

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-13384

(P2013-13384A)

(43) 公開日 平成25年1月24日(2013.1.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	4B063
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
C12N 15/09 (2006.01)	GO1N 37/00 1O2	
	C12N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 43 O L (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2011-149990 (P2011-149990)
 (22) 出願日 平成23年7月6日(2011.7.6)

(出願人による申告)平成22年度独立行政法人新エネルギー・産業技術開発機構「高機能簡易型有害性評価手法の開発/28日間反復投与試験結果と相関する遺伝子発現データセットの開発」にかかる業務委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 509088653
 株式会社メディクローム
 東京都新宿区西新宿三丁目1番5号8F

(74) 代理人 100134865
 弁理士 田中 泰彦

(74) 代理人 100151345
 弁理士 今井 順一

(72) 発明者 渡邊 慎哉
 東京都港区白金台3-18-8-903

(72) 発明者 今井 順一
 東京都品川区戸越5-2-1-1005

(72) 発明者 河村 未佳
 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番地1号
 株式会社メディクローム横浜研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学物質の生体に対する影響の評価方法

(57) 【要約】

【課題】神経毒性は、実験動物の感覚異常を的確に把握することが難しく、また、形態学的変化を伴わない場合も多いため、評価することが難しい。

【解決手段】外部環境の変化による生体内の遺伝子発現変化は鋭敏であるため、生体毒性を判別するための遺伝子セットを同定することは、生体毒性が起こる前に及びそれが病理学的検査により実証される前に生体毒性を迅速かつ正確に検出することが可能である。本発明は、その新たな遺伝子セットを用いた生体毒性の検出・予測方法、そのキット、生体毒性の処置方法及び生体毒性の候補薬剤確認方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検化学物質を生体または細胞に所定期間曝露させた後の遺伝子発現レベルを測定することにより該被検化学物質の毒性を評価する方法であって、

(A) 実験動物または神経由来の細胞試料を複数用意し、その一部について前記被検化学物質を所定期間だけ曝露した後の小脳または神経由来の細胞試料を検査試料とするとともに、残りを未処理または前記化学物質の溶媒を曝露した後の小脳または神経細胞由来の細胞試料を参照試料とするステップと、

(B) 前記検査試料について、配列番号 1 ~ 107 に示される塩基配列を有する遺伝子群としての生体応答遺伝子群のうちから選択される任意の 1 以上の選択生体応答遺伝子群に対する遺伝子の発現レベルを測定する第 1 の遺伝子発現レベル測定ステップと、

(C) 前記参照試料について、前記選択生体応答遺伝子群に対する遺伝子の発現レベルを測定する第 2 の遺伝子発現レベル測定ステップと、

(D) 前記第 1 の遺伝子発現レベル測定ステップ及び前記第 2 の遺伝子発現レベル測定ステップで測定した遺伝子発現レベルを対応する遺伝子ごとに比較し、前記遺伝子の発現レベルの差異に基づいて前記被検化学物質が有する神経毒性を評価するステップと、を含むことを特徴とする化学物質の神経毒性評価方法。

10

【請求項 2】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 41 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

20

【請求項 3】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 11、42 ~ 67 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 4】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 67 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 5】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 3、12、68 ~ 97 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 6】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 4、13、42、43、68 ~ 83、98 ~ 107 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

30

【請求項 7】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 4、12、13、42、43、68 ~ 107 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 8】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 3、68 ~ 83 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

40

【請求項 9】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 4、12、13、42、43 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 10】

前記遺伝子の発現レベルは、前記生体応答遺伝子群のうちのそれぞれの生体応答遺伝子におけるプロモーター配列に連結されたレポータータンパク質をコードする配列を含むレポーター遺伝子における発現レベルを指標として測定されることを特徴とする請求項 1 乃至 9 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 11】

請求項 10 記載の方法に使用されるレポーター遺伝子を含む核酸構成物、これを含むべ

50

クター、又は、これらを宿主細胞に導入した形質転換細胞であって、前記生体応答遺伝子のプロモーター配列に連結されたレポータータンパク質をコードする配列を含むことを特徴とする核酸構成物、これを含むベクター、又は、これらを宿主細胞に導入した形質転換細胞。

【請求項 1 2】

前記宿主細胞は、動物細胞、幹細胞、または胚性幹細胞であることを特徴とする請求項 1 1 記載の形質転換細胞。

【請求項 1 3】

化学物質が生体に与える影響を遺伝子発現レベルで検出することにより被検化学物質の毒性を判別・予測する方法であって、

(A) 神経毒性を有することが既知の化学物質について所定量を所定期間生体または神経由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(B) 神経毒性を有さないことが既知の化学物質について所定量を所定期間生体または神経由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(C) 前記化学物質の溶媒を対照として所定量を所定期間生体または神経由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(D) 前記生体の小脳または前記神経由来の細胞試料から mRNA を単離して、配列番号 1 ~ 107 の塩基配列を有する遺伝子群としての生体応答遺伝子群のうちから選択される任意の 1 以上の生体応答遺伝子に対する遺伝子発現レベルを測定する測定ステップと、

(E) 前記遺伝子発現レベルを対応する前記化学物質、曝露量、曝露期間とともに遺伝子発現データとして収集するステップと、

(F) 被検化学物質を適当な濃度で一定期間生体または神経由来の細胞試料に曝露させるステップと、

(G) 前記生体由来の前記小脳または前記神経由来の細胞試料から mRNA を単離して、(D) のステップで選択した生体応答遺伝子に対する遺伝子発現レベルを測定するステップと、

(H) (G) で得られた前記遺伝子発現レベルを前記被検化学物質、曝露量及び曝露期間とともに遺伝子発現データとして収集するステップと、

(I) (H) で収集された遺伝子発現データを (E) で収集された照合用の対応する遺伝子発現データと比較するステップと、

を含むことを特徴とする化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 1 4】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 41 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 1 5】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 11、42 ~ 67 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 1 6】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 67 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 1 7】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 3、12、68 ~ 97 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 1 8】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 4、13、42、43、68 ~ 83、98 ~ 107 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 1 9】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 4、12、13、42、43、68 ~ 107 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の神

10

20

30

40

50

経毒性評価方法。

【請求項 2 0】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 3、68 ~ 83 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 2 1】

前記生体応答遺伝子群が配列番号 1 ~ 4、12、13、42、43 に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする請求項 1 3 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 2 2】

前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と神経毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における遺伝子発現レベルの差異であることを特徴とする、請求項 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

10

【請求項 2 3】

前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と神経毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における前記生体応答遺伝子群の発現プロファイルを指標としたクラスタ分析であることを特徴とする、請求項 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 2 4】

前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と神経毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における前記生体応答遺伝子群の発現プロファイルの相関係数を指標とすることを特徴とする、請求項 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

20

【請求項 2 5】

神経毒性を有することが既知の化学物質が、メタクリルアミド (CAS登録番号79-39-0) またはヒドラジン-水和物 (CAS登録番号7803-57-8) であることを特徴とする、請求項 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 2 6】

神経毒性を有さないことが既知の化学物質が、2-ブタノンオキシム (CAS登録番号96-29-7)、m-キシリレンジアミン (CAS登録番号1477-55-0)、3-シアノピリジン (CAS登録番号100-54-9)、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール (CAS登録番号111-41-1)、テトラヒドロフルフリルアルコール (CAS登録番号97-99-4)、スルホラン (CAS登録番号126-33-0)、2-イソプロポキシエタノール (CAS登録番号109-59-1)、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド (CAS登録番号5039-78-1)、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム (CAS登録番号56-93-9)、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (CAS登録番号127-68-4)、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物 (CAS登録番号130-13-2)、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール (CAS登録番号56539-66-3)、o-ジクロロベンゼン (CAS登録番号95-50-1)、3,4-キシリジン (CAS登録番号95-64-7)、N-メチルアニリン (CAS登録番号100-61-8)、トリレンジイソシアナート (CAS登録番号26471-62-5)、p-クミルフェノール (CAS登録番号599-64-4)、m-クレゾール (CAS登録番号108-39-4)、2,3-ジメチルアニリン (CAS登録番号87-59-2)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (CAS登録番号538-75-0)、フタル酸ジヘプチル (CAS登録番号3648-21-3)、テトラプロモエタン (CAS登録番号79-27-6)、アジピン酸ジブチル (CAS登録番号105-99-7)、P-エチルフェノール (CAS登録番号123-07-9)、o-t-ブチルフェノール (CAS登録番号88-18-6)、p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (CAS登録番号140-66-9)、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール (CAS登録番号96-76-4)、3,5-キシリジン (CAS登録番号108-69-0)、N,N-ジメチルベンジルアミン (CAS登録番号103-83-3)、1,3-ジプロモプロパン (CAS登録番号109-64-8)、n-ヘキサデカン (CAS登録番号544-76-3)、プソイドクメン (CAS登録番号95-63-6)、1,4-ジプロモベンゼン (CAS登録番号106-37-6)、及び2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸 (CAS登録番号88-44-8) のうちから選択される 1 以上の化学物質であることを特徴とする、請求項 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価

30

40

50

方法。

【請求項 27】

前記遺伝子発現レベルの測定は、RT-PCR法、Real Time PCR法、iAFLP (introduced Amplified Fragment Length Polymorphism) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、nCounter Analysis system、ハイブリダイゼーション法のうちの 1 つの方法を用いることを特徴とする請求項 1 乃至 26 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 28】

前記ハイブリダイゼーション法は、マイクロアレイ法又はプロット法であることを特徴とする請求項 27 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

10

【請求項 29】

前記マイクロアレイ法又はプロット法に用いられるプローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする請求項 28 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 30】

前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 29 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 31】

前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 29 または 30 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 32】

前記遺伝子発現レベルの測定は、前記生体応答遺伝子に対応する核酸、又は、前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質について、存在するか、もしくは、量の測定によることを特徴とする請求項 1 乃至 26 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

20

【請求項 33】

前記タンパク質は、免疫学的方法で測定されることを特徴とする請求項 32 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 34】

前記免疫学的方法は、前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質又はその断片に対する特異抗体と標的タンパク質との免疫学的複合体を検出する方法によることを特徴とする請求項 33 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

30

【請求項 35】

前記特異抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、及び抗体フラグメントから選択されることを特徴とする請求項 34 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

【請求項 36】

請求項 1 乃至 35 のうちのいずれか 1 つに記載の方法に用いられるプローブを含む化学物質の毒性判別キットであって、前記プローブは、前記生体応答遺伝子またはその転写産物に特異的にハイブリダイズする配列を有する分子を含むことを特徴とする化学物質の神経毒性評価キット。

40

【請求項 37】

前記プローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする請求項 36 記載の化学物質の神経毒性評価キット。

【請求項 38】

前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、又は合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項 37 記載の化学物質の神経毒性評価キット。

【請求項 39】

前記ヌクレオチドは、前記生体応答遺伝子のセンス鎖又はアンチセンス鎖とハイブリダイズし、10～100塩基であることを特徴とする請求項 38 記載の化学物質の神経毒性評価キット。

50

【請求項 4 0】

前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 3 8 または 3 9 記載の化学物質の神経毒性評価キット。

【請求項 4 1】

前記プローブは、抗体及び / 又はアプタマーであるタンパク質であることを特徴とする請求項 3 7 記載の化学物質の神経毒性評価キット。

【請求項 4 2】

前記プローブは、任意の 1 つ以上を固体支持体に固定した DNA マイクロアレイ、DNA チップ、タンパクチップまたは抗体チップを含むことを特徴とする請求項 3 6 乃至 4 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価キット。

10

【請求項 4 3】

前記固体支持体は、ガラス、シリコン、プラスチック又は生体膜であることを特徴とする請求項 4 2 記載の化学物質の神経毒性評価キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、化学物質が生体に与える影響、神経毒性の検出、診断、予測及び / もしくは処置のための方法、及び、生体毒性を検出又は予測するためのキットに関する。特に、本発明は、化学物質が生体に与える影響を指標とした化学物質の神経毒性の検出・予測方法、神経毒性の処置の有効性を確認することを助けるための遺伝子発現解析手段及びその結果の使用に関する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

人類の生活する環境の中で、膨大な数の化学物質が利用されており、現在でも年々新しい化学物質が開発され続けている。しかしながら、これらの化学物質が環境中に放出されることにより、人体を含む生態系に有害な影響を及ぼすことが問題となっており、特に化学物質に起因する環境汚染による人体への影響は社会問題にまでなっている。特に、呼吸・血液循環など生命維持の基本的機能のみならず、運動機能・精神活動などの調節中枢として極めて重要な神経系組織に対する毒性は、我が国において過去に経験した水俣病（水銀）、スモン病（キノホルム）などの化学物質による中毒例が物語っているように、非常に悲惨な結果を招くことが多い。

30

【0 0 0 3】

OECD、米国EPA、ならびに農林水産省から発行されるガイドラインに共通する基本姿勢は、一般毒性試験を 1 次スクリーニングと位置づけ、その試験で得られた成績に基づいて成獣の神経毒性試験ならびに発達期の神経毒性試験を実施するようにガイドラインを設定していることにある。一般毒性試験では、通常、単回投与試験に続いて反復毒性試験が実施され、これらの試験において神経毒性が疑われた場合に神経毒性試験が実施される。さらに、神経毒性試験や繁殖毒性などの安全性試験の結果から、発達期の神経毒性を検査する必要が生じた場合に発達神経毒性試験が実施される。

【0 0 0 4】

しかしながら、EPAの神経毒性ガイドラインやOECD神経毒性試験法ガイドラインのいずれにおいても、各機能検査の方法に関しては具体的な記載はなく、どのような検査法を採用するかは各研究者の裁量に任されているのが現状である（非特許文献 1）。

40

【0 0 0 5】

近年、急速な発展を見せるゲノム学的なアプローチが、個別化医療に向けてバイオマーカーを用いた薬剤の感受性や副作用との相関を調べるファーマコゲノミクス（非特許文献 2 及び 3 参照）、食品成分の摂取に伴って起こる mRNA やタンパク質の発現量の変動を網羅的に解析し、食物が生体に与える影響を調べるニュートリゲノミクス（非特許文献 4）等と同様に、化学物質の生物学的活性（特にその有害性）の評価にも応用され始めてきたトキシコゲノミクスと呼ばれる手法が用いられ始めてきた（非特許文献 5 乃至 7 参照）。

50

【0006】

これらのゲノム学的手法は、全遺伝子を個々のパラメータとして活用することで、従来の手法では得られない膨大かつ多様な観点による生物学的現象の評価を可能にした。

【0007】

遺伝子発現変動解析を用いた化学物質の毒性評価手法としては、酵母を用いた毒性物質の検出方法（特許文献1及び2参照）、細胞を用いた遺伝毒性の判定方法（特許文献3参照）、哺乳動物を用いた発達神経毒性の検出方法（特許文献4乃至6参照）、哺乳動物を用いた発がん物質の予測方法（特許文献7及び8参照）、哺乳動物を用いた発生毒性の予測方法（特許文献9参照）などが公開されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特許第4022610号公報

【特許文献2】特許第4475373号公報

【特許文献3】特許第4573876号公報

【特許文献4】特開2006-115748号公報

【特許文献5】特開2009-232842号公報

【特許文献6】特開2009-77701号公報

【特許文献7】特開2009-159852号公報

【特許文献8】特開2007-54022号公報

【特許文献9】特開2010-11843号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】非臨床試験マニュアル（株式会社エル・アイ・シー）（2001）

【非特許文献2】Alison H. Harrill et al., Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. November; 4(11): 1379-1389 (2008)

【非特許文献3】Elisa Giovannetti et al., Mol. Cancer Ther. 5(6): 1387-1394 (2006)

【非特許文献4】Licia Iacoviello et al., Genes Nutr. 3: 19-24 (2008)

【非特許文献5】Preeti Chavan et al., Evid Based Complement Alternat Med. Dec; 3(4): 447-457 (2006)

【非特許文献6】渡邊肇 YAKUGAKU ZASSHI: 127(12): 1967-1974 (2007)

【非特許文献7】Uehara, Takeki et al., Mol. Nutr. Food Res. 54: 218-227 (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従来の反復投与毒性試験は血液学的検査や病理組織学的検査を主体としており、それらの生物学的情報は限られている。さらに、病理組織学的検査での評価は、判断した者の主観に左右されやすく、同じ病態を見ているにもかかわらず別の表現を用いたり、異なる化学物質間の毒性を評価するための客観的な指標が乏しかった。

【0011】

特に、神経毒性の評価については、実験動物の感覚異常を的確に把握することが難しいこと、神経系組織の解剖学的知見、特に機能分担関連は実験動物では情報が不十分であること、形態学的変化と機能障害の程度が一致しないこと、等の様々な問題点が指摘されていた。

【0012】

また、EPAの神経毒性ガイドライン、OECD神経毒性試験法ガイドラインのいずれも各機

10

20

30

40

50

能検査の方法に関しては具体的な記載はなく、どのような検査法を採用するかは、各研究者の裁量に任されているのが現状である。

【 0 0 1 3 】

本発明は化学物質の神経毒性を簡便かつ確実に検出するための客観的な指標の一つを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 4 】

本発明者は、メタクリルアミドメタクリルアミド（CAS登録番号79-39-0）またはヒドロジン-水和物（CAS登録番号7803-57-8）をラットに28日間反復投与したことにより、ラットの小脳で統計的に有意に発現変動した遺伝子が107遺伝子存在していることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

【 0 0 1 5 】

すなわち本発明は以下を提供する。

1. 被検化学物質を生体または細胞に所定期間曝露させた後の遺伝子発現レベルを測定することにより該被検化学物質の毒性を評価する方法であって、

(A) 実験動物または神経由来の細胞試料を複数用意し、その一部について前記被検化学物質を所定期間だけ曝露した後の小脳または神経由来の細胞試料を検査試料とするとともに、残りを未処理または前記化学物質の溶媒を曝露した後の小脳または神経細胞由来の細胞試料を参照試料とするステップと、

(B) 前記検査試料について、配列番号1～107に示される塩基配列を有する遺伝子群としての生体応答遺伝子群のうちから選択される任意の1以上の選択生体応答遺伝子群に対する遺伝子の発現レベルを測定する第1の遺伝子発現レベル測定ステップと、

20

(C) 前記参照試料について、前記選択生体応答遺伝子群に対する遺伝子の発現レベルを測定する第2の遺伝子発現レベル測定ステップと、

(D) 前記第1の遺伝子発現レベル測定ステップ及び前記第2の遺伝子発現レベル測定ステップで測定した遺伝子発現レベルを対応する遺伝子ごとに比較し、前記遺伝子の発現レベルの差異に基づいて前記被検化学物質が有する神経毒性を評価するステップと、を含むことを特徴とする化学物質の神経毒性評価方法。

2. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1～41に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記1記載の化学物質の神経毒性評価方法。

30

3. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1～11、42～67に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記1記載の化学物質の神経毒性評価方法。

4. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1～67に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記1記載の化学物質の神経毒性評価方法。

5. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1～3、12、68～97に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記1記載の化学物質の神経毒性評価方法。

6. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1～4、13、42、43、68～83、98～107に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記1記載の化学物質の神経毒性評価方法。

7. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1～4、12、13、42、43、68～107に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記1記載の化学物質の神経毒性評価方法。

40

8. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1～3、68～83に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記1記載の化学物質の神経毒性評価方法。

9. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1～4、12、13、42、43に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記1記載の化学物質の神経毒性評価方法。

10. 前記遺伝子の発現レベルは、前記生体応答遺伝子群のうちのそれぞれの生体応答遺伝子におけるプロモーター配列に連結されたレポータータンパク質をコードする配列を含むレポーター遺伝子における発現レベルを指標として測定されることを特徴とする前記1乃至9のうちのいずれか1つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

50

11. 前記10記載の方法に使用されるレポーター遺伝子を含む核酸構成物、これを含むベクター、又は、これらを宿主細胞に導入した形質転換細胞であって、前記生体応答遺伝子のプロモーター配列に連結されたレポータータンパク質をコードする配列を含むことを特徴とする核酸構成物、これを含むベクター、又は、これらを宿主細胞に導入した形質転換細胞。

12. 前記宿主細胞は、動物細胞、幹細胞、または胚性幹細胞であることを特徴とする前記11記載の形質転換細胞。

13. 化学物質が生体に与える影響を遺伝子発現レベルで検出することにより被検化学物質の毒性を判別・予測する方法であって、

(A) 神経毒性を有することが既知の化学物質について所定量を所定期間生体または神経由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(B) 神経毒性を有さないことが既知の化学物質について所定量を所定期間生体または神経由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(C) 前記化学物質の溶媒を対照として所定量を所定期間生体または神経由来の細胞試料に投与(曝露)するステップと、

(D) 前記生体の小脳または前記神経由来の細胞試料からmRNAを単離して、配列番号1~107の塩基配列を有する遺伝子群としての生体応答遺伝子群のうちから選択される任意の1以上の生体応答遺伝子に対する遺伝子発現レベルを測定する測定ステップと、

(E) 前記遺伝子発現レベルを対応する前記化学物質、曝露量、曝露期間とともに遺伝子発現データとして収集するステップと、

(F) 被検化学物質を適当な濃度で一定期間生体または神経由来の細胞試料に曝露させるステップと、

(G) 前記生体由来の前記小脳または前記神経由来の細胞試料からmRNAを単離して、(D)のステップで選択した生体応答遺伝子に対する遺伝子発現レベルを測定するステップと、

(H) (G)で得られた前記遺伝子発現レベルを前記被検化学物質、曝露量及び曝露期間とともに遺伝子発現データとして収集するステップと、

(I) (H)で収集された遺伝子発現データを(E)で収集された照合用の対応する遺伝子発現データと比較するステップと、

を含むことを特徴とする化学物質の神経毒性評価方法。

14. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1~41に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記13記載の化学物質の神経毒性評価方法。

15. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1~11、42~67に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記1記載の化学物質の神経毒性評価方法。

16. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1~67に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記13記載の化学物質の神経毒性評価方法。

17. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1~3、12、68~97に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記13記載の化学物質の神経毒性評価方法。

18. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1~4、13、42、43、68~83、98~107に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記13記載の化学物質の神経毒性評価方法。

19. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1~4、12、13、42、43、68~107に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記13記載の化学物質の神経毒性評価方法。

20. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1~3、68~83に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記13記載の化学物質の神経毒性評価方法。

21. 前記生体応答遺伝子群が配列番号1~4、12、13、42、43に示される塩基配列を有する遺伝子群であることを特徴とする前記13記載の化学物質の神経毒性評価方法。

22. 前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と神経毒性を有さないことが

10

20

30

40

50

既知の化学物質曝露群における遺伝子発現レベルの差異であることを特徴とする、前記 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

2 3 . 前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と神経毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における前記生体応答遺伝子群の発現プロファイルを指標としたクラスタ分析であることを特徴とする、前記 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

2 4 . 前記遺伝子発現データの比較が、被検化学物質曝露群と神経毒性を有さないことが既知の化学物質曝露群における前記生体応答遺伝子群の発現プロファイルの相関係数を指標とすることを特徴とする、前記 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

2 5 . 神経毒性を有することが既知の化学物質が、メタクリルアミド (CAS登録番号79-39-0) またはヒドラジン-水和物 (CAS登録番号7803-57-8) であることを特徴とする、前記 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

2 6 . 神経毒性を有さないことが既知の化学物質が、2-ブタノンオキシム (CAS登録番号96-29-7)、m-キシリレンジアミン (CAS登録番号1477-55-0)、3-シアノピリジン (CAS登録番号100-54-9)、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール (CAS登録番号111-41-1)、テトラヒドロフルフリルアルコール (CAS登録番号97-99-4)、スルホラン (CAS登録番号126-33-0)、2-イソプロポキシエタノール (CAS登録番号109-59-1)、メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド (CAS登録番号5039-78-1)、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム (CAS登録番号56-93-9)、m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (CAS登録番号127-68-4)、1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物 (CAS登録番号130-13-2)、3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール (CAS登録番号56539-66-3)、o-ジクロロベンゼン (CAS登録番号95-50-1)、3,4-キシリジン (CAS登録番号95-64-7)、N-メチルアニリン (CAS登録番号100-61-8)、トリレンジイソシアナート (CAS登録番号26471-62-5)、p-クミルフェノール (CAS登録番号599-64-4)、m-クレゾール (CAS登録番号108-39-4)、2,3-ジメチルアニリン (CAS登録番号87-59-2)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (CAS登録番号538-75-0)、フタル酸ジヘプチル (CAS登録番号3648-21-3)、テトラプロモエタン (CAS登録番号79-27-6)、アジピン酸ジブチル (CAS登録番号105-99-7)、P-エチルフェノール (CAS登録番号123-07-9)、o-t-ブチルフェノール (CAS登録番号88-18-6)、p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (CAS登録番号140-66-9)、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール (CAS登録番号96-76-4)、3,5-キシリジン (CAS登録番号108-69-0)、N,N-ジメチルベンジルアミン (CAS登録番号103-83-3)、1,3-ジプロモプロパン (CAS登録番号109-64-8)、n-ヘキサデカン (CAS登録番号544-76-3)、ブソイドクメン (CAS登録番号95-63-6)、1,4-ジプロモベンゼン (CAS登録番号106-37-6)、及び2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸 (CAS登録番号88-44-8) のうちから選択される 1 以上の化学物質であることを特徴とする、前記 1 3 乃至 2 1 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

2 7 . 前記遺伝子発現レベルの測定は、RT-PCR法、Real Time PCR法、iAFLP (introduced Amplified Fragment Length Polymorphism) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、nCounter Analysis system、ハイブリダイゼーション法のうちの 1 つの方法を用いることを特徴とする前記 1 乃至 2 6 のうちのいずれか 1 つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

2 8 . 前記ハイブリダイゼーション法は、マイクロアレイ法又はプロット法であることを特徴とする前記 2 7 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

2 9 . 前記マイクロアレイ法又はプロット法に用いられるプローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする前記 2 8 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

3 0 . 前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする前記 2 9 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

3 1 . 前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする前記 2 9 または 3 0 記載の化学物質の神経毒性評価方法。

10

20

30

40

50

32. 前記遺伝子発現レベルの測定は、前記生体応答遺伝子に対応する核酸、又は、前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質について、存在するか、もしくは、量の測定によることを特徴とする前記1乃至26のうちのいずれか1つに記載の化学物質の神経毒性評価方法。

33. 前記タンパク質は、免疫学的方法で測定されることを特徴とする前記32記載の化学物質の神経毒性評価方法。

34. 前記免疫学的方法は、前記生体応答遺伝子によってコードされるタンパク質又はその断片に対する特異抗体と標的タンパク質との免疫学的複合体を検出する方法によることを特徴とする前記33記載の化学物質の神経毒性評価方法。

35. 前記特異抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、及び抗体フラグメントから選択されることを特徴とする前記34記載の化学物質の神経毒性評価方法。

36. 前記1乃至35のうちのいずれか1つに記載の方法に用いられるプローブを含む化学物質の毒性判別キットであって、前記プローブは、前記生体応答遺伝子またはその転写産物に特異的にハイブリダイズする配列を有する分子を含むことを特徴とする化学物質の神経毒性評価キット。

37. 前記プローブは、ヌクレオチド又はタンパク質であることを特徴とする前記36記載の化学物質の神経毒性評価キット。

38. 前記ヌクレオチドは、mRNA、cDNA、又は合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする前記37記載の化学物質の神経毒性評価キット。

39. 前記ヌクレオチドは、前記生体応答遺伝子のセンス鎖又はアンチセンス鎖とハイブリダイズし、10～100塩基であることを特徴とする前記38記載の化学物質の神経毒性評価キット。

40. 前記ヌクレオチドは、標識化ヌクレオチドであることを特徴とする前記38または39記載の化学物質の神経毒性評価キット。

41. 前記プローブは、抗体及び/又はアプタマーであるタンパク質であることを特徴とする前記37記載の化学物質の神経毒性評価キット。

42. 前記プローブは、任意の1つ以上を固体支持体に固定したDNAマイクロアレイ、DNAチップ、タンパクチップまたは抗体チップを含むことを特徴とする前記36乃至41のうちのいずれか1つに記載の化学物質の神経毒性評価キット。

43. 前記固体支持体は、ガラス、シリコン、プラスチック又は生体膜であることを特徴とする前記42記載の化学物質の神経毒性評価キット。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、化学物質を生体に投与した後の小脳又は化学物質を曝露した後の神経由来の細胞試料における遺伝子発現様式を比較することにより、化学物質が生体に対して神経毒性を有するか否かを簡便に判定あるいは予測できる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】配列番号1～107に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【図2】配列番号1～41に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【図3】配列番号1～11、42～67に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【図4】配列番号1～67に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【図5】配列番号1～3、12、68～97に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【図6】配列番号1～4、13、42、43、68～83、98～107に示される塩基

10

20

30

40

50

配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【図7】配列番号1～4、12、13、42、43、68～107に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【図8】配列番号1～3、68～83に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【図9】配列番号1～4、12、13、42、43に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

他に特に規定されない限り、明細書及び特許請求の範囲を含む本出願に使用される用語は、本発明が属する分野における通常の知識を有する者（当業者）によって、一般的に理解されるものと同一の意味を有する。

【0019】

当業者は、本明細書中に記載されるものと同様又は類似の多くの方法及び物質を認識する。ただし、本発明は本明細書に記載される方法及び物質に限定されない。

【0020】

被検化学物質の投与量は、被検化学物質を曝露された試験動物または細胞内の遺伝子発現レベルが適度に増加または減少する量であることが望ましい。例えば、試験動物又は細胞の致死量未満の最大用量が望ましく、被検化学物質の試験動物に対するLD50値を基準にして決定することも可能である。

【0021】

被検化学物質（被検群）またはその溶媒（対照群）を投与する対象となる試験動物には、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サルなどの哺乳動物を使用することもできる。また、その対象となる細胞には、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル、ヒトなどの哺乳動物由来の細胞を使用することができる。

【0022】

被検化学物質の投与期間は1～90日が望ましく、より好ましくは1～60日であり、さらに好ましくは1～28日であるが、より迅速に試験を行う観点から1～14日でも構わない。投与は1日数回が望ましく、より好ましくは1日1回が望ましい。

【0023】

被検化学物質の投与方法は特に制限されない。例えば、経口投与、腹腔内投与、静脈注射等の一般的な方法を使用できる。

【0024】

「遺伝子発現レベルを測定する」とは、該遺伝子の発現レベルを検出又は定量する限り特に制限されず、例えば、該遺伝子のmRNAやcDNAを検出又は定量してもよい。さらには、該遺伝子がコードするタンパク質を検出又は定量してもよい。これらの検出又は定量には、該遺伝子又はその遺伝子産物であるペプチド若しくはタンパク質に特異的に結合する分子を用いることが望ましい。遺伝子又はその遺伝子産物であるペプチド若しくはタンパク質に特異的に結合する分子とは、特に制限されないが、該遺伝子に特異的に結合するヌクレオチド、DNA、cDNA、RNA、ペプチド若しくはタンパク質に特異的に結合する抗体等を例示することができる。また、該遺伝子の発現レベルの検出又は定量には、該遺伝子のmRNAもしくはタンパク質の断片又はホモログを用いてもよい。

【0025】

配列番号1～107に示される塩基配列は、例えば、National Center for Biotechnology InformationのBLAST (URL; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を利用したホモロジー検索により遺伝子を特定することが可能である。

【0026】

「DNAマイクロアレイ」とは、オリゴヌクレオチドや一本鎖または二本鎖のDNAをガラス基板上などに高密度に配置したものをいい、「DNAマイクロアレイ法」とは、そのDNAマイ

10

20

30

40

50

クローレイ上で蛍光標識したcDNA分子などとハイブリッド形成を行わせて定性的且つ定量的にDNAと結合した核酸の種類や量を測定する手法をいう。

【0027】

「オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオチドが数個重合した分子の総称のことをいう。

【0028】

mRNAの「ホモログ」とは、該mRNAに実質的に類似したヌクレオチドに関連する。「実質的に類似した」とは、当業者によって十分理解され、具体的にはそれぞれの配列類似性が少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%を有することを意味する。

【0029】

また、タンパク質の「ホモログ」とは、該mRNAに実質的に類似したペプチドに関連する。「実質的に類似した」とは、当業者によって十分理解され、具体的にはそれぞれの配列類似性が少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%を有することを意味する。

【0030】

「化学物質に曝露された臓器組織または細胞試料」とは、組織もしくは細胞試料、または試料が由来した動物が、化学物質により処理されたことを意味する。

【0031】

「幹細胞」とは、自己複製能と分化した細胞をつくる能力を併せ持った未分化細胞のことを言い、胚性幹細胞（ES細胞：Embryonic stem cell）、組織幹細胞、人工多能性肝細胞（iPS細胞：induced pluripotent stem cell）で例示できるが、これらに限られるものではない。

【0032】

「プロモーター」とは、転写開始反応の効率に関与するDNA領域をいう。

【0033】

「レポーター遺伝子」とは、目的の因子の機能を測定するために代用される遺伝子のことであり、産物の活性が簡単に定量化できるものが好まれる。本発明のレポーター遺伝子には、生体応答遺伝子のプロモーター配列と当該プロモーター配列に作動可能に接続されたレポータータンパク質をコードする配列とを含み、レポータータンパク質としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（CFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）または赤色蛍光タンパク質（dsRed）等が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0034】

本発明において「生体応答遺伝子のプロモーター配列に連結される」とは、対象の遺伝子の発現が該プロモーター配列の制御下に配置されることをいい、通常、対象となる遺伝子のすぐ上流にプロモーター配列が配置されるが、必ずしも隣接している必要はない。

【0035】

「ベクター」とは、組換えDNA技術において、外来性DNAを組み込み、宿主細胞中で増えることのできるDNAのことをいい、プラスミド、ファージ、ウイルス、酵母人工染色体などが挙げられるが、これらに限られるものではない。

【0036】

「形質転換細胞」とは、形質転換体、トランスフォーマントとも呼ばれ、ある形質を示す細胞（供与細胞）のDNAを、それを示さない細胞（受容細胞）へ導入して生じた供与細胞の形質を示す細胞をいう。供与細胞又は受容細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞等が例示される。

【0037】

「毒性作用」とは、化学物質の存在に起因する、生体、臓器系、各臓器、組織、細胞、又は細胞内単位に対する有害作用を指す。毒性作用は、生理的もしくは物理的な症状、又は細胞もしくは臓器の壊死のような攪乱であり得る。

10

20

30

40

50

【0038】

「試料」には、好ましくは神経組織由来の材料、並びに、例えば血液、血漿、血清、リンパ液、腹水、尿、便のような任意の体液が含まれるものとする。なお、これに限られるものではない。

【0039】

明細書及び特許請求の範囲を含む本出願で使用される際には、「個体」とは、ヒトの個体、動物又は個体の集団もしくはプールを意味するものとする。

【0040】

「CAS登録番号」とは米国化学会の一部門であるCAS (Chemical Abstracts Service) が運営・管理する化学物質登録システムから付与される化学物質に固有の数値識別番号のことを意味する。

10

【0041】

本出願に係る特許請求の範囲及び明細書で使用する「生体応答遺伝子」とは、化学物質の曝露等の外的な刺激により生体内において発現レベルが変動する遺伝子を意味し、「生体応答遺伝子群」とは複数の生体応答遺伝子の組合せのことを意味する。

【0042】

遺伝子の発現レベルを検出、測定又は定量する具体的な方法としては、該遺伝子に特異的に結合するプローブ用の標識化ヌクレオチド、標識化cDNAまたは標識化RNAを用いたノーザンブロット法、ドットブロット法、iAFLP (introduced Amplified Fragment Length Polymorphism) 法、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、PCR法、又はmRNA分子を直接測定する方法等を用いることができる。PCR法としては、RT-PCR法、Real Time PCR法、競合PCR法を挙げることができる。

20

【0043】

前記Real Time PCR法としては、例えば、試料内の全RNAやmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、該cDNAを鋳型にして目的領域をPCR法により増幅し、該増幅産物の生産過程をリアルタイムにモニタリングする方法が挙げられる。リアルタイムにモニタリングする試薬としては、例えば、SYBR (登録商標: Molecular Probes社) Green Iや、TaqMan (登録商標: アプライドバイオシステムズ社) プローブ等が挙げられる。

【0044】

前記競合PCR法としては、例えば、試料内の全RNAやmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、該cDNAと内部標準DNAを同一の反応チューブ内で反応させる方法や、さらに前記逆転写反応時にmRNAとともにRNA内部標準を加えて反応させる方法等が挙げられる。また、内部標準遺伝子の配列は、例えば、増幅目的遺伝子の配列と相同配列でもよく、非相同な配列でもよい。

30

【0045】

さらに、遺伝子の発現レベルを検出又は定量する具体的な方法としては、DNAマイクロアレイ、DNAチップ、又は抗体アレイ等を用いる方法が挙げられる。DNAマイクロアレイ又はDNAチップには該遺伝子のヌクレオチド又はcDNAが1つ以上固定化されているものを用いる。

【0046】

なお、ヌクレオチド又はcDNAは、該遺伝子の一部に相当する部分でもよい。

40

【0047】

上記プローブの標識化に用いられる標識試薬は、例えば放射性同位元素である [1 2 5 I]、[1 3 1 I]、[3 H]、[1 4 C]、[3 2 P]、[3 5 S]、酵素であるガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、また、蛍光物質であるシアニン蛍光色素蛍光色素 (例えば、Cy 2、Cy 3、Cy 5、Cy5.5、Cy 7、Cyanine 3、Cyanine 5 など) を用いることができる。

【0048】

また、上記Real Time PCR法としては、例えば、組織内又は細胞内の全RNAやmRNAから逆転写酵素により合成したcDNAを鋳型にして、PCRの増幅産物をリアルタイムでモニタリ

50

ングする方法が挙げられる。リアルタイムPCR用モニタリング試薬としては、例えばSYBR Green I やTaqManプローブ等が用いられる。

【0049】

通常、DNAマイクロアレイやDNAチップは、プローブが支持体の上に固定されているアレイ又はチップであり、DNAマイクロアレイ又はDNAチップの支持体としては、ハイブリダイゼーションに使用可能なものであればよく、例えばガラス、シリコン、プラスチックなどの基板や、ニトロセルロース膜、ナイロン膜等を用いることができる。

【0050】

なお、DNAマイクロアレイとは、生体応答遺伝子群に含まれる遺伝子全長、またはその部分配列と相補的なcDNA断片若しくはオリゴDNAを固定支持体に1つ以上固定したものをいう。ここでいう相補的なオリゴDNAは一般的には25～100塩基の長さのものが用いられるが、必ずしもこれに限定されない。

10

【0051】

DNAマイクロアレイやDNAチップの使用方法については特に制限されない。例えば、生体試料からmRNAを精製し、該mRNAを鋳型とした逆転写反応を行う際に、適切な標識を付したプライマーや標識ヌクレオチドを使用することにより、標識されたcDNAを得ることができる。この標識化cDNAとDNAマイクロアレイやDNAチップ表面上に固定された本発明におけるプローブとの間でハイブリダイゼーションを行わせ、被検試料とのハイブリダイゼーション及び対照試料とのハイブリダイゼーションのそれぞれの結果を比較し、該遺伝子の有無を検出したり、発現レベルを測定したりすることにより、臓器毒性の検出または予測を行うことができる。

20

【0052】

遺伝子に対応するポリペプチド又はタンパク質は上記生体応答遺伝子の発現産物であり、該ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列の配列情報は、NCBIの遺伝子データベースにおいて、それぞれのアクセッションナンバーによりアプローチすることもできる。

【0053】

上記ポリペプチド又はタンパク質を検出又は定量する方法としては、所定のポリペプチド又はタンパク質を検出又は定量する方法であれば特に制限されない。例えば、該ポリペプチド又はタンパク質に特異的に結合する抗体やアプタマー等を用いることができ、抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、2つのエピトープを同時に認識することができる二機能性抗体等を例示できる。これらの抗体は、慣用のプロトコルを用いて該ポリペプチド又はタンパク質又はそれらの断片を抗原として用いて作製することができる。また、アプタマーとは、タンパク質、アミノ酸等の分子に特異的に結合する核酸分子である。

30

【0054】

上記ポリペプチド又はタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、被検試料中に存在する該ポリペプチド又はタンパク質を検出又は定量する場合、免疫沈降法、電気化学発光法、RIA (Radioimmunoassay) 法、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法、蛍光抗体法等の公知の免疫学的方法を用いることができる。

【0055】

上記判定の基準としては、被検試料中に存在する該遺伝子の発現レベル（又は該遺伝子に対応するポリペプチド若しくはタンパク質の発現レベル）が正常対照試料中に存在する、該遺伝子の発現レベル（又は該遺伝子に対応するポリペプチド若しくはタンパク質の発現レベル）よりも高い又は低いことを利用する。例えば、1群3検体以上の試料の発現レベルを測定した結果について、t検定を行った場合に、 $P < 0.05$ 、より好ましくは $P < 0.01$ 、さらに好ましくは $P < 0.001$ 、さらにより好ましくは $P < 0.0001$ である場合が挙げられる。

40

【0056】

検定方法はt検定に限定されるものではなく、U検定、F検定、マン・ホイットニ検定やウィルコクサン符号付順位検定でもよい。また検定に限定されるものではなく、例えば

50

各群の発現レベルの平均値の差を用いてもよい。

【0057】

基準値は、被検試料における発現レベルを測定する度に毎回測定する必要はなく、例えば、様々な種の生体試料における正常対照試料中に存在する遺伝子の発現レベルをあらかじめ測定しておき、その測定値を用いて比較することができる。

【0058】

遺伝子発現レベルの変化には特定の化学物質と生体組織との直接の反応のみならず、臓器に障害が生じた結果としての二次的反応も含まれる。

【0059】

生体応答遺伝子群に含まれる遺伝子は、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、又はサルのような任意の哺乳動物において、マーカーとして用いられ得る。好ましくは、生体応答遺伝子群に含まれる遺伝子は、ラット又はマウスにおいてマーカーとして用いられる。

10

【0060】

動物の種類は特に限定されるものではなく、例えば、ラットの場合にはSprague Dawleyラット、Wistarラットなどでもよく、雄でも雌でも構わない。

【0061】

以下、実施例により本発明による化学物質の毒性判別・予測方法、核酸構成物、ベクター、形質転換細胞、照合用遺伝子発現データベースの作成方法、及び、化学物質の毒性判別キットをより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

20

【実施例1】

【0062】

本発明の毒性作用を検出または予測するための方法に用いられる生体応答遺伝子群は、メタクリルアミド（CAS登録番号79-39-0）またはヒドラジン-水和物（CAS登録番号7803-57-8）を雄のSprague Dawleyラット（6週齢）（日本チャールス・リバー社）に28日間反復投与することにより小脳で発現レベルが著しく変化した遺伝子群である。

【0063】

本発明で用いられる生体応答遺伝子群は以下の方法により得られる。なお、ここで、「発現レベル」とは絶対量である必要はなく相対量でよい。

【0064】

< 遺伝子発現データベース >

本発明による遺伝子発現データベースの作成は、

- (1) 種々の化学物質について、ラットなどが死亡しない適当な投与量を決定し、
- (2) 適当な濃度の化学物質を一定期間、ラットなどに繰り返し曝露し、
- (3) 曝露した生体から各臓器を摘出し、
- (4) 摘出した臓器からmRNAを単離し、
- (5) DNAマイクロアレイ法などにより特定遺伝子の発現レベルを測定し、
- (6) 得られた遺伝子発現レベルを化学物質、その濃度、曝露時間とともに遺伝子発現データベースとしてまとめる、と以上6つの工程によりなされる。

30

【0065】

< 動物試験 >

5週齢のCrI:CD(SD)ラット（雄）を準備し、ポリカーボネイトケージに入れ、エアークンディショニング・アニマルラック（商品名）内で飼育した。エアークンディショニング・アニマルラックは、温度22℃、湿度55%に設定し、照明は明期7:00~19:00、暗期19:00~7:00の12時間サイクルに設定した。水は給水ピンを用いて、浄水器を通した水道水を不断給与し、飼料は固形飼料を不断給餌した。実験開始までに1週間の馴化検疫期間を設けた。

40

【0066】

国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」（http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp）に登録されている22種類の化学物質、2-ブタノ

50

ンオキシム、m-キシリレンジアミン、3-シアノピリジン、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール、テトラヒドロフルフリルアルコール、メタクリルアミド、スルホラン、2-イソプロポキシエタノール、ヒドラジーン-水和物、4-エチルモルホリン、o-ジクロロベンゼン、3,4-キシリジン、N-メチルアニリン、トリレンジイソシアナート、2-(ジブチルアミノ)エタノール、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール、3,5-キシリジン、N,N-ジメチルベンジルアミン、1,3-ジブromopropan、n-ヘキサデカン、1-ブrom-3-クロロプロパン、ジシクロヘキシルアミンをそれぞれ28日間反復してSprague Dawleyラット(6週齢、雄)に経口投与した。正常対照群として、オリーブ油、注射用水又はゴマ油を28日間反復してSprague Dawleyラット(6週齢、雄)に経口投与した。また、1群あたり3個体のラットを使用した。なお、動物試験は28日間に制限されることはなく、例えば数日間でもよい。

10

【0067】

化学物質の投与液は、化学物質を必要量秤量し、適当な溶媒(注射用水、オリーブ油、ゴマ油など)を用いて溶液又は均一な懸濁液を作製した。経口投与は2.5mL用または5.0mL用注射用シリンジにフレキシブル経口ゾンデ(商品名)を装着したものをを用いたが、これに限定されるものではない。なお、溶媒は、2-ブタノンオキシム、m-キシリレンジアミン、3-シアノピリジン、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール、テトラヒドロフルフリルアルコール、メタクリルアミド、スルホラン、2-イソプロポキシエタノール、ヒドラジーン-水和物および4-エチルモルホリンは注射用水(大塚製薬株式会社製)を使用し、o-ジクロロベンゼン、3,4-キシリジン、N-メチルアニリン、トリレンジイソシアナート、2-(ジブチルアミノ)エタノール、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール、3,5-キシリジン、N,N-ジメチルベンジルアミン、1,3-ジブromopropanおよびn-ヘキサデカンはオリーブ油(小堺製薬株式会社製)を使用し、1-ブrom-3-クロロプロパンおよびジシクロヘキシルアミンはゴマ油(小堺製薬株式会社製)を使用した。なお、投与液に使用する溶媒はこれらに限定されることはない。

20

【0068】

各化学物質の投与量はそれぞれ、2-ブタノンオキシムが100mg/kg/day、m-キシリレンジアミンが400mg/kg/day、3-シアノピリジンが180mg/kg/day、2-(2-アミノエチルアミノ)エタノールが1,000mg/kg/day、テトラヒドロフルフリルアルコールが600mg/kg/day、メタクリルアミドが150mg/kg/day、スルホランが700mg/kg/day、2-イソプロポキシエタノールが500mg/kg/day、ヒドラジーン-水和物が30mg/kg/day、4-エチルモルホリンが500mg/kg/day、o-ジクロロベンゼンが500mg/kg/day、3,4-キシリジンが250mg/kg/day、N-メチルアニリンが125mg/kg/day、トリレンジイソシアナートが300mg/kg/day、2-(ジブチルアミノ)エタノールが250mg/kg/day、2,4-ジ-tert-ブチルフェノールが300mg/kg/day、3,5-キシリジンが200mg/kg/day、N,N-ジメチルベンジルアミンが200mg/kg/day、1,3-ジブromopropanが250mg/kg/day、n-ヘキサデカンは1,000mg/kg/day、1-ブrom-3-クロロプロパンが300mg/kg/day、ジシクロヘキシルアミンが70mg/kg/dayとし、投与対象となるラットの体重の測定値から投与液量を計算して、ラットに投与した。

30

【0069】

臓器の採取は、化学物質の最終投与の約24時間後に行った。具体的には、ラットを麻酔下で腹部大動脈より放血(全採血)して安楽死させた後、小脳を採取し、速やかに液体窒素で凍結させた。凍結させた小脳はISOGEN(ニッポンジーン社製)溶液中でホモジナイズすることにより粉碎した。

40

【0070】

<全RNAの抽出>

小脳組織からの全RNAの抽出はISOGEN試薬(ニッポンジーン社製)を用いて推奨のプロトコルに従って行った。

【0071】

<核酸検体の調製>

検体用mRNAの調製は、小脳組織からISOGEN試薬(ニッポンジーン社製)を用いて抽出し

50

た全RNAから、Poly(A) Pureキット (Ambion社製) を用い、各社推奨のプロトコルに従って行った。

【0072】

< マイクロアレイの作製 >

ラット遺伝子断片ライブラリー (マイクロダイアグノスティック社製) を用いてマイクロアレイを作製した。該ラット遺伝子断片ライブラリーには、配列番号1~107で示される塩基配列を有する合成オリゴヌクレオチドを含んでいた。また、マイクロアレイの作製方法・条件に限定はないが、例えば (Schena, M. et al., Science, 270, 467-470. (1995)) に記載の作製方法を用いることができる。

【0073】

ラット遺伝子断片ライブラリーを微量分注装置 (マイクロダイアグノスティック社製) によりスライドガラス (松波硝子工業社製、HAコートスライドガラス) にプリントしてマイクロアレイを作製した。該マイクロアレイを気相恒温器内にて80℃で1時間静置し、さらにUVクロスリンカー (Hoefer社製、UVC500) を用いて120mJの紫外線を照射した。

【0074】

< マイクロアレイの後処理 >

マイクロアレイの後処理については、特許公報 (特許第4190899号) 記載の方法により行った。

【0075】

< 標識cDNAの合成 >

該mRNA 1.5 µgを核酸標識・ハイブリダイゼーション試薬 (マイクロダイアグノスティック社製)、逆転写酵素SuperScriptII (登録商標: ライフテクノロジーズ) (インビトロジェン社製)、Cyanine5-deoxyuridinetriphosphate(Cyanine5-dUTP) (Perkin Elmer社製) を用い、標識cDNAを作製した。一方、対照としてラット共通レファレンス (マイクロダイアグノスティック社製) を使用した。共通レファレンスに対しては核酸標識・ハイブリダイゼーション試薬 (マイクロダイアグノスティック社製)、逆転写酵素SuperScriptII (インビトロジェン社製)、Cyanine3-deoxyuridinetriphosphate(Cyanine3-dUTP) (Perkin Elmer社製) を用い、標識cDNAを作製した。作製方法は、各社推奨のプロトコルに従った。

【0076】

< 標識プローブの作製 >

これらの標識cDNA、すなわち、Cyanine5-dUTPで標識した検体及びCyanine3-dUTPで標識した対照レファレンスを同一試験管内で混合した後、MicropureEZ (ミリポア社製) 及びMicroconYM30 (登録商標: ミリポア) (ミリポア社製) により精製した。最終的には核酸標識・ハイブリダイゼーション試薬に付属のハイブリダイゼーションバッファー及び純水を用いて15 µlに調製した。

【0077】

< ハイブリダイゼーション >

該溶液を99℃で5分間加熱して熱変性させた後に、DNAマイクロアレイ上に滴下し、ハイブリダイゼーションカセット (マイクロダイアグノスティック社製) に格納した。該ハイブリダイゼーションカセットを気相恒温器 (三洋電機バイオメディカ社製) に入れ、42℃で約20時間、静置した状態で保温した。この操作によって、サンプル中に含まれる標識cDNAがDNAマイクロアレイ上の相補的なオリゴDNAと特異的に結合する。

【0078】

< 洗浄 >

ハイブリダイゼーションカセットからスライドガラスを取り出し、核酸標識・ハイブリダイゼーション試薬 (マイクロダイアグノスティック社製) 付属のハイブリダイゼーション洗浄溶液を用い、同社推奨のプロトコルに従ってスライドガラスを洗浄した。

【0079】

< 蛍光強度の検出及び数値化 >

10

20

30

40

50

各遺伝子の発現レベルはDNAマイクロアレイ上に固定されたオリゴDNAと結合した標識cDNAの蛍光強度を測定することにより見積もることができる。洗浄したスライドガラスをスキヤナGenePix4000B (Axon Instrument社製)を用いて蛍光を測定し、スキヤナに付属の解析ソフトウェアGenePixPro (Axon Instrument社製)を用いて光学的に評価し、蛍光強度の相対値 (Cyanine5/Cyanine3) 数値化した。すなわち、DNAマイクロアレイ上に固定されたオリゴDNAのスポットの蛍光強度をそれぞれ別々に測定し、蛍光強度をヒト共通レファレンスとの相対比 (\log_2 比) で表した。また、スポット以外の場所の蛍光強度からバックグラウンドを算出してノイズとしてそれぞれのスポットの蛍光強度から差し引いた。さらに、サンプルにおける蛍光強度/共通レファレンスの蛍光強度を算出するという解析を行った。すなわち、各サンプルの遺伝子発現レベルはすべて共通レファレンスに対する相対比として検出されるため、単純に複数サンプルを横並び比較できる状態となっている。このようにして取得された数値を集積してデータベース化した。

10

【0080】

<二次比の算出>

次に、すべての対照群の平均値を算出し、それぞれのサンプルについてその平均値との相対値 (「二次比」と呼ぶ。) を算出した。以下の計算はすべて二次比を用いて行った。

【0081】

<遺伝子群の抽出>

メタクリルアミドは神経毒性を有する化学物質として報告されている化学物質であり、28日間反復投与試験により小脳脚の軸策膨化 (7個体中1個体に症状が出現したと報告されている)、坐骨神経の神経線維の変性などの病理所見、よるめき歩行の観察などが報告されている (国立医薬品食品衛生研究所「既存化学物質毒性データベース」参照)。また、ヒドラジーン-水和物は国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」では神経毒性に関する報告はなかったものの、「化学物質等安全データシート」 (昭和化学株式会社) ではヒトにおける神経症状、振戦、嗜眠、言動の一貫性喪失などの神経毒性が報告されている。

20

【0082】

そこで、これらの化学物質をラットに反復投与した際に生体に与える影響を判別するために有用な遺伝子を選択するために、メタクリルアミド (CAS登録番号79-39-0) またはヒドラジーン-水和物 (CAS登録番号7803-57-8) を28日間反復投与したラットの小脳と注射用水を投与した対照群ラットの小脳とを比較して、各遺伝子の対数変換相対的発現比に対するスチューデントのt検定を行ってP値を算出した。それぞれの化学物質投与群と対照群との間で発現レベルの平均値の差の絶対値が0.75以上、かつ、P値が0.05未満である遺伝子群を抽出したところ、メタクリルアミドで41遺伝子、ヒドラジーン-水和物が37遺伝子抽出できた。これらを合わせたところ、のべ67遺伝子となった。

30

【0083】

一方、第2回目の実験で使用した注射用水 (「C2」で表す。) を投与したラットの小脳において、それらの標準偏差が0.5以上の遺伝子を除いた後、C2およびメタクリルアミド投与群のサンプルのうち2以上のサンプルで1以上または-1以下の値を有する遺伝子を抽出した。さらに、それらの遺伝子から1以上のサンプルで値が0の遺伝子を除いた。次に、メタクリルアミド投与群のうち動物番号4 (「mca_4」で表す。) または動物番号5 (「mca_5」で表す。) で-1以上、1以下の値を有する遺伝子群を除いた。さらに、mca_4とmca_5のうちどちらか一方が正の値、かつ、他方が負の値を有する遺伝子群を除いた。その結果、34遺伝子が抽出できた。

40

【0084】

同様にして、第2回目の実験で使用した注射用水 (「C2」で表す。) を投与したラットの小脳において、それらの標準偏差が0.5以上の遺伝子を除いた後、C2およびヒドラジーン-水和物投与群のサンプルのうち2以上のサンプルで1以上または-1以下の値を有する遺伝子を抽出した。さらに、それらの遺伝子から1つ以上のサンプルで値が0の遺伝子を除いた。次に、メタクリルアミド投与群のうち動物番号19 (「mca_19」で表す。) また

50

は動物番号20(「mca_20」で表す。)で-1以上、1以下の値を有する遺伝子群を除いた。さらに、mca_19とmca_20のうちどちらか一方が正の値、かつ、他方が負の値を有する遺伝子群を除いた。その結果、33遺伝子が抽出できた。前記34遺伝子と該33遺伝子を合わせたところ、のべ48遺伝子となった。

【0085】

前記t検定で抽出した遺伝子群(67遺伝子)と前記48遺伝子を合わせたところ、のべ107遺伝子となった。表1~10には該107遺伝子の発現情報を記しており、数値は二次比で表している。また表中、「配列番号」の欄には特定した遺伝子の配列番号を記している。また、表中の略号は「C1」は「第1回目の実験に使用した注射用水」を、「2bo」は「2-ブタノンオキシム」を、「mxa」は「m-キシリレンジアミン」を、「3cp」は「3-シアノピリジン」を、「2ae」は「2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール」を、「thf」は「テトラヒドロフルフリルアルコール」を、「C2」は「第2回目の実験に使用した注射用水」を、「mca」は「メタクリルアミド」を、「suf」は「スルホラン」を、「2ip」は「2-イソプロポキシエタノール」を、「hnh」は「ヒドラジン-水和物」を、「4em」は「4-エチルモルホリン」を、「C4」は「第4回目の実験に使用した注射用水」を、「dcb」は「o-ジクロロベンゼン」を、「34x」は「3,4-キシリジン」を、「nma」は「N-メチルアニリン」を、「tdn」は「トリレンジイソシアナート」を、「2de」は「2-(ジブチルアミノ)エタノール」を、「C7」は「第7回の実験に使用したオリブ油」を、「24b」は「2,4-ジ-tert-ブチルフェノール」を、「35x」は「3,5-キシリジン」を、「nda」は「N,N-ジメチルベンジルアミン」を、「13d」は「1,3-ジブプロモプロパン」を、「nhd」は「n-ヘキサデカン」を、「C8」は「ゴマ油」を、「bcp」は「1-ブromo-3-クロロプロパン」を、「dha」は「ジシクロヘキシルアミン」を表す。また、略号に付随の数字は個体の別を表している。

10

20

【0086】

【表 1】

配列番号	C1 1	C1 2	C1 3	2bo 4	2bo 5	2bo 6	mxs 8	mxs 9	3cp 12	2ae 15	thf 18
1	0.434	-0.766	-0.106	0.267	-0.417	0.067	0.059	-0.587	-0.387	-0.008	-0.254
2	0.817	0.019	-0.945	0.411	0.563	-0.369	0.288	-0.653	-1.397	-0.545	-0.567
3	0.346	0.631	-0.859	0.895	-0.273	-1.068	0.542	-0.181	-0.900	0.234	-0.506
4	0.054	-0.367	0.178	0.475	0.199	0.873	-0.216	0.771	0.001	-0.196	0.234
5	0.035	-0.180	-0.313	0.041	0.010	-0.485	-0.100	-0.330	-0.277	-0.356	-0.372
6	-0.367	-0.022	1.319	-0.136	-0.480	1.028	-0.250	0.482	0.877	0.382	0.360
7	-0.370	0.134	0.707	0.025	-0.978	0.750	-0.793	-0.171	0.655	0.169	0.247
8	0.283	0.000	-0.123	-0.433	0.489	0.039	0.221	0.000	0.000	0.345	0.000
9	-0.078	0.000	-0.500	-0.176	-0.903	-0.020	-0.037	0.000	-0.034	0.000	-0.567
10	-0.934	0.052	0.042	0.059	-0.079	-0.483	-0.001	-0.705	-0.242	-0.294	-0.041
11	-0.044	-0.025	-0.047	-0.124	0.110	-0.110	-0.483	-0.308	-0.074	-0.210	-0.192
12	0.150	-0.034	-0.200	-0.032	0.014	-0.432	-0.106	0.261	-0.155	0.133	-0.132
13	-0.032	0.433	0.295	-0.157	0.826	-0.208	0.300	-0.071	1.007	0.302	-0.078
14	-0.080	-0.695	0.523	-0.309	-0.227	0.103	0.293	-0.094	0.172	-0.036	0.388
15	0.138	-0.271	1.332	0.065	-0.345	0.322	0.024	0.312	1.074	0.223	0.781
16	-0.071	-0.085	0.437	-0.389	-0.369	0.090	0.332	-0.223	-0.004	0.060	0.226
17	-0.077	-0.184	-0.457	-0.305	-0.629	0.062	0.316	-0.700	-0.554	0.090	0.145
18	-0.496	-0.172	1.119	-0.295	-0.978	0.832	-0.616	-0.033	0.823	0.129	0.964
19	-0.073	-0.214	0.558	-0.129	-0.152	0.130	-0.984	-0.196	0.230	0.287	0.514
20	0.201	-0.340	-0.172	1.350	0.441	-0.620	0.421	0.000	0.067	-0.095	0.559
21	-0.013	-0.007	-0.291	0.010	-0.075	-0.181	-0.177	-0.603	-0.159	-0.270	-0.717
22	0.000	0.112	0.000	-0.442	1.442	0.000	0.223	0.000	0.750	0.000	0.000
23	0.500	0.479	-0.741	0.563	0.375	-0.086	-0.176	-0.013	-0.549	-0.562	-0.493
24	-0.018	-0.930	-0.255	0.410	0.000	0.000	0.247	0.000	0.473	0.000	0.000
25	0.150	-0.196	-0.472	0.031	0.225	0.680	0.057	0.877	1.215	2.147	1.266
26	-0.451	-0.609	0.369	-1.494	-0.471	0.339	-0.479	0.042	0.085	-0.083	0.368
27	-0.090	0.012	-0.013	0.099	0.028	0.135	0.088	-0.119	0.399	0.794	0.153
28	-0.074	-0.349	0.400	-0.006	-0.136	-0.303	0.136	-0.277	0.389	0.500	0.036
29	0.096	0.753	0.112	0.158	0.187	-0.362	0.425	0.129	-0.514	0.677	1.103
30	0.509	-0.227	-0.063	0.090	-0.202	-0.235	0.487	0.000	-0.045	-0.118	-0.178
31	0.362	0.132	-0.397	-0.143	0.093	-0.235	0.161	-0.326	-0.909	-0.658	-0.600
32	0.497	0.181	-0.208	0.022	-0.101	0.264	0.208	-0.242	-0.158	-0.083	-0.520
33	0.000	0.000	0.019	0.000	0.136	-0.884	-0.035	-0.125	-0.007	0.515	-0.416
34	-0.088	0.000	-0.116	1.074	-0.621	0.000	0.678	0.000	-0.572	0.000	0.000
35	0.578	0.050	-1.247	0.788	0.348	-0.966	0.020	-1.280	-0.578	-0.356	-0.627
36	0.034	-0.391	0.306	-0.201	-0.403	0.213	0.489	0.419	0.398	0.535	0.303
37	0.500	0.000	-0.247	-0.277	-0.945	-0.204	-0.584	-0.390	0.142	0.000	-0.919
38	-0.468	0.000	-0.732	0.000	0.000	-0.474	0.000	-0.405	-1.086	-0.641	-0.977
39	0.308	-0.326	-0.669	0.034	0.635	0.913	-0.084	0.295	-0.771	0.749	0.030
40	0.171	0.573	-0.462	0.711	0.686	-0.938	0.750	-0.487	-0.211	0.454	-0.250
41	-0.012	0.624	-0.879	0.580	0.560	-1.979	-0.092	0.038	-1.321	0.084	-0.485
42	-0.489	-0.559	0.850	-0.205	0.033	0.261	-0.704	0.638	1.261	0.303	0.725
43	0.176	-0.436	0.419	-0.026	0.034	0.006	-0.082	-0.391	0.245	-0.033	-0.032
44	-0.123	-0.028	-0.035	-0.092	-0.335	0.534	-0.018	-0.058	0.227	-0.139	-0.060
45	-0.545	-0.360	0.423	0.047	-0.139	0.183	-0.246	0.526	0.474	0.256	0.414
46	-0.257	0.000	0.026	0.174	0.065	0.667	0.647	0.049	-0.049	0.000	-0.037
47	-0.157	-0.348	0.344	-0.886	-0.342	-0.311	-0.056	0.142	1.845	0.848	0.391
48	-0.486	-0.322	1.182	-0.296	-0.155	1.235	-0.098	1.130	0.989	0.875	0.822
49	0.000	0.000	0.551	0.000	0.600	0.000	0.529	-0.017	-1.101	-0.041	0.000
50	-0.382	0.328	1.401	0.200	-0.613	-0.223	0.167	-0.789	0.311	-0.473	1.074

10

20

30

【 0 0 8 7 】

【表 2】

配列番号	C1_1	C1_2	C1_3	2bo_4	2bo_5	2bo_6	mx_a_8	mx_a_9	3cp_12	2ae_15	thf_18
52	0.398	0.180	-0.158	0.287	0.268	-0.015	0.318	0.172	-0.061	-0.183	-0.175
53	0.346	0.039	0.144	0.219	0.140	0.131	0.285	0.078	0.347	0.239	0.042
54	0.436	0.125	-0.365	0.324	0.180	-0.439	-0.041	-0.352	-0.046	-0.437	-0.198
55	0.656	-0.084	-0.251	0.014	-0.162	-0.305	0.155	0.161	-0.079	-0.048	-0.168
56	0.204	-0.452	0.031	0.664	0.296	0.209	-0.214	-0.264	0.164	-0.073	-0.111
57	-0.302	0.804	-0.793	-0.278	0.023	0.401	0.046	0.156	-0.245	-0.266	-0.852
58	0.000	-0.039	-0.361	-0.071	-0.431	-0.430	0.539	-0.601	-0.515	-0.535	0.000
59	-0.122	0.136	-0.331	-0.026	-0.029	0.000	0.057	0.000	-0.301	-0.325	-0.142
60	0.086	0.347	-0.467	0.412	0.174	-0.075	-0.793	-0.077	-0.425	-0.261	-0.991
61	0.139	-0.108	-1.021	0.258	0.323	-0.785	-0.035	-0.381	-0.796	-0.394	-0.887
62	0.665	0.149	-0.887	0.018	0.281	-0.562	0.272	0.022	-0.239	-0.481	-0.638
63	0.396	0.504	-0.683	0.606	0.773	-0.831	0.580	-0.203	-0.484	0.079	-0.373
64	0.453	-0.014	-0.385	0.904	0.746	-0.217	1.079	0.059	-0.371	-0.279	-0.371
65	0.342	-0.054	-0.960	0.410	0.398	-0.906	0.210	-0.389	-0.155	0.399	0.243
66	0.118	0.448	-0.191	0.504	-0.064	-0.334	-0.450	-0.500	0.031	-0.669	-0.743
67	0.533	0.798	-0.465	0.622	0.497	-0.310	0.407	0.599	0.205	-0.418	-0.218
68	-0.221	-0.119	0.733	-0.292	-0.237	0.163	0.292	-0.127	0.585	-0.151	0.287
69	-0.288	-0.217	0.467	-0.034	-0.421	0.113	-0.070	-0.456	0.389	-0.159	0.367
70	0.360	0.050	0.207	0.207	0.380	0.228	0.283	-0.093	0.516	-0.016	-0.184
71	-0.222	0.122	-0.275	0.205	0.030	-0.074	-0.100	0.328	0.255	0.357	0.177
72	0.220	0.060	-0.238	0.191	0.145	0.087	0.229	0.414	-0.014	0.162	0.306
73	0.018	0.050	-0.049	0.212	0.149	0.512	0.149	-0.106	0.242	0.136	0.064
74	0.276	0.137	-0.023	0.000	0.160	-0.094	0.147	0.123	-0.031	0.109	0.034
75	0.511	-0.095	-0.420	0.686	0.189	0.220	0.233	0.531	0.076	0.205	0.548
76	-0.042	0.392	-0.819	0.043	0.158	-0.434	-0.012	-0.341	-1.012	-0.608	-0.425
77	0.206	0.202	0.130	0.465	0.204	0.359	0.355	0.114	0.051	0.511	0.335
78	0.170	0.553	-0.006	0.269	0.405	0.072	0.142	0.638	0.396	0.578	0.641
79	0.001	0.000	0.147	0.368	0.726	0.159	0.357	0.127	0.024	-0.265	-0.113
80	0.677	0.746	-0.296	-0.310	-0.096	0.070	-0.177	-0.461	-0.544	0.636	-0.455
81	-0.640	-0.122	0.423	0.152	0.000	0.072	-0.347	-1.086	0.038	-0.250	-0.284
82	0.117	-0.079	0.112	0.302	-0.344	-0.377	0.131	-0.084	0.316	-0.638	-0.487
83	0.022	-0.178	0.940	-0.149	-0.112	0.191	0.182	0.877	0.921	0.543	0.185
84	-0.367	-0.017	0.248	-0.164	0.144	0.711	0.598	0.302	0.587	0.183	0.240
85	0.359	-0.668	0.355	-0.479	0.182	-0.029	-0.184	0.503	0.786	0.217	0.369
86	-0.498	-0.062	0.278	0.049	0.609	0.231	0.303	0.003	0.330	0.546	-0.226
87	0.057	0.266	-0.491	-0.311	-0.545	-0.590	-0.163	0.415	0.632	0.165	-0.338
88	0.319	0.056	-0.111	0.199	0.397	0.067	0.072	0.216	0.092	0.378	0.253
89	-0.005	0.319	-0.247	0.201	0.315	-0.271	-0.088	0.543	-0.047	0.313	0.378
90	0.121	-0.078	-0.223	0.360	0.044	0.141	-0.112	0.656	-0.250	0.448	0.433
91	0.103	-0.023	0.148	-0.029	-0.117	0.123	-0.252	0.753	0.381	0.772	0.756
92	0.406	-0.198	-0.033	-0.378	0.046	-0.679	-0.165	-0.440	-0.742	0.177	-0.525
93	-0.093	0.169	-0.033	0.031	0.270	-0.338	-0.229	-0.190	-0.416	0.400	0.318
94	0.657	0.399	-0.746	0.521	0.282	-0.307	-0.230	-0.616	-0.575	-0.129	-0.848
95	0.381	0.274	-0.990	0.580	-0.490	-0.496	0.394	0.100	-0.485	0.000	0.756
96	0.218	-0.361	-0.627	0.448	0.121	-0.181	-0.543	1.263	-0.510	0.803	0.780
97	-0.798	-1.002	-0.202	-0.034	0.898	0.636	-1.121	0.059	0.384	-0.488	0.723
98	0.392	-0.510	0.235	0.635	0.295	1.063	-0.594	0.740	0.234	-0.032	0.113
99	-0.376	-0.183	0.564	-0.809	-0.768	0.729	-0.272	0.042	0.071	0.096	1.043
100	0.003	0.259	-0.282	0.563	0.308	0.151	0.104	-0.120	-0.332	-0.645	-0.348
101	-0.269	-0.163	0.403	0.138	0.199	1.186	-0.424	0.036	0.338	-0.274	-0.108
102	-0.107	-0.801	-0.130	0.486	0.566	0.537	-0.006	0.012	0.085	0.484	-0.142
103	0.269	0.065	-0.123	-0.212	0.418	-0.087	0.072	-0.118	0.117	0.170	-0.011
104	-0.309	0.047	-0.217	-0.354	0.035	-0.411	0.016	-0.614	0.149	-0.058	-0.779
105	0.464	0.163	-0.402	-0.346	0.328	-0.801	0.522	-0.534	-0.545	-0.273	-0.668
106	-0.148	-0.142	-0.500	-0.829	-0.004	-0.304	-0.403	-0.570	-0.472	-0.924	-0.999
107	-0.529	0.059	-0.997	-0.606	-0.402	-0.740	-0.500	-1.148	-1.214	-0.098	-0.788

10

20

30

【 0 0 8 8 】

【表 3】

配列番号	C2 1	C2 2	C2 3	mca 4	mca 5	mca 6	suf 9	suf 10	suf 11
1	-0.179	0.047	-0.311	-1.378	-1.140	-0.740	-0.247	0.315	-0.796
2	-0.101	0.632	0.063	-1.635	-1.383	-0.464	0.432	0.301	0.105
3	-0.312	0.095	-0.635	-1.820	-1.706	-1.076	0.045	0.080	-0.100
4	-0.217	-0.168	0.427	0.664	0.974	0.829	0.190	-0.196	0.417
5	-0.240	-0.098	0.000	0.594	0.683	0.000	-0.128	-0.065	0.000
6	-0.193	-0.252	0.004	0.887	1.294	0.460	-0.139	-0.175	0.211
7	-0.699	-0.328	-0.277	0.674	0.786	0.231	-0.961	-0.313	-0.294
8	0.287	0.369	0.000	-0.367	-0.598	-0.870	0.540	-0.462	0.976
9	0.623	0.577	0.381	-0.266	-0.957	-0.445	-0.397	0.262	-0.764
10	0.301	0.292	0.743	-0.105	-0.592	-0.255	-0.084	0.153	-0.244
11	0.721	0.547	0.316	-0.354	-0.360	0.000	-0.674	-1.275	-0.351
12	0.143	-0.154	-0.316	-1.221	-1.158	-0.729	0.100	0.027	-0.158
13	-0.743	-0.531	-0.733	1.099	0.424	0.669	1.035	-0.161	0.291
14	-0.441	-0.258	-0.021	0.889	0.856	0.288	-0.308	0.255	0.227
15	0.063	-0.454	-0.108	0.424	1.042	0.614	-0.212	-0.069	0.410
16	0.162	-0.083	0.080	0.617	0.878	0.955	-0.005	0.052	0.246
17	-0.245	-0.020	0.410	0.945	0.768	0.716	0.141	-0.247	0.514
18	-0.143	0.077	0.096	0.946	0.770	0.755	-0.159	0.393	0.460
19	-0.399	-0.868	-0.340	0.130	0.360	0.661	-0.691	-0.009	-0.756
20	-0.433	-0.200	0.000	1.253	0.885	0.000	0.000	-0.397	0.000
21	-0.092	-0.266	-0.167	0.669	0.666	0.842	0.154	-0.138	-0.008
22	-0.174	-0.359	0.000	0.708	0.578	0.892	0.000	0.000	0.000
23	-0.288	0.271	-0.491	0.770	0.914	0.441	0.041	0.739	0.065
24	0.239	0.597	0.827	0.000	-0.307	-0.177	0.292	0.357	-0.003
25	-0.949	-0.447	-0.468	0.466	-0.147	0.363	-0.045	-0.845	0.250
26	0.183	-0.128	0.622	-0.386	-1.197	-0.547	-0.809	-0.602	-0.441
27	0.167	0.045	0.040	-0.862	-0.915	-0.327	-0.021	0.160	-0.174
28	0.143	0.497	0.034	-1.252	-0.966	-0.803	0.158	0.049	0.026
29	0.216	0.022	0.000	-1.672	-1.594	0.000	0.323	0.352	0.000
30	0.000	0.116	-0.187	-1.559	-1.576	-0.660	-0.140	-0.118	-0.583
31	0.242	-0.013	-0.299	-0.867	-1.085	-0.418	0.586	0.075	-0.955
32	0.138	-0.005	0.426	-0.862	-0.855	-0.249	0.196	0.389	-0.152
33	0.016	0.404	0.194	-0.863	-0.786	-0.537	0.000	-0.109	-0.633
34	-0.183	0.096	0.000	-0.761	-0.713	-1.261	0.000	-0.461	0.000
35	0.256	-0.207	0.353	-0.365	-0.926	-0.967	-0.717	0.530	-0.238
36	0.191	-0.148	0.539	-0.885	-0.740	-0.234	0.219	0.024	0.222
37	0.600	0.362	0.000	-0.468	-0.710	-0.521	0.000	-0.382	0.203
38	0.000	0.078	-0.171	-0.660	-0.623	-1.194	0.000	0.000	-0.230
39	0.563	0.316	0.413	-0.276	-0.320	-0.957	-0.067	0.437	-0.235
40	1.096	0.893	-0.547	-1.977	-1.891	-0.574	0.016	0.813	-0.147
41	0.837	0.311	0.187	-1.056	-0.565	-0.120	-0.518	-0.285	1.393
42	-0.385	-0.205	0.454	0.392	0.469	0.811	0.395	-0.661	0.311
43	0.217	0.334	-0.066	-1.099	-0.724	0.373	-0.349	-0.051	0.099
44	-0.262	-0.043	-0.423	0.686	0.802	0.035	-0.073	0.005	0.083
45	-0.177	-0.093	0.027	1.044	0.852	0.056	0.745	0.045	0.638
46	-0.700	-0.256	0.000	0.210	0.447	0.176	-0.365	-0.055	0.429
47	-0.151	-0.318	-0.701	0.202	0.298	0.211	-0.114	-0.534	0.234
48	-0.435	-0.257	-0.195	0.399	0.221	0.605	0.040	-0.237	0.038
49	-0.410	-0.443	0.000	0.496	-0.152	0.000	0.199	0.000	0.000
50	-0.755	-0.420	-0.507	-0.407	0.014	-0.338	0.100	-0.209	-1.261

10

20

30

【 0 0 8 9 】

【表 4】

配列番号	C2 1	C2 2	C2 3	mca 4	mca 5	mca 6	suf 9	suf 10	suf 11
52	-0.025	0.285	-0.049	-1.378	-0.740	-0.259	0.196	-0.246	-0.440
53	0.047	0.325	-0.099	-0.510	-0.517	-0.423	-0.167	-0.061	-0.109
54	0.335	0.503	-0.134	-0.675	-0.665	0.023	-0.224	0.102	-0.376
55	-0.071	0.305	0.487	-0.434	-0.947	-0.016	0.280	-0.051	0.179
56	0.582	0.029	0.181	-0.661	-0.597	0.054	0.181	0.266	0.360
57	0.250	0.176	-0.023	-0.613	-1.220	0.041	0.765	0.136	-0.115
58	0.050	0.624	0.581	-0.321	-0.399	0.417	0.536	-0.276	-0.157
59	0.129	-0.221	0.469	0.521	-0.264	-0.486	0.436	-0.348	-0.349
60	0.450	0.414	-0.039	-0.857	-0.049	0.172	-0.519	0.532	0.023
61	-0.189	0.200	-0.065	-0.366	-0.376	-0.848	-0.059	0.426	-0.359
62	-0.034	0.001	-0.100	-0.250	-0.514	-0.172	-0.396	0.160	-0.788
63	0.676	0.435	-0.213	-0.711	-0.989	0.006	0.530	0.321	-0.411
64	0.768	0.207	0.316	-0.284	-0.340	-0.292	0.403	-0.243	0.539
65	0.381	0.443	0.489	0.174	-0.448	0.282	0.121	-0.206	0.271
66	0.570	0.076	0.303	0.660	1.482	2.041	0.848	1.083	1.152
67	0.520	0.578	0.488	-0.122	0.060	0.511	0.876	0.554	0.167
68	-0.062	-0.007	-0.234	1.690	1.711	0.210	-0.145	-0.071	-0.211
69	-0.348	-0.180	-0.301	1.302	1.401	-0.105	-0.283	-0.315	-0.184
70	0.242	0.177	0.171	-1.020	-1.435	0.138	0.271	0.214	0.191
71	0.275	0.132	0.094	-1.285	-1.108	-0.072	0.213	0.099	0.168
72	0.016	0.029	0.164	-1.813	-1.619	-0.016	0.101	0.190	0.144
73	-0.182	-0.035	0.087	-1.432	-1.196	0.344	-0.030	0.062	0.145
74	-0.147	0.264	-0.518	-1.200	-1.150	-0.359	-0.162	0.094	-0.106
75	-0.117	-0.271	-0.388	-1.938	-1.086	-0.032	-0.105	0.222	0.239
76	0.109	0.123	-0.746	-1.519	-1.055	-0.471	-0.179	0.204	0.052
77	0.602	0.474	0.021	-2.105	-2.022	-0.332	0.670	0.139	-0.230
78	0.427	0.290	-0.186	-1.577	-1.548	-0.001	0.447	0.692	-0.026
79	0.419	0.301	-0.007	-1.547	-1.622	0.236	0.377	0.402	0.599
80	0.095	0.265	-0.338	-1.035	-1.434	0.029	0.714	0.351	-0.655
81	0.102	-0.278	0.587	-1.095	-1.840	-0.236	-0.265	0.249	1.072
82	0.226	0.386	-0.445	-1.622	-1.158	-0.453	-0.374	0.445	0.514
83	0.283	-0.301	-0.279	-1.423	-1.334	-0.127	1.017	0.150	-0.320
84	0.194	0.462	0.280	1.007	1.112	-0.199	-0.017	-0.502	0.411
85	0.192	-0.307	-0.479	1.076	1.195	0.136	0.520	-0.134	-0.422
86	0.307	-0.050	-0.412	1.756	1.044	-0.339	-0.529	-0.481	-0.395
87	-0.367	0.103	-0.662	1.204	2.733	-0.417	-0.142	0.001	-1.007
88	0.106	0.077	0.132	-1.123	-1.323	0.130	0.259	-0.048	0.177
89	-0.016	0.140	-0.305	-1.148	-1.007	-0.101	0.142	0.018	0.026
90	-0.230	0.036	-0.266	-1.083	-1.114	-0.157	0.297	-0.051	0.200
91	0.357	0.138	-0.161	-1.024	-1.210	-0.171	-0.029	-0.132	0.005
92	0.018	0.071	-0.053	-1.020	-1.157	-0.279	-0.475	-0.550	-0.128
93	0.002	-0.037	-0.526	-1.048	-1.075	-0.639	0.056	0.247	-0.637
94	-0.147	0.294	-0.248	-1.109	-1.267	0.308	0.269	0.457	0.545
95	0.241	-0.241	0.056	-1.219	-1.092	-0.272	0.547	-0.034	-0.202
96	0.416	0.210	0.621	-1.877	-1.944	1.509	0.681	-0.235	0.977
97	-0.951	-0.648	-0.146	1.456	1.764	-0.768	-0.799	-1.073	-1.842
98	-0.043	-0.405	0.561	0.457	0.931	0.925	0.235	-0.330	0.521
99	-0.718	-0.395	0.251	0.683	1.338	-0.303	-0.499	-0.443	-0.407
100	0.166	-0.109	0.179	1.529	0.820	-0.176	0.339	-0.357	-0.124
101	0.076	-0.282	-0.347	0.026	0.603	-0.188	-0.044	-0.300	-0.377
102	0.048	-0.047	0.478	0.564	0.310	0.136	0.046	-0.103	0.198
103	-0.021	-0.311	-0.772	0.268	0.187	-1.490	0.027	-0.019	-1.624
104	0.264	0.316	-0.448	0.124	0.403	-0.901	0.070	-0.472	-1.259
105	-0.026	0.086	-0.178	0.247	-1.129	-0.008	-0.678	-0.358	-0.611
106	0.147	-0.525	-0.153	-0.125	0.191	-1.088	-1.445	-0.679	-0.052
107	-0.261	-0.127	-0.269	1.687	0.627	-1.502	-0.588	-0.142	-1.281

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

【表 5】

配列番号	2ip 14	2ip 15	2ip 16	hnh 19	hnh 20	hnh 21	4em 24	4em 25	4em 26
1	-0.567	0.633	0.095	-1.251	-1.287	-0.822	-0.570	-0.532	-0.603
2	0.142	0.541	0.128	-1.717	-1.670	-0.667	0.271	0.385	0.145
3	-0.289	0.236	-0.979	-1.778	-2.079	-1.059	-0.003	-0.157	-1.120
4	0.111	-0.354	0.234	1.254	1.229	0.529	-0.545	-0.399	0.342
5	-0.071	0.151	0.000	0.706	0.626	0.000	-0.166	-0.069	0.000
6	-0.237	-0.619	0.319	0.941	1.086	0.598	-0.366	0.212	0.492
7	-0.089	-0.203	0.670	0.444	0.688	0.678	-0.738	0.443	0.981
8	0.298	0.245	0.000	-0.893	-0.877	0.000	-0.512	-0.153	0.835
9	0.057	0.205	0.000	-0.073	-0.217	-0.608	-0.019	-0.253	-0.160
10	-0.311	-0.103	-0.052	-0.780	-0.785	0.015	-0.188	-0.198	-0.016
11	-0.056	0.464	-0.395	-0.338	-0.187	-1.013	-0.222	-0.382	-0.131
12	0.179	0.049	-0.327	-0.961	-0.932	-0.163	0.023	0.274	-0.312
13	0.311	-0.188	0.727	1.683	1.065	-0.087	0.102	-0.083	0.485
14	0.267	0.106	0.282	0.879	0.803	0.065	-0.173	-0.316	-0.419
15	-0.134	0.206	0.333	0.884	0.456	0.110	-0.155	-0.150	0.398
16	0.137	0.007	0.150	0.452	0.117	-0.137	-0.004	-0.195	-0.255
17	-0.275	-0.496	0.442	0.622	0.752	0.850	-0.169	-0.373	0.483
18	-0.164	0.184	0.312	0.476	0.964	0.212	-0.923	-0.185	1.043
19	-1.092	-0.246	-0.334	0.261	0.400	-0.089	-0.622	-0.399	0.037
20	0.160	0.372	0.000	0.000	0.118	0.000	0.506	-0.598	0.000
21	-0.004	-0.821	-0.201	0.098	-0.253	0.335	-0.235	-0.527	0.313
22	-0.060	0.035	-0.009	0.000	-0.350	0.000	-0.198	0.763	0.000
23	-0.301	0.173	-0.235	-0.385	0.446	-0.527	0.391	0.420	0.194
24	0.772	0.282	0.550	0.617	0.678	0.544	-0.060	0.083	0.229
25	-0.200	0.662	-0.896	1.290	0.602	-0.386	-0.385	-0.973	-0.579
26	-0.960	0.619	0.000	0.184	-0.695	-0.734	-1.250	-0.624	0.000
27	-0.045	-0.053	0.036	-0.749	-0.739	-0.021	-0.516	0.017	0.112
28	-0.341	-0.116	0.189	-0.822	-0.262	0.439	-0.062	0.200	0.139
29	0.037	0.065	-0.055	-1.622	-1.277	0.159	0.316	0.109	-0.577
30	0.573	0.034	-0.232	-1.586	-1.659	-0.181	-0.543	-0.008	-0.385
31	0.642	-0.005	-0.774	-0.739	-0.984	-0.554	0.314	0.221	-0.399
32	0.447	0.070	-0.221	0.756	-0.527	-0.085	0.131	-0.056	0.145
33	0.080	0.084	0.000	0.000	0.000	-0.854	-0.367	0.077	0.000
34	-0.055	-0.864	0.000	-0.359	-0.448	-0.068	0.226	-0.519	-0.024
35	0.066	0.176	-0.872	-0.669	-0.509	-0.354	0.514	0.429	-1.219
36	0.577	0.332	0.049	-0.491	-0.928	-0.025	0.304	0.423	-0.627
37	0.025	-0.222	0.917	-0.598	-0.305	0.788	0.271	0.022	1.082
38	0.000	0.000	-0.247	0.000	-0.302	-0.757	0.000	-0.365	-0.289
39	-0.479	0.356	-0.547	0.059	0.155	-0.703	-0.161	0.255	-0.742
40	0.515	0.537	-0.910	-1.341	-1.107	-0.303	0.878	0.292	-0.091
41	-0.346	-0.340	0.613	0.024	0.068	0.240	-0.221	0.298	-0.632
42	-0.009	-0.208	0.853	1.187	1.208	1.411	-0.542	-0.667	0.657
43	-0.356	-0.012	0.369	-1.047	-1.215	-0.746	0.070	-0.383	-0.286
44	0.169	-0.151	0.008	0.507	0.696	0.346	-0.317	0.129	0.106
45	-0.445	-0.279	0.313	0.837	0.620	0.619	-0.143	-0.318	-0.485
46	-0.195	0.424	0.000	0.486	1.368	1.097	0.282	-0.464	0.000
47	0.037	0.196	0.147	0.488	0.606	0.096	-0.007	0.073	0.067
48	-0.286	-0.326	0.326	0.730	0.204	0.649	-0.271	0.257	0.250
49	0.177	-0.105	0.000	0.510	0.531	0.327	0.714	-0.379	1.326
50	0.457	-0.143	-0.783	0.175	0.718	1.019	-0.608	0.349	-0.304

10

20

30

【 0 0 9 1 】

【表 6】

配列番号	2ip 14	2ip 15	2ip 16	hnh 19	hnh 20	hnh 21	4em 24	4em 25	4em 26
52	0.252	0.634	-0.450	-0.959	-0.983	-0.352	0.293	0.036	-0.263
53	0.070	0.336	-0.239	-0.868	-1.054	-0.288	-0.166	0.297	-0.159
54	0.294	-0.146	-0.208	-0.891	-0.581	-0.387	0.105	0.118	-0.413
55	0.013	-0.122	-0.141	-0.767	-0.801	-0.256	0.042	0.016	-0.063
56	0.016	0.081	-0.249	-0.778	-0.691	-0.185	-0.128	-0.117	-0.161
57	0.534	0.466	-0.434	-0.880	-0.822	-0.334	0.443	-0.415	0.157
58	0.262	-0.009	-1.009	-1.304	-0.421	-0.375	-0.428	-0.082	-0.074
59	0.279	-0.089	-0.214	-1.065	-0.773	-0.562	0.238	0.720	0.330
60	-0.205	0.385	0.211	-0.706	-0.940	-0.268	-0.154	0.277	-0.216
61	0.080	0.026	-1.215	-0.624	-0.663	-1.084	0.572	-0.268	-0.778
62	0.276	0.146	-1.212	-0.905	-0.819	-0.994	0.208	-0.226	-1.472
63	0.689	0.566	-0.942	-1.102	-0.971	-0.798	0.647	0.128	-0.813
64	0.672	-0.345	-0.226	-0.327	-0.167	-0.968	0.756	0.353	0.000
65	0.739	0.443	-0.749	-0.427	-0.415	-0.533	0.211	0.243	-0.433
66	0.510	0.344	1.081	-0.793	-0.594	-0.055	0.715	0.622	1.312
67	0.967	-0.229	-0.316	-0.660	-0.167	-0.129	0.867	0.584	-0.005
68	-0.262	-0.299	0.581	1.457	1.450	0.218	-0.440	-0.491	-0.107
69	-0.307	-0.225	0.140	1.214	1.160	0.022	-0.419	0.053	-0.160
70	0.148	0.030	0.230	-1.162	-1.370	0.117	0.270	0.224	-0.079
71	0.460	0.297	0.157	-1.141	-1.122	0.077	0.387	0.043	0.314
72	0.213	0.131	0.020	-1.747	-1.630	0.297	0.005	0.027	0.065
73	0.260	0.201	-0.093	-1.464	-1.395	0.024	0.101	0.237	0.139
74	0.046	0.260	-0.262	-1.374	-1.289	-0.261	-0.057	0.473	-0.413
75	-0.002	0.269	0.239	-1.560	-1.518	0.442	0.065	0.625	-0.180
76	-0.148	-0.029	-0.349	-1.458	-1.123	-0.438	-0.070	0.395	-1.205
77	0.428	0.162	0.440	-1.419	-2.077	-0.036	0.386	-0.176	0.746
78	0.415	0.590	0.189	-1.548	-1.479	0.103	0.604	0.477	0.017
79	0.408	0.185	0.082	-1.226	-1.757	-0.215	-0.077	0.255	0.309
80	0.241	0.170	-0.240	-1.582	-1.775	-0.052	0.550	0.048	-0.551
81	-0.501	0.015	0.687	-1.310	-1.755	0.655	-0.272	-0.202	0.211
82	0.447	0.093	0.047	-1.798	-1.038	0.018	0.423	0.234	-0.057
83	0.470	0.188	-0.764	-1.093	-1.847	-0.107	0.072	0.371	-0.374
84	0.080	0.489	-0.484	1.145	0.198	-0.513	-0.791	-0.507	-0.341
85	0.444	-0.340	-0.051	1.515	0.503	-0.407	0.314	0.142	0.048
86	-0.041	0.066	-0.366	1.054	0.101	-0.837	-0.158	-0.410	-0.518
87	-0.633	-0.085	-0.500	1.014	0.749	-0.795	-0.514	-0.090	-1.112
88	0.112	0.137	0.256	-0.985	-0.978	0.079	0.113	0.245	0.149
89	0.008	0.468	0.005	-1.299	-0.871	-0.203	0.234	0.390	-0.412
90	0.225	0.447	-0.121	-0.644	-0.976	-0.343	0.250	0.072	-0.146
91	0.033	0.316	0.435	-0.278	-1.038	-0.150	0.252	-0.059	0.146
92	0.023	0.120	-0.320	-1.126	-0.841	0.011	0.200	0.256	0.007
93	0.314	0.458	-0.312	0.000	-0.392	-0.432	-0.185	-0.066	-0.457
94	-0.032	0.099	0.287	-1.500	-0.691	0.217	0.657	0.855	0.269
95	0.152	0.578	-0.083	-0.233	-0.469	-1.312	0.265	-0.132	-0.350
96	-0.430	0.821	1.370	-0.755	-1.148	0.463	-0.009	0.411	0.397
97	-0.354	0.557	-0.031	0.914	1.133	-1.034	-0.239	-0.946	-0.855
98	0.288	-0.359	0.138	1.120	1.219	0.583	-0.156	-0.339	0.470
99	-0.652	-0.271	0.343	1.249	1.706	-0.313	-0.418	-0.051	1.192
100	0.168	-0.175	-0.472	1.393	1.213	0.157	0.076	-0.745	0.217
101	0.170	0.316	0.366	1.053	1.055	-0.468	-0.036	-0.009	0.260
102	0.556	0.502	0.533	1.854	1.457	0.254	0.245	0.069	-0.171
103	0.218	-0.451	-0.876	1.072	2.128	-1.258	-0.545	-1.117	-0.550
104	-0.676	-0.354	-0.941	1.219	1.046	0.268	-1.048	-0.751	-0.834
105	-0.140	-0.626	-1.186	-1.028	-1.263	-0.057	-0.676	-1.061	-0.946
106	-0.155	-1.357	-0.059	-1.394	-1.066	-0.058	-1.139	-0.502	-0.624
107	0.229	0.406	-0.612	1.173	1.041	-1.156	-1.082	-0.217	-1.834

10

20

30

40

【 0 0 9 2 】

【表 7】

配列番号	C4 1	C4 2	C4 3	dc5 5	34x 10	nma 15	tdn 20	2de 24	2de 25	2de 26
1	-0.151	1.124	0.535	-0.126	0.000	0.562	0.167	0.141	0.486	-0.349
2	0.524	0.332	-0.532	-0.301	-0.203	0.009	-0.716	0.180	-0.549	0.380
3	-0.165	0.072	0.675	0.240	1.175	0.168	0.695	0.320	0.509	-0.558
4	-0.320	0.300	-0.432	-0.134	-0.464	0.933	0.373	-0.346	-0.222	0.280
5	0.380	0.181	-0.126	-0.050	0.024	-0.086	0.079	0.293	-0.044	0.171
6	0.052	-0.754	-0.246	-0.584	-0.941	-0.219	-0.161	0.163	-0.282	1.033
7	-0.003	0.038	0.109	0.335	0.453	0.715	0.647	0.729	0.423	0.686
8	-0.134	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.303	-0.725	0.000	0.181
9	0.000	0.000	0.000	0.119	0.000	-0.038	-0.028	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.343	0.000	0.212	0.000	0.000	-0.478
11	-0.313	0.000	-0.026	-0.557	0.000	0.660	-0.378	0.419	0.000	-0.333
12	-0.098	0.315	0.050	0.022	0.132	0.361	-0.111	0.000	-0.134	-0.320
13	0.969	-0.731	0.878	0.360	0.239	0.986	0.475	-0.149	0.415	0.655
14	0.595	0.143	0.280	0.086	0.278	-0.143	0.385	0.289	0.025	-0.023
15	-0.005	0.169	-0.427	-0.115	-0.276	0.519	0.160	-0.114	-0.050	0.076
16	0.281	0.676	-0.187	0.301	0.522	0.869	-0.033	0.381	0.200	0.069
17	0.599	0.035	0.184	-0.254	0.423	-0.435	-0.373	0.193	-0.340	0.298
18	0.033	0.415	-0.063	-0.124	0.693	0.718	0.644	0.026	0.768	0.023
19	0.371	1.380	-0.060	0.776	0.000	0.000	1.300	0.392	0.000	0.156
20	0.297	0.000	0.499	-0.048	0.444	-0.029	1.230	0.511	0.000	0.000
21	0.000	0.354	0.000	-0.401	-0.382	0.000	-1.275	0.000	0.000	0.395
22	0.000	-0.171	0.000	0.330	0.068	0.000	0.000	0.000	0.000	0.926
23	0.084	0.755	-0.105	0.389	0.493	0.622	0.050	-0.112	0.516	-0.022
24	0.000	0.106	0.098	0.171	-0.087	0.483	1.449	0.000	0.554	0.976
25	1.624	0.441	0.810	-0.627	0.561	1.181	0.431	0.854	0.481	0.226
26	-0.700	0.649	0.583	-0.641	0.056	0.556	-1.008	0.020	-0.177	-0.321
27	-0.028	-0.150	0.252	-0.206	0.477	0.362	-0.142	0.182	0.065	0.129
28	-0.200	0.325	-0.668	-0.034	-0.034	0.434	0.252	-0.149	0.344	-0.076
29	-0.083	-0.142	-0.242	-0.024	0.567	0.423	-0.140	-0.060	-0.051	-0.869
30	-0.027	0.555	0.198	0.134	-0.201	-0.080	0.183	0.317	0.135	-0.238
31	0.429	0.384	0.035	0.096	-0.345	0.050	-0.068	0.080	0.166	0.288
32	-0.237	-0.262	0.535	-0.064	-0.421	-0.412	0.323	0.133	0.378	-0.311
33	0.000	-0.550	0.000	-0.316	-0.842	0.000	0.097	0.000	-0.353	-1.395
34	0.000	0.000	0.000	0.382	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.081
35	-0.470	0.528	0.243	-0.442	0.131	0.225	0.034	0.330	0.273	-0.388
36	0.243	0.385	0.011	0.010	-0.511	0.613	0.509	-0.472	0.244	-0.078
37	-0.383	0.000	0.493	-0.253	0.000	-0.106	0.000	0.000	-0.169	0.000
38	0.822	0.000	1.311	0.670	0.000	-0.452	0.706	0.000	0.766	-0.011
39	0.012	0.270	0.280	0.725	0.824	0.181	0.255	0.271	0.452	-0.817
40	-0.738	0.544	-0.089	0.409	0.527	-0.145	0.096	0.008	0.782	-1.103
41	0.566	-0.986	-0.636	-1.244	-0.643	-1.276	-0.859	0.003	-1.424	0.002
42	0.105	-0.025	-0.155	0.036	0.473	0.540	-0.066	0.139	0.223	0.019
43	-0.400	0.450	-0.165	-0.743	0.678	0.545	0.387	-0.583	0.882	-0.581
44	-0.025	0.039	0.130	-0.121	0.055	0.025	0.276	-0.099	-0.220	0.308
45	0.204	-0.023	-0.341	-0.080	-0.327	-0.266	-0.507	-0.490	-0.272	0.063
46	1.076	0.000	-0.223	0.000	-0.490	0.000	0.000	0.003	0.000	-0.044
47	0.582	0.037	0.494	0.029	0.099	0.835	0.449	-0.224	-0.148	0.061
48	0.102	-0.792	0.273	-0.531	-0.509	-0.127	-0.506	0.013	-0.094	0.524
49	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.121
50	-0.181	0.208	0.197	0.004	0.000	-0.346	0.252	-0.754	0.000	-0.424

10

20

30

【 0 0 9 3 】

【表 8】

配列番号	C4 1	C4 2	C4 3	dc5 5	34x 10	nma 15	tdn 20	2de 24	2de 25	2de 26
52	-0.203	-0.037	-0.014	0.008	0.115	0.109	-0.026	-0.133	0.417	-0.254
53	-0.045	-0.159	-0.454	-0.133	-0.164	0.015	0.091	-0.285	0.216	-0.278
54	-0.394	0.335	-0.050	-0.207	-0.104	0.100	-0.365	0.029	-0.399	-0.517
55	0.045	-0.070	0.075	0.025	-0.201	0.458	-0.020	-0.035	0.180	-0.406
56	-0.125	-0.453	-0.055	-0.490	0.024	0.166	0.408	-0.163	0.408	-0.147
57	0.047	0.383	0.126	-0.059	0.114	-0.115	0.227	-0.005	0.475	-0.236
58	-0.443	0.000	-0.755	-0.376	0.000	0.000	0.000	-0.121	0.000	0.094
59	0.148	-0.235	-0.153	-0.171	0.000	0.630	0.301	-0.543	0.604	-0.340
60	0.000	0.472	-0.047	-0.289	-0.043	0.449	-0.295	0.762	-0.626	-0.451
61	-0.160	0.786	0.482	-0.545	0.079	0.365	-0.952	-0.145	0.295	-0.515
62	-0.186	0.172	0.233	-0.143	-0.303	0.037	-0.679	0.232	-0.233	-0.341
63	-0.494	-0.042	0.108	-0.393	-0.181	-0.719	-0.800	0.019	-0.193	-0.789
64	-0.069	-0.631	-0.107	-0.525	-0.506	-0.235	-0.518	-0.213	-0.550	-0.367
65	-0.964	0.039	-0.329	-0.384	0.203	-0.920	-0.542	-0.687	0.107	-0.114
66	-0.840	-0.988	-0.236	0.713	-1.094	0.033	0.348	0.372	0.682	-0.372
67	-0.157	-0.474	-0.129	0.671	-0.615	-0.478	-0.070	-0.368	0.086	0.116
68	0.141	0.049	-0.232	0.058	0.010	0.207	0.246	0.121	-0.005	0.311
69	0.123	0.494	-0.090	0.096	0.522	0.352	0.212	0.020	-0.062	0.208
70	-0.124	0.034	-0.227	0.212	0.221	-0.054	0.321	-0.324	0.294	-0.239
71	-0.158	-0.268	-0.113	-0.097	-0.115	-0.293	-0.134	-0.009	-0.157	-0.040
72	0.074	-0.223	0.041	0.266	0.552	0.111	0.285	0.181	-0.024	-0.164
73	-0.189	0.531	-0.053	-0.081	0.623	0.143	0.242	-0.125	0.045	-0.310
74	-0.220	0.325	-0.321	0.143	0.133	0.208	0.327	-0.471	0.224	-0.288
75	0.233	-0.098	0.082	0.191	-0.290	-0.068	-0.230	-0.088	0.025	-0.197
76	-0.086	0.357	-0.075	-0.220	-0.145	-0.032	-0.102	-0.263	-0.082	-0.004
77	-0.623	0.276	-0.109	-0.030	0.185	-0.024	0.047	-0.416	0.109	-0.476
78	-0.507	0.126	-0.493	0.467	-0.018	-0.181	0.327	-0.072	0.406	0.067
79	0.376	-0.003	-0.234	-0.030	0.198	0.185	0.375	-0.095	-0.133	0.116
80	-0.721	0.193	-0.352	0.034	0.270	0.070	0.126	-0.102	-0.003	-0.081
81	-0.071	0.000	0.255	-0.021	0.029	0.000	-0.117	-0.153	-0.089	-0.578
82	0.014	-1.153	-0.211	-0.241	-0.865	-0.554	0.113	-0.761	-0.172	-0.559
83	0.510	-0.033	-0.184	0.395	-0.868	1.701	0.998	-0.195	0.496	0.692
84	0.172	0.177	-0.049	-0.354	0.919	0.130	-0.296	0.681	-0.426	0.049
85	0.541	0.419	-0.007	0.511	0.505	1.184	-0.041	-0.394	0.337	0.620
86	0.530	0.137	0.024	-0.238	0.298	0.110	-0.078	-0.157	-0.167	0.294
87	0.239	0.367	0.157	-0.578	0.282	-0.249	-0.047	-0.086	-0.054	0.336
88	-0.185	0.135	-0.120	-0.148	-0.013	-0.343	0.006	-0.158	0.011	-0.476
89	-0.399	-0.062	-0.270	-0.189	0.288	0.440	-0.162	-0.374	0.037	-0.197
90	-0.025	0.042	-0.068	-0.353	0.028	0.299	-0.231	-0.251	0.069	-0.209
91	0.114	-0.527	0.199	-0.192	0.147	-0.524	0.001	-0.027	-0.170	-0.266
92	-0.054	0.045	0.251	-0.318	-0.387	-0.061	-0.769	-0.332	0.590	-0.226
93	-0.327	0.722	-0.153	-0.329	-0.333	0.084	0.247	0.182	1.137	-0.192
94	-0.518	0.120	0.057	-0.032	-0.399	0.279	-0.145	-0.414	0.511	-0.314
95	0.211	0.000	0.244	1.452	0.000	0.000	0.000	1.011	0.000	-0.231
96	-0.893	-0.291	0.036	-0.846	-0.019	0.426	-0.496	-0.279	-1.165	-0.167
97	0.240	0.000	0.978	0.905	1.284	2.148	0.658	1.425	0.776	0.104
98	-0.320	0.519	-0.304	-0.425	-0.138	0.625	0.563	-0.567	-0.295	0.485
99	0.061	0.515	0.025	0.005	0.179	0.919	0.615	0.416	0.435	0.098
100	0.090	0.284	0.334	0.443	0.962	0.672	0.137	0.554	0.101	-0.050
101	0.165	-0.040	0.112	0.195	0.430	1.941	0.672	0.056	0.210	0.154
102	0.263	0.327	0.463	0.363	0.646	2.201	0.121	-0.043	-0.050	0.180
103	0.436	0.718	0.658	0.994	1.378	0.320	0.482	0.760	0.687	-0.141
104	-0.250	-0.293	-0.056	-0.026	0.443	-0.268	-0.224	0.912	0.003	-0.424
105	0.257	-0.397	-0.372	-0.313	-0.697	-0.641	-1.057	-0.274	-0.262	-0.312
106	-0.220	0.203	0.254	-0.093	0.164	-0.600	0.352	-0.040	-0.326	-0.198
107	0.383	-0.136	1.109	-0.661	0.219	-0.854	-0.217	0.000	-0.727	-0.118

10

20

30

【 0 0 9 4 】

【表 9】

配列番号	C7_2	24b_5	35x_10	nda_15	13d_20	nhd_25	C8_1	C8_2	C8_3	bcp_4	bcp_5	bcp_6	dha_14	dha_15	dha_16
1	-0.440	0.274	-0.032	-0.021	-0.757	-0.386	-0.579	0.160	0.233	0.134	-0.445	-0.311	0.243	0.850	0.069
2	-0.249	-0.510	0.131	-0.345	-0.009	-0.366	-0.419	0.143	-0.284	-0.326	-0.676	0.470	-0.012	-0.362	0.572
3	-0.354	-0.426	-0.356	0.334	-0.103	-0.172	0.252	0.133	0.122	0.173	0.000	0.000	0.316	0.007	-0.130
4	-0.174	-0.341	-0.407	-0.071	-0.242	-0.368	0.038	0.013	0.699	-0.026	-0.454	0.296	0.465	-0.229	0.770
5	-0.003	-0.074	0.038	-0.020	-0.067	-0.060	0.060	0.122	0.183	0.138	0.240	0.256	0.145	0.269	0.349
6	0.174	0.019	-0.056	0.065	0.531	-0.309	-0.194	0.321	0.160	-0.057	-0.633	-0.359	0.200	0.208	0.054
7	-0.278	0.478	-0.053	0.206	-0.015	-0.713	0.067	0.010	0.890	0.287	0.805	0.276	-0.036	1.385	0.239
8	0.095	-0.204	-0.391	-0.180	0.020	-0.666	0.000	-0.285	-0.483	0.404	0.000	-0.530	-0.618	-0.312	-0.218
9	-0.647	-0.071	-0.055	0.282	0.376	-0.186	0.000	-0.357	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.253	-1.094	0.000
10	-0.497	-0.202	-0.028	-0.426	-0.202	-0.813	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.682	0.000	0.000	0.000
11	-0.594	-0.353	-0.471	-0.565	-0.525	0.096	-0.809	0.499	-0.227	0.000	0.000	0.000	-0.342	0.000	-0.080
12	0.355	0.162	-0.078	0.104	0.244	0.187	0.001	-0.279	0.066	0.050	-0.300	0.068	0.081	-0.255	-0.179
13	-0.232	0.087	0.330	-0.096	0.004	-0.317	0.493	-0.073	0.006	0.765	1.052	1.509	1.771	1.231	1.039
14	-0.589	-0.230	-0.363	-0.212	-0.305	-0.248	0.462	-0.129	0.211	0.220	0.488	0.974	0.873	0.915	0.613
15	0.083	-0.230	-0.055	0.172	-0.225	-0.229	-0.219	-0.463	0.163	-0.021	0.245	0.460	0.678	-0.056	0.195
16	-0.546	-0.220	-0.382	0.075	-0.155	0.017	-0.283	-0.104	-0.276	-0.264	0.602	0.346	0.174	0.302	0.473
17	-0.420	0.056	-0.685	-0.082	-0.569	0.213	-0.172	0.171	0.175	0.035	0.627	1.209	1.292	0.671	1.291
18	-0.269	-0.231	-0.099	-0.097	-0.268	-0.653	-0.473	-0.027	-0.095	0.568	0.480	0.673	0.540	0.721	0.384
19	-0.343	-0.357	-0.415	-0.329	0.054	-0.572	-0.520	0.137	0.371	0.281	0.876	0.901	0.169	1.448	0.225
20	-0.019	-0.270	0.000	-0.135	-1.293	0.068	0.906	-0.193	-0.546	0.000	0.000	-0.169	0.000	0.194	0.267
21	0.441	-0.581	0.278	-0.338	-0.132	-0.316	0.000	-0.115	0.156	-0.412	0.000	0.000	-0.058	0.000	0.000
22	0.391	0.082	0.566	-0.062	0.004	-0.246	0.000	-0.041	0.241	0.475	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
23	0.134	-0.155	0.094	-0.292	0.047	0.006	0.412	-0.523	-0.488	0.145	0.023	-0.134	0.139	-0.539	-0.215
24	-0.504	0.249	-0.260	1.337	-0.399	-0.027	0.000	-0.115	-0.045	0.000	0.044	0.000	0.000	0.285	0.801
25	-0.406	-0.361	-0.685	-0.944	-1.192	-0.495	0.000	-0.099	0.011	0.441	0.069	1.014	1.474	-0.011	0.291
26	-0.523	-0.199	-0.844	-1.584	-1.471	-0.979	-0.383	0.000	0.388	0.009	0.310	0.780	0.472	0.753	-0.054
27	0.083	-0.025	0.075	0.101	-0.116	0.041	-0.261	-0.055	-0.001	0.198	-0.308	-0.392	0.052	-0.607	0.239
28	0.092	0.250	0.454	0.373	0.246	0.573	-0.498	0.136	0.163	0.087	-0.475	0.041	-0.319	0.169	-0.081
29	0.090	0.568	0.157	0.029	-0.355	0.355	-0.515	-0.082	-0.226	-0.252	0.000	0.000	-0.445	-0.122	-0.300
30	-0.292	-0.550	-0.255	0.191	-0.182	0.383	-0.583	-0.007	0.007	0.140	-0.097	0.028	0.509	-0.282	0.370
31	-0.022	0.327	0.205	0.532	0.036	0.629	-0.028	-0.492	-0.333	0.064	0.259	0.509	0.871	-0.265	-0.175
32	0.010	-0.166	0.268	0.053	-0.405	-0.325	-0.394	-0.470	-0.211	-0.199	0.196	0.000	-0.317	-0.283	0.000
33	-0.083	-0.294	-0.484	0.430	-0.054	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
34	0.540	-0.021	0.442	-0.310	-0.477	0.062	0.000	-0.249	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.095	0.000
35	0.030	0.172	0.421	0.048	-0.679	0.488	0.156	-0.105	-0.166	0.124	0.190	0.000	-0.812	-0.379	-0.536
36	0.308	0.908	0.256	-0.161	0.147	-0.057	-0.135	-0.459	-0.884	0.487	-0.517	0.477	-0.028	-0.607	-0.280
37	-0.361	0.030	-0.826	-0.316	-0.503	-0.402	0.000	-0.610	-0.354	-1.390	0.000	0.000	0.000	0.388	-0.942
38	-0.800	0.000	0.000	0.000	-0.155	0.000	-0.135	-0.158	0.253	0.811	0.000	0.000	0.000	0.016	0.376
39	-0.632	-0.691	0.257	-0.376	-0.620	-0.861	0.700	-0.751	-0.484	0.168	0.290	0.955	0.669	0.293	0.620
40	0.291	0.116	1.008	1.045	-0.155	0.582	-0.505	-0.548	-0.679	-0.421	0.126	-0.045	-0.032	-1.058	-0.361
41	0.034	-0.767	-0.497	-0.581	-0.362	0.164	-0.218	0.313	-0.141	0.410	-0.285	-0.864	-0.395	-0.802	-1.099
42	0.475	0.493	0.034	-0.050	0.400	-0.380	-0.179	0.157	-0.045	0.324	-0.213	0.750	0.649	-0.067	-0.099
43	-0.141	0.089	0.437	-0.311	-0.729	-0.156	-0.351	0.168	-0.206	0.046	-0.291	-0.349	0.139	0.192	-0.469
44	0.035	0.269	0.145	-0.140	0.212	-0.257	0.261	0.240	0.236	0.282	-0.145	0.189	0.168	0.430	0.137
45	0.262	0.076	-0.285	-0.015	-0.217	-0.126	0.211	0.280	0.131	-0.438	-0.149	0.072	-0.063	0.224	-0.148
46	-0.056	0.037	0.321	0.123	0.253	-0.149	0.000	0.371	0.019	0.000	0.000	0.700	0.000	0.125	0.504
47	0.068	-0.105	-0.136	-0.033	-0.220	-0.418	0.462	-0.134	-0.177	0.513	-0.238	0.458	0.600	0.201	0.491
48	-0.150	-0.061	0.129	0.429	0.474	0.439	0.227	0.765	0.088	-0.070	0.201	0.236	0.350	0.767	0.622
49	0.509	0.229	0.148	0.285	-0.946	-0.117	0.000	-0.207	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
50	-0.843	0.291	0.369	-0.635	-0.399	-0.139	0.489	0.638	-0.173	0.417	0.814	-0.303	-0.326	0.303	-0.108

10

20

30

40

50

【0095】

【表 10】

配列番号	C7_2	24b_5	35x_10	nda_15	13d_20	nhd_25	C8_1	C8_2	C8_3	bcp_4	bcp_5	bcp_6	dha_14	dha_15	dha_16
52	0.072	0.322	-0.004	0.129	-0.062	-0.013	-0.237	-0.253	0.041	-0.027	-0.375	-0.097	0.041	-0.136	0.043
53	0.246	0.335	0.017	0.411	0.161	0.122	-0.111	-0.089	-0.089	-0.345	0.127	0.043	0.087	0.116	-0.013
54	-0.188	-0.267	-0.034	-0.144	0.186	0.139	-0.142	-0.183	-0.279	0.035	-0.312	-0.305	-0.162	-0.346	-0.433
55	-0.222	-0.070	0.344	-0.195	-0.057	-0.280	-0.152	-0.302	-0.417	0.215	0.253	0.012	0.399	-0.178	-0.261
56	-0.070	-0.497	0.327	0.148	0.191	0.287	0.242	-0.095	-0.018	0.025	-0.082	0.359	0.022	-0.169	-0.054
57	0.078	0.137	0.219	-0.202	0.636	-0.236	-0.262	-0.221	-0.262	0.024	0.422	0.029	0.481	-0.188	-0.270
58	-0.308	-0.040	0.144	-0.166	-0.136	0.152	0.971	-0.001	-0.319	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.214	0.135
59	0.234	0.012	0.074	0.079	0.267	-0.017	0.148	-0.007	-0.194	0.562	0.719	-0.149	-0.274	-0.373	0.376
60	-0.022	-0.237	0.089	0.036	-0.509	-0.628	-0.361	-0.870	0.038	-0.888	-0.364	-0.515	-0.097	-0.006	-0.134
61	-0.441	-0.360	-0.362	-0.188	-0.599	0.303	-0.084	0.354	0.106	-0.110	0.172	-0.116	-0.434	0.259	-0.546
62	-0.315	-0.469	-0.784	-0.447	-0.678	-0.013	0.218	0.264	-0.182	0.034	0.317	-0.203	-0.251	-0.214	-0.671
63	0.315	-0.093	0.219	-0.065	-0.300	0.143	-0.237	-0.328	-0.436	-0.329	0.350	0.175	-0.086	-0.819	-0.366
64	0.383	-0.388	0.295	0.094	-0.431	0.459	-0.582	-0.221	-0.117	-0.491	-0.982	-0.703	-0.576	-1.045	-0.583
65	0.438	-0.278	-0.008	0.386	0.102	-0.092	0.060	0.167	-0.054	0.141	-0.971	-0.785	-0.525	-0.734	0.061
66	0.490	0.859	0.570	0.590	0.782	0.161	-0.531	0.605	0.175	-0.579	-0.919	-1.250	-1.114	-0.625	-0.512
67	1.001	0.287	0.494	0.318	0.745	0.072	0.120	-1.442	-1.370	-1.019	-0.584	-0.475	-0.991	-1.055	-1.139
68	-0.286	-0.131	-0.093	0.111	-0.208	0.004	0.174	0.100	-0.035	0.369	0.381	0.201	0.266	0.269	0.660
69	-0.058	0.235	-0.284	-0.164	-0.306	-0.406	-0.315	0.382	0.331	0.363	0.340	0.456	0.599	0.286	0.739
70	0.124	0.434	0.258	0.111	0.084	0.176	-0.304	-0.466	-0.244	-0.106	-0.062	-0.436	-0.350	-0.285	-0.161
71	0.334	0.058	0.203	-0.174	0.049	0.139	-0.110	-0.028	0.218	0.098	-0.159	-0.153	-0.261	-0.117	-0.425
72	0.151	0.377	-0.196	0.158	0.253	0.201	-0.009	-0.158	-0.126	-0.052	-0.428	-0.564	0.249	0.374	-0.022
73	-0.033	0.206	-0.252	-0.149	0.108	0.091	-0.101</								

【実施例 2】

【0096】

<クラスタ分析>

DNAマイクロアレイで取得した遺伝子発現データの分析手法として、例えばクラスタ分析が挙げられる。クラスタ分析とは、遺伝子発現変化パターンの類似した遺伝子同士をグルーピングする統計的手法である。データ間の類似度（例えばユークリッド距離など）を定義し、その類似度を用いることにより遺伝子発現パターンが類似した、すなわち、遺伝子発現に対して類似した影響を持つ化学物質同士がグループ化される。

【0097】

配列番号1～107に示される塩基配列を有する遺伝子の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行った。階層的クラスタ分析は解析用ソフトウェア「Expression View Pro」（マイクロダイアグノスティック社製）を用いて行った。また、階層的クラスタ分析は「cluster」や「treeview」などのソフトウェアを用いても行うことができる。その結果、メタクリルアミドを投与したラットの2個体（mca_4およびmca_5）とヒドラジン-水和物を投与したラットの2個体（hnh_19およびhnh_20）で一つのクラスタを形成し、他のサンプルと区別することができた（図1）。なお、図中、「C1」は「第1回目の実験に使用した注射用水」を、「2bo」は「2-ブタノンオキシム」を、「mxa」は「m-キシレンジアミン」を、「3cp」は「3-シアノピリジン」を、「2ae」は「2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール」を、「thf」は「テトラヒドロフルフリルアルコール」を、「C2」は「第2回目の実験に使用した注射用水」を、「mca」は「メタクリルアミド」を、「suf」は「スルホラン」を、「2ip」は「2-イソプロポキシエタノール」を、「hnh」は「ヒドラジン-水和物」を、「4em」は「4-エチルモルホリン」を、「C4」は「第4回目の実験に使用した注射用水」を、「dcb」は「o-ジクロロベンゼン」を、「34x」は「3,4-キシリジン」を、「nma」は「N-メチルアニリン」を、「tdn」は「トリレンジイソシアナート」を、「2de」は「2-(ジブチルアミノ)エタノール」を、「C7」は「第7回の実験に使用したオリブ油」を、「24b」は「2,4-ジ-tert-ブチルフェノール」を、「35x」は「3,5-キシリジン」を、「nda」は「N,N-ジメチルベンジルアミン」を、「13d」は「1,3-ジプロモプロパン」を、「nhd」は「n-ヘキサデカン」を、「C8」は「ごま油」を、「bcp」は「1-プロモ-3-クロロプロパン」を、「dha」は「ジシクロヘキシルアミン」を表す。また、各化学物質の略号に付随している数字はラットの個体の別を表している。黒丸と白丸は、配列番号1～107に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサンプルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。

【0098】

この結果は、配列番号1～107に示される塩基配列を有する遺伝子セットの遺伝子発現変動パターンを比較することにより、対照群と小脳に影響を与える特定の化学物質を判別することが可能であることを示唆している。

【0099】

なお、動物実験においては、個体差が生じることが珍しくなく国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」の報告書においても個体差が生じている例が多い。したがって、本実施例で示す結果も個体差が生じているものと考えられる。

【実施例 3】

【0100】

メタクリルアミド投与群と対照群との間のt検定を行い、P値が0.05以下、かつ、メタクリルアミド投与群の平均値と対照群の平均値の差が0.75以上という条件で抽出した遺伝子群（配列番号1～41に示される塩基配列を有する41遺伝子）の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行った。その結果、メタクリルアミドを投与したラットの2個体（mca_4およびmca_5）とヒドラジン-水和物を投与したラットの2個体（hnh_19およびhnh_20）で一つのクラスタを形成し、他のサンプルと区別することができた（図2）。図2の中で記されている略号は図1と同様の意味を表している。また、黒丸と白丸は、配列番号1～41に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサン

ブルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。

【0101】

該遺伝子セットがメタクリルアミド投与群のみを考慮して抽出したものであるにもかかわらず、ヒドラジン-水和物投与群の個体も同じクラスタに含まれたことは、ヒドラジン-水和物をラットに投与した場合において、小脳における遺伝子発現に関してメタクリルアミドと類似した影響を与えることを意味している。また、この結果は、配列番号1~41に示される塩基配列を有する遺伝子セットの遺伝子発現変動パターンを比較することにより、対照群と小脳に影響を与える特定の化学物質を判別することが可能であることを示唆している。

【実施例4】

【0102】

ヒドラジン-水和物投与群と対照群との間のt検定を行い、P値が0.05以下、かつ、ヒドラジン-水和物投与群の平均値と対照群の平均値の差が0.75以上という条件で抽出した遺伝子群（配列番号1~11、42~67に示される塩基配列を有する37遺伝子）の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行った。その結果、ヒドラジン-水和物を投与したラットの2個体（hmh_19およびhmh_20）とメタクリルアミドを投与したラットの2個体（mca_4およびmca_5）で一つのクラスタを形成し、他のサンプルと区別することができた（図3）。図3の中で記されている略号は図1と同様の意味を表している。また、黒丸と白丸は、配列番号1~11、42~67に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサンプルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。

【0103】

該遺伝子セットがヒドラジン-水和物投与群のみを考慮して抽出したものであるにもかかわらず、メタクリルアミド投与群の個体も同じクラスタに含まれたことは、ヒドラジン-水和物をラットに投与した場合において、小脳における遺伝子発現に関してメタクリルアミドと類似した影響を与えることを意味している。

【実施例5】

【0104】

実施例3および4で示した遺伝子群を集めて統合したところ、67遺伝子（配列番号1~67）存在した。これらの遺伝子群の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行ったところ、ヒドラジン-水和物を投与したラットの2個体（hmh_19およびhmh_20）とメタクリルアミドを投与したラットの2個体（mca_4およびmca_5）で一つのクラスタを形成し、他のサンプルと区別することができた（図4）。図2の中で記されている略号は図1と同様の意味を表している。また、黒丸と白丸は、配列番号1~67に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサンプルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。

【実施例6】

【0105】

第2回目の実験の対照群（「C2」で表す。）の3個体のデータを用いて標準偏差を算出し、標準偏差が0.5以上の遺伝子を削除した。次に、C2群とメタクリルアミド投与群のデータの中から2以上のサンプルで値が1以上または-1以下の遺伝子を抽出した。次に、メタクリルアミドを投与したラットの2個体（mca_4およびmca_5）のデータで値が-1以上、かつ1以下の遺伝子を削除した。さらに、メタクリルアミドを投与したラットの2個体（mca_4およびmca_5）のデータを比較して一方が正の値を他方が負の値を示している遺伝子を削除した。このようにして抽出した遺伝子群は34遺伝子であった（配列番号1~3、12、68~97）。

【0106】

これらの遺伝子群の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行ったところ、メタクリルアミドを投与したラットの2個体（mca_4およびmca_5）とヒドラジン-水和物を投与したラットの2個体（hmh_19およびhmh_20）で一つのクラスタを形成し、他のサン

10

20

30

40

50

ブルと区別することができた(図5)。図5の中で記されている略号は図1と同様の意味を表している。また、黒丸と白丸は、配列番号1~3、12、68~97に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサンプルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。

【0107】

該遺伝子セットがメタクリルアミド投与群のみを考慮して抽出したものであるにもかかわらず、ヒドラジン-水和物投与群の個体も同じクラスタに含まれたことは、ヒドラジン-水和物をラットに投与した場合において、小脳における遺伝子発現に関してメタクリルアミドと類似した影響を与えることを意味している。また、この結果は、配列番号1~3、12、および68~97に示される塩基配列を有する遺伝子セットの遺伝子発現変動パターンを比較することにより、対照群と小脳に影響を与える特定の化学物質を判別することが可能であることを示唆している。

10

【実施例7】

【0108】

第2回目の実験の対照群(「C2」で表す。)の3個体のデータを用いて標準偏差を算出し、標準偏差が0.5以上の遺伝子を削除した。次に、C2群とヒドラジン-水和物投与群のデータの中から2以上のサンプルで値が1以上または-1以下の遺伝子を抽出した。次に、ヒドラジン-水和物を投与したラットの2個体(hmh_19およびhmh_20)のデータで値が-1以上、かつ1以下の遺伝子を削除した。さらに、ヒドラジン-水和物を投与したラットの2個体(hmh_19およびhmh_20)のデータを比較して一方が正の値を他方が負の値を示している遺伝子を削除した。このようにして抽出した遺伝子群は33遺伝子であった(配列番号1~4、13、42、43、68~83、98~107)。

20

【0109】

これらの遺伝子群の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行ったところ、ヒドラジン-水和物を投与したラットの2個体(hmh_19およびhmh_20)とメタクリルアミドを投与したラットの2個体(mca_4およびmca_5)で一つのクラスタを形成し、他のサンプルと区別することができた(図6)。図6の中で記されている略号は図1と同様の意味を表している。また、黒丸と白丸は、配列番号1~4、13、42、43、68~83、98~107に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサンプルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。

30

【0110】

該遺伝子セットがヒドラジン-水和物投与群のみを考慮して抽出したものであるにもかかわらず、メタクリルアミド投与群の個体も同じクラスタに含まれたことは、メタクリルアミドをラットに投与した場合において、小脳における遺伝子発現に関してヒドラジン-水和物と類似した影響を与えることを意味している。また、この結果は、配列番号1~4、12、13、42、43、68~83、98~107に示される塩基配列を有する遺伝子セットの遺伝子発現変動パターンを比較することにより、対照群と小脳に影響を与える特定の化学物質を判別することが可能であることを示唆している。

【実施例8】

【0111】

実施例6および7で示した遺伝子群を集めて統合したところ、48遺伝子(配列番号1~4、12、13、42、43、68~107)存在した。これらの遺伝子群の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行ったところ、ヒドラジン-水和物を投与したラットの2個体(hmh_19およびhmh_20)とメタクリルアミドを投与したラットの2個体(mca_4およびmca_5)で一つのクラスタを形成し、他のサンプルと区別することができた(図7)。図7の中で記されている略号は図1と同様の意味を表している。また、黒丸と白丸は、配列番号1~4、12、13、42、43、68~107に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサンプルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。

40

【実施例9】

50

【 0 1 1 2 】

実施例 6 および 7 で示した遺伝子群の中で両者に共通する遺伝子を抽出したところ、19 遺伝子（配列番号 1 ~ 3、6 8 ~ 8 3）存在した。これらの遺伝子群の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行ったところ、ヒドラジン-水和物を投与したラットの 2 個体（hmh_19 および hmh_20）とメタクリルアミドを投与したラットの 2 個体（mca_4 および mca_5）で一つのクラスタを形成し、他のサンプルと区別することができた（図 8）。図 8 の中で記されている略号は図 1 と同様の意味を表している。また、黒丸と白丸は、配列番号 1 ~ 3、6 8 ~ 8 3 に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサンプルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。

10

【 実施例 1 0 】

【 0 1 1 3 】

実施例 5 および 9 で示した遺伝子群の中で両者に共通する遺伝子を抽出したところ、8 遺伝子（配列番号 1 ~ 4、1 2、1 3、4 2、4 3）存在した。これらの遺伝子群の発現変動パターンに基づいて階層的クラスタ分析を行ったところ、ヒドラジン-水和物を投与したラットの 2 個体（hmh_19 および hmh_20）とメタクリルアミドを投与したラットの 2 個体（mca_4 および mca_5）で一つのクラスタを形成し、他のサンプルと区別することができた（図 9）。図 9 の中で記されている略号は図 1 と同様の意味を表している。また、黒丸と白丸は、配列番号 1 ~ 4、1 2、1 3、4 2、4 3 に示される塩基配列を有する遺伝子を特定する際に比較対象としたサンプルを表しており、黒丸が化学物質投与サンプルを、白丸が対照サンプルを表している。

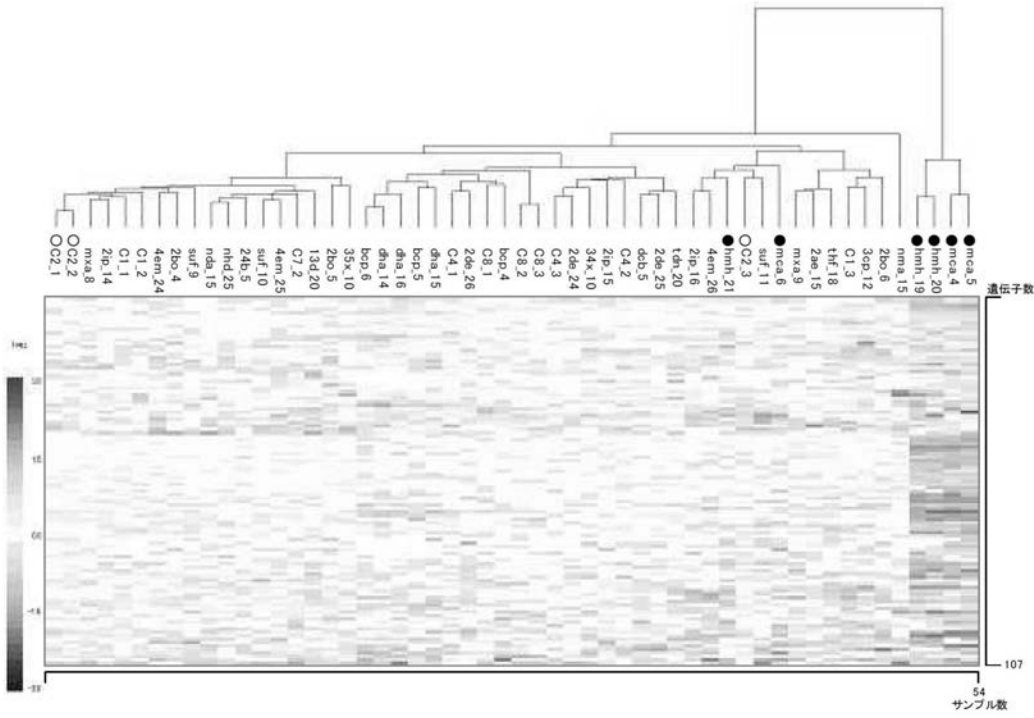
20

【 産業上の利用可能性 】

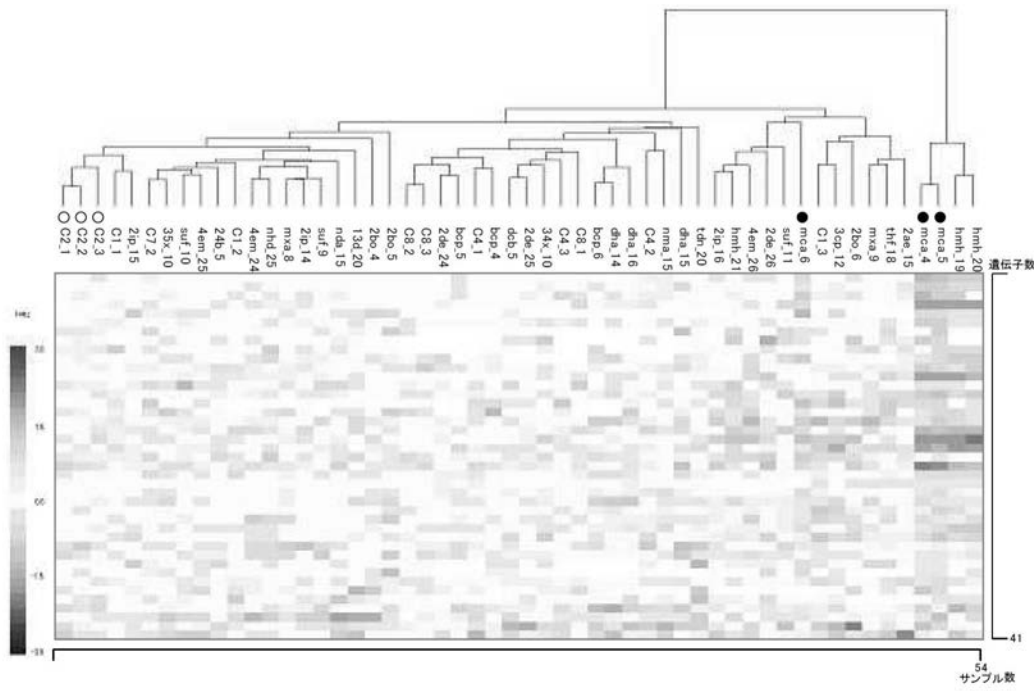
【 0 1 1 4 】

本発明の毒性判定遺伝子セットは、神経毒性のモニタリング、それらの診断および/またはそれらに対する種々の措置もしくは薬剤の有効性を判定することを助けることができる可能性がある。

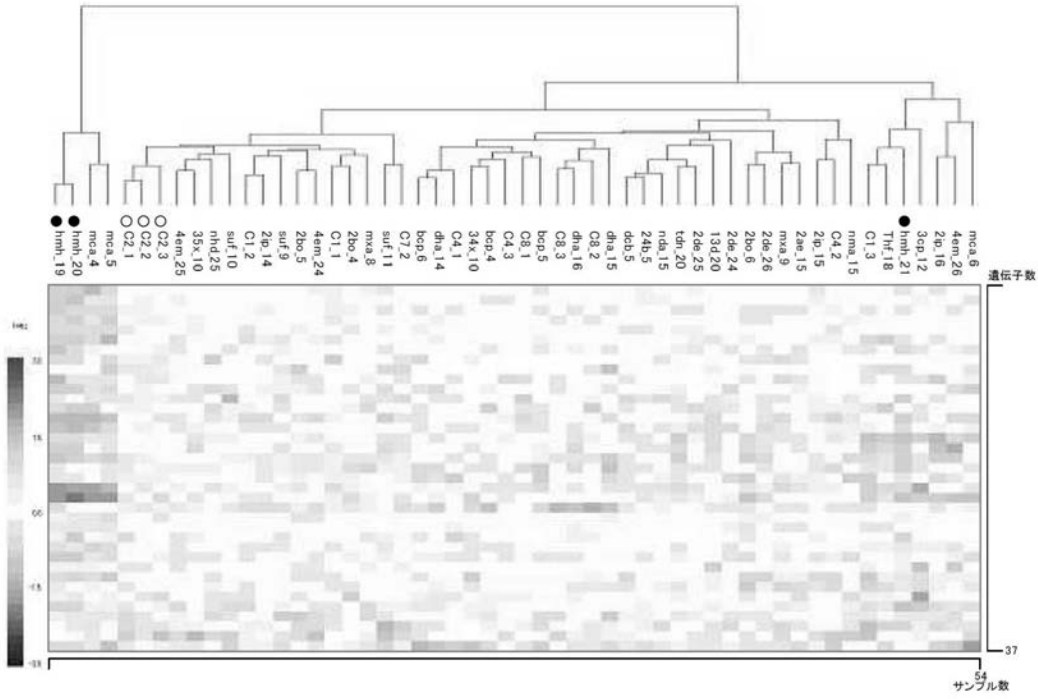
【 図 1 】



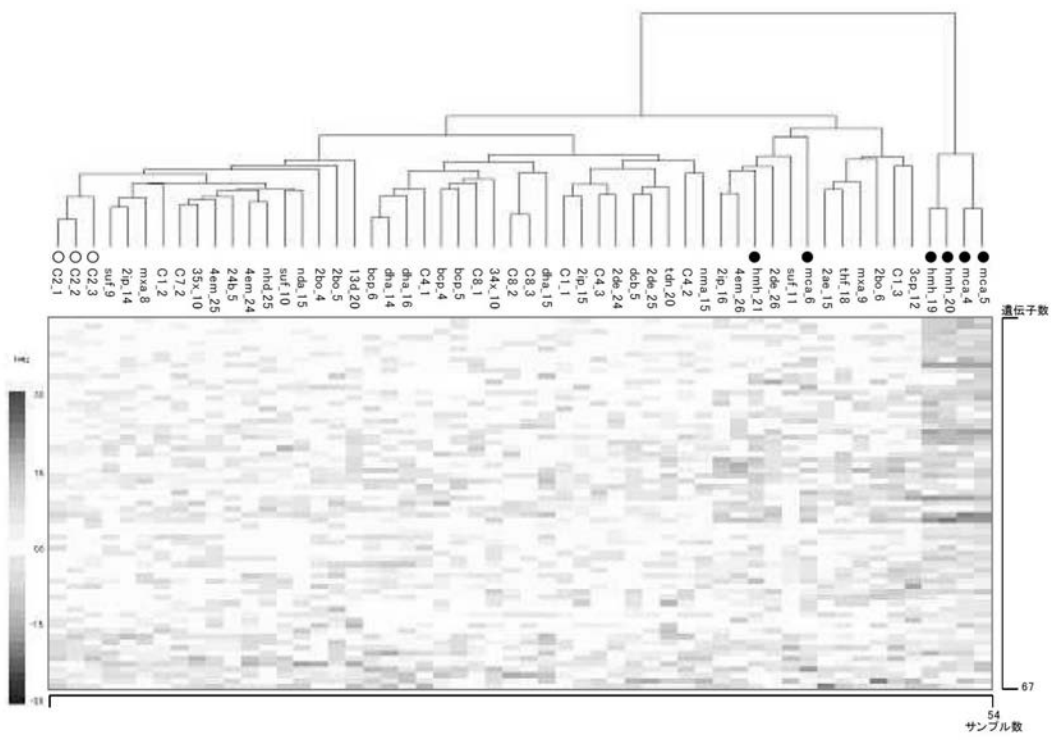
【 図 2 】



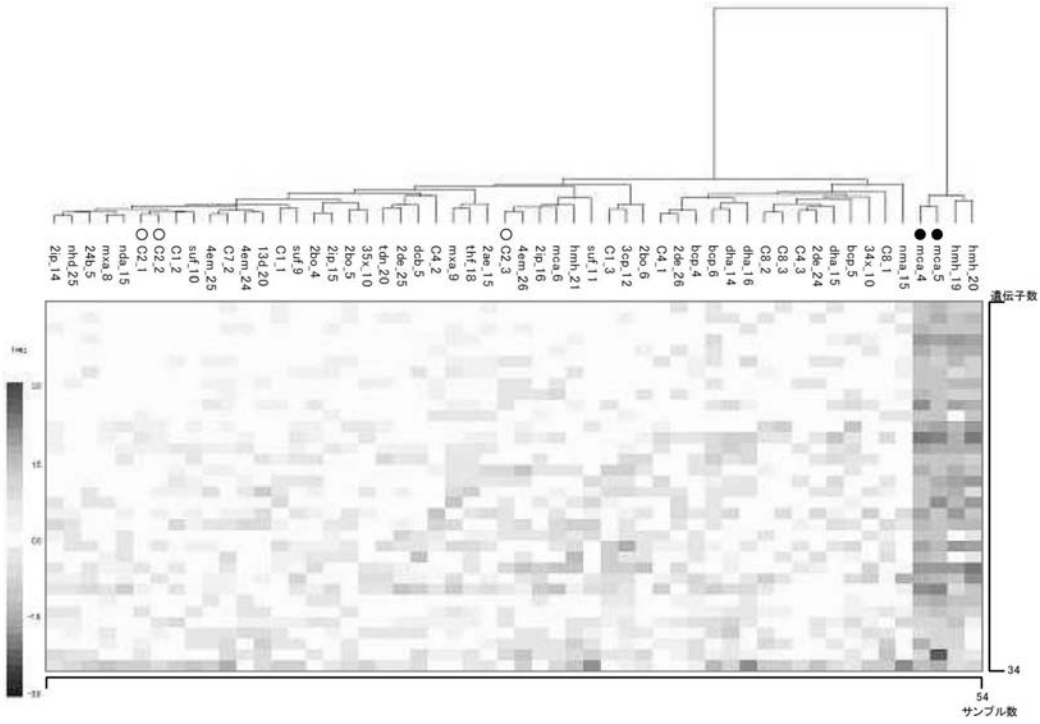
【 図 3 】



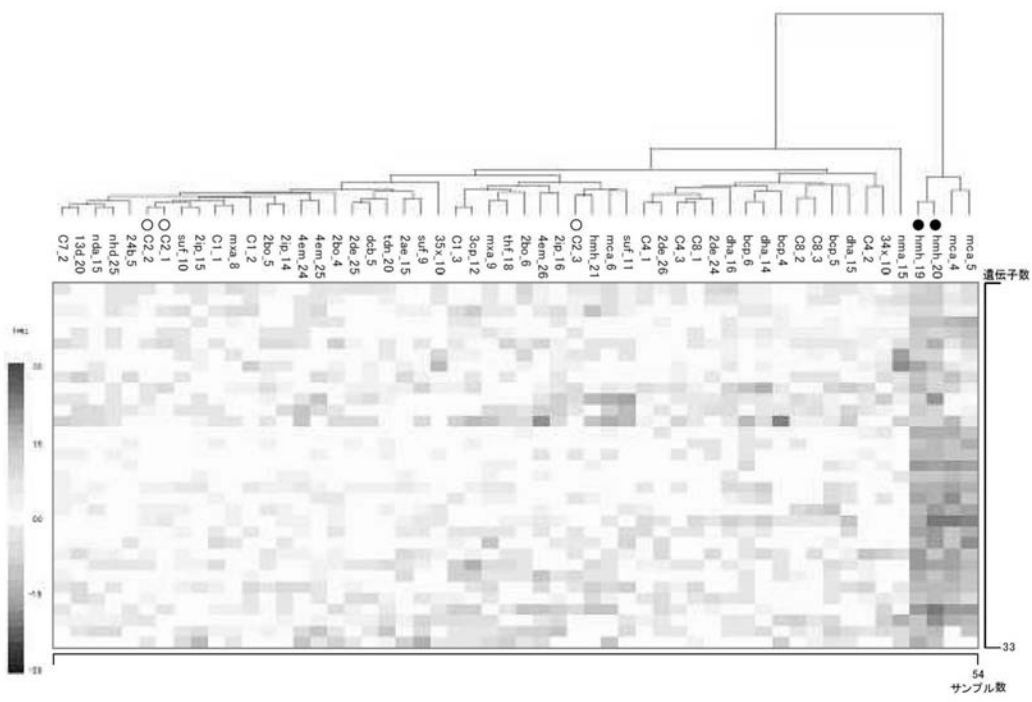
【 図 4 】



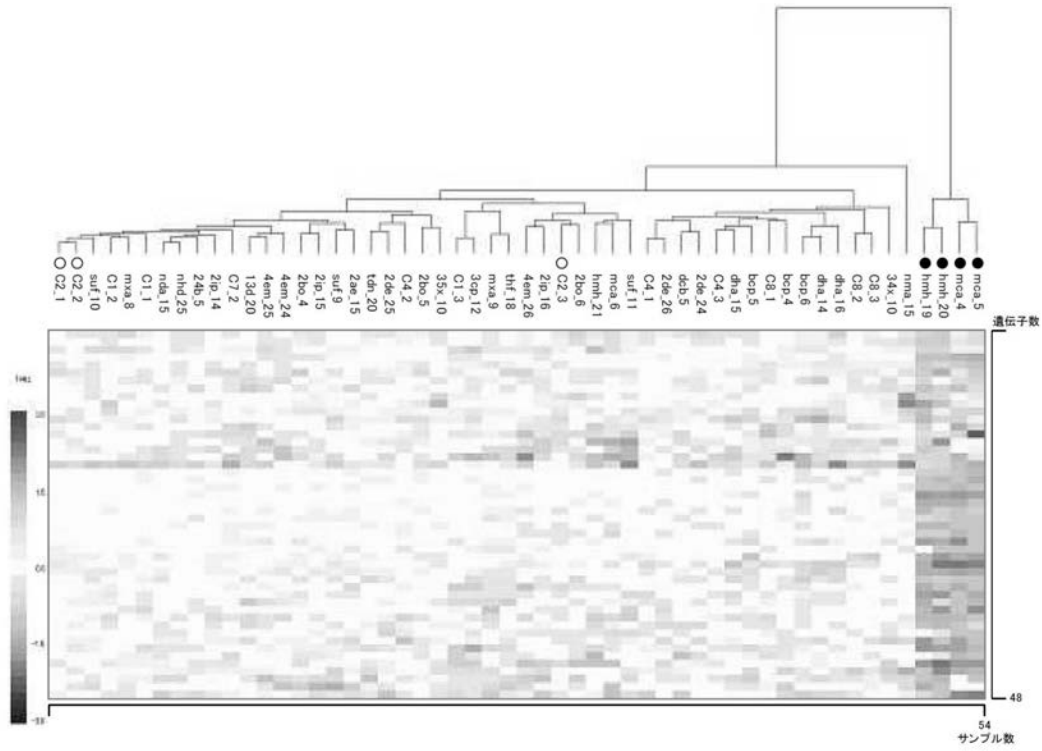
【 図 5 】



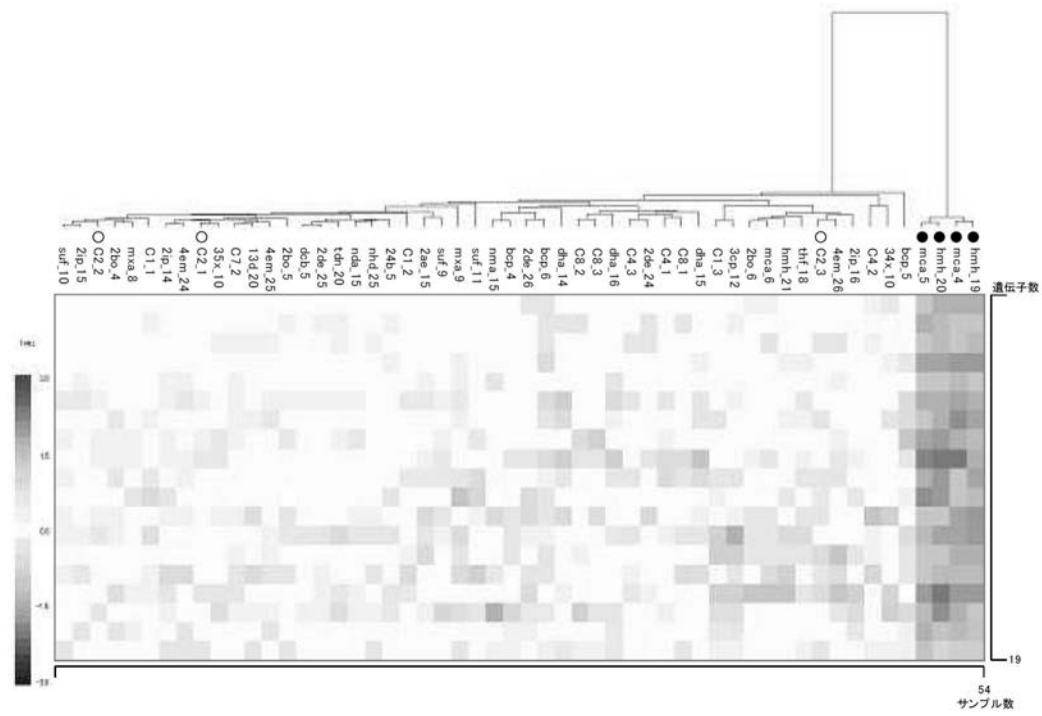
【 図 6 】



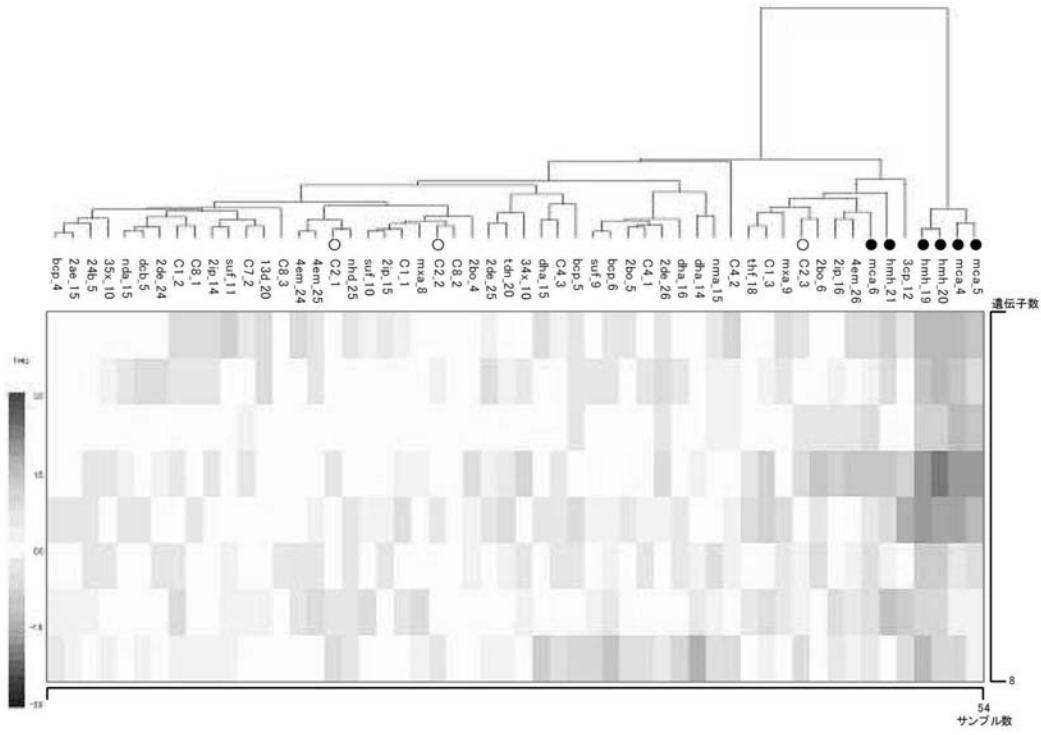
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

[201301338400001.app](#)

フロントページの続き

(72)発明者 加藤 史子

神奈川県横浜市鶴見区小野町75番地1号 株式会社メディクローム横浜研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 HA14

4B063 QA01 QQ42 QQ52 QS34

专利名称(译)	化学物质对生物体影响的评价方法		
公开(公告)号	JP2013013384A	公开(公告)日	2013-01-24
申请号	JP2011149990	申请日	2011-07-06
申请(专利权)人(译)	公司的Medig络		
[标]发明人	渡邊慎哉 今井順一 河村未佳 加藤史子		
发明人	渡邊 慎哉 今井 順一 河村 未佳 加藤 史子		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N37/00 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/09.Z C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6897.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QS34		
代理人(译)	田中彦 今井淳一		
其他公开文献	JP2013013384A5 JP5874876B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：解决神经毒性难以准确理解实验动物的感觉异常的问题，并且通常伴随没有形态学变化，在评估中是困难的。解决方案：由于变化引起的基因表达的体内变化在外部环境中是急性的，用于确定生物毒性的基因组的鉴定使得可以在发生生物毒性之前并且在通过病理学检查验证之前快速且精确地检测生物毒性。本发明提供了一种通过使用新基因组检测和预测生物毒性的方法，其试剂盒，治疗生物毒性的方法，以及确认候选药物的生物毒性的方法。

配列番号	G1_1	G1_2	G1_3	2bp_4	2bp_5	2bp_6	max_8	max_9	3bp_12	2bp_15	GW_15
1	0.434	-0.766	-0.196	0.267	-0.417	0.067	0.059	-0.987	-0.387	-0.008	-0.234
2	0.817	0.019	-0.945	0.411	0.563	-0.369	0.288	-0.653	-1.397	-0.545	-0.587
3	0.346	0.831	-0.859	0.895	-0.273	-1.068	0.542	-0.181	-0.909	0.234	-0.566
4	0.054	-0.367	0.178	0.475	0.199	0.733	0.216	0.771	0.001	-0.186	0.234
5	0.035	-0.189	-0.313	0.041	0.010	-0.485	-0.100	-0.330	-0.277	-0.356	-0.372
6	-0.367	-0.022	1.319	-0.136	-0.480	1.028	-0.260	0.482	0.877	0.362	0.360
7	-0.370	0.134	0.707	0.025	-0.978	0.750	-0.793	-0.171	0.655	0.169	0.247
8	0.283	0.000	-0.723	-0.433	0.489	0.328	0.221	0.000	0.000	0.343	0.000
9	-0.678	0.000	-0.560	-0.176	-0.503	-0.920	-0.637	0.000	-0.034	0.000	-0.587
10	-0.834	0.052	0.042	0.059	-0.078	-0.483	-0.001	-0.705	-0.242	-0.294	-0.041
11	-0.044	-0.025	-0.047	-0.124	0.110	-0.110	-0.483	-0.308	-0.074	-0.210	-0.182
12	0.150	-0.034	-0.200	-0.032	0.014	-0.432	-0.106	0.261	-0.155	0.133	-0.132
13	-0.032	0.433	0.295	-0.157	0.225	-0.408	0.300	-0.671	1.007	0.392	-0.978
14	-0.080	-0.695	0.523	-0.309	-0.227	0.193	0.293	-0.694	0.172	-0.056	0.388
15	0.138	-0.271	1.332	0.065	-0.345	0.322	0.024	0.312	1.074	0.253	0.781
16	-0.071	-0.085	0.437	-0.389	-0.389	0.000	0.382	-0.223	-0.004	0.060	0.236
17	-0.977	-0.184	-0.457	-0.305	-0.629	0.062	0.316	-0.759	-0.554	0.090	0.145
18	-0.486	-0.12	1.119	-0.285	-0.76	0.322	-0.616	-0.633	0.823	0.128	0.954
19	-0.973	-0.214	0.558	-0.128	-0.132	-0.36	-0.884	-0.186	-0.230	-0.287	0.514
20	0.201	-0.349	-0.172	1.350	0.441	-0.620	0.421	0.600	0.967	-0.095	0.559
21	-0.013	-0.007	-0.291	0.010	-0.075	-0.181	-0.177	-0.603	-0.159	-0.270	-0.717
22	0.000	0.112	0.000	-0.442	1.442	0.000	0.223	0.000	0.750	0.000	0.000
23	0.599	0.419	-0.741	0.263	0.275	-0.068	-0.176	-0.613	-0.549	-0.562	-0.483
24	-0.018	-0.830	-0.255	0.410	0.000	0.000	0.547	0.000	0.473	0.000	0.000
25	0.150	-0.196	-0.472	0.031	0.225	0.680	0.057	0.877	1.215	2.147	1.266
26	-0.451	-0.609	0.368	-1.484	-0.471	0.338	-0.878	0.042	0.005	-0.063	0.388
27	-0.090	0.012	-0.013	0.089	0.028	0.135	0.088	-0.119	0.399	0.784	0.133
28	-0.074	-0.348	0.460	-0.006	-0.136	-0.003	0.186	-0.277	0.389	0.590	0.636
29	0.096	0.753	0.112	0.158	0.187	-0.362	0.425	0.129	-0.514	-0.677	1.103
30	0.509	-0.247	-0.063	0.080	-0.202	-0.235	0.487	0.000	-0.045	-0.118	-0.178
31	0.362	0.132	-0.397	-0.143	0.093	-0.235	0.161	-0.326	-0.909	-0.658	-0.600
32	0.497	0.181	-0.208	0.022	-0.101	0.264	0.208	-0.242	-0.158	-0.083	-0.520
33	0.000	0.000	0.019	0.000	0.136	-0.684	-0.632	-0.123	-0.007	0.513	-0.416
34	-0.088	-0.001	-0.116	1.074	-0.921	0.000	0.678	0.000	-0.572	0.000	0.000
35	0.578	0.050	-1.247	0.788	0.348	-0.866	0.020	-1.280	-0.578	-0.356	-0.627
36	0.034	-0.281	0.306	-0.201	-0.403	0.213	0.488	0.419	0.398	0.535	0.303
37	0.500	0.000	-0.247	-0.277	-0.945	-0.204	-0.584	-0.390	0.142	0.000	-0.919
38	-0.468	0.000	-0.752	0.000	0.000	-0.474	0.000	-0.405	-1.086	-0.641	-0.977
39	0.308	-0.326	-0.609	0.034	0.635	0.013	0.084	0.293	-0.771	0.749	0.030
40	0.171	0.573	-0.462	0.111	0.686	-0.939	0.750	-0.487	-0.211	0.454	-0.250
41	-0.012	0.624	-0.678	0.560	0.560	-1.376	-0.092	0.038	-1.321	0.064	-0.445
42	-0.489	-0.559	0.850	-0.205	0.033	0.261	-0.704	0.638	1.261	0.303	0.732
43	-0.178	-0.438	-0.419	-0.026	0.034	0.000	-0.082	-0.291	0.253	-0.033	-0.059
44	-0.123	-0.023	0.035	-0.032	-0.335	0.334	0.016	-0.093	-0.227	-0.159	-0.000
45	-0.545	-0.360	0.423	0.047	-0.139	0.183	-0.246	0.526	0.474	0.256	-0.414
46	-0.257	-0.000	0.006	0.174	0.000	0.000	0.647	0.000	-0.046	0.000	-0.037
47	-0.157	-0.348	0.344	-0.886	-0.342	-0.311	-0.056	0.142	1.845	0.848	0.391
48	-0.486	-0.322	1.182	-0.286	-0.135	1.320	-0.098	1.130	0.889	0.875	0.822
49	0.090	-0.069	0.531	0.000	0.000	0.000	0.228	-0.017	-1.101	-0.041	0.903
50	-0.382	0.328	1.401	0.200	-0.613	-0.223	0.167	-0.789	0.311	-0.473	1.074