

特許文献3は、ピレスロイド、有機リン酸塩、及び、場合によっては、以下のクラスの分子：クロロニコチニル；フェニルピラゾール；オキサジアジン；ピラゾール；又は有機塩素、から選択される別の殺生物剤を含む、併用処理を提案する。ただし、魚類処理の実施例の開示はない。 40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】欧州特許出願公開第0590425号明細書

【特許文献2】国際公開第2009/010755号公報

【特許文献3】国際公開第2010/109187号公報 50

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0009】**

したがって、安全性、環境保護的及び処理抵抗性の問題を考慮しうる、魚の外部寄生虫に対する商業的に実行可能な浸水処理が依然として必要である。

**【課題を解決するための手段】****【0010】**

従って、本発明の態様は、水中の魚から外部寄生虫を除去する方法であって、以下の：  
(i) ネオニコチノイドを投与して、前記魚から前記外部寄生虫を除去する工程；及び、  
(ii) 除去された前記外部寄生虫を含む水を置換水で交換して、前記除去された外部寄生虫と魚を分離する工程；を含む方法であって、ここで、前記ネオニコチノイドは、イミダクロプリド、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではなく；かつ、前記ネオニコチノイドは、飼料内投与用には構成又は処方されていない、方法を提供する。

10

**【0011】**

好ましくは、当該処理は浸水処理である。

**【0012】**

好ましくは、当該処理は飼料内処理ではない。

**【0013】**

したがって、ネオニコチノイドが船虫を死滅したり、不活化するだけでは不十分である。代わりに、船虫は、生死にかかわらず、魚から隔離して、採取しなければならず、場合によっては、別個に殺傷する。このように、当該方法によれば、化学的処理を用いて外部寄生虫を殺傷する必要なく、外部寄生虫の寄生を処理することができ、外部寄生虫と魚を分離して、当該外部寄生虫を捕捉しうる。当該方法で除去された外部寄生虫は各々、生存、瀕死状態、死滅のいずれかの状態である。これは、魚からの外部寄生虫の除去前に外部寄生虫を死滅させる方法は、殺傷され、かつしばしばその結果、当該魚に緊密に固定された外部寄生虫を除去するためのさらなるプロセスが必要となるため、特に有利である。水産養殖の文脈では、当該方法はまた、船虫汚染を比較的含まない、実質的に含まない、又は完全に含まない魚介類製品を提供する。

20

**【0014】**

従って、本発明の方法は、外部寄生虫駆除剤に対してある程度の抵抗性を示す外部寄生虫の集団の除去に有利に有用であり、これは、外部寄生虫の死滅に必要な用量を、達成に実用的でないか又は著しい高費用なレベルまで高めうる。この点で、本発明は、処理抵抗性に対する解決策を提供する。

30

**【0015】**

本発明の実施形態では、外部寄生虫は、運動性生活環段階にある。本発明の他の実施形態では、外部寄生虫は、非運動性生活環段階にある。外部寄生虫の個体群内では、外部寄生虫は運動性生活環と非運動性生活環の両段階にある。従って、本発明の実施形態では、当該処理は、運動性及び非運動性の生活環の両段階に対して有効であり得る。

**【0016】**

本発明の実施形態では、ネオニコチノイドは、1 ~ 500 ppm、1 ~ 200 ppm、20 ~ 200 ppm、1 ~ 64 ppm、10 ~ 64 ppm、10 ~ 50 ppm、50 ppm以上、100 ppm以上、200 ppm以上の濃度(w/v)で投与される。

40

**【0017】**

本発明の例示的实施形態では、ネオニコチノイドは、1、2、5、10、15、20、25、30、50、64、100、200、又は500 ppm w/vの濃度で投与される。

**【0018】**

通常、ネオニコチノイドは15 ppm w/v、又は20 ppm w/vの濃度で投与される。

**【0019】**

50

特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、100ppm w/v以上の濃度で5～15分間、好ましくは200ppm w/v以上の濃度で5～15分間投与される。

【0020】

本発明の実施形態では、ネオニコチノイドは、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は全ての外部寄生虫に十分な期間適用して、魚から除去する。

【0021】

従って、本方法は、適当な有効時間を推定しうる工程を含んでよい。従って、この方法は、ネオニコチノイドの投与後にシラミを追跡して、許容可能なレベルの除去（例えば、除去率）を評価し、かつ、許容可能なレベルの除去の達成に必要な用量及び期間を導出することを含み得る。その後、当該パラメータを、許容可能なレベルの除去の達成見込みの知識において、除去のレベルを追跡せずに、現場で方法を適用する場合に用いうる。

10

【0022】

通常、ネオニコチノイドは、180分以下、120分以下、60分以下、30分未満、20分未満、15分以下、10分未満、又は5分以下に適用される。

【0023】

本発明の実施形態では、魚は、サケ科魚、イワナ属魚又は掃除魚（cleaner fish）である。本発明の特定の実施形態では、サケ科は、サケ又はマスである。本発明の特定の実施形態では、掃除魚は、Cyclopteroidea科又はLabridae科由来である。

20

【0024】

ネオニコチノイドは、致死量未満及び/又は致死未満時間の投与が可能である。

【0025】

「致死未満（sublethal）」は、処理の用量及び/又は時間に関してよく、外部寄生虫の死滅に必要な用量及び/又は時間の知識に関して定義されてもよく、いくつかの実施形態では、「致死未満」は、外部寄生虫駆除剤に対してある程度の耐性を発現した外部寄生虫の死滅に必要な用量及び/又は時間に関してよい。好ましい実施形態では、致死未満とは、集団内の全ての外部寄生虫を殺さない処理で、場合によっては4～32の温度である。

30

【0026】

従って、本発明の実施態様は、外部寄生虫がネオニコチノイドによって最初に死滅されなくてよく、むしろ、魚から放出又は振り外されるように誘導される。これにより、野外において潜在的危険物質の使用が最小限に抑えられる。処理密封しても周囲環境から完全に隔離されない場合があるため、適用時間を最小限にすることで、活性物質の漏出が生じうる現場で有用である。濃度は処理時間を通して維持されなければならないため、当該状況下で、処理時間を短縮することで、環境中への薬剤損失を最小限に抑えることができる。

【0027】

当該ネオニコチノイドは、致死量及び/又は致死時間で投与されてよい。

【0028】

当該ネオニコチノイドは、外部寄生虫をノックダウンする用量で投与されてよい。

40

【0029】

本発明の実施形態では、ネオニコチノイドは、4～32、4～24、4～18、4～16、5～15、10～14、又は12～14の温度で適用される。

【0030】

本発明の実施形態では、ネオニコチノイドは、処理中に投与される唯一の外部寄生虫駆除剤である。これは、併用処理の非標的効果がより高いため、環境への負の影響が高いと予想され、耐性出現の可能性が高まるため、併用処理よりも有利である。

【0031】

本発明の実施形態では、ネオニコチノイドは、イミダクロプリド、又はその医薬上有効

50

な塩若しくはエステルである。本発明の他の実施形態では、ネオニコチノイドは、クロチアニジン、ジノテフラン、アセトアミプリド、ニテンピラム、ニチアジン、チアクロプリド若しくはチアメトキサム、又はそれらの医薬上有効な塩若しくはエステルであり得る。

【0032】

本発明の特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド若しくはチアメトキサム、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルである。本発明の特定の態様において、ネオニコチノイドはクロチアニジンである。本発明の特定の態様において、ネオニコチノイドはジノテフランである。

【0033】

本発明の特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、チアメトキサム、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではない。

10

【0034】

本発明の特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、クロチアニジン、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではない。

【0035】

本発明の実施形態では、本方法は、さらに、(iii)前記除去された外部寄生虫の環境への放出を防ぐ工程；を含む。これは、除去された外部寄生虫を含む水の試料から外部寄生虫を採取する形態をとりうる。

【0036】

好ましくは、当該水の試料は、この方法で使用される全ての水である。

20

【0037】

本発明の実施形態では、本方法は、除去された外部寄生虫の採取工程、場合によっては、外部寄生虫の濃縮工程、及び生存寄生虫の死滅工程をさらに含む。これは、ネオニコチノイドが外部寄生虫を死滅させると推定される場合、又はネオニコチノイド投与計画が外部寄生虫を死滅させず、外部寄生虫の単なる除去であることが知られている場合、外部寄生虫の死滅を確実にするために有利である。これは、ネオニコチノイドに対する外部寄生虫又は外部寄生虫の個体群の脱感受性に関する問題の発生の回避に役立つ。生存寄生虫の死滅には、機械的、化学的手段等の適当な手段を用い、通常は外部寄生虫駆除剤を用いる。

【0038】

本発明の実施形態では、ウェルポート等の閉鎖環境で処理された魚は、シーペン等の環境に戻される。

30

【0039】

本発明の特定の実施形態では、生きているかどうか、死んでいるかどうか、瀕死状態であるかどうか、及び/又はロックダウンされているかどうかにかかわらず、それらの卵系が存在する場合にはそれらの卵系を含む、外部寄生虫は、試料をフィルタ、好ましくは篩等のメッシュフィルタに通して採取される。当業者は、当該目的のために適当に指定されたフィルタを入手し、使用することができる。当該フィルタのサイズは、少なくとも0.2 μm、少なくとも0.45 μm、少なくとも5.0 μm、少なくとも10 μm、少なくとも30 μm、少なくとも60 μm、又は少なくとも150 μm、例えば、約150、60、30、又は0.2 μmの孔又はギャップであり得る。一例として、船虫に適するメッシュフィルタのギャップサイズは、約150 μmである。

40

【0040】

本明細書中で用いる用語「ロックダウン」は、ネオニコチノイド等の殺虫剤に反応して、殺虫剤への曝露期間中に、外部寄生虫が、魚等の宿主から物理的に分離する動作をいい、つまり、「ロックダウン」された外部寄生虫とは、曝露期間中、及び殺虫剤に反応して、宿主から物理的に分離した外部寄生虫をいう。

【0041】

本発明の態様は、外部寄生虫駆除剤及び外部寄生虫を含む水の除染方法であって、以下の：

50

( i ) 水の試料を採取する工程；

( i i ) 前記試料から前記外部寄生虫を採取する工程；

を含む方法を提供する。

【 0 0 4 2 】

水の試料から外部寄生虫を採取する工程は、試料をメッシュフィルタに通すことを含んでよい。当該メッシュフィルタのメッシュ又はギャップサイズは、例えば、少なくとも  $60\ \mu\text{m}$  又は少なくとも  $150\ \mu\text{m}$  であり得る。

【 0 0 4 3 】

実施形態では、外部寄生虫は、船虫 ( sea louse ) である。

【 0 0 4 4 】

本発明はさらに、場合によっては、外部寄生虫を濃縮後、生存外部寄生虫を除去する工程を含んでよい。生存外部寄生虫の生存場所では、場合によっては、外部寄生虫駆除剤を適用して死滅しうる。

【 0 0 4 5 】

本発明の態様は、魚の外部寄生虫の寄生の処理の使用のためのネオニコチノイドを提供し、前記ネオニコチノイドはイミダクロプリド、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではなく、前記ネオニコチノイドは飼料内投与用に構成又は処方されていない。

【 0 0 4 6 】

好ましくは、当該ネオニコチノイドは、180分以下、120分以下、60分以下、30分未満、20分未満、15分以下、10分未満、又は5分以下で投与される

好ましくは、ネオニコチノイドは浸水投与用に構成又は処方される。

【 0 0 4 7 】

本発明者らは、ネオニコチノイドが、その生活環の運動段階における外部寄生虫に対してより効果的であることを見出した。従って、本発明の実施形態では、外部寄生虫は、運動性生活環段階にある。本発明の他の実施形態では、外部寄生虫は、非運動性生活環段階にある。外部寄生虫の個体群内では、外部寄生虫は運動性生活環と非運動性生活環の両段階にある。従って、本発明の実施形態では、当該処理は、運動性及び非運動性の生活環の両段階に対して有効であり得る。

【 0 0 4 8 】

本発明の実施形態では、ネオニコチノイドは、1 ~ 500 ppm、1 ~ 200 ppm、20 ~ 200 ppm、1 ~ 64 ppm、10 ~ 64 ppm、10 ~ 50 ppm、50 ppm 以上、100 ppm 以上、又は200 ppm 以上の濃度 ( w / v ) で投与される。

【 0 0 4 9 】

本発明の例示的实施形態では、ネオニコチノイドは、1、2、5、10、15、20、25、30、50、64、100、200又は500 ppm w / v の濃度で投与される。

【 0 0 5 0 】

通常、ネオニコチノイドは15 ppm w / v、又は20 ppm w / v の濃度で投与される。

【 0 0 5 1 】

特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、100 ppm w / v 以上の濃度で5 ~ 15分間、好ましくは200 ppm w / v 以上の濃度で5 ~ 15分間投与される。

【 0 0 5 2 】

このように、ネオニコチノイドは、例えばウェルポートであってよい野外において、魚から外部寄生虫を除去する安全かつ効果的な手段を提供する。

【 0 0 5 3 】

ウェルポート環境は、処理の空間と時間が制限される点で、固有な課題を提示し、かつ、処理済みの船虫が環境中に確実に放出されない点では、さらなるリスクがある。当該課題にもかかわらず、本発明は、有利には、現場での船虫処理に成功し、船虫の処理水からの除去のため、例えば、ウェルポートを陸上に戻さなくてもよく、又は、ウェルポートを

10

20

30

40

50

他の容器に揚水して、処理若しくは陸上輸送をする必要がない。

【0054】

本発明は、外部寄生虫駆除剤又は除去剤シラミの環境中への放出を回避する、いかなる密閉領域での使用又は実施が可能である。本発明の実施形態は、ウェルポート上で実施される。

【0055】

驚くべきことに、本発明者らは、ネオニコチノイドを用いると、アザメチホス又はデルタメトリンよりも外部寄生虫の除去により効果的であることを見出した。

【0056】

ネオニコチノイドはすべての外部寄生虫に対して有効であると考えられている。しかしながら、本発明の実施形態では、外部寄生虫は、船虫である。特定の実施形態では、船虫は *Lepeophtheirus salmonis* である。特定の実施形態では、船虫は、*C. elongatus* 又は *C. rogercressyi* 等のカリガス (*Caligus*) 属である。

【0057】

ネオニコチノイドは、すべての魚類の外部寄生虫の寄生に有効であると考えられている。本発明の実施形態では、魚は、サケ科魚、イワナ属魚又は掃除魚である。本発明の特定の実施形態では、サケ科はサケ又はマスである。本発明の特定の実施形態では、掃除魚は、*Cyclopteroidea* 又は *Labridae* 科由来である。

【0058】

本明細書に記載される本発明の全ての態様及び実施形態では、用語「掃除魚 (*cleaner fish*)」とは、死滅皮膚及び/又は外部寄生虫等の望ましくない物質を除去して、他の魚種に役立つ魚種をいう。本発明のいずれの実施形態でも、掃除魚は、ランプフィッシュ/ランプサッカー (*Cyclopterus lumpus*); *Labridae* 科のラス; カナー (*Tautogolabrus adspersus*); 及び *patagonian blennie* (*Eleginops maclovinus*) からなる群から選択される1又はそれ以上の魚であってよい。*Labridae* 科のラスは、バルーン・ラス (*Labrus bergylta*)、コルクウイング・ラス (*Symphodus melops*)、ロック・クック・ラス (*Centrolabrus exoletus*)、ゴールドシンニー・ラス (*Ctenolabrus rupestris*)、及びカッコウ・ラス (*Labrus mixtus*) からなる群より1又はそれ以上選択しうる。本発明の特定の実施形態では、掃除魚はランプフィッシュ又はラッシュである。

【0059】

本発明の特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、イミダクロプリド、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルである。本発明の他の実施形態では、ネオニコチノイドは、クロチアニジン、ジノテフラン、アセトアミプリド、ニテンピラム、ニチアジン、チアクロプリド若しくはチアメトキサム、又はそれらの医薬上有効な塩若しくはエステルであり得る。

【0060】

本発明の特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、クロチアニジン、ジノテフラン、イミダクロプリド若しくはチアメトキサム、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルである。本発明の特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、クロチアニジンである。本発明の特定の実施形態では、ネオニコチノイドはジノテフランである。

【0061】

本発明の特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、チアメトキサム、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではない。

【0062】

本発明の特定の実施形態では、ネオニコチノイドは、クロチアニジン、又はその医薬上有効な塩若しくはエステルではない。

10

20

30

40

50

## 【0063】

本発明の実施態様は、外部寄生虫がネオニコチノイドによって最初に死滅されなくてよい。そのかわり、外部寄生虫は、魚から放出又は振り外されるように誘導されて、各々の外部寄生虫は、生存状態、瀕死状態又は死滅状態のいずれかである。外部寄生虫はロックダウンされうる。例えば、用いられる外部寄生虫駆除剤に対する感受性が異なりうる船虫の混合集団に寄生された魚を処理する場合、除去済船虫の個体群は、2又はそれ以上の状態の混合物になる可能性がより高い。これにより、野外において潜在的危険物質の使用が最小限に抑えられる。処理密封しても周囲環境から完全に隔離されない場合があるため、適用時間を最小限にすることで、活性物質の漏出が生じうる現場で有用である。濃度は処理時間を通して維持されなければならないため、当該状況下で、処理時間を短縮することで、環境中への薬剤損失を最小限に抑えることができる。その代わりに、外部寄生虫は魚を放出又は飛び降りるように誘導され、それぞれの外部寄生虫は、生きている状態、瀕死状態、死んでいる状態のいずれかになる。された可能性がある。従って、当該実施形態では、外部寄生虫を最初に死滅する必要はないが、処理の間に一部又は全てが死滅されるであろう。外部寄生虫を放出する必要はあるが死滅させなくてよい実施形態では、ネオニコチノイドは、致死未満用量及び/又は致死未満時間で適用され得る。当該実施形態は、外部寄生虫の死滅には、達成に実用的でないか又は高費用なレベルの用量まで用量を高める必要がある場合に、外部寄生虫防除剤に対してある程度の抵抗性を示す外部寄生虫の集団の除去に有利に有用である。この点で、本発明は、処理抵抗性に対する解決策を提供する。

10

## 【0064】

他の実施形態では、ネオニコチノイドは、致死量及び/又は致死時間で適用される。

20

## 【0065】

他の実施形態では、ネオニコチノイドは、外部寄生虫をロックダウンする用量で適用される。

## 【0066】

致死以下の処理の場合、規制要因と優良な実務のため、除去済み外部寄生虫の環境中への放出を回避する措置が必要な場合がある。従って、本発明の実施形態は、除去済み外部寄生虫の環境への放出を阻止する最終工程を含む。

## 【0067】

本発明の実施形態では、ネオニコチノイドは、4～32、4～24、4～18、4～16、5～15、10～14、12～14の温度で適用される。

30

## 【0068】

本発明の別の態様は、1又はそれ以上の外部寄生虫駆除剤を含む魚の外部寄生虫の寄生の処理に用いる組成物を提供し、1又はそれ以上の前記外部寄生虫駆除剤の1つが、本発明に関する使用のためのネオニコチノイドである。

## 【0069】

本発明の特定の実施形態では、当該組成物は、1つの外部寄生虫駆除剤を含む。すなわち、組成物はネオニコチノイドのみを含み、外部寄生虫駆除剤の他の形態を除外する。

## 【0070】

従って、例えば、本発明の実施形態は、ネオニコチノイドを含む組成物を提供するが、カルバメート、有機リン酸、ピレスロイド、ピレトリン、クロロニコチニル、フェニルピラゾール、オキサジアジン、ピラゾール、又は有機塩素から選択される薬剤の1又はそれ以上を除外する。

40

以下、添付の図面を参照して、本発明を例示する：

## 【図面の簡単な説明】

## 【0071】

【図1】イミダクロプリドを5つの濃度(0、10、15、20及び25mg/L)で浸水処理したサケから除去したシラミの割合を示すグラフである。

【図2】イミダクロプリド10mg/L及び20mg/Lでの処理による、処理時間(n=10、t=56分)の関数としての感染魚の割合のカプランマイヤープロットを示すグ

50

ラフである。

【図3】イミダクロプリド、ジノテフラン、クロチアニジン、及び曝露時間が、最大曝露時間で魚をロックアウトした場合の、シラミの割合に及ぼす影響を図3に示す。

【図4】イミダクロプリド、ジノテフラン、クロチアニジン基の曝露後24時間の処理終了時の位置（魚上）に関係なくシラミの反応性を示すグラフである。

【実施例1】

【0072】

イミダクロプリド10、30、50ppmによる処理

1.1. 船虫チャレンジ

各々15匹の魚を入れた8基の流水処理槽を設置した。魚は平均体重約270g、性別は混在するサケ (*Salmo salar*) である。 10

卵性メス *Lepeophtheirus salmonis* から採取した卵糸を採取し、感染性のコペポダイトが産生されるまで培養した。およそ330~350個のコペポダイトを含む8本のボトルを、それぞれ無作為に処理タンクに割り付けた（魚当たり平均22匹のシラミを得るために）。

チャレンジに備えて、タンク内の水流を停止し、光レベルを低下させた。次いで、シラミを各タンクに添加し、タンクを6時間完全暗所に維持した後、光レベルを上昇させ、水流を再開した。

魚に1週間又は6週間、船虫を接種した。

【0073】

20

1.2 処理

1.2.1 1週間投与後の処理

船虫チャレンジから1週間後、3つのタンクの魚を10ppm w/v、30ppm w/v、又は50ppm w/vのイミダクロプリドで処理した。一方のタンクは0.03% DMSOで処理し、もう一方のタンクは対照として海水で処理した。

各処理タンクについて、適当な量のイミダクロプリド（表1参照）を100mlのDMSOに溶解し、実験タンクからの約900mlの海水と混合して処理溶液を得た。実験用タンクの水流を遮断し、処理液を添加した。

魚は、60分間、全曝気の静水中で曝露され、曝露期間中に観察された。曝露期間の終了時には、水は約1/3の容量に急速に排水され、その後、タンク内で流れが再開された。 30

表1

【0074】

【表 1】

| 群  | 処置の種類         | タンク容積(リットル) | 処置に用いたイミダクロプリドの質量(g) | 投与時点、シラミ誘発後の週数 |
|----|---------------|-------------|----------------------|----------------|
| 群1 | 対照－海水         | 該当なし        | －                    | 1 週間           |
| 群2 | 対照－海水/DMSO    | 該当なし        | －                    | 1 週間           |
| 群3 | 10ppmイミダクロプリド | 273. 2      | 2. 73                | 1 週間           |
| 群4 | 30ppmイミダクロプリド | 271. 6      | 8. 15                | 1 週間           |
| 群5 | 50ppmイミダクロプリド | 288. 2      | 14. 41               | 1 週間           |
| 群6 | 10ppmイミダクロプリド | 293. 3      | 2. 9                 | 6 週間           |
| 群7 | 30ppmイミダクロプリド | 278. 4      | 8. 4                 | 6 週間           |
| 群8 | 50ppmイミダクロプリド | 292. 0      | 14. 6                | 6 週間           |

10

## 1. 2. 2 6 週間曝露後の処理

20

6 週間後に、残りの 3 つの処理タンクの魚を 10 ppm w/v、30 ppm w/v、又は 50 ppm w/v のイミダクロプリドで処理した。処理は、惹起 1 週間後の処理用タンクと同様に行った(1. 2. 1 参照)。各処理槽に添加したイミダクロプリドの量を表 1 に示す。

## 【0075】

## 〔50 ppm w/v での観察〕

イミダクロプリド添加 2 ~ 6 分後の観察では、50 ppm w/v 投与群の水柱にシラミは認められなかった。

12 分間の処理後、約 10 匹のシラミが宿主から分離され、水柱中に遊離したことが観察された。18 分間の処理後、約 20 匹のシラミが水柱で観察された。当該シラミの活発な運動は記録されなかった。イミダクロプリド添加の 44 分後、シラミはタンクの底部に不活性で残存残していることが認められた。さらに、感染した魚はわずか 5 匹で、各々 1 匹のシラミであった。イミダクロプリド添加 53 分後、2 ~ 3 匹の魚のみが単一のシラミ感染をおこしたようだ。イミダクロプリド添加 58 分後、1 匹の魚に 1 匹のシラミのみが認められた。イミダクロプリド添加 81 分後、魚にシラミは認められなかった。

30

投与 2 日後、シラミの摂食及び付着に関連する病変はほぼ完全に消失したことが認められた。

## 【0076】

## 〔30 ppm w/v での観察〕

添加 10 分後にイミダクロプリド 30 ppm w/v で処理した魚を入れたタンクの水柱では、約 1 ~ 2 匹のシラミが観察された。添加 18 分後、約 10 匹のシラミが水柱に存在した。添加 25 分後、水中に約 20 匹のシラミが認められ、6 匹未満の魚が 1 匹あたり推定 1 ~ 2 匹のシラミに感染したようだ。イミダクロプリドの添加 33 分後、ほとんどの魚はシラミ感染に対して陰性であると考えられた。宿主から隔離されたシラミはすべて不動であった。添加 47 分後、3 匹の魚のみが感染しているようであり、各々 1 匹のシラミがいた。イミダクロプリド添加 59 分後、シラミに明らかに感染した魚はいなかった。イミダクロプリド添加 78 分後、4 匹の魚に 4 匹のシラミが付着し、4 匹の魚に 1 匹のシラミが観察された。6 分後、これらの魚ではシラミは観察されず、タンク内のシラミはすべて不動であった。

40

投与 2 日後、シラミの摂食及び付着に関連する病変はほぼ完全に消失したことが認められ

50

た。

【0077】

〔10ppm w/vでの観察〕

イミダクロプリド添加後の最初の19分以内に水柱でシラミは観察されなかった。添加後21日目、いくつかのシラミが水柱で活発に泳ぐのが観察された。4分後、これらのシラミの大部分は不動であった。添加54分後、2匹の感染魚が認められ、各々1匹の卵性メスが寄生していた。添加86分後、単一メスシラミが宿主から分離されたのが観察された。直接観察されなかったが、残りの卵性メスは、宿主から隔離されたことが認められた。添加91分後、単一のオスシラミが宿主の頭部で観察された。このシラミは処理後少なくとも5日間宿主で観察された。

10

【0078】

1.2.3 終了

魚に船虫を投与してから8週間後に試験を中止した。魚をMS222（トリカインメタンサルホン酸）で麻酔し、Iki Jiméツールを用いてピッチングした。各魚の体長、体重、外表症状を記録した。すべてのシラミを各々の魚から除去し、性別と発育段階を記録した。シラミをエタノール及び性別で保存し、ステージを実体顕微鏡で確認した。

【0079】

最終的なシラミの数を盲検下で測定した結果を表2に示す。データは、有病率及び存在量として表される。有病率は、ある寄生虫種の複数の個体に感染した宿主の数を、調べた宿主の数（感染した宿主と感染していない宿主を含む）で除し、%で表したものと定義される。

20

表2

【0080】

【表2】

| 処置                    | 有病率   | 成体雄性シラミの数(及び範囲) | 成体雌シラミの数(及び範囲) | 卵性雌の個体数(及びその範囲) | 平均個体数(及び範囲)又はすべてのミの発生段階 |
|-----------------------|-------|-----------------|----------------|-----------------|-------------------------|
| DMSO制御                | 100   | 1.2(0-4)        | 0(0-0)         | 1.47(0-4)       | 2.67(1-6)               |
| 海水管理                  | 93.33 | 2(0-7)          | 0.067(0-1)     | 1.8(0-6)        | 3.87(0-11)              |
| 1週間の惹起+10ppmのイミダクロプリド | 100   | 0.87(0-2)       | 0.067(0-1)     | 1.47(0-3)       | 2.4(1-5)                |
| 1週間投与+イミダクロプリド30ppm   | 93.33 | 0.8(0-1)        | 0(0-0)         | 1.4(0-3)        | 2.2(0-4)                |
| 1週間投与+イミダクロプリド50ppm*  | 100   | 1.23(0-3)       | 0(0-0)         | 1.69(0-5)       | 2.92(0-7)               |
| 6週間投与+10ppmのイミダクロプリド  | 0     | 0               | 0              | 0               | 0                       |
| 6週間投与+イミダクロプリド30ppm   | 0     | 0               | 0              | 0               | 0                       |
| 6週間投与+50ppmのイミダクロプリド  | 0     | 0               | 0              | 0               | 0                       |

30

\*この投与群から2匹の魚が除去された。魚1：フォーク長316mm、総重量452g。成体（成熟）オス3例、成体メス6例が回復した。魚2：フォーク長290mm、総体重379g、オス1匹、メス1匹が回復。

40

【0081】

8週目に検査した全てのシラミのステージにおける感染の有病率は、2つの対照群と、イミダクロプリドを10、30、50ppm w/vのいずれかで投与した1週間後の魚との間で差がないと考えられた。しかし、上記のように、イミダクロプリドを10、30又は50ppm w/vで処理した魚からは、船虫チャレンジ6週間後にシラミは採取されなかった。この処理は、シラミの運動性寄生段階に対するすべての処理用量で100%有効であると考えられた。

50

## 【0082】

チャレンジ1週間後に投与した魚では、DMSO対照群と比較してシラミの総量に有意差は認められず、海水対照群と比較してシラミの量にわずかな差が認められたが、有意差はないと考えられた。同様に、チャレンジから1週間後に処理した魚から採取したオスシラミの個体数にも、対照群との間でわずかな差が認められた。投与1週間後に投与した魚と対照群の卵母細胞数に有意差は認められなかった。

## 【実施例2】

## 【0083】

## 処理濃度の最適化

## 2.1 船虫チャレンジ

120匹のサケ (*Salmo salar*) を5つの流水処理槽に分割し、寄生虫誘発前に24時間馴化した。

卵性メス *Lepeophtheirus salmonis* から採取した卵系を採取し、感染性のコペポダイトが産生されるまで培養した。その後、コペポダイトを海水の入った5本の瓶に均等に分配し、~10で一晚保存した。

惹起に備えて、処理槽内の水流を停止し、光レベルを低下させた。650 静水に±20種のコペポダイト(宿主当たり約27種)を添加し、タンクを7時間完全暗所に維持した後、光レベルを上昇させ、水流を再開した。

## 【0084】

## 2.2 相対的有効性試験

表3に示すように、魚を無作為に10匹ずつ10群に分け、30 Lの水と高曝気を含む静止した「処理バケツ」に入れた。

表3

## 【0085】

## 【表3】

| 群    | イミダクロプリド濃度(mg/l) | 投与期間(分) | 複製数 | 魚/シラミの総数 |
|------|------------------|---------|-----|----------|
| 1&2  | 0                | 60      | 2   | 10       |
| 3&4  | 10               | 60      | 2   | 10       |
| 5&6  | 15               | 60      | 2   | 10       |
| 7&8  | 20               | 60      | 2   | 10       |
| 9&10 | 25               | 60      | 2   | 10       |

8群(3~10群)を、イミダクロプリドの必要濃度で60分間処理した:イミダクロプリドをDMSOに溶解し、処理バケツに添加する前に~1Lのタンク水に添加した。残りの群及びその反復(1及び2)は0.03%のDMSO対照であった。

実験動物は、副作用及び寄生虫感染の状態について注意深く追跡した。可能なかぎり、すべての寄生虫が隔離されたと考えられる時間を記録した。処理は静止系で行われたので、温度と溶存酸素を手順全体を通して定期的にモニターし、必要に応じてエアレーションを調整した。

## 【0086】

処理期間後、被験動物を処理液から取り出し、人為的に安楽死させた。各魚の体重を測定し、個々の寄生虫量を評価した。処理液中の寄生虫数も計測し、性別及び成体度、ネオニコチノイド中毒の明らかな徴候、及び/又は回収の可能性について定性的に評価した。

## 【0087】

## 〔結果〕

4種類の処理濃度10、15、20及び25mg/Lのイミダクロプリドと0.03%のDMSO濃度を組み合わせたシラミの総除去率を表4及び図1に示す(n=2、t=60分、エラーバーは±SEMを示す)。

表4

【 0 0 8 8 】

【 表 4 】

| 群  | イミダクロプリド濃度 (mg/L) | 複製 | 最初のフィッシュアウト (イミダクロプリド添加後最低) | 最後の魚介類 (イミダクロプリド添加後) | 寄生虫の推定総クリアランス (イミダクロプリド添加後の最小値) |
|----|-------------------|----|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|
| 1  | 0                 | 1  | 60                          | 65                   | n/a                             |
| 2  | 0                 | 2  | 60                          | 65                   | n/a                             |
| 3  | 10                | 1  | 60                          | 65                   | n/a                             |
| 4  | 10                | 2  | 60                          | 65                   | 46                              |
| 5  | 15                | 1  | 58                          | 64                   | 33                              |
| 6  | 15                | 2  | 60                          | 66                   | 43                              |
| 7  | 20                | 1  | 59                          | 64                   | 32                              |
| 8  | 20                | 2  | 60                          | 65                   | 38                              |
| 9  | 25                | 1  | 60                          | 66                   | 31                              |
| 10 | 25                | 2  | 60                          | 66                   | 22                              |

10

60分間の処理期間中、4種類の処理用量すべてで寄生虫感染の80～100%が除去された。

ロジスティック回帰を用いて、各濃度で処理後の寄生虫クリアランスを比較した。ロジスティック回帰分析は、 $R \cdot v \cdot 2 \cdot 13 \cdot 0$ のglm関数を用いて行い、二項分布又は準二項分布(帰無偏差と自由度の比較により決定)を仮定した。

20

【 0 0 8 9 】

全ての処理濃度での寄生虫クリアランスは0mg/Lより有意に大きかった( $p < 0.01$ )。クリアランスは25mg/L( $97 \pm 3\%$ )で10mg/L( $80 \pm 11\%$ )より有意に大きかった( $p < 0.05$ )が、15mg/L以上( $92 \pm 4\%$ )の間では有効性に有意差は認められなかった( $p > 0.4$ )。宿主動物を20mg/Lで処理した場合の寄生虫クリアランスは $92 \pm 7\%$ であった。要約すると、イミダクロプリドは試験したすべての濃度で宿主から*Salmonis*を効果的に除去した。

30

【 0 0 9 0 】

### 2.3 速度決定研究

イミダクロプリド10mg/Lに曝露された船虫は、30mg/Lに曝露されたシラミと比較して、宿主から落下するのに時間がかかるようであった。

濃度と影響時間との関係を定量するために、20匹の宿主動物をイミダクロプリド10mg/L又は20mg/L(10匹/濃度)のいずれかの処理濃度は無作為に割り付けた。速度決定試験のロジスティックスは、本質的には相対的有効性試験と同じであったが、例外として、魚を処理液から除去し、寄生虫の総クリアランスが生じたらすぐに安楽死させ、手順及び関連する福祉的考慮のもと時間を最小限にすることができた。

40

【 0 0 9 1 】

### 〔結果〕

イミダクロプリドを10mg/L及び20mg/Lで処理すると、宿主からの寄生虫の総クリアランスがもたらされた。実験動物を処理の間中厳密にモニターし、総クリアランスまでの時間を最も近い分まで記録した。この事象は実験エンドポイントを表しており、この時点で動物を摘出し、安楽死させた。

生存分析を用いて、寄生虫クリアランスまでの時間が10mg/Lと20mg/Lの間で有意差があるかどうかを決定した。図2は、Kaplan-Meierグラフで速度を視覚的に表し、Mantel-Cox(ログランク検定)は、両者間に有意差がないと判定する( $p = 0.48$ 、 $n = 10$ 、 $t = 56$ 分)。その結果、イミダクロプリドの濃度は寄生虫クリアランスまでの時間に影響を及ぼさず、致死時間50%(LT50)は約27.5分と推定された。

50

## 【0092】

この試験では、試験範囲内の最適濃度を15 mg/Lと決定したが、この濃度を上回る有効性の統計学的に有意な増加は観察されなかった。さらに、濃度と効果発現までの時間の関係は確立できなかった。すなわち、どの時点(56分)においても、イミダクロプリド10 mg/Lでも20 mg/Lでも、寄生者の総クリアランス率に有意差は認められなかった。

## 【0093】

## 〔2.4 船虫の回復〕

相対的有効性試験(2.2参照)のサンプリング時点で、多数の寄生者が宿主に付着したままであった(10 mg/Lに曝露した人の20%、15及び20 mg/Lに曝露した人の8%、25 mg/Lに曝露した人の3%)。

イミダクロプリドに曝露した寄生虫(宿主の処理後に手で除去した寄生虫及び処理中に剥離した寄生虫)の相対的有効性及び速度決定試験の双方から、清浄な海水に浸漬し、回復の兆候を観察した。

最初の観察時に、曝露された個体が死滅しているか、あるいは活動的であることが確認された。なお活動的な個体のうち、筋興奮は協調不能、コントロール不能、制限されていた。これらの個体は明らかに基本的な機能(宿主への付着と標的への移動)を果たすことができなかったことから、処理後も宿主に付着したままであった寄生虫は、その後下流に移動した可能性が示唆された。

曝露後の期間(最長6時間)では、どの濃度のイミダクロプリドに曝露した寄生虫にも、明らかな機能回復の徴候は認められなかった。

## 【実施例3】

## 【0094】

ウェルポートにおける船虫寄生の処理

処理対象のサケを標準的な養殖ケージに混ぜ、ウェルポートの酸素添加したウェルにポンプで注入し、各ウェルの魚の密度を水1立方メートルあたり90 kg又は120 kgとした。予混合イミダクロプリドをウェルに20 ppm w/vの用量まで添加した。その後、魚を60分間処理した。処理期間の終了時に、魚をウェルから揚水し、脱水して、処理水を確実にウェルに戻す。これを行うために、魚を格子状の棒状の上を通過させ、未処理の海水で洗い流して、魚の外側に残った処理水を取り除いた後、海洋ペンに戻した。使用後はすべての洗流水を保持した。

約50 µm又は約150 µmのメッシュサイズのメッシュフィルタに水を通して、瀕死及び死んだ船虫及びそれらの卵殻を含む有機物を除去した。

## 【実施例4】

## 【0095】

野外でのシラミのL. salmonis及びCaligus属の処理

L. salmonis及びCaligus属の感染の成体前及び成体期に対するイミダクロプリドの有効性を、イミダクロプリドによる処理を受けているサケについて、処理前及び処理後の船虫数を測定することにより調べた。本試験は、ノルウェーの市販のサケ水槽で実施された。サケをウェルポートにポンプで注入し、20 ppmのイミダクロプリドに60分間曝露した。サケの平均体重は3.5 kgで、水槽当たりの平均サケの数は18万匹であった。L. salmonis及びCaligus属について水槽当たり30匹の魚を評価し、見つかったL. salmonisの各ライフステージの数を記録した。投与前24時間以内、投与後24時間以内に実施した。

これらの評価は、合計4頭のサケ水槽で行った。処理に先立ち、魚は、処理前の船虫評価が行われたウェルポートに送り込まれるように、水槽内で密な状態であった。処理後のシラミの評価は、ウェルポートの流出管から魚を取り除くことによって行った。

いずれの時点においても、3匹の魚を採取し、麻酔浴に入れた。これを30匹の魚が評価されるまで10回繰り返した。

試験に供した4つの水槽各々について、試験前又は投与後の活性シラミのライフサイクル

10

20

30

40

50

の状態に応じて、本試験で魚当たりを観察されたシラミの数を表5に示す。いずれの魚も投与期間中観察されたが、有害な行動は認められなかった。

表5 - 処理前の船虫数

【0096】

【表5】

| ステージ           | Pen A |     | Pen B |     | Pen C |     | Pen D |     |
|----------------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
|                | 前     | 後   | 前     | 後   | 前     | 後   | 前     | 後   |
| Chalimus       | 1.2   | 0.5 | 0.2   | 0.0 | 0.1   | 0.0 | 0.0   | 0.0 |
| 成熟前<br>オス      | 1.8   | 0.0 | 0.4   | 0.0 | 0.0   | 0.0 | 0.0   | 0.0 |
| 成熟前<br>メス      | 1.9   | 0.0 | 1.1   | 0.0 | 0.4   | 0.0 | 0.6   | 0.0 |
| 成熟<br>オス       | 0.9   | 0.0 | 1.0   | 0.0 | 1.7   | 0.0 | 0.8   | 0.0 |
| 成熟<br>メス       | 2.0   | 0.0 | 0.8   | 0.0 | 1.0   | 0.0 | 0.8   | 0.0 |
| Gravid<br>メス   | 0.5   | 0.0 | 0.4   | 0.0 | 0.4   | 0.0 | 0.3   | 0.0 |
| 合計             | 8.3   | 0.0 | 4.0   | 0.0 | 3.6   | 0.0 | 2.5   | 0.0 |
| <i>Caligus</i> | 2.9   | 0.0 | 0.7   | 0.1 | 3.0   | 0.0 | 0.5   | 0.0 |

10

20

従って、イミダクロプリド処理はシラミの *L. salmonis* 及び *Caligus* 属に対する野外で効果的である。

【実施例5】

【0097】

#### イミダクロプリドの船虫に対する効果の時間尺度

イミダクロプリドの効果の時間スケールを決定するために、成体前及び成体前の船虫に感染したサケをストックタンクから取り出し、頭部に鋭い打撃を与えて殺傷した。魚をイミダクロプリド0、20、50、100、200、500ppmの存在下で30リットルの水に懸濁させ、船虫を30～60分間観察し、宿主から分離するかどうか、いつ分離するかを観察した。

30

0ppmのイミダクロプリドに曝露した魚（陰性対照）では、60分間観察が行われた。500ppmのイミダクロプリドを60分間曝露した1匹の魚を除き、他の処理した魚はすべて30分間観察された。各投与群につき3匹の魚を試験した。

シラミが宿主から離れた時期、及び船虫の性と段階についての観察が認められた。宿主を離れたシラミはすぐに清浄な海水に移された。さらに、曝露期間終了時に宿主上に残っていたシラミは宿主から除去され、清浄な海水に移された。

40

【0098】

シラミは曝露期間終了直後と約2時間後の両方で観察された。

メスオスのシラミの割合は約50：50であった。水温は12前後であった。

死んだ魚のシラミは、未処理の海水中に置かれ、60分間の観察期間を通して宿主を離れることはなく、いったんペトリ皿に移すと正常な動きを示した。これらの動きには、水泳や付属肢の典型的な制御された動きが含まれていた。

【0099】

イミダクロプリドを短期間投与したところ、シラミには2つの顕著な変化が認められた。第1に、甲殻状面の外側縁を内側に引き、シラミに円背のような外観を与えることで、シラミの下面を魚から引き上げ、第2に、罹患した個体の腹部を魚の表面に対して約45

50

°の角度で引き上げた。

【0100】

宿主を離れる前に、シラミは一般に非常に活発になり、しばしば環状パターンで魚の表面を移動した。いったん魚を離れると、彼らは試験タンクの底部に固定される前に、幅広い螺旋状の下向きの動きをした。

20 ~ 200 ppmのイミダクロプリドに曝露された群では、シラミの約50%が最初の15分以内に宿主を離れた。500 ppmのイミダクロプリドに曝露した魚では、シラミの約70%が最初の9分以内に宿主を離れた。残りのシラミは曝露期間の終わりまで宿主に留まった。宿主上のシラミは処理中に甲殻状面の側方圧迫を受け、シラミのハンチバック様外観を生じた。

このように、大部分の船虫は15分以内に処理宿主から離れた。

オスシラミはメスに比べて宿主を離れる可能性が高いようであった。イミダクロプリドに曝露されたシラミは、通常、運動性の完全な喪失と付属肢の急速な攣縮を示した。メスシラミはオスよりも付属肢の運動が少なかったが、腸の蠕動運動を示した。

【0101】

〔宿主以外のシラミ（清浄な海水中）の観察〕

陰性対照 - イミダクロプリドを投与されなかったシラミは、宿主から除去されたシラミに典型的な行動を示した。これには消化管の活発な遊泳と蠕動運動が含まれた。付属器の動きは系統的で制御されていると考えられた。シラミは物理的刺激に反応し、活発に移動した。

【0102】

〔20 ppm〕

20 mg/Lのイミダクロプリドに曝露された49匹のシラミのうち、2匹は曝露後30分で死滅したと考えられた(p.e.)。ピンセットで触れると、シラミはペトリ皿の側面から落ち、逆さまになって短時間泳いだ。しかし、遊泳は不安定で、大部分の付属肢の過剰な動きが原因であるように思われた。残りのシラミは、脚、第2上顎及び一次触角を含むそれらの付属肢の急速な攣縮を伴う瀕死状態と考えられた。20 ppmのイミダクロプリドに30分間曝露したメスでは、腸管の蠕動が認められた。49例中12例は生きており、刺激なしに活発に泳いでいるとみなされた。30分間曝露したシラミは回復の兆候を示さなかった。

【0103】

〔50 ppm〕

50 ppmのイミダクロプリドに曝露された21匹のシラミのうち、4匹は30分後に死滅したと考えられた。主要な付属肢の攣縮が残りのシラミで認められたが、30分間曝露した2匹の成体メスでは蠕動が認められた。シラミ14匹を生後2時間に検査したが、運動は検出されず、死滅したとみなされた。2つの個体は1本の脚の攣縮を示し、4人の成体メスは腸の蠕動運動を示した。

【0104】

〔100 ppm〕

100 ppmのイミダクロプリドに曝露された28匹のシラミのうち、4匹は曝露期間終了時に死滅したと考えられた。シラミは典型的に二次触角と二次上顎骨の攣縮を示した。さらに11匹のシラミが腸の蠕動運動を示した。甲骨の側方圧迫が多数の個体で認められた。2時間後、17/28匹のシラミが死滅したとみなされた。消化管の蠕動運動は、2時間後にシラミ28匹中9匹で認められ、すべて成体メスであった。最後に、シラミの1本と他のシラミの脚4の触角は、2時間後に限定された攣縮運動を示した。

【0105】

〔200 ppm〕

200 ppmのイミダクロプリドに曝露された26匹のシラミのうち、4匹は曝露期間終了時に死滅したと考えられた。残りのシラミは、通常二次アンテナの攣縮を除いて動かず、4匹の成体メスシラミで腸の蠕動運動が認められた。1匹のシラミの肛門の捻転が午後

10

20

30

40

50

30分に認められた。6匹のシラミが曝露2時間後に死滅したと考えられた。さらに、残りの動物では限定的な攣縮が記録され、主に成体メス3匹の一次及び二次触角の収縮と消化管の蠕動からなっていた。

【0106】

[500ppm]

20匹のシラミのうち6匹が、30分後に死滅したと考えられた。このうち2例は、2時間後に腸蠕動又は軽微な攣縮が認められたことが記録された。30分後に調べた残りのシラミは、1番目と2番目の触角が急速に収縮し、4匹の上顎脚がいくらか収縮し、腸の蠕動運動が認められた。生後2時間で、シラミの15/20が死滅したと考えられた。3匹のシラミは二次触角の攣縮を示し、2匹のシラミで消化管蠕動が記録された。

10

【実施例6】

【0107】

#### アザメチホス及びデルタメトリンを単離した船虫と比較

アザメチホス耐性及びデルタメトリン耐性の船虫とネオニコチノイドとの間に交差耐性がないことを確認するために試験を実施した。両性の成体前及び成体期(移動期)の両方を用い、それらは群間で均等に分布した。イミダクロプリドを60分間、アザメチホスを60分間、デルタメトリンを30分間、1リットルの浴中で一定の濃度範囲で曝露した(表6、7及び8)。シラミを処理後清浄な曝気海水に移した。実験中の海水の温度は12であったが、曝露中は60分間曝露(イミダクロプリド及びアザメチホス)で約14、30分間曝露(デルタメトリン)で13に上昇した。

20

各レジームにおいて、生シラミ及び固定(死んだものを含む)シラミの数は、曝露終了から約20時間後に記録された。各シラミを個別に調べた。

このインビトロ試験におけるイミダクロプリド、アザメチホス及びデルタメトリンの比例効果を表6、7及び8に示す。

表6 - イミダクロプリドのシラミへの影響

【0108】

【表6】

| 投与量(ppm) | 生存 | 固定化 | % 効果 |
|----------|----|-----|------|
| 0        | 9  | 0   | 0    |
| 0        | 11 | 0   | 0    |
| 5        | 7  | 3   | 30   |
| 5        | 7  | 3   | 30   |
| 10       | 5  | 5   | 50   |
| 10       | 6  | 4   | 40   |
| 15       | 0  | 10  | 100  |
| 15       | 0  | 10  | 100  |
| 20       | 0  | 10  | 100  |
| 20       | 0  | 10  | 100  |
| 30       | 0  | 10  | 100  |
| 30       | 0  | 10  | 100  |

30

40

表7 - アザメチホスのシラミへの影響

【0109】

【表 7】

| 投与量(ppm) | 生存 | 固定化 | % 効果 |
|----------|----|-----|------|
| 0        | 11 | 0   | 0    |
| 0        | 11 | 0   | 0    |
| 5        | 10 | 0   | 0    |
| 5        | 10 | 0   | 0    |
| 10       | 9  | 1   | 10   |
| 10       | 9  | 1   | 10   |
| 15       | 10 | 0   | 0    |
| 15       | 10 | 0   | 0    |
| 20       | 9  | 1   | 10   |
| 20       | 8  | 2   | 20   |
| 30       | 9  | 1   | 10   |
| 30       | 6  | 4   | 40   |

10

20

表 8 - デルタメトリンのシラミへの影響

【 0 1 1 0 】

30

【表 8】

| 投与量(ppm) | ライブ | 固定化 | % 効果 |
|----------|-----|-----|------|
| 0        | 10  | 0   | 0    |
| 0        | 11  | 0   | 0    |
| 5        | 10  | 0   | 0    |
| 5        | 10  | 0   | 0    |
| 10       | 10  | 0   | 0    |
| 10       | 9   | 2   | 18.2 |
| 15       | 8   | 2   | 20   |
| 15       | 9   | 1   | 10   |
| 20       | 8   | 2   | 20   |
| 20       | 9   | 1   | 10   |
| 30       | 10  | 1   | 9.1  |
| 30       | 8   | 2   | 20   |

10

20

イミダクロプリドの推定EC50値は7.6ppm、イミダクロプリドの推定EC90値は14.4ppmであった。アザメチホス及びデルタメトリンのEC50及びEC90は算出されなかった。

## 【実施例7】

## 【0111】

インビボでのイミダクロプリド処理の濃度及び時間依存性

インビボでのイミダクロプリド処理の濃度及び時間依存性を測定するために、アトランティックサーモン(平均320.9g)に海水(32.5%塩分)中のイミダクロプリドを12で負荷した。活性剤の投与中、タンク内の水位を下げ、エアレーションを行った。各チャレンジ時点で、チャレンジタンク中の魚当たり約40個のコペポダイトの目標レベルが得られるように、サケシラミのカイアシ培養物を計数し、調整した。

## 【0112】

魚のサケシラミは標準的な方法で計数した。鰓及び口腔/口腔を含まない魚の外表面のシラミのみが調査された。

タンク水又はタンク壁に付着した解離シラミの数を記録した。タンク水中のシラミを採取し、処理直後及び30~60分後に再度(回復の可能性を評価するために)平滑なプラスチック表面に吸引によって付着する能力について評価した。生きているシラミ及び生存可能なシラミも参考のために模擬処理対照群から採取し、システムを評価するために同期間、リバイバルチャンバーで飼育した。

魚の行動/外観は、各試験期間中にインビボで評価した。死滅率を含む行動及び/又は外観の変化を記録した。試験中に死滅した魚はなく、剖検も行われなかった。

## 【0113】

活性物質の試験液を調製(添加及び海水でホモジナイズ)し、40リットルの処理容量に投与した。

30

40

50

保持タンクから3匹のシラミに感染した魚を無作為に集め、内側の区画（直径 = 34.5 ~ 40 cm、高さ = 54 cm）を形成する樽に注意深く操縦した。これはタンク内に沈められ、基部は9 mm<sup>2</sup>の角穴を有するプラスチック製のメッシュスクリーンに置き換えられた。

各試験開始から3分以内に魚を内部コンパートメントに移した。内部コンパートメントは、処理を待つ間、保持タンク内に懸濁/浸漬された。

処理及び模擬処理は、魚で内部コンパートメントを排水し、試験液を入れた樽に移すことによって実施した。処理/模擬処理は、曝気/酸素化を伴う静水中で行った。酸素飽和度を70 ~ 100%に設定するためにエアレーションを調整した。

【0114】

処理された魚を入れた内部コンパートメントを水面に持ち上げて排水して処理を終了し、その後、魚を直接、水なしで、致死的な過量の麻酔薬を含む第2プレートに移し、致死まで放置した。これらの魚に残ったシラミと麻酔浴中に落下したシラミはすべて記録した。

処理浴中の残りのシラミを、清浄な海水で水浴中に懸濁させたプランクトンメッシュ（孔径2 mm）を通して歪めた。このコレクター中のシラミをプラスチックベーカー（1リットル）に移し、次に再びリバイバルチューブ（直径5 cm、長さ10 cm）に移した。各試験終了後3分以内に処理槽又はベーカーの壁に付着できるシラミは、生菌数と判定した。壁に付着しなかったシラミを、再生チューブで30 ~ 60分間モニターした。30 ~ 60分後にリバイバルチューブで生存可能と思われるシラミとそうでないシラミは、別々のカテゴリーで採点した。

模擬処理対照は、同様の方法で行った。

各魚は処理前に1匹あたり平均1.1匹のシラミがいた。イミダクロプリドの曝露時間は3 ~ 60分、用量は20 ~ 200 ppmであった。

試験中に死滅した魚はいなかった。

表9は、イミダクロプリド処理によって魚から除去されたシラミの割合を示している。

表9 - イミダクロプリドによる入浴処理の結果

【0115】

【表9】

| 投与量(ppm)    | 処理期間(分)                          |                    |                    |                    |                                    |
|-------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|
|             | 3                                | 5                  | 15                 | 30                 | 60                                 |
| 0 (control) | 0 <sup>24</sup> /0 <sup>16</sup> | -                  | -                  | -                  | 0 <sup>18</sup> /7.3 <sup>23</sup> |
| 20          | -                                | -                  | -                  | 63.9 <sup>36</sup> | 74.1 <sup>27</sup>                 |
| 50          | -                                | -                  | -                  | 91.3 <sup>23</sup> | -                                  |
| 100         | 7.0 <sup>43</sup>                | -                  | 73.7 <sup>38</sup> | -                  | -                                  |
| 200         | -                                | 55.9 <sup>34</sup> | 91.5 <sup>47</sup> | -                  | -                                  |

表9は、シラミの総数に対する処理後に魚から除去されたシラミの割合を示している。3分後及び60分後に陰性対照群を重複して設けた。上付きの数字は各試験における3匹の魚のシラミの総数を示す。

従って、イミダクロプリドは、処理時間を用いてシラミを除去するのに有効であった。

表10は、処理によって魚から切り離された船虫の割合と、処理中に付着したまま回収され、処理後30 ~ 60分で活性化した船虫の割合を示したものである。

表10 - 船虫の復活率

【0116】

10

20

30

40

【表 1 0】

| 試験レジーム               | 処理後30～60分に活動したシラミの割合(%) |     |               |      |
|----------------------|-------------------------|-----|---------------|------|
|                      | タンク水から捕集した分離シラミ         |     | 魚から採取したアタマジラミ |      |
|                      | n lice                  | %活性 | n lice        | %活性  |
| コントロール 3分            | 0                       | NA  | 0             | NA   |
| コントロール 3分            | 0                       | NA  | 26            | 7.7  |
| コントロール 60分           | 0                       | NA  | 0             | NA   |
| コントロール 60分           | 3                       | 0.0 | 16            | 50.0 |
| イミダクロプリド20ppm<br>30分 | 23                      | 4.3 | 9             | 11.1 |
| イミダクロプリド20ppm<br>60分 | 20                      | 0.0 | 0             | NA   |

10

【 0 1 1 7】

【表 1 1】

|                       |    |      |    |     |
|-----------------------|----|------|----|-----|
| イミダクロプリド50ppm<br>30分  | 31 | 0.0  | 0  | NA  |
| イミダクロプリド100ppm<br>3分  | 3  | 33.3 | 0  | NA  |
| イミダクロプリド100ppm<br>15分 | 28 | 0.0  | 0  | NA  |
| イミダクロプリド200ppm<br>5分  | 13 | 0.0  | 13 | 0.0 |
| イミダクロプリド200ppm<br>15分 | 43 | 0.0  | 0  | NA  |

20

30

このように、シラミはイミダクロプリドに反応して分離する。処理された船虫の一部は生存可能であると思われる。生育可能な分離（及び死んだ）船虫は、処理水の濾過を用いて除去される。

【 0 1 1 8】

比較のために、同じ供給源からの船虫に感染した魚を、推奨用量の投与法に従い、アザメチホス0.1mg/L及びデルタメトリン0.2μL/Lで30分間処理した。イミダクロプリドで処理したものと同様の条件下で処理を行った。模擬処理対照も投与した。各処理条件は2回実施した。この比較試験の結果を表11に示す。

表 1 1 - アザメチホス及びデルタメトリンによる浴処理の結果

【 0 1 1 9】

40

【表 1 2】

| 組成物      | %除去               |
|----------|-------------------|
| コントロール1  | 0 <sup>29</sup>   |
| コントロール2  | 0 <sup>42</sup>   |
| デルタメトリン1 | 0 <sup>37</sup>   |
| デルタメトリン2 | 0 <sup>37</sup>   |
| アザメチホス1  | 3.8 <sup>52</sup> |
| アザメチホス2  | 3.0 <sup>33</sup> |

10

表 1 1 は、シラミの総数に対する処理後に魚から除去されたシラミの割合を示している。上付きの数字は各試験における 3 匹の魚のシラミの総数を示す。

このように、イミダクロプリドで見られるように、イミダクロプリドでは魚からシラミが分離するのとは対照的に、船虫はデルタメトリン又はアザメチホスに反応して実質的に魚に付着したままである。

【実施例 8】

20

【0 1 2 0】

#### イミダクロプリドの安全性

魚類に対するイミダクロプリド処理の安全性を評価した。271.8 L の海水を入れた流水タンクに入れた魚を 65 ppm w/v の活性成分イミダクロプリドに曝露した。17.67 g のイミダクロプリドを 100 ml のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、その溶液を約 900 ml の海水に添加し、混合した。スルータンク上の流動が無効になり、イミダクロプリドの溶液を添加した。

65 ppm のイミダクロプリドを静水中で 1 時間曝露し、5 ~ 10 分間隔で行動変化を観察した。その後、魚をさらに 7 日間飼育した後、終了した。曝露期間中、魚類の行動に観察可能な変化は認められなかった。魚をさらに 7 日間モニターしたが、副作用は認められなかった。終了時には、外部からの病理学的変化は認められなかった。

30

【実施例 9】

【0 1 2 1】

#### 一連のネオニコチノイドの効果の比較

約 233 g の 18 か月齢の大西洋サケにおいて、シラミ *Lepeophtheirus salmonis* の移動性幼虫で、約 20 ppm の 4 種の新規ネオニコチノイドへの様々な時間の曝露中又は曝露の結果としてのノックダウン時間とその後の反応性 / 死滅率を調べた。試験開始時、魚の健康状態に重大な問題はなかった。

通常 of 摂餌行動が再開されるまで、誘発前に最大 10 日間まで順応させた。魚は 750 リットルのタンクに 35 kg / m<sup>3</sup> 以下のストック密度で収容された。タンクには、4.8 ~ 10.4 の温度で 5 L / 分を超える流量の海水を連続的に供給した。光周期は 12 時間明 : 12 時間暗に設定した。

40

【0 1 2 2】

〔チャレンジモデル〕

*Lepeophtheirus salmonis* のコペポダイドの幼虫を、1 タンク当たり 1,250 ~ 1,700 の目標力価で成体メスシラミから新たに取り出した卵弦の出現により、静止浴中で誘発した。

【0 1 2 3】

〔チャレンジ資料の作成〕

50

卵弦を妊娠した船虫から収穫し、ノープリウス包皮形成まで湧昇室でインキュベートした。Naupliiをコペポダイドの齢まで脱皮させ(約10で5日間)、タンク水を100 $\mu$ mのメッシュで濾過した後、コペポダイドを225mLの海水中に再懸濁させた。25mLの試料を取り出し、次いで、24ウェルプレート中で1~2mLの試料に分割し、ノウプリ/コペポデイドを実体顕微鏡下で計数した。存在量が十分で、最低80%がコペポダイドである場合には、暗所での静水流下で8時間チャレンジした。

#### 【0124】

〔処理群の選択と割り付け〕

魚をタンクから無作為に選び、90ppmのMS222溶液で軽く鎮静させて、平衡の喪失を誘導した後、頭部に回収不能な打撃を与えて犠牲にした。4~33匹の魚が処理ごとに必要であった。

10

次いで、カレット化した魚を処理タンクに懸濁した。魚はケーブルタイ(1本は弁蓋を貫通し、1本は茎の周囲を通る)と木製ロッドに取り付けられたワイヤから水平にタンク内に懸垂された。20ppmの被験物質の20Lタンクを1日1槽使用した。殺処分した魚のシラミを5、10、15、30、60分のいずれかに曝露した(陰性対照は、試験する最長の曝露期間をカバーするため、60分間のみ曝露した)。処理中の順序を無作為に割り付けた。

#### 【0125】

〔処理評価〕

シラミは、曝露期間中継続的にモニターされ、魚からのシラミの剥離を含め、観察された行動学的観察が行われた。曝露終了時に、シラミをタンク又は魚から取り出し、通気口の付いた小さなプラスチック製スクリュートップ容器(125mL、LDPE、25mm穴)に入れ、蓋に穴をあけ、200 $\mu$ mのメッシュで固定し、濾過した海水を供給された清浄なタンクに移し、そこで24時間保持した。魚から離れたシラミは離れていないシラミと離れていた。

20

#### 【0126】

〔処理後の評価〕

処理24時間後にシラミをスクリュートップ容器から取り出し、生存しているかどうか、生存している場合は反応性があるかどうかを確認した。カテゴリーは以下のように定義された: 生存 - 検出された動き; 反応 - 生存であり、協調して刺激を能動的に回避する; 死 - 検出されなかった動き。

30

反応性と定義されたシラミは、魚に再付着する可能性がある。評価後、幼虫及び性の決定が必要な場合には、シラミを70%アルコールに移した。

#### 【0127】

〔外部寄生虫処理の対照及び試験〕

対照処理は海水であった。試験した外部寄生虫処理は、ネオニコチノイド: イミダクロプリド、ジノテフラン、ニテンピラム、クロチアニジン及びチアメトキサム(すべてSigma Aldrich, Dorset, UKから入手)であった。

曝露日に、200mgの試験外部寄生虫処理を1Lの海水に添加した。ニテンピラム192mgのみを供給した。溶液を、攪拌プレート及び磁気ノミ(VWR)を用いて、均一な溶液を確実にするために強い渦を発生させるのに十分な速度で、30分間機械的に攪拌した。その後、9Lの海水を入れた約25Lの透明プラスチック製タンクに移送した。次いで、溶液を、小型ポンプ(フルバルシーCP1)を用いてさらに10分間混合し、次いで、魚の添加前にタンクから除去した。最終濃度は、19ppmの濃度のニテンピラムを除き、すべての試験外部寄生虫処理について20ppmであった。

40

#### 【0128】

〔結果〕

〔処理成績〕

各処理には、1回あたり1~4匹/回、1群あたり2~13匹/回が必要である。陰性対照(海水)、ジノテフラン、クロチアニジン及びチアメトキサムによる処理を2回、イミ

50

ダクロブリドについては3回複製した。ニテンピラムの反復投与は1回につき1回のみであった。個々の処理ごとに用いたシラミの平均数は5.5～10個で、1群当たりの平均数は6.2～7.2個であった。

【0129】

イミダクロブリド（60分で92.9%）、ジノテフラン（60分で53.3%）及びクロチアニジン（30分で69.2%）処理でロックダウン効果が認められた（表12）。海水群とチアメトキサム群ではロックダウンは観察されなかった。

表12 - 魚から落下した船虫の割合

【0130】

【表13】

10

| 暴露時間(分) | 海水  | イミダクロブリド | ディノテフラン | ニテンピラム | クロチアニジン | チアメトキサム |
|---------|-----|----------|---------|--------|---------|---------|
| 5       | N/A | 0        | 0       | 0      | 0       | 0       |
| 10      | N/A | 20.0     | 0       | 0      | 0       | 0       |
| 15      | N/A | 42.9     | 0       | 16.7   | 9.1     | 0       |
| 30      | N/A | 41.2     | 7.7     | 0      | 69.2    | 0       |
| 60      | 0   | 92.9     | 53.3    | 14.3   | 54.5    | 0       |

表12は、6回の処理期間の終了時に処理魚から落下した船虫の割合を示したものである。「N/A」は未試験を示す。

ニテンピラムに曝露された2匹のシラミは落下したが、試験の結果、シラミは物理的に損傷を受けていることがわかり（おそらくは魚の殺傷時）、これがニテンピラムよりもむしろロックダウンの原因であった可能性がある。

イミダクロブリド及びクロチアニジン処理では、ロックダウン時間が曝露時間に等しいシラミの割合は、曝露時間と負の相関を示す（図3）。処理中、イミダクロブリドに曝露されたシラミは、魚から離れる前に活性があることが認められた。クロチアニジンに曝露したシラミは比較的不活性であることがわかった。このことは、ロックダウン時間が曝露時間と同じであるシラミの割合に反映されているようだ（表13及び14）。

表13 - ロックダウン時間

【0131】

【表14】

30

| 暴露時間(分) | 海水  | イミダクロブリド   | ディノテフラン    | ニテンピラム | クロチアニジン    | チアメトキサム |
|---------|-----|------------|------------|--------|------------|---------|
| 5       | N/A |            |            |        |            |         |
| 10      | N/A | 481 ± 60   |            |        |            |         |
| 15      | N/A | 586 ± 114  | 900*       | 900*   | 900*       |         |
| 30      | N/A | 1029 ± 165 | 1800*      |        | 1706 ± 71  |         |
| 60      |     | 1209 ± 235 | 3109 ± 224 | 3600*  | 2289 ± 424 |         |

表13は、5回の投与で適用した6回の処理のロックダウン時間（秒、平均値 ± 標準誤差）を示している。「N/A」は試験されていないことを示し、「空白」はシラミがロックダウンされていないことを示し、「\*」はシラミが1匹しかロックダウンされていないことを示す。

表14 - ロックダウン期間が曝露期間に等しい船虫の割合

【0132】

40

【表 1 5】

| 暴露時間(分) | 海水  | イミダクロプリド | ディノテフラン | ニテンピラム | クロチアニジン | チアメトキサム |
|---------|-----|----------|---------|--------|---------|---------|
| 5       | N/A |          |         |        |         |         |
| 10      | N/A | 33.3     |         |        |         |         |
| 15      | N/A | 28.6     | 100*    | 100*   | 100*    |         |
| 30      | N/A | 11.1     | 100*    |        | 77.8    |         |
| 60      |     | 7.7      | 25      | 100*   | 33.3    |         |

表 1 4 は、ロックダウン時間が曝露時間と等しいシラミの割合を示したものである。「なし」は試験されていないことを示し、「空白」はシラミがロックダウンされていないことを示し、「\*」はシラミが 1 匹のみロックダウンされたことを示す。

10

【0 1 3 3】

〔処理後の結果〕

(i) 曝露終了時に魚の上に残っているシラミ

海水処理したシラミはすべて反応性であった(表 1 5)。イミダクロプリドで処理したシラミの反応性は 15 分以降に徐々に影響を受け、60 分間の処理ではシラミ反応性は認められなかった。ジノテフランに曝露されたシラミは、影響を受けなかった 10 分間の曝露を除いて、反応性が低下した。クロチアニジンは、10、15 及び 30 分曝露でシラミの反応性に影響したが、5 及び 60 分曝露では影響しなかった。これは、低複製のためにアーチファクトである可能性がある。チアメトキサムに曝露されたシラミは、1 匹のシラミのために、曝露 60 分後にわずかに影響を受け、ニテンピラムに曝露されたシラミは、曝露期間中ずっと影響を受けなかった。

20

表 1 5 - 魚から採取されたシラミの反応性

【0 1 3 4】

【表 1 6】

| 暴露時間(分) | 海水  | イミダクロプリド | ディノテフラン | ニテンピラム | クロチアニジン | チアメトキサム |
|---------|-----|----------|---------|--------|---------|---------|
| 5       | N/A | 100      | 73      | 100    | 100     | 100     |
| 10      | N/A | 100      | 100     | 100    | 93      | 100     |
| 15      | N/A | 45       | 69      | 100    | 90      | 100     |
| 30      | N/A | 50       | 83      | 100    | 75      | 100     |
| 60      | 100 | 0        | 88      | 100    | 100     | 92      |

30

表 1 5 は、投与期間終了時に魚から回収された船虫の反応率を示したものである。

(ii) 曝露終了により魚をロックアウトしたシラミ

ロックダウンは、イミダクロプリド、ジノテフラン、ニテンピラム及びクロチアニジン基で認められた(表 1 6)。これは陽性対照群で最も顕著であり、10 分間の曝露からロックダウンがあった。曝露時間の増加に伴い、反応性は漸進的に消失した。60 分間曝露したシラミは反応性を示さなかった。ジノテフラン群では、15 分目に 100%、30 分目に 0% の反応性が認められたが、これはシラミ 1 匹の反応性によるものであった。これらの各曝露時間にシラミが 1 匹だけ落下したので、この結果はある程度の注意を払って処理すべきである。ニテンピラム投与では、シラミは物理的に損傷を受け、死滅した。損傷は、サケ殺傷時に起こった可能性が最も高い。クロチアニジンは、15、30、60 分曝露でそれぞれ 0%、44%、33% の反応性を示した。15 分間の曝露での 0% の反応性は、1 匹のシラミでは反応性がなかったためであった。

40

表 1 6 - 魚から採取されたシラミの反応性

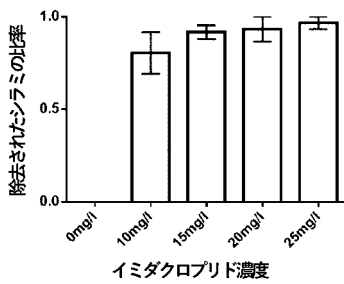
【0 1 3 5】

【表 17】

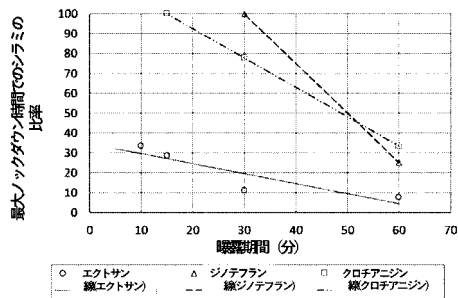
| 暴露時間(分) | 海水  | イミダクロブリド | ディノテフラン | ニテンピラム | クロチアニジン | チアメトキサム |
|---------|-----|----------|---------|--------|---------|---------|
| 5       | N/A |          |         |        |         |         |
| 10      | N/A | 100      |         |        |         |         |
| 15      | N/A | 33       | 100     | 0      | 0       |         |
| 30      | N/A | 10       | 0       |        | 44      |         |
| 60      |     | 0        | 71      | 0      | 33      |         |

表 16 は、処理後 24 時間で処理終了時にタンクから回収されたシラミの反応率を示す。データテーブルに入力がない場合は、シラミが落ちなかったことを示している。すべてのシラミの反応性を検討したところ、海水処理群及び多かれ少なかれクロチアニジン群では反応性は漸進的に消失した(図 4)。ジノテフラン群では、曝露時間に関連した明らかな影響は認められなかった。

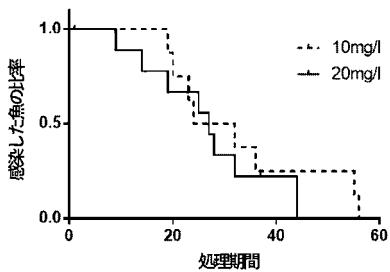
【図 1】



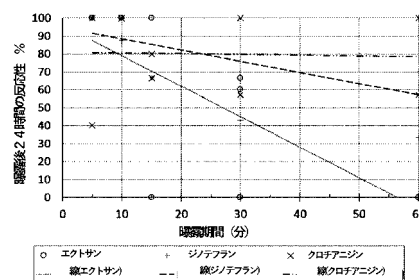
【図 3】



【図 2】



【図 4】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |   | International application No<br>PCT/GB2019/051519  |
|---|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. A01N37/18 A01N43/40 A01N43/86 A01N47/40 A01N51/00<br>A61K31/426 A01P15/00<br>ADD.<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>A01N A61K<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |   |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| A   | US 5 504 081 A (LOEHR REINHOLD [DE] ET AL)<br>2 April 1996 (1996-04-02)<br>cited in the application<br>column 1, lines 1-6<br>column 4 - column 5, line 20<br>column 6, lines 10-16<br>columns 9-10; example A<br>claims 1, 7 | 1-26   |
| X   | -----<br>WO 2014/064184 A1 (NOVARTIS AG [CH];<br>BOUVIER JACQUES [CH] ET AL.)<br>1 May 2014 (2014-05-01)<br>page 1, paragraph first<br>page 2, line fourth<br>page 3, lines third, fourth                                     | 1-26   |
| X,P   | -----<br>WO 2018/104487 A1 (FISH VET GROUP NORGE AS<br>[NO]) 14 June 2018 (2018-06-14)<br>claims 1-40<br>-----  | 1-26   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.   |   | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.   |
| * Special categories of cited documents :<br>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*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<br>*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<br>*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<br>*&* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>11 July 2019   |   | Date of mailing of the international search report<br><br>19/09/2019   |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |   | Authorized officer<br><br>Davies, Maxwell  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/GB2019/051519**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos. :  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos. :  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos. :  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. :  
1-26(partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ GB2019/ 051519

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-26(partially)

Method/composition for removing ectoparasites from a fish in water by administering clothianidin.

---

2. claims: 1-26(partially)

Method/composition for removing ectoparasites from a fish in water by administering dinotefuran.

---

3. claims: 1-26(partially)

Method/composition for removing ectoparasites from a fish in water by administering acetamiprid.

---

4. claims: 1-26(partially)

Method/composition for removing ectoparasites from a fish in water by administering imidacloprid.

---

5. claims: 1-26(partially)

Method/composition for removing ectoparasites from a fish in water by administering nitenpyram.

---

6. claims: 1-26(partially)

Method/composition for removing ectoparasites from a fish in water by administering nithiazine.

---

7. claims: 1-26(partially)

Method/composition for removing ectoparasites from a fish in water by administering thiacloprid.

---

8. claims: 1-26(partially)

Method/composition for removing ectoparasites from a fish in water by administering thiamethoxam.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2019/051519

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |            |
|--|------------------|-------------------------|------------------|------------|
| US 5504081                             | A                | 02-04-1996              | CA 2106895 A1    | 30-03-1994 |
|  |                  |                         | CN 1094218 A     | 02-11-1994 |
|  |                  |                         | DE 4232561 A1    | 31-03-1994 |
|  |                  |                         | DE 59310142 D1   | 01-03-2001 |
|  |                  |                         | DK 0590425 T3    | 26-02-2001 |
|  |                  |                         | EP 0590425 A1    | 06-04-1994 |
|  |                  |                         | JP 3572093 B2    | 29-09-2004 |
|  |                  |                         | JP H06192128 A   | 12-07-1994 |
|  |                  |                         | KR 940006587 A   | 25-04-1994 |
|  |                  |                         | NO 305681 B1     | 12-07-1999 |
|  |                  |                         | TW 256772 B      | 11-09-1995 |
|  |                  |                         | US 5504081 A     | 02-04-1996 |
|  |                  |                         | WO 2014064184    | A1         |
| CL 2015001003 A1                       | 28-08-2015       |                         |                  |            |
| EP 2911512 A1                          | 02-09-2015       |                         |                  |            |
| US 2015272931 A1                       | 01-10-2015       |                         |                  |            |
| WO 2014064184 A1                       | 01-05-2014       |                         |                  |            |
| WO 2018104487                          | A1               | 14-06-2018              | AU 2017373823 A1 | 11-07-2019 |
|  |                  |                         | CA 3045239 A1    | 14-06-2018 |
|  |                  |                         | WO 2018104487 A1 | 14-06-2018 |

## フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 マーシャル, ジョン  
イギリス国, エスジー 8 6 アールエー, ハートフォードシャー ロイストン, シェプレス, ダンスブリッジ ターンパイク, ジ オールド ミル ハウス(番地なし)

(72)発明者 ロングショー, マシュー  
イギリス国, ディーティー 5 2 ディーピー ドーセット ポートランド, サウスウェル ストリート 12

(72)発明者 アップルヤード, エリザベス  
イギリス国, エス 3 6 2 エーエス サウス ヨークシャー シェフィールド, ナイン エイカーレーン, ブラエリー バスク ファーム, フラット 5

Fターム(参考) 2B104 AA01 AA02 BA14 CA01 EA01 EB26 EE05 FA27  
4H011 AC01 BB09 BB10 BB11 DD01