

## L-カルニチン添加体外成熟培地が マウス未成熟卵子由来初期胚の発生に与える影響

松浦 悟<sup>1</sup>、西村 愛美<sup>2</sup>、石束 祐太<sup>1</sup>、  
杉本 奈央<sup>1</sup>、中家 雅隆<sup>1</sup>、東 雅志<sup>3</sup>、  
三谷 匡<sup>4</sup>、細井 美彦<sup>1,2,4</sup>、安齋 政幸<sup>4</sup>

### 要 約

本研究では、卵子の細胞内運搬経路として密接な関係を示す、L-カルニチンを添加した体外成熟培地を用いて、マウス未成熟卵子への体外成熟および体外受精をおこない、その後の初期胚の発生改善に与える影響を検討した。私たちの開発した、修正 TaM 培地に L-カルニチン 1mM, 2mM, 5mM, 10mM を添加して体外成熟をおこなった結果、82 ~ 90% であり、非添加区 (92% : 905/987) との有意な差は認めず正常に発生した。次に、体外成熟を経て正常に発生した卵子の体外受精成績は、それぞれ 69 ~ 80% であり、非添加区 (71% : 635/889) との有意な差は認めなかった。続いて、胚盤胞期胚への発生成績は、それぞれ 24 ~ 46% であり、2mM 添加成熟培地 (46% : 136/293) および 5mM 添加成熟培地 (37% : 101/272) では、非添加区 (26% : 129/499) と比較し初期胚の発生に改善を認めた。さらに、初期胚の発生が改善された、2mM L-カルニチン添加区において、正常な産子への発生を認めた。これらの結果から、体外成熟培地への適切な濃度の L-カルニチン添加は、胚盤胞期胚への発生を有意に改善することが示唆された。

### 緒 言

始原生殖細胞は、減数分裂と成熟過程を経て、卵子に分化すると再び全能性を発揮できるようになる。発生した卵子は、雌由来の遺伝情報を伝達するのみならず、卵子成熟中に受精後の発生に必要な mRNA やたんぱく質を蓄積し、受精後に活性化する役割を持つ。この卵子の発生能において、成熟時の成熟環境は極めて重要であり、特に、卵巣内にある卵母細胞においては、様々な体外成熟培地が開発されるに至り、Eppig らは、マウス卵巣内卵子を回収し、体外成熟培養をおこない体外成熟卵子からの体外受精および初期胚の発生能力を検討し、正常な産子への発生を確認した<sup>(1)</sup>。近年では、TaM 培地を用いた体外成熟由来卵子において、微小管およびミトコンドリアの分布が体内成熟由来卵子に近く、十分な細胞質成熟が認められ受精および初期胚発生が交雑系マウスにおいて向上したと示されている<sup>(2)</sup>。西村らは、この体外成熟培地に透明帯硬化の軽減による受精能の改善を目的に、5%のウシ胎児血清を添加した、修正 TaM 培地 (mTaM 培地) を用いて近交系マウスへ適用したところ、媒精濃度の調節とレーザー穿孔処理により体外受精成績の改善に成功した<sup>(3)</sup>。しかし、得られた受精卵の初期胚発生は近交系マウスの場合、8細胞期以降に低下することが示されている<sup>(4)</sup>。

脂肪酸はエネルギー源として重要な役割を果たし、L-カルニチンと密接に関係している。この脂肪酸は、単独でミトコンドリア膜を通過できず、細胞質ゾルにおいて ACS (Acyl-CoA Synthase) により、補酵素 A と結合し活性脂肪酸に活性化される。活性脂肪酸は CPT- I によってカルニチンと結合し、アシルカルニチ

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. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 株式会社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

4. 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

ンとなってミトコンドリアを通過し、その後、アシルカルニチンは CPT- II によってカルニチンと活性脂肪酸に分解され、カルニチンシャトルにより活性脂肪酸はアセチル-CoA となり、TCA 回路で代謝される。Abdelrazik らは、L-カルニチンを受精培地に添加することで胚盤胞期への発生を改善することが示され、初期胚発生において活性酸素の発生を抑制すると考えられている<sup>(5)</sup>。

本実験では、成熟週齢雌マウスの卵巣内から GV 期卵子を回収し、修正 TaM 培地に各濃度の L-カルニチンを添加した培地を用いて、体外成熟および体外受精操作をおこない得られた初期胚の発生を検討した。

## 材料および方法

### 1. 供試動物

成熟齢に達した ICR マウス（(株) 紀和実験動物研究所）を体外成熟操作に供した。また、胚移植および里親マウスには、MCH (ICR) (日本クレア (株)) を用いた。これらのマウスは、明期：7:00～19:00 と暗期：19:00～7:00 の条件下においてライトサイクルの馴化をおこなった後、実験に供試した。飼育条件としては、室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  および湿度 50% の飼育環境下において、飼料 (500N: 日本 SLC (株)) は不断給餌とし、飲水は自由摂取させた。なお、本実験における動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規定に基づき実施した。

### 2. 培養液の調整

体外成熟培地への L-カルニチン添加は、佐東らが開発した修正 TaM 培地 (mTaM 培地) 基本培地<sup>(6)</sup> として、L-カルニチン (ロンザジャパン (株)) をそれぞれ、1mM, 2mM, 5mM, 10mM となるように添加した。卵巣からの未成熟卵子の回収には、mCZB-HEPES<sup>(7)</sup> および 0.1% になるように Hyaluronidase (H3506: SIGMA) を添加した mCZB-HEPES 培地を用いた。体外受精培地には HTF 培地<sup>(8)</sup> を用い、体外受精後における胚の洗浄および初期胚の培養には、KSOM 培地 (アーク・リソース (株)) を用いた。

### 3. 体外成熟操作

体外成熟操作は、西村らの方法に準じておこなった<sup>(3)</sup>。成熟齢 ICR 雌マウスに、血清性性腺刺激ホルモン (セロトロピン: あすか製薬 (株)) を 7.5 単位、腹腔内投与をおこなった。投与後 46 時間目に卵巣を摘出し、0.1% ヒアルロニダーゼを含む CZB-HEPES 培地内にて、26G の注射針を用い卵巣を細切することで、未成熟卵子 (以下、GV 期卵子) を回収した。得られた GV 期卵子は、ピペッティングにより卵丘細胞を除去した後、mTaM 培地あるいは L-カルニチンを各濃度添加した mTaM 培地を用いて、炭酸ガスインキュベーター内 ( $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  in air) にて、16 時間培養することで体外成熟をおこなった。体外成熟後、供試した卵子の検査は、実体顕微鏡下にて形態学的に正常に発生した M II 期卵子を確認した。次に、HTF 培地に移し、炭酸ガスインキュベーター内 ( $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  in air) にて、その後の体外受精操作に供試した。

### 4. 体外受精操作

成熟齢に達した、同系統雄マウスの精巣上体尾部から採精した新鮮精子を、HTF 培地にて約 1.5 時間培養して受精能を獲得させた<sup>(9)</sup>。次に、L-カルニチンを添加した各体外成熟培地で体外成熟した M II 期卵子に媒精をおこない (媒精濃度:  $8.0 \times 10^2$  sp/ $\mu\text{L}$ )、炭酸ガスインキュベーター内 ( $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  in air) で培養した。媒精 6 時間後に実体顕微鏡下において、雌雄両前核の有無を確認した後、KSOM 培地にて、これら前核期受精卵の選別と洗浄をおこなった。得られた前核期受精卵は、引き続き同培地によって胚盤胞期胚までの発生を経時的に観察した。

## 5. 胚盤胞期胚の移植操作

胚盤胞期へ発生した一部の胚は、偽妊娠第 2.5 日目の受容雌（Jcl：MCH（ICR））の子宮内へ移植した。胚移植後、17.5 日目において出産の有無を確認し、分娩に至らない受容雌は、帝王切開によりの産子を取り出し、里親マウスへ寄託し保育させた。

## 6. 統計学的解析

本実験操作における全ての統計学的処理は、Stat View-J 5.0 ソフトウェアにより、各実験区について分散分析値を求めた後、Fisher の PLSD により有意差の検定をおこなった。なお、統計学的な有意差の表値については、5%水準以下とした。

## 結 果

表 1 には、各濃度の L-カルニチンを添加した mTaM 体外成熟培地による、ICR マウス未成熟卵子を用いた体外成熟成績を示す。これら各濃度の L-カルニチンを添加した体外成熟培地による体外成熟率は、82～90%であり、L-カルニチン非添加区での M II 期へ発生した体外成熟卵子 92%（905/987）と比較して、有意な差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。

表 1. L-カルニチン添加体外成熟培地における体外成熟成績

L-カルニチン 添加濃度	GV 期 卵子数	M II 期 卵子発生数	体外成熟率 (%)
0mM	987	905	92
1mM	781	644	82
2mM	704	581	83
5mM	510	460	90
10mM	640	564	88

L-カルニチン添加 mTaM 培地において発生した体外成熟卵子を用いた体外受精および 2 細胞期胚への発生成績を表 2 に示した。それぞれの処理区において 67～80%の体外受精成績であり、この区においての 2 細胞期胚への発生率はそれぞれ 72～80%であった。一方、L-カルニチン非添加区では、71%（635/889）の受精成績であり、2 細胞期胚へは 79%（499/635）の発生を認めた。また、これらの受精成績および 2 細胞期胚への発生成績に顕著な差は認められなかった（ $P>0.05$ ）。

表 2. L-カルニチン添加体外成熟培地において発生した体外成熟卵子を用いた体外受精成績

L-カルニチン 添加濃度	供試卵数	受精卵数 (%)	多精子 受精卵数	2細胞期胚発生数 (%)
0mM	889	635 (71)	44	499 (79)
1mM	621	414 (67)	19	323 (78)
2mM	560	407 (73)	19	293 (72)
5mM	443	355 (80)	42	272 (77)
10mM	547	378 (69)	26	302 (80)

表 3 には、各体外成熟培地により得られた体外成熟卵子を用いた体外受精由来胚の発生成績を示す。それぞれの体外成熟由来初期胚の胚盤胞期への発生成績は、L-カルニチン非添加区では、26% (129/499) の発生を認めた。一方、L-カルニチン添加体外成熟培地により発生した初期胚の胚盤胞期への発生成績は、1mM 添加区では 27% (86/323) および 2mM 添加区では 46% (136/293) であった。また、5mM 添加区では 37% (101/272) そして 10mM 添加区では 24% (71/302) の発生成績であり、L-カルニチン 2mM および 5mM 添加成熟培地により発生した体外成熟卵子を用いた体外受精後の初期胚は、胚盤胞期への発生を改善することを認めた ( $P < 0.05$ )。

表 3. L-カルニチン添加体外成熟培地を用いたマウス未成熟卵子由来初期胚の発生成績

L-カルニチン 添加濃度	初期胚発生数 (%)			
	2細胞期	4細胞期 (%)	桑実期 (%)	胚盤胞期 (%)
0mM	499	382 (77)	328 (66)	129 (26) <sup>a</sup>
1mM	323	258 (80)	211 (65)	86 (27) <sup>a</sup>
2mM	293	245 (84)	231 (79)	136 (46) <sup>b</sup>
5mM	272	185 (68)	170 (63)	101 (37) <sup>b</sup>
10mM	302	223 (74)	182 (60)	71 (24) <sup>a</sup>

異文字間に有意差有り  $P < 0.05$

表 4 には、L-カルニチン非添加区および 2mM 添加体外成熟培地により得られた体外成熟卵子由来胚における胚盤胞期胚の移植成績を示す。各体外成熟由来初期胚の移植成績は、L-カルニチン非添加区においては 37% (36/98) が着床し、17% (17/98) が正常産子へと発生した。一方、L-カルニチン 2mM 添加区においては 57% (40/70) が着床し、19% (13/70) が正常産子へと発生し、非添加区と同等の産子獲得を示した。また、得られたマウスの妊孕性の確認のため、無作為に選抜した雌雄を交配したところ、いずれのマウスにおいて妊娠と出産を確認できた。

表 4. L-カルニチン添加体外成熟培地により得られた体外成熟由来胚の移植成績

L-カルニチン 添加濃度	移植卵子数	着床数 (%)	産子数 (%)	雌 雄	
				雄	雌
0mM	98	36 (37)	17 (17)	8	9
2mM	70	40 (57)	13 (19)	6	7

## 考 察

体外成熟由来卵子における核相から判断される核成熟は、受精および初期発生を引き起こすために十分な状態であるにもかかわらず、初期発生は、体内成熟由来卵子と比較して低率である。これは、細胞質の不十分さ (Cytoplasmic incoherence) が体外成熟由来卵子には起因しており、体内成熟由来卵子と比較して低い初期胚発生能を示す。卵子成熟では、核成熟と細胞質成熟の調和が必要であり<sup>(10)</sup>、現在、体外成熟培養技術では、核成熟がうまく進行しても細胞質成熟が十分に誘起されないことが重大な問題となっている<sup>(11)</sup>。細胞質成熟は、細胞質内小器官の局在変化が関係し、特に、エネルギー生産器官であるミトコンドリアと  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションを発生する小胞体の分布が、成熟卵子の受精および初期胚発生能の獲得に重要な役割を果たしている<sup>(12,13)</sup>。卵子成熟過程におけるミトコンドリア分布は、GV 期では、活性ミトコンドリアが卵母細胞の表層周囲に局在し、その後、M I 期から M II 期へと成熟過程を経て、表層から内部に移送され、十分な細胞質成熟を伴った M II 期卵子では細胞質全体に拡散している<sup>(14,15)</sup>。したがって、本実験において体外成熟培地への L-カルニチン添加における、体外成熟由来卵子からの初期胚の効率的な作製の成功には、これらの活性が向上し細胞質の成熟が改善したものと考えられる。

Balaban らは、ミトコンドリアは、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の発生源の一つで、活性酸素種によるタンパク質、脂質、核酸の細胞組織が酸化修飾を受け、生体機能に異常をきたすとされており<sup>(16,17)</sup>、ミトコンドリア DNA (以下、mtDNA) 上に生じた変異によってミトコンドリア機能異常が引き起こされ、ミトコンドリア疾患と呼ばれる重篤な症状を示すことが知られている<sup>(18,19)</sup>。マウス卵子における mtDNA 量は受精時に最大となり、卵割以降、mtDNA 量は半分ずつ減少し胚盤胞期の内部細胞塊において体細胞とほぼ同等となり<sup>(20)</sup>、マウス初期胚における発生過程では、一つの胚における mtDNA 量は変化しないと考えられている。また、TNF- $\alpha$  は多くの細胞においてカスパーゼのカスケードを活性化し、アポトーシスを誘導する炎症性サイトカインの一種であり、ヒト<sup>(21)</sup> およびラット<sup>(22)</sup> そしてマウス<sup>(23)</sup> の子宮内で生産されることが報告されている。TNF- $\alpha$  は、マウス体外初期発生において発育を抑制およびアポトーシスを誘導し胚盤胞において細胞数の減少およびアポトーシスを増加させる<sup>(23)</sup>。さらに、TNF- $\alpha$  処理したマウス胚盤胞の移植による産子獲得は発育阻害が認められ<sup>(24)</sup>、TNF- $\alpha$  投与マウスによる妊娠マウスにおいても同様な報告がされている<sup>(23)</sup>。一方で、L-カルニチンは、活性酸素種からの酸化修飾を抑制することが確認されており<sup>(25)</sup>、さらに、TNF- $\alpha$  によるアポトーシスを誘導を抑制することが報告されている<sup>(5)</sup>。本実験において、体外成熟培地への L-カルニチン添加は、ATP 合成を高レベルで維持し、ミトコンドリア活性において発生した活性酸素種の酸化修飾を抑制したことで、体外成熟由来卵子の胚盤胞期胚への発生が向上したと考えられた。

本研究において、私たちが開発した、5% ウシ胎児血清を含む修正 TaM 培地 (mTaM 培地) への L-カルニチンの添加は、ICR 系統マウスにおける卵丘細胞を除去した未成熟卵子を用いた、体外成熟後の初期胚発生成績を向上することが示された。一方で、mTaM 培地への過度な L-カルニチン添加は、初期胚の

発生を改善しないことも示唆された。これらは、mTaM 培地への適切な L-カルニチン添加がマウス体外成熟培地として期待できると考えられ、今後、複合的に存在する成長因子や明確ではない総タンパク質成分を含有するウシ胎児血清<sup>(26)</sup>に頼らない、既知のアミノ酸成分の添加あるいは高純度なアルブミン代替物質の添加による、マウス体外成熟培地の確立が進むと思われる。

## 参考文献

1. Eppig J.J., Schroeder A.C. (1989). Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol.Reprod.*41 : 268-276.
2. Miki H., Ogonuki M., Inoue K., *et al.* (2006). Improvement of Cumulus-free Oocyte Maturation In Vitro and Its Application to Microinsemination with Primary Spermatoocytes in mice. *J.Reprod. Dev.*52 : 239-248.
3. 西村愛美, 西山有依, 柳美穂, 川辺敏晃, 三谷匡, 細井美彦, 安齋政幸. (2010). C57BL/6 体外成熟卵子を用いた透明帯レーザー穿孔処理後における媒精濃度が体外受精成績にあたえる影響. *J. Mamm. Ova Res.* 27 : 62.
4. 西村愛美, 大本夏未, 西山有依, 柳美穂, 三谷匡, 細井美彦, 入谷明, 安齋政幸. (2010). C57BL/6 系未成熟卵子を用いた成熟後におけるレーザー穿孔処理・体外受精方法の検討. *近畿大学先端研紀要.*15 : 27-35.
5. Abdelrazik H., Aharma R., Mahfouz R., *et al.* (2009). L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil.Steril.*91 : 859-896.
6. 佐東春香, 西村愛美, 森田真裕, 古田祐奈, 柳美穂, 安齋政幸. (2009). 近交系 C57BL/6 マウスの未成熟卵子を用いた体外成熟および発生能の検討. *実験動物技術.* 44 : 43-48.
7. Kawasumi M., Unno Y., Matsuoka T., *et al.* (2009). Abnormal DNA methylation of the Oct-4 enhancer region in cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev.*76 : 342-350.
8. Quinn P., Kerin JF., Warnes GM. (1985). Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid.*Fertil Steril.*44 : 493-498.
9. 豊田裕, 横山峯介, 星冬四朗. (1971). マウス卵子の体外受精に関する研究 I. 精巢上体精子による受精成績. *家畜繁殖誌.* 16 : 147-151.
10. Eppig JJ. (1996). Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil.*8 : 485-489.
11. Gilchrist R.B., and Thompson J.G. (2007). Oocyte maturation : emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology.*67 : 6-15.
12. Brevini T.A., Cillo F., Antonini S., *et al.* (2007). Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim.Reprod.Sci.*98 : 23-38.
13. Ajduk A., Malagocki A., Maleszewski M. (2008). Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes : development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca<sup>2+</sup>oscillations. *Reprod.Biol.*8 : 3-22.
14. Brevini T.A., Vassena R., Francisci C., *et al.* (2005). Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biol.Reprod.*72 : 1218-1223.

15. Stojkovic M., Machado S.A., Stojkovic P., *et al.* (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation : correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol.Reprod.* 64 : 904-909.
16. Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120 : 483-495.
17. Baughman J.M., Mootha V.K. (2006). Buffering mitochondrial DNA variation. *Nat.Genet.*38 : 1232-1233.
18. Wallace D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.*283 : 1482-1488.
19. Zeviani M., Di Donato S. (2004). Mitochondrial disorders. *Brain.*127 : 2153-2172.
20. Cao L., Shitara H., Horii T., *et al.* (2007). The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat.Genet.*39 : 386-390.
21. Kane M.T., Morgan P.M., Coonan C. (1997). Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum.Reprod.Update.*3 : 137-157.
22. Pampfer S. (2001). Dysregulation of the cytokine network in the uterus of the diabetic rat. *Am.J.Reprod.Immunol.*45 : 375-381.
23. Kawamura K., Kawamura N., Kumagai J., *et al.* (2007). Tumor necrosis factor regulation of apoptosis in mouse preimplantation embryos and its antagonism by transforming growth factor alpha/ phosphatidylinositol 3-kinase signaling system. *Biol.Reprod.*76 : 611-618.
24. Wu Y.D., Pampfer S., Becquet P., *et al.* (1999). Tumor necrosis factor alpha decreases the viability of mouse blastocysts in vitro and in vivo. *Biol.Reprod.*60 : 479-483.
25. Somfai T., Kaneda M., Akagi S., *et al.* (2011). Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 23 : 912-920.
26. Kalab P, Kopf GS, Schultz RM. (1991). Modifications of the mouse zona pellucida during oocyte maturation and egg activation : effects of newborn calf serum and fetuin. *Biol. Reprod.* 45 : 783-787.

## 英文要旨

Influence of L-Carnitine under *in vitro* maturation media in early embryo development

Satoru Matsuura<sup>1</sup>, Manami Nishimura<sup>2</sup>, Yuta Ishizuka<sup>1</sup>, Nao Sugimoto<sup>1</sup>, Masataka Nakaya<sup>1</sup>,  
Masashi Azuma<sup>3</sup>, Tasuku Mitani<sup>4</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>1, 2, 4</sup> and Masayuki Anzai<sup>4</sup>

**Abstract**

In this study, mouse immature oocytes of ICR used *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization, since analysed early embryos development. PMSG interperitoneal administration mouse collected immature oocytes removal cumulus oocyte complexes (COCs). *In vitro* maturation experimented with modified TaM medium or modified TaM medium supplement with L-Carnitine 1mM, 2mM, 5mM, and 10mM. *In vitro* maturation oocytes fertilized sperm of ICR. *In vitro* maturation medium supplement with L-Carnitine of maturation rate was 82 to 90%. There was not significant differential L-Carnitine non supplement. *In vitro* fertilization rate of L-Carnitine supplement was 67 to 80%. There was not significant differential L-Carnitine non supplement. *In vitro* early embryos development resulted 26% (129/499), 27% (86/323), 46% (136/293), 37% (101/272) and 24% (71/302) respective. Moreover, Supplement with L-Carnitine 2mM and 5mM of blastcyst rate was significant higher than L-Carnitine 0mM of blastcyst rate ( $p < 0.05$ ). In conclusion, *in vitro* maturation medium supplement with appropriate L-Carnitine suggested that blastcyst rate was improvement.

---

1. Development of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan.

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

3. Kiwa Laboratory Animal Co, Ltd., Wakayama 640-1473, Japan.

4. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 649-0017, Japan.