(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3720710号
(P3720710)
(45)発行日　平成17年11月30日(2005.11.30)　(24)登録日　平成17年9月16日(2005.9.16)

| (51)Int.Cl.[7] | F I | | |
|---|---|---|---|
| A61K 31/197 | A61K | 31/197 | |
| A01K 61/00 | A01K | 61/00 | B |
| A01N 37/44 | A01N | 37/44 | |
| A23K 1/16 | A23K | 1/16 | 301F |
| A23K 1/18 | A23K | 1/18 | 102A |

請求項の数 1　(全 28 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-9821(P2001-9821)
(22)出願日　平成13年1月18日(2001.1.18)
(65)公開番号　特開2001-316255(P2001-316255A)
(43)公開日　平成13年11月13日(2001.11.13)
審査請求日　平成13年1月18日(2001.1.18)
(31)優先権主張番号　2000-24382
(32)優先日　平成12年5月8日(2000.5.8)
(33)優先権主張国　韓国(KR)

前置審査

(73)特許権者　501023258
金亨洛
Ｈｙｅｕｎｇｒａｋ　ＫＩＭ
大韓民国　釜山広域市南区大淵３洞　三益グ゛リーンアパ゜ト１０２棟４０３号
１０２－４０３，Ｓａｍｉｃｋ　Ｇｒｅｅｎ　ＡＰＴ　Ｄａｅｙｏｕｎ３－ｄｏｎｇ，Ｎａｍ－ｇｕ，Ｐｕｓａｎ－ｃｉｔｙ，６０８－０２３，Ｒｅｐｕｂｌｉｃ　ｏｆ　Ｋｏｒｅａ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】魚類病原性微生物と寄生虫の感染予防および治療のためのδ－アミノレブリン酸の新規の用途｛
Ｎｏｖｅｌｕｓｅｏｆｄｅｌｔａ－ａｍｉｎｏｌｅｖｕｌｉｎｉｃａｃｉｄｆｏｒｐｒｅｖｅｎ

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
δ－アミノレブリン酸を有効成分とするエドワードジエラタルダ細菌（Ｅｄｗａｒｄｓｉｅｌｌａ　ｔａｒｄａ）、ストレプトコッカス属細菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）、シュードモナス属細菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｐ．）、ビブリオアングイラルム細菌（Ｖｉｂｒｉｏ　ａｎｇｕｉｌｌａｒｕｍ）、スクチカ虫又はイリドウイルス（ｉｒｉｄｏ　ｖｉｒｕｓ）による魚類の病原性感染症の予防および治療剤。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明はδ－アミノレブリン酸（δ－aminolevulinic acid：ALA）を有効成分として含有する魚類病原性微生物と寄生虫の感染予防および治療用組成物に関する。より詳細には、δ－アミノレブリン酸を飼育水槽に含有させて魚類を養殖したり、飼育に混合して魚類に経口投与することにより、魚類の病原性微生物と寄生虫の感染を予防したり、感染された魚類を治療する組成物に関する。
【０００２】
【従来の技術】
最近、魚類の人工種苗生産技術の開発と共に海産魚類の養殖産業が急速に発達することにより、ひらめ、くろそい，真鯛、すずき、ふぐ等の高級魚種が主な養殖対象種として脚光を受けている。このような養殖業の急速な伸長に因り、我が国の沿岸海水を含む周囲環境

は、魚類疾病の主要病因性ウイルスヘルパースウイルス（Herpersvirus）、バーナウイルス（Birnavirus）、ラブドウイルス（Rhabdovirus）等とエドワードジエラ属（Edwardsiella sp.）、ビブリオ属（Vibrio sp.）、スタフィロコッカス属（Staphylococcus sp.）、ストレプトコッカス（Streptococcus）およびフレキシバター属（Flexibater sp.）等の病原性細菌らにより汚染されている蓋然性のため、常にウイルスと細菌による疾病発生のおそれがあり（Cheung, R. J. ,Nigelli,R.F. and Ruggieri, G. D. 1980. Studies on the morphology og uronema with a description of the infection in marine fishes, J. Fish Disease, 3; 295; Drolet M., Peloguin L., EscelardY., Cousineau L., and Sasarman A., 1989. Isolation and nucleotide sequence of the hemA gene of E. coli K-12, Mol. Gen.Genet, 216; 347: Ellen, N.L, and Kaplan S., 1993. 5-Aminolevulinic acid availability and control of spectral complex formation in hemA and hemT mutant of R. spharoides, J. Bacteriol., 175; 2304）,このような病原体の感染により魚類養殖業は深刻な被害を受けている実情である。特に、病原性細菌とウイルスの感染被害は種苗生産が成魚養殖の場合より甚だしい状態であり、その被害もまた年毎に増加している。 このような細菌性疾病の治療と予防の目的で現在は獣医用抗生剤を用いている実情である。同定にならない病原菌が起こす疾病を治療するために適切でない抗生剤を過多投与するのは養殖漁家の費用だけを増加させ、新たな抗生剤耐性を付与することにより、新たな薬剤耐性を有する細菌の出現を招くおそれがあり、実験に所要される時間が長引くため、迅速に処理することができなくなることにより、養殖魚類の斃死が増加するので、養殖魚類の活力または免疫能を増加させるための飼料補助剤が開発されている。

【０００３】

国内で発病する海産魚類疾病のうち、前述した通り、微生物およびウイルスの外に特にその被害が莫甚な疾病は、寄生虫により発病するものとしては繊毛虫類の一種である白点虫（Ichthiophthirius）感染症である白点病とスカチコシリアチダ（Scuticosiliatida）によるスクチカ感染症が代表的である。日本の場合、寄生性疾病の防除法として多く用いられるホルマリン薬浴法に対する研究が行われたが、外部に露出した虫体の場合、１００ｐｐｍ程の薬浴濃度でその活性が減少されたとの報告（Yoshinaga, T. and Nakazoe, J. 1993. Isolation and in vitro cultivation of an unidentified ciliate causing scuticociliatoisis in Japanese flounder, Fish Pathol.. 28 ;131）に基づき養殖現場防疫チームによる現場適用結果、その効果が全然現われなかった結果は、実験実績である結果の現場適用が難しいことを立証している（Mizuno, Y. , 1993. Control methods of diseased flounder used in fish farm in Japan, J. Fish Pathol. , 6 ; 219）。そして、実験室内で細胞培養法を利用したスクチカ増殖方法に成功して、培養細胞上のスクチカ虫を利用した病原性を直接ひらめに適用してその病原性を確認し、試験管内で虫体の不活性化のための方法としてプレジルおよびエキテシンを用いてその活性を除去するに成功したが、魚体内における感染虫体を不活性化させる研究はなされていない（Yoshimizu, M. , Hyuuga, S. , Oh, M.-J. , Ikoma, M. , Kimura , T. , Mori, T. , Nomura, T. , and Ezura, Y. 1993. Scuticociliatida infection of cultured hirame-characteristics, drug sensitivity and pathogenicity of cultured Scuticociliatida, J. Fish Pathol. , 6 ; 205）。韓国内で養殖ひらめ稚魚および中間育成魚を利用して治療効果試験を行った結果、その効果が現われなかった。体内の治療効果がなかった理由としては、Mizuno（Mizuno, Y. , 1993. Control methods of diseased flounder used in fish farm in Japan, J. Fish Pathol., 6; 219）とYoshimizu (Yoshimizu, M., Hyuuga, S., Oh, M.-J., Ikoma, M., Kimura, T., Mori, T., Nomura, T., and Ezura. Y., 1993. Scuticociliatida infection of cultured hirame-characteristics, drug sensitivity and phathogenicity of cultured Scuticociliatida, J. Fish Pathol.,6; 205)の研究におけると同様に、ホルマリン処理の場合のように水系に露出したプロットモント系のスクチカ虫の除去は可能であるが、体内にまで一連の実験薬剤が浸透しないため、その効果を発揮しえないと判断された。そして、薬剤の値段が一般水産用薬剤に比べて非常に高いため、水系内に放

出された虫体だけを除去する場合において安価なホルマリンに比べて非経済的である。本寄生虫の感染による病理学的研究は韓国内でも行われて（Lee, H.-S. and Sinskey, A. J. 1994. Molecular characterization of aceB, a gene encoding malate synthase in Corynebacterium glutamicum, J. Microbiol. Biotechnol., 4; 256）、虫体の感染は表皮およびえらを通過して血流に乗って体内の神経系まで進入して致命的な損傷を与えるものと確認された。そのような病理的現象は、ひらめの稚魚（Cheung, R. J. , Nigrelli, R. F. and Ruggieri, G. D. 1980. Studies on the morphology of uronema with a description of the infection in marine fishes, J. Fish Disease, 3; 295）と淡水魚類18（ Hoffman, G.L. 1955. A disease of freshwater fishes caused by tetrahymena and a key for identification of holotrich ciliates of freshwater fishes, J. Parasitol., 61;217 ）の研究結果と類似である。

【０００４】

最近、化学合成殺虫剤および除草剤の過多使用に因る有毒性によって環境汚染の問題が台頭することにより、生物学的、特に微生物根源の新素材の発掘が要求されている。このような観点からδアミノレブリン酸は全ての生物においてヘム（heme）、バクテリオクロロフィル（bacteriochlorophyll）、コリノイド（corrinoid）等のテトラピロール（tetrapyrrole）化合物らの生合成前駆体であり、現在まで知られた唯一の生物素材であるフォトダイナミック（photodynamic）物質であって除草剤、殺虫剤、植物成長促進剤および癌治療剤としてその効果が広く報告されている（Hua, Z. Scott, L. G. Thomas, H. F., and Russell, H., 1995, Effectiveness of delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin as a photosensitizer for photodynamic therapy in Vivo, Cancer Research, 55; 1723; Matsumoto, T. H., Usui, K., and Ishizuka, K. 1992, Basis of Differential Tolerance of Plant Species to delta-Aminolevulinic Acid, Weed Research, 37; 60; Matumoto, H., Tanida, Y., and Ishizuka, K. 1994. Porphyrin Intermediate Involved in Herbicidial Action of delta-Aminolevulinic Acid on Duckweed, Pesticide Biochemistry, 48; 214; Rebeiz, C. A. Juvik, J. A. and Reibez, C. C. 1988. Porphyric insecticides: Concep and phenomenology, Pestic. Bchem. Physiol., 30; 11; Tanaka, T., Takahashi, K., Hotta, Y., Takeuchi, Y., and Konnai, M., 1992. 5-aminolevulinic acid as Plant growth stimulator, Eur. Pat. Appl. EP 514 776）。

【０００５】

また、δ－アミノレブリン酸は、自然で容易に分解されるため、環境親和的な除草・殺虫剤とみなされて来た。しかし、微生物から生産されるδ－アミノレブリン酸の量は、その濃度が低く、化学的合成による生産もまた複雑な合成段階（Beale, S. I., Gold, M. H. and Granick, S., 1979, Chemical synthesis of 4,5,-dioxavaleric acid and its non-enzymatic transamination to 5-aminolevulinic acid, Phytochemistry,18; 441）に因り産業化が難しいため、現在は毒性が強いジフェニールエーテル（diphenyl ether; DPEs）およびオキサジアゾール（oxadiazole）等のような合成フォトダイナミック（photodynamic）除草剤を化学的合成により生産している。このような合成フォトダイナミック除草剤の動物と人体への有害性と遅い分解速度に因る環境汚染の問題が提起されており、その例としてゴルフ場における除草剤濫用に因る上水道源の汚染と隣近農民達の被害が社会問題として台頭している実情である。

【０００６】

ロドバクター（Rhodobacter）から特に多く生産されるδ－アミノレブリン酸（δ-aminolevulinic acid; ALA）は、植物に撒布されると双子葉植物にのみ選択的に作用して太陽光線により強力な酸化物質であるピクリド（pichlide）が形成され、この物質による一連の酸化反応が起こり葉の燐脂質が破壊されて葉が枯死する除草活性を示す。故に、δ－アミノレブリン酸は、人と動物および農作物には被害を与えないながらも雑草を選択的に枯死（Rebeiz, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen,H., and Wu, S. M., 1984. Photodynamic herbicides. Concep and Phenomology, Enzyme Microb. Technol., 6; 390）させるため、環境親和性の除草剤として報告されている（Rebeiz, C. A., Juvik, J. A., and R

eibez , C. C. 1988. Porophyric insecticides: Concep and phenomenology, Pestic. Biochem. Physiol. , 30; 11）。

【０００７】

しかし、現在δ－アミノレブリン酸は、諸段階の複雑な過程を経て有機合成をしなければならないため、生産単価が高く生産性がないので、現在利用されている除草剤の大部分は、人体毒性および土壌残留毒性等が高い問題点がある（Beale, S. I., Gold, M. H., and Granick, S., 1979, Chemical synthesis of 4, 5-dioxavaleric acid and its non-enzymatic transamination to 5-aminolevulinic acid, Phytochemistry, 18; 441）。

【０００８】

食品は栄養・味および安全性の順に重要視された従来の概念が国民所得の増大と健康に対する関心のため、却って食品の安全性が最も重要視されている。このような食品の安全性は、食品中に汚染または混入されている病原性微生物、重金属、農薬および抗生物質らが最も頻繁に台頭しており、養殖魚類の場合、抗生物質の過量投与に因る魚類の組織内に残留する抗生物質は、食品の安全性に違背する可能性がある。沿岸の汚染と養殖場の密集に因り細菌性疾病が多発し、これの治療のために薬剤を無分別に投与することにより薬剤耐性がある新たな病原性微生物が生じるようになり、このような結果は新しい抗生物質の開発を要求している。医学と同様に魚類疾病を治療するためにより多様で広汎な抗生物質の開発は、養殖魚類の生産性を向上させることができるが、組織中に残留する抗生物質に因り食品に安全性において問題をひきおこすことがある。従って、養殖魚類の種苗生産場から成魚養殖場に至るまで病原性微生物により発病する疾病を広汎に予防または治療効果がある物質の開発が要求される。

【０００９】

本発明者達は、前記のような点を勘案してδ－アミノレブリン酸を魚類の配合飼料に含有させて魚類に供給したり、飼育水槽に一定量を供給して魚類を養殖するする場合、抗生剤の使用なく病原性微生物と寄生虫の感染を効果的に予防することができ、既に感染された魚類の場合は治療効果を得られることを確認して本発明を完成した。

【００１０】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、δ－アミノレブリン酸を有効成分として含有する魚類病原性微生物と寄生虫の感染予防および治療用組成物を提供することにある。本発明の別の目的は、前記組成物を魚類に経口投与したり、飼育時に水槽投与して、魚類の病原性微生物と寄生虫の感染を予防および治療する方法を提供することにある。

【００１１】

本発明のまた別の目的は、δ－アミノレブリン酸を有効成分として含有する魚類養殖用飼料を提供することにある。

【００１２】

本発明の前記目的は、δ－アミノレブリン酸が魚類に及ぼす細胞毒性効果を調査した後、細胞毒性を及ぼさないδ－アミノレブリン酸の濃度を決定し、この濃度のδ－アミノレブリン酸をin vitroで多様な種類の魚類病原性微生物とウイルスに処理してδ－アミノレブリン酸が魚類病原性微生物とウイルスの増殖を抑制することを確認し、次いでin vivoでδ－アミノレブリン酸を魚類に予め水槽投与または経口投与した後、多様な種類の魚類病原性微生物を感染させて時間経過による斃死率を調査して、δ－アミノレブリン酸の魚類病原性微生物感染予防効果を確認し、また予め多様な魚類病原性微生物を感染させた魚類にδ－アミノレブリン酸を水槽投与または経口投与して時間経過による斃死率を調査して、δ－アミノレブリン酸の魚類病原性微生物感染治療効果を確認し、同じ方法で魚類にスクチカ寄生虫感染予防および治療効果を確認することにより達成した。

以下、本発明の構成を説明する。

【００１３】

【課題を解決するための手段】

本発明は３種の魚類株化細胞に多様な濃度のδ－アミノレブリン酸溶液とＭＴＴ溶液を添

加して培養した後、細胞増殖度を測定し、δ－アミノレブリン酸が細胞系に及ぼす細胞毒性効果を調査して、δ－アミノレブリン酸が細胞毒性を及ぼさない濃度範囲を決定する段階；３種の魚類に多様な濃度の－アミノレブリン酸溶液を注射したり、飼育海水に一定濃度に溶解させ、前記３種の魚類を飼育しながら時間経過による生存率を測定して、δ－アミノレブリン酸が魚類に及ぼす細胞毒性濃度を決定する段階；魚類養殖場から分離された病原性細菌液を市販用δ－アミノレブリン酸と混合し、６２０ｎｍでＥＬＩＳＡreaderで細菌成長を２４時間観察して、δ－アミノレブリン酸が魚類病原性細菌の増殖を抑制する効果があることを確認し、ＭＩＣ検索により海産魚養殖場から分離された病原性細菌液の増殖抑制効果を確認する段階；ウイルス培養液とδ－アミノレブリン酸希釈液を混合した反応液を培養細胞に接種した後、ウイルス感染程度を測定し、ウイルス液のみ接種した対照区とその値を比較して、δ－アミノレブリン酸が魚類病原性ウイルスに対する駆除効果があることを確認する段階；一定濃度のδ－アミノレブリン酸を維持する飼育水槽に魚類を飼育したり、一定の濃度のδ－アミノレブリン酸を含有する飼料を魚類に経口投与して斃死率を調査して、δ－アミノレブリン酸が魚類に及ぼす細胞毒性効果を調査する段階；震盪培養したエドワードジエラタルダ細菌をδ－アミノレブリン酸が水槽投与または経口投与された魚類に腹腔注射した後、飼育中の斃死率を調査して、δ－アミノレブリン酸がエドワードジエラタルダ細菌の感染予防効果があることを確認する段階；魚類病原性細菌エドワードジエラタルダの感染予防効果調査と同様の方法によりδ－アミノレブリン酸を水槽投与または経口投与した魚類にストレプトコッカス細菌を腹腔注射で人為感染させた後、飼育中の斃死率を調査して、δ－アミノレブリン酸がストレプトコッカス細菌の感染予防効果があることを確認する段階；魚類病原性細菌エドワードジエラタルダの感染予防効果調査と同様の方法によりδ－アミノレブリン酸を水槽投与または経口投与した魚類にスタフィロコッカスエピデルミディス細菌を腹腔注射で人為感染させた後、飼育中の斃死率を調査して、δ－アミノレブリン酸がスタフィロコッカスエピデルミディス細菌の感染予防効果があることを確認する段階；魚類病原性細菌エドワードジエラタルダ感染予防効果と同様の方法によりδ－アミノレブリン酸を水槽投与または経口投与した魚類にシュードモナス属細菌を腹腔注射で人為感染させた後、飼育中の斃死率を調査して、δ－アミノレブリン酸がシュードモナス属細菌の感染予防効果があることを確認する段階；魚類病原性細菌エドワードジエラタルダ感染予防効果と同様の方法によりδ－アミノレブリン酸を水槽投与または経口投与した魚類にビブリオアングイルジアルムを腹腔注射して人為感染させた後、飼育中の斃死率を調査して、δ－アミノレブリン酸がビブリオアングイルジアルム細菌の感染予防効果があることを確認する段階；δ－アミノレブリン酸が多様な濃度に含まれた飼育水槽に魚類病原性細菌を感染させた魚類を飼育しながら魚類の生存率を調査して、δ－アミノレブリン酸が魚類疾病を治療する効果があることを確認する段階；養殖場でイリドウイルスに感染されたものと判定された魚体を多様な濃度のδ－アミノレブリン酸で処理し、時間経過による斃死率を調査して、実際δ－アミノレブリン酸がウイルス感染治療効果があることを確認する段階；養殖場で大量がエドワードジエラタルダ細菌に感染された魚体に一定濃度のδ－アミノレブリン酸を処理して生存状態を観察することにより、実際δ－アミノレブリン酸が養殖場内で魚類病原性細菌に感染された魚類を治療することができることを確認する段階；スクチカ寄生虫培溶液にδ－アミノレブリン酸の希釈液を混合して培養しながら時間経過によるスクチカ寄生虫の数を計数して、δ－アミノレブリン酸のスクチカ虫の死滅効果を調査する段階；一定濃度のδ－アミノレブリン酸を水槽投与したり経口投与した魚類にスクチカ虫体を人為感染させた後、時間経過による魚類斃死率を観察して、δ－アミノレブリン酸のスクチカ虫人為感染予防効果を調査する段階；およびスクチカ虫感染が発生して販売が中断された種苗生産場のひらめ稚魚にδ－アミノレブリン酸を処理し、斃死率を観察して、実際δ－アミノレブリン酸がスクチカ虫感染魚類を治療する効果があることを確認する段階から構成される。

【００１４】

本発明のδ－アミノレブリン酸は、養殖する全ての種類の魚類に適用可能であり、特に海産魚に効果が優れている。

【００１５】
本発明でδ－アミノレブリン酸の投与方式は、魚類養殖中に養殖水槽に添加する水槽投与方式または魚類養殖に用いられる通常の飼料に配合して経口投与する方式の全てに可能である。
【００１６】
本発明では海産養殖魚のうち、ひらめ、くろそい、真鯛等を用いてδ－アミノレブリン酸の魚類病原性微生物の感染予防・治療、ウイルス感染治療およびスクチカ虫の予防および治療効果が優れることを確認したが、これは本発明の一実施例に過ぎない。
【００１７】
本発明でδ－アミノレブリン酸は液状で通常の魚類養殖飼料に噴霧して添加したり、粉末状に製造して飼料製造時に配合することができる。
【００１８】
かくして、本発明は、
１．δ－アミノレブリン酸（δ－aminolevulinic acid：ALA）を有効成分として含有する魚類病原性微生物の感染予防および治療用組成物。
２．前記魚類病原性微生物がエドワードジエラタルダ細菌（Edwardsiella tarda）、ストレプトコッカス属細菌（Streptococcus sp.）スタフィロコッカス属細菌（Staphylococcus sp.）、スタフィロコッカスエピデルミディス細菌　(Staphilococcus epidermidis)、 シュードモナス属細菌（Pseudomonas sp.）、またはビブリオアングイラルム細菌（Vibrio anguillarum）であることを特徴とする前項１記載の魚類病原性微生物の感染予防および治療用組成物。
３．前記魚類病原性微生物の感染予防および治療用組成物を魚類養殖飼育水槽に０．１～１００ｐｐｍの濃度で添加して水槽投与したり、通常の魚類養殖試料に１．０～１００ｐｐｍを添加して経口投与することにより、魚類病原性微生物の感染を予防したり治療することを特徴とする前項１または２記載の魚類病原性微生物の感染予防および治療方法。
４．δ－アミノレブリン酸（δ－aminolevulinic acid）を有効成分として含有するイリドウイルス（irido virus）感染治療用組成物。
５．前記イリドウイルス感染治療用組成物を魚類養殖飼育水槽に０．１～１０ｐｐｍの濃度で添加して水槽投与することにより、イリドウイルス感染を治療することを特徴とする前項４記載のイリドウイルス感染治療方法。
６．δ－アミノレブリン酸（δ－aminolevulinic acid）を有効成分として含有するスクチカ虫感染予防および治療用組成物。
７．前記スクチカ虫感染予防および治療用組成物を魚類養殖飼育水槽に０．１～１００ｐｐｍの濃度で添加して水槽投与したり、通常の魚類養殖飼料に１．０～１００ｐｐｍを添加して経口投与することにより、スクチカ虫感染予防および治療をすることを特徴とする前項６記載のスクチカ虫感染予防および治療方法。
８．δ－アミノレブリン酸（δ－aminolevulinic acid）を通常の魚類養殖飼料に１．０～１００ｐｐｍを含有させることを特徴とする魚類養殖用飼料。
からなる。
【００１９】
【発明の実施の形態】
以下、本発明の具体的な方法を実施例により詳細に説明するが、本発明の権利範囲はこれら実施例にのみ限定されるのではない。
【００２０】
実施例１： 魚類株化細胞に対するδ－アミノレブリン酸の細胞毒性
本実施例では海産養殖魚に莫大な被害を与える数種の魚類病原性細菌、ウイルスおよびスクチカ虫感染の予防および治療剤として用いようとするδ－アミノレブリン酸の魚類体内毒性有無を確認するための基礎実験であって、魚類由来株化細胞３種を対象としてin vitro状における細胞系内毒性を調査してδ－アミノレブリン酸処理安全濃度および毒性濃度を確認し、直接的な露出によるδ－アミノレブリン酸の魚類に対する毒性実験のために魚

類細胞に影響を及ぼさないδ－アミノレブリン酸濃度を確立すべく行った。δ－アミノレブリン酸試料は、１.０M濃度（０.１６７ｇ／１mＬ ＨＢＳＳ）で調剤して１０倍希釈法で希釈し、９６wellマイクロプレートに２.５×１０５cells／ｍＬに懸濁された魚類株化細胞液をそれぞれ１００μＬずつ入れた後、δ－アミノレブリン酸希釈液を希釈単位当り４wellずつそれぞれ１００μＬずつ添加して実験を行った。δ－アミノレブリン酸の細胞毒性実験に用いられた魚類株化細胞は、日本北海道大学水産学部の吉水教授（Dr. M. Yoshimizu）から分譲を受けたＲＴＧ－２（Rainbow trout gonad）、ＦＨＭ（Fathead minnow epithelioma）およびＣＨＳＥ－２１４（Chinook salmon embryo）である。実験用細胞は１００Ｕ／ｍＬのペニシリン（Sigma）、１００μｇ／ｍＬのストレプトマイシン（Sigma）および５％ＦＢＳが添加されたＭＥＭ（Gibco）細胞培養用培地を用いた。９６wellマイクロプレートに培養した細胞を１５℃の培養基で３時間培養した後、０mM，１.０mM，１０mM，５０mMおよび１００mMのδ－アミノレブリン酸液を１００μＬずつ添加した後、１８℃で２４時間培養した。対照区はδ－アミノレブリン酸の代わりにＨＢＳＳを同量入れた。培養後にＭＴＴ溶液［3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide(DOJＩＮＤＯ Lot ZY903, Japan)をＰＢＳに５ｍｇ／ｍＬを溶かしてフィルター（０.４５μm）した後、実験に用いた］を各wellに１００μＬずつ入れた後、０.０４Ｎ ＨＣｌ－isopropanolを１００μＬずつ入れてELISA readerで５７０ｎｍで吸光度を測定した。実験結果、図１に示した通り、実験に用いられた3種の株化細胞全て１mM，１０mMのδ－アミノレブリン酸で処理したとき、対照区と比較して類似の細胞増殖度を示した反面、５０mMと１００mMのδ－アミノレブリン酸を処理したときには対照区と比較して半分程の低い細胞増殖度を示した。結果的に、細胞培養条件のwell内に反応条件を勘案してその毒性安定範囲は１０mM以下と現われ、実験適正濃度基準を設定することができた。また、生物体内のδ－アミノレブリン酸の適用による毒性濃度の設定のための基礎資料により物質の体内吸収および代謝過程による目的臓器または細胞単位までの伝達経路を推定したとき（一般的に魚体内物質の吸収率は１０～２０％）、本物質の魚体処理濃度を５０mM以下とすれば、直接的な毒性は魚体内で発現しないことが分かった。

【００２１】

実施例2： 魚類に対するδ－アミノレブリン酸の細胞毒性

前記実施例１でδ－アミノレブリン酸の細胞単位における毒性実験結果、２４時間の露出による細胞への毒性が５０mM以下の濃度で安定したことが分かった。本実施例ではδ－アミノレブリン酸の体内投入による魚体の毒性確認のために注射法を利用した直接投与と、一般的に魚類養殖場で多数の魚体を対象とした疾病治療用薬剤の投与法として最も容易に適用されている浸漬法の二つの方法により魚類に及ぼす毒性を確認した。

【００２２】

実験に用いた魚類は、ひらめ（３ｇ）、真鯛（１.５ｇ）およびくろそい（５ｇ）の稚魚を対象として毒性効果を検査し、δ－アミノレブリン酸の処理濃度および方法は、５００mM，１００mM、５０mMおよび１０mMのδ－アミノレブリン酸溶液を製造して体内注射法で各魚体に１００μＬずつ腹腔内に注射して飼育水槽に入れて１週間観察した。また、浸漬法による実験のためにδ－アミノレブリン酸を３０Ｌ飼育海水に5、０２８ｇを溶かして１６７.６ｐｐｍの濃度に作った。同じ方法で１０倍および１００倍の希釈濃度である１６.７６ｐｐｍおよび１.６７６ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸を含有する実験海水を製造して、各実験水槽に実験魚を１０分、 ３０分、６０分、１２０分および１８０分間露出した後、各経過時間毎に露出魚をそれぞれ２０匹ずつ採取してδ－アミノレブリン酸無添加飼育水槽に移し、１週間生存率を測定した。実験結果、表１に示した通り、腹腔内注射法によるδ－アミノレブリン酸処理実験群は全ての魚体および魚種にδ－アミノレブリン酸処理濃度と関係なく生存率の変化が現われなかった。浸漬法によるδ－アミノレブリン酸処理実験群は、表２に示した通り、全ての処理実験区および対照区の生存率が１００％で魚種間処理濃度間、浸漬時間間の差異が現われなかった。結果的に、δ－アミノレブリン酸を魚類に直接適用するための現場使用形態および経済性を勘案した適用可能

濃度範囲で魚体に対する直接的な毒性はなかった。即ち、腹腔内に注射する場合、ひらめの場合、５０ｍM以下の濃度で体重の３．３％以下で注射する場合、毒性が確認されなく、真鯛とくろそいの場合、５０ｍM以下の濃度で体重の２．０％以下で注射する場合、毒性が確認されなかった。そして、ひらめ、真鯛およびくろそいを１６７ｐｐｍの濃度で１８０分間まで浸漬（薬浴）する場合、実験魚種に毒性が現われなかったため、魚類疾病治療剤または予防剤としての使用時に前記の濃度以下ではひらめ、真鯛およびくろそいに無害であることが分かった。

【００２３】

【表１】

ひらめおよびくろそい稚魚のδ－アミノレブリン酸腹腔注射法による生存率

（％）

| 魚種 | 50mM | 10mM | 5mM | 1mM | 対照群 |
|---|---|---|---|---|---|
| ひらめ | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 真鯛 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| くろそい | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |

【００２４】

【表２】

ひらめ、真鯛およびくろそい稚魚のδ－アミノレブリン酸浸漬法による生存率

（％）

| 魚種 | 167ppm 10~180 分 | 16.7ppm 10~180 分 | 1.67ppm 10~180 分 | 0.167ppm 10~180 分 |
|---|---|---|---|---|
| ひらめ | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 真鯛 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| くろそい | 100% | 100% | 100% | 100% |

【００２５】

実施例３： in vitro 状でδ－アミノレブリン酸による魚類病原性微生物の増殖抑制効果

実験例１： 魚類病原性細菌の増殖抑制効果

本実験例に用いられた病原性指標細菌は麗水隣近の海産魚養殖場で分離されたエドワードジエラタルダ細菌（Edwardsiella tarda）、ストレプトコッカス属細菌（Streptococcus sp.）、スタフィロコッカス属細菌（Staphylococcus sp.）、スタフィロコッカスエピデルミディス細菌（Staohylococcus epidermidis）、シュードモナス属細菌（Pseudomonas sp.）、およびビブリオアングイラルム細菌（Vibrio anguillarum ）を用いた。固体培養時に０．２％ＮａＣｌが添加されたＴＳＡ（triptic soy agar）平板培地で培養し、液体培養時にはＢＨＩbroth に２４時間培養して０．D値を１．０に調整して実験に用いた。実験に用いたδ－アミノレブリン酸は、市販用（Sigma）および本発明者が製造したδ－アミノレブリン酸（韓国特許出願番号１９９８－４１８９８）でそれぞれ滅菌蒸留水１．０ｍLにδ－アミノレブリン酸０．１６７ｇを溶かしたものを原液（１．０M）として用いた。１．０Mδアミノレブリン酸は、ＢＨＩbrothで２倍率ずつ段階的に６４倍まで希釈して病原性細菌の増殖阻害効果のための試験溶液に調剤した。 ９６wellマイクロプレートに段階的に希釈したδ－アミノレブリン酸と細菌懸濁液を１：１比率で混合し、２５℃で６２０ｎｍに設定された ELISA readerに入れ２４時間δ－アミノレブリン酸濃度による細菌の成長を観察した。対照区はδ－アミノレブリン酸の代わりにBHI brothと細菌懸濁液を１：１にで混合して実験区と同じ方法で行った。海産養殖魚の主要病原性細菌であるエドワードジエラタルダ細菌、ストレプトコッカス属細菌、ストレプトコッカス属細菌、スタフィロコッカスエピデルミディス細菌、シュードモナス属細菌およびビブリオアングイラルム細菌に対するδ－アミノレブリン酸のＭＩＣ検索は、平板薬剤ディスク法

で行った。それぞれの細菌培養液１００μＬを一定量のtop agarと混合してＴＳＡagarに塗抹した後、１.０Ｍδ－アミノレブリン酸溶液をＰＢＳで２倍率希釈して各希釈液１０μＬを滅菌したディスクに吸湿させた後、２３～２５℃の培養基で２～３日間培養して clear zoneの大きさ（ｍｍ）を測定して抗菌力で示した。対照区はδ－アミノレブリン酸希釈液の代わりにＰＢＳを同量ディスクに吸湿させて測定した。また、本発明者が製作したδ－アミノレブリン酸を利用した実験でエドワードジエラタルダ細菌とストレプトコッカス属細菌のδ－アミノレブリン酸による増殖阻害効果と共に韓国の海産魚養殖場に頻繁に検出されて飼育魚類の大量斃死を誘発するストレプトコッカス属、スタフィロコッカスエピデルミディス、ビブリオアングイラルムおよびシュードモナス属を追加的に確保して、ＭＩＣ検索によるδ－アミノレブリン酸による病原性細菌の増殖阻害を測定した。この際、ＭＩＣ検索用細菌をＢＨＩbrothに接種して２３～２５℃に調整した培養基で２～３日間培養した。培養された細菌を６００ｎｍで吸光度を測定して、０.Ｄ値を１.０に調整した細菌懸濁液を製造して用いた。但し、シュードモナス属細菌の０.Ｄ値は０.６に調整した懸濁液を製造して用いた。ＭＩＣ実験は細菌培養液１００μＬを一定量のtop agarと混合してＴＳＡagarに塗抹した後、１.０Ｍδ－アミノレブリン酸溶液をＰＢＳで２倍率希釈して、各希釈液１０μＬを滅菌したディスクに吸湿させた後、２３～２５℃の培養基で２～３日間培養して、clear zoneの大きさ（ｍｍ）を測定して抗菌力で示した。対照区はδ－アミノレブリン酸希釈液の代わりにＰＢＳを同量ディスクに吸湿させて測定した。実験結果、市販用δ－アミノレブリン酸を利用した実験でδ－アミノレブリン酸濃度による病原性細菌の増殖阻害効果は、図２（エドワードジエラタルダ細菌）、図３（ストレプトコッカス属細菌）に示した通りである。δ－アミノレブリン酸の希釈率が１／３２倍（３１ｍＭ）以下では二つの細菌全て増殖が抑制されたが、１／６４倍（１６ｍＭ）以上の希釈率では対照区と目立つ差異がなかった。本発明者が製作したδ－アミノレブリン酸の実験結果は表３に示した。市販用δ－アミノレブリン酸とその効果面に差異をみせなかった。

【００２６】

【表３】

δ－アミノレブリン酸による海産養殖魚病原性細菌のＭＩＣ試験結果

| 細　菌 | ＭＩＣ |
|---|---|
| エドワードジエラタルダ(Edwardsiella tarda) | 56.0μg/mL |
| ストレプトコッカス属(Streptococcus sp.) | 72.9 μg/mL |
| スタフィロコッカス属(Staphylococcus sp.) | 59.6μg/mL |
| スタフィロコッカスエピデルミディス (Staphylococcus epidermidis) | 62.0μg/mL |
| シュードモナス属(Pseudomonas sp.) | 42.2μg/mL |
| ビブリオアングイラルム(Vibrio anguillarum) | 29.9μg/mL |

【００２７】

実験例２： 魚類病原性ウイルスの駆除効果

本実験例では主要海産魚養殖魚種であるひらめ、くろそい、すずき等に感染して大量斃死原因として作用する海洋バーナウイルス（marine birnavirus,MAVB）を対象としてδ－アミノレブリン酸処理によるウイルス感染価の変動を魚類株化細胞を利用したＴＣＩＤ５０法で確認した。実験に用いられたウイルスは麗水隣近の養殖場のひらめから分離報告された種であって、先ず、ＣＨＳＥ－２１４細胞でウイルス感染価を確認し、それを実験ウイルス液として用いた。反応はウイルス培養液とδ－アミノレブリン酸希釈液（８ｍＭ）を同量混合して３０分間反応させた後、培養細胞に接種し、２０℃で培養しながら経時的なウイルス感染価の変動をＨＢＳＳ反応ウイルス液（対照区）のウイルス感染価の変動と比較した。実験結果、表４に示した通り、培養細胞内におけるδ－アミノレブリン酸処理によりＭＡＢＶが不活性化されたことを確認することができた。

【００２８】

δ－アミノレブリン酸処理によるＭＡＶＢウイルス感染価の変動

【表４】

| 実験区 | 接種後の時間経過（日） | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 3 | 5 | 7 |
| δ－アミノレブリン酸処理区 (8mM) | 4.3* | 3.8 | 3.5 | 2.3 | <1.8 |
| 対照区 (HBSS) | 4.5 | 4.8 | 6.8 | 8.5 | 8.8 |
| ［註］ $LogTCID_{50}$ /mL | | | | | |

【００２９】

実施例４： in vivo状でδ－アミノレブリン酸による魚類病原性微生物の増殖抑制効果

実験例１： 水槽投与および経口投与による毒性調査

２５ｇ前後のひらめ２０匹を二つの実験区と一つの対照区に設定して循環濾過システムで飼育した。実験区１は実験開始日から飼育水に３日に１回ずつδ－アミノレブリン酸を投与して飼育水中のδ－アミノレブリン酸濃度を０.１～１０ｐｐｍに維持させながら１～３週間飼育し（水槽投与）、実験区２は飼料として用いられる人工配合飼料（ＥＰ、魚体重量の３％：１５ｇ）１ｋｇに対しδ－アミノレブリン酸溶液を噴霧して０.１～１００ｐｐｍの濃度で添加した後、乾燥して投与しながら１～３週間飼育した(経口投与)。実験期間実験区１と無処理区は実験区２の飼料量と同量の市販人工配合飼料をδ－アミノレブリン酸処理なくそのまま用いた。使用した魚類病原性細菌らはBrain heart Infusion（ＢＨＩ）broth培地１Ｌを２Ｌ三角フラスコに取り滅菌した後、それぞれのフラスコにエドワードジエラタルダ細菌、ストレプトコッカス属細菌、スタフィロコッカス属細菌、スタフィロコッカスエピデルミス細菌、シュードモナス属細菌およびビブリオアングイラルム細菌を接種して３時間震盪培養して魚類病原菌らを製造した。病原性細菌の人為感染は実験飼育３週後に施行し、人為攻撃方法は培養菌を生理食塩水で希釈して魚類１匹当り１０５ＣＦＵで直接的な腹腔注射法(注射量３００μＬ／fish)で行った。人為感染された各実験区別実験魚は観察用水槽に移して２週間その感染および感染による斃死を観察した。実験全期間の水温は２０℃（±２℃）に維持した。実験結果、表５に示した通り、飼育水中のδ－アミノレブリン酸濃度を１０ｐｐｍに維持した実験区１と飼料１ｋｇ当り０.１～１００ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸を添加して飼育した実験区２はδ－アミノレブリン酸が含有されていない対照区と同様に飼育中の斃死は起こらなかった。このような結果は、δ－アミノレブリン酸が魚類株化細胞に毒性を示さないとの結果と一致した。

【００３０】

【表５】

δ－アミノレブリン酸処理によるひらめとくろそいの飼育実験結果

| δ－アミノレブリン酸投与方法 | 魚種 | 魚体数 | 飼育中斃死 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|---|
| 水槽投与 | ひらめ | 20匹 | 0 | 100 |
| | くろそい | 20匹 | 0 | 100 |
| 経口投与 | ひらめ | 20匹 | 0 | 100 |
| | くろそい | 20匹 | 0 | 100 |
| 無投与対照区 | ひらめ | 20匹 | 0 | 100 |
| | くろそい | 20匹 | 0 | 100 |

【００３１】

実験例２： 魚類病原性細菌であるエドワードジエラタルダ細菌感染予防効果前記実験例１と同じ方法で実験区と対照区の魚類を準備し、魚類１匹当りエドワードジエラタルダ１０５ＣＦで直接的な腹腔注射法で人為感染させた後、それぞれの実験魚を観察用水槽に移

し、感染による斃死を２週間観察し、２週後の生存率を調査した。実験結果、表６に示した通り、δ－アミノレブリン酸を投与しなかった無投与対照区の場合、実験魚の生存率は５～１０％と現われた反面、浸漬法と経口投与法によりδ－アミノレブリン酸を処理した処理区の生存率は度外れに高く現われた。

【００３２】

【表６】

δ－アミノレブリン酸処理飼育ひらめとくろそいのエドワードジエラタルダ人為感染に対する予防効果

| 投与方法 | δ―アミノレブリン酸濃度 | 魚種 | 魚体数 | 飼育中斃死 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| 水槽投与 | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 0.1ppm | ひらめ | 20 匹 | 5 | 75 |
| | 0.1ppm | くろそい | 20 匹 | 5 | 75 |
| 経口投与 | 100ppm | ひらめ | 20 匹 | 1 | 95 |
| | 100ppm | くろそい | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 6 | 70 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 4 | 80 |
| 無投与対照区 | | ひらめ | 20 匹 | 19 | 5 |
| | | くろそい | 20 匹 | 18 | 10 |

【００３３】

実験例３： 魚類病原性細菌ストレプトコッカス属細菌の感染予防効果

実験例１と実験例２で実施した魚類の飼育、δ－アミノレブリン酸の処理および人為感染と同じ方法でひらめとくろそいに腹腔注射法によりストレプトコッカス属細菌を人為感染させた後、それぞれの実験魚を観察用水槽に移し、感染による斃死を２週間観察した。表２に示した通り、δ－アミノレブリン酸を投与しなかった無投与対照区の場合、実験魚の生存率は５～１０％と現われた反面、水槽投与法と経口投与法によりδ－アミノレブリン酸を処理した処理区の生存率は６５％以上で、前記実験例２のエドワードジエラタルダ攻撃による生存率に比べてやや低いが、これまた生存率は高い方であった。

【００３４】

【表７】

δ－アミノレブリン酸処理飼育ひらめとくろそいのストレプトコッカス属人為感染に対する予防効果

| 投与方法 | δ―アミノレブリン酸濃度 | 魚種 | 魚体数 | 飼育中斃死 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| 水槽投与 | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 4 | 80 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 5 | 75 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 0.1ppm | ひらめ | 20 匹 | 7 | 65 |
| | 0.1ppm | くろそい | 20 匹 | 7 | 65 |
| 経口投与 | 100ppm | ひらめ | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 100ppm | くろそい | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 4 | 80 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 7 | 65 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 6 | 70 |
| 無投与対照区 | | ひらめ | 20 匹 | 19 | 5 |
| | | くろそい | 20 匹 | 19 | 5 |

【００３５】

実験例４： 魚類病原性細菌であるスタフィロコッカスエピデルミディス細菌感染予防効果

実験例１と実験例２で実施した魚類の飼育、δ－アミノレブリン酸の処理および人為感染と同じ方法でひらめとくろそいに腹腔注射法によりスタフィロコッカスエピデルミディス細菌を人為感染させた後、それぞれの実験魚を観察用水槽に移して感染による斃死を２週間観察した。表８に示した通り、δ－アミノレブリン酸を投与しなかった無投与対照区の場合、くろそい実験魚の生存率は５％程と現われた反面、水槽投与法と経口投与法によりδ－アミノレブリン酸を処理した処理区の生存率は高く現われた。

【００３６】

δ－アミノレブリン酸処理飼育ひらめとくろそいのスタフィロコッカスエピデルミディスの人為感染に対する予防効果

【表８】

| 投与方法 | δ―アミノレブリン酸濃度 | 魚種 | 魚体数 | 飼育中斃死 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| 水槽投与 | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 5 | 75 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 4 | 80 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 7 | 65 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 4 | 80 |
| | 0.1ppm | ひらめ | 20 匹 | 7 | 65 |
| | 0.1ppm | くろそい | 20 匹 | 9 | 55 |
| 経口投与 | 100ppm | ひらめ | 20 匹 | 4 | 80 |
| | 100ppm | くろそい | 20 匹 | 4 | 80 |
| | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 6 | 70 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 5 | 75 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 9 | 55 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 10 | 50 |
| 無投与対照区 | | ひらめ | 20 匹 | 19 | 5 |
| | | くろそい | 20 匹 | 19 | 5 |

【００３７】
実験例５： 魚類病原性細菌であるスタフィロコッカス属細菌感染予防効果
実験例１と実験例２で実施した魚類の飼育、δ－アミノレブリン酸の処理および人為感染と同じ方法でひらめとくろそいに腹腔注射法によりスタフィロコッカス属細菌を人為感染させた後、それぞれの実験魚を観察用水槽に移して感染による斃死を２週間観察した。実験結果、表９に示した通り、δ－アミノレブリン酸を投与しなかった無投与対照区の場合、実験魚の生存率は５％程と現われた反面、水槽投与法と経口投与法によりδ－アミノレブリン酸を処理した実験区の生存率は５５％以上と現われた。
【００３８】
【表９】

δ－アミノレブリン酸処理飼育ひらめとくろそいのスタフィロコッカス属細菌人為感染に対する予防効果

| 投与方法 | δ―アミノレブリン酸濃度 | 魚種 | 魚体数 | 飼育中斃死 | 生存率（％） |
|---|---|---|---|---|---|
| 水槽投与 | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 1 | 95 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 1 | 95 |
| | 0.1ppm | ひらめ | 20 匹 | 5 | 75 |
| | 0.1ppm | くろそい | 20 匹 | 7 | 65 |
| 経口投与 | 100ppm | ひらめ | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 100ppm | くろそい | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 1 | 95 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 7 | 65 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 9 | 55 |
| 無投与対照区 | | ひらめ | 20 匹 | 19 | 5 |
| | | くろそい | 20 匹 | 19 | 5 |

【００３９】
実験例６： 魚類病原性細菌であるシュードモナス属細菌感染予防効果
実験例１と実験例２で実施した魚類の飼育、δ－アミノレブリン酸の処理および人為感染と同じ方法でひらめとくろそいに腹腔注射法によりシュードモナス属細菌を人為感染させた後、それぞれの実験魚を観察用水槽に移して感染による斃死を２週間観察した。実験結果、表１０に示した通り、δ－アミノレブリン酸を投与しなかった無投与対照区の場合、実験魚の生存率は５～１５％程と現われた反面、水槽投与法と経口投与法によりδ－アミノレブリン酸を処理した処理区の生存率は度外れに高く現われた。
【００４０】
【表１０】

δ－アミノレブリン酸処理飼育ひらめとくろそいのシュードモナス属人為感染に対する予防効果

| 投与方法 | δ―アミノレブリン酸濃度 | 魚種 | 魚体数 | 飼育中斃死 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| 水槽投与 | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 0.1ppm | ひらめ | 20 匹 | 6 | 70 |
| | 0.1ppm | くろそい | 20 匹 | 9 | 55 |
| 経口投与 | 100ppm | ひらめ | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 100ppm | くろそい | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 10ppm | ひらめ | 20 匹 | 2 | 90 |
| | 10ppm | くろそい | 20 匹 | 3 | 85 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20 匹 | 9 | 55 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20 匹 | 8 | 60 |
| 無投与対照区 | | ひらめ | 20 匹 | 19 | 5 |
| | | くろそい | 20 匹 | 17 | 15 |

【００４１】
実験例７： 魚類病原性細菌であるビブリオアングイラルム細菌感染予防効果
実験例１と実験例２で実施した魚類の飼育、δ－アミノレブリン酸の処理および人為感染と同じ方法でひらめとくろそいに腹腔注射法によりビブリオアングイラルム細菌を人為感染させた後、それぞれの実験魚を観察用水槽に移して感染による斃死を２週間観察した。表１１に示した通り、δ－アミノレブリン酸を投与しなかった無投与対照区の場合、実験魚の生存率は１０～１５％程と現われた反面、水槽投与法と経口投与法によりδ－アミノレブリン酸を処理した処理区の生存率は度外れに高く現われた。
【００４２】
【表１１】

δ－アミノレブリン酸処理飼育ひらめとくろそいのビブリオアングイラルム細菌人為感染に対する予防効果

| 投与方法 | δ―アミノレブリン酸濃度 | 魚種 | 魚体数 | 飼育中斃死 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| 水槽投与 | 10ppm | ひらめ | 20匹 | 3 | 85 |
| | 10ppm | くろそい | 20匹 | 2 | 90 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20匹 | 2 | 80 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20匹 | 1 | 85 |
| | 0.1ppm | ひらめ | 20匹 | 7 | 65 |
| | 0.1ppm | くろそい | 20匹 | 8 | 60 |
| 経口投与 | 100ppm | ひらめ | 20匹 | 2 | 90 |
| | 100ppm | くろそい | 20匹 | 2 | 90 |
| | 10ppm | ひらめ | 20匹 | 3 | 85 |
| | 10ppm | くろそい | 20匹 | 4 | 80 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20匹 | 9 | 55 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20匹 | 7 | 65 |
| 無投与対照区 | | ひらめ | 20匹 | 18 | 10 |
| | | くろそい | 20匹 | 17 | 15 |

【００４３】

実施例５： in vivoでδ－アミノレブリン酸の養育による病原菌感染魚類治療効果

本実施例で実験魚としてひらめとくろそいの稚魚（平均体重２ｇ）を各実験区に５０匹ずつ飼育水槽に収容し１週間予備飼育して安定化させた。人為感染は魚類病原性細菌６種（Edwardsiella tarda, Streptococcus sp., Staphylococcus sp., Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas sp. およびVibrio anguillarum ）を感染病原体として用い、人為感染方法は浸漬法で行った。即ち、飼育水槽に感染病原体を入れて病原体の濃度を１０４ＣＦＵ／ｍＬになるように調整した海水にそれぞれ１時間浸漬して感染させた。治療条件は人為的な感染後に感染魚体を飼育水槽に移し、３日間感染させた後、感染４日目にδ－アミノレブリン酸を飼育水槽水に０.１、１.０、５および１０ｐｐｍになるように処理して換水せずに１～２４時間通気条件で飼育した後、清い海水で換水して２週間飼育しながら感染による魚の斃死を確認した。対照実験区は各細菌らを浸漬法により同一に感染処理した後、δ－アミノレブリン酸無処理条件で飼育しながらそれぞれの細菌感染によるひらめとくろそいの斃死を確認した。実験結果、ひらめ（表１２～１５）とくろそい（表１６～１９）全てδ－アミノレブリン酸処理区の生存率が高かった。

【００４４】

【表１２】

病原性細菌感染ひらめに対する０．１ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 54 |
| | 対照区 | 50匹 | 4 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 46 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 42 |
| | 対照区 | 50匹 | 36 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 54 |
| | 対照区 | 50匹 | 6 |
| シュードモナス属 | 処理区 | 50匹 | 50 |
| | 対照区 | 50匹 | 16 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 56 |
| | 対照区 | 50匹 | 40 |

【００４５】
【表１３】

病原性細菌感染ひらめに対する１．０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 76 |
| | 対照区 | 50匹 | 4 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 64 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 66 |
| | 対照区 | 50匹 | 36 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 66 |
| | 対照区 | 50匹 | 6 |
| シュードモナス属 | 処理区 | 50匹 | 70 |
| | 対照区 | 50匹 | 16 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 66 |
| | 対照区 | 50匹 | 40 |

【００４６】
【表１４】

病原性細菌感染ひらめに対する５．０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 4 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 80 |
| | 対照区 | 50匹 | 36 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 6 |
| シューデモナス属 | 処理区 | 50匹 | 80 |
| | 対照区 | 50匹 | 16 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 40 |

【００４７】

【表１５】

病原性細菌感染ひらめに対する１０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 4 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 90 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 36 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 6 |
| シューデモナス属 | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 16 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 80 |
| | 対照区 | 50匹 | 40 |

【００４８】

【表１６】

病原性細菌感染くろそいに対する０．１ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（％） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 60 |
| | 対照区 | 50匹 | 10 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 50 |
| | 対照区 | 50匹 | 24 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 40 |
| | 対照区 | 50匹 | 16 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 50 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 40 |
| | 対照区 | 50匹 | 20 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 50 |
| | 対照区 | 50匹 | 20 |

【００４９】
【表１７】

病原性細菌感染くろそいに対する１．０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（％） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 80 |
| | 対照区 | 50匹 | 10 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 76 |
| | 対照区 | 50匹 | 24 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 70 |
| | 対照区 | 50匹 | 16 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 76 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 76 |
| | 対照区 | 50匹 | 20 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 74 |
| | 対照区 | 50匹 | 20 |

【００５０】
【表１８】

病原性細菌感染くろそいに対する５.０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 10 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 24 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 66 |
| | 対照区 | 50匹 | 16 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 20 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 20 |

【００５１】

【表１９】

病原性細菌感染くろそいに対する５.０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 10 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 24 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 66 |
| | 対照区 | 50匹 | 16 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 20 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 20 |

【００５２】

実施例６： δ－アミノレブリン酸経口投与による病原菌感染魚類治療効果

本実施例では実験魚としてひらめとくろそいの稚魚（平均体重２ｇ）を各実験区に５０匹ずつ飼育水槽に収容して１週間予備飼育して安定化させた。人為感染は魚類病原性細菌６種（Edwardsiella tarda, Streptococcus sp. Staphylococcus sp., Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas sp. およびVibrio anguillarum）を感染病原体として用い、人為感染方法は浸漬法により行った。即ち、飼育水槽に感染病体を入れて病原体の濃度を１０４ＣＦＵ／ｍＬになるように調整した海水にそれぞれ１時間浸漬して感染させた。治療条件は人為的な感染後に感染魚を飼育槽に移して３日間感染期間を与えた後、感染４日目に飼料に０.１～５０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸を添加して清い海水で換水して２週間飼育しながら感染による魚の斃死を確認した。対象実験区は各細菌らを浸漬法により同一に感染処理した後、δ－アミノレブリン酸を含有していない市販配合飼料で飼育しながら

それぞれの細菌感染によるひらめとくろそいの斃死を確認した。実験結果、ひらめ（表２０～２３）とくろそい(表２４～２７)全てδ－アミノレブリン酸処理区の生存率が高かった。

【００５３】

【表２０】

病原性細菌感染ひらめに対する５０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 92 |
| | 対照区 | 50匹 | 4 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 90 |
| | 対照区 | 50匹 | 10 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 94 |
| | 対照区 | 50匹 | 30 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 92 |
| | 対照区 | 50匹 | 8 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 88 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 90 |
| | 対照区 | 50匹 | 32 |

【００５４】

【表２１】

病原性細菌感染ひらめに対する１．０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 68 |
| | 対照区 | 50匹 | 4 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 74 |
| | 対照区 | 50匹 | 10 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 68 |
| | 対照区 | 50匹 | 30 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 72 |
| | 対照区 | 50匹 | 8 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 68 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 72 |
| | 対照区 | 50匹 | 32 |

【００５５】

【表２２】

病原性細菌感染ひらめに対する１０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 82 |
| | 対照区 | 50匹 | 4 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 10 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 30 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 8 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 82 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 88 |
| | 対照区 | 50匹 | 32 |

【００５６】

【表２３】

病原性細菌感染ひらめに対する５０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 92 |
| | 対照区 | 50匹 | 4 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 90 |
| | 対照区 | 50匹 | 10 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 94 |
| | 対照区 | 50匹 | 30 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 92 |
| | 対照区 | 50匹 | 8 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 88 |
| | 対照区 | 50匹 | 14 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 90 |
| | 対照区 | 50匹 | 32 |

【００５７】

病原性細菌感染くろそいに対する０．１ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

【表２４】

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 52 |
| | 対照区 | 50匹 | 8 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 44 |
| | 対照区 | 50匹 | 18 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 36 |
| | 対照区 | 50匹 | 28 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 48 |
| | 対照区 | 50匹 | 12 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 52 |
| | 対照区 | 50匹 | 12 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 50 |
| | 対照区 | 50匹 | 28 |

【００５８】
【表２５】

病原性細菌感染ひらめに対する１.０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 62 |
| | 対照区 | 50匹 | 8 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 66 |
| | 対照区 | 50匹 | 18 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 63 |
| | 対照区 | 50匹 | 28 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 70 |
| | 対照区 | 50匹 | 12 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 78 |
| | 対照区 | 50匹 | 12 |
| ビブリオアングイラルム | 処理区 | 50匹 | 74 |
| | 対照区 | 50匹 | 28 |

【００５９】
病原性細菌感染ひらめに対する１０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果
【表２６】

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 68 |
| | 対照区 | 50匹 | 8 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 72 |
| | 対照区 | 50匹 | 18 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 64 |
| | 対照区 | 50匹 | 28 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 78 |
| | 対照区 | 50匹 | 12 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 12 |
| ビブリオアングィラルム | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 28 |

【００６０】
【表２７】

病原性細菌感染ひらめに対する５０ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸処理による治療効果

| 病原性菌 | | 魚体数 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|
| エドワードジエラタルダ | 処理区 | 50匹 | 88 |
| | 対照区 | 50匹 | 8 |
| ストレプトコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 82 |
| | 対照区 | 50匹 | 18 |
| スタフィロコッカスエピデルミディス | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 28 |
| スタフィロコッカス属 | 処理区 | 50匹 | 88 |
| | 対照区 | 50匹 | 12 |
| シューヂモナス属 | 処理区 | 50匹 | 84 |
| | 対照区 | 50匹 | 12 |
| ビブリオアングィラルム | 処理区 | 50匹 | 86 |
| | 対照区 | 50匹 | 28 |

【００６１】
実施例７： ウイルス感染魚類治療効果
本実施例では実施例３の実験例２で実験した通り、in vitro条件でδ－アミノレブリン酸処理によるウイルスの感染抑制効果が確認された実験結果に照らして実際ウイルスの感染により疾病が進行している魚類を対象としてδ－アミノレブリン酸を処理したとき、感染魚の斃死率の現象を確認した。麗水隣近の養殖場でＰＣＲ法により診断されたイリドウイルス（irido virus）感染魚群に含まれた真鯛を各３０匹ずつ三つの水槽に隔離収容し、本発明者が製作したδ－アミノレブリン酸を利用してδ－アミノレブリン酸処理Ａ群（１０ｐｐｍ）、δ－アミノレブリン酸処理Ｂ群（１.０ｐｐｍ）、δ－アミノレブリン酸処理Ｃ群（０.１ｐｐｍ）およびδ－アミノレブリン酸無処理対照群に分けて経時的な斃死率の変化を確認した。δ－アミノレブリン酸処理各実験区を３日間隔で３回処理し、１０日目までの結果を示した。実験結果、表２８の感染魚実験結果からみられる通り、本ウイルスの感染による斃死率は実際養魚場の場合７０％に至るが、本実験条件では感染個体を無処理した状態の場合、１０日が経過するまで５０％の累積斃死率を示した。しかし、δ－アミノレブリン酸を処理した区の場合、実験観察１０日間に亘ってＡ，ＢおよびＣの実

験条件で１７％、１７％、および２７％の低い斃死率を示した。このような点からδ－アミノレブリン酸がウイルス疾病に対し治療効果を示すことにより、δ－アミノレブリン酸処理による感染魚の生存率が向上された。

【００６２】

【表２８】

イリドウイルス感染真鯛のδ－アミノレブリン酸処理による生存趨移

| δ－アミノレブリン酸濃度 | 処理後経過日数による生存匹数 | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 10ppm | 30 | 28 | 26 | 26 | 26 | 26 | 26 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| 1.0ppm | 30 | 28 | 26 | 26 | 26 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| 0.1ppm | 30 | 25 | 25 | 23 | 23 | 23 | 23 | 22 | 22 | 22 | 22 |
| 0ppm | 30 | 23 | 22 | 19 | 17 | 17 | 17 | 16 | 16 | 16 | 16 |

【００６３】

実施例８： エドワード細菌感染魚類治療

本実験例では陸上水槽式養殖場で飼育中のひらめ（平均体重１１ｇ）が自然発生的な発病により斃死している養殖場があり、その養殖場の感染魚を調査した結果、感染源はエドワードタルダ細菌が主要原因であって、斃死発生後５日程が経過する間に飼育タンク当り３０～４０％の累積斃死が生じ、δ－アミノレブリン酸処理当時にもエドワード感染による典型的な症状である腹部膨満および肛門の脱腸等の病変を示す固体が観察されて、病の進行が非常に深刻に起こっている状況であるのを確認し、養殖場の水槽にδ－アミノレブリン酸を処理した。二つの飼育水槽を対象として水槽に初日０．１ｐｐｍのδ－アミノレブリン酸で２時間薬浴処理し、２日と３日目に０．０１ｐｐｍの濃度で２時間－アミノレブリン酸で薬浴処理した後に換水して生存状態を観察した。δ－アミノレブリン酸で薬浴処理した水槽（薬３、０００匹）の場合、投与後１週間の累積斃死率が４０％を維持したのに反し、δ－アミノレブリン酸無処理水槽の場合には６０％以上の斃死と継続的な病の進行が観察され、以後にも約２０％程の斃死がもっと生じたのが確認された。結果的に、無処理区の場合、約８０％の累積斃死を記録したのに比べて発病中に－アミノレブリン酸で薬浴処理した処理区の場合、その斃死率が約４０％を示し、健康度の比較においても卓越な状態が観察された。

【００６４】

実施例９： δ－アミノレブリン酸の魚類病原寄生虫類スクチカ虫に対する抑制効果

実験例１： in vitroで魚類寄生虫であるスクチカ虫死滅効果

本実験例に用いられたスクチカ虫は寄生虫に感染されたひらめの表皮粘液を一定量取ってＨＢＳＳに懸濁させた後、浮遊液を作り３０分間室温に放置し、８００ｒｐｍで１０分間遠心分離して上澄液を捨て、沈澱物をＭＥＭ－１０（minimum essential medium, 10%FBS, streptomycin, penicillin）に懸濁させて３０分間放置後、同一に遠心分離して上澄液を除去し虫体のみを得て、血球計数器で計数して一定数の虫体懸濁液を製造した。製造された虫体懸濁液を実験室内で継代培養して一定数（２．５×１０５cells／mL）を予め準備して置いたＦＨＭ細胞に接種して１７℃で培養した。次いで、実験前にδ－アミノレブリン酸濃度別、反応時間別によるスクチカ虫の死滅効果を測定してスクチカ虫の駆除のための最適δ－アミノレブリン酸濃度と処理時間を検討した。ＦＨＭ cell lineに培養されたスクチカ培養液を３０００ｒｐｍで５分間遠心分離して殺虫液を捨てＰＢＳを添加し３回洗滌して実験に用いた。滅菌した３次蒸留水で作った１．０Mδ－アミノレブリン酸溶液を原液として２倍ずつ希釈して１００倍（１．０mM）まで希釈した。９６ウェルマイクロプレート（well microplates）にスクチカを各ウェルに５０μＬずつ入れ、２段階で希釈されたδ－アミノレブリン酸溶液を加えて１２０分間培養しながらスクチカ虫の生存状態を観察した。 １２０分間の培養中各濃度におけるスクチカ虫の死滅時間を10分間隔で測定した。接種間毎に5分は攪拌（stirring）し、5分は放置した。反応が終わった後、生体検査染色液である１％トリパンブルー（trypan blue）を各ウェルに１００μＬずつ同

一に添加して混合した後、δ－アミノレブリン酸希釈液と共に培養されたスクチカ虫を時間帯別に血球計算盤を利用して寄生虫の数を測定した。実験結果、表29に示した通り、δ－アミノレブリン算の濃度が５００～６０ｍＭの場合、処理後10分以内に完全に死滅し、３０～１５ｍＭの濃度範囲では処理時間20分でスクチカ虫を完全に死滅させることができ、実際濃度８ｍＭ範囲では60分以上の処理条件で完全に死滅し、60分以内の処理により５０％以上のスクチカが死滅した。実際処理濃度２ｍＭの濃度条件である場合、1時間の処理で５０％程のスクチカ虫が死滅した。実際濃度５００～２ｍＭの濃度範囲の処理条件で最小限2時間の処理により９０％以上のスクチカ虫が死滅することにより、δ－アミノレブリン惨によるスクチカ虫の駆除が可能であることが分かった。

【００６５】

【表２９】

δ－アミノレブリン酸処理濃度別、反応時間別スクチカ虫の生存率（％）

| 濃度 | 処理時間（分） | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 110 | 120 |
| 500mM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 250mM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 125mM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60mM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | o | 0 | 0 |
| 30mM | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15mM | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8.0mM | 45 | 50 | 45 | 25 | 40 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4.0mM | 50 | 50 | 30 | 30 | 20 | 45 | 30 | 45 | 40 | 10 | 10 |
| 2.0mM | 50 | 60 | 40 | 45 | 35 | 55 | 40 | 40 | 35 | 40 | 10 |

【００６６】

実験例２： in vivoでスクチカ虫の魚体人為感染に対する予防効果

２５ｇ前後のひらめ２０匹を二つの実験区と１個の対照区に設定して循環濾過システムで飼育した。実験区１は実験開始日から飼育水に３日に１回ずつ　　δ－アミノレブリン酸を投与して飼育水中のδ－アミノレブリン酸濃度を０．１～５０ｐｐｍに維持させながら１～３週間飼育し（水槽投与）、実験区２は飼料として用いられる人工配合飼料（ＥＰ，魚体重量の３％：１５ｇ）１ｋｇに対しδ－アミノレブリン酸溶液を噴霧して１．０～１００ｐｐｍの濃度で添加した後、乾燥して投与しながら１～３週間飼育した（経口投与）。実験期間中実験区１と無処理区は実験区２の飼料量と同一の量で市販される人工配合飼料をδ－アミノレブリン酸処理なくそのまま用いた。感染はＦＨＭ細胞上で純粋培養されたスクチカ虫体を利用して人為的な感染実験を行った。虫体の人為感染は実験飼育３週後に施行し、人為攻撃方法は培養虫液（１０００個体／ｍ）に直接浸漬して暴気状態で３０分間露出する方法で行った。人為感染後、それぞれの実験区別実験魚を観察用水槽に移し、２週間感染および感染による斃死を観察した。人為感染された各実験区別実験魚は観察用水槽に移し、２週間その感染および感染による斃死を観察した。実験全前期間中の水温は２０℃（＋２℃）に維持した。実験結果、表３０に示した通り、飼育水中のδ－アミノレブリン酸濃度を１０ｐｐｍに維持した実験区１と飼料１ｋｇ当り１００ｐｐｍの濃度でδ－アミノレブリン酸を添加して飼育した実験区２は、δ－アミノレブリン酸が含有されていない対照区と同様に飼育中の斃死は起こらなかった。このような結果はδ－アミノレブリン酸が魚類株化細胞に毒性を示さないとの結果と一致した。また、人為的な攻撃によりスクチカ虫に感染された実験魚を観察用水槽に移し、感染による斃死を2週間観察し２週後の生存率を表31に示した。表31に示した通り、δ－アミノレブリン酸を投与しなかった無投与対照群の場合、実験魚の生存率は４０～４５％と現われた反面、水槽投与法と経口投与法によりδ－アミノレブリン酸を処理した処理区の生存率は度外れに高く現われた。

【００６７】

δ－アミノレブリン酸処理によるひらめとくろそいの飼育実験結果

【表３０】

| アミノレブリン酸投与方法 | 魚種 | 魚体数 | 飼育中斃死 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|---|
| 水槽投与 | ひらめ | 20匹 | 0 | 100 |
| | くろそい | 20匹 | 0 | 100 |
| 経口投与 | ひらめ | 20匹 | 0 | 100 |
| | くろそい | 20匹 | 0 | 100 |
| 無投与対照区 | ひらめ | 20匹 | 0 | 100 |
| | くろそい | 20匹 | 0 | 100 |

【００６８】
【表３１】

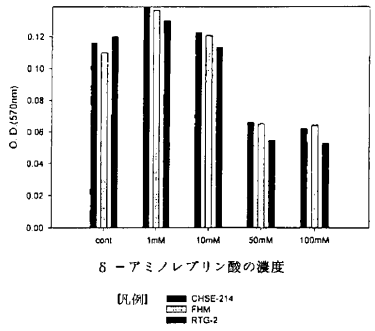
δ－アミノレブリン酸処理飼育ひらめのスクチカ虫人為感染に対する予防効果

| 投与方法 | δ—アミノレブリン酸濃度 | 魚種 | 魚体数 | 飼育中斃死 | 生存率（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| 水槽投与 | 50ppm | ひらめ | 20匹 | 4 | 80 |
| | 50ppm | くろそい | 20匹 | 4 | 80 |
| | 10ppm | ひらめ | 20匹 | 3 | 85 |
| | 10ppm | くろそい | 20匹 | 3 | 85 |
| | 5.0ppm | ひらめ | 20匹 | 3 | 85 |
| | 5.0ppm | くろそい | 20匹 | 3 | 85 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20匹 | 5 | 75 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20匹 | 6 | 70 |
| | 0.1ppm | ひらめ | 20匹 | 7 | 75 |
| | 0.1ppm | くろそい | 20匹 | 8 | 60 |
| 経口投与 | 100ppm | ひらめ | 20匹 | 2 | 90 |
| | 100ppm | くろそい | 20匹 | 1 | 95 |
| | 50ppm | ひらめ | 20匹 | 1 | 95 |
| | 50ppm | くろそい | 20匹 | 1 | 95 |
| | 10ppm | ひらめ | 20匹 | 1 | 95 |
| | 10ppm | くろそい | 20匹 | 1 | 95 |
| | 5ppm | ひらめ | 20匹 | 3 | 85 |
| | 5ppm | くろそい | 20匹 | 3 | 85 |
| | 1.0ppm | ひらめ | 20匹 | 6 | 70 |
| | 1.0ppm | くろそい | 20匹 | 5 | 75 |
| 無投与対照区 | | ひらめ | 20匹 | 11 | 45 |
| | | くろそい | 20匹 | 12 | 40 |

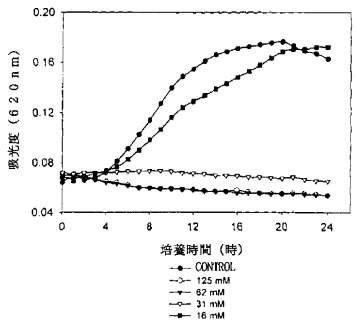
【００６９】
実験例３： スクチカ感染種苗生産場に適用
ひらめ種苗生産場で種苗を生産して販売段階（体長５～６ｃｍ）にスクチカ虫の感染が発生して販売を中断している種苗生産場のひらめ稚魚を対照として本発明者が製造したδ－アミノレブリン酸で処理した、種苗生産場で選別して感染魚だけを集めて置いた水槽に収容されている重症魚が治療対象であった。初日ホルマリン３０ｐｐｍを処理し、二日および三日１ｐｐｍの濃度で２時間ずつδ－アミノレブリン酸を処理し、換水して状態を観察した。実験結果、処理魚の活力が処理した翌日から目立って良くなり、引き続いた斃死が著しく減る傾向をみせた。その以後、飼育用水中の病原体管理が可能なオゾン処理システムを適用している飼育場の飼育水槽に収容して飼育した結果、正常的な飼育が可能であった。２週間の飼育期間後、魚体のサンプリングによる魚体内のスクチカ虫の感染を調査したところ、その感染が確認されなかった。

【００７０】
【発明の効果】
以上、前記実施例により説明した通り、δ－アミノレブリン酸を魚類に水槽投与または経口投与する場合、魚類病原性細菌の感染を予防および治療できることにより、抗生剤を用いなくても海産魚を養殖することができる優れた効果があり、またウイルス感染魚類を治療する効果があり、スクチカ寄生虫の感染も予防し治療する優れた効果があるため、魚類養殖産業上非常に有用な発明である。
【００７１】
【図面の簡単な説明】
【図１】δ－アミノレブリン酸濃度による魚類株化細胞に対する細胞毒性効果を示すグラフである。
【図２】
【図３】市販用δ－アミノレブリン酸濃度による魚類病原性細菌エドワードジエラタルダ細菌（図２）とスタフィロコッカス属（図３）増殖阻害効果を示す図面である。

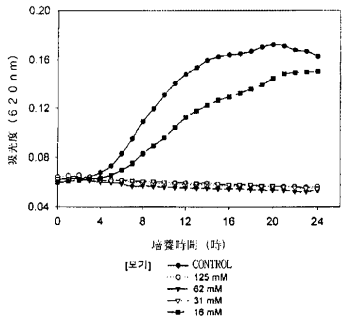
【図１】




【図２】




【図３】



フロントページの続き

| (51)Int.Cl.[7] | FI |
|---|---|
| Ａ６１Ｐ 31/04 | Ａ６１Ｐ 31/04 １７１ |
| Ａ６１Ｐ 33/00 | Ａ６１Ｐ 33/00 １７１ |

(73)特許権者 501023269
金 在豪
Ｊａｅｈｏ ＫＩＭ
大韓民国 忠清北道清酒市斜川洞 新東亜アパ゜ト５棟１０３号
５－１０３, Ｓｈｉｎｄｏｎｇａ Ａｐｔ, Ｓａｃｈｏｎ－ｄｏｎｇ, Ｃｈｕｎｇｊｕ－ｃｉｔｙ, Ｃｈｏｏｎｇｃｈｕｎｇｂｕｋ－ｄｏ, ３６０－２２０ Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｋｏｒｅａ
(73)特許権者 501023270
呉 明柱
Ｍｙｕｎｇｊｏｏ ＯＨ
大韓民国 全羅南道麗水市新月洞 錦湖アパ゜ト１２棟１５０４号
１２－１５０４, Ｋｕｍｈｏ ＡＰＴ Ｓｈｉｎｗｏｌ－ｄｏｎｇ, Ｙｏｓｏｏ－ｃｉｔｙ, Ｃｈｕｌｌａｎａｍ－ｄｏ, ５５０－１９０, Ｒｅｐｕｂｌｉｃ ｏｆ Ｋｏｒｅａ
(74)代理人 100088904
弁理士 庄司 隆
(72)発明者 金亨洛
大韓民国 釜山広域市南区大淵３洞 三益グ゛リーンアパ゜ト１０２棟４０３号
(72)発明者 金在豪
大韓民国 忠清北道清酒市斜川洞 新東亜アパ゜ト５棟１０３号
(72)発明者 呉明柱
大韓民国 全羅南道麗水市新月洞 錦湖アパ゜ト１２棟１５０４号
(72)発明者 卞大石
大韓民国 釜山広域市蓮堤区蓮山８洞 鮮京アパ゜ト１０３棟２０２号

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 特開２０００－００７５６４（ＪＰ，Ａ）
Karrer et al., Photodynamic Inactivation of Staphylococci with 5-Aminolaevulinic Acid or Photofrin , Lasers Med. Sci., 英国, １９９９年, 14(1), 54-61

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
A61K 31/00-31/197
A61P 31/00
A61P 33/00

(54)【発明の名称】魚類病原性微生物と寄生虫の感染予防および治療のためのδ－アミノレブリン酸の新規の用途｛Ｎｏｖｅｌｕｓｅｏｆｄｅｌｔａ－ａｍｉｎｏｌｅｖｕｌｉｎｉｃａｃｉｄｆｏｒｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎａｎｄｔｒｅａｔｍｅｎｔｏｆｉｎｆｅｃｔｉｏｎｂｙｐａｔｈｏｇｅｎｉｃｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓａｎｄｐａｒａｓｉｔｅ｝