

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5411405号
(P5411405)

(45) 発行日 平成26年2月12日 (2014. 2. 12)

(24) 登録日 平成25年11月15日 (2013. 11. 15)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 35/74 (2006. 01)

A 6 1 K 35/74 A

A 6 1 P 1/12 (2006. 01)

A 6 1 P 1/12 1 7 1

請求項の数 9 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2006-511043 (P2006-511043)
 (86) (22) 出願日 平成17年3月15日 (2005. 3. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2005/004572
 (87) 国際公開番号 W02005/087240
 (87) 国際公開日 平成17年9月22日 (2005. 9. 22)
 審査請求日 平成20年2月21日 (2008. 2. 21)
 審判番号 不服2011-28303 (P2011-28303/J1)
 審判請求日 平成23年12月28日 (2011. 12. 28)
 (31) 優先権主張番号 特願2004-75429 (P2004-75429)
 (32) 優先日 平成16年3月16日 (2004. 3. 16)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

微生物の受託番号 IPOD FERMBP-10284

(73) 特許権者 391003912
 コンビ株式会社
 東京都台東区元浅草2丁目6番7号
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 牛田 一成
 日本国兵庫県西宮市柏堂西町7-23
 (72) 発明者 塚原 隆充
 日本国兵庫県川西市多田院2丁目13-3
 O
 (72) 発明者 武川 和琴
 日本国埼玉県さいたま市桜区西堀5-2-
 39 コンビ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 家畜・家禽用下痢抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) EC - 12 (FERM BP - 10284) の死菌体を有効成分として含有することを特徴とする浮腫病を引き起こす大腸菌、又は腸管毒血症性大腸菌 (Enterotoxemic Escherichia coli) による豚の下痢の抑制剤。

【請求項 2】

豚が、5 ~ 33 日齢の子豚であることを特徴とする、請求項 1 記載の豚の下痢の抑制剤。

【請求項 3】

豚が、18 ~ 24 日齢で下痢症状を認めた哺乳豚であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の豚の下痢の抑制剤。

【請求項 4】

死菌体が、加熱処理死菌体であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の豚の下痢の抑制剤。

【請求項 5】

エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) EC - 12 (FERM BP - 10284) の死菌体を有効成分として含有する組成物を、豚に経口投与することを特徴とする浮腫病を引き起こす大腸菌、又は腸管毒血症性大腸菌 (Enterotoxemic Escherichia coli) による豚の下痢の抑制方法。

【請求項 6】

10

20

豚が、5～33日齢の子豚であることを特徴とする、請求項5記載の豚の下痢の抑制方法。

【請求項7】

豚が、18～24日齢で下痢症状を認めた哺乳豚であることを特徴とする、請求項5又は6記載の豚の下痢の抑制方法。

【請求項8】

死菌体が、加熱処理死菌体であることを特徴とする請求項5～7のいずれかに記載の豚の下痢の抑制方法。

【請求項9】

授乳期の母豚及び離乳期前後の子豚に経口投与することを特徴とする請求項5～8のいずれかに記載の豚の下痢の抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸菌エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) EC-12 (FERM BP-10284) の死菌体又はその処理物を有効成分とする、家畜・家禽に蔓延する細菌感染、或いは腸過敏性による下痢抑制剤及び特に豚に投与する下痢抑制方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、乳酸菌を含む家畜の治療薬として、家畜の成長促進あるいは下痢の予防治療薬に、生菌であるラクトバチルス・アシドフィラスおよびストレプトコッカス・フェカリスを含有してなる家畜用薬剤が知られている（例えば、特開昭51-106725号公報参照）。また、豚、牛等の家畜の下痢や軟便症状を回復させると共に、毛づやを良くして順調な発育を得ることができるようにするために、ビフィズス菌等の生菌剤1gに対し、塩化ナトリウム2～12g、塩化カリウム1～10g、重炭酸ナトリウム2～18g、ブドウ糖10～80g、グリシン5～30gの割合で含有させる家畜用混合飼料（例えば、特開平3-61452号公報参照）や、ビフィズス菌、乳酸菌、又は酵母の菌体処理物を含有する犬特有の感染症の予防・治療用ドッグフードが知られている（例えば、特開2001-309753号公報参照）。

【0003】

さらに、乳酸菌であるエンテロコッカス属に属する菌体又はその処理物の利用として、カンジダ菌等の感染防御剤（例えば、特開平05-97689号参照）や、免疫賦活剤（例えば、特開平8-99887号公報、特開平11-92389号公報参照）が知られている。また、エンテロコッカス・フェカリスEC-12 (FERM BP-10284) を、コーンスティープリカーとカゼインの加水分解物とを含有する培地を用いて培養する免疫賦活効果を有する乳酸菌の製造法（例えば、特開2004-41099号公報参照）や、エンテロコッカス・フェカリスAD101菌株の死菌体を主成分とする免疫調整剤（例えば、特開2001-48796号公報参照）も知られている。しかしながら、エンテロコッカス・フェカリスEC-12 (FERM BP-10284) が家畜・家禽の下痢

に対してきわめて優れた抑制作用を有することは知られていなかった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

下痢とは、元来糞便中の水分の増加を意味し、下痢の発生機序から浸透圧性下痢 (osmotic diarrhea)、分泌性下痢 (secretory diarrhea)、通過時間の異常による下痢の3つに大別される。浸透圧性下痢は腸管から吸収されない物質によって腸管内浸透圧が高まり起こる下痢である。分泌性下痢は、細菌毒素、ホルモン、化学物質などが腸管において水分や電解質の分泌を促進して起こる下痢でその種類は多い。その中で細菌によるものは粘膜損傷を伴わず細菌毒素により下痢を起す型（例えば、ある種の大腸菌）と細菌が細胞内

10

20

30

40

50

に侵入し粘膜を傷害して下痢を起す型（たとえば、サルモネラ菌）の２種類がある。脂肪や胆汁酸の吸収障害に基づく脂肪性下痢や胆汁酸性下痢も分泌性下痢の１つである。そのほか炎症性腸疾患でも腸管壁の透過性が亢進して下痢を起す。腸通過時間異常のうち、その低下によるものは腸狭窄、憩室など盲係蹄症候群で細菌の異常増殖をおこすことによる。一方、亢進によるものは過敏性腸症候群や甲状腺機能亢進症で、腸運動を亢進することにより下痢を起す。

【 0 0 0 5 】

豚において、その飼育中、離乳期子豚や母豚で消化不良性下痢を起す場合がある。育成豚の飼料にトウモロコシを主原料とした穀類が約 4 0 ～ 8 0 % 含まれており、豚の小腸で澱粉は消化・吸収されるが、一時に大量の食物が小腸に入ってきた場合や、離乳期前後の子豚、授乳している母豚では消化酵素や胃酸の分泌が不十分であるため、小腸では澱粉を完全に消化・吸収できず、その澱粉が大腸に入ってくる場合がある。大腸内の乳酸菌の一種であるストレプトコッカス属の中には、素早くその澱粉を分解し、乳酸をどんどん生産し、それ自体増殖するものもあるので、大腸内は急に乳酸が増える。その結果、急激な pH の低下を起し、他菌の死滅或いは弱体化が起こり、異常な大腸フローラになる。このとき、下痢が起こり、下痢便中からは乳酸と、乳酸と同様の性質を持つコハク酸が大量に検出される。このように、大腸フローラが様々な原因で異常になった時に、しばしば下痢が起こる。さらに、乳酸の大量蓄積は、大腸組織にも悪影響を及ぼして、大腸組織が損傷を受けて大腸が薄くなるだけでなく、結果として病原菌の大腸への侵入を受けやすくなるという二次被害を被る可能性が出てくる。したがって、大腸菌、クロストリディウム (*Clostridium perfringens*)、*Brychispira hyodysenteriae*、*Lawsonia intracellularis*、*Salmonella* sp.、ロタウィルス、コクシジウムなど下痢を引き起こす病原性細菌、病原性ウイルス、病原性原虫に感染されやすい。

ところで、豚の大腸菌症は、原因菌や発病機序により大腸菌性下痢、大腸菌性腸管毒血症及び大腸菌性敗血症に大別される。下痢、敗血症は新生期に多発し、下痢は特定の血清型に属する毒素原生大腸菌の感染が主因である。腸管毒血症は離乳期（4 ～ 12 週齢）に発生し、原因菌は腸管毒血症大腸菌 *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) と総称される。毒血症はETECの小腸内定着とその結果産生された毒素が吸収され、標的組織に障害を引き起こすことにより発病する。浮腫病 *Edema disease* (ED) は大腸菌性腸管毒血症の典型であり、原因菌は特定の血清型に属し、Vero毒素産生性大腸菌 (VTEC) の範疇に入る。浮腫病 (ED) は散発的に発生することが多いが、時には小規模な集団発生を起こす。まれに 2 ～ 3 週齢の哺乳豚、あるいは成豚にも発生する。成豚は離乳豚よりも慢性の経過をとる。発症の特徴は、豚群の中の数等が突発的に発病し、短期間（4 ～ 15 日間）で終息することであるが、同一農場で再発を繰り返すこともある。発病率は、10 ～ 40 % であるが、死亡率は 50 ～ 90 % と高い。発生は 1 つの血清型菌の感染によることが多いが、時には複数の菌型による感染もある。浮腫病 (ED) 原因菌の血清型 (O139、O141) は各国とも共通している。実験的には O139 の 10^5 個を 3 日間経口投与する事で発症する。通常、伝播は糞便、エロゾール、汚染飼料などを介して起こり、農場の汚染は長期に及ぶことが知られている（「臨床と微生物」 Vol.23, 843-849, 1996）。

【 0 0 0 6 】

本発明の課題は、従来のように家畜・家禽の感染症に使用されてきた抗生物質や合成抗菌剤を使用することなく、効果的に下痢抑制剤効果を奏し、また、抗生物質耐性の病原性感染病に対しても予防および治療が可能となる、安全な下痢抑制剤及び抑制方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

家畜のうちでも特に食肉として、近年需要性が高い豚において、哺乳期、離乳期前後の子豚、或いは授乳期の母豚では、下痢を伴う病原性の大腸菌により浮腫病に罹る。この疾病は離乳後の子豚にみられることが多く、発生農場では子豚の 10 ～ 40 % が発病するといわれている。

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、このような豚の飼育期間において、離乳期前後の子豚に高い確率で罹患する下痢に着目し、その予防及び治療について鋭意研究の結果、特定の乳酸菌エンテロコッカス・フェカリス EC - 12 (FERM BP - 10284) の死菌体又はその処理物を投与すると、大幅に子豚の下痢、浮腫病が減少することを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 9 】

すなわち本発明は、(1) エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) EC - 12 (FERM BP - 10284) の死菌体を有効成分として含有することを特徴とする浮腫病を引き起こす大腸菌、又は腸管毒血症性大腸菌 (Enterotoxemic Escherichia coli) による豚の下痢の抑制剤や、(2) 豚が、5 ~ 33 日齢の子豚であることを特徴とする、上記(1)記載の豚の下痢の抑制剤や、(3) 豚が、18 ~ 24 日齢で下痢症状を認めた哺乳豚であることを特徴とする、上記(1)又は(2)記載の豚の下痢の抑制剤や、(4) 死菌体が、加熱処理死菌体であることを特徴とする上記(1) ~ (3) のいずれかに記載の豚の下痢の抑制剤に関する。

10

【 0 0 1 0 】

また本発明は、(5) エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) EC - 12 (FERM BP - 10284) の死菌体を有効成分として含有する組成物を、豚に経口投与することを特徴とする浮腫病を引き起こす大腸菌、又は腸管毒血症性大腸菌 (Enterotoxemic Escherichia coli) による豚の下痢の抑制方法や、(6) 豚が、5 ~ 33 日齢の子豚であることを特徴とする、上記(5)記載の豚の下痢の抑制方法や、(7) 豚が、18 ~ 24 日齢で下痢症状を認めた哺乳豚であることを特徴とする、上記(5)又は(6)記載の豚の下痢の抑制方法や、(8) 死菌体が、加熱処理死菌体であることを特徴とする上記(5) ~ (7) のいずれかに記載の豚の下痢の抑制方法や、(9) 授乳期の母猪及び離乳期前後の子豚に経口投与することを特徴とする上記(5) ~ (8) のいずれかに記載の豚の下痢の抑制方法に関する。

20

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明のエンテロコッカス・フェカリス EC - 12 (FERM BP - 10284) の死菌体又はその処理物を有効成分として含有する家畜・家禽の下痢抑制剤を経口的に投与すると、家畜・家禽、特に豚の下痢を抑制し、下痢による死亡率が著しく低下し、従来のように家畜・家禽の感染症に使用されてきた抗生物質や合成抗菌剤を使用することなく、効果的に下痢抑制剤効果を奏するうえに、抗生物質耐性の病原性感染病に対しても予防および治療が可能となる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 2 】

本発明の家畜・家禽の下痢抑制剤としては、乳酸菌エンテロコッカス・フェカリス EC - 12 (FERM BP - 10284) の死菌体又はその処理物を有効成分として含有する組成物であれば特に制限されず、また、本発明の家畜・家禽の下痢抑制方法としては、乳酸菌エンテロコッカス・フェカリス EC - 12 (FERM BP - 10284) の死菌体又はその処理物を有効成分として含有する組成物を、家畜・家禽に経口投与する方法であれば特に制限されず、上記感染防除剤や組成物は、そのままあるいは製剤などあらゆる形態で使うことができる。

40

【 0 0 1 3 】

本発明において用いられるエンテロコッカス・フェカリス EC - 12 の菌学的性質を(表1)に示す。このエンテロコッカス・フェカリス EC - 12 の培養方法としては、従来公知の乳酸菌の培養方法も含め特に制限されるものではないが、乳酸菌生育用培地を用い、37 で培養 pH を中性付近に維持しながら 5 ~ 120 時間、好ましくは、16 ~ 28 時間培養し、生菌数約 $10^7 \sim 10^{10} / \text{ml}$ 、好ましくは約 $10^8 \sim 10^{10} / \text{ml}$ の培養液を得る方法を例示することができる。また、エンテロコッカス・フェカリス EC -

50

12は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）において2005年2月25日に「FERM BP-10284」としても寄託されており、エンテロコッカス・フェカリス EC-12の16SrDNAは、国立遺伝研究所に「AB15482」として登録されている。

【0014】

【表1】

寄託番号	IFO16803
菌株	E.faecalis EC-12株
細胞形状	球状
グラム染色性	+
カタラーゼ	—
NaCl(6.5%)増殖	+
pH9.6培地での増殖	+
胆汁酸培地での増殖(4%)	+
アラビノース	—
メリビオース	—
ソルボース	—
メレジトース	+
ソルビトール	+

10

【0015】

本発明においては、エンテロコッカス・フェカリス EC-12は、死菌体又はその処理物として用いる必要があるが、かかる死菌体としては、常法により培養、集菌した乳酸菌の菌体を洗浄し、遠心脱水し、必要に応じて洗浄・脱水を繰り返した後、蒸留水、生理食塩水等に懸濁し、この懸濁液を、例えば80～115℃で30分～3秒間加熱することにより得られる死菌体懸濁液やその乾燥物、又は前記死菌体懸濁液にガンマ線或いは中性子線を照射することにより得られる死菌体懸濁液やその乾燥物を挙げることができる。該死菌体懸濁液の乾燥手段としては公知の乾燥手段であれば特に制限されないが、噴霧乾燥、凍結乾燥等を例示することができる。場合によっては、加熱等による殺菌処理の前後、あるいは、乾燥処理の前後に、酵素処理、界面活性剤処理、磨砕・粉碎処理を行うこともでき、これらの処理により得られるものも、本発明の死菌体又はその処理物に含まれる。

20

【0016】

前記の下痢抑制剤や組成物を製剤として用いる場合、デンプン、乳糖、大豆蛋白等の担体、賦形剤、結合材、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、懸濁剤等の添加剤を配合して、周知の方法で粉剤、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤等に製剤することができる。かかる製剤はそのまま投与することもできるが、飼料等に混じて給餌させることもできる。

30

【0017】

本発明において、下痢抑制の対象となる家畜・家禽類としては、牛、豚、馬、羊、ヤギなどの家畜、鶏、鴨、ダチョウなどの家禽を例示することができ、授乳、哺乳期も含め、いずれの段階の日齢、年齢の家畜・家禽にも適用できるが、特に、豚の飼育においては、授乳期の母豚及び離乳期前後の子豚に経口投与することが浮腫病の感染防除の点で好ましい。豚の下痢は、上記のように、特に離乳後の子豚や哺乳豚に多く発生するが、その発生原因としては、飼育されている分娩舎や離乳舎の構造等の飼育環境要因や、大腸菌が発生しやすい梅雨の期間、夏の暑い時や冬の寒い時など子豚の免疫力が低下する季節要因や、また、離乳方法が悪く消化不良等による哺乳要因や、栄養不良等の飼育要因や、遺伝要因などが複雑に関与すると考えられる。その主なる症状は、眼瞼の浮腫（赤く腫れる）、著明な腸管膜リンパ節の腫脹、下痢が特徴であり、神経症状もある。

40

【0018】

本発明の下痢抑制剤は、下痢の治療ばかりでなく、下痢の予防にも有用であり、家畜・家禽への投与時期としては、その時期は下痢症状を発症している時に投与することは勿論、抵抗力が低下している時や、周囲で下痢が流行している時、家畜・家禽の妊娠時、授乳時、哺乳期間等を好適に例示することができる。また、下痢としては、病原性細菌やククシジウム原虫に起因する下痢や腸過敏性下痢を好適に例示することができ、また、上記病

50

原性細菌としては大腸菌、特に浮腫病を引き起こす大腸菌や腸管毒血症性大腸菌の他、クロストリディウム・パーフリンゲンス (*Clostridium perfringens*) 等のクロストリディウム属に属する微生物を具体的に例示することができる。

【0019】

本発明の下痢抑制剤や本発明の下痢抑制方法における組成物の投与量や投与回数は、家畜・家禽の種類、体重、下痢の症状、回復状態等に応じて、適宜決定することができるが、例えば、子豚に関しては、エンテロコッカス・フェカリス EC-12 の死菌体又はその処理物として、体重 1 kg あたり 0.1 ~ 200 mg / 日、好ましくは 20 ~ 100 mg / 日を、通常の離乳後の飼料に混ぜて投与することが好ましい。投与期間は、子豚の健康状態、環境により異なるが、21 日齢より 42 日齢、さらに望ましくは、5 日齢より約 70 日齢までの間が適当である。

10

【0020】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例 1】

【0021】

エンテロコッカス・フェカリス EC-12 (*FERM BP-10284*) をロゴサ培地で 37、24 時間培養した前培養液を、酵母エキス 4%、ポリペプトン 3%、乳糖 10% を含む液体培地に 0.1 (v/v) % 接種し、pH スタットを用いて pH 6.8 ~ 7.0 に苛性ソーダ水溶液で調整しながら 37、22 ~ 24 時間中和培養を行なった。

20

【0022】

培養終了後、連続遠心機で菌体を分離、回収した後、水を加えて元の液量まで希釈して再度連続遠心機で菌体を分離、回収した。この操作を合計 4 回繰り返して菌体を洗浄した。次いで、洗浄した菌体を適量の水に懸濁し、100、30 分間殺菌した後、スプレードライヤーを用いて菌体を乾燥して加熱処理菌体粉末を調整した。

【実施例 2】

【0023】

[病原因子の特定と臨床スコア]

1. 供試飼料・供試動物・飼育方法

実施例 1 で得られた乾燥死菌体 (以下、「EC-12」という) は予め小麦粉で 10 倍希釈したプレミックスを作製しておき、EC-12 を 0.05 % 含有するように基礎飼料 SD S No. 1 (日本配合飼料株式会社製、抗菌剤及び生菌剤を含まないもの) に添加したものを用いた。また、対照飼料には、0.5 % の市販小麦粉を基礎飼料に添加したものを用いた。被検動物として、哺乳期及び離乳期に下痢が頻発している養豚場において飼育されている、下痢症状を認めた哺乳豚 (LWD 系三元交雑種豚) 31 頭 (4 腹分) を対象とした。該哺乳豚は 18 ~ 24 日齢で、分娩ストールで母豚とともに飼育されており、母乳のみを摂食していた。EC-12 投与群は試験開始後 4 又は 8 日で、無投与対照群は試験開始後 2 日に離乳されていた。なお、分娩時から母豚及び供試子豚に薬剤は投与されていなかった。

30

【0024】

2. 試験の概要

投与前に、供試豚全頭の採糞をスワブで行い、病原因子の陽性率を定性的に調査した。次に、供試豚の 21 頭 (3 腹分) に EC-12 添加飼料を、残りの 10 頭 (1 腹分) に EC-12 無添加飼料 (対照) を 14 日間給与した。その間、投与開始後 7 日目に全頭スワブで採糞を行い、その後 7 日間投与を継続し、経過を観察した。具体的には、病原因子の特定と、平均臨床スコアと、体重測定について試験した。

40

【0025】

3. 病原因子の特定

子豚の哺乳期であり、罹患しやすい 1) クロストリジウム (*Clostridium perfringens*)、2) サルモネラ (*Salmonella* sp.)、3) 溶血性大腸菌 (*E.coli*) について、投与開始

50

後0及び7日に、病原菌の検出を行った。糞便中の病原因子検査結果を(表2)に示す。
 なお、投与開始後14日の観察時に糞便を採材し、*Brychispira hyodysenteriae*(豚赤痢原因菌)、*Lowsonia intracellularis*(増殖性腸炎原因菌)、ロタウィルス、コクシジウムの検査を行ったが、全例陰性であった。

【0026】

【表2】

試験群	個体 番号	溶血性大腸菌		<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Salmonella</i> spp.	
		0d	7d	0d	7d	0d	7d
無投与対照群 陽性率 (%)		0	90 *	10	0	0	0
EC-12投与群 陽性率 (%)		5	0	57	0 *	0	0
Fisher's exact probability test p値		0.68	<0.001	0.02	N.C.	N.C.	N.C.

*: ウィルコクソンの符号付順位検定を行ったところ、投与前と投与後の間に有意差あり。

【0027】

その結果、溶血性大腸菌陽性率は、無投与対照群では試験開始後0日で0%(0/10例)、試験開始後7日で90%(9/10例)であった。ウィルコクソンの符号付順位検定の結果では、試験開始後0日と7日の間に有意差が認められた。EC-12投与群では試験開始後0日で5%(1/21例)、試験開始後7日で0%(0/21例)であった。観察時点毎に実施したフィッシャーの直接確率計算法の結果では、試験開始後7日で無投与対照群及びEC-12投与群間に有意差が認められた。また、クロストリジウム(*Clostridium perfringens*)陽性率は、無投与対照群では試験開始後0日で10%(1/10例)、試験開始後7日で0%(0/10例)であった。EC-12投与群では試験開始後0日で57%(13/21例)、試験開始後7日で0%(0/21例)であった。ウィルコクソンの符号付順位検定の結果では、試験開始後0日と7日の間に有意差が認められた。観察時点毎に実施したフィッシャーの直接確率計算法の結果では、試験開始後0日で無投与対照群及びEC-12投与群間に有意差が認められた。なお、試験期間を通してサルモネラは検出されなかった。

【0028】

10

20

30

40

50

4. 平均臨床スコア

投与開始後0, 1, 2, 3, 4, 7, 10及び14日に、糞便性状観察、活力、被毛、食欲について観察して記録し、総合臨床スコアを求めた。結果を(表3)に示す。

【0029】

【表3】

観察項目	試験群	供試 頭数	試験開始後日数											投与期間中合計 1-14d
			0	1	2	3	4	7	10	14				
糞便性状	無投与対照群	10	1.8	1.4	0.9	1.0	1.2	1.9	1.4	1.1				8.9
	EC-12投与群	21	1.5	0.7	0.5	0.6	0.6	0.5	0.4	0.8				4.0
	マンホイットニ検定p値		0.15	0.02	0.03	0.10	0.04	<0.001	<0.001	0.2				<0.001
活力	無投与対照群	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2				0.2
	EC-12投与群	21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				0.0
	マンホイットニ検定p値		N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.04				0.04
被毛	無投与対照群	10	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.7				1.1
	EC-12投与群	21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				0.0
	マンホイットニ検定p値		0.15	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.002	<0.001				<0.001
食欲	無投与対照群	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1				0.1
	EC-12投与群	21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				0.0
	マンホイットニ検定p値		N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.59				0.59
総合臨床 スコア	無投与対照群	10	1.9	1.4	0.9	1.0	1.2	1.9	1.8	2.1				10.3
	EC-12投与群	21	1.5	0.7	0.5	0.6	0.6	0.5	0.4	0.9				4.1
	マンホイットニ検定p値		0.09	0.02	0.03	0.1	0.04	<0.001	<0.001	0.008				<0.001

【0030】

(1) 糞便性状スコア

平均糞便性状スコアは無投与対照群では試験開始後0日で1.8, 試験開始後1日で1.4, 試験開始後2日で0.9, 試験開始後3日で1.0, 試験開始後4日で1.2, 試験開始後7日で1.9, 試験開始後10日で1.4, 試験開始後14日で1.1であり、試験開始後1から14日(EC-12投与期間中)の合計スコアは8.9であった。EC-12投与群では試験開始後0日で1.5, 試験開始後1日で0.7, 試験開始後2日で0.5, 試験開始後3及び4日で0.6, 試験開始後7日で0.5, 試験開始後10日で0.4, 試験開始後14日で0.8であり、試験開始後1から14日(EC-12投与期間中)の合計スコアは4.0であった。観察時点毎に実施したマン・ホイットニ検定の結果では、試験開始後1, 2, 4, 7及び10日で有意差が認められ、EC-12投与期間中の合計スコアでの比較でも有意差が認められた。

【0031】

(2) 活力スコア

平均活力スコアは無投与対照群では試験開始後0から10日まで0.0, 試験開始後1

10

20

30

40

50

4日で0.2であった。EC-12投与群では試験期間中の活力スコアは全て0.0であった。試験開始後14日のマン・ホイットニ検定で有意差が認められた。

【0032】

(3) 被毛スコア

平均被毛スコアは無投与対照群では試験開始後0日で0.1, 試験開始後1から7日まで0.0, 試験開始後10日で0.4, 試験開始後14日で0.7であった。EC-12投与期間中の合計スコアは1.1であった。EC-12投与群では試験期間中の被毛スコアは全て0.0であった。観察時点毎に実施したマン・ホイットニ検定の結果では, 試験開始後10, 14日で有意差が認められ, EC-12投与期間中の合計スコアでの比較でも有意差が認められた。

10

【0033】

(4) 食欲スコア

平均食欲スコアは無投与対照群では試験開始後0から10日まで0.0, 試験開始後14日で0.1であった。EC-12投与群では試験期間中の食欲スコアは全て0.0であった。試験開始後14日のマン・ホイットニ検定で有意差は認められなかった。

【0034】

(5) 総合臨床スコア

平均総合臨床スコアは無投与対照群では試験開始後0日で1.9, 試験開始後1日で1.4, 試験開始後2日で0.9, 試験開始後3日で1.0, 試験開始後4日で1.2, 試験開始後7日で1.9, 試験開始後10日で1.8, 試験開始後14日で2.1であり, EC-12投与期間中の合計スコアは10.3であった。EC-12投与群では試験開始後0日で1.5, 試験開始後1日で0.7, 試験開始後2日で0.5, 試験開始後3及び4日で0.6, 試験開始後7日で0.5, 試験開始後10日で0.4, 試験開始後14日で0.9であり, EC-12投与期間中の合計スコアは4.1であった。観察時点毎に実施したマン・ホイットニ検定の結果では, 試験開始後1, 2, 4, 7, 10及び14日で有意差が認められ, EC-12投与期間中の合計スコアでの比較でも有意差が認められた。

20

【0035】

5. 体重測定

投与開始後0, 7及び14日に体重測定を実施した。試験期間中の体重測定結果及び増体量の推移を(表4)に示す。

30

【0036】

【表 4】

試験期間中の体重測定結果及び増体量 (kg)									
試験群	供試頭数	試験開始後日数				試験期間中増体量			
		0d	7d	14d		0-7d	7-14d	0-14d	
無投与対照群	10	平均	5.2	5.9	6.8	0.7	0.9	1.6	
		標準偏差	1.1	1.3	1.3	0.3	0.4	0.6	
EC-12投与群	21	平均	5.3	6.3	6.6	1.0	0.3	1.3	
		標準偏差	1.1	1.2	1.3	0.4	0.5	0.6	
t-test p値		0.94	0.22	0.87		<0.001	0.01	0.65	

【0037】

その結果、平均体重は、無投与対照群では試験開始後0日で5.2kg、試験開始後7日で5.9kg、試験開始後14日で6.8kgであった。EC-12投与群では試験開始後0日で5.3kg、試験開始後7日で6.3kg、試験開始後14日で6.6kgであった。t検定の結果では、どの時点にも有意差は認められなかった。また、試験期間中の平均増体量は、無投与対照群では試験開始後0～7日で0.7kg、試験開始後7～14日で0.9kg、試験開始後0～14日で1.6kgであった。EC-12投与群では試験開始後0～7日で1.0kg、試験開始後7～14日で0.3kg、試験開始後0～14日で1.3kgであった。t検定の結果では、試験開始後0～7日ではEC-12投与群で、試験開始後7～14日では無投与対照群でそれぞれに対して高値となり、有意差が認められた。

【0038】

6. まとめ

EC-12投与開始後1日から便性状は有意に改善され、その傾向は試験終了時まで認められた。試験開始後14日ではEC-12を投与している1豚房（試験開始後8日に離乳）で下痢の再発が散見されたが、他の2豚房では重篤な再発は認められなかった。その他の臨床スコアは、無投与対照群では下痢の継続による活力減退、被毛失沢及び食欲不振などを起こす個体が認められたが、EC-12投与群では試験期間を通して観察されなかった。糞便中の病原因子検査では、試験開始後7日では無投与対照群の10頭中9頭で溶血性大腸菌が陽性であったのに対してEC-12投与群では全て陰性であった。また、EC-12投与群で試験開始後0日に21頭中13頭陽性であったクロストリジウム（Clos

tridium perfringens) は試験開始後 7 日には全例陰性になっていた。以上の結果から, E C - 1 2 を哺乳期子豚に投与することで病原性大腸菌及びクロストリジウム (Clostridium perfringens) による下痢を抑制する可能性が示唆された。また試験期間中 E C - 1 2 投与によると思われる異常は認められず, E C - 1 2 の豚に対する投与の安全性も確認された。

【実施例 3】

【0039】

[子豚の死亡頭数の減少]

1. 試験の概要

試験農場は、母豚 400 頭を一貫経営する農場で、分娩舎は解放豚舎で離乳舎はウィンドレス豚舎で、オールインオールアウトを実施している。E C - 1 2 を、餌付け開始時より離乳後 7 日までの間に飼料に混ぜて、5 日齢より 33 日齢の子豚に投与した。その他の条件は実施例 2 と同様に行った。体重 1 kg 当たり 100 mg の E C - 1 2 の投与は、2002 年 6 月 22 日より開始し、同年 7 月 18 日まで行った。2002 年 7 月 19 日から投与量を半分に減らし、体重 1 kg 当たり 50 mg を同年 8 月 2 日まで投与した。2002 年 8 月 3 日から投与量を元に戻し、体重 1 kg 当たり 100 mg を同年 9 月 27 日まで投与した。その後、投与量を倍量に増加して、体重 1 kg 当たり 200 mg を 2003 年 12 月まで投与した。

【0040】

2. 投与効果

図 1 に示すように、投与開始の 2002 年 6 月 22 日の翌週より下痢の発生が減少するとともに、下痢による死亡も半数以下となった。また、図 1 に示すように、印は、図欄外右の縦軸に示す死亡子豚の日齢を表し、この死亡日齢をみると、約 35 日～45 日齢であることから、投与は約 35 日～45 日齢以前の日齢から開始することが好ましいことがわかった。

【0041】

その後の 2002 年 7 月 19 日から投与量を半分に減らし、体重 1 kg 当たり 50 mg を同年 8 月 2 日まで 2 週間投与をしたところ、図 2 に示すように、死亡の増加が見られた。これは、分娩舎の環境と離乳舎の環境の影響を受けていることも考えられるが、投与量を半分に減らしたのが更に死亡数の増加に関係すると思われる。その後 8 月 3 日から投与量を元に戻し、9 月の最後の週まで、即ち、体重 1 kg 当たり 100 mg を投与したところ、図 2 に示すように、死亡頭数が約 1/2 ～ 1/3 以下となり、～9 月 6 日の週では、死亡頭数はわずか 1 頭であった。

【0042】

9 月の最後の週より死亡頭数が増加し始めたので、投与量を倍量に増加した。即ち、体重 1 kg 当たり 200 mg を投与した。その結果、図 2 に示すように、徐々に死亡頭数が減少し、～11 月 8 日の週では、死亡頭数が 2 頭まで減少した。その後 2 週にわたり、死亡頭数が増加したが、その原因は明らかでなく、分娩舎の環境にあると思われる。旧分娩舎は、温度コントロールが悪く外気温と殆ど変わらない状態の建物である。2003 年の死亡頭数を 2002 年の同週の死亡頭数を合わせて図 3 に示す。図 3 に示す死亡頭数からみて、明らかに本発明の E C - 1 2 を投与した 2003 年の方が、2002 年に比べてその数は少ないことがわかった。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図 1】E C - 1 2 死菌体の投与開始よりの週別下痢死亡頭数 (2002 年 5 月～同年 7 月) を示す図である。

【図 2】E C - 1 2 死菌体の投与開始、投与量の変更を含む週別下痢死亡頭数 (2002 年 5 月～同年 11 月) を示す図である。

【図 3】2002 年と 2003 年を比較した週ごとの離乳後下痢死亡頭数を示す図である。

【 0 0 4 4 】

原寄託についての受領書

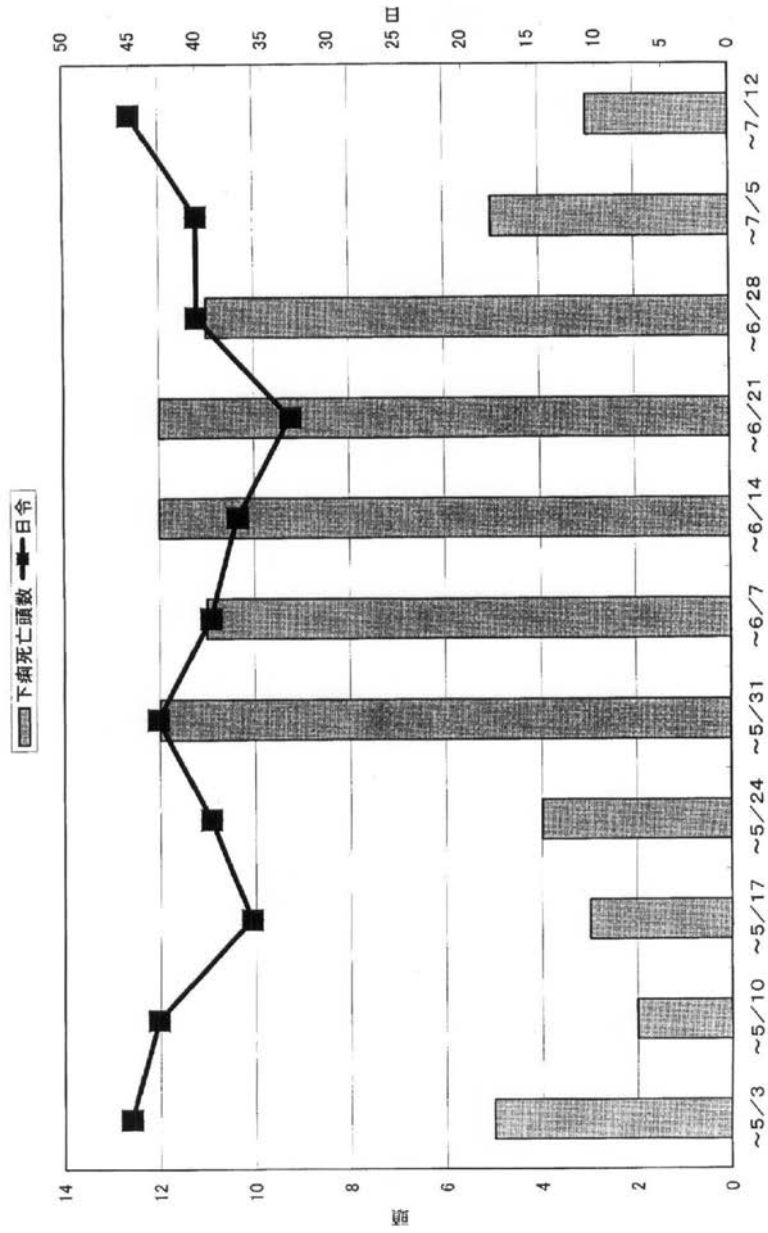
氏名 (名称)
 コンビ株式会社
 代表取締役社長 松浦 弘昌 殿
 寄託者
 あて名 〒 111-0041
 東京都台東区元浅草2-6-7

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Enterococcus faecalis EC-12	(受領番号) FERM ABP-10284
II. 原寄託申請の受領	
本国際寄託当局は、2005 年 2 月 25 日にI欄の微生物を受領した。	
III. 移管申請の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (国内受託日) に受託したI欄の微生物を受領した。	
IV. 国際寄託当局	
<p style="text-align: center;">独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター</p> <p>名称 International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology</p> <p style="text-align: center;">センター長 山岡 正和 Dr.Masakazu Yamaoka , Director</p> <p>あて名 日本国 茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)</p> <p style="text-align: center;">AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan</p>	
平成 17 年 (05) 2 月 25 日	

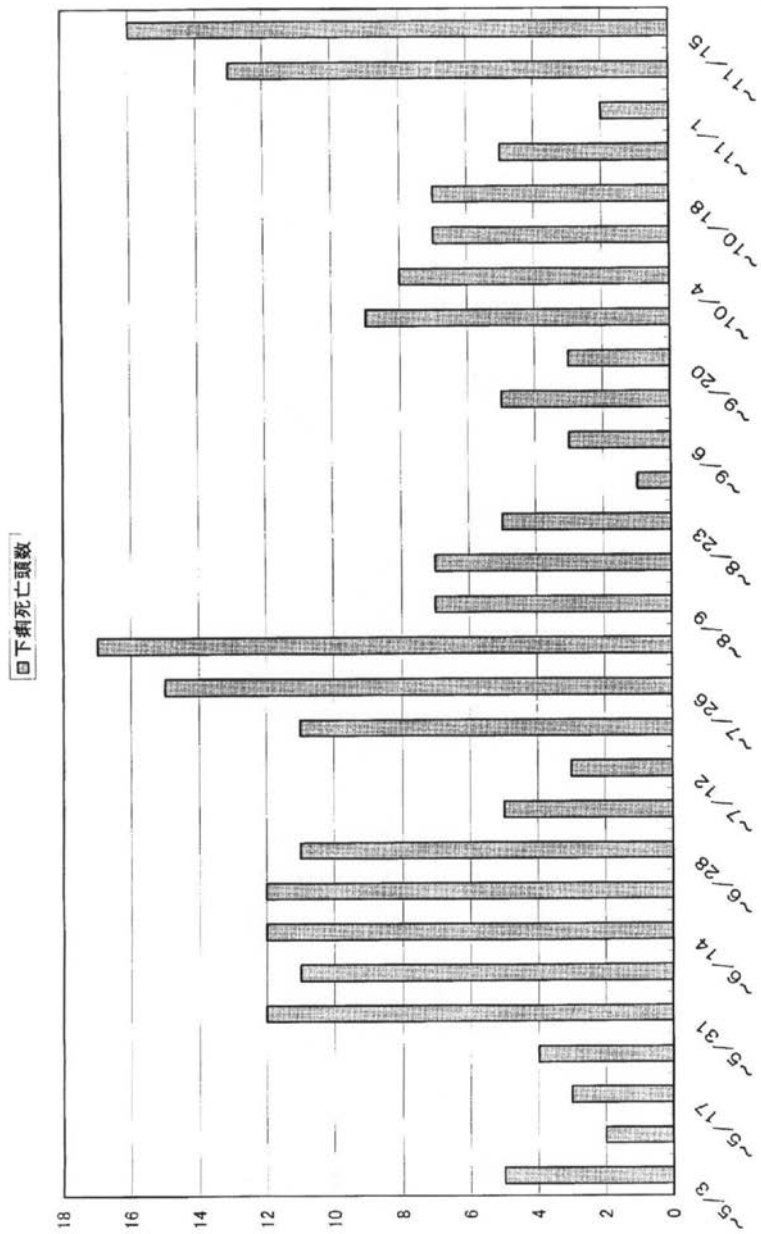
10

20

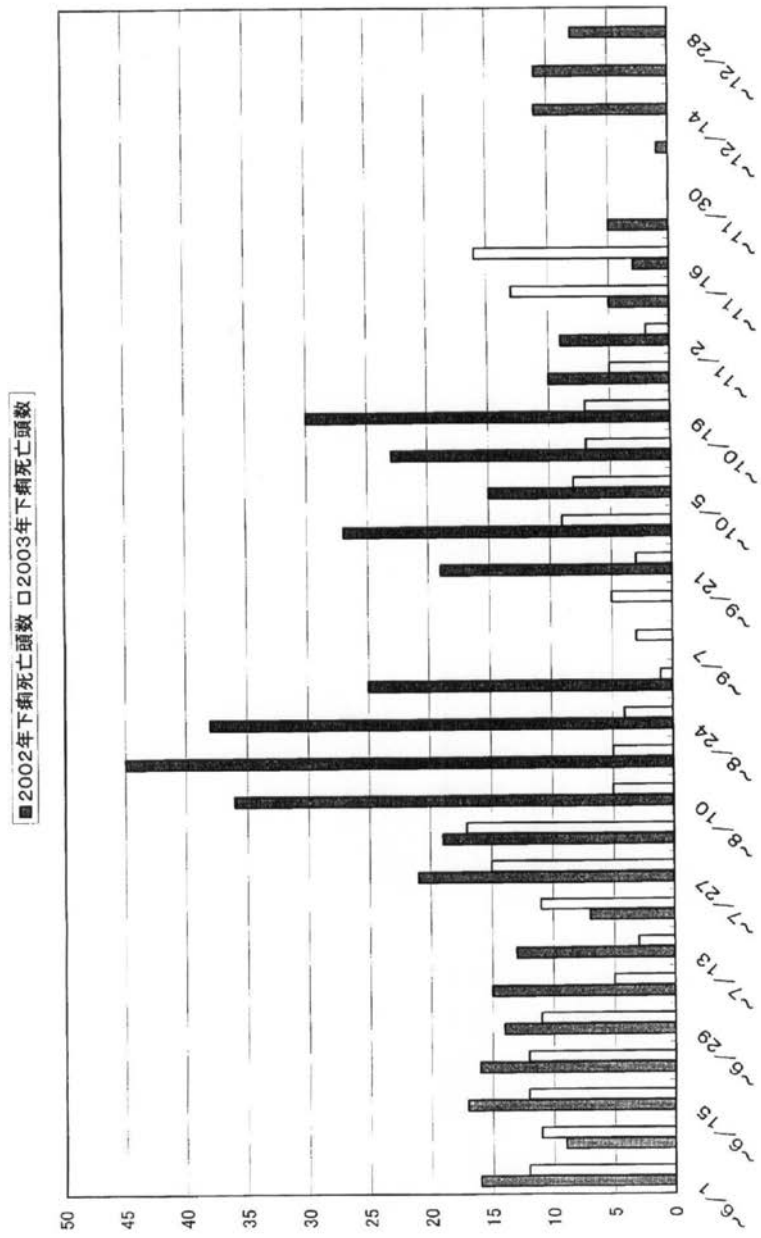
【図 1】



【図2】



【図 3】



フロントページの続き

- (72)発明者 菅 辰彦
日本国埼玉県さいたま市桜区西堀 5 - 2 - 3 9 コンビ株式会社内
- (72)発明者 渡邊 卓巳
日本国埼玉県さいたま市桜区西堀 5 - 2 - 3 9 コンビ株式会社内
- (72)発明者 松原 範宜
日本国埼玉県さいたま市桜区西堀 5 - 2 - 3 9 コンビ株式会社内

合議体

審判長 村上 騎見高
審判官 増山 淳子
審判官 穴吹 智子

- (56)参考文献 特開 2 0 0 4 - 5 1 5 3 0 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K35/00

CAPLUS、MEDLINE、BIOSIS、EMBASE (STN)