

(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  
2023年1月12日(12.01.2023)



(10) 国際公開番号

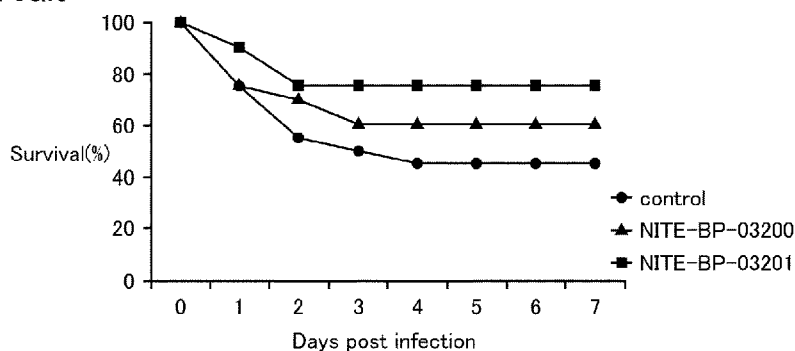
WO 2023/282354 A1

- (51) 国際特許分類:  
*A61K 39/106* (2006.01) *A23K 50/80* (2016.01)  
*A61P 31/04* (2006.01) *A01K 61/59* (2017.01)  
*A23K 10/16* (2016.01) *C12N 1/20* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/027145
- (22) 国際出願日: 2022年7月8日(08.07.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2021-114165 2021年7月9日(09.07.2021) JP
- (71) 出願人: 住友化学株式会社  
(SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1036020 東京都中央区日本
- 橋二丁目7番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人東京海洋大学(TOKYO UNIVERSITY OF MARINE SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1088477 東京都港区港南4丁目5番7号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 青木 幹雄(AOKI, Mikio); 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内 Osaka (JP). 味方 和樹(MIKATA, Kazuki); 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内 Osaka (JP). 甲斐 敏裕(KAI, Toshihiro); 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内 Osaka (JP). 廣野 育生(HIRONO, Ikuo); 〒1088477 東京都港区港南4丁目5番7号 国

(54) Title: COMPOSITION FOR REARING ORGANISM BELONGING TO ORDER DECAPODA AND COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING INFECTION IN DECAPODS

(54) 発明の名称: エビ目の生物の飼育用組成物、およびエビ目感染症に対する予防または治療用組成物

FIG.5



(57) Abstract: Provided are: a composition for rearing an organism belonging to the order Decapoda, which includes bacterial cells of at least one type selected from NITE-BP-03199, NITE-BP-03200, and NITE-BP-03201 or a culture of the cells, or an extract thereof; and a rearing method for an organism belonging to the order Decapoda using the same. Provided are: a composition for preventing or treating a Vibrios infection in decapods, which includes bacterial cells of at least one type selected from NITE-BP-03199, NITE-BP-03200, and NITE-BP-03201 or a culture of the cells, or an extract thereof; and a method for preventing or treating an infection in decapods using the same.

(57) 要約: NITE-BP-03199、NITE-BP-03200およびNITE-BP-03201から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含むエビ目の生物の飼育用組成物ならびにこれを用いたエビ目の生物の飼育方法が提供される。NITE-BP-03199、NITE-BP-03200およびNITE-BP-03201から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む、ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療用組成物ならびにこれを用いたエビ目感染症に対する予防または治療方法が提供される。

立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP). 近藤秀裕(KONDO, Hidehiro); 〒1088477 東京都港区港南4丁目5番7号 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP). 松本 紗奈(MATSUMOTO, Sana); 〒1088477 東京都港区港南4丁目5番7号 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人深見特許事務所(FUKAMI PATENT OFFICE, P.C.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 中之島フェスティバルタワー・ウエスト Osaka (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))

## 明 細 書

発明の名称：

エビ目の生物の飼育用組成物、およびエビ目感染症に対する予防または治療用組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、エビ目の生物の飼育用組成物、およびエビ目感染症に対する予防または治療用組成物に関する。本発明は、上記組成物を用いるエビ目の生物の飼育方法にも関する。

### 背景技術

[0002] 近年、エビの養殖場において、早期死亡症候群／急性肝臓壊死病（以下、「EMS／AHPND」とも記す。）による被害が増加している。EMS／AHPNDは中国、タイ、ベトナム、マレーシアおよびメキシコ等で発生が報告されており、2020年には日本でも発生が報告された。養殖池でEMS／AHPNDが発生すると、20～30日の間に大量のエビが急激に死亡し、その死亡率は100%近くに達する。このため、一部の国においてエビ養殖業は危機的な状況に直面している。EMS／AHPNDは、ビブリオ・パラヘモリティカス（*Vibrio parahaemolyticus*）の特殊タイプが主な原因菌であることがわかっている。EMS／AHPNDを抑制するために、PCR法による稚エビの感染検査が実施されている。しかしながら、検査で陰性となった稚エビがEMS／AHPNDを発症することもあり、感染検査のみでEMS／AHPNDを防止することは困難である。多くの先進国は抗生物質を使用した養殖エビの輸入を禁止しており、抗生物質の投与によるEMS／AHPNDの予防または治療も制限される。

[0003] これまで、細菌感染によるエビの養殖被害を抑制するための方法が開発されている。例えば、特開2015-137254号公報（特許文献1）には、エビにおいてビブリオ菌に対する免疫を誘導するワクチン組成物が開示されている。しかしながら、EMS／AHPNDの原因菌であるビブリオ・パ

ラヘモリティカスを含むワクチンは未だ開発されておらず、上記ワクチン組成物のEMS/AHPNDへの予防および治療効果は不明である。国際公開第2019/059027号（特許文献2）には、5-アミノレブリン酸を含む経口投与組成物をエビ目の生物に摂取させ成長を促進させることで、EMS/AHPNDを予防・治療することが開示されている。Sudarat Chomwong et al. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol.89 Page.54-65 (2018)（非特許文献1）には、エビ腸管由来のラクトバチルス・プランタラムSGLAB01株およびラクトコッカス・ラクティスSGLAB02株、またはその組み合わせのプロバイオティクス（生菌）添加餌により生体防御系を活性化し、EMS/AHPNDに対する抵抗性を高める方法が報告されている。上記の成長促進剤およびプロバイオティクスは、EMS/AHPNDの原因菌に対して直接抗菌活性を示さず、エビの生体防御系に作用することで間接的にEMS/AHPNDに対する抵抗性を高める。

### 先行技術文献

### 特許文献

- [0004] 特許文献1：特開2015-137254号公報  
特許文献2：国際公開第2019/059027号

### 非特許文献

- [0005] 非特許文献1：Sudarat Chomwong et al. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol.89 Page.54-65 (2018)

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、環境への影響および人への毒性が少なく、エビ目感染症を抑制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

- [0007] 本発明は、以下に例示される項目に関する。

[1] NITE-BP-03199、NITE-BP-03200および

N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む、エビ目の生物の飼育用組成物。

[2] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む、ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療用組成物。

[3] 前記エビ目感染症は、早期死亡症候群／急性肝臓壊死病を含む、  
[2] に記載の組成物。

[4] 飼料または飼料添加剤である、[1]～[3]のいずれかに記載の組成物。

[5] 飼育水または飼育水添加剤である、[1]～[3]のいずれかに記載の組成物。

[6] 前記エビ目は、クルマエビ科を含む、[1]～[5]のいずれかに記載の組成物。

[7] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をエビ目の生物に摂取させることを含む、エビ目の生物の飼育方法。

[8] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む飼育水にエビ目の生物を浸漬させることを含む、エビ目の生物の飼育方法。

[9] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をエビ目の生物に摂取させることを含む、ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療方法。

[10] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 およ

びN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む飼育水にエビ目の生物を浸漬させることを含む、ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療方法。

[11] 前記エビ目感染症は、早期死亡症候群／急性肝臓壊死病を含む、[9]または[10]に記載の方法。

[12] 前記エビ目は、クルマエビ科を含む、[7]～[11]のいずれかに記載の方法。

[13] [1]～[6]のいずれかに記載の組成物をエビ目の生物を飼育する水中に落下させて供給することを含むエビ目の生物の飼育方法。

[14] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をビブリオ属菌に接触させることを含む、ビブリオ属菌の増殖抑制または殺菌方法。

### 発明の効果

[0008] 本発明によれば、環境への影響および人への毒性が少なく、エビ目感染症を抑制することができる。また、本発明によれば、エビ目感染症の原因菌に直接抗菌活性を示すことにより感染症を抑制することができる。

### 図面の簡単な説明

[0009] [図1]実験1において、N I T E B P - 0 3 1 9 9の(A)コロニーの形状および(B)グラム染色結果を示す図である。

[図2]実験2において、N I T E B P - 0 3 2 0 0の(A)コロニーの形状および(B)グラム染色結果を示す図である。

[図3]実験3において、N I T E B P - 0 3 2 0 1の(A)コロニーの形状および(B)グラム染色結果を示す図である。

[図4]実験4のビブリオ属菌に対する抗菌活性評価試験(平板培養)を説明する図である。

[図5]実験7において、N I T E B P - 0 3 2 0 0およびN I T E B P -

03201によるビブリオ属菌によるエビ目感染症の抑制効果を示すグラフである。

[図6]実験8において、NITE BP-03201によるビブリオ属菌によるエビ目感染症の抑制効果を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではない。本明細書において「A～B」という形式の表記は、範囲の上限下限（すなわちA以上B以下）を意味し、Aにおいて単位の記載がなく、Bにおいてのみ単位が記載されている場合、Aの単位とBの単位とは同じである。

[0011] [エビ目の生物の飼育用組成物]

本発明の一実施形態に係るエビ目の生物の飼育用組成物は、NITE-BP-03199、NITE-BP-03200およびNITE-BP-03201から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む。本発明に係るエビ目の生物の飼育用組成物は、エビ目の生物のビブリオ属菌による感染症を予防または治療することができる。

[0012] NITE-BP-03199、NITE-BP-03200およびNITE-BP-03201は、それぞれ受託番号NITE BP-03199（原寄託日：2020年4月9日）、受託番号NITE BP-03200（原寄託日：2020年4月9日）および受託番号NITE BP-03201（原寄託日：2020年4月9日）として、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（NPMD、住所：〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）にブダペスト条約に基づいて国際寄託されている細菌である。NITE-BP-03199、NITE-BP-03200およびNITE-BP-03201は、いずれも乳酸菌の一種であるラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）に属する細菌である。上記菌株の菌学的性質につ

いては、後述する表1～表6および図1～図3に示す。

[0013] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1は、自然環境中に存在するため、エビの飼育に用いる際の安全性が高いと考えられる。N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1は、単離された細菌であってよい。

[0014] 本発明に係るエビ目の生物の飼育用組成物は、上記乳酸菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む。菌体は、環境中から単離されたものであってもよく、培養されたものであってもよい。菌体は死菌であっても生菌であってもよい。菌体は培養液、緩衝液等に存在しているものであってもよく、これらを濃縮して液体を除いたものまたはその凍結乾燥物であってもよく、凍結ストックであってもよい。

[0015] 菌体培養物は、細菌の分泌物、代謝物等を含んでよい。菌体培養物には、細菌が産生するペプチド、タンパク質、糖、酵素、有機酸およびこれらを含む培地（液体培地および固形培地）が含まれる。菌体培養物は、細菌を培養した上清であってもよい。培養上清は、例えば細菌を培養した液体培地から遠心分離、濾過操作等で細菌を除いて得ることができる。

[0016] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1は、乳酸菌の通常の培養方法に従って培養することができる。代表的な培養方法としては、MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 液体培地またはMRS寒天培地を用いて温度30℃で培養する方法が挙げられる。

[0017] 菌体または菌体培養物の抽出物は、上記乳酸菌の菌体または菌体培養物が有するビブリオ属菌に対する抗菌活性を失わないように調製される。抽出物は、例えば細菌の菌体または菌体培養物を超音波破碎、ビーズ摩擦、凍結融解、化学的溶解等の処理をすることにより得ることができる。抽出物は、菌体または菌体培養物を塩析、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィーまたは有機溶媒を用いた液相抽出等を行って得てもよい。これらの処理は適宜組

合わせて行なうことができる。抽出物は、細菌の菌体の断片、核酸、ペプチド、タンパク質、糖および酵素を含み得る。本明細書において、細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を「菌体調製物」とも記す。

[0018] 本明細書において、エビ目は、十脚目 (Decapoda) ともいい、甲殻類の分類群のひとつである。エビ目は、エビ、カニ、ヤドカリ等を含む。エビ目は、クルマエビ亜目 (Dendrobranchiata) およびエビ亜目 (Pleocyemata) を含む。クルマエビ亜目は、サクラエビ科 (Sergestidae)、クルマエビ科 (Penaeidae)、イシエビ科 (Sicyoniidae)、クダヒゲエビ科 (Solenoceridae)、チヒロエビ科 (Aristeidae) およびオヨギチヒロエビ科 (Benthescymidae) を含む。クルマエビ科は、ウシエビ (通称: ブラックタイガー) (*Penaeus monodon*)、シロアシエビ (通称: バナメイエビ) (*Litopenaeus vannamei*)、コウライエビ (*Fenneropenaeus chinensis*)、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*)、フトミゾエビ (*Melicertus latisulcatus*)、ヨシエビ (*Metapenaeus ensis*)、シバエビ (*Metapenaeus joyneri*)、モエビ (*Metapenaeus moyebi*)、アカエビ (*Metapenaeopsis barbata*)、シロエビ (*Metapenaeopsis lata*)、クマエビ (*Penaeus semisulcatus*)、サルエビ (*Trachysalambria curvirostris*) 等を含む。クルマエビ科は、エビ養殖産業における重要種を多く含む。エビ亜目は、オトヒメエビ下目 (Stenopodidea)、コエビ下目 (Caridea)、センジュエビ下目 (Polychelida)、イセエビ下目 (Achelata)、ザリガニ下目 (Astacidea)、ムカシイセエビ下目 (Glypheidea)、アナエビ下目 (Axiidea)、アナジャコ下目 (Gebiidea)、ヤドカリ下目 (Anomura) およびカニ下目 (Brachyu

r a) を含む。

[0019] エビ目の生物の飼育用組成物は、経口投与組成物であってよい。経口投与組成物は、エビ目の生物に経口投与される組成物であれば特に限定されない。エビ目の生物の飼育用組成物は、エビ目の生物用の飼料または飼料添加剤であってよい。経口投与組成物は、エビ目の生物が飼育されている環境（例えば飼育水）に投与され、上記乳酸菌の菌体調製物が環境中に溶け出し、環境中で飼育されるエビ目の生物に経口的に摂取されてもよい。上記乳酸菌の菌体調製物を含むエビ目の生物の経口投与組成物は、投与されたエビ目の生物のビブリオ属菌による感染症を予防または治療することができる。

[0020] エビ目用飼料は、通常エビ目の生物の飼育、養殖に使用される成分であれば任意の成分を含んでよく、任意の製造方法において製造されてよい。エビ目用飼料の組成は、エビ目の種類および生育ステージによって適宜選択できる。エビ目用飼料には、例えばイカミール、オキアミミール、フィッシュミール、大豆油かす、コーングルテンミール等のタンパク質源、グルテン、デンプン等のバインダーを含んでよい。エビ目用飼料は、飼料用に許容される公知の担体または添加剤を含んでよく、エリスロマイシン製剤、アンピシリン製剤、プラジクアンテル製剤、塩化リゾチーム製剤、塩酸オキシテトラサイクリン製剤、スピラマイシン製剤、ニフルスチレン酸ナトリウム製剤、塩酸リンコマイシン製剤、フルメキン製剤、およびグルタチオン製剤等の水産生物用医薬品、ビタミンC、ビタミンB1、ビタミンA、ビタミンD、およびビタミンE等のビタミン類、ならびに、リジン、メチオニン、およびヒスチジン等のアミノ酸類等の栄養補給物質、 $\beta$ -カロチン、アスタキサンチン、およびカンタキサンチン等の色素、カルシウム、およびケイ酸等のミネラル類、微量金属、ならびに、保存料等を含んでよい。

[0021] エビ目用飼料は、飼育されるエビ目の種類および大きさ等に応じて任意の形状、大きさを有してよい。エビ目用飼料は、例えば乾燥原料を混合および粉碎した粉末状飼料、粉体を固形化した固形化飼料（ドライペレット）、水分を含んだペースト状の飼料（モイストペレット）等であってもよい。エビ

目用飼料の製造方法の一例として、まず一般的な粉末のエビ養殖用飼料と、上記乳酸菌の菌体調製物とを混合する。この混合物を成形、例えばパスタマシンまたはシリンジを用いて押し出し成形する。最後に成形物を、例えば60℃～65℃で2時間程度乾燥させることにより、上記乳酸菌の菌体調製物を含むエビ目用飼料を得ることができる。N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 の菌体調製物は、高温で乾燥させてもビブリオ属菌に対する抗菌活性を失わない。エビ目用飼料の他の一例として、一般的な粉末のエビ養殖用飼料に上記乳酸菌の菌体調製物をまぶしたものの、粉末のエビ養殖用飼料を上記乳酸菌の菌体調製物を含む液体（培養上清等）に浸漬したものが挙げられる。

[0022] エビ目用飼料に含まれる上記乳酸菌の菌体調製物の量は、ビブリオ属菌に対する抗菌活性を示す程度であれば特に限定されず、ビブリオ属菌の菌体密度、飼育場所、飼育温度、酸素濃度、飼育密度、対象のエビ目の種類等に適した量であればよい。エビ目用飼料中の上記乳酸菌の菌体調製物の合計量は、例えば $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$  c f u（コロニー形成単位）/gであってもよく、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{12}$  c f u/gであってもよく、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$  c f u/gであってもよい。上記コロニー形成単位は、寒天平板培養法によって求めることができる。エビ目用飼料中の上記乳酸菌の菌体調製物の合計量（含有割合）は、飼料重量に対して0.001質量%～50質量%、好ましくは0.001質量%～30質量%、より好ましくは0.01質量%～30質量%、更に好ましくは0.01質量%～10質量%であってよい。当該合計量は、天秤等で秤量可能である。

[0023] エビ目用飼料添加剤は、特に限定されず、一般的なエビ目用養殖用飼料に添加できる添加剤であればよい。飼料添加剤は、液体または粉末であってよく、凍結乾燥されていてもよい。飼料添加剤は、上記乳酸菌の菌体調製物そのものであってもよい。飼料添加剤は、上記乳酸菌の菌体調製物をエビ目用飼料に付着、吸収または混合させやすくするための液体、展着剤等を含んでよい。飼料添加剤は、飼料中に含まれる菌体調製物の合計量が上述の範囲と

なるように飼料に添加されることが好ましい。

[0024] 上記乳酸菌の菌体調製物を含むエビ目用飼料は、1日1回または複数回に分けて給餌されてよい。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼料は、数日に1回給餌されてもよい。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼料を給餌する期間は、対象のエビ目の種類等に応じて適宜選択することができる。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼料は、養殖（飼育）の全期間において継続して給餌されてもよく、一部の期間にのみ給餌されてもよい。「一部の期間」とは、例えば、飼育の全期間の10%以上、20%以上、30%以上、50%以上、70%以上または90%以上の期間であってよい。本実施形態の一側面において、上述の「一部の期間」の上限値は、特に制限されないが、例えば、飼育の全期間の100%未満であってもよいし、99%以下であってもよい。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼料を給餌する期間は、例えば、1ヵ月間～4ヵ月間であってよく、約2ヵ月であってもよい。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼料は、任意の期間で給餌の継続と中断を繰り返してもよい。

[0025] エビ目の飼育用組成物はエビ目の生物に与えられ得る。エビ目の飼育用組成物をエビ目の生物に与える方法としては、エビ目の生物を飼育する水とエビ目の飼育用組成物とを混合する方法が挙げられる。エビ目の生物を飼育する水とエビ目の生物の飼育用組成物とを混合する方法としては、水中にエビ目の生物の飼育用組成物を落下させる方法、エビ目の生物の飼育用組成物が静置された飼育槽に水を注ぐ方法、水に溶かしたエビ目の生物の飼育用組成物をエビ目の生物を飼育する水に添加する方法などが挙げられる。エビ目の生物の飼育用組成物は、自動的に一定の間隔でエビ目の生物に与えられてもよい。例えばエビ目用飼料は、エビ目の生物を飼育する水中に落下させて供給されてもよく、自動的に一定の間隔で供給されてもよい。

[0026] エビ目の生物の飼育用組成物は、浸漬投与組成物であってよい。浸漬投与組成物は、飼育水または飼育水添加剤であってよい。飼育水は、エビ目の生物の飼育に通常使用される液体であってよく、淡水、汽水または海水（人工的に調製された海水を含む）であってよい。エビ目の生物の飼育は、自然の

環境中、養殖池または水槽で行ってよい。飼育水は、エアレーションが行われていてもよい。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼育水は、ビブリオ属菌に対する抗菌活性を有する。この飼育水中に浸漬されたエビ目の生物は、ビブリオ属菌による感染症が抑制され得る。

[0027] 飼育水中の上記乳酸菌の菌体調製物の含有量は、ビブリオ属菌に対する抗菌活性を示す程度であれば特に限定されず、ビブリオ属菌の菌体密度、飼育場所、飼育温度、酸素濃度、飼育密度、対象のエビ目の種類等に適した量であればよい。飼育水中の上記乳酸菌の菌体調製物の合計量（含有量）は、例えば  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL であってもよく、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL であってもよく、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$  cfu/mL であってもよい。上記コロニー形成単位は、寒天平板培養法によって求めることができる。飼育水に含まれる上記乳酸菌の菌体調製物の合計の濃度は、特に限定されず、 $0.1 \sim 100,000$  ppm であってもよく、 $1 \sim 100,000$  ppm であってもよく、 $10 \sim 100,000$  ppm であってもよい。上記乳酸菌の菌体調製物の合計量は、天秤等で秤量可能である。求められた合計量に基づいて、飼育水に対する質量比から濃度を算出することが可能である。

[0028] 飼育水添加剤は、特に限定されず、一般的なエビ目の生物の飼育水に添加できる添加剤であればよい。飼育水添加剤は、液体または粉末であってもよく、凍結乾燥されていてもよい。飼育水添加剤は、上記乳酸菌の菌体調製物そのものであってもよい。飼育水添加剤は、飼育水中に含まれる菌体調製物の合計量が上述の範囲となるように飼育水に添加されることが好ましい。

[0029] 飼育水添加剤は、エビ目の生物の飼育を開始する前の飼育水に添加されてもよく、エビ目の生物の飼育を行っている飼育水に添加してもよい。飼育水添加剤を飼育水に添加する方法としては、上述のエビ目の生物を飼育する水とエビ目の生物の飼育用組成物とを混合する方法と同様の方法が挙げられる。例えば飼育水添加剤は、エビ目の生物を飼育する水中に落下させて供給されてもよく、自動的に一定の間隔で供給されてもよい。

[0030] 上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼育水に、エビ目の生物を浸漬する期間は、適宜選択することができる。エビ目の生物の飼育の全期間に亘って継続して上記乳酸菌の調製物を含む飼育水でエビ目の生物を飼育してもよく、一部の期間にのみこの飼育水にエビ目の生物を浸漬してもよい。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼育水中で飼育する期間は、例えば、1ヵ月間～4ヵ月間であってよく、約2ヵ月であってよい。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼育水中での飼育は、任意の期間で継続と中断を繰り返してもよい。

[0031] 本発明の一実施形態は、エビ目の生物の飼育用組成物の製造におけるN I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物の使用である。

[0032] [エビ目の生物の飼育方法]

本発明の一実施形態に係るエビ目の生物の飼育方法は、N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をエビ目の生物に投与することを含む。投与は、経口投与または浸漬投与であってよい。

[0033] 本発明の一実施形態に係るエビ目の生物の飼育方法は、N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をエビ目の生物に摂取させることを含む。上記乳酸菌の菌体調製物は、上記のエビ目の生物の飼育用組成物として供給されてよい。

[0034] 本発明の一実施形態に係るエビ目の生物の飼育方法は、N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む飼育水にエビ目の生物を浸漬させることを含む。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼育水は、上記エビ目の生物の飼育用組成物として供給されてよい。

[0035] エビ目の生物の飼育方法において、エビ目の生物の飼育用組成物は、上述のエビ目の生物を飼育する水とエビ目の生物の飼育用組成物とを混合する方法に従って与えられてもよい。例えばエビ目の生物の飼育方法において、エビ目の生物の飼育用組成物は、エビ目の生物を飼育する水中に落下させて供給されてもよく、自動的に一定の間隔で供給されてもよい。

[0036] 本発明の一実施形態は、エビ目の生物の飼育におけるN I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物の使用である。

[0037] [ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療用組成物]

本発明の一実施形態に係るビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療用組成物は、N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む。予防または治療用組成物は、動物用医薬品であってよい。

[0038] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1は、ビブリオ属菌に対して抗菌活性を有し、ビブリオ属菌の増殖を抑制すること、またはビブリオ属菌を殺菌することができる。N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1を用いて、ビブリオ属菌によるエビ目感染症を予防または治療することができる。本明細書において、治療には、症状の緩和、症状の好転および完治を含む。上記乳酸菌は、感染症の原因菌に対して直接抗菌活性を有し、感染症の抑制機構が宿主に依存しないため、対象のエビ目の種類または成長ステージにかかわらず、より汎用的にエビ目感染症を抑制することができる。上記乳酸菌を用いれば、より安定したエビ目の生物の養殖が可能になる。

[0039] ビブリオ属菌によるエビ目感染症としては、ビブリオ・パラヘモリティカス (*Vibrio parahaemolyticus*) を原因菌とするE

MS/AHPNDが挙げられる。EMS/AHPNDは稚エビに発生すると死亡率がほぼ100%であり、養殖業に致命的な問題となる。エビ目の生物にEMS/AHPNDを起こすビブリオ・パラヘモリティカスは、ヒトに食中毒を起こす原因菌である腸炎ビブリオと同種であるが、異なるタイプの細菌である。エビ目の生物に感染症を引き起こす他のビブリオ属菌としては、*V. nigripulchritudo*、*V. penaeicida*、*V. alginolyticus*、*V. anguillarum*、*V. campbelli*、*V. damsella*、*V. fischeri*、*V. harveyi*、*V. logei*、*V. mediterrani*、*V. ordalii*、*V. orientalis*、*V. pelagicus*、*V. splendidus*、*V. vulnificus*、*V. fluvialis*、*V. cholerae*等が含まれる。*V. nigripulchritudo*および*V. penaeicida*の感染によるエビ目の生物の大量死も報告されている。

[0040] 予防または治療用組成物は、経口投与組成物であってよく、飼料または飼料添加剤の形態でエビ目の生物に投与されてよい。予防または治療用組成物は、上記エビ目の生物の飼育に用いられる経口投与組成物に含まれ得る成分を含んでよい。予防または治療用組成物は、公知のビブリオ属菌に対する抗菌活性を有する成分またはエビ目の生物の免疫活性を上昇させる成分をさらに含んでもよい。予防または治療組成物の形状、製造方法および投与方法は、上記の経口投与組成物の形状、製造方法および投与方法と同じであってよい。予防または治療用組成物における上記乳酸菌の菌体調製物の含有量は、投与されたエビ目の生物においてビブリオ属菌による感染症を抑制できる程度であれば特に限定されず、上記経口投与組成物における含有量と同じ範囲であってよい。

[0041] 予防または治療用組成物は、飼育水または飼育水添加剤であってよい。飼育水または飼育水添加剤である予防または治療用組成物は、上記エビ目の生物の飼育に用いられる飼育水または飼育水添加剤と同じように使用または添

加されてよい。予防または治療用組成物における上記乳酸菌の菌体調製物の含有量は、浸漬されたエビ目の生物においてビブリオ属菌による感染症を抑制できる程度であれば特に限定されず、上記飼育水における含有量と同じ範囲であってよい。

[0042] 本発明の一実施形態は、ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療用組成物の製造におけるNITE-BP-03199、NITE-BP-03200およびNITE-BP-03201から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物の使用である。

[0043] [ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療方法]

本発明の一実施形態に係るビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療方法は、NITE-BP-03199、NITE-BP-03200およびNITE-BP-03201から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をエビ目の生物に投与することを含む。投与は、経口投与または浸漬投与であってよい。

[0044] 本発明の一実施形態に係るビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療方法は、NITE-BP-03199、NITE-BP-03200およびNITE-BP-03201から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をエビ目の生物に摂取させることを含む。上記乳酸菌の菌体調製物は、上記予防または治療用組成物としてエビ目の生物に供給されてよい。

[0045] 本発明の一実施形態に係るビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療方法は、NITE-BP-03199、NITE-BP-03200およびNITE-BP-03201から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む飼育水にエビ目の生物を浸漬させることを含む。上記乳酸菌の菌体調製物を含む飼育水は、上記予防または治療用組成物として供給されてよい。

[0046] 本発明の一実施形態は、ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防ま

たは治療のためのN I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物の使用である。

[0047] [ビブリオ属菌の増殖抑制剤または殺菌剤、および増殖抑制方法または殺菌方法]

本発明の一実施形態に係るビブリオ属菌の増殖抑制剤または殺菌剤は、N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む。増殖抑制剤または殺菌剤は、上記エビ目の生物の飼育用組成物と同じものを用いることができる。増殖抑制剤または殺菌剤は、ビブリオ属菌に対する抗菌活性を有する物質をさらに含んでもよい。

[0048] ビブリオ属菌の増殖抑制剤または殺菌剤に含まれる上記乳酸菌の菌体調製物の含有量は特に限定されないが、例えば $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{12}$  c f u / m Lであってもよく、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$  c f u / m Lであってもよく、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{12}$  c f u / m Lであってもよい。ビブリオ属菌の増殖抑制剤または殺菌剤に含まれる上記乳酸菌の菌体調製物の濃度は、特に限定されず、 $1 \sim 1,000,000$  p p mであってもよく、 $100 \sim 1,000,000$  p p mであってもよく、 $10,000 \sim 1,000,000$  p p mであってもよい。

[0049] 上記乳酸菌の菌体調製物は、ビブリオ属菌の増殖を抑制または殺菌することができ、好ましくは、*V. parahaemolyticus*、*V. nigrripulchritudo*および*V. penaeicida*から選択される少なくとも1種の増殖を抑制または殺菌する。

[0050] 本発明の一実施形態に係るビブリオ属菌の増殖抑制または殺菌方法は、N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をビブリオ属菌に接触させることを含む。上記

乳酸菌の菌体調製物とビブリオ属菌とを接触させる方法は特に限定されず、例えばビブリオ属菌が存在する水に上記乳酸菌の菌体調製物を添加してもよく、ビブリオ属菌が存在する物体を上記乳酸菌の菌体調製物を含む液体に浸漬してもよく、ビブリオ属菌が感染した宿主に上記乳酸菌の菌体調製物を含む組成物を摂取させてもよい。上記乳酸菌の菌体調製物は、ビブリオ属菌の増殖抑制剤または殺菌剤の形態で使用されてもよい。

[0051] 本発明の一実施形態は、ビブリオ属菌の増殖抑制剤または殺菌剤の製造におけるN I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物の使用である。

[0052] 本発明の一実施形態は、ビブリオ属菌の増殖抑制または殺菌のためのN I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0およびN I T E - B P - 0 3 2 0 1から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物の使用である。

## 実施例

[0053] 以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0054] [実験1：N I T E B P - 0 3 1 9 9の分離および同定]

分離源（レンブ）を滅菌水と共に摩砕した。摩砕液を適宜希釈して1 / 2 M R S液体培地に添加し、集積培養した。集積培養液を炭酸カルシウム含有のM R S寒天培地に塗抹し、ハローを形成した微生物を分離した。以下、この分離株を分離株Aという。過酸化水素に分離株Aの培養液を懸濁したところ、気泡が発生しなかった。分離株Aは、カタラーゼ活性を有しないことから、乳酸菌であることが確認された。

[0055] 1 6 S r R N A遺伝子解析、形態観察および生理・生化学的性状試験によって、分離株Aを同定した。

(1) 1 6 S r R N A遺伝子解析

分離株AからゲノムDNAを抽出し、得られたゲノムDNAを鋳型として

、クローニング用フォワードプライマー9Fおよびクローニング用リバースプライマー1510R（中川恭好他：遺伝子解析法 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法、日本放線菌学会編、放線菌の分類と同定、88-117pp. 日本学会事務センター、2001）を用いて16S rRNA 遺伝子のPCR増幅を行った。PCR増幅はTks Gflex DNA ポリメラーゼ（タカラバイオ社製）を用いて行い、PCR後の増幅産物を精製した。

[0056] 精製したPCR後の増幅産物を用いてサイクルシーケンス反応を行った。サイクルシーケンス反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて行った。得られた反応液を精製し、精製液をDNAシーケンス解析（3130xl DNA Analyzer）に供して、分離株Aから抽出した鋳型DNAの16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。シーケンス解析用プライマーとしては、9F、515F、1099F、536R、926R、1510R（中川恭好他：遺伝子解析法 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定法、日本放線菌学会編、放線菌の分類と同定、88-117pp. 日本学会事務センター、2001）を用いた。

[0057] 分離株Aの16S rRNA 遺伝子の塩基配列を微生物同定システム「ENKI」（テクノスルガ・ラボ社製）を用いて、微生物同定データベースDB-BA15.0（テクノスルガ・ラボ社製）、国際塩基配列データベース（DDBJ/ENA (EMBL) /GenBank）に対してBLAST相同性検索を行った。分離株Aの16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、Lactobacillus pentosus (JCM1558) の16S rRNA 遺伝子の塩基配列に対して同一性100.0%、Lactobacillus plantarum subsp. plantarum (JCM1149) の16S rRNA 遺伝子の塩基配列に対して同一性100.0%、Lactobacillus paraplantarum (DSM10667) の16S rRNA 遺伝子の塩基配列に対して同一性99.8

0%を示した。

[0058] (2) 形態観察および生理・生化学的性状試験

MRS寒天培地に分離菌Aを塗布し、温度30℃で48時間好気培養し、以下の方法で細胞形態、グラム染色性、運動性およびコロニー形態を観察した。

コロニー形態は、実体顕微鏡SMZ800N（ニコン社製）によって観察した。細胞形態は、光学顕微鏡BX50F4（オリンパス社製）によって観察した。グラム染色ではフェイバーG「ニッスイ」（日水製薬社製）を用いた。Barrow&Feltham（Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.）に記載の方法に基づき、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス産生およびブドウ糖の酸化/発酵（O/F）について試験を行った。API50CHBキット（bioMérieux社製、フランス）を用いて、細菌の生理・生化学的性状反応を調べた。

[0059] 図1の(A)に示すように、分離株Aは円形のコロニーを形成した。図1の(B)に示すように、分離株Aはグラム染色性が陽性であった。分離株Aの生理・生化学的性状試験および発酵性試験の結果を表1および表2に示す。分離株Aは運動性を示さないグラム陽性の桿菌で、芽胞を形成せず、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応は陰性を示し、グルコースを発酵した。これらの性状は、16S rDNA部分塩基配列解析の結果、帰属の可能性が示された*Lactobacillus*属の性状と一致した。APIキットを用いて行った発酵性試験の結果、分離株Aはガラクトース、フラクトース、 $\alpha$ -メチルーD-マンノシドおよびメレチトース等を発酵し、グリセロール、D-キシロース等を発酵しなかった。分離株Aは、アルギニンジヒドロラーゼ活性を示さず、15℃で生育した。これらの性状は、16S rDNA部分塩基配列解析の結果、帰属が示唆された*L. pentosus*および

L. plantarumのうち、グリセロールおよびD-キシロースの発酵を示さない点がL. pentosusと異なり、L. plantarumの性状と一致した。従って、分離株AはLactobacillus plantarumに属する新規分離株であることがわかった。分離株AをNITE BP-03199として国際寄託した。

[0060] [表1]

試験項目	NITE BP-03199	
培養温度	30℃	
細胞形態	桿菌 (0.7-0.8×2.0-3.0 μm)	
グラム染色性	+	
芽胞の有無	-	
運動性	-	
コロニー形態	培地	MRS 寒天培地
	培養時間	48 時間
	直径	1~3 mm
	色調	乳白色
	形	円形
	隆起状態	レンズ状
	周縁	全縁
	表面の形状など	スムーズ
	透明度	不透明
	粘稠度	バター様
生育温度試験	15℃	+
	37℃	+
	45℃	-
アルギニンジヒドロラーゼ活性	-	
カタラーゼ反応	-	
オキシダーゼ反応	-	
グルコースからの酸/ガス産生 (酸産生/ガス産生)	+ / -	
O/F テスト(酸化/発酵)	+ / +	

+ : 陽性、- : 陰性

[0061]

[表2]

項目	基質成分	試験結果	項目	基質成分	試験結果
0	コントロール	-	25	エスクリン	+
1	グリセロール	-	26	サリシン	+
2	エリスリトール	-	27	セロビオース	+
3	D-アラビノース	-	28	マルトース	+
4	L-アラビノース	+	29	ラクトース	+
5	リボース	+	30	メリビオース	+
6	D-キシロース	-	31	スクロース	+
7	L-キシロース	-	32	トレハロース	+
8	アドニトール	-	33	イヌリン	-
9	$\beta$ -メチル-D-キシロース	-	34	メレチトース	+
10	ガラクトース	+	35	ラフィノース	+
11	グルコース	+	36	でんぷん	-
12	フラクトース	+	37	グリコーゲン	-
13	マンノース	+	38	キシリトール	-
14	ソルボース	-	39	ゲンチオビオース	+
15	ラムノース	-	40	D-ツラノース	+
16	ズルシトール	-	41	D-リキソース	-
17	イノシトール	-	42	D-タガトース	-
18	マンニトール	+	43	D-フコース	-
19	ソルビトール	+	44	L-フコース	-
20	$\alpha$ -メチル-D-マンノシド	+	45	D-アラビトール	-
21	$\alpha$ -メチル-D-グルコシド	+	46	L-アラビトール	-
22	N-アセチルグルコサミン	+	47	グルコネート	+
23	アミグダリン	+	48	2-ケトグルコネート	-
24	アルブチン	+	49	5-ケトグルコネート	-

+ : 陽性、- : 陰性

[0062] [実験2 : N I T E B P - 0 3 2 0 0 の分離および同定]

分離源として、アダンを用いた以外は、実験1と同じ方法により、分離株Bを分離した。分離株Bの同定を実験1と同じ方法によって行なった。

[0063] 分離株Bの16S rRNA遺伝子の塩基配列は、*Lactobacillus pentosus* (JCM1558)の16S rRNA遺伝子の塩基配列に対して同一性99.87%、*Lactobacillus pl*

*antarum* subsp. *plantarum* (JCM1149) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に対して同一性 99.87%、*Lactobacillus parapantarum* (DSM10667) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に対して同一性 99.66% を示した。しかし、分離株 B の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列と完全に一致する 16S rRNA 遺伝子を持つ微生物は存在しなかった。

[0064] 図 2 の (A) に示すように、分離株 B は円形のコロニーを形成した。図 2 の (B) に示すように、分離株 B はグラム染色性が陽性であった。分離株 B の生理・生化学的性状試験および発酵性試験の結果を表 3 および表 4 に示す。分離株 B は運動性を示さないグラム陽性の桿菌で、芽胞を形成せず、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応は陰性を示し、グルコースを発酵した。これらの性状は、16S rDNA 部分塩基配列解析の結果、帰属の可能性が示された *Lactobacillus* 属の性状と一致した。API キットを用いて行った発酵性試験の結果、分離株 B はガラクトース、フラクトース、 $\alpha$ -メチル-D-マンノシドおよびメレチトース等を発酵し、グリセロール、D-キシロース等を発酵しなかった。分離株 B は、アルギニンジヒドロラーゼ活性を示さず、15°C で生育した。これらの性状は、16S rDNA 部分塩基配列解析の結果、近縁と示された *L. pentosus* および *L. plantarum* のうち、グリセロールおよび D-キシロースの発酵を示さない点が *L. pentosus* と異なり、*L. plantarum* の性状と一致した。従って、分離株 B は *Lactobacillus plantarum* に属する新規分離株であることがわかった。分離株 B を NITE BP-03200 として国際寄託した。

[0065]

[表3]

試験項目	N I T E B P - 0 3 2 0 0	
培養温度	30℃	
細胞形態	桿菌 (0.7-0.8×2.0-3.0 μm)	
グラム染色性	+	
芽胞の有無	-	
運動性	-	
コロニー形態	培地	MRS 寒天培地
	培養時間	48 時間
	直径	1~3 mm
	色調	乳白色
	形	円形
	隆起状態	レンズ状
	周縁	全縁
	表面の形状など	スムーズ
	透明度	不透明
	粘稠度	バター様
生育温度試験	15℃	+
	37℃	+
	45℃	-
アルギニンジヒドロラーゼ活性	-	
カタラーゼ反応	-	
オキシダーゼ反応	-	
グルコースからの酸/ガス産生 (酸産生/ガス産生)	+ / -	
O/F テスト(酸化/発酵)	+ / +	

+ : 陽性、- : 陰性

[0066]

[表4]

項目	基質成分	試験結果	項目	基質成分	試験結果
0	コントロール	-	25	エスクリン	+
1	グリセロール	-	26	サリシン	+
2	エリスリトール	-	27	セロビオース	+
3	D-アラビノース	-	28	マルトース	+
4	L-アラビノース	-	29	ラクトース	+
5	リボース	+	30	メリビオース	+
6	D-キシロース	-	31	スクロース	+
7	L-キシロース	-	32	トレハロース	+
8	アドニトール	-	33	イヌリン	-
9	$\beta$ -メチル-D-キシロース	-	34	メレチトース	+
10	ガラクトース	+	35	ラフィノース	+
11	グルコース	+	36	でんぷん	-
12	フラクトース	+	37	グリコーゲン	-
13	マンノース	+	38	キシリトール	-
14	ソルボース	-	39	ゲンチオビオース	+
15	ラムノース	-	40	D-ツラノース	+
16	ズルシトール	-	41	D-リキソース	-
17	イノシトール	-	42	D-タガトース	-
18	マンニトール	+	43	D-フコース	-
19	ソルビトール	+	44	L-フコース	-
20	$\alpha$ -メチル-D-マンノシド	+	45	D-アラビトール	-
21	$\alpha$ -メチル-D-グルコシド	-	46	L-アラビトール	-
22	N-アセチルグルコサミン	+	47	グルコネート	+
23	アミグダリン	+	48	2-ケトグルコネート	-
24	アルブチン	+	49	5-ケトグルコネート	-

+ : 陽性、- : 陰性

[0067] [実験3 : N I T E B P - 0 3 2 0 1 の分離および同定]

分離源として、ギランイヌビワを用いた以外は、実験1と同じ方法により分離株Cを分離した。分離株Cの同定を実験1と同じ方法によって行なった。

[0068] 分離株Cの16S rRNA遺伝子の塩基配列は、*Lactobacillus pentosus* (JCM1558) の16S rRNA遺伝子の

塩基配列に対して同一性99.93%、*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (JCM1149) の16S rRNA遺伝子の塩基配列に対して同一性99.93%、*Lactobacillus paraplantarum* (DSM10667) の16S rRNA遺伝子の塩基配列に対して同一性99.73%を示した。しかし、分離株Cの16S rRNA遺伝子の塩基配列と完全に一致する16S rRNA遺伝子を持つ微生物は存在しなかった。

[0069] 図3の(A)に示すように、分離株Cは円形のコロニーを形成した。図3の(B)に示すように、分離株Cはグラム染色性が陽性であった。分離株Cの生理・生化学的性状試験および発酵性試験の結果を表5および表6に示す。分離株Cは運動性を示さないグラム陽性の桿菌で、芽胞を形成せず、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応は陰性を示し、グルコースを発酵した。これらの性状は、16S rDNA部分塩基配列解析の結果、帰属の可能性が示された*Lactobacillus*属の性状と一致した。APIキットを用いて行った発酵性試験の結果、分離株Cはガラクトース、フラクトースおよびメレチトース等を発酵し、グリセロール、D-キシロース等を発酵しなかった。分離株Cは、アルギニンジヒドロラーゼ活性を示さず、15℃で生育した。これらの性状は、16S rDNA部分塩基配列解析の結果、帰属が示唆された*L. pentosus*および*L. plantarum*のうち、グリセロールおよびD-キシロースの発酵を示さない点が*L. pentosus*と異なり、*L. plantarum*の性状と一致した。従って、分離株Cは*Lactobacillus plantarum*に属する新規分離株であることがわかった。分離株CをNITE BP-03201として国際寄託した。

[0070]

[表5]

試験項目	N I T E B P - 0 3 2 0 1	
培養温度	30℃	
細胞形態	桿菌 (0.9-1.0×2.0-4.0 μm)	
グラム染色性	+	
芽胞の有無	-	
運動性	-	
コロニー形態	培地	MRS 寒天培地
	培養時間	48 時間
	直径	1~3 mm
	色調	乳白色
	形	円形
	隆起状態	レンズ状
	周縁	全縁
	表面の形状など	スムーズ
	透明度	不透明
	粘稠度	バター様
生育温度試験	15℃	+
	37℃	+
	45℃	-
アルギニンジヒドロラーゼ活性	-	
カタラーゼ反応	-	
オキシダーゼ反応	-	
グルコースからの酸/ガス産生 (酸産生/ガス産生)	+ / -	
O/F テスト(酸化/発酵)	+ / +	

+ : 陽性、- : 陰性

[0071]

[表6]

項目	基質成分	試験結果	項目	基質成分	試験結果
0	コントロール	-	25	エスクリン	+
1	グリセロール	-	26	サリシン	+
2	エリスリトール	-	27	セロビオース	+
3	D-アラビノース	-	28	マルトース	+
4	L-アラビノース	+	29	ラクトース	+
5	リボース	+	30	メリビオース	+
6	D-キシロース	-	31	スクロース	+
7	L-キシロース	-	32	トレハロース	+
8	アドニトール	-	33	イヌリン	-
9	$\beta$ -メチル-D-キシロース	-	34	メレチトース	+
10	ガラクトース	+	35	ラフィノース	+
11	グルコース	+	36	でんぷん	-
12	フラクトース	+	37	グリコーゲン	-
13	マンノース	+	38	キシリトール	-
14	ソルボース	-	39	ゲンチオビオース	+
15	ラムノース	-	40	D-ツラノース	+
16	ズルシトール	-	41	D-リキソース	-
17	イノシトール	-	42	D-タガトース	-
18	マンニトール	+	43	D-フコース	-
19	ソルビトール	+	44	L-フコース	-
20	$\alpha$ -メチル-D-マンノシド	-	45	D-アラビトール	-
21	$\alpha$ -メチル-D-グルコシド	-	46	L-アラビトール	-
22	N-アセチルグルコサミン	+	47	グルコネート	+
23	アミグダリン	+	48	2-ケトグルコネート	-
24	アルブチン	+	49	5-ケトグルコネート	-

+ : 陽性、- : 陰性

[0072] [実験4 : 乳酸菌の菌体培養物の抗菌活性評価試験 (平板培養)]

NITE BP-03199、NITE BP-03200およびNITE BP-03201の菌体培養物がビブリオ属菌に対する抗菌活性を有するかを検証した。ビブリオ属菌としては、*V. parahaemolyticus* TUMSAT-D6株 (AHPND株)、*V. nigrripulchritudo* TUMSAT-OK1株および*V. penaeicida*

TUMSAT-OG1株を用いた。

[0073] 図4を参照して実験方法を説明する。100 $\mu$ Lのビブリオ属菌の菌液11（約10<sup>8</sup>cfu/mL）を寒天培地12にコンラージ棒を用いて塗抹した。寒天培地は、Marine agar（Difco社）を使用した。濾紙ディスク15に20 $\mu$ Lの乳酸菌培養濾過液13を染み込ませ、ビブリオ属菌を塗抹した寒天培地上に置いた。乳酸菌培養濾過液（菌体培養物）は、NITE BP-03199、NITE BP-03200およびNITE BP-03201のいずれかの乳酸菌をMRS Brothで温度30℃で培養し、培養上清を0.22 $\mu$ m径のフィルターで濾過した液である。各乳酸菌培養液の波長600nmにおける濁度は約10ODであった。濾紙ディスク15を置いた寒天培地を25℃で24時間培養し、生育阻止円14の直径（mm）を測定した。結果を表7に示す。表7において示されている数値は、上記生育阻止円の直径（mm）を示している。ネガティブコントロールとして乳酸菌用培地（MRS Broth）、ポジティブコントロールとして抗生物質であるアンピシリン（100 $\mu$ g/mL）を濾紙ディスクに染みこませた。

[0074] [表7]

	NITE-BP-03199	NITE-BP-03200	NITE-BP-03201	MRS Broth	Ampicillin
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10	10	10	0	28
<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	14	13	16	0	29
<i>Vibrio penaeicida</i>	13	12	16	0	37

[0075] NITE BP-03199、NITE BP-03200およびNITE BP-03201の菌体培養物はいずれも、ビブリオ属菌の生育培地に生育阻止円を形成させた。NITE BP-03199、NITE BP-03200およびNITE BP-03201の菌体培養物はいずれも、ビブリオ属菌の増殖を抑制できることが示された。

[0076] [実験5：乳酸菌の菌体培養物の抗菌活性評価試験（液体培養）]  
平板培養法で最も高い抗菌活性を示したNITE BP-03201の菌

体培養物について、液体中でもビブリオ属菌の増殖を抑制できるかを検証した。実験5では、ビブリオ属菌を液体培地中で培養した点の実験4と異なる。実験5で用いたビブリオ属菌の菌株は、実験4と同じである。

[0077] Heart Infusion broth (Difco社) に2.5% NaClを添加して、NaCl終濃度を3%にしたビブリオ属菌用液体培地(3HI培地)を準備した。ビブリオ属菌を3HI培地に添加し、約 $10^6$  cfu/mLとなるように菌液を調整した。その菌液450 $\mu$ Lに、MRS Brothで培養したNITE BP-03201の培養濾過液を50 $\mu$ L加えて混合し、25 $^{\circ}$ Cで18時間培養した。NITE BP-03201の培養濾過液は、波長600nmにおける濁度が約100Dの乳酸菌培養液から調製した。

[0078] 波長600nmにおける濁度によりビブリオ属菌の菌数を算出した。MRS Brothのみを添加した試料(ネガティブコントロール)では、培養前と比較してビブリオ属菌が約1000倍に増殖していた。これに対して、NITE BP-03201の培養濾過液を添加した試料ではビブリオ属菌の増殖は認められなかった。NITE BP-03201の菌体培養物は、液体中でもビブリオ属菌の増殖を抑制できることが示された。

[0079] さらに以下の実験を行った。NITE BP-03201の培養濾過液を添加して18時間培養したサンプルを遠心して上清を除き、回収した細菌(ビブリオ属菌)を3HI培地で再び懸濁し、さらに24時間培養した。培養後に細菌の増殖は認められなかった。乳酸菌の菌体培養物を除いた後もビブリオ属菌の増殖が認められなかったことから、NITE BP-03201の菌体培養物は、ビブリオ属菌に対して静菌作用ではなく殺菌作用を有することが示唆された。

[0080] [実験6: 乳酸菌の菌体培養物の抗菌活性評価試験(滅菌海水培養)]  
NITE BP-03199、NITE BP-03200およびNITE BP-03201の菌体培養物がビブリオ属菌に対する抗菌活性を有するかを検証した。実験6では、ビブリオ属菌を人工海水中で培養した点の実

験4と異なる。実験6では、ビブリオ属菌として *V. parahaemolyticus* TUMSAT-D6株（AHPND株）を使用した。

[0081] 3HI培地で培養したビブリオ属菌（ $2 \times 10^9$  cfu/mL）を約  $2 \times 10^2$  cfu/mLとなるように人工海水中に懸濁した。人工海水はマリンソルト（テトラ社）を使用して調製し、 $0.22 \mu\text{m}$ 径のフィルターを用いて滅菌した。ビブリオ属菌を含む人工海水を  $450 \mu\text{L}$ 、 $475 \mu\text{L}$  および  $490 \mu\text{L}$  ずつ  $1.5 \text{mL}$  チューブに分注し、NITE BP-03199、NITE BP-03200 および NITE BP-03201 のいずれかの乳酸菌培養濾過液をそれぞれ  $50 \mu\text{L}$ （ $1/10$  希釈）、 $25 \mu\text{L}$ （ $1/20$  希釈）および  $10 \mu\text{L}$ （ $1/50$  希釈）ずつ加えた。ネガティブコントロールとしては、乳酸菌用培地である MRS Broth を添加した。混合液を  $25^\circ\text{C}$  のインキュベータに静置した。培養1時間後、3時間後および6時間後にチューブから  $50 \mu\text{L}$  の溶液を取り出し、3HI寒天培地に塗抹し、 $25^\circ\text{C}$  で一晩培養した。寒天培地上に生じたコロニー数を表8に示す。

[0082] [表8]

	NITE-BP-03199			NITE-BP-03200			NITE-BP-03201			MRS Broth		
	1h	3h	6h	1h	3h	6h	1h	3h	6h	1h	3h	6h
1/10 希釈	3	0	0	2	0	0	3	0	0	1	8	198
1/20 希釈	1	1	1	2	2	1	1	3	1	1	14	>200
1/50 希釈	4	2	4	4	5	26	2	5	146	2	8	>200

[0083] MRS Broth（ネガティブコントロール）を添加した海水と比較して、乳酸菌培養濾過液を添加した海水中ではいずれも、ビブリオ属菌の増殖が顕著に抑制されていた。NITE BP-03199、NITE BP-03200 および NITE BP-03201 の菌体培養物はいずれも、海水中でビブリオ属菌の増殖を抑制できることが示された。

[0084] [実験7：乳酸菌の経口投与によるEMS/AHPND予防または治療効果の検証]

経口投与した乳酸菌の菌体培養物が、エビにおけるビブリオ属菌による感染症を抑制できるかを検証した。ビブリオ属菌として *V. parahaem*

olyticus TUMSAT-D6株（AHPND株）を使用した。エビの飼育環境として、18Lガラス水槽に10Lの人工海水を準備した。水作エイトMサイズで飼育水を濾過しながらエビを飼育した。水温は28℃に設定した。各試験群にはバナメイエビを20匹ずつ用いた。

[0085] タイで使用されている市販の顆粒タイプの餌に、乳酸菌培養濾過液を餌が十分に浸かる程度加えてエビ目の生物の飼育用経口投与組成物を作製した。乳酸菌はNITE BP-03200およびNITE BP-03201を用いた。乳酸菌培養濾過液は波長600nmにおける濁度が約100Dの乳酸菌培養液から調製した。ネガティブコントロールとしては、乳酸菌用培地であるMRS Brothを餌に添加したものを準備した。給餌は1日にエビの体重の10%程度を3~4回に分けて実施した。感染試験の3日前から乳酸菌培養物を含む経口投与組成物の給餌を開始し、感染試験中も給餌を継続した。10Lの人工海水に $2 \times 10^9$  cfu/mLのビブリオ属菌液を0.25mL添加し、感染試験を行った。感染開始からのエビの生残率を図5に示す。

[0086] NITE BP-03200およびNITE BP-03201のいずれかの菌体培養物を含むエビ目の生物の飼育用経口投与組成物を投与したエビは、コントロールと比較して、生残率が高かった。NITE BP-03200およびNITE BP-03201の菌体培養物を経口投与させることで、ビブリオ属菌による感染症（EMS/AHPND）を予防できることが示された。

[0087] [実験8：乳酸菌の経口投与によるEMS/AHPND予防または治療効果の検証]

実験7とは異なる方法でエビ目の生物の飼育用経口投与組成物を作製した。これをエビに経口投与して感染症抑制効果を検証した。エビの飼育環境および用いたビブリオ属菌は実験7と同じである。

[0088] 顆粒タイプの餌を粉碎し、NITE BP-03201の培養濾過液24mLを20gの餌に添加して捏ね、パスタマシンで成型した後、60℃で2

時間程度乾燥させた。N I T E B P - 0 3 2 0 1 の培養濾過液は、波長 6 0 0 n m における濁度が約 1 0 0 D の乳酸菌培養液から調製した。感染実験の 3 日前からこの経口投与組成物の給餌を開始し、感染試験中も給餌を続した。ネガティブコントロールとしては、通常の餌をエビに給餌した。ビブリオ属菌を  $2.6 \times 10^5$  c f u / m L になるよう人工海水に添加し、エビを 6 時間浸漬した後、エアレーション装置を交換した。感染開始から 1 4 日までのエビの生残数を図 6 に示す。

[0089] 通常の餌を与えた群ではエビの生残率が約 3 0 % であったのに対し、N I T E B P - 0 3 2 0 1 の菌体培養物を含むエビ目の生物の飼育用経口投与組成物を投与した群では、エビの生残率は 6 0 % であった。N I T E B P - 0 3 2 0 1 の菌体培養物は、高温処理および乾燥処理を行っても、ビブリオ属菌に対する抗菌活性を失わず、乾燥後の菌体培養物を含む組成物の給餌によっても、ビブリオ属菌による感染症 ( E M S / A H P N D ) を予防または治療できることが示された。

[0090] [実験 9 : 乳酸菌の培養物を含む飼育水による E M S / A H P N D 予防または治療効果の検証]

N I T E B P - 0 3 1 9 9 、 N I T E B P - 0 3 2 0 0 および N I T E B P - 0 3 2 0 1 の菌体培養物を飼育水に添加し、その飼育水中で飼育されたエビがビブリオ属菌による感染症を抑制できるかを検証した。エビの飼育環境および用いたビブリオ属菌は実験 7 と同じである。給餌はタイで使用されている市販の顆粒タイプの餌を朝夕に給餌した。

[0091] エビを飼育水槽に入れ、N I T E B P - 0 3 1 9 9 、 N I T E B P - 0 3 2 0 0 および N I T E B P - 0 3 2 0 1 のいずれかの乳酸菌培養濾過液、あるいは、ネガティブコントロールとして乳酸菌用培地 M R S B r o t h を飼育水 1 0 L に 1 0 m L 添加した。乳酸菌培養濾過液は波長 6 0 0 n m における濁度が約 1 0 0 D の乳酸菌培養液から調製した。その後、 $2 \times 10^9$  c f u / m L のビブリオ属菌の菌液 0. 2 5 m L を飼育水に添加した。添加後 3 時間はエアーストーンにより曝気し、3 時間後にエアーストーンをろ

過装置（水作エイトMサイズ）に変更した。ビブリオ属菌の感染開始から24時間後にさらに乳酸菌培養濾過液10mLを飼育水に添加した。感染開始から6日までのエビの生残数を表9に示す。

[0092] [表9]

日数	NITE-BP-03199	NITE-BP-03200	NITE-BP-03201	MRS Broth
0	20	20	20	20
1	20	20	19	17
2	20	20	19	17
3	20	20	19	17
4	20	20	19	16
5	20	20	19	14
6	20	20	19	14

[0093] コントロール群（MRS Broth）と比較して、NITE BP-03199、NITE BP-03200およびNITE BP-03201のいずれかの乳酸菌培養濾過液を添加した飼育水では、エビの生残数が高かった。NITE BP-03199、NITE BP-03200およびNITE BP-03201のいずれかの菌体培養物を含む飼育水は、ビブリオ属菌による感染症（EMS/AHPND）の予防に有用であることが示された。

### 符号の説明

[0094] 11 ビブリオ属菌の菌液、12 寒天培地、13 乳酸菌培養濾過液、14 生育阻止円、15 濾紙ディスク。

## 請求の範囲

- [請求項1] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む、エビ目の生物の飼育用組成物。
- [請求項2] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む、ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療用組成物。
- [請求項3] 前記エビ目感染症は、早期死亡症候群／急性肝臓壊死病を含む、請求項2に記載の組成物。
- [請求項4] 飼料または飼料添加剤である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項5] 飼育水または飼育水添加剤である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項6] 前記エビ目は、クルマエビ科を含む、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項7] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をエビ目の生物に摂取させることを含む、エビ目の生物の飼育方法。
- [請求項8] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む飼育水にエビ目の生物を浸漬させることを含む、エビ目の生物の飼育方法。
- [請求項9] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0 および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をエビ目の生物に摂取させることを含む、ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防ま

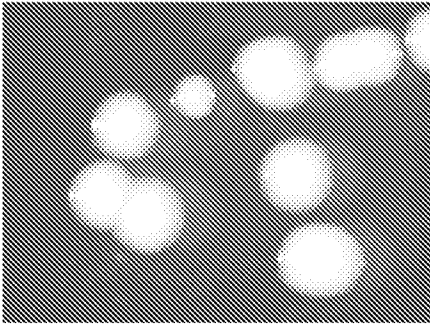
たは治療方法。

- [請求項10] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物を含む飼育水にエビ目の生物を浸漬させることを含む、ビブリオ属菌によるエビ目感染症に対する予防または治療方法。
- [請求項11] 前記エビ目感染症は、早期死亡症候群／急性肝臓壊死病を含む、請求項9または10に記載の方法。
- [請求項12] 前記エビ目は、クルマエビ科を含む、請求項7～10のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項13] 請求項1または2に記載の組成物をエビ目の生物を飼育する水中に落下させて供給することを含むエビ目の生物の飼育方法。
- [請求項14] N I T E - B P - 0 3 1 9 9、N I T E - B P - 0 3 2 0 0および N I T E - B P - 0 3 2 0 1 から選択される少なくとも1種の細菌の菌体もしくは菌体培養物またはこれらの抽出物をビブリオ属菌に接触させることを含む、ビブリオ属菌の増殖抑制または殺菌方法。

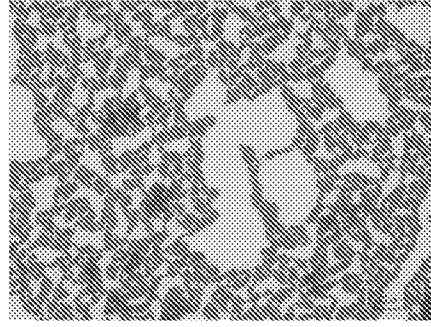
[図1]

FIG.1

(A)



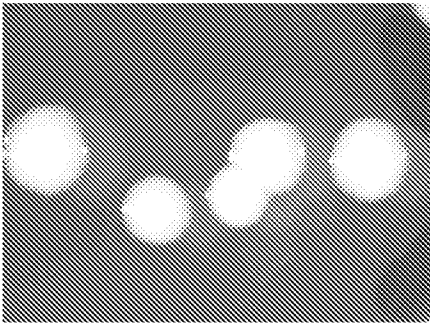
(B)



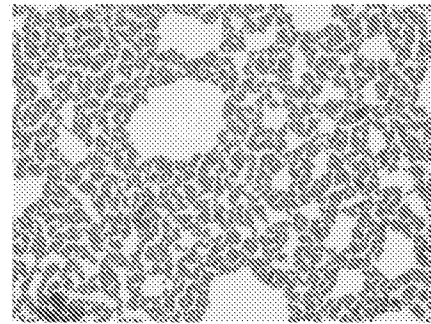
[図2]

FIG.2

(A)



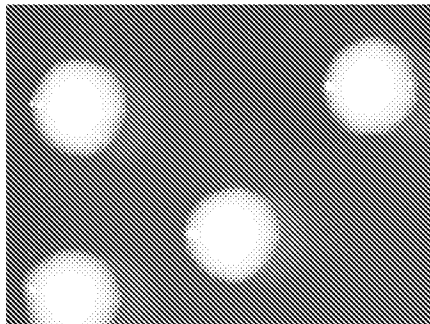
(B)



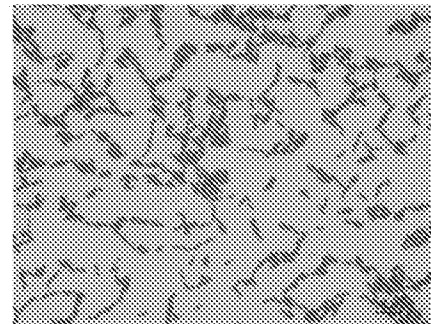
[図3]

FIG.3

(A)

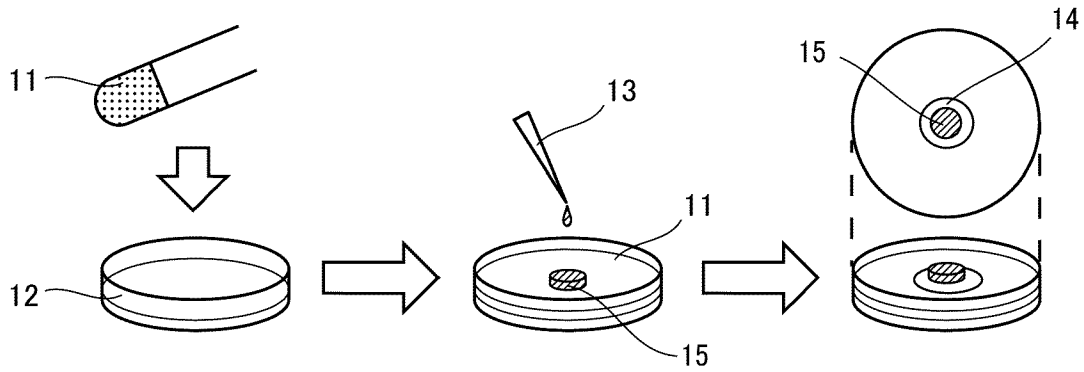


(B)



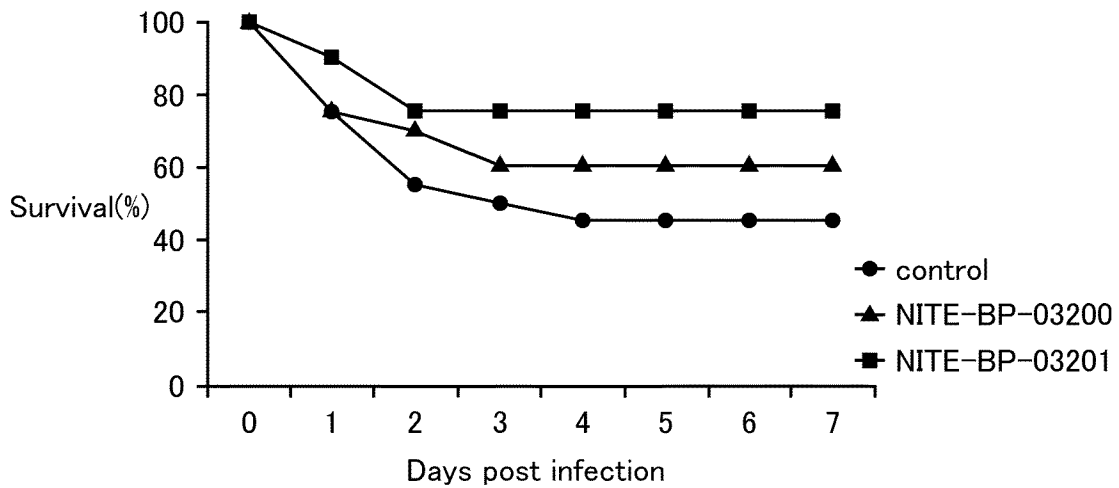
[図4]

FIG.4



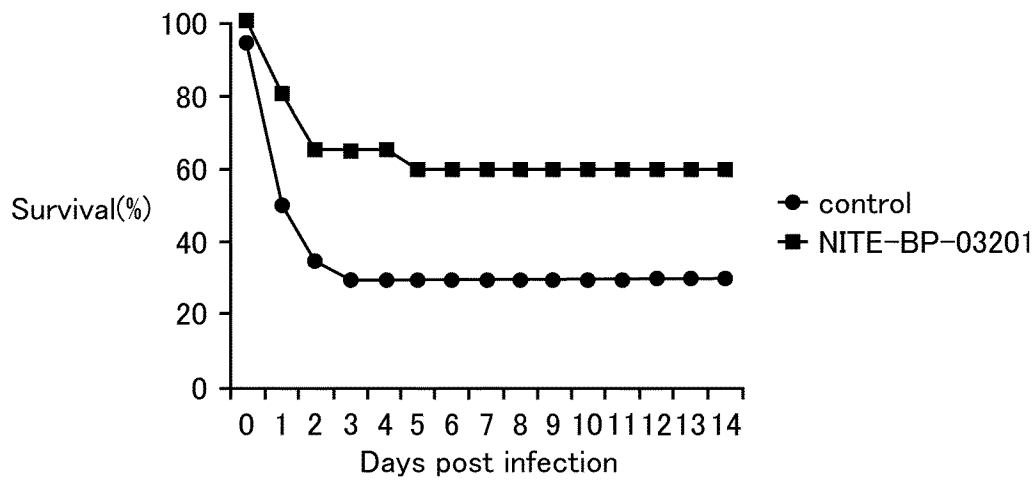
[図5]

FIG.5



[図6]

FIG.6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/027145

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><b>A61K 39/106</b>(2006.01)i; <b>A61P 31/04</b>(2006.01)i; <b>A23K 10/16</b>(2016.01)i; <b>A23K 50/80</b>(2016.01)i; <b>A01K 61/59</b>(2017.01)i; <b>C12N 1/20</b>(2006.01)i  FI: A23K10/16; A23K50/80; A01K61/59; C12N1/20 E; A61K39/106; A61P31/04</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39/106; A61P31/04; A23K10/16; A23K50/80; A01K61/59; C12N1/20		
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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2009-159955 A (KYUSHU MEDICAL KK) 23 July 2009 (2009-07-23) paragraphs [0016]-[0049]	1-14
A	JP 8-298982 A (AASU GIKEN KK) 19 November 1996 (1996-11-19) paragraphs [0034]-[0064]	1-14
A	JP 2007-236386 A (NIPPON SUISAN KAISHA LTD) 20 September 2007 (2007-09-20) paragraphs [0007]-[0023]	1-14
A	WO 2004/084922 A1 (TAKEDA FOOD PRODUCTS, LTD.) 07 October 2004 (2004-10-07) p. 7, line 14 to p. 11, line 7	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>29 August 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>06 September 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2022/027145**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2009-159955 A	23 July 2009	(Family: none)	
JP 8-298982 A	19 November 1996	(Family: none)	
JP 2007-236386 A	20 September 2007	(Family: none)	
WO 2004/084922 A1	07 October 2004	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 39/106(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A23K 10/16(2016.01)i; A23K 50/80(2016.01)i; A01K 61/59(2017.01)i; C12N 1/20(2006.01)i FI: A23K10/16; A23K50/80; A01K61/59; C12N1/20 E; A61K39/106; A61P31/04		
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）） A61K39/106; A61P31/04; A23K10/16; A23K50/80; A01K61/59; C12N1/20 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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022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
X	JP 2009-159955 A (株式会社九州メディカル) 23.07.2009 (2009-07-23) [0016]-[0049]	1-14
A	JP 8-298982 A (株式会社アース技研) 19.11.1996 (1996-11-19) [0034]-[0064]	1-14
A	JP 2007-236386 A (日本水産株式会社) 20.09.2007 (2007-09-20) [0007]-[0023]	1-14
A	WO 2004/084922 A1 (武田食品工業株式会社) 07.10.2004 (2004-10-07) 7頁14行-11頁7行	1-14
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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抵触するものではなく、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	29.08.2022	国際調査報告の発送日 06.09.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  田辺 義拓 2B 5713  電話番号 03-3581-1101 内線 3237	

国際調査報告  
特許ファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/027145

引用文献	公表日	特許ファミリー文献	公表日
JP 2009-159955 A	23.07.2009	(ファミリーなし)	
JP 8-298982 A	19.11.1996	(ファミリーなし)	
JP 2007-236386 A	20.09.2007	(ファミリーなし)	
WO 2004/084922 A1	07.10.2004	(ファミリーなし)	