Attachment K

資料番号 15-2

子牛を用いた野外応用試験

目　次

	頁
総　括	1 ～ 3
野外試験Ⅰ	4 ～ 10
野外試験Ⅱ	11 ～ 17
野外試験Ⅲ	18 ～ 24

1. 表題

Bacillus subtilis DB9011 株の子牛における試験の総括

2. 目的

3 施設において 1 群 5 頭（1 頭×5 反復）の試験を実施し、その結果から *Bacillus subtilis* DB9011 株の子牛に対する成長促進の効果を検討する。

3. 方法

Bacillus subtilis DB9011 株の投与の有無を 1 因子、また試験施設による差を 1 因子として 2 元配置による分散分析を行い、増体重と平均飼料要求率の改善の効果を判定した。

4. 分散分析の結果

(1) 増体重

各試験施設における、*Bacillus subtilis* DB9011 株の試験群および対照群のそれぞれ 5 試験区の成績を表 1 に示した。また分散分析の結果を表 2 に示した。

その結果、*Bacillus subtilis* DB9011 株の投与により、$P<0.01$ の水準で増体重の効果が認められた。また、試験施設との交互作用は認められなかった。

(2) 飼料要求率

各試験施設における、*Bacillus subtilis* DB9011 株の試験群および対照群のそれぞれ 5 試験区の成績を表 3 に示した。また分散分析の結果を表 4 に示した。

その結果、*Bacillus subtilis* DB9011 株の投与により、$P<0.05$ の水準で飼料要求率の改善効果が認められた。また、試験施設との交互作用は認められなかった。

5. まとめ

Bacillus subtilis DB9011 株の子牛への投与により、3 施設において統計学的に有意な体重増加促進効果が見られ、2 施設において飼料要求率の有意な改善が見られ 1 施設において改善傾向が見られた。

分散分析の結果、これらの作用は試験施設の相違に影響を受けず、統計学的に有意な体重増加促進効果（$p<0.01$）および飼料要求率の改善（$p<0.05$）が認められた。

Bacillus subtilis DB9011 株の添加は、子牛の体重増加促進効果および飼料要求率の改善効果をもたらすものと推察された。

表１　増体重に関する試験成績

施設名	対照群					試験群				
	１区	２区	３区	４区	５区	１区	２区	３区	４区	５区
大平	15	19	18	15	7	26	24	21	22	19
宇根	12	14	9	15	17	16	26	15	21	18
賀陽	15	9	14	12	14	17	16	21	22	16

（単位：ＫＧ）

表２　分散分析表（増体重）

因子	自由度	S	MS	F	P
DB9011 株	1	300.84	300.84	24.90	＜0.01
試験施設	2	49.27	24.63	2.04	
交互作用	2	3.03	3.03	0.25	
群間誤差	24	12.08	12.08		

表３　飼料要求率に関する試験成績

施設名	対照群					試験群				
	１区	２区	３区	４区	５区	１区	２区	３区	４区	５区
大平	1.70	1.46	1.70	1.56	2.89	1.30	1.34	1.23	1.26	1.25
宇根	1.56	1.40	1.60	1.42	1.41	1.35	1.30	1.59	1.24	1.35
賀陽	1.59	2.33	1.85	1.68	1.68	1.53	1.84	1.51	1.30	1.67

単位（飼料 kg／体重 KG）

表４　分散分析表（飼料要求率）

因子	自由度	S	MS	F	P
DB9011 株	1	0.58	0.58	5.49	<0.05
試験施設	2	0.25	0.12	1.16	
交互作用	2	0.36	0.18	1.67	
群間誤差	24	2.55	0.11		

1. 表題

Bacillus subtilis DB9011 株の子牛における野外試験 I

2. 目的

本試験は、野外における *Bacillus subtilis* DB9011 株の子牛に対する成長促進の作用を確認し、野外における *Bacillus subtilis* DB9011 株の生菌剤としての有効性を検討する。

3. 試験実施機関

[redacted]

4. 試験責任者

[redacted]

5. 試験実施者

[redacted]

6. 試験実施場所

[redacted]

7. 試験期間

平成 6 年 10 月～平成 6 年 12 月

試験材料および方法

1. 供試薬剤と飼料への添加

生菌製剤*Bacillus subtilis* DB9011（1g中に*Bacillus subtilis* DB9011 株の耐熱胞子を 10^8個含有する乳糖製剤：Lot No. 3001-941001-02P-L）を子牛用代用乳に 10 %の割合で添加、溶解した。

2. 供試動物

茨城県大平牧場に導入された、健康状態の良好な生後 5～15 日令の乳用種雌子牛 10 頭。

3. 供試飼料

導入日から 35 日間子牛用の代用乳（「カーフトップ」全酪連製）を給与した。また導入直後から人工乳（「スーパーモーレットえづけ」くみあい配合飼料製）を給与した。

＊抗生物質の使用：下痢等の消化器系或いはその他呼吸器系の疾病の症状を示した場合、治療を目的とした抗生物質の投与を実施した。

4. 投与期間および投与方法

導入日から 35 日間投与した。

5. 飼養条件

カウハッチにて育成した。代用乳については、導入後 1 週間は 1 日 2 回朝夕 200 g づつ給与し、その後は 1 日 1 回 400 g を給与した。人工乳については、自由摂取させた。

ワクチンの接種は実施しなかった。

6. 試験区の設定

試験区の設定				日令
供試薬剤	投与方法	投与期間	供試子牛	
対照群（乳糖　10%　添加）	飼料添加	導入後 35 日間	1頭×5ハッチ	7～12
試験群（生菌製剤 10%　添加）	飼料添加	導入後 35 日間	1頭×5ハッチ	5～15

7. 観察および検査項目

(1) 体重測定

各個体について、導入日、導入後 14 日目・35 日目（試験終了時）に実施した。

(2) 飼料摂取量

代用乳を食べ残した場合には、その量を記録し給与量から差し引くことにより、摂取量を推定した。

また人工乳は、残量を毎日記録し、給与量から差し引くことにより摂取量を推定した。代用乳および人工乳の推定摂取量を飼料摂取量とした。

(3) 死亡淘汰

死亡淘汰については、毎日記録した。

(4) 一般症状

糞便の状態を毎日観察・記録した。

糞便の状態　（普通・軟便・下痢）

（試験日程）

経過日数	0(1)	7	14	21	28	35
体重測定	○		○			○
飼料残存量	←					→
死亡淘汰	←					→
一般症状	←					→

8. 統計処理

対照群と試験群の平均増体重量と平均飼料要求率について、Student の t-検定或いは Cochran-Cox の検定により統計学的解析を行った。

また各群の計量値については、Smirnov の棄却検定を行い異常値の棄却を行った。

試験成績

1. 増体重および飼料要求率

各群の増体重および飼料要求率を表 1 に示した。

導入後 15-35 日目の間の増体重においては、試験群が対照群に比べ $P<0.05$ の水準で有意に大きく、試験期間全体の増体重においても同様の結果となった。

飼料要求率については、試験群が対照群に比べ $P<0.05$ の水準で有意に小さかった。

2. 死亡淘汰

試験期間中の死亡淘汰数を表 2 に示した。

試験期間中に対照群にも試験群にも死亡淘汰例は見られなかった。

3. 一般症状

糞便の状態の観察結果を表 3 に示した。

糞便の状態については、試験群で計 5 回、対照群で計 6 回の軟便が見られ、下痢については試験群で計 3 回、対照群で計 13 回の軟便が見られ、試験群において下痢の発生頻度が小さくなる傾向が見られた。

ま と め

Bacillus subtilis DB9011 株を導入直後の子牛に 35 日間投与してその増体重および飼料要求率に及ぼす効果を検討した。

その結果、*Bacillus subtilis* DB9011 株生菌を 1 日 4×10^9個給与することにより、給与開始後 15-35 日目の間に有意な体重増加がみられ、全体の増体重も試験群が有意に大きかった。

飼料要求率については、本生菌剤の給与により有意に改善された。

また、*Bacillus subtilis* DB9011 株の投与による糞便の状態から観た一般健康状態に対する悪影響はないものと思われた。

表１　増体重と飼料要求率

	区名	体重（kg／頭）			増体重（kg／頭）			摂取量(kg/頭)	菌の投与量(個/頭)	飼料要求率
		導入時	14 日目	35 日目	0-14	15-35	合計			
対照群	1 区	44	45	59	1	14	15	25.5	—	1.70
	2 区	41	45	60	4	15	19	27.8	—	1.46
	3 区	46	52	64	6	12	18	30.6	—	1.70
	4 区	40	40	55	0	15	15	23.4	—	1.56
	5 区	44	44	51	0	7	7	20.2	—	2.89 ○
	平均値	43.0 ± 1.1	45.2 ± 1.9	57.8 ± 2.2	2.2 ± 1.2	12.6 ± 1.5	14.8 ± 2.1	25.5 ± 2.1	—	1.61 ± 0.06
試験群	1 区	41	49	67	8	18	26	33.8	1.4×10^{11}	1.30
	2 区	44	48	68	4	20	24	32.2	1.4×10^{11}	1.34
	3 区	36	40	57	4	17	21	25.8	1.4×10^{11}	1.23
	4 区	37	44	59	7	15	22	27.7	1.4×10^{11}	1.26
	5 区	38	39	57	1	18	19	23.7	1.4×10^{11}	1.25
	平均値	39.2 ± 1.5	44.0 ± 2.0	61.6 ± 2.4	4.8 ± 1.2	17.6 * ± 0.8	22.4 * ± 1.2	28.6 ± 1.9	1.4×10^{11}	1.28 * ± 0.02

＊　：P＜0.05 の水準で有意差あり。

○　：棄却値（P<0.05:smirnov test for outlying observations）

表２　死亡淘汰数

	期間内死亡淘汰（日目）		
	1-14	15-35	1-35
対照群	0／5	0／5	0／5
試験群	0／5	0／5	0／5

表３　糞便の状態

	区名	試験期間（日目）					
		1-14			15-35		
		普通	軟便	下痢	普通	軟便	下痢
対照群	１区	9/14	1/14	4/14	21/21	0/21	0/21
	２区	9/14	2/14	3/14	21/21	0/21	0/21
	３区	13/14	1/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	４区	10/14	0/14	4/14	21/21	0/21	0/21
	５区	10/14	2/14	2/14	21/21	0/21	0/21
	合計	51/70	6/70	13/70	105/105	0/105	0/105
試験群	１区	12/14	1/14	1/14	18/21	3/21	0/21
	２区	13/14	0/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	３区	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	４区	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	５区	12/14	1/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	合計	65/70	2/70	3/70	102/105	3/105	0/105

1. 表題

Bacillus subtilis DB9011 株の子牛における野外試験 II

2. 目的

本試験は、野外における *Bacillus subtilis* DB9011 株の子牛に対する成長促進の作用を確認し、野外における *Bacillus subtilis* DB9011 株の生菌剤としての有効性を検討する。

3. 試験実施機関

[redacted]

4. 試験責任者

[redacted]

5. 試験実施者

[redacted]

6. 試験実施場所

[redacted]

7. 試験期間

平成 7 年 2 月～平成 7 年 3 月

試験材料および方法

1. 供試薬剤と飼料への添加

生菌製剤*Bacillus subtilis* DB9011（1g中に*Bacillus subtilis* DB9011株の耐熱胞子を10^8個含有する乳糖製剤：Lot No. 3001-941001-02P-L）を子牛用代用乳に10％の割合で添加、溶解した。

2. 供試動物

沖縄県宇根牧場に導入された、生後7～14日令の黒毛和種雄子牛10頭。

3. 供試飼料

導入日から35日間子牛用の代用乳（「ネオベビーカーフ」協同飼料㈱製）を給与した。また導入直後から人工乳（「カーフマンナ」協同飼料㈱製）を給与した。

＊抗生物質の使用：下痢等の消化器系或いはその他呼吸器系の疾病の症状を示した場合、治療を目的とした抗生物質の投与を実施した。

4. 投与期間および投与方法

導入日から35日間投与した。

5. 飼養条件

カウハッチにて育成した。代用乳については、導入後1週間は1日2回朝夕200ｇづつ給与し、その後は1日1回400ｇを給与した。人工乳については、原則として自由に摂取させた。

ワクチンの接種は実施しなかった。

6. 試験区の設定

試験区の設定				日令
供試薬剤	投与方法	投与期間	供試子牛	
対照群（乳糖　10%　添加）	飼料添加	導入後35日間	1頭×5ハッチ	7～14
試験群（生菌製剤10%　添加）	飼料添加	導入後35日間	1頭×5ハッチ	7～14

7. 観察および検査項目

(1) 体重測定

各個体について、導入日、導入後 14 日目・35 日目（試験終了時）に実施した。

(2) 飼料摂取量

代用乳を食べ残した場合には、その量を記録し給与量から差し引くことにより、摂取量を推定した。

また人工乳は、残量を毎日記録し、給与量から差し引くことにより摂取量を推定した。代用乳および人工乳の推定摂取量を飼料摂取量とした。

(3) 死亡淘汰

死亡淘汰については、毎日記録した。

(4) 一般症状

糞便の状態を毎日観察・記録した。

糞便の状態　（普通・軟便・下痢）

（試験日程）

経過日数	0(1)	7	14	21	28	35
体重測定	○		○			○
飼料残存量	←→	←→	←→	←→	←→	←→
死亡淘汰	←→	←→	←→	←→	←→	←→
一般症状	←→	←→	←→	←→	←→	←→

8. 統計処理

対照群と試験群の平均増体重量と平均飼料要求率について、Student の t-検定或いは Cochran-Cox の検定により統計学的解析を行った。

また各群の計量値については、Smirnov の棄却検定を行い異常値の棄却を行った。

試験成績

1. 増体重および飼料要求率

各群の平均増体重および飼料要求率を表1に示した。

導入後15-35日目の間の増体重において、試験群が対照群に比べ増体重が大きくなる傾向にあり、試験期間全体での増体重については、試験群が対照群に比べ$P<0.05$の水準で有意に大きかった。

飼料要求率については、試験期間全体において試験群が対照群に比べ$P<0.05$の水準で有意に小さかった。

2. 死亡淘汰

試験期間中の死亡淘汰数を表2に示した。

試験期間中に対照群にも試験群にも死亡淘汰例は見られなかった。

3. 一般症状

糞便の状態の観察結果を表3に示した。

糞便の状態については、試験群で計6回、対照群で計6回の軟便が見られ、下痢については試験群で計9回、対照群で計9回の軟便が見られた、両群での発生頻度に相違は認められなかった。

ま と め

Bacillus subtilis DB9011株を導入直後の子牛に35日間投与してその増体重および飼料要求率に及ぼす効果を検討した。

その結果、*Bacillus subtilis* DB9011株生菌を1日4×10^9個給与することにより、給与開始後15-35日目の間に体重増加傾向がみられ、試験期間全体の増体重も試験群が有意に大きかった。

飼料要求率については、本生菌剤の給与により有意に改善された。

また、*Bacillus subtilis* DB9011株の投与による糞便の状態から観た一般健康状態に対する悪影響はないものと思われた。

表１　増体重と飼料要求率

	区名	体重（kg／頭）			増体重（kg／頭）			摂取量(kg/頭)	菌の投与量(個/頭)	飼料要求率
		導入時	14 日目	35 日目	0-14	15-35	合計			
対照群	1 区	36	35	48	−1	13	12	18.7	−	1.56
	2 区	38	39	52	1	13	14	19.6	−	1.40
	3 区	35	37	44	2	7○	9	14.4	−	1.60
	4 区	32	32	47	0	15	15	21.3	−	1.42
	5 区	39	42	56	3	14	17	23.9	−	1.41
	平均値	36.0 ± 1.2	37.0 ± 1.7	49.4 ± 2.1	0.8 ± 0.6	13.8 ± 1.0	13.4 ± 1.4	19.6 ± 1.6	−	1.48 ± 0.04
試験群	1 区	34	36	50	2	14	16	21.6	1.4×10^{11}	1.35
	2 区	39	43	65	4	22	26	33.8	1.4×10^{11}	1.30
	3 区	28	29	43	1	14	15	23.9	1.3×10^{11}	1.59○
	4 区	30	34	51	4	17	21	26.1	1.4×10^{11}	1.24
	5 区	36	34	54	−2	20	18	24.3	1.3×10^{11}	1.35
	平均値	33.4 ± 2.0	35.2 ± 2.3	52.6 ± 3.6	1.8 ± 1.1	17.4 ± 3.6	19.2 * ± 2.0	24.0 ± 1.8	1.4×10^{11}	1.31* ± 0.03

＊　：P＜0.05 の水準で有意差あり。

○　：棄却値（P<0.05:smirnov test for outlying observations）

表２　死亡淘汰数

	期間内死亡淘汰（日目）		
	1-14	15-35	1-35
対照群	0／5	0／5	0／5
試験群	0／5	0／5	0／5

表３　糞便の状態

	区名	試験期間（日目）					
		1-14			15-35		
		普通	軟便	下痢	普通	軟便	下痢
対照群	１区	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	２区	12/14	0/14	2/14	19/21	1/21	1/21
	３区	11/14	2/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	４区	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	５区	7/14	3/14	4/14	20/21	0/21	1/21
	合計	58/70	5/70	7/70	102/105	1/105	2/105
試験群	１区	13/14	0/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	２区	13/14	0/14	1/14	20/21	0/21	1/21
	３区	9/14	2/14	3/14	19/21	0/21	2/21
	４区	12/14	1/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	５区	11/14	3/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	合計	58/70	6/70	6/70	102/105	0/105	3/105

1. 表題

Bacillus subtilis DB9011 株の子牛における野外試験Ⅲ

2. 目的

本試験は、野外における *Bacillus subtilis* DB9011 株の子牛に対する成長促進の作用を確認し、野外における *Bacillus subtilis* DB9011 株の生菌剤としての有効性を検討する。

3. 試験実施機関

[redacted]

4. 試験責任者

[redacted]

5. 試験実施者

[redacted]

6. 試験実施場所

[redacted]

7. 試験期間

平成７年１月～平成７年４月

試験材料および方法

1. 供試薬剤と飼料への添加

生菌製剤*Bacillus subtilis* DB9011（1g中に*Bacillus subtilis* DB9011 株の耐熱胞子を 10^8個含有する乳糖製剤：Lot No. 3005-941019-02P-L）を子牛用代用乳に 10 %の割合で添加、溶解した。

2. 供試動物

岡山県賀陽牧場に導入された、生後 7～13 日令のＦ１雑種子牛 10 頭。

3. 供試飼料

導入日から 35 日間子牛用の代用乳（「カーフトップ」全酪連製）を給与した。また導入直後から人工乳（「スーパーモーレットえづけ」くみあい飼料製）を給与した。

＊抗生物質の使用：下痢等の消化器系或いはその他呼吸器系の疾病の症状を示した場合、治療を目的とした抗生物質の投与を実施した。

4. 投与期間および投与方法

導入日から 35 日間投与した。

5. 飼養条件

カウハッチにて育成した。代用乳については、導入後１週間は１日２回朝夕 200 g づつ給与し、その後は１日１回 400 g を給与した。人工乳については、原則として自由に摂取させた。

ワクチンの接種は実施しなかった。

6. 試験区の設定

試験区の設定				(頭)		日令
供試薬剤	投与方法	投与期間	供試子牛	雄	雌	
対照群（乳糖 10%添加）	飼料添加	導入後 35 日間	１頭×５ハッチ	3	2	7～13
試験群（生菌製 10%添加）	飼料添加	導入後 35 日間	１頭×５ハッチ	3	2	8～13

7. 観察および検査項目

(1) 体重測定

各個体について、導入日、導入後 14 日目・35 日目（試験終了時）に実施した。

(2) 飼料摂取量

代用乳を食べ残した場合には、その量を記録し給与量から差し引くことにより、摂取量を推定した。

また人工乳は、残量を毎日記録し、給与量から差し引くことにより摂取量を推定した。代用乳および人工乳の推定摂取量を飼料摂取量とした。

(3) 死亡淘汰

死亡淘汰については、毎日記録した。

(4) 一般症状

糞便の状態を毎日観察・記録した。

糞便の状態　（普通・軟便・下痢）

（試験日程）

経過日数	0(1)	7	14	21	28	35
体重測定	○		○			○
飼料残存量	←→	←→	←→	←→	←→	←→
死亡淘汰	←→	←→	←→	←→	←→	←→
一般症状	←→	←→	←→	←→	←→	←→

8. 統計処理

対照群と試験群の平均増体重量と平均飼料要求率について、Student の t-検定或いは Cochran-Cox の検定により統計学的解析を行った。

また各群の計量値については、Smirnov の棄却検定を行い異常値の棄却を行った。

試験成績

1. 増体重および飼料要求率

各群の平均増体重および飼料要求率を表 1 に示した。

35 日目における体重の平均値については、試験群が対照群に比べ試験群が対照群に比べ $P<0.01$ の水準で有意に大きかった。

増体重については、導入後 15-35 日目の間に試験群が対照群に比べ $P<0.05$ の水準で有意に大きかった。

飼料摂取量において試験群が対照群に比べ導入後 15-35 日目の間に $P<0.01$ の水準で有意に多かったが、試験全期間を通じての飼料要求率については試験群が対照群に比べ小さくなる傾向にあった。

2. 死亡淘汰

試験期間中の死亡淘汰数を表 2 に示した。

試験期間中に対照群にも試験群にも死亡淘汰例は見られなかった。

3. 一般症状

糞便の状態の観察結果を表 3 に示した。

糞便の状態については、試験群で計 3 回、対照群で計 4 回の軟便が見られ、また試験群で計 9 回、対照群で計 12 回の下痢が観察されたが、両群での発生頻度に大きな相違が認められなかった。

ま と め

Bacillus subtilis DB9011 株を導入直後の子牛に 35 日間投与してその増体重および飼料要求率に及ぼす効果を検討した。

その結果、*Bacillus subtilis* DB9011 株生菌を 1 日 4×10^9個給与することにより、給与開始後 15-35 日目の間に有意な体重増加がみられ、最終の体重も試験群が有意に大きかった。

飼料要求率については、生菌の給与による有意な改善は見られなかったものの、対照群に比べ試験群において改善される傾向が見られた。

また、*Bacillus subtilis* DB9011 株の投与による糞便の状態から観た一般健康状態に対する悪影響はないものと思われた。

表１　増体重と飼料要求率

	区名	体重（kg／頭）			増体重（kg／頭）			摂取量(kg/頭)	菌の投与量(個/頭)	飼料要求率
		導入時	14 日目	35 日目	0-14	15-35	合計			
対照群	1 区	38	40	53	2	13	15	23.9	—	1.59
	2 区	40	38	49	−2	11	9	21.0	—	2.33○
	3 区	40	41	54	1	13	14	25.9	—	1.85
	4 区	32	34	44	2	10	12	20.2	—	1.68
	5 区	33	33	47	0	14	14	23.5	—	1.68
	平均値	36.6 ± 1.7	37.2 ± 1.6	49.4 ± 1.9	0.6 ± 0.7	12.2 ± 0.7	12.8 ± 1.1	22.9 ± 1.0	—	1.70 ± 0.05
試験群	1 区	41	46	58	5	12	17	26.0	1.4×10^{11}	1.53
	2 区	47	46	63	−1	17	16	29.5	1.3×10^{11}	1.84
	3 区	39	42	60	3	18	21	31.8	1.4×10^{11}	1.51
	4 区	35	41	57	6	16	22	28.6	1.4×10^{11}	1.30
	5 区	39	39	55	0	16	16	26.7	1.2×10^{11}	1.67
	平均値	40.2 ± 2.0	42.8* ± 1.4	58.6** ± 1.4	2.6 ± 1.4	15.8* ± 1.0	18.4* ± 1.3	28.5** ± 1.0	1.3×10^{11}	1.57 ± 0.09

＊　：P＜0.05　，＊＊　：P＜0.01 の水準で有意差あり。

○　：棄却値（P<0.05:smirnov test for outlying observations）

表２　死亡淘汰数

	期間内死亡淘汰（日目）		
	1-14	15-35	1-35
対照群	0／5	0／5	0／5
試験群	0／5	0／5	0／5

表３　糞便の状態

	区名	試験期間（日目）					
		1-14			15-35		
		普通	軟便	下痢	普通	軟便	下痢
対照群	１区	13/14	1/14	0/14	20/21	1/21	0/21
	２区	13/14	0/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	３区	11/14	0/14	3/14	21/21	0/21	0/21
	４区	11/14	1/14	2/14	19/21	1/21	1/21
	５区	9/14	0/14	5/14	21/21	0/21	0/21
	合計	57/70	2/70	11/70	102/105	2/105	1/105
試験群	１区	13/14	0/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	２区	10/14	1/14	3/14	21/21	0/21	0/21
	３区	13/14	1/14	0/14	19/21	1/21	1/21
	４区	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	５区	10/14	0/14	4/14	21/21	0/21	0/21
	合計	60/70	2/70	8/70	103/105	1/105	1/105

Attachment K/ Translation

Material No. 15-2

Field Study Using Calves

Contents

Summary	1 - 3
Field study I	4 - 10
Field study II	11 - 17
Field study III	18 - 24

1. Title

Summary of Study of *Bacillus subtilis* DB9011 in Calves

2. Study objectives

The effect of *Bacillus subtilis* DB9011 on the growth enhancement using 5 calves per group at 3 testing facilities

3. Study methods

Two-way analysis of variance was conducted for 2 factors (administration of *Bacillus subtilis* DB9011 and difference in testing facilities) in order to determine the effect of DB9011 on body weight gain and mean feed conversion rate.

4. Analysis of variance results

(1) Body weight gain

Table 1 indicates results from 5 partitions each of the test substance (*Bacillus subtilis* DB9011) and control groups at each testing facility. Table 2 indicates analysis of variance results.

Administration of *Bacillus subtilis* DB9011 increased body weight gain with a significance level of less than 0.01. There were no interactions with the testing facilities.

(2) Feed conversion rate

Table 3 indicates results from 5 partitions each of the test (*Bacillus subtilis* DB9011) and control groups at each testing facility. Table 4 indicates analysis of variance results.

Administration of *Bacillus subtilis* DB9011 improved feed conversion rate with a significance level of less than 0.05. There were no interactions with the testing facilities.

5. Conclusion

Administration of *Bacillus subtilis* DB9011 significantly increased body weight gain of calves at the 3 testing facilities. There were significant improvements in feed conversion rate and a tendency towards an improvement in 2 and 1 testing facilities, respectively.

Analysis of variance indicated that these effects are not affected by differences in testing facilities, showing statistically significant effects of DB9011 on body weight gain ($p < 0.01$) and feed conversion rate ($p < 0.05$).

Addition of *Bacillus subtilis* DB9011 increases body weight gain and improves feed conversion rate in calves.

Table 1 Study results for body weight gain

Testing facilities	Control group					Test substance group				
	Partition 1	Partition 2	Partition 3	Partition 4	Partition 5	Partition 1	Partition 2	Partition 3	Partition 4	Partition 5
Ohira	15	19	18	15	7	26	24	21	22	19
Une	12	14	9	15	17	16	26	15	21	18
Kayo	15	9	14	12	14	17	16	21	22	16

Unit (kg)

Table 2 Analysis of variance results (body weight gain)

Factors	Degree of freedom	S	MS	F	P
DB9011 strain	1	300.84	300.84	24.90	<0.01
Testing facility	2	49.27	24.63	2.04	
Interactions	2	3.03	3.03	0.25	
Error between groups	24	12.08	12.08		

Table 3 Study results for feed conversion rate

Testing facilities	Control group					Test substance group				
	Partition 1	Partition 2	Partition 3	Partition 4	Partition 5	Partition 1	Partition 2	Partition 3	Partition 4	Partition 5
Ohira	1.70	1.46	1.70	1.56	2.89	1.30	1.34	1.23	1.26	1.25
Une	1.56	1.40	1.60	1.42	1.41	1.35	1.30	1.59	1.24	1.35
Kayo	1.59	2.33	1.85	1.68	1.68	1.53	1.84	1.51	1.30	1.67

Unit (kg of feed/kg of body weight)

Table 4 Analysis of variance results (feed conversion rate)

Factors	Degree of freedom	S	MS	F	P
DB9011 strain	1	0.58	0.58	5.49	<0.05
Testing facility	2	0.25	0.12	1.16	
Interactions	2	0.36	0.18	1.67	
Error between groups	24	2.55	0.11		

1. Study title

Field Study of *Bacillus subtilis* DB9011 in Calves I

2. Study objectives

To confirm the growth promotion effect of *Bacillus subtilis* DB9011 in calves and to investigate efficacy of this probiotic in the field

3. Testing facilities

[redacted]

4. Study director

[redacted]

5. Staff members engaged in study

[redacted]

6. Location of field study

[redacted]

7. Study period

October, 1994 to December, 1994

Study materials and methods

1. Test substance and addition to feed

The probiotic *Bacillus subtilis* DB9011 (a lactose formulation containing *Bacillus subtilis* DB9011-Spore at 10^8 cfu per gram; lot No.: 3001-941001-02P-L) was dissolved in milk substitute for calves at a concentration of 10%.

2. Test animals

Female dairy breed calves (n=10) at postnatal day 5 to 15 in healthy condition were transferred to Ohira Ranch in Ibaraki Prefecture.

3. Feed

Milk substitute for calves [*"Kafutoppu"*, National Federation of Dairy Cooperative Associations (Zenrakuren)] was provided for 35 days after the transfer. Immediately after transfer, artificial milk (*"Supamoretto ezuke"*, JA Kita Kyushu Kumiai Feed Mill Co., Ltd.) was also provided.

* Use of antibiotics

For animals with digestive system symptoms (diarrhea etc.) or respiratory system symptoms suggestive of disease, antibiotics were administered for treatment.

4. Administration period and methods

Administration was repeated for 35 days from the transfer day.

5. Rearing condition

Calves were reared in cow holding pens. Milk substitute (200 g) was provided twice daily in the morning and evening for 1 week from animal transfer, and thereafter 400 g once daily. Artificial milk was provided *ad libitum*.

Vaccination was not conducted.

6. Composition of study groups

Composition of study groups				Age (days)
Dosage	Administration method	Administration period	Test calves	
Control (10% lactose)	Admixed with feed	For 35 days from transfer	1 animal × 5 partitions	7 to 12
DB9011 (10% probiotic)	Admixed with feed	For 35 days from transfer	1 animal × 5 partitions	5 to 15

7. Observation and examination items

(1) Measurement of body weight

Body weight was measured on the transfer day, plus days 14 and 35 (completion of study) after transfer.

(2) Feed intake

When milk substitute remained, feed intake was estimated by subtracting the amount of milk remained from that provided.

For artificial milk, the amount remained was recorded every day, and feed intake was estimated by subtracting the amount of milk remained from that provided.

Estimated amount of milk substitute plus artificial milk was regarded as feed intake.

(3) Animal deaths

Checking for animal deaths was conducted every day.

(4) Clinical condition

Fecal condition was observed and recorded everyday.

Fecal condition (normal, soft stool, diarrhea)

Study schedule

Day of study	0 (1)	7	14	21	28	35
Measurement of body weight	○		○			○
Measurement of feed remain ing	—	—	—	—	—	—
No. of animal deaths	—	—	—	—	—	—
Clinical condition	—	—	—	—	—	—

8. Statistical analysis

Student's *t*-test or Cochran-Cox test was conducted for statistical analysis of mean body weight gain and mean feed conversion rate between the control and test substance groups.

Smirnov's rejection test was conducted to remove outliers.

Study results

1. Body weight gain and feed conversion rate

Table 1 indicates body weight gain and feed conversion rate for each group.

There was a significant increase in body weight gain in the test substance group compared to the control group from days 15 to 35 after transfer, with a significance level of less than 0.05. Similar results were obtained for body weight gain throughout the study period.

Feed conversion rate was significantly lower in the test substance group than the control group, with a significance level of less than 0.05.

2. Animal deaths

Table 2 indicates the number of animal deaths during the study period.

There were no animal deaths in the control or test substance group during the study period.

3. Clinical condition

Table 3 indicates observation results for fecal condition.

Soft stool and diarrhea were observed 5 and 3 times in the test substance group, and 6 and 13 times in the control group, respectively, showing a tendency towards lower frequency of diarrhea in the test substance group.

Conclusion

Bacillus subtilis DB9011 was administered for 35 days in calves immediately after transfer to holding pens and effect on body weight gain and feed conversion rate was investigated.

Administration of *Bacillus subtilis* DB9011 (4×10^9 cfu per day) significantly increased body weight from days 15 to 35 of administration. Body weight gain was also significantly greater in the test substance group compared to the control group.

Administration of this probiotic significantly improved feed conversion rate.

Observation of fecal condition indicated no negative effect of *Bacillus subtilis* DB9011 on clinical condition.

Table 1 Body weight gain and feed conversion rate

	Partition	Body weight (kg/animal) At transfer	Day 14	Day 35	Body weight gain (kg/animal) 0 - 14	15 - 35	Total	Feed intake (kg/animal)	Dose of bacteria (cfu per animal)	Feed conversion rate
Control group	1	44	45	59	1	14	15	25.5	—	1.70
	2	41	45	60	4	15	19	27.8	—	1.46
	3	46	52	64	6	12	18	30.6	—	1.70
	4	40	40	55	0	15	15	23.4		1.56
	5	44	44	51	0	7	7	20.2	—	2.89 °
	Mean	43.0 ± 1.1	45.2 ± 1.9	57.8 ± 2.2	2.2 ± 1.2	12.6 ± 1.5	14.8 ± 2.1	25.5 ± 2.1	—	1.61 ± 0.06
DB9011 group	1	41	49	67	8	18	26	33.8	$1.4X10^{11}$	1.30
	2	44	48	68	4	20	24	32.2	$1.4X10^{11}$	1.34
	3	36	40	57	4	17	21	25.8	$1.4X10^{11}$	1.23
	4	37	44	59	7	15	22	27.7	$1.4X10^{11}$	1.26
	5	38	39	57	1	18	19	23.7	$1.4X10^{11}$	1.25
	Mean	39.2 ± 1.5	44.0 ± 2.0	61.6 ± 2.4	4.8 ± 1.2	17.6* ± 0.8	22.4* ± 1.2	28.6 ± 1.9	$1.4X10^{11}$	1.28* ± 0.02

*: Significant difference, $p < 0.05$

0: Outliers ($p < 0.05$, Smirnov's test)

Table 2 Number of animal deaths

	Incidence of animal deaths during the study period (day)		
	1-14	15-35	1-35
Control group	0／5	0／5	0／5
DB9011 group	0／5	0／5	0／5

Table 3 Fecal condition

	Partition No.	Study day (day)					
		1 - 14			15 - 35		
		Normal	Soft stool	Diarrhea	Normal	Soft stool	Diarrhea
Control group	1	9/14	1/14	4/14	21/21	0/21	0/21
	2	9/14	2/14	3/14	21/21	0/21	0/21
	3	13/14	1/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	4	10/14	0/14	4/14	21/21	0/21	0/21
	5	10/14	2/14	2/14	21/21	0/21	0/21
	Total	51/70	6/70	13/70	105/105	0/105	0/105
DB9011 group	1	12/14	1/14	1/14	18/21	3/21	0/21
	2	13/14	0/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	3	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	4	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	5	12/14	1/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	Total	65/70	2/70	3/70	102/105	3/105	0/105

1. Study title

Field Study of *Bacillus subtilis* DB9011 in Calves II

2. Study objectives

To confirm the growth promotion effect of *Bacillus subtilis* DB9011 in calves and to investigate efficacy of this probiotic in the field

3. Testing facilities

[redacted]

4. Study director

[redacted]

5. Staff members engaged in study

[redacted]

Naomi Tsumura (veterinary practitioner), Nosoko, Ishigaki, Okinawa

6. Location of field study

[redacted]

7. Study period

February, 1995 to March, 1995

Study materials and methods

1. Test substance and addition to feed

The probiotic *Bacillus subtilis* DB9011 (a lactose formulation containing *Bacillus subtilis* DB9011-Spore at 10^8 cfu per gram; lot No.: 3001-941001-02P-L) was dissolved in milk substitute for calves at a concentration of 10%.

2. Test animals

Japanese Black calves (n=10) at postnatal day 7 to 14 were transferred to Une Ranch in Okinawa Prefecture.

3. Feed

Milk substitute for calves (*"Neobebikafu"*, Kyodo Shiryo Co., Ltd.) was provided for 35 days after transfer. Immediately after transfer, artificial milk (*"Kafumanna"*, Kyodo Shiryo Co., Ltd.) was provided.

* Use of antibiotics

For animals with digestive system symptoms (diarrhea etc.) or respiratory system symptoms suggestive of disease, antibiotics were administered for treatment.

4. Administration period and methods

Administration was repeated for 35 days from the transfer day.

5. Rearing condition

Calves were reared in cow holding pens. Milk substitute (200 g) was provided twice daily in the morning and evening for 1 week from animal transfer, and thereafter 400 g once daily. Artificial milk was provided *ad libitum*.

Vaccination was not conducted.

6. Composition of study groups

Composition of study groups				Age (days)
Dosage	Administration method	Administration period	Test calves	
Control (10% lactose)	Admixed with feed	For 35 days from transfer	1 animal × 5 partitions	7 - 14
DB9011 (10% probiotic)	Admixed with feed	For 35 days from transfer	1 animal × 5 partitions	7 - 14

7. Observation and examination items

(1) Measurement of body weight

Body weight was measured on the transfer day, plus days 14 and 35 (completion of study) after transfer.

(2) Feed intake

When milk substitute remained, feed intake was estimated by subtracting the amount of milk remained from that provided.

For artificial milk, the amount remained was recorded every day, and feed intake was estimated by subtracting the amount of milk remained from that provided.

Estimated amount of milk substitute plus artificial milk was regarded as feed intake.

(3) Animal deaths

Checking for animal deaths was conducted every day.

(4) Clinical condition

Fecal condition was observed and recorded everyday.

Fecal condition (normal, soft stool, diarrhea)

Study schedule

Day of study	0 (1)	7	14	21	28	35
Measurement of body weight	○		○			○
Measurement of feed remaining	—	—	—	—	—	—
No. of animal deaths	—	—	—	—	—	—
Clinical condition	—	—	—	—	—	—

8. Statistical analysis

Student's *t*-test or Cochran-Cox test was conducted for statistical analysis of mean body weight gain and mean feed conversion rate between the control and test substance groups.

Smirnov's rejection test was conducted to remove outliers.

Study results

1. Body weight gain and feed conversion rate

Table 1 indicates body weight gain and feed conversion rate for each group.

There was a tendency towards an increase in body weight gain in the test substance group compared to the control group from days 15 to 35 after transfer. Body weight gain was statistically greater in the test substance group than control group with a significance level of less than 0.05.

Feed conversion rate was significantly lower in the test substance group than control group with a significance level of less than 0.05 throughout the study period.

2. Animal deaths

Table 2 indicates the number of animal deaths during the study period.

There were no animal deaths in the control or the test substance group during the study period.

3. Clinical condition

Table 3 indicates observation results for fecal condition.

Soft stool and diarrhea were observed 6 and 9 times in both the study and control groups, respectively, with no significant difference in incidence rates between the 2 groups.

Conclusion

Bacillus subtilis DB9011 was administered for 35 days in calves immediately after transfer to holding pens, then effect on body weight gain and feed conversion rate were investigated.

Administration of *Bacillus subtilis* DB9011 (4×10^9 cfu per day) significantly increased body weight from days 15 to 35 of administration. Body weight gain was also significantly greater in the test substance group than control group throughout the study period.

Administration of this probiotic significantly improved feed conversion rate.

Observation of fecal condition indicated no negative effect of *Bacillus subtilis* DB9011 on clinical condition.

Table 1 Body weight gain and feed conversion rate

	Partition No.	Body weight (kg/animal) At transfer	Day 14	Day 35	Body weight gain (kg/animal) 0 - 14	15 - 35	Total	Feed intake (kg/animal)	Dose of bacteria (cfu per animal)	Feed conversion rate
Control group	1	36	35	48	-1	13	12	18.7	—	1.56
	2	38	39	52	1	13	14	19.6	—	1.40
	3	35	37	44	2	7°	9	14.4	—	1.60
	4	32	32	47	0	15	15	21.3	—	1.42
	5	39	42	56	3	14	17	23.9	—	1.41
	Mean	36.0 ± 1.2	37.0 ± 1.7	49.4 ± 2.1	0.8 ± 0.6	13.8 ± 1.0	13.4 ± 1.4	19.6 ± 1.6	—	1.48 ± 0.04
DB9011 group	1	34	36	50	2	14	16	21.6	$1.4X10^{11}$	1.35
	2	39	43	65	4	22	26	33.8	$1.4X10^{11}$	1.30
	3	28	29	43	1	14	15	23.9	$1.3X10^{11}$	1.59 °
	4	30	34	51	4	17	21	26.1	$1.4X10^{11}$	1.24
	5	36	34	54	-2	20	18	24.3	$1.3X10^{11}$	1.35
	Mean	33.4 ± 2.0	35.2 ± 2.3	52.6 ± 3.6	1.8 ± 1.1	17.4 ± 3.6	19.2* ± 2.0	24.0 ± 1.8	$1.4X10^{11}$	1.31 * ± 0.03

*: Significant difference, $p < 0.05$

0: Outliers ($p < 0.05$, Smirnov's test)

Table 2 Number of animal deaths

	Incidence of animal deaths during the study period (day)		
	1-14	15-35	1-35
Control group	0／5	0／5	0／5
DB9011 group	0／5	0／5	0／5

Table 3 Fecal condition

	Partition No.	Study day (day)					
		1 - 14			15 - 35		
		Normal	Soft stool	Diarrhea	Normal	Soft stool	Diarrhea
Control group	1	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	2	12/14	0/14	2/14	19/21	1/21	1/21
	3	11/14	2/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	4	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	5	7/14	3/14	4/14	20/21	0/21	1/21
	Total	58/70	5/70	7/70	102/105	1/105	2/105
DB9011 group	1	13/14	0/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	2	13/14	0/14	1/14	20/21	0/21	1/21
	3	9/14	2/14	3/14	19/21	0/21	2/21
	4	12/14	1/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	5	11/14	3/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	Total	58/70	6/70	6/70	102/105	0/105	3/105

1. Study title

Field Study of *Bacillus subtilis* DB9011 in Calves III

2. Study objectives

To confirm the growth promotion effect of *Bacillus subtilis* DB9011 in calves and to investigate efficacy of this probiotic in the field

3. Testing facilities

[redacted]

4. Study director

[redacted]

5. Staff members engaged in study

[redacted]

6. Location of field study

[redacted]

7. Study period

January, 1995 to April, 1995

Study materials and methods

1. Test substance and addition to feed

The probiotic *Bacillus subtilis* DB9011 (a lactose formulation containing *Bacillus subtilis* DB9011-Spore at 10^8 cfu per gram; lot No.: 3005-941019-02P-L) was dissolved in milk substitute for calves at a concentration of 10%.

2. Test animals

F1 crossbreed calves (n=10) at postnatal day 7 to 13 were transferred to Kayo Ranch in Okayama Prefecture.

3. Feed

Milk substitute for calves [*"Kafutoppu"*, National Federation of Dairy Cooperative Associations (Zenrakuren)] was provided for 35 days after the transfer. Immediately after transfer, artificial milk (*"Supamoretto eduke"*, JA Kita Kyushu Kumiai Feed Mill Co., Ltd.) was also provided.

* Use of antibiotics

For animals with digestive system symptoms (diarrhea etc.) or respiratory system symptoms suggestive of disease, antibiotics were administered for treatment.

4. Administration period and methods

Administration was repeated for 35 days from the transfer day.

55. Rearing conditions

Calves were reared in cow holding pens. Milk substitute (200 g) was provided twice daily in the morning and evening for 1 week from animal transfer, and thereafter 400 g once daily. Artificial milk was provided *ad libitum*.

Vaccination was not conducted.

6. Composition of study groups

Composition of study groups				(N)		Age (days)
Dosage	Administration method	Administration period	Test calves	Male	Female	
Control (10% lactose)	Admixed with feed	For 35 days from transfer	1 animal × 5 partitions	3	2	7 - 13
DB9011 (10% probiotic)	Admixed with feed	For 35 days from transfer	1 animal × 5 partitions	3	2	8 - 13

7. Observation and examination items

(1) Measurement of body weight

Body weight was measured on the transfer day, plus days 14 and 35 (completion of study) after transfer.

(2) Feed intake

When milk substitute remained, feed intake was estimated by subtracting the amount of milk remained from that provided.

For artificial milk, the amount remained was recorded every day, and feed intake was estimated by subtracting the amount of milk remained from that provided.

Estimated amount of milk substitute plus artificial milk was regarded as feed intake.

(3) Animal deaths

Checking for animal deaths was conducted every day.

(4) Clinical condition

Fecal condition was observed and recorded everyday.

Fecal condition (normal, soft stool, diarrhea)

Study schedule

Day of study	0 (1)	7	14	21	28	35
Measurement of body weight	○		○			○
Measurement of feed remaining	—	—	—	—	—	—
No. of animal deaths	—	—	—	—	—	—
Clinical condition	—	—	—	—	—	—

8. Statistical analysis

Student's *t*-test or Cochran-Cox test was conducted for statistical analysis of mean body weight gain and mean feed conversion rate between the control and test substance groups.

Smirnov's rejection test was conducted to remove outliers.

Study results

1. Body weight gain and feed conversion rate

Table 1 indicates body weight gain and feed conversion rate for each group.

There was a significant increase in mean body weight for the test substance group compared to the control group on day 35 of transfer, with a significance level of less than 0.01.

Body weight gain was greater in the test substance group, with a significance level of 0.05 from day 15 to 35 after transfer.

Feed consumption was significantly greater in the test substance group than the control group, with a significance level of less than 0.01 from days 15 to 35 after transfer; however, there was a tendency towards a decrease in feed conversion rate throughout the study period for the test substance group compared to the control group.

2. Animal deaths

Table 2 indicates the number of animal deaths during the study period.

There were no animal deaths in the control or test substance group during the study period.

3. Clinical condition

Table 3 indicates observation results for fecal condition.

Soft stool and diarrhea were observed 3 and 9 times in the test substance group, and 4 and 12 times in the control group, respectively, with no difference in incidence rates between the 2 groups.

Conclusion

Bacillus subtilis DB9011 was administered for 35 days in calves immediately after transfer to holding pens, then effect on body weight gain and feed conversion rate were investigated.

Administration of *Bacillus subtilis* DB9011 (4×10^9 cfu per day) significantly increased body weight from days 15 to 35 of administration. Final body weight was also significantly greater in the test substance group.

Although administration of this probiotic did not significantly improve feed conversion rate, there was a tendency towards an improvement in this parameter in the test substance group compared to the control group.

Observation of fecal condition indicated no negative effect of *Bacillus subtilis* DB9011 on clinical condition.

Table 1 Body weight gain and feed conversion rate

	Partition No.	Body weight (kg/animal) At transfer	Day 14	Day 35	Body weight gain (kg/animal) 0 - 14	15 - 35	Total	Feed intake (kg/animal)	Dose of bacteria (cfu per animal)	Feed conversion rate
Control group	1	38	40	53	2	13	15	23.9	—	1.59
	2	40	38	49	-2	11	9	21.0	—	2.33 °
	3	40	41	54	1	13	14	25.9	—	1.85
	4	32	34	44	2	10	12	20.2	—	1.68
	5	33	33	47	0	14	14	23.5	—	1.68
	Mean	36.6 ± 1.7	37.2 ± 1.6	49.4 ± 1.9	0.6 ± 0.7	12.2 ± 0.7	12.8 ± 1.1	22.9 ± 1.0	—	1.70 ± 0.05
DB9011 group	1	41	46	58	5	12	17	26.0	$1.4X10^{11}$	1.53
	2	47	46	63	-1	17	16	29.5	$1.3X10^{11}$	1.84
	3	39	42	60	3	18	21	31.8	$1.4X10^{11}$	1.51
	4	35	41	57	6	16	22	28.6	$1.4X10^{11}$	1.30
	5	39	39	55	0	16	16	26.7	$1.2X10^{11}$	1.67
	Mean	40.2 ± 2.0	42.8* ± 1.4	58.6** ± 1.4	2.6 ± 1.4	15.8* ± 1.0	18.4* ± 1.3	28.5 ** ± 1.0	$1.3X10^{11}$	1.57 ± 0.09

*: Significant difference, $p < 0.05$ **: Significant difference, $p < 0.01$

0: Outliers ($p < 0.05$, Smirnov's test)

Table 2 Number of animal deaths

	Incidence of animal deaths during the study period (day)		
	1-14	15-35	1-35
Control group	0／5	0／5	0／5
DB9011 group	0／5	0／5	0／5

Table 3 Fecal condition

	Partition No.	Study day (day)					
		1 - 14			15 - 35		
		Normal	Soft stool	Diarrhea	Normal	Soft stool	Diarrhea
Control group	1	13/14	1/14	0/14	20/21	1/21	0/21
	2	13/14	0/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	3	11/14	0/14	3/14	21/21	0/21	0/21
	4	11/14	1/14	2/14	19/21	1/21	1/21
	5	9/14	0/14	5/14	21/21	0/21	0/21
	Total	57/70	2/70	11/70	102/105	2/105	1/105
DB9011 group	1	13/14	0/14	1/14	21/21	0/21	0/21
	2	10/14	1/14	3/14	21/21	0/21	0/21
	3	13/14	1/14	0/14	19/21	1/21	1/21
	4	14/14	0/14	0/14	21/21	0/21	0/21
	5	10/14	0/14	4/14	21/21	0/21	0/21
	Total	60/70	2/70	8/70	103/105	1/105	1/105

ASCA CORPORATION

Hiranomachi Yachiyo Bldg. 1-8-13 Hiranomachi, Chuo-ku, Osaka 541-0046, Japan
Tel: 06-6202-6272, Fax: 06-6202-6271

証明書番号：No. 050876-5
October 28, 2005

株式会社バイオ医療情報
新事業開発部
残間 雅秋　様

株式会社アスカコ-ポレ-ション
541-0046 大阪市中央区平野町 1-8-13
平野町八千代ビル

翻訳証明書
Certificate of Translation

貴社から依頼のあった以下の文書を、原文にもとづき、知り得る知識の範囲で、忠実かつ正確に翻訳したことを証明します。

This is to certify that the following document has been translated faithfully and accurately to the best of our knowledge and ability.

依頼文書タイトル: 子牛を用いた野外応用試験
Translated title: Field Study Using Calves

翻訳完了日：2005 年 10 月 5 日
Date: October 5, 2005

責任者:

Signature

Eiko Ishioka
President