

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4846795号  
(P4846795)

(45) 発行日 平成23年12月28日(2011.12.28)

(24) 登録日 平成23年10月21日(2011.10.21)

(51) Int.Cl.	F I
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30 Z
A 2 3 K 1/16 (2006.01)	A 2 3 K 1/16 3 O 4 B
A 2 3 K 1/18 (2006.01)	A 2 3 K 1/18 D
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	A 2 3 K 1/18 Z
	C 1 2 N 1/20 Z N A A

請求項の数 24 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2008-516061 (P2008-516061)	(73) 特許権者	500303696
(86) (22) 出願日	平成18年6月14日 (2006. 6. 14)		エルベル・アクチエンゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2008-543290 (P2008-543290A)		オーストリア国、アー 3 1 3 O・ヘルツ
(43) 公表日	平成20年12月4日 (2008. 12. 4)		オーゲンブルク、インドウストリーシュト
(86) 国際出願番号	PCT/AT2006/000243		ラーセ・2 1
(87) 国際公開番号	W02006/133472	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成18年12月21日 (2006. 12. 21)		弁理士 川口 義雄
審査請求日	平成21年4月23日 (2009. 4. 23)	(74) 代理人	100114188
(31) 優先権主張番号	A999/2005		弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成17年6月14日 (2005. 6. 14)	(74) 代理人	100140523
(33) 優先権主張国	オーストリア (AT)		弁理士 渡邊 千尋
微生物の受託番号	DSMZ DSM 16284	(74) 代理人	100119253
微生物の受託番号	DSMZ DSM 16211		弁理士 金山 賢教
微生物の受託番号	DSMZ DSM 16210	(74) 代理人	100103920
微生物の受託番号	DSMZ DSM 16350		弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロバイオティック健康及び体調増進食品、餌及び／又は飲料水添加物並びにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エンテロコッカス・ファエシウム (Enterococcus faecium) DSM 16211、ラクトバシラス・リューテリ (Lactobacillus reuteri) DSM 16350、ラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス (Lactobacillus salivarius ssp. salivarius) DSM 16351、ペディオコッカス・アシディラクチシ (Pediococcus acidilactici) DSM 16210、及びビフィドバクテリウム・アニマリス (Bifidobacterium animalis) DSM 16284 からなる群から選択される少なくとも3つの微生物を含むことを特徴とする、微生物の混合物を含有するプロバイオティック健康及び体調増進食品、餌及び／又は飲料水添加物であって、

但し、ラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス DSM 16351 及びビフィドバクテリウム・アニマリス DSM 16284 のいずれか一方又は両方を含む、前記食品、餌及び／又は飲料水添加物。

【請求項 2】

エンテロコッカス・ファエシウム DSM 16211、ラクトバシラス・リューテリ DSM 16350 及びラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス DSM 16351 を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の食品、餌及び／又は飲料水添加物。

【請求項 3】

エンテロコッカス・ファエシウム DSM 16211、ペディオコッカス・アシディラク

チシ D S M 1 6 2 1 0 及びビフィドバクテリウム・アニマリス D S M 1 6 2 8 4 を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の食品、餌及び / 又は飲料水添加物。

【請求項 4】

さらに担体として使用可能であり、及びフルクトオリゴ糖、イヌリン、イソマルト - オリゴ糖、ラクチツール、ラクトスクロース、ラクチュロース、ピロデキストリン、大豆オリゴ糖、トランスガラクト - オリゴ糖、キシロ - オリゴ糖、ビタミンから選択される栄養物質及び / 又はプレバイオティック物質を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の食品、餌及び / 又は飲料水添加物。

【請求項 5】

ゼオライト、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、トレハロース、キトサン、シェラック、アルブミン、デンプン、スキムミルク粉末、スイートホウエイ粉末、マルトデキストリン、ラクトース、イヌリン、デキストロース、植物油又は（水若しくは生理的食塩水溶液から選択される）溶媒から選択されるさらなる担体を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の食品、餌及び / 又は飲料水添加物。

【請求項 6】

マルトデキストリン、ガラナ種子粉末、アラビアゴム、アルギナート、修飾されたデンプン及びデンプン誘導体、デキストリン、（セルロースエステル及びエーテルのような）セルロース誘導体、（ゼラチン、アルブミン、カゼイン、グルテンのような）タンパク質、アカシアゴム、トラガカント、（蠟、パラフィン、ステアリン酸、モノ及びジグリセリドのような）脂質から選択される被覆材料をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 5

【請求項 7】

ビフィドバクテリウム種（*Bifidobacterium* sp.）、ラクトバシラス・サリバリウス（*Lactobacillus salivarius*）、ラクトバシラス種（*Lactobacillus* sp.）、ラクトバシラス・ファーマンタム（*Lactobacillus fermentum*）及びエンテロコッカス・ファエカリス（*Enterococcus faecalis*）の群から選択される少なくとも 1 つの微生物をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載の食品、餌及び / 又は飲料水添加物。

【請求項 8】

微生物が、2000 μm の最大直径を有する、懸濁された、粉末状又は封入された形態で含有されることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 に記載の食品、餌及び / 又は飲料水添加物。

【請求項 9】

畜産用の鳥及び / 又は豚の体調を向上させるための前記畜産動物用の請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の餌添加物であり、前記餌添加物は、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU / kg 餌添加物のエンテロコッカス・ファエシウム（*Enterococcus faecium*）DSM 16211、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU / kg 餌添加物のペディオコッカス・アシディラクチシ（*Pediococcus acidilactici*）DSM 16210、及び、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU / kg 餌添加物のビフィドバクテリウム・アニマリス（*Bifidobacterium animalis*）DSM 16284 から構成されることを特徴とする、前記餌添加物。

【請求項 10】

畜産用の鳥及び / 又は豚の体調を向上させるための前記畜産動物用の請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の餌添加物であり、前記餌添加物は、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU / kg 餌添加物のエンテロコッカス・ファエシウム（*Enterococcus faecium*）DSM 16211、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU / kg 餌添加物のラクトバシラス・リューテリ（*Lactobacillus reuteri*）DSM 16350、及び、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU / kg 餌添加物のラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス（*Lactobacillus salivarius* ssp. s

10

20

30

40

50

salivarius) DSM16351から構成されることを特徴とする、前記餌添加物。

【請求項11】

畜産用の鳥及び／又は豚の体調を向上させるための前記畜産動物用の請求項1～8の何れか1項に記載の餌添加物であり、前記餌添加物は、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 餌添加物のエンテロコッカス・ファエシウム (Enterococcus faecium) DSM16211、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 餌添加物のラクトバシラス・リューテリ (Lactobacillus reuteri) DSM16350、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 餌添加物のラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス (Lactobacillus salivarius ssp. salivarius) DSM16351、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 餌添加物のペディオコッカス・アシディラクチシ (Pediococcus acidilactici) DSM16210、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 餌添加物のビフィドバクテリウム・アニマリス (Bifidobacterium animalis) DSM16284、及び  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 餌添加物のビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) sp. 2、から構成されることを特徴とする、前記餌添加物。

10

【請求項12】

餌添加物が、担体又は天然物質の1%～95%をさらに含むことを特徴とする、請求項9、10又は11に記載の餌添加物。

20

【請求項13】

餌添加物が、0.01g/kg～10g/kg 餌の量で水性懸濁液として餌に用いられることを特徴とする、請求項9、10又は11に記載の餌添加物。

【請求項14】

餌添加物が、20g/t～20kg/tの量で餌の中に混合されることを特徴とする、請求項8～13の何れか1項に記載の餌添加物。

【請求項15】

畜産用の鳥及び／又は豚の体調を向上させるための、前記畜産動物用の請求項1～8の何れか1項に記載の飲料水添加物であり、前記飲料水添加物は、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のエンテロコッカス・ファエシウム (Enterococcus faecium) DSM16211、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のラクトバシラス・リューテリ (Lactobacillus reuteri) DSM16350、及び  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス (Lactobacillus salivarius ssp. salivarius) DSM16351から構成されることを特徴とする、前記飲料水添加物。

30

【請求項16】

畜産用の鳥及び／又は豚の体調を向上させるための、前記畜産動物用の請求項1～8の何れか1項に記載の飲料水添加物であり、前記飲料水添加物は、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のエンテロコッカス・ファエシウム (Enterococcus faecium) DSM16211、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のペディオコッカス・アシディラクチシ (Pediococcus acidilactici) DSM16210、及び、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のビフィドバクテリウム・アニマリス (Bifidobacterium animalis) DSM16284から構成されることを特徴とする、前記飲料水添加物。

40

【請求項17】

畜産用の鳥及び／又は豚の体調を向上させるための、前記畜産動物用の請求項1～8の何れか1項に記載の飲料水添加物であり、前記飲料水添加物は、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のエンテロコッカス・ファエシウム (Enterococcus faecium) DSM16211、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料

50

水添加物のラクトバシラス・リューテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM16350、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*) DSM16351、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のペディオコッカス・アシディラクチシ (*Pediococcus acidilactici*) DSM16210、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*) DSM16284、及び  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{14}$  CFU/kg 飲料水添加物のビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) sp. 2、から構成されることを特徴とする、前記飲料水添加物。

10

#### 【請求項18】

飲料水添加物が、担体又は栄養素の1%～95%をさらに含むことを特徴とする、請求項15～17の何れか1項に記載の飲料水添加物。

#### 【請求項19】

プロバイオティック健康及び体調増進食品、餌及び/又は飲料水添加物としての、エンテロコッカス・ファエシウム (*Enterococcus faecium*) DSM16211、ラクトバシラス・リューテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM16350、及びラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*) DSM16351、ペディオコッカス・アシディラクチシ (*Pediococcus acidilactici*) DSM16210、及びビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*) DSM16284 からなる群から選択される少なくとも3つの微生物の混合物の使用であって、

20

但し、ラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス DSM16351 及びビフィドバクテリウム・アニマリス DSM16284 のいずれか一方又は両方を含む、前記使用。

#### 【請求項20】

エンテロコッカス・ファエシウム DSM16211、ラクトバシラス・リューテリ DSM16350、及びラクトバシラス・サリバリウス属種サリバリウス DSM16351 が使用されることを特徴とする、請求項19に記載の使用。

#### 【請求項21】

30

エンテロコッカス・ファエシウム DSM16211、ペディオコッカス・アシディラクチシ DSM16210、及びビフィドバクテリウム・アニマリス DSM16284 が使用されることを特徴とする、請求項19に記載の使用。

#### 【請求項22】

微生物の混合物が免疫防御を増加させるために使用されることを特徴とする、請求項19～21の何れか1項に記載の使用。

#### 【請求項23】

微生物の混合物が、マルトデキストリン、ガラナ種子粉末、アラビアゴム、アルギナート、修飾されたデンプン及びデンプン誘導体、デキストリン、セルロース誘導体、タンパク質、アカシアゴム、トラガカント、脂質から選択される少なくとも1つのゼラチン化剤とともに使用されることを特徴とする、請求項19～22の何れか1項に記載の使用。

40

#### 【請求項24】

微生物の混合物が、液体担体とともに、スプレー懸濁液として使用されることを特徴とする、請求項19～23の何れか1項に記載の使用。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、微生物の混合物を含有するプロバイオティック (Probiotic) 健康及び体調増進食品、餌及び/又は飲料水添加物、並びにこのようなプロバイオティック健康及び体調増進食品、餌及び/又は飲料水添加物の使用に関する。

50

## 【背景技術】

## 【0002】

微生物の混合物を含有する食品、餌及び/又は飲料水添加物が、例えば、サルモネラ又はE.コリ(E.coli)、カンピロバクター(Compylobacter)、クロストリジア(Clostridia)などの病原性細菌による感染症を可能な限り予防するために、ヒト及び動物の両用途において、ますます多く使用されている。微生物のこのような混合物の使用は、いわゆる競合的排除(CE)に基づいており、競合的排除によって、いわゆる「善玉」細菌により、「悪玉」細菌(すなわち、健康を損なう又は有害な細菌)を抑制又は排除をすることを目指している。従って、善玉細菌の増殖は、例えば、より迅速に増殖するために、増殖の見地から、消化管の環境の利点を利用することによって、悪玉細菌の増殖を阻害する。具体的には、用途の幅広い分野を達成するために、可能な限り広い、腸内細菌のスペクトルを投与することを試みながら、同じく消化管から単離することが可能な細菌の特別な混合物が使用される。しかしながら、特定されていない腸内細菌の可能な限り広いスペクトルの使用は、一方で、例えば、抗生物質耐性又は疾病の伝達を避けることが困難であり、他方で、確定されていない混合物の投与は、このような混合物の投与から生じる予期されない結果又は望ましくない結果を防ぐために、国内又は国際的な規制及び法規によって制約されるなど、確定されない混合物に生じ得る問題などの問題を孕んでいることが明らかとなった。従って、予測されない効果を回避し、法規に適合させるために、確定された混合物、特に、1つ又は数個の株を含む確定されたプロバイオティック培養物の使用を再分類しなければならない。

10

20

## 【0003】

法的規制に留意しながら、及び可能な限り具体的な結果を取得することを求めながら、刊行物の複数が、最近、公知となっており、そのうち、US-A5 372 810は、例えば、嫌気的に増殖された、滅菌された細菌細胞、それらのホモジネート又は細胞壁成分を用いることによって、家畜の下痢を予防及び治療するための製剤及び方法について記載している。この事例で使用される細菌は、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)及び/又はコリネバクテリウム(Corynebacterium)の属に属する。

## 【0004】

US-公報2004-0115308は、新鮮なプロバイオティック成分を含有する消費可能な製品について記載しており、前記プロバイオティックスは、酵母、アスペルギルス(Aspergillus)、ラクトバチルス(Lactobacilli)、ビフィドバクテリウム(Bifidobacteria)、ストレプトコッカス(Streptococci)、エンテロコッカス(Enterococci)及びこれらの混合物の群から構成される。そこで使用される細菌は、いかなる様式においても、乾燥又は濃縮されておらず、取得されたまま使用されるので、安定性、適用可能性などの観点で問題を引き起こす。

30

## 【0005】

EP 1 037 964からは、ブタのサルモネラを駆除又は阻害するための嫌気性細菌の確定されたプロバイオティック又は製剤が公知となっており、前記細菌はエンテロコッカス・ファエカリス(Enterococcus faecalis)、ストレプトコッカス・ボvis(Streptococcus bovis)、クロストリジウム・クロストリジホルム(Clostridium clostridiiforme)、クロストリジウム・シンバイオサム(Clostridium symbiosum)、クロストリジウム・ラモサム(Clostridium ramosum)、バクテロイデス・フラギリス(Bacteroides fragilis)、バクテロイデス・ディスタソニス(Bacteroides distasonis)、バクテロイデス・ブルガタス(Bacteroides vulgatus)、バクテロイデス・テタイオタオミクロン(Bacteroides thetaiotamicron)及びバクテロイデス・カッカエ(Bacteroides caccae)を含み、細菌の少なくとも7つの

40

50

異なる群が製品中に含有されなければならない。

【0006】

最後に、WO03/054168は、病原性細菌を除去することができる腸内細菌の製剤を調製するための方法を記載している。この方法において、微生物試料は、特定の動物種の腸から取得され、好氣的条件に曝露され、続いて、凍結され、再融解される。各微生物群は、選択的に採集され、阻害検査において、病原性微生物に対するそれらの活性について検査され、最後に、醗酵され及び使用される。

【0007】

しかしながら、前記文献に記載されている方法は、個別の特異的な細菌又はそれらの組み合わせの何れかを使用することによって、特別な病原性細菌に対する1つの活性のみが得られるという問題を有している。消化管中に含有される様々な病原性細菌に対する活性は達成できない。最後に、前記文献に記載されている方法は、通常、細菌の投与されるスペクトルが、可能な限り完全な病原性細菌の阻害を達成するのに十分広くないという問題も有している。他の公知の製品は、腸から得られない細菌を使用しているので、完全に特異的な活性を与えるわけではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、微生物の混合物を含むプロバイオティック健康及び体調増進食品、餌及び/又は飲料水添加物であり、哺乳動物及び/又は畜産用の鳥の実質的に消化系全体でその活性を示すことにより、例えば、サルモネラ (*Salmonella*)、E.コリ (*E. coli*)、クロストリジウム (*Clostridia*) などの多数の望ましくない細菌の有害な効果を抑制し、又は少なくとも低減するプロバイオティック健康及び体調増進食品、餌及び/又は飲料水添加物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

これらの課題を解決するために、エンテロコッカス・ファエシウム (*Enterococcus faecium*)、DSM16211、ラクトバシラス・リューテリ (*Lactobacillus reuteri*)、DSM16350及びラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス (*Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*)、DSM16351、ペディオコッカス・アシディラクチシ (*Pediococcus acidilactici*)、DSM16210及びビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*)、DSM16284からなる群から選択される少なくとも2つの微生物を含む、微生物の混合物を含有するプロバイオティック健康及び体調増進食品、餌及び/又は飲料水添加物が、本発明において使用される。エンテロコッカス・ファエシウム、DSM16211、ラクトバシラス・リューテリ、DSM16350及びラクトバシラス・サリバリウス ssp. サリバリウス、DSM16351、ペディオコッカス・アシディラクチシ、DSM16210及びビフィドバクテリウム・アニマリス、DSM16284からなる群から得られる微生物を使用することによって、前記微生物は、例えば、盲腸、空腸、回腸又は甲状腺腫など、消化管の最も多岐にわたる領域に由来するので、消化管全体、特に、胃腸領域に実質的に及んで、消化管全体で病原性細菌を機能できなくなるようにすることが可能である。

【0010】

新種であると考えられているDSM16284、ビフィドバクテリウム・アニマリスを除き、寄託された微生物は、一般に、公知の株と99%を超える一致度を示すので、既に公知の種の新しい株である。

【0011】

寄託された株の各配列は、以下のとおりである。

【0012】

10

20

30

40

50

ペディオコッカス・アシディラクチシ、D S M 1 6 2 1 0

【 0 0 1 3 】

【 化 1 】

CCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTCCGT  
TAATTGATTATGACGTGCTTGCACTGAATGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGGACGG  
GTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTA  
ATACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTT  
CTGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGAT  
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGTGACGCCGCG  
TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAGCTGGGTGAGAG  
TAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTAT'TGGGCGTAAAGCGAGCGCAG  
GCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCAATTGGAACT  
GGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
TATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTC  
GAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATT  
ACTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCC  
TGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT  
GGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTG  
CCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGATGTTGTC  
GTCAGCTCGTGTCTG

10

20

【 0 0 1 4 】

配列決定プライマー：3 4 1 フォワード、5 3 0 リバース

2つの部分配列から得られたコンティグ：3 4 1 f 5 3 0 r

配列長：計 1 0 9 4 塩基

公知の株との一致度：9 9 . 6 %

【 0 0 1 5 】

ラクトバシラス・リューテリ、D S M 1 6 3 5 0

【 0 0 1 6 】

【 化 2 】

GGATGAACGCCGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCAACTGATTG  
ATGGTGCTTGACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACAC  
GTAGGTAACCTGCCCCGAGCGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAA  
CAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTGTTGAAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGATGGAC  
CTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGA  
GTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAAGTGAAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCA  
GCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCACACCGCGTGAGTGAAGA  
AGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAAGCTGCGTGAGAGTAACTGTTCA  
YGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTT  
AGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTG  
AGTGCGAAGAGGACAGTGGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAG  
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGG  
GTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGGTGT  
TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTA  
CGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAAGCATG  
TGGTTTAATTGAAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTT  
AGAGATAAGGCGTTCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGATG  
GTCGTCGTCAGCTCGTG

30

40

【 0 0 1 7 】

配列決定プライマー：3 4 1 フォワード、5 3 0 リバース

2つの部分配列から得られたコンティグ：3 4 1 f 5 3 0 r

50

配列長：計 1 0 8 3 塩基

公知の株との一致度：99.7%

【0018】

ラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス、DSM 16351

【0019】

【化3】

ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTTG  
CATTCACTCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTAA  
AAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTNTAAGGATCGCATGA  
TCCTNAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTNTAGATGGACCCGCGGCGTATTANCTAG  
TTGGTGGGGTAACGGCNTACCAAGNGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGNTGATCGGC  
CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA  
CAATGGACGCAAGTCTGATGGTGCCCGCCGCGAGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAA  
ACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTATCTAA  
CCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  
GTCCGGATTTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC  
TTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCAATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAAGAGGAGAGT  
GGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGC  
GGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTC  
AGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT  
CAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACG  
CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAAAAATTAGGTTTCCCTTCG  
GGGACAAAGTGACAGGTGGTGATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTG

10

20

【0020】

配列決定プライマー：341フォワード、530リバー

2つの部分配列から得られたコンティグ：341f530r

配列長：計 1 0 6 6 塩基

公知の株との一致度：99.5%

【0021】

エンテロコッカス・ファエシウム、DSM 16211

【0022】

【化4】

CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTT  
TCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG  
GTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTG  
GAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGC  
TTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAG  
AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGT  
AGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG  
TTTTTCGGATCGTAAACCTCTGTTGTTAGAGAA  
GAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGG  
GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGG  
GGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTC  
TGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAG  
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAG  
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAAT  
TGACGGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTC

30

40

50



## 【 0 0 2 3 】

配列決定プライマー： 3 4 1 フォワード、 5 3 0 リバース  
 2つの部分配列から得られたコンティグ： 3 4 1 f 5 3 0 r  
 配列長：計 1 0 3 3 塩基  
 公知の株との一致度： 9 9 . 9 %

## 【 0 0 2 4 】

ビフィドバクテリウム・アニマリス、 D S M 1 6 2 8 4

## 【 0 0 2 5 】

## 【 化 5 】

TTGCCATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGGAGGCCTTCGGGTTG  
 TAAACCGCTTTTGTTCAGGGCAAGGCACGGTTTCGGGCCGTGTTGAGTGGAATTGTTCTGA  
 ATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATC  
 CGGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCAT  
 CGCCTAACGGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGAGTGCNTAAGGGAGACTGGA  
 ATCCCCGGTGTAAACGNTGGAATGTGTANATATCGGGAAGAACACCAATGGNNAANGNAGG  
 TCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGACGATNNAAGACGTGAACCAGCGANCNCNATAANAT  
 ACCCTGACTACGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGATGCTGGATGT  
 GGGGCCCTTTCCACGGGTCTGTGTGTCGAGCCAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGT  
 ACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATG  
 CGGATTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGCTTGACATGTGCCGGATCGCCG  
 TGGAACACGGTTTCCCTTCGGGGCCGGTTACAGGTGGTGCATGGTTCGTCAGCTCG  
 TGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCGCATGTTGCCAGC  
 GGGTGATGCCGGGAACCTCATGTGGGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGA  
 CGTCAGATCATCATGCCCTTACGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAA  
 CGCGATGCGACACGGTGACGTGGGGCGGATCGCTGAAAACCGGTCTCAGTTCGGATCGCA  
 GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAACGCCGCG  
 GTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTGGGTAGCACC  
 GGAAGCCGGTGGCCCGACCCCTCGTGGGGCGGACCGTCTAATGGTGAGACTCGTGATTGG

10

20

## 【 0 0 2 6 】

配列決定プライマー： 3 4 1 フォワード、 1 4 9 2 リバース  
 2つの部分配列から得られたコンティグ： 3 4 1 f 1 4 9 2 r  
 配列長：計 1 1 3 9 塩基  
 公知の株との一致度： 9 8 . 9 % - 新種

30

## 【 0 0 2 7 】

本発明のさらなる発展によれば、前記食品、餌及び/又は飲料水添加物は、少なくとも 3つの微生物を含むので、消化管全体をさらに完全に及ぶことが達成でき、さらに、病原性細菌に対する、3つの使用される微生物の相乗効果の検出が可能となる。

## 【 0 0 2 8 】

エンテロコッカス・ファエシウム、 D S M 1 6 2 1 1、ラクトバシラス・リューテリ、 D S M 1 6 3 5 0、及びラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス、 D S M 1 6 3 5を含む混合物は、食品、餌及び/又は飲料水添加物に対する特に好ましい混合物であることが明らかとなった。このような混合物は、病原性細菌、特に、E・コリ細菌の阻害に対して有益であることが判明しただけでなく、その強いpH低下能及び高い酸（例えば、乳酸の）産生速度のために、病原性細菌に対する環境を強く制約するので、さらに、他の異なる病原体の定着も強力に阻害する。

40

## 【 0 0 2 9 】

さらに、エンテロコッカス・ファエシウム、 D S M 1 6 2 1 1、ペディオコッカス・アシディラクチシ、 D S M 1 6 2 1 0及びビフィドバクテリウム・アニマリス、 D S M 1 6 2 8 4を含む食品、餌及び/又は飲料水添加物が特に好ましい。このような食品、餌及び/又は飲料水添加物は、特に、ほぼ全ての一般的に存在する病原性細菌、特に、E・コリ、サルモネラ・コレラエシス (Salmonella choleraesuis)、カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni)、クロス

50

トリジウム・ペルフリゲンズ (*Clostridium perfringens*) の均一に増強された阻害を示し、これは、病原性細菌の複数に対する3つの微生物の相乗効果を与える程度まで、混合物中に含有される微生物の単一効果に比べて増大する。さらに、本混合物は、特に、乳酸および酢酸が比較的大量に形成されるために、強いpH低下能も有し、これも、病原性細菌の生息環境に対して強く有害な効果を有する。

#### 【0030】

本発明の好ましいさらなる発展につれて、さらに、担体として使用可能であり、及びフルクトオリゴ糖、イヌリン、イソマルト・オリゴ糖、ラクチトール、ラクトスクロース、ラクチュロース、ピロデキストリン、大豆オリゴ糖、トランスガラクト・オリゴ糖、キシロ・オリゴ糖、ビタミン、特にビタミンEから選択される栄養物質及び/又はプレバイオティック物質が、前記食品、餌及び/又は飲料水添加物中に含有されているという事実のために、消化管中の使用される微生物に対する生息条件は顕著に改善され、特に、使用される微生物が、消化管内で迅速且つ確実に増殖できるように保護されつつ、同時に、競合的排除によって、病原性細菌の増殖を妨害又は抑制する。使用される栄養物質及び/又はプレバイオティック酸は、病原性細菌に比べて、使用される微生物に増殖上の有利性を与える。

10

#### 【0031】

本発明の好ましいさらなる発展に従えば、ゼオライト、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、トレハロース、キトサン、シェラック、アルブミン、デンプン、スキムミルク粉末、スイートホウェイ粉末、マルトデキストリン、ラクトース、イヌリン、デキストロース、植物油又は(水若しくは生理的食塩水溶液から選択される)溶媒から選択されるさらなる担体が含有されるので、一方で、消化管中での微生物の均一な分布を得ることが可能であり、他方で、競合的排除のさらなる補助を得ることが可能である。

20

#### 【0032】

本発明の好ましいさらなる発展に従えば、マルトデキストリン、ガラナ種子粉末、アラビアゴム、アルギナート、修飾されたデンプン及びデンプン誘導体、デキストリン、(セルロースエステル及びエーテルのような)セルロース誘導体、(ゼラチン、アルブミン、カゼイン、グルテンのような)タンパク質、アカシアゴム、トラガカント、蠟、(パラフィン、ステアリン酸、モノ及びジグリセリドのような)脂質から選択される被覆材料が含有されるので、微生物の使用目的部位(すなわち、消化管)上でのみ、微生物がそれらの活性を発現するように確保するために場合によって含有される担体材料と一緒に微生物を被覆することが可能である。さらに、このような被覆材料を使用することによって、病原性微生物による感染に対して、幼い動物に予防的処置又は治療的処置を与えるために、いわゆるゲル又はペレット適用により、動物の輸送箱中で、例えば、食品、餌及び/又は飲料用添加物で処理すべき動物(日齢のヒナなど)に、食品、餌及び/又は飲料用添加物を直接付与することが可能である。幼い動物がその母親と直接接触することがないために、完全な状態の腸管内菌叢についての適切な基礎がもはや伝達されないので、このような適用は、現代の動物育種において特に重要である。

30

#### 【0033】

病原性細菌に対する食品、餌及び/又は飲料水添加物のより完全な活性を達成するために、添加物は、好ましくは、ビフィドバクテリウム種(*Bifidobacterium* sp.)、ラクトバシラス・サリバリウス(*Lactobacillus salivarius*)、ラクトバシラス種(*Lactobacillus* sp.)、ラクトバシラス・ファーマンタム(*Lactobacillus fermentum*)及びエンテロコッカス・ファエカリス(*Enterococcus faecalis*)の群から選択される少なくとも1つの微生物をさらに含むという結果になるまでさらに発展される。それ自体公知のさらなる微生物を、食品、餌及び/又は飲料水添加物に混合することによって、各動物内で予想されるべき1つ又は数個の病原性細菌に対する活性が、感染のリスクのさらなる減少を確保するために、選択的に増強される。

40

#### 【0034】

50

好ましいさらなる発展によれば、例えば、甲状腺腫、胃、小腸などの使用の所望される部位の機能として、微生物の活性の正確な選択的放出を可能とするために、 $2000\mu\text{m}$ の最大直径を有する、懸濁された、粉末状又は封入された形態で、食品、餌及び/又は飲料水添加物を使用することが特に有益であることが明らかとなった。さらに、もちろん、消化系全体にわたって活性を確保できるようにするために、懸濁及び封入された食品、餌及び/又は飲料水添加物の混合された形態を使用することも可能である。

#### 【0035】

本発明の好ましいさらなる発展によれば、特に、畜産用の鳥及び/又は豚の体調を向上させるための前記畜産動物用の餌添加物が提供され、前記餌添加物は、 $1 \times 10^7$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のエンテロコッカス・ファエシウム、DSM16211、及び $1 \times 10^6$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のラクトバシラス・リューテリ、DSM16350から構成される。使用される微生物の量のこのような選択は、特に、E・コリ細菌の多くに対して優れた活性を示す餌添加物の産生を確保する。

#### 【0036】

本発明の好ましいさらなる発展によれば、特に、畜産用の鳥及び/又は豚の体調を向上させるための前記畜産動物用の餌添加物が提供され、前記餌添加物は、 $1 \times 10^7$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のエンテロコッカス・ファエシウム、DSM16211、 $1 \times 10^7$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のペディオコッカス・アシディラクチシ、DSM16210及び $1 \times 10^7$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に、 $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のビフィドバクテリウム・アニマリス、DSM16284から構成される。このような餌添加物は、特に、サルモネラ・コレラエシス及びクロストリジウム・ペルフルングェンス並びにE・コリ細菌の作用を強力に、又は均一に強力に阻害し、さらに、使用される微生物による酸（すなわち、酢酸及び酪酸）の高い生産のために、このようにして給餌された動物の消化管のpHを強力に低下させて、さらなる病原性細菌が増殖するのを強力に妨げることを確保する。

#### 【0037】

餌添加物の活性を増加させるために、餌添加物は、 $1 \times 10^7$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のエンテロコッカス・ファエシウム、DSM16211、 $1 \times 10^6$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のラクトバシラス・リューテリ、DSM16350、及び $1 \times 10^6$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス、DSM16351から構成される結果まで、好ましくは発展される。使用される微生物の量のこのような選択は、特に、E・コリ細菌に対して優れた活性を示し、さらに、高いpH低下能のために、ほぼ全ての他の病原性細菌の増殖の強力な阻害を提供する餌添加物の製造を確保する。

#### 【0038】

本発明の好ましいさらなる発展によれば、特に、畜産用の鳥及び/又は豚の体調を向上させるための前記畜産動物用の餌添加物は、 $1 \times 10^7$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のエンテロコッカス・ファエシウム、DSM16211、 $1 \times 10^6$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のラクトバシラス・リューテリ、DSM16350、 $1 \times 10^6$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス、DSM16351、 $1 \times 10^7$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のペディオコッカス・アシディラクチシ、DSM16210、 $1 \times 10^7$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のビフィドバクテリウム・アニマリス、DSM16284、及び $1 \times 10^6$ から $1 \times 10^{14}$ 、特に $1 \times 10^{10}$ から $1 \times 10^{12}$ 、CFU/kg 餌添加物のビフィドバクテリウム s p . 2、から構成される。このような餌添加物は

、特に、病原性細菌カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) 及びサルモネラ・コレラエシス (*Salmonella choleraesuis*) に対して顕著に増加された活性を示す。さらに、一般的な E. コリ細菌に対する活性も強力に増強され、一般に、各株の活性を大きく超える。さらに、このような餌添加物の代謝反応は、細菌の相乗効果が存在しなければならないことを証明した。従って、5つの微生物の本混合物は、とりわけ、キシリトールの変換を可能とするが、これは混合物の微生物単独によっては行えない。これに対する理由は、例えば、キシリトールの分解に対して複数の酵素が必要とされ、極めて複雑で分解されない炭水化物の変換を可能とするために、必要な酵素を合同で利用可能とする5つの微生物の本発明に係る組み合わせによってのみ分解されるということである。

10

#### 【0039】

好ましいさらなる発展によれば、餌添加物は、さらに、担体又は天然物質の1%から95%、特に20%から98%を含む。担体又は天然物質がさらに含有されることによって、胃腸環境からの病原性細菌のさらなる除去が、使用される微生物の選択的増殖を支持又は促進することによって実行可能である。

#### 【0040】

本発明の好ましいさらなる発展に従えば、水性細菌懸濁液は、0.01g/kgから10g/kg餌、特に0.025g/kgから2.5g/kg餌の量で餌又はそのペレット上に付与されるので、一方で、餌添加物は動物によって容易に摂取されることが確保され、他方で、餌の摂取の前に餌の表面上に既に存在する病原性細菌は、餌添加物によって撲滅され、又は除去され、又は分解されることが確保される。餌添加物の特に優れた活性を達成するために、餌添加物は、好ましくは、20g/tから20kg/t、特に100g/tから2.5kg/tの量で餌の中に混合され、従って、一方で、微生物の十分な量を提供し、他方で、胃腸環境からの病原性細菌の安全な分解又は除去を確保する。

20

#### 【0041】

本発明の好ましいさらなる発展に従えば、微生物又は微生物の混合物は飲料水添加物として使用され、好ましいさらなる発展によれば、飲料水添加物は、 $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のエンテロコッカス・ファエシウム、DSM16211、及び  $1 \times 10^6$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のラクトバシラス・リューテリ、DSM16350を含む。このような飲料水添加物は、特に病原性細菌の阻害、特に E. コリの阻害に有益である。さらに、このような混合物は、乳酸、酢酸及びプロピオン酸の形成のために、胃腸管中の pH を強力に低下させることが可能であり、従って、病原性細菌に対して好ましくない生息状態を作出し、他方で、形成された酸は、一般的に知られているように、それらの非解離形態において、殺菌的に作用して、病原性細菌の複数に対して全く優れた作用を与える。

30

#### 【0042】

好ましいさらなる発展によれば、 $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のエンテロコッカス・ファエシウム、DSM16211、 $1 \times 10^6$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のラクトバシラス・リューテリ、DSM16350、及び、 $1 \times 10^6$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス、DSM16351から構成される飲料水添加物が使用される。このような飲料水添加物は、E. コリ及びサルモネラ・コレラエシスの阻害に特に有益であることが明らかとなり、さらに、代謝的特性に関して相乗効果も示す。この混合物は、従って、例えば、D-タガトースを分解することが可能であるが、これは、混合物中に含有されている全ての個別の株によっては行えない。代謝特性に関するこれら3つの株の相乗効果は、従って、検出可能である。

40

#### 【0043】

好ましいさらなる発展によれば、本発明は、飲料水添加物が  $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^{14}$

50

4、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のエンテロコッカス・ファエシウム、DSM 16211、 $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のペディオコッカス・アシディラクチシ、DSM 16210、及び、 $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のビフィドバクテリウム・アニマリス、DSM 16284 から構成されるという効果にまでさらに発展される。微生物のこのような混合物は、サルモネラ・コレラエシス、カンピロバクター・ジェジュニ及びクロストリジウム・ペルフリゲンスの群の病原性細菌の阻害に対して特に有益であることが明らかとなり、微生物の胃腸管からの由来が異なるために、さらに、胃腸管全体にわたってその活性を発揮して、胃腸系全体から有害な病原性細菌をほぼ完全に除去することが確保される。

10

#### 【0044】

好ましいさらなる発展によれば、 $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のエンテロコッカス・ファエシウム、DSM 16211、 $1 \times 10^6$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のラクトバシラス・リューテリ、DSM 16350、 $1 \times 10^6$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス、DSM 16351、 $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のペディオコッカス・アシディラクチシ、DSM 16210、 $1 \times 10^7$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のビフィドバクテリウム・アニマリス、DSM 16284、及び  $1 \times 10^6$  から  $1 \times 10^{14}$ 、特に  $1 \times 10^{10}$  から  $1 \times 10^{13}$ 、CFU/kg 飲料水添加物のビフィドバクテリウム種から構成される飲料水添加物が使用される。このような飲料水添加物によって、各微生物の加算的作用を大きく超過する程度まで、頻繁に存在するほぼ全ての病原性細菌、特にE・コリ、サルモネラ、クロストリジウム及びカンピロバクターを阻害することが可能であり、病原性細菌に対して大きな相乗効果が達成される。さらに、このような微生物によって、動物の消化管中のpHを強力に、且つ極めて迅速に低下させて、その作用、特に、病原性細菌の増殖の阻害をさらに増強することが可能である。

20

#### 【0045】

特に、胃腸管中の望ましい微生物の増殖を促進し、除去効果をさらに増強するために、好ましいさらなる発展に係る飲料水添加物は、さらに、担体又は栄養素の1%から95%、特に20%から92%を含む。

30

#### 【0046】

さらなる目的によれば、本発明は、微生物又は微生物の混合物の選択的使用によって、哺乳動物及び/又は畜産用の鳥の免疫系を選択的に強化し、これにより、可能な限り完全に、消化管から病原性細菌を除去することを目的とする。

#### 【0047】

これらの課題を解決するために、本発明は、プロバイオティック健康及び体調増進食品、餌及び/又は飲料水添加物としての、エンテロコッカス・ファエシウム、DSM 16211、ラクトバシラス・リューテリ、DSM 16350、及びラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス、DSM 16351、ペディオコッカス・アシディラクチシ、DSM 16210、及びビフィドバクテリウム・アニマリス、DSM 16284 からなる群から選択される少なくとも2つの微生物の混合物の使用を想定する。前記微生物の選択的混合物によって、特に、消化管中のpHの極めて迅速で強力な低下が実行可能であるので、このような使用は、いわゆる競合的排除によって、哺乳動物及び家畜の消化管から病原性細菌をほぼ完全に除去することが可能であり、本発明に係る使用は、病原性細菌の発展の選択的阻害を可能とする。それを除くと、このような使用中に、少なくとも1つの抗生物質の長期同時投与時でさえ、抗生物質耐性を示す微生物は存在しなかった。

40

#### 【0048】

好ましいさらなる発展によれば、エンテロコッカス・ファエシウム、DSM 16211

50

、ラクトバシラス・リューテリ、DSM 16350、及びラクトバシラス・サリバリウス亜種サリバリウス、DSM 16351の混合物が、本発明に従って使用される。このような使用は、特に、病原性細菌、すなわちE. コリの作用の阻害を確保し、消化管中のpHの極めて迅速な低下によって、他のあらゆる有害な細菌の増殖が強力に妨害又は阻害されて、混合物を与えた哺乳動物及び/又は畜産用の鳥の疾病に対する感受性を顕著に低下させる程度まで、病原性細菌に対する生育条件を破壊する。

【0049】

本発明のさらなる発展によれば、エンテロコッカス・ファエシウム、DSM 16211、ペディオコッカス・アシディラクチシ、DSM 16210、及びビフィドバクテリウム・アニマリス、DSM 16284の混合物が好ましく使用され、本混合物は、それぞれ、特に、サルモネラ・コレラエシス、カンピロバクター・ジェジュニ及びクロストリジウム・ペルフリンゲンスの阻害を実行可能とし、さらに、概ね、使用される混合物のプロバイオティック効果が個別の微生物を使用したときの加算的效果を大きく超過するように、他の病原性細菌に対する生育条件を大きく破壊することを示すことができる。

10

【0050】

本発明の好ましいさらなる発展によれば、エンテロコッカス・ファエシウム、DSM 16211、ラクトバシラス・リューテリ、DSM 16350が、ラクトバシラス、ストレプトコッカス及び/又はビフィドバクテリアのこれらの群から得られる他の株とともに使用され、ラクトバシラス、ストレプトコッカス及び/又はビフィドバクテリアの群から得られるさらなる使用が、胃腸管の選択的領域中での特殊な微視物の選択的使用又は選択的阻害を可能とし、病原性細菌によって引き起こされる特定の疾患の発生を特に阻害する。

20

【0051】

本発明のさらなる好ましい発展によれば、微生物の混合物は、免疫防御を強化するために使用される。このような使用は、特に、使用される微生物の選択的な選択によって可能となり、微生物が消化管の最も多岐にわたる領域に由来するため、使用される微生物が、消化系の全長にわたってそれらの活性を発現し、これにより、実際に、このようにして処理された哺乳動物又は畜産用の鳥の、消化管全体での特異的病原性細菌に対する免疫防御を顕著に強化することが確保される。

【0052】

好ましいさらなる発展によれば、微生物の混合物は、マルトデキストリン、ガラナ種子粉末、アラビアゴム、アルギナート、修飾されたデンプン及びデンプン誘導体、デキストリン、セルロース誘導体、タンパク質、アカシアゴム、トラガカント、脂質から選択される少なくとも1つのゼラチン化剤及び/又はペレット形成剤又は被覆材料とともに使用される。ゲル及び/又はペレット形成剤と一緒に微生物の混合物を使用することによって、いわゆるゲル適用のペレットとしてのその使用が実行可能となり、特に、母親によって適切な免疫増強物質がもはや供給されえない極めて若い動物に、それらの免疫防御を強化するために必要とされる必要な微生物が安全且つ確実に供給されるようになる。このようなゲル又はペレット適用を使用する場合、微生物の混合物は、ゼラチン化剤で覆われるか、又はカプセル封入され、この化合物は、この化合物を供給されるべき若い動物上に直接噴霧若しくは適用されるか、又は、例えば、若い雛の場合には、輸送箱中に導入され、若い動物にとって極めて重要な微生物が若い動物に供給されることを確保する。液体担体ともに、スプレー懸濁液として微生物の混合物が、該混合物で処理されるべき若い動物上に直接適用されるという点で、同様の好ましい使用が達成される。微生物の混合物で若い動物を噴霧することによって、このスプレー混合物の一部が、自分で毛づくろいすることによって、又は他の若い動物と接触することによって消化管中に摂取され、これにより、免疫防御を強化するために不可欠である微生物の供給が、再度確保される。

30

40

【0053】

以下、典型的な実施形態によって、本発明をさらに詳しく説明する。その中で、実施例1は、寒天プレートアッセイモデル中での単離された試験細菌による病原性細菌の阻害を示す。実施例2は、5つ、3つの微生物を含有し、又は微生物を含有しない餌及び飲料水

50

添加物を日齢の雛に与える給餌検査を示している。実施例 3 は、5 つの微生物を含有する飲料水添加物を日齢の雛に与えるフィールド研究を示している。実施例 4 は、所定の時点で、5 つの微生物を含有する飲料水添加物を日齢の雛に与える給餌試験を示す。実施例 5 は、3 つ又は 5 つの微生物の混合物を使用して、所定の時点で、飲料水を通じて、又は飼料を通じて、微生物が投与された日齢の雛におけるサルモネラチャレンジについて示している。実施例 6 は、離乳した子ブタにおける給餌試験を示している。

【実施例 1】

【0054】

寒天プレートアッセイモデルにおける、本発明に従う単離された C E 試験細菌（競合排除試験細菌）による病原性細菌の阻害

10

アッセイは、MRS 寒天プレート上で行った。接種によって、寒天プレート上に株を配置し、冷却したバイアルからこの株を直接採取する。プレートの温置は、嫌氣的条件下で、48 時間行った。適切な培地中での病原性株の培養後、各病原性株を含有する半固体培地約 9 mL を、慎重にプレートに注いだ。E. コリ及びサルモネラ・クロエラエスuis ( *Salmonella choleraesuis* ) については、半固体 VL 培地を、カンピロバクター・ジェジュニ ( *Campylobacter jejuni* ) については、半固体 Brain Heart Infusion Medium を、並びにクロストリジウム・ペルFRINGENS ( *Clostridial perfringens* ) については、半固体 Reinforced Clostridial Medium を使用した。

20

【0055】

続いて、病原性株の各温置条件下で、プレートを温置した。プレートの評価は、試験細菌の直径及び阻害ゾーンを測定し、そこから、阻害ゾーン対試験細菌比を計算することによって行った。阻害ゾーン / 試験細菌比に基づいて、試験細菌の阻害作用の評価を行うことができる。下表 1 は、個別に及び混合物中で使用された株に対する結果を示している。

【0056】

【表 1】

表 1

単離株	株	E. コリ	E. コリ	サルモネラ・コレラエシス	カンピロバクター・ジェジュニ	クロストリジウム・ペルフリンゲンス
DSM 16211	エンテロコッカス・ファエシウム	2.11	1.44	1.37	1.28	1.43
DSM 16284	ビフィドバクテリウム・アニマリス	0.45	0.85	0.84	0.33	1.85
DSM 16210	ペディオコッカス・アシディラクテシ	1.52	1.38	1.34	1.47	1.51
DSM 16351	ラクトバシラス・サリバリウス	1.49	2.26	1.46	1.50	2.05
DSM 16350	ラクトバシラス・リユーテリ	2.53	1.42	1.60	1.36	2.12
範囲		0.45-2.5	0.85-2.26	0.84-1.37	0.33-1.5	1.01-2.12
NCIMB 10415	エンテロコッカス・ファエシウム	1.37	1.35	1.20	1.22	1.31
DSM 20104	ビフィドバクテリウム・アニマリス	0.41	0.79	0.65	0.31	1.42
DSM 20284	ペディオコッカス・アシディラクテシ	1.41	1.20	1.10	1.32	1.35
DSM 20555	ラクトバシラス・サリバリウス	1.40	2.19	1.09	1.41	1.63
DSM 20016	ラクトバシラス・リユーテリ	2.14	1.30	1.20	1.35	1.54
個別の株の平均活性		1.48	1.56	1.11	0.92	1.57
DSM 16211、 DSM 16210、 DSM 16284		1.70	1.70	1.90	1.30	1.60
DSM 16211、 DSM 16350、 DSM 16351		2.50	1.80	1.60	1.30	1.80
DSM 16210、 DSM 16211、 DSM 16350、 DSM 16351、 DSM 16284		2.60	1.90	2.10	1.70	1.90

## 【0057】

寄託された微生物（太字で書かれている。）の、関連の株（筆記体で書かれている。）との比較から、寄託された微生物（太字で書かれている。）が、既に公知の株（筆記体で書かれている。）より、かなり高い程度で、病原性細菌を阻害できることが明らかである。

## 【実施例 2】

## 【0058】

全ての 5 つの寄託された微生物の混合物又は 3 つの寄託された微生物の混合物のうち何れかを投与された日齢の雛における給餌試験。混合物は、開始期において、飲料水を介して投与され、さらに、全試験期間の間、餌を介して投与された。

## 【0059】

試験パラメータ：

600 匹の日齢の雛（種：Ross 308）を、3 つの群に分けた。



群 1 : 添加物なしの対照

群 2 : 5 つの微生物 ; 1 から 2 1 日まで、飲料水中 ; 1 から 4 2 日まで餌を介する

群 3 : D S M 1 6 2 1 0、D S M 1 6 2 1 1、D S M 1 6 2 8 4 ; 1 から 2 1 日まで、飲料水中 ; 1 から 4 2 日まで餌を介する

動物は、水及び餌を自由に摂取できた。

【 0 0 6 0 】

記録された体調パラメータ :

生体重、一日の体重増加、餌の摂取、餌変換比率 ( = F C R )、死亡率、欧州生産効率因子 ( E P F F ; E u r o p e a n P r o d u c t i o n E f f i c i e n c y F a c t o r )。

【 0 0 6 1 】

【表 2】

表 2 : 給餌試験における体調データの要約

群	生体重 (g)	一日の増加 (g)	餌の接種 (g/動物)	FCR	死亡率	EPEF
対照	2588 <sup>a</sup>	60.0	91.0	1.68	6.4	343
DSM 16210、 DSM 16211、 DSM 16284	2657 <sup>ab</sup>	62.4	91.3	1.68	5.0	357
DSM 16211、 DSM 16284、 DSM 16210、 DSM 16351、 DSM 16350	2689 <sup>b</sup>	63.1	92.3	1.69	3.3	366

a, b 有意な差 (P<0.05)

\* EPEF (欧州生産効率因子)

【 0 0 6 2 】

製品の使用によって、試験群の動物の生体重が有意に改善された。餌の摂取は、5 つの微生物を全て含有する製品群では僅かに増加し得たが、餌変換比については、差は観察されなかった。試験が真夏に行われ、動物は極めて高い室温に晒されたので、概ね、死亡率は高かった。しかしながら、このさらなるストレス因子にも関わらず、製品群の体調の顕著な増加が観察された。

【実施例 3】

【 0 0 6 3 】

フィールド試験では、実際の条件下に置かれ、全期間を通じて飲料水中に投与された日齢の雛において、5 つの全微生物の混合物を検査した。

【 0 0 6 4 】

試験パラメータ :

約 5 3 , 0 0 0 匹の日齢の雛を、2 つの階層に等しく分割した。

1 階 : 添加物なしの対照

2 階 : 動物は、飲料水及び餌中の 5 つの全ての微生物を自由に摂取可能。

【 0 0 6 5 】

記録された体調パラメータ :

生体重、死亡率

【 0 0 6 6 】

下表 3 から明らかなように、とりわけ、表 4 に列記されている先行する生産サイクルに比べても、動物の体調は、顕著に向上しており、以前に発生した E . コリの問題が解決されている。

【 0 0 6 7 】

## 【表 3】

表 3：体調データの要約

	生体重(g)	死亡率%
1 階	2282	3.38
2 階	2328	3.03

## 【0068】

## 【表 4】

表 4：農場の最後の6生産サイクルの成績

	動物の数	死亡率(%)	生体重 (g)
1	51000	5.55	2109
2	49990	6.46	2228
3	49000	2.65	2043
4	50592	5.41	1627
5	48450	5.09	1785
6*	53244	3.20	2305

10

\*...5つの微生物を全て有する

## 【実施例 4】

## 【0069】

20

給餌試験では、所定の時点で、飲料水を介して、5つの微生物全ての混合物を日齢の雛に投与した。

## 【0070】

試験パラメータ：

400匹の日齢の雛、種：Ross 308を、無作為に2つの群に分けた。

群1：対照；添加物なし

群2：1、2、3、7、8、9及び14、15、16日目に、飲料水中の5つの微生物動物は、水及び餌を自由に摂取できた。

## 【0071】

記録された体調パラメータ：

30

生体重増加、餌の摂取、餌変換比率(=FCR)、死亡率、欧州生産効率因子(EPEF; European Production Efficiency Factor)。

## 【0072】

結果は、表5に要約されている。

## 【0073】

## 【表 5】

表 5：体調データの要約

	対照	5つの微生物
生体重(g)	2320.66a	2392.19b
体重増加(g)	54.17	55.87
餌消費(g)	4365	4482
餌変換比(=FCR)	1.92	1.90
死亡率(%)	1	1.5
EPEF*	285	295

40

a, b 有意な差 (P&lt;0.05)

\* EPEF (欧州生産効率因子)

## 【0074】

微生物の添加のために、動物の生体重が有意に増加した。餌の摂取及び餌変換比率の観

50

点からは、2つの群は互いに同等であった。量産性数(=EPEF)は、対照群より、製品群が明確に高かった。

#### 【実施例5】

#### 【0075】

日齢の雛におけるサルモネラチャレンジ

5つの微生物全てから構成される製品及び3つの微生物から構成される製品を、全試験期間にわたって餌の中に投与し、開始期には、飲料水を介して投与した。

#### 【0076】

試験パラメータ：

304匹の日齢の雛(種：Ross308)を、4つの群に分けた。

群1：陰性対照；添加物なし、及びサルモネラチャレンジなし

群2：陽性対照；添加物なし、及びサルモネラチャレンジあり

群3：サルモネラチャレンジ+5つの微生物の製品；1から21日まで、飲料水中；1から42日まで餌を介する。

群4：サルモネラチャレンジ+3つの微生物(DSM16211、DSM16210、DSM16284)の製品；1から21日まで、飲料水中；1から42日まで餌を介する動物は、水及び餌を自由に摂取できた。

#### 【0077】

5日目に、群2、3及び4の全ての動物に、サルモネラ・エンテリティディス(*Salmonella enteritidis*)の $6 \times 10^5$  cfuの用量を経口接種した。正常な体調データの対照と同時に、陰性対照を実施した。

#### 【0078】

記録された体調パラメータ：

生体重増加、餌の摂取、餌変換比率(=FCR)、有病率(下痢の数によって測定)、死亡率、欧州生産効率因子(EPEF；European Production Efficiency Factor)。結果は、表6に要約されている。

#### 【0079】

#### 【表6】

表6：体調データの要約

	1	2	3	4
総体重の増加(g)	2347.29 <sup>a</sup>	2632.39 <sup>b</sup>	2716.49 <sup>ab</sup>	2702.18
餌消費(g)	4790.07 <sup>a</sup>	4559.11 <sup>b</sup>	4534.30 <sup>b</sup>	4527.02
餌変換比(=FCR)	1.68	1.73	1.67	1.67
%有病率	6.34 <sup>a</sup>	19.14 <sup>a</sup>	15.65 <sup>b</sup>	16.79 <sup>b</sup>
%死亡率	0.96	0.47	0.72	0.669
EPEF*	.422	385	416	412

a, b 有意な差 (P<0.05)

\* EPEF (欧州生産効率因子)

#### 【0080】

総体重増加に関しては、対照群に比べて、サルモネラ・エンテリティディスでの感染のために、顕著な成績の低下が生じたが、これは、本発明の製品の添加によって改善される。3つの微生物を含む製品及び5つの微生物を含む製品の両者を添加することによって、顕著な改善が達成されることが示された。餌接種も、感染によって有害な影響を受けたが、餌変換比率は、本発明の製品の添加によって顕著に改善され得た。観察される下痢の数によって測定された有病率でさえ、非処理群に比べて、製品の添加によって顕著に低下され得た。

#### 【実施例6】

#### 【0081】

日齢の雛における給餌試験 - サルモネラチャレンジ

それぞれ、36匹の日齢の雛からなる3つの群を、サルモネラチャレンジを用いた給餌試験に供した。第一の群には、何れの製品も投与せず、第二の群には、5つの寄託された株全ての混合物を投与し、第三の群には、以下の微生物：ラクトバシラス種、ラクトバシラス種、ビフィドバクテリウム種及びエンテロコッカス・ファエシウムを含む市販のプロバイオティック製品を与えた。

#### 【0082】

試験のアプローチ：

隔離された部屋の中の檻の中で、日齢の雛を飼育した。1、2及び3日齢に、雛が自由に飲めるようにした飲料水を介して、プロバイオティック製品を投与した。第3日齢目に、サルモネラ・エンテリディティスの懸濁液の1.0mLを全ての雛に経口投与した。サルモネラ溶液の濃度は、 $1.0 \times 10^6$  CFU/mLであった。さらに、全ての雛に、餌及び水を自由に与えた。動物の排泄物中のサルモネラの濃度を測定した。

#### 【0083】

##### 【表7】

評価：

群	排泄物中のサルモネラの濃度 (CFU log 10)
市販のプロバイオティック製品	2.43 <sup>b</sup>
製品混合物	測定せず (<2.00) <sup>a</sup>
対照	3.2

#### 【0084】

結果は、5つの寄託された微生物の組み合わせのみが、サルモネラ細菌の数が検出限界未満に低下する程度まで、サルモネラの増殖を有意に低下させることができることを示している。

#### 【実施例7】

#### 【0085】

それぞれ、5つの微生物を含む混合物及び3つの微生物を含む混合物を用いた、離乳した仔ブタでの給餌試験。

#### 【0086】

給餌試験では、離乳した仔ブタの体調に対する効果について、本発明の微生物を検査した。47日の試験期間全体にわたって、餌を介して、製品を投与した。

#### 【0087】

試験パラメータ：

101匹の離乳した仔ブタ（種：OHYB）を、3つの群に分けた。

群1：添加物なしの対照

群2：5つの微生物（C5）；餌を介して1から47日まで

群3：DSM16211、DSM16350、DSM16351を含む3つの微生物（C3）；餌を介して1から47日まで

動物は、水及び餌を自由に摂取できた。

#### 【0088】

記録された体調パラメータ：

生体重、一日の体重増加、餌の摂取、餌返還比率（=FCR）、死亡率

結果は、表7に要約されている。

#### 【0089】

## 【表 8】

表 7：体調データの要約

	対照	C5	C5 と対照の差	C3	C3 と対照の差
動物の数	34	33		33	
当初体重(kg)	7.75	7.76		7.75	
13 日目の体重(kg)	11.89	12.26	+3.1%	12.09	+1.7%
最終体重(kg)	31.67	33.00	+4.2%	32.5	+2.6%
1 から 13 日目までの、一日の体重増加(g)	321	350	+9.0%	334	+4.0%
14 から 47 日目までの、一日の体重増加(g)	582	610	+4.8%	600	+3.09%
1 から 47 日目までの、一日の体重増加(g)	509	537	+5.5%	527	+3.5%
死亡率(数)	2	2			

10

## 【0090】

製品の使用によって、試験群の動物の生体重が有意に改善された（すなわち、それぞれ、最初の13日後に、3%と1.7%、試験の終了まで、それぞれ、4%及び2.6%）。一日の体重増加の観点から、製品の添加による顕著な増加も得ることができた。

## 【0091】

下表 8 には、給餌データが要約されている。

20

## 【0092】

## 【表 9】

表 8

	対照	C5	差	C3	差
餌の消費(g)					
1-13 日	495	511	+3.2%	504	+1.8
14-47 日	1155	1193	+3.3%	1180	+2.2
1-47 日	972	1033	+6.3	1012	+4.1
FCR (kg/kg)					
1-13 日	1.76	1.66		1.68	
14-47 日	1.98	2.02		2.00	
1-47 日	1.95	1.96		1.95	

30

## 【0093】

餌摂取は、製品群で僅かに増加することができたが、餌変換比率の観点では、最初の試験期間において、とりわけ改善が見られた。しかしながら、その後は、餌変換比率の差を測定することはできなかった。

## 【0094】

特許協力条約に基づく規定の規則 13 の 2、第 4 段に基づくリスト。

40

## 【0095】

本願に挙げられている全ての微生物は、German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH - DSM Z、Mascheroder Weg 1b、38124 Braunschweig、Germany (DE) に寄託された。

## 【0096】

【表 10】

受託番号	受託日
DSM 16284	10. 03. 2004
DSM 16211	06. 02. 2004
DSM 16210	06. 02. 2004
DSM 16350	15. 04. 2004
DSM 16351	15. 04. 2004

## 【実施例 8】

10

## 【0097】

若鶏中の腸内細菌叢の陽性シフト

若鶏の4つの群を給餌試験に供し、2つの群には、寄託された5つの微生物から構成される製品混合物が投与され（1つの群は、全く添加物を加えない陰性対照であり、1つの群は、抗生物質体調促進物質、すなわちアビアルマイシンを添加した陽性対象である。）

## 【0098】

1つの群には、飲料水を介して、5つの微生物の混合物を与えられ、1つの群には、餌を介して、微生物の混合物が投与された。

検査の間、好氣的細菌、大腸菌の総数、嫌気性細菌及びバクテロイドの総数に関して、各群の間で統計的に有意な差は存在しないことが明らかとなった。5つの微生物の混合物を与えた群は、陽性及び陰性対照（NK、PK）と比べて、ビフィドバクテリア種、ラクトバシラス属種及びグラム+球菌（例えば、エンテロコッカス、ペディオコッカス）に関して、有意により高い細菌数を示した。

20

## 【0099】

この比較のフローチャートが、図に記されている。

## 【0100】

図のフローチャート（黒い枠の部分）は、それぞれ、飲料水又は餌を介して5つの微生物の混合物を与えられた群が、「善玉」細菌のかなりより高い数を示すことを示している。この図のグラフでは、陰性対照群は黒のバーとして表されており、陽性対照群は斜線のバーとして表されており、餌を介して5つの微生物が投与された群は点状のバーによって示され、飲料水を介して5つの微生物の混合物が投与された群は、単なる灰色のバーとして記されている。

30

## 【実施例 9】

## 【0101】

若鶏での給餌試験

4,500匹の雄及び雌の若鶏（Ross 308）を2つの群に分け、2つの群の各々は、観察を容易にするために、3つのさらなる亜群へと再分類された。両群は標準的な食物を与えられ、試験群には、 $1 \times 10^9$  CFU/kg 餌の用量で、寄託された5つの微生物の混合物が与えられた。対照群には、同じ用量で、市販のプロバイオティック製品が投与された。物質の投与は、食物を介して行った。

40

## 【0102】

38日後に、試験群の体調パラメータは、生体重及び一日の体重増加及び餌変換率に関して、顕著に改善された。さらに、死亡率は、比較群に比べて、有意に低下した。結果は、下表9に示されている。

## 【0103】

## 【表 1 1】

表 9

	市販のプロバイオティック製品	C5 製品混合物
動物の数	2250	2250
生体重(g)	1875	2034
一日の体重増加(g)	52	56.5
餌変換比	1.66	1.61
死亡率(%)	1.15	0.40

## 【実施例 1 0】

10

## 【0 1 0 4】

研究室試験では、寄託された 5 つの微生物の抗生物質耐性を調べ、可能な場合、関連のビフィドバクテリアの耐性記録と比較した。困難な培養条件のために、比較株が文献中に見当たらず、又は比較株に対して確実なデータが取得できなかったのは、ビフィドバクテリウム・アニマリス株のみであった。一般的な抗生物質に関する耐性試験の結果が、入手可能な場合には、比較株とともに、下表に示されている。

## 【0 1 0 5】

## 【表 1 2】

	ベディオコッカス・アシディ ラクティ、DSM 16210	ベディオコッカス・アシディ ラクティ、参照株
$\beta$ -ラクタムー アンピシリン	S	S
アミノグリコシド		
ストレプトマイシン	S	R
カナマイシン	S	R
ネオマイシン	S	R
ゲンタマイシン	S	R
アムフェニコールー クロロアムフェニコール	S	S
マクロライドー エリスロマイシン	S	S
アンサマイシンーリファン ピン	S	S
ストレプトグラミンー チヌ／ダルホプリスチン	S	R
フルオロキノロンー エンロフロキサシン	S	n. a.
オキサゾリジノンー リネゾリド	S	R

20

30

## 【0 1 0 6】

40

【表 13】

	エンテロコッカス・ファエシウム、DSM 16211	エンテロコッカス・ファエシウム、参照株 1	エンテロコッカス・ファエシウム、参照株 2
$\beta$ -ラクタム-アンピシリン	S	S	S
アミノグリコシド			
ストレプトマイシン	S	R	S
カナマイシン	S	R	R
ネオマイシン	S	R	R
ゲンタマイシン	S	R	S
アムフェニコール-クロロアムフェニコール	S	S	S
テトラサイクリン	S	R	S
マクロライド-エリスロマイシン	S	R	R
アンサマイシン-リファンピン	S	S	S
ストレプトグラミン-チヌ/ダルホプリシン	S	R	n. a.
オキサゾリジノン-リネゾリド	S	S	n. a.
フォレート阻害剤-トリメトプリム	S	R	n. a.
糖ペプチド-バンコマイシン	S	S	S

10

20

【0107】

30



【表 1 4】

	ラクトバシラス・サリ バリウス亜種サリバ リウス、DSM 16351	ラクトバシラス・サ リバリウス、参照株 1	ラクトバシラス・サ リバリウス、参照株 2
$\beta$ -ラクタムー アンピシリン	S	S	S
アムフェニコールー クロロアムフェニコ ール	S	S	S
テトラサイクリン	S	S	R
マクロライドー エリスロマイシン	S	S	S
アンサマイシンーリ ファンピン	S	S	S
ストレプトグラミン ー チヌ／ダルホプリス チン	S	R	S
オキサゾリジノンー リネゾリド	S	S	S
フォラート阻害剤ー トリメトプリム	S	R	S

10

20

【 0 1 0 8 】

【表 1 5】

	ラクトバシラス・リユーテ リ、DSM 16350	ラクトバシラス・リユーテ リ、参照株
アムフェニコールー クロロアムフェニコール	S	S
マクロライドー エリスロマイシン	S	R
アンサマイシンーリファン ピン	S	S
ストレプトグラミンー チヌ／ダルホプリスチン	S	R
オキサゾリジノンー リネゾリド	S	S

30

【 0 1 0 9 】

【表 16】

	ビフィドバクテリウム・アニマリス、DSM 16284	
β-ラクタムー アンピシリン	S	
アミノグリコシド		
ネオマイシン	R	
ゲンタマイシン	R	
アムフェニコールー クロロアムフェニコール	S	
テトラサイクリン	R	
マクロライドー エリスロマイシン	R	
アンサマイシンーリファンピン	S	
ストレプトグラミンー チヌ/ダルホプリスチン	R	
フルオロキノロンー エンロフロキサシン		
オキサゾリジノンー リネゾリド	S	
フォレート阻害剤ー トリメトプリム	R	
糖ペプチドー バンコマイシン	S	

S・・・感受性、R・・・耐性

## 【0110】

これらの比較試験の結果から、寄託された微生物の何れも、検査された公知の抗生物質に対しても耐性とならず、これら全てが、感受性及び過敏性の状態を保っていた。

## 【0111】

PCT出願に対する添付書類

出願人：Erber Aktiengesellschaftら

特許協力条約に基づく規定の規則13の2、第4段に基づくリスト。

## 【0112】

本願に挙げられている全ての微生物は、German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH - DSMZ、Mascheroder Weg 1b、38124 Braunschweig、Germany (DE) に寄託された。

## 【0113】

## 【表 17】

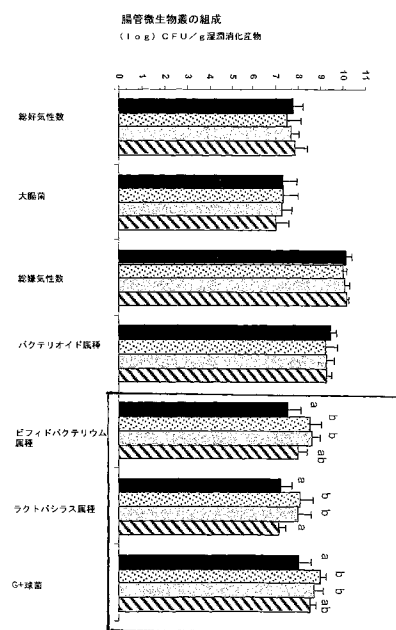
受託番号	受託日
DSM 16284	10. 03. 2004
DSM 16211	06. 02. 2004
DSM 16210	06. 02. 2004
DSM 16350	15. 04. 2004
DSM 16351	15. 04. 2004

## 【図面の簡単な説明】

## 【0114】

【図 1】実施例 8 の試験における腸管微生物叢の組成を示す。

【図 1】



FIGURE

【配列表】

0004846795000001.app

## フロントページの続き

微生物の受託番号 DSMZ DSM 16351

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ブライル, レジーナ

オーストリア国、アー - 3 5 5 0・ランゲンロイス・バーンシュトラッセ・1 4

(72)発明者 シヤツツマイヤー, ゲルト

オーストリア国、アー - 3 4 3 0・トウルン、ヨーゼフ - ハイドン - ガツセ・1

(72)発明者 ピンダー, エバ - マリア

オーストリア国、アー - 7 5 0 1・ウンターバルト・2 6 9

(72)発明者 モーン, ミヒヤエラ

オーストリア国、アー - 3 4 3 0・トウルン、バツハガツセ・3

(72)発明者 クリミツチ, アルフレッド

オーストリア国、アー - 3 4 5 4・レイドリング、ノイシュティフトガツセ・2 6

(72)発明者 ニツチ, サビーネ

オーストリア国、アー - 3 1 0 0・ザンクト・ペルテン、ランズベルゲルシュトラッセ・3 2 / 7

(72)発明者 クローゼ, ビビアナ

オーストリア国、アー - 1 2 1 0・ウイーン、バウムベルガツセ・2 / 1 2

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 特開 2 0 0 2 - 2 3 8 4 6 5 ( J P , A )

特開 2 0 0 2 - 3 0 6 1 2 5 ( J P , A )

国際公開第 9 9 / 0 6 4 0 2 3 ( W O , A 1 )

特表 2 0 0 2 - 5 0 5 2 5 1 ( J P , A )

特表 2 0 0 5 - 5 2 6 0 3 8 ( J P , A )

特表 2 0 0 6 - 5 0 1 2 8 1 ( J P , A )

特開 2 0 0 2 - 0 6 5 2 0 6 ( J P , A )

特開 2 0 0 4 - 2 5 0 3 3 7 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A23L 1/275 ~ 1/308

PubMed