

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A )

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 515138

(P2003 - 515138A)

(43)公表日 平成15年4月22日(2003.4.22)

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | 識別記号 | F I           | テマコード* (参考) |
|----------------------------|------|---------------|-------------|
| G 0 1 N 33/53              |      | G 0 1 N 33/53 | D 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 38/00              |      | A 6 1 K 45/00 | 4 B 0 6 3   |
| 45/00                      |      | A 6 1 P 9/00  | 4 C 0 8 4   |
| A 6 1 P 9/00               |      | 9/12          | 4 H 0 4 5   |
| 9/12                       |      | 15/00         |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 63数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 538816(P2001 - 538816)

(86)(22)出願日 平成12年11月10日(2000.11.10)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月16日(2002.5.16)

(86)国際出願番号 PCT/GB00/04315

(87)国際公開番号 W001/036979

(87)国際公開日 平成13年5月25日(2001.5.25)

(31)優先権主張番号 9927125.6

(32)優先日 平成11年11月16日(1999.11.16)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 ユニヴァーシティー オブ リーディング  
イギリス国 アールジー6 6エイエイチ  
リーディング ホワイトナイツ ホワイト  
ナイツ ハウス

(72)発明者 ペイジ, ナイジェル  
イギリス国 アールジー6 6エイジェイ  
リーディング ピーオー ボックス 228  
ホワイトナイツ ユニヴァーシティー オ  
ブ リーディング スクール オブ アニ  
マル マイクロバイアルサイエンス

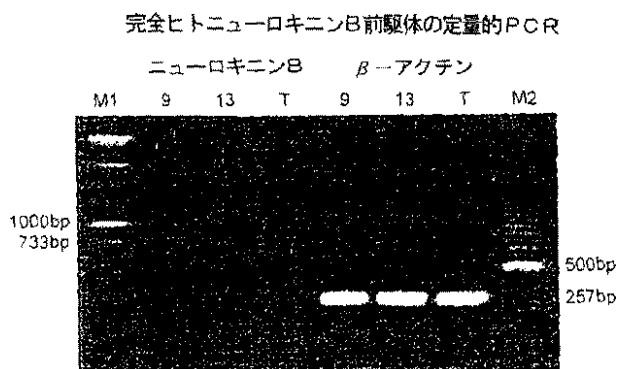
(74)代理人 弁理士 柳田 征史 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 胎盤ヒトニューロキニンB前駆体

(57)【要約】

ニューロキニンB、その前駆体、およびそれらの断片の産生の測定によって妊娠誘発性高血圧または子癇前症を診断する方法、ならびにそのような方法で使用するためのキットを提供する。さらに、そのような症状の治療法、および適切な薬剤を調製する方法、ならびに抗体および有用な抗原性物質を提供する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する抗体等の結合パートナーを含んでなる、妊娠誘発性高血圧、あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測または診断のためのキット。

【請求項2】 生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測するための測定法を実施し、さらにその結果を妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測される将来の発症と関連付けるための使用説明書をさらに含んでなる請求項1記載のキット。

【請求項3】 生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測するための測定法を実施し、さらにその測定結果を妊娠誘発性高血圧ならびに子癇前症または関連する胎児合併症の予測される将来の重篤性と関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する抗体等の結合パートナーを含んでなる、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の将来の程度の評価において使用するためのキット。

【請求項4】 前記結合パートナーが、ニューロキニンB前駆体、またはニューロキニンB、あるいはそれらのエピトープ断片またはエピトープ変異体に特異的な抗体であることを特徴とする請求項1から3何れか1項記載のキット。

【請求項5】 前記結合パートナーが、図1記載の配列を有するヒトニューロキニンB前駆体あるいはそのエピトープ変異体またはエピトープ断片に特異的な抗体であることを特徴とする請求項1から4何れか1項記載のキット。

【請求項6】 ラジオイムノアッセイキット、酵素免疫測定法キット、イムノラジオメトリックアッセイキット、またはラジオレセプターアッセイキットであることを特徴とする請求項1から5何れか1項記載のキット。

【請求項7】 ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質を投与することによって、ヒト被検者における妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症を予防または治療する方法。

【請求項8】 前記ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質が、NK<sub>1</sub>、NK<sub>2</sub>、またはNK<sub>3</sub>アンタゴニストであることを特徴とする請求項7記載の方法。

【請求項9】 前記NK<sub>3</sub>アンタゴニストが、A<sup>1</sup>-D-Pro<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>-D<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-D-Trp<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>-D-Trp<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Nle<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>の化学式を有するデカペプチドであって、A<sup>1</sup>およびD<sup>4</sup>がAspまたはD-Aspアミノ酸であるデカペプチド、あるいはSR 142801であることを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項10】 前記ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質が、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーターの活性を調節する物質であることを特徴とする請求項7記載の方法。

【請求項11】 前記物質が、24時間に亘り有効であるように選択および投与されることを特徴とする請求項7から10何れか1項記載の方法。

【請求項12】 妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測または診断において使用するための診断薬の製造におけるヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の使用。

【請求項13】 前記遺伝子産物が、ヒトニューロキニンB前駆体またはヒトニューロキニン、あるいはそのエピトープ変異体またはエピトープ断片であることを特徴とする、請求項12記載のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の使用。

【請求項14】 妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測または診断において使用するための診断薬の製造におけるニューロキニンBの使用。

【請求項15】 妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予防または治療のための薬剤の製造におけるヒトニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質の使用。

【請求項16】 前記ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質が、NK<sub>1</sub>、NK<sub>2</sub>、またはNK<sub>3</sub>アンタゴニストであることを特徴とする請求項15記載の使用。

【請求項17】 前記NK<sub>3</sub>アンタゴニストが、SR 142801、あるいはA<sup>1</sup>-D-Pro<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>-D<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-D-Trp<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>-D-Trp<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Nle<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>の化学式を有するデカペプチドであって、A<sup>1</sup>およびD<sup>4</sup>がAspまたはD-Aspアミノ酸であるデカペプチド、であることを特徴とする請求項15記載の使用。

【請求項18】 前記ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質が、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーターの活性を調節する物質であることを特徴とする請求項15記載の使用。

【請求項19】 前記薬剤が、24時間に亘り有効であるように製剤化されることを特徴とする請求項15から18何れか1項記載の使用。

【請求項20】 血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することによって、ヒト被検者での初期における妊娠誘発性高血圧あるいは子癰前症または関連する胎児合併症を予測または診断する方法。

【請求項21】 血液等の生体試料中のヒトニューロキニンBまたはその前駆体の濃度を評価することによって、ヒト被検者での初期における妊娠誘発性高血圧を予測または診断し、あるいはヒト被検者での初期における子癰前症または関連する胎児合併症を予測する方法。

【請求項22】 ニューロキニンBおよびその前駆体が、それぞれ図1および図2の配列を有することを特徴とする請求項21記載の方法。

【請求項23】 請求項1または2記載のキットを使用することを含んでなる、請求項20から22何れか1項記載の方法。

【請求項24】 血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価し、さらにその結果を妊娠誘発性高血圧あるいは子癰前症または関連する胎児合併症の予測される将来の重篤性と関連付けることによって、ヒト被検者における妊娠誘発性高血圧あるいは子癰前症または関連する胎児合併症の将来の程度を予測する方法。

【請求項25】 血液等の生体試料中のヒトニューロキニンBの濃度を評価することを含んでなる請求項24記載の方法。

【請求項26】 請求項3から5何れか1項記載のキットの使用を含んでなる請求項24または25記載の方法。

【請求項27】 前記キットが、ニューロキニンBに特異的な抗体を含むことを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項28】 前記キットが、ラジオイムノアッセイキット、酵素免疫測

定法キット、イムノラジオメトリックアッセイキット、またはラジオレセプターアッセイキットであることを特徴とする請求項26または27記載の方法。

【請求項29】 低血圧の場合に血液容量を減らすためのニューロキニンBまたはそのアゴニストの使用。

【請求項30】 低血圧の場合に血液容量を減らすための薬剤の調製におけるニューロキニンBまたはそのアゴニストの使用。

【請求項31】 毒素発生物質の含有量を減らすようにヒト被検者の食事を調整することによって、ヒト被検者の子癇前症を改善する方法。

【請求項32】 門脈中の潜在的毒素の濃度を減らすように被検者の食事パターンを調整することを含んでなる、ヒト被検者の子癇前症を改善する方法。

【請求項33】 毒素発生物質の量を減らすことを特徴とする、ヒト被検者の子癇前症を改善する食事方法。

**【発明の詳細な説明】**

本発明は、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する（もしくはその経過に続く）胎児合併症の兆候を予測する手段としての、胎盤によるヒトニューロキニン B 前駆体の産生の検出、およびニューロキニン B 遺伝子産物あるいはその変異体または断片の検出に関する。また、本出願は、母体血液中に分泌された過剰なニューロキニン B の効果を抑制することによって妊娠誘発性高血圧または子癇前症を予防または治療する方法に関する。

妊娠の最も捕らえどころが無くかつ複雑な症状である妊娠誘発性高血圧（PIH）および子癇前症は、定義および管理するのが非常に困難であった。子癇前症は、西側諸国において、今でも最も一般的でかつ生命に関わる妊娠合併症の 1 つである。子癇前症の兆候および症状はいつも一連の症状として現れるため、主な原因を解明するのは困難であった。従って、一般的に、母体の高血圧および蛋白尿の特徴を示す症候群として定義されているが、母体の肝臓、凝固、および神経系等に関連する広範囲の合併症を含む(Henriksen, T., (1998) Scand. J. Rheumatol. Suppl. 107 86-91)。子癇前症の臨床的問題は、通常、妊娠後期においてのみ明白になり、妊娠の最初の 3 ヶ月の間に出現すると考えられている。胎盤組織が母体の子宮に存在する場合にのみ子癇前症が現れることは明らかであろう。実際、子宮が異常胎盤組織のみを有する胞状奇胎の症状が子癇前症と共に表れる(Nugent, C.E, et al (1966) Obstet. Gynecol. 87 829-31)。妊娠の経過の間に子癇前症が診断され、分娩の間に胎盤組織が外科的に除去または追い出されると、症状は最終的に消える。胎盤 / 子宮脈管系の乏しい発達から母体と胎児との間の免疫不適合まで広範囲にわたる、子癇前症の原因についての多くの示唆が示されている。それら理論はいくつかの物質を示唆するが、それら物質はその症候群の全身的効果を説明するものではない。多くの症状は、高血圧の二次的影響の結果であり、その症候群の直接的原因ではないと思われる。従って、PIH または子癇前症の早期検出は、高血圧、ならびに例えば痙攣、血液凝固問題(blot clotting problems)等の子癇前症に関連する他の合併症の特異的治療を含む、予防手段をとることを可能とする大きな利点を有する。

子癇前症を有する妊婦において現れる胎盤損傷および高血圧は、成長遅延およ

び胎児仮死等の胎児合併症の危険性の上昇に関連すると考えられている。極端な場合、それは流産の原因となる。他の研究において、子癰前症は、胎児成長遅延への母体および胎児の順応と仮定されている。胎児成長遅延を有する全ての妊婦が子癰前症を発症するわけではないので、決定的因子は母体の反応である(Walker, J. (2000) The Lancet 356 1260-1265)。その順応の特徴は、子癰前症のみならず、胎児成長遅延および流産にも存在する。例えば、母体血漿量の正常な増加の失敗は、障害のある胎児成長および子癰前症の両方に関連する(Gulmezoglu AM, Hofmeyr GJ (2000) Cochrane Database Syst Rev 2 CD000167)。例えば血栓嗜好症等の子癰前症において観察される問題は、異常な胎盤における血栓性病変の結果であることが示唆されている(Mousa HA, Alfirevic Z (2000) Hum Reprod 151830-3)。従って、子癰前症と胎児成長遅延および胎児仮死は関連し、子癰前症の診断法および治療が、それら胎児症状の予測、診断および/または治療にも適合し得ることは明らかである。

ニューロキニンB (NK B) はタキキニンと称されるペプチドファミリーに属し、そのファミリーの中で最初に公知となりかつ最も良く知られているのが1931年に発見されたサブスタンスPである(von Euler, U.S. and Gaddum, J.H. (1931) J Physiol 72: 74-87)。タキキニンファミリーの他の2つのメンバーの発見はさらに50年後であり、その一方はサブスタンスKすなわちニューロキニンA(Kimura, S., et al (1983) Proc. Japan Acad 59B 101-104)であり、もう一方はニューロキニンKであり、現在ニューロキニンBとして知られている(Kan gawa, K., et al (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 114 533-540)。タキキニンは、平滑筋収縮から、血管拡張、疼痛伝達、神経性炎症、免疫系の活性化までの広範囲な生物学的作用に関連している(Longmore, J., et al., (1997) Canadian J. Physio. & Pharmacol. 75 612-621)。ニューロキニンBは、腸間膜血管床の血管収縮(D'Orleans-Juste, P. et al (1991). Eur. J. Pharmacol. 204 329-334)および肝門脈の収縮(Mastrangelo, D., et al (1987) Eur J Pharmacol. 134, 321-6)の両方を生じさせる最も強力なニューロキニンであることが分かっている。また、ニューロキニンBは、ファミリーの中でNK<sub>3</sub>受容体で作用する最も強力なメンバーであり、サブスタンスPおよびKは心拍数を下げるが、

NK<sub>3</sub>受容体アゴニストはイヌの冠動脈血液供給中に灌流させた場合に心拍数を高める反対の効果を有する(Thompson, G.W. et al (1998) American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology 275 (5), 1683-1689)。動物モデルにおいて、ニューロキニンBのモルモットへの静脈注射が用量依存的な高血圧をもたらすことが示されており、高レベルのニューロキニンBアゴニストが動物に不快感をもたらした(Roccon, A., et al (1996) Brit. J. Pharmacol. 118 1095-1102)。同様の実験が、ラットにおけるニューロキニンBの静脈注入によって血圧が上昇することを示している(Page et al., (2000) Nature 405 797-800)。ニューロキニンBは実験動物から採取した任意の末梢組織において正確には認められていない；例えばMoussaouiらは、非常に高感度でかつ特異的な測定系を用いて広範囲の末梢組織を調べて、ニューロキニンBの形跡を全く見つけることができなかった(Neuroscience (1992) 48, 967-978)。

プロセシングによって他の哺乳類(ウシ、ブタ、ラット、およびマウス)のニューロキニンBと同一のペプチドを生じさせるヒトニューロキニンB前駆体が同定された(Incyte Pharmaceuticals Inc., 国際特許出願第W098/57986号)。驚くべきことに、そのニューロキニンB前駆体は、妊娠の間、胎盤組織によって産生され、さらにニューロキニンBおよび前駆体の断片が母体の血流中に入ることを我々は発見した。

正常な妊娠において、出産間近に実質的レベル(例えば100ピコモル程度)のニューロキニンBが母体血流中において認められるが、それ以前にはゼロまたは非常に低レベルであることを我々は見出した。しかしながら、時には、妊娠初期(例えばたった9週間後)に出産間近のレベルが特定されており、さらに妊娠誘発高血圧または子癇前症の場合、非常に高い(ナノモル)濃度のニューロキニンBが、出産間近の母体の血漿において認められる。従って、ニューロキニンB、ニューロキニンB前駆体またはその分解産物、あるいはそれらの変異体の初期における上昇した血漿レベルの検出は、高血圧または子癇前症の発症の指標を提供し、さらにそれら症状の将来の重篤性の指標をも提供するであろう。さらには、循環ニューロキニンBレベルの低下(またはその効果の低下)は、それら症状において認められる母体に対する不都合な効果を改善するであろう。子癇前症と

、胎児成長遅延および／または胎児仮死等の胎児合併症との間の関連性の結果として、ニューロキニンBアゴニストまたはアンタゴニストはそれら症状を改善するのに有用であろう。また、ヒトニューロキニンB前駆体の過剰産生は、妊娠していない個体での特定の高血圧症状の要因となり得る（ニューロキニンBの効果、または前駆体の他の1つ以上の分解産物の効果の何れかを介して）。

#### 発明の概要

本発明の第1の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することによって、ヒト被検者での妊娠誘発性高血圧を予測する方法を提供する。

本発明の第2の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することによって、ヒト被検者での子癇前症または関連する胎児合併症を予測する方法を提供する。

本発明の第3の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することによって、ヒト被検者での妊娠誘発性高血圧を診断する方法を提供する。

本発明の第4の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することによって、ヒト被検者での子癇前症または関連する胎児合併症を診断する方法を提供する。

好ましくは、第1、第2、第3、または第4の態様の方法は、例えば血液等の生体試料中のニューロキニンBの濃度を評価することを含む。

本発明の第5の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価し、さらにその結果を妊娠誘発性高血圧の予測される将来の重篤性と関連付けることによって、ヒト被検者における妊娠誘発性高血圧の将来の程度を予測する方法を提供する。

本発明の第6の態様において、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価し、さらにそ

の結果を子癇前症または関連する胎児合併症の予測される将来の重篤性と関連付けることによって、ヒト被検者における子癇前症または関連する胎児合併症の将来の程度を予測する方法を提供する。

好ましくは、第5および第6の態様の方法は、例えば血液等の生体試料中におけるヒトニューロキニンBの濃度を評価し、さらにその結果をそれぞれ妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測される将来の重篤性と関連付けることを含む。

本発明の第7の態様において、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質を投与することによって、ヒト被検者での妊娠誘発性高血圧を予防または治療する方法を提供する。

本発明の第8の態様において、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質を投与することによって、ヒト被検者での子癇前症または関連する胎児合併症を予防または治療する方法を提供する。

本発明の第9の態様において、妊娠誘発性高血圧の予測または診断で用いるための診断薬の製造における、ヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の使用を提供する。

本発明の第10の態様において、子癇前症または関連する胎児合併症の予測または診断で用いるための診断薬の製造における、ヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の使用を提供する。

好ましくは、第9および第10の態様は、ヒトニューロキニンB前駆体のエピトープ変異体またはエピトープ断片の使用を含む。より好ましくは、本方法は、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予測または診断で用いるための診断薬の製造におけるニューロキニンBの使用を含む。

本発明の第11の態様において、妊娠誘発性高血圧の予防または治療のための薬剤の製造における、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質の使用を提供する。

本発明の第12の態様において、子癇前症または関連する胎児合併症の予防または治療のための薬剤の製造における、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質の使用を提供する。

第11および第12の態様の好ましい実施形態において、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予防または治療において使用するための、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質を含む薬剤組成物を提供する。

本発明の第13の態様において、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、妊娠誘発性高血圧の予測または診断のためのキットを提供する。

本発明の第14の態様において、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、子癇前症または関連する胎児合併症の予測または診断のためのキットを提供する。

本発明の第15の態様において、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測する測定法を実施し、さらにその測定結果を妊娠誘発性高血圧の予測される将来の発症と関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、妊娠誘発性高血圧の予測または診断のためのキットを提供する。

本発明の第16の態様において、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測する測定法を実施し、さらにその測定結果を子癇前症または関連する胎児合併症の予測される将来の発症と関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、子癇前症または関連する胎児合併症の予測または診断のためのキットを提供する。

本発明の第17の態様において、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測する測定法を実施し、さらにその測定結果を妊娠誘発性高血圧の予測される将来の重篤性と関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、妊娠誘発性高血圧の将来の程度の評価において使用するためのキットを提供する。

本発明の第18の態様において、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測する測定法を実施し、さらにその測定結果を子癇前症または関連する胎児合併

症の予測される将来の重篤性に関連付けるための使用説明書と共に、ニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む、子癇前症または関連する胎児合併症の将来の程度の評価において使用するためのキットを提供する。

好ましくは、本発明の第 13 の態様から第 18 の態様までのキットは、ニューロキニン B 前駆体、ニューロキニン B、あるいはそれらのエピトープ変異体またはエピトープ断片に対する例えば抗体等の結合パートナーを含む。さらに好ましくは、本キットは、図 1 または 2 のポリペプチド配列、あるいはそのエピトープ変異体またはエピトープ断片に対する結合パートナーを含む。

本発明の第 19 の態様において、低血圧の場合に血液容量を減らすための薬剤の調製におけるニューロキニン B アゴニストまたはニューロキニン B の使用を提供する。

本発明の第 20 の態様において、低血圧の場合に血液容量を減らすためのニューロキニン B アゴニストまたはニューロキニン B の使用を提供する。

本発明の第 21 の態様において、毒素発生物質の含有量を減らすようにヒト被検者の食事を調整することを含む、ヒト被検者での子癇前症を改善する方法を提供する。

本発明の第 22 の態様において、門脈中の潜在的毒素の濃度を減らすようにヒト被検者の食事パターンを調整することを含む、ヒト被検者での子癇前症を改善する方法を提供する。

本発明の第 23 の態様において、毒素発生物質の量を減らすことによる、ヒト被検者での子癇前症を改善するための食事方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、クローン化ヒトニューロキニン B 前駆体のポリペプチド配列を示す（登録番号 aaf76980 で利用可能）。

図 2 は、活性ニューロキニン B ペプチドのポリペプチド配列を示す。

図 3 は、ヒトニューロキニン B 前駆体の胎盤 cDNA のポリヌクレオチド配列を示す：A T G は開始コドンであり；T A G は終止コドンであり；A A T A A A はポリアデニル酸シグナルであり；A A A A A はポリ A テイルであり；さらに G

G C A C A G A G C T G C T C C A C A G G C A C Cは、ウシクローンに類似の、完全遺伝子を増幅するために用いられるニューロキニンB前駆体（登録番号08858）の人類cDNAクローン138761（登録番号R63635）に基づくPCRプライマーである。

図4は、27928塩基対プロモーター領域、イントロン、および7つのエキソン（下線）を含む、ニューロキニンBのゲノム配列を示す。

図5は、9週、13週、および妊娠満期に採取したmRNAを用いた、完全ヒトニューロキニンB前駆体の半定量的PCRの結果を示す。733bp完全長のニューロキニンB前駆体cDNAを増幅するため、9週、13週、および妊娠満期（T）に採取したmRNAを用いて逆転写PCRを実施した。β-アクチンのためのプライマーを対照（257bp）として用いた。M1は1kbのDNAラダーを示し；M2は100bpのDNAラダーを示す。

図6は、ヒト妊娠血漿およびヒト妊娠満期胎盤における酸化ニューロキニンBおよび還元ニューロキニンBの結果を示す。胎盤抽出物中に、相当量（妊娠初期において $2.1 \text{ pg g}^{-1}$ 、妊娠満期において $2.5 \text{ pg g}^{-1}$ ）のペプチドが存在していることが示され、そのクロマトグラフィーの挙動は、合成NK Bのものに一致した。抽出の間における胎盤NK Bの部分的酸化は、2つのメチオニン残基の一方または両方が酸化された、3つの酸化形態の産生をもたらした（aは血漿、bは胎盤での結果）。得られたメチオニンスルホキシドは疎水性の低下をもたらし、従って、還元形態より先に溶出した。その溶出パターンは、過酸化水素による合成NK Bの部分的酸化によってもたらされたパターンに一致した。過酸化水素による完全酸化は、全てのNK Bの第1ピーク位置での溶出をもたらした。同様の溶出パターンが、妊娠満期の胎盤試料（b）からのNK B抽出後においても観察された。

図7は、意識のあるラットにおけるニューロキニンBの心血管効果を示す。意識のある抑制されていないメスラットにおける、生理食塩水または漸増用量のNK Bの注入の間における血圧および心拍数の変化を示す。0分から $1.8 \text{ nmol h}^{-1}$ （kg当たり）、16時間から $1.8 \text{ nmol h}^{-1}$ （kg当たり）、さらに20時間から $1.8 \text{ nmol h}^{-1}$ （kg当たり）の用量でNK Bを注入した。値は平均値 $\pm$ s.e.で示す。\*

は基線および  $t = 20$  時間での値との有意差を示す(Friedman's test)。

図8は、ヒトおよびラットの胎盤におけるニューロキニンB mRNAのin situハイブリダイゼーションを示す。aはヒトアンチセンスプローブを用いた妊娠満期(39週)のヒト胎盤、bはヒトセンスプローブを用いた妊娠満期(39週)のヒト胎盤、cはラットアンチセンスプローブを用いた18日目のラット胎盤、dはニューロキニンBを発現するラット胎盤の巨細胞を高倍率で示したものである。倍率は、a = 10倍、b = 10倍、c = 16倍、d = 40倍である。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、部分的に、発達中の胎盤による母体血流へのニューロキニンBの早期のおよび/または過剰な放出が妊娠誘発性高血圧および子癇前症の原因となり得ることの発見に基づく。特に、妊娠誘発性高血圧または子癇前症に罹りやすい人が、妊娠の約10週から12週において、母体血流中のニューロキニンレベルの僅かな上昇を有することが前提とされる。例えば10週から12週またはそれ以前のような妊娠初期におけるニューロキニンBの監視は、個体が妊娠後期に妊娠誘発性高血圧または子癇前症に罹りやすいか否か、および例えば胎児成長遅延、胎児仮死、または流産等の子癇前症に関連する胎児合併症に罹りやすいか否かを予測するのに有用である。例えば18週のような妊娠10週から12週より後でのニューロキニンBレベルの測定は、その予測を確認し、さらに妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の診断を行うことを可能とする。さらには、妊娠誘発性高血圧または子癇前症の最初の予測の後のニューロキニンBレベルの上昇レベルが将来の症状の重篤性に相関することが観察された。特に、ニューロキニンBの上昇の程度と将来の症状の重篤性との間に関連性が存在することが示された。それら所見を、将来の症状の重篤性の予測において用いることができる。また、ヒトニューロキニンB前駆体の他のプロセッシング断片もそれら症状の発症に関連するであろう。さらには、ニューロキニンBおよび/またはヒトニューロキニンB前駆体の他の断片の産生が、妊娠していない個体における高血圧の発症に関連するであろう。

本発明において、胎児合併症は、子癇前症に関連する任意の胎児症状を含む。特に、胎児合併症は、胎児成長遅延、胎児仮死、満期前出産、および重症例では

流産を含む。

本発明の目的において、ニューロキニンB前駆体遺伝子産物は、ニューロキニンB前駆体またはニューロキニンBをコードするポリヌクレオチド配列、ならびにニューロキニンB前駆体ポリペプチドを含む。ポリヌクレオチド配列は、例えば図3または4記載の配列のようなゲノム配列またはcDNA配列、およびRNA、好ましくはmRNAを含む。好ましくは、ニューロキニンB前駆体ポリペプチドは、図1記載の配列を有する。ニューロキニンB前駆体遺伝子産物の断片は、前駆体遺伝子産物から派生した断片であり、ニューロキニンBをコードするポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を含む。好ましくは、前駆体から派生したニューロキニンBペプチドは図2の配列を有する。エピトープ断片またはエピトープ変異体は、通常、抗体が結合できる部位を構成する少なくとも4残基のアミノ酸配列を含むものである。好ましいエピトープ断片は図1のアミノ酸配列DMHDである。

ニューロキニン前駆体遺伝子産物の変異体も含まれる。好ましくは、変異体は、ニューロキニン前駆体遺伝子産物またはその断片と80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、さらに最も好ましくは99%以上の配列同一性を有し、好ましくは遺伝子産物またはその断片と同じ生物活性を保持する。

当業界で公知の「同一性%」は、配列間の比較によって特定される、2つのポリペプチド配列間または2つのポリヌクレオチド配列間の関連性の指標である。通常、比較される2つの配列を、それら配列間に最大の相関性をもたらすように整列させる。2つの配列の整列を検討し、2つの配列間の正確なアミノ酸またはヌクレオチドの一致をもたらす位置の数を特定し、その整列の全長によって割り、さらに100を乗じて同一性%をもたらす。比較される配列の全長に亘り同一性%を特定して差し支えなく、それは同じかまたは非常に類似する長さの配列で高い相同性を有する場合に特に適しており、あるいはより短い特定の長さに亘り同一性%を特定しても差し支えなく、それは等しくない長さの配列または低い相同性レベルを有する場合により適している。

2つ以上の配列の同一性の比較方法は、当業界で周知である。従って、例えば、Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux J et al, Nu

cleic Acids Res. 12: 387-395, 1984, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USAから購入可能)において利用可能なプログラム、例えばBESTFITおよびGAPを用いて、2つのポリヌクレオチド間の同一性%および2つのポリペプチド配列間の同一性%を特定することができる。BESTFITはSmithおよびWatermanの「局部的相同性」アルゴリズムを用い(Advances in Applied Mathematics, 2: 482-489, 1981)、2つの配列間で最も類似する単一領域を見つける。BESTFITは、異なる長さの2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列を比較するのにより適しており、より短い配列がより長い配列の一部を表すとみなすプログラムである。一方、Gapは、NeddlemanおよびWunschのアルゴリズム(J. Mol. Biol. 48: 443-354, 1970)に基づいて、「最大類似性」を見つけるように2つの配列を並べる。GAPは、ほぼ同じ長さの配列を比較するのにより適しており、その整列は全長に亘り予測される。好ましくは、各プログラムで用いられるパラメーター「ギャップウェイト(Gap Weight)および「長さウェイト(Length Weight)」は、それぞれ、ポリヌクレオチド配列に関して50と3であり、ポリペプチド配列に関して12と4である。好ましくは、比較される2つの配列が最適に整列された時に同一性%および類似性を特定する。

例えば、プログラムのBLASTファミリー(Altschul S.F. et al, J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990, Altschul S.F. et al, Nucleic Acids Res., 25: 289-340, 1997, 米国メリーランド州ベテスダの全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)から利用可能であり、さらにNCBIのホームページ[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)を介してアクセス可能である)、およびFASTA(Pearson W.R. and Lipman D.J., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 85: 2444-2448, 1988, ウィスコンシン配列分析パッケージの一部として利用可能である)のような、配列間の同一性および/または類似性を特定する他のプログラムも当業界で公知である。好ましくは、BLOSUM62アミノ酸置換マトリックス(Henikoff S. and Henikoff J.G., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 89: 10915-10919, 1992)がポリペプチド配列比較において用いられ、その際、比較前にヌクレオチド配列がまずアミノ酸配列に翻訳される。

好ましくはBESTFITプログラムを用いて、本発明のポリヌクレオチドまたはポリ

ペプチド配列に関して、照会ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の同一性%を特定する。照会および参照配列を最適に整列させ、さらにプログラムのパラメーターを初期値に設定する。

本発明の第1、第2、第3、および第4の態様は、ヒト被検者における妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症を予測または診断する方法に関する。それら方法は、例えば血液等の生体試料中のヒトニューロキニンB前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の濃度を評価することを含む。それら方法は、好ましくは、試料中のヒトニューロキニンB遺伝子産物（例えばニューロキニンBまたはその前駆体）の濃度の評価結果を、予測値または以前に被検者において認められた値と比較することを含む。

好ましくは、例えば予測のため10 - 12週、あるいは診断のため18週のような、妊娠初期においてそれら方法を実施する。

それら方法は、当業者に利用可能なニューロキニンB遺伝子産物を測定する任意の手段を含む。好ましくは、その方法は本発明のキットを用いる。本発明の方法は、生体試料中のニューロキニンB mRNA、ニューロキニンBまたはその前駆体、あるいはそれらの変異体または断片の存在を特定する工程を少なくとも含む；しかしながら、追加の工程を含んでいて差し支えない。そのような追加の工程として、1つ以上の以下の工程が挙げられる：生体試料を採取する；生体試料を調製する；試料中の、例えばポリペプチドのような標的ニューロキニンB遺伝子産物の濃度を測定する；妊娠していない個体、あるいは同じまたは異なる妊娠段階の妊娠している個体での標的ニューロキニンB遺伝子産物の期待濃度を予測するための標準曲線を作成する；特定生体試料から得られた結果を、適当な期待値または適当な標準曲線と比較して、症状の重篤性を特定する；あるいは症状の重篤性が変化するか否かを特定するために後日に以前のいくつかのまたは全ての工程を繰り返す。

キットに基づいて検出する適切な方法は当業者に明らかであり、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素免疫測定法（ELISA）、イムノラジオメトリックアッセイ（IRMA）、アンチセンス技術、あるいはラジオレセプターアッセイ（RRA）を含む。後者の場合、検出システムまたはバイオセンサーシステムに

において、例えばNK<sub>3</sub>受容体または他のニューロキニンB結合パートナーを用いることができる。別の検出法として、放射分析法、ならびに例えば蛍光および発光のような非放射性の方法も挙げられる。

好ましい方法はラジオイムノアッセイであり、その方法は、少量の放射能標識ペプチド（例えばニューロキニンB）と、限定量の例えば抗体のような結合パートナー（例えばNK<sub>3</sub>特異的）との相互作用に基づく。標準ペプチドの量の増加による放射能標識ペプチドの置換を、未知の試料による置換と比較する。通常、結合パートナーを沈ませた後遠心する沈殿工程を用いて、結合パートナーに結合した標識を、遊離した標識と分離することによって置換をモニターするが、遊離の標識画分に結合しその後遠心によって除去することができる吸着剤（例えば活性炭）もある。IRMAは、1サイト(1 site)であっても2サイト(two site)であっても差し支えなく、過剰な例えば放射能標識抗体のような特異的結合パートナーを用いる。2サイト法では、ペプチド上の別のエピトープに特異的な第2の特異的結合パートナー（通常固相に結合している）を用いる。固相上の複合体の除去によって容易に分離することができる。RRAは、限定量の受容体で抗体を置換する点において、RIAに類似する。受容体調製物は、例えば遠心によって結合標識の洗浄および分離を実施できるように、膜調製物の形態であることが多い。イムノメトリックアッセイにおいて、信号部分としての酵素の使用は、通常、特異的抗体に対する酵素の架橋結合によって達成され、マウスモノクローナル抗体が最初の反応において用いられた場合には、例えば酵素に対して架橋結合したブタ抗マウス抗体が使用される。

妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の将来の程度を予測するのに上記の方法を用いても差し支えない。それら方法は、好ましくは、試料中のヒトニューロキニンB遺伝子産物（例えばニューロキニンBまたはその前駆体）の濃度の評価の結果を、期待値と比較することを含む。例えば18週後のような、妊娠10週以降は、ヒトニューロキニンB遺伝子産物の存在（および濃度）を評価するのに特に有益な時期である。

本発明の方法は、体から取り出した試料においてインビトロで実施するのが好ましい。任意の生体試料を本発明の方法において用いて差し支えない。好ましい

生体試料として、血液、唾液、または尿が挙げられる。

また、本発明は、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質を投与することによる、ヒト被検者における妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症を予防または治療する方法を提供する。好ましくは、本発明のキットを用いてそのような方法を実施する。ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質として、例えば血漿からニューロキニンBを除去することによって；ニューロキニンBが受容体に結合するのを妨げるようにその構造を変化させることによって；ニューロキニンBの受容体への結合をブロックするように受容体に直接結合することによって（それ自体は、ニューロキニンBによって通常生じるそれら受容体での効果を生じることなく）；同じまたは異なる受容体においてニューロキニンBとは逆の効果を及ぼすことによって；あるいは例えばニューロキニンB遺伝子プロモーターの活性を調節することによっておよび/またはアンチセンス技術を用いることによって遺伝子発現または翻訳を低下させまたは妨げることによって；作用する任意の物質が挙げられる。前駆体の産生またはプロセッシングを阻害してニューロキシニンの産生を妨げる物質も含まれる。その背景内で、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質は、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の発症に関連するヒトニューロキニンBまたはその前駆体の任意の変異体または断片の生物学的効果を阻害する物質を含む。ヒトニューロキニンBの作用の主要部位はNK<sub>3</sub>受容体であり、従って本発明において用いるためのニューロキニンBの生物学的効果を阻害する好ましい物質としてNK<sub>3</sub>受容体アンタゴニストが挙げられる。しかしながら、特に妊娠誘発性高血圧または子癇前症の被検者で出産間近に観察される高い循環濃度において、ニューロキニンBは他の受容体（例えばNK<sub>1</sub>またはNK<sub>2</sub>受容体）でも顕著な効果を有し、従って、本発明において用いるためのニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物質は、そのような他の特異的受容体でのニューロキニンBの効果を阻害する物質、ならびに広範囲のニューロキニンアンタゴニストおよびそれらの組合せも含む。

1991年から、多くの高親和性非ペプチドアンタゴニストが報告されている。Snider R. M.(Science, 251: 435 (1991))およびGarret C.(Proc. Natl. Acad

. Sci., 88: 10208(1991))らは、それぞれ、CP-96,345およびRP67580をNK<sub>1</sub>受容体でのアンタゴニストとして記載しており、一方、Advenier C.(Brit. J. Pharmacol., 105:78 (1992))らはSR 48968に基づくデータを示し、NK<sub>2</sub>受容体に対するその高親和性および選択性を示した。さらに最近、Macleod(J. Med. Chem., 36: 2044 (1993))らは、新規な一連のトリプトファン誘導体をNK<sub>1</sub>受容体アンタゴニストとして発表した。最近、NK<sub>1</sub>受容体に対して高親和性を有する「ジペプチド」FK888が記載されている(Fujii J., et al., Neuropeptide, 22: 24 (1992))。

本発明において使用するための適切なNK<sub>3</sub>受容体アンタゴニストとして、例えば、GaoおよびPeet(Current Medicinal Chemistry, 1999, 6, 375-388)、KhavagaおよびRogers(Int. J. Biochem Cell Biol. 1996, 28, 7, 721-738)、米国特許第5,942,523号、米国特許第5,846,973号、米国特許第5,491,140号、米国特許第5,328,927号、米国特許第5,360,820号、米国特許第5,344,830号、米国特許5,331,089号、米国特許第4,742,156号、米国特許第4,665,157号、欧州特許第591,040 A、国際特許出願第W094/01402号、国際特許出願第W094/04494号、国際特許出願第93/011609号、カナダ特許出願第2,154,116号、欧州特許第693,489号、およびカナダ特許出願第2,151,116号に記載されている物質のような、NK<sub>3</sub>受容体においてニューロキニンBの効果をブロックまたは低下させる全ての物質が挙げられる。適切なアンタゴニストの特定実施例として、受容体選択的リガンド、SR 142801(Edmonds-Alt, et al., Life Sciences, 56: 27 (1995))、および以下の化学式のデカペプチド： $A^1$ -D-Pro<sup>2</sup>-His<sup>3</sup>-D<sup>4</sup>-Phe<sup>5</sup>-D-Trp<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>-D-Trp<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Nle<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub> ( $A^1$ およびD<sup>4</sup>はAspまたはD-Aspアミノ酸である)が挙げられる。

ニューロキニンBの生物学的効果を阻害するための好ましい物質として、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーターの活性を調節し、それによってニューロキニンB前駆体遺伝子の転写レベルを変化させる物質が挙げられる。そのような物質の例として、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーター転写因子の競合的または非競合的アンタゴニスト、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーター転写因子の生物学的効果を阻害する物質、ニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーター阻害剤のアゴニスト、ならびにニューロキニンB前駆体遺伝子プロモーター

活性に結合しかつそれを阻害するポリヌクレオチド配列が挙げられる。そのようなポリヌクレオチドは、好ましくはインビボでプロモーター配列にハイブリダイズしてプロモーター活性を阻害するように、プロモーター配列の全体または一部に十分相補的であることが好ましい。適切なポリヌクレオチド配列は、プロモーターの全体または一部と、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上、および好ましくは99%以上の配列同一性を有する配列である。好ましくは、ポリヌクレオチド配列は、例えば転写因子結合部位のようなプロモーターの調節領域に相補的であろう。

物質がポリヌクレオチド配列である場合、ベクターの形態で投与するのが好ましい。ベクターは、例えば、応答要素を含むプロモーター、コンセンサス部位、メチル化部位、遺伝子坐制御領域、転写後修飾、スプライス変異体、ホメオボックス、誘導因子、DNA結合ドメイン、エンハンサー配列、開始コドン、およびポリA配列のような、ポリヌクレオチド配列の発現の活性化のための1つ以上の調節配列をさらに含んでいて差し支えない。当業者に公知である任意の適切な遺伝子治療技術によってそのような物質を投与して差し支えない。

例えば経口または非経口的経路のような任意の有効な経路によって、薬剤組成物の投与を実施する。非経口輸送の方法として、局所的、動脈内、皮下、脊髄内、静脈内、または鼻腔内投与が挙げられる。羊水穿刺関連技術によって投与しても差し支えない。経口投与に続く皮下注射は好ましい取り込み経路であり；持続性固定技術も用いられるであろう。胎盤NK Bの効果は末梢受容体におけるものであるため、中枢神経系に対する副作用の無い有効な薬剤は、ペプチド様の分布特性を有することが好ましい。活性材料に加えて、それら薬剤組成物は、賦形剤、および活性化合物の薬剤的に用いることができる調製物への加工を容易にする他の化合物を含む、薬剤的に許容される適当な担体を含んでいて差し支えない。製剤化および投与に関するより詳細な技術は、「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES」(Maack Publishing Co, Easton PA)の最新版に記載されている。

経口投与用の薬剤組成物は、当業界で周知な薬剤的に許容される担体を用いて、経口投与に適した用量に製剤化することができる。そのような担体は、患者による摂取に適した、例えば錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロッ

ブ、スラリー、懸濁液等に、薬剤組成物を製剤化することを可能とする。

固形賦形剤と活性化合物とを混合し、必要に応じて得られた混合物を粉碎し、さらに必要であれば適当量の追加の化合物を添加した後、その顆粒混合物を加工して、錠剤または糖衣錠のコアを得ることによって、経口投与用の薬剤調製物を作成することができる。適当な賦形剤は、炭水化物またはタンパク質の賦形剤である。そのような賦形剤は、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトール等の糖に限定されず、トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモまたは他の植物からのデンプン；例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース；アラビアゴムおよびトラガカントのようなゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質を含む。必要な場合には、架橋結合ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、あるいは例えばアルギン酸ナトリウム等のそれらの塩のような崩壊剤または可溶化剤を添加しても差し支えない。

糖衣錠のコアは、例えば濃縮糖溶液のような適切な被覆を用いて提供され、そのような濃縮糖溶液は、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポール(carbopol)ゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒または有機溶媒混合物を含んでいても差し支えない。製品の識別、または活性化合物の量（例えば用量）の特徴付けのため、染料または色素を錠剤または糖衣錠の被覆に添加しても差し支えない。

経口で用いることができる薬剤調製物として、ゼラチンからなるプッシュフィット(push-fit)カプセル、ならびにゼラチンおよび例えばグリセロールまたはソリビトール等の被覆からなるソフトシールカプセル(soft, sealed capsules)等が挙げられる。プッシュフィットカプセルは、例えばラクトースまたはデンプンのような賦形剤または結合剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウムのような滑剤、さらに必要に応じて安定化剤と、活性材料とを混合して含んでいて差し支えない。ソフトカプセルにおいて、安定化剤と共にまたは安定化剤無しに、例えば脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールのような適切な液体中に、活性化合物を溶解または懸濁させて差し支えない。

非経口投与用の製剤は、活性化合物の水溶液を含む。注射用に、本発明の薬剤

組成物を、水溶液、好ましくはハanks液、リンガー液、または緩衝生理食塩水のような生理適合緩衝液中に製剤化して差し支えない。水溶性注射懸濁液は例えばカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストラン等の懸濁液の粘性を高める物質を含んでいて差し支えない。さらには、活性化合物の懸濁液を適切な油性注射懸濁液として調製しても差し支えない。適切な親油性溶媒または媒体として、例えばゴマ油等の脂肪油、あるいはオレイン酸エチルまたはトリグリセライド等の合成脂肪酸エステル、あるいはリポソーム等が挙げられる。必要に応じて、懸濁液は、化合物の安定性を高めて高濃度溶液の調製を可能とする、適切な安定化剤または物質を含んでいて差し支えない。

局所投与または鼻腔投与のため、浸透すべき特定のバリアに適した浸透剤を製剤化において用いる。そのような浸透剤は当業界で公知である。

本発明の薬剤組成物は、当業界で公知である方法に類似の方法で製造することができる（例えば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣錠形成、すり潰し、乳化、カプセル化、封入、凍結乾燥工程によって）。例えば被覆のような従来手段によって、例えば徐放性または標的化された放出のような適切な放出特性をもたらすように薬剤組成物を修飾しても差し支えない。

薬剤組成物を塩として提供して差し支えなく、塩化水素に限定されず、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等の多くの酸を用いてそれら塩を形成することができる。塩は、対応する遊離塩基の形態の水溶液または他のプロトン溶媒中に溶解しやすい傾向がある。他の例では、好ましい調製物は、pH4.5から5.5の1 mM - 50 mMヒスチジン、0.1% - 2%スクロース、2% - 7%マンニトール中での凍結乾燥粉末であって差し支えなく、そのような調製物は使用前に緩衝液と混合される。

選択された標的部位にのみ輸送されるように、本発明において用いるための物質（例えばNK<sub>3</sub>受容体アンタゴニスト）を修飾することができる。例えば、内蔵でのタンパク質分解消化に対する安定性、または血液/脳関門を通過する能力を調節することによって、あるいは例えば標的部位に選択的な抗体等のターゲティング成分を含む複合分子を作成することによって修飾することができる。

許容される担体中に製剤化された本発明の化合物を含む薬剤組成物を調製した

後、それら組成物を適切な容器中に置き、さらに指示条件での取り扱いのためのラベルを付ける。NK<sub>3</sub>受容体アンタゴニストの投与のため、そのようなラベルは、投与の量、頻度、および方法を含む。

本発明での使用に適した薬剤組成物として、意図した目的を達成するのに有効な量の活性材料が含まれている組成物が挙げられる。従って、治療的有效量とは、治療される疾患の症状を改善するのに十分な量である。実際に投与される量は、治療が施される個体に依存し、さらに好ましくは、顕著な副作用無しに所望の効果を達成するように最適化された量であろう。治療的有效量の決定は、当業者の能力の範囲内である。もちろん、熟練者は、分割量および部分量も本願発明の範囲内であることに気付くであろう。

任意の化合物に関して、まず、細胞培養法または任意の適当な動物モデル（例えば子癇前症に関して霊長類、高血圧に関してラットおよびモルモット、さらに誘発性高血圧および誘発性子癇前症に関する用途のため他の実験小動物）の何れかにおいて治療的有效量を評価することができる。それら測定法は、受容体活性、ならびに下流のプロセッシング活性を考慮すべきである。望ましい投与濃度範囲および投与経路を見つけるためにも動物モデルが用いられる。そのような情報はヒトでの投与のための有用な用量および経路を決定するために用いることができる。

治療的有效量とは、兆候または症状を改善する物質の量を称する。標準的な薬学的方法によって、培養細胞または実験動物においてそのような化合物の治療効果と毒性を決定することができる（例えばED<sub>50</sub>：集団の50%において治療的に有効な量；LD<sub>50</sub>：集団の50%において致死性である量）。治療効果と毒性効果との間の用量比が治療指数であり、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>の比として表すことができる。大きな治療指数を表す薬剤組成物が好ましい。ヒトでの使用のための用量範囲を決めるのに、細胞培養法および動物実験から得られたデータが用いられる。そのような化合物の用量は、好ましくは、殆どまたは全く毒性の無いED<sub>50</sub>を含む循環濃度の範囲内にある。用量は、用いられた剤形、患者の感受性、および投与経路に依存して、その範囲内で変化する。

正確な用量は、治療される患者を考慮して、個々の医者によって選択される。

用量および投与は、十分なレベルの活性部分を提供するように、または所望の効果を維持するように調整される。考慮され得る付加的因子として、疾患症状の重篤性が挙げられる。特定製剤の半減期およびクリアランス率に基づいて、3から4日おき、1週間おき、あるいは2週間おきに、持続性薬剤組成物を投与して差し支えない。特定用量および輸送方法に関するガイダンスが文献において提供されている（参照によってこの中に組み込まれている、米国特許第4,657,760号；第5,206,344号；および第5,225,212号を参照）。

子癇前症を予防または治療する本発明の方法；あるいは子癇前症を予防または治療するための薬剤を調製する本発明の方法；において用いるための、ニューロキニンBの生物学的効果を阻害する物は、限定はされないが、食後の段階(post prandial phase)で、その物質の使用が有効であるように製剤化されることが好ましい。その物質は、食後の段階でのみ有効であるというのではなく、例えば24時間に亘り有効であるように選択される。子癇前症は、門脈における高血圧のせいで血液が肝臓（通常毒素を除去する）を通過できないことによる母体血液供給中における毒素の形成に関連すると考えられているため、食後の段階が特に重要な時間である。従って、食事後の高血圧の一時的な除去は、最高濃度の毒素が存在する時に血液が肝臓を通過することを可能とし、従って胎盤で産生されたニューロキニンBによって生じる効果に短期間の低下をもたらすのみであっても、子癇前症の危険性をかなり減らすであろう。そのような時間限定効果は、短期間の活性を有する物質を選択し、さらに適当な製剤および用量スケジュールを用いることによって達成されるであろう。

好ましくは、この中に記載の症状を予防または治療する方法は、例えば妊娠10週後に最初の予測または診断を行った後直ぐに開始されるであろう。一連の治療の開始に関する決定はもちろん医師の決定であり、従って早くまたは遅く開始する場合がある。通常、妊娠の間中、または症状が治まるまで、一連の治療を行う。その治療は、出産後8週間まで続くかもしれない。例えば成長遅延または仮死のような胎児症状あるいは子癇前症を発症する危険性があるとして特定された個体において（例えば妊娠における以前の流産または合併症のような他の要因を考慮することによって）、妊娠が確認された直後に治療を開始し、妊娠満期まで

継続して差し支えない。

本発明の別の態様において、妊娠誘発性高血圧あるいは子癰前症または関連する胎児合併症の予測または診断で使用するための診断薬の製造における、ヒトニューロキニン B 前駆体遺伝子産物あるいはその変異体または断片の使用を提供する。例えばニューロキニン B に特異的な結合パートナーを含む診断薬の製造において、用いられる遺伝子産物は、ニューロキニン B、あるいはその変異体または断片であることが好ましい。好ましくは、その変異体または断片はエピトープである。例えばニューロキニン B 前駆体ゲノム配列の調節配列、またはアンチセンス配列の産生におけるニューロキニン B 前駆体 mRNA のような他の遺伝子産物を用い得ることが考えられる。

用いられるポリペプチドとして、ヒトニューロキニン B またはその前駆体、あるいはそれらの変異体または断片が挙げられる。好ましくは、ポリペプチドは、図 1 または図 2 の配列をそれぞれ含む。好ましくは、その断片または変異体は上述したようにエピトープである。

それらポリペプチドは、単離された実質的に純粋な形態で、または組換えポリペプチドとして作成される。そのような作成方法は当業者に明白であろう。例えば、組換え技術または抽出、ゲル分離、あるいは、より一般的に、ニューロキニン B のサイズのペプチドに関して、例えば液相および固相ペプチド等の化学合成が挙げられる。

本発明の別の態様において、妊娠誘発性高血圧あるいは子癰前症または関連する胎児合併症の予防または治療のための薬剤の製造における、ニューロキニン B の生物学的効果を阻害する物質の使用を提供する。好ましくは、その物質は上記のようなものである。

本発明の別の態様において、妊娠誘発性高血圧あるいは子癰前症または関連する胎児合併症の兆候を予測し、その将来の重篤性を診断または評価するためのキットを提供する。本発明のキットは、例えばニューロキニン B またはその前駆体あるいはそれらの断片または変異体をコードするポリヌクレオチドまたはポリペプチドのようなヒトニューロキニン B 遺伝子産物の、被検者による産生を検出する手段を含む。従って、本キットは、ニューロキニン B またはその前駆体に対す

る結合パートナー；ニューロキニンBポリペプチドあるいはその変異体または断片；および／またはニューロキニンBあるいはその変異体または断片をコードする配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列；の1つ以上を通常含む。

結合パートナーは、例えば抗体のような、標的を検出（およびそれに結合）できる任意の物質を意味する。本発明のキットにおいて用いるための好ましい結合パートナーは、ニューロキニンB前駆体あるいはそのエピトープ断片またはエピトープ変異体に特異的な抗体である。ニューロキニンBに対する抗体およびヒトニューロキニンB前駆体に対する抗体が好ましい。ニューロキニンBに特異的である抗体が最も好ましいが、測定可能な時間、身体に残存するニューロキニンB前駆体の任意の他の分解産物に特異的な抗体も用いることができる。それら抗体は、ヒトニューロキニンB前駆体の断片に結合して、ヒトの体による前駆体の産生を特定することができる。本発明の抗体は、例えば、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体、あるいはそれらの断片であって差し支えない。例えばサブスタンスPすなわちNK Aのような関連ペプチドと交差反応する結合パートナーは、それら関連ペプチドがニューロキニンBと共通配列（FVGLM-NH<sub>2</sub>）を有するため、例えば薬剤としてまたは診断において有用となり得る。

そのような抗体を作成する方法は、当業者に明白であろう。例えば、ポリクロナール抗体の場合、動物を免疫する標準的方法によって、あるいはモノクロナール抗体の場合、KöhlerおよびMilsteinの周知の方法、または米国特許第5,844,080号に記載の方法の使用によって実施できる。キメラ抗体は、遺伝子組換え技術によって作成することができ、定常領域はヒト由来であるが、可変領域は例えばマウス抗体由来であるような抗体である。キメラ抗体の利点は免疫原性を減らすことである。ヒト化抗体は、キメラ抗体の原則に加えて、相補性決定領域および可変領域中の最少数の他のアミノ酸が例えばマウス等の動物由来である。抗体構造の残りの部分はヒトの配列であり、ヒト免疫系によってヒトとして認識される（例えば、Queen et al, PNAS, USA 86(December 1989), 10029-10033を参照）。

本発明のキットのポリヌクレオチドは、好ましくは、ニューロキニンBまたはその前駆体、あるいはそれらの変異体または断片をコードする配列、あるいはそ

これらの相補体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドである。図3または図4のヌクレオチド配列、あるいはそれらの相補体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列であることが好ましい。ストリンジェントな条件は、例えば、65℃で6×SSCである。好ましくは、そのようなポリヌクレオチド配列は、参照配列の相補体と、85%以上、90%以上、95%以上、さらに好ましくは98%以上、さらに最も好ましくは99%以上の配列同一性を有する。そのようなポリヌクレオチドは、好ましくは、少なくとも10ヌクレオチド長であり、ニューロキニンBまたはその前駆体の発現を検出するのに有用であろう。そのようなポリヌクレオチドはアンチセンス技術または診断的PCRにおいて有用である。本発明のポリヌクレオチドを作成する手段は当業者に明白であり、例えば、合成的に、あるいは適当なcDNAまたはゲノムライブラリー（特に胎盤cDNAライブラリー）を用いることによって作成することができる。

本発明のキットは、生体試料中のニューロキニンBのレベルを予測または診断するための測定法（ニューロキニンBの直接的測定によって、あるいはヒトニューロキニンB前駆体またはその断片の濃度を測定し、その値を用いてニューロキニンBの存在量を予測することによって）の実施に関する使用説明書を含んでいて差し支えない。Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USAから市販されているニューロキニンBラジオイムノアッセイキットRIA 7357の構成要素を本発明で用いることができる。本発明のキットは、好ましくは、生体試料中のニューロキニンB遺伝子産物のレベルと、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の診断、および/またはそのような症状の将来の発症および/または重篤性との間の相関性を示す手段を含む。

さらに、被検者におけるニューロキニンBまたはその前駆体の生物学的効果を阻害する手段を含む、妊娠誘発性高血圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症の予防または治療のためのキットを提供する。好ましくは、そのような手段として、上記のような物質が挙げられる。特に、上記のような抗体またはポリヌクレオチド配列は、ニューロキニンBまたはその前駆体の生物学的効果を阻害するためのキットにおいて有用であろう。キットは、好ましくは、妊娠誘発性高血

圧あるいは子癇前症または関連する胎児合併症を予防または治療するためのキットの使用に関する使用説明書、および/または用いられる物質の量と症状に対する予測の効果との間の相関性を示す手段を含む。

子癇前症は、毒素および毒素発生物質の含有量を減らすようにヒト被検者の食事を調整することによって改善される。毒素発生物質は、非常に高濃度で血液中を循環した場合にその殆どのものが毒性となるアミノ酸に消化され、そのようなアミノ酸として内蔵から吸収されるタンパク質を含む。通常、1日の必要量を越える任意のアミノ酸は、肝臓によって直ぐにアミノ基が取り去られて代謝される。例えば、個体の食事量を実質的に減らす(少量の食事の回数を増やす)ことによって、門脈中に現れる潜在的毒素の濃度が最高になるのを防止するように、被検者の食事パターンを調整しても差し支えない。

ニューロキニンBのアゴニストは、血圧の上昇または血液容量の減少が有益と考えられる医薬品として用いても差し支えない。適切なアゴニストは、例えばセンクタイド(senktide)または[MePhe<sup>7</sup>]NKBのような、NK<sub>3</sub>受容体(または任意の他の受容体)でのニューロキニンBの効果を補足または模倣する任意の作用を含む。

また、本発明は、適当なモデルにおいて、ニューロキニンBの昇圧効果をブロック(または増強)する能力を調べることによって、潜在的有効物質(例えばNK<sub>3</sub>受容体アンタゴニストおよびアゴニスト)をスクリーニングする手段を提供する。適当な物質が同定されると直ぐに、高血圧;妊娠誘発性高血圧または子癇前症;の予防または治療におけるそれら物質の可能性を特定するためにさらに評価され、その結果によって用いられる。そのような工程によって同定された全ての物質(既に公知の物質を除いて)が本発明に含まれる。スクリーニング方法として、Affymetric IncのVilsips<sup>TM</sup>技術のような、ラージアレイ(large array)技術が挙げられる(例えばEPB No. 0476014を参照)。

当業者に明白である方法での、受容体結合実験および細胞シグナル経路実験において、クローン化NK<sub>3</sub>(あるいはNK<sub>1</sub>またはNK<sub>2</sub>)受容体を包含するトランスフェクト細胞を用いることができる。原則的に、内生的に高レベルのニューロキニン受容体を発現する細胞株、あるいはニューロキニン受容体のクローン

化cDNA構成物でトランスフェクトした細胞株の何れかを用いて、膜調製物を作成することができる。溶液中またはリン脂質膜中に再構築された精製受容体の膜調製物を用いて、ニューロキニンBの標識アゴニストおよび/またはアンタゴニストとの受容体結合を評価することができる。標準的細胞シグナリングアッセイを用いて、アゴニストおよびアンタゴニストの作用の効果を評価することができる。当業者に明白な方法で(受容体結合、サイクリックAMP測定、プロテインキナーゼC、イノシトール三リン酸濃度等の測定法を含む)、G-タンパク質結合受容体システムを用いる場合に、それら方法は日常的に実施されるであろう。ニューロキニンB、ニューロキニンBアゴニスト、およびニューロキニンBアンタゴニストの長期および短期の効果を特定するために、慢性的にアゴニストを注入されたモルモットおよびラットを含む動物モデルにおいてそれら実験を実施することも可能である。心拍数、血圧、血液容量、および臓器の重量(例えば子宮、胎盤)の変化等の効果を測定することができる。

## 実施例

### 実施例1

#### ヒトニューロキニンB前駆体cDNAの産生

以下の方法による胎盤cDNAのクローニングを用いて、図1に示すポリペプチド配列を有するヒトニューロキニンB前駆体を同定した。前駆体におけるニューロキニンBのペプチド配列を下線で示した(C末端のG残基は、図2の最終的なプロセッシングを受けたペプチドにおけるC末端のM上のアミドとなる)。ヒトニューロキニンB前駆体のクローン化胎盤cDNAが図3に示されており、位置26-28のATG開始コドン、389-391のTAG終止コドン、659-663のAATAAAポリアデニル酸シグナル、ならびに680のポリAテイル開始を有する(下線)。

9および13週の妊娠期間ならびに妊娠満期で妊娠を終えた被検者からヒト胎盤組織を得た。地方研究倫理委員会に従い、その許可を受けて、試料を採取した。基本的に、Chomczynski, P.およびSacchi, N.(1987) Analytical Biochemistry, 162, 156-159に記載のようにRNAを抽出した。

RT-PCRを用いて、ヒト妊娠末期全胎盤RNAから完全長プレプロニューロ

キニンB前駆体を増幅した。その増幅は、SMART RACE cDNA増幅法を用いて行われた(Chenchik, A. et al(1998), In RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis. Eds. Siebert, P. and Larrick, J. BioTechniques Books, MA, 305-319)。基本的に、全RNAの抽出後、3'アンカー配列を包含するcDNA合成プライマー(5' AAGCAGTG GTAAACAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N3')を用いて逆転写を実施した。ウシP08858ニューロキニンB前駆体に類似の人類cDNAクローン138761由来の5'遺伝子特異的プライマー(5' GGCAACAGAGCTGCTCCACAGGCACCAT3')を用いて、3'伸長を実施した。得られたPCR断片をゲル電気泳動の後ゲル精製し、さらに発現ベクターpGEM-T Easy中にクローン化した。得られたクローンの配列を決定し、BLASTプログラム(Altschul, S.F., et al (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410)を用いて、GeneBankデータベースにおける提出配列と比較した。

## 実施例2

### 胎盤におけるNK Bを測定するための半定量的PCR

下記のように半定量的PCRを用いて、9および13週の妊娠期間ならびに妊娠満期に採取した胎盤中のニューロキニンB mRNAの発現を測定した。最初の3ヶ月の胎盤と妊娠満期の胎盤との間に、発現程度の違いが示された。図5に示されるように、発現レベルは妊娠満期に5倍まで上昇した。

ウシP08858ニューロキニンB前駆体に類似の人類cDNAクローン138761由来の5'遺伝子特異的プライマー(5' GGCAACAGAGCTGCTCCACAGGCACCAT3')、ならびに3' SMARTアンカー配列プライマーを用いて、SMART RACE cDNA法によって胎盤cDNAを増幅した。正規化のためにβ-アクチンに特異的なプライマー対を用いた。95℃で30秒間および68℃で2分間の21サイクルを用いてPCRを実施した。非特異的産物の形成の可能性を減らすため、2段階でPCR反応が行われるように、高いアニリング温度を有するプライマーが意図的に選択された。β-アクチンRT-PCR産物の再現可能な指数増幅を達成するのに必要とされるサイクルの回数は、15、18、21、24、および30サイクルでそれぞれ制御反応を終わらせること

によって特定された。それら実験を用いて、産生される $\beta$ -アクチンPCR産物のレベルを最適化するため、精度、効率、および半定量的増幅を行う必要がある全RNA量をチェックした。PCR産物を電気泳動後、UV照射によって可視化した(図5において、1 kb DNAラダー(M1)および100 kb DNAラダー(M2)が示されている)。

### 実施例3

#### 胎盤組織および血漿からのニューロキニンBの抽出

以下に記載の技術を用いた胎盤抽出物の評価は、ニューロキニンBが相当量存在し、そのHPLCでのクロマトグラフィー特性が合成ニューロキニンBのものと一致することを示した。また、そのメチオニン残基を酸化後、(HPLCで)同程度の疎水性の喪失を示した。酸化は、2酸化形態(1)、1酸化形態(2)、および非酸化形態(3)の3つのピークをもたらすことが認められた(図6を参照)。図6(a)は、RP HPLCによって、ヒト妊娠血漿から分離された酸化および還元ニューロキニンBを示し、図6(b)は、RP HPLCによってヒト妊娠満期胎盤から抽出した濃縮および還元されたニューロキニンの分離を示す。

#### 胎盤からのニューロキニンBの抽出

出産後直ぐに全胎盤の重量を測定し、10 mM EDTA含有150 mM塩化ナトリウム溶液(pH7.5)で洗浄した。100 g以下の組織試料を切り取り、ガラス容器付きのブレンダーを用いて、100 mlの生理食塩水/EDTA溶液中においてホモジナイズした。プロテアーゼ阻害剤である、フェニルメチルスルホニルフッ化物、N-エチルマレイミド、およびペプスタチンをメタノール中の原液から添加した。20秒後、800 mlのメタノールを添加し、さらに1分間混合を続けた。混合物を200 mlポリプロピレン遠心チューブに静かに注ぎ、4℃、3000 x gで30分間遠心した。上清を分離し、4℃で一晩保存し、さらに生じた沈殿物を遠心で除いた。各抽出物の容積は最初の容積の1/8未満まで減少し、3容積の0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)含有水の添加によって希釈した。最後の遠心工程によって任意の微量の浮遊物質を除去した。抽出物の容積を記録し、Sep-Pak C18 3CCカートリッジ(Waters Chromatography Division, Millipore Corp

oration, Milford, MA, U.S.A.)を用いた固相抽出用に、20gの胎盤に相当する量を保存した。2mlの以下の溶液を灌流させることによって、使用前にカートリッジを準備する；1) 0.1% TFAおよび0.1% Polypepゼラチン加水分解物(Sigma-Aldrich, Poole, UK)含有水；2) 0.1% TFA含有水；3) 80% v/vアセトニトリル含有水；および4) 0.1% TFA含有水。各抽出物を調製カートリッジに通し、その後、2mlの0.1% TFA含有水、2mlの0.1% TFA含有水中の10%アセトニトリル、および2mlの0.1% TFA含有水中の20%アセトニトリルで洗浄した。2mlの0.1% TFA含有水中の30%、40%、および50%アセトニトリルでカラムを溶出した。溶出分画に1mgのマニトールおよび100 μgのPolypepを添加後、真空下で乾燥した。妊娠中絶から得た少量の胎盤も上記のように処理したが、胎盤重量に対する緩衝液およびメタノールの比率が同じになるようにしてガラスホモジナイザー中において分離した。

#### 血漿からのニューロキニンBの抽出

5人の若い女性の血液からEDTA中に採取したプール血漿においてニューロキニンB標準を調製した。その標準は、1280、640、320、160、および80 pg/mlニューロキニンBを含む。220 μlの0.21 Mグリシン含有1 M HClの添加によって血漿標準の各2mlの試料を酸性化した。その後、0.9%生理食塩水によって10mlに希釈し、さらに3000 × gで20分間遠心し、完全に透明にした。Sep-Pak C18 3CCカートリッジに関して上述したようにして、Sep-Pak C18 3CCカートリッジを準備した。試料添加後、1mlの0.02 Mグリシン含有0.1 M HCl、続いて1mlの0.1% TFA含有水でカートリッジを洗浄した。1mlの0.1% TFA含有水中の10%および20%アセトニトリルでさらに洗浄した後、1mlの50%の水とアセトニトリルとの混合物中の0.1% TFAで溶出した。溶出分画に1mgのマニトールおよび100 μgのPolypepを添加後、真空下で乾燥した。注意しても、不活性循環前駆体が内因性血漿プロテアーゼによって切断されて免疫活性ペプチドを産生する可能性があるため、酸性化工程によって、既にプロセッシングを受けた成熟ペプチドを抽出することを確実にした。

#### 実施例4

##### 胎盤組織および血漿におけるNK Bの測定

胎盤および血漿抽出物を、Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USAから市販されているニューロキニンBラジオイムノアッセイキットRIK 7357の一部として提供される緩衝液に0.2%のIgepal CA-630非イオン性界面活性剤(Sigma)を添加した液500  $\mu$ l中に再構築した。抽出標準および非抽出標準から一部試料25  $\mu$ lを採り、上記の緩衝液75  $\mu$ lと混合した。200  $\mu$ g/mlのPolypepを添加したIgepalを含む緩衝液中に標準を調製した。ブランクを除いて全ての測定チューブに抗ニューロキニン抗体溶液(100  $\mu$ l)を添加し、ラジオイムノアッセイキットの使用説明書の「一般的プロトコル」に記載のように測定を実施した。二重で測定を実施し、抽出標準を参照にして結果を補正した。

様々なヒトボランティアおよびラットにおけるニューロキニンBの血漿および胎盤でのレベルを上記の方法によって測定した。血漿試料の結果を表1に要約する。胎盤試料は妊娠7週 - 15週から採取したものであり、7例全てが同等の相当量のニューロキニンBを有することを示した；しかしながら、妊娠満期に検出された血漿NK Bの濃度は、母体の心血管に影響を及ぼすことが予測されるであろう100ピコモル程度であった。非妊娠ボランティアから採取した血漿試料は全て、7週から15週で人工妊娠中絶を受けた個体から採取した血漿試料の大部分と同様に低いレベルのペプチドを有していた。7週から15週で人工妊娠中絶を受けた個体の群の内4試料は、妊娠満期の試料で認められた濃度と同等の濃度を有していた。このことは、その個体由来の胎盤が妊娠の初期に生理的濃度を越える濃度のニューロキニンBを分泌し始めることを示唆する。高血圧および子癇前症に罹った妊娠後期の患者の試料は全て、ナノモル程度の濃度を有しており、このことはニューロキニンBの上昇がそれら症状の原因となり得ることを示唆する。

#### 【表1】

| 妊娠（週） | 正常血圧妊娠におけるNKB<br>(nmol/l) |
|-------|---------------------------|
| 6     | 0                         |
| 9     | 0                         |
| 9     | 0.97                      |
| 10    | 0.535                     |
| 13    | 0                         |
| 13    | 0                         |
| 13    | 0.083                     |
| 13    | 0.511                     |
| 14    | 0                         |
| 14    | 0                         |
| 14    | 0.511                     |
| 17    | 0.182                     |
| 17    | 0.182                     |
| 18    | 0                         |
| 23    | 0.12                      |
| 24    | 0                         |
| 25    | 0.17                      |
| 27    | 0                         |
| 28    | 0                         |
| 28    | 0.033                     |
| 31    | 0                         |
| 31    | 0.031                     |
| 32    | 0                         |
| 33    | 0                         |
| 37    | 0                         |
| 38    | 0.07                      |
| 39    | 0.138                     |
| 40    | 0.05                      |
| 40    | 0.2                       |
| 41    | 0.118                     |

【表2】

| 妊娠（週） | 子癇前症妊娠におけるNKB<br>(nmol/l) |
|-------|---------------------------|
| 30    | 3.964                     |
| 34    | 6.156                     |
| 36    | 3.796                     |
| 37    | 2.141                     |
| 38    | 2.752                     |
| 39    | 2.004                     |
| 39    | 6.288                     |
| 39    | 0.98                      |

【表3】

| 患者番号 | 出産間近での<br>正常血圧妊娠におけるNKB<br>(nmol/l) |
|------|-------------------------------------|
| 1    | 0                                   |
| 2    | 0                                   |
| 3    | 0                                   |
| 4    | 0                                   |
| 5    | 0                                   |
| 6    | 0                                   |
| 7    | 0                                   |
| 8    | 0.084                               |
| 9    | 0.118                               |
| 10   | 0.143                               |
| 11   | 0.22                                |
| 12   | 0.226                               |
| 13   | 0.228                               |
| 14   | 0.398                               |
| 15   | 0.521                               |
| 16   | 1.317                               |

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1は、クローン化ヒトニューロキニンB前駆体のポリペプチド配列を示す

## 【図2】

図2は、活性ニューロキニンBペプチドのポリペプチド配列を示す

## 【図3】

図3は、ヒトニューロキニンB前駆体の胎盤cDNAのポリヌクレオチド配列を示す

## 【図4】

図4は、27928塩基対プロモーター領域、イントロン、および7つのエキソン（下線）を含む、ニューロキニンBのゲノム配列を示す

## 【図5】

図5は、9週、13週、および妊娠満期に採取したmRNAを用いた、完全ヒトニューロキニンB前駆体の半定量的PCRの結果を示す

## 【図6】

図6は、ヒト妊娠血漿および妊娠満期の胎盤における酸化ニューロキニンおよび還元ニューロキニンBの結果を示す

## 【図7】

図7は、意識のあるラットにおけるニューロキニンBの心血管効果を示す

## 【図8】

図8は、ヒトの胎盤におけるニューロキニンB mRNAのin situハイブリダイゼーションを示す

## 【図1】

ヒトニューロキニンB前駆体のアミノ酸配列

MRIMLLFTAILAFSLAQSFQAVCKEPQEEVVPGGGRSKRDPDLYQLLQRLFKSHSSLEGLLKALSQASTDPK  
ESTSPEKRDMHDFVGLMGKRSVQPDSPDVNQENVPSFGILKYPPRAE

## 【図2】

ニューロキニンペプチドのアミノ酸配列

DMHDFVGLM-NH<sub>2</sub>

## 【図3】

ヒトニューロキニンB前駆体のクローン化完全長胎盤cDNA

|             |            |            |            |            |     |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| GGCACAGAGC  | TGCTCCACAG | GCACCATGAG | GATCATGCTG | CTATTCACAG | 50  |
| CCATCCTGGC  | CTTCAGCCTA | GCTCAGAGCT | TTGGGGCTGT | CTGTAAGGAG | 100 |
| CCACAGGAGG  | AGGTGGTTCC | TGGCGGGGGC | CGCAGCAAGA | GGGATCCAGA | 150 |
| TCTCTACCAG  | CTGCTCCAGA | GACTCTTCAA | AAGCCACTCA | TCTCTGGAGG | 200 |
| GATTGCTCAA  | AGCCCTGAGC | CAGGCTAGCA | CAGATCCTAA | GGAATCAACA | 250 |
| TCTCCCGAGA  | AACGTCACAT | GCATGACTTC | TTTGTGGGAC | TTATGGGCAA | 300 |
| GAGGAGCGTC  | CAGCCAGACT | CTCCTACGGA | TGTGAATCAA | GAGAACGTCC | 350 |
| CCAGCTTTGG  | CATCCTCAAG | TATCCCCCGA | GAGCAGAATA | GGTACTCCAC | 400 |
| TTCCGGACTC  | CTGGACTGCA | TTAGGAAGAC | CTCTTTCCCT | GTCCCAATCC | 450 |
| CCAGGTGCGC  | ACGCTCCTGT | TACCCCTTCT | CTTCCCTGTT | CTTGTAACAT | 500 |
| TCTTGCTGCTT | TGACTCCTTC | TCCATCTTTT | CTACCTGACC | CTGGTGTGGA | 550 |
| AACTGCATAG  | TGAATATCCC | CAACCCCAAT | GGGCATTGAC | TGTAGAATAC | 600 |
| CCTAGAGTTC  | CTGTAGTGTC | CTACATTAAA | AATATAATGT | CTCTCTCTAT | 650 |
| TCCTCAACAA  | TAAAGGATTT | TTGCATACGA | AAAAAAAAAA | AAAAAAAAAA | 700 |
| AAAAAA      |            |            |            |            | 706 |

## 【図4】

FIG. 4

|      |             |             |             |             |             |             |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1    | AGGCTACTGT  | AGGTAACCA   | CCAGCTTGGT  | TCTTCAGCTC  | CACATGGTGG  | GGTTAGGAGA  |
| 61   | GGAGGAGGAG  | GGAGATGGAT  | GGAACCAATT  | AGGAACAGCA  | CCTGGGCTCC  | TCACAGGAAT  |
| 121  | GAACCAAGTCA | TGCCATTTGC  | ATGTAAACAG  | CTTCCCACTT  | CTCTCCTCAT  | CCTACCAAAAT |
| 181  | GCTCCCAACC  | CTGGGTCTCTG | CCCCATGTTT  | TTTGCCCAACA | CAGCCCTGTA  | ATTAGCTGGG  |
| 241  | TAATGAGAAG  | CTTTAATGA   | GTCCCATTAG  | CATCTCGTGT  | AATAAAGAGG  | CCTTGAGACC  |
| 301  | CAGCTGCTGT  | CCTCACTTTG  | GGATGAACAC  | GGGTCCCTGT  | GAGCCAGTG   | ACTTCTGTCA  |
| 361  | GTACAGTCTA  | AGTTCTCGGA  | TGGGGTGGGA  | GACAAACATT  | TCAGGACCCC  | AGCAGCACTT  |
| 421  | GAGAGGTTCC  | ATGGTGGATC  | CATGTTTTTG  | ACTGTGATAC  | AAGAACTTG   | GCTCTGGCTT  |
| 481  | CCTTGTTTCAT | TTTGTAATA   | ACATTTTTTC  | TTCTTTTAAG  | AGACAGAGTC  | TTACTTTGTT  |
| 541  | GCCCAGGCTG  | GAGTGTAGCA  | ATGCAATTAT  | AGCTCACTGC  | AGCCTCAACC  | TCCTGGGCTC  |
| 601  | AAGTGATCCT  | CCTGCCTCAG  | CCTCTGGGAT  | AGCTGGGGCC  | ACAGGCATGC  | ACCACCATGC  |
| 661  | CTGGCTAATT  | TTTAAAAATG  | TTTTTGTAAG  | GATGGGGTCT  | TACTTGCTAT  | GTTGCTCAGA  |
| 721  | CTGGTCTCGA  | ACTTCTGGCT  | TCAAGCAATT  | CTCCACCTC   | GCCCTCCTAA  | AGTGCTGGGA  |
| 781  | GTATGGGCAT  | GAGCCACCAT  | GTCCAGCCTT  | GTAAATACAT  | TTTTATGTAG  | CACCTATTAT  |
| 841  | ATGTCAAACA  | TTATAAAGTG  | AGGGATACAG  | TAGCAAACAA  | AACAGACAAA  | AATTTTGGCC  |
| 901  | ATCATGACAC  | TTATATTCTT  | GGGTGGGAGT  | GGTGATAGAA  | AGACAATAAG  | TAAAATACTT  |
| 961  | AGCATAGTGG  | ATGTAATAAG  | TTCATGAAGG  | GAAAAATGGG  | AGTGAGGTAT  | ATGGAATTTT  |
| 1021 | GGGGTGGTGA  | TAATTTTAAA  | TAGGGTGATT  | GGGGAATGCT  | TTGTTGCACA  | GATTGTTTTT  |
| 1081 | GATGTAAATA  | TGAGATAAAG  | ATACGGTTCT  | CTCCCAAACT  | CAAAATGTAG  | AAGAGTAGAA  |
| 1141 | GGTCCCAAAAT | CTTCAAGTCT  | CTTGAGAGG   | GGGGCCACCC  | ATTCCGCTCTG | GGACAGTTAA  |
| 1201 | CTGTTCCCTC  | ACAGGTCAAA  | GTTTATGCCA  | GTGCAGTAAA  | AAGAGTGGGA  | GACCTGGGGT  |
| 1261 | GAGACAAACC  | TGGATTTGAG  | GCTGTTCTTC  | ACTGATTAGT  | AGCCATATGT  | ACTGGAGCAA  |
| 1321 | GTGACTGAAC  | CTTCTGAGCC  | TGTTTTCTCA  | TCTGGAAAAT  | CAGAAATATT  | CCTACTTACA  |
| 1381 | TGGTCATGGT  | GATGAAAACC  | AGATGGACTG  | CTCCATGCCA  | AAGCACCTTG  | CAAACATTCA  |
| 1441 | AACCTGTCAC  | CCATTACAAA  | TACTGGGCTG  | ACGGATGGCT  | CTGGCTTTGC  | TTTTGCATCT  |
| 1501 | CCGCTGTCTC  | ATTCAGCAGC  | AGCATCTGGC  | TCTGGCTCTC  | GGCTCTGATC  | CTGGTTCTGA  |
| 1561 | CTCTCCCCTG  | GAGCTCTCTC  | CCTTGGGTGA  | GAAATAAGCA  | GATAATCTCC  | CTCATCTGTG  |
| 1621 | TGTGGTGTGA  | ACAAGAGGCT  | TGAAAGGTCA  | GAGAAGAAGA  | TGCCTGAACT  | GCAGGGAGAC  |
| 1681 | AGATTAGAGT  | GGGGAAAATG  | TAACCTCTGAG | GAAAAAGGGA  | AGCAATTAAG  | AGATCAAGGC  |
| 1741 | CAGGGGCAGT  | GGCTCATGCC  | TGTAATCCCA  | ACACTTTGGG  | AGGCTGAGGC  | GGGCAGACCA  |
| 1801 | TGAGGTGAGG  | AGTTGAGAGC  | CAGTCTGGCC  | AACATAGTGA  | AACCCCGTCT  | CTACTAAAAA  |
| 1861 | TACAAAAAAA  | TTAGCCAGGT  | ATGGTGGTGT  | GCACCTGTAA  | TCCAGCTAC   | TTGGGAGGCT  |

## 【図4 - 1】

```

1921 GAGGCAGAAG AATTGCATGA ACCCGGGAGG CAGAGGTTGC GGTGAGCCGA GATTGAACCA
1981 TTGCACTCCA ACCTGGGCAA CAGTGTGAGA CTCTGTCTCC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
2041 AAATCAAGGC CGGGGAGGGG GCAGGGGTGG CACAGCTATC GAGTTCTGTT CATCCTCTGT
2101 GAGATTACAT CAGGAGGTGT AAAAGAACTC TAGAAGAATG AAGCTAAGTC CAGCTGATTC
2161 AGGGTTCAAG AAGGATTGAG GTGGGAGAGG CATCATGACC ACTGGTGAGG AGTGGAGGAA
2221 GGCCGACACT GGAGCTTTCT TTGCCCAGC AGAGGAGGGG TGTGACACTC TTGAGGACCA
2281 ATGTAATGGC GCAGCTCCCT CTGGGAGGGG GAAAGGAGAG GACTGGAGGG GATGCTAAAC
2341 TGACCTTCTA ACCTTCAGGG GCCTGAGTCT GGTGTCTCTG GGTGGGGAGG GGCCTCTGCC
2401 TGAAACTGTT TTAGCCCAGA AGTCAGGCCT GAAGGTTAAA GGGCAAGGAG CTGGTGGATG
2461 AACAAAGTGG GGAAAGAGGC CCAGGGTCCA CATCTACTGA GCTGGACTCA GGCATGGGAA
2521 TTGGTGTGTG GAGGGCCAAG ACACCTGGCC TCCTAAAAGT TTGCTGAAAA TCACCTGACAT
2581 GAGAGTAATT GATTTATAGG AGAAAAGGTA GATAAATTTA TTTAATATGT ATATATGAGC
2641 ACCTTTAGAA TGAAGACCCA AAGATATAGG GGAATTTGCC AGTTATTAT TATTTTTTTT
2701 TGGAGATGGA GTCTCACTGT GTCTGCCAGG CTAGAGTGCA GTGGCATGAT CTCGGCTCAC
2761 TGCAACCTCC GCCTGCTGGG TTCAAGCAAT TCTCTGCCT CATCTCCTG AGCAGCTGTG
2821 ACTACAGGCA CGCACCACCA TGCCCGCTA ATTTTTTGTA TTTTTTAGTA GAGACAGGGT
2881 TTCACCATGC TGGCCAGGCT GGTCTGGAAC TCCTGACCTT GTGATCCGCC CGCCTTGGCC
2941 TCCAGAGTG CTGGGATTAT AGGCATGAGC CACCGCCCCC AGCCTGAAAT CGCAATTTT
3001 ATGTTTATGT TTTACAAAGT ATGGACAGCT GTGTAGAAAT ATGACTGGAC AGAAGGGCAT
3061 GCTCTAATGT TAACAGACTG AGTGGGGAAA CCCAGGAAGG CCTGTTGAGA TTCCTCTGG
3121 CCTCTCTCAT TCCTTCCTTC TGGGTATGGG GCAGGACCCT CTCTGGAATG GGGAGATCTT
3181 AGGACCTAAG TTAAATAAGG TAGGTCAGAT AATTTTTTAT GGCCAGTTTT TACATACAGT
3241 AATTTTAGGT TTTATGGCTG GCTTTGGGGA AAAGAGGTCC TGGTTTTTAT AGCTGGCCTT
3301 GGGGGAGAAT GGGACCCAGC AACAGGAGGA CAGGAGAGGG TCAGAGAAAA ACTTCTGCTT
3361 CTGAGGCTGC TACTGAGGCC TTCATTTTAG GGTATTGTCT TCTGAGCCCC AGCATTCCCTC
3421 GGTGTGAAAA ATTTTAAAGA AATTTTATAG TCCAGAAAT GAGTTGGTGA ATTGTCTTAT
3481 AAGCCATGGA ACTAGTCTCT TAGTCTGAG AATAGGCCAG TCTAGTTAAA TAGTTATTAG
3541 TTGTGTCTAA TTTTAGGCAG TGTGTGTCAG ATGGGCTTCC ACCAAAGCCA GGCCTCTATA
3601 TGATATGAGT AATCAGTTAT TTAGTAAGAG GCATTTTTGT CTCAAAAAAT AAATAAATAA
3661 AAATATATGA ATAAATGAAT GTATGTTTCT TATCAGACTA CGTCTGTTCT ATCATTAATT
3721 CCAGAAGGGA GGAGGGTCTG GTTCCCCCTT CCCATCATGG CCTGACCTAG TTTTCAGGTT
3781 AATTTTAGAA CACCCTTGGC TGTGAGGAGT GGTCCATTGG GATGGTTAGG GAGCTTTAGG
3841 ATTTTACTTT TGGTTTACAA AGTAATGTGA ATTAACAGA CATTTGAGTT AAAGTTTTTA

```

FIG. 4CONT'D

## 【図4 - 2】

```

3901 TTTTAAATA AAATATTGA TTTAAGCATT TTTTAACTG AATTAATTAG AGCTCTTTTA
3961 TATATTTTGA TAATGGAACA TTACATACAC AGGCACATAT AAATATATAG ACACATAAAC
4021 AGAAGTAGAG CTTATAGATT TATACTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTAAT GAGACAGGTT
4081 CTCCTTCTGT CATCTAGGCT GGAGTGCAGT GGTGCCATCA CAGCTCACTG CAGCCTTGAC
4141 CTCCAAGGCT CAAGCAATCC TTCTACCTGA CTGGCTAGCT GGGACTACAG GCGCGTGCCA
4201 CCATGCCTGG CTAATTCGTG TATTTTTTGT AGATATGGGG AGTTTTACCA TCTTGCCCAG
4261 GCTGGTCTTG AACTCCTGGG CTCAAGAAAT TTTCTAACT TGACCTCCCA AAGTGTGGA
4321 ATTACAGGCA TGAGSCACTA CGCCAGACCA GATTTTTTAT TTGTCAGTTT CTAGGTAGTT
4381 TTCCCCAACT TCAGACTATC AATTTTTAAA TTATCTGTTT TATGTCTTAA TTATTAACCTA
4441 GGCAACTCTA AACTTGATC TCTAAGACAT GACTTTTGA TGAAATAAGG TAGAAAATGT
4501 ATATTTCAAA GGCATAGAAT TTAGATCTAA ATAAAGGTAA AGTTATCTAA ATTTAAGCC
4561 ATTGTCTTTT CTATTCTAAA AGGTTTTGGA GGTGCGGTG TAGAGAGGGA GATGCTTTTA
4621 CAAATGGAAT TTTTGTGTTT GTTTTTGTTT TGAGACGGAG TCTTGCTCTG TCACCCAGAG
4681 TCTCGCTCTG TCGCCCAGGC TGGAGTGCAG TGGCAGCATC TCCGCTCACT GCAACCTCTG
4741 CCTCCCGGCT TCAAGTGATT CTCCCACCTC AACCTCCTGA GTAGTGGGGA TTAGAGCTGT
4801 GTGCCACCAC GCCCAGCTAA TTTTGTATT TTTAGTAGAG ACCGAGTTTC ACCATGCTGG
4861 CCAGGCTGAT CTCGAACCTC CACCTCAGGT GATCCGCTCG CCTTGCCCTC CCAAAGTGCT
4921 GGGATAACAG GCATGAGCCA CTGCACCTGG CCTTTTCTGA GTTTTTTAAG GAGTCTGAGT
4981 CATTAGAAGT CTTTCTAGA TTTTTTAAAA ATGTGGTATT GAAGATGGCA AAGAGGAAGG
5041 AGGAATAGGG TGGAGTAAAA GTAAATGGGA GGATAGTTT TAAGAAAGGA AGTGAATAGA
5101 GACATCAAAC ACATTTTTAA AAAAAGATTT TAGTCTACTG AACAAAATTT TTTAAATAG
5161 GATTTAAAGA GAAAACACAG AAGGCTTTAA AAATATACAC ATAGCTTGAA TATTAGCTTT
5221 TAATTAAGCT GACTTCTAAC CATGGAGCTC TTTAACAAAA ATTCTTTTAA ATTTGTCTCT
5281 CTCCTCCTTT AAAACTTTTT GTAGAGATGG GGTTCGCCC TGTTACCCAG GCTGGTCTCA
5341 AGTCCGGGCA ACTTCTGGGC TAAAGTGATC TGCCTGTCTC GGCCTCCCAA GTGATAGGAT
5401 TACAGGTGTG AGCCACTGCG ACTCACCTTA AATCTCTTGT TACCAGATTT TAGTTGGGAC
5461 AAATGCTGAT ATTTTAAAG TCACATAAAT ATTAAGCCGA AAAGGACTGA TTTCTGATTA
5521 GGAAGGAAAC CTAAGCCACG GTGGGAATTT TAATTATTAA ACTGTAAAT GGAGCAGCCT
5581 CCATTGTATA TTTTGTATGG AATCCAAAGT GGCAGTTTGA GTGTAATTGT TTTAGGTCAG
5641 GTTTTTGTGC TTTAATTTAA TCAAGACAAT TGTAAAGGAT AGCTGTGACA CTATTATGTG
5701 TCCTTTTAAAT TTGATCTATC AATTCTTTAG AACAAGTAAT TTTTTTAAAT TTAGGAATTT
5761 TAGTCTAAAG GATTTATCTT TTGGCCATTG ACAATTAGAA TTTTAAATGG GGTATTTAAT
5821 TCCAATAGCA ACTTAATCCA AAGTTTTCTT TATGTCAAAG AAAACAGAAG CCCAGGAGGG
5881 ATGAGACCTT GTAAGACAAA ACTCCCCTAG GAGCTTGGA TGTGTAAGAA TACATGTGTT
5941 GGGCTCCCAA TCTTTTCATA CTGGCTGTGA TGTTACCTGA AAAATCACAT CCTTTGGATG
6001 GTGGAGACCA AGCGGGAATA TCCCACCTA GTCACGTCAT GCTCTCAAG ACATGAGACA
6061 AGAGGGAAAC CTCTCACCTT GTTTTTATTT CAGGGACTGG CAGCAAAGTT TGTCATAACA
6121 GAAGTCAGCA TAACCAGAAC CACGAACTG ACCAGTTTGC AGGGCCAGTT CAAACAGTGG

```

FIG. 4<sub>CONT'D</sub>

## 【図4 - 3】

```

6181 GTTGCAGGCC TGTTCACCC TAGGGTACCC CTCCTTATGA CAGAACACCA AAAGACAAGA
6241 CAAAAACGAA GGAAAACGGC AACAACAAAA AAGCTATTTT TGAAAGGAAA ATGGCAACAA
6301 CAACAACAAA AGCTATTTCT GAAGGGAATG GGGTCAAACT ATGAATACTT ATACCACAAA
6361 GTACTAAAAA ATATATCAGA CTCACATATC CAAGGTTAGT CACACACAAA ACCTGTTCTC
6421 TCATTAATCT TACATTTGGA AAGGAAAAGG GAAACAATGA TTTTACTGT CCACTCATCC
6481 AGAGTCCACA GAGAGAGGAA AACTGGAAAA CTGGGAGTCT GGCAGGAAAT TCTCACTCCT
6541 CTGCTGGCTT GCCAGGTTCC TGTATTTCCCT TCTCTGTGGC TTCCAGAAAA GCACAATAGC
6601 TTTGGTGGTC TTATTTGTGA TGCCAAACTG TGCTCTTGGC CCCCTAAAGT TTCAGTGAAA
6661 ATCACTGACA TGAAGCAGAT TAATAGGGAA AAAGGCATAC AAATTTATTA AATACGAATG
6721 GGAGCCTTTA GAATGAAGCC TTGAAGCTAT AGGGGAAATT GTCTATTTT ATGTTTAGGT
6781 TTAACAAAGT ATGGACAGCT GTGTAGAAAT ATGACTGGAC AGAAAGGGCA CGATCTAATG
6841 TTAACAGACT GAGTGGGGAA ACCCAGCAAG GCCTGTCTGT TGAGATTCCCT CCTAGCCTCT
6901 CTCATTCCTT CCTTCTGGTG TGGGGCAGGA CCCTCTCTGG AATGGAGGTT TTATGACCTA
6961 AGTCAAATAA CGTAGGTCAG ATTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTGAGC TGGAGTCTCT
7021 CTGTCAACAG GCTGGAGTGC AGTGGCGTGA CCTTGGCTCA CTGAAACCTC CGCCCCCTGG
7081 GTTCAAGCCA TTCTCCTGCC TTAGCCTCCT GAGTAGCTGG GATTACAGGG GTGTGCCACC
7141 ACGCCACAGT AATTTTTGTA TTTTGTAGTAC AGACAGGGTT TCACCTTGTT GGTGAGGCTG
7201 GTCTCAAATT CCTGACCTTG TGATCCACCT GCCTCGGCCT CCCAAAGTGC TAGGATTACA
7261 GCGGTGAGCC ACTGTGCCCG GCCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTATAGGAA GTTGTATTTT
7321 GGGCTTTTTA ACTAGCTTGT TTTTAAATTA GATTATTGCC TTTAGGGTGG AGCCCTTTAA
7381 TAAAAAGGGG GAAGAAAACA TAGGTTTTAG GGCTCATAT TTAATGGGT AAAGCAGGCA
7441 TAGCTGGAAG GCAGAATACA GAACCCCCCT AATCAAGGAT CTCATTTTTA TATTGAATCC
7501 TAGGCCCCC AAAAGAGGGA AATGTCATGG GACGAGATGT GTGGCATTTT TATCGAGTGC
7561 CCCACTGTAA AGATGCTCCC CCAAGGCTGG CAGGCAGCCC AGTGCCGATT AGCCCACTCT
7621 GTGCTTAGTC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GAGGTGGAGT CTTGCTCTGT TGCCCAGGCT
7681 GGAGTGCAAT GCGGTGATCT CGGCTCAATG CAATCTCTGT CTCGTGGGTT CAAGCGATTC
7741 TCCTGCCTCA GCCTCCCAAG TAGCTGAGAT TACAGGCACC AGCCACTATG CTCAGCTAAT
7801 TTTTGTATT TTTAGTAGAG ATGGGTTTC AACATGTTGG CCAGGCTGGT CTCGAAC TTC
7861 TGACCCCAAG TGATCCGCCC GCCTCGGCCT CCCAAAGTGC TGGGATTACA GCGGTGAGCC
7921 ACCATGCCTG GCGTGCTTAG CCTATTTTTA ATGGGAGTTT CATCCTCAAT GGTGAGTGCT
7981 TTCATTGTCT TTAGGTGCCC CAGACCATGT TTTTAAAAAT TTAATGCAC GAAGAAATAA
8041 GTAGCCCTGT ATAGTAGTAA TACTTTGTTG TGAATAACTG TCATAAGTCA TCTCTAAAAC
8101 TGTATTTTTT ATCTAGTTAT TATATATGAC TAGCTATATG TCTAGTTTTT TAAATAATAC
8161 AAAGTAATTT ATTTTGGCA TCCTCAAAAA CCAAAGAGAT TAGGTAATGT AGTGTAGAAG
8221 AGAGCAGAGC TTTAGACCTG AGAAGAATCT GCCCATGACT CGTGAAACTC CACAACGAAA
8281 GTAGGAGACC CCAAAAAGG GGTGAGTGTG ATCTTTTCTG AATTTTTTTT TTTTTTTAGA
8341 TGGAGTCTTG CTCTGCCACC AGGCTGGAGT GCAGTGGTGC AATCTCGGCT CAGCCTCCCG
8401 AGTAGCTAGG ATTACAGGCA CGCGCCACCA TGACCAGCTA ATTTTGTAT TTTTAGTAGA
8461 GACAGCGTTT CACCATGTTG GCCAGGATGG TCTCGGTCTC TTGACCTCGT GATCCGCCCG

```

FIG. 4<sub>CONT'D</sub>

## 【図4 - 4】

```

8521 CCTCGGCCTC CCAAAGTGCT GGGATTACAA GCGTGAGCCA CTGCACTCGG CCGGTCAGAT
8581 AATTTTTTTG GCCAGTTTTT ACATAGAGTA ATTTTAGGTT TTATGGCTGG CTTTGGGGCA
8641 AAGGGGTTCT GGTTTTTATA GCTGGTCTTG GGGGAGAATG GAACCGAGTG ACAAGAGGAC
8701 AAGAGAGGGT CAGAGAAAAA CTTCTGCTTC TGAGGCGGCT ATTGAGGCCT TCATTTTGGA
8761 GTATTGTCCT CTAAGCCCCA GCAGTGTCAA ACTGTACACA AACCATACAC AGCAGCCAGC
8821 TCGGGTGCTG TTAGGAAATG GTCTCACTGC TGGGTCTGTG GGGTATGTGT GTGTCTGGGT
8881 GTGTGGCTAC TGTCTGCATC CTCTCCTCCC CTACAGCCTC CCCGCCCTCC CTCCAGCCAC
8941 CCTGGGATTG GTGACTCTCA GCCCCTCCCC TCAGCTCCCC TAGACCCTCC CAGAGCCTTT
9001 ATCAGGGAGC TGGGACTGAG TGACTGCAGC CTTCTAGAT CCCCTCCACT CGGTTTCTCT
9061 CTTTGCAGGA GCACCGGCAG CACCAGTGTG TGAGGAGAGC AGGCAGCGGT CCTAGCCAGT
9121 TCCTTGATCC TGCCAGACCA CCCAGCCCCC GGCACAGAGC TGCTCCACAG GTAGGCAAGT
9181 GGGAGAATGC TGGATGGACC AGAGCTGGCA CCAGGGGGCT GTTATCTCCT GACTGCCCTT
9241 CTTCTTCCTT TTCTTTCATC TGTGTATTGT CAGGCAGCTA CTAATTGTCA ACCCAGAAGC
9301 TGCTGGGTTT AGACCAGGGT CTCAATAAAT CACACCCCCA CAGAAGCCTG CGGGCACTGG
9361 GCACTGATTC CCCCAGTGTT TCTGAGTATT CCAGTTTGCC ACTGCCTTGA CTGTAACATA
9421 TGCTAGTATC CATTCTCATT TTTTAAATTT TTATTTATTT ATTTATTTAT TTTTGTAGAC
9481 AGAGTTTCAC TCTTGTCAAC CAGGCTGGAG TACAATGGCG CGATCTCAGC TCACTGCAAC
9541 CTCCGCCCTC CAGGTTCAAG TGATTATCCT GCCTCAGCCT CCTGAGCTGG GATTACAGGC
9601 ATGCGCCACC ATGCCAGCT AATTTTGTGA TTTTGTAGTAG AGACAGAGTT TCACCATGTT
9661 GGCCAGGCTG GTCTTGAACCT CCTGACCTCA AGTGACCCGC CCATCTCGGC CTCCCAAAGT
9721 GCTAGGATTA CAGGTGTGAG CCACTGCGCC CAGCCTATTT CTTTTTTGAG ATGGAATCTT
9781 GCTCTCTCGC CCAGGCTGGA ATGCAGCAAG CATGATCTCG GCTCACTGCA ACCTCCATCT
9841 CCCGGGCTCA AGCCATCCTT CAGCCTCGGC CTCCCCAGTA GCTGAGACCA CAGGCACATG
9901 CCACCACGCC TGGCTAATTT TTTATATTTT TGGTAAAGAT GTGGTTTCAC CATGTTGCCC
9961 AGGCTGGTCT CAAACTCCTG AGCTCAAGTG APTCACTCGC CTTGGCCTCC CAAAGTGCTA
10021 GGATTACAGG TGTGAGCCAC TGCACCCGGC CTTACCCATT ATCTTTTGAA CATCTACTAT
10081 GCATTAAAGCT CTTTACATGC ATTAACCTCTA ATACTTTCAA TAACCTGTG AGGTAGGCTC
10141 TTTTCTTTCT CCCATTTTGT AGTTAAAAAG CCAAGGCTCA GAGAGGTTAA ATAACCTGCC
10201 GGGGGTTCCA CAGCTGTAAG TGGTAAAGCT GGGTTACAAA CTATTTGACT CTAGAGCTTT
10261 TAACCACTGC CTAAGACTGC CCCTCATCAA TAGAGGCTTG GGCAACCCAT GGCCCTAGGC
10321 AGACCTGGGG GCAGGAGGGC TGCATAGGAA AGGGCAGAAC TTTCTAGTTC TAGAACAAC
10381 AATAAAAAGA AGAAAGCCTT CAGAGGCTCC ACATTAATTG GAACAAAGGG GATTATGACA
10441 GATGCTTAGG CATGTTTGTG GAATTATTAA TAAATAAAT CAGACTAGGG ACTGGGGACT
10501 CCAGTCTTGG AGGCCTTCAC AGGCCAGAT CCCAAACCCA CCAAACCCAC TAGACCTGCA
10561 GTGGAAGCTA CAATGAGCTT GGATAGTTCC TGCAGTTAAC AGCAATATAC TATGTATTCT
10621 GCCTCTTTCT ATTTAAATTT TTTAACCTGA TATCTTAGTA AAACTTTTTC ATAAAAATTC
10681 CAGACATTTG GAAGTGCCAA AAATCAAGTC ATTTTTTATA TCTTCAGTAA TTCTGTGCCA
10741 TAAACAAACA GGTGCTAGG TGCTCTATGG GATGTAAAC CTTGGCCAGG CAAGGTGACT

```

FIG. 4<sub>CONT'D</sub>

## 【図4 - 5】

```

10801 CACTCCTGTA ATCCTAGCAC TTTGGGAGGC TGAGGCGGGA ATATTGCTTG AGCCCAGGAA
10861 TTTGTGACCA GTCTGGGCAA CATAGTGAGA CCTAGACTCT ACAAAAAAAA TTTAAAAATT
10921 AGGTGGGTGT GGTGGCTCAT ACCTGTAGTC CCAGCTACTT GGAAGGCTGA GGTGGGAGGA
10981 TCGCTTGAGC CCAGGAGGCG GGCAAGGCTG CAGTGAGCTG TGATGGTGGC ACTGCACTCC
11041 AGCCTGGGCG ACAGAGCAAA ACCCTGTCTC AAAAAAAGAG GCAAAAAACA AACTTAAGA
11101 ATCCTTGTTT TAGATTGGGG CAGACTAAAG AGTCAGTTGC CATGGATGAA GCTTGATTGG
11161 ATCCTGGAAA AGGAAAAATA AAGCTTCAAA GGACATGTTT AGAAGTTTAT AAAGGACATG
11221 TAGAGAAATC TGAGAGTGGG TCGCTGTGTT ATGAGTGATG TTGATTTTCT TAGGTGTGGT
11281 GATGGAGTTA TGATTGTGTA AGAGAATGTT CCAGTTCTTG GGAGAGGCAT GCTGACATTT
11341 TAGGGTAAAA TGTGATGATA TCTATAACCT ACTTTAGGAT GGTAGGGTAG CAAGGATTTG
11401 TGTAATGTG TATATGCATG TATTTATATG CACACATATG TGTGTGTGTC AGAGCACACA
11461 GATAGTGCAA GGTGTTAACA TTATCAGTTG GTGCATTTAG ATGAGGAACA TACAGTATAC
11521 AGATGTTAAT TGTATCTTTT TTCAACTTTT CTGTAAGTTA AAAAAACTTT CAAAAATAATA
11581 AGCTATATTG AATTTTTAAA ACATCATATT ATGCTATTCT TCTGTATAAA TTCTCCAATG
11641 GTGTTCCATT TCACCTCCTTA CCACAGCCTA CAAGGCCCAT CATGATCTGC CCCGACCTAC
11701 TCTCTGATCC TCTCTCTTCC TGCTCAAGTG ATTCTGGCCA CCCTTTTTTT TTCTTCTTTT
11761 TTAGACAGTC TTGCTCTGTC ACCCAAGCTG GAGTGCAGTG GTGCGATCTT GGCTCACTGC
11821 AACCTCCACC TCCCAGGTTT AAGCGATTCT CCTGCTCAA CCTCTAGAGT AGCTGGGATT
11881 ACAGGCATGC GCCACCATGC CCAGCTAATT TTTGCTCACC CTGGCTTTTT AATGTCTCTG
11941 GAATATGCTG CCACTCATTG CTGCCTCAGG GTCTACTTCT TTGCATCACA GCAGATGCCA
12001 TTATCTGACA TCACACTATA TATTTATTTG CTTGTGTAGT TGGTCCCCTT CTCCACCCTA
12061 CAGTAGAATG TAAGTCCAGT GAAAATGAAG ACTTTGTTCA CTGTTATGTC CCAGTACCTA
12121 GAACAGTTCC AGGCACTAAG TAGACACTCA ATAAATGTTG ACTAGTGAAA AAAAAATGTGA
12181 GACCTGGGAT CCTGCCTTAT AAGGACTCAG TGTCTAGAAA AGGGAGCTGT TTTCCATGCA
12241 AATAACTGTA GTACAAAAGAC GAGTGTAGGC AAATTGCTAT GGGGCTTCAA AGAAAGGAGA
12301 GGCAATCCGG GGCTTGGGGA ATCAGGGAGG GCTTTGAGCT GATCTCCCAG GTTGGCAGAG
12361 TTGAGTCAAG AGAGCATCGA GAGCTAAGGC ACACAGTGAT CATGCATGGG CTGGGTAGGG
12421 GCATGGGAAA GAGTCCTGTC CGGGTGGTGT GCCCAGGGAA TGCAGGGGTC CTGCGACATG
12481 AGGCTGGGCT CTTAAGTGTC AGGGAGGAAA CCCAGGAGAG AAAAGCACTT CCAGTGAAAC
12541 CCTGGGAAAG GCCAGAGAGA AGGAGGAAGA GCATGGGATC TTGGACAGAG GCTGGAGCAA
12601 ATTGTAAGTG ACCTCCGCTG ATTGGATTTT TGACCGTGGT TAGGACCCTG ACTATTGCTC
12661 ATTCAGACAT GAGACACATT TGCTTACAGC CTCTCTTTGT TGTTCGAGGG TCTGGATCCC
12721 TCAGCTTAAG AGAGGAATGG GGGCTCTGAA GCTCTGGGCC TCTTCATTGT CTCCTGAAT
12781 TCATTTGCTC TTTCTCCTTT GCTCCTTTAT TTGCTCCTTC TTCCTTTGAA TGGAGGCTGA
12841 CATGTTTGGA CTTGACTGAT TTGAGAGGAG GGGAAATTTG GTACCTAGCC AACAGCTGAC
12901 ACAGACAGTG GCTGCCACCT GTAGGCAATT GTGAACAGAA GGAATAGAAA GCTACAGGAG
12961 CAAAACCTTG AGACCAGCTT TCATATTGGT TCCTCTTACC TCACTGCCCT GGGTAGCAGG
13021 TCTTTGGTTG GAACTAATCG TTCTCTCCTT CCAGTCTCCT ATTCATGCTC TTACCTCCCC
13081 GCCTCAAGCC TGCACCTCTT GCTGAAAAAG ATCCAAGAGG TGAATCCCTT CCATCTCTTC

```

FIG. 4<sub>CONT'D</sub>

## 【図4 - 6】

```

13141 AGCTCCACCC CTTGCTTCTC ACTGTGGGTT AACTTCCTCC TTTGAAGTGG CAGGATCTGG
13201 GTGCCAGTTT GCCTGTCAGG AAGTGTTTCT TATCACTCCA CTCCCAATCC CCCTGGTCCC
13261 AAACCTAGGTA CAGAAATTCC TACTGGGGCT GAAGAACAAT TTGCCATCCA CAAACGTCTT
13321 AGACAAGACA TGGCCAGCCG CCCCCTACAA GTGCCTCAGC ACAGCAAATC AGGAGCTGCA
13381 GCAGCTCTTC TACCAGTGGA AGGCAAGTGG AGCCCAGGCA CCCCTCCTCT CATTTCGTCT
13441 TTTTTTTCCC TCCCCCTGAT TTTCTCTTTT TGCCTCCCTC TTCTATTTTT TTCCCATTA
13501 AAAAATTGTG GTAAATATA CATAACATAC AATCTACCAT TTTAAGGGTG TTTAAGTGTA
13561 TAGTTCAGTG GCATGAGCGA CATTTCATGT GTTCTGCAGC CATCACTGCC ATCCATCTCC
13621 ATATGCGTTT TTCATCACCC CAAACTGAAA CTCTGTACCC ATTAAGCAAT AACCCTCTAT
13681 TCTCCCATTC CCCTAGCCCC TGATATCTTA TAATCTACTT TCTGTTTCTA TGAATTTTAC
13741 TTTTCCAAGT GCCTCATATA AGTGGGAATC ATATTTGTCC TTTTGTCTCT GGCTTATTTT
13801 ACTTAGCATA AAGTAATTTG TTCTTTTATT CAGGAAATGC TTATTGAGCA CCTGTCTGGG
13861 ACTAAGCCTT GCCCTGAGAG CTGAGCATAG AGCCCTCCTG GTGCTTTTAT TTGATGGTGT
13921 CCATTCCTTC CCCTAGCCTC CCTCAGTTCT CGCACTCCTC CTCAATGGTC CTCCAGCCCC
13981 GGCTCTCTCC TGAGGTGTCT AGTGCTGTCT CTTTTTCTC AGTCTCTCTC CTCTCCTAGT
14041 GTCTTCTAGT CAATATTTCT CACCTCCCTC CCCAGCCCTG CCCTCCCACT CTATGATTTT
14101 AGCTCCTGTC CCTCCTTCCT CACAGTGCAA GAGGTTCCGG GATCAGCTGT CCCCCAAGCA
14161 GGTAGAGATC CTGAGGGAAA AGCTCTGTGC CAGTGAATG TTCAAGGGCA AGAAGGCTTC
14221 ATATCCCCAG AGGTGAGGGC CTCCCAGACC CTGCACAGCC AGTTCCATCA CGCAGCAGTT
14281 CTCAAACTTG AGCGTGCCTT AGAATCACCT GGCAGGATTG TCACCCCAAG GTGCTGTGTC
14341 CCTCCTCAGA GTCTCTGATC CAGCAGGTCT TGGGGTGAGG ACCAAAATTT GCCTTTCTAA
14401 CAACTCCCCA GGTGGTGCTG ATGTCTTGGT CCTGGACTGT GCTCTGTGGA CACTGACAGA
14461 GGATACGTGG ATGTGGGGGA AGGGCCCCGG AGGACTAGGA TGGGAATCTT GGGGGTGGGG
14521 AAGAGGCCTC TGGGCCTTGT CGCGCTGCAC ACCTCCCATG TGTCTCAGT GTCCCAATTC
14581 CATTCTGTGG TGAATACATT GGGCTGCAAG GGAACCCCAA GCTGCAGAAG CTGAAAGGCG
14641 GGGAGGAGGG GCCTGTTCTG ATGGCAGAGG CCGTGAAGAA GGTCAATCGT GGCAATGGCA
14701 AGGTAAGGGC CTGCAGGCTG AACTCCTCCC GCAGCTAGTG CAGAGCTGTG GGCTGGCATC
14761 TGGAGAGCAG ATGGCAGGCT GTGTTTGCCT CCTGCCAGGT GGAGTGGGGG CAATTAATCC
14821 TGCTTTCTCT CACCCTTGCC TGTTCCTGCC CTAGACTTCT TCTCGGATTC TCCTCCTGAC
14881 CAAGGGCCAT GTGATTCTCA CAGACACCAA GAAGTCCCAG GCCAAAATTG TCATTGGGCT
14941 AGACAATGTG GCTGGGGTGT CAGTCACCAG CCTCAAGGAT GGGCTCTTTA GCTTGCATCT
15001 GAGTGAGGTA TCAGAGCTGG GTGGGGCAAG CCTTGGACTG GAGAAGGTGG TATGCATCCC
15061 AGGGCTGGGG CAGGCTGGAG GTGATGGGGA CCAGACCTTT CGCTCTGGGC CTTTGATGTC
15121 CCTCAGGTGC TCCTGAAGAG AAAAAATGAA TCCCTTTCTT GCTATTTTTT CCTCTTCTTA
15181 AGATGTCATC GGTGGGCTCC AAGGGGGACT TCCTGCTGGT CAGCGAGCAT GTGATTGAAC
15241 TGCTGACCAA AATGTACCGG GCTGTGCTGG ATGCCACGCA GAGGCAGCTT ACAGTCACCG
15301 TGAAGTGAAG GTGAGGCCAT GAAGTGGGGG TGAGGGGCGG CTTACGGTAG ATGGCCAGGC
15361 TGATGGTCAT CGTGACCAGG ATCAGAAAGC GAAGCATGTA GGGCAGTGCA GGCCGGGGCT

```

FIG. 4CONT'D

## 【図4 - 7】

```

15421 TGGAGGTGTT TCTCAGGCC CCACCCAGGT TCTCTGGGGC CTCAAGTCCT CTGACTCGCA
15481 TGATGGGGGG GCCATCATGG AAATGCGGGA GTCGGGGTGA GGGGATGGGC ACTAGACTTG
15541 GTTTTCTGTT CCCTCTCCAG GTTCTCAGTG AGGTTCAGG AGAACAGTGT GGCTGTCAAG
15601 GTCGTCCAGG GCCCTGCAGG TGGTGACAAC AGCAAGCTAC GCTACAAAAA AAAGGGGAGT
15661 CATTGCTTGG AGGTGACTGT GCAGTGAGGA GGGGGCACCA TGCAGAGATG GCAGTTGCTT
15721 CCTCCTGAAC CAGCACTAAT CCCCTCTGC CCTCCTGTGT GGGAGGATCT CTAACCCCTC
15781 TGATCGTGGC GCATGGCTTG GGGATTAAAC TACCCTTGAA GAGGACCCTT GTCCTCAAAC
15841 CTTCTTGTTT TCTCCTCCAA AAGTAGCTTC CTCCAACCCG CAGCCTCTCT GCACACTAAT
15901 AAAACATGTG GCTTGGAAG GTTCAGTCAG GGTGGGTGGG TCCTTGTTCC CCCATCTTTT
15961 TCACCCAGGT GTACTTAGAC CCTGCCCCC ATGCCCTTTT TCCTCCTCAA GCTCCTTGA
16021 GCCAGCTAGT GAGGTAATAA GAAAGGAAAA GAAGGAAAAT TGTCTCCGGG CTCCTTGACC
16081 GGCTGAGCTC TGGGGGGGTG TTTAGAGAGA CTGCGGTGGG TGGAGGGGCT GCGGGGGGAG
16141 TTAAGGATGG GGCTCAGGTC GCAGGTGGCC AGTGGACTGA TTCATTAAAGT GTGTCCCTGG
16201 AGGAAAGAAG TGAGCATCCC TGTCTGGCA GAACTGGGG TCCTTTGGCG ATTTAGCCTG
16261 AAAAGCAGCC CAAGGCTGGA GGGCTTATGT ATGCTGGGT GCTGGGGAAT GCAGGGTCTC
16321 CTGTACTTGG GAACGCCATC ACCCTTCTA CTCCCACACA CAGCACAGGG CTCATCACA
16381 CCAGCCTCCC CGACACCCCC TTCTTCTCA CACACCCGAG ATGCCAACT GCTGCCAACA
16441 GTTATCTTGC TCGTCTCTGT CCCACAGCTG GGGCCTGCAG CAGGTGGCAC TTCACATCAC
16501 TCACTTGATG AGGCTCCCTC ATCAAGACCC TCCCATCCCT GTAACTGGC CCTTCTCTC
16561 CCTCTTCCCT TATTTTCCCT GCGTCATTGT CATTATCTTT TTCTCACCCT CCCAACTATC
16621 TCACACCATC TCATTGTCCC TGTTTCTGTG AGCTCTGACT AATATCAATA TGTAATATTT
16681 TGTAAATGC TTTAAATATT TTCCTACTCC CCCTCATATC TATTTTCTCA TAGATTCTGT
16741 CTTGTCTGTC TTGTCTCTAC CTTCTGTCTG GCCTCTACCT TTGGGGAACA AGCTGCTCAT
16801 GTAGTCACAG TAAAATTTAG ATCTGTGGTC TGTGAGAGCT TAGCAGGGTC TGCCTTTGTT
16861 TTTGTCTCTG GCTGTCTCTT CCTCTTCTCA AGATCTCTAC CTGCTCTACC TCTTCCCGCT
16921 TCCTTCCCTT AACTCACTAT GCCTTGGGGC TGGGGTCTCC CTCCACCTGA CTTCCATCTG
16981 CAGGCAGCTC ACGGCCGGCT ATCATGCTGG CCAGGGAGAA CTGATTAAT TCTCTTCTG
17041 CCTGCAGATT AATCTGCTGT CTGAGCACAA GCCACGTGCT TCTGGCACAC CCTGCTTTGA
17101 GCTGAGATAG AACCTGGGGA ATCATCTGTT TTCAGGCGGG TGAGGGGCTA GAGCCTGCCT
17161 TGTTTGGGAG GAGGGTGGCT CTGTTTCAGAA TAGGGGTAGC TCAGGCTCTG GCCAGCCTTC
17221 TCCCGCCCCC AACAGCTCCC CCCATCCTTG ACTTCTCAGA ATCAGGCCGA GAAGAGCCTA
17281 TCTGGCCGAG AGTGGGGTGG TGACCTGCCG CTCTCGCCC CCGCTCTCCA TCTCATCTCC
17341 TGCTCCAGG GCCCAAATTG TCGTCACTTT CCCAGTGAAG TGTCTGGTCA TTTTCAGAAG
17401 CAATTTAGG AGAACATGCA GCTGCCGCTC CCTATCCTGC ATTTCCCTTC ACAGGCTGTA
17461 AGGCACTGTC AGCTCCCTGG GCTGGGGGTG ATGGGAGAGG GGAAGGGCTA GGGCCCTCAC
17521 CCCTGTCTC ACTGTGCCCC TCATGTAGAT GGACTGGAGT TCAAGGAAGG GCAGGCACTC
17581 CCCTCCTCCT TTACTCTTCT GTCCTCTCT TCCTCCTCTT CTTTCTGTG TCTGCCTCTC
17641 TTTTCTGGAG CCTAGGAGTG TGTGTTTTCA TCCCCTGAAA CAAATAGGGA CTCAGTTTCC
17701 CCACCTGTGT TACAGGGTGG GAATTGGCTC CATCACTGTG GGAGAAGCTG GAGTTCTGCT

```

FIG. 4<sub>CONT'D</sub>

## 【図4 - 8】

```

17761 ACCAGTCTCT CCCTCCCCAG CCCTGCCTCT TCTCTCCCAG CCCTCTCCCT TCAGCCAGTT
17821 CAGCGCTCTG AGAGTCTGGG TTGTTTCAGC CTCTGAGGGG CACAAGCCAT CCTGGATTCC
17881 CCTAACCCCA TGAGGAGCCA TTCTAGCATC TCACAGCTTA AACCAGCTCT AGCTCAGTCC
17941 TCCTGGCTTA GTCCATTTT CTTCCTCAGG CTCTGAGGGC CTCTTGTTCC TTGCTCTGTG
18001 GGGTTTTCTC CAGTTGTCTC CTGGCTGCAG GACATGGCAG GACATAGAAT GCTGTCATCC
18061 TTCCACTCTT CATTGGCATC TCCACCCAGT GTCACATATG ACCCTAGCCC TGCTCTCCCC
18121 TTGCCAGTAC CCCTCTGGGA TTTTGCGAGA GTCCACAAGT TGTGCATGTG GTGGATATAT
18181 TCAGGCCATC TTGTGTGTAC AAGCTAGAGG GTCTGCTTCC ACCTCTGGCC CTCAGTGAAT
18241 TGCTGACTAA CCTGTCTCAA CACAGCACAA CTGTACACAC CTTTTCCTGG CCTCATCCCT
18301 AACCCATCAT AGCAGCAAAG AGGGGAAGTT GCAGGGGAGG AGCTGCTAAG GACCCTGGAC
18361 TCCAAGTACC CTGCTCCTCT AGGCCAGGGA CATCATCTGA GATGTGGCTC AAATAAAGGG
18421 TGGGTGTTCA AGAAAAACA CTTGGGGACT CTATAGCTGC AACACCCACT TTACATGTCA
18481 TTTCCATATG ATTTGTAGGC AAAATGAAGC CCAGGCTGTC CTAGCCCTCC AATACCTCCC
18541 TCTCTCATCA CCTCTCCAAC ATAGCCTAGC ATTAGCTCTT TCAAGTCTTT GCTAATCCCA
18601 GAGATCAAGG GGTGATCAAC TCTCCCTGCC ATCCCCTGT TCCCCGACC CCCC GCCCGC
18661 GCTCCCCCAC CATCCTTGGC TCCTGCCATC CTCTTTGAGA TGCTGCATCA TCAAAGGACA
18721 TTATTTATGG TGTACCTTTG CTGAAGCCCT GCTTCCCTGG TGCCAGGGCT TGGGAGCAGG
18781 GATGGGTGGG TTGGTGGGG AGAGGGGTGG ATGCAGAGAT TGGACCCAGG AGGCTTTTAG
18841 TCCTCAGCTC TTGGCTTAAC ACCTCCTCCT CTTACACACC CAACTCCCTC CAGCCTGCCC
18901 AGCTTGGGCC TTCAGCTCCA GATTGGTGGG GTTAGGAGAG GAGGAGGAGG GAGATGGATG
18961 GAACCAATTA GGAACAGCAC CTGGGCTCCT CACAGGAATG AACCAGTCAT GCCATTGCA
19021 TGTAACAGC TTCCCACTTC TCTCCTCATC CTACCAAATG CTCCCAACCC TGGGTCTGG
19081 CCCATGTTCT TTGCCACAC AGCCCTGTAA TTAGCTGGGT AATGAGAAGC TTTTAATGAG
19141 TCCCATTAGC ATCTCGTGTA ATAAAGAGGC CTTGAGACCC AGCTGCTGTC CTCACTTTGG
19201 GATGAACACG GGTCCCTGTG TAGCCAGTGA CTTCTGTCAG TACAGTCTAA GTTCTCGGAT
19261 GGGGTGGGAG ACAAACATTT CAGGACCCCA GCAGCACTTG AGAGGTTCCA TGGTGGATCC
19321 ATGTTTTTGA CTGTGATACA AGAACTTGG CTCTGGCTTC CTTGTTCAAT TTGTAAATAA
19381 CATTTTTTCT TCTTTTAAGA GACAGAGTCT TACTTTGTTG CCCAGGCTGG AGTGTAGCAA
19441 TGCAATTATA GCTCACTGCA GCCTCAACCT CCTGGGCTCA AGTGATCCTC CTGCCTCAGC
19501 CTCTGGGATA GCTGGGGCCA CAGGCATGCA CCACCATGCC TGGCTAATTT TTAATAATGT
19561 TTTTGTAGAG ATGGGGTCTT ACTTGCTATG TTGCTCAGAC TGGTCTCGAA CTTCTGGCTT
19621 CAAGCAATTC TCCCACCTCG CCCTCCTAAA GTGCTGGGAG TATGGGCATG AGCCACCATG
19681 TCCAGCCTTG TAAATACATT TTTATTGAGC ACCTATTATA TGTCAAACAT TATAAAGTGA
19741 GGGATACAGT AGCAAAACAA ACAGACAAA ATTTTGGCCA TCATGACACT TATATTCTCTG
19801 GGTGGGAGTG GTGATAGAAA GACAATAAGT AAAATACTTA GCATAGTGGA TGTAAATAAGT
19861 TCATGAAGGG AAAAAATGGG GTGAGGTATA TGGAAATTTG GGGTGGTGAT AATTTTAAAT
19921 AGGGTGATTG GGGAAATGCTT TGTTGCACAG ATTGTTTTTG TAGTAAATAT GAGATAAAGA
19981 TACGGTTCTC TCCCAAACTC AAAATGTAGA AGAGTAGAAG GTCCCAAATC TTCAAGTCTC

```

FIG. 4CONT'D

## 【図4 - 9】

```

20041 TTGGAGAGGG GGGCCACCCA TTCCGTCTGG GACAGTTAAC TGTTCCTCA CAGGTCAAAG
20101 TTTATGCCAG TGCAGTAAAA AGAGTGGGAG ACCTGGGGTG AGACAAACCT GGATTTGAGG
20161 CTGTTCTTCA CTGATTAGTA GCCATATGTA CTGGAGCAAG TGACTGAACC TTCTGAGCCT
20221 GTTTTCTCAT CTGGAAAAATC AGAATATTTTCTACTTACAT GGTTCATGGTG ATGAAAACCA
20281 GATGGACTGC TCCATGCCAA AGCACCCCTGC AAACATTCAA ACCCTGCACC CATTACAAAT
20341 ACTGGGCTGA CGGATGGCTC TGGCTTTGCT TTTGCATCTC CGCTGTCTCA TTCAGCAGCA
20401 GCATCTGGCT CTGGCTCTCG GCTCTGATCC TGGTTCTGAC TCTCCCTTGG AGCTCTCTCC
20461 CTGGGTGAG AAATAAGCAG ATAATCTCCC TCATCTGTGT GTGGTGTGAA CAAGAGGCTT
20521 GAAAGGTCAG AGAAGAAGAT GCCTGAACCTG CAGGGAGACA GATTAGAGTG GGGAAAATGT
20581 AACTCTGAGG AAAAAGGGAA GCAATTAAGA GATCAAGGCC AGGGGCAGTG GCTCATGCCT
20641 GTAATCCCAA CACTTTGGGA GCGTGAGGCG GGCAGACCAT GAGGTCAGGA GTTCGAGACC
20701 AGTCTGGCCA ACATAGTGAA ACCCGTCTC TACTAAAAAT ACAAAAAAAT TAGCCAGGTA
20761 TGGTGGTGTG CACCTGTAAT CCCAGCTACT TGGGAGGCTG AGGCAGAAGA ATTGCATGAA
20821 CCCGGGAGGC AGAGGTTGCG GTGAGCCGAG ATTGAACCAT TGCACTCCAA CCTGGGCAAC
20881 AGTGTGAGAC TCTGTCTCCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AGATTACATC AGGAGGTGTA
20941 CAGGGGTGGC ACAGCTATCG AGTTCTGTTC ATCCTCTGTG AGATTACATC AGGAGGTGTA
21001 AAAGAACTCT AGAAGAATGA AGCTAAGTCC AGCTGATTCA GGGTTCAAGA AGGATTGAGG
21061 TGGGAGAGGC ATCATGACCA CTGGTGAGGA GTGGAGGAAG GCCGACACTG GAGCTTTCTT
21121 TGCCCAAGCA GAGGAGGGGT GTGACACTCT TGAGGACCAA TGTAATGGCG CAGCTCCCTC
21181 TGGGAGGGGG AAAGGAGAGG ACTGGAGGGG ATGCTAAACT GACCTTCTAA CCTTCAGGGG
21241 CCTGAGTCTG GTTGTCTCG GTGGGAGGG GCGCCTGCCT GAAACTGTTT TAGCCAGAA
21301 GTCAGGCCCTG AAGGTTAAAG GGCAAGGAGC TGGTGGATGA ACAAGGTGGG GAAAGAGGCC
21361 CAGGGTCCAC ATCTACTGAG CTGGACTCAG GCATGGGAAT TGGTGTGTG AGGGCCAAGA
21421 CACTTGGCCT CCTAAAAGTT TGCTGAAAT CACTGACATG AGAGTAATTG ATTTATAGGA
21481 GAAAAGGTAG ATAAATTTAT TTAATATGTA TATATGAGCA CCTTTAGAAT GAAGACCCAA
21541 AGATATAGGG GAAATTGCCA GTTATTTATT TATTTT TTTT GGAGATGGAG TCTCACTGTG
21601 TCTGCCAGGC TAGAGTGCAG TGGCAATGAT CTCGGCTCAC TGCAACCTCC GCCTGCTGGG
21661 TTCAAGCAAT TCTCCTGCCT CATCCTCCTG AGCAGCTGTG ACTACAGGCA CGCACCACCA
21721 TGCCCGGCTA ATTTTTTGTG TTTTTTAGTA GAGACAGGGT TTCACCATGC TGGCCAGGCT
21781 GGTCTGGAAC TCCTGACCTT GTGATCCGCC CGCCTTGGCC TCCCAGAGTG CTGGGATTAT
21841 AGGCGTGAGC CACCGCCCCC AGCCTGAAAT CGCCAATTTT ATGTTTATGT TTTACAAAGT
21901 ATGGACAGCT GTGTAGAAAT ATGACTGGAC AGAAGGGCAT GCTCTAATGT TAACAGACTG
21961 AGTGGGGA AAAAGGAGG CCTGTTGAGA TTCCTCCTGG CCTCTCTCAT TCCTTCCTTC
22021 TGGGTATGGG GCAGGACCCT CTCTGGAATG GGGAGATCTT AGGACCTAAG TTAATAAAGG
22081 TAGGTCAGAT AATTTTTTAT GGCCAGTTT TACATACAGT AATTTTAGGT TTTATGGCTG
22141 GCTTTGGGA AAAGAGGTCC TGGTTTTTAT AGCTGGCCTT GGGGAGAAAT GGGACCCAGC
22201 AACAGGAGGA CAGGAGAGGG TCAGAGAAAA ACTTCTGCTT CTGAGGCTGC TACTGAGGCC
22261 TTCATTTAG GGTATTGTCT TCTGAGCCCC AGCATTCCTC GGTGTGAAAA ATTTTAAAGA
22321 AATTTTATAG TCCAGAAATT GAGTTGGTGA ATTGTCTTAT AAGCCATGGA ACTAGTCTCT

```

FIG. 4CONT'D

## 【図4-10】

```

22381 TAGTCCTGAG AATAGGCCAG TCTAGTTAAA TAGTTATTAG TTGTGTCTAA TTTTAGGCAG
22441 TGTGTTGCAG ATGGGCTTCC ACCAAAGCCA GGCTCTATA TGATATGAGT AATCAGTTAT
22501 TTAGTAAGAG GCATTTTGT CTCAAAAAT AAATAAATA AAATATATGA ATAAATGAAT
22561 GTATGTTTCT TATCAGACTA CGTCTGTTCT ATCATTAAAT CCAGAAGGGA GGAGGGTCTG
22621 GTTCCCCCTT CCCATCATGG CCTGACCTAG TTTTCAGGTT AATTTTAGAA CACCCTTGGC
22681 TGTGAGGAGT GGTCCATTCT GATGGTTAGG GAGCTTTAGG ATTTTACTTT TGGTTTACAA
22741 AGTAATGTGA ATTAACAGA CATTGAGTT AAAGTTTTTA TTTTATAA AAATATTGTA
22801 TTTAAGCATT TTTTAACTG AATTAATTAG AGCTCTTTTA TATATTTTGA TAATGGAACA
22861 TTACATACAC AGGCACATAT AAATATATAG ACACATAAAC AGAAGTAGAG CTTATAGATT
22921 TATAGTTTTT TTTTTTTTT TTTTAAAA TGAGACAGGT TCTCCTTCTG TCATCTAGGC
22981 TGGAGTGCAG TGGTGCCATC ACAGCTCACT GCAGCCTTGA CCTCCAAGGC TCAAGCAATC
23041 CTCTACCTG ACTGGCTAGC TGGGACTACA GGCGCGTGCC ACCATGCCTG GCTAATTCGT
23101 GTATTTTTTG TAGATATGGG GAGTTTTACC ATCTTGCCCA GGCTGGTCTT GAACTCCTGG
23161 GCTCAAGAAA TTTTCTAAC TTGACCTCCC AAAGTGTGG AATTACAGGC ATGAGGCACT
23221 ACGCCAGACC AGATTTTAA TTTGTCAGTT TCTAGGTAGT TTTCCCAAC TTCAGACTAT
23281 CAATTTTTAA ATTATCTGTT TTAGTCTTA ATTATTAAC AGGCAACTCT AAATTTGTAT
23341 CTCTAAGACA TGACTTTAG ATGAAATAAG GTAGAAAATG TATATTTCAA AGGCATAGAA
23401 TTTAGATCTA AATAAAGGTA AAGTTATCTA AATTTAAGC CATGTCTTT TCTATCTAA
23461 AAGGTTTTGG AGGTTGGGT GTAGAGAGGG AGATGCCTTT ACAAATGGAA TTTTGTGTG
23521 TGTTTTTGT TTAGACGGA GTCTTGCTCT GTCACCCAGA GTCTCGCTCT GTCGCCCAGG
23581 CTGGAGTGCA GTGGCAGAT CTCCGCTCAC TGCAACCTCT GCCTCCCGGC TTCAAGTGAT
23641 TCTCCACCT CAACCTCCTG AGTAGTGGGG ATTACAGCTG TGTGCCACCA CGCCCAGCTA
23701 ATTTTTGTAT TTTTAGTAGA GACCGAGTT CACCATGCTG GCCAGGCTGA TCTCGAACTC
23761 CCAACCTCAG GTGATCCGCT CGCCTTGGCC TCCCAAAGTG CTGGGATAAC AGGCATGAGC
23821 CACTGCACCT GGCCTTTCT GAGTTTTTA AGGAGTCTGA GTCATTAGAA GTCTTTTCTA
23881 GATTTTTTAA AAATGTGGA TTGAAGATGG CAAAGAGGAA GGAGGAATAG GGTGGAGTAA
23941 AAGTAAATGG GAGGATAGTT TTTAAGAAAG GAAGTGAATA GAGACATCAA ACACATTTTA
24001 AAAAAAGAT TTTAGTCTAC TGAACAAAAT TTTTAAAAT AGGATTTAAA GAGAAAACAC
24061 AGAAGGCTTT AAAATATAC ACATAGCTTG AATATTAGCT TTTAATTAG CTGACTTCTA
24121 ACCATGGAGC TCTTTACAA AAATCTTTT AAATTTGTCT CTCTCCTCCT TTAAACTTTT
24181 TTGTAGAGAT GGGGTTTCGC CCTGTTACCC AGGCTGGTCT CAAGTCCGGG CAACTTCTGG
24241 GCTAAAGTGA TCTGCCTGTC TCGGCCTCCC AAGTGATAGG ATTACAGGTG TGAGCCACTG
24301 CGACTCACCT TAAATCTCT GTTACCAGAT TTTAGTTGGG ACAAATGCTG ATATTTTAAA
24361 AGTCACATAA ATATTAAGCC GAAAAGGACT GATTCTGAT TAGGAAGGAA ACCCTAAGCC
24421 ACGGTGGGAA TTTAATTAT TAACTGTAA AATGGAGCAG CCTCCATTGT TAATTTTGTA
24481 TGGAATCCAA AGTGGCAGTT TGAGTGAAT TGTTTAGGT CAGGTTTTTG TGCTTTAATT
24541 TAATCAAGAC AATTGTTAAG GATAGCTGTG ACACTATTAT GTGCCTTTT AATTGATCT
24601 ATCAATTCTT TAGAACAAGT AATTTTTTTA AATTAGGAA TTTTAGTCTA AAGGATTTAT

```

FIG. 4CONT'D

## 【図4-11】

```

24661 CTTTGGGCA TTGACAATTA GAATTTTAA TGGGGTATTT AATCCAATA GCAACTTAAT
24721 CCAAAGTTTT CTTTATGTCA AAGAAAACAG AAGCCCAGGA GGGATGAGAC CTGTAAGAC
24781 AAAACTCCCC TAGGAGCTTG GAATGTTTGA AAATACATGT GTTGGGCTCC CAATCTTTTC
24841 ATACTGGCTG TGATGTTACC TGAAAAATCA CATCCTTTGG ATGGTGGAGA CCAAGCGGGA
24901 ATATCCCCAT CTAGTCACGT CATGCTCTCA AGGACATGAG ACAAGAGGGA AACCTCTCAC
24961 CCTGTTTTTA TTTCAGGGAC TGGCAGCAAA GTTGTGCATA ACAGAAGTCA GCATAACCAG
25021 AACCACGAAA CTGACCAGTT TGCAGGGCCA GTTCAAACAG TGGGTGTCAG GCCTGTTCTA
25081 CCCTAGGGTA CCCCTCCTTA TGACAGAACA CCAAAAGACA AGACAAAAC GAAGGAAAAC
25141 GGCAACAACA AAAAAGCTAT TTCTGAAAGG AAAATGGCAA CAACAACAAC AAAAGCTATT
25201 TCTGAAGGGA ATGGGGTCAA ACTATGAATA CTTATACCAC AAAGTACTAA AAAATATATC
25261 AGACTACTA TACCAAGGTT AGTCACACAC AAAACCTGTT CTCTCATTAA TCTTACATTT
25321 GGAAAGGAAA AGGGAAACAA TGATTTTAC TGTCCACTCA TCCAGAGTCC ACAGAGAGAG
25381 GAAACTGGA AAAGTGGGAG TCTGGCAGGA AATTCTCACT CCTCTGCTGG CTGCCAGGT
25441 TCCTGTATTT CCTTCTCTGT GGCTTCCAGA AAAGCACAAT AGCTTTGGTG GTCTTATTTG
25501 TGATGCCAAA CTGTGGTCTT GGCCCCCTAA AGTTTCAGTG AAAATCACTG ACATGAAGCA
25561 GATTAATAGG GAAAAAGGCA TACAAATTTA TTAATACGA ATGGGAGCCT TTAGAATGAA
25621 GCCTTGAAGC TATAGGGGAA ATTGTCTATT TTTATGTTA GGTTTAACAA AGTATGGACA
25681 GCTGTGTAGA AATATGACTG GACAGAAAGG GCACGATCTA ATGTTAACAG ACTGAGTGGG
25741 GAAACCCAGC AAGGCCTGTC TGTGAGATT CCTCCTAGCC TCTCTCATT CTCTCTCTG
25801 GTGTGGGGCA GGACCCTCTC TGAATGGAG GTTTTATGAC CTAAGTCAA TAACGTAGGT
25861 CAGATTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GAGCTGGAGT CTCTCTGTCA ACAGGCTGGA
25921 GTGCAGTGGC GTGACCTTGG CTCACTGAAA CCTCCGCCCC CTGGGTTCAG GCCATTCTCC
25981 TGCCTTAGCC TCCTGAGTAG CTGGGATTAC AGGGGTGTGC CACCACGCCC AGCTAATTTT
26041 TGTATTTTTA GTACAGACAG GGTTTCACCT TGTTGGTCAG GCTGGTCTCA AATTCCTGAC
26101 CTTGTGATCC ACCTGCCTCG GCCTCCCAA GTGCTAGGAT TACAGGCGTG AGCCACTGTG
26161 CCCGGCCTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GGAAGTTGTA TTTTGGGCTT TTTAACTAGC
26221 TTGTTTTTTA ATTAGATTAT TGCCCTTAGG GTGGAGCCCT TTAATAAAAA GGGGGAAGAA
26281 AACATAGGTT TTAGGGCCTC ATATTTAAAT GGGTAAAGCA GGCATAGCTG GAAGGCAGAA
26341 TACAGAACCC CCTAATCAA GGATCTCATT TTTATATTGA ATCCTAGGCC CCCCAAAAGA
26401 GGGAAATGTC ATGGGACGAG ATGTGTGGCA TTTTATCGA GTGCCCCACT GTAAAGATGC
26461 TCCCCCAAGG CTGGCAGGCA GCCCAGTGCC GATTAGCCCA CTCTGTGCTT AGTCTTTTTT
26521 TTTTTTTTTT TTTTGAGGTG GAGTCTTGCT CTGTGCCCCA GGCTGGAGTG CAATGGCGTG
26581 ATCTCGGCTC AATGCAATCT CTGTCTCGTG GGTCAAGCG ATTCTCCTGC CTCAGCCTCC
26641 CAAGTAGCTG AGATTACAGG CACCAGCCAC TATGCTCAGC TAATTTTTTG TATTTTATG
26701 AGAGATGGGG TTTCAACATG TTGGCCAGGC TGGTCTCGAA CTCTGACCC CAAGTGATCC
26761 GCCCCGCTCG GCCTCCCAA GTGCTGGGAT TACAGGCGTG AGCCACCATG CCTGGCGTGC
26821 TTAGCCTATT TTTAATGGGA GTTTCATCCT CAATGGTGAG TGCTTTTATT GTCTTTAGGT
26881 GCCCAGACC ATGTTTTTAA AAATTTAAAT GCACGAAGAA ATAAGTAGCC CTGTATAGTA
26941 GTAATACTTT GTTGTGAATA ACTGTCATAA GTCATCTCTA AAAGTGTATT TTTTATCTAG

```

FIG. 4CONT'D

## 【図4-12】

```

27001 TTATTATATA TGACTAGCTA TATGTCTAGT TTTTAAATA ATACAAAGTA ATTTATTTTT
27061 GGCATCCTCA AAAACCAAAG AGATTAGGTA ATGTAGTGTA GAAGAGAGCA GAGCTTTAGA
27121 CCTGAGAAGA ATCTGCCCAT GACTCGTGAA ACTCCACAC GAAAGTAGGA GACCCCAAAA
27181 AAGGGGTGAG TGTCATCTTT TCTGAATTTT TTTTTTTTTT TAGATGGAGT CTGCTCTGC
27241 CACCAGGCTG GAGTGCAGTG GTGCAATCTC GGCTCAGCCT CCCGAGTAGC TAGGATTACA
27301 GGCACGCGCC ACCATGACCA GCTAATTTTT GTATTTTTAG TAGAGACAGC GTTTCACCAT
27361 GTTGGCCAGG ATGGTCTCGG TCTCTTGACC TCGTGATCCG CCCGCCCTCG CCTCCCAAAG
27421 TGCTGGGATT ACAAGCGTGA GCCACTGCAC TCGGCCGGTC AGATAATTTT TTTGGCCAGT
27481 TTTTACATAG AGTAATTTTA GGTTTTATGG CTGGCTTTGG GGCAAAGGGG TTCTGGTTTT
27541 TATAGCTGGT CTTGGGGGAG AATGGAACCG AGTGACAAGA GGACAAGAGA GGGTCAGAGA
27601 AAAACTTCTG CTTCTGAGGC GGCTATTGAG GCCTTCATTT TGGAGTATTG TCCTCTAAGC
27661 CCCAGCAGTG TCAAACGTGA CACAAACCAT ACACAGCAGC CAGCTCGGGT GCTGTTAGGA
27721 AATGGTCTCA CTGCTGGGTC TGTGGGGTAT GTGTGTGTCT GGGTGTGTGG CTA CTGCTG
27781 CATCCTCCTC CCCCCTACAG CCTCCCCGCC TCCCCTCCAG CCACCCTGGG ATTGGTGACT
27841 CTCAGCCCCCT CCCCCTAGCT CCCCCTAGACC CTCCCAGAGC CTTTATCAGG GAGCTGGGAC
27901 TGAGTGACTG CAGCCTTCTT AGATCCCCCT CACTCGGTTT CTCTCTTTGC AGGAGCACCG
27961 GCAGCACCAG TGTGTGAGGG GAGCAGGCAG CGGTCTTAGC CAGTTCCTTG ATCCTGCCAG
28021 ACCACCCAGC CCCCCTGACA GAGCTGCTCC ACAGGTAGGC AAGTGGGAGA ATGCTGGATG
28081 GACCAGAGCT GGCACCAGGG GACAGGAGCC AGCGTCAGGA GGAATAAAG CAGATGCCAG
28141 CCTCTGATAG GGGAGCAGGG GACTGGGAAG GTGAGCACA AGCACCTGTA GGGCCGAGAG
28201 CTGGTTGGTG TTTGGAGCCT GTGGCTACAG ACTCATTTCT TCATACCAGA AAGTTTTTGC
28261 CTAAGTCTTG GGATTATCTA GTACTGGAAG ATAGCATCCA GGATCCCTCC TCCAGCTGAC
28321 TGAGGAAACA GACCAGTCCA TGTCTACAA ATCTATCATC TTTCTTGGGA GCTAGAGTCC
28381 TCCTGGCACC ACTATAGCAT TGCACATCTC CTGGGGAGAT ATCTGATGGG GTAGCAGGGA
28441 AACTAAGCCC AAGGGCTGTA CCCCCTTCTC AGAAATACTT TCCACCCTCT CTCCAGACCA
28501 GGGCTTGGAC AGTGAGTTG GGGGCTGGGG AAGCAGGGTC AAGCCAAGCT GCTGGTAATG
28561 AATGTCTCTT GTGTCTTCAC CCATGCTGTA TCTTCTCTT CTCTCCTTTA CCTGAGTCTT
28621 GTCCTTTTGC TCTCCAGGC ACCATGAGGA TCATGCTGCT ATTCACAGCC ATCCTGGCCT
28681 TCAGCCTAGC TCAGAGCTTT GGGGCTGTCT GTAAGGAGCC ACAGGAGGAG GTGGTTCCTG
28741 GCGGGGGCCG CAGCAAGGTA AGTCTCCCTT GGCAGAGTAC TGGGGACATC ACGGGAACTT
28801 GGGACTCTGC CTGTCTGGAC AGCTGTAGTG AGGAAACTGG GGTGGGGGGG TTGTCCGTCA
28861 GAGGGCATT TGCCTCCCTT TGGATTCTT TGTTCCTCTG GTCCTTTCAT GTTCCCACTG
28921 TCTCCAGGTG TGTGTGTGTC TCTGTATCTC TGCATGTCTT TGACACCTTG TACATAAAAG
28981 GTGCCCTACA AATATGTTGT TTGGTGGGTT GATTGATGGG AGACTTGGTG ATTGGATGGT
29041 ACTGTGAGGG GTGAGCTAGG GTGGTCTAAG GCTCTCTATA GTCTACCTCA GGTCCCTTTG
29101 CAAGGGACAG ATCTCTTCTA TTTCTGGAT GGTATGAAAC AGTCAGAATT TCTTTCCCAA
29161 ATGGTTATTT GTGTGCTATT TTACCTATCA GTTATGTGTA TTGTTTTATT TTCAAATGTC
29221 AAATAAATTC CCTTATCTTT TGCTCATCCA CCCCAGTAA CCTCAGGTGC TTCTAAGATC

```

FIG. 4<sub>CONT'D</sub>

## 【図4-13】

```

29281 CCAACCCCTT CCTTCTTCTC TTTTCTCCCT TGCCCGCCTC TATCCTCTGC TTAGTCAGGA
29341 TAGGAAAACA ACAACAGCAA AAAAACCAGA TTGAGCCTCG ATTTCCACAG TCCCTTTACG
29401 AAAAAGAATA GGAATTGTCA GGGTAGGGGT ACAGGGGGAG GATAGGGAGG AAGTCTTTTC
29461 AAGGTTTTGA AATGACAGCA ATTACATCGG TACAAATGCT TTTAAGATGA TTGCGGGTGG
29521 GACTTATTAC AAATTCAATG TGTGAAGTTT AACTGCCTCT TCAGCTCAAA TCTGTTCAGC
29581 ATCTCATTAT AGGAGGTGGG CAGAGTATTC AACAATTTGG GAAAAGTGGC TGCCTGAACA
29641 CCACATGCTG GGCCAAGGGA GTTATCACCA GGGCAGCCTT GCAGGTGGCA GCAGTTGTGC
29701 CATATCCAAA AGGCCAGAAC CGTTAAAAAA AAAAACACCC AGGGGAGTGC CAAGTATGGG
29761 CTGGACACCG TTTGGAGCCA CAAAGTTCCA GCCCAGGATA GTTAGAGTAT CTGAGTTCTT
29821 CTGAGACAAA CTTGTTTCAA GACCTTGGCC AATGAGATGT CCCCTCTGCC CCTCTTGGTC
29881 AATGAATGAG AGGGATTGCC ATCCTACCCC TTCTCCTTGA GAGTCTGTGA GGATGAGGGA
29941 AATTGGGGCA GGAAGAGGGT AGTACATAGG TGTGCCTAGG CAACTGGGTT GGTATGTGTG
30001 GGGGTGTGTT CTGTGTAATG GCACTTCTGT GTGTGCACAA CAGCCGAAGG ATGCCTGGGT
30061 TCTGGAAGA GAGGCGCTGC TGAGACTTGA GATTTGAGAT GAAAATCTCC AGCCATGATC
30121 ATTGTTATTG TCTCTCTGCA GCTGCAATTA ACTGGCTGTG TGGTGTGTGC CCACCACCTC
30181 GCTGTACGCA AGTTGCTAAA AAAAAAAAAA AAATCACAGG GACAATCAAG AGCCCCGTCT
30241 GGGCAACAGC TCTAGAACTT GGGATTCACT TGTGGAGAGA AGAAGACGTG CCTTCTGAGC
30301 ATGTTGCCTT CCTGGAATTC TAGACCTAGG GCCAAAAGGG AGAGGSAGAG AAAACTAGAG
30361 GCGGAAAAGC ATGGAGAATA GAGAAAGAGG TGGTGGAAA CAGGGAGAGA AACATCCATG
30421 GACATCGTGC AGAGTGGGGG AATCACAGGT GCAGATGTGT GCCTCCAATC TCACCATGCA
30481 TGTGAATCAC CTGGGGGGCT GCTTAAAATG CAGATTCTGT CTCAGGAGGT CTGGGGTAGG
30541 AACAAAGATC TGCAATTCTA ACAGGCTCTG TGTAGTGTCT GTGTTGCTGT TGGTCCACAG
30601 GTCACCTCTG GAGCACCTAC TTCTCGTCCA GTGTGAACCA GAGGAAACTC TGAAAGAAAT
30661 AGGGTGTCTG ATTCAGGATG GGCTCAGGAA GAGGCTGTTT CTTGTGGGAA AAGGATGAGT
30721 GGATCCGGGT GGGAGCCTCC TGCCTCACCC CTCTTTGTTT CTTCCTAGA GGGATCCAGA
30781 TCTCTACCAG CTGCTCCAGA GACTCTTCAA AAGCCACTCA TCTCTGGAGG GATTGCTCAA
30841 AGCCCTGAGC CAGGCTAGCA CAGGTAGGAG GCGGCCCTAG GGGAGAGGGG AATGAGGGGC
30901 AGGATTCCTG AGATAAGAGG CCTGGGAGAT CCTTTCAGAT GGGAGAGAGA TGGGGGATAG
30961 CTTAGTGAAT CCGTGAGGGT TGTGATCTGA ACCCGCTCT CATCACTTTC CAACTTCACT
31021 CCCCATTTAG ACATCTGTTT TGGGTTTAC AGATCCTAAG GAATCAACAT CTCCCGAGAA
31081 ACGTAAGTAC CCTCTTCTCC CTCCCTATCT CTTGCCACTT GCCCAGAGCT CTGTGGGGCA
31141 TTGGGCCCAG GGGCCATTTT GTCCAGCCCC TTCTCACCTG GTACAAACAA TATGCCAGCT
31201 CCCACTGCTC AGCCAACCTT TCCTGAAAGG GAGAGGCCAT CCAGAACTAG GAGGAAGCTG
31261 GTGTGAGGGG CATGGTGGGC TCTCCCTCTG CTGGCTGGTC CTTGGAAAC AAGGGGATCT
31321 CTTCTGTGCC CTGAAAATTC CAAATCAGGC ACCTGCTAGA GCAGAAAATT CTTGAAATGT
31381 GGAGGAAGGA AAGGTGAGCA GAGAGAGTGG GTTTAGGGGA GGCATTGCT AACTGTGAGG
31441 AGTCATGCTT TGACAAGAAA AAGGAACAGA GACCAGAAAC CCAGTCTCAG AAGTGTGAC
31501 CCATGTCTGG GGAGATGCTT CACTTTCTCA TCATCACTGC TGACAATGTT GGCCCTTTTC
31561 TGCAGGTGAC ATGCATGACT TCTTTGTGGG ACTTATGGGC AAGAGGAGCG TCCAGCCAGG

```

FIG. 4<sub>CONT'D</sub>

## 【図4-14】

```

31621 TAGGAGTGTG TGGAGGTACA GTGGAAGGGC TTAGGGTACT GGCAGAGTAT GACAGAAGTC
31681 ACGTGCCTCA TATTTGTCAC CAGAGGGAAA GACAGGACCT TTCTTACCTT CAGTGAGGGT
31741 TCCTCGGCCC CTTTCATCCA ATCAGCTTGG ATCCACAGGA AAGTCTTCCC TGGGAACAGA
31801 GGAGCAGAGA CCTTTATAAG GTAGTCCTGT TGCAGCTGGG AGGAAGGATA GGGAGACTCT
31861 GCTTCCACCC CAGTCTCCCA ACTCTGTCTT TGAACACTGC CCGTCATAGC CAGCCCTTTG
31921 CTGTTGGATC AGGGTGTAGT TCACATTGAG AAAGATCCCT CTTACTTACA CTGTTGCTT
31981 TACCCTAGAC TCTCCTACGG ATGTGAATCA AGAGAACGTC CCCAGCTTTG GCATCCTCAA
32041 GTATCCCCCG AGAGCAGAAT AGGGTAAGGA TTGTTTATTA GAGAGGGGAG AGGGGACTGG
32101 GGAGGGGGCT GTGGGGGTTG CCAGCTGTGC ATTTCTCTCC ATGCTACAGG TATTAAAGCT
32161 CATAGATTG CCCTGAAATA CACTGCCAAT GCCCAGCACA CTGTCGGCCA AACACAAAGA
32221 CACTTAGAGG CACGTGTGTT TGTACACATC CCCCCTCTTT CATCTCTTTC CTCTGGATCA
32281 TGGACGGCAG CTGACTATTG AGCAGGAGTG AGTGTGGGA GATGAGGAGA GAGGGGCTTC
32341 CCGATGGGCA ATTTCTGTTG TTTGGACTTC ATTCTTTTGT AATCTATGCA AAAAGATGGA
32401 GAAATTATTA TCTGATAATT ACAAATACCA CAACCAATTC ACAGGCAAGC ATTTGCCCTC
32461 CAGGCAGGCT GAGCCTTTCA AATCACTCAG AATCCTGGGT TACGGGGCCC AGAAGGTAGT
32521 CATAACAAG GATGATTCAG GAAGAAATGC AAGGAACTCT GAAATCTAAT GGGGATTAGC
32581 AGGAAACCAT ATCTGAATCT CTCTTTAGCA TAATGAATAA GAACAATGGC CTGAATGTGA
32641 ATCCTGGATC TGCCACTCTA TCTGTATCTT TTTGGCCAAG GTACATATCC TCCTGTGCTT
32701 CAGTTTCCTC ATCTGAAAAA TGAAAGTGAT AATAGTATCT CACAGGGTTG TGGTTTTGAG
32761 GATTGAGTAT AGGTAAAGTG TTCAGAACAG TGCCGGGTGC ACAGTGCTGT GTGCCAATTT
32821 TATGATAATT GTCCAGTTT GGGAGGTATG GGGGATGTCC TAATGTTTCC CCTGACTGGC
32881 TCTGTCTGGA CCCCAGGCCT GAGTGGGCTG ACAAATTCCT CACTTGGTAT GCGAGTGTA
32941 GAGTCCCCCA GGGAGGTGTC TAGTCAAAAC ACGAACCTTC CGCCTTGACA CTGTCTTCCC
33001 ACACACAGCA AGAGCAGCTC CACCAATGGC TTTCTTTTCA CTAGCTTCCA AAGAATTGGG
33061 GTGGAGGGAG TGAAGAGGAG AGGGAGAGAG ATTGGGAAGG CTCGTAATCA TGGAGAGCCT
33121 CCTGCTTTTC TCTCTGTGTC CCTGTTACCC ATACTCACTG GTCTCAAGGT GGCACGCCCA
33181 AGACCCAGG AGCTGGTGCT TGATGATGCT GCCTGTGCAT GAATTCCTGG GACCAGAGAC
33241 TGAGTCTGGC CCCCATTTA GTGTTGGGTG AGAGGGCACA AAGAGCTATA ATAAGTAA
33301 CTGCTGATT ACATGGTAGT TACTGTATCA TTTTGCTCTC ATTAGATGGT TATTTAGTC
33361 CTGCCGACGG CCAGATAATT ATACGAGCAG CTATATCTGG ATGACATACT CTGCTCCAGC
33421 GTTATGCACT GGCCATAAAG ATAATTACAG TGCAATTTTG CTATAGTATT TTATACAAAT
33481 GGCAAAAACA AGTGCAATTGT GGAAATCTAC TTTTAATGCT TGTTTGTGCA TCCAGGCTCT
33541 TTCAGAGGGA CCCATAATTG CAGCTTTTCT AATCTTACCA TTGAGGGAGC ATTCCCAACC
33601 TGTTAGGTGT CAGGCAGAAAT AGGACATAAG GTTCTGGGA GCTGGCATT TAAAGATTAGA
33661 TGAGATGGAT CAACACAGAT CATTGTGTCA TCTGATTTCA TTCATGTGAA ACTGTAAGTA
33721 ATCCCTGGGC CTGTGCTTCC TCTGGGAGGT TTCTGGGAAG AGGAGGAACT GGATAAGGCA
33781 GGGGGAGCAT TCATAGTAGG GCACCTTGGG CAGGGCTGTG TGTGTGTCTG GCTCATGGTG
33841 GTGCTAGGAT GGCATGAACT TGGTTCCTAC ATCTTTGGTC CACATGGGCC CCACTGGCCA

```

FIG. 4CONT'D

## 【図4-15】

```

33901 TGCACACAGG TGTGTAGAGT AATGTAAATA TGGCAGCTGG GAAGGTGCAA GTACCTGCCG
33961 CTAGGAGAGT TCCATCCTCA GGCCCAAAGC CTGGAGGGCA GGCTGAGGGT CAAGACTTGT
34021 TCTTTCCTCT CTCACAGACG CCTCTCCCTT TCTCTCCTGC TGCCACAGCA GGTTTTCAGT
34081 GGGACTTTTT TACAGGATAT AAGATGTGAT TTCAGTGTTT TTTTGTGTTT TGTTTTGTTT
34141 TTTGTCTCTCA GTACTCCACT TCCGGACTCC TGGACTGCAT TAGGAAGACC TCTTCCCTG
34201 TCCCAATCCC CAGGTGCGCA CGCTCCTGTT ACCCTTTCTC TTCCCTGTTT TTGTAACATT
34261 CTGTGCTTTT GACTCCTTCT CCATCTTTTC TACCTGACCC TGGTGTGGAA ACTGCATAGT
34321 GAATATCCCC AACCCCAATG GGCATTGACT GTAGAATACC CTAGAGTTCC TGTAGTGTCC
34381 TACATTAAAA ATATAATGTC TCTCTCTATT CCTCAACRAAT AAAGGATTTT TGCATATGAA
34441 TGATGTGGTG TGTGTGTTA CTTGTTTGGT TGGTGGGTTT TTCTGTTTCT TGACTCCTCC
34501 AGCTACATGG TAAATACACA CATACTTATG ATACACACAC TTCATATTTA AATGTAAATA
34561 ACTTTACATA TCTTTTTGTA TATATCTATT TCCTGAACAG TGCCTTACAC AGTGCTTTGC
34621 ACGATGAGTA TCAGATTAT TTAGTGATTA AAATAAATAC ACGAATTTGG AAGATGGTTT
34681 CTAACACACA AAGATTTTAA CAGACCAGTT TTAGATAAAG AAAAAACAGG CCGGGCCCGG
34741 TGGCTCACGC CTGTAATCCC AGCACTTTGG GAGGCCGAGG CCGGTGGATC ACGAGGTCAG
34801 GAGGTCGAGA CCAGCTGAC CAACATGGTG AAACCCCTTC TCTACTAAAA ATACAAAAAT
34861 TAGCCAGGCA TGGTGGCGCA TGCCTGTAAT TCCAGCTACT TGGGAGGCTG AGGCAGGAGA
34921 ATCGTTTGAA CCCAGGAGGC AGGGGTTGCA GTGAGCCGAG ATCAGCCAC TGCCTCCAG
34981 CCTGGGCAAC AAGAGCAAAA AACTCCGTCT CAAACAAAA CAAACAAAA AAAAAACAA
35041 TAAAAAAGA AAAAGAAAAA GAAAAAAAT ATTGAGATG ACTTGATTA CTAGGATGGG
35101 TCTGGGAGAT ATTCAATCCT GAATCTGACC CTACTTAATT AGAGAAGGAG GTGGGGATCA
35161 AGGCTGTCCG GAGACCCAGC CACAGAGGAG GACAAATCTA TGACCTATA CAATTTTTTT
35221 GTCTCCAAAT GCTGAGCCTG GGTCTGTGTA CAGATCCTGG GGATGAAATG ATGACTCATA
35281 CACAGAGTTT ACAGTTTAGC AGGGCTGTGG ACAAGCAAAC AGAAGTTGAT CCAGCTAGGA
35341 TGGGATGTGG ACAGGGAAGT TACTACCGAG GCCAAGAAAG AGAGGAGCAG ATATCTTCAC
35401 CGTTAACTGG CTGCCTTAGT TATTATAAAG GGAAACATT TATCTCCAC TCCTCTCTAA
35461 AGTGCTGTG ACCAGCTCCT GCAGCTCTGA CTTAACAGTC CCCAGAATGT GTAAGGCACT
35521 TACATGTGGT ATGCATGGGT ATGGATGTCT TTTACTAATC TATGATGTCA ACTATCACCC
35581 GCCATCCTAA GGGGGGTTCT GTACCCTAAT GGAACAGCCA GTGAAATCCT CAGGCTCCTT
35641 ATCTTAGCGT GGTACAGGGG CCTTTGTTAT GCCCTGAAT TGCACTGATA AAACATCAAC
35701 ACATAGATTT CCCAAGGCAG TGTAAGGACA GGGCCACAGA GCCAGAGGCC ACTTCCTGCA
35761 GTCCTTTTCAT TCTAGTGAAA ATTCTATCTT CCTACAGCCT GACTTGGGCG CACTTTGGAA
35821 TGACAGCTGT ATAGTGGGGG GCGGGGAAAG GAGGGAATAC TCACCCTAGT ATTACTTATG
35881 TCAGCTTTAT AGCCAGAGGT CAAAGAATGC CCCACCCCA GAGCCTAGAC CCTTTTCCCA
35941 GTGAGTCATC TCTTTGACTT TTCAAAATTA TCTATCTATA GGGCTTAAAA CTGGGGACAC
36001 TTTTGCAGAG TCTAGGGGCT TTCTCTGGGT CATGAAAGCT ACAAGAGTTG GTTCTGCTCA
36061 GACTTGGTGG GAGTTAGGCT TATAGGCTGA GATGAGACAA TTGCTTTGCA AGTAGGAACA
36121 TTAAGTGCAG AAAGATTGCT CTCTAGTGGG ACTGACAAAA ATTGCAGTAC TGGGGACTCC
36181 AGAAAAAAT GAAGACAAAT GTTAAGTTAG ATTCCTGTGT TTGTACTTGA AGAATGTGTG

```

FIG. 4CONT'D

## 【図4-16】

```

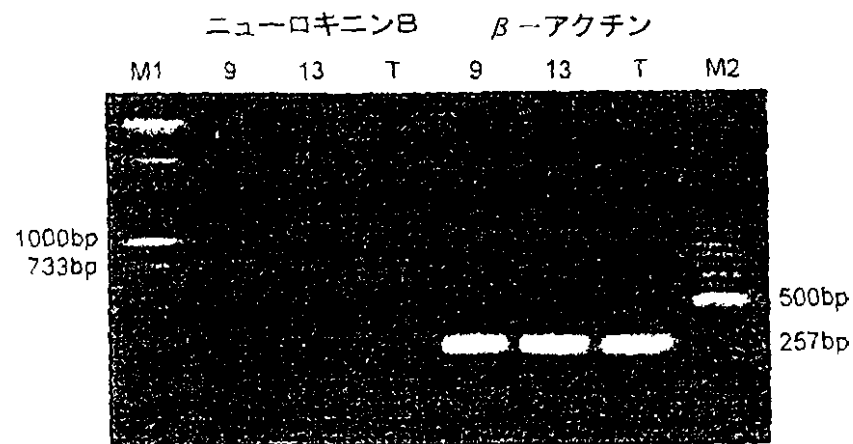
36241 AAGGGATCCT GACCCTCCCT TTCCTGTTGT AAAACAGTTG ATGCCTAAAG AGATCTGGTC
36301 CACAAGACCT TGACTAAATT CCTGGCCCTT TCTTCTCCAT TTAACCTTGT ATATGTTTGT
36361 TATTGTGACT ATATGGTGAT TTACTTTAAA AAGACTTCAG TATAAGTGGT ATATACTTTC
36421 ACCTGCGTCT TTTGGATGAT TTGTTTTCAT GTGAAGTTA TTGGGGTCAA CCTCCAGAG
36481 ATGGCTGGGG CAGTTGGTTA GAAAGACTGT ATAGGCCAG GCCCTTGCAA GCCCAGCAGC
36541 CCTCTGTCTC CAGAGTCATG CTGGAGGTCT GGACCTGCTG GCTGTGTGAT ATTCCACTTT
36601 AGGGAGACTC AGTCACCTTG CACAACCTGT AGAGCTGGGC CTGCCACTGA AACATTGTGT
36661 CAACCTCTAA GTGACCCCTT CACTAGATGG TAAAGTGAGA TGCCATCATCC CCAAACATA
36721 AGAACAGTTC TATGGCTGTT TTTGTATCTC CTGGCTAACA AATGTTACAT GTTTGGCAGC
36781 ATTTGGTATA GTGCTTGCTT TCAGTATAGT CTGCCACCAG TTAATGAGGT TGTGGAAAGG
36841 AGGACACACA ATCTCCCAA TTCATCAAGA GAATGGACAA TTGCTGAATG GCCAAACTGG
36901 CTTAGATCTG TTGGCAACAT TCAGTGTGTC CCTTCCTTTC CACTTATCCA TCAAGGAATT
36961 ACTGAATCCT ACCATGCGCC TGTCTGGGA GTTTGTCTT GGCTGCAAGC TATTTTCAGG
37021 CAGTGACTGG GATGGGATGG GAGAGAGGAT GAACTGAAG GGTCTTGGAG CCTAAGAGCT
37081 TCCTCTGTAC TGAGGGAGGG AGGGCGACAT GACGAAGACT TCTAATGTCT TTGGTGGTGG
37141 TGGGTGGGGC AGGCAGTGTA GGTGGTTTTT GTTTGATGAC AATCTTGGG CAGAAGCATT
37201 TGAAAAGATG ATTTGGGAGA AGGGTGGGGA GGAAGAGTGA TCGAGTTCTA CACAGAGTTG
37261 GGGAGGGCAG GCTTCAGGAA GCAGGCCTGG GGTGCCAAAG TACAGTGAGA TCCGGTGACT
37321 TTCTTCATTT GGCCACCTAG ATGGAAGGAG GGACAGCAGT GGATTATCAG AAGGGTCCAG
37381 TAGTAGCGGT CTAGCCCTCA AGTGCTCCTT CATTCAATCA AGCAGGCTTA ATGTATTAAG
37441 CACTTATTGT GCCAGGAAGT GTGGTAAGGG TCAGTGTGGA CCTGCGGCCG TGTGCAAAGC
37501 CACAGATCCC TGCTTCAGG AAGCCCACAG CCTAGTGGAG GAGATATATA GTAATCAAAC
37561 AATCTTACAA CATTTTGTA AATGCCATA GTAGATGTTT TGAGGAGAAG CTTTGGAAAC
37621 TGTGAGCGTA GAACAGGGGA GGTGAAGAGA GTTGGATAG G

```

FIG. 4CONT'D

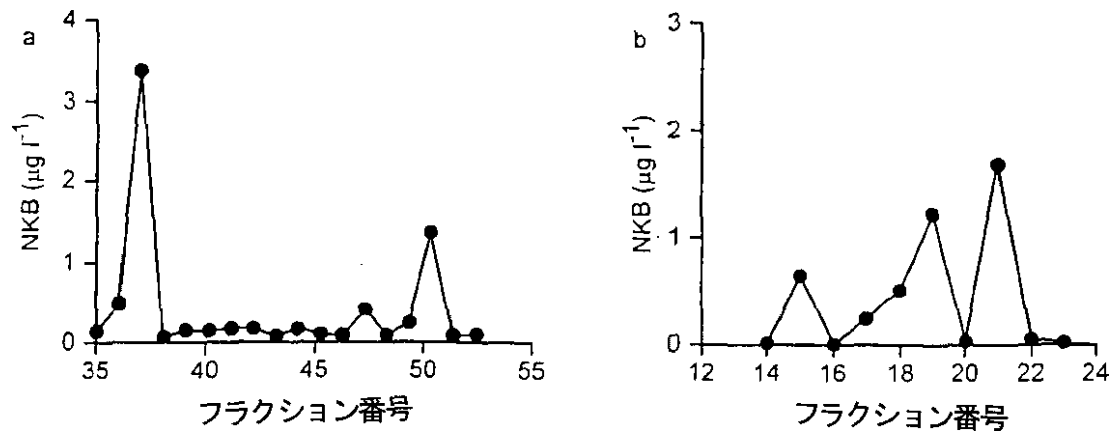
## 【図5】

完全ヒトニューロキニンB前駆体の定量的PCR



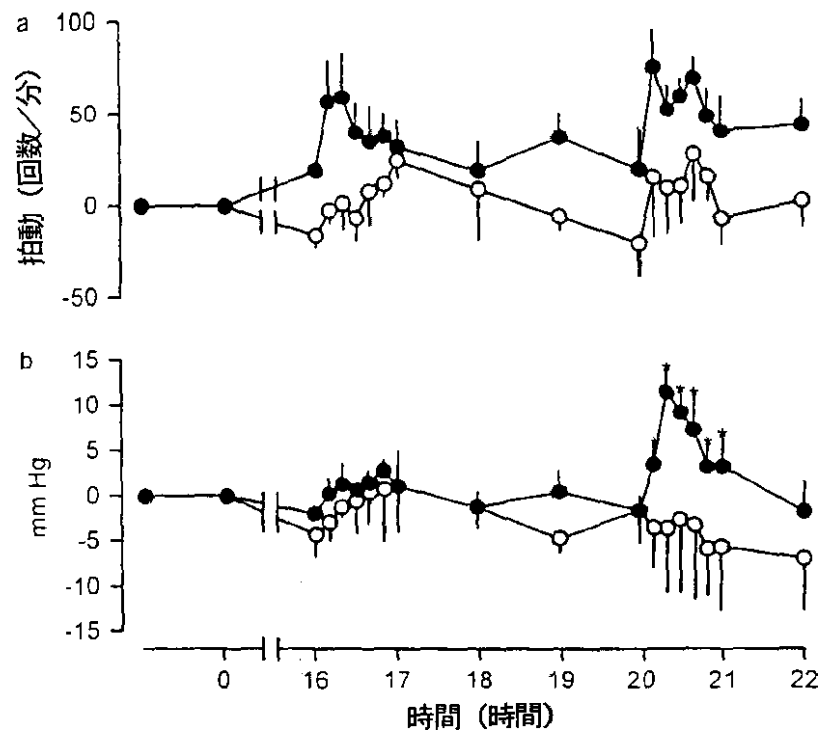
【図6】

ニューロキニンBの高圧液体クロマトグラフィー (HPLC)



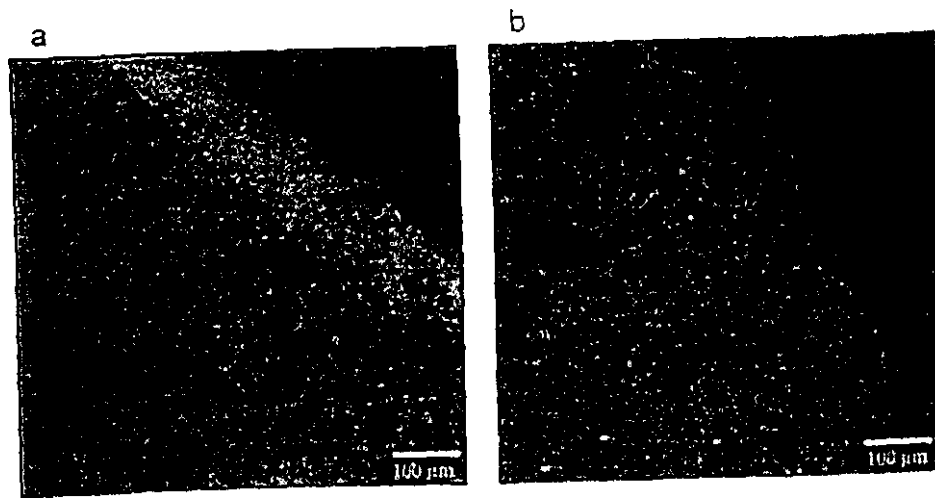
【図7】

意識のあるラットにおけるNK Bの心血管効果



## 【図8】

胎盤の垂直断面におけるニューロキニンB mRNA発現の局在性



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/GB 00/04315

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 AG1P9/12 G01N33/68                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                |                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                |                                                    |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 G01N                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                |                                                    |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                |                                                    |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EP0-internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                |                                                    |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                |                                                    |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                             | Relevant to claim No.                              |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | EP 0 892 053 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC ;HUMAN GENOME SCIENCES (US))<br>20 January 1999 (1999-01-20)<br>abstract<br>page 4, line 39 - line 51   | 1-6                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | page 11, line 25 -page 12, line 7                                                                                                              | 7,12,<br>20-24                                     |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | WO 98 57986 A (INCYTE PHARMA INC ;KASER MATTHEW R (US); LAL PREETI (US); HILLMAN)<br>23 December 1998 (1998-12-23)<br>cited in the application | 1-6                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | the whole document                                                                                                                             | 7,12,<br>20-24                                     |
| ---<br>-/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                |                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                |                                                    |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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.<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                |                                                    |
| Date of the actual completion of the international search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                | Date of mailing of the international search report |
| 22 May 2001                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                | 31. 07. 2001                                       |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                | Authorized officer                                 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                | Gundlach, B                                        |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/GB 00/04315

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                       |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No. |
| A                                                     | US 4 742 156 A (WRIGHT DAVID E)<br>3 May 1988 (1988-05-03)<br>cited in the application<br>abstract                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 7-9                   |
| A                                                     | ---<br>EMONDS-ALT, X. ET AL.: "SR 142801, The<br>first potent non-peptide antagonist of the<br>tachykinin NK3 receptor"<br>LIFE SCIENCES,<br>vol. 56, no. 1, 1995, pages 27-32,<br>XP001004440<br>cited in the application<br>abstract                                                                                                                                                                                                                                                  | 7-9                   |
| P,X                                                   | ---<br>PAGE N M ET AL: "Excessive placental<br>secretion of neurokinin B during the third<br>trimester causes pre-eclampsia."<br>NATURE (LONDON),<br>vol. 405, no. 6788, 2000, pages 797-800,<br>XP001002073<br>ISSN: 0028-0836<br>abstract<br>-& ALLAND, L. ET AL.: "Pre-eclampsia<br>peptide"<br>NATURE MEDICINE,<br>vol. 6, no. 7, July 2000 (2000-07), page<br>750 XP001002069<br>abstract<br>-& DATABASE GENBANK [Online]<br>AC: AAF76980 ID: AF216586,<br>XP002168014<br>abstract | 1-28                  |
| T                                                     | ---<br>DUCKETT R.A. ET AL: "Hypertension in<br>pregnancy."<br>CURRENT OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY, (2001)<br>11/1 (7-14).,<br>XP001004504<br>abstract<br>page 8, left-hand column<br>page 10, left-hand column, paragraph 2                                                                                                                                                                                                                                                              | 20-28                 |
| T                                                     | ---<br>PAGE NIGEL M ET AL: "A regulatory role<br>for neurokinin B in placental physiology<br>and pre-eclampsia."<br>REGULATORY PEPTIDES,<br>vol. 98, no. 3, 2001, pages 97-104,<br>XP001001551<br>ISSN: 0167-0115<br>abstract                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-28                  |
| A                                                     | ---<br>US 5 922 681 A (REES DAVID CHARLES ET AL)<br>13 July 1999 (1999-07-13)<br>abstract; claim 1<br>---<br>-/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1                     |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/GB 00/04315

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                             |                       |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages          | Relevant to claim No. |
| A                                                    | EP 0 673 928 A (SANOFI SA)<br>27 September 1995 (1995-09-27)<br>abstract; claim 15<br>----- | 1                     |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB 00/04315**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-28

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-28

Diagnosis and treatment of pregnancy induced hypertension

2. Claims: 29,30

The use of neurokinin B or an antagonist in the reduction of blood volume in cases of hypotension

3. Claims: 31-33

Methods of alleviating pre-eclampsia by reduction of toxin generating substances

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 00/04315

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0892053 A                              | 20-01-1999          | JP 11137273 A              | 25-05-1999          |
| WO 9857986 A                              | 23-12-1998          | US 5985606 A               | 16-11-1999          |
|                                           |                     | AU 8155898 A               | 04-01-1999          |
|                                           |                     | EP 0989996 A               | 05-04-2000          |
|                                           |                     | US 6008194 A               | 28-12-1999          |
| US 4742156 A                              | 03-05-1988          | US 4665157 A               | 12-05-1987          |
|                                           |                     | AU 587285 B                | 10-08-1989          |
|                                           |                     | AU 6321486 A               | 02-04-1987          |
|                                           |                     | CA 1291592 A               | 29-10-1991          |
|                                           |                     | DK 464986 A                | 31-03-1987          |
|                                           |                     | EP 0219258 A               | 22-04-1987          |
|                                           |                     | ES 2003112 A               | 16-10-1988          |
|                                           |                     | GR 862451 A                | 03-02-1987          |
|                                           |                     | JP 62123198 A              | 04-06-1987          |
|                                           |                     | ZA 8607423 A               | 27-04-1988          |
| US 5922681 A                              | 13-07-1999          | NONE                       |                     |
| EP 0673928 A                              | 27-09-1995          | FR 2717477 A               | 22-09-1995          |
|                                           |                     | FR 2717478 A               | 22-09-1995          |
|                                           |                     | FR 2719311 A               | 03-11-1995          |
|                                           |                     | AU 693845 B                | 09-07-1998          |
|                                           |                     | AU 1490995 A               | 28-09-1995          |
|                                           |                     | CA 2145000 A               | 19-09-1995          |
|                                           |                     | CN 1128756 A,B             | 14-08-1996          |
|                                           |                     | FI 951265 A                | 19-09-1995          |
|                                           |                     | HU 72065 A                 | 28-03-1996          |
|                                           |                     | IL 113026 A                | 20-06-1999          |
|                                           |                     | JP 2922816 B               | 26-07-1999          |
|                                           |                     | JP 8048669 A               | 20-02-1996          |
|                                           |                     | KR 238343 B                | 02-03-2000          |
|                                           |                     | NO 951044 A                | 19-09-1995          |
|                                           |                     | NO 975089 A                | 19-09-1995          |
|                                           |                     | NZ 270727 A                | 26-05-1997          |
|                                           |                     | PL 307723 A                | 02-10-1995          |
|                                           |                     | RU 2143425 C               | 27-12-1999          |
|                                           |                     | TW 380138 B                | 21-01-2000          |
|                                           |                     | US 6124316 A               | 26-09-2000          |
|                                           |                     | US 5741910 A               | 21-04-1998          |
|                                           |                     | US 5942523 A               | 24-08-1999          |
|                                           |                     | ZA 9502228 A               | 21-12-1995          |

-----  
フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I           | テ-マコ-ト' (参考) |
|--------------------------|-------|---------------|--------------|
| A 6 1 P 15/00            |       | C 1 2 Q 1/68  | A            |
| C 1 2 N 15/09            | Z N A | C 0 7 K 7/08  |              |
| C 1 2 Q 1/68             |       | C 1 2 N 15/00 | Z N A A      |
| // C 0 7 K 7/08          |       | A 6 1 K 37/02 |              |

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ローリー, フィリップ  
イギリス国 アールジー6 6エイジェイ  
リーディング ピーオー ボックス  
228 ホワイトナイツ ユニヴァーシティ  
ー オブ リーディング スクール オブ  
アニマル アンド マイクロバイアル  
サイエンスーズ

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA12 HA14  
HA15  
4B063 QA18 QA19 QQ42 QQ53 QR55  
QS25 QS34  
4C084 AA02 AA17 BA01 BA09 BA17  
BA23 CA53 CA59 NA14 ZA362  
ZA812  
4H045 AA10 AA30 BA16 EA23 EA26  
EA50

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | <无法获取翻译>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2003515138A5</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 公开(公告)日 | 2008-01-10 |
| 申请号            | JP2001538816                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 申请日     | 2000-11-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 雷丁大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 雷丁盐湖城大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 雷丁盐湖城大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| [标]发明人         | ペイジナイジェル<br>ローリーフィリップ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |
| 发明人            | ペイジ,ナイジェル<br>ローリー,フィリップ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 A61K45/00 A61P9/00 A61P9/12 A61P15/00 C12Q1/68 C12N15/09 A61K38/00 C07K7/08                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/689 G01N33/74 G01N2800/368 G01N2410/00 A61K38/046 A61P15/00                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.D A61K45/00 A61P9/00 A61P9/12 A61P15/00 C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C07K7/08                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA09 4C084/BA17 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA812 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/EA23 4H045/EA26 4H045/EA50 |         |            |
| 优先权            | 1999027125 1999-11-16 GB                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |            |
| 其他公开文献         | JP2003515138A<br>JP4668501B2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |            |

#### 摘要(译)

提供了通过测量神经激肽B，其前体及其片段的产生来诊断由妊娠引起的高血压或先兆子痫的方法，以及用于此类方法的试剂盒。还提供了治疗这种病症的方法，以及制备合适的试剂以及抗体和有用的抗原试剂的方法。