

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

日本 國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， 有 無主張優先權
 1999 年 3 月 26 日 特願平 11-084399(主張優先權)

有關微生物已寄存於： ， 寄存日期： ， 寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

[發明之技術領域]

本發明乃甲殼類或魚類用飼料添加劑以及添加該添加劑之飼料有關者，特別是顯示顯著的免疫賦活，感染症預防效果之飼料添加劑，以及以適當比例添加上述飼料添加劑而成之飼料，還有使用該飼料之預防方法和飼養方法有關者。

[背景技術]

近年來，隨著甲殼類或魚類等之養殖產業的發展，頻頻發生細菌病和病毒等疾病，以致在經濟上發生很大的損失。甲殼類或魚類之疾病，例如斑節蝦之急性病毒血症、弧菌病、鰻之類結節症、腸球菌症、香魚之冷水症，假單胞菌病、嘉鱺魚、鰻、棘鰭之琉蟻病毒感染症最常發生，經濟上之損失也最大。

上述疾病中屬於細菌性疾病者使用抗生素或合成抗菌劑做為治療藥物，然而出現對於抗菌性物質之耐病性菌，以致無法獲得充分的治療效果。另外，所使用藥劑在甲殼類、魚類之殘留也成為公共衛生上之問題，因此，期待不必依靠化學治療方法之預防對策出現。另外，甲殼類和魚類之病毒疾病，至今尚未研發疫苗或治療藥物，因此，依然疾病頻發狀態。

以增強甲殼類和魚類之免疫功能 and 預防感染為目的，已知利用來源於耐熱雙歧桿菌之肽聚糖(參照日本專利第2547371號公報)，利用桿菌屬等革蘭陽性菌之細胞壁成分(參照日本專利公開平3-173826號公報)，利用來源於裂褶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

五、發明說明(2)

菌之 β -1,3-聚糖(參照日本專利公開平 6-65649 號公報)等多糖類。另外，高分子量之脂多糖也被報告對於魚類有活化免疫機能(參照 Salati, f. and R. Kusuda, 日本水產學會誌，53 卷，201 至 204 頁，1987 年)(Odean M. J. 等人，Infection and Immunity，58 卷，427 至 432 頁，1990 年)。

本發明所使用之低分子量脂多糖(下文中簡稱為低分子量 LPS)和上述來源於革蘭陽性菌之肽聚糖，細胞壁成分以及來源於裂褶菌之 β -1,3-聚糖等在基本構造和成分上皆不同，係由特殊的脂質 A 和與之具有共價結合之被稱為 R 核之低聚糖，還有 O 特異多糖之三種成分所構成之物質，已知係可依據增強腫瘍壞死因子(TNF)生產效果而成為動物用之免疫機能活化劑，但是迄今完全不知對於甲殼類和魚類之感染症具有預防作用。另外，前人研究報告中所使用之高分子量脂多糖(LPS)之分子量極大，在 100 萬至 1000 萬範圍，且毒性強大，所以不能長期間投與給甲殼類和魚類，經常保持其免疫機能之活化。又，前述已知物質之分子量大，從腸管之吸收不良，所以必須大量經口投與，而且很多在長期間投與時尚有免疫機能降低之問題。

甲殼類和魚類如前述經常發生各種感染症，嚴重結果會造成死亡，帶來經濟上莫大損失。其背景中，尚有這些甲殼類和魚類往往在有限環境中高密度養殖造成其免疫機能之降低。為活化這種已下降之免疫機能，已有各種物質被使用，但是甲殼類本身沒有生產抗體之能力，不像脊椎動物之備有淋巴球，中性白細胞，嗜鹼細胞等，另外，魚

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(3)

類生產抗體能力也有限制，並且是屬於變溫動物，抗體之生產受到水溫之影響很大，因此，免疫機能無法充分發揮等，綜之，甲殼類和魚類二者跟哺乳動物比較，其生物體防禦機構有相當不相同之處(參考 Fish Pathology, 30(2), 141-150, 1995.6)。已有之 LPS 由於毒性強，在養殖現場甚至無法使用，或長時間投與時免疫機能反而會降低者不少，所以無法滿足甲殼類和魚類之防止感染症上之用途。

本發明之目的在提供以極微量就能確實活化甲殼類和魚類本來所備有之免疫機能而預防感染症，且無藥物殘留等公共衛生上之問題，而養育甲殼類和魚類用之安全的飼料添加劑，以及添加有上述飼料添加劑之飼料，還有使用上述之預防方法和飼養方法。

本發明乃得自革蘭陰性之微生物菌體，據使用蛋白質標記以 SDS-PAGE 方法所測定之分子量在 5000 ± 2000 ，實質上不含高分子量之脂多糖，而以含有低分子量之脂多糖為有效成分為其特徵之具有免疫賦活，預防感染症效果之甲殼類或魚類用之飼料添加劑有關者。

本發明也跟與有上述低分子量之脂多糖以及甲殼類和魚類上容許使用之載劑之甲殼類或魚類用飼料添加劑有關。

本發明也與製造甲殼類或魚類用飼料添加劑用上述低分子量脂多糖之使用有關。

本發明也以投與有效量之上述低分子量脂多糖於甲殼類或魚類為特徵之甲殼類或魚類之免疫賦活、感染症之預

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

五、發明說明(4)

防方法有關。

本發明也以含有上述低分子量脂多糖為有效成分做為特徵之甲殼類或魚類之暴斃預防劑有關。

本發明也以含有上述低分子量脂多糖以及藥學上容許之載劑之甲殼類或魚類之暴斃預防劑有關。

本發明也與製造甲殼類或魚類之暴斃預防劑用之上述低分子量脂多糖之使用有關。

本發明也以有效量之上述低分子量脂多糖飼養甲殼類或魚類為特徵之甲殼類或魚類之暴斃預防方法有關。

本發明也與革蘭陰性之微生物菌體係屬於泛多艾屬 (*Pantoea Gavini* et al. 1989) 之微生物菌體之甲殼類或魚類用飼料添加劑有關。

本發明和革蘭陰性之微生物菌體係屬於團聚泛多艾菌 (*Pantoea agglomerans*) 之甲殼類或魚類用飼料添加劑有關。

本發明與以添加有上述飼料添加劑或暴斃預防劑為特徵之甲殼類或魚類飼料有關。

本發明也和將上述飼料給與甲殼類或魚類為特徵之甲殼類或魚類之飼養方法有關。

本發明係自革蘭陰性之微生物菌體，例如按照日本專利特開平 8-198902 號公報所公告方法精製之物質中，將分子量為 5000 ± 2000 之低分子量之 LPS 添加在飼料中，投與甲殼類和魚類之結果，發現可以活化甲殼類、魚類本來具有之免疫機能，以致能防禦病毒或細菌之感染症，得預

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

防暴斃，且確認其安全性極高而完成本發明。

本發明之低分子量 LPS 係如前述由革蘭陰性之微生物菌體，例如按照日本特開平 8-198902 號公報中所公告方法而得分子量為 5000 ± 2000 之脂多糖，其特徵乃較之已往的高分子量 LPS(分子量在 100 萬至 1000 萬)，對於甲殼類和魚類之安全性高，而具有顯著的免疫活化作用和感染症預防效果以及暴斃預防效果。

本發明中所述實質上不含高分子量之脂多糖乃指不含分子量 8000 以上之脂多糖。

本發明中所述革蘭陰性之微生物菌體，乃可舉例如泛多艾屬(Pantoea)、沙門桿菌屬(Salmonella)、氣單胞菌屬(Aeromonas)、沙雷氏菌屬(Serratia)、腸桿菌屬(Enterobacter)等所屬之微生物菌體，以及其他在日本專利特開平 4-99481 號公報上所記載之革蘭陰性之微生物菌體等，其中較宜之微生物為屬於泛多艾屬(Pantoea)之微生物，尤以團聚泛多艾菌(Pantoea agglomerans)為最佳。

本發明之低分子量 LPS 係將革蘭陰性之微生物等依照常法培養，由培養基收集菌體，就所收集菌體按照周知方法，例如熱酚方法(參考 O. Westphal 編，Methods in Carbohydrate Chemistry，第 5 卷，第 83 頁，Academic Press 出版，1965 年)萃取，再經陰離子交換樹脂精製而製成。換言之，將微生物菌體懸濁在蒸餾水中，再將該懸濁液添加在蒸餾水和等容量之熱酚混合液中攪拌，繼之，離心處理而回收水液層，透析該水液層而除去酚，以超濾法濃縮

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

而得粗製 LPS 部分，再以一般陰離子交換層析法(使用單 Q-瓊脂糖或 Q-瓊脂糖)精製，並依照常法脫鹽。

按照上述所製得之精製 LPS，實質上相當於日本專利特開平 4-187640 號公報，特開平 4-49240 號公報，特開平 4-99481 號公報以及特開平 5-155778 號公報中所公告之分子量為 5000 至 6000 左右之 LPS。再將所得之精製 LPS，例如在脫氧膽酸鈉等表面活化劑之存在下膠濾，僅回收含有低分子量 LPS 之部分，除去所混有之高分子量 LPS，而製得高度精製之本發明之低分子量 LPS。該表面活化性劑存在下之膠濾工程乃係將日本專利之特開平 4-187640 號公報，特開平 4-49240 號公報和特開平 5-155778 號公報中所公告之分子量 5000 至 6000 程度之 LPS，再行高度精製為目的，據該工程可完全排除所混有之高分子量 LPS。

本發明之對象的甲殼類包括斑節蝦(*Penaeus japonica*)、草蝦(*Penaeus monodon*)、高麗蝦(*Penaeus chinensis*)、香蕉蝦(*Penaeus morguiensis*)等之斑節蝦類在內之所有蝦類(包括 lobster、shrimp、prawn)，上海蟹、蟬等所有蟹類，其中以蝦類為適用對象，尤以斑節蝦類為最適用對象。魚類包括鯽、河豚、嘉鱚魚、比目魚、鰻魚、虹鱒等所有魚類。感染症指甲殼類之急性病毒血症、弧菌病、*Bpistylis* sp., *Zoothamnium* sp. 等寄生症，或鏈壺菌屬(*Lagenidium* Ap.)、離壺菌屬(*Sirolopidium* Ap.)等之真菌病、魚類之琉蚊病毒感染症、拉布多病毒症、神經壞死症、傳染性造血器壞死症、類結節症、鏈球菌症、腸球菌症、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (7)

弧菌病、冷水病、假單胞菌病、滑走細菌症、水霉病之外，所有病毒、類菌質體、細菌、真菌和寄生蟲所造成之感染症，其中以甲殼類之急性病毒血症，魚類之鏈球菌症、腸球菌症、弧菌病等為較適對象。

本發明中，可以直接將低分子量 LPS 做為甲殼類或魚類用飼料添加劑使用，或添加周知之載劑、安定劑等，必要時再添加維生素、胺基酸類、礦物質等各種營養成分，抗氧化劑、抗生素、抗菌劑以及其他添加劑等而提供甲殼類或魚類飼料用添加劑用途，其形狀可調製成粉狀，顆粒狀、錠狀、懸濁液狀等各種適當狀態。本發明之飼料添加劑在餵飼時，可以單獨用來飼養甲殼類或魚類，也可以混合在飼料中飼養。餵養時期可以預防疾病為目的而經常使用，也可以在餵養後半期添加使用。

本發明之飼料並無特別限制，粉狀飼料、固形飼料、濕式錠狀飼料、乾燥錠狀飼料、擠塑錠(extruder pellet)狀飼料、新鮮飼料等任何飼料皆可使用。

本發明中，低分子量 LPS 在飼料添加劑或飼料中之調配量可在廣範圍中選擇之，其中，對於飼料添加劑或飼料而言，以 0.000001 至 0.001 重量%為宜，尤以 0.00002 至 0.00005 重量%為最佳，但並非限制在上述範圍內。低分子量 LPS 之給餌量可以適當決定之，例如甲殼類和魚類之體重 1kg 一日計，使用 1 至 100 μ g，其中以投與 10 至 20 μ g 為較宜，但並非限制在該範圍。

[實施發明之最佳形態]

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · · · · · 訂 · · · · · 線

五、發明說明(8)

實施本發明之最佳途徑說明如下。

本發明舉實施例說明如後，但是並非限制在實施例範圍。又，實施例中所使用低分子量 LPS 係指分子量約 5000 之 LPS，高分子量之 LPS 係指分子量為 8000 至 50000 之 LPS。

參考例 1 (低分子量 LPS 之製造)

將 10g 之胰蛋白朊(Difco 公司製品)，5g 之酵母萃取物(Difco 公司製品)，10g 之氯化鈉(和光純藥工業公司製品，特級)添加在 1 l 之蒸餾水中，以氫氧化鈉調整為 pH7.5，在高壓釜中殺菌處理，另外，在含有 100ml 的由添加 0.1% 比率之經殺菌過的葡萄糖(和光純藥工業公司製品，特級)而構成的培養基(下文中簡稱為 L-肉汁培養基)的容量為 500ml 之坂口氏燒瓶中，以 -80°C 下保存的團聚泛多艾菌(*Pantoea agglomerans*)之保存菌株分離單一菌叢而行接種，在 35°C 下振盪培養一夜，然後直接全量接種在含有 1000ml 之 L-肉汁培養基的容量為 3 l 之坂口氏燒瓶中，按照上述相同方法培養之。

然後，在含有 7 l 之 L-肉汁培養基的容量為 10 l 之桌上型醱酵容器(丸菱生物技術公司製品)中，將上述培養菌體加以接種，相同條件下通氣培養後收集菌體，回收得大約 70g 之濕菌體，並凍結保存之。取約 ++70g 之保存凍結菌體懸濁於 500ml 之蒸餾水中，添加 500ml 之 90% 熱酚，並在 65 至 70°C 下攪拌 20 分鐘。再冷卻，以 1,0000G，4°C 下離心處理 20 分鐘，回收水液層。酚液層再按照上述相

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(9)

同操作重複處理一次，合併二次之水液層，透析一夜而去除酚，透析內液用超濾裝置(Ad-vantech·Toyo 公司製品，UK-200 型)以分子量 20 萬之去除膜，在氮氣中，二氣壓下進行超濾濃縮。

將所得粗製 LPS 之凍結乾燥物溶解於蒸餾水中，過濾除菌，添加緩衝液，行陰離子交換層析分離(Pharmacia 公司製品，Q-瓊脂糖、快流型)，以含有 10mM 之 Tris-HCl(pH7.5)和 10mM 之氯化鈉的緩衝液將試料溶液導過分離管，再用 200 至 400mM 氯化鈉/10mM Tris-HCl (pH7.5)溶出活性部分，該溶出液按照上述相同條件進行超濾，脫鹽濃縮，再行凍結乾燥，由約 70g 之濕菌體可製得約 300mg 之精製 LPS。

將所得精製 LPS 100mg 以 5mg/ml 濃度溶解在可溶化緩衝液[由 3%之脫氧膽酸鈉(和光純藥工業公司製品)，0.2M 氯化鈉，5mM EDTA-2Na 和 20mM Tris-HCl 所構成，pH8.3]，再將精製 LPS 溶液 20ml 自 Sephacryl S-200 HR 分離管(Pharmacia 公司製品)之上端輕輕添加。以溶出緩衝液[由 0.25%脫氧膽酸鈉(和光純藥工業公司製品)，0.2M 氯化鈉，5mM EDTA 和 10mM Tris-HCl 所構成，pH8.3]藉 16ml/hr 之流速溶出 800ml(需時 50 小時)。

使用貝利斯塔泵 PI 型(Pharmacia 製品)控制流速下將所得溶出液利用餾分收集器(Advantech 公司製品，SF2120 型)分離餾分，去除最早之餾分 240 ml(相當於 24 個分劃部分)，然後以 10ml/餾分分劃到 80 個分劃部分。就所溶出之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · · · · · 訂 · · · · · 線

五、發明說明 (10)

各分劃餾分，使用其原液或稀釋液藉酚/硫酸法(參考福井作藏著「還原糖之定量法」，第2版，50至52頁，學會出版中心出版，1990年)進行糖之定量，調查溶出情形。由所得溶出情形之結果，將預測有LPS存在之餾分(餾分30至60)中，餾分37至55之各餾分0.5ml進行SDS-PAGE，而調查LPS之餾分狀態圖樣。

其結果，餾分45至55中僅有低分子量LPS(分子量約5000)存在，而餾分37至44有高分子量和低分子量之雙種LPS存在，所以將餾分45至55之低分子量LPS餾分按照下述更加精製之。

各餾分混合後凍結乾燥，懸濁乙醇中，由離心處理去除可溶於乙醇的脫氧膽酸，從不溶性餾分回收得低分子量LPS。低分子量LPS餾分重複二次乙醇處理，去除脫氧膽酸，再以70%乙醇懸濁，離心處理去除緩衝液成分，重複上述操作三次，由不溶性餾分回收低分子量LPS，經凍結乾燥，而得精製低分子量LPS約20mg。

實施例 1 (對於甲殼類之低分子量LPS之安全性試驗)

將平均體重為20g之斑節蝦每20尾為一群，分成5群，分別以本發明之低分子量LPS(分子量約為5000)按蝦體重1kg計，以投與於第3腹節肌肉之方式，對第1群投與50mg，第2群投與100mg，對第3群投與10mg之已往的高分子量LPS(來源於大腸菌(E. Coli 0111)之LPS，Difco公司製品，分子量約為8000至50000);對第4群投與20mg之上述高分子量LPS，對第5群投與不含LPS之生理食鹽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

水。然後調查投與後 120 小時為止之生死狀況，求得暴斃率，其結果示於表 1 中。

【表 1】

試驗分群	死亡數/供試數	暴斃率(%)
第 1 群：低分子量 LPS50mg/kg	0/20	0
第 2 群：低分子量 LPS100mg/kg	0/20	0
第 3 群：高分子量 LPS10mg/kg	13/20	65
第 4 群：高分子量 LPS20mg/kg	20/20	100
第 5 群：生理食鹽水投與群	0/20	0

由表 1 所示可知投與高分子量 LPS10mg 和 20mg 群之暴斃率分別為 65% 和 100%，相對地，投與低分子量 LPS 50mg 和 100mg 群皆無死亡情形，由此顯示本發明之低分子量 LPS 較之已往的高分子量 LPS，對於蝦類之安全性而言，乃係安全性極高之物質。

實施例 2 (對於魚類之低分子量 LPS 之安全性試驗)

將平均體重為 85g 之鯉魚以 40 條為一群，分成 3 群，鯉魚體重 1kg 計，藉背部肌肉投與，第 1 群投與低分子量 LPS 100mg，第 2 群投與高分子量 LPS(E. Coli 0111, Difco 公司製品)20mg，第 3 群投與不含 LPS 之生理食鹽水。調查投與後 120 小時為止之鯉魚之生死情形，求得暴斃率，其結果示於表 2。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

五、發明說明 (14)

【表 3】

試驗分群	血球之嗜食指數	
	0	1(日後)
第 1 群：低分子量 LPS20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9 \pm 0.18	2.1 \pm 0.61 ※ 2
第 2 群：低分子量 LPS40 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9 \pm 0.18	3.3 \pm 1.16 ※ 2
第 3 群：低分子量 LPS100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9 \pm 0.18	3.8 \pm 1.00 ※ 2
第 4 群：高分子量 LPS100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9 \pm 0.18	0.7 \pm 1.31
第 5 群：高分子量 LPS1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9 \pm 0.18	1.1 \pm 0.63
第 6 群：未添加 LPS 飼料群	0.9 \pm 0.18	0.5 \pm 0.24

試驗分群	血球之嗜食指數	
	5	7(日後)
第 1 群：低分子量 LPS20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3.2 \pm 0.71 ※ 2	8.4 \pm 1.37 ※ 2
第 2 群：低分子量 LPS40 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4.5 \pm 0.75 ※ 2	3.7 \pm 1.02 ※ 2
第 3 群：低分子量 LPS100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3.1 \pm 0.94 ※ 2	2.8 \pm 0.70 ※ 2
第 4 群：高分子量 LPS100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.7 \pm 0.82	1.2 \pm 0.44
第 5 群：高分子量 LPS1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2.1 \pm 0.58 ※ 1	2.9 \pm 0.68 ※ 1
第 6 群：未添加 LPS 飼料群	0.7 \pm 0.5	1.1 \pm 0.56

※ 1：示和第 6 群之有意差距 ($P < 0.05$)

※ 2：示和第 6 群之有意差距 ($P < 0.01$)

由表 3 所示可知投與低分子量 LPS 之蝦類的血球之嗜

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

食指數皆較之第 6 群為高，顯示有意差距 ($P < 0.01, 0.05$)。然而，投與已往之高分子量 LPS $100 \mu g$ 之蝦類的血球其嗜食指數在投與 1、5 和 7 日後皆未上升，投與 $1000 \mu g$ 群在投與 5、7 日後，較之第 6 群有意提高 ($P < 0.05$)。由上述顯示本發明之低分子量 LPS 較之高分子量 LPS，能以極微量而活化蝦類血球之嗜食活性等生物體防禦能力。

實施例 4 (甲殼類上對於血球酚氧化酶之活化作用)

將平均體重為 20g 之斑節蝦以 20 尾為一群分成 6 群，本發明試驗分群之 1、2 和 3 群，分別按蝦體重 1kg 計每日量以低分子量 LPS 20、40、 $100 \mu g$ 混合在飼料中投與 7 日。另外，高分子量 LPS 之第 4 群以 $100 \mu g$ ，第 5 群使用 $1000 \mu g$ 混合在飼料中，同樣投與 7 日。第 6 群為不含 LPS 之飼料投與群。投與開始後，分別在 0、1、5 和 7 日後，使用裝有含 EDTA 之 KHE 培養基之注射器從蝦胸節部採血，藉離心處理而得血球。所得血球懸濁在 Ca-Mg HEPES 培養基中並調配成為 1×10^6 個細胞/ml 濃度之後，藉解凍和超音波處理破壞，經離心處理所得上述澄液以濾膜過濾。將 $900 \mu l$ 之該濾液和基質溶液之 L-DOPA 溶液 $100 \mu l$ 混合之後，在 $60^\circ C$ 下反應 60 分鐘，使用分光光度儀測定波長 490nm 處之吸光度做為酚氧化酶 (PO) 活性。

試驗結果：甲殼類之生物體防禦機制由細胞性因子和液性因子所構成，後者和血球之酚氧化酶活性有密切相關。因此，蝦類之生物體防禦機制有無活化，可由調查酚氧化酶活性而瞭解。所以調查本發明之低分子量 LPS 和高

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

五、發明說明 (16)

分子量 LPS 群中投與開始後 0、1、5 和 7 日後之酚氧化酶活性，其結果示於表 4。

【表 4】

試驗分群	PO 活性 (吸光度 · 490nm)			
	0	1	5	7(日後)
第 1 群:低分子量 LPS20 μ g/kg	0.092	0.105	0.199 ※ 1	0.405 ※ 2
第 2 群:低分子量 LPS40 μ g/kg	0.092	0.115	0.201 ※ 1	0.325 ※ 2
第 3 群:低分子量 LPS100 μ g/kg	0.092	0.166 ※ 1	0.170 ※ 1	0.292 ※ 2
第 4 群:高分子量 LPS100 μ g/kg	0.092	0.093	0.124	0.138
第 5 群:高分子量 LPS1000 μ g/kg	0.092	0.104	0.197 ※ 1	0.230 ※ 1
第 6 群:未添加 LPS 飼料群	0.092	0.093	0.136	0.123

※ 1：和第 6 群之有意差 ($P < 0.05$)

※ 2：和第 6 群之有意差 ($P < 0.01$)

由表 4 顯示投與低分子量 LPS 之蝦類血球中之 PO 活性，任何本發明試驗分群皆較之第 6 群為高並有意差存在 ($P < 0.01, 0.05$)。然而，投與以往之高分子量 LPS100 μ m 之蝦類血球中之 PO 活性一直到投與 7 日後尚未提升，投與 1000 μ m 群在投與 5、7 日後始較之第 6 群有意提高 ($P < 0.05$)。由上述可知本發明之低分子量 LPS 較之高分子量 LPS，以極微量就能活化蝦類血球中之 PO 活性等生物體防禦機能至為明顯。

實施例 5 (對於斑節蝦急性病毒血症之預防效果)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

將平均體重為 14g 之斑節蝦以 20 尾為一群分成 7 群，本發明試驗群之第 1、2 和 3 群將低分子量 LPS 按照蝦之體重 1kg 計每日量分別以 20、40 和 100 μ g 混合在飼料中投與 18 日。另外，第 4 群以高分子量 LPS 混合 1000 μ g 在飼料中同樣投與 18 日，第 5 群使用日本專利第 2547371 號公報中記載之來源於耐熱雙歧桿菌之肽聚糖 (PG) 以 0.2mg/kg (200 μ g/kg) 混合在飼料中投與 18 日。第 6 群使用日本專利特公平 6-65649 號公報中所記載之來源於裂褶菌之 β -1,3-聚糖 (1,3-G) 以 50mg/kg (50000 μ g/kg) 混合在飼料中同樣投與 18 日。第 7 群投與不含 LPS 之飼料做為對照試驗群。

投與 LPS 開始後第 8 日，使用斑節蝦急性病毒血症之病原病毒的 PRDV [penaeid rad-shaped DNA virus (斑節蝦桿狀 DNA 病毒)] 接種進行感染試驗。該感染方法採用將因本病症而暴斃之斑節蝦 3 尾剝除其頭胸部甲殼後，在 40ml 之殺菌處理海水中均質化，經離心處理 (10,000 \times g, 10 分鐘, 4 $^{\circ}$ C) 所得 10ml 之上澄液加入 20 l 之海水中。其中，浸漬投與 LPS 開始後第 8 日之蝦類 2 小時而使之感染。觀察感染病毒後 10 日內之暴斃狀況，將暴斃之蝦體以病理學以及 PCR (Polymerase chain reaction) 方法檢驗而確定其為感染 PRDV 而暴斃。

試驗結果：將本發明之低分子量 LPS 群，高分子量 LPS 群以及未添加 LPS 群在感染 PRDV 後之累積暴斃尾數和暴斃率分別示於表 5 和表 6 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

五、發明說明 (18)

表 5

試驗分群	感染後經過日數				
	1	2	3	4	5
第 1 群：低分子量 LPS20 μ g/kg	0	0	0	2※	3
第 2 群：低分子量 LPS40 μ g/kg	0	0	3	4	4
第 3 群：低分子量 LPS100 μ g/kg	1	1	3	3	4
第 4 群：高分子量 LPS1000 μ g/kg	1	1	6	6	6
第 5 群： PG 0.2mg/kg	0	0	2	5	5
第 6 群： 1,3-G 50mg/kg	0	3	5	7	10
第 7 群：未添加 LPS 群	2	4	13	14	15

※數值示累積暴斃尾數(以下同)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (19)

【表 6】

試驗分群	感染後經過日數					感染率(%)
	6	7	8	9	10	
第 1 群:低分子量 LPS20 μ g/kg	3	3	4	4	4	20※※※
第 2 群:低分子量 LPS40 μ g/kg	6	6	6	7	7	35※※※
第 3 群:低分子量 LPS100 μ g/kg	5	6	8	8	8	40※※※
第 4 群:高分子量 LPS1000 μ g/kg	9	9	10	11	11	55※※
第 5 群: PG 0.2mg/kg	7	8	8	8	10	50※※
第 6 群: 1,3-G 50mg/kg	10	11	11	12	12	60※※
第 7 群:未添加 LPS 群	18	18	19	20	20	100

※※ 示和第 7 群存在有意差 ($P < 0.05$)。

※※※ 示和第 7 群存在有意差 ($P < 0.01$)。

感染 PRDV 後，未添加 LPS 飼料投與群之對照區之蝦類在 9 日內暴斃率高達 100%，相對地，本發明試驗群之暴斃率，就低分子量 LPS20 μ g 投與群而言為 20%，40 μ g 投與群為 35%，100 μ g 投與群為 40% 而皆較低，和對照區之間顯示有意義存在 ($P < 0.01$)。另一方面，高分子量 LPS 1000 μ g 投與群之暴斃率為 55%，PG 0.2mg 投與群之暴斃率為 50%，1,3-G 50mg 投與群之暴斃率為 60%，皆較之低分子量 LPS 投與群之暴斃率為高。由上述結果，可知本發明之低分子量 LPS 能防禦蝦之病毒感染，其效果較之已往

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

五、發明說明 (20)

之高分子量 LPS 為優異。

實施例 6 (對於魚類之免疫功能之活化作用試驗)

將平均體重為 230g 之鰱以 20 尾為一群分成 6 群，本發明試驗群之第 1、2 和 3 群分別將低分子量 LPS 依照鰱體重 1kg 計每日量使用 20、40 和 100 μ g 混合在濕狀片中並投與 7 日。又，高分子量 LPS 之第 4 群使用 100 μ g，第 5 群使用 1000 μ g 也同樣混合在濕狀片中並投與 7 日。第 6 群以不含 LPS 之濕狀片段與之。投與開始後 0、1、5 和 7 日後，分別從 5 尾鰱魚摘取頭腎，在裝有添加 0.25% 氯化鈉之 RPM1-1640-HAH 培養基的塑膠質培養皿中分離血球細胞，經過細胞過濾器而得細胞懸濁液，該液以滲濾非連續性密度梯度層積之後，進行 1600rpm，20 分鐘(4°C)之離心處理，而得白血球液層。

採取該液層後，以離心處理洗淨，然後懸濁在含有 10% 之牛胎兒血清(簡稱 FBS)中，並添加有 0.25% 之氯化鈉的 PRM1-1640-H 培養基中，將白血球細胞數調整為 1×10^6 個細胞/ml。取 500 μ l 之該白血球懸濁液，和以鰱血清調理素處理之酵母懸濁液(1×10^8 個細胞/ml)500 μ l 放入經矽酮處理之玻璃試管中，每隔 10 分鐘攪拌下，以 25°C 培養 60 分鐘。培養結束後，每尾鰱製得 5 張塗抹標本，施以輕染色後用歐試劑封裝。再用光學顯微鏡任意觀察每一標本中之 200 個血球細胞，調查白血球之酵母嗜食數日，按照實施例 3 所示相同計算方法求得嗜食指數，其結果示於表 7 至 8 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

總

五、發明說明 (21)

【表 7】

試驗分群	白血球之嗜食指數	
	0	1(日後)
第 1 群：低分子量 LPS20 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	12.7 \pm 2.65 ※1
第 2 群：低分子量 LPS40 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	17.9 \pm 3.99 ※2
第 3 群：低分子量 LPS100 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	18.6 \pm 4.12 ※2
第 4 群：高分子量 LPS100 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	6.3 \pm 2.24
第 5 群：高分子量 LPS1000 μ g/kg	7.3 \pm 2.30	8.2 \pm 2.18
第 6 群：未添加 LPS 飼料群	7.3 \pm 2.30	6.6 \pm 1.19

※1：和第 6 群間存在有意差 (P<0.05)

※2：和第 6 群間存在有意差 (P<0.01)

【表 8】

試驗分群	白血球之嗜食指數	
	5	7(日後)
第 1 群：低分子量 LPS20 μ g/kg	39.2 \pm 2.54 ※2	52.7 \pm 4.08 ※2
第 2 群：低分子量 LPS40 μ g/kg	37.4 \pm 4.28 ※2	37.0 \pm 3.11 ※2
第 3 群：低分子量 LPS100 μ g/kg	42.6 \pm 5.35 ※2	36.5 \pm 4.32 ※1
第 4 群：高分子量 LPS100 μ g/kg	11.2 \pm 3.05	10.6 \pm 2.96
第 5 群：高分子量 LPS1000 μ g/kg	22.7 \pm 3.16 ※1	31.8 \pm 3.52 ※1
第 6 群：未添加 LPS 飼料群	9.0 \pm 2.04	7.7 \pm 1.73

※1：和第 6 群間存在有意差 (P<0.05)

※2：和第 6 群間存在有意差 (P<0.01)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

五、發明說明(22)

由表 7 至 8 所示可知投與低分子量 LPS 之鯽魚的白血球嗜食指數，任意本發明試驗群皆較之第 6 群為高並存在有意差 ($P < 0.01, 0.05$)。相對地，投與已往之高分子量 LPS $100 \mu g$ 的鯽魚之白血球嗜食指數到投與 7 日後尚未上升，投與 $1000 \mu g$ 群在投與 5 日後始有意高於第 6 群 ($P < 0.01$)。由上述顯示本發明之低分子量 LPS 較之高分子量 LPS 能以極微量而活化白血球之嗜食作用等魚類之免疫機能。

實施例 7 (對於鯽之腸球菌症之預防效果)

將平均體重為 63g 之鯽以 30 尾為一群分成 5 群，本發明試驗群之第 1、2 和 3 群用低分子量 LPS 以鯽之體重 1kg 計，每日量分別使用 20、40 和 $100 \mu g$ 混合在濕狀顆粒每日投與之，另外，第 4 群用 $1000 \mu g$ 高分子量 LPS 混合在濕狀顆粒中同樣每日投與之。第 5 群之對照區投與不含 LPS 之濕狀顆粒。開始投與 7 日後，藉腹腔內接種將鯽之腸球菌症之病原菌種之絲腸球菌 (*Enterococcus seriolicida*) 按照每一尾鯽接種 4.0×10^6 個細胞，求得接種後 15 日內之暴斃率，其結果示於表 9 至 10 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

【表 9】

試驗分群	白血球之嗜食指數								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
第 1 群：低分子量 LPS20 μ g/kg	0	0	0	0	0	0	0	0	1※
第 2 群：低分子量 LPS40 μ g/kg	0	0	0	1	1	2	2	4	4
第 3 群：低分子量 LPS100 μ g/kg	0	0	0	0	0	1	3	3	5
第 4 群：高分子量 LPS1000 μ g/kg	0	0	0	1	1	1	3	3	3
第 5 群：未添加 LPS 群	0	0	1	2	7	7	10	12	16

※數值代表累積暴斃尾數(以下同)。

【表 10】

試驗分群	感染後經過日數						暴斃率(%)
	10	11	12	13	14	15	
第 1 群：低分子量 LPS20 μ g/kg	3	3	3	3	4	4	13.3※※※
第 2 群：低分子量 LPS40 μ g/kg	7	8	8	8	8	8	26.7※※
第 3 群：低分子量 LPS100 μ g/kg	5	5	5	7	7	7	23.3※※
第 4 群：高分子量 LPS1000 μ g/kg	5	9	10	10	11	11	36.7※※
第 5 群：未添加 LPS 群	16	16	17	22	22	22	73.3

※※ 示和第 5 群間存在有意差 ($P < 0.05$)

※※※ 示和第 5 群間存在有意差 ($P < 0.01$)

接種絲腸球菌種 (*E. Seriolicida*) 15 日後，投與未添加

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

五、發明說明 (24)

LPS 飼料之對照群，其暴斃率高達 73.3%，相對地，本發明試驗群之低分子量 LPS $20\mu\text{g}$ 投與群僅為 13.3%， $40\mu\text{g}$ 投與群為 26.7%， $100\mu\text{g}$ 投與群為 23.3%，皆較對照群為低，和對照群之間顯示有意義 ($P<0.05$)。另一方面，投與高分子量 LPS $1000\mu\text{g}$ 之暴斃率為 36.7%，顯示較之各低分子量 LPS 投與群為高。由上述結果顯示本發明之低分子量 LPS 可防禦魚類之細菌感染，其效果較之以往的高分子量 LPS 為優異。

依照本發明可藉極微量之低分子量 LPS 能確實活化甲殼類和魚類之免疫機能而預防感染症，又能預防甲殼類和魚類之暴斃，而提供沒有藥物殘留等公共衛生上沒有問題而安全的飼養甲殼類和魚類用飼料添加劑和飼料。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱： 甲殼類或魚類用飼料添加劑及飼料)

本發明乃甲殼類或魚類用飼料添加劑以及添加該添加劑為特徵之飼料有關者。其特徵為含有得自革蘭氏陰性之微生物菌體，使用蛋白質標記以 SDS-PAGE 方法所測定之分子量為 5000 ± 2000 ，實質上不含高分子量之脂多糖，而以低分子量之脂多糖為有效成分，並且具有免疫賦活，感染病之預防效果的甲殼類或魚類用飼料添加劑，以及添加該添加劑而成之飼料有關者。

英文發明摘要(發明之名稱：)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

中華民國八十九年七月十九日
89.10.19

申請日期	89.7.24
案號	89105420
類別	A-3k 1/6, 1/8

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 型 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	甲殼類或魚類用飼料添加劑及飼料
	英 文	FEED ADDITIVES AND FEEDS FOR SHELLFISH OR FISH
二、發明 創作人	姓 名	1. 杣源一郎 2. 高橋幸則 3. 水野傳一(水野伝一)
	國 籍	日本國
三、申請人	住、居所	1. 日本國東京都世田谷區東玉川 1-10-21 2. 日本國山口縣下關市稗田中町 5-43-304 3. 日本國神奈川縣鎌倉市岡本 1 丁目 21 番 20 號
	姓 名 (名稱)	1. 杣源一郎 2. 高橋幸則
	國 籍	日本國
	住、居所 (事務所)	1. 日本國東京都世田谷區東玉川 1-10-21 2. 日本國山口縣下關市稗田中町 5-43-304
	代 表 人 姓 名	

五、發明說明(12)

【表 2】

試驗分群	死亡數/供試數	暴斃率(%)
第 1 群：低分子量 LPS100mg/kg	0/40	0
第 2 群：高分子量 LPS20mg/kg	34/40	85
第 3 群：生理食鹽水投與群	0/40	0

由表 2 所示可知高分子量 LPS20mg 投與群之暴斃率為 85%，相對地，低分子量 LPS 100mg 投與群完全無死亡者，由此顯示本發明之低分子量 LPS 較之已往的高分子量 LPS 對於魚類而言，其安全性極高。

實施例 3 (甲殼類中對於血球嗜食功能之活化作用)

將平均體重為 20g 之斑節蝦以 20 隻為一群，分成 6 群。蝦體重 1kg 計每日將本發明之低分子量 LPS 分別混合 20, 40 和 100 μ g 於飼料中投與 7 日做為本發明試驗群 1, 2 和 3 群，另外，將高分子量 LPS 分別混合 100 μ g 和 1000 μ g 於飼料中投與 7 日做為第 4、第 5 群、第 6 群投與不含 LPS 之飼料。開始投與後 0、1、5 和 7 日後，使用含有抗凝固劑之 L-半胱胺酸之 K-199 培養基之注射器，由蝦之胸腔抽血，藉離心處理而得血球。將 1 μ l 之懸濁液計含有 1×10^5 個細胞之血球和 1×10^8 個之膠乳顆粒(直徑為 1.986 μ m)混合，在 25 $^{\circ}$ C 下反應半小時之後，使用戊二醛固定後，風乾之。風乾後，以吉姆薩氏液染色，用歐試劑固定在載玻片上。每隻蝦製造上述標本 5 張，利用螢光顯微鏡

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

95.4.26 A7 B7

五、發明說明 (13)

觀察每一標本中任意 200 個血球，調查血球之膠乳顆粒之嗜食率，一個血球細胞計膠乳顆粒之嗜食率，並依照下式求得嗜食指數。

$$\text{嗜食率} = [\text{攝取膠乳顆粒血球數} / \text{所觀察血球總數}] \times 100$$

$$\text{平均攝取數} = [\text{被血球攝取之膠乳顆粒數} / \text{攝取血球數}]$$

$$\text{嗜食指數} = [\text{攝取膠乳顆粒血球數} / \text{所觀察血球總數}] \times [\text{被血球攝取之膠乳顆粒數} / \text{所觀察血球總數}] \times 100$$

試驗結果：甲殼類之生物體防禦機構係由細胞性因子和液性因子所構成，前者以對於異物之血球之嗜食能力關係最深，因此，蝦類之生物體防禦能力有無活化，可藉調查對於異物之血球之嗜食活性而瞭解[參考高橋幸則等人，魚病研究 30(2)，141 至 150 頁(1995 年)]。所以調查本發明低分子量 LPS 群和高分子量 LPS 群之投與開始後 0、1、5 和 7 日後之嗜食指數，其結果示於表 3 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 · 訂 · 線

第 89105420 號專利申請案

申請專利範圍修正本

(95 年 10 月 24 日)

1. 一種甲殼類或魚類用飼料添加劑，係具有免疫賦活、預防感染症效果之甲殼類或魚類用飼料添加劑，其特徵為含有由革蘭陰性之微生物菌體而得，藉蛋白質標記之 SDS-PAGE 方法所測定分子量在 5000 ± 2000 ，實質上不含高分子量脂多糖之低分子量脂多糖為有效成分，該脂多糖之含量，對飼料而言為 0.000001 至 0.001 重量%。
2. 如申請專利範圍第 1 項之甲殼類或魚類用飼料添加劑，其中另含甲殼類或魚類容許之載劑者。
3. 一種由革蘭陰性之微生物菌體而得之低分子量脂多糖之用途，該脂多糖係藉蛋白質標記之 SDS-PAGE 方法所測定之分子量在 5000 ± 2000 ，且實質上不含高分子量脂多糖之低分子量脂多糖，係用於製造甲殼類或魚類用飼料添加劑者。
4. 一種甲殼類或魚類之暴斃預防劑，其特徵為含有由革蘭陰性之微生物菌體而得，藉蛋白質標記之 SDS-PAGE 方法所測定分子量在 5000 ± 2000 ，實質上不含高分子量脂多糖之低分子量脂多糖為有效成分者。
5. 如申請專利範圍第 4 項之甲殼類或魚類之暴斃預防劑，係含有上述分子量為 5000 ± 2000 之低分子量之脂多糖和藥學上容許之載劑者。
6. 一種由革蘭陰性之微生物菌體而得之低分子量脂多糖

之用途，該脂多糖係藉蛋白質標記之 SDS-PAGE 方法所測定分子量在 5000 ± 2000 ，且實質上不含高分子量脂多糖之低分子量之脂多糖，係用於製造甲殼類或魚類之暴斃預防劑用者。

7. 如申請專利範圍第 1 項之甲殼類或魚類用飼料添加劑，其中革蘭陰性之微生物菌體係屬於泛多艾菌屬 (*Pantoea*) 之微生物菌體者。
8. 如申請專利範圍第 7 項之甲殼類或魚類用飼料添加劑，其中革蘭陰性之微生物菌體係團聚泛多艾菌 (*Pantoea agglomerans*) 者。
9. 一種甲殼類或魚類用飼料，其特徵為添加有如申請專利範圍第 1 項之飼料添加劑者。
10. 一種甲殼類或魚類用飼料，其特徵為添加有如申請專利範圍第 4 項之暴斃預防劑者。
11. 一種甲殼類或魚類之飼養方法，其特徵為投與如申請專利範圍第 9 項之飼料於甲殼類或魚類者。
12. 一種甲殼類或魚類之飼養方法，其特徵為投與如申請專利範圍第 10 項之飼料於甲殼類或魚類者。
13. 如申請專利範圍第 1 項之甲殼類或魚類用飼料添加劑，其中感染症係甲殼類之急性病毒血症、弧菌病、寄生病、真菌病、魚類之琉蟻病毒感染症，拉布多病毒症 (*Rhabdovirus*)，神經壞死症、傳染性造血器壞死症、類結節症、鏈球菌症、腸球菌症、弧菌症、冷水病、假單胞菌病、滑走細菌症、水霉病等為對象者。

14.如申請專利範圍第1項之甲殼類或魚類用飼料添加劑，其中高分子量之脂多糖係具有8000以上之分子量者。