

明 細 書

発明の名称： 男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、男性不妊症の治療、予防又は改善のために用いられる組成物及びそれを用いた食品等に関する。

背景技術

[0002] 現在、妊娠を望んでいるカップルの約 1 割が不妊であると報告されているが、晩婚化等による妊娠希望年齢の上昇の影響もあり、不妊の傾向が高まっていることが指摘されている。不妊の原因は、女性側、男性側、あるいはその両方にある場合があるところ、男性側に原因があるケースが 48%とされている（非特許文献 1）。男性不妊症の原因の約 8～9 割は、精原細胞から精子が形成される過程または精子が成熟する過程に何らかの問題を有する造精機能障害であり、具体的な症状としては、乏精子症、無精子症、奇形精子症、精子無力症等がある。それゆえ、この種の男性不妊症を治療するため、造精機能障害に関する研究が進められている。

[0003] 特許文献 1 及び非特許文献 2 には、健康な精子にはリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ（PHGPx、GPx4）が多量に存在しており、精子における GPx4 の発現低下が総精子数の著しい減少と精子運動能の低下をもたらすことが記載されている。また、非特許文献 2 では、精巣特異的 GPx4 ノックアウトマウスは、ヒト男性不妊症と同様の造精機能障害を示すことが報告されている。

[0004] 他方、近年、日本酒・焼酎・甘酒・味噌・醤油等の麴を利用した日本の伝統的な麴発酵食品の価値が再認識され、麴の人気の高まっている。麴とは、米、米ぬか、麦又は豆等を蒸して麴菌を繁殖させたものであり、たとえば、米に麴菌を繁殖させたものは米麴と呼ばれている。麴菌は、発酵食品の製造を可能とする多種類の酵素を生産する機能を有していることが知られているが、この種の分野に留まらず、麴菌のもつ新たな機能の研究及びそれに基づ

く用途の開発が本願発明者によって進められている。特許文献2では、穀物等を麹菌で発酵させて得られた飼料が動物の成長を促進させることが報告され、特許文献3では、茶葉に麹菌を接種し、培養して得られる麹発酵組成物が抗酸化活性を有することが報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2004-344164号公報

特許文献2：特許第6111416号

特許文献3：国際公開第2015/119036号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：日本産科婦人科学会編著，“HUMAN+ 男と女のディクショナリー”，[online]，2014年9月，インターネット<URL:http://www.jsog.or.jp/public/human_plus_dictionary>

非特許文献2：今井浩孝，“リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ（PHGPx）と男性不妊”，HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY，2012年，Vol.19，No.2，p.59-70

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上述したように、精巣特異的GPx4ノックアウトマウスはヒト男性不妊症と同様の造精機能障害を示すことから、この精巣特異的GPx4ノックアウトマウスを男性不妊モデルマウスとして用い、男性不妊症の治療、予防又は改善に有用な医薬品や食品等の材料を開発し、提供することが期待されている。

[0008] なお、特許文献2及び特許文献3には、麹菌で穀物や茶葉を発酵させて得られる麹発酵物がそれぞれ記載されているが、この麹発酵物や麹菌自体を男性不妊症の治療、予防又は改善に用いる検討はなされておらず、その有効性は不明であった。

[0009] したがって、本発明は上述した点に鑑みてなされたもので、その目的は、男性不妊症を治療、予防又は改善することができる医薬品、食品、サプリメント又は飲料に用いられる組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 上記課題を解決するため、本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物は、麹菌で発酵された麹菌発酵物を含有する。

[0011] この麹菌発酵物は、総精子数を増加させ、構造不全（精子尾部の異常ヘアピン構造など）を有する異常精子を減少させ、又は、精巣組織における精子形成細胞の脱落を抑制させる作用を有しており、その結果、男性不妊症の治療、予防又は改善に有用である。また、本発明における男性不妊症の「男性」には、ヒトの男性のほか、非ヒト動物のオスも含まれる。

[0012] また、本発明の麹菌発酵物は、茶葉又は米を由来とする原料を発酵原料とすることも好ましい。これにより、麹菌発酵物の原料として好適なものが選択される。

[0013] また、上述した麹菌は黒麹菌又は白麹菌であることも好ましい。これにより、本発明の有効成分である麹菌発酵物をもたらす麹菌として好適なものが選択される。

[0014] また、本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物には、さらに乳酸菌を含有することも好ましい。これにより、麹菌の増殖が促進されて麹菌による発酵が安定的に行われ、高い活性を有する麹菌発酵物が得られると共に、摂取した際に腸内細菌が乳酸菌により整えられて免疫力が向上される。

[0015] また、本発明における男性不妊症が、乏精子症又は奇形精子症であることも好ましい。これにより、治療、予防又は改善する病態として好適なものが選択される。

[0016] また、本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用食品が、上述の組成物を含んでいることも好ましい。食品製造でも用いられる麹菌による発酵物を有効成分とするものであるため、安全性が高く、経口摂取することができる。

[0017] また、本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物の製造方法は、発酵原料に麹菌を接種する工程、及びこの麹菌で発酵原料を発酵させて麹菌発酵物を得る工程を有しており、または、発酵原料に麹菌と乳酸菌を接種する工程、及びこの麹菌と乳酸菌とで発酵原料を発酵させて麹菌発酵物を得る工程を有している。これにより、本発明に係る男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物を得ることができる。また、麹菌と乳酸菌とを共培養させることにより、麹菌の増殖が促進され、安定した発酵処理を行うことができ、発酵期間も短縮される。なお、この発酵原料は、茶葉又は米を由来とする原料であることが好ましい。また、この麹菌は黒麹菌又は白麹菌であることも好ましい。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、以下のような優れた効果を有する男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物を提供することができる。

(1) 男性不妊症の治療、予防又は改善効果に優れ、精液中の精子数を増加させると共に異常精子割合を減少させることができる。

(2) 食品製造でも用いられる麹菌による発酵物を有効成分とするものであるため、安全性が高く、摂取しやすい。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明の実施形態に係る麹菌発酵物の製造方法を概略的に示すフローチャートである。

[図2]実施例2における各対照群及び各試験群の交配結果を示すグラフである。

[図3]実施例3における各対照群及び各試験群の総精子数を示すグラフである。

[図4]実施例4における各対照群及び各試験群の異常精子割合を示すグラフである。

[図5]実施例4における各対照群及び各試験群の精子の精子尾部の折れ曲がり角度の割合を示すグラフである。

[図6]実施例5における各対照群及び各試験群の精巢組織を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0020] まず、図1を参照し、本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物に含有される、麹菌で発酵された麹菌発酵物の製造方法について説明する。

[0021] 図1に示すように、本発明の実施形態にかかる麹菌発酵物の製造方法は、発酵原料を準備する工程S0、発酵原料に水を加え吸水させる工程S1、発酵原料を蒸煮する工程S2、蒸煮された発酵原料に麹菌を接種する工程S3、発酵を行う工程S4、及び麹菌発酵物を得る工程S5から概略構成される。

[0022] (発酵原料の準備)

まず、図1に示す発酵原料を準備する工程S0について説明する。本発明における発酵原料としては植物由来原料が選択され、植物の葉、茎、根、花及び果実を発酵原料として用いることができる。このうち、茶葉、穀物又は豆類が好適に用いられ、男性不妊症の改善効果に優れる観点から、特に茶葉又は穀物が発酵原料として好適に用いられる。穀物には、米、トウモロコシ、小麦、大麦、ライ麦、えんばく、モロコシ、そば及びその他雑穀類が広く含まれるところ、その効果に優れる観点から、特に米が好ましい。米には精米された白米だけでなく、玄米も含まれる。また、茶葉には、茶の葉だけでなく、茶樹から採取される茎や枝等も含まれる。本発明の麹菌発酵物の原料として使用される茶葉は、採取されたままの状態の生の茶葉が好適に用いられるが、採取後すぐに加熱処理された茶葉、採取後茶葉に含まれる酸化酵素で茶葉を酸化発酵させたウーロン茶又は紅茶、さらに後発酵茶であってもよい。また、これら緑茶、ウーロン茶又は紅茶等を煎じた後の茶滓を使用することもできる。また、後の蒸煮処理や麹菌の培養効率を高めるために、茶葉や茶の茎は大き過ぎないように、ある程度の大きさに破砕されていることが好ましい。

[0023] (吸水処理)

次に、吸水処理工程S1について説明する。本工程では、発酵原料に水を

加えるか、発酵原料を水に浸漬させて吸水させる処理が行われる。吸水量は、たとえば、茶葉を発酵原料として用いる場合には、茶葉の水分が20～60%、好ましくは30～50%となるように調整する。

[0024] (蒸煮処理)

次に、蒸煮処理工程S2について説明する。上述の工程で吸水させた発酵原料を蒸し器に入れて蓋をし、蒸し器を加熱することにより水蒸気を発酵原料に当てて加熱する。蒸煮処理の時間は、30分～120分程度が好ましく、45分～90分がより好ましく、60分程度が特に好ましい。本工程を行うことにより、原料中の雑菌が殺菌され、後の発酵工程において、麹菌を優占種とした発酵が行われる。また、発酵原料として生の茶葉を用いる場合には、本工程を行うことにより、茶葉中の雑菌が殺菌されると共に、茶葉に含まれる酸化酵素が失活するので、後の工程において、茶葉に麹菌を効率よく繁殖させることができる。蒸煮が終了した原料は、蒸し器から取り出し、台の上に均等に広げ、30～40℃程度にまで冷却させる。これにより、麹菌を発酵原料に接種することが可能となる。

[0025] (麹菌の接種)

次に、麹菌を発酵原料に接種する工程S3について説明する。本工程では、上述の蒸煮工程を経て冷却された発酵原料に対し、麹菌を接種する。本発明において麹菌とは、主に麹発酵食品を製造する際に使用される微生物であり、具体的には、黒麹菌、白麹菌又は黄麹菌が挙げられる。このうち、黒麹菌とは、沖縄での泡盛や鹿児島での芋焼酎等の蒸留酒の製造に用いられている黒色又は黒褐色の分生子（無性孢子の一種）を形成するアスペルギルス属のカビの一群のことをいう。具体的には、特に限定されないが、アスペルギルス・アワモリ・ヴァル・カワチ（河内黒麹菌）、アスペルギルス・リュウキュウエンシス、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・サイトイ、アスペルギルス・イヌイ、アスペルギルス・ウサミ、アスペルギルス・アウレス等が挙げられる。また、白麹菌とは、白黄土色の分生子を形成するアスペルギルス属のカビの一群のことをいい、具体的には、例えば、アスペルギ

ルス・カワチ (*Aspergillus kawachii*) が挙げられる。さらに、黄麹菌とは、黄色又は黄緑色の分生子を形成するアスペルギルス属のカビの一群のことをいい、主に清酒や味噌、醤油等の製造に用いられている微生物である。具体的には、特に限定されないが、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*) 等が挙げられる。本発明においては、男性不妊症の改善効果に優れる観点から、黒麹菌又は白麹菌を用いることが好ましい。このうち、黒麹菌である河内黒麹菌 (*Aspergillus awamori* var. *kawachii*)、アスペルギルス・リュウキュウエンシス (*Aspergillus luchuensis*) 又はアスペルギルス・イヌイ (*Aspergillus inuii*)、白麹菌であるアスペルギルス・カワチ (*Aspergillus kawachii*) 及びこれらの組み合わせが好適に用いられ、特に河内黒麹菌 (*Aspergillus awamori* var. *kawachii*) が好ましい。これら麹菌の接種にあたっては、台上に広げた発酵原料に麹菌を均一に散布して混合する。麹菌はその胞子を接種することが好ましく、発酵原料 1 g (乾燥重量) に対して、麹菌の胞子が 50 万個以上、好ましくは 200 万個以上になるように添加して接種することが好ましい。たとえば、種麹 1 g に含まれる胞子数が 20 億個の場合には、発酵原料 1 kg に対して、種麹を 1.0 g (0.1 重量%) 程度を添加すればよい。麹菌を発酵原料に接種したのち、よく攪拌して麹菌を原料全体に分散させることが好ましい。

[0026] また、麹菌の接種工程 S3 において、さらに乳酸菌を接種して、麹菌と乳酸菌とを共培養させることも好ましい。麹菌と乳酸菌とを共培養することにより、麹菌の増殖が促進されて安定した発酵処理が行われると共に、これら接種した菌が優占種となるため、他の雑菌等の繁殖が抑制される。乳酸菌としては、乳酸菌発酵食品に使用される乳酸菌を使用することができ、例えば、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、*Lactobacillus fermentum* 又はラクトバチルス・ブルガリクス (*Lactobacillus bulgaricus*) などのラクトバチルス属、*Bifidobacterium bifidum* 等のビフィズス菌、*Lactococcus lactis* 等のラクトコッカス属、*Enterococcus faecium* 等のエンテロコッカ

ス属が挙げられる。接種する乳酸菌は予め培養しておいたものを用い、発酵原料 1 k g に対し、菌体として 0. 1 重量%程度を添加すればよい。麹菌と乳酸菌とで発酵されて得られた麹菌発酵物には、麹菌及び乳酸菌が生産した多種の酵素が含まれるほか、麹菌やその孢子及び乳酸菌も含まれる。乳酸菌は、プロバイオティクス機能を有するため、摂取することによって腸内環境が整い、免疫機能が強化することによる男性不妊の改善効果が期待される。

[0027] (発酵)

次に、発酵原料に接種した麹菌を培養して発酵を行う工程 S 4 について説明する。本工程では、麹菌を接種した原料に麹菌を繁殖させる。まず、麹菌を添加した発酵原料を 3 0℃前後に保った培養室に入れる。時間が経過するにしたがって発酵がすすみ、茶葉等の発酵原料の温度が上昇するが、麹菌は一般的に 4 0℃を超えると増殖し難くなるため、通風して原料の温度を下げ、発酵原料の温度が 3 0℃～4 2℃、好ましくは 3 0℃～4 0℃を維持するように通風量を調整する。なお、発酵温度は、発酵に用いる麹菌の種類によって適宜調整される。具体的には、麹菌として黒麹菌を選択した場合には、一例として、培養開始から 1 2～3 0 時間は通風により茶葉等の発酵原料の温度が 3 5℃～4 0℃になるように調整する。その後、同様に通風量を調整するなどして、温度を 3 0℃～3 5℃になるようにやや低めに調整し、培養開始から合計で 1～4 日間、好ましくは 3 6～7 2 時間、さらに好ましくは 4 0～6 0 時間程度培養した時点を麹菌発酵物の完成とする。

[0028] なお、麹菌発酵物の製造 S 1～S 4 にあたっては、原料の洗浄、吸水、蒸煮、麹菌の接種及び発酵（製麹）を同一装置内で行うことができる機械（例えば、ドラム式自動製麹装置等）により行うことも可能である。

[0029] (麹菌発酵物)

得られた麹菌発酵物は、発酵原料に麹菌が繁殖した、いわゆる「こうじ」である。上述の工程により得られた麹菌発酵物は、一定の水分を含んだ状態であるが、自然乾燥させたり、低温除湿乾燥させることにより、水分を除去することができる。また、水分を除去した麹菌発酵物を粉碎して粉末状とし

たり、顆粒状とすることも可能である。いったん水分を除去したものにおいても、麹菌発酵物としての機能は有効に保持され得る。この麹菌発酵物は、男性不妊症の治療、予防、改善効果を有している。また、発酵原料として茶葉を用いた場合には、元来、茶葉は細胞増殖阻害活性を有しており、経口摂取には不向きであるが、本発明の麹菌発酵物は細胞増殖阻害活性が低減されており、経口摂取することが可能である。

[0030] 本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物は、上述した麹菌で発酵された麹菌発酵物を有効成分として含むものであって、乏精子症、無精子症、奇形精子症、精子無力症等といった造精機能障害に基づく男性不妊症を改善、予防又は治療し、造精機能障害の発現を抑制する作用を有する。それゆえ、本発明の麹菌発酵物を有効成分として含む組成物は、これらの疾患を予防、治療又は改善するための医薬品、医薬部外品及び食品組成物として用いることができる。男性不妊症は発症原因が特定されていないものも多く、本発明にかかる組成物は、さまざまな原因による男性不妊症を治療、予防又は改善するが、特に、精子におけるGP×4の発現低下に起因する男性不妊症を好適に治療、予防又は改善することができる。また、本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物は、主にヒトの男性を対象とするものであるが、非ヒト動物のオスに対しても動物用医薬や動物用サプリメント、動物飼料又はペットフード等の態様で広く用いることができる。

[0031] 本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物の投与量は、目標とする予防又は治療効果、投与方法、年齢、体重などによって変化するので一概には規定できないが、通常一日の経口投与量は、麹菌発酵物として約0.1～1000mg/kg体重であり、好ましくは約0.5～200mg/kg体重であり、さらに好ましくは約1～50mg/kg体重であり、これを1～3回に分割して投与すればよい。

[0032] 本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物は、従来慣用されている方法により種々の形態に調製することができる。この場合、通常製剤用の担体や賦形剤など、医薬品の添加剤として許容されている添加剤を用いて製

剤化することができる。また、本発明に係る麹菌発酵物のバイオアベイラビリティや安定性を向上させるために、マイクロカプセル、微粉末化、シクロデキストリン等を用いた包接化などの製剤技術を含むドラッグデリバリーシステムを用いることもできる。

[0033] さらに、上記組成物は、錠剤、顆粒剤、カプセル剤又は内服液剤等の形態で用いることができるが、消化管からの吸収に適した形態で用いることが好ましい。また、流通性、保存性などの理由により所望される形態での製剤を提供する場合にも従来の製剤技術を用いることができる。

[0034] また、本発明の男性不妊症の治療、予防又は改善用組成物は、錠剤やカプセル剤、顆粒剤、シロップ剤などのサプリメント形態、飲料、菓子、パン、粥、シリアル、麺類、ゼリー、スープ、乳製品、調味料等のあらゆる形態にて食品組成物として用いることができる。このように食品組成物として用いる際には、本発明の有効成分の効能に影響を与えない範囲において、他の有効成分や、ビタミン、ミネラル若しくはアミノ酸等の栄養素等を種々組み合わせることも可能である。本発明の食品組成物から展開される食品には、サプリメント、健康食品、機能性食品、特定保健用食品等が含まれる。また、本発明の食品組成物の1日あたりの摂取量は、上述の麹菌発酵物として約0.1～1000mg/kg体重とすることが好ましく、約0.5～200mg/kg体重とすることがより好ましく、さらに約1～50mg/kg体重とすることが好ましく、これを1～3回に分割して摂取することが好ましい。

[0035] 次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例によってなんら限定されるものではない。

実施例

[0036] [実施例1]

1. 麹菌発酵物の調製

本実施例では、発酵原料として生の茶葉を用いた。茶葉の水分が約50%となるよう水を加えて吸水処理を施した後、ドラム式製麹装置に入れて蒸煮

処理を行った。蒸煮処理の条件は95℃で60分とした。ドラム式製麹装置内で茶葉を30℃まで冷却したのち、河内黒麹菌（アスペルギルス・アワモリ・ヴァル・カワチ：Aspergillus awamori var. kawachii）の種麹（孢子数20億個／種麹1g）を0.1重量%、乳酸菌（Lactobacillus casei）を0.1重量%となるように茶葉に添加して混合し、ドラム式製麹装置内で3日間製麹した。製麹温度は、種麹を添加してから24時間は通風により茶葉の温度が35℃～40℃になるように調整し、その後の48時間は、同様に通風量を調整するなどして、茶葉の温度を30℃～35℃になるようにやや低めに調整した。装置内で3日間製麹された麹菌発酵物を取り出して粉碎し、粉末状の麹菌発酵物を得た。

[0037] [実施例2]

2. 麹菌発酵物による男性不妊の改善

本実施例では、男性不妊モデルマウスとして、雄の精巣特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウスを用いた（非特許文献2参照）。この精巣特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウスは、精巣において非ミトコンドリア型のリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ（cGP×4）が欠損したマウスであり、以下表1に示すフェノタイプを有している。

[0038] [表1]

精子数	精子運動能	精子形状	精巣組織	生殖能力
減少	低下*	精子尾部の異常ヘアピン構造(折れ曲がり)*	精母細胞の一部脱落	通常の50%の不妊傾向あり

*：正常な精子も2割程度存在する

[0039] 3週齢の雄の精巣特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウスを以下表2に示す4つの群に1匹ずつ配し、8週齢となるまで1ケージあたり1匹ずつ単飼した。正常対照群には、試験期間中、マウス飼育繁殖用飼料CE-2（CLEA Rodent Diet CE-2；日本クレア株式会社製品）を給餌した。陽性対照物質として男性不妊症の治療に用いられるビタミンE（非特許文献1）を選択し、陽性対照物質投与群には、試験期間中、飼料CE-2にビタ

ミンEを混合したものを給餌した。ビタミンEの混合割合は100gの飼料CE-2に対し、100mgとした。他方、試験群には、試験期間中、飼料CE-2に実施例1で得た麹菌発酵物を混合したものを給餌した。低用量群には麹菌発酵物が0.5重量%含有され、高用量群には麹菌発酵物が5.0重量%含有されたものを用いた。飼料CE-2、陽性対照物質又は麹菌発酵物が混合された飼料CE-2は自由摂取とし、飲水も給水瓶からの自由飲水とした。上述した条件にて3週齢から8週齢まで飼育を行った。

[0040] [表2]

対照群及び試験群(♂1匹×♀3匹)		投与内容
対照群	正常対照群 「CE-2」	投与なし(CE-2 飼料のみ)
	陽性対照物質投与群 「VE 高添加食」	ビタミンE 高添 (ビタミンE 100mg+CE-2 飼料 100g)
試験群	麹菌発酵物投与群・低用量 「茶麹 0.5%」	麹菌発酵物 0.5 重量% (麹菌発酵物 0.5g+CE-2 飼料 99.5g)
	麹菌発酵物投与群・高用量 「茶麹 5.0%」	麹菌発酵物 5.0 重量% (麹菌発酵物 5g+CE-2 飼料 95g)

[0041] 雄の精巢特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウスが交配可能となった8週齢で、各ケージに7週齢のBALB/c 雌マウスを3匹ずつ配し、雄の精巢特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウス1匹と交配させた。交配期間は3ヶ月とした。交配開始後も、各対照群又は各試験群のケージごとに、雄マウスが3週齢から給餌されていた飼料を引き続き給餌し、ケージ内に配された雌マウスも雄マウスと同じ飼料を摂取した。交配期間における雌マウスの妊娠回数及び産仔数について調べた。結果を図2に示す。図1のグラフのバー上に記載された*は、正常対照群「CE-2」と比較したときのp値が $p < 0.05$ であることを示し、**は、p値が $p < 0.01$ であることを示している。

[0042] 正常対照群「CE-2」では、雌マウス3匹の合計の妊娠回数は4回であり(図2a)、総産仔数は10匹未満であった(図2b)。そして、雌マウスの出産1回あたりの産仔数も2匹と少なかった(図2c)。また、陽性対照物質であるビタミンEを投与した陽性対照物質投与群「VE高添加食」の

結果をみると、雌マウス3匹の合計の妊娠回数は8回であり（図2a）、総産仔数は60匹であり（図2b）、雌マウスの出産1回あたりの産仔数は7匹と多く（図2c）、雄の精巢特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウスの不妊傾向の改善がみられた。他方、麴菌発酵物の低用量群「茶麴0.5%」では、雌マウス3匹の合計の妊娠回数は12回であり（図2a）、総産仔数は110匹を超えたことが確認された（図2b）。BALB/c 雌マウスの妊娠期間が3週間程度であり、交配期間が3ヶ月間であることを考慮すると、雌マウスの1匹あたりの妊娠回数は最大で4回であるが、本試験群のケージに配された雌マウス3匹全てが4回妊娠したことがわかった。また、雌マウスの出産1回あたりの産仔数は約9匹と多かった（図2c）。この結果より、本発明の麴菌発酵物は、男性不妊モデルマウスの不妊傾向を大きく改善でき、男性不妊症を治療できることが示された。

[0043] なお、麴菌発酵物の高用量群「茶麴5%」では、雌マウス3匹の合計の妊娠回数は3回に低下し（図2a）、総産仔数は10匹程度と少なく（図2b）、雌マウスの出産1回あたりの産仔数は約4匹であった（図2c）。この結果より、麴菌発酵物の投与量は、高用量群「茶麴5%」の投与量程度とするよりも、少ない投与量とすることが好ましいことがわかった。なお、雄マウスの体重が25g程度、飼料の一日摂取量を3～4g/dayとすると、高用量群における麴菌発酵物の投与量は6～8g/kg体重/dayであり、低用量群における麴菌発酵物の投与量は0.6～0.8g/kg体重/dayである。そのため、男性不妊症の改善のためには、麴菌発酵物の投与量を6g/kg体重/day未満とすることが好ましく、3g/kg体重/day以下とすることがより好ましく、1g/kg体重/day以下とすることがより好ましいと考えられた。

[0044] [実施例3]

3. 麴菌発酵物による精子数の改善

精巢特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウスは、精子数が通常のマウスの半分以下に減少している。そこで、本発明の麴菌発酵物の摂

取による精子数への影響について、以下のようにして調べた。実施例1での交配期間が終了した後、各対照群及び各試験群における雄の精巢特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウスの解剖を行い、各個体から精巢上体をそれぞれ摘出した。各精巢上体からの精子の回収は次のようにして行った。TYH培地500μLを入れておいた24穴シャーレに精巢上体を入れた後、精子が培地に移動するように切れ込みを入れ、37℃で2時間培精した。精子懸濁液をチューブに回収し、4℃、2000rpmで5分間遠心して上清を取り除いた。さらに、PBSを500μL加え、4℃、2000rpmで5分間遠心して上清を取り除くことを2回繰り返して洗浄を行った。その後、PBSを500μL加えて精子検体液とした。この精子検体液をPBSで50倍に希釈し、血球計算盤を用いて精子数をカウントした。結果を図3に示す。

[0045] 図3に示すグラフによれば、麴菌発酵物の低用量群「茶麴0.5%」における精巢特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウスは、正常対照群「CE-2」のマウスと比べて精子数が約2倍に増加していることがわかった。なお、麴菌発酵物の高用量群「茶麴5%」のマウスも精子数の増加が認められたが、低用量群「茶麴0.5%」の方が精子数は多いことがわかった。この結果より、本発明の麴菌発酵物は、男性不妊症の乏精子症を改善できることが示された。

[0046] [実施例4]

4. 麴菌発酵物による異常精子の改善

精巢特異的非ミトコンドリア型GP×4ノックアウトマウスは、精子の半分以上について精子尾部が折れ曲がった異常ヘアピン構造を有しており、精子形態に異常を有している。そこで、本発明の麴菌発酵物の摂取による精子形態への影響について、以下のようにして調べた。実施例3で回収した精子検体液をPBSで10倍に希釈し、スライドガラスに10μLとり、カバーガラスをかけてオールインワン顕微鏡（キーエンス）で精子形状の観察を行った。顕微鏡下の複数の視野について写真を撮影し、各写真中の正常精子と

異常精子の数をカウントして異常精子の平均割合を算出した。なお、精子尾部の角度については、精子尾部の折れ曲がりの角度がほぼないもの（ストレート形状）を「 0° 」、精子尾部の折れ曲がり認められるもの～折れ曲がりの角度が 90° 程度のものを「 90° 」、精子尾部の折れ曲がり 180° に近いものを「 180° 」としてカウントした。図4に各対照群及び各試験群の異常精子割合を示し、図5に精子尾部の折れ曲がり角度の割合を示す。

[0047] 図4に示すグラフによれば、麹菌発酵物の低用量群「茶麹0.5%」における精巢特異的非ミトコンドリア型GP $\times$ 4ノックアウトマウスは、正常対照群「CE-2」のマウスと比べて異常精子割合が著しく減少したことがわかった。この異常精子割合の顕著な減少は、陽性対照物質であるビタミンEを投与した陽性対照物質投与群「VE高添加食」のマウスには認められなかった効果であった。この結果より、本発明の麹菌発酵物は、男性不妊症の奇形精子症を改善できることが示された。なお、麹菌発酵物の高用量群「茶麹5%」のマウスは正常対照群「CE-2」のマウスよりも異常精子割合が増加したことが確認された。この結果より、麹菌発酵物の投与量は、高用量群「茶麹5%」の投与量よりも、少ない投与量とすることが好ましいことがわかった。

[0048] また、図5に示すグラフによれば、麹菌発酵物の低用量群「茶麹0.5%」における精巢特異的非ミトコンドリア型GP $\times$ 4ノックアウトマウスは、特に、精子尾部の折れ曲がり角度が「 90° 」程度に分類される精子尾部の構造異常が抑制されており、麹菌発酵物が精子尾部の構造不全を改善していることが確認された。

[0049] [実施例5]

5. 麹菌発酵物による精巢組織の改善

精巢特異的非ミトコンドリア型GP $\times$ 4ノックアウトマウスは、精巢組織における精母細胞の脱落が認められる。そこで、本発明の麹菌発酵物の摂取による精母細胞への影響について、以下のようにして調べた。実施例1での

交配期間が終了した後、各対照群及び各試験群における雄の精巣特異的非ミトコンドリア型GPx4ノックアウトマウスの解剖を行い、各個体から精巣をそれぞれ摘出した。精巣組織を10%中性ホルマリン液で固定し、パラフィンで包埋した後、4 μ mの厚さにスライスし、ヘマトキシリン・エオジン染色して観察を行った。各対照群及び各試験群の精巣組織における精母細胞の写真を図6に示す。

[0050] 図6のうち、正常対照群である「CE-2」の写真中の矢印は、精母細胞の脱落が生じている部分を示している。他方、麹菌発酵物の低用量群「茶麹0.5%」は、陽性対照物質投与群「VE高添加食」と同様に、精母細胞の脱落が改善されており、細胞形状が一定であった。他方、麹菌発酵物の高用量群「茶麹5%」は、精母細胞の脱落が一部で確認された。この結果より、麹菌発酵物の投与量は、高用量群「茶麹5%」の投与量よりも、少ない投与量とすることが好ましいことがわかった。

[0051] 本発明は、上記の実施形態又は実施例に限定されるものでなく、特許請求の範囲に記載された発明の要旨を逸脱しない範囲内での種々、設計変更した形態も技術的範囲に含むものである。

産業上の利用可能性

[0052] 本発明は男性不妊症の治療、予防又は改善のために用いられる組成物を提供するため、医療や食品分野（サプリメント、健康食品、機能性食品、特定保健用食品等も含む）の産業において幅広く役立つものである。