

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6314250号
(P6314250)

(45) 発行日 平成30年4月18日 (2018. 4. 18)

(24) 登録日 平成30年3月30日 (2018. 3. 30)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 7/00 (2006. 01)

A 2 3 K 50/75 (2016. 01)

A 2 3 K 10/18 (2016. 01)

A 6 1 K 35/76 (2015. 01)

A 6 1 P 31/04 (2006. 01)

C 1 2 N 7/00 Z N A

A 2 3 K 50/75

A 2 3 K 10/18

A 6 1 K 35/76

A 6 1 P 31/04 1 7 1

請求項の数 12 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2016-563041 (P2016-563041)
 (86) (22) 出願日 平成27年4月14日 (2015. 4. 14)
 (65) 公表番号 特表2017-518735 (P2017-518735A)
 (43) 公表日 平成29年7月13日 (2017. 7. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2015/003705
 (87) 国際公開番号 W02015/160165
 (87) 国際公開日 平成27年10月22日 (2015. 10. 22)
 審査請求日 平成28年12月14日 (2016. 12. 14)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0044997
 (32) 優先日 平成26年4月15日 (2014. 4. 15)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

微生物の受託番号 KCCM KCCM11463P

(73) 特許権者 508074963
 シージェイ チェイルジェダン グ コーポ
 レイション
 大韓民国、04560 ソウル、ジュン
 グ、ドングホーロ、330、シージェイ
 チェイルジェダン グ センター
 (74) 代理人 100077665
 弁理士 千葉 剛宏
 (74) 代理人 100116676
 弁理士 宮寺 利幸
 (74) 代理人 100149261
 弁理士 大内 秀治
 (74) 代理人 100136548
 弁理士 仲宗根 康晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新たなバクテリオファージ及びこれを含む組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鳥類病原性大腸菌 (Avian Pathogenic Escherichia coli) に特異的な死滅能を有し、寄託番号が KCCM11463P である、バクテリオファージ φCJ25。

【請求項 2】

請求項 1 の前記バクテリオファージ φCJ25 を有効成分として含み、O-1、O78 及び O-125 の少なくとも何れか 1 つの血清型を有する鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防又は治療用の組成物。

【請求項 3】

前記感染性疾患は、鳥類大腸菌症であることを特徴とする、請求項 2 に記載の鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防又は治療用の組成物。

【請求項 4】

請求項 1 の前記バクテリオファージ φCJ25 を有効成分として含む、抗生剤。

【請求項 5】

請求項 1 の前記バクテリオファージ φCJ25 を有効成分として含む、鳥類用飼料添加剤。

【請求項 6】

請求項 5 の鳥類用飼料添加剤を含む、鳥類用飼料。

【請求項 7】

10

20

請求項 1 の前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む、鳥類用飲用水添加剤。

【請求項 8】

請求項 7 の鳥類用飲用水添加剤を含む、鳥類用飲用水。

【請求項 9】

請求項 1 の前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む、消毒剤。

【請求項 10】

請求項 1 の前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む、洗浄剤。

【請求項 11】

請求項 1 の前記バクテリオファージφCJ25又は請求項 2 の前記組成物を鳥類に投与する段階を含み、O-1、O78 及び O-125 の少なくとも何れか 1 つの血清型を有する鳥類病原性大腸菌による感染性疾患を予防又は治療する方法。

10

【請求項 12】

前記感染性疾患は鳥類大腸菌症であることを特徴とする、請求項 11 に記載の鳥類病原性大腸菌による感染性疾患を予防又は治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は鳥類病原性大腸菌 (APEC) に特異的な死滅能を有する新たなバクテリオファージ、これを含む組成物及び前記新たなバクテリオファージ又は前記組成物を利用し、鳥類の感染性疾患を予防又は治療する方法に関するものである。

20

【背景技術】

【0002】

大腸菌 (*Escherichia coli*、以下「*E. coli*」ともいう) は、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) エシエリキア属 (*Escherichia*) に属するグラム陰性の短桿菌であり、哺乳動物をはじめ多様な動物の腸管内に存在する正常細菌叢の一つである。ほとんどの大腸菌は、日和見感染を誘発することもあるが、非病原性である。しかしながら、一部の高病原性菌株は、ヒトをはじめ動物内で様々な腸疾患及び敗血症などを誘発することが知られている。

【0003】

30

このような大腸菌の中で、特に鳥類病原性大腸菌 (*Avian Pathogenic E. coli*, APEC) は、鳥類、例えば鶏、アヒル、七面鳥などの呼吸器を介して感染を誘発する大腸菌であり、呼吸器の粘膜を通して体内に進入することが知られている。前記鳥類病原性大腸菌は、鳥類の呼吸器疾患を主に家禽類に発病させることなどにより、家禽産業に莫大な経済的被害を与えて問題となっている。

【0004】

一方、バクテリオファージ (*bacteriophage*) は、特定の細菌に感染し、感染した細菌の成長を抑制・阻害する細菌特異的ウイルスを意味する。バクテリオファージは、抗生剤に比べて宿主特異性が強いだけでなく、近年、抗生剤の使用に対する耐性菌出現の問題が深刻になるにつれて、その活用に対する関心が高まっている。

40

【0005】

そして、世界諸国でバクテリオファージに対する研究が活発に行われており、バクテリオファージに関する特許出願と、これを活用した組成物に対して米食品医薬品局 (*Food and Drug Administration*, FDA) の承認などを取得しようとする取り組みが増加している状況である。

【0006】

しかし、養鶏を始めとする鳥類の飼育において重要な問題となっている鳥類病原性大腸菌による感染性疾患を予防及び/又は治療するためのバクテリオファージ関連技術は、いまだに足りない状況であり、したがって、このようなバクテリオファージ及びその関連技術の開発が要求されている。

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らは、抗生剤の使用による耐性菌の出現及び抗生剤の肉類内残留問題などを解決し、大腸菌感染性疾患を効率的に予防及び治療するための研究を重ねた結果、家禽類の呼吸器疾患を起こす鳥類病原性大腸菌に対して特異的な死滅能を有する新たなバクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)を自然界で分離することに至った。

【0008】

また、前記新たなバクテリオファージの形態的、生化学的、遺伝的特性を同定し、前記バクテリオファージの耐酸性、耐熱性及び耐乾性などに優れていることを確認し、これを活用した抗生剤、消毒剤、飼料添加剤、その他の組成物などを開発し、更に鳥類に発病する感染性疾患の予防又は治療用の組成物及びこれを利用した疾患の予防又は治療方法を開発した。

【0009】

本発明は、鳥類病原性大腸菌に特異的な死滅能を有する新たなバクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)の提供を目的とする。

【0010】

また、本発明は、前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)を有効成分として含む、鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防及び/又は治療用組成物を提供することを目的とする。

【0011】

また、本発明は、前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)を有効成分として含む抗生剤、飼料添加剤、飲用水添加剤、飼料、飲用水、消毒剤又は洗浄剤を提供することを目的とする。

【0012】

また、本発明は、前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)又はこれを有効成分として含む組成物を利用し、鳥類病原性大腸菌による感染性疾患を予防及び/又は治療する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明の一例によれば、鳥類病原性大腸菌(Avian Pathogenic Escherichia coli)に特異的な死滅能を有する、新たなバクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)が提供される。

【0014】

本発明の他の一例によれば、前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)を有効成分として含む、鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防又は治療用の組成物が提供される。

【0015】

本発明の更に他の一例によれば、前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)を有効成分として含む抗生剤、飼料添加剤、飲用水添加剤、飼料、飲用水、消毒剤又は洗浄剤が提供される。

【0016】

本発明の更に他の一例によれば、前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)又はこれを有効成分として含む組成物を鳥類に投与する段階を含む、鳥類病原性大腸菌による感染性疾患を予防又は治療する方法が提供される。

【発明の効果】

【0017】

本発明のバクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)は、鳥類病原性大腸菌を特異的に死滅させる効果を奏する。

【0018】

また、本発明の前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)は、耐酸性、耐熱性及び耐乾性に優れていて様々な温度、pH及び乾燥条件範囲で鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防又は治療用の組成物として活用できる。また、前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)を有効成分として含む抗生剤、飼料添加剤、飲用水添加剤、飼料、飲用水、消毒剤又は洗浄剤などに活用できるという効果がある。

【0019】

また、本発明は、前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)又はこれを有効成分として含む抗生剤を提供し、従来の抗生剤に比べて鳥類病原性大腸菌に対する特異性が非常に高く、益菌は殺さずに特定病原菌のみを死滅させることができ、薬物耐性を誘導しないため、従来の抗生剤に比べて製品寿命を延長できるという効果がある。

10

【0020】

また、本発明は、前記バクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)又はこれを有効成分として含む組成物を鳥類に投与すると、鳥類病原性大腸菌による感染性疾患を予防又は治療できるという効果がある。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】新たなバクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)(以下、「ΦCJ25」ともいう)の電子顕微鏡写真である。

【図2】新たなバクテリオファージΦCJ25のPFGE結果を示す図である。

【図3】新たなバクテリオファージΦCJ25のSDS-PAGE結果を示す図である。

20

【図4】新たなバクテリオファージΦCJ25の耐酸性実験結果を示すグラフである。

【図5】新たなバクテリオファージΦCJ25の耐熱性実験結果を示すグラフである。

【図6】新たなバクテリオファージΦCJ25の耐乾性実験結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0022】

以下、本発明に関してより詳しく説明する。本明細書に記載されなかった内容は、当該技術分野又は類似分野の熟練者なら十分に認識・類推できるため、その説明を省略する。

【0023】

本発明の一様態は、鳥類病原性大腸菌(Avian Pathogenic Escherichia coli, APEC)に特異的な死滅能を有する、新たなバクテリオファージΦCJ25(KCCM11463P)(以下、「ΦCJ25」ともいう)を提供する。

30

【0024】

鳥類病原性大腸菌は、鶏、アヒル、七面鳥などの鳥類の呼吸器を介して感染する大腸菌であり、鳥類感染性疾患、具体的には鳥類大腸菌症を誘発する。具体的には、前記鳥類病原性大腸菌は、呼吸器の粘膜を通して鳥類の体内に進入し、敗血症、肉芽腫、気嚢炎、卵管炎、関節炎などの様々な疾患を誘発する大腸菌である。前記鳥類病原性大腸菌は、一般的大腸菌と同様にグラム陰性の桿菌であり、周毛性鞭毛があるため運動性があり、ラクトース(Lactose)、フルクトース(Fructose)を分解して酸とガスを生成する好気性又は通性嫌気性菌である。

40

【0025】

前記鳥類病原性大腸菌は、普段の培地でもよく育ち約7～48の温度で発育が可能であり、発育最適温度は約35ないし約37である。特に鳥類の体温に近い約42で病原性因子の発現が効果的に行われる。また、鳥類病原性大腸菌は、pH4.5～pH9.0の範囲で発育が可能である。

【0026】

バクテリオファージ(bacteriophage)は、特定の細菌に感染し、当該細菌の成長を抑制・阻害する細菌特異的ウイルスであり、単一あるいは二重鎖のDNA(Deoxyribonucleic acid)又はRNA(Ribonucleic acid)を遺伝物質として含むウイルスを意味する。

50

【0027】

具体的に、本発明の一樣態のバクテリオファージΦCJ25は、鳥類病原性大腸菌に選択的に感染する種特異性を有するバクテリオファージであり、正二十面体ヘッド(icosahedral capsid)と収縮性のテール(contractile tail)で構成された構造(図1)を有する、形態学上、マイオウイルス科(Myoviridae)に属するバクテリオファージである。バクテリオファージΦCJ25の塩基配列と他のバクテリオファージの解読塩基配列の相同性を比較した結果は表1に示した。バクテリオファージΦCJ25の耐酸性においてはpH3.5ないしpH11.0まで活性を失わず安定的であり(図4)、耐熱性においては50℃以上(例:53℃)で2時間暴露しても大して活性を失わなかった(図5)。耐乾性においてはバクテリオファージΦCJ25のタイターは、乾燥後に約2ログ(log)程度減少した(図6)。バクテリオファージΦCJ25の塩基配列の一部は、フリーテキスト上の配列番号1である。

10

【0028】

前記バクテリオファージΦCJ25は、本発明者らが新たに分離したバクテリオファージであり、2013年10月25日に韓国微生物保存センター(Korean Culture Center of Microorganisms、ソウル市西大門区弘濟1洞361-221)に寄託番号第KCCM11463Pで寄託した。

【0029】

本発明の他の一樣態によれば、前記バクテリオファージΦCJ25を有効成分として含む、鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防又は治療用組成物が提供される。

20

【0030】

前記バクテリオファージΦCJ25は、鳥類病原性大腸菌を特異的に死滅させる抗菌活性を表すため、鳥類病原性大腸菌の感染で誘発される疾患を予防・治療する目的として利用することができる。前記鳥類病原性大腸菌の感染性疾患例として、鳥類大腸菌症(Avian colibacillosis)を挙げることができるが、これらに制限されるものではない。

【0031】

前記鳥類大腸菌症は、鳥類の呼吸器などに病原性大腸菌が感染して発生する疾患であり、その症状として気嚢炎(airsacculitis)、肝包膜炎(perihepatitis)、腹膜炎(peritonitis)、心臓周囲炎(pericarditis)、卵管炎(salpingitis)、臍炎(omphalitis)、骨髓炎(osteomyelitis)又は敗血症(septicemia)など様々な病変を示し、感染した鳥類の成長低下及びへい死を誘発する。

30

【0032】

本明細書で用いられる用語「予防」は、前記バクテリオファージΦCJ25及び/又は前記バクテリオファージΦCJ25を有効成分として含む組成物を対象体に提供して、該当疾患を抑制したり、発病を遅延させたりする全ての行為を意味する。

【0033】

本明細書で用いられる用語「治療」は、前記バクテリオファージΦCJ25及び/又は前記バクテリオファージΦCJ25を有効成分として含む組成物を対象体に提供して、既に感染した該当疾患の症状を好転又は改善させる全ての行為を意味する。

40

【0034】

本様態の前記鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防又は治療用組成物は、前記バクテリオファージΦCJ25を $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^{12}$ pfu/ml含有してもよく、好ましくは、前記バクテリオファージΦCJ25を $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ pfu/ml含有してもよい。

【0035】

本様態の前記鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防又は治療用組成物は、薬学的に許容可能な担体を追加的に含むことができ、前記担体とともに製剤化され、食品、医薬品、飼料添加剤又は飲用水添加剤などに提供され得る。本明細書で用いられる用語「薬学的

50

に許容可能な担体」は、生物体を刺激せず投与化合物の生物学的活性及び特性を阻害しない担体又は希釈剤を意味する。

【 0 0 3 6 】

本様態で使用可能な前記担体の種類は、特に制限されず、当該技術分野で通常的に使用され、薬学的に許容される担体ならいずれも使用することができる。前記担体の非制限的な例として、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、アルブミン注射溶液、テキストローズ溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノールなどがある。これらは単独又は2種類以上を混合して使用することができる。

【 0 0 3 7 】

また、必要に応じて、抗酸化剤、緩衝液及び/又は静菌剤など他の通常の添加剤を添加して使用することができ、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤及び/又は潤滑剤などを付加的に添加し、水溶液、懸濁液、油濁液などの注射用剤形、丸薬、カプセル、顆粒又は精製などで製剤化して用いることができる。

【 0 0 3 8 】

本様態の前記鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防又は治療用組成物の投与方式は、特に制限されず、当該技術分野で通常的に使用される方式で行うことができる。前記投与方式の非制限的な例として、組成物を経口投与又は非経口投与方式で投与することが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

前記経口投与用の剤形の非制限的な例として、トローチ剤 (t r o c h e s)、ローゼンジ (l o z e n g e)、錠剤、水溶性懸濁液、油性懸濁液、調剤粉末、顆粒、エマルジョン、ハードカプセル、ソフトカプセル、シロップ又はエリキシル剤 (e l i x i r s) などを挙げることができる。

【 0 0 4 0 】

本様態の組成物を錠剤又はカプセルなどの剤形に製剤化するため、ラクトース、サッカロース (S a c c h a r o s e)、ソルビトール (S o r b i t o l)、マンニトール (M a n n i t o l)、デンプン、アミロペクチン (A m y l o p e c t i n)、セルロース (C e l l u l o s e) 又はゼラチン (G e l a t i n) などの結合剤；ジカルシウムホスフェート (d i c a l c i u m p h o s p h a t e) などの賦形剤；トウモロコシデンプン又はサツマイモデンプンなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム (m a g n e s i u m s t e a r a t e)、ステアリン酸カルシウム (c a l c i u m s t e a r a t e)、フマル酸ステアリルナトリウム (s o d i u m s t e a r y l f u m a r a t e) 又はポリエチレングリコールワックス (p o l y e t h y l e n e g l y c o l w a x) などの潤滑剤などを含ませることが可能であり、カプセル剤形の場合には上述した物質以外にも脂肪油などの液体担体などを更に含ませることができる。

【 0 0 4 1 】

本様態の組成物を非経口投与する方法として、例えば静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮下投与又は局部投与などを利用することが可能であり、前記組成物を疾患部位に塗布又は噴霧する方法も利用することができるが、これらに制限されることはない。

【 0 0 4 2 】

前記非経口投与用の剤形として、例えば皮下注射、静脈注射又は筋肉内注射などの注射用形態；坐剤注入方式；又は呼吸器を通して吸入を可能とするエアロゾル剤などのスプレー用として製剤化することができるが、これらに制限されることはない。前記注射用剤形として製剤化するためには、本様態の組成物を安定剤又は緩衝剤とともに水に混合した溶液又は懸濁液として製造し、これをアンプル (a m p o u l e) 又はバイアル (v i a l) の単位投与用に製剤化することができる。前記エアロゾル剤などのスプレー用として剤形化する場合、水分散された濃縮物又は湿潤粉末が分散できるように、推進剤などを添加剤とともに配合することができる。

【 0 0 4 3 】

本様態の前記鳥類病原性大腸菌による感染性疾患の予防又は治療用組成物の適切な塗布

10

20

30

40

50

、噴霧又は投与量は、前記組成物の製剤化方法、投与方式、投与時間及び／又は投与経路と、投与対象となる動物の年齢、体重、性別、疾病症状の程度、摂取する食べ物、排泄速度などの要因によって可変的であり、一般的に熟練した獣医師なら目的とする治療に効果的な投与量を容易に決定して処方することができる。

【 0 0 4 4 】

本発明の更に他の一様態によれば、前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む抗生剤が提供される。

【 0 0 4 5 】

本明細書で用いられる用語「抗生剤」は、薬剤の形態としてヒトを含む対象体に提供され、菌を死滅させることが可能な効能を有する製剤を意味し、防腐剤、殺菌剤及び抗菌剤を総称する概念である。

10

【 0 0 4 6 】

本様態の前記バクテリオファージφCJ25又はこれが含まれた組成物を有効成分として含む抗生剤は、従来の抗生剤に比べて鳥類病原性大腸菌に対する特異性が非常に高いため、益菌は殺さずに特定の病原菌のみを死滅させることができ、薬物耐性を誘導しないため、従来の抗生剤に比べて製品寿命を延長できる効果がある。

【 0 0 4 7 】

本発明の更に他の一様態によれば、前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む鳥類用飼料添加剤又は飲用水添加剤が提供される。

【 0 0 4 8 】

20

前記鳥類用飼料添加剤又は飲用水添加剤の適用対象である「鳥類」は、特に限定されるものではなく、本様態において、前記鳥類は、具体的には家禽類であってもよい。

【 0 0 4 9 】

本発明で用いられる用語「家禽類」は、家畜の中で鳥類に属する動物を総称する概念である。前記家禽類は特に限定されないが、鶏、アヒル及び七面鳥などからなる群より選択される一つ以上を含むことができる。

【 0 0 5 0 】

本様態の前記鳥類用飼料添加剤又は飲用水添加剤は、前記バクテリオファージφCJ25又はこれを含む組成物を飼料添加剤又は飲用水添加剤の形態として別に製造して飼料又は飲用水に混合する方式で使用するか、前記バクテリオファージφCJ25又はこれを含む組成物を、飼料又は飲用水を製造する際に、直接添加する方式で 사용할 こと が 可 能 である。

30

【 0 0 5 1 】

本様態の前記飼料添加剤又は飲用水添加剤として用いられる前記バクテリオファージφCJ25又は前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む組成物は、液状又は乾燥状態であり、例えば、乾燥した粉末形態であってもよい。

【 0 0 5 2 】

例えば、本発明のバクテリオファージφCJ25は、粉末形態として飼料添加剤重量の0.05～10重量%、好ましくは、0.1～2重量%の割合で混合され得る。

【 0 0 5 3 】

40

本様態の前記飼料添加剤又は飲用水添加剤を乾燥した粉末形態として製造するための乾燥方法は、特に制限されず、当該技術分野における通常的な方法を用いることができる。前記乾燥方法の非制限的な例として、通風乾燥、自然乾燥、噴霧乾燥、凍結乾燥などがある。これらは単独又は二つ以上の方法を共に利用する方式で行うことができる。

【 0 0 5 4 】

本様態の前記飼料添加剤又は飲用水添加剤には、非病原性の他の微生物を追加的に添加することができる。添加できる前記微生物の非制限的な例として、タンパク質分解酵素、脂質分解酵素及び／又は糖転換酵素の生産が可能であるバチルス・ブチリス (*Bacillus subtilis*) などの枯草菌；牛の胃のような嫌気的条件下で生理的活性及び有機物分解能を有するラクトバチルス菌株 (*Lactobacillus* sp.) な

50

どの乳酸菌；家畜の体重と牛乳の産乳量を増加させ飼料の消化吸収率を高める効果があるアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) などの糸状菌；及びサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母；からなる群より選択され得る。これらは、単独又は２種類以上を混合して使用することができる。

【 0 0 5 5 】

本様態の前記バクテリオファージΦCJ25を有効成分として含む飼料添加剤又は飲用水添加剤は、必要に応じて他の添加剤を更に含ませることができる。使用できる前記添加剤の非制限的な例として、飼料又は飲用水の品質低下を防止するために添加する決着剤、油化剤、保存剤など；飼料又は飲用水の効用増大のため添加するアミノ酸剤、ビタミン剤、酵素剤、生菌剤、香味剤、非タンパク質態窒素化合物、ケイ酸塩剤、緩衝剤、着色剤、抽出剤又はオリゴ糖などがあり、その他飼料混合剤などが含まれ得る。これらは単独で使用されてもよいし、２種類以上が共に添加されてもよい。

10

【 0 0 5 6 】

本発明の前記飼料添加剤は、飼料１００重量部に対して、０．０５～１０重量部で含まれることが好ましく、０．１～２重量部で含まれることがより好ましい。本発明の前記飲用水添加剤は、飲用水１００重量部に対して、０．０００１～０．０１の重量部で含まれることが好ましく、０．００１～０．００５重量部で含まれることがより好ましい。前記範囲内では、鳥類病原性大腸菌に対するバクテリオファージΦCJ25の活性が十分に発揮できるという利点がある。

20

【 0 0 5 7 】

本発明の更に他の一様態によれば、前記バクテリオファージΦCJ25を有効成分として含む飼料添加剤又は飲用水添加剤を飼料又は飲用水に添加するか、前記バクテリオファージΦCJ25を飼料又は飲用水に直接添加して製造する飼料又は飲用水が提供される。

【 0 0 5 8 】

本様態で用いられる飼料は、特に制限されず、当該技術分野における通常的な飼料を用いることができる。前記飼料の非制限的な例として、穀物類、根果類、食品加工副産物類、藻類、繊維質類、製菓副産物類、油脂類、デンプン類、フクベ類又は穀物副産物類などの植物性飼料；タンパク質類、無機物類、油脂類、鉱物性類、単細胞タンパク質類、動物性プランクトン類又は飲食物などの動物性飼料などがある。これらは、単独又は２種類以上を混合して使用することができる。

30

【 0 0 5 9 】

本様態で用いられる飲用水は、特に制限されず、当該技術分野における通常的な飲用水を用いることができる。

【 0 0 6 0 】

本発明の更に他の一様態によれば、前記バクテリオファージΦCJ25を有効成分として含む、消毒剤又は洗浄剤が提供される。前記消毒剤又は洗浄剤の剤形は特に制限されず、当該技術分野で知られた剤形で製造されて使用され得る。

【 0 0 6 1 】

前記消毒剤は、鳥類病原性大腸菌を除去するために撒布することができ、鳥類の活動領域、屠畜場、へい死地域、調理場所又は調理設備などに撒布することができるが、これらに制限されることはない。

40

【 0 0 6 2 】

前記洗浄剤は、鳥類病原性大腸菌に暴露されたか、暴露される可能性のある鳥類の皮膚表面又は身体の一部などを洗浄する用途で用いることができるが、これらに制限されることはない。

【 0 0 6 3 】

本発明の更に他の一様態によれば、前記バクテリオファージΦCJ25又はこれを有効成分として含む組成物を利用し、鳥類病原性大腸菌による感染性疾患を予防又は治療する方法が提供される。

50

【 0 0 6 4 】

本発明の更に他の一様態によれば、鳥類病原性大腸菌に感染したか感染する恐れがある鳥類に前記バクテリオファージφCJ25又は前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む組成物を薬学的に有効な量で投与する段階を含む。前記バクテリオファージφCJ25又はこれを含む組成物の適切な1日当たりの総使用量は、正しい医学的判断の範囲内で医師によって決定され、これは当該技術分野における通常の知識を有する者において自明なことである。

【 0 0 6 5 】

特定の鳥類に対する前記バクテリオファージφCJ25又は前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む組成物の具体的な薬学的有効量は、達成しようとする反応の種類と程度、該当個体の年齢、体重、一般的な健康状態、性別又は食餌はもちろん、前記バクテリオファージφCJ25又はこれを含む組成物の投与時間、投与経路及び組成物の分泌率、治療期間などを考慮して決定することが可能であり、同時又は異時において共に使用される薬物とその他の組成物の成分などをはじめとした多数の因子及び医薬分野においてよく知られている類似因子にしたがって可変的である。

【 0 0 6 6 】

本発明の前記バクテリオファージφCJ25又は前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む組成物は、薬学的製剤の形態として鳥類に噴霧式鼻腔投与、鳥類の飼料又は飲用水に直接添加しこれを摂食させる方式で投与することが可能であり、飼料添加剤又は飲用水添加剤の形態で飼料又は飲用水に混合して投与することができる。

【 0 0 6 7 】

本様態の前記バクテリオファージφCJ25又は前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む組成物の投与経路及び投与方式は、特に制限されず、目的とする該当組織に前記バクテリオファージφCJ25又はこれを含む組成物を到達させることができる限り、任意の投与経路及び投与方式で行うことができる。すなわち、前記バクテリオファージφCJ25又は前記バクテリオファージφCJ25を有効成分として含む組成物は、経口又は非経口の様々な経路を介して投与することが可能であり、その投与経路の非制限的な例として、口腔、直腸、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、経皮、鼻側内又は吸入などに投与され得る。

【 0 0 6 8 】

以下、実施例をもって本発明をより詳しく説明する。ただし、これらの実施例は本発明を例示的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されることはない。

【 0 0 6 9 】

[実施例 1]

鳥類病原性大腸菌に感染するバクテリオファージの分離

【 0 0 7 0 】

< 実施例 1 - 1 >

バクテリオファージスクリーニング及び単一バクテリオファージの分離

韓国忠清道清原郡にある養鶏農場で鶏の糞便から得た試料50mlを4000rpmで10分間遠心分離した後、その上澄み液を0.45µmのフィルターで濾過して、試料液を用意し、これを利用してソフトアガーオーバーレイ(soft agar overlay)方法を行った。前記ソフトアガーオーバーレイ方法は、トップアガー(top agar、0.7%の寒天を利用して固体培地上に付着させたもの)で成長した宿主細胞を利用してバクテリオファージが溶菌することを観察する方法をいう。

【 0 0 7 1 】

具体的には、建国大学校獣医科大学で入手した鳥類病原性大腸菌(E09-19)の振とう培養液(OD₆₀₀=2)150µlと、10×LB培地(トリプトファン(tryptopan)10g/l;酵母抽出物5g/l;NaCl(10g/l)2mlに前記試料液18mlを混合し、これを30で18時間培養した後、前記培養液を400

10

20

30

40

50

0 rpmで10分間遠心分離し、その上澄み液を0.45 µmのフィルターで濾過した。その後、LB平板培地上に0.7% (w/v) 寒天3 mlと鳥類病原性大腸菌 (E09-19) 振とう培養液 ($OD_{600} = 2$) 150 µlの混合液を注いで固まった後、その上に試料液10 µlを滴加し、30 で18時間培養して、溶菌斑の形成を確認した。

【0072】

一つの溶菌斑には一種類のバクテリオファージが存在すると知られているため、形成された前記溶菌斑から単一バクテリオファージを分離した。具体的には、前記溶菌斑を400 µlのSM溶液 (NaCl 5.8 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/l; 1M Tris-HCl (pH 7.5) 50 ml) に加えて室温で4時間放置し、バクテリオファージ溶液を得た。

10

【0073】

続いて、前記バクテリオファージ溶液100 µlを0.7% (w/v) 寒天12 ml及び鳥類病原性大腸菌 (E09-19) 振とう培養液 ($OD_{600} = 2$) 500 µlと混合し、150 mm直径のLB平板培地を利用したソフトアガーオーバーレイ方法を行い、完全に溶菌するまで培養した。培養が終わった後、前記LB平板培地に15 mlのSM溶液を加えて室温で4時間放置し、バクテリオファージ溶液を得た。

【0074】

前記溶液を回収し、1% (v/v) クロロホルムを加えた後、10分間混合し4000 rpmで10分間遠心分離して上澄み液を得て、前記上澄み液を0.45 µmのフィルターで濾過し、最終試料を得た。

20

【0075】

<実施例1-2>

バクテリオファージの大量培養及び精製

実施例1-1で得た前記バクテリオファージを、鳥類病原性大腸菌 (E09-19) を利用して大量培養し、これからバクテリオファージを精製した。

【0076】

具体的には、鳥類病原性大腸菌 (E09-19) を振とう培養して 1.5×10^{10} cfuとなるように分注し、4000 rpmで10分間遠心分離した後、これを4 mlのSM溶液に再浮遊させた。ここに前記バクテリオファージを 1.5×10^6 pfuで接種し、MOI (multiplicity of infection) = 0.0001で滴定した後、常温で20分間静置した。

30

【0077】

続いて、これを150 mlのLB培地に接種し、30 で6時間培養した。培養が終了した後、最終体積の1% (v/v) となるようにクロロホルムを添加し、20分間攪拌し、制限酵素であるDNase IとRNase Aの各々を最終濃度が1 µg/mlとなるように添加し、30 で30分間静置した。その後、最終濃度が各々1 Mと10% (w/v) となるように塩化ナトリウムとポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) を加えて4 で3時間更に静置し、4 及び12000 rpmで20分間遠心分離して沈殿物を得た。

【0078】

得られた前記沈殿物を5 mlのSM溶液で懸濁させ20分間室温で静置した後、クロロホルム1 mlを加えて攪拌し、4 及び4000 rpmで20分間遠心分離して上澄み液を得た。前記上澄み液を0.45 µmのフィルターで濾過した後、グリセロール密度勾配法 (密度: 40%、5%グリセロール) を利用した超遠心分離 (35000 rpm、1時間、4) を行ってバクテリオファージを精製した。

40

【0079】

本発明者らは農場の糞便サンプルから試料を採取し、鳥類病原性大腸菌 (Avian Pathogenic E. coli, APEC) に対する特異的の死滅能を有する前記バクテリオファージを「Bacteriophage ΦCJ25」と命名し、2013年10月25日韓国微生物保存センター (Korean Culture Center

50

of Microorganisms、ソウル市西大門区弘濟 1 洞 3 6 1 - 2 2 1) に寄託番号第 K C C M 1 1 4 6 3 P 号で寄託した。

【 0 0 8 0 】

< 実施例 2 >

Φ C J 2 5 の形態観察

前記実施例 1 で精製したバクテリオファージ Φ C J 2 5 を 0 . 0 1 % のゼラチン溶液に希釈し、2 . 5 % グルタルアルデヒド (glutaraldehyde) 溶液で固定した。これを炭素コーティングした雲母板 (carbon-coated mica plate (約 2 . 5 mm × 2 . 5 mm)) に滴下し、1 0 分間適応させた後、滅菌蒸留水で洗浄した。

10

【 0 0 8 1 】

その後、炭素被膜 (carbon film) を銅グリッド (copper grid) に挟んで 2 % ウラニルアセテート (uranyl acetate) で 6 0 秒間染色して乾燥した後、透過電子顕微鏡 (J E M - 1 0 1 1 、 8 0 k V 、倍率 × 2 0 0 0 0 0) で検鏡した (図 1) 。

【 0 0 8 2 】

図 1 は、バクテリオファージ Φ C J 2 5 の透過電子顕微鏡写真であり、バクテリオファージ Φ C J 2 5 は、約 8 3 nm サイズの正二十面体ヘッドと収縮性のテール (contractile tail) で構成された形態型 (morphotype) A 1 のマイオウイルス科 (myobiridae) に属することが分かった。

20

【 0 0 8 3 】

< 実施例 3 >

Φ C J 2 5 の全ゲノム DNA のサイズ分析

前記実施例 1 で精製したバクテリオファージ Φ C J 2 5 からゲノム DNA を抽出した。

【 0 0 8 4 】

具体的には、精製されたバクテリオファージ Φ C J 2 5 の培養液に 2 0 mM の E D T A (Ethylenediaminetetraacetic acid) 、 5 0 μ g / ml のタンパク質分解酵素 (proteinase K) 、及び 0 . 5 % (w / v) の S D S (sodium dodecyl sulfate) を加えて、5 0 で 1 時間静置し、同一体積のフェノール (pH 8 . 0) を加えて撹拌した後、室温及び 1 2 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離し、上澄み液を得た。

30

【 0 0 8 5 】

前記上澄み液を同一体積の P C (フェノール : クロロホルム = 1 : 1) と混合し、室温及び 1 2 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離して、上澄み液を得た。前記上澄み液を同一体積のクロロホルムと混合し、室温及び 1 2 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離して、その上澄み液を得た。前記上澄み液に 3 M の酢酸ナトリウム (sodium acetate) を全体体積に対して 1 0 % (v / v) となるように加えて混合し、2 倍体積の冷たい 9 5 % エタノールを更に加えて混合した後、- 2 0 で 1 時間静置した。

【 0 0 8 6 】

続いて、0 で 1 0 分間 1 2 0 0 0 r p m で遠心分離した後、上澄み液を除去して沈殿物を得た後、これに 5 0 μ l の T E 緩衝液 (Tris - EDTA 、 pH 8 . 0) を加えて溶解させた。前記抽出した DNA を 1 0 倍希釈し O D _{2 6 0} で吸光度を測定し、濃度を測った。

40

【 0 0 8 7 】

その後、1 μ g の DNA を 1 % P F G E (pulse-field gel electrophoresis) アガロースゲルにロードし、バイオラッド (B I O R A D) P F G E システム 7 番のプログラム (サイズ範囲 2 5 k b ~ 1 0 0 k b ; スイッチタイムランプ (switch time ramp) 0 . 4 秒 ~ 2 . 0 秒、線形 (linear shape) ; 順方向電圧 (forward voltage) 1 8 0 V ; 逆方向電圧 (reverse voltage) 1 2 0 V) を利用して常温で 2 0 時間展開させた (

50

図 2)。

【 0 0 8 8 】

図 2 は、バクテリオファージ ϕ C J 2 5 のゲノム DNA の電気泳動写真であり、バクテリオファージ ϕ C J 2 5 のゲノム DNA は、約 3 9 k b p のサイズであることを確認することができた。

【 0 0 8 9 】

< 実施例 4 >

ϕ C J 2 5 のタンパク質パターンの分析

1 0¹¹ p f u / m l タイター (t i t e r) の精製されたバクテリオファージ ϕ C J 2 5 溶液 1 5 μ l と、5 $\times$ S D S 試料溶液 3 μ l とを混合し、5 分間沸騰させた後、1 2 % S D S - P A G E を行った (図 3) 。

【 0 0 9 0 】

図 3 は、バクテリオファージ ϕ C J 2 5 を対象として行った S D S - P A G E 結果を表す電気泳動写真であり、約 4 3 k D a、4 9 . 3 k D a、6 0 . 4 k D a、9 4 . 9 k D a サイズの主要タンパク質を確認することができた。

【 0 0 9 1 】

< 実施例 5 >

ϕ C J 2 5 の遺伝的特性の分析

前記実施例 1 で精製されたバクテリオファージ ϕ C J 2 5 の遺伝的特性を調べるため、バクテリオファージ ϕ C J 2 5 の DNA を遺伝子分析機器である F L X チタニウムシーケンサー (t i t a n i u m s e q u e n c e r) (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製) を用いて分析した。株式会社マクロジェン (M a c r o g e n I n c .) で、G S とデ・ノボアセンブリソフトウェア (d e n o v o a s s e m b l e r s o f t w a r e) (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製) を用いて遺伝子の組換えを行った。オープンリーディングフレーム (o p e n r e a d i n g f r a m e) は G e n e M A r k . h m m、G l i m m e r v 3 . 0 2 及び F G E N E S B ソフトウェアを用いて行われた。B L A S T P とインタープロスキャン (I n t e r P r o S c a n) プログラムを用いてオープンリーディングフレームの名称を命名 (a n n o t a t i o n) した。

【 0 0 9 2 】

前記バクテリオファージの塩基配列は、従来に報告されたバクテリオファージ (E n t e r o b a c t e r i a p h a g e E c o D S 1) の塩基配列と様々な類似性を示したが、全てのフラグメントが 1 0 0 % 一致するバクテリオファージは存在しなかったことを確認した。これにより、前記バクテリオファージは、新たに分離されたバクテリオファージであることを確認することができた。

【 0 0 9 3 】

表 1 は、バクテリオファージ ϕ C J 2 5 の塩基配列と、他のバクテリオファージの解読塩基配列との相同性を比較した結果を示す。

【 0 0 9 4 】

【 表 1 】

(表 1)

Query				Subject	Identities		
Name	Length	Start	End	Description	E-Value	Match/Total	Pct. (%)
配列番号1	39618	1	9030	Enterobacteria phage EcoDS1, complete genome	0	8653/9041	95

10

20

30

40

50

【0095】

前記製造されたバクテリオファージφCJ25のDNAを、遺伝子分析機器を用いて分析した全塩基配列の結果は、配列番号1である。

【0096】

<実施例6>

pHによるφCJ25の安定性の調査

バクテリオファージφCJ25が胃腸内の条件と同様に低いpHで安定性を保つことができるかを確認するため、様々なpH範囲(pH2.5、3.0、3.5、4.0、5.5、6.5、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0)で安定性の調査実験を行った。

10

【0097】

実験のための様々なpH溶液(酢酸ナトリウム緩衝溶液(pH4.0、pH4.5、pH5.0、pH5.5)、クエン酸ナトリウム緩衝溶液(pH2.5、pH3.0、pH3.5)、リン酸ナトリウム緩衝溶液(pH6.5及びpH7.0)、Tris-HCl溶液(pH8.0、pH9.0、pH10.0、pH11.0))を各々0.2Mで製造した。

【0098】

前記各pH溶液180μlと、 1.0×10^{10} pfu/mlタイターのバクテリオファージ溶液20μlとを混ぜた後、2時間常温で静置した。対照群は同一方法で 1.0×10^{10} pfu/mlバクテリオファージ溶液20μlをSM溶液180μlに混ぜた後、2時間常温で静置した。その後、これらを段階希釈し、ソフトアガーオーバーレイ方法を利用して各段階の希釈液を10μlずつ滴下した後、30で18時間培養し、溶菌の有無によってタイターを測定した(図4)。

20

【0099】

図4は、バクテリオファージφCJ25の耐酸性実験結果を表したものである。図4に示した通り、対照群に比べてバクテリオファージφCJ25は、pH3.5からpH11.0まで活性を失うことなく安定的であることが確認された。

【0100】

<実施例7>

温度によるφCJ25の安定性の調査

30

バクテリオファージの製品剤形の中で飼料添加剤として利用した場合、バクテリオファージの剤形過程において熱が発生する可能性があり、熱に対する安定性を確認するため下記の実験を行った。

【0101】

具体的には、 1.25×10^{10} pfu/ml濃度のバクテリオファージφCJ25の溶液100μlを、37、45、53、60で、10分、30分、60分、120分静置した後、得られた実験培養液を段階希釈し、ソフトアガーオーバーレイ方法で各段階の希釈液を10μlずつ滴下した後、30で18時間培養して溶菌の有無によってタイターを測定した(図5)。

【0102】

40

図5は、バクテリオファージφCJ25の耐熱性実験結果を表したものである。図5に示した通り、バクテリオファージφCJ25は、53においては120分暴露されても活性が減少せず、60においては120分暴露されるまでの間に減少した活性が約1ログ(log)以下であった。

【0103】

<実施例8>

乾燥に対する安定性の調査

バクテリオファージの製品剤形の中で飼料添加剤として利用する場合、バクテリオファージの剤形過程で乾燥過程があり、乾燥条件に対するφCJ25の安定性を確認するため、下記の実験を行った。

50

【0104】

耐熱性確認実験によって導出した結果に基づいて、真空濃縮遠心分離機 (Speed Vac concentrator) を利用し、乾燥実験を行った。 1.2×10^{10} pfu/ml タイターの ϕ CJ25 の溶液 200 μ l を 2 時間 60 で真空乾燥し、得られたペレット (pellet) を SM 溶液 200 μ l に入れて 4 で 1 日間完全に再浮遊させた後、タイターを測定した (図 6)。

【0105】

図 6 は、バクテリオファージ ϕ CJ25 の耐乾性実験結果を表したものである。図 6 に示した通り、乾燥後に、元のタイターと相対的な安定性を比較すると、60 で 2 時間乾燥した場合に減少した活性は、約 2 ログ (log) 以下であることが分かった。

10

【0106】

< 実施例 9 >

野生分離株の鳥類病原性大腸菌に対する ϕ CJ25 の感染範囲の調査

バクテリオファージ ϕ CJ25 が、実験で用いられた鳥類病原性大腸菌 (E09-19) 以外に、建国大学校獣医科大学で分離した野生分離鳥類病原性大腸菌 46 株、検疫院で分離した鳥類病原性大腸菌 10 株、全北大獣医科大学で分離した鳥類病原性大腸菌 7 株、コミファーム農場で分離した病性鑑定鳥類病原性大腸菌 26 株に対して溶菌活性の有無を確認した。

【0107】

具体的には、各菌株の振とう培養液 ($OD_{600} = 2$) 150 μ l を混ぜてソフトアガーオーバーレイ方法を行い、 10^9 pfu/ml タイターのバクテリオファージ ϕ CJ25 の溶液を 10 μ l ずつ滴下した後、30 で 18 時間培養して溶菌斑形成の有無を観察した (表 2)。前記結果は下表 2 に示した。

20

【0108】

【表 2】

No.	建国大 strains	serotypin g	ΦCJ25	No.	検疫院strains	serotypin g	ΦCJ25
1	E09-1		0	48	06Q-035	0-78	0
2	E09-2		0	49	06D-044	0-78	
3	E09-3		0	50	06Q-140	0-78	0
4	E09-4		0	51	07D-001	0-78	0
5	E09-5		0	52	07D-022	0-78	0
6	E09-6	0-78	0	53	07Q-039	0-78	0
7	E09-7		0	54	KWU-02	0-78	0
8	E09-8	0-78	0	55	KWU-32	0-78	0
9	E09-9	0-78	0	56	KWU-33	0-78	
10	E09-10		0	57	KWU-43	0-78	0
11	E09-11	0-78	0	No.	全北大strains	serotypin g	ΦCJ25
12	E09-12	0-125	0				
13	E09-13		0	58	A12-MRA-076-①		0
14	E09-14		0	59	A10-LSf-005		
15	E09-15		0	60	A11-LSF-043		
16	E09-16		0	61	A12-MRA-076-②		
17	E09-17		0	62	D12-JW-058		0
18	E09-18			63	A12-LSF-083	0-78	

10

20

30

40

19	E09-19		0	64	A12-MRA-076-③		0
20	E09-20		0	No.	コミファーム strains	serotypin g	ΦCJ25
21	E09-21		0				
22	E09-22		0	65	12-001-3		0
23	E09-23		0	66	12-053		0
24	E09-24		0	67	12-055		0
25	E09-25		0	68	12-086-1	0-78	0
26	E09-26		0	69	12-086-2	0-78	0
27	E09-27		0	70	12-096-3		0
28	E09-28		0	71	12-175		0
29	E09-29		0	72	12-187	0-78	0
30	E09-30		0	73	12-211-5		0
31	E09-31		0	74	12-220-4		0
32	E09-32		0	75	12-220-6		0
33	E09-33		0	76	12-248		0
34	E09-34		0	77	12-261-1		0
35	E09-35 (297)	0-78		78	12-266		0
36	E09-36 (343)		0	79	12-274-1		0
37	E09-37 (343)		0	80	12-275-2	0-78	0
38	E09-38 (343)		0	81	12-286-2		0
39	E09-39 (353)		0	82	12-300	0-78	

10

20

30

40

40	E09-40(353)		0	83	12-303-2	0-78	0
41	E09-41(376)		0	84	12-304-3		0
42	E09-42(376)		0	85	12-299-1	0-78	0
43	E102	0-1	0	86	12-299-2	0-78	0
44	E103	0-78	0	87	12-299-3	0-78	0
45	E104	0-78	0	88	12-324	0-78	0
46	E105	0-78		89	12-338-1	0-78	
47	E106			90	12-338-4	0-78	

10

【 0 1 0 9 】

表 2 で示した通り、バクテリオファージφCJ25 は、一般の養鶏農家で鳥類大腸菌症の原因菌である鳥類病原性大腸菌のうち、最も頻繁に検出される O - 7 8 血清型とその他 (O - 1 、 O - 1 2 5) に対して広くかつ効果的な感染能を示すことが確認された。

20

【 配列表フリーテキスト 】

【 0 1 1 0 】

配列表を添付して提出。

【 0 1 1 1 】

出願人または代理人 のファイル参照番号	P14-5114	国際出願番号
------------------------	----------	--------

寄託された微生物またはその他生物学的物質の表示事項

(特許協力条約規則第13条の2)

A 下記の表示事項は明細書 18ページ、164行目に記載された寄託微生物又は ¹⁾ その他の生物学的物質に関するものである。	
B. 寄託物の確認 以外の追加的寄託物は次の別度のページに記載	
寄託機関の名称 KCCM韓国微生物培養所	
寄託機関の住所(郵便番号及び国名を含む) 韓国120-861 ソウル市西大門区弘済内2街ギル45、ユリムBldg.	
寄託日2013年12月25日	寄託番号 KCCM11463P
C. 追加的表示事項(記載事項がなければ空欄で提出) 別の追加ページが続く ☐	
D. 表示事項が指定している指定国(表示事項が全ての指定国のための事項でない場合)	
E. 表示事項の別度提出(記載事項がなければ空欄で提出)	
下記の表示事項は後で国際事務局に提出される(表示事項の一般的性質を特定したもの) ¹⁾	

10

20

30

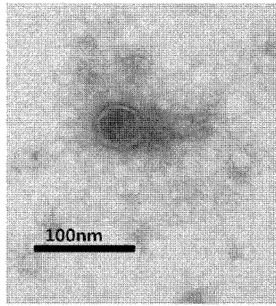
受理官庁の使用欄	国際事務局の使用欄
☐ 当該要旨は国際出願と同時に受け付けられた。	☐ 当該要旨は国際出願と同時に受け付けられた。
担当官	担当官

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

40

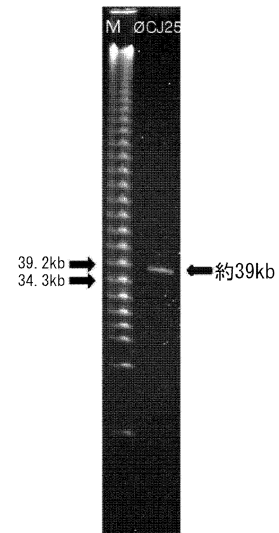
【図 1】

FIG. 1



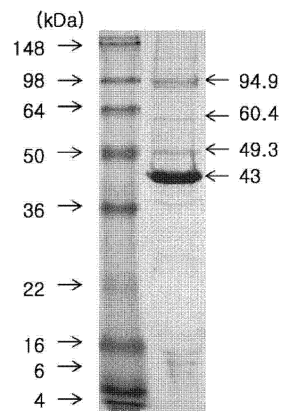
【図 2】

FIG. 2



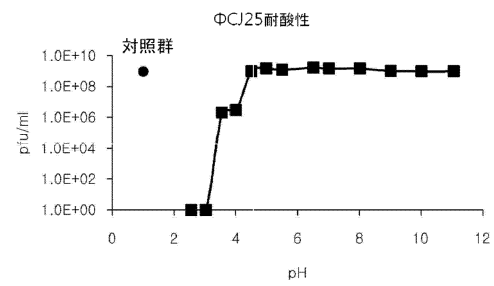
【図 3】

FIG. 3



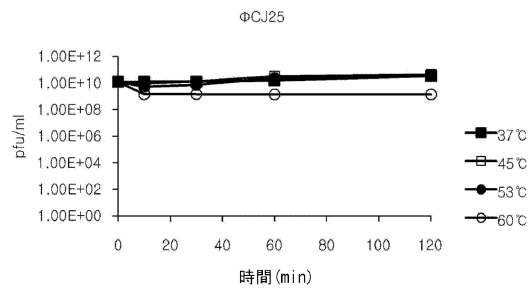
【図 4】

FIG. 4



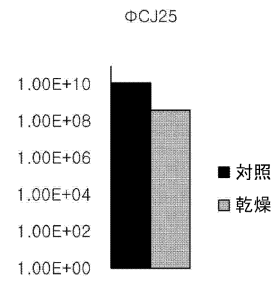
【図 5】

FIG. 5



【図 6】

FIG. 6



【配列表】

0006314250000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100136641

弁理士 坂井 志郎

(72)発明者 シン、エウン ミ

大韓民国、157-776 ソウル、ガングセオ - グ、ヤングチェオン - ロ 6 - ギル、28、1
208 - 1208

(72)発明者 バエ、ギ デュク

大韓民国、157-210 ソウル、ガングセオ - グ、ヤングチェオン - ロ 47 - ギル、118
、105 - 1402

(72)発明者 キム、ジャエ ウォン

大韓民国、446-721 ギェオングギ - ド、ヨンギン - シ、ギヘウング - グ、ドングバエク
7 - ロ、97、2302 - 1702

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 韓国登録特許第10 - 1299179 (KR, B1)

韓国公開特許第10 - 2012 - 0111535 (KR, A)

Veterinary Microbiology, 2013.11.04 (available online), Vol.171, No.3-4, pp.470-479

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 7/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

PubMed