

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5680413号

(P5680413)

(45) 発行日 平成27年3月4日(2015.3.4)

(24) 登録日 平成27年1月16日(2015.1.16)

(51) Int. Cl.	F I
A 2 3 K 1/18 (2006.01)	A 2 3 K 1/18 1 O 2 B
A 2 3 K 1/16 (2006.01)	A 2 3 K 1/18 1 O 2 A
A O 1 K 61/00 (2006.01)	A 2 3 K 1/16 3 O 1 G
	A O 1 K 61/00 J
	A O 1 K 61/00 A

請求項の数 7 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2010-521661 (P2010-521661)
 (86) (22) 出願日 平成21年6月30日(2009.6.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/061895
 (87) 国際公開番号 W02010/010794
 (87) 国際公開日 平成22年1月28日(2010.1.28)
 審査請求日 平成24年6月5日(2012.6.5)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-190853 (P2008-190853)
 (32) 優先日 平成20年7月24日(2008.7.24)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

前置審査

(73) 特許権者 514071956
 あすかアニマルヘルス株式会社
 東京都新宿区西新宿一丁目26番2号 新宿野村ビル
 (73) 特許権者 503114002
 独立行政法人水産大学校
 山口県下関市永田本町2-7-1
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100144794
 弁理士 大木 信人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 魚介類の生存限界温度耐性付与剤および魚介類の養殖方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルギニン含有量が3.5% (w/w) 以上となるようにアルギニンを水産用飼料に添加して給餌することを特徴とする、養殖場の水温が29 以上または12 以下にある甲殻類の養殖方法。

【請求項 2】

甲殻類がクルマエビ、ウシエビ、ホワイトレッグシュリンプまたはガザミであり、養殖場の水温が29 ~ 33 または7 ~ 12 における請求項1記載の甲殻類の養殖方法。

【請求項 3】

さらに、トリプトファン含有量が0.6% (w/w) 以上となるようにトリプトファンを水産用飼料に添加することを含む、請求項1または2記載の甲殻類の養殖方法。

【請求項 4】

養殖場の水温が29 以上または12 以下にある甲殻類に、アルギニン含有量が3.5% (w/w) 以上となるようにアルギニンを水産用飼料に添加して給餌することを特徴とする、該甲殻類に生存限界温度耐性を付与する方法。

【請求項 5】

アルギニン含有量が3.0% (w/w) 以上となるようにアルギニンを水産用飼料に添加して給餌することを特徴とする、養殖場の水温が29 以上または12 以下にある魚類の養殖方法。

【請求項 6】

10

20

魚類がマダイ、ヒラメ、ブリ、カンパチ、トラフグ、マグロ、ウナギ、アユまたはニジマスであり、養殖場の水温が29～33 または7～12 における、請求項5記載の魚類の養殖方法。

【請求項7】

養殖場の水温が29 以上または12 以下にある魚類に、アルギニン含有量が3.0 % (w/w) 以上となるようにアルギニンを水産用飼料に添加して給餌することを特徴とする、該魚類に生存限界温度耐性を付与する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルギニンを含有する魚類または甲殻類の生存限界温度耐性付与剤およびアルギニンを給餌することを特徴とする魚類または甲殻類の養殖方法に関する。

【背景技術】

【0002】

魚類および甲殻類は変温動物のため恒温動物にくらべ、環境温度変化に弱く、水温が個体の生存限界から外れると死を招くという生物的特徴を持つ。近年の地球環境の温暖化等の異常気象現象の到来により、夏季は魚類または甲殻類を養殖する養殖池の水温が29～30 を超えることが多く養殖対象である魚類または甲殻類の大量死をもたらすことが問題となっている。一方、冬季は、養殖池の水温が7 以下になり養殖対象である魚類または甲殻類の大量死をもたらすことも問題となっている。

【0003】

甲殻類の養殖と、短期間の温度変化に由来する魚類のストレスを軽減する方法としては、DHAまたはそのエステルおよび/またはリン脂質を含有する飼料を給餌する方法が知られている(特許文献1)。

【特許文献1】特開平9-121784号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、魚類または甲殻類がより長期間の異常水温状態における飼育に耐えることを可能とする添加剤および養殖方法はなく、その開発が望まれている。

【0005】

本発明の目的は、魚類または甲殻類に生存限界温度耐性を付与する新規製剤を提供すること、およびその製剤を使用することによって魚類または甲殻類の非適温度を超える水温、すなわち生存限界温度においても、魚類または甲殻類が生存可能な養殖方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは鋭意工夫した結果、アルギニンを飼料に添加して魚類および甲殻類を飼育すると、本来これらの水産動物が生存不能な水温領域においても、魚類または甲殻類の飼育が可能であることを見出した。本発明者らは、この知見を基に本発明を完成させるに至った。

【0007】

なお、魚介類に対してアミノ酸を栄養素として飼料に添加する方法は知られており(特開2001-231461号公報)、クルマエビの成長のために最適なアルギニンまたはトリプトファンの含有量は、各々飼料中3.0%または1.0%であることが知られている(金澤昭夫:エビ・カニ類の増養殖(橘高二郎ら編)、恒星社厚生閣、東京、1996、226-250)。甲殻類の共食いを防ぐためにトリプトファンまたはその誘導体を飼料に添加する方法(特開平5-7463号公報、特開平6-78687号公報)、魚類の成長を促進させるためにアラニンと共にアルギニン3.5mmol/Kgを筋肉注射することにより魚類のインスリン分泌を促進する方法(特開2007-49938号公報)が知られている

10

20

30

40

50

。しかし、アルギニンによる魚類または甲殻類への生存限界温度耐性付与の薬理効果は知られておらず、本発明者らによって初めて見出されたことである。

【0008】

すなわち、本発明は、下記(1)～(25)に関する。

【0009】

(1) アルギニンを含有することを特徴とする魚類または甲殻類の生存限界温度耐性付与剤。

【0010】

(2) さらに、トリプトファンを含有することを特徴とする(1)の魚類または甲殻類の生存限界温度耐性付与剤。

10

【0011】

(3) 魚類がマダイ、ヒラメ、ブリ、カンパチ、トラフグ、マグロ、ウナギ、アユまたはニジマスであり、甲殻類がクルマエビ、ウシエビ、ホワイトレッグシュリンプまたはガザミであることを特徴とする(1)または(2)の魚類または甲殻類の生存限界温度耐性付与剤。

【0012】

(4) アルギニン含量が3.5%(w/w)以上であることを特徴とする(1)～(3)のいずれかの甲殻類の生存限界温度耐性付与剤。

【0013】

(5) アルギニン含量が3.5～5.0%(w/w)であることを特徴とする(4)の甲殻類の生存限界温度耐性付与剤。

20

【0014】

(6) トリプトファン含量が0.6%(w/w)以上であることを特徴とする(2)～(5)のいずれかの甲殻類の生存限界温度耐性付与剤。

【0015】

(7) トリプトファン含量が1.6～2.0%(w/w)であることを特徴とする(6)の甲殻類の生存限界温度耐性付与剤。

【0016】

(8) アルギニン含量が3.0%(w/w)以上であることを特徴とする(1)～(3)のいずれかの魚類の生存限界温度耐性付与剤。

30

【0017】

(9) アルギニン含量が3.0～5.0%(w/w)であることを特徴とする(8)の魚類の生存限界温度耐性付与剤。

【0018】

(10) 対象が甲殻類である場合、アルギニン含有量が3.5%(w/w)以上となるようにアルギニンを水産用飼料に添加して給餌することを特徴とし、対象が魚類である場合、アルギニン含有量が3.0%(w/w)以上となるようにアルギニンを水産用飼料に添加して給餌することを特徴とする魚類または甲殻類の養殖方法。

【0019】

(11) (1)～(9)のいずれかの魚類または甲殻類の生存限界温度耐性付与剤を給餌することを特徴とする魚類または甲殻類の養殖方法。

40

【0020】

(12) 魚類がマダイ、ヒラメ、ブリ、カンパチ、トラフグ、マグロ、ウナギ、アユまたはニジマスであり、甲殻類がクルマエビ、ウシエビ、ホワイトレッグシュリンプまたはガザミであることを特徴とする(10)または(11)の魚類または甲殻類の養殖方法。

【0021】

(13) 養殖場の水温が29℃以上または12℃以下における(10)～(12)いずれかの魚類または甲殻類の養殖方法。

【0022】

(14) 養殖場の水温が29～33℃または7～12℃における(13)の魚類または

50

甲殻類の養殖方法。

【0023】

(15) 養殖場の水温が29 以上または12 以下において、1日あたり魚類または甲殻類の体重1kgにつき800mg以上のアルギニンを含有する飼料を給餌することを特徴とする魚類または甲殻類の養殖方法。

【0024】

(16) さらに、1日あたり魚類または甲殻類の体重1kgにつき180mg以上のトリプトファンを含有する飼料を給餌することを特徴とする(15)の魚類または甲殻類の養殖方法。

【0025】

(17) 甲殻類の生存限界温度耐性付与剤を製造するためのアルギニンの使用。

【0026】

(18) アルギニン含有量が3.5%(w/w)以上となるように水産用飼料に添加する、(17)のアルギニンの使用。

【0027】

(19) アルギニン含有量が3.5~5.0%(w/w)となるように水産用飼料に添加する、(18)のアルギニンの使用。

【0028】

(20) 魚類の生存限界温度耐性付与剤を製造するためのアルギニンの使用。

【0029】

(21) アルギニン含有量が3.0%(w/w)以上となるように水産用飼料に添加する、(20)のアルギニンの使用。

【0030】

(22) アルギニン含有量が3.0~5.0%(w/w)となるように水産用飼料に添加する、(21)のアルギニンの使用。

【0031】

(23) 魚類または甲殻類に生存限界温度耐性を付与するためのアルギニン。

【0032】

(24) 水産用飼料中に3.5%(w/w)以上となるように含め甲殻類に給餌するか、または水産用飼料中に3.0%(w/w)以上となるように含め魚類に給餌する、(23)のアルギニン。

【0033】

(25) 水温が29 以上または12 以下における魚類または甲殻類に、1日あたり体重1kgにつき800mg以上を給餌する、(23)または(24)のアルギニン。

【0034】

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2008 190853号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、アルギニン含有製剤を投与した試験区と比較製剤を投与した対照区における高温負荷後のクルマエビの生残率推移の結果を示す。

【図2】図2は、アルギニン含有製剤を投与した試験区と比較製剤を投与した対照区における高温負荷後のマダイの生残率推移の結果を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0037】

本発明のアルギニンを含有することを特徴とする魚類または甲殻類の生存限界温度耐性付与剤とは、アルギニンを通常の魚類または甲殻類の栄養量より過剰に投与することにより、非適温度下において生育障害を軽減させるまたは生存限界温度において生存率を向上

10

20

30

40

50

させる効果を有する水産用製剤である。

【0038】

本発明において非適温度とは、魚類または甲殻類が生育障害を発生する温度から致死に至る温度、すなわち生存限界温度までの温度領域であり、非適温度と生存限界温度を含めた温度領域は生物種によって異なるが通常は7～12 および29～33 である。

【0039】

また、本発明のアルギニン含有することを特徴とする魚類または甲殻類の生存限界温度耐性付与剤は、アルギニンに加えてトリプトファンを有効量含むものでも良い。さらに一般に水産用医薬品、飼料用添加剤は飼料に添加されて給餌されるため、一般的な水産用飼料ペレットに含まれる成分を含んでいても良い。

10

【0040】

本発明のアルギニン含有する魚類または甲殻類の生存限界温度耐性付与剤はアルギニン含有し、魚類または甲殻類が摂取できるものであればどのようなものでも良く、単に水産用飼料にアルギニンを有効量配合したもの、給餌前に飼料に添加するために特別に調製されたアルギニンの配合製剤等があげられるが、アルギニンの薬理効果を効率良く発現させるためには、水産用飼料にアルギニンを添加して形成されたものであることが好ましい。

【0041】

水産用飼料は、魚類または甲殻類の水産用飼料として用いられる飼料であればどのようなものでも良いが、例えばドライペレット、モイストペレット等の水産用飼料ペレットを用いても良く、通常はドライペレットを用いることが好ましい。該水産用飼料ペレットは、市販品または通常水産用飼料に用いられる成分を常法により配合して作製したものを用いることができる。

20

【0042】

水産用飼料は、天然成分から構成される水産用飼料に、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、グルタチオン製剤等の水産用医薬品、ビタミンC、ビタミンB1、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンE等のビタミン類、リジン、メチオニン、ヒスチジン等のアミノ酸類等の栄養補給物質、β-カロチン、アスタキサンチン、カンタキサンチン等の色素等（以下、これらの物質を総称して水産用添加物質と呼ぶ）が混合または展着された水産用飼料であってもよい。

30

【0043】

これらの水産用添加物質は、飼料中好ましくは0.01～10%（w/w）、さらに好ましくは1.0～5.0%（w/w）含まれる。水産用飼料が含有する他の成分としては、粗蛋白質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分等があげられる。

【0044】

アルギニンを水産用飼料と混合し、甲殻類の生存限界温度付与剤として使用する場合、甲殻類用飼料中に通常含まれるアルギニンと併せて最終的にアルギニンを3.5%（w/w）以上含有すれば良いが、高濃度では成長障害が生じる可能性があるため、好ましくはアルギニンを3.5～7.0%（w/w）、とりわけ好ましくは3.5～5.0%（w/w）を含有すれば良い。

40

【0045】

更にトリプトファンを前記アルギニン含有水産用飼料に混合する場合は、最終的にトリプトファン0.6%（w/w）以上、好ましくは1.6%（w/w）以上を配合すれば良いが、トリプトファンの場合成長阻害の観点から含有量の上限を3.0%以下にすることが好ましく、とりわけ好ましくはトリプトファン1.6～2.0%（w/w）を含有すれば良い。

【0046】

なお、甲殻類用水産飼料には天然原料由来のアルギニンが約2.8～3.0%（w/w）

50

、トリプトファンが約0.5～1.0% (w/w) 予め栄養素として存在する場合があるが、その場合は前記の終濃度から飼料中の天然原料由来のアルギニンおよびトリプトファンのそれぞれの含量を除いた、アルギニンおよびトリプトファンのそれぞれの必要量を添加すればよい。

【0047】

したがって、本発明においては甲殻類用飼料に天然原料由来のアルギニンを含めて含有量が、3.5% (w/w) 以上、好ましくは3.5～7.0% (w/w)、とりわけ好ましくは3.5～5.0% (w/w) となるべく、アルギニンを0.5～0.7% (w/w) 以上、好ましくは0.5～4.2% (w/w)、とりわけ好ましくは0.5～2.2% (w/w) 添加することを必要とし得る。更に必要により、甲殻類用飼料に天然原料由来のトリプトファンを含めて含有量が、0.6% (w/w) 以上、好ましくは1.6～2.0% (w/w) となるべく、トリプトファンを0.1% (w/w) 以上、好ましくは0.6～1.5% (w/w) 加えても良い。

【0048】

アルギニンを水産用飼料と混合し、魚類の生存限界温度付与剤として使用する場合、魚類用飼料中に含まれる天然原料由来のアルギニンと併せて最終的にアルギニンを3.0% (w/w) 以上含有すれば良いが、高濃度では成長障害が生じる可能性があるため、アルギニンを3.0～7.0% (w/w)、とりわけ好ましくは3.0～5.0% (w/w) を含有すれば良い。

【0049】

なお、魚類用飼料には天然原料由来のアルギニンが約1.7～2.6% (w/w)、予め栄養素として存在する場合があるが、その場合は前記の終濃度から飼料中の含量を除いたアルギニンをそれぞれ添加すればよい。

【0050】

したがって、本発明においては魚類用飼料に天然原料由来のアルギニンを含めて含有量が、好ましくは3.0～7.0% (w/w)、とりわけ好ましくは3.0～5.0% (w/w) となるべく、アルギニンを好ましくは0.4～5.3% (w/w)、とりわけ好ましくは0.4～3.3% (w/w) 添加することを必要とし得る。

【0051】

アルギニン含有することを特徴とする魚類または甲殻類の生存限界温度耐性付与剤の製造方法は、アルギニンを予め前記所望量含むよう調製した飼料製剤原料をペレットとして製造しても良いし、市販の水産用飼料のペレットに前記所望量のアルギニンを添加しても良い。

【0052】

アルギニンを予め前記所望量含むよう調製した飼料製剤原料をペレットとして製造する方法としては、アルギニンが所望量含まれるのであればどのような方法でも良いが、たとえば以下のような造粒法による製剤の製造が挙げられる。

【0053】

予めアルギニンを甲殻類用飼料ペレットの場合はペレット終濃度として3.5% (w/w) 以上、魚類用飼料ペレットの場合はペレット終濃度として3.0% 以上、必要によりトリプトファンおよび水産用添加物質を前記所望量配合されるよう調製された飼料原料に対して、飼料原料に対して約3～10%の魚油、レシチン、ステロール類等の油脂を1種以上混合した油脂類を加え、更に必要により水、含水エタノール等から選ばれる水溶媒を原料合計量に対して10～40% 加え混合した後、押し出し造粒機、流動層造粒機により生存限界温度耐性付与剤を製造する。

【0054】

また、市販の水産用飼料ペレットにアルギニンを展着させる方法はとくに制限はないが、例えば、以下のような方法をあげることができる。すなわち、水産用飼料ペレットに対して好ましくは0.1～20% (v/w)、さらに好ましくは1.0～10% (v/w) の水をトレイ等に入れ、その中にペレットを入れ浸漬する方法、あるいはスプレー等を用

いて水を噴霧する方法により飼料ペレットを含水させる。

【0055】

次に、水産用飼料ペレットの重量に対して、甲殻類用飼料ペレットの場合は終濃度として3.5% (w/w) 以上、魚類用飼料ペレットの場合は終濃度として3.0% (w/w) 以上、のアルギニンを、必要により前記所望量のトリプトファンおよび水産用添加物質を加え、水産用飼料ペレットの表面にそのままふりかけるか、あるいは篩等を用いてふりかける。

【0056】

また、別法として水、緩衝液、エタノール等適当な溶媒に、甲殻類用飼料ペレットの場合、飼料ペレット重量に対して終濃度として3.5% (w/w) 以上、魚類用飼料ペレットの場合は終濃度として3.0% (w/w) 以上の、アルギニンを、必要により前記所望量のトリプトファンおよび水産用添加物質を溶解または懸濁させ、得られた溶解液または懸濁液に水産用ペレットを浸漬させるか、または該溶解液または懸濁液を水産用飼料ペレットに噴霧することにより、アルギニンを水産用飼料ペレットの表面に展着させてもよい。展着後の水産用添加物質の含有量は、水産用飼料ペレットに対して0.01~10% (w/w) であることが好ましく、1.0~5.0% (w/w) であることがさらに好ましい。

【0057】

前記ペレット状に加工した生存限界温度耐性付与剤は、アルギニンをより効率良く吸収させるため、コーティング剤によりコーティングを行っても良い。

【0058】

本発明に用いるコーティング剤はどのようなものでも良いが、植物性のツエインを用いることが好ましく、コーティングされた生存限界温度耐性付与剤は、ツエインの終濃度が、好ましくは1.0~15% (w/v)、より好ましくは2.0~10% (w/v)、さらに好ましくは4.0~8.0% (w/v) となるように、ツエインを好ましくは50~90% (v/v)、さらに好ましくは50~70% (v/v) のアルコール水溶液に溶解して製造することができる。

【0059】

ツエインは公知の方法（例えば、特公平07-84477号公報、特公平07-25797、特開平05-30917号公報、特開昭61-167700号公報に記載の方法）により調製することができる。

【0060】

また、ツエインは市販のもの（例えば、昭和産業株式会社製）を用いてもよい。ツエインを溶解するアルコールとしては、エタノール、食用アルコール等があげられるがエタノールを用いることが好ましい。

【0061】

該コーティング剤には、必要により可塑剤として脂肪酸等を0.1~30% (w/v)、好ましくは1.0~10% (w/v) 加えてもよい。脂肪酸としては、細胞に対する融合活性の高い脂肪酸が好ましく、例えばオレイン酸、リノール酸、リノレン酸、イコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸やアルコール水溶液に溶解可能な上記脂肪酸で構成されるモノグリセライドやレシチンがあげられるが、オレイン酸がとくに好ましく用いられる。

【0062】

コーティング剤でコーティングする方法は、水産用飼料ペレットをコーティングできる方法であればいずれの方法でもよい。例えば、水産用飼料ペレットをコーティング剤中に浸漬させる方法、または水産用飼料ペレットにコーティング剤をスプレー等で噴霧してコーティングする方法等をあげることができる。

【0063】

具体的には、ツエインの濃度が、好ましくは1.0~15% (w/v)、より好ましくは2.0~10% (w/v)、さらに好ましくは4.0~8.0% (w/v) の濃度とな

10

20

30

40

50

るように、ツエインを好ましくは50～90% (v/v)、さらに好ましくは50～70% (v/v)のアルコール水溶液に溶解しておき、これをコーティング剤として上記浸漬による方法あるいはスプレー等により噴霧する方法により、水産用飼料ペレットをコーティングする。コーティング後、室温で0.5～1時間放置することで、コーティングされた水産用飼料ペレット(以下、本発明の水産用飼料と略す)を得ることができる。コーティング後の本発明の生存限界温度耐性付与剤に対するコーティング剤の含有量は、1.0～10% (w/w)であることが好ましく、2.0～3.0% (w/w)であることがさらに好ましい。

【0064】

本発明の魚類または甲殻類の養殖方法は、魚類または甲殻類に生存限界温度耐性を付与するため、1日あたり魚類または甲殻類の体重1kgにつき800mg以上のアルギニン含有する飼料を魚類または甲殻類に給餌することを特徴とする。当該養殖方法は、養殖場の水温が上記非適温度または生存限界温度において用いることが可能である。本養殖方法の給餌期間は1～4ヵ月間好ましくは2ヵ月であり得る。

【0065】

本発明の魚類または甲殻類の養殖方法は更に、1日あたり魚類または甲殻類の体重1kgにつき180mg以上のトリプトファン含有する飼料を魚類または甲殻類に給餌してもよい。

【0066】

本発明の養殖方法の対象となる魚類としては、マダイ、ヒラメ、ブリ、カンパチ、トラフグ、マグロ、ウナギ、アユ、ニジマス等が挙げられ、甲殻類としては、クルマエビ、ウシエビ、ホワイトレグシュリンプ、ガザミが挙げられ、好ましくはマダイ、ヒラメ、ブリ、カンパチ、クルマエビの養殖に用いる。

【0067】

本発明の養殖方法におけるアルギニンの給餌方法としては、前記水産飼料ペレットに加工した生存限界温度耐性付与剤を給与しても良いが、アルギニンを飼料に添加する方法、単にアルギニンを給餌する方法等どのような方法を用いても良い。

【0068】

本発明の養殖方法には、種苗生産(稚魚生産)のみを行う増養殖および親魚までの生産を行う養殖を含む。

【実施例】

【0069】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0070】

実施例1 アルギニン含有製剤の甲殻類への影響

(I) アルギニン3.5% (w/w)含有製剤の製造

【表1】

原料名	含有率(%)
動物性原料	82.60
植物性原料	7.00
油脂類	5.20
アミノ酸類	アルギニン 0.50
その他(ビタミン、ミネラル等)	4.70
Total 合計	100.00

【0071】

上記表1に示した油脂類を除く動物性原料、植物性原料、その他(天然原料由来のアルギニン3.0% (w/w)、トリプトファン0.6% (w/w)を含む)およびアルギニ

10

20

30

50

ン(0.5%(w/w))からなる原料成分94.8kgを粉碎機により粗粉碎した後、更に微粉碎分級機(ホソカワミクロン社製)で微粉碎した。

【0072】

得られた微粉碎原料をブレンダー(ネオテック社製)に入れ、更に表1に記載した油脂類5.2kgと、水300kgを加え混合を行った。

【0073】

混合して製造したスラリーを、押し出し造粒機(ビューラー社製)にかけ60の温度で成型した後、100の温度で乾燥させた(日本乾燥機製)。

【0074】

得られたペレットを篩分し粒径0.2mmで、比較製剤(アルギニン3.0%(w/w)含有)よりアルギニンが0.5%(w/w)増量されたアルギニン3.5%(w/w)含有生存限界温度耐性付与剤(製剤1)を製造した。なお、本実施例において比較製剤は、上記表1に示した原料組成からアミノ酸類アルギニンのみを除いた原料を用いて、実施例1と同様の方法により製造したエビ用市販飼料である。

【0075】

(II)アルギニン4.0%(w/w)含有製剤の製造

【表2a】

原料名	含有率(%)
動物性原料	82.10
植物性原料	7.00
油脂類	5.20
アミノ酸類	アルギニン トリプトファン
その他(ビタミン、ミネラル等)	4.70
Total 合計	100.00

【0076】

表2aに示した原料(天然原料由来のアルギニン3.0%(w/w)、トリプトファン0.6%(w/w)を含む)を用いて、実施例1と同様の方法により、比較製剤の市販飼料よりアルギニンが1.0%(w/w)増量された、アルギニン4.0%(w/w)含有生存限界温度耐性付与剤(製剤2)を製造した。

【0077】

(III)アルギニン5.0%(w/w)含有製剤の製造

【表2b】

原料名	含有率(%)
動物性原料	80.10
植物性原料	7.00
油脂類	5.20
アミノ酸類	アルギニン トリプトファン
その他(ビタミン、ミネラル等)	4.70
Total 合計	100.00

【0078】

表2bに示した原料(天然原料由来のアルギニン3.0%(w/w)、トリプトファン0.6%(w/w)を含む)を用いて、実施例1と同様の方法により、比較製剤の市販飼

料よりアルギニンが 2.0% (w/w) およびトリプトファンが 1.0% (w/w) 増量された、アルギニン 5.0% (w/w) 含有生存限界温度耐性付与剤 (製剤 3) を製造した。

【0079】

(IV) 甲殻類の養殖・高温耐性試験

(1) 供試クルマエビ

野外の養殖場から搬入した平均体重 12.5 g のクルマエビを水温 25 ± 1 で 1 週間馴致飼育したのち、以下の試験に供した。

【0080】

(2) 飼育方法

容量 1 トンの FRP 角水槽 4 台の底面に、20 cm の厚さとなるよう砂を敷いたのち、上記のエビを 1 水槽あたり 46 尾ずつ収容し、水温 25 から 1 日に 1 ずつ昇温し、30 に達したのちに試験を開始した。

【0081】

試験期間中は、水温 30 から 1 週間後ごとに 1 ずつ昇温し、30 ~ 33 で計 4 週間飼育した。

【0082】

(3) 給餌試験

1 区にはアルギニンを 3.0% (w/w)、トリプトファン 0.6% (w/w) 含有する比較製剤を与え対照区とした。2 区には、比較製剤に比べアルギニンを 0.5% (w/w) 増量 (アルギニン 3.5% (w/w) 含有) した製剤 1 を、3 区には比較例に比べアルギニンを 1.0% (w/w) 増量 (アルギニン 4.0% (w/w) 含有) した製剤 2 を、また 4 区には比較例に比べアルギニンを 2.0% (w/w) 増量 (アルギニン 5.0% (w/w) 含有) した製剤 3 を与えた。

【0083】

試験開始 2 日前 (水温 28) から 3 日間 (試験開始日、水温 30) は上記製剤を各区ともに体重の 2.0% (w/w) 量となるように与え、その後は残餌が無い場合に 0.5% (w/w) ずつ増量し、残餌がみられた場合は 0.5% (w/w) 減量する方法によって 4 週間給餌した。

【0084】

(4) 効果評価方法

アルギニン (およびトリプトファン) 投与区および対照区における試験期間中の死亡尾数、生残率、残餌量、摂餌量、増体重量および脱皮状況について調べ、その効果を評価した。

【0085】

(5) 試験結果

10

20

30

【表 3】

アルギニン投与区と対照区における試験成績(高温度耐性)

調査項目	1区 対照区 (Arg3.0%)	2区 Arg3.5%	3区 Arg4.0%	4区 Arg5.0%
水温(°C)	30~33	30~33	30~33	30~33
供試尾数(尾)	46	46	46	46
試験開始時の平均体重(g)	12.5	12.5	12.5	12.5
給餌率(%)	1.0~4.0	2.0~4.5	2.0~4.5	2.0~4.5
総給餌量(g)	281	459.3	642.2	644
総残餌量(g)	22.7	17.1	15.5	15.0
総摂餌量(g)	258.3	443.8	625.1	629.0
死亡尾数(尾)	22	21	5	3
死亡率(%)	47.8	45.7	10.9 ※	6.5 ※
生残率(%)	52.2	54.3	89.1 ※	93.5 ※
脱皮尾数(尾)	76	112	129	128
試験終了時の平均増体重量(g)	0.5	1.2	2.1	2.2
試験終了時の総重量(g)	312.0	342.5	598.6	632.1

※ 対照区および2区との間に有意差(P<0.05)

【0086】

アルギニン(およびトリプトファン)投与区と対照区における試験成績を表3に、また試験開始後における生残率の推移の結果を図1に示した。

【0087】

対照区においては、水温を30に設定した試験開始時の2日後から死亡がみられ、4週間後の試験終了時までには47.8%が死亡したのに対し、製剤1投与の2区は対照区よりもかなり遅く6日後から死亡が見られ、終了時までには45.7%が死亡した。一方、製剤2投与の3区では試験開始後17日後からようやく死亡が見られたが、終了時までには10.9%が死亡し、製剤3投与の4区では25日後から死亡が見られ、終了時までには僅か6.5%が死亡した。対照区および2区と3区および4区の死亡率および生残率には有意な差が見られた($p < 0.05$)。

【0088】

水温別の死亡率を対比すると、30においては対照区で21.7%の死亡が見られたものが製剤1投与の2区では4.3%、製剤2および製剤3投与の3区および4区では0%であり、31においては対照区で22.2%、製剤1投与の2区で25.0%の死亡率が見られたものの製剤2および製剤3投与の3区および4区は0%であった。また、32においては対照区で10.7%、製剤1投与の2区で18.7%、製剤2投与の3区で2.2%、製剤3投与の4区で0%、33においては対照区で4.0%、製剤1投与の2区で7.4%、製剤2投与の3区で6.8%、製剤3投与の4区で6.5%であった。

【0089】

以上の事実からアミノ酸成長必要量が配合された飼料(アルギニン含有量3.0%(w/w)、トリプトファン含有量0.6%(w/w))を給餌した対照区ではクルマエビの約半数が30~31で死亡したものの、0.5%(w/w)のアルギニンを増量した製剤1(アルギニン含有量3.5%(w/w)、トリプトファン含有量0.6%(w/w))投与の2区では、30で死亡するエビはほとんど見られず、31~32で約半数が死亡した。また、アルギニンを1.0%(w/w)増量した製剤2(アルギニン含有量4.0%

30

40

50

0% (w/w)、トリプトファン含有量0.6% (w/w)投与の3区では生存限界温度を遥かに超えた32~33の温度領域で10.9%死亡し、アルギニン(2.0% (w/w)、トリプトファンを1.0% (w/w)増量した製剤3(アルギニン含有量5.0% (w/w)、トリプトファン含有量1.6% (w/w)投与の4区では30~32での死亡が全く見られず、33で6.5%が死亡したのみであった。

【0090】

以上、アルギニンの飼料への添加により、高温領域における生存限界温度に対する耐性が付与されることが明らかとなった。

【0091】

(V) 甲殻類の養殖・低温度耐性試験

10

(1) 供試クルマエビ

野外の養殖場から搬入した平均体重14gのクルマエビを水温15±1で1週間馴致飼育したのち、以下の試験に供した。

【0092】

(2) 飼育方法

容量1トンのFRP角水槽4台の底面に、20cmの厚さとなるよう砂を敷いたのち、上記のエビを1水槽あたり50尾ずつ収容し、水温15から1日に1ずつ降温し、12に達したのちに試験を開始した。

【0093】

試験期間中は、水温12から1週間後ごとに1ずつ降温し、12~7で計42日間飼育した。

20

【0094】

(3) 給餌試験

上記と同じく1区にはアルギニンを3.0% (w/w)含有する比較製剤を与え対照区とした。2区には、比較製剤に比べアルギニンを0.5% (w/w)増量(アルギニン含有量3.5% (w/w))した製剤1を、3区には比較製剤に比べアルギニンを1.0% (w/w)増量(アルギニン含有量4.0% (w/w))した製剤2を、また4区には比較製剤に比べアルギニンを2.0% (w/w)およびトリプトファンを1.0% (w/w)増量(アルギニン含有量5.0% (w/w)、トリプトファン含有量1.6% (w/w))した製剤3を与えた。

30

【0095】

試験開始2日前(水温14)から3日間(試験開始日、水温12)は上記製剤を各区ともに体重の1% (w/w)量となるように与え、その後は残餌が無い場合に0.5% (w/w)ずつ増量し、残餌がみられた場合は0.5% (w/w)減量する方法によって42日間給餌した。

【0096】

(4) 効果評価方法

アルギニン(およびトリプトファン)投与区および対照区における試験期間中の死亡尾数、生残率、残餌量、摂餌量、増体重量および脱皮状況について調べ、その効果を評価した。

40

【0097】

(5) 試験結果

【表 4】

アルギニン投与区と対照区における試験成績(低温度耐性)

調査項目	1区 対照区 (Arg3.0%)	2区 Arg3.5%	3区 Arg4.0%	4区 Arg5.0%
水温(°C)	12~7	12~7	12~7	12~7
供試尾数(尾)	50	50	50	50
試験開始時の平均体重(g)	14	14	14	14
給餌率(%)	0~1.0	0~1.5	0~2.0	0~2.0
総給餌量(g)	35.0	80.5	119.0	133.0
総残餌量(g)	4.7	5.2	7.4	8.6
総摂餌量(g)	30.3	75.3	111.6	124.4
死亡尾数(尾)	29	10	2	0
死亡率(%)	58	20 ※	4※	0 ※
生残率(%)	42	80 ※	96 ※	100 ※
脱皮尾数(尾)	2	7 ※	21	26
試験終了時の平均増体重量(g)	-0.3	0.7	1.6	1.8
試験終了時の総重量(g)	287.7	588	780	790

※ 対照区との間に有意差(P<0.05)

【0098】

アルギニン(およびトリプトファン)投与区と対照区における試験成績を表4に示した。

【0099】

水温が12~11においては全ての区に死亡は見られなかったが、水温10~9では、対照区のエビの8%が死亡し、製剤1~3投与の2~4区には死亡は見られなかった。水温8~7においては、対照区の50%が死亡したのに対し、製剤1投与の2区が20%、製剤2投与の3区が4%死亡したが、製剤3投与の4区には死亡が見られなかった。試験終了時における累積死亡率は、対照区が58%であったのに対し、製剤1~3投与の2, 3, 4区は、それぞれ20, 4, 0%であり、対照区と2~4区の死亡率および生残率には有意な差が認められた(p<0.05)。

【0100】

また、製剤投与区と対照区には、死亡率だけでなく、摂餌量にも差異が見られた。すなわち、対照区においては、水温12までは1日あたり体重の0.5~1%(w/w)程度を摂餌したものの、11以下では摂餌せず、総摂餌量が30.3gであったのに対し、製剤1投与の2区では、水温11においても摂餌し、総摂餌量は75.3gであった。また、製剤2投与の3区は、水温12~10に設定の14日間に、1日あたり体重の0.5~2%(w/w)量摂餌し、総摂餌量は111.6gであり、製剤3投与の4区は、水温12~10に設定の15日間に、1日あたり0.5~2%量(w/w)を摂餌し、総摂餌量は124.4gであった。

【0101】

以上、アルギニンの飼料への添加により、高温度の生存限界水温下のみならず、低温度限界水温下においても耐性が付与されることが明らかになるとともに、低水温でも摂餌し、成長することが確認された。

【0102】

実施例2 アルギニン含有製剤の魚類への影響

(I) アルギニン3.0%(w/w)含有製剤の製造

【表 5 a】

原料名	含有率(%)
動物性原料	72.6
植物性原料	8.11
油脂類	6.43
アルギニン(添加量)	0.00
その他(ビタミン、ミネラル等)	12.86
Total 合計	100.00

【0103】

表 5 a に示した原料（天然原料由来のアルギニン 3.0% (w/w) を含む）を用いて、実施例 1 と同様の方法により、アルギニンを 3.0% (w/w) 含有する生存限界温度耐性付与剤（製剤 4）を製造した。なお、本実施例において比較製剤は、アルギニン 2.5% (w/w) を含む魚類用飼料である。

【0104】

(II) アルギニン 4.0% (w/w) 含有製剤の製造

【表 5 b】

原料名	含有率(%)
動物性原料	72.6
植物性原料	7.61
油脂類	6.43
アルギニン(添加量)	1.00
その他(ビタミン、ミネラル等)	12.36
Total 合計	100.00

【0105】

表 5 b に示した原料（天然原料由来のアルギニン 3.0% (w/w) を含む）を用いて、実施例 1 と同様の方法により、アルギニンを 4.0% (w/w) 含有する生存限界温度耐性付与剤（製剤 5）を製造した。 30

【0106】

(III) アルギニン 5.0% (w/w) 含有製剤の製造

【表 5 c】

原料名	含有率(%)
動物性原料	71.6
植物性原料	7.61
油脂類	6.43
アルギニン(添加量)	2.00
その他(ビタミン、ミネラル等)	12.36
Total 合計	100.00

【0107】

表 5 c に示した原料（天然原料由来のアルギニン 3.0% (w/w) を含む）を用いて、実施例 1 と同様の方法により、アルギニンを 5.0% (w/w) 含有する生存限界温度耐性付与剤（製剤 6）を製造した。

【0108】

(IV) 魚類の養殖・高温耐性試験

(1) 供試魚

長崎県の種苗生産場から搬入した平均体重52gのマダイを水温25±1で1週間馴致飼育したのち、以下の試験に供した。

【0109】

(2) 飼育方法

容量500リットルの円形水槽に、上記のマダイを1区あたり(すなわち、1水槽あたり)30尾ずつ収容し、水温25から1日に1ずつ昇温し、29に達したのちに試験を開始した。

【0110】

試験期間中は、水温29から1週間ごとに1ずつ昇温し、29～33まで、計5週間飼育した。

【0111】

(3) 給餌試験

1区にはアルギニンを2.5%(w/w)含む比較製剤を与え対照区とした。2区にはアルギニンを3.0%(w/w)含む製剤4を、3区にはアルギニンを4.0%(w/w)含む製剤5を、また4区にはアルギニンを5.0%(w/w)含む製剤6を与えた。

【0112】

試験開始2日前(水温27)から3日間(試験開始日、水温29)は上記製剤を各区ともに体重の2.0%(w/w)量となるように与え、その後は残餌がない場合には0.5%(w/w)ずつ増量し、残餌がみられた場合は0.5%(w/w)減量する方法によって5週間給餌した。

【0113】

(4) 効果評価方法

アルギニン投与区および対照区における試験期間中の死亡尾数、生残率、残餌量、摂餌量、増体重量について調べ、アルギニンの効果を評価した。

【0114】

(5) 試験結果

【表6】

アルギニン投与区と対照区における試験成績(高温度耐性)

調査項目	1区 対照区 (Arg2.5%)	2区 Arg3.0%	3区 Arg4.0%	4区 Arg5.0%
水温(°C)	29～33	29～33	29～33	29～33
供試尾数(尾)	30	30	30	30
試験開始時の平均体重(g)	52	52	52	52
給餌率(%)	2.0～4.0	2.0～4.5	2.0～4.5	2.0～4.5
総給餌量(g)	1029	1432	2499	2646
総残餌量(g)	207	174	156	161
総摂餌量(g)	822	1258	2343	2485
死亡尾数(尾)	30	20	1	0
死亡率(%)	100	66.7	3.3※	0※
生残率(%)	0	33.3	96.7※	100※
試験終了時の平均増体重量(g)	-	48	54	56
試験終了時の総重量(g)	-	1000	3074	3240

※ 対照区および2区との間に有意差(P<0.01).

【0115】

アルギニン投与区と対照区における試験成績を表6に、また試験開始後における生残率の推移を図2に示した。

【0116】

対照区においては、水温を29℃に設定した試験開始時の2日後から死亡がみられ、31℃に設定した14日後までに10%が死亡し、23日後の32℃水温下で100%が死亡した。一方、試験区においては、製剤4投与の2区が31℃水温下の17日後から死亡しはじめ、試験終了時まで66.7%が死亡し、製剤5投与の3区では33℃水温下の29日後に3.3%(1尾)が死亡したのみであり、製剤6投与の4区は試験終了時まで死亡する個体はみられず、全ての魚が生存した。

【0117】

水温別の死亡率を比較すると、29～30℃においては対照区に10%の死亡がみられたのに対し、いずれの試験区にも死亡はみられず、31℃においては対照区で20%、製剤4投与の2区で6.7%が死亡したものの、製剤5投与の3区および製剤6投与の4区では死亡がみられなかった。32℃においては、対照区の全ての魚と、製剤4投与の2区の50%が死亡したのに対し、製剤5投与の3区および製剤6投与の4区では死亡がみられなかった。また、33℃においては製剤5投与の3区のみに3.3%の死亡がみられたものの、対照区および製剤6投与の4区では死亡がみられなかった。

【0118】

このように、マダイの成長に必要なアミノ酸量が配合された比較製剤(アルギニン含有量2.5%(w/w))を給餌した対照区では、32℃までに全ての魚が死亡したのに対し、アルギニンを増量添加した製剤を給餌した試験区においては33℃水温下の試験終了時まで製剤6(アルギニン含有量5.0%(w/w))投与の4区では全く死亡がみられなかった。

【0119】

以上のことから、魚類に、成長に必要な量を超えるアルギニンを投与することによって、高温領域における生存限界温度に対する耐性が付与されることが明らかとなった。

【0120】

(V) 甲殻類の養殖・低温度耐性試験

(1) 供試魚

長崎県の種苗生産場から搬入した平均体重52gのマダイを水温15±1℃で1週間馴致飼育したのち、以下の試験に供した。

【0121】

(2) 飼育方法

容量500リットルの円形水槽に、上記のマダイを1区あたり(すなわち1水槽あたり)30尾ずつ収容し、水温15℃から1日に1℃ずつ降温し、12℃に達したのちに試験を開始した。

【0122】

試験期間中は、水温12℃から1週間後ごとに1℃ずつ水温冷却装置を用いて降温し、12～8℃まで35日間飼育した。

【0123】

(3) 給餌試験

1区にはアルギニンを2.5%(w/w)含む比較製剤を与え対照区とした。2区にはアルギニンを3.0%(w/w)含有する製剤4を、3区にはアルギニン4.0%(w/w)含有する製剤5を、また4区にはアルギニン5.0%(w/w)含有する製剤6を与えた。

【0124】

試験開始2日前(水温14℃)から3日間(試験開始日、水温12℃)は上記飼料を各区ともに体重の1%(w/w)量となるように与え、その後は残餌がない場合には0.5%(w/w)ずつ増量し、残餌がみられた場合は0.5%(w/w)減量する方法によって35日間給餌した。

【0125】

10

20

30

40

50

(4) 効果評価方法

アルギニン投与区および対照区における試験期間中の死亡尾数、生残率、残餌量、摂餌量、増体重量について調べ、アルギニンの効果を評価した。

【0126】

(5) 試験結果

【表7】

アルギニン投与区と対照区における試験成績(低温度耐性)

調査項目	1区 対照区 (Arg2.5%)	2区 Arg3.0%	3区 Arg4.0%	4区 Arg5.0%
水温(°C)	12~8	12~8	12~8	12~8
供試尾数(尾)	30	30	30	30
試験開始時の平均体重(g)	52	52	52	52
給餌率(%)	0~1.0	0~1.0	0~1.5	0~1.5
総給餌量(g)	187	296	383	437
総残餌量(g)	26	30	34	41
総摂餌量(g)	161	266	349	396
死亡尾数(尾)	16	8	2	0
死亡率(%)	30	26.7	6.7※	0※
生残率(%)	70	73.3	93.3※	100※
試験終了時の平均増体重量(g)	-2	0.8	1.7	2
試験終了時の総重量(g)	700	1162	1504	1620

※ 対照区および2区との間に有意差(P<0.05,0.01).

【0127】

アルギニン投与区と対照区における試験成績を表7に示した。

【0128】

水温が12~11においては、全ての区に死亡はみられなかったが、水温10~9では、対照区のマダイの13.3%が死亡し、製剤4投与の2区で6.7%死亡したが、製剤5投与の3区および製剤6投与の4区で死亡はみられなかった。水温8においては、対照区のマダイの40%が死亡したのに対し、製剤4投与の2区で20%、製剤5投与の3区で6.7%死亡したものの、製剤6投与の4区で死亡はみられなかった。

【0129】

また、製剤投与区と対照区には、死亡率だけでなく、摂餌量にも差異がみられた。すなわち、対照区においては水温12および11の前半までは1日あたり体重の0.5~1.0%(w/w)程度を摂餌したものの、11の後半から摂餌せず、総摂餌量が161gであったのに対し、製剤4投与の2区では10の後半まで摂餌し、総摂餌量は266gであった。また、製剤5投与の3区は水温12~10に設定の21日間に、1日あたり体重の0.5~1.5%(w/w)を摂餌し、総摂餌量は349gであり、製剤6投与の4区は水温12~9に設定の23日間に、1日あたり体重の0.5~1.5%(w/w)量を摂餌し、総摂餌量は396gであった。

【0130】

以上のことから、アルギニンを増量添加した飼料を魚類に投与することによって、高温度の生存限界水温下のみならず、低温度限界水温下においても耐性が付与されることが明らかになるとともに、低水温でも摂餌し、成長することが認められた。

【産業上の利用可能性】

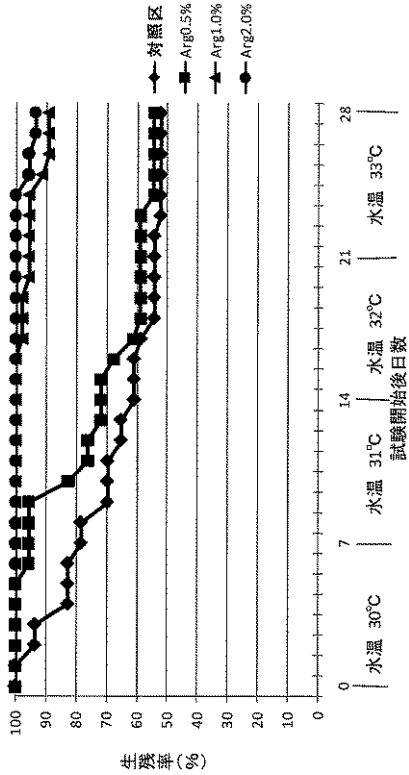
【0131】

本発明により、安定した養殖効果が得られる魚類または甲殻類の生存温度限界耐性付与剤および、魚類および甲殻類の生存限界水温領域を超える温度領域においても魚類または甲殻類が生存可能な養殖方法が提供される。

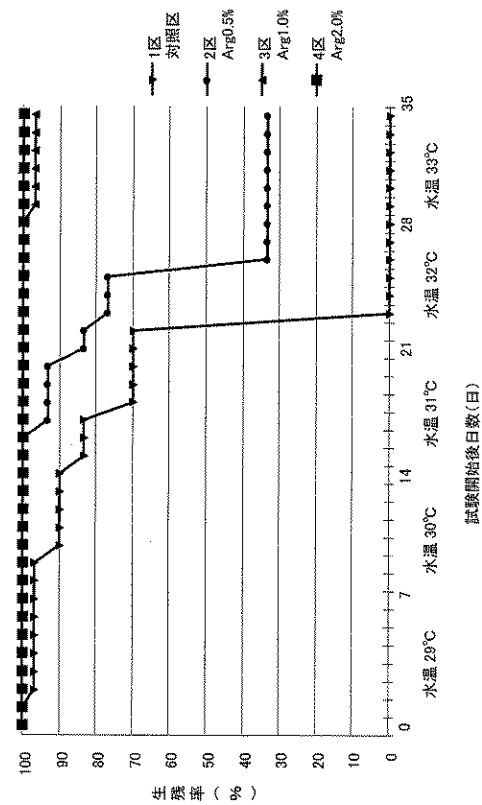
【 0 1 3 2 】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 下山 泰正
福岡県福岡市博多区博多駅前二丁目2番1号 協和発酵バイオ株式会社 九州営業所内
- (72)発明者 西田 雅充
東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵バイオ株式会社 本社内
- (72)発明者 久保埜 和成
福岡県福岡市博多区博多駅前二丁目2番1号 協和発酵バイオ株式会社 九州営業所内
- (72)発明者 縄田 俊浩
福岡県福岡市博多区博多駅前二丁目2番1号 協和発酵バイオ株式会社 九州営業所内
- (72)発明者 高橋 幸則
山口県下関市永田本町2-7-1 独立行政法人水産大学校内
- (72)発明者 近藤 昌和
山口県下関市永田本町2-7-1 独立行政法人水産大学校内

審査官 坂田 誠

- (56)参考文献 特開昭61-202663(JP,A)
特開2006-87348(JP,A)
特開平4-173060(JP,A)
特開平9-121784(JP,A)
特開2001-309749(JP,A)
Journal of Aquatic Animal Health, 2007年, vol.19, p.195-203
Journal of Aquatic Animal Health, 2001年, vol.13, p.194-201
Comp. Biochem. Physiol., 1991年, vol.98A, p.165-170
Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1986年, vol.52, p.2039
British Journal of Nutrition, 2007年, vol.97, p.786-789

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A 23 K 1 / 00 - 3 / 04
A 01 K 61 / 00