

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年8月13日(13.08.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/161801 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 61/10 (2017.01) *A01K 63/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/004067
- (22) 国際出願日: 2019年2月5日(05.02.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 久木野 憲司 (KUGINO Kenji) [JP/JP]; 〒8500931 長崎県長崎市南山手町 8 番 6 4 号 Nagasaki (JP).
- (72) 発明者: 久木野 睦子 (KUGINO Mutsuko); 〒8500931 長崎県長崎市南山手町 8 番 6 4 号 Nagasaki (JP).
- (74) 代理人: 有吉 修一郎, 外 (ARIYOSHI Shuichiro et al.); 〒8100001 福岡県福岡市中央区天神 1 丁目 6 番 8 号 天神ツインビル 6 階 Fukuoka (JP).
- (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:
一 発明者である旨の申立て (規則 4.17(iv))
- 添付公開書類:
一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR CARRYING OUT EXTENDED-PERIOD DEEP SEDATION/ANESTHESIA OF FISH AND SHELLFISH USING NITROUS OXIDE, AND FOR AWAKENING SAID FISH AND SHELLFISH

(54) 発明の名称: 魚介類を対象とした亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる方法および装置

(57) Abstract: [Problem] To carry out extended-period anesthesia of fish and shellfish in a safe, practical, and simple manner, in an underwater environment containing a prescribed concentration of nitrous oxide exhibiting an anesthetic effect. [Solution] Bringing fine bubbles containing oxygen gas into contact with the surface of a gill epithelium cellular membrane of fish and shellfish generates a [oxygen gas partial pressure] - [partial pressure of dissolved oxygen in gill capillary blood vessel] partial pressure difference that exceeds a [partial pressure of in-water dissolved oxygen] - [partial pressure of dissolved oxygen in gill capillary blood vessel] partial pressure difference, and the foregoing significantly increase the amount of oxygen captured in the thin capillary blood vessels of the gill. This configuration prevents respiratory failure that could occur in a state where spontaneous respiration is suppressed by anesthesia, making it possible to conduct extended-period nitrous oxide sedation at a water temperature normally selected for handling fish and shellfish (around 20°C).

(57) 要約: 【課題】麻酔効果を発揮する所定濃度の亜酸化窒素を含む水中環境下において安全かつ実用的な簡便さをもって魚介類に長時間の麻酔を施す。【解決手段】気体酸素を含む微細気泡を魚介類の鰓上皮細胞膜表面に接触させることで、[水中溶存酸素分圧] - [鰓の毛細血管内容存酸素分圧] の分圧差を超えた [気体酸素分圧] - [鰓の毛細血管内容存酸素分圧] の分圧差を生み出し、鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量を顕著に増加させる。これにより麻酔によって抑制された自発呼吸運動下において発生する呼吸不全を回避し、通常魚介類を取り扱う水温(20°C前後)下での長時間亜酸化窒素麻酔を可能にした。

WO 2020/161801 A1

明 細 書

発明の名称：

魚介類を対象とした亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる方法および装置

技術分野

[0001] 本発明は、魚介類に、游泳移動や体動の抑制を伴った強度の鎮静（以下、強度鎮静という）効果、ないし麻酔効果を奏する所定濃度の亜酸化窒素（一酸化二窒素）を含む水中において気体酸素を含む微細気泡で魚介類に酸素を供給することにより、長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる方法および装置に関する。

背景技術

[0002] 従来、活魚を取り扱う養殖現場などでは、疾病予防のためのワクチン接種、トラフグの噛み合い防止のための歯切りなど様々な場面において、魚体の損傷及び消耗を防止するために作業中の魚を完全に沈静化する必要から麻酔薬などが使用されている。

[0003] 一例として、食品添加物の一種であるオイゲノール（4-アリル-2-メトキシフェノール）を主成分とする麻酔薬は動物用医薬品として承認を受けて販売されており（商品名：F A 1 0 0）、魚の麻酔薬に使用されている。しかし、麻酔薬を養殖現場などで用いた場合、使用済み麻酔液はそのまま海洋や河川に投棄されるため環境保全の観点から好ましくない。

[0004] また、食の安全に対する消費者の関心の高まりに伴って養殖魚の体内に残留する虞のある麻酔薬の使用が敬遠されるようになってきたこと、また日本の農林水産省は魚介類を水揚げする前の7日間は麻酔薬の使用を禁止する指導を行うなど、魚介類の沈静化のために麻酔薬を使用できる場面は狭まってきた。

[0005] オイゲノールなどの化学物質からなる麻酔薬を用いない魚の短時間麻酔方法としては、水中に溶存させた二酸化炭素による短時間麻酔技術が従来から

知られている。また、最近では、炭酸水素ナトリウムとコハク酸と固形化促進剤を主原料とし、食品添加物として公認されている原料のみで作った固形状炭酸ガス発泡剤からなる魚類用の麻酔剤が開発され（特許文献1参照）、短時間麻酔剤として使用されている。活魚の長時間麻酔状態を維持する技術として、特許文献2には、魚の冷温処理と併用して炭酸ガス分圧を55～95 mmHgに調節した水槽中で活魚を長時間麻酔状態に維持する方法が開示されているが、魚介類の斃死を回避して無事に覚醒させることに成功した実際の使用例は見当たらない。

[0006] 活魚を長時間にわたって麻酔状態に維持できる実用的な方法としては、唯一、二酸化炭素を用いた方法が開示されている（特許文献3）。しかしながら、二酸化炭素は多くの生物種に対して麻酔効果を有する物質である一方、中枢神経系への鎮静効果はあまり期待できないことから、魚介類を対象として用いた場合には、適応魚種によっては麻酔導入時の神経興奮が過大となって著しい体動を惹起し、円滑な麻酔導入が困難となる場合もある。また、個体の健康状態が異なる多くの魚体を同一条件で同時に麻酔することは、どのような麻酔剤を用いたとしても、事実上困難であり、多くの魚体を一度に麻酔するためには事前に魚体の状態を均一化するための馴化処理を全魚に行うことができる馴化水槽と環境（温度、光、音など）制御された施設が必要となる。

[0007] 大量の魚体を処理する方法として最も普及しているのは水温を下げることで活魚をある程度沈静化する方法である。魚体を麻酔して完全に不動化することはできないものの、多くの魚体を同時に沈静化することが可能であり、比較的簡便な活魚の沈静化方法として冷却水槽を備えた活魚車による活魚輸送などに利用されている。また、特許文献4には、活イカを氷温状態の低温状態に保管運搬するための氷温海水冷却装置なども開示されている。しかしながら、水温を下げて魚を輸送するには冷却装置を備えた特殊車両設備が必要となりため輸送費用の負担が大きく、また、魚類毎に異なる低温生理特性の不確実性に起因した輸送中の斃死リスクが避けられないことから、低温沈

静化に変わるより実用的な活魚の沈静技術あるいは鎮静・麻酔技術の開発が期待されている。

[0008] 短時間に限って麻酔効果を期待するのであれば、これまでいくつかの方法が開示されている。その一つである亜酸化窒素は魚介類を短時間麻酔ないし強度鎮静化を施すのに有効な物質であることが知られているが、長時間にわたって魚介類に強度鎮静化ないし麻酔を施すと斃死を招くことも周知の事実となっている。亜酸化窒素の麻酔効果は二酸化炭素に及ばないものの多くの生物種に温和な鎮静効果を奏するという特徴を持っていることから、二酸化炭素による麻酔の際に亜酸化窒素を鎮静剤として併用する方法も提案されている（特許文献5参照）。しかし、このような従来の亜酸化窒素によって魚類に長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施した場合には、数分から十数分の限られた時間内で魚介類は斃死する。

[0009] 鎮静効果ないし麻酔効果を有する特定物質の生物に対する生理的作用は、それぞれの物質毎に特有のメカニズムによって発現される。ヒトに処方される各種麻酔剤の適用例で明らかのように、個々の麻酔剤がヒトの中樞神経系に与える影響は一様ではなく、それぞれ特有のメカニズムによって鎮静効果および麻酔効果が発現される。そのため、呼吸不全を始めとする合併症を回避して鎮静効果ないし麻酔効果を発現・消失させる方法（麻酔処方）は個々の麻酔剤や鎮静剤毎に開発され利用されている。

[0010] 亜酸化窒素は鎮静効果に優れた物質であることが知られており、鎮静効果の強弱も投与濃度によって容易に調整できるため、多くの魚体を、馴化処理を経ずに鎮静下するのに適した物質であると言える。一方で、魚類に強度鎮静化ないし麻酔を施した後に、合併症を回避して覚醒させることは容易ではない次のような特徴を有している。例えば、高濃度（50～70%）の亜酸化窒素をヒトに吸入させて強度鎮静化ないし麻酔を施した後に覚醒させる場合、体内に相当量の亜酸化窒素が残留しているため、亜酸化窒素の投与を中止した後も（吸気ガスの亜酸化窒素濃度はゼロとなっても）体内の亜酸化窒素ガスが肺胞内に急速に拡散して呼気に排出され続ける。この肺胞内に遊出して

きた亜酸化窒素は「肺胞低換気」を惹起することから、亜酸化窒素吸入停止後の覚醒には、通常の空気環境のおよそ5倍の酸素濃度となる、100%酸素の投与を持続させる必要がある。

[0011] すなわち、亜酸化窒素は、その効果が消失して覚醒するまでの間、低下した「肺胞低換気」を補完するために高濃度酸素の供給が必要な鎮静ないし麻酔効果物質である。ヒトの手術に用いられている多くの麻酔剤は、併用した筋弛緩剤・鎮静剤・オピオイド系沈痛薬の作用で肺胞換気量が低下することはあっても、それ自体に覚醒時の「肺胞低換気」を惹起する効果は低く、投与中止後に覚醒を待つ間に高濃度酸素の供給が必ずしも必要ではない。また、魚介類を対象として二酸化炭素を用いて麻酔した際にも、二酸化炭素の投与を中止して覚醒させる際に高濃度酸素の供給は必ずしも必要ではない。魚介類を対象として亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、また、正常に覚醒させるためには、水中に高濃度酸素を供給し続ける方法（麻酔処方）が不可欠であり、そのための装置を必要とする。

[0012] 亜酸化窒素を用いて魚介類を対象に強度鎮静化ないし麻酔を施すには、水中への高濃度酸素の供給方法が欠かせないが、従来のブローを用いた水中への酸素供給では必要な高濃度酸素の供給を果たせないことから、現在までのところ、魚介類を対象として長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施す方法として亜酸化窒素を利用することは不可能となっている。

[0013] 亜酸化窒素は陸生生物にも水生生物にも緩慢な濃度依存的鎮静効果を持ち、時には麻酔効果を発揮する場合もあることから、多くの魚種を対象として鎮静効果ないし麻酔効果を期待することができる。亜酸化窒素は二酸化炭素よりも麻酔効果は弱いものの、鎮静効果に優れているため、軽度の麻酔ないしそれに準じた鎮静化を多数の魚体に簡便に施すには好適な物質である。また、食品添加剤でもある亜酸化窒素は何らの有害物質も魚体内に残さないという点で食品素材となる生物を対象とした鎮静方法ないし麻酔方法としては理想的である。さらに、亜酸化窒素は二酸化炭素に比べて、より水に溶けやすく、また、鎮静効果を発揮する濃度範囲が広いために魚の種類に応じて任

意に鎮静効果を惹起する濃度設定が容易である。

しかしながら、水生生物に対して長時間の強度鎮静効果あるいは麻酔効果を得ようとするとは例外なく頓死を引き起こすことから、活魚を対象とした長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施す方法としては利用することはできなかった。

[0014] 魚介類に関わる事業者の一般的な認識として、魚介類への酸素供給は溶存酸素（DO）が飽和ないしそれに近い状態が保持されていることで十分であり、強度鎮静状態ないし麻酔下においてさえ飽和溶存酸素環境にあれば酸素欠乏はないと信じられている。しかしながら、この認識は誤りであり、「いかなる麻酔薬を用いても魚介類には長時間の麻酔を施すことはできない」という間違った科学知識が長年にわたって信じられてきた原因ともなっていた。もちろん、亜酸化窒素を用いても、魚介類に長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施すことは不可能であると考えられてきた。

[0015] 魚介類を取り扱う水温（20℃前後）下において亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を魚介類（鰓呼吸をする水生生物）に施した場合、魚体が完全に沈静化するとともに強度鎮静効果ないし麻酔効果により抑制された鰓呼吸器運動のために、[水中溶存酸素分圧]－[鰓の毛細血管内容存酸素分圧]間で行われる酸素の拡散移動速度は減少し、鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量は低下する。強度鎮静化ないし麻酔効果が魚体に発現した場合、仮に魚体が飽和溶存酸素の水中に置かれていた場合であっても、鰓から吸収される酸素量が個体の酸素需要量を満たすことができない状態に陥るため、呼吸不全を回避するためには鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量を増やす必要があるが、そのためには飽和溶存酸素環境を大きく越えた高濃度の酸素供給を行って抑制された呼吸運動を補完する必要がある。高濃度の酸素供給によって初めて長時間の強度鎮静化ないし麻酔を魚介類（鰓呼吸をする水生生物）に施すことが可能となるのである。

[0016] 高濃度の酸素供給が必要である状況は魚介類に亜酸化窒素を供給している間のみならず、亜酸化窒素の供給を止めて覚醒を待っている時間、すなわち

体内に残留する相当量の亜酸化窒素が呼気として鰓の毛細血管から排出されて低換気を惹起する間も持続する。そのため、亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を魚介類（鰓呼吸をする水生生物）に施すためには亜酸化窒素供給時から魚介類が完全に覚醒するまでの間、高濃度の酸素供給を続ける必要がある。

[0017] 従来のエアレーションによって飽和溶存酸素とした水中に魚介類を入れて、亜酸化窒素を用いて強度鎮静化ないし麻酔を実際に施した場合、短時間内に全個体が呼吸を停止して例外なく斃死する。多くの魚介類が生息する海域の溶存酸素環境は、概ね飽和溶存酸素状態に近い。生息する環境の酸素濃度を保持するだけでは麻酔下に呼吸運動が抑制された状態の魚介類は酸素欠乏を免れない。そうすると、亜酸化窒素を作用させて長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施した魚介類に十分な酸素を供給するためには生息環境である飽和溶存酸素濃度を大きく超えた酸素環境を提供する必要がある。

[0018] 通常の魚介類を取り扱う水温（20℃前後）下において二酸化炭素による麻酔を魚介類に施した場合の例を見ると、たとえ十分な濃度の溶存酸素を含む麻酔用炭酸水を予め製造してから一定濃度の溶存炭酸ガスおよび溶存酸素を含む新鮮な麻酔用炭酸水を常時麻酔用水槽に供給する装置を用いたとしても、最長で20分間程度の短時間麻酔が可能となるだけである。麻酔下においては、飽和溶存酸素の水中にあっても鰓から吸収される酸素量は魚介類の個体の酸素需要量を満たすことができないため、分単位のごく短時間で魚介類は呼吸不全を起こし、例外なく斃死する。

先行技術文献

特許文献

- [0019] 特許文献1：特許第4831409号公報
特許文献2：特許第4951736号公報
特許文献3：特開2014-39514号公報
特許文献4：韓国特許第10-0531728号公報
特許文献5：特開昭61-104730号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0020] 本発明は、従来の麻酔方法における前述した諸課題を解決すべくなされたものである。すなわち、魚介類に強度鎮静効果ないし麻酔効果を奏する所定濃度の亜酸化窒素を含む水中環境下において、状態の異なる魚介類を馴化処理することなく安全かつ実用的な簡便さをもって、多数の魚介類を同時に長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる方法および装置を提供するものである。

課題を解決するための手段

[0021] 本発明における長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施す原理は次のとおりである。通常水温（20℃前後）下において魚介類に対して亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を惹起するためには、飽和溶存酸素を超える高酸素水中環境を魚介類に提供しなければならない。亜酸化窒素の強度鎮静効果ないし麻酔効果により低下した呼吸運動は、鰓部における〔水中溶存酸素分圧〕－〔鰓の毛細血管内溶存酸素分圧〕の分圧差による酸素拡散を減少させ、鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量が低下することで低酸素血症を引き起こして斃死を招く。これを防ぐには鰓部における酸素拡散を顕著に増加させる方法が必要であり、そのための新たな方法として、気体酸素を含む微細な気泡によって魚介類に酸素供給を行う方法を考案した。すなわち、気体酸素を含む微細な気泡を水中に供給することで溶存酸素を持続的に過飽和状態にするとともに微細気泡自体を鰓部に接触させることで、〔水中溶存酸素分圧〕－〔鰓の毛細血管内溶存酸素分圧〕の分圧差を超えた〔気体酸素分圧〕－〔鰓の毛細血管内溶存酸素分圧〕の分圧差を生み出し、鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量を顕著に増加させる方法である。

[0022] 本発明の第一の態様は、対象となる魚介類に対して強度鎮静効果ないし麻酔効果を奏する所定濃度の亜酸化窒素を水中に生成する工程と、粒径が略100μm以下の気体酸素を含む微細気泡を供給する工程と、水中に気体酸素を通気させ、水中の前記亜酸化窒素濃度を下げて魚介類を鎮静状態ないし麻

酔状態から覚醒する工程とを備える。

[0023] 酸素を含む微細気泡は水流によって魚介類の鰓上皮細胞膜表面に接触させるように供給するのが望ましい。

[0024] 酸素を含む微細気泡の粒径は100 μ m以下であることが望ましい。また酸素を含む微細気泡を4000万個/m^l以上の密度で供給することが望ましい。

[0025] 本発明の第二の態様は、対象となる魚介類を収容する水槽と、前記水槽内に亜酸化窒素を供給する手段と、前記水槽内に粒径が略100 μ m以下の気体酸素を含む微細気泡を供給する手段とを備える。

[0026] 本発明において、魚介類とは、魚類の他に、頭足類および甲殻類等の鰓呼吸によって酸素を摂取する遊泳性を持った水生生物を含む概念である。また、魚介類に強度鎮静効果と麻酔効果を引き起こす気体ガスとして、亜酸化窒素を使用するものである。

発明の効果

[0027] 本発明によれば、水中に亜酸化窒素を供給して対象となる魚介類に対して強度鎮静効果ないし麻酔効果を有する濃度の亜酸化窒素を与えるとともに、麻酔下では飽和溶存酸素環境でも個体の酸素需要を満たせない問題を解決する方法として、気体酸素を含む微細気泡を供給することによって、通常水温（20℃前後）下で魚介類を斃死させることなく安全に麻酔を施すことができ、また、魚介類が完全に覚醒するまでの間に気体酸素を含む微細気泡を供給し続けることによって覚醒するまでの間に酸素欠乏で斃死することを回避できる。

発明を実施するための形態

[0028] 本発明の実施に係る麻酔方法の概要について説明する。魚介類の種毎に存在する魚体の不動化をともなった強度鎮静化ないし適正な麻酔深度（ヒトの全身麻酔における麻酔第3期第1相から第2相に相当する麻酔深度＝視床、皮質下核、脊髄の麻痺）を誘導維持するのに適した濃度の亜酸化窒素を持続的にかつ正確に個体の鰓部分に供給するために、水槽全体に任意の濃度の亜

酸化窒素を供給して強度鎮静化ないし麻酔の誘導維持を行う。同時に、魚介類の個体の酸素需要量を超える酸素を供給するために、気体酸素を含む微細気泡を水中に供給して過飽和溶存酸素水および微細気泡自体を魚体の鰓部分に直接接触するように水流によって持続的に供給する。気体酸素を含む微細気泡を含んだ過飽和酸素水が接した鰓部分では、[気体酸素分圧] - [鰓の毛細血管内溶存酸素分圧] 間の分圧差で酸素の拡散移動が行われるため、この部分から鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量は飛躍的に増加する。鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量は、鰓上皮細胞の膜表面に接する酸素量に依存した拡散係数に従って増加することになり、この方法により亜酸化窒素麻酔下において個体の酸素需要を上回る高酸素濃度環境を実現することが可能である。

[0029] 次に、麻酔下において魚介類の酸素需要量を満たすことを可能とする環境酸素濃度について説明する。空気の酸素濃度はおよそ21%（大気組成＝体積百分率は、窒素78%、酸素21%、アルゴン0.93%、二酸化炭素約0.03%）であり、肺呼吸を行っている陸上動物はこの酸素濃度下で個体の酸素需要に見合う酸素を補給している。

[0030] ヒトや家畜などの陸上動物を麻酔する際には、麻酔の合併症としての呼吸不全を回避するために高濃度酸素吸入を施すが、この時の酸素濃度はおよそ40%～80%の範囲で調整される。すなわち、健常時に呼吸する通常空気のおよそ2～4倍の高濃度酸素供給を行なうことで麻酔によって抑制された自発呼吸運動下において発生する合併症としての呼吸不全を回避している。

[0031] 麻酔で抑制された呼吸中枢により自発呼吸運動が低下して低酸素血症を引き起こし、全身の末梢において酸素濃度が低下することで合併症としての呼吸不全を惹起するが、これを防ぐために肺に吸入される酸素濃度を2～4倍にして[肺胞内酸素分圧] - [肺胞の毛細血管内酸素分圧] の分圧差を高め、肺胞の毛細血管内に摂取される酸素量を上げることで機能低下した肺呼吸運動を補完している。肺呼吸を行っている陸上動物に見られる現象、すなわち、麻酔下においては通常の生存環境よりも数倍の高濃度酸素供給が必要で

あるということが魚介類においても該当することが当然に推定されるが、そうであるならば、海水に生息する魚類及び頭足類に長時間の麻酔を施すことは困難である。

[0032] なぜならば海洋表層の酸素濃度は殆どの調査地点において6～7.5 mg/Lの範囲（飽和酸素濃度の85～100%）であり、多くの魚介類は溶存酸素がほぼ飽和した水中に生存しているからである。いかなる方法によっても溶存酸素100%の状態の水に対して、その溶存酸素濃度を数倍に引き上げることは不可能である。そのため、通常魚介類を取り扱う水温（20℃前後）下において亜酸化窒素による強度鎮静化ないし麻酔を施すと分単位のごく短い時間内に鎮静効果ないし麻酔で抑制された呼吸運動によって低酸素血症を引き起こし、呼吸不全となって斃死するのである。これを防ぐためには、通常生存環境のおよそ数倍以上の酸素濃度環境を麻酔下の魚介類に提供する必要がある。

[0033] 次に、魚介類に高い酸素濃度環境を与えるための気体酸素を含む微細気泡の径と密度について説明する。水中に存在する気泡は、その径により浮力の大きさが決まり、水中を上昇する速度に反映される。水中における気泡の上昇速度は液物性に依存するが、水中では粒径が略100 μ mほどでレイノルズ数 Re がほぼ1になる。さらに、 $Re < 1$ では球形気泡界面の流動状態により個体球として振る舞うことから、 $Stokes$ 式がよく適応する。すなわち、水中における気泡の粒径が略100 μ m以下であれば、該気泡は水中において固体として振る舞うことができる。なお、本発明においては、気泡の粒径が略100 μ m以下の気泡を「微細気泡」と称する。

[0034] また、蒸留水や水道水を用いた実験の測定結果も $Stokes$ 式による計算値とほぼ一致することが知られている。そのため、水中における気泡の上昇速度は下表のように計算される。すなわち、気泡の粒径が小さくなるに従い時間単位で考えれば、水面上に浮上することなく位置が保持されやすくなる。そのため、麻酔下で移動できない魚介類の個体に安定的した濃度で持続的に酸素気泡を供給するためには、浮力を持たない粒径100 μ m以下の微細

気泡が適しており、より好ましくは粒径 $1 \mu\text{m}$ 以下のいわゆるナノバブル（超微細気泡）が適している。

[0035] [表1]

気泡径	水中における気泡の上昇速度
$100 \mu\text{m}$	$5440 \mu\text{m/s}$
$10 \mu\text{m}$	$54.4 \mu\text{m/s} \approx 19.6\text{cm/h}$
$1 \mu\text{m}$	$0.544 \mu\text{m/s} \approx 2\text{mm/h}$

[0036] 過飽和酸素水および気体酸素を含む微細気泡が接した魚介類の鰓部分では、[気体酸素分圧] - [鰓の毛細血管内容酸素分圧] 間の分圧差で酸素の拡散移動が行われる。水中の気泡径と気泡内圧力の関係は *Young-Laplace* の式で表せ、その関係は「 $\Delta P = 4\sigma/d$ 」で与えられる。この時、水の表面張力 $\sigma = 72.8 \text{ mN/m}$ (20°C)、気泡周囲の圧力は 1 atm とすると、以下の表示 2 のようになる。そのため、酸素が水に溶ける効率を上げて、溶存酸素の過飽和度を上げるには微細気泡の粒径がより小さい方が有利である。また、気体酸素を含む微細気泡の接触によって鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量は、鰓上皮細胞の膜表面に接する微細気泡の粒径（気泡内圧力）と数に依存した拡散係数にしたがって変化し、粒径がより小さな気泡がより多く鰓上皮細胞の膜表面に接することで鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量は増加する。

[0037]

[表2]

気泡径	気泡内圧力 (atm)
1mm	1.003
100 μ m	1.03
10 μ m	1.29
1 μ m	3.9
500nm	5.8
300nm	9.7
200nm	14.6
100nm	29.7

[0038] すなわち、酸素の拡散速度を上げて鰓薄板毛細血管に摂取される酸素量を増加させるためには〔気体酸素分圧〕－〔鰓の毛細血管内容存酸素分圧〕間の分圧差を大きくすればよい。そのためには、酸素の気泡径はより小さいほど幾何級数的に効率がよくなり、鰓薄板毛細血管に摂取される酸素総量を高めるために顕著な効果を発揮するものと考えられる。

[0039] 次に、本発明の作用効果を確認するために行った実施例について説明する。

《実施例1：水温20℃において魚介類に亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる際の限界時間の確認》

通常、魚介類を取り扱う水温（20℃前後）下で魚介類に亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施すと飽和溶存酸素下においても短時間で斃死することが知られている。長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施す限界時間を実験により確認する。実験に供した魚介類の種類と個体数は表3に示した。実験用300L水槽内の水温は20℃に調整し、通常のアアポンプとエアストーンを用いて水槽内海水の溶存酸素（DO）を飽和状態に保った。飽和溶存酸素下において亜酸化窒素を10L/minで水中に通気させて溶存

亜酸化窒素の濃度を上げ、魚介類に強度鎮静効果ないし麻酔効果が発現するまで濃度を高めた。遊泳行動が無く鰓部分の呼吸運動を除いた体動が停止した状態を確認した時点強度鎮静効果の発現、腹部が上になるように反転した時点麻酔効果の発現と評価した。全個体が強度鎮静効果ないし麻酔効果が発現した後、亜酸化窒素の通気を停止した。この時、一部の魚体は強度鎮静効果の発現に留まり、麻酔にまでは至らなかったが、通気停止後も強度鎮静効果ないし麻酔効果は継続した。その後、鰓部分の活動が停止した個体は即座に引き上げて斃死を確認した。結果として、全ての個体は強度鎮静効果ないし麻酔効果が発現した後25分以内で斃死に到り、その経過は表4に示した通りである。

[0040] [表3]

実験に供した魚介類	個体数	体重
アズキハタ (<i>Amyperodon leucogrammicus</i>)	5	約410g
イサキ (<i>Parapristipoma trilineatum</i>)	5	約450g
マアジ (<i>Trachurus japonicus</i>)	5	約420g
マダイ (<i>Pagrus major</i>)	5	約490g

[0041]

[表4]

魚介類	個体番号	強度鎮静効果が現れるまでの時間 (通気開始後の時間)	麻酔効果が現れるまでの時間 (通気開始後の時間)	発死を確認した時間 =限界時間 (効果発現後の時間)
アズキハダ	No.1	17分	30分	麻酔後 10分
	No.2	19分	—	鎮静後 20分
	No.3	16分	—	鎮静後 22分
	No.4	15分	25分	麻酔後 13分
	No.5	21分	—	鎮静後 25分
イサキ	No.1	15分	—	鎮静後 18分
	No.2	9分	21分	麻酔後 12分
	No.3	13分	—	鎮静後 13分
	No.4	19分	18分	麻酔後 8分
	No.5	8分	21分	麻酔後 6分
マアジ	No.1	13分	19分	麻酔後 18分
	No.2	12分	28分	麻酔後 16分
	No.3	13分	—	鎮静後 23分
	No.4	16分	31分	麻酔後 11分
	No.5	9分	22分	麻酔後 9分
マダイ	No.1	15分	—	鎮静後 13分
	No.2	16分	—	鎮静後 15分
	No.3	13分	—	鎮静後 21分
	No.4	17分	—	鎮静後 20分
	No.5	14分	19分	麻酔後 13分

[0042] 《実施例 2：亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔の実証》

実験に供した魚介類の種類と個体数は表 6 に示した。実験用 300 L 水槽内の水温は 20℃ に調整し、酸素気泡発生装置によって水槽に、表 5 に示した粒径分布の酸素の微細気泡を持続的に供給するとともに、亜酸化窒素を 10 L/min で水中に通気させて溶存亜酸化窒素の濃度を上げ、魚介類に強度鎮静効果ないし麻酔効果が発現するまで濃度を高めた。遊泳行動が無く鰓部分の呼吸運動を除いた体動が停止した状態を確認した時点強度鎮静効果の発現、腹部が上になるように反転した時点麻酔効果の発現と評価した。全個体が強度鎮静効果ないし麻酔効果が発現した後、亜酸化窒素の通気を停止した。この時、一部の魚体は強度鎮静効果の発現に留まり、麻酔にまでは至らなかったが、通気停止後も強度鎮静効果ないし麻酔効果は継続した。この状

態で12時間が経過した後、酸素気泡発生装置によって表5に示した粒径分布の酸素の微細気泡を持続的に供給しておいた別の実験用300L水槽に全魚体を移し、魚体内に残留した亜酸化窒素を徐々に排出させて魚体を麻酔から覚醒させた。その結果、実験に供した全ての魚介類は正常に覚醒し、覚醒後6時間時点の肉眼的所見においても何らかの異常が観察される個体を認めることはなかった。すなわち、広範な魚介類に対して通常魚介類を取り扱う水温（20℃前後）下での長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施すことが可能であることが明らかになり、その経過は表7に示した通りである。

[0043] [表5]

平均粒径 (Mean)	187nm
最頻値 (Mode)	136nm
標準偏差 (SD)	42nm
総濃度 (Total concentration)	4200万個以上/ml

[0044] [表6]

実験に供した魚介類	個体数	体重
アズキハタ (<i>Amyperodon leucogrammicus</i>)	3	約 450g
イサキ (<i>Parapristipoma trilineatum</i>)	3	約 500g
マアジ (<i>Trachurus japonicus</i>)	3	約 400g
マダイ (<i>Pagrus major</i>)	3	約 550g

[0045]

[表7]

魚介類	個体番号	強度鎮静効果ないし 麻酔効果の発現	12時間後、酸素微細気 泡が持続供給される水 槽で覚醒した魚体	覚醒6時間 後の所見
アズキハタ	No.1	強度鎮静効果	○	異常なし
	No.2	麻酔効果	○	異常なし
	No.3	麻酔効果	○	異常なし
イサキ	No.1	麻酔効果	○	異常なし
	No.2	強度鎮静効果	○	異常なし
	No.3	麻酔効果	○	異常なし
マアジ	No.1	麻酔効果	○	異常なし
	No.2	麻酔効果	○	異常なし
	No.3	麻酔効果	○	異常なし
マダイ	No.1	強度鎮静効果	○	異常なし
	No.2	強度鎮静効果	○	異常なし
	No.3	強度鎮静効果	○	異常なし

[0046] 《実施例3：亜酸化窒素による長時間麻酔後の覚醒期間における高濃度酸素環境の必要性》

実験には重さ約450gのマダイ20尾を用いた。実験用300L水槽内の水温は20℃に調整し、酸素気泡発生装置によって水槽に表5に示した粒径分布の酸素の微細気泡を持続的に供給するとともに、亜酸化窒素を10L/minで水中に通気させて溶存亜酸化窒素の濃度を上げ、魚介類に強度鎮静効果ないし麻酔効果が発現するまで濃度を高めた。遊泳行動が無く鰓部分の呼吸運動を除いた体動が停止した状態を確認した時点強度鎮静効果の発現、腹部が上になるように反転した時点麻酔効果の発現と評価した。全個体が強度鎮静効果ないし麻酔効果が発現した後、亜酸化窒素の通気を停止した。この時、一部の魚体は強度鎮静効果の発現に留まり、麻酔にまでは至らなかったが、通気停止後も強度鎮静効果ないし麻酔効果は継続した。この状態で12時間が経過した後、半数10尾のマダイは微細気泡発生装置によって表5に示した粒径分布の酸素微細気泡を持続的に供給しておいた別の実験用300L水槽に移し、魚体内に残留した亜酸化窒素を徐々に排出させて魚体を麻酔から覚醒させた。一方、残り半数10尾のマダイは従来汎用されているブローワーによる酸素供給によって飽和溶存酸素状態を維持された別の実験用30

0 L水槽に移した。その結果、酸素微細気泡を持続的に供給される水槽に移されたマダイ10尾は魚体内に残留した亜酸化窒素を徐々に排出させて全魚が無事に麻酔から覚醒した。一方、飽和溶存酸素状態を維持されている水槽に移されたマダイ10尾は30分以内に全魚が斃死した。すなわち、溶存亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施した魚体を無事に覚醒させるには酸素を含む微細気泡を水中に供給することが不可欠であることが実証され、その経過は表8に示した通りである。

[0047] [表8]

魚介類	個体番号	覚醒時の酸素環境	無事に覚醒した魚体	覚醒6時間後までの所見
マダイ	No.1	酸素微細気泡が持続供給されている水槽	○	異常なし
	No.2		○	異常なし
	No.3		○	異常なし
	No.4		○	異常なし
	No.5		○	異常なし
	No.6		○	異常なし
	No.7		○	異常なし
	No.8		○	異常なし
	No.9		○	異常なし
	No.10		○	異常なし
	No.11	飽和溶存酸素状態が維持されている水槽	—	斃死
	No.12		—	斃死
	No.13		—	斃死
	No.14		—	斃死
	No.15		—	斃死
	No.16		—	斃死
	No.17		—	斃死
	No.18		—	斃死
	No.19		—	斃死
	No.20		—	斃死

産業上の利用可能性

[0048] 本発明によれば、長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施した魚介類に様々な処置を可能とするのみならず長距離輸送などにも利用することも可能となる。強度鎮静化ないし麻酔された魚介類は生理・代謝活性が低下しているため、老廃物の排出による水質悪化を抑制することができ、限られた水槽内における積載率を向上させることができる。魚介類に対して安全な長時間の強度

鎮静化ないし麻酔を施した後、再び元の覚醒状態にもどして活魚として泳ぎ回ることが可能にした新たな麻酔技術によって、陸路、空路、海路、いずれの輸送手段においても、従来不可能とされた遠距離まで生かしたまま魚介類を運ぶことも可能となる。また、魚の養殖現場などでは、疾病予防のためのワクチン接種、トラフグの噛み合い防止のための歯切りなど様々な場面で、魚体の損傷及び消耗を防止するための魚の沈静化に使用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 対象となる魚介類に対して游泳移動や体動の抑制を伴った強度の鎮静効果ないし麻酔効果を奏する所定濃度の亜酸化窒素を水中に生成する工程と、
- 粒径が略100 μm 以下の気体酸素を含む微細気泡を水中に供給する工程と、
- 上記酸素を含む微細気泡を持続的に水中に供給して前記亜酸化窒素濃度を下げて魚介類を覚醒する工程と、を含む、
- 魚介類を対象とした亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる方法
- [請求項2] 前記亜酸化窒素濃度を下げて魚介類を覚醒する工程は、粒径が略100 μm 以下の気体酸素を含む微細気泡を持続的に水中に供給された水槽へ魚介類を移す工程を含む、
- 請求項1に記載の魚介類を対象とした亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる方法。
- [請求項3] 前記気体酸素を含む微細気泡を水中で移動できない魚介類の鰓上皮細胞膜表面に対して水流を用いて供給する工程を含む、
- 請求項1に記載の魚介類を対象とした亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる方法。
- [請求項4] 前記気体酸素を含む微細気泡の粒径の最頻値が略1 μm 以下である、
- 請求項1に記載の魚介類を対象とした亜酸化窒素による長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる方法。
- [請求項5] 請求項1に記載の方法を実施するための装置であって、
- 対象となる魚介類を収容する水槽と、
- 前記水槽内に亜酸化窒素を供給する手段と、
- 前記水槽内に粒径が略100 μm 以下の気体酸素を含む微細酸素気泡を供給する手段と、を備えた、

魚介類を対象とした亜酸化窒素によるによる長時間の強度鎮静化ないし麻酔を施し、覚醒させる装置。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/004067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. A01K61/10 (2017.01) i, A01K63/02 (2006.01) i

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. Cl. A01K61/10, A01K63/02

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-267620 A (MORI KIKAI SEISAKUSHO KK) 18 October 2007, paragraphs [0018]-[0025] (Family: none)	1-5
Y	JP 2014-39514 A (MARINE BIOTECHNOLOGY KK) 06 March 2014, paragraphs [0011]-[0032] (Family: none)	1-5
Y	JP 2016-198096 A (TECH CORPORATION KK) 01 December 2016, paragraphs [0014]-[0029] (Family: none)	1-5
A	WO 2017/110766 A1 (ANZAI, Satoshi) 29 June 2017, paragraph [0017] (Family: none)	1-5

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
01.04.2019

Date of mailing of the international search report
16.04.2019

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2019/004067

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 5897133 B2 (MARINE BIOTECHNOLOGY INC.) 30 March 2016, paragraphs [0018]-[0032] & US 2017/0172116 A1, paragraphs [0016]-[0031] & WO 2015/122021 A1 & EP 3108746 A1 & KR 10-2016-0100361 A & CN 105979774 A	1-5
A	JP 61-104730 A (SHOWA DENKO K.K.) 23 May 1986, page 2 (Family: none)	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A01K61/10(2017.01)i, A01K63/02(2006.01)i

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. A01K61/10, A01K63/02

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

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)

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 請求項の番号
Y	JP 2007-267620 A (株式会社森機械製作所) 2007.10.18, [0018]-[0025] (ファミリーなし)	1-5
Y	JP 2014-39514 A (マリンバイオテクノロジー株式会社) 2014.03.06, [0011]-[0032] (ファミリーなし)	1-5
Y	JP 2016-198096 A (株式会社テックコーポレーション) 2016.12.01, [0014]-[0029] (ファミリーなし)	1-5

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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

の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

01.04.2019

国際調査報告の発送日

16.04.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田辺 義拓

電話番号 03-3581-1101 内線 3237

2B

5713

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 請求項の番号
A	WO 2017/110766 A1 (安斎聡) 2017.06.29, [0017] (ファミリーなし)	1-5
A	JP 5897133 B2 (マリンバイオテクノロジー株式会社) 2016.03.30, [0018]-[0032] & US 2017/0172116 A1, [0016]-[0031] & WO 2015/122021 A1 & EP 3108746 A1 & KR 10-2016-0100361 A & CN 105979774 A	1-5
A	JP 61-104730 A (昭和電工株式会社) 1986.05.23, 2頁 (ファミリーなし)	1-5