

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年9月21日 (21.09.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/098447 A1

- (51) 国際特許分類:
A23K 1/00 (2006.01) C12P 7/52 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/305448
- (22) 国際出願日: 2006年3月17日 (17.03.2006)
- (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2005-079168 2005年3月18日 (18.03.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治飼糧株式会社 (MEIJI FEED. CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1300021 東京都墨田区緑1-26-11 Tokyo (JP). 明治乳業株式会社 (Meiji Dairies Corporation) [JP/JP]; 〒1368908 東京都江東区新砂一丁目2番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 羽川 義人 (HAGAWA, Yoshihito). 依田 伸生 (YODA, Nobuo). 折橋 毅典 (ORIHASHI, Takenori). 神辺 道雄 (KANBE, Michio).
- (74) 代理人: 小栗 昌平, 外 (OGURI, Shohei et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目7番13号 栄光特許事務所 Tokyo (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FEEDING STUFF COMPOSITION COMPRISING PROLIFERATION PROMOTING AGENT FOR BIFIDUS BACTERIA AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: ビフィズス菌増殖促進成分を含有する飼料組成物及びその使用方法

(57) Abstract: A feeding stuff composition comprising whey fermented by a propionic acid bacterium, and a method for the formation and/or colonization of bifidus flora in the intestine of a young livestock comprising administering the feed stock composition to the young livestock.

(57) 要約: 本発明は、プロピオン酸菌による乳清発酵物を含有することを特徴とする飼料組成物、及びその飼料組成物を仔畜に投与することを特徴とする、仔畜の腸内にビフィズス菌叢を形成及び/又は定着させる方法に関する。



WO 2006/098447 A1

明 細 書

ビフィズス菌増殖促進成分を含有する飼料組成物及びその使用方法 技術分野

[0001] 本発明は、飼料組成物及びその使用方法に関するものであり、更に詳細には、出生後間もない仔畜、特に仔ウシを対象とする飼料組成物及びその使用方法に関するものである。本発明に係わる飼料組成物は、腸内菌叢改善作用を有するものであって、例えば、仔ウシ用代用乳や混合飼料に利用することができる。仔畜の出生後、速やかに本発明の飼料組成物を投与することにより、ビフィズス菌の多い菌叢を作り上げることができる。

背景技術

[0002] 家畜の成長を順調に促進することは、成畜においても容易なことではなく、ましてや体力が劣り且つデリケートな仔畜の場合には一層むずかしい。例えば、新生仔ウシの場合、その成長を阻害する因子には、初乳の摂取不足、不適切な環境(不衛生)、飼料の変化、母乳から人工飼料(代用乳、スターターなど)への切り替え、輸送や飼育環境の変化によるストレスなどがある。

[0003] 健康な動物の腸内では一定の腸内常在菌が腸粘膜上皮に存在し、各種病原菌の感染を防いでいる。一方、食餌や環境の変化、ストレス、抗生物質の投与などによって、腸内菌叢のバランスに乱れが生ずる。例えば、下痢の仔ウシでは、LactobacillusもしくはBifidobacteriumのいずれかが減少していたという報告があり、これらの有用菌の重要なことが指摘されている。

[0004] 仔ウシの腸内菌叢は、生後、速やかに構築される。しかしながら、ビフィズス菌の多い正常な菌叢が構築され、そのまま離乳期およびそれ以降まで維持されればよいが、実際には菌叢に影響する多くの阻害要因に遭遇する。例えば、生後4～7日位で初乳から代用乳に切り替わるが、この時に下痢を起こしやすい。

次いで、14日以前に、仔ウシは生まれた所から飼育場に輸送される。

仔ウシは、給与飼料の変化や給与量の増加、輸送や環境ストレスに対して順応性が乏しいため、安定性が十分でない腸内菌叢は影響を受ける。

- [0005] また、初乳不足による免疫力の低下、仔ウシ導入時の輸送や環境の変化によるストレス、飼料の変化などにより、腸内菌叢に乱れが生じ、下痢の原因となる。哺乳期の下痢は、発育の停滞を生じさせ、その後の発育に悪影響をおよぼす原因となる。
- [0006] 以下に、仔ウシの腸内菌叢に影響する代表的な因子を具体的に示す。
第一に、仔ウシの出生時の環境は、場所によって衛生的に差があり、また、生後4～7日で初乳から代用乳に飼料が変わるが、初乳の質や給与量には個体差があり、さらに代用乳の品質や給与量にも差がある。
- [0007] 第二に、仔ウシは出生後2週齢前に他の飼育場に導入されるが、移動(輸送)と環境の変化によるストレスを受け、また、導入される飼育場によって、環境条件、衛生面、飼育方法などに差がある。
- [0008] 第三に、出生後2～3週間で、仔ウシの受動免疫(受動抗体)は半減するが、その受動免疫の減少には個体差がある。ここで、仔ウシの移行抗体の半減期は、IgG 16～32日、IgM 4日、IgA 2.5日である(例えば、非特許文献1参照)。
なお、IgGは全身及び腸管の免疫、IgMは3日齢までの初生仔ウシの敗血症の予防、IgAは粘膜表面の免疫(局所免疫)に役立つ。
そして、仔ウシは出生後2週以降に抗体を作り始め、能動免疫が生ずるが、その能動免疫の生じ方には個体差がある。
- [0009] 仔ウシの主な疾病は、下痢を主徴とする消化器疾患と肺炎を主徴とする呼吸器疾患である。仔ウシの受動抗体は2～3週間で切れ、仔ウシ自身が満足すべき抗体を作りだすようになるのは生後4週齢以降である。IgG不足による仔ウシの感染症には、大腸菌、ロタウイルス、コロナウイルス、クリプトスポリジア、サルモネラなどの下痢症がある。また、肺炎が多発する仔ウシ群では、出生後の下痢や栄養不足があり、リンパ球の成熟に重要な出生後1ヶ月におけるT細胞の機能低下が見られる。
- [0010] 仔ウシは、疾病率が非常に高く、へい死率も5%を越える事例も多く、経営上の圧迫要因となっている。例えば、導入された生後5～14日の乳用雄ウシ300頭の中、166頭が単純性下痢と診断された例が報告されており(例えば、非特許文献2参照)、疾病、特に下痢とへい死率とは密接に関連している。

[0011] これらの点を考慮して、現在、仔ウシ用の腸内菌そう改善促進剤として、Enterococcus faecalis、Enterococcus faecium、Clostridium butyricum、Bacillus subtilis、Bacillus cereus、Bifidobacterium thermophilum、Bifidobacterium pseudolongum、Lactobacillus acidophilus等の生菌剤、及びオリゴ糖が市販されている。

しかしながら、生菌剤の場合、投与した生菌が腸内で定着することは難しく、また、オリゴ糖はビフィズス菌以外の多くの細菌にも利用されるという欠点を有しており、仔ウシの腸内に定着することができる有用菌のみを、出生後約2週間までの間に特異的に増加させるものは見出されていない。

[0012] 一方、プロピオン酸菌による乳清発酵物のひとつであるProfec (登録商標: Propionibacterium freudenreichii ET-3株による乳清発酵物) が知られているが (例えば、非特許文献3参照)、この乳清発酵物を実際に仔ウシ等の仔畜に投与して効果を確認した知見はなく、ましてや、新生仔畜の腸内においてビフィズス菌そうを形成し、定着させ、下痢を防止してへい死率を低下せしめることについては、何ら報告例はない。

非特許文献1: 萩原克郎: 家畜診療、47(7)、477(2000)

非特許文献2: 鈴木和夫ら: 家畜診療、第256号、19～25(1984年10月)

非特許文献3: 依田伸生: ILSI、No.80、5～13(2004)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明は、仔畜の疾病率が高く、例えば、仔ウシの場合、下痢等を発症してへい死率5%をこえる場合も多いため、酪農家の経営を圧迫しているという現状に鑑み、仔ウシ等の仔畜の疾病率を低下させることによりへい死率を低下させ、健康に仔畜を飼育することを目的とする。

[0014] すなわち、本発明は、仔畜の出生後、安定な腸内菌そうができる過程で、速やかに、且つ積極的にビフィズス菌そうを作り上げることを目的とする。仔ウシ等の仔畜は、安定な腸内菌そう形成後においては、保有する各自の生理にあったビフィズス菌を増やすので、安定な腸内菌そう形成後における、増殖したビフィズス菌の定着は容易である。しかしながら、出生後、腸内菌そうが自然に形成される前に、積極的に良好な腸内菌そうを形成させ、ビフィズス菌を驚異的に増やすことについての例はない

。

課題を解決するための手段

- [0015] 本発明は、上記目的を達成するためになされたものであって、本発明者らは、仔畜の出生後、腸内菌叢が自然に形成される前に、積極的にビフィズス菌叢を形成させること、すなわち、出生後の最初から良好な腸内菌叢を形成させ、これを定着させることを課題とした。
- [0016] 本発明は、上述した技術課題を解決するためになされたものであって、本発明者らは鋭意検討の結果、投与の容易性、仔畜に対する安全性の面から、経口投与による方法により上記課題の解決を図った。
- [0017] 出生時の仔ウシの腸内は無菌状態であるが、母ウシの初乳や環境(乳頭、敷料、水など)を介して菌が腸内に定着し、出生後3週間でバランスのとれた腸内菌叢が形成される。この重要な時期にBifidobacteriumなどの有用菌を優勢にしておくことは、その期間に仔ウシを疾病から守る上で極めて有効である。また、加齢に伴いこれらの有用菌が減少することが報告されているが、出生後3週間、より好ましくは2週間までに有用菌を高いレベルで優勢にしておくことで、その減少を遅延させることができる可能性に本発明者らは着目し、各種の物質についてスクリーニングを行った。
- [0018] そして、本発明者らは、莫大な数の物質の中から、仔ウシ等の仔畜の出生後において可及的早い時期にビフィズス菌の多い腸内菌叢を形成させ得る成分として、プロピオン酸菌による乳清発酵物をスクリーニングし、更に研究を重ね、遂に本発明の完成に至った。
- [0019] すなわち、本発明は、プロピオン酸菌による乳清発酵物を投与することにより、仔畜の腸内にビフィズス菌叢を形成、定着させ、仔畜を健康に飼育させる解決手段を提供するものであって、例えば次のような態様が包含される。
- [0020] (1)プロピオン酸菌による乳清発酵物を含有することを特徴とする飼料組成物。
(2)出生後から3週齢までの仔畜に投与されることを特徴とする上記(1)に記載の飼料組成物。
(3)仔畜が仔ウシであることを特徴とする上記(2)に記載の飼料組成物。
(4)飼料組成物が腸内菌叢改善作用を有するものであることを特徴とする上記(1)

～(3)のいずれか1つに記載の飼料組成物。

(5)プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii*であることを特徴とする上記(1)～(4)のいずれか1つに記載の飼料組成物。

(6)プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207、*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 8262、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424 (NBRC 12424)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12426 (NBRC 12426)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12391 (NBRC 12391)、*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株から選ばれる少なくともひとつであることを特徴とする上記(5)に記載の飼料組成物。

(7)プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ET-3(FERM BP-8115)株であることを特徴とする上記(6)に記載の飼料組成物。

(8)上記(1)に記載の飼料組成物を仔畜に投与することを特徴とする、仔畜の腸内にビフィズス菌叢を形成及び/又は定着させる方法。

(9)投与が、腸内菌叢が形成される時期、受動免疫が低下する時期及び/又はストレスがかかる時期に行われることを特徴とする上記(8)に記載の方法。

(10)仔畜が出生後から3週齢までの仔畜であることを特徴とする上記(8)または(9)に記載の方法。

(11)仔畜が仔ウシであることを特徴とする上記(8)に記載の方法。

(12)プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii*であることを特徴とする上記(8)に記載の方法。

(13)プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207、*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 8262、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424 (NBRC 12424)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12426 (NBRC 12426)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12391 (NBRC 12391)、*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株から選ばれる少なくともひとつであることを特徴とする上記(12)に記載の方法。

(14)プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ET-3(FERM BP-8115)株であることを特徴とする上記(13)に記載の方法。

(15) 飼料組成物を、一日当たり、飼料組成物中に含まれる1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidが $2 \mu\text{g}$ ～ $600 \mu\text{g}$ の範囲となる量で投与することを特徴とする上記(8)に記載の方法。

(16) 飼料組成物中に含まれる1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidが $6 \mu\text{g}$ ～ $240 \mu\text{g}$ の範囲であることを特徴とする上記(15)に記載の方法。

(17) 仔畜の腸内にビフィズス菌叢を形成及び/又は定着させるための上記(1)に記載の飼料組成物の使用。

(18) 腸内菌叢が形成される時期、受動免疫が低下する時期及び/又はストレスがかかる時期における上記(17)に記載の使用。

(19) 仔畜が出生後から3週齢までの仔畜であることを特徴とする上記(17)または(18)に記載の使用。

(20) 仔畜が仔ウシであることを特徴とする上記(17)に記載の使用。

(21) プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii*であることを特徴とする上記(17)に記載の使用。

(22) プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207、*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 8262、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424 (NBRC 12424)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12426 (NBRC 12426)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12391 (NBRC 12391)、*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株から選ばれる少なくともひとつであることを特徴とする上記(21)に記載の使用。

(23) プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ET-3(FERM BP-8115)株であることを特徴とする上記(22)に記載の使用。

(24) 飼料組成物を、一日当たり、飼料組成物中に含まれる1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidが $2 \mu\text{g}$ ～ $600 \mu\text{g}$ の範囲となる量で使用することを特徴とする上記(17)に記載の使用。

(25) 飼料組成物中に含まれる1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidが $6 \mu\text{g}$ ～ $240 \mu\text{g}$ の範囲であることを特徴とする上記(24)に記載の使用。

発明の効果

[0021] 本発明に係る飼料及び/又は飼料組成物を仔畜に経口投与することにより、未だ腸内菌叢が形成されていない時期に、仔畜の腸内に有用なビフィズス菌叢を形成させ、更にそれを定着させること、すなわち有用な菌叢を人工的に形成、定着させることが可能となる。さらに、その結果、仔ウシ等の仔畜の下痢等各種疾病を低下、抑制して、へい死率を大幅に低減することができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]糞便1g中の菌数を示す。

[図2]総菌数に対するビフィズス菌の占有率を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0023] 以下、本発明を詳細に説明する。

なお、本明細書においては、質量で定義される全ての部、百分率、割合等は、それぞれ重量で定義されるそれらと同義である。

本発明で用いられるプロピオン酸菌としては、BGS産生菌等を適宜使用することができ、例えば、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ(*Propionibacterium freudenreichii*、以下*P.freudenreichii*ともいう)に属するBGS産生菌が使用される。その非限定的な例としては、*P.freudenreichii* ATCC 6207、*P.freudenreichii* ATCC 8262、*P.freudenreichii* IFO 12424 (NBRC 12424)、*P.freudenreichii* IFO 12426 (NBRC 12426)、*P.freudenreichii* IFO 12391 (NBRC 12391)株が例示され、また、Profecに使用されている*P.freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株も入手、使用可能である。ここで、前記した菌株は単独で用いてもよく、また複数を併用して用いることも可能である。また、本発明で用いられるプロピオン酸菌の好ましい例としては、*P.freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株が挙げられる。

[0024] プロピオン酸菌の培養方法としては、例えば、ホエイを含有する培地を使用すること(ホエイの含有量として、好ましくは、培地に対して1~20質量%、更に好ましくは5~15質量%)、常法にしたがった好氣的又は嫌氣的(例えば、窒素ガス加圧下(0.5kg/cm²))培養等を挙げることができる。通常、20~40℃、pH6~8程度で液体培養すればよい。

[0025] 本発明においては、プロピオン酸菌による乳清発酵物を使用する。

[0026] ここで、プロピオン酸菌による乳清発酵物としては、プロピオン酸菌を乳清(ホエイ及び/又はそのプロテアーゼ処理物)含有培地で培養し得られた培養物、単離した細菌自体、培養液(培養上清)、これらの混合物等を広く使用することができる。なお、上述の乳清含有培地の他にも、脱脂粉乳含有培地等の培地を適宜用いることも可能であり、これによってプロピオン酸菌を培養することにより得られた培養物、単離した細菌自体、培養液(培養上清)、これらの混合物等を、プロピオン酸菌による乳清発酵物の代わりに、あるいは併用して用いることも可能である。

例えば、ビフィズス菌増殖促進物質(Bifidogenic Growth Stimulator:BGS)を産生する *Propionibacterium freudenreichii* ET-3株をホエイ粉還元液で発酵させ、プロピオン酸菌発酵物(Profec)を調整し、これをプロピオン酸菌による乳清発酵物の1例として使用することができる。ここで、ホエイ粉還元液中のホエイ粉の含有量は特に限定されないが、1~25重量%程度が適当であり、調製されたProfecは100g当たり50 μ g~25mgの1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸(1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid:DHNA)を含有する。

[0027] なお、本発明において用いられるProfecとしては、通常の出酵方法により得られるもの、もしくは市販されているもの等を用いることが可能である。

[0028] プロピオン酸菌による乳清発酵物のBGSは、1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)と2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone(ACNQ)である。この内、1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸(1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid:DHNA)は、微生物におけるビタミンK₂(menaquinone)の生合成中間体である。これらの物質はビフィズス菌のエネルギー代謝過程で生成したNADH(Nicotinamide adenine dinucleotide)を効率的に再酸化することにより、増殖を促進する。

本発明においては、プロピオン酸菌による乳清発酵物の仔畜への投与量は、仔畜の出生後、腸内菌叢が自然に形成される前に、ビフィズス菌叢の形成及び定着が促進される量であれば特に限定されず、また、投与される対象、例えば種類、大きさ、症状等により異なる。

しかしながら、1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid及び/又は2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinoneをビフィズス菌叢の形成及び定着が促進される程度に含むプロピオ

ン酸菌による乳清発酵物が好ましい。例えば、1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidの場合、一日当たりに投与されるプロピオン酸菌による乳清発酵物が、 $2\mu\text{g}\sim 600\mu\text{g}$ 、さらに好ましくは $6\mu\text{g}\sim 240\mu\text{g}$ の範囲となる量で1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidを含んでいることが好ましい。ここで、必要に応じて、プロピオン酸菌による乳清発酵物を1度ではなく複数回に分けて投与することも可能である。

[0029] このように調整したプロピオン酸菌による乳清発酵物は、これを有効成分として、それ自体単独で、あるいは賦形剤(脱脂粉乳、デンプン、穀粉、糖類等)と混合し、飼料組成物として投与することが可能である。ここで、本飼料組成物は、その他の飼料成分(例えば、乾牧草類、穀類、油粕類、槽糠類等)とともに飼料として仔畜に経口にて投与される。例えば、本飼料組成物は、代用乳やスターター、飲料水等に混ぜて投与することが可能である。その投与量は、後記するようにきわめて少量であって、仔畜に負担がかからない。

[0030] プロピオン酸菌による乳清発酵物の投与量は、投与される対象、例えば種類、大きさ、症状等により異なるが、例えば、プロピオン酸菌による乳清発酵物を単独で仔ウシ(仔畜の代表例として仔ウシを使用)に投与する場合、1日当たり $0.01\sim 1200\text{g}$ 、好ましくは $0.03\sim 480\text{g}$ を投与すればよい。ここで、場合によっては、上記範囲を逸脱する量のプロピオン酸菌による乳清発酵物を投与することも可能であり、また、必要に応じて、1度ではなく複数回に分けて投与することも可能である。

また、例えば、プロピオン酸菌による乳清発酵物としてProfecを用い、これに賦形剤を加え、必要に応じて凍結乾燥等の処理をして得られた飼料組成物(以下、Profec含有組成物ともいう。)を仔ウシ(仔畜の代表例として仔ウシを使用)に投与する場合、賦形剤の割合や凍結乾燥等の処理条件によっても異なるが、1日当たり $0.04\sim 10\text{g}$ 、好ましくは $0.1\sim 4\text{g}$ の飼料組成物を代用乳等に混合して投与すればよく、きわめて少量で十分にすぐれた効果が奏される。ここで、場合によっては、上記範囲を逸脱する量のProfec含有組成物を投与することも可能であり、また、必要に応じて、1度ではなく複数回に分けて投与することも可能である。また、Profec以外のプロピオン酸菌による乳清発酵物を含有する飼料組成物を使用する場合には、上記した投与量、投与回数にしたがい適宜投与を行えばよい。

[0031] 以上、本発明の対象の1例としてとして仔ウシについて述べたが、本発明の対象はこれに限定されるものではない。本発明の対象は、哺乳類(好ましくはヒト以外の哺乳類)及び鳥類であり、好ましくはウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、スイギュウ、ラクダ等の家畜であり、さらに好ましくはこれらの仔畜であり、最も好ましくは仔ウシである。ここで、本発明における仔畜とは生後から離乳期の仔畜を示すが、離乳期を過ぎたもの、あるいは成畜に投与しても何ら問題はない。

また、本発明の飼料組成物の仔畜への投与時期は特に限定されないが、バランスのとれた腸内菌叢が形成される時期、受動免疫が低下する時期、又はストレスがかかる時期に投与することが好ましい。具体的には、出生後3週間まで、より好ましくは出生後2週間までに投与することが好ましい。

実施例

[0032] 以下、本発明の実施例について述べるが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

[0033] なお、本実施例においては、プロピオン酸菌による乳清発酵物としてProfecを用い、これに賦形剤を加えて凍結乾燥して得られた飼料組成物(Profec含有組成物)を使用した。なお、このProfec含有組成物0.4g中には、1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA)が24 μ g含まれていた。

[0034] (実施例1)

<試験スケジュール>

契約農家で出生したホルスタイン種雄仔ウシに、出生後1回目だけ、速やかに十分な初乳を投与した。

その後、仔ウシを速やかに試験牧場へ移動した。

初乳の差による影響をできるだけ排除するため、2回目の哺乳以降、生後3日齢まで初乳代替乳を投与した。

生後4日齢以降は、市販代用乳に切り替え、試験区と対照区各9頭ずつに分けた。

初乳代替乳および市販代用乳は、250gを1.8Lの温水(45°C)に溶かし、朝、夕の2回投与した。

なお、試験区には、プロピオン酸菌による乳清発酵物(Profec)含有組成物を1回の

哺乳あたり0.2g、1日あたり0.4gを混合して投与した。

試験期間は生後14日齢時までとした。

[0035] <試験時期>

(1): 出生後3日齢時(試験開始前)

(2): 出生後14日齢時(試験終了後)

[0036] (試験に供した初乳代替乳の組成)

免疫グロブリン高含有輸入初乳粉末(脱脂) 75%

乳糖 6%

植物性油脂 19%

合計 100%

成分・粗タンパク質57%、粗脂肪18%、乳糖15%、免疫グロブリン15%

[0037] (試験に供した市販代用乳の組成)

脱脂粉乳 55%

濃縮ホエイタンパク 20%

植物性油脂 20%

ビタミン・ミネラル混合物 5%

合計 100%

成分・粗タンパク質24%、粗脂肪20%、可消化養分総量110%

[0038] <腸内菌そう改善試験>

仔ウシをそれぞれ下記の試験区に分け、各試験期における腸内菌そうの変化を調査した。なお、試験時期は前記した試験時期(1)、(2)とした。調査対象菌は、次のとおり(A)~(F)とし、糞便1g中の菌数を測定した。

得られた結果を下記にそれぞれ示すが、いずれも平均値を示す。

[0039] (試験区)

試験区(Profec給与区)

対照区

[0040] (調査対象菌)

- (A) Bifidobacterium菌
- (B) Lactobacillus菌
- (C) Enterobacteriaceae菌
- (D) Bacteroidaceae菌
- (E) Clostridium、Lecithinase(+)菌
- (F) Clostridium、Lecithinase(-)菌
- (G) 総菌数

[0041] <結果>

得られた結果を、表1~3及び図1、2に示した。各表のデータは、糞便1g中の菌数を対数で表示したものであり、また()内に検出率(%)を表示した。また、14日齢時における試験区と対照区の有意差を検定した。(**:p<0.01)、(X:3日齢(投与前))、(Y:14日齢(投与後))

[0042] (表1)

	試験区		対照区	
	X	Y	X	Y
(A)	8.96±0.47 (100)	10.19±0.30** (100)	8.71±0.42 (100)	8.98±0.95 (100)
(B)	7.99±1.00 (100)	8.37±0.68 (100)	7.83±0.87 (100)	8.20±0.89 (100)
(C)	9.68±0.20 (100)	9.06±0.29** (100)	9.71±0.24 (100)	9.14±0.47** (100)
(D)	10.32±0.39 (100)	10.75±0.20** (100)	10.29±0.33 (100)	10.45±0.53 (100)
(E)	5.90±0.84 (100)	3.69±0.86** (22)	5.53±2.02 (89)	4.62±2.08 (78)
(F)	8.06±0.53 (78)	8.45±0.21 (22)	8.38±0.67 (100)	8.47±0.34 (78)
(G)	10.57±0.27 n=9	10.92±0.19** n=9	10.52±0.27 n=9	10.63±0.50 n=9

(表2)

Bifidobacterium 菌数	菌数平均		偏差	
	対照区	試験区	対照区	試験区
4日齢(投与前)	8.71	8.96	0.42	0.47
14日齢(投与後)	8.98	10.19**	0.95	0.30

(表3)

Bifidobacterium 占有率	%		偏差	
	対照区	試験区	対照区	試験区
4日齢(投与前)	2.1	2.9	2.35	2.94
14日齢(投与後)	4.2	21.4**	7.09	11.16

[0043] 上記結果から明らかなように、試験区(Profec 0.4g/日、10日間投与)では、糞便内のBifidobacteriumは有意に増加し(8.96→10.19Log10/g糞便)、総菌数に対する占有率が著しく増大した(2.9%→21.4%)。一方、レシチナーゼ陽性Clostridiumの検出率は著しく低下した(100%→22%)。以上のように、Profecは、出生後の腸内菌数形成期において、腸内のBifidobacteriumを特異的に増加させ、腸内菌叢の改善に有効であることが、実際の仔ウシを使用したin vivo試験にて確認された。

[0044] 本発明を特定の態様を参照して詳細に説明したが、本発明の精神と範囲を離れることなく様々な変更および修正が可能であることは、当業者にとって明らかである。

なお、本出願は、2005年3月18日付けで出願された日本特許出願(特願2005-079168)に基づいており、その全体が引用により援用される。

産業上の利用可能性

[0045] 本発明に係る飼料及び/又は飼料組成物を仔畜に投与することにより、未だ腸内菌叢が形成されていない時期に、仔畜の腸内に有用なビフィズス菌叢を形成させ、更にそれを定着させること、すなわち有用な菌叢を人工的に形成、定着させることが可能となる。さらに、その結果、仔ウシ等の仔畜の下痢等各種疾病を低下、抑制して、へい死率を大幅に低減することができる。

請求の範囲

- [1] プロピオン酸菌による乳清発酵物を含有することを特徴とする飼料組成物。
- [2] 出生後から3週齢までの仔畜に投与されることを特徴とする請求項1に記載の飼料組成物。
- [3] 仔畜が仔ウシであることを特徴とする請求項2に記載の飼料組成物。
- [4] 飼料組成物が腸内菌叢改善作用を有するものであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の飼料組成物。
- [5] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii*であることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の飼料組成物。
- [6] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207、*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 8262、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424 (NBRC 12424)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12426 (NBRC 12426)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12391 (NBRC 12391)、*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株から選ばれる少なくともひとつであることを特徴とする請求項5記載の飼料組成物。
- [7] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株であることを特徴とする請求項6記載の飼料組成物。
- [8] 請求項1に記載の飼料組成物を仔畜に投与することを特徴とする、仔畜の腸内にビフィズス菌叢を形成及び/又は定着させる方法。
- [9] 投与が、腸内菌叢が形成される時期、受動免疫が低下する時期及び/又はストレスがかかる時期に行われることを特徴とする請求項8に記載の方法。
- [10] 仔畜が出生後から3週齢までの仔畜であることを特徴とする請求項8または9に記載の方法。
- [11] 仔畜が仔ウシであることを特徴とする請求項8に記載の方法。
- [12] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii*であることを特徴とする請求項8に記載の方法。
- [13] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207、*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 8262、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424 (NBRC 12

請求の範囲

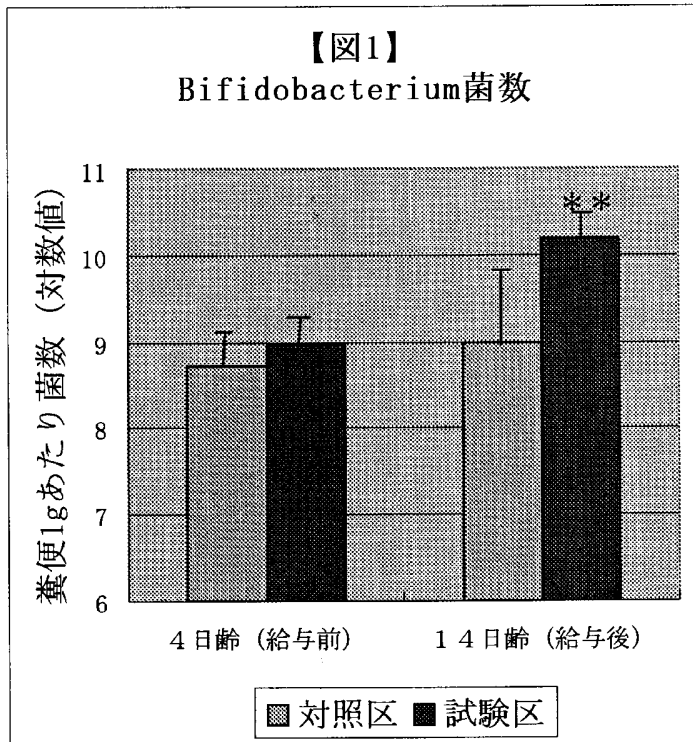
- [1] プロピオン酸菌による乳清発酵物を含有することを特徴とする飼料組成物。
- [2] 出生後から3週齢までの仔畜に投与されることを特徴とする請求項1に記載の飼料組成物。
- [3] 仔畜が仔ウシであることを特徴とする請求項2に記載の飼料組成物。
- [4] 飼料組成物が腸内菌叢改善作用を有するものであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の飼料組成物。
- [5] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii*であることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の飼料組成物。
- [6] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207、*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 8262、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424 (NBRC 12424)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12426 (NBRC 12426)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12391 (NBRC 12391)、*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株から選ばれる少なくともひとつであることを特徴とする請求項5記載の飼料組成物。
- [7] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株であることを特徴とする請求項6記載の飼料組成物。
- [8] 請求項1に記載の飼料組成物を仔畜に投与することを特徴とする、仔畜の腸内にビフィズス菌叢を形成及び/又は定着させる方法。
- [9] 投与が、腸内菌叢が形成される時期、受動免疫が低下する時期及び/又はストレスがかかる時期に行われることを特徴とする請求項8に記載の方法。
- [10] 仔畜が出生後から3週齢までの仔畜であることを特徴とする請求項8または9に記載の方法。
- [11] 仔畜が仔ウシであることを特徴とする請求項8に記載の方法。
- [12] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii*であることを特徴とする請求項8に記載の方法。
- [13] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207、*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 8262、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424 (NBRC 12

424)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12426 (NBRC 12426)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12391 (NBRC 12391)、*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株から選ばれる少なくともひとつであることを特徴とする請求項12記載の方法。

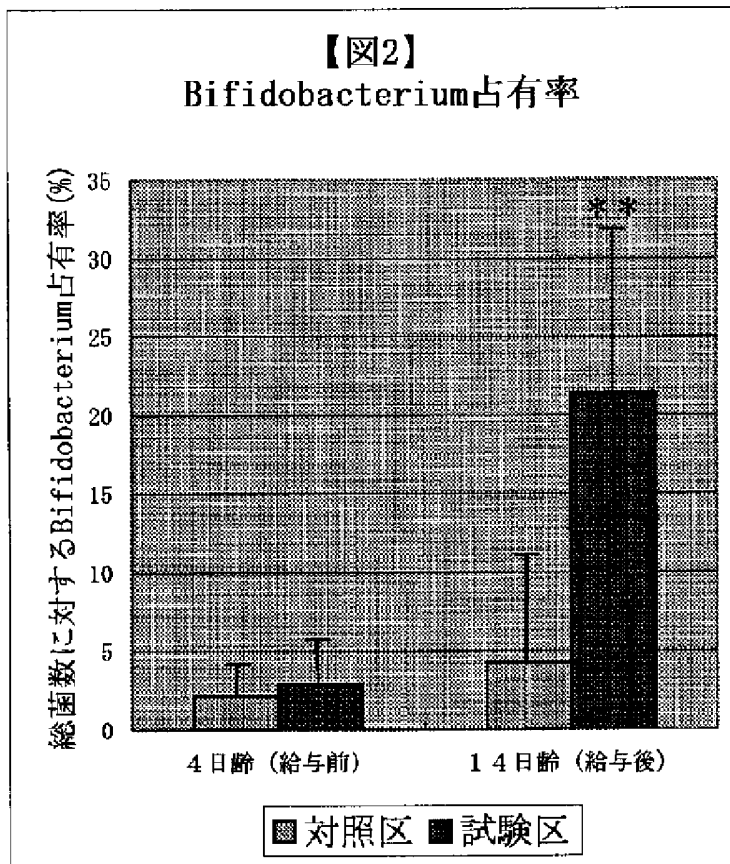
- [14] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株であることを特徴とする請求項13に記載の方法。
- [15] 飼料組成物を、一日当たり、飼料組成物中に含まれる1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidが $2 \mu\text{g}$ ～ $600 \mu\text{g}$ の範囲となる量で投与することを特徴とする請求項8に記載の方法。
- [16] 飼料組成物中に含まれる1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidが $6 \mu\text{g}$ ～ $240 \mu\text{g}$ の範囲であることを特徴とする請求項15に記載の方法。
- [17] 仔畜の腸内にビフィズス菌叢を形成及び/又は定着させるための請求項1に記載の飼料組成物の使用。
- [18] 腸内菌叢が形成される時期、受動免疫が低下する時期及び/又はストレスがかかる時期における請求項17に記載の使用。
- [19] 仔畜が出生後から3週齢までの仔畜であることを特徴とする請求項17または18に記載の使用。
- [20] 仔畜が仔ウシであることを特徴とする請求項17に記載の使用。
- [21] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii*であることを特徴とする請求項17に記載の使用。
- [22] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207、*Propionibacterium freudenreichii* ATCC 8262、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424 (NBRC 12424)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12426 (NBRC 12426)、*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12391 (NBRC 12391)、*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株から選ばれる少なくともひとつであることを特徴とする請求項21に記載の使用。
- [23] プロピオン酸菌が*Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115)株であることを特徴とする請求項22に記載の使用。

- [24] 飼料組成物を、一日当たり、飼料組成物中に含まれる1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidが $2\ \mu\text{g}$ ～ $600\ \mu\text{g}$ の範囲となる量で使用することを特徴とする請求項17に記載の使用。
- [25] 飼料組成物中に含まれる1,4-dihydroxy-2-naphthoic acidが $6\ \mu\text{g}$ ～ $240\ \mu\text{g}$ の範囲であることを特徴とする請求項24に記載の使用。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/305448

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23K1/00 (2006.01), **A23K1/18** (2006.01), **C12P7/52** (2006.01), **C12R1/01** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23K1/00-3/04, C12P7/52

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 10-108672 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 28 April, 1998 (28.04.98), Par. Nos. [0025] to [0027] & US 5929109 A1 & EP 835658 A3 & CA 2217251 A1	1, 4-6 2, 3, 7-25
Y	JP 2004-305128 A (Meiji Feed Co., Ltd.), 04 November, 2004 (04.11.04), Full text & WO 2004/089109 A1 & EP 1611796 A1	2, 3, 7-25

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
05 April, 2006 (05.04.06)

Date of mailing of the international search report
02 May, 2006 (02.05.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/305448

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2003/016544 A1 (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 27 February, 2003 (27.02.03), Page 8, line 39 to page 9, line 16 & EP 1416052 A1 & KR 2004032886 A & AU 2002323899 A1 & US 2004/0241815 A1 & CN 1539019 A & NZ 531192 A	7, 14, 23
A	Nobuo YORIDA, "Propionibacterium ni yoru Nyusei Hakkoubutsu o Haigo shita Tablet 'B.G.S.', Nippon Nogei Kagaku Kaishi, Vol.76, No.7, 2002, pages 640 to 641	1-25
A	Yoshikiyo OKADA, "'Propionibacterium ni yoru Nyusei Hakkobutsu Seibun no DHNA no DSS Choen ni Taisuru Ko Ensho Sayo no Kento", Digestive organ and immunology, Vol.40, 2003, pages 58 to 60	1-25
A	Nobuo YORITA, "Series 'Health Claim no Kagakuteki Konkyo' -11- propionibacterium Sansei Busshitsu no Bifidobacterium Zoshoku Sokushin Sayo", International Life Science Institute of Japan, Vol.80, 2004, pages 5 to 13	1-25

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A23K1/00(2006.01), A23K1/18(2006.01), C12P7/52(2006.01), C12R1/01(2006.01)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A23K1/00-3/04, C12P7/52		
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 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006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) JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2)		
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 請求の範囲の番号
X Y	JP 10-108672 A (明治乳業株式会社) 1998.04.28, 【0025】 - 【0027】 & US 5929109 A1 & EP 835658 A3 & CA 2217251 A1	1,4-6 2,3,7-25
Y	JP 2004-305128 A (明治飼糧株式会社) 2004.11.04, 全文 & WO 2004/089109 A1 & EP 1611796 A1	2,3,7-25
Y	WO 2003/016544 A1 (明治乳業株式会社) 2003.02.27, 第8頁第39 行-第9頁第16行 & EP 1416052 A1 & KR 2004032886 A & AU 2002323899 A1 & US 2004/0241815 A1 & CN 1539019 A	7,14,23
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input 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日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05.04.2006	国際調査報告の発送日 02.05.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 松本 隆彦 電話番号 03-3581-1101 内線 3237	2B 2914

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	& NZ 531192 A	
A	依田伸生, プロピオン酸菌による乳性発酵物を配合したタブレット「B. G. S.」, 日本農芸化学会誌, 第76巻、第7号, 2002, p. 640-641	1-25
A	岡田義清, プロピオン酸菌による乳性発酵物成分DHNAのDSS腸炎に対する抗炎症作用の検討, 消化器と免疫, 第40巻, 2003, p. 58-60	1-25
A	依田伸生, シリーズ「ヘルスクレームの科学的根拠」-11-プロピオン酸菌産生物質のビフィズス菌増殖促進作用, International Life Science Institute of Japan, 第80巻, 2004, p. 5-13	1-25