

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6308530号
(P6308530)

(45) 発行日 平成30年4月11日(2018.4.11)

(24) 登録日 平成30年3月23日(2018.3.23)

(51) Int.Cl.		F 1	
A 2 3 K	10/26 (2016.01)	A 2 3 K	10/26
A 2 3 K	50/80 (2016.01)	A 2 3 K	50/80
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 7 1
A 6 1 P	5/06 (2006.01)	A 6 1 P	5/06
A 6 1 K	35/60 (2006.01)	A 6 1 K	35/60

請求項の数 5 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2015-152885 (P2015-152885)
 (22) 出願日 平成27年7月31日(2015.7.31)
 (65) 公開番号 特開2017-29070 (P2017-29070A)
 (43) 公開日 平成29年2月9日(2017.2.9)
 審査請求日 平成29年2月24日(2017.2.24)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 598041566
 学校法人北里研究所
 東京都港区白金5丁目9番1号
 (73) 特許権者 515210927
 三陸飼料株式会社
 宮城県気仙沼市川口町2丁目106
 (74) 代理人 100106909
 弁理士 棚井 澄雄
 (74) 代理人 100188558
 弁理士 飯田 雅人
 (72) 発明者 森山 俊介
 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内
 (72) 発明者 足利 喜恵子
 宮城県気仙沼市川口町2丁目106
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サケ成長ホルモン含有飼料の製造方法、該製造方法により得られるサケ成長ホルモン含有飼料及びサケ成長ホルモン含有液

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

粉碎したサケの頭部を 60 より高く 90 以下で加熱する工程を備えることを特徴とするサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法。

【請求項2】

さらに、前記加熱したサケの頭部の固体成分と液体成分とを分離する工程と、
 前記固体成分と前記液体成分とを乾燥する工程と、
 をこの順に備える請求項1に記載のサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の製造方法によって得られることを特徴とするサケ成長ホルモン含有飼料。 10

【請求項4】

前記サケ成長ホルモンが、サケ脳下垂体由来成長ホルモンである請求項3に記載のサケ成長ホルモン含有飼料。

【請求項5】

粉碎したサケの頭部を 60 より高く 90 以下で加熱し、前記加熱したサケの頭部の固体成分と液体成分を分離することで得られたことを特徴とするサケ成長ホルモン含有液。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、サケ成長ホルモン含有飼料の製造方法、該製造方法により得られるサケ成長ホルモン含有飼料及びサケ成長ホルモン含有液に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

サケなど魚類由来の成長ホルモンが魚介類の成長を顕著に促進することが知られている。ニジマス、ウナギや錦鯉などの魚類、また、アワビなどの貝類の養殖産業等に有効であり、前記成長ホルモンを含有する飼料を魚介類に与え、成長を早める試みがなされている。

【 0 0 0 3 】

特許文献 1 には、サケ由来の成長ホルモンを含有する海洋無脊椎動物用飼料について開示されており、特に貝類等の成長を簡便且つ短期間で効率的に促進できることが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 4 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 5 - 9 5 1 0 4 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

特許文献 1 において、サケ成長ホルモンを得るために、4 で酢酸アンモニウム (pH 9) などの塩基性緩衝液を用いて抽出している。サケ成長ホルモンの熱変性を避け、生物活性を保つためには低温で作業を行うことが望ましいが、低温で抽出したサケ成長ホルモンを室温以上の温度で保存することにより活性が失活することや保存のためにサケ成長ホルモンを含む溶液を凍結乾燥する必要があるなど、製造効率が悪い。

また、飼料の製造方法において、サケ等の冷凍した魚を粉碎し、100 で煮沸するのが一般的である。煮沸により水分を蒸発させ、効率的に製造することができるが、成長ホルモンが熱変性するため、飼料中にほとんど残存せず、成長ホルモンの生物活性は失われる。

【 0 0 0 6 】

本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、簡便で効率的な生物活性を有するサケ成長ホルモン含有飼料の製造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】

【 0 0 0 7 】

本発明は、以下のとおりである。

(1) 粉碎したサケの頭部を 60 以上 90 以下 で加熱する工程を備えることを特徴とするサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法。

(2) さらに、前記加熱したサケの頭部の固体成分と液体成分とを分離する工程と、前記固体成分と前記液体成分とを乾燥する工程と、をこの順に備える (1) に記載のサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法。

(3) (1) 又は (2) に記載の製造方法によって得られることを特徴とするサケ成長ホルモン含有飼料。

(4) 前記サケ成長ホルモンが、サケ脳下垂体由来成長ホルモンである (3) に記載のサケ成長ホルモン含有飼料。

(5) 粉碎したサケの頭部を 60 以上 90 以下 で加熱し、前記加熱したサケの頭部の固体成分と液体成分とを分離することで得られたことを特徴とするサケ成長ホルモン含有液。

【発明の効果】

【 0 0 0 8 】

本発明によれば、生物活性を有するサケ成長ホルモンが高含有率である飼料を高効率で

10

20

30

40

50

製造することができる。また、本発明によれば、魚介類の成長を簡便且つ短時間で効率的に促進させ、それらの生産性の向上を図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】本発明の第一実施形態に係るサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法の概略構成を示す図である。

【図2】本発明の第二実施形態に係るサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法の概略構成を示す図である。

【図3】本発明の第三実施形態に係るサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法の概略構成を示す図である。

【図4】実施例1における50 で加熱した飼料中のサケ成長ホルモンのHPLCによる検出結果を示したグラフである。

【図5】実施例2における60 で加熱した飼料中のサケ成長ホルモンのHPLCによる検出結果を示したグラフである。

【図6】(A)実施例3における液体成分中のサケ成長ホルモンのHPLCによる検出結果を示したグラフである。(B)実施例3における固体成分中のサケ成長ホルモンのHPLCによる検出結果を示したグラフである。

【図7】(A)実施例4における液体成分中のサケ成長ホルモンのHPLCによる検出結果を示したグラフである。(B)実施例4における固体成分中のサケ成長ホルモンのHPLCによる検出結果を示したグラフである。

【図8】(A)～(D)試験例1における精製されたサケ成長ホルモンの熱耐性試験のHPLCによる検出結果を示したグラフである。

【図9】(A)～(D)試験例1における脳下垂体抽出液中のサケ成長ホルモンの熱耐性試験のHPLCによる検出結果を示したグラフである。

【図10】(A)～(C)試験例1におけるサケ成長ホルモンのpH安定性試験のHPLCによる検出結果を示したグラフである。

【図11】試験例3におけるサケ成長ホルモンを添加したニジマス肝臓由来細胞のIGF-Iの発現量の定量試験について定量PCRによる検出結果を示したグラフである。

【図12】試験例4におけるサケ成長ホルモン含有飼料を与えたニジマス稚魚の体重の変化を表したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

以下、必要に応じて図面を参照しながら、本発明の実施形態について詳細に説明する。なお、図面中、同一又は相当部分には同一符号を付し、重複する説明は省略する。

【0011】

<サケ成長ホルモン含有飼料の製造方法>

(第一実施形態)

一実施形態において、本発明は、粉碎したサケの頭部を30～90 で加熱する工程を備えるサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法を提供する。

【0012】

本実施形態の製造方法によれば、生物活性を有するサケ成長ホルモンが高含有率である飼料を高効率で製造することができる。

【0013】

本明細書において、「サケ成長ホルモン」とは、サケ脳下垂体で産生及び分泌される成長ホルモンを意味している。「サケ成長ホルモン」の構造は当業界で既知であり、例えば、Kawauchi et al., Arch. Biochem. Biophys., 1986, 244: 542-552に記載されている。

飼料に使用可能な「サケ成長ホルモン」は、特に限定されるものではなく、サケ脳下垂体で産生及び分泌される成長ホルモンを抽出したサケ脳下垂体由来成長ホルモン(粗抽出物、精製物などを含む)、遺伝子組み換えにより製造された組換えサケ成長ホルモン等が

10

20

30

40

50

挙げられる。

サケの加工工程で頭部の未利用部位が大量に廃棄されていることから、本発明では、サケ頭部の未利用部位由来の脳下垂体から調製した成長ホルモンを活用することが好ましい。また、サケ成長ホルモンの抽出及び精製しやすさの観点から、脂質の含有率が少ないサケが好ましく、脂質の含有率が0.1%以下であるサケがより好ましい。

【0014】

図1は、本発明の第一実施形態に係るサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法の概略構成を示す図である。各工程の詳細について、以下に説明する。

材料としては、上述のサケの加工工程で大量に廃棄されるサケ頭部の未使用部位を回収し、冷凍保存したものを使用する。まず、サケ頭部を冷凍状態のまま、水とともに粉碎装置1に添加し、粉碎及び摩砕する。サケ頭部の重量に対して、1/4～1/3倍量の水を添加することが好ましい。また、粉碎装置としては、特に限定はなく、ミクロカッター等が挙げられる。

次に、粉碎したサケ頭部を加熱装置2に添加し加熱することで、サケ成長ホルモンを溶出し、余分な水分を蒸発して濃縮する。通常、ホルモンは熱に弱く変性しやすいが、発明者らは、サケ成長ホルモンが優れた熱耐性を有することを発見し、本発明を見出した。詳細については不明であるが、サケ成長ホルモンは疎水性が高く、難溶性の物質であることが知られており、そのため、その他のホルモン類と比較して、優れた熱耐性を有すると推察できる。

加熱温度は、30～90が好ましく、50～70がより好ましい。30未満でサケ成長ホルモンの溶出工程を行うと、サケ成長ホルモンの熱変性を避け、生物活性を保つことができるが、低温ではサケ成長ホルモンが溶出しにくく、製造効率が悪い。一方、90以上でサケ成長ホルモンの溶出工程を行うと、水分の蒸発が速く、効率的に製造することができるが、成長ホルモンが熱変性するため、成長ホルモンの生物活性が失われる。加熱時間は、粉碎したサケ頭部の重量により適宜調整することができるが、効率的な製造とエネルギーコストの観点から1～2時間が好ましい。

また、加熱装置に特に限定はなく、熱湯や蒸気等により材料を加熱及び保温することができるタンク等が挙げられる。

【0015】

(第二実施形態)

また、一実施形態において、本発明は、さらに、加熱したサケの頭部を乾燥する工程を備えるサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法を提供する。

【0016】

本実施形態の製造方法によれば、余分な水分を取り除くことができ、乾燥状態のサケ成長ホルモン含有飼料を得ることができる。

【0017】

図2は、本発明の第二実施形態に係るサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法の概略構成を示す図である。各工程の詳細について、以下に説明する。

粉碎工程、加熱工程までは、第一実施形態と同様に行う。加熱工程後のサケ頭部を乾燥装置3に入れて、乾燥する。乾燥温度は、50～70が好ましく、乾燥時間は、加熱したサケ頭部の重量により適宜調整することができるが、5～12時間が好ましい。

また、乾燥装置としては、特に限定はなく、減圧乾燥機、真空乾燥機、脱湿乾燥機、凍結乾燥機、熱風乾燥機等が挙げられる。

【0018】

(第三実施形態)

また、一実施形態において、本発明は、さらに、前記加熱工程後であって前記乾燥工程前に、前記加熱したサケの頭部の固体成分と液体成分を分離する工程を備えるサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法を提供する。

【0019】

本実施形態の製造方法によれば、固体成分と液体成分とを飼料の加工形態に応じて適宜

10

20

30

40

50

使い分けることができる。また、液体成分により多くのサケ成長ホルモンが溶出しているため、サケ成長ホルモンの濃度の高い液を得ることができる。

【0020】

図2は、本発明の第三実施形態に係るサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法の概略構成を示す図である。各工程の詳細について、以下に説明する。

粉碎工程、加熱工程までは、第一実施形態と同様に行う。加熱工程後のサケ頭部を固形分離装置4に入れて、固体成分と液体成分とを分離する。固液分離装置としては、特に限定はなく、三相分離が可能な遠心分離機等が挙げられる。

図2においては、固液分離工程後の固体成分及び液体成分をそれぞれ乾燥装置3により乾燥する工程を有しているが、使用用途に応じて、乾燥せずにそのまま用いることもできる。

10

【0021】

<サケ成長ホルモン含有飼料>

一実施形態において、本発明は、上述の第一実施形態～第三実施形態のいずれかの製造方法によって得られるサケ成長ホルモン含有飼料を提供する。

【0022】

本実施形態のサケ成長ホルモン含有飼料によれば、魚介類の成長を簡便且つ短時間で効率的に促進させ、それらの生産性の向上を図ることができる。

【0023】

本発明のサケ成長ホルモン含有飼料は、液体、固体（ゲル等）形態のいずれであってもよい。液体形態の場合には、サケ成長ホルモン含有飼料を、適当な溶媒、例えば、真水、海水等に溶解させて用いることができる。その際の溶液の濃度は、対象とする魚介類やその個体重量や体積等によって異なるため、適宜決定すればよい。好ましくは0.01～1g/mlである。

20

【0024】

また、液体形態のサケ成長ホルモン含有飼料は、特に貝類において液浴や筋肉注射により投与することができる。液浴を行う場合には、所定濃度のサケ成長ホルモン含有飼料を調製し、この溶液に所定時間および頻度で対象とする貝類を浸漬する。これにより、サケ成長ホルモンが貝類の体内に取り込まれ、その結果、成長が促進される。液浴に使用するサケ成長ホルモンの濃度は、例えば、魚類の場合、又は、アワビの場合、ともに、1mg/L～100mg/Lであることが好ましい。

30

また、筋肉注射の場合には、所定濃度のサケ成長ホルモン含有飼料を貝類の所定部位に筋肉注射する。筋肉注射に使用するサケ成長ホルモンの濃度は、例えば、魚類の場合には、10ng/g体重～1000ng/g体重であることが好ましく、アワビの場合には、1ng/g体重～100ng/g体重であることが好ましい。筋肉注射を行う部位は、貝殻筋が好ましい。

液体形態のサケ成長ホルモン含有飼料は、モノマーとしての生物活性を保つために、pHを7～9に調製したものが好ましい。pHを調製するためには、水酸化ナトリウムや酢酸アンモニウム溶液（pH7～9）等を使用することが好ましい。

【0025】

また、固体形態のサケ成長ホルモン含有飼料は、経口用飼料として使用することができる。特に、貝類では、固体形態の中でもゲル形態、特にサケ成長ホルモンの他に海藻成分等を含み、ゲル内にサケ成長ホルモンを保持したゲル形態であることが好ましい。

40

経口用飼料の投与方法としては、魚介類と同一の環境下において、魚介類に所定期間および回数で摂餌させる。固体形態のサケ成長ホルモン含有飼料中のサケ成長ホルモン濃度は、対象とする魚介類やその個体重量や体積等によって異なるため、適宜決定すればよい。例えば、アワビ（体重約2g～3g、殻長約3～5cm）の場合、0.5mg/8g～5mg/8gの濃度範囲であることが好ましい。前記濃度範囲外であると、アワビを短期間で効率的に成長促進させることが困難になる。投与する間隔および回数は、目的や状況に応じて決定すればよく、例えば、7～14日間毎で、20～60回である。また、例

50

えば、魚類の場合には、 $100\text{ ng/g} \sim 5000\text{ ng/g}$ の濃度範囲であることが好ましい。

固体形態のサケ成長ホルモン含有飼料は、ハンドリングストレスの影響を魚介類に与えずに、また、サケ成長ホルモンの失活を抑えて、魚介類の体内へ取り込むことができる。

【0026】

本発明のサケ成長ホルモン含有飼料は、飼料成分として通常用いられる飼料添加物を含んでもよく、例えば、抗生物質、ビタミン、ミネラル類等が挙げられる。

【0027】

本発明において、魚介類の種類としては、特に限定されず、例えば、アユ、コイ、マス等、養殖業が盛んに行われている魚類、アワビ、サザエ、フジツボ、カキ、ホタテガイ等の貝類、エビ、カニなどの甲殻類、ウニ類等が挙げられる。ただし、これらに限定されるものではなく、淡水に生息するタニシ、カワニナ等の無脊椎動物にも適用することができる。なお、カキ、ホタテガイは液浴に適している。

【0028】

<サケ成長ホルモン含有液>

一実施形態において、本発明は、粉碎したサケの頭部を $30 \sim 90$ で加熱し、前記加熱したサケの頭部の固体成分と液体成分を分離することで得られたサケ成長ホルモン含有液を提供する。

【0029】

本実施形態のサケ成長ホルモン含有液によれば、魚介類の成長を簡便且つ短期間で効率的に促進させ、それらの生産性の向上を図ることができる。また、サケ成長ホルモン含有液はサケ成長ホルモンの濃度が高く、そのまま液体飼料として使用することができ、さらに、その他の栄養成分等と混合し自由にカスタマイズした加工を施すことができる。

【0030】

本実施形態のサケ成長ホルモン含有液の製造方法は、上述のサケ成長ホルモン含有飼料の製造方法の第三実施形態と同様である。粉碎工程及び加熱工程後のサケ頭部を固液分離装置により分離することで得られる。固形分離工程後の液体成分をそのまま使用してもよいが、液体成分中にはコラーゲンが溶解している。よって、液体成分を冷凍し再解凍することで、コラーゲンがゲル化沈殿し、液体中のサケ成長ホルモンを簡単に精製することができる。

【実施例】

【0031】

[実施例1] サケ成長ホルモン含有飼料の製造 (50 加熱)

(1) 粉碎工程

冷凍保存していたサケ頭部 (600 kg) に対して、合計 180 kg の水を添加した後、マイクロカッター ($\sim 1.5\text{ mm}$) にて粉碎及び摩砕した。

(2) 加熱工程

粉碎したサケ頭部を加温タンクに投入し、 30 分間解凍するために攪拌した後、 50 に達してから約 30 分間、加熱しながら加温した。

(3) 乾燥工程

得られた液体成分及び固体成分を 70 に設定した真空乾燥機で乾燥した。

【0032】

(4) サケ成長ホルモンの検出

得られた乾燥固形物に 350 ml の蒸留水を添加し、 4 で 24 時間攪拌した。懸濁液を遠心分離 ($6,000$ 回転、 30 分間、 4) した後、上清を採取した。得られた上清を、再度、遠心分離 ($145,000$ 回転、 10 分間、 4) した後、上清を高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) (日本分光社製) に添加して、サケ成長ホルモンの溶出位置及び含有量を算出した。流速は 1 ml/min 、カラム温度は 40 とした。HPLCの結果を図4に示した。サケ成長ホルモン含有飼料中のサケ成長ホルモンの濃度は、 $77.1\text{ }\mu\text{g/g}$ (77.1 mg/kg) であった。従来のサケ成長ホルモン含有飼料 (サ

10

20

30

40

50

ケ成長ホルモン濃度が $2 \mu\text{g}/\text{g}$ である。)に換算すると、 38.55 kg の飼料に相当する量のサケ成長ホルモンが含まれていた。

【0033】

[実施例2] サケ成長ホルモン含有飼料の製造(60 加熱)

加熱工程での温度を60 にした以外は、実施例1と同様の方法で、サケ成長ホルモン含有飼料を製造し、飼料中のサケ成長ホルモンの溶出位置及び含有量を算出した。HPLCの結果を図5に示した。サケ成長ホルモン含有飼料中のサケ成長ホルモンの濃度は、 $85.2 \mu\text{g}/\text{g}$ ($85.2 \text{ mg}/\text{kg}$)であった。従来のサケ成長ホルモン含有飼料(サケ成長ホルモン濃度が $2 \mu\text{g}/\text{g}$ である。)に換算すると、 42.60 kg の飼料に相当する量のサケ成長ホルモンが含まれていた。

10

【0034】

[実施例3] サケ成長ホルモン含有飼料の製造(50 加熱・固液分離)

(1) 粉碎工程

実施例1の(1)と同様の方法にて行った。

(2) 加熱工程

実施例1の(2)と同様の方法にて行った。

(3) 固液分離工程

加熱されたサケ頭部を、三相分離機により液体成分と固体成分に分離した。

(4) 乾燥工程

得られた液体成分及び固体成分を50 に設定した真空乾燥機で、それぞれ固体成分は7時間30分、液体成分は11時間15分乾燥させた。

20

【0035】

(5) サケ成長ホルモンの検出

(i) サケ成長ホルモンの抽出

真空乾燥機後の固形物(0.5g)を2mlの0.2M酢酸アンモニウム(pH9)に加え、ポリトロンホモジナイザー(ポリトロン社製)で摩砕した。その後、2mlの0.2M酢酸アンモニウム(pH9)を加えて、4 で1時間抽出した。遠心分離した後、サケ成長ホルモンを含む上清3mlを得た。

(ii) サケ成長ホルモンの濃縮

次に、サケ成長ホルモンを濃縮するために、上清1mlを0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)(9.1%)で平衡化したSep-Pak C18カートリッジ(Waters社製)に添加した。0.1%TFA 5mlで洗浄した後、20%アセトニトリル(0.1%TFA含有)4ml、次いで60%アセトニトリル(0.1%TFA含有)4mlを添加して、カートリッジに吸着しているタンパク質を溶出し、凍結乾燥した。

30

(iii) HPLCでの検出

凍結乾燥した固形分0.6gを0.1%TFA 500 μl に溶解し、ODS-120Tカラム(東ソー社製)を高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)(日本分光社製)に添加した。0.1%TFAを含むアセトニトリルを用いて、30%から60%まで60分間で上昇させる直線濃度勾配法で、サケ成長ホルモンの溶出位置及び含有量を算出した。流速は1ml/min、カラム温度は40 とした。HPLCの結果を図6(A)及び(B)に示した。サケ成長ホルモン含有液体成分由来の乾燥物中のサケ成長ホルモンの濃度は、 $15 \mu\text{g}/\text{g}$ であり、サケ成長ホルモン含有固形成分由来の乾燥物中のサケ成長ホルモンの濃度は、 $3 \mu\text{g}/\text{g}$ であった。

40

【0036】

[実施例4] サケ成長ホルモン含有飼料の製造(70 加熱・固液分離)

(1) 粉碎工程

実施例1の(1)と同様の方法にて行った。

(2) 加熱工程

実施例1の(2)と同様の方法にて行った。

(3) 固液分離工程

50

加熱されたサケ頭部を、三相分離機により液体成分と固体成分に分離した。

(4) 乾燥工程

得られた液体成分及び固体成分を70℃に設定した真空乾燥機で、それぞれ固体成分は5時間、液体成分は10時間15分乾燥させた。

【0037】

(5) サケ成長ホルモンの検出

(i) サケ成長ホルモンの抽出

実施例3の(5)(i)と同様の方法にて行った。

(ii) サケ成長ホルモンの濃縮

実施例3の(5)(ii)と同様の方法にて行った。

10

(iii) HPLCでの検出

実施例3の(5)(iii)と同様の方法にて行った。HPLCの結果を図7(A)及び(B)に示した。サケ成長ホルモン含有液体成分由来の乾燥物中のサケ成長ホルモンの濃度は、 $11\mu\text{g/g}$ であり、サケ成長ホルモン含有固形成分由来の乾燥物中のサケ成長ホルモンの濃度は、 $1.5\mu\text{g/g}$ であった。

【0038】

[試験例1] サケ成長ホルモンの熱耐性試験

(1) 試料の調製

サケ脳下垂体から精製された成長ホルモンを0.05M酢酸アンモニウム(pH9.0)に入れて、4℃、50℃、60℃及び70℃の温度条件下で、それぞれ10分間保持した(こちらを精製されたサケ成長ホルモンとした)。

20

また、サケ脳室内臓物を400 μl の0.2M酢酸アンモニウム溶液(pH9.0)に入れた後、4℃、50℃、60℃及び70℃の温度条件下で、それぞれ10分間保持したものも用意した(こちらを脳下垂体抽出液中のサケ成長ホルモンとした)。脳下垂体抽出液中のサケ成長ホルモンについては、10分経過後、ペッスルを用いて脳室内臓物を摩砕し、サケ成長ホルモンを4℃で10分間抽出した。抽出液を遠心分離し、上清(350 μl)を採取した。

(2) サケ成長ホルモンの検出

精製されたサケ成長ホルモン及び脳下垂体抽出液中のサケ成長ホルモンについて、4℃、50℃、60℃及び70℃の温度条件下で処理した試料(350 μl)について、それぞれ500 μl の0.1%TFAを加えて希釈した。そのうち、500 μl をHPLCに添加し、サケ成長ホルモンの溶出位置及び含有量を検証した。精製された成長ホルモンのHPLCの結果を図8(A)~(D)に示した。また、脳下垂体抽出液中のサケ成長ホルモンのHPLCの結果を図9(A)~(D)に示した。

30

【0039】

精製された成長ホルモン及び脳下垂体抽出液中のサケ成長ホルモンの両方において、4℃の温度条件下で処理した試料中の成長ホルモンの含有量に対して、温度の上昇に伴い、試料中の成長ホルモンの含有量は減少したが、70℃の試料においてもサケ成長ホルモンが残存することが明らかとなった。サケ成長ホルモンは疎水性が高いことが知られており、そのため、その他のホルモンと比較して高い耐熱性を有すると推察できる。

40

【0040】

[試験例2] サケ成長ホルモンのpH安定性試験

(1) 試料の調製

サケ脳下垂体から精製されたサケ成長ホルモンを溶解した溶液を、pH調整剤を用いて、pH7.0、pH9.0及びpH11.0となるように調製し、室温で60分間保持した。

(2) サケ成長ホルモンの検出

試験例1の(2)と同様の方法にて行った。結果を図10(A)~(C)に示した。

【0041】

pHが塩基性になるにつれて、サケ成長ホルモンの検出量は減っていくが、pH11に

50

においても十分量のサケ成長ホルモンが得られることが明らかとなった。このことから、サケ成長ホルモンは、高い耐塩基性を有すると推察できる。

【0042】

[試験例3] サケ成長ホルモンを添加したニジマス肝臓由来細胞のIGF-Iの発現量の定量試験

(1) 試料の調製

実施例1及び実施例2で得られたサケ成長ホルモン含有飼料、並びにコントロールとして精製サケ成長ホルモンを、それぞれサケ成長ホルモンの含有量が0、10、100、1000 ng/mlとなるようにイーグル最小必須培地(シグマアルドリッチ)に添加した。事前に播種し培養しておいたニジマス肝臓由来細胞に、上述の濃度のサケ成長ホルモンを含有したイーグル最小必須培地(シグマアルドリッチ) 0.5 mlをそれぞれ添加し、10 で24時間培養した。

(2) 定量PCRによるニジマス肝臓由来細胞のIGF-Iの発現量の定量

培養した細胞を回収し、mRNAを抽出し、定量PCRによりIGF-I(Insulin like growth factors)の発現量を定量した。結果を図11に示した。図11では、実施例1及び実施例2で得られたサケ成長ホルモン含有飼料、並びにコントロールとして精製サケ成長ホルモンそれぞれにおいて、サケ成長ホルモンを含まない培養液のIGF-Iの発現量を1としたときの相対比を示している。

IGF-Iとは、70個のアミノ酸からなる単鎖ポリペプチドで、骨及び体細胞における成長ホルモン(Growth Hormone; GH)の成長促進作用を仲介する因子のひとつである。IGF-Iの分泌は、成長ホルモン(GH)に依存し、種々の器官で産生される。よって、IGF-Iの発現量は、サケ成長ホルモンによる成長効果の指標として用いることができる。

【0043】

図11より、実施例1及び実施例2で得られたサケ成長ホルモン含有飼料、並びに精製サケ成長ホルモンにおいて、濃度依存的にIGF-Iの発現量が増加していた。よって、実施例1及び実施例2において、50及び60にて加熱処理して得られた飼料中のサケ成長ホルモンは、十分な生物活性を有することが明らかとなった。

【0044】

[試験例4] サケ成長ホルモン含有飼料を与えたニジマス稚魚の成長についての評価

(1) ニジマス稚魚用飼料の調製

実施例1及び実施例2で得られたサケ成長ホルモン含有飼料から調製した成長ホルモン溶液を用いて、それぞれサケ成長ホルモンの含有量が2.5 µg/gとなるように添加したニジマス稚魚用飼料を調製した。コントロールとして、サケ成長ホルモンを含有しない飼料も調製した。

【0045】

(2) ニジマス稚魚の飼育

ニジマス稚魚(n=15尾)に1日に全体重の1%量を2回与えて、56日間飼育した。14日ごとに稚魚の体重を計測し、結果を図12に示した。

【0046】

コントロールの飼料を与えた稚魚と比較して、実施例1及び実施例2で得られたサケ成長ホルモン含有飼料を与えた稚魚では、飼育から14日後から体重の増加量について有意な差が見られた。さらに、56日後にはコントロールの飼料を与えた稚魚と比較して、実施例1及び実施例2で得られたサケ成長ホルモン含有飼料を与えた稚魚では、約1.5g程度多く、体重が増加していた。よって、実施例1及び実施例2で得られたサケ成長ホルモン含有飼料は、ニジマス稚魚の成長促進効果を有することが明らかとなった。

【0047】

以上の結果から、本発明によれば、生物活性を有するサケ成長ホルモンが高含有率である飼料を高効率で製造することができることが明らかとなった。また、本発明によれば、魚介類の成長を簡便且つ短期間で効率的に促進させ、それらの生産性の向上を図ることが

10

20

30

40

50

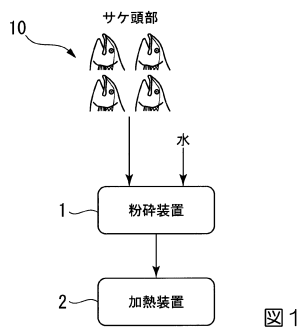
できることが明らかとなった。

【符号の説明】

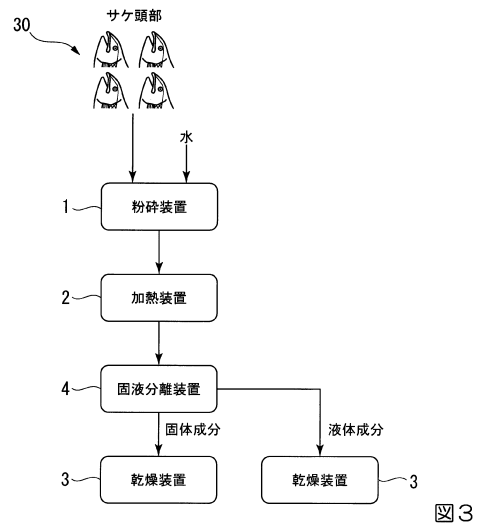
【0048】

1...粉砕装置、2...加熱装置、3...乾燥装置、4...固液分離装置、10, 20, 30...サケ成長ホルモン含有飼料の製造装置

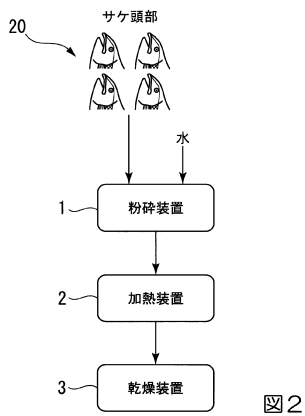
【図1】



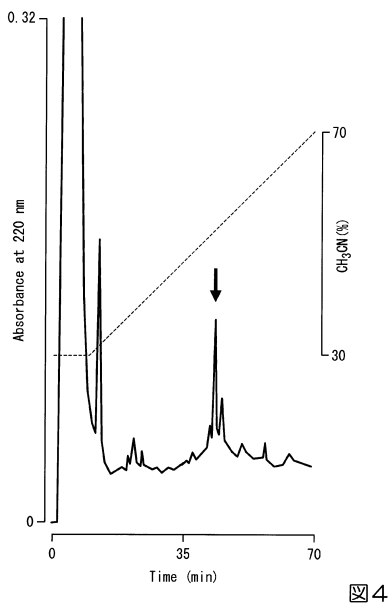
【図3】



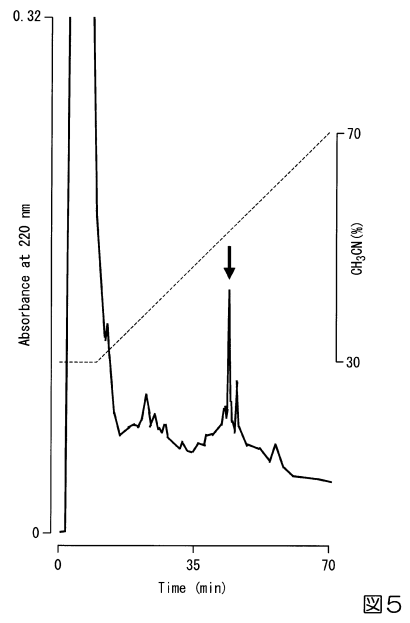
【図2】



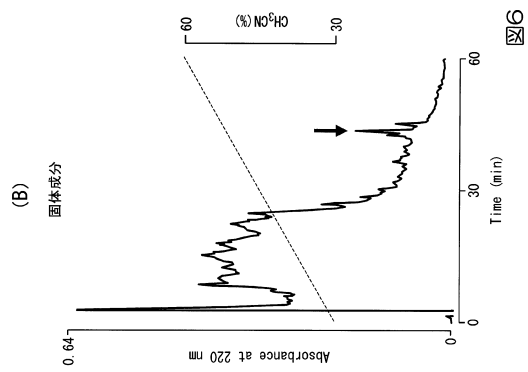
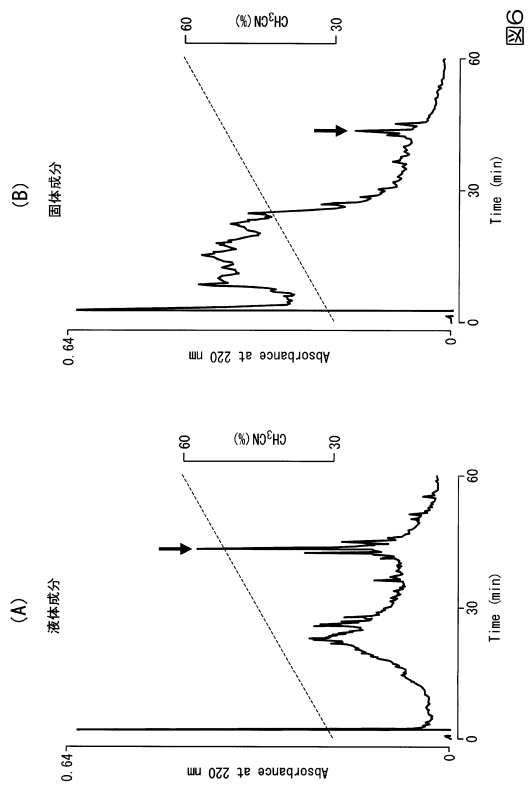
【 図 4 】



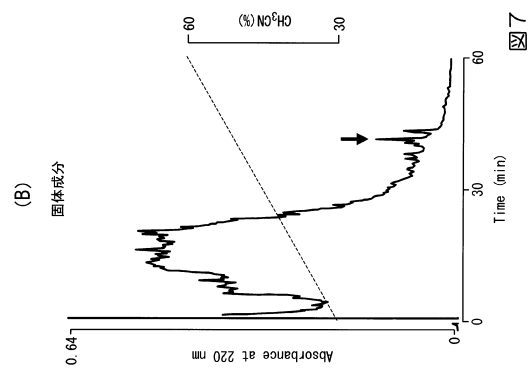
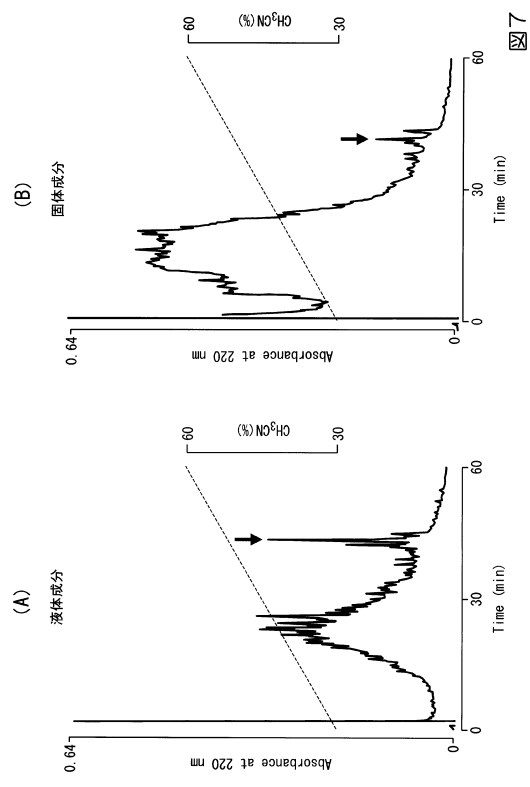
【 図 5 】



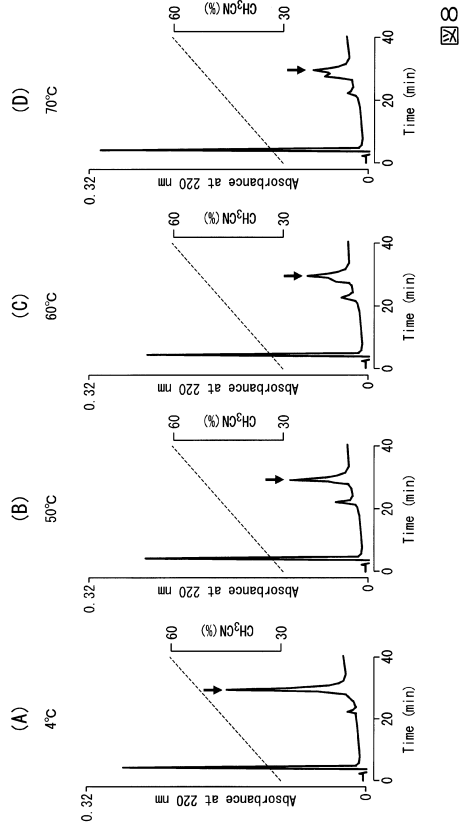
【 図 6 】



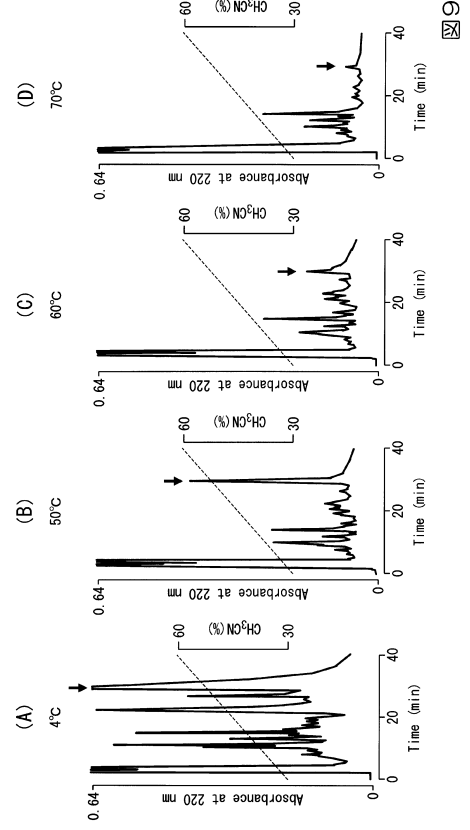
【 図 7 】



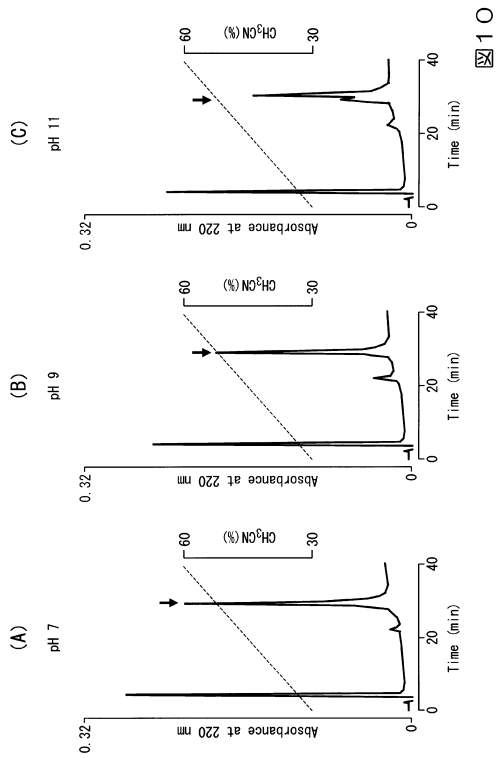
【 図 8 】



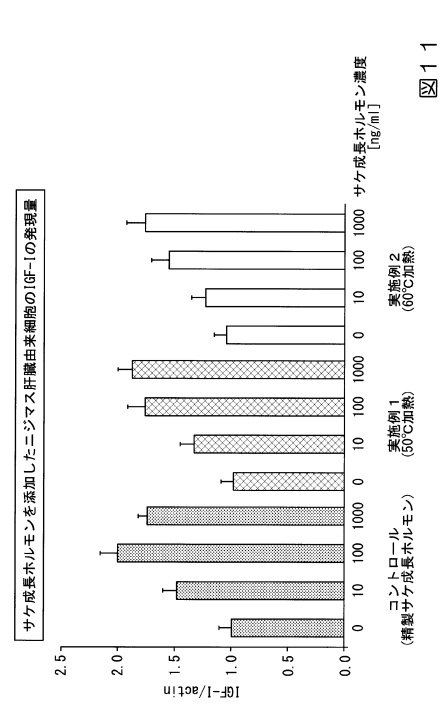
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 11 】

【 図 1 2 】

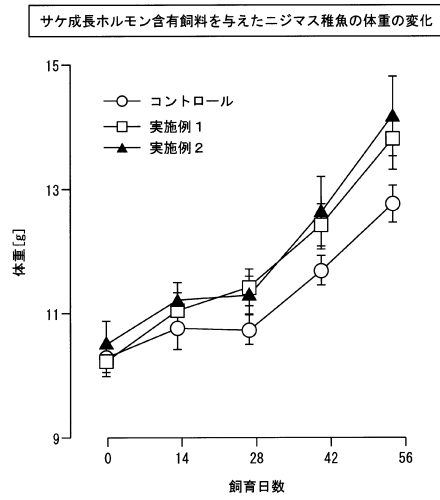


図 1 2

フロントページの続き

(72)発明者 守 和宏
宮城県気仙沼市川口町2丁目106

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 特開2014-193158(JP,A)
特開平04-141050(JP,A)
特開昭62-153223(JP,A)
特開昭60-214798(JP,A)
特開2005-095104(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A23K 10/00 - 50/90
A61K 35/60
A61P 5/06
A61P 43/00