

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2015年5月7日(07.05.2015)



(10) 国際公開番号  
WO 2015/064109 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 33/00 (2006.01) A61P 15/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/005506
- (22) 国際出願日: 2014年10月30日(30.10.2014)
- (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 2013-227297 2013年10月31日(31.10.2013) JP
- (71) 出願人: 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(TOKYO METROPOLITAN GERIATRIC HOSPITAL AND INSTITUTE OF GERONTOLOGY) [JP/JP]; 〒1730015 東京都板橋区栄町3番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 山下 直樹(YAMASHITA, Naoki) [JP/JP]; 〒2510025 神奈川県藤沢市鵜沼石上1-2-1 0山下湘南夢クリニック内 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 中田 久美子(NAKATA, Kumiko); 〒2510025 神奈川県藤沢市鵜沼石上1-2-1 0山下湘南夢クリニック内 Kanagawa (JP). 大澤 郁朗(OHSAWA, Ikuroh); 〒1730015 東京都板橋区栄町3番2号地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目2番19号アドレシビル6階 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: SPERM-MOTILITY ENHANCER

(54) 発明の名称: 精子運動性改善剤

(57) Abstract: This invention addresses the problem of providing a sperm-motility enhancer—in particular, a forward-sperm-motility enhancer—for use on reduced-motility sperm in male infertility treatment. A gaseous sperm-motility enhancer comprising a gas that contains hydrogen molecules in the amount of at least 1% (v/v)—for example, a gas that contains hydrogen molecules in an amount between 45% and 55% (v/v), inclusive—or a liquid sperm-motility enhancer comprising a liquid such as normal saline, a nutrient broth, or a buffer solution containing hydrogen molecules in the amount of at least 1% of the saturation solubility thereof—for example, a liquid in which hydrogen molecules have been dissolved by means of bubbling—is prepared. The gaseous sperm-motility enhancer can enhance the motility of sperm by making hydrogen gas and either semen or a dilution thereof contact each other in a gaseous phase. The liquid sperm-motility enhancer can enhance the motility of sperm when used as a washing solution or diluent for semen.

(57) 要約: 男性不妊治療における運動性の低下した精子を対象とした精子運動性改善剤、特に精子前進運動性改善剤を提供することを課題とした。水素分子を1(v/v)%以上含む気体、例えば水素分子を45~55(v/v)%含む気体からなる気体状精子運動性改善剤や、水素分子を飽和溶解度の1%以上含む生理食塩水、培養液、緩衝液等の液体、例えば水素分子をバブリングにより溶解した液体からなる液体状精子運動性改善剤を調製する。気体状精子運動性改善剤は、精液又はその希釈液と水素ガスとを気相状態で接触させることにより、精子の運動性を改善することができる。液体状精子運動性改善剤は、精液の洗浄液、希釈液として用いることにより、精子の運動性を改善することができる。

WO 2015/064109 A1

## 明 細 書

**発明の名称：精子運動性改善剤**

### 技術分野

[0001] 本発明は、水素分子を有効成分として含む、精子の運動性、特に前進運動性や前進運動する精子の移動距離を向上させ、受精率を高める精子運動性改善剤に関する。

### 背景技術

[0002] WHO（世界保健機関）によると、不妊原因のうち、「男性のみ」に原因がある場合が24%であり、男女双方に原因がある場合を加えると、約50%のケースで男性が関係している。しかしながら、日本の不妊治療は女性側に偏っており、男性側の対策はほとんどなされていないのが現状である。

[0003] 男性不妊の原因は、射精された精液量が少ない場合を精液減少症、精子の数が少ない場合を乏精子症、精液中に精子が全く存在しない場合を無精子症と分類される。また、精子の運動性が低い場合は、精子無力症と診断される。しかしながら、なぜ精子数が減少し、運動率が低下するのか、その原因が特定できるのはむしろ少数で、男性不妊の6割は原因不明とされる。

[0004] 無精子症は更に二つに区別され、閉塞性無精子症と非閉塞性無精子症に分類される。閉塞性無精子症は、精巣では精子が正常に形成されているが、精巣上体や精管などの異常で、精子が射出精液中に出てこない病態である。一方、非閉塞性無精子症は、精巣自体の造精機能に障害があるために、精子ができない病態である。この診断には、採血によるゴナドトロピン（FSH、LHなど）の血中濃度異常、精巣容量および弾力の低下、輸精管閉塞がないことの確認が重要である。血清ゴナドトロピン値はその時点での造精機能の指標となるため、無精子症でFSHが正常値範囲内であれば、精子は造られているのに射出精液に出てこないことを意味し、閉塞性無精子症と診断される。FSHが非常に低い場合や非常に高い場合は、非閉塞性無精子症と診断される。

- [0005] 非閉塞性無精子症で、精巢生検で精子が確認される場合は未熟な精子や奇形精子が多く、そのほとんどが不動精子である。このような不動精子を用いて顕微授精を行っても、妊娠率は非常に低くなる。そのため、精子の生存性をHOS test [hypo-osmotic swelling test] で確認してから顕微授精を行っている施設もある [Jeyendran RS, et al., J Reprod Fertil. 1984;70:219-28.]。しかしながら、低浸透圧の培養液に精子を浸漬するHOS testにより、精子の生存の有無を確認できても、その精子を顕微授精に使用することは技術的に困難である。精巢内精子に限らず、射出精液中の精子でも運動性がない場合は、顕微授精による受精・胚発生率・移植後の妊娠率が極端に低いという報告から [Vandervorst M, et al., Hum Reprod. 1997;12:2429-33.]、臨床の現場では、運動性のある正常形態精子を選択し顕微授精に用いられている。
- [0006] また、生殖治療では凍結保存された精子が日常的に用いられている。しかし、凍結処理は精子のミトコンドリアの損傷を含む精子の形態の変化を引き起こすことが報告されており、特に、精子の運動性に大きな影響を与えることが報告されている [O'Connell M, et al., Hum Reprod. 2002; 17: 704-9.] [Boitrelle F, et al. J Androl. 2012; 33: 1371-8.]。凍結処理精子の低運動性を活性化するための、臨床における有効なアプローチは報告されていない。
- [0007] 精子の運動性の原動力である鞭毛運動は、モータータンパク質であるダイニン [Gibbons IR, et al., Science, 1965;149:424-426.] とレール役である細胞骨格の微小管を構成するチューブリン [Mohri H, Nature, 1968;217:1053-54.] の働きでおこる。鞭毛運動の基本がダイニンの働きによる微小管同士への滑りにあることや [Summers KE, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971;68:3092-3096.]、微小管の滑りによって鞭毛の屈曲が生じることは [Shingyouji, et al., Nature, 1977;265:269-270.]、すでに1970年代に明らかにされているが、屈曲が鞭毛の根元で生じる仕組みや屈曲波が伝わる仕組みは未だ解明されていない。鞭毛運動はATPによって支えられている

。主にミトコンドリアで作られたATPは拡散により鞭毛の各部分で使われていると考えられている [Steeghs, et al., Biochem. Biophys. Acta., 1995;30:130-138.]。一方、嫌気性の条件下、例えば、マウスやウシの子宮や卵管内での精子では、酸素を必要としない解糖系で造られたATPに依存しているとの報告もある [Mukai, et al., Biol. Reprod., 2004;71:540-547.]。

[0008] ミトコンドリアでのATP産生には酸素が必要である。酸素を必要とする細胞の一つとして、精子も過酸化水素、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素種の影響を受けることが知られている [Aitken, et al., J. Reprod. Fertil., 1987;81:459-469.]。スーパーオキシドアニオンなどは、精子の超活性化や受精能獲得といった役割を担っているが、作用箇所や作用期間などによって働きが異なっている。一方、精漿には活性酸素種を取り除くカタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) などが含まれ、過剰な活性酸素種を除去している。この為、不妊治療に用いるため精漿を洗浄除去した精子は、活性酸素種に曝されやすくなる。

[0009] 酸化ストレスは、強い酸化力を持つ活性酸素種やフリーラジカルが過剰に生じることにより起こる。なかでも強力なヒドロキシラジカルは、生体に様々な悪い影響をもたらすことが知られており、抗酸化物を用いてヒドロキシラジカルを消去する試みや、その効果が検討されてきた。例えば、ヒドロキシラジカルなど毒性の高いラジカルを選択的に還元し失活させる水素分子の性質を利用した検討では、脳における虚血・再灌流障害の抑制や、アテローム性動脈硬化症の抑制を示した実験動物モデルのほか [非特許文献1]、脂質代謝の改善 [特許文献1]、水素含有薬剤を肺の炎症治療に用い得ること [特許文献2]、健康促進効果を狙った水素ガスの体内吸入方法 [特許文献3] などの報告がある。また、精子の運動性に関しては、ミオイノシトールを精子懸濁液に添加することでミトコンドリア機能の回復を促し、精子の運動性が向上したと報告されているものの [非特許文献2]、体外受精あるいは顕微授精の治療に使用可能な、採取当日に射出された運動性を有する精子

の検討であるため、不動精子の臨床使用の問題に対する解決策にはなり得ない。さらに、水素分子と精子運動性の関連については何ら報告がない。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0010] 特許文献1：再表2008-026785号公報  
特許文献2：特表2000-517311号公報  
特許文献3：特開2005-087257号公報

### 非特許文献

- [0011] 非特許文献1：大澤郁朗著 「水素分子医学の現状と展望」基礎老化研究 35(1)；1-7, 2011  
非特許文献2：Condorelli, et. al., Urology. 2012 Jun;79(6):1290-5.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0012] 本発明の課題は、男性不妊治療における運動性の低下した精子を対象とした精子運動性改善剤、特に精子前進運動性改善剤を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

- [0013] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。その過程において、不妊治療用に採取された後に余剰として破棄される、射精から5日以上経過し著しく運動機能の低下した精子を被検体として、高濃度に水素分子を含む気体を精子懸濁液と接触処置したところ、精子の前進運動能回復と前進移動距離の飛躍的向上を見いだした。また、水素分子を溶解した培養液に、運動機能の低下した精子を接触させたところ、前進運動性が回復することを見いだした。さらに、水素分子を溶解した培養液で凍結保存した精子を洗浄したところ、前進運動性が回復することを見いだした。本発明はこれらの知見に基づき完成する至ったものである。

- [0014] すなわち、本発明は以下に示すとおりである。

(1) 水素分子を1(v/v)%以上含む気体からなる精子運動性改善剤、

- (2) 水素分子を1 (v/v)%以上含む気体が、水素分子を45～55 (v/v)%含む気体であることを特徴とする上記(1)記載の精子運動性改善剤、
- (3) 気体が、水素ガスと酸素ガスと炭酸ガスと窒素ガスとの混合ガスであることを特徴とする上記(1)又は(2)記載の精子運動性改善剤、
- (4) 水素分子を飽和溶解度の1%以上含む液体からなる精子運動性改善剤、
- (5) 水素分子をバブリングにより溶解した液体であることを特徴とする上記(4)記載の精子運動性改善剤、
- (6) 液体が、水素分子を含む生理食塩水、培養液又は緩衝液であることを特徴とする上記(4)又は(5)記載の精子運動性改善剤、
- (7) 容器に収納されていることを特徴とする上記(4)～(6)のいずれか記載の精子運動性改善剤、
- (8) 精子の前進運動性を改善することを特徴とする上記(1)～(7)のいずれか記載の精子運動性改善剤、
- (9) 精子が凍結保存した精子であることを特徴とする上記(1)～(8)のいずれか記載の精子運動性改善剤、
- (10) 上記(1)～(9)のいずれか記載の精子運動性改善剤を、生体外で精子と接触させることを特徴とする精子の運動性を改善する方法、
- (11) 精子運動性改善剤を複数回精子と接触させることを特徴とする上記(10)記載の方法、
- (12) 気体状又は液体状の精子運動性改善剤の調製における水素分子の使用、
- (13) 精子の運動性を改善するための水素分子、
- (14) 水素分子を含む気体の導入口と導入気体の排出口を備えた、精子の運動性を改善するための処置容器に関する。

### 発明の効果

[0015] 本発明によると、現在確たる対策のない運動性を有さない不動精子に対して、前進運動能を回復させる新たな治療法が提供される。また、凍結保存に

より運動性が低下した精子の前進運動能を回復させることが可能となり、精子採取による負担を軽減することが可能となる。本発明によると、前進運動性を有する精子を使用した場合に比べて、極端に妊娠率が劣ることを承知の上で、運動性のない精子を顕微授精に用いざるを得ない男性側を原因とする不妊治療の症例、とりわけ、精巣内精子など運動機能のない精子や、精子として未熟な円形精子細胞を治療に使用せざるを得ない男性不妊患者を含む治療中の患者にとって、妊娠率の向上が期待される有力な技術がもたらされる。

### 図面の簡単な説明

- [0016] [図1]本発明の精子運動性改善剤で処置するための容器の写真である。
- [図2]本発明の精子運動性改善剤で処置するための装置の概略図である。
- [図3] (a) 採取後5日以上経過した精子のH<sub>2</sub>処置及びN<sub>2</sub>処置後の前進運動精子率を示した図である。(b) 採取後5日以上経過したのちH<sub>2</sub>処置した精子における、処置時間と前進運動精子率の関係を示した図である。
- [図4]採取後5日以上経過した精子のH<sub>2</sub>処置及びN<sub>2</sub>処置前後の、前進運動精子率を検体別に示した図である。
- [図5]採取後5日以上経過したのちH<sub>2</sub>処置及びN<sub>2</sub>処置した精子における、前進運動精子の1秒間あたりの移動距離を示した図である。
- [図6]採取後5日以上経過した精子にH<sub>2</sub>処置及びN<sub>2</sub>処置を行うにあたり、一度目の処置から24時間後に再処置した精子における、前進運動精子率の推移を経時的に示した図である。
- [図7] (a) 無処置、(b) H<sub>2</sub>処置、及び(c) N<sub>2</sub>処置をそれぞれ行った精子を、ミトコンドリアの膜電位依存色素を用いて共染色した後、レーザー走査型共焦点顕微鏡で撮影した画像である。(d) ミトコンドリア膜電位依存色素で染色した精子の蛍光強度をImageJを用いて半定量化したグラフである。
- [図8]凍結融解処理を行った精子を、異なるH<sub>2</sub>濃度で処置した際の前進運動精子率を検体別に示した図である。(a) は前進運動精子率50%以上の患

者より得た検体、(b)は前進運動精子率50%未満の患者より得た検体が対象である。

### 発明を実施するための形態

- [0017] 本発明の精子運動性改善剤としては、水素分子を1(v/v)%以上含む気体、又は水素分子を飽和溶解度の1%以上含む液体からなり、精子を水素分子に接触処置させることができるものであれば特に制限されず、本発明の精子運動性改善剤によると、男性不妊患者由来の精子における運動性、とりわけ前進運動性を回復せしめ、顕微授精による妊娠成立の可能性を高めることができる。
- [0018] 本発明において、精子運動性改善とは、日本泌尿器科学会が監修した精液検査標準化ガイドライン(金原出版、東京、2003年)又は、WHO精液検査ラボマニュアル第5版(世界保健機構刊行、高度生殖医療技術研究所訳、2010年)に準拠した精液検査・精子運動率の測定法により、100個程度の精子を、A:速度が速く、直進する精子、B:速度が遅い、あるいは直進性が良好でない精子、C:頭部あるいは尾部の動きを認めるが、前進運動していない精子、D:非運動性の不動精子の4項目に分類し、原則上述の検査を2~3回繰り返した平均値で示される精子運動率% $(A + B + C / A + B + C + D)$ が有意に向上することを意味する。また本発明において、前進運動精子率%とは、 $A + B / A + B + C + D$ で示される。
- [0019] 上記精子運動率の測定方法としては、液化した精液10 $\mu$ lを、望ましくは37 $^{\circ}$ Cの保温性を維持しながら計算盤に載せカバーガラスで覆い、200又は400倍率の検鏡下にて、5カ所以上の視野中100個程度の精子を上記4項目に分類し、これを原則2~3回繰り返す平均値の算出方法を好ましく例示することができる。また、上記精液に代えて、生理食塩水、培養液、緩衝液等で適宜濃度に希釈した精液を用いることができる。
- [0020] 上記精子としては、上記精液検査標準化ガイドライン又は、WHO精液検査ラボマニュアルに記載のサンプル採取法に準拠した方法で採集されることが好ましく、具体的には、最低2日間以上、最高7日間以内の禁欲期間を経

た男性患者より、好ましくは専用の精液採取場所にて、マスターベーションにより、清潔なガラス又はプラスチック製広口容器中に採取された、一生産工程分からなる、射出されて4時間以内、より好ましくは3時間以内、特に好ましくは2時間以内、最も好ましくは1時間以内の精液サンプル中精子（射出精子）や、精巣内精子採取術又は顕微鏡下精巣内精子採取術によって採取された精子（精巣内精子）を好ましく例示することができる。

また、これら方法で採取後の精子を凍結処理し保存した精子が、男性患者の精子採取における負担を軽減する観点で特に好ましく、本発明の効果を享受することができる。凍結処理の条件は特に制限されることはないが、例えば、採取した精子をテストヨークバッファー [Refrigeratin Medium-TEST Yolk Buffer, Irvine Scientific、カリフォルニア、米国] などの凍結保存用緩衝液に懸濁した後クライオチューブに分注し、液体窒素下にて凍結する方法を挙げることができる。精子を解凍する際には、例えば、精子が分注されているクライオチューブを37℃の温水中で加熱し融解する方法を挙げることができる。凍結融解した精子は、凍結処理を行っていない精子と同様に本発明の精子の運動性を改善する方法に用いることが可能である。

[0021] 上記精子の由来としては、ヒトを最も好適に例示することができるが、その他にも、通常、実験動物、家畜、ペットとして一般的に使用される哺乳動物、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ネコ、イヌ、サルなどを例示することができる。ウシ、ウマ、ブタといった大型動物の場合は、人工膣法、電気刺激法、精管膨大部マッサージ法、手掌圧迫法などの方法により採取された精子を好適に挙げることができる。

[0022] 本発明の水素分子を1 (v/v)%以上含む気体からなる精子運動性改善剤としては、水素ガス濃度の下限が、好ましくは10 (v/v)%以上、より好ましくは20 (v/v)%以上、さらに好ましくは30 (v/v)%以上、中でも40 (v/v)%以上含む混合ガスを挙げることができ、他方水素ガス濃度の上限は、安全性を考慮して決定され、密閉条件下で静電気が発生しないように配慮された安全な条件下においては、100 (v/v)%であっても差し支えないが、実用面を考

慮すると、水素ガス濃度80(v/v)%以下、好ましくは60(v/v)%以下であり、例えば、水素ガス濃度45～55(v/v)%の混合ガスを特に好適に挙げることができる。かかる混合ガス中の水素ガス以外のガス成分としては、酸素ガス、二酸化炭素ガス、不活性ガス等を挙げることができ、不活性ガスとしては、窒素ガス、ヘリウムガス、アルゴンガス等を挙げることができるが、安価でかつ空気の組成物である窒素ガスが好ましい。水素ガス以外のガス成分の含有量は、当業者が任意に設定することができるが、水素ガスを50%、窒素ガスを25%、酸素ガスを20%、二酸化炭素ガスを5%の混合ガスが好ましい。

[0023] 水素分子を飽和溶解度の1%以上含む液体からなる精子運動性改善剤としては、水素ガス又は水素含有混合ガスを、バブリング等により、生理食塩水、培養液、緩衝液等に溶解した液体を挙げることができる。水素分子の溶解度は水素分圧が0.101MPa(1気圧)20℃の場合、1000gの水に対して0.00162g(約1.6ppm、0.8mM)であるが、過飽和状態まで水素ガスが溶解した水素溶解量大きいものが好ましい。50%の水素分子を含む水素含有混合ガスで液体をバブリングすると約0.4mMとなる。上記生理食塩水としては、塩化ナトリウムを0.9(w/v)%含有する食塩水であれば特に制限されず、上記培養液としては、体外受精用に調製された培養液が望ましく、ヒト胚専用の培養液として開発された、クリベージメディウム[SAGE(登録商標)Cleavage Medium CooperSurgical, Inc.、コネチカット、米国]に10%の血漿タンパク質分画(PPF: plasma protein fraction)の添加されたもの、スパームウォッシングメディウム[Irvine Scientific、カリフォルニア、米国]、ファティリゼイション(HTF)メディウム[SAGE In-Vitro Fertilization、コネチカット、米国]、Ferticult(登録商標)Sperm Washing Flushing Medium[FertiPro N.V.、ベールネム、ベルギー]を好適に挙げることができる。また、上記緩衝液としては、ヒト卵管液組成培養液[human tubal fluid culture medium(HTF)]に20mM HEPES[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]を添加する

ことで緩衝作用を持たせた改変HTF液や、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を挙げることができる。また、上記培養液や緩衝液に10%加熱ヒト血漿たん白〔プラズマプロテインフラクション（PPF）；バクスター株式会社、カリフォルニア、米国〕を加えたものを最も好ましく挙げることができ、上記PPFは、エタノール分画、加熱処理、S/D処理などにより不活化されているものが望ましい。

[0024] 上記本発明の液体状精子運動性改善剤は、水素分子を溶解した液体、好ましくは滅菌された液体が収容された容器（ボトル）として提供することができる。かかる容器入り液体状精子運動性改善剤の製法としては、水素非透過性の素材で形成された容器に水素ガス溶解液体を充填する方法や、液体が収容された水素透過性の素材で形成された容器を、水素ガス雰囲気下に維持する方法を挙げることができる。水素ガス雰囲気下に維持する方法として、例えば、液体が収容された水素透過性の素材で形成されたボトルを、水素非透過性の素材で形成された包装パックに収容する方法を挙げることができる。

[0025] 上記水素非透過性の素材としては、アルミニウム（缶、箔）、アルミニウム合金（缶、箔）、エポキシ樹脂を含浸させた高強度カーボン繊維をアルミニウム製ライナーの全面に巻きつけたカーボンFRP、合成樹脂フィルムにアルミ箔をラミネート（圧着）したアルミパウチ、紙とポリエチレンの間にアルミ箔を挟んだラミネート等を挙げることができる。また、水素透過性の素材としては、PET（ポリエチレンテレフタレート・ポリエステル）、ポリエチレン、ポリプロピレン、エチレン-酢酸ビニル共重合体、環状オレフィンコポリマー等を挙げることができる。

[0026] 本発明の精子の運動性を改善する方法としては、上記本発明の気体状精子運動性改善剤又は液体状の精子運動性改善剤と精子とを生体外で接触させる方法であれば特に制限されず、精子と気体状精子運動性改善剤とを接触させるには、水素分子を含む気体の導入口と導入気体の排出口を備えた（精子の運動性を改善するための）処置容器内に、薄層状態の精子懸濁液を載置し、気体状精子運動性改善剤を所定時間、例えば1～60分間、流し続けること

で容器内の空気を気体状精子運動性改善剤で置換後、精子懸濁液を容器内に所定時間、例えば10～120分間、静置してガス平衡することで、行うことができる。また、精子と液体状精子運動性改善剤とを接触させるには、液体状精子運動性改善剤を精液の洗浄液、希釈液として使用することにより行うことができる。精子運動性改善剤と精子との接触は、所定間隔、例えば12～48時間間隔で複数回行うこともできる。精子運動性改善剤による再処置により、精子の運動能を再度回復することができる。

[0027] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。以下の実施例において使用した精子は、山下湘南夢クリニックにて不妊治療中の患者の同意のもと、施設内治験審査委員会（IRB）の承認を受けた研究目的で使用された。

## 実施例 1

[0028] 1. 精子採取と調整

3日以上7日以内の禁欲期間を経た男性患者から、マスターベーションにより射出精子を採取した。射出から4時間以内にクリニックに搬送された精液を、37.5℃、5%二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）、5%酸素（O<sub>2</sub>）、90%窒素（N<sub>2</sub>）でガス平衡を24時間行った1.5mlの10%PPF添加のSAGE（登録商標）Cleavage Medium（CooperSurgical, Inc.、コネチカット、米国）にて希釈を行った。15mlの遠心管に80%Sperm Filter、続いて60%Sperm Filterの上に希釈精液を重層し、600g×15分の条件で遠心分離を行った。遠心後、上澄みを捨て、沈殿したペレットを6mlの10%PPF添加のCleavage Mediumにて希釈し、400g、5分の条件で遠心分離を行った。上澄みを捨て、沈殿したペレットに10%PPF添加のCleavage Mediumを添加し、体外受精に使用する場合には、1×10<sup>6</sup>個/mlの濃度に希釈し、顕微授精用の場合には、最終容量が0.05mlになるように調整した。

以下実施例2～8においての検討には、体外受精や顕微授精に使用した後の残余の精子懸濁液を、室温で5日以上保管したものを用いた。

## 実施例 2

### [0029] 2. 気体状精子運動性改善剤への処置

精子懸濁液を無処置群、5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>、50%水素(H<sub>2</sub>)、25%N<sub>2</sub>からなる混合ガス処置群(以下、H<sub>2</sub>処置群)、5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>、75%N<sub>2</sub>からなる混合ガス処置群(以下、N<sub>2</sub>処置群)の3群に分け、各群における精子の運動率(前進運動率及び非前進運動率)と不動率の比較を行った。混合ガスは、MIGM Incubation Gas Mixer(株式会社トッケン、千葉、日本)と流量計により、5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>のガスを調整し、5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>の流量が安定したことを確認した後、H<sub>2</sub>ガスのポンペを開き、密閉したフラスコ内の水にH<sub>2</sub>ガスを通気し、フラスコ内で、H<sub>2</sub>ガスを含む混合ガスを作製した。フラスコからつながれたルートを実クリルボックスに接着し、密閉した実クリルボックス内にH<sub>2</sub>ガスを含む混合ガスを通気した。実クリルボックスに通気されているかどうかの確認のため、もう一つのルートを実水の入ったビーカーに挿入した。そのルートからビーカー内の水にバブリングが起ること通気されていることを確認した。N<sub>2</sub>ガスについても同様に行い、すべて室温で行った。1008ディッシュに100μlの精子懸濁液を滴下し、混合ガス通気前に実クリルボックスに入れた。H<sub>2</sub>処置群及びN<sub>2</sub>処置群それぞれ40分間処置した。40分経過後、それぞれの精子懸濁液をピペティングによりよく混和し、数μlをマクラーチャンバーに滴下し、精子濃度、前進運動精子数、非前進運動精子数、不動精子数を目視で測定した。精子懸濁液をそのまま使用した無処置群についても同様に精子濃度、前進運動精子数、非前進運動精子数、不動精子数を目視で測定した。以上の検討では、採取から5日以上経過し、運動性がほぼ消失している精子を被検体として用いており、無処置群での前進運動率が15%を超える検体を除外した検体について、1検体を3つの処置群に分け、各処置群につき2回ずつ測定した。すなわち、各サンプルにつき、視野中の総精子数に対する前進運動性を有する精子数の割合を前進運動精子率とし、前進運動性を示さないものの運動性を有する(鞭毛の動いている)精子数の割合を非前進運動精子率

とし、運動性を示さない精子数の割合を不動精子率とした。

### 実施例 3

#### [0030] 3. 前進運動精子率測定結果

各処置群における前進運動精子率を図3(a)に示す。図3(a)において、無処置群における前進運動精子率は平均3.6%、及びN<sub>2</sub>処置群における前進運動精子率は平均7.7%であるのに対し、H<sub>2</sub>処置群における前進運動精子率は16.8%と上昇していたことがわかる。次に、検体ごとの運動性の回復についてみると、H<sub>2</sub>処置群及びN<sub>2</sub>処置群において30検体中12検体(40%)は、前進運動性の回復が見られなかった。H<sub>2</sub>処置群における前進運動性の回復しない12検体のうち、H<sub>2</sub>処置により非前進運動精子(前進しないが鞭毛の動いているもの)3検体(25%)を確認した。H<sub>2</sub>処置を行っても精子の運動性が回復しない精子は、無処理の時点で、精子の鞭毛が直線ではなく、渦巻き状の形態を示すものがほとんどであったのに対し、H<sub>2</sub>処置後に運動性が回復した前進運動精子及び非前進運動精子は鞭毛が直線であった。渦巻き状の形態の精子はP I (Propidium Iodide) による蛍光染色で死滅精子であると確認した。

前進運動性の回復した18検体中17検体(94%)において、H<sub>2</sub>処置群はN<sub>2</sub>処置群より長い移動距離(高い前進性)を示した(P<0.01)。H<sub>2</sub>処置群がN<sub>2</sub>処置群より高い前進性を示した17検体中6検体(35%)では、無処置群とN<sub>2</sub>処置群において前進運動の回復が見られず、H<sub>2</sub>処置群でのみ前進運動が回復した。

[0031] また、検体別前進運動精子率を図4に示す。前進運動精子率15%未満の患者より得た17検体を対象としたH<sub>2</sub>処置により、16検体において前進運動精子率が上昇したことがわかる。これに対し、N<sub>2</sub>処置群では4検体において前進運動精子率が上昇したが、この4検体はいずれもH<sub>2</sub>処置によっても前進運動精子率が上昇した検体であった。また、H<sub>2</sub>処置群の前進運動精子率は平均11%だったのに対し、N<sub>2</sub>処置群では平均3.6%だった。これより、H<sub>2</sub>処置により精子の運動性の改善が効果的に行われることが示された。

## 実施例 4

### [0032] 4. 前進運動精子率測定結果

10人の患者の採取5日目の各条件で処置した精子における、10秒間の前進運動における移動距離を動画撮影により測定した。その後、撮影した動画をCASAシステム(NIH)(Computer assisted sperm analysis using ImageJ; description of necessary components and use of free software)による精子の前進運動により移動距離を測定した。結果を図5に示す。10人の患者において、無処置群(コントロール)、H<sub>2</sub>処置群、及びN<sub>2</sub>処置群の平均移動距離を比較したところ、有意差はみられなかった(P=0.2193)。これは、H<sub>2</sub>処置が精子の前進速度に影響を与えないことを示している。また、H<sub>2</sub>処置群の精子の1秒間あたりの移動距離が最も長いという結果が示された。

## 実施例 5

### [0033] 5. 各H<sub>2</sub>処置時間における前進運動精子率測定結果

患者別のH<sub>2</sub>処置時間と前進運動精子率とを比較した。5分、30分、60分のH<sub>2</sub>処置時間における患者別前進運動精子率の比較結果を図3(b)に示す。H<sub>2</sub>処置時間5分では、コントロール(無処置群)に対する前進運動精子率はむしろ低下の傾向を示した。H<sub>2</sub>処置時間30分又は60分では、約70%の検体で前進運動率がコントロールより上昇した。これより、30分のH<sub>2</sub>処置により精子運動性は十分に改善されることが示された。

## 実施例 6

### [0034] 6. H<sub>2</sub>処置及びH<sub>2</sub>再処置による運動精子数の経時的推移

10人の患者の採取5日目の精子における、H<sub>2</sub>処置(30分)による前進運動精子率の経時的推移(30分後、60分後)を図6に示す。30分間のH<sub>2</sub>処置後、10分を経過すると懸濁液10 $\mu$ l中の水素は消失するが、30分~150分後であっても、精子の前進運動性に大きな変化はみられなかったことから、H<sub>2</sub>処置したのちに運動機能を回復した精子をそのまま顕微授精に使用することが可能であることがわかる。H<sub>2</sub>処置(30分)から24時間

後にH<sub>2</sub>再処置（30分）を行うと、H<sub>2</sub>処置した精子は24時間後でも運動性を有していた。

## 実施例 7

### [0035] 7. 液体状精子運動性改善剤への処置

精子を洗浄する培養液6mlに、水素を含む混合ガス（5%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 40%N<sub>2</sub>, 50%H<sub>2</sub>）を10分間バブリングして液体状精子運動性改善剤を作製した。水素をバブリングにより培養液へ溶解させた場合、ユニセンス社の水素電極を用いて測定した結果、水素濃度はバブリングから10分後に300μMで平衡に達した。その後、静置して水素濃度を測定すると緩やかに減少し、3時間後に50μMとなった。上記の様に作製した培養液を用いて精子を洗浄し、運動性の変化を検討したところ、洗浄前は前進運動精子率が0%であったのに対し、水素を含む混合ガスバブリング培養液による5分間の洗浄処置により前進運動精子率が47%に増加した。また洗浄過程において、400g×5分間の遠心により、5分後の水素濃度は150μMとなり、再度遠心すると100μMまで減少した。このことから、遠心処置は培養液から水素を分散させる要素となることがわかったが、図3（b）に示すように5分間の気体状精子運動性改善剤での処置では精子の運動性が回復しなかったのに対して、液体状精子運動性改善剤による5分間の洗浄処置では精子の運動性を亢進させることが示された。

## 実施例 8

### [0036] 8. H<sub>2</sub>処置によるミトコンドリア膜電位の増加

無処置群、H<sub>2</sub>処置群、及びN<sub>2</sub>処置群の精子懸濁液を用い、精子のミトコンドリアを2μM テトラメチルローダミンメチルエステル（TMRM; Life Technologies、カリフォルニア、米国）及び対照として2μM MitoTrackerグリーン（MTG; Life Technologies、カリフォルニア、米国）で30分間共染色した。MTGの蛍光は膜電位とは無関係であるが、TMRMの蛍光はミトコンドリアの膜電位に依存することが知られている。染色した精子はレーザー走査型共焦点顕微鏡（Leica、ヴェッツラー、独国）を用いて可視化

した。また、精子の生存率はPIによる蛍光染色にて確認した。

[0037] 共染色の結果を図7(a)～(c)に示す。(a)は無処置群、(b)はH<sub>2</sub>処置群、及び(c)はN<sub>2</sub>処置群である。また、微分干渉による像をDIC (Differential interference contrast) として示した。バーは10μmである。(d)は、TMRM染色した精子の蛍光強度をImageJを用いて半定量化したグラフである。無処置群及びN<sub>2</sub>処置群と比較し、H<sub>2</sub>処置群は強いTMRM蛍光強度を示した(P<0.001)。精子の運動性は、ATP含有量に依存する。H<sub>2</sub>処置群の精子は、ミトコンドリア膜電位に依存するTMRMの蛍光強度が他群よりも増加することが示された。これより、H<sub>2</sub>処置により精子のミトコンドリアの機能が高まり、運動性が高まることが示唆された。

## 実施例 9

[0038] 9. 凍結融解精子のH<sub>2</sub>処置による運動性の向上

3日以上7日以内の禁欲期間を経た男性患者から、マスターベーションにより射出精子を採取した。射出から4時間以内にクリニックに搬送された精液を、Cleavage MediumとTEST-yolk buffer (TYB; Irvine Scientific、カリフォルニア、米国)とを等量混合した溶液に懸濁し、クライオチューブに分注した。得られたクライオチューブは、まず5分間窒素蒸気に暴露した後、液体窒素下にて凍結保存した。解凍時には、クライオチューブを37℃の温水中で加熱した後、クライオチューブ内の精子懸濁液を4本のバイアルに分注した。

H<sub>2</sub>で飽和させたCleavage Mediumと、5%CO<sub>2</sub>で平衡化させたCleavage Mediumを混合し、精子洗浄培地を作製した。精子洗浄培地は、H<sub>2</sub>飽和Cleavage Mediumの混合割合が50%、75%、及び100%のものを用意した。分注した精子懸濁液は精子洗浄培地で5分間洗浄した後、精子運動性を測定した。

[0039] 凍結融解精子の運動性の測定結果を図8にて示す。(a)は前進運動精子率50%以上の患者より得た6検体、(b)は前進運動精子率50%未満の

患者より得た15検体を対象としている。(a)において、H<sub>2</sub>処理をしなかった際の前進運動精子率の平均は27.5%だったが、H<sub>2</sub>50%洗浄培地処理後は61.3%、H<sub>2</sub>75%洗浄培地処理後は71.0%、及びH<sub>2</sub>100%洗浄培地処理後は70.0%にそれぞれ増加した。(b)においては、H<sub>2</sub>処理をしなかった際の前進運動精子率の平均は61.3%だったが、H<sub>2</sub>50%洗浄培地処理後は41.2%、H<sub>2</sub>75%洗浄培地処理後は40.8%、及びH<sub>2</sub>100%洗浄培地処理後は31.4%にそれぞれ増加した。

これより、H<sub>2</sub>処置により効果的かつ大幅に、凍結融解精子の低運動性を改善することが示された。

### 産業上の利用可能性

[0040] 本発明は、男性不妊治療において死滅精子と判断される、不動精子に対する精子運動性改善剤を提供する。精子無力症に代表される症例において、本発明により不動精子の運動機能を回復せしめ、顕微授精-胚移植療法による妊娠率を向上させるものと期待される。

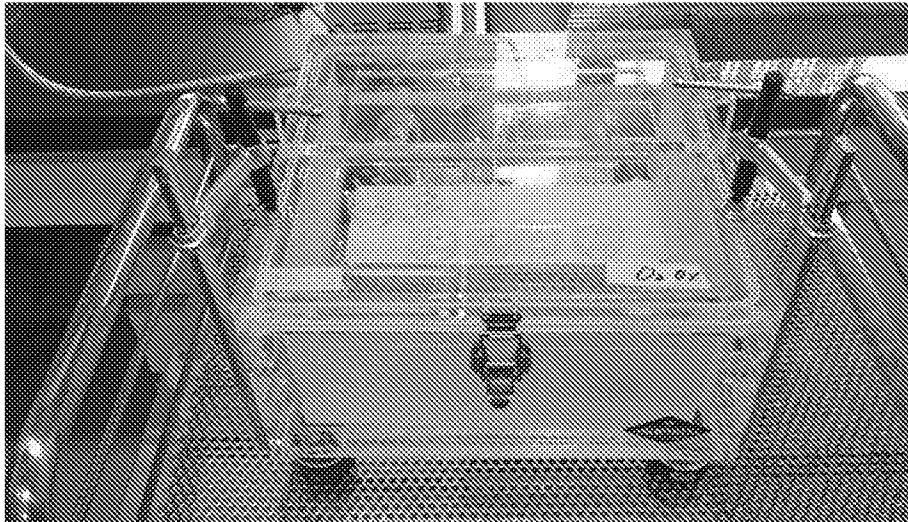
### 符号の説明

- [0041]
- 1 精子運動性改善剤処置容器
  - 2 ガス混合機
  - 3 水素ガス容器
  - 4 水素ガス以外のガス容器
  - 5 配管

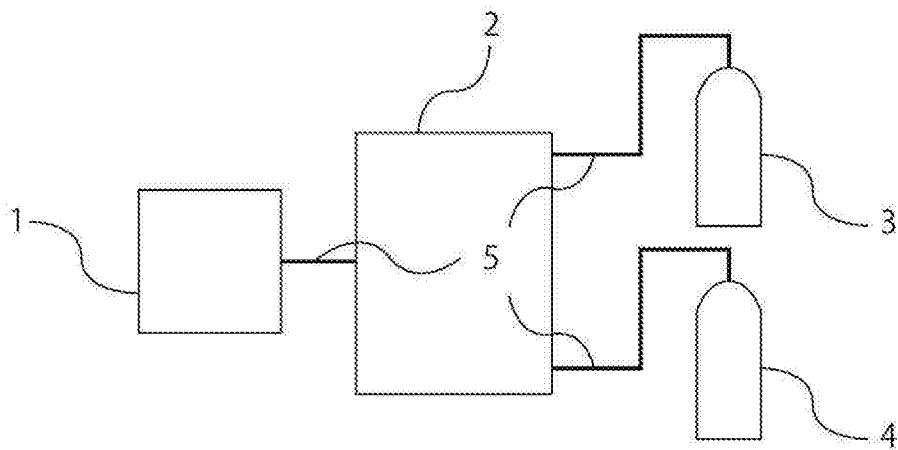
## 請求の範囲

- [請求項1] 水素分子を1 (v/v)%以上含む気体からなる精子運動性改善剤。
- [請求項2] 水素分子を1 (v/v)%以上含む気体が、水素分子を45～55 (v/v)%含む気体であることを特徴とする請求項1記載の精子運動性改善剤。
- [請求項3] 気体が、水素ガスと酸素ガスと炭酸ガスと窒素ガスとの混合ガスであることを特徴とする請求項1又は2記載の精子運動性改善剤。
- [請求項4] 水素分子を飽和溶解度の1%以上含む液体からなる精子運動性改善剤。
- [請求項5] 水素分子をバブリングにより溶解した液体であることを特徴とする請求項4記載の精子運動性改善剤。
- [請求項6] 液体が、水素分子を含む生理食塩水、培養液又は緩衝液であることを特徴とする請求項4又は5記載の精子運動性改善剤。
- [請求項7] 容器に収納されていることを特徴とする請求項4～6のいずれか記載の精子運動性改善剤。
- [請求項8] 精子の前進運動性を改善することを特徴とする請求項1～7のいずれか記載の精子運動性改善剤。
- [請求項9] 精子が凍結保存した精子であることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の精子運動性改善剤。
- [請求項10] 請求項1～9のいずれか記載の精子運動性改善剤を、生体外で精子と接触させることを特徴とする精子の運動性を改善する方法。
- [請求項11] 精子運動性改善剤を複数回精子と接触させることを特徴とする請求項10記載の方法。
- [請求項12] 気体状又は液体状の精子運動性改善剤の調製における水素分子の使用。
- [請求項13] 精子の運動性を改善するための水素分子。
- [請求項14] 水素分子を含む気体の導入口と導入気体の排出口を備えた、精子の運動性を改善するための処置容器。

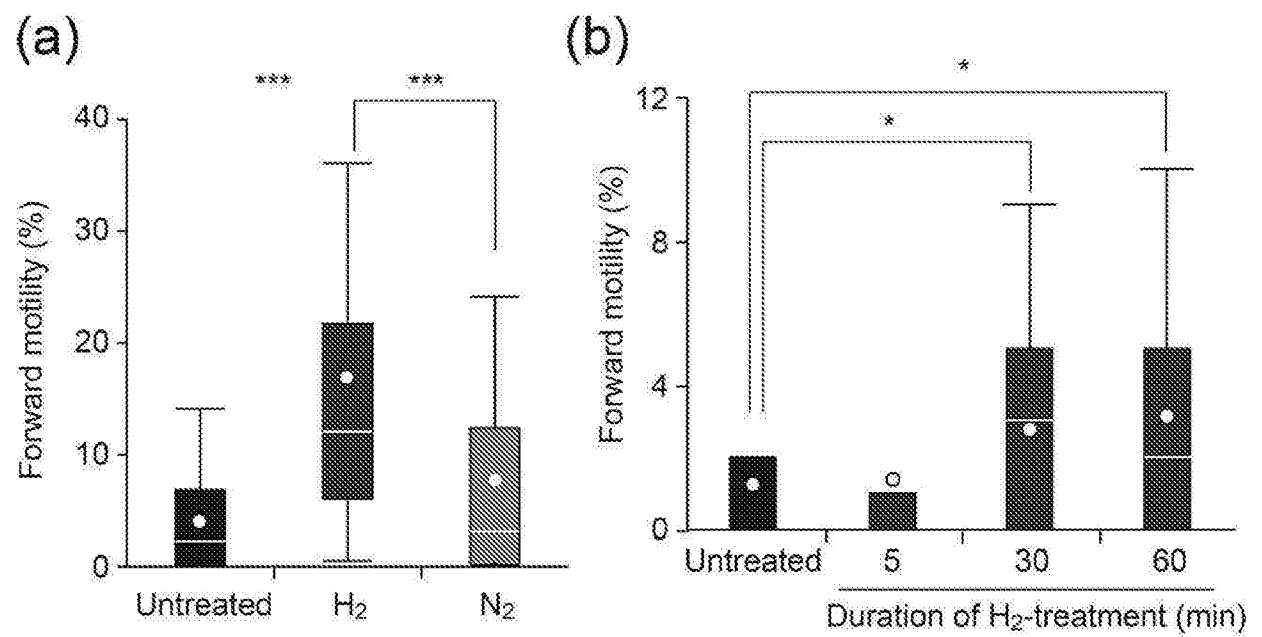
[図1]



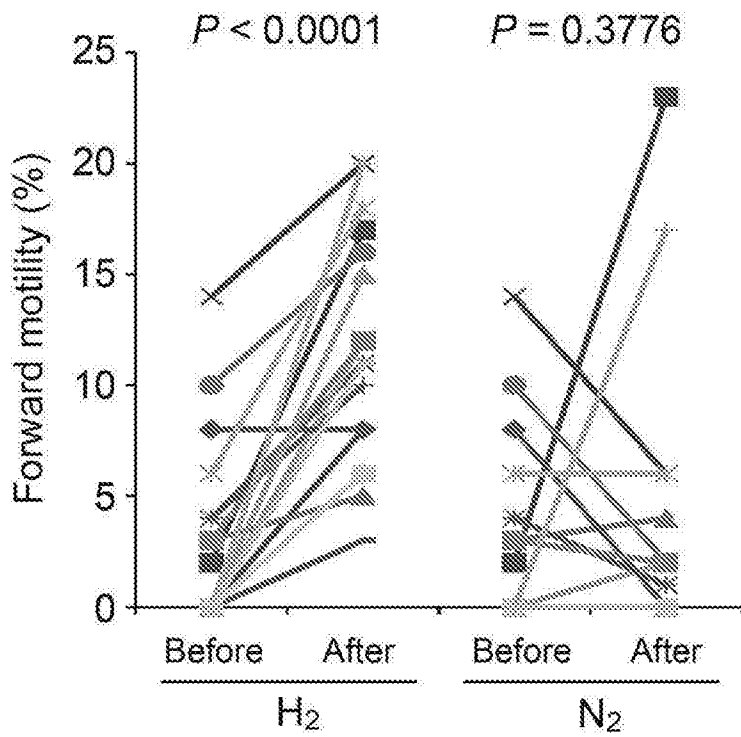
[図2]



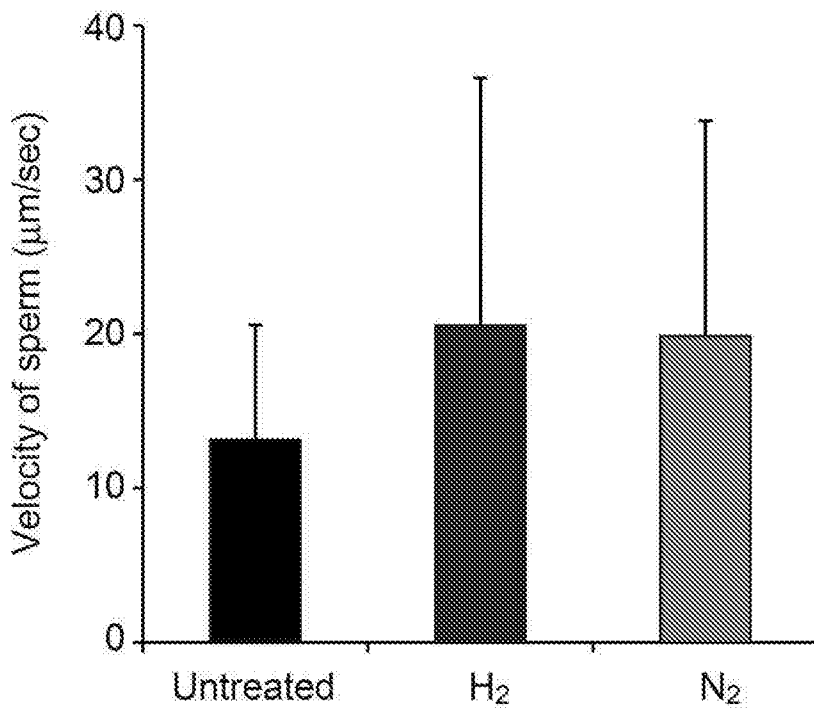
[図3]



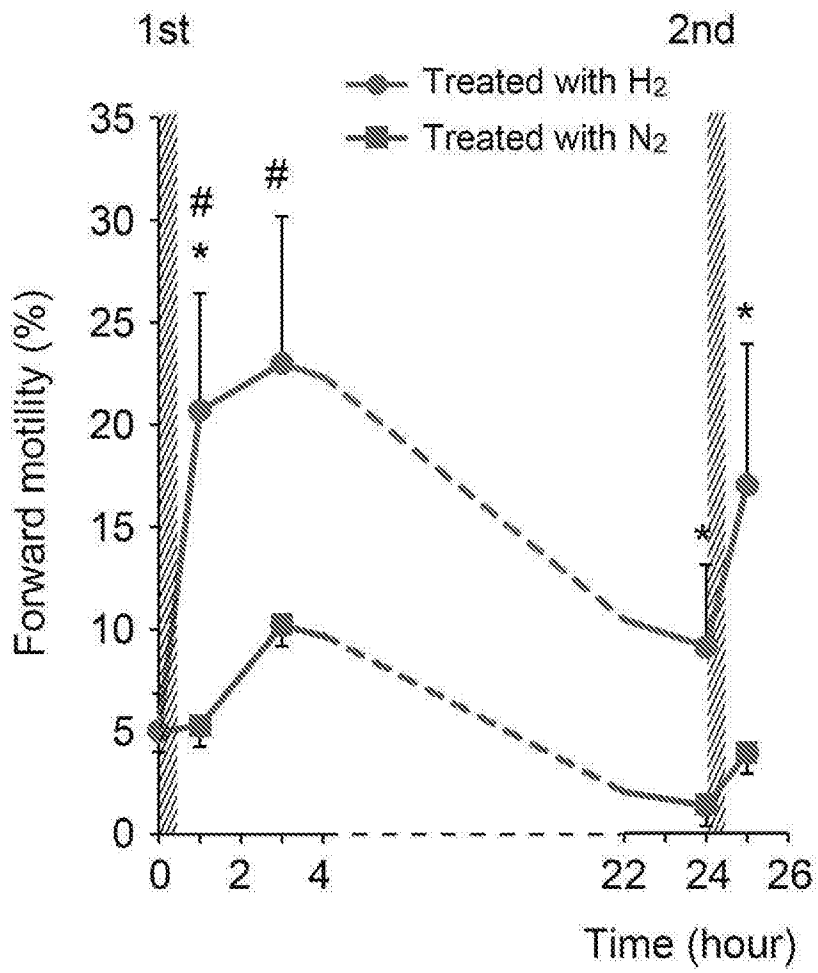
[図4]



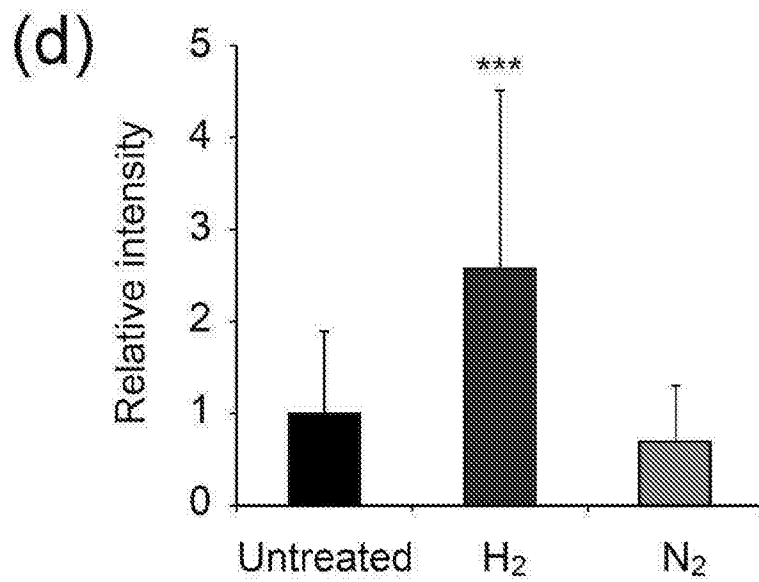
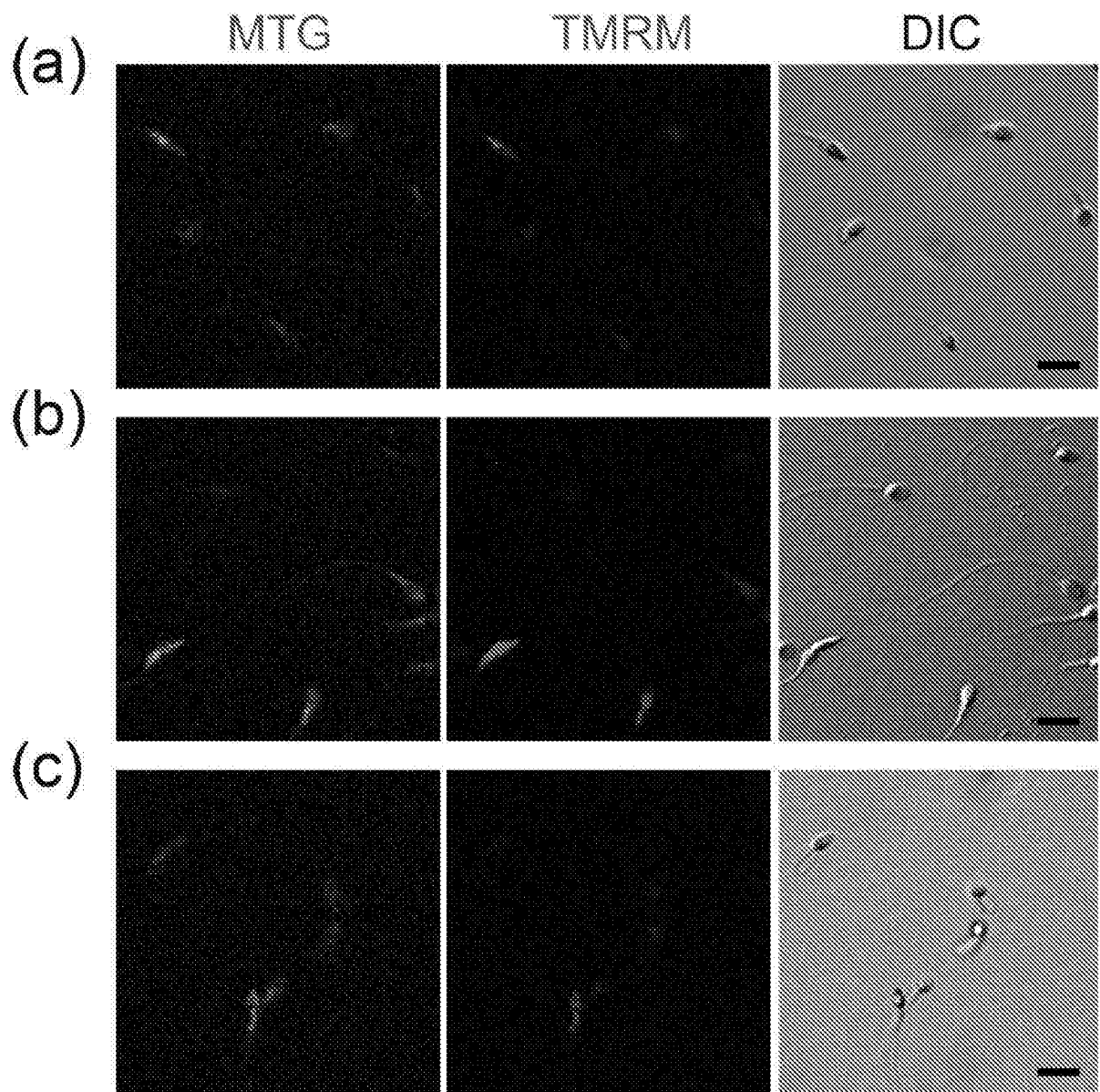
[図5]



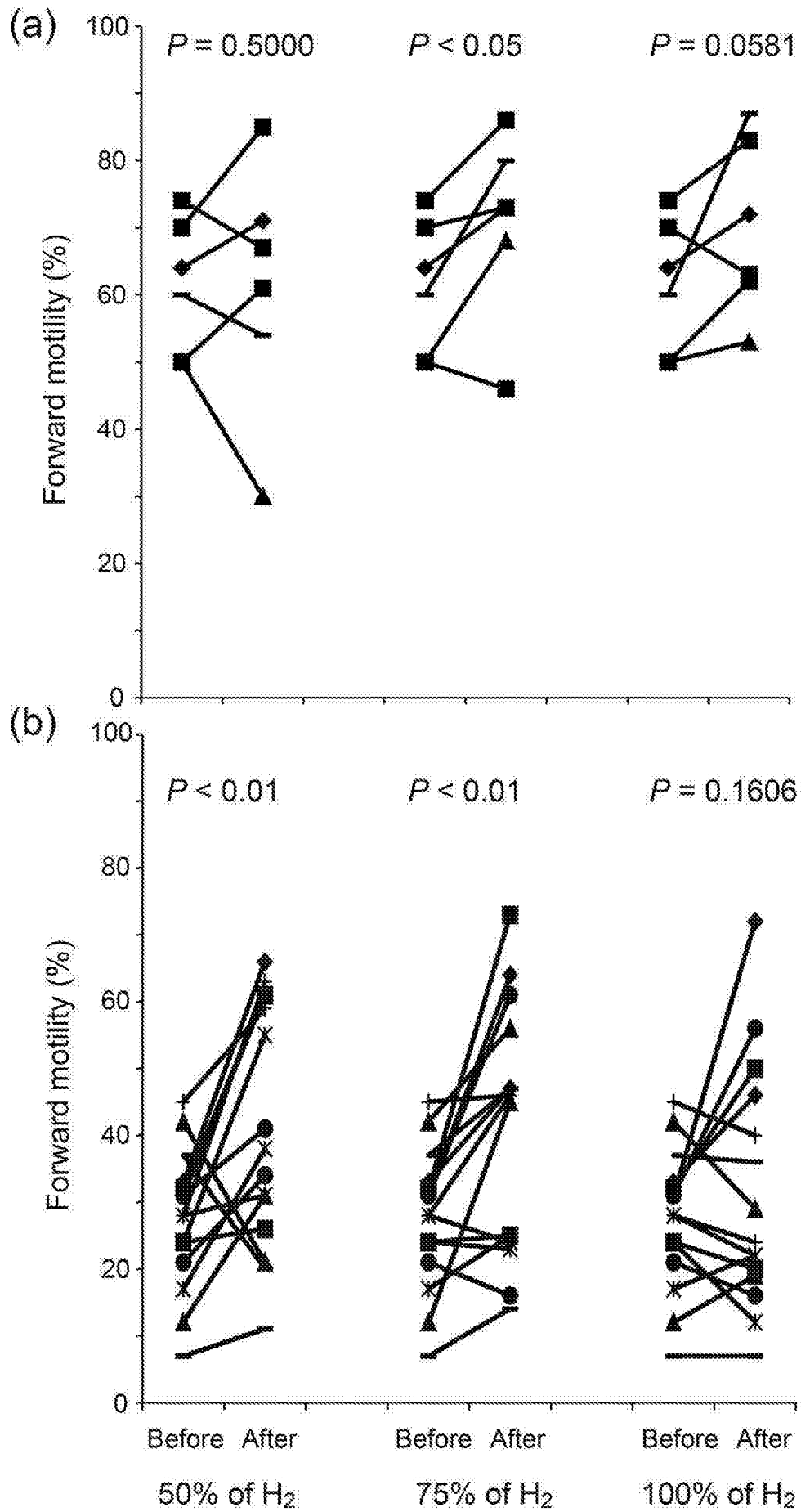
[圖6]



[図7]



[圖8]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/005506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K33/00(2006.01)i, A61P15/08(2006.01)i		
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) A61K33/00, A61P15/08		
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 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Emi MITSUZUKA, "Suiso Bunshi ga Ushi Toketsu Yukai Seishi no Sanka Stress ni Oyobosu Eikyo", The Journal of Reproduction and Development, 2011, vol.57, Suppl., page j119, no.OR2-9, entire text	4-13 1-3, 10-12, 14
X Y	WO 2007/021034 A1 (Shigeo OTA), 22 February 2007 (22.02.2007), claims; page 5, 3rd paragraph to page 6, 1st paragraph; examples & US 2009/0035383 A1 & US 2010/0291228 A1 & US 2013/0177653 A1 & EP 1946762 A1 & WO 2007/021034 A1 & CA 2619769 A & KR 10-2008-0046177 A & CN 101287476 A	13 1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"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 10 December 2014 (10.12.14)	Date of mailing of the international search report 22 December 2014 (22.12.14)	
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/005506

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010-259722 A (Hitachi Plant Technologies, Ltd.), 18 November 2010 (18.11.2010), fig. 1 (Family: none)	14
Y	Nami ONO, "Effects of Reactive Oxygen Species and Antioxidants on the Motility of Boar Spermatozoa in the Process of Freezing and Thawing", The Japanese Journal of Swine Science, 2001, vol.38, no.1, pages 12 to 19, entire text	1-14
Y	WO 2005/115141 A1 (Kagawa University), 08 December 2005 (08.12.2005), claims; example 4 & JP 5470597 B & US 2008/0299535 A1 & EP 1759582 A1	1-14
Y	JP 2005-213147 A (Ryoko KUMAI), 11 August 2005 (11.08.2005), claims; paragraph [0009]; examples (Family: none)	1-14
Y	Gupta, S., The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Assisted Reproduction, Current Women's Health Reviews, 2010, Vol.6, No.3, pp.227-238, page 231, column of 'SPERMATOZOA'	1-14
A	Chuai, Y. et al., Hydrogen-rich saline protects spermatogenesis and hematopoiesis in irradiated BALB/c mice, Med. Sci. Monit., 2012, Vol.18, No.3, pp.BR89-BR94	1-14
A	JP 2010-240376 A (Miz Co., Ltd.), 28 October 2010 (28.10.2010), & US 2011/0111048 A1 & US 2013/0245540 A1 & EP 2407141 A1 & WO 2010/103894 A1 & CN 101932297 A & CA 2753110 A & TW 201032794 A & KR 10-2011-0112880 A & AU 2010222294 A & MX 2011009450 A & IL 214980 A & RU 2465910 C & HK 1151455 A	1-14

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A61K33/00(2006.01)i, A61P15/08(2006.01)i		
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. A61K33/00, A61P15/08		
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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） Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	三塚愛美, 水素分子がウシ凍結・融解精子の酸化ストレスに及ぼす 影響, The Journal of Reproduction and Development, 2011, Vol. 57, Suppl., p. j119, No. 0R2-9 全文	4-13
Y		1-3, 10-12, 14
<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 10. 12. 2014	国際調査報告の発送日 22. 12. 2014	
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） 安居 拓哉 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 3437

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 請求項の番号
X	WO 2007/021034 A1 (太田成男) 2007. 02. 22, 請求の範囲, 5 頁 3 段落-6 頁 1 段落, 実施例	13
Y	& US 2009/0035383 A1 & US 2010/0291228 A1 & US 2013/0177653 A1 & EP 1946762 A1 & WO 2007/021034 A1 & CA 2619769 A & KR 10-2008-0046177 A & CN 101287476 A	1-14
X	JP 2010-259722 A (株式会社日立プラントテクノロジー) 2010. 11. 18, 図 1 (ファミリーなし)	14
Y	大野奈実, 凍結・融解過程における活性酸素種および抗酸化剤がブ タ精子の活力に及ぼす影響, 日豚会誌, 2001, Vol. 38, No. 1, pp. 12-19 全文	1-14
Y	WO 2005/115141 A1 (国立大学法人香川大学) 2005. 12. 08, 請求の範囲, 実施例 4 & JP 5470597 B & US 2008/0299535 A1 & EP 1759582 A1	1-14
Y	JP 2005-213147 A (熊井良子) 2005. 08. 11, 特許請求の範囲, [0009], 実施例 (ファミリーなし)	1-14
Y	Gupta, S., The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Assisted Reproduction, Current Women's Health Reviews, 2010, Vol. 6, No. 3, pp. 227-238 231 頁「SPERMATOZOA」欄	1-14
A	Chuai, Y. et al., Hydrogen-rich saline protects spermatogenesis and hematopoiesis in irradiated BALB/c mice, Med. Sci. Monit., 2012, Vol. 18, No. 3, pp. BR89-BR94	1-14
A	JP 2010-240376 A (ミズ株式会社) 2010. 10. 28, & US 2011/0111048 A1 & US 2013/0245540 A1 & EP 2407141 A1 & WO 2010/103894 A1 & CN 101932297 A & CA 2753110 A & TW 201032794 A & KR 10-2011-0112880 A & AU 2010222294 A & MX 2011009450 A & IL 214980 A & RU 2465910 C & HK 1151455 A	1-14