

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4584577号

(P4584577)

(45) 発行日 平成22年11月24日 (2010.11.24)

(24) 登録日 平成22年9月10日 (2010.9.10)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 36/06 (2006.01) A 6 1 K 35/72
A 6 1 K 31/736 (2006.01) A 6 1 K 31/736
A 6 1 P 33/02 (2006.01) A 6 1 P 33/02 1 7 3

請求項の数 12 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2003-516540 (P2003-516540)
(86) (22) 出願日 平成14年7月26日 (2002.7.26)
(65) 公表番号 特表2005-507862 (P2005-507862A)
(43) 公表日 平成17年3月24日 (2005.3.24)
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/023939
(87) 国際公開番号 W02003/011310
(87) 国際公開日 平成15年2月13日 (2003.2.13)
審査請求日 平成17年2月3日 (2005.2.3)
(31) 優先権主張番号 60/308, 215
(32) 優先日 平成13年7月27日 (2001.7.27)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 NCYC 1026

前置審査

(73) 特許権者 500481444
オールテック インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ケンタッキー州 403
56 ニコラウスヴィル キャットニップ
ヒル パイク 3031
(74) 代理人 100079980
弁理士 飯田 伸行
(72) 発明者 ドーソン, カール, エイ.
アメリカ合衆国 ケンタッキー州 405
07, レキシントン, ローリィ レーン
729
(72) 発明者 セフトン, アーノルド, イー.
カナダ オンタリオ州 エヌ1ジー 3ジ
ー6, グエルフ, シャディー ブルック
クレセント 56

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コクシジウムの制御のための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コクシジウム感染を患っている、又はコクシジウム感染に曝されている動物（但し、ヒトを除く）におけるコクシジウム感染を防止又は軽減させるための方法であって、コクシジウム感染を防止又は軽減させるのに有効な量のサッカロミセス（*Saccharomyces*）酵母細胞壁含有組成物を該動物に投与する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記工程が該組成物を飼料に添加する工程を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

該組成物が少なくとも1種の酵母由来マンナンオリゴサッカリドを含む請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 4】

該組成物が、ウシ、ブタ、鳥類、ウマ、ヒツジ、ウサギ、ヤギからなる群から選択される動物に与えるために処方されている請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

該組成物が、サッカロミセス・セレビスイ（*Saccharomyces cerevisiae*）から得られるものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

該組成物が、サッカロミセス・セレビスイ（*Saccharomyces cerevisiae*）菌株 NCYC 1026 から得られるものである請求項 1 記載の方法。 20

【請求項 7】

該組成物が該酵母の乾燥細胞からなる請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

該動物がブタ又は鳥類である請求項 4 記載の方法。

【請求項 9】

該鳥類が、ニワトリ、七面鳥、アヒル、ガチョウ、キジ、ウズラ、又はペット用鳥である請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

該組成物が更に、少なくとも1種の抗コクシジウム性イオノフォアを含む請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 11】

該組成物が更に、少なくとも1種の抗コクシジウム性ステロイド・サポゲニンを含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

該酵母細胞壁含有組成物を投与する前又は後に、コクシジウム感染の存在又は盲腸炎について該動物をモニターすることを含む請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は動物中におけるコクシジウム感染の制御のための方法および組成物に関する。特に、本発明は哺乳類および鳥類におけるコクシジウム感染の制御に使用される酵母細胞および酵母細胞壁含有調剤の使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

コクシジウム症は、コクシジウム・アイメリア種によりもたらされる哺乳類および鳥類の原生動物寄生虫性感染であり、腸管の病変、下痢、腸炎および死亡を生じさせる。アイメリア種 (*E. tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*) は家畜産業を悩ます最も一般的な3種のコクシジウムである。これらのコクシジウム種は作用形式が夫々異なる。*E. tenella*は盲腸を攻撃し、*E. maxima*および*E. acervulina*は腸管の中間部および上部をそれぞれ攻撃する。

30

【0003】

コクシジウム症は家畜生産において、経済的に重要な病気であり、重度でない感染でも、飼料変換効率の損失および体重増加率の減退は、近代的集約的動物生産環境において、利益と、損失との境目を表すことになる。コクシジウム感染は他の症候群への素因となることが知られており、特に壊疽性腸炎（腸管内層のバクテリア性感染であって、消化管の種々の領域の腸管内層の壊死をもたらす）の素因となる。

【0004】

コクシジウム微生物は、例外的な再生能力のため、および可なりの期間に亘る異常な生存能力を与えるその接合子の壁体の組成物のため、環境に生き残ることができる。この接合子は糞および糞を介してばら撒かれるほか、空気中に浮遊した状態でもばら撒かれる。例えば、埃の移動により、並びにミミズ、甲虫、ハエ、害虫などの媒介微生物によりばら撒かれる。家畜産業においては、糞を再使用することが標準的慣習であるため、先に感染した群れからの糞中のコクシジウムは将来の感染のための貯蔵部として作用することになる。

40

【0005】

従来の殺菌剤は、コクシジウムに対して比較的有効なものとは言えない。ハウジングの完全な洗浄および厳格な生物安全対策が、正しい衛生を維持し、動物および鳥が接する接合子の数を減少させるために必要となる。残念ながら、潜在的宿主動物の比較的急激な移転（例えば、プロイラーの運用における群れの急激な置換）のため、接合子の恒久的貯蔵がしばしば維持される。僅かな数の接合子でも数週間の内に大量の感染を生じさせるこ

50

とができる。したがって、正しい衛生処置の維持を超えた制御対策が必要となる。

【 0 0 0 6 】

現在公知のコクシジウム制御法として、抗コクシジウム薬剤の使用および予防接種プロトコルが行われている。抗コクシジウム薬はその意図した目的において一般的に有効である。すなわち、これら薬剤は処置すべき動物の飼料中又は飲料水中に都合良く含ませることができる。これら薬剤の例としては、イオノフォア（モネンシン、ラサロシド）および化学的抗コクシジウム薬を挙げることができる。コクシジウムの治療/制御に使用される従来の薬剤の大きな欠点は、時が経るにつれて処置された微生物がその特定の薬剤に対して抵抗を示すようになることである。したがって、異なる種類の薬剤を、しばしば巡回的に又は日替え的（折返しプログラム）に沿って、使用し、抵抗性微生物の発達を防止しなければならぬ。この折返しプログラムが実行された場合でも、コクシジウム感染に対する薬効が、この抗コクシジウム薬剤の変更の期間において効かなくなることがある。更に、或る種の薬剤はコクシジウム症の制御に有用ではあるが、その処置された動物の肉、ミルクおよび卵の販売に関連する安全性の問題に対処するため、その動物の屠殺又は消費前の所定の投与中止期間を必要とする。

10

【 0 0 0 7 】

コクシジウム微生物に対し現在使用されているワクチンも、一般的に意図する目的において有効であり、処置した動物における感染に対して能動免疫を生じさせる。ワクチンはコストが大きく、病気のプロセスに関与するコクシジウム微生物の各々の種に対する保護免疫応答を刺激する適当な抗原を含むものでなければならないという欠点を有している。例えば、家禽において、これは鳥を感染させるアイメリア属の7種のいずれか又は全てであり得る。更に、予防接種プロトコルが、異なる重度の無症状感染を生じさせる虞があり、従って、これらの予防接種された動物の能力に悪影響を与える虞がある。

20

【 特 許 文 献 1 】 EP 1,082,909

【 非 特 許 文 献 1 】 JohnsonおよびReid. 1970 "Anticoccidial Drugs: Lesion Scoring Technique in Battery and Floor Pen Experiments with Chickens."Exp. Parasitol. 28:30-36

【 非 特 許 文 献 2 】 Peppler, H.J. 1979. Production of Yeasts and Yeast Products. 第157頁: Microbial Technology & Microbial Processes, Vol. 1(2nd Ed.), Academic Press

30

【 発 明 の 開 示 】

【 発 明 が 解 決 し よ う と す る 課 題 】

【 0 0 0 8 】

従って、家畜におけるコクシジウム感染を制御するための他の方法であって、改善された生産性および経済性の利益を受けることができる方法についての必要性が求められている。又、その方法は、抵抗性微生物の発達をもたらすことがなく、あるいは屠殺前の長期の投与中止期間を必要とするものでないことを要する。

【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、ブタおよび家禽を含む家畜のコクシジウム感染を防止、減少又は改善するための方法および組成物を提供するものである。この組成物は、概略的に酵母細胞又は酵母細胞壁含有調剤であると言うことができる。1例において、本発明の組成物は、酵母細胞壁から得られる調剤を含む。この場合、この調剤はかなりの量のマンナンオリゴサッカリドを含む。本発明の方法は、酵母細胞壁含有又は酵母細胞含有組成物の所定量、つまり、コクシジウム感染の防止又は軽減のため、一旦、当該動物においてコクシジウム感染した場合、その有害な作用を改善するために有効な量を当該動物に投与することからなる。このマンナンオリゴサッカリドおよび/又は酵母細胞壁含有又は酵母細胞含有組成物は、動物の飼料中に添加してもよいし、あるいはこの組成物を動物に対するサプリメントとして与えてもよい。本発明のこれらの組成物は食用酵母から製造することができる。この食用酵母の例としては、*Saccharomyces* (サッカロミセス) *cerevisiae* (又は他のサッカロミ

40

50

セス種)、Candida、Kluyveromyces又Torulasporaなどが含まれる。本明細書に具体的に例示したように、酵母由来調剤はSaccharomyces (サッカロミセス) cerevisiae NCYC 1026の細胞から製造することができる。更なるコクシジウム感染の予防、軽減又は改善を、酵母細胞および酵母細胞壁含有組成物が更に、抗コクシジウム・イオノフォア (モネンシン、ラサロシド) および/又はステロイド性界面活性剤 (例えば、サボゲニン) を含む場合に達成することができる。

【 0 0 1 0 】

本発明の更なる他の目的は、本発明を実施するのに最適な形態の1つを単に説明のために記述した好ましい実施例を記載した以下の記載から、当業者が容易に理解できるであろう。明らかに、本発明は他の異なる実施例が可能であり、幾つかの細部については、本発明から逸脱することなく種々、変化させることができる。従って、ここに記載した内容は単に説明のためのものであり、制限的に解されるべきではない。

(本発明の具体的説明)

【 0 0 1 1 】

本発明は、動物におけるコクシジウム感染を防止、軽減又は改善するための新規な方法を提供する。特に、本発明は、動物におけるコクシジウム感染を防止又は改善するための方法であって、酵母由来調剤、好ましくはマンナンオリゴサッカリドを含む酵母細胞壁物質を含有する調剤の有効量を動物に投与することからなる。本発明の組成物および方法で使用される酵母細胞由来調剤は、任意の数の食用酵母、例えば、Saccharomyces、Candida、Kluyveromyces又Torulaspora種の細胞を使用して製造することができる。具体的例において、この酵母はSaccharomyces (サッカロミセス) cerevisiae菌株NCYC 1026である。この菌株は、American Type Culture Collection, Manassas, VA (Accession No.46785)およびAgricultural Research Service, Peoria, IL(Accession No.NRRL Y-11875)に寄託されている。具体例として、この酵母細胞由来組成物はAlltech, Inc., Nicholasville, KY(BIO-MOS (登録商標))から市販されている。この組成物は酵母細胞壁物質および酵母由来マンナンオリゴサッカリドを含むものである。

【 0 0 1 2 】

ここに記載した本発明の組成物は、サプリメントとして、あるいは市販の飼料中に添加して投与することができる。投与されるべきこの組成物の量は、動物の種類、年齢、大きさ、添加される飼料のタイプ、あるいは別の栄養補助剤としての使用などによって、異なることは当業者にとって自明であろう。

【 0 0 1 3 】

ここに記載した本発明の方法および組成物は、全ての動物、例えばウシ、ブタ、鳥類、ウマ、ヒツジ、ウサギ、ヤギなどにおけるコクシジウム感染を防止又は改善するのに適している。全ての集団又は群れがコクシジウム症で感染されるわけでもないし、全ての農業環境が感染されているわけでもない。コクシジウム感染を防止、軽減又は改善するのにこの酵母細胞壁含有組成物が投与されるところの鳥類の例としては、家禽、ハト、ペット用鳥 (コンゴウインコ、パラキート、大形オウム、カナリヤ、フィンチ、オウムなど) などを挙げることができる。卵、肉又は遊びのために飼育される鳥の例としては、ウズラ、ライチョウ、キジ、ニワトリ、ガチョウ、アヒル、七面鳥などを挙げることができる。哺乳類もこの酵母由来サプリメントから恩恵を得ることができ、特に農業的に重要な動物、例えばブタ、ウシ、野牛、ウマ、ヒツジ、ヤギなどに対して有効である。

【 0 0 1 4 】

臨床免疫性テストの研究は、若鳥に対し、コクシジウムの特定量を経口投与して感染させ、ついで、感染のレベル、腸管組織の損傷、死亡率、身体機能 (体重増加および飼料変換率) に対する感染の悪影響を測定する。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 5 】

トリを酵母細胞由来組成物、特に、以下に記載のように製造された酵母細胞壁およびマンナンオリゴサッカリド含有組成物を投与することにより、下記実施例に記載のように、

損傷の割合を減少させ、体重増加および腸炎の重度に対する感染の悪影響を減少させた。なお、これらの実施例は本発明の範囲を限定することを意図するものと理解されるべきではない。抗コクシジウム作用に関連する身体機能の更なる改善が、酵母細胞含有又は、酵母細胞壁含有組成物に対し抗コクシジウム性イオノフォア（例えば、モネンシン、ラサロシド）および/又は抗コクシジウム性ステロイド・サボゲニンを更に含有させたとき達成される（例えば、EP 1,082,909参照）。

【0016】

なお、ここで使用されている略語および命名は、当該分野で標準的なものであり、ここに引用した専門書に一般的に使用されているものである。

本出願で引用されている全ての文献は、本明細書に開示されているものと一致する範囲において参照として組み込まれるものとする。

【実施例1】

【0017】

360羽のCornish Rockオスのブロイラーを用いた28日間の実験を行い、*E. tenella*の損傷作用の抑制に対する2種の薬剤入り飼料の効果について調査した（表IおよびII参照）。

【0018】

生後1日のヒナ（ひよこ）に対し、モネンシン（60g/kg）又は酵母細胞壁/マンナンオリゴサッカリド含有組成物(BIO-MOS(登録商標)、Alltech, Inc., Nicholasville, KY)(1kg/トン)を含む標準コーン大豆食餌を与えた。この実験グループは：1) 陰性対照（薬剤を含ませないで、病原菌投与もしないもの）；2) 陽性対照（処置しないで、病原菌投与をしたもの）；3) モネンシンで処置し、病原菌投与をしたもの；4) BIO-MOSで処置し、病原菌投与をしたものが含まれていた。トリは、各処置グループにおいて、3つの反復用檻に無差別に割り当てた。14日齢の時点で、ヒナを胃管栄養法により経口を介して*E. tenella*で感染させた（50,000接合子/トリ）。測定した応答変数には週毎の体重増加および記載したような盲腸病変の傷（JohnsonおよびReid, 1970 "Anticoccidial Drugs: Lesion Scoring Technique in Battery and Floor Pen Experiments with Chickens." Exp. Parasitol. 28:30-36）を含めた。処置の相違は、LSDを用い、実験単位として檻を使用したGeneral Linear Models法（SAS Institute, 1985, Cary, NC）で評価した。モデルのステートメントには処置効果のみを含めた。有意な差異（ $P < 0.05$ ）が観察された場合は、最小有意差（LSD）法を、処置間の相違についてテストするために適用した。

【0019】

モネンシンおよびBIO-MOSの双方の投与は、盲腸病変スコアにより測定した結果、*E. tenella*感染の重度を可なり減少（ $P < 0.05$ ）させるものであった（表1参照）。BIO-MOSを受けたトリの改善された健康状態が、*E. tenella*菌投与した対照と比較において平均体重の増加の改善に反映されていた（表II参照）。BIO-MOSを投与したトリの平均体重増加は病原菌未投与（健康）対照グループで観察されたものと同等であり、未処理の*E. tenella*感染グループで観察されたものよりも5%大きかった。体重増加における同様の改善は、標準モネンシン処置を受けたトリにおいては認められなかった。

【実施例2】

【0020】

360羽のCornish Rockオスのブロイラーを用いた28日間の実験を行い、*E. maxima*感染の抑制に対する2種の薬剤入り飼料の効果について調査した。各処置グループ当たり生後1日の30羽のヒナをバッテリーケージに入れ、これらに対し、モネンシン（60g/kg）又は市販の酵母細胞壁物質およびマンナンオリゴサッカリド含有組成物(BIO-MOS)（1kg/トン）を含む標準コーン大豆食餌を与えた。この4つの実験グループは：1) 陰性対照（薬剤を含ませないで、病原菌投与もしないもの）；2) 陽性対照（処置しないで、病原菌投与をしたもの）；3) モネンシンで処置し、病原菌投与をしたもの；4) BIO-MOSで処置し、病原菌投与をしたものが含まれていた。トリは、実施例1と同様に、治療処置および反復用檻に割り当てた。

【0021】

14日齢の時点で、ヒナを胃管栄養法により経口を介してE.maximaで感染させた（50,000接合子/トリ）。測定した応答変数には週毎の体重増加および記載したような盲腸病変のスコアを含めた。これらの測定において、実施例1と同様の変動の分析を行った。

【0022】

モネンシンおよびBIO-MOSによる処置は、E.maxima感染に関係する盲腸病変スコアを夫々可なり減少させるものであった。すなわち、モネンシンは平均盲腸病変スコアを21%減少させ、BIO-MOSは平均盲腸病変スコアを28%減少させるものであった（表III）。これらの結果から、BIO-MOS食餌サプリメントがE.maxima感染による盲腸病変の重度を改善させることが確認された。

【0023】

2-4週間におけるBIO-MOS処置のヒナの平均体重増加は、陽性対照（未処置、病原菌投与）のヒナの平均体重増加よりも、27%大きく、コクシジウム菌投与に関連する生育抑制を克服する点においてモネンシンよりも効果的であった。従って、BIO-MOS処置のヒナはE.maxima感染においても身体機能の測定としての体重増加の維持が可能であった。

【実施例3】

【0024】

360羽のCornish Rockオスのブロイラーを用いた28日間の実験を行い、E.acervulina感染の抑制に対する2種の薬剤入り飼料の効果について調査した。

【0025】

生後1日のヒナに対し、サリノマイシン（6mg/kg）又はBIO-MOS（1kg/トン）を含む標準コーン大豆食餌を与えた。この4つの実験グループは：1）陰性対照（薬剤を含ませないで、病原菌投与もしないもの）；2）サリノマイシンで処置し、病原菌投与をしたもの；3）BIO-MOSで処置し、病原菌投与をしたもの；4）BIO-MOSで処置し、病原菌投与しないものが含まれていた。トリは、各処置グループにおいて、3つの反復用檻に無差別に割り当てた。14日齢の時点で、ヒナを胃管栄養法により経口を介してE.acervulinaで感染させた（500,000接合子/トリ）。測定した応答変数には週毎の体重増加および記載したような盲腸病変のスコアを含めた。実施例1と同様に、データはGeneral Linear Models法（SAS Institute, 1985, Cary, NC）を用い、ANOVAで評価した。

【0026】

サリノマイシンと同様に、BIO-MOSによる処置は、盲腸病変スコアで測定したとき、盲腸病変の重度を可なり減少させるものであった。すなわち、BIO-MOSは病変の重度を49%軽減させ、サリノマイシンは病変の重度を57%軽減させた（表V）。BIO-MOS処置のヒナは、陽性対照よりも平均体重増加を12%増大させた（表VI）。これらの結果から、この酵母細胞壁調剤を、E.acervulinaで感染されたヒナの身体機能を維持させるために使用し得ることが確認された。

【実施例4】

【0027】

孢子形成したアイメリア種で感染させたブロイラーのヒナ（大カモメ）における酵母細胞組成物の坑コクシジウム活性を判定するため20日間のバッテリー実験を行った。160羽のヒナ（生後1日）を複数のバッテリー・ケージ（ケージ当り10羽のヒナ、459平方センチ/1羽）に収容した。各処置当り4個の複製ケージを用意した。水を無制限に備えるようにして、標準コーン大豆食餌を与えた。この処理グループは：1）陰性対照（薬剤を含ませないで、病原菌投与もしないもの）；2）陽性対照（薬剤を含ませないで、病原菌投与したもの）；3）BIO-MOS（1kg/トン）で処置し、病原菌投与をしたもの；4）サリノマイシン（60g/トン）を与え、病原菌投与したものであった。

【0028】

病原菌摂取物は14日齢の時点で与え、これには50,000 E.acervulina、50,000 E.maxima又は40,000 E.tenella接合子が夫々含まれ、これらは胃管栄養法により経口を介して投与した。体重および飼料消費は、9、14および20日齢で測定した。感染後6日の後、全てのヒナを殺し、上記のJohnson and Reid(1970)法を用いて病変をスコアした。病変スコアは、

10

20

30

40

50

腸管の上部 (E. acervulina)、中間部 (E. Maxima) および盲腸 (E. tenella) 領域で評価した。

【 0 0 2 9 】

BIO-MOS処置およびサリノマイシン処置したヒナについての盲腸病変スコアは上部および中間部腸管領域においての双方の対照グループと比較して、それぞれ可なり減少した ($P<0.05$) (表VII)。この2つの処理グループについての盲腸病変スコアの減少は、BIO-MOSおよびサリノマイシンが、未処理、病原菌投与の対照と比較してコクシジウム菌投与に対する制御作用が良好に働いていることを示唆するものである。

【 0 0 3 0 】

病原菌投与後の体重増加は、病原菌投与されていない対照と比較して、病原菌投与された対照において可なり低い (18.48%) ($P<0.05$) ことが認められた (表VIII)。BIO-MOSを投与されたヒナにおいては、体重の減少が小さい (11.6%) ことが観察された。

【 0 0 3 1 】

BIO-MOSは、アイメリアで感染されたときでも、病変スコアを減少させ、感染後の体重増加の改善が認められた。これらの知見は、BIO-MOSがコクシジウム感染の存在でも、感染の重度を軽減させ、身体機能を向上させるという結論を支持するものである。

【 実施例 5 】

【 0 0 3 2 】

孢子形成したアイメリア種で感染させたブロイラーのヒナ (大カモメ) におけるBIO-MOSの坑コクシジウム活性を判定するため20日間のバタリー実験を行った。160羽のヒナ (生後1日) を複数のバタリー・ケージ (ケージ当り10羽のヒナ、459平方センチ/1羽) に収容した。各処置当り4個の複製ケージを用意した。水を無制限に備えるようにして、標準コーン大豆食餌を与えた。この処理グループは: 1) 陰性対照 (薬剤を含ませないで、病原菌投与もしないもの); 2) 陽性対照 (薬剤を含ませないで、病原菌投与したもの); 3) BIO-MOS (1kg/トン) で処置し、病原菌投与をしたもの; 4) サリノマイシン (60g/トン) を与え、病原菌投与したものであった。

【 0 0 3 3 】

病原菌摂取物は14日齢の時点で与え、これには50,000 E. acervulina、50,000 E. maxima又は40,000 E. tenella接合子が夫々含まれ、これらは胃管栄養法により経口を介して投与した。体重および飼料消費は、0、14および20日齢で測定した。

【 0 0 3 4 】

感染後6日の後、全てのヒナを殺し、上記のJohnson and Reid(1970)法を用いて病変をスコアした。病変スコアは、腸管の上部 (E. acervulina)、中間部 (E. Maxima) および盲腸 (E. tenella) 領域で評価した。

【 0 0 3 5 】

BIO-MOS処置およびサリノマイシン処置グループは病変スコアを腸管の全ての領域において陽性対照と比較して、それぞれ可なり減少させた (表IX)。すなわち、BIO-MOSは病変スコアを33%減少させた。BIO-MOSは更に、陽性対照 (薬剤を含ませないで、病原菌投与したもの) と比較して、104%の感染後体重増加に反映されているように、ヒナの身体機能の維持にも有用であった (表X)。この病原菌投与後の体重増加はアイメリア感染の存在下における身体機能の改善を反映するものである。

【 実施例 6 】

【 0 0 3 6 】

AVATEC (ラサロシド、Alpharma, Fort Lee, NJ)、抗コクシジウムイオノフォア (90.7g/トン); Bacitracin Zn (50g/t) およびBIO-MOS (0.5kg/メートルトン) の、リサイクル寝糞上で育てたブロイラーヒナの成長に対する作用を評価するため、3種の42日間の実験を行った。60羽のCornish Rockオスのブロイラーヒナ (生後1日) を4つの処置グループの夫々に分けた。この4つのグループは: 1) 対照 (処置を施さないヒナ); 2) BIO-MOSで処置したもの; 3) AVATECで処置したもの; 4) Bacitracin Znで処置したものからなっていた。実験用リサイクル寝糞としてマツ材削りくずを用い、これを介してブロイラーにE. te

10

20

30

40

50

nella、E.maximaおよびE.acervulinaをヒナに感染させた。実験開始前に、このリサイクル寝藁を収容した檻を4つの処置グループに割り当てた。ついで、生後1日のヒナを、同じリサイクル寝藁を用いた後の3つの実験の各々のために、檻内に収容した。

【0037】

1994年のNational Research Councilによる要件を満たすため、食餌は必要なビタミンおよびミネラルを補ったコーン - 大豆を主成分とするものであった。週ごとに体重の測定を行った。BIO-MOSで補った食餌で飼育したヒナの平均体重は、3つの全ての実験において対照のものよりもかなり大きく ($P<0.05$)、又、Bacitracin並びに AVATECで飼育したヒナのもと同等であった (表XI)。処置を行った全てのヒナの平均体重は、感染のため寝藁の再使用の各サイクルと共に減少した。しかし、3つの実験のそれぞれにおいて、BIO-MOSを与えたヒナの平均体重は対照グループの平均体重よりも平均で7%高く、コクシジウム感染の存在においても、BIO-MOSが身体機能を維持させる能力を有することが実証された。

【実施例7】

【0038】

200羽 (生後1日) のヒナを10個の細菌絶縁チャンバー内に収容させた。15日齢の時点で、150羽のヒナを10個の細菌絶縁チャンバー内に無作為に等しく配置させた。5個の対照チャンバー内のヒナには未処理のプロイラー・スタータ食餌を与え、処置チャンバー内のヒナには同様の食餌に0.1%のBIO-MOSを添加したものを与えた。22日目に、全てのヒナに 2.9×10^5 のE.acervulina接合子を胃管栄養法により経口を介して投与した。排泄物は毎日、各チャンバー内の浮かせたワイヤーメッシュ床の下方にて収集し、21-35日にて計測した。処置したヒナの糞の接合子のカウントは、26,27および29日の時点で、より低く ($P<0.05$)、BIO-MOSが感染ピークで接合子をかなり減少させることを実証した。これは家禽生産システムにおいて、BIO-MOSがE.acervulinaの増殖を減少させるという能力により反映されている。

【実施例8】

【0039】

ここに記載した実験において、酵母由来組成物はS.cerevisiae菌株NCYC 1026 (American Type Culture Collection, Manassas, VA (Accession No.46885)およびAgricultural Research Service, Peoria, IL, NRRL (Accession No. Y-11875) の細胞を使用して製造された。酵母細胞壁抽出物は当業界で一般的に公知の方法により得られる (Peppler, H.J. 1979. Production of Yeasts and Yeast Products. 第157頁: Microbial Technology & Microbial Processes, Vol. 1(2nd Ed.), Academic Press)。簡単に述べると、この酵母微生物は食品関連発酵および飲料産業で使用されている一般的技術に従って成長させることができる。酵母細胞の急激な増殖を可能にする複合培養基を使用することができる。一般的な糖含有培養基、例えば希釈糖蜜の任意の数のものを細胞成長に使用することができる。他の使用可能な培養基成分の例としては、トウモロコシ、木糖、亜硫酸廃液、ホエーを挙げることができる。ついで、酵母細胞は例えば、遠心分離により使用済み培養基から分離され、洗浄され、再び集められ、“酵母クリーム”を得ることができる。

【0040】

分離後、酵母クリーム中の細胞は溶解される。この場合、この酵母微生物を溶解するのに使用できる当業者に公知の任意の方法、例えば自己分解、加水分解又は機械的手段 (凍結溶解、押出し、超音波処理) を使用することができる。具体的に例示すると、酵母細胞懸濁液を水で希釈し、10-12%の乾燥固形濃度のものとする。ついで、これを140°Fの温度まで加熱する。pHは例えば、水酸化ナトリウムを用いて略8.5に調整される。プロテアーゼ、例えばパイン又はアルカリ性又は中性プロテアーゼの任意のものを、溶解段階にて添加し、崩壊された細胞物質中の酵母たんぱく質の可溶化を加速させてもよい。プロテアーゼを用いた最初の培養の後、一般には約2時間後、pHを約8.0に調整し、その混合物の温度を徐々に約158°Fまで上昇させる。この混合物を約158°Fにて約30分間保持する。この得られた酵母細胞壁含有粒状物質を遠心分離により集め、低分子量細胞間成分を除去し

、細胞壁抽出物を濃縮させる。その得られた濃縮物を乾燥し（噴霧乾燥、ドラム乾燥などの公知の任意の方法により）、吸湿性、水溶性粉体を形成させる。この乾燥した粉体は動物食餌に対し略0.5ないし20kg/メートルトンの範囲の割合で直接、添加することができる。

【0041】

上記実施例は本発明の方法、すなわち、コクシジウム感染にかかる危険性のある動物に対し酵母細胞由来組成物を与える方法がコクシジウム感染による悪影響を軽減させるのに有効であることを実証するものである。本発明は、一般に遭遇するコクシジウム微生物によるコクシジウム感染の悪影響並びに近代の家畜生産の代表的条件下でのコクシジウム感染の悪影響を軽減させるのに有効である。更に、本発明の方法および組成物は、モネンシンおよびサリノマイシンを用いた処置などのコクシジウム感染に対する従来の制御法と同等又はそれ以上にすぐれたものである。更に有利なことに、本発明の方法および組成物は、コクシジウム微生物に耐性を生じさせることなく、更に、その処置された動物の肉、ミルクおよび卵の販売に先立ち、その動物の屠殺前の長い投与中止期間を必要とすることなく、コクシジウム感染による悪影響を改善することができる。

【0042】

以上の本発明の好ましい実施例の記載は単に説明を目的としてなされたものである。従って、本発明をこれら実施例の記載に制限することを意図したものではない。従って、これらの記載に照らして自明の変更および変化が可能である。これら実施例は本発明の原理を最良に説明するために選択されたものであり、当業者は、特定の目的に応じて本発明を利用して種々に変形して実施し得ることは明らかであろう。従って、その様な全ての変形および変化も、付記した請求の範囲に従って正当に解釈されることにより本発明の範囲に包含されるべきものである。

【0043】

表 I: E.tenella 感染ひよこの盲腸病変のスコア (scores) に対するモネンシンおよび BIO-MOS の作用	
治療	盲腸病変のスコア
陰性対照	0.83 ^b
陽性対照	3.17 ^a
モネンシン	1.50 ^b
BIO-MOS	1.33 ^b
a,b:異なる上付き文字を有するカラム内の平均は統計的に異なる (p<.05)	

【0044】

表 II: E.tenella 感染ひよこの病原菌投与後 2-4 週間における平均体重増加 (g) に対するモネンシンおよび BIO-MOS の作用					
反復					
治療	1	2	3	平均	SD
陰性対照	730	498	589	606	164.4
陽性対照	585	543	606	578	100.5
モネンシン	498	611	523	544	312.5
BIO-MOS	595	655	564	605	85.3

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

表 III: E.maxima 投与のひよこの盲腸病変のスコアに対するモネンシンおよび BIO-MOS の作用	
治療	盲腸病変のスコア
陰性対照	0.85 ^b
陽性対照	2.33 ^a
モネンシン	0.93 ^b
BIO-MOS	1.67 ^b
a,b:異なる上付き文字を有するカラム内の平均は統計的に異なる (p<.05)	

10

【 0 0 4 6 】

表 IV: E.maxima 感染ひよこの病原菌投与後 2-4 週間における平均体重増加 (g) に対するモネンシンおよび BIO-MOS の作用					
反復					
治療	1	2	3	平均	SD
陰性対照	730	498	589	606	164.7
陽性対照	385	443	505	444	112.82
モネンシン	598	412	599	536	142.9
BIO-MOS	613	541	582	565	83.1

20

【 0 0 4 7 】

表 V: E.acervulina 投与のひよこの盲腸病変のスコアに対するモネンシンおよび BIO-MOS の作用	
治療	盲腸病変のスコア
対照	0.81 ^c
陽性対照	2.14 ^b
BIO-MOS	1.101 ^a
サリノマイシン	0.92 ^{bc}
a,b:異なる上付き文字を有するカラム内の平均は統計的に異なる (p<.05)	

30

40

【 0 0 4 8 】

表 VI: *E.acervulina* 感染ひよこの病原菌投与前後 2、3、4 週間における体重増加に対するサリノマイシンおよび BIO-MOS の作用

治療	菌投与	感染後の体重(g)		
		2 週間目	3 週間目	4 週間目
対照	なし	194 ^b	351 ^{ab}	580 ^{ab}
対照	あり	195 ^b	293 ^b	533 ^b
サリノマイシン	あり	236 ^a	350 ^a	607 ^{ab}
BIO-MOS	なし	234 ^a	370 ^a	659 ^a
BIO-MOS	あり	232 ^a	322 ^{ab}	599 ^{ab}

a,b:異なる上付き文字を有するカラム内の平均は統計的に異なる (p<.05)

10

【 0 0 4 9 】

表 VII: *Eimeria.spp* 感染ひよこの平均的盲腸病変のスコアに対するサリノマイシンおよび BIO-MOS の作用

治療	上部	中間	盲腸	合計
陰性対照	0.0	0.0	0.0	0.0
陽性対照	2.3	1.8 ^a	2.7 ^a	6.7 ^a
BIO-MOS 1kg/t	1.7 ^b	1.3 ^b	1.5 ^b	4.5 ^b
サリノマイシン 60g/t	1.3 ^c	0.8 ^c	0.6 ^c	2.7 ^c

20

【 0 0 5 0 】

表 VIII: *Eimeria.spp* 感染ひよこの飼料変換率、平均体重増加および体重の減少率%に対するサリノマイシンおよび BIO-MOS の作用

治療	飼料変換率	平均体重増加(kg)			体 重 の 減 少 率%
		0-14 日	0-20 日	14-20 日	
陰性対照	1.431 ^b	0.640 ^a	0.640 ^a	0.312 ^a	0.00
陽性対照	1.555 ^a	0.592 ^b	0.592 ^b	0.255 ^b	18.48
BIO-MOS 1kg/t	1.538 ^a	0.617 ^{ab}	0.617 ^{ab}	0.276 ^b	11.59
サリノマイシン 60g/t	1.511 ^b	0.634 ^a	0.634 ^a	0.314 ^a	-0.41

a,b:異なる上付き文字を有するカラム内の平均は統計的に異なる (p<.05)

30

【 0 0 5 1 】

表 IX: *Eimeria.spp* 感染ひよこの腸管の上部、中間および盲腸領域における平均的盲腸病変のスコアに対するサリノマイシンおよび BIO-MOS の作用

治療	上部	中間	盲腸	合計
陰性対照	0.0 ^c	0.0 ^b	0.0 ^d	0.0 ^d
陽性対照	1.6 ^a	1.6 ^a	2.5 ^a	5.8 ^a
BIO-MOS 1kg/t	0.9 ^b	1.1 ^b	1.9 ^{ab}	3.9 ^{ab}
サリノマイシン 60g/t	0.8 ^b	0.7 ^b	1.2 ^b	2.7 ^{ab}

40

【 0 0 5 2 】

表 X: Eimeria.spp 感染ひよこの飼料変換率、平均体重増加および体重の減少率%に対するサリノマイシンおよび BIO-MOS の作用					
	飼料変換率	平均体重増加(kg)			体 重 の 減 少 率%
治療		0-14 日	0-20 日	14-20 日	
陰性対照	1.575 ^b	0.257 ^a	0.523 ^a	0.266 ^a	0.00
陽性対照	1.826 ^a	0.248 ^a	0.473 ^b	0.226 ^b	15.24
BIO-MOS 1kg/t	1.787 ^a	0.281 ^a	0.516 ^a	0.235 ^{ab}	11.59
サリノマイシン 60g/t	1.675 ^a	0.262 ^a	0.504 ^{ab}	0.243 ^{ab}	8.90
a,b:異なる上付き文字を有するカラム内の平均は統計的に異なる (p<.05)					

10

【 0 0 5 3 】

表 XI: Eimeria.spp 感染リサイクル薬上で生育させたひよこの体重に対する AVATEC、バシトラシン Zn および BIO-MOS の作用			
	体 重 (g)		
治療	実験 1	実験 2	実験 3
対照	1993 ^b	1696 ^c	1696 ^b
AVATEC2	2271 ^a	1863 ^b	1760 ^{ab}
バシトラシン Zn3	2272 ^a	2211 ^a	1819 ^a
BIO-MOS	2186 ^a	1832 ^b	1760 ^{ab}
a,b:異なる上付き文字を有するカラム内の平均は統計的に異なる (p<.05)			

20

フロントページの続き

審査官 遠藤 広介

- (56)参考文献 特開平 0 9 - 0 8 4 5 2 9 (J P , A)
特開平 0 9 - 2 5 2 7 2 8 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 0 0 8 6 3 6 (J P , A)
特開 2 0 0 1 - 0 5 5 3 3 8 (J P , A)
米国特許第 0 5 7 0 3 0 6 0 (U S , A)
米国特許第 0 5 0 6 3 2 1 9 (U S , A)
欧州特許出願公開第 0 1 0 8 2 9 0 9 (E P , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 36/06
A61K 31/736
A61P 33/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)