

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年10月7日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/084923 A1

(51) 国際特許分類: A61K 35/74,
A61P 25/00, A23K 1/16, 1/18

NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003898

(22) 国際公開日: 2004年3月22日 (22.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) 優先権データ:
特願2003-086419 2003年3月26日 (26.03.2003) JP

規則4.17に規定する申立て:

— AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)の指定のための出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))
— USのみのための発明者である旨の申立て (規則4.17(iv))

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田食品工業株式会社 (TAKEDA FOOD PRODUCTS, LTD.) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町二丁目3番6号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 越塩 俊介 (KOSHIO, Shunsuke) [JP/JP]; 〒8910145 鹿児島県鹿児島市錦江台1丁目5番3号 Kagoshima (JP). 山本佳弘 (YAMAMOTO, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒6640002 兵庫県伊丹市荻野7丁目7-2 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番27号 桜橋千代田ビル5階 Osaka (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTISTRESS AGENT

(54) 発明の名称: 抗ストレス剤

(57) Abstract: An antistress agent for fishes and shellfishes characterized by containing dead lactic acid bacterium cells optionally having been processed. This antistress agent is useful in preventing or treating stresses in fishes and shellfishes.

(57) 要約: 本発明は、乳酸菌の死菌体又はその処理物を含有することを特徴とする魚介類用抗ストレス剤であり、この抗ストレス剤は、魚介類のストレスを予防又は治療するのに有用である。



WO 2004/084923 A1

明 細 書

抗ストレス剤

5 技術分野

本発明は、ストレスによる悪影響に対して魚介類に抵抗性を付与する抗ストレス剤に関する。本発明はまた、それを使用する養殖方法にも関する。

背景技術

- 10 従来、各種魚介類の養殖や観賞用水生動物の飼育を行なう場合、飼育育成環境の過密、温度の変化又は水質悪化、或いは輸送等のストレスによって、これら水生動物は体調を崩し、退色や変色、疾病に対する抵抗力の低下、摂餌の悪化、体格の貧弱化、肉質や脂乗りの低下等の弊害が生じることは知られている（特開平09-308440号公報）。このようなストレスによる弊害を下記
- 15 に例示する。

ブリの稚魚については、飼育水槽内に攻撃する個体（攻撃個体）と攻撃される個体（劣位個体）とがあり、劣位個体は強度のストレス状態におかれ、体重増加に支障がでる（平成8年度日本水産学会春季大会講演要旨集、p64、1996）。

- 20 アユについては、なわばりを持つことのできない非なわばり個体では、移動範囲が狭く、摂餌頻度が低いことから、なわばり個体と比較して成長率が低いとの報告（平成8年度日本水産学会春季大会講演要旨集、p43、1996）がある。ストレスのかかった劣位個体で、非なわばりアユと同様成長率が低くなると考えられる。

- 25 また、ヒラメのように神経質な魚では、選別のための池替えや池の掃除などの後には、そのストレスによって摂餌が悪くなる。トラフグでもヒラメと同様、

池替えの後には摂餌が悪くなる。

さらに、観賞魚は、ストレスによって皮膚が退色及び変色し、本来鮮やかな色彩が消失する。

これらの悪影響を防止するため、抗生物質等の薬剤が汎用された。しかしながら、抗生物質等の薬剤はある程度の効果はあるが、動物体内への残留、環境汚染等の安全性の問題や、耐性菌の出現による弊害があり、現在は薬剤の使用を差し控える方向に向かっている。また、抗生物質製剤以外に生菌剤も知られている。生菌剤としては、光合成細菌（P S B）、混合微生物（商品名「サイクル」：（株）スドー製、商品名「スーパーバイオ」：（株）トモフジ製）等が挙げられる。しかしながら、これら生菌剤の多くは、常温保存液体タイプであり、使用前の生菌保持率が概して悪い。そのため、使用に際しての生菌数が不十分であったり、使用環境条件が少しでも過酷になると効果が認められなかったりして、適性条件での使用が困難である場合が多く、目に見えて体質を改善し得るものは、未だ実用化に至っていないのが現状である。生菌である以上その生菌数の維持には、注意を払わなくてはならないから、その取り扱いが困難であり、工程管理が容易ではなかった。

発明の開示

本発明は、魚介類のストレスを有効に予防又は治療する製剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を達成するために鋭意検討した結果、乳酸菌の生菌体ではなく、予想外かつ驚くべきことに、乳酸菌の死菌体又はその処理物が魚介類用のストレスの予防又は治療に優れた効果を奏することを知見した。また、本発明者らは、乳酸菌の生菌体ではなく、有効成分として死菌体を使用する場合は、抗ストレス剤の製造に際して、有効成分が取り扱いやすく、工程管理が容易であり、製造された製剤中の有効成分が保存時並びに水中で安定性に富む

ことをも知見した。

すなわち、本発明は、

(1) 乳酸菌の死菌体又はその処理物を含有することを特徴とする魚介類用抗ストレス剤、

5 (2) 乳酸菌が、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチラス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラ
10 クトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、エンテロコッカス・フェーカリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・ファシウム (*Enterococcus faecium*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ラクトコ
15 カス・プランタラム (*Lactococcus plantarum*) 又はビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ブレービ (*Bifidobacterium breve*) である上記 (1) 記載の魚介類用抗ストレス剤、

20 (3) 乳酸菌の死菌体が乳酸菌の加熱処理により得られる死菌体であることを特徴とする上記 (1) 又は (2) に記載の魚介類用抗ストレス剤、

(4) 乳酸菌の死菌体がラクトバチルス・プランタラム L-137 株 (*Lactobacillus plantarum* L-137、受託番号 FERM BP-08607) の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
25 載の魚介類用抗ストレス剤、

(5) 魚介類が養殖魚類又は観賞魚類であることを特徴とする上記 (1)

- ～ (4) のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤、
- (6) 魚介類が、海水魚又は淡水魚であることを特徴とする上記 (1) ～ (5) のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤、
- (7) 魚介類が、仔稚魚であることを特徴とする上記 (1) ～ (6) のい
5 ずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤、
- (8) 乳酸菌の死菌体又はその処理物の配合割合が、全体量に対して 0.1～50 質量%であることを特徴とする上記 (1) ～ (7) のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤、
- (9) 上記 (1) ～ (8) のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤を含
10 有する魚介類用飼料、
- (10) 飼料中の乳酸菌の死菌体又はその処理物の濃度が、0 を超え 2000 ppm 以下であることを特徴とする上記 (9) 記載の魚介類用飼料、
- (11) 上記 (1) ～ (8) のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤を魚介類に給餌することを特徴とする魚介類のストレスの予防又は治療方法、
- 15 (12) 乳酸菌の死菌体又はその処理物を魚介類に魚介類体重 1 kg 当たり 1 日 0.0005～75 mg 給餌することを特徴とする魚介類のストレスの予防又は治療方法、
- (13) 上記 (1) ～ (8) のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤を使用することを特徴とする魚介類の血清コルチゾール上昇抑制方法、
- 20 (14) 上記 (1) 記載の魚介類用抗ストレス剤を使用することを特徴とする魚介類の養殖方法、
- (15) 魚介類の味質が改善される上記 (14) 記載の養殖方法、及び
- (16) 養殖魚介類の生残率が改善される上記 (14) 又は (15) に記載の養殖方法、
- 25 に関する。

発明を実施するための最良の形態

本発明において乳酸菌としては、公知の乳酸菌、例えば、ラクトバチルス属、
ストレプトコッカス属、エンテロコッカス属、ラクトコッカス属又はビフィズ
ス属する乳酸菌のいずれをも用いることができる。さらに詳しくは、ラクトバ
5 チルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチラス・アシド
フィラス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ブレビス
(*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、
ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチル
ス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチルス・ブフネリ
10 (*Lactobacillus buchneri*)、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobacillus*
delbrueckii)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ス
トレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、エンテロ
コッカス・フェーカリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・ファ
シウム (*Enterococcus faecium*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus*
15 *lactis*)、ラクトコッカス・プランタラム (*Lactococcus plantarum*) 又はビフ
イドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*)、ビフ
イドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリ
ウム・ブレービ (*Bifidobacterium breve*) などが挙げられる。これら各種乳
酸菌のうち、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) が
20 好ましい。

本発明に用いられるラクトバチルス・プランタラムに属する菌の代表的なも
のとしてラクトバチルス・プランタラム L-137 を挙げるができるが、
この菌は、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に、受託
番号 FERM BP-08607 号 (平成7年11月30日に寄託された FERM
25 RM P-15317 号より移管) として寄託されている。本発明で用いられ
るラクトバチルス・プランタラムには、さらにラクトバチルス・プランタラム

(*Lactobacillus plantarum*) JCM 1149 基準株およびラクトバチルス・プラントラムL-051 (微工研菌寄第11912号) が含まれる。ラクトバチルス・プラントラムL-137が最も好ましい。

上記の本発明に用いる菌は天然培地、合成培地、半合成培地などの培地に培養することにより得ることができる。培地としては、窒素源および炭素源を含有するものが用いられる。窒素源としてはたとえば、肉エキス、ペプトン、グルテン、カゼイン、酵母エキス、アミノ酸等であり、炭素源としては、たとえば、グルコース、キシロース、フラクトース、イノシトール、マルトース、水アメ、麴汁、澱粉、バカス、フスマ、糖蜜、グリセリン等が用いられる。このほか、無機質として、たとえば硫酸アンモニウム、リン酸カリウム、塩化マグネシウム、食塩、鉄、マンガン、モリブデンなどを添加することができ、更に各種ビタミン類その他を添加することができる。培養温度は約25~40℃、好ましくは約27~35℃であり、培養時間は約12~48時間程度であり、通気振盪してもよい。培地のpHは約3~6、好ましくは約4~6である。

培養終了後、菌体を採取した後、死菌体を調製してもよいし、又は菌体を培養液から一旦分離することなく、培養液中の菌体を死菌体にし、その死菌体を採取してもよい。菌体を採取する方法としては、例えば培養液に蒸留水を加え、遠心分離などの手段により上清を除き、必要によりその操作を繰り返し、遠心分離や濾過等により菌体を採取する方法がある。死菌体は、採取された生菌あるいは生菌を含んだ培養液ごと、たとえば加熱、紫外線照射、ホルマリン処理などにより不活性化することにより得られる。加熱処理により死菌体を得る場合、加熱温度は通常約60~100℃、好ましくは約70~90℃である。加熱手段としては、ヒーターを用いる公知の手段であってよい。加熱時間は所望の温度に達した後、通常約5~40分、好ましくは約10~30分である。死菌体の処理物は、例えば、死菌体を凍結乾燥や噴霧乾燥することによって得られる。また、死菌体にデキストリンやセルロースなどの適当な賦形剤を加えて、

これを凍結乾燥や噴霧乾燥することによっても得られる。死菌体の処理物はまた、死菌体の抽出物であってもよい。

本発明における魚介類としては、特に限定されず、淡水魚、海水魚、甲殻類のいずれであってもよく、また、養殖魚類、観賞魚類のいずれであってもよい。

- 5 淡水魚としては、ウナギ、コイ、ニジマス、アユ、ティラピア、フナ、金魚類（例えば、ランチュウ、和金、コメット、朱文金、オランダシシガシラ、出目金等）、グッピー、アピストグラマ、ディスカス等が挙げられ、海水魚としては、クロマグロ、ブリ、タイ、ギンザケ、マアジ、ヒラメ、カレイ、クロソイ、トラフグ、カンパチ等が挙げられる。また、淡水魚及び海水魚のいずれにも属
- 10 するものとして、サケ・マス類等が挙げられる。甲殻類としては、クルマエビ、ブラックタイガー、ウシエビ、コウライエビ、ガザミ等が挙げられる。

上記のような魚介類は、仔稚魚（小魚、子魚、稚魚、幼魚を含む）、成魚のいずれであってもよい。

- 本発明の抗ストレス剤は、乳酸菌の死菌体又はその処理物そのものであって
- 15 よいし、死菌体又はその処理物を賦形剤又は希釈剤と混合した製剤であってもよい。製剤全体に対する死菌体又はその処理物の配合割合は好ましくは約0.01～95質量%であり、より好ましくは約0.1～50質量%である。剤型としては、ペレット剤、錠剤、液剤、粉剤、粒剤、ペースト剤などが挙げられる。そのような製剤は魚介類に接触させたり、経口で与えることができる。

- 20 固状の賦形剤又は希釈剤としては、例えば、魚粉、骨粉、スキムミルク、綿実粕、小麦粉、小麦胚芽、米ぬか、ビール酵母、セルロース、ビタミン類（例えばβ-カロチン、ビタミンD₃、メナジオン-亜硫酸水素ナトリウム、α-トコフェロール、チアミン-硝酸塩、リボフラビン、ピリドキシン-塩酸塩、シアノコバラミン、ビオチン、イノシトール、ニコチン酸、パントテン酸カルシウム、葉酸、塩化コリン、パラアミノ安息香酸又はビタミンC等）、ミネラル
- 25 ルミックス類（例えば硫酸マグネシウム、リン酸2ナトリウム、リン酸2ナト

リウムカリウム、クエン酸鉄、乳酸カルシウム、水酸化アルミニウム、硫酸亜鉛、硫酸銅、硫酸マンガン、ヨウ素酸カルシウム又は硫酸コバルト等) などのいわゆる飼料原料が挙げられる。液状の賦形剤又は希釈剤としては、水あるいは水とアルコールとの混合物などが挙げられる。本発明の抗ストレス剤は、ラ

5 クトバチルス・プランタムの死菌体又はその処理物を上記した賦形剤又は希釈剤と混合することによって容易に製造できる。混合に際して、所望により加熱し、フレーク状製剤を得ることもできる。このようにして製造された本発明の製剤は、魚介類用の飼料として使用されてよい。飼料として使用される場合、飼料中の死菌体又はその処理物の濃度は、好ましくは約0 ppmを超え200

10 0 ppm以下であり、より好ましくは約0.1~200 ppmである。

本発明の魚介類用抗ストレス剤の給餌量は、上記乳酸菌の死菌体又はその処理物に換算して、魚介類の体重1 kg当たり1日0.0005~75 mgであるのが好ましく、0.005~7.5 mgであるのがより好ましい。

本発明製剤の魚介類に対する抗ストレス作用のメカニズムは、その一つとして、血清コルチゾール上昇抑制によるものが考えられる。ストレスを受けた場合、まずストレスに対して神経・内分泌系が反応し、神経伝達物質やホルモンを分泌する。分泌された神経伝達物質やホルモンの持つ生理作用によって体内で生理的な変化が起こり、その生理的変化に伴い、成長の阻害、生殖機能低下及び病気に対する抵抗性の低下が生じ得る。これらストレスの影響は、神経伝

15 達物質、ホルモンなどいろいろな物質の統合による結果であるが、その主役を演じているのはコルチゾールであるといわれている(養殖 2001.No.11、56-59)。ゆえに、前述したようなストレスによる悪影響に抵抗するためには、コルチゾールの上昇を抑制することによって可能である。

20

本発明の魚介類用抗ストレス剤は、魚介類のコルチゾールの上昇を抑制する

25 作用があり、魚介類に投与すると魚介類のストレスを有効に予防又は治療することができる。この結果、魚介類の体重が増加し、魚介類の成長が増進され、

生存率がアップし、魚介類の味質（例えば食感、風味等）が改善される。

実施例 1

5 [ラクトバチルス・プランタラム L-137 株 (Lactobacillus plantarum L-137) の死菌体を含むペレット剤の製造]

(菌の培養)

グルコース 1%、酵母エキス 1%、ポリペプトン 0.5%、肉エキス 0.2%、酢酸ナトリウム 0.2%、硫酸マンガン・4水和物 0.001%、硫酸鉄・7水和物 0.001%、食塩 0.001%、シヨ糖脂肪酸エステル 0.05% 含む培地 6 L にラクトバチルス・プランタラム L-137 (受託番号 FERM BP-08607) 株を接種し、32℃で24時間培養した。培養後、培養液を 5000 rpm で 35 分間遠心分離し菌体を集めた。得られた菌体を生理食塩水によく分散し、5000 rpm で 35 分間遠心分離した後、上清を除き、菌体を集めた。この操作を 3 回繰り返した後、菌体をイオン交換水に分散し、15 70℃10分間加熱した後、凍結乾燥することにより加熱死菌体を約 7 g 得た。

(死菌体からペレット剤の製造)

ブラウンフィッシュミール 65.6 質量部、 α -スターチ 3.4 質量部、デキストリン 3.4 質量部、ダイズレシチン 4.2 質量部、メナジオン一亜硫酸水素ナトリウム 0.01428 質量部、チアミン一硝酸塩 0.01797 質量部、リボフラビン 0.05981 質量部、ピリドキシン一塩酸塩 0.01428 質量部、シアノコバラミン 0.00002 質量部、セルロース 0.59869 質量部、ビオチン 0.00181 質量部、イノシトール 1.19769 質量部、ニコチン酸 0.23954 質量部、パントテン酸カルシウム 0.08386 質量部、葉酸 0.0045 質量部、塩化コリン 2.44855 質量部、パラ25 アミノ安息香酸 0.11929 質量部、ビタミン C 0.04681 質量部、ミネラルミックス 4.3 質量部、イノシン酸 0.1 質量部、ペタイン 0.6 質量

- 部、アラニン0.4質量部及び活性化グルテン5.0質量部からなる飼料原料をよく混合し、キッチンエンドで10分間混合した。これに、ビタミン含有鱈肝油（鱈肝油7質量部に、 β -カロチン0.02996質量部、ビタミンD₃0.00301質量部、 α -トコフェロール0.11993質量部を加え、超音波洗浄機を用いて混合したもの）を加えた。これに、ラクトバチルス・プラ
- 5 ンタラムL-137加熱死菌体を所定濃度となるように加えた後、 α -セルロースを加え、全量を100質量部に調整して死菌体含有飼料とした。加熱死菌体の添加濃度は、死菌体含有飼料中、それぞれ0、0.2、2、20、200 ppmの5水準とした。
- 10 上記で得られた死菌体含有飼料に水を該飼料に対して40質量%となるように加え10分間混ぜ合わせた。得られた混合物をチョッパーで2回ひき、直径1.2mmのペレット状飼料を作製した。それをオーブンで乾燥させ、水分含量が全体の10%以下にしたものを試験飼料とした。なお、上記ミネラルミックスの組成を下記第1表に示す。

第1表

| ミネラルミックスの組成 | 質量比 |
|---------------|---------|
| 硫酸マグネシウム | 734.78 |
| リン酸2ナトリウム | 467.77 |
| リン酸2ナトリウムカリウム | 1291.73 |
| クエン酸鉄 | 27.08 |
| 乳酸カルシウム | 1754.10 |
| 水酸化アルミニウム | 0.34 |
| 硫酸亜鉛 | 18.56 |
| 硫酸銅 | 0.54 |
| 硫酸マンガン | 4.29 |
| ヨウ素酸カルシウム | 0.80 |
| 硫酸コバルト | 5.36 |

マダイ稚魚（体重：0.9±0.1g）を、循環式30L円形ポリカーボネートタンクに15尾ずつ収容し、これを各試験飼料当たり3タンクずつセットし、試験飼料を朝夕の一日二回、体重の5～7%を与え、換水率2.4L/分、水温20.0℃で飼育した。30日間飼育後、尾部毛細血管から血液を採取した。この血液から血清を調整した後、血清中のコルチゾール量をELISA法で測定した。結果を第2表に示した。

第2表

| L-137株の加熱死菌体の飼料中濃度 (ppm) | 血清コルチゾール濃度 (ng/ml) |
|-----------------------------|-----------------------|
| 0 | 3.32 |
| 0.2 | 0.24 |
| 2.0 | 0.41 |
| 20 | 0.36 |
| 200 | 0.28 |

第2表からわかるように、ラクトバチルス・プランタラムL-137株 (Lactobacillus plantarum L-137) の加熱死菌体を0.2ppm以上含有した飼料を与えた試験群では、該加熱死菌体を含有しない飼料を与えた対照群に比べ、マダイ血清中のコルチゾールが著しく低値であった。

実施例2

1. 死菌体処理物の製造

10 マルトース4%、ポリヘプトン2%、酵母エキス2%、酢酸ナトリウム0.5%、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート0.05%、硫酸マンガン0.002%を含有する培地にて、ラクトバチルス・プランタラムL-137 (Lactobacillus plantarum L-137) を32℃で24時間培養し、培養液を80℃で20分間加熱処理した。その後、加水しながら濾過濃縮装置
15 にて培養液を洗浄・濃縮し、加熱死菌体溶液を得た。得られた加熱死菌体溶液にデキストリンを加え、噴霧乾燥し、加熱死菌体を18%含む死菌体処理物を得た。

2. ペレット剤の製造

100g当たり、ブラウンフィッシュミール65.6g、 α -スターチ5.

8 g、デキストリン3.4 g、タラ肝油5.2 g、大豆レシチン2.0 g、高度不飽和脂肪酸1.0 g、ビタミンミックス3.0 g、ミネラルミックス3.0 g、ベタイン0.5 g、アラニン0.5 g、カルボキシメルセルロースナトリウム塩5.0 g、上記1で作製した死菌体処理物を0.01 g（菌体含量として約0.0018 g）及び α -セルロース4.99 g含有する混合物に水道水を適量加えさらによく混合し、ペレッターにて、直径2.5 mmの飼料を作製した。得られた飼料を50℃に設定したオーブン中で水分含量が10%になるまで乾燥させ、これを試験飼料とした。また、死菌体処理物を α -セルロースに置き換えて用いたこと以外、上記試験飼料を製造する方法と同様の方法で対照飼料を調製した。

なお、ビタミンミックスの組成を第3表に示し、ミネラルミックスの組成を第4表に示した。

第3表

ビタミンミックス3gあたりに含有するビタミン(mg)

| | |
|-----------------------------|--------|
| β-カロチン | 9.63 |
| ビタミンD ₃ | 0.97 |
| メナジオン-亜硫酸水素ナトリウム | 4.58 |
| α-トコフェロール | 38.5 |
| チアミン-硝酸塩 | 5.78 |
| リボフラビン | 19.24 |
| ピリドキシン-塩酸塩 | 4.58 |
| シアノコバラミン | 0.01 |
| セルロース | 192.45 |
| ビオチン | 0.58 |
| イノシトール | 384.92 |
| ニコチン酸 | 76.97 |
| パントテン酸カルシウム | 26.95 |
| 葉酸 | 1.44 |
| 塩化コリン | 786.93 |
| パラアミノ安息香酸 | 38.33 |
| アスコルビン酸-2-リン酸エステルナトリウムカルシウム | 28.57 |

第4表

ミネラルミックス 3 g 当たり含有するミネラル(mg)

| | |
|-----------------|--------|
| 食塩 | 107.79 |
| 硫酸マグネシウム・7水和物 | 380.03 |
| リン酸1ナトリウム2水和物 | 241.91 |
| リン酸2カリウム | 665.2 |
| リン酸2水素カルシウム2水和物 | 376.7 |
| クエン酸鉄 | 82.38 |
| 乳酸カルシウム | 907.1 |
| 水酸化アルミニウム | 0.52 |
| 硫酸亜鉛 | 9.9 |
| 硫酸銅 | 0.28 |
| 硫酸マンガン | 2.22 |
| ヨウ素酸カルシウム | 0.42 |
| 硫酸コバルト | 2.77 |

4 5 L水槽中にヒラメ稚魚（体重：2～3.5 g）を5匹ずつ収容し、1週
 5 間飼育した。飼育に際し、対照群（水槽数=2）には、対照飼料を与え、試験
 群（水槽数=2）には、ラクトバチルス・プランタラムL-137株加熱死菌
 体量に換算して、0.036 mg/kg/日になるように試験飼料を与えた。

飼育後、ヒラメ稚魚を室温20℃、湿度70%の室内で、空気中に20分間
 露出することにより、ストレスを負荷した後、回復水槽（1 L）に移し、安定
 10 状態（稚魚が正常に泳ぐ状態）に回復するまでの時間を測定した。

その結果、対照群での回復時間は平均26.2分であったのに対し、試験群
 （ラクトバチルス・プランタラムL-137株加熱死菌体摂取群）での回復時

間は平均18.9分であった。このことから、ラクトバチルス・プランタラムL-137株加熱死菌体を給餌することにより、回復時間が著しく短縮され、稚魚のストレスに対する抵抗性が高まったことがわかる。

5 実施例3

100g当たり、ブラウンフィッシュミール70g、 α -スターチ3.8g、デキストリン3.5g、タラ肝油5.7g、ビタミンミックス3.0g、ミネラルミックス3.0g、ベタイン0.5g、アラニン0.5g、カルボキシメ
10 01g（菌体含量として0.0018g）及び α -セルロース4.99g含有する混合物に水道水を適量加えさらによく混合し、ペレットにて、直径3.5mm飼料を作製した。得られた飼料を50℃に設定したオーブン中で水分含
15 量が10%になるまで乾燥させ、これを試験飼料とした。また、死菌体処理物を α -セルロースに置き換えて用いたこと以外、上記試験飼料を製造する方法と同様の方法で対照飼料を調製した。

なお、ミネラルミックスおよびビタミンミックスについては、それぞれ実施例2と同様のものを用いた。

カンパチ稚魚（体重：300～600g）を1トン水槽に7匹ずつ収容して1週間飼育した。飼育の際に、対照群（水槽数=2）には、対照飼料を、試験
20 群（水槽数=2）には、ラクトバチルス・プランタラムL-137株加熱死菌体量に換算して0.036mg/kg/日になるように試験飼料を与えた。

飼育後、各水槽から無作為に3匹ずつ取り出し、刺身にした。この刺身の味質（食感、外観及び風味）を15人のパネラーで評価した。結果を第5表に示す。

第5表

| | 試験群の方がよい | どちらともいえない | 対照群の方がよい |
|---------|----------|-----------|----------|
| 食感 | 12 | 0 | 3 |
| 外観 | 2 | 10 | 3 |
| 風味 | 8 | 3 | 4 |
| 総合評価(※) | 10 | 2 | 2 |

※ 1名無回答

外観に関しては、両群に差は認められないが、食感、風味、並びに食感、外観及び風味を総合的に判断した総合評価に関しては、試験群の方が圧倒的に好まれることが示された。特に食感に関しては、試験群の方が弾力があり、おいしいとの評価が多く、また、試験群の方がコリコリ感があり、おいしいとの評価も多かった。風味に関しても、試験群の方が生臭みがないといった評価が多かった。

カンパチのような回遊性の魚を水槽内で密集して飼育するとストレス負荷は強くなり、味質の低下が予想される。しかしながら、ラクトバチルス・プラ
 ンタラムL-137加熱死菌体を摂取させた場合、摂取時間が1週間でも味質を大きく改善することが可能であることが示された。このことから、短期間の魚介類の飼育（活け魚料理店等の生け簀での飼育あるいは養殖魚介類等を出荷する前の飼育等）において、魚介類の味質を改善できることがわかる。

15

産業上の利用可能性

本発明の抗ストレス剤は、魚介類のストレスを有効に予防又は治療することができる。

請 求 の 範 囲

1. 乳酸菌の死菌体又はその処理物を含有することを特徴とする魚介類用抗ストレス剤。

5

2. 乳酸菌が、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチラス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・ファーメントム (*Lactobacillus fermentum*)、
10 ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ラクトバチルス・デルブルッキー (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、エンテロコッカス・フェーカリス
15 (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・ファシウム (*Enterococcus faecium*)、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ラクトコッカス・プランタラム (*Lactococcus plantarum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) 又はビフィドバクテリウム・ブレービ
20 (*Bifidobacterium breve*) であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の魚介類用抗ストレス剤。

3. 乳酸菌の死菌体が乳酸菌の加熱処理により得られる死菌体であることを特徴とする請求の範囲第1項又は第2項に記載の魚介類用抗ストレス剤。

25

4. 乳酸菌の死菌体がラクトバチルス・プランタラム L-137 株

(*Lactobacillus plantarum* L-137、受託番号FERM BP-08607)の加熱処理死菌体であることを特徴とする請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤。

5 5. 魚介類が養殖魚類又は観賞魚類であることを特徴とする請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤。

6. 魚介類が、海水魚又は淡水魚であることを特徴とする請求の範囲第1項～第5項のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤。

10

7. 魚介類が、仔稚魚であることを特徴とする請求の範囲第1項～第6項のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤。

8. 乳酸菌の死菌体又はその処理物の配合割合が、全体量に対して0.01
15 ～95質量%であることを特徴とする請求の範囲第1項～第7項のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤。

9. 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤を含有する魚介類用飼料。

20

10. 飼料中の乳酸菌の死菌体又はその処理物の濃度が、0を超え2000 ppm以下であることを特徴とする請求の範囲第9項に記載の魚介類用飼料。

11. 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤
25 を魚介類に給餌することを特徴とする魚介類のストレスの予防又は治療方法、

1 2. 乳酸菌の死菌体又はその処理物を魚介類に魚介類の体重1kg当たり1日0.0005～75mg給餌することを特徴とする魚介類のストレスの予防又は治療方法。

5 1 3. 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の魚介類用抗ストレス剤を使用することを特徴とする魚介類の血清コルチゾール上昇抑制方法。

1 4. 請求の範囲第1項に記載の魚介類用抗ストレス剤を使用することを特徴とする魚介類の養殖方法。

10

1 5. 魚介類の味質が改善される請求の範囲第14項に記載の養殖方法。

1 6. 養殖魚介類の生残率が改善される請求の範囲第14項又は第15項に記載の養殖方法。

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/74, A61P25/00, A23K1/16, A23K1/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/74, A61P25/00, A23K1/16, A23K1/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X Y | JP 2002-80364 A (Takeda Food Products, Ltd.), 19 March, 2002 (19.03.02), Full text; Claims; page 3, column 4, line 48; page 4, column 5, lines 17 to 18; examples (Family: none) | 1-16 13 |
| X Y | JP 11-92390 A (Zenkoku Nogyo Kyodo Kumiai Rengokai), 06 April, 1999 (06.04.99), Full text; Par. Nos. [0008], [0017] & EP 892081 A2 & DE 19730993 A1 & US 6056826 A | 1-3, 5-16 1-16 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 June, 2004 (04.06.04)

Date of mailing of the international search report

13 July, 2004 (13.07.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003898

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | JP 9-308440 A (Shimadzu Corp.), 02 December, 1997 (02.12.97), Full text; Par. Nos. [0009], [0017] to [0021] (Family: none) | 1-16 |
| Y | Takatsugu IIDA, 'Sakana no Stress to Seitai Bogyo Kassei', Yoshoku, (2001), Vol.38, No.11, pages 57 to 59, Full text; particularly, the 21st line from the right, the lowest paragraph on page 58 to the 2nd line from the right, the 2nd column of page 59 | 13 |

| | | |
|--|---|------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁷ A61K35/74, A61P25/00, A23K1/16, A23K1/18 | | |
| B. 調査を行った分野 | | |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁷ A61K35/74, A61P25/00, A23K1/16, A23K1/18 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) | | |
| CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | JP 2002-80364 A (武田食品工業株式会社) 2002.03.19 文献全体、特許請求の範囲、p.3第4欄第48行、p.4第5欄第17-18行、実施例 (ファミリーなし) | 1-16 |
| Y | | 13 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 | 04.06.2004 | 国際調査報告の発送日 |
| | | 13.7.2004 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 | 特許庁審査官 (権限のある職員) | 4C 8828 |
| 日本国特許庁 (ISA/JP) | 大久保元浩 | |
| 郵便番号100-8915 | 電話番号 03-3581-1101 | 内線 3452 |
| 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | JP 11-92390 A (全国農業協同組合連合会) 1999.04.06 文献全 体、【0008】、【0017】 & EP 892081 A2 & DE 19730993 A1 | 1-3, 5-16 |
| Y | & US 6056826 A | 1-16 |
| Y | JP 9-308440 A (株式会社島津製作所) 1997.12.02 文献全体、 【0009】、【0017】 - 【0021】 (ファミリーなし) | 1-16 |
| Y | 飯田貴次 ‘魚のストレスと生体防御活性’ 養殖, (2001) vol. 3 8 no.11 p.57-59 文献全体、特にp.58最下段右から第21行-p. 59第2欄右から第2行 | 13 |