

Wistar系ラットにおける卵子の体外受精 および体外培養に関する研究

古田 祐奈¹、中川 隆生²、森田 真裕³、伊藤 慧¹、
永井 匡⁴、佐東 春香¹、安齋 政幸⁵、入谷 明⁵

要 約

本研究では、Wistar系ラットを用いた体外受精ならびに、初期胚の体外培養について検討した。体外受精では、常法により過剰排卵処置を施した幼若雌ラットより卵を回収し、前培養を行うことにより、受精能を獲得させた精子と共に培養し、受精させた。その結果、Wistar (HLA) では48% (61/127)、WistarHannover/Rccでは67% (62/92)の排卵誘起率が得られた。続いて各種系統において、2,526個、3,238個の卵子がそれぞれ得られ、Wistar (HLA) では一匹あたり41個、WistarHannover/Rccでは一匹あたり52個の卵子が過剰排卵処置により得られた。体外受精においてWistar (HLA) では46% (1,172/2,526)、WistarHannover/Rccでは69% (2,226/3,238)の卵子が受精した。その後、77% (900/1,172)、88% (1,954/2,226)の卵子がそれぞれ2細胞期胚に発生した。初期胚の体外培養では、Wistar (HLA) では10% (40/387)、WistarHannover/Rccでは13% (122/923)の胚が2細胞期胚から胚盤胞期胚まで発生した。これらの結果から、今回供試したWistar系幼若ラットは系統により差は生じるものの、過剰排卵処置および体外受精が可能であり、低率ではあるが胚盤胞期胚まで発生することが示された。

緒 言

ラットにおける体外受精はToyoda and Changによって透明帯除去卵子を用いて初めて精子の卵子への侵入が観察され¹⁾、Miyamoto and Changによって完全な排卵卵子での体外受精が成功した^{2, 3)}。しかしMiyamotoらは、射出精子を用いて体外で受精させており、完全に体外で受精能を獲得させた精子を用いての体外受精の成功は、三宅らおよび豊田らによって初めてなされた^{4, 5, 6)}。翌1974年には、これらの体外受精卵子が、移植後正常な産子となることが証明⁷⁾されたが、過去においてラット胚を使用した生殖工学技術は、再現性に乏しく実用化は困難と考えられてきた。近年、江藤らは技術の開発・改良を進め、複数の系統においても安定して生殖工学技術が実施できることを報告している⁸⁾。また、このような基盤技術の開発により実験動物ラットにおける、バイオリソースプロジェクトも進行中である^{9, 10)}。それでもなお、ラットにおける系統差は著しく、このような系統における生殖工学技術の普及が急務である。さらに、新規系統に対しても同様に、基礎的な生殖工学技術、特に体外での胚・配偶子操作が適用できるか否か検討する必要がある。

そこで本研究では、Wistar系ラットを用いた、胚・配偶子の体外操作の確立を目的に、幼若雌ラットを用いた体外受精、およびその後の初期胚の発生能を検討した。

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. (株) 紀和実験動物研究所 〒640-1473 和歌山県海草郡紀美野町毛原宮 486
3. 近畿大学大学院生物理工学研究科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
4. (株) 日本医化器械製作所 〒550-0002 大阪府大阪市西区江戸堀 1-22-38
5. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

材料および方法

供試動物

本研究では、標準型 Wistar 系統として Wistar (HLA) ((株) 紀和実験動物研究所) および、一般安全性試験等に使用できる同一基準の生産や供給体制に基づいた高品質の実験動物を安定供給することを目的として開発された種動物である WistarHannover/Rcc (日本エスエルシー (株))、共に 3～4 週齢の幼若雌ラットと、9～10 週齢の成熟雄ラットを供試した。なお、実験の立案および動物の飼養については、近畿大学動物実験規定に準じて行った。

培地の調整

本研究における使用培地は Miyoshi らの mR1ECM の組成^{11, 12)} を基本とし、体外受精培地および胚培養培地ともに Glucose 濃度を 7.5mM から 4.5mM に変更し、体外受精培地においては塩化ナトリウム (以下、NaCl) 濃度を 76.7mM から 110mM に変更し、Polyvinyl Alcohol (以下、PVA) 1.0mg/mL の代わりにウシ血清アルブミン (以下、BSA) 4.0mg/mL を添加したものをを用いた^{12, 13)}。なお、各培地における浸透圧を使用前に (株) 日本医化器械製作所に委託し、浸透圧計 (ARKRAY:M-6040) を用いて測定を行ったところ、体外受精培地では 290mOsm、胚培養培地では 227mOsm であった (表 1)。

表 1. 修正 R1ECM (mR1ECM) の組成

Reagent	体外受精培地	胚培養培地
NaCl	110mM	76.7mM
KCl	3.2mM	3.2mM
CaCl ₂	2.0mM	2.0mM
MgCl ₂	0.5mM	0.5mM
NaHCO ₃	25.0mM	25.0mM
D-Glucose	4.5mM	4.5mM
Na-Pyruvate	0.5mM	0.5mM
Na-lactate	10.0mM	10.0mM
PVA(Cold Water Soluble.)	—	1.0mg/mL
BSA	4.0mg/mL	—
L-Glutamine	0.1mM	0.1mM
MEM-essential amino acid	2%	2%
MEM-nonessential amino acid	1%	1%
Osmolarity	290mOsm	227mOsm

体外受精培地は直径 60mm ペトリディッシュ (FALCON : 1007) に 400 μ L/1drop を、胚培養培地は直径 35mm ペトリディッシュ (CORNING : 430165) に 200 μ L/4drop 入れ、その上部をミネラルオイル (SIGMA : M8410-1L) で被った。その後使用する前まで、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内にて 3 時間以上、温度と気相を平衡させた。

精子懸濁液の調整

精子懸濁液の調整は、Toyoda らの方法を若干修正した⁷⁾。すなわち、成熟雄ラットより精巢上部尾部を摘出後、尾部のトリミングを行い余分な血液や、体液を取り除いた。以降の取り扱い操作は温度の低下を防ぐため、37 $^{\circ}$ C 加温盤上にて行った。精巢上部尾部を 21G 注射針 (TERUMO : NN-2138R) を用いて精子塊を採取した。体外受精培地に先端を丸めた細いヘマトクリット管を用いて導入後、約 10 分間、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内にて培養し、精子を拡散させ、続いて精子濃度を 300 精子/ μ L に調整し、新鮮体外受精培地に添加した後、受精能獲得のため 37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内において 5 時間前培養を行った。

体外受精操作

体外受精操作は、Toyoda らの方法を若干修正した⁷⁾。実験に供試する幼若雌ラットに 30 単位の PMSG (妊馬血清性腺刺激ホルモン : 三共ライフテック株式会社) を腹腔内投与し、48 時間後に 30 単位の hCG (ヒト絨毛性腺刺激ホルモン : あすか製薬株式会社) を腹腔内に投与した。hCG 投与 17 時間後に幼若雌ラットより、卵管を摘出し組織の余分な血液や体液を取り除いた。ペトリディッシュのミネラルオイルの部分に、摘出した卵管を入れ、前培養を行った精子懸濁液を含む体外受精培地に、26G 注射針 (TERUMO : NN-26135) を付けたシリンジ (TERUMO : SS-01T) を用いて、卵管膨大部を切開し卵子卵丘複合体を回収後、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内にて体外受精を行った。受精後 6 時間以降に卵子の洗浄を行い、形態的に良好な卵子のみ新鮮な胚培養培地に移し、雌雄両前核を確認後、引き続き 37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内において培養した¹⁾。

体外受精由来各種系統における初期胚の培養操作

媒精後 24 時間に得られた 2 細胞期胚のみを、40 ~ 50 個 /50 μ L となるよう胚培養培地に移し、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内にて培養を行った。その後、24 時間毎に経時観察を行い初期胚の発生成能について検討した。なお、それぞれの実験操作にて、等分散検定を用いて統計処理を行った。

結 果

各種系統の幼若ラットを用いた過剰排卵処置の成績を表 2 に示した。Wistar (HLA) では 48% (61/127)、WistarHannover/Rcc では 67% (62/92) の排卵誘起率が得られた。さらに、各種系統における排卵卵子数はそれぞれ、2,526 個、3,238 個が回収され、Wistar (HLA) では一匹あたり 41 個、WistarHannover/Rcc では一匹あたり 52 個の卵子が過剰排卵処置により得られた。また排卵誘起率および平均排卵数において、WistarHannover/Rcc 系統に有意に高い排卵誘起が認められた ($P < 0.05$)。

表 3 には、各種系統由来幼若ラットを用いた体外受精および 2 細胞期胚への発生成績を示した。受精用 mR1ECM を用いて体外受精を実施したところ、Wistar (HLA) では 46% (1,172/2,526) の卵子が受精し、WistarHannover/Rcc では 69% (2,226/3,238) の卵子が受精し、系統間において有意差が認められた ($P < 0.05$)。続いて体外受精により得られた前核期受精卵のうち 77% (900/1,172)、88% (1,954/2,226)

の卵子がそれぞれ 2 細胞期胚に発生した。

各種系統における体外受精により得られた 2 細胞期胚の一部を培養用 mR1ECM にて培養した初期胚の発生能を表 4 に示した。Wistar (HLA) では、31% (120/387) の胚が 2 細胞期胚から 4 細胞期胚に発生し、続いて 15% (58/387) の胚が桑実期胚に、10% (40/387) の胚が胚盤胞期胚に発生した。一方、WistarHannover/Rcc では、供試した 2 細胞期胚のうち 46% (428/923) の胚が 4 細胞期胚に発生し、Wistar (HLA) と比較し高率に得られた。続いて 26% (242/923) の胚が桑実期胚に発生し、このステージにおける発生率において系統間に有意な差が認められた ($P < 0.05$)。そして、13% (122/923) の胚が胚盤胞期胚に発生した。

表 2. 各種系統由来幼若ラットを用いた過剰排卵成績

系統	供試匹数	排卵匹数(%)	総卵子数	平均排卵数
Wistar(HLA)	127	61(48) ^a	2,526	41 ^a
WistarHannover/Rcc	92	62(67) ^b	3,238	52 ^b

a,b 間に有意差有り($p < 0.05$)

表 3. 各種系統由来幼若ラットを用いた体外受精成績

系統	供試卵子数	受精数(%)	2 細胞期胚数(%)
Wistar(HLA)	2,526	1,172(46) ^a	900(77)
WistarHannover/Rcc	3,238	2,226(69) ^b	1,954(88)

a,b 間に有意差有り($p < 0.05$)

表 4. 各種系統の幼若ラットにおける体外受精由来胚の発生成績

系統	胚発生数(%)			
	2 細胞期	≥ 4 細胞期	≥ 桑実期	≥ 胚盤胞期
Wistar(HLA)	387	120(31)	58(15) ^a	40(10)
WistarHannover/Rcc	923	428(46)	242(26) ^b	122(13)

a,b 間に有意差有り($p < 0.05$)

考 察

ホルモン投与に関する研究では、投与単位数、週齢ともに群を抜いて効果のある結果が得られていない^{14, 15, 16, 17)}。そのため本研究では、Wistar系を使用したことと週齢を考慮して、田谷らの報告を参考に各ホルモン30単位とした¹⁸⁾。また石橋、山口らの方法を参考に各ホルモン同用量を腹腔内に投与した^{17, 19)}。各種系統の排卵誘起率には有意差が認められ、これは系統によってホルモンに対する感受性が異なる可能性が考えられる²⁰⁾。排卵誘起率は50～70%とマウスに比べ高率に誘起することはできなかったが、過剰排卵処置により得られた排卵卵子数は個体差が大きいものの、平均では自然排卵卵子数(平均10個(252/26), 未発表)を上回る値が得られ、Wistar系において過剰排卵処置は有効であることが示された⁸⁾。

体外受精において、各種系統は体外受精が可能であり、系統間の受精率に有意な差が認められた。原因として操作や培養条件はほぼ同じと考えられるため、この差は系統によって卵子や精子の受精能力に違いがある、もしくは今回用いた体外受精培地はWistar(HLA)よりもWistarHannover/Rccに適していたと思われる。また、今回得られた受精率は良好ではあるものの、精子の卵子への侵入には培地のNaCl濃度と浸透圧が密接に関与していることがMiyoshiらの研究により報告されており^{12, 21)}、体外受精培地の改良により、更に受精率を上げることが可能であると示唆された。

初期胚の体外培養において、*in vitro*由来2細胞期胚の胚盤胞期胚への発生率は低く、同じ培養条件で行った、成熟雌ラットを用いた*in vivo*由来胚の発生率(72%:30/50, 未発表)と比べ、著しい低下が見られた。特に、2細胞期胚から4細胞期胚へ発生する過程で見られた低下は、2-cell blockが関与しているのではないかと考えられる。Matsumotoらは、*in vivo*由来胚の体外培養における2-cell blockは後期2細胞期胚におけるリン酸の除去により、回避することが可能であるとしている^{22, 23)}。そのため本研究で使用した培地は、あらかじめリン酸を除去している。しかし、リン酸はウサギ、ヒツジ、ブタの卵管液に存在しており^{24, 25)}、リン酸化合物が生体内で重要な役割を果たしていることはよく知られていることから、リン酸は生物にとって生理機能の活性と維持に重要かつ一般的な物質であると言える²⁵⁾。子宮液や卵管液といった体液は、血液成分と類似しており、ラットでは血液においてリンが存在している²⁶⁾。それにも関わらず、*in vivo*では発生阻害が起らない。これらのことから、体外培養におけるリン酸の除去は発生率の改善に有効ではあるが、発生阻害がリン酸のみによって引き起こされているとは言えない。

一方Miyoshiは、mKRBを用いて受精し、受精後4～30時間後にmR1ECMに移すことで胚盤胞への発生率の改善を報告しており、2細胞期以前の発生段階においてmKRBに含まれる何らかの要因、例えばBSAやリン酸の必要性が示唆されている^{27, 28)}。また松本は、ラット体外培養胚の発生阻害は、胚性ゲノムの活性化によるタンパク質合成によって制御されるマウスや、Crabtree効果によるハムスターの発生阻害とは異なり、細胞質内の代謝系において起きているとしている。そのため、発生阻害の原因は細胞質内にあるのではないかと考えられており、*in vitro*由来胚の体外培養においては、リン酸の除去以外にも2-cell blockに影響する要因があると思われる^{25, 29)}。本研究の結果において、*in vivo*由来胚と*in vitro*由来胚に見られた発生率の差は、成熟ラットより得られた卵子よりも、幼若ラットより得られた卵子は体外環境に影響されやすいこと、過剰排卵処置により卵子の質が低下したこと、2細胞期以前の培養条件により、その後の発生が大きく左右されるため*in vivo*由来と*in vitro*由来では胚の発生能が異なることなどが考えられる。

一般に幼若動物を用いた過剰排卵処置後における体外受精およびその後の発生に関する報告はマウスやラットが多い^{30, 31)}。成熟ラットにおいては、ハンドリングや性周期に依存して高濃度のホルモン投与を行わなければならない、その取り扱いや披見物質の調整に熟練を要する³²⁾。一方、幼若ラットについては、

個体の取り扱いに優れ、性周期非依存的に排卵誘起が可能であり³³⁾、明確な性周期を示さないため内在性ホルモンに左右されず過剰排卵の効果が期待できる³⁴⁾。藤澤らは、過剰排卵処置を施した、自然交配による幼若ラットより回収した初期胚を体外培養した結果、前核期受精卵から培養した場合44%が胚盤胞期胚に発生し、2細胞期胚から培養した場合76～80%が胚盤胞期胚へ発生することが報告されている³⁵⁾。今後、若齢ラットを用いた体外における生殖工学技術の構築のためには、2細胞期以前の培養条件や、発生機序の変わるステージ毎にそれら初期胚に必要とされる組成を培地に添加するなどの改良が、体外受精により得られる初期胚の発生改善に必要であると示唆された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、数々の御協力と御助言を頂いた、日本エスエルシー株式会社 竹中 慎氏、アーク・リソース株式会社 柳 美穂氏、川辺 敏晃氏、京都大学医学研究科動物実験施設 滝澤 明子博士に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Toyoda Y and Chang M.C. (1968) Sperm Penetration of Rat Eggs *in vitro* after Dissolution of Zona Pellucida. *Nature*. 220; 589-591.
2. Miyamoto H and Chang M.C. (1973) Fertilization of Rat Eggs *in vitro*. *Biol.Reprod.* 9; 384-393.
3. Miyamoto H and Chang M.C. (1973) *In vitro* Fertilization of Rat Eggs. *Nature*. 241; 50.
4. 三宅正史、宮本元、入谷明、西川義正。(1973) 精巣上体精子によるラット卵子の体外受精. 日畜会報. 44; 臨時増刊.70.
5. 豊田裕。(1973) 卵子の体外受精. 遺伝. 27; 41-47.
6. 豊田裕。(1973) 卵子の体外受精. 家畜繁殖誌. 19; 11-20.
7. Toyoda Y and Chang M.C. (1974) Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J.Reprod.Fert.* 36; 9-22.
8. 江藤智生。(2007) ラット受精卵の採取・保存・個体復元. 実験動物技術. 42; 41-46.
9. Serikawa T. (2008) Year of the Rat. *Nature genetics.* 40; 513.
10. Serikawa T. (2004) Colourful history of Japan's rat resources. *Nature*. 429; 15.
11. Miyoshi K, Kono T, and Niwa K. (1997) Stage-Dependent Development of Rat 1-Cell Embryos in a Chemically Defined Medium after Fertilization *In vivo* and *In vitro*. *Biol.Reprod.* 56; 180-185.
12. Oh S H, Miyoshi K and Funahashi H. (1998) Rat Oocytes Fertilized in Modified Rat 1-Cell Embryo Culture Medium Containing a High Sodium Chloride Concentration and Bovine Serum Albumin Maintain Developmental Ability to the Blastocyst Stage. *Biol.Reprod.* 59; 884-889.
13. Niwa K and Chang M.C. (1975) Effect of Pretreatment of Rat Spermatozoa with High Concentrations of NaCl on Sperm Capacitation and Fertilization of Eggs *in vitro*. *Biol.Reprod.* 13; 187-189.
14. 野村達次。(1992) 昭和63年度～平成3年度「研究事業報告書」実験動物のモニタリング研究開発事業. pp617-631.
15. 湊芳明、豊田裕。(1980) PMSG 単一投与および PMSG-HCG 投与による幼若マウスの未熟卵排卵と排卵卵子の受精能力について. 家畜繁殖誌. 26; 81-89.
16. 石橋功、青木ひかる。(1976) 成熟ラットにおける卵子の成熟・排卵に及ぼす性腺刺激ホルモンの影響.

家畜繁殖誌 . 21; 130-134.

17. 石橋功 . (1983) 種々の量の PMSG と hCG を投与した成熟ラットにおける排卵数と受精および発育について . 家畜繁殖誌 . 29; 1-7.
18. 田谷一善、沢本二郎、笹本修司 . (1974) PMS 単一投与による幼若ラットの排卵に及ぼす日令と体重の影響並びに排卵誘起後の発情回帰について . 家畜繁殖誌 . 20; 1-6.
19. 山口孝雄、勝山慎、鈴木亘、斎藤徹、高橋和明 . (1992) hCG と PMSG の単回投与におけるマウス、シリアンハムスターおよびラットの 50%排卵誘起量の比較 . Exp.Anim. 41; 153-159.
20. 丹羽浩二、三宅正史、入谷明、西川義正 . (1976) ラット卵子の体外受精 . ホルモンと臨床 . 24; 663-669.
21. Miyoshi K, Abeydeera L R, Okuda K and Niwa K. (1995) Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. J.Reprod.Fert. 103; 27-32.
22. Matsumoto H, Shoji N, Umezumi M and Sato E. (1998) Microtubule and Microfilament Dynamics in Rat Embryos During the Two-Cell Block *In vitro*. J.Exp.Zool. 281; 149-153.
23. Miyoshi K, Funahashi H, Okuda K and Niwa K. (1994) Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity. J.Reprod.Fert. 100; 21-26.
24. 入谷明 . (1972) 哺乳動物の卵管および子宮分泌液の生理学的意義—とくに精子を中心として— . 医学のあゆみ . 42; 971-983.
25. 松本浩道 . (1996) ラット体外培養胚におけるリン酸の発生阻害に関する研究 . 博士論文 .
26. 前島一淑、笠井憲雪 . (1998) 最新実験動物学 . pp.103.
27. Miyoshi K. (1996) Studies on culture of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium. 博士論文 .
28. 金子武人、木村信哉、中瀨直己 . (2008) フリーズドライしたラット精子の長期保存と ICSI 胚の培養条件の検討 . 日本実験動物科学技術 . pp130.
29. Lon J.V.W. and Helen R.D. (1995) Differences in Amino Acid Content of Preimplantation Mouse Embryos That Develop *In vitro* Versus *In vivo* : *In vitro* Effects of Five Amino Acids That Are Abundant in Oviductal Secretions. Biol.Reprod. 52; 96-104.
30. 伊藤雅夫、樋口勝啓、佐久間勇次、猪貴義 . (1974) 過排卵処置マウスにおける排卵数と着床数の関係 . 家畜繁殖誌 . 19 ; 153-159.
31. 安斎政幸、中瀨直己、松本和也、高橋明男、高橋由美、宮田堅司 . (1994) 超急速凍結法を用いたトランスジェニックラット由来前核期受精卵の凍結保存 . 実験動物 . 43 ; 247-250.
32. Mukumoto S, Mori K, Ishikawa H. (1995) Efficient Induction of Superovulation in Adult Rats by PMSG and hCG. Exp.Anim.44;111-118.
33. Sotomaru Y, Kamisako T, Hioki K. (2005) Estrous Stage-and Animal Age-Independent Superovulation in the BrHan:WIST@Jcl (GALAS) Rat. Exp Anim.54;137-141.
34. Hirabayashi M, Ito K, Sekimoto A, Hochi S, Ueda M. (2001) Production of Transgenic Rats Using Young Sprague-Dawley Females Treated with PMSG and hCG. Exp Anim.50;365-369.
35. 藤沢信義、岡純平、横山峯介 . (2008) 過排卵誘起処理した幼若ラット卵子の体外培養：成熟動物との比較 . 日本実験動物科学技術 . pp256.

英文要旨

Study of Fertilization and Development of Wistar Rat Eggs *in vitro*.

Yuna Koda¹, Takao Nakagawa², Masahiro Morita³, Kei Ito¹,
Tadashi Nagai⁴, Haruka Sato¹, Masayuki Anzai⁵ and Akira Iritani⁵

Abstract

The present study was conducted to examine the fertilization of rat eggs and the development of early embryos *in vitro* with Wistar strain. Newly ovulated eggs from immature rats treated with PMSG and hCG were ‘inseminated’ *in vitro* with spermatozoa recovered from the cauda epididymidis of mature males. Result of the percentage to induce ovulation were 48% (61/127) at Wistar (HLA) and 67% (62/92) at WistarHannover/Rcc. Following the average of the number of ova ovulated were 41 (2,526/61) and 52 (3,238/62), respectively. The percentage of eggs undergoing fertilized were 46% (1,172/2,526) and 69% (2,226/3,238), respectively. The fertilized eggs cleaved to the two-cell embryos were 77% (900/1,172) and 88% (1,954/2,226), respectively. The two-cell embryos came from *in vitro* developed to the blastocyst is 10% (40/387) and 13% (122/923), respectively. The results of the present study indicate that super ovulation, fertilization of intact rat eggs *in vitro* and their development to the blastocyst.

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Kiwa Laboratory Animal Co, Ltd., Kebaramiya, Kimino-cho, Kaisou-gun, Wakayama 640-1473, Japan

3. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

4. Nihon Medical & Chemical Instruments Co, Ltd., Edohori, nishi-ku, Oosaka, 550-0002, Japan

5. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 642-0017, Japan