(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2011-518559
(P2011-518559A)
(43)公表日　平成23年6月30日(2011.6.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A23K 1/16	(2006.01)	A23K	1/16	303D	2B005
A23K 1/18	(2006.01)	A23K	1/18	102A	2B150
A61K 31/7088	(2006.01)	A23K	1/18	102B	4C084
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	31/7088		4C086
A61P 31/00	(2006.01)	A61K	37/02		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 21 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-506221 (P2011-506221)
(86)(22)出願日　平成21年4月24日 (2009.4.24)
(85)翻訳文提出日　平成22年12月16日 (2010.12.16)
(86)国際出願番号　PCT/NO2009/000156
(87)国際公開番号　WO2009/131467
(87)国際公開日　平成21年10月29日 (2009.10.29)
(31)優先権主張番号　20081977
(32)優先日　平成20年4月24日 (2008.4.24)
(33)優先権主張国　ノルウェー(NO)

(71)出願人　510282240
エウォス、イノベーション、アクティーゼルスカブ
EWOS　INNOVATION　AS
ノルウェー国ディルダル
(71)出願人　510282251
ケモフォルマ、リミテッド
CHEMOFORMA　LTD.
スイス国アウグスト、ラインシュトラーセ、２８－３２
(74)代理人　100117787
弁理士　勝沼　宏仁
(74)代理人　100091487
弁理士　中村　行孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】機能性飼料組成物

(57)【要約】
通常の飼料成分、ペプチドグリカンおよびヌクレオチドを含んでなる飼料組成物を記載する。この飼料組成物は、動物の感染性疾患を防止しまたは減少させかつ感染性疾患に関連した症状を防止するのに用いることができる。この飼料組成物を感染体の投与前、感染中または感染後に供給することによる魚類の給餌方法も提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
通常の飼料成分を含んでなる飼料組成物であって、ペプチドグリカンおよびヌクレオチドを含んでなることを特徴とする、飼料組成物。
【請求項２】
上記ペプチドグリカンが、０．００１－０．０１重量％、好ましくは０．００１－０．００５重量％、最も好ましくは０．００５重量％の範囲である、請求項１に記載の飼料組成物。
【請求項３】
ヌクレオチドが、０．０５％－１重量％、好ましくは０．１－０．５重量％、最も好ましくは０．２重量％の範囲である、請求項１に記載の飼料組成物。
【請求項４】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、４より大きく、更に好ましくは２０より大きく、更に好ましくは４０より大きい、請求項１に記載の飼料組成物。
【請求項５】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、４０より大きい、請求項１に記載の飼料組成物。
【請求項６】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、２０より大きく、かつペプチドグルカンの量が、飼料組成物の重量の０．００１－０．０１％の範囲である、請求項１に記載の飼料組成物。
【請求項７】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、４０より大きく、かつペプチドグルカンの量が、飼料組成物の重量の０．００１－０．０１％の範囲である、請求項６に記載の飼料組成物。
【請求項８】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、２０より大きく、かつペプチドグルカンの量が、飼料組成物の重量に対して０．０１％未満であり、好ましくは約０．０５以下である、請求項６に記載の飼料組成物。
【請求項９】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、４０より大きく、かつペプチドグルカンの量が、飼料組成物の重量に対して０．０１％未満であり、好ましくは約０．００５％以下である、請求項６に記載の飼料組成物。
【請求項１０】
ヌクレオチドの量が飼料組成物の総重量の約０．２％であり、ペプチドグルカンの量が約０．００５％である、請求項１に記載の飼料組成物。
【請求項１１】
ヌクレオチドが、アデノシン一リン酸、シチジン一リン酸、グアノシン一リン酸、ウリジン一リン酸、チミジン一リン酸を含んでなる群から選択される、請求項１～１０のいずれか一項に記載の飼料組成物。
【請求項１２】
組成物が、更に他の免疫刺激および／または抗炎症成分を含んでなる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の飼料組成物。
【請求項１３】
動物の感染性疾患の予防および／もしくは処置、並び／または疾患の症状の軽減のための医薬組成物および／または栄養組成物および／または機能性飼料の製造ための、通常の飼料成分、ヌクレオチドおよびペプチドグリカンを含んでなる組成物の使用。
【請求項１４】
上記ペプチドグルカンが、０．００１－０．０１重量％、好ましくは０．００１－０．００５重量％、最も好ましくは０．００５重量％の範囲である、請求項１３に記載の使用

。
【請求項１５】
ヌクレオチドが、０．０５重量％－１重量％、好ましくは０．１－０．５重量％、最も好ましくは０．２重量％の範囲である、請求項１３に記載の使用。
【請求項１６】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、４より大きく、更に好ましくは２０より大きく、更に好ましくは４０より大きい、請求項１３に記載の使用。
【請求項１７】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、４０より大きい、請求項１３に記載の使用。
【請求項１８】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、２０より大きく、かつペプチドグルカンの量が飼料組成物の重量の０．００１－０．０１％の範囲である、請求項１３に記載の使用。
【請求項１９】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、４０より大きく、かつペプチドグルカンの量が飼料組成物の重量の０．００１－０．０１％の範囲である、請求項１８に記載の使用。
【請求項２０】
ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比が、４０より大きく、かつペプチドグルカンの量が飼料組成物の重量に対して０．０１％未満であり、好ましくは約０．００５％以下である、請求項１８に記載の使用。
【請求項２１】
ヌクレオチドの量が飼料組成物の総重量の約０．２％であり、かつペプチドグルカンの量が約０．００５％である、請求項１３に記載の使用。
【請求項２２】
ヌクレオチドが、アデノシン一リン酸、シチジン一リン酸、グアノシン一リン酸、ウリジン一リン酸、チミジン一リン酸を含んでなる群から選択される、請求項１３～２１のいずれか一項に記載の使用。
【請求項２３】
組成物が、更に他の免疫刺激および／または抗炎症成分を含んでなる、請求項１３～２１のいずれか一項に記載の使用。
【請求項２４】
動物の感染性疾患に関連する症状を防止または軽減するための機能性飼料組成物としての請求項１３～２３のいずれか一項に記載の使用。
【請求項２５】
感染体に攻撃された魚の生存および／または成長を増加させるための、請求項１３～２３のいずれか一項に記載の使用。
【請求項２６】
感染が、Piscirikettsia salmonis、Moritella viscosa、Francisella種，マウス・ロット、連鎖球菌感染症、ビブリオ感染症のような細菌、膵臓疾患、ＮＳＡＶ、鰓炎症（GI）、心臓・骨格筋炎症（HSMI）、サケ伝染性貧血症（ISA）ウイルス、サプロレグニオシス、およびウミシラミ感染症によって引き起こされる、請求項１３～２５のいずれか一項に記載の使用。
【請求項２７】
動物が、水生動物である、請求項１３～２６のいずれか一項に記載の使用。
【請求項２８】
水生動物が、魚類、甲殻類または軟体動物である、請求項２７に記載の使用。
【請求項２９】
魚類が、サケ、カレイ、または任意の他の養殖可能な魚種である、請求項２８に記載の

使用。
【請求項３０】
魚類が、大西洋サケSalmo salarである、請求項２９に記載の使用。
【請求項３１】
動物の感染性疾患に関連する症状を防止または軽減するための、請求項１３に記載の使用。
【請求項３２】
感染後の効果的回復および／または感染による抗生物質処置のための、および／または再感染の危険を軽減するための、請求項１３に記載の使用。
【請求項３３】
抗生物質と組み合わせたおよび／または抗生物質処置の前の感染症の改良処置のための、請求項１３に記載の使用。
【請求項３４】
感染症に罹りやすい魚類の給餌方法であって、請求項１～１２のいずれか一項に記載の組成物を、感染体に攻撃される前の期間、感染中または魚が感染してしまった後に魚に供給することを特徴とする、方法。
【請求項３５】
組成物を感染前の１～１２週間、更に好ましくは２～６週間、最も好ましくは４週間の時期に給餌する、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
魚にヌクレオチドを更に含んでなる通常の飼料組成物を所定期間給餌した後、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物を給餌する、請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
ヌクレオチドを更に含んでなる飼料組成物を１～８週間、好ましくは２～４週間、最も好ましくは３週間給餌する、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
請求項１～１２のいずれか一項に記載の飼料組成物を１～１２週間、好ましくは１週間給餌する、請求項３４～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
感染が、Piscirikettsia salmonis、Moritella viscosa、Francisella種，マウス・ロット、連鎖球菌感染症、ビブリオ感染症のような細菌、膵臓疾患、ＮＳＡＶ、鰓炎症（GI）、心臓・骨格筋炎症（HSMI）、サケ伝染性貧血症（ISA）ウイルス、サプロレグニオシス、およびウミシラミ感染症によって引き起こされる、請求項３４～３８のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の分野】
【０００１】
本発明は、動物の感染性疾患の症状を防止しまたは軽減する目的で投与することができる飼料組成物、飼料組成物の使用、および独立クレームの前文で定義されている通りの魚類の給餌方法に関する。
【発明の背景】
【０００２】
Piscirickettsia salmonisは、サケ科の魚に致命的な敗血症を引き起こす小型の細胞内細菌である。１９８０年代後半に最初に単離されて以来、P.salmonisはチリの水産養殖産業においてサケ科の魚の大量死の主要な原因となっている。P.salmonisは細胞内性であるので、感染したサケの抗生物質投与の効力は極めて不十分である。ワクチン開発も、細菌が細胞内性であることから困難であることが明らかになっている。従って、P.salmonisに対して現在用いられているワクチンは淡水から海水に移した６ヶ月後には大部分が無効となり、当該産業はこの疾患を治療するときには依然として大部分を抗生物質に依存している。オキソリン酸のような抗微生物薬の使用は、チリでは多年にわたって広範囲に行われ

ており、１３０ｔ（活性化合物）／年を上回る量に達している。この中の８０％を上回る量がP.salmonisの制御に用いられているが、いずれの抗微生物薬も一貫して有効であることは示されていない。

【０００３】

更に、オキシテトラサイクリンおよびオキソリン酸のような抗生物質投与は、大西洋サケのような魚類の特異的および非特異的免疫系の機能を著しく減少させる可能性がある。この免疫抑制によりP. salmonisのような病理学的微生物による再感染の危険性が増加し、P. salmonisが速やかに再集落形成し、抗生物質の投与が繰り返し必要となる。この抗生物質の広汎な再使用により、魚の免疫が低下し、消化管微生物叢のような生物の天然の微生物叢に影響を及ぼす。給餌効率および成長が低いことは、これに関して抗生物質投与の負の効果として報告されているものの幾つかであり、従って経済的問題だけでなく全般的な魚の健康の問題でもある。魚の健康について一般および消費者の認識が高まることによって、水産養殖生産における有効な代替治療および疾患出現の防止の必要性が増している。

【０００４】

抗生物質の継続使用は、残留物や食品安全性の問題も提起してきている。米国および日本市場には、チリ産のサケの総てのバッチについて抗生物質残留物を試験することが求められている。これらのイニシアティブにより、大西洋サケ個体群の水揚げ前に2ヶ月を上回る長めの投与中止期間が生じた。従って、この期間は重大な危険を表し、あらゆる種類の重篤な感染症の場合に貴重な魚の大きな損失を生じる可能性がある。更に、疾患を制御するのに抗生物質を全く使用することができないので、任意の感染症および水揚げ前の個体群の損失は重大な財政上の不利益を生じる可能性がある。

【０００５】

魚の免疫応答を高める免疫刺激薬は、水産養殖において、特に統合した健康管理プログラムの一部として配置されるときには重要な用途を有する。ペプチドグリカン（PG）は細菌細胞癖の構造成分であり、グラム陽性菌の９０％乾燥重量までを形成することができる。ＰＧは、細胞強度、形状および細胞質の浸透圧の中和に関与している。それらは、強力な格子型構造を生じさせる２種類の交互になっているアミノ糖から形成される。ＰＧは、多くの病原性細菌に存在しているため、宿主の免疫系に暴露されたときに強力な応答を生じさせる。ＰＧは、サケ科の魚、ブリ、テラピア、カレイおよび小エビなどの幼魚並びに成魚水産養殖種の範囲で病原菌に対する改良された防御を示している。しかしながら、ペプチドグリカンの投与は、これが最適用量で投与されず、高すぎたりまたは低すぎたりし、特に生物に一層長期間投与されると、生存数の減少などの負の副作用を生じることがあることが示されている。水産養殖の観点からは、この強力な免疫刺激薬を現在の実験経験および知識に基づいて推奨可能な期間より長期間投与することができるならば、有益であろう。Matsuo K. & Miyazono I.（「ニジマス幼魚の耐病性および成長に対するペプチドグリカンの長期投与の影響」Nippon Suisan Gakkaishi 89 (8): 1377-1379, August 1993）は、２８日より長期間のＰＧの経口投与は、耐病性を減少させる可能性があることを報告した。

【０００６】

ほとんどの細胞は、細胞複製に用いられるヌクレオチドを産生する。任意の生きている生物における通常の条件下では、ヌクレオチドの一定の合成は細胞増殖で求められる自然の要求と良好にバランスがとれている。

【０００７】

本明細書によって解決すべき問題は、上記の負の副作用がなく、かつ魚類がP.salmonisのような感染症に暴露されているまたはされてしまった期間中に魚類の生存を向上させる効果的な機能性健康食餌および給餌方法を開発し、提供することである。このような食餌は、魚および給餌生産者のいずれにもかなりの経済的利益を与えるものと思われる。更に、それは魚の健康に寄与するであろうし、また不利益が知られている抗生物質投与の必要性および量を減少させることができる。

【発明の概要】
【０００８】
本発明の第一の態様によれば、組成物が更にペプチドグリカンおよびヌクレオチドを含んでなることを特徴とする通常の飼料成分を含んでなる飼料組成物（feed composition）が提供される。
【０００９】
好ましくは、飼料組成物中のペプチドグルカンは、０．００１－０．０１重量％、更に好ましくは０．００１－０．００５重量％、最も好ましくは０．００１重量％の範囲である。好ましくは、ヌクレオチドは０．０５重量％－１重量％、更に好ましくは０．１－０．５重量％、最も好ましくは０．２重量％の範囲である。
【００１０】
好ましくは、ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比は４より大きく、更に好ましくは２０より大きく、更に好ましくは４０より大きい。
【００１１】
好ましくは、ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比は４０より大きい。
【００１２】
好ましくは、ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比は２０より大きく、ペプチドグルカンの量は飼料組成物の重量の０．００１－０．０１％の範囲である。
【００１３】
好ましくは、ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比は４０より大きくかつペプチドグルカンの量は飼料組成物の重量の０．００１－０．０１％の範囲である。
【００１４】
好ましくは、ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比は２０より大きく、ペプチドグルカンの量は飼料組成物の重量に対して０．０１％未満であり、好ましくは約０．０５以下である。
【００１５】
好ましくは、ペプチドグルカンに対するヌクレオチドの重量比は４０より大きくかつペプチドグルカンの量は飼料組成物の重量に対して０．０１％未満であり、好ましくは約０．００５％以下である。
【００１６】
好ましくは、ヌクレオチドの量は飼料組成物の総重量に対して約０．２％であり、ペプチドグルカンの量は約０．００５％である。
【００１７】
好ましくは、ヌクレオチドは、アデノシン一リン酸、シチジン一リン酸、グアノシン一リン酸、ウリジン一リン酸、チミジン一リン酸から選択される。
【００１８】
好ましくは、組成物は、更に他の免疫刺激および／または抗炎症成分を含んでなる。
【００１９】
本発明の第二の態様によれば、通常の飼料成分、ヌクレオチドおよびペプチドグリカンを含んでなる飼料組成物は、動物の感染性疾患に関連した症状を防止しまたは減少させるための機能性飼料組成物として用いられる。
【００２０】
本発明の第三の態様によれば、通常の飼料成分およびペプチドグリカンを含んでなる飼料組成物は、動物の感染性疾患に関連した症状を防止しまたは減少させるための機能性飼料組成物として用いられ、ペプチドグリカンの濃度は０．０１ｇｋｇ$^{-1}$飼料－０．０５ｇｋｇ$^{-1}$飼料の範囲である。
【００２１】
好ましくは、第二および第三の態様の飼料組成物は、感染体によって攻撃された魚（fish challenged by an intection）の生存および／または成長を増加させる目的で用いられる。

【００２２】
更に好ましくは、組成物は、感染が、Piscirikettsia salmonis、Moritella viscosa、Francisella種，マウス・ロット、連鎖球菌感染症、ビブリオ感染症のような細菌、膵臓疾患、ＮＳＡＶ、鰓炎症（GI）、心臓・骨格筋炎症（HSMI）、サケ伝染性貧血症（ISA）ウイルス、サプロレグニオシス、およびウミシラミ感染症によって引き起こされる場合に用いられる。
【００２３】
好ましくは、組成物は、動物が水生動物であり、更に好ましくは水生動物が魚類、甲殻類または軟体動物であるときに用いられる。この魚類は、サケ、カレイ、または任意の他の養殖可能な魚種であることができ、最も好ましくは、魚は大西洋サケSalmo salarである。
【００２４】
組成物は、動物の感染性疾患の予防および／または処置のための薬剤および／または栄養補助食品（nutraceutical）および／または機能性飼料を生産するために、および／または疾患の症状を減少させるために用いられる。
【００２５】
これらの組成物は、感染後の効果的回復および／または感染による抗生物質処置のために、および／または再感染の危険を減少させるために用いることもできる。
【００２６】
組成物は、抗生物質と組み合わせておよび／または抗生物質処置に先だって感染症の改良治療の目的で用いることもできる。
【００２７】
本発明の第四の態様では、請求項１－５のいずれか一項に記載の組成物を感染体による攻撃の前、感染中または魚類が感染してしまった後の期間に魚類に提供することを特徴とする、感染しやすい魚類の給餌（feeding）方法が提供される。
【００２８】
好ましくは、組成物を感染前の１－１２週間、更に好ましくは２－６週間、最も好ましくは４週間給餌する。
【００２９】
あるいは、魚にヌクレオチドを更に含んでなる通常の飼料組成物を所定期間給餌した後、請求項１－１２のいずれか一項に記載の組成物を給餌することができる。
【００３０】
好ましくは、ヌクレオチドを更に含んでなる飼料組成物を１－８週間、更に好ましくは２－４週間、最も好ましくは３週間給餌する。
【００３１】
請求項１－１２のいずれか一項に記載の飼料組成物を１－１２週間、最も好ましくは１週間給餌するのが好ましい。
【００３２】
好ましくは、方法の請求項に記載の方法は、感染が、Piscirikettsia salmonis、Moritella viscosa、Francisella種，マウス・ロット、連鎖球菌感染症、ビブリオ感染症のような細菌、膵臓疾患、ＮＳＡＶ、鰓炎症（GI）、心臓・骨格筋炎症（HSMI）、サケ伝染性貧血症（ISA）ウイルス、サプロレグニオシス、およびウミシラミ感染症によって引き起こされるときに用いられる。
【００３３】
好ましい態様は、従属請求項にも記載されている。
【図面の簡単な説明】
【００３４】
【図１】投与前相に様々な食餌を投与された大西洋サケ（Salmo salar）の投与後期間中の実験１の累積死亡率（平均値＋ＳＥＭ）。
【図２】投与前相に様々な食餌を投与された後の投与後期間中の（実験１）大西洋サケ（

Salmo salar）のKaplan-Meier生存曲線（相対生存率，平均値±平均値の標準誤差）。
【図３】時間系列として表される実験２における大西洋サケ（Salmo salar）の累積死亡率（％）（平均値±ＳＤＥＶ）。魚は、Piscirickettsia salmonisの投与前に様々な食餌を投与された。
【図４】投与後相の後の最終死亡率として表される実験２における大西洋サケ（Salmo salar）の累積死亡率（％）（平均値±ＳＥＭ）。魚は、Piscirickettsia salmonisの投与前に様々な食餌を投与された。
【実施例】
【００３５】
本発明の態様を、下記の図表に関する実施例によって説明する。
【００３６】
実験の部
実験１
総数が６４０尾の大西洋サケSalmo salar（１６０尾／群）で雌雄混合し出発重量が８０ｇの海水に適合させたものに、１日当たり２％体重で４週間給餌した。実際には、魚は自由に飼料に接近できる。魚を６個のタンクに保持した。給餌期間の開始前に、魚にピットを装着して（pit-tagged）異なる群を識別した。魚を、周囲海水温（１６℃）に保持した。死亡数を、１日毎に評価した。
【００３７】
投与前（pre-challenge）期間には、５種類の食餌（表１）を含む４種類の食餌処置を行った（表３）。３群の魚には、ヌクレオチドを含んでなる食餌を３週間給餌した後、様々な濃度のペプチドグリカンおよびヌクレオチドを含んでなる３種類の食餌を１週間給餌した。対照群には、４週間の全投与前期間中、市販の食餌を投与した。総ての食餌は通常の飼料成分を含んでなり、添加したペプチドグリカンおよびヌクレオチドの量だけが異なっていた（表２）。
【００３８】
Piscirikettsia salmonisの投与および投与後（post-challenge）給餌
投与前期間の最後の給餌の２４時間後に、魚を６個のタンクに群当たりタンク当たり２５尾の魚となるように均等に混合した（総数１００尾／タンク）。魚に、Piscirikettsia salmonisの致死投与量（LD_{50}）の０．２ｍｌを腹腔内投与した。投与後に、魚にヌクレオチドまたはペプチドグリカンを全く添加していない同一対照食餌を３０日間与え（投与後）、実験を終了し、最終的死亡数を評価した。
【００３９】
【表１】

表１：実験１に用いた試験食餌。ＰＧ　＝ペプチドグリカン。

食餌番号	食餌名
1.	対照食餌（市販品）
2.	0.2%ヌクレオチドおよびPG 0.005%を含む食餌(50g PG･トン$^{-1}$)
3.	0.2%ヌクレオチドおよびPG 0.01%を含む食餌(100g PG･トン$^{-1}$)
4.	0.2%ヌクレオチドおよびPG 0.05%を含む食餌(500g PG･ トン$^{-1}$)
5.	0.2%ヌクレオチドを含む食餌

【００４０】

【表２】

表２：実験１における試験食餌の組成物の主要な飼料成分および化学分析

成分(重量%)	食餌1	食餌2	食餌3	食餌4	食餌5
魚粉	51	51	51	51	51
魚油	18	18	18	18	18
小麦グルテン	7	7	7	7	7
機能性飼料組成物	8	8	8	8	8
ビタミンプレミックス*	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
ミネラルプレミックス**	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
ペプチドグリカン	-	0.005	0.01	0.05	-
ヌクレオチド	-	0.2	0.2	0.2	0.2
組成(%)					
タンパク質	47.9	47.9	47.9	47.9	47.9
脂質	24.3	24.3	24.3	24.3	24.3
灰分	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
乾燥質量	92.7	92.7	92.7	92.7	92.7

*EWOS ビタミンプレミックス(登録商標)

**EWOS ミネラルプレミックス(登録商標)

【００４１】
【表３】

表３．Piscirikettsia salmonisの投与前（投与前）および
P.salmonisの投与後（投与後）の実験１における試験食餌の給餌方法

治療群	投与前				投与後
	第1週目	第2週目	第3週目	第4週目	30日
1(対照)	食餌1	食餌1	食餌1	食餌1	食餌1
2	食餌5	食餌5	食餌5	食餌2	
3	食餌5	食餌5	食餌5	食餌3	
4	食餌5	食餌5	食餌5	食餌4	

【００４２】
ＬＤ５０評価

個体群の５０％の死亡率水準（ＬＤ$_{50}$）を決定するための正確な用量を、主要な投与前に評価した。給餌実験に用いた同一ストックの魚から総数２２０尾（Salmo salar）を、４基の７００Ｌタンクに振り分けた。魚の平均重量は、１２０－１５０ｇであった（５５尾／タンク）。タンクには、室温の海水を供給した。魚をタンク条件に順応させたならば、既知力価のP.salmonis PSLT8の４種類の希釈物（１／１０、１／１００、１／１０００および１／１０，０００）を投与した（０．２ｍｌ　魚、腹腔内投与、腹内側）。水温および投与された魚の死亡率データーを、３０日間にわたって記録した。様々な食餌の給餌期間と平行してＬＤ$_{50}$を推定した。

【００４３】

統計

死亡率は、累積死亡率（％）として表した。データーは、Log RankおよびWilcoxon検定（Minitab 13.32, State College, PA, USA）の他にKaplan-Meier生存分析を用いて評価した。相対生存率（RPS）は、下記のようにして計算した。

【数１】

$$RPS = \left(1 - \frac{\text{試験群の死亡率}}{\text{対照群の死亡率}}\right) \times 100$$

【００４４】

結果および検討

ヌクレオチドおよびペプチドグリカン（ＰＧ）を給餌された魚は、対照食餌を与えられた魚と比較して、投与の３０日後の検討の終了時までには有意に高い相対生存率（ＲＰＳ）を示した（表４、図２）（Log-Rank検定：ｐ＜０．００１；Wilcoxon検定：ｐ＜０．００１）。対照群における生存の確率は、ヌクレオチドおよびＰＧ　０．０５％、ヌクレオチドおよびＰＧ　０．０１％およびヌクレオチドおよびＰＧ　０．００５％を投与された処置群ではそれぞれ６９％、７２％および７５％であったのと比較して、４９％を下回った（図２）。ヌクレオチドとペプチドグリカンの組合せを含んでなる食餌を投与する処置では死亡率に有意な差はなかったが、投与量が低下するにつれて死亡率が低下する明らかな傾向が見られた（図１）。タンク間の偏差は低く、タンクの影響に有意差は見られなかった（Log-Rank検定：ｐ＝０．９０６；Wilcoxon検定：ｐ＝０．９５２）。

【００４５】

【表４】

表４：P.salmonisの投与前に様々な食餌を給餌された大西洋サケ（Salmo salar）の投与後相の終了時における相対生存率（RPS）および死亡率（平均値±平均値の標準誤差）。
＊は、対照と比較した有意差を示す（ｐ＜０．００１）。

処置１	RPS (%)	死亡率(%)
1 (対照)	-	51 ± 1.23
2	51	25 ± 1.33*
3	46	28 ± 1.79*
4	40	31 ± 2.40*

【００４６】

実験２

総数が９００尾の大西洋サケSalmo salar（１５０尾／処置群、６処置群）で出発重量が８０ｇの海水に適合させたものに、給餌期間の開始前にピットを装着して（pit-tagged）異なる群を識別した。魚を、周囲海水温（１６℃）に保持した。死亡数を、１日毎に評価した。魚に、様々な組合せの６種類の食餌を１日当たり２％体重で８週間給餌した：追加成分を含まない対照食餌、ヌクレオチドを含んでなる食餌、ペプチドグリカンを含んでなる食餌、およびヌクレオチドとペプチドグリカンの組合せを含んでなる食餌（表５）。ヌクレオチドおよび／またはペプチドグリカンの添加を除けば、総ての食餌は通常の飼料成分を含んでいた（表６）。実際には、魚は自由に飼料に接近できる。

【００４７】

【表５】

表５：実験２で用いられる試験食餌。ＰＧ＝ペプチドグリカン。

食餌番号	食餌名
1.	対照食餌(市販品)
2.	0.2%ヌクレオチドを含む食餌
3.	PG 0.005%を含む食餌(50g PG･トン$^{-1}$)
4.	0.2% ヌクレオチド+ PG 0.005% (50g PG･トン$^{-1}$)を含む食餌
5.	0.2% ヌクレオチド+ PG 0.001% (10g PG･トン$^{-1}$)を含む食餌

【００４８】

【表６】

表６：実験２の試験食餌の組成物の主要な飼料成分および化学分析

成分(重量%)	食餌1	食餌2	食餌3	食餌4	食餌5
魚粉	51	51	51	51	51
魚油	18	18	18	18	18
小麦グルテン	7	7	7	7	7
トウモロコシグルテン粉	8	8	8	8	8
ビタミンプレミックス*	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
ミネラルプレミックス**	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
ペプチドグリカン	-	-	0.005	0.005	0.001
ヌクレオチド	-	0.2	-	0.2	0.2
組成(%)					
タンパク質	47.6	47.6	47.6	47.6	47.6
脂質	24.3	24.3	24.3	24.3	24.3
灰分	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
乾燥質量	92.7	92.5	92.7	92.5	92.7

*EWOS ビタミンプレミックス(登録商標)

**EWOS ミネラルプレミックス(登録商標)

【００４９】

魚には、４週間の投与前相中に様々な食餌を与えた（表７）。処置１では、投与前期間の４週間に如何なる成分も加えない対照食餌を投与した。処置２では、ヌクレオチドを加えた食餌を４週間投与した。処置３では、魚に対照食餌を３週間投与した後、０．００５％ＰＧを含んでなる食餌１週間投与した。処置４および５では、魚にヌクレオチドを含んでなる食餌を３週間投与した後、ヌクレオチドとペプチドグリカンの様々な組合せ（処置４では０．００５％　ＰＧおよび処置５では０．００１％　ＰＧ）を含んでなる食餌１週間投与した。処置６では、魚にヌクレオチドとペプチドグリカンの組合せを含んでなる食餌を４週間投与した。投与前期間の後、魚に下記に詳細に説明するようにP.salmonisを投与した。

【００５０】

投与後期間中に、総ての処置群には実験を終了するまで４週間対照食餌を投与した。

【００５１】

【表７】

表７．魚にPiscirikettsia salmonisを投与する前（投与前）およびP.salmonisを投与した後（投与後）の実験２における給餌方法。正および負の対照は、ヌクレオチドを添加した（食餌２）およびヌクレオチドを添加していない（食餌１）通常の市販の食餌である。

処置	投与前				投与後			
	第1週	第2週	第3週	第4週	第5週	第6週	第7週	第8週
1	食餌1	食餌1	食餌1	食餌1	食餌1			
2	食餌2	食餌2	食餌2	食餌2				
3	食餌1	食餌1	食餌1	食餌3				
4	食餌2	食餌2	食餌2	食餌4				
5	食餌2	食餌2	食餌2	食餌5				
6	食餌5	食餌5	食餌5	食餌5				

【００５２】

Piscirikettsia salmonisの投与

４週間の試験用食餌を投与した後（投与前期間）、魚を群当たりタンク当たり２５尾ずつ６個のタンクに均等に割り振った（総数１５０尾／タンク）。魚に、個体群の５０％を殺すと予想された投与量（LD_{50}）のPiscirikettsia salmonis ０．２ｍｌを腹腔内（ｉ．ｐ．）投与した。魚に、投与期間中を通じて対照食餌を投与した。死亡した魚は、毎日取り除き、記録した。

【００５３】

LD_{50}評価

LD_{50}を、様々な食餌の給餌期間と平行して実験１に記載したように評価した。LD_{50}評価についての魚の平均重量は、８０ｇであった（５５尾／タンク）。

【００５４】

統計

統計学的評価は、実験１に記載した通りに行った。

【００５５】

結果および検討

LD_{50}用量を投与し、約５０％の対照個体群における死亡率水準を得た。最終的な対照死亡率は、５３％に達した（表８、図４）。現行の投与研究には、有意なタンクに基づく効果はないと思われる（ｐ＝０．９６７）。

【００５６】

投与後の１４日目には、死亡率は対照処置で１０％を越えた（図３）。ペプチドグリカンを与えた群では、死亡率は投与から２１日後に１０％に達した。ヌクレオチドを添加しただけのものも、全般的死亡率を遅らせ減少させたが（図４）、ペプチドグリカンとヌクレオチドの組合せについての場合ほど効率的ではなかった。添加物としてヌクレオチドのみを含んでなる食餌を投与された魚は、相対生存率（ＲＰＳ）が４５％（表８）であり、添加物を全く含まない対照食餌を投与された対照と比較して有意に高い生存確率（ｐ＜０．００１、Log Rank-Wilcoxon）を示した。

【００５７】

ペプチドグリカンを投与された総ての処置群は、対照食餌を投与された処置群と比較して有意に高い生存確率(p>0.001、Log Rank-Wilcoxon)を示し、RPS値は66% ～ 78%であっ

た(表8、図3)。
【００５８】
【表８】

表８．Piscirickettsia salmonisの投与前に様々な食餌を与えた大西洋サケ（Salmo salar）の死亡率および相対生存率（ＲＰＳ）。ＳＥＭ＝平均値の標準誤差。

処置	平均死亡率(%)	SEM	RPS
1（対照）	53.33	1.33	-
2	29.33	1.69	45
3	18.00	1.71	66
4	16.67	1.23	69
5	16.67	1.91	69
6	12.00	1.03	78

【００５９】
ペプチドグリカン群は総て、添加剤としてヌクレオチドのみを投与する処置から有意に異なる生存確率を有していた（ｐ＜０．０５、Log Rank-Wilcoxon）。
【００６０】
投与前相においてヌクレオチドとペプチドグリカンの組合せを含んでなる食餌（処置４、５および６）を給餌された魚は、ヌクレオチドを全く添加せずペプチドグリカンのみを含んでなる食餌（処置３）を給餌された魚と比較して３～１２％高い生存確率を有した。
【００６１】
ヌクレオチドを含む食餌を３週間給餌した後、ヌクレオチドを様々な量のペプチドグリカン（０．００１％　ＰＧまたは０．００５％　ＰＧ）と組み合わせて含んでなる食餌を給餌した魚の生存には差がなかった。しかしながら、魚に、低濃度（０．００１％　ＰＧ）のペプチドグリカンをヌクレオチドと組み合わせたものを４週間の全投与前期間中に給餌したときには（処置６）、驚くべきことには最良の投与後生存率が得られた。
【００６２】
実験１および２からの結論
実験１においてヌクレオチドとペプチドグリカンの組合せを給餌したところ、負の対照（市販の食餌）と比較してPiscirickettsia salmonisに対する耐性が有意に増加した。試験群（ペプチドグリカン＋ヌクレオチド）間の生存率には有意差はなかったが、実験１では投与量を低くすると生存率は増加する傾向があった。
【００６３】
Zhou et al.(2006;「日本カレイ（Paralichthys olivaceus）の先天免疫応答および防護活性に対するＡ３ａ－ペプチドグリカンの食餌用栄養補給物の効果」, Aquaculture 251 , 172-181）は、Vibrio anguillariumを投与した後の日本カレイ（Paralichthys olivaceus）におけるペプチドグリカンの最適投与量として４ｇ　ｋｇ$^{-1}$食餌を見出した。４ｇ　ｋｇ$^{-1}$より低いおよび高い投与量では、いずれも死亡率を増加させることが報告された。同様な用量範囲の効果はブラックタイガーエビ（Penaeus monodon）で観察され、改良された生存率が低めの最適用量で達成された（Boonyaratpalin S. et al. (1995)「ブラックタイガーエビPenaeus monodonの成長、生存、免疫応答およびストレス耐性に対するBrevibacterium lactofermentumから調製したペプチドグリカンの効果」：　アジ

アの水産養殖における疾患II. M. Shariff, J.R. Arthur & RP. Subasinghe （監修），p. 469-477. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines）。

【００６４】

驚くべきことには、ヌクレオチドと組み合わせた０．５ｇ～０．０１ｇ　ＰＧ　ｋｇ$^{-1}$食餌の濃度は、実験１および２における感染した魚の生存を有意に向上させるのに有効であった。更に、ペプチドグリカンは、ヌクレオチドを添加しない実験２における投与後生存の改良では、０．０５ｇ　ｋｇ$^{-1}$飼料程度の濃度で有効であった。

【００６５】

実験２の投与前期間中にヌクレオチドと組み合わせたペプチドグリカンを経口投与したところ、投与後期間の終了時における魚の生存が７８％　ＲＰＳまで有意に保護された（生存確率ｐ＜０．００１、Log Rank-Wilcoxon）。

【００６６】

全投与前相中にヌクレオチドと組み合わせてペプチドグリカンを低濃度（０．００１％　ＰＧ；最終投与量６ｍｇ　ｋｇ$^{-1}$体重）で魚に投与したときに、最良の結果を得た。

【００６７】

実験の結果は、免疫刺激薬と共に投与される適切な水準のヌクレオチドは感染体の投与またはストレスの期間において魚にとって有益と思われることを示している。これらの効果は、細胞個体群が、例えば免疫系刺激の期間中に速やかに増加するときには制限的になるヌクレオチドによることがある。

【００６８】

ペプチドグリカンへの過剰暴露による免疫の負の効果は、文献に記載されている（Matsuo & Miyazono, (1993)は、ＰＧを０．２および２ｍｇ／ｋｇ食餌で経口投与することによりV.anguillarumに対するニジマスの耐病性が高まるが、２８日より長期に投与すると耐病性が減少する可能性があることを報告した）。

【００６９】

実験の結果は、ヌクレオチドがペプチドグリカンによる過剰暴露および／または長期に関するこれらの負の効果を補償することができることを示唆している。

【００７０】

従って、本発明は、魚の健康管理のための重要な改良を表している。

【００７１】

上記した本発明の特徴は、発明の範囲から離反することなしに改質することができることを理解されるであろう。

【００７２】

用語の定義

ペプチドグリカンという用語は、ペプチドグリカンの物質群に属する総ての一般に記載されているおよび未だに記載されていない化合物を包含する。

【００７３】

ヌクレオチドは、ＡＭＰ、ＧＭＰ、ＵＭＰ、ＣＭＰ、ＵＭＰのようなヌクレオシドの任意の既知のリン酸エステルを包含する。

【００７４】

通常の飼料成分は、脂質、タンパク質、ビタミン、炭水化物、ミネラルなどのような特定の動物種の飼料組成物に一般に用いられる飼料成分である。

【００７５】

機能性飼料とは、通常の食餌の一部として消費される従来の食物に外観が類似している可能性がありまたは従来の食物であることがあり、かつ生理学的利点を有しおよび／またはヌクレオチドやペプチドグリカンのような生物活性化合物を含んでなることによって基本的栄養機能を越えてある種の疾患の危険性を減少させることが示されているものである。

【００７６】

サケは、サケ科に属する魚である。代表例は、大西洋サケ（Salmo salar）、ニジマス

（Onchorynchus mykiss）、ギンザケ（Onchorynchus kisutch）である。

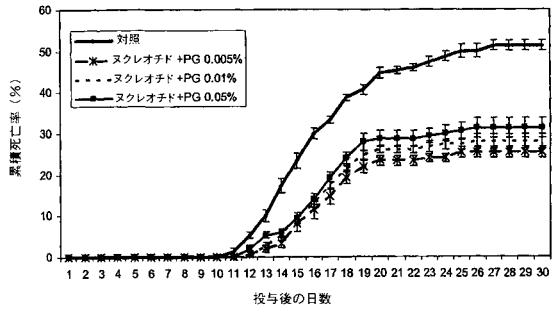
【００７７】

感染性疾患という用語は、例えば、Piscirikettsia salmonis、Moritella viscosa、Francisella種，マウス・ロット（Mouth Rot）、連鎖球菌感染症、ビブリオ感染症のような細菌、膵臓疾患、ＮＳＡＶ、鰓炎症（GI）、心臓・骨格筋炎症（HSMI）、サケ伝染性貧血症（ISA）ウイルス、サプロレグニオシス（Saprolegniosis）、およびウミシラミ感染症（sealice infection）によって引き起こされる一般に知られている動物の感染性疾患を包含する。

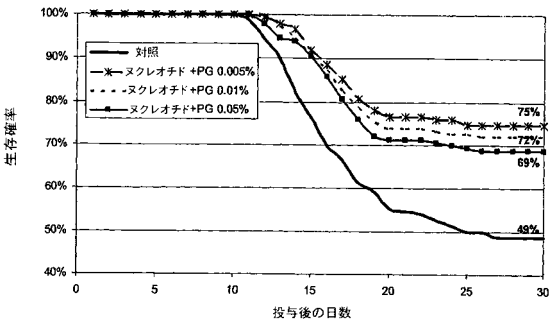
【００７８】

回復という用語は、動物の健康が疾患に冒された後に回復することを意味する。

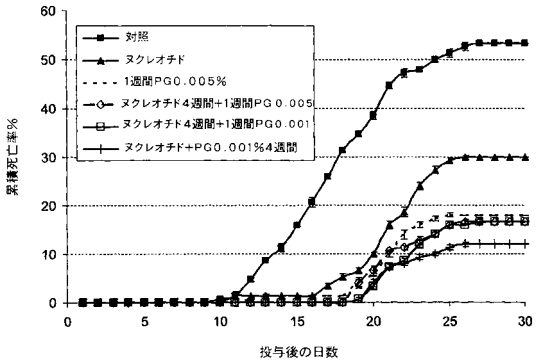
【図１】



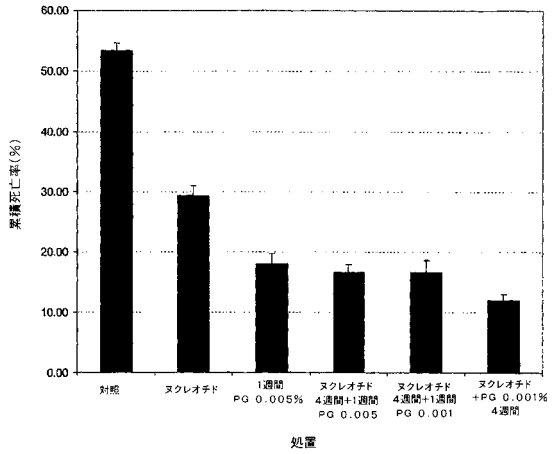
【図２】



【図３】



【図４】


60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
累積死亡率(%)
対照
ヌクレオチド
1週間
PG 0.005%
ヌクレオチド
4週間+1週間
PG 0.005
ヌクレオチド
4週間+1週間
PG 0.001
ヌクレオチド
+PG 0.001%
4週間
処置

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NO2009/000156

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. 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)
A23K

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 practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/095313 A2 (ROAN GROUP INC [US]; DENTONE ALFRED J [US]; GUTHRIE ROBERT A [CA]; GAT) 23 August 2007 (2007-08-23) claims; examples	1-39
X,P	WO 2008/051091 A1 (EWOS INNOVATION AS [NO]; CHEMOFORMA LTD [CH]; GONZALEZ VECINO JOSE L [) 2 May 2008 (2008-05-02) claims; examples	1-39

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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 document 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	Date of mailing of the international search report
13 July 2009	03/08/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Fax: (+31–70) 340–3016	Vernier, Frédéric

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NO2009/000156

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI P ET AL: "Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications" AQUACULTURE, ELSEVIER, vol. 251, no. 2-4, 28 February 2006 (2006-02-28), pages 141-152, XP025040761 ISSN: 0044-8486 [retrieved on 2006-02-28] the whole document	1-39
Y	BURRELLS C ET AL: "Dietary nucleotides: A novel supplement in fish feeds: 1. Effects on resistance to disease in salmonids" 16 July 2001 (2001-07-16), AQUACULTURE, VOL. 199, NR. 1-2, PAGE(S) 159-169 , XP002536762 ISSN: 0044-8486 the whole document	1-39
Y	ZHOU J ET AL: "Effects of dietary supplementation of A3alpha-peptidoglycan on innate immune responses and defense activity of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus)" AQUACULTURE, ELSEVIER, vol. 251, no. 2-4, 28 February 2006 (2006-02-28), pages 172-181, XP025040765 ISSN: 0044-8486 [retrieved on 2006-02-28] the whole document	1-39
Y	EP 1 082 908 A1 (TAIHO PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]; SOMA GENICHIRO [JP]; TAKAHASHI YUKIN) 14 March 2001 (2001-03-14) claims; examples	1-39

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/NO2009/000156

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007095313 A2	23-08-2007	NONE	
WO 2008051091 A1	02-05-2008	NONE	
EP 1082908 A1	14-03-2001	AU 757122 B2	06-02-2003
		AU 3325700 A	16-10-2000
		CA 2333160 A1	05-10-2000
		CN 1306399 A	01-08-2001
		WO 0057719 A1	05-10-2000
		TW 272914 B	11-02-2007

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 45/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00	
Ａ６１Ｐ 31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ａ６１Ｐ 33/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04	
Ａ６１Ｐ 31/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/14	
		Ａ６１Ｐ	31/12	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100107342
弁理士 横田 修孝
(74)代理人 100111730
弁理士 伊藤 武泰
(74)代理人 100137497
弁理士 大森 未知子
(72)発明者 ホセ、エレ．、ゴンサレス、ベシノ
ノルウェー国スタバンゲル、ロブダールスガータ、２２ベー
(72)発明者 サイモン、ワズワース
ノルウェー国ホメルサク、イェルテスシェルベイエン、８

Ｆターム(参考) 2B005 GA01 GA06 GA07
2B150 AA07 AA08 AB10 DC14 DC18 DC19
4C084 AA02 AA19 BA03 BA34 DA41 MA02 NA14 ZB092 ZB112 ZB331
ZB332 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372 ZC651 ZC652
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB33 ZB35 ZB37 ZC65