



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I650135 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：106103272

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 26 日

(51)Int. Cl. : A61K38/36 (2006.01)

A61P19/02 (2006.01)

A61P19/10 (2006.01)

(30)優先權：2016/01/29 美國

62/288,430

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：鄭琮霖 CHENG, CHIH KUANG (TW)；葉竹來 YEH, JWU LAI (TW)；何美玲 HO, MEI LING (TW)；施桂月 SHI, GUEY YUEH (TW)；吳華林 WU, HUA LIN (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

US 2005/0147611A1

Yi-Heng Li, et al. "The role of thrombomodulin lectin-like domain in inflammation", Journal of Biomedical Science 2012, 19:34, 1~8.

D H Jones et al. "Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis", Ann Rheum Dis 2002; 61 (Suppl II): ii32-ii39.

審查人員：官速貞

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：7 共 21 頁

(54)名稱

TMD 1 蛋白用於治療骨質流失疾病

TMD1 PROTEIN FOR TREATING BONE LOSS DISEASES

(57)摘要

本發明係關於一種組合物用於製備治療骨質流失疾病、病況或失調的藥物的方法，其中該組合物包含一醫藥上有效劑量之血栓調節蛋白類凝集素結構域 TMD1。

The present invention relates to a method for a composition in preparing drug for treating a bone loss disease, condition, or disorder. The composition comprises a pharmaceutically effective amount of thrombomodulin lectin-like domain TMD1.

指定代表圖：

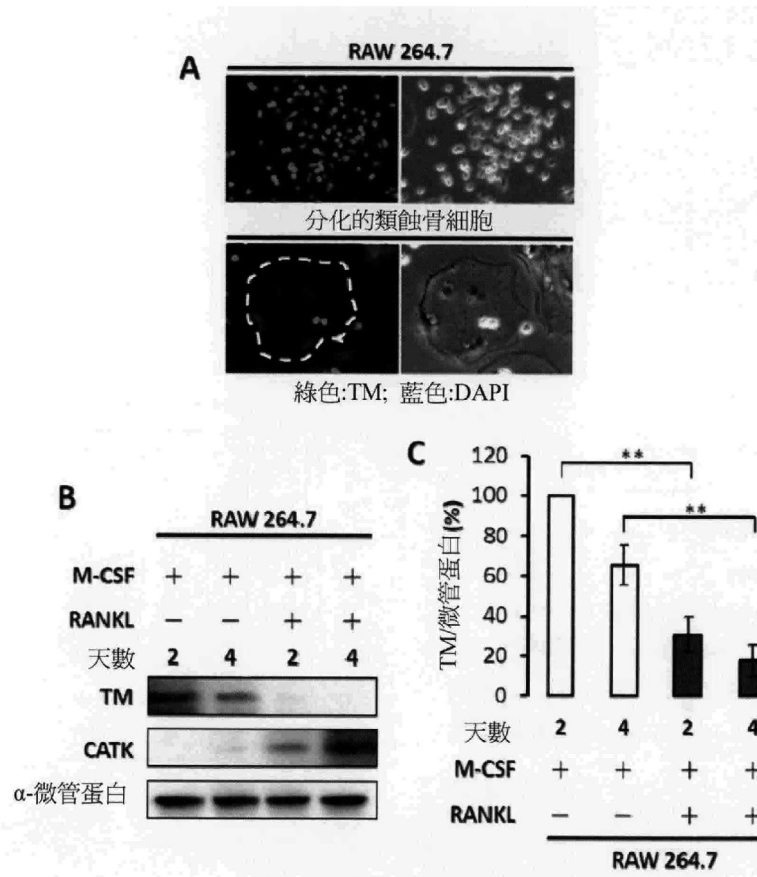


圖 1

I650135

發明摘要

※ 申請案號：106103272

※ 申請日：106.1.26

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

TMD1 蛋白用於治療骨質流失疾病 / TMD1 PROTEIN FOR TREATING BONE LOSS DISEASES

【中文】

本發明係關於一種組合物用於製備治療骨質流失疾病、病況或失調的藥物的方法，其中該組合物包含一醫藥上有效劑量之血栓調節蛋白類凝集素結構域 TMD1。

【英文】

The present invention relates to a method for a composition in preparing drug for treating a bone loss disease, condition, or disorder. The composition comprises a pharmaceutically effective amount of thrombomodulin lectin-like domain TMD1.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

TMD1 蛋白用於治療骨質流失疾病 / TMD1 PROTEIN FOR TREATING BONE LOSS DISEASES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種透過抑制核因子- κ B 配體的受體活化劑 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 誘發的蝕骨細胞分化，以治療骨質流失疾病的方法。

【先前技術】

【0002】 骨骼是在一種稱作改造的過程中不斷被重塑的一種活器官。在這個過程中，稱為蝕骨細胞的細胞再吸收骨組織，而稱為成骨細胞的細胞沉積新的骨組織。成骨細胞可以被封鎖在其所分泌的骨基質內，促其分化成骨細胞。這些細胞被認為在感測骨負載中扮演重要的角色。在高負載條件下，成骨細胞增加骨質量，而在低負載條件下，蝕骨細胞去除骨組織，優化其結構。因此，蝕骨細胞與骨質流失或骨密度的降低有密切的關係。

【0003】 人們可能因為生理因素或其他外在因素而骨質流失或骨密度降低，導致骨質疏鬆症。骨質疏鬆症的症狀包括骨折、背痛、活動能力受限（甚至無法移動）。目前骨質疏鬆症的治療方法包括改善營養、運動、藥物治療等。關於藥物治療，臨床使用的藥物包括：雌激素或雌激素的同功異構物、治療糖皮質激素誘發之骨質疏鬆症的藥物、二磷酸鹽或降鈣素等。然而上述這些藥物全都有副作用，例如，二磷酸鹽會造成噁心、消化

不良、腹瀉或便秘，而降鈣素會引起面部潮紅、頻尿、噁心或皮膚瘙癢。最重要的是，上述這些藥物不能抑制蝕骨細胞的產生，因此不能有效地治療骨質疏鬆症。

【0004】 核因子- κ B 配體受體活化劑 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 是誘發衍生自骨髓之巨噬細胞 (BMM) 的蝕骨細胞分化的關鍵因素。

【發明內容】

【0005】 本發明的目的是治療與骨質流失相關的疾病、病況或失調。在本發明中，透過抑制核因子- κ B 配體受體活化劑 (RANKL) 誘發之蝕骨細胞分化的受體活化劑，達到治療骨質疏鬆症的效果。在本發明中使用的血栓調節蛋白 (TM) 是天然存在的酶。血栓調節蛋白類凝集素結構域 (TM 的第一結構域, TMD1) 可以配製成用於抑制 RANKL 之活化的蛋白質藥物，從而透過抑制蝕骨細胞分化達成骨質疏鬆症的治療。

【0006】 本發明在 RAW264.7 細胞中使用 RANKL 誘發蝕骨細胞分化的模型，第一次顯示 TMD1 的補充能以劑量依賴性的方式顯著的緩解蝕骨細胞分化和骨質再吸收。總而言之，如圖 7 所闡述之模型所示，本發明證明由單核細胞/巨噬細胞表現的 TM，是蝕骨細胞生成的負調節劑，rTMD1 的治療能抑制 OVX 誘發的骨質流失。這些觀察結果，為骨質流失的病症提供了新的治療策略。因此，TMD1 可能是骨質流失疾病的新治療方法。

【0007】 因此，本發明提供了一種在有需要的個體中治療骨質流失疾病、病況或失調的方法，包含投予該個體一醫藥上有效劑量之組合物，其

包含血栓調節蛋白類凝集素結構域 (TMD1)。

【0008】 在一實施例中，該方法抑制個體體內的蝕骨細胞分化。

【0009】 在另一實施例中，該方法抑制個體體內核因子- κ B 配體受體活化劑(RANKL)的活化。

【0010】 在一實施例中，該骨質流失疾病、病況或失調包括、但不限於骨質疏鬆症或風濕性關節炎。

【0011】 在一實施例中，該個體是一個哺乳類動物。在另一實施例中，該個體是人類。

【0012】 本發明另提供了一種組合物用於製備治療骨質流失疾病、病況或失調的藥物的方法，其中該組合物包含一醫藥上有效劑量之血栓調節蛋白類凝集素結構域 TMD1。

【0013】 在一實施例中，該組合物抑制蝕骨細胞分化。

【0014】 在另一實施例中，該組合物抑制核因子- κ B 配體受體活化劑 RANKL 的活化。

【0015】 在一實施例中，該骨質流失疾病、病況或失調包含骨質疏鬆症或風濕性關節炎。

【0016】 在一實施例中，該藥物係用於哺乳動物。在另一實施例中，該藥物係用於人類。

【圖式簡單說明】

【0017】 圖 1 顯示在 RAW264.7-分化的蝕骨細胞中下調的 TM 表現。

(A)以 M-CSF (20ng / ml) 與 RANKL (30ng / ml) 處理 4 天的 RAW 264.7

細胞和分化之類蝕骨細胞中，使用 IF 染色偵測到的 TM 蛋白表現（原始放大倍數×200）。(B)經 M-CSF 和 RANKL 處理的 RAW 264.7 細胞中，TM 和 CATK 表現的西方墨點分析。所示之代表性數據得自三個獨立實驗。(C) 將 (B)以定量表示。 ** P <0.01

【0018】 圖 2 顯示在 PBMC 分化的蝕骨細胞中下調的 TM 表現。(A) 經 M-CSF (20ng / ml) 和 RANKL (30ng / ml) 處理 1 週之 PBMC 和分化之類蝕骨細胞 (osteoclast-like cell) 中，使用 IF 染色偵測到之 TM 蛋白表現。(原始放大倍數×200) (B) 經 M-CSF 和 RANKL 處理的 PBMC 中，TM 和 CATK 表現的西方墨點分析。 所示之代表性數據得自三個獨立實驗。(C) (B)的定量表徵。 ** P <0.01 , *** P <0.001 。

【0019】 圖 3 顯示 TM 的骨髓特異性缺失提高蝕骨細胞的生成。(A) 分化自原代培養之巨噬細胞的蝕骨細胞的 TRAP 染色分析，該巨噬細胞是得自經 M-CSF 和各種濃度之 RANKL 處理以進行分化的 $TM^{flx/flx}$ 和 $LysMcre/TM^{flx/flx}$ 小鼠（原始放大倍數×200）。(B) 每孔中 TRAP 陽性多核蝕骨細胞 (MNC) 的定量。 *** P <0.001。 實驗重複三次。

【0020】 圖 4 顯示巨噬細胞上的 TM 類凝集素結構域延緩 RANKL 誘發的蝕骨細胞形成。(A)分化自原代培養之巨噬細胞的蝕骨細胞的 TRAP 染色分析，該巨噬細胞是得自經 M-CSF 和各種濃度之 RANKL 處理以進行分化的 $TM^{WT/LeD}$ 及 $TM^{LeD/LeD}$ 小鼠（原始放大倍數×200）。(B) 使用 4-NPP 作為基質之 TRAP 活性定量。 * P <0.05 , ** P <0.01。 實驗重複三次。

【0021】 圖 5 顯示 TM 的不足提高細胞外 HMGB1 的產生和卵巢切除誘發的骨質流失。在(A)來自 $TM^{flx/flx}$ 和 $LysMcre/TM^{flx/flx}$ 小鼠和(B)來自

TM^{WT/LeD} 及 TM^{LeD/LeD} 小鼠之原代培養巨噬細胞中，以西方墨點分析評量細胞外 HMGB1 的產生。使用谷胱甘肽 S-轉移酶 (GST) 作為內部對照。CM：條件培養基。所示之代表性數據來自三個獨立實驗。(C) 在卵巢切除術 4 週後，以 μ CT 掃描偵測脛骨的骨質流失。虛線表示橫截面。(D) 小梁骨體積分數 (BV / TV) 的定量結果。BV、小梁骨體積; TV、總骨體積。 ** P < 0.01。 n = 5。(E) TM 之不足對於促進骨質流失的潛在機制。

【0022】 圖 6 顯示重組 TM 類凝集素結構域 (rTMD1) 抑制 RANKL 誘發之骨質再吸收並降低卵巢切除術誘發之骨質流失。(A) 經 RANKL 和 rTMD1 處理的 RAW264.7 細胞中，骨質再吸收的試驗結果。實驗重複三次。(B) 在來自 TM^{LeD/LeD} 小鼠之骨髓巨噬細胞/單核細胞中，因應 rTMD1 之處理細胞外 HMGB1 的產生。CM：條件培養基。Lys：細胞溶解產物。(C) 以各種不同劑量之腹膜內 rTMD1 注射處理之卵巢切除的野生型小鼠中，骨體積分數 (BV / TV) 的定量結果。BV、小梁骨體積; TV、總骨體積。 n = 5。(D) 巢切除術 4 週內、經過或未經過 rTMD1 治療的野生型小鼠，藉 μ CT 掃描偵測到的脛骨骨質流失。(E) (D) 的定量結果。 n = 5。(F) rTMD1 減緩卵巢切除術誘發之骨質流失的建議機制。 * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001。

【0023】 圖 7 顯示蝕骨細胞生成中之 TM 的示意性模型。在蝕骨細胞生成的過程中，RANKL 降低 TM 表現並促進單核細胞中細胞外 HMGB1 的分泌，導致骨質再吸收和骨質流失的提高。此外，rTMD1 治療能抑制 HMGB1 分泌、骨質再吸收和骨質流失。

【實施方式】

【0024】 以下實施例非用於限定而僅是本發明的各個態樣與特徵的代表。

【0025】 實施例 1：

【0026】 方法與材料

【0027】 實驗動物

【0028】 本實驗根據先前的報告，取得具有骨髓特異性 TM 缺失的 $LysMcre/TM^{flox/flox}$ 小鼠。相較於其對照組 ($TM^{flox/flox}$ 小鼠)，TM 的表現在 $LysMcre/TM^{flox/flox}$ 小鼠的骨髓系細胞（巨噬細胞和嗜中性粒細胞）中被抑制，但未在其他組織和器官中被抑制。缺乏 TM 之類凝集素結構域的小鼠 ($TM^{LeD/LeD}$ 小鼠) 及其對照組 ($TM^{WT/LeD}$ 小鼠) 是由 Conway 博士無償提供。這些 B6 背景小鼠存放於國立成功大學中心 (NCKU) 的無病原體動物設施中。所有動物實驗方案由成功大學的實驗動物照護與使用委員會批准。根據之前所述的方法，在 8 週齡時進行雙側卵巢切除術 (OVX)。

【0029】 細胞分離

【0030】 根據廠商說明書，使用 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Brussels, Belgium) 梯度法，從血液中分離人類 PBMC。根據稍做一些修改之先前所述方法，自股骨和脛骨分離小鼠 (6 至 12 週齡) 骨髓的巨噬細胞/單核細胞 (BMM)。簡言之，將分離的全部骨髓細胞在完全最低必需培養基 (α 修飾; α -MEM) 中培養過夜。隨後，收集未黏附的細胞，使用 Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 密度梯度離心法製備單核細胞。再將 BMM 細胞均勻地散佈在 Ficoll-Hypaque 和培養基之間的界面上。

【0031】 蝕骨細胞培養和 TRAP 染色

【0032】 使用 96 孔細胞培養板 (1×10^5 個細胞/孔) 培養細胞 (RAW264.7, PBMC 或 BMM)。添加 RANKL 和 M-CSF 以刺激蝕骨細胞的產生。每 2 天補充培養基。在第 8 天時, 使用 3% 的甲醛固定細胞, 並用抗酒石酸酸性磷酸酶 (Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 染色。將具有三個或更多個核的 TRAP 陽性細胞計為蝕骨細胞。

【0033】 TRAP 活性分析

【0034】 以 4-NPP 作為基質, 根據經修改的微孔板分析法, 測量 TRAP 活性。將 50 μ L 樣品在 150 μ L 基質中於 37 $^{\circ}$ C、pH 5.0 之條件下培養 40 分鐘, 該基質是在含 500mM 酒石酸鈉之 100mM 乙酸鈉緩衝液中包含 8mM 4-NPP。加入 50 μ L、3M 的 NaOH 以終止反應。在微盤分析儀 (SPECTRAMax TM 340; Molecular Devices, Palo Alto, CA, USA) 中測量波長為 405nm 的吸光度。

【0035】 西方墨點分析

【0036】 根據先前所述的方法溶解細胞並進行西方墨點分析。在 10% 十二烷基硫酸鈉-聚丙醯胺凝膠中, 分離約 50 μ g 的總蛋白質, 然而轉移至聚偏二氟乙烯膜上。使用初級和二級抗體探測後, 使用增強的化學發光試劑 (Amersham Pharmacia Biotech) 偵測信號。

【0037】 骨質再吸收分析

【0038】 根據廠商的說明書, 使用骨質再吸收試驗盒 (Cosmo Bio.Co. Ltd., Tokyo, Japan) 測量骨質再吸收活性。簡言之, 在有或沒有

各種濃度之 rTMD1 的情況下，將 RAW264.7 細胞在具有 M-CSF (30ng / ml) 和 RANKL (30ng / ml) 之螢光磷酸鈣塗覆的細胞培養板上培養 7 天。透過在激發波長 485nm 和放射波長 535nm 時測量條件培養基的螢光強度，評量 RANKL 誘發之骨質再吸收活性。

【0039】 微計算機斷層掃描 (Micro-Computed Tomography, μ CT)

【0040】 本發明之所有微計算機斷層掃描分析均符合當前的指導原則。使用 SkyScan-1076 Micro-CT 系統 (Skyscan, Belgium) 將來自各組別的骨質樣本顯像。小梁骨的分析是在 45kV、220 μ A、0.4 μ 旋轉梯級、0.5mm 鋁過濾器等以及 18 μ m/畫素之掃描解析度下操作 μ CT 掃描器。測量的參數如下：總骨體積 (TV, mm³)，小梁骨體積 (BV, mm³) 以及小梁骨體積分數 (BV/TV, %)。

【0041】 結果

【0042】 蝕骨細胞生成過程中單核細胞/巨噬細胞中 TM 蛋白表現下降

【0043】 使用 RANKL 和 M-CSF 誘發小鼠 RAW 264.7 細胞和人類 PBMC 中的蝕骨細胞生成，以評量 TM 蛋白在該過程中的表現量。免疫螢光染色顯示，當 RAW264.7 細胞分化成類蝕骨細胞時，TM 的表現顯著降低 (圖 1A)。西方墨點分析顯示，使用 RANKL 處理 RAW 264.7 細胞時，TM 和 CATK (一種蝕骨細胞的生物標記) 分別以時間依賴性的方式下降和增加 (圖 1(B)-(C))。在人類 PBMC 中觀察到類似的結果 (圖 2)。總體而言，這些結果顯示，單核細胞/巨噬細胞中的 TM 表現，可能與蝕骨細胞的生成有反相關的關係。

【0044】 巨噬細胞中全長 TM 的缺乏提高 RANKL 誘發的蝕骨細胞生成

【0045】 爲了研究 TM 是否可能是蝕骨細胞生成中的負調節劑，本發明自骨髓特異性轉基因小鼠分離巨噬細胞。TRAP 染色分析顯示，RANKL 能以劑量依賴性的方式誘發來自 $LysMcre/TM^{flox/flox}$ 和 $TM^{flox/flox}$ 小鼠之巨噬細胞中的蝕骨細胞生成。然而， $LysMcre/TM^{flox/flox}$ 小鼠中的細胞面積大於來自 $TM^{flox/flox}$ 小鼠的細胞面積（圖 3，(A)）。實驗結果的定量顯示， $LysMcre/TM^{flox/flox}$ 組中分化之 TRAP 陽性多核細胞 (TRAP + MNC) 的比例，比 $TM^{flox/flox}$ 組至少高 3 倍（圖 3，(B)）。這些結果指出，存在於巨噬細胞中的全長 TM 可能阻礙 RANKL 誘發的蝕骨細胞生成。

【0046】 巨噬細胞中的 TM 類凝集素結構域延緩 RANKL 誘發的蝕骨細胞生成

【0047】 過去的研究顯示蝕骨細胞衍生的 C 型凝集素能抑制蝕骨細胞的生成。爲了進一步研究 TM 之類凝集素結構域是否可能有助於抑制 RANKL 誘發之蝕骨細胞生成，本發明檢驗來自 $TM^{WT/LeD}$ 和 $TM^{LeD/LeD}$ 小鼠的原代巨噬細胞。TRAP 染色分析顯示，RANKL 可在來自 $TM^{WT/LeD}$ 及 $TM^{LeD/LeD}$ 小鼠的原代細胞中誘發蝕骨細胞生成。然而， $TM^{LeD/LeD}$ 組中的一些 OC 之細胞面積顯得大於 $TM^{WT/LeD}$ 組中的細胞面積（圖 4，(A)）。此外， $TM^{LeD/LeD}$ 組中偵測到的 TRAP 活性，顯著高於 $TM^{WT/LeD}$ 組（圖 4，(B)）。這些結果顯示，TM 的類凝集素結構域可能在抑制 RANKL 誘發之蝕骨細胞生成中，具有關鍵作用。

【0048】 全長 TM 的缺失或 TM 類凝集素結構域的缺失，提高巨噬

細胞中細胞外 HMGB1 的產生以及卵巢切除誘發的骨質流失。

【0049】 由於 HMGB1 的釋放是 RANKL 誘發之蝕骨細胞生成所必需的，因此本發明進一步評量 TM 之不足對細胞外 HMGB1 之產生的影響。如圖 5 所示，條件培養基中經 RANKL 處理之 $LysMcre/TM^{flx/flx}$ 細胞中的 HMGB1 蛋白質生產量，顯著高於 $TM^{flx/flx}$ 細胞中的 HMGB1 蛋白質生產量（圖 5，(A)）。同樣的，由 $TM^{LeD/LeD}$ 巨噬細胞產生的細胞外 HMGB1，也高於 $TM^{WT/LeD}$ （圖 5(B)）。此外， μ CT 掃描顯示，透過卵巢切除術誘發的脛骨骨質流失， $TM^{LeD/LeD}$ 小鼠顯著的比 $TM^{WT/LeD}$ 小鼠更嚴重（圖 5，(C)-(D)）。這些數據顯示，巨噬細胞內 TM 的不足，可能與細胞外 HMGB1 的產生相關聯，提高蝕骨細胞的形成和骨質的流失（圖 5，(E)）。

【0050】 rTMD1 治療抑制骨質再吸收和骨質流失

【0051】 人體 rTMD1 對於體外骨質再吸收和體內骨質流失的影響，已經研究完成。骨質再吸收的試驗結果顯示，rTMD1 治療能夠以劑量依賴性的方式抑制 RANKL 誘發的骨質再吸收（圖 6(A)），並且降低來自 $TM^{LeD/LeD}$ 小鼠之 BMM 中細胞外 HMGB1 的產生（圖 6，(B)）。此外，rTMD1 治療以劑量依賴性的方式增加卵巢切除之野生型小鼠的骨體積分數（BV / TV）（圖 6，(C)）。與這些結果一致的是，rTMD1 治療在 4 週的期間內抑制骨質流失（圖 6，(D)-(E)）。這些結果顯示，透過阻斷 HMGB1 誘發的蝕骨細胞生成，rTMD1 至少部分抑制骨質流失（圖 6，(F)）。

【0052】 一個熟知此領域技藝者能很快體會到本發明可很容易達成目標，並獲得所提到之結果及優點，以及那些存在於其中的事項。本發明中之方法和用途乃較佳實施例的代表，其為示範性且不是用來侷限本發明

的範圍。熟知此技藝者將會想到其中可修改之處及其他用途。這些修改都蘊含在本發明的精神中，並在申請專利範圍中界定。

【0053】 對於本領域技術人員顯而易見的是，在不悖離本發明的範圍和精神的情況下，可以對本發明所揭露的內文進行各種替代和修改。

【0054】 本文說明書中提到的所有專利和出版物，都以引用的方式併入本文中，引用的程度就如同將各個別專利和出版物特定且個別地以引用的方式併入本文中一般。

【0055】 本文闡明性地描述的本發明，可以在本文未具體公開的任何一個或多個元件、一個或多個限制不存在的情況下實施。使用的術語和表達的方式，是當作描述而不是限制的術語，且在使用這些術語和表達方式時，沒有意圖要排除所示和所描述之特徵或其部分特徵，且意識到可能在本發明申請的專利範圍內做各種的修改。因此，應當理解的是，儘管本發明已經透過優選的具體實施例和任選的特徵具體地公開，本領域的技術人員能善用本文所公開之概念的各種修改與，但這種修改和變化視為所附專請專利範圍所定義之本發明的範圍內。

申請專利範圍

1. 一種組合物用於製備治療骨質流失疾病、病況或失調的藥物的用途，其中該組合物包含一醫藥上有效劑量之血栓調節蛋白類凝集素結構域 TMD1，其中該骨質流失疾病、病況或失調不包含風濕性關節炎。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該組合物抑制蝕骨細胞分化。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該組合物抑制核因子- κ B 配體受體活化劑 RANKL 的活化。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該骨質流失疾病、病況或失調包含骨質疏鬆症。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該藥物係用於哺乳動物。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該藥物係用於人類。

圖式

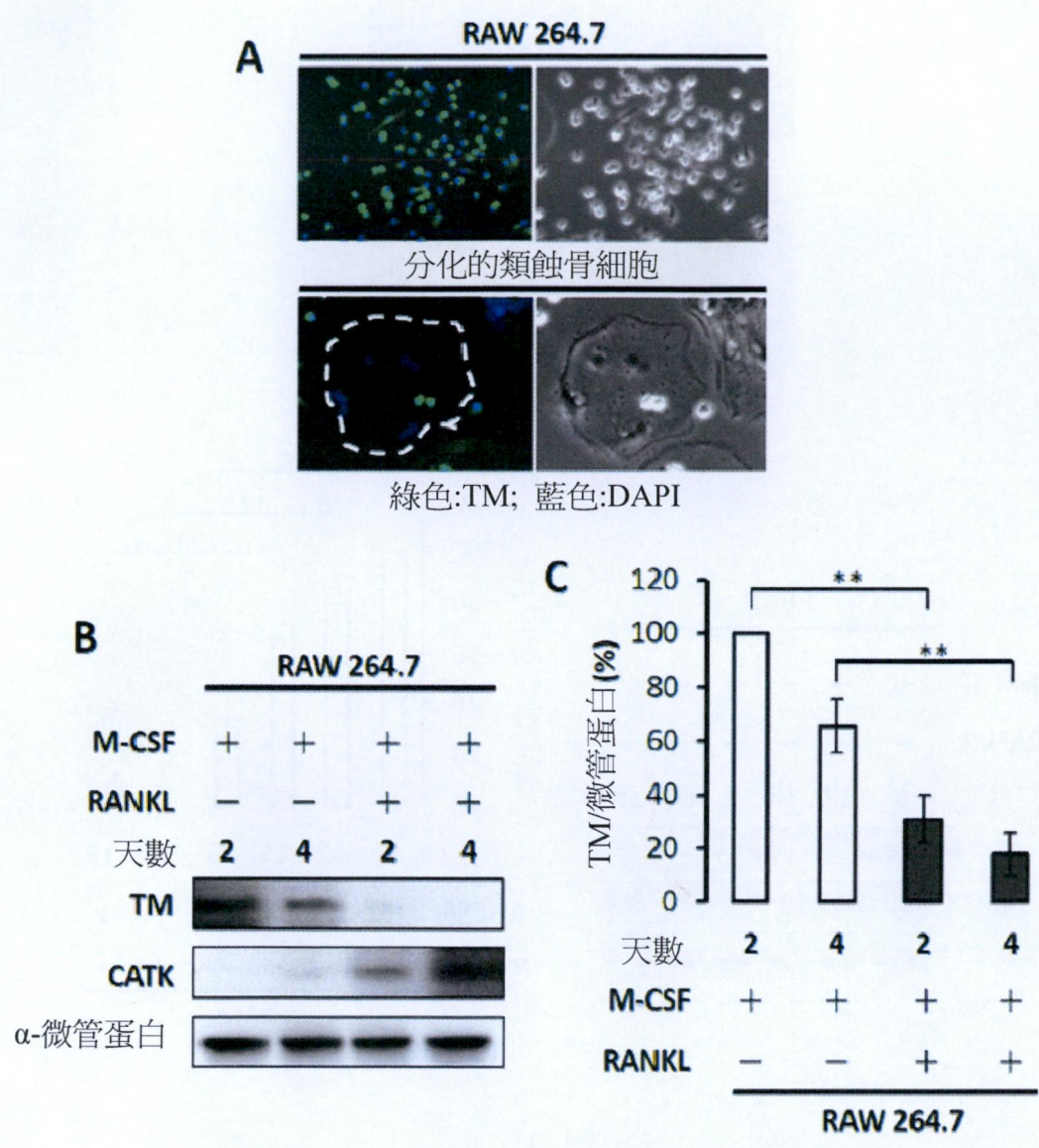


圖 1

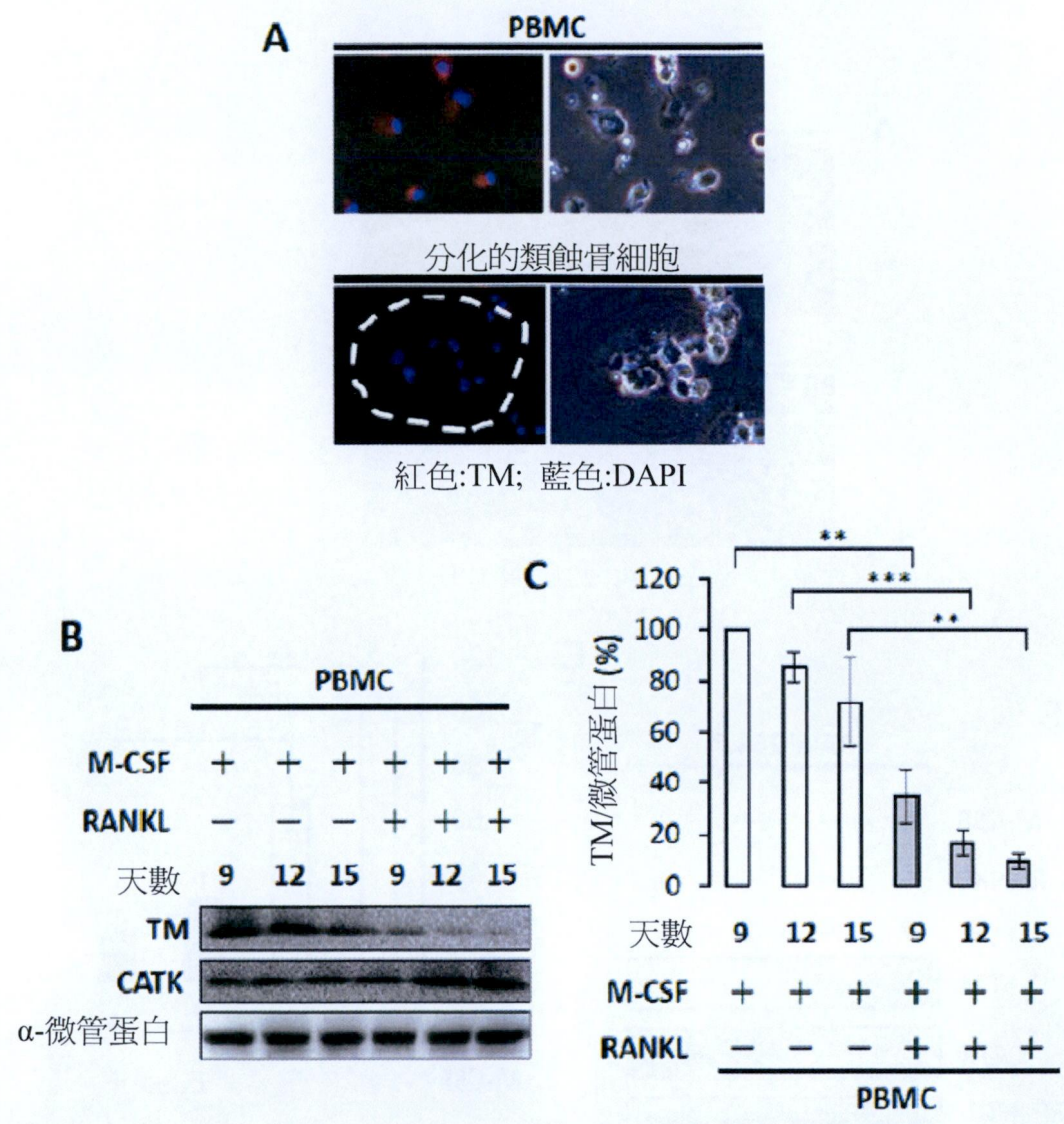
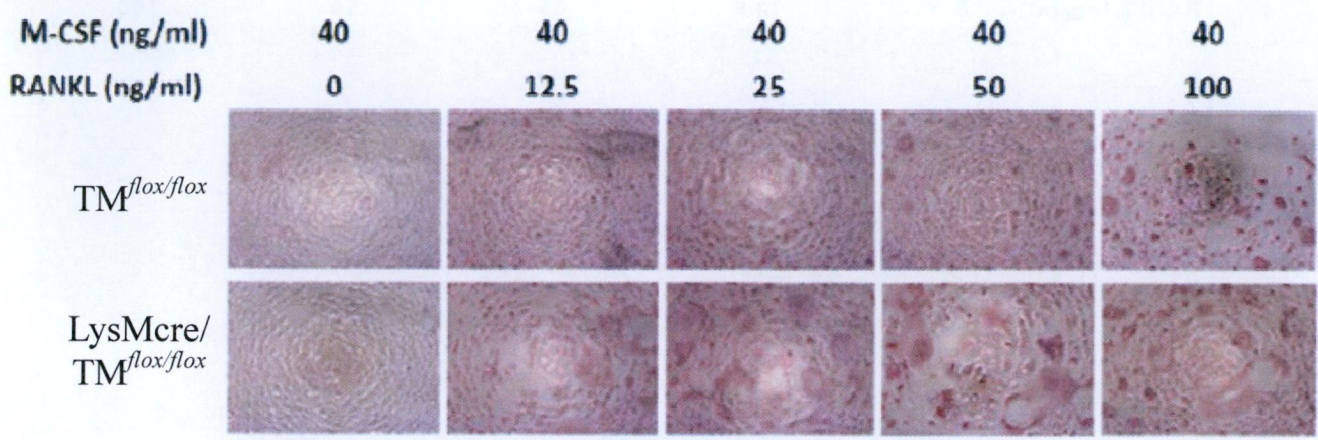


圖 2

A



B

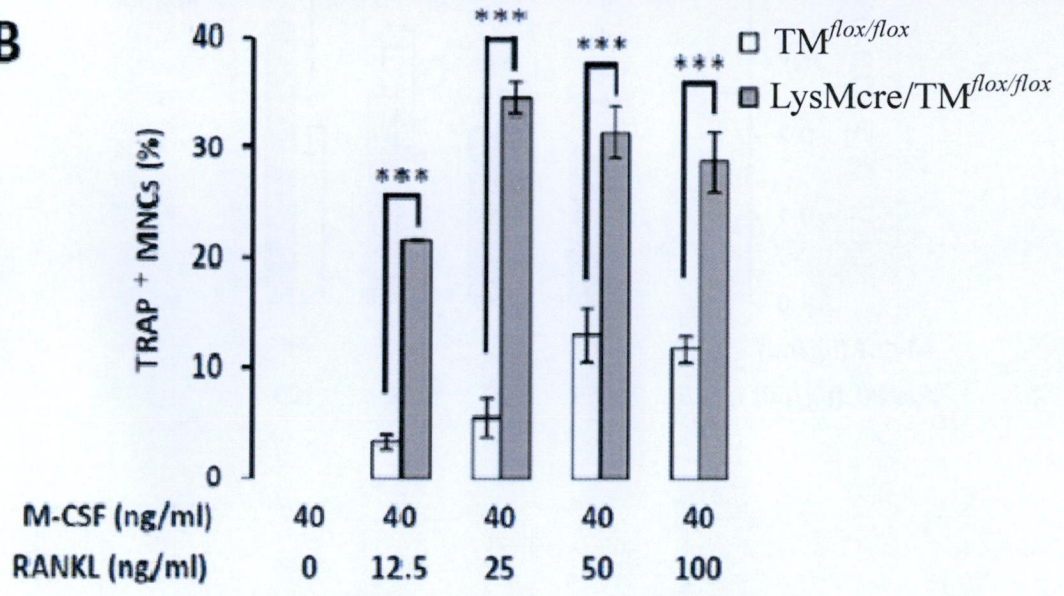
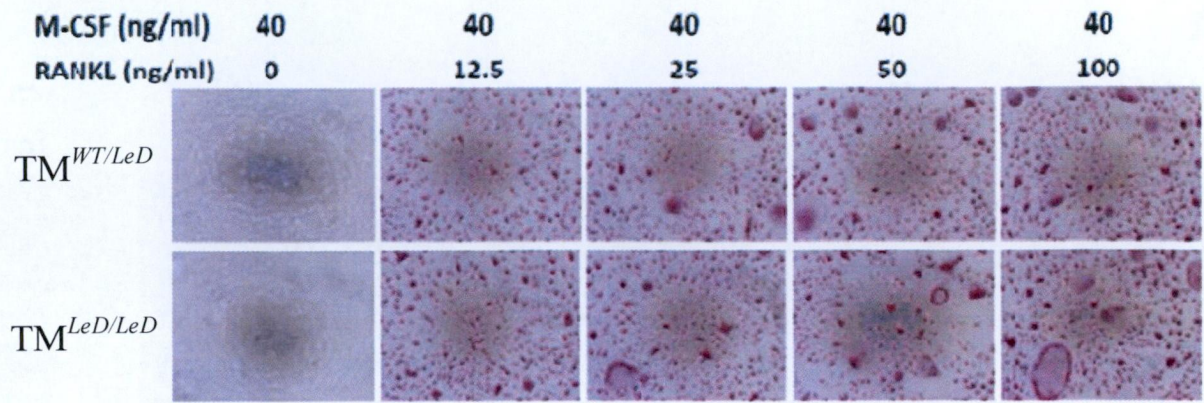


圖 3

A



B

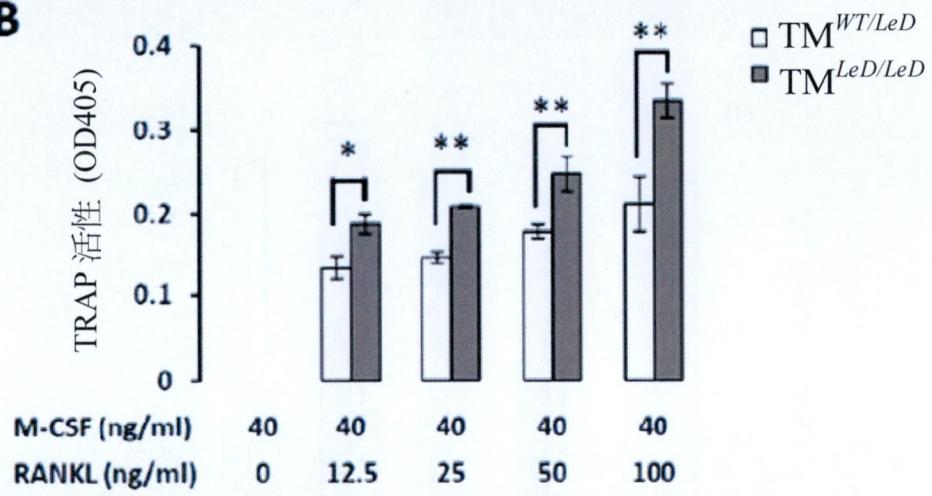
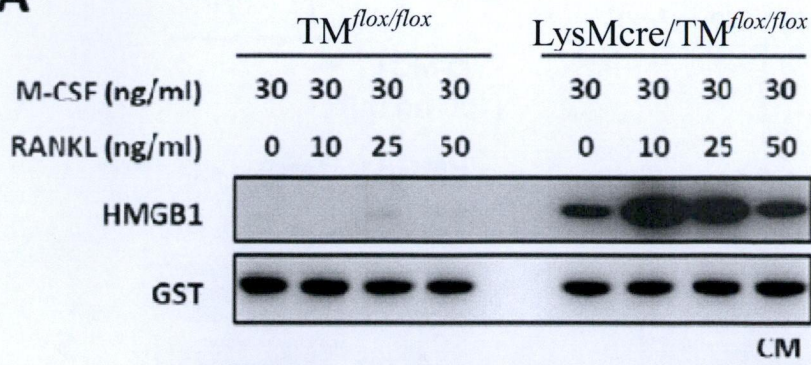
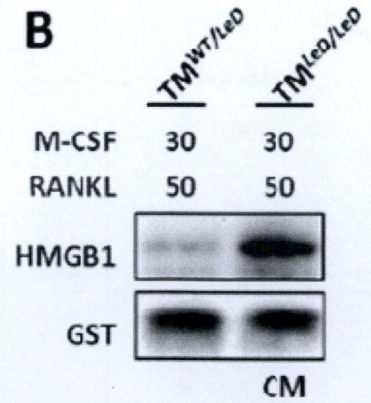


圖 4

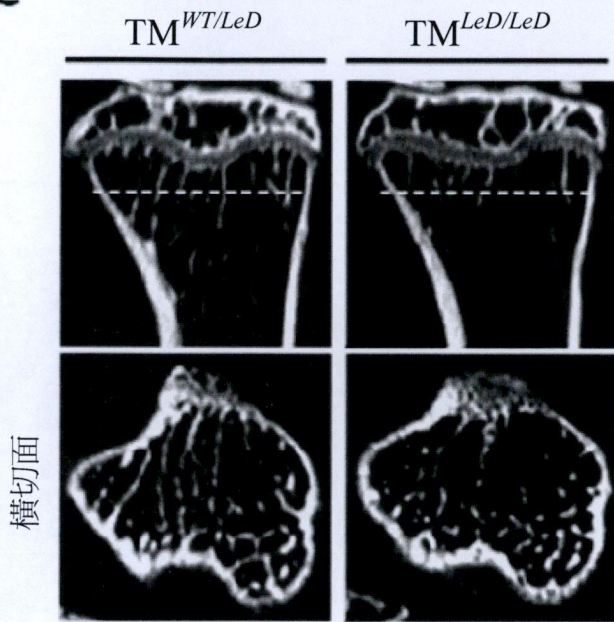
A



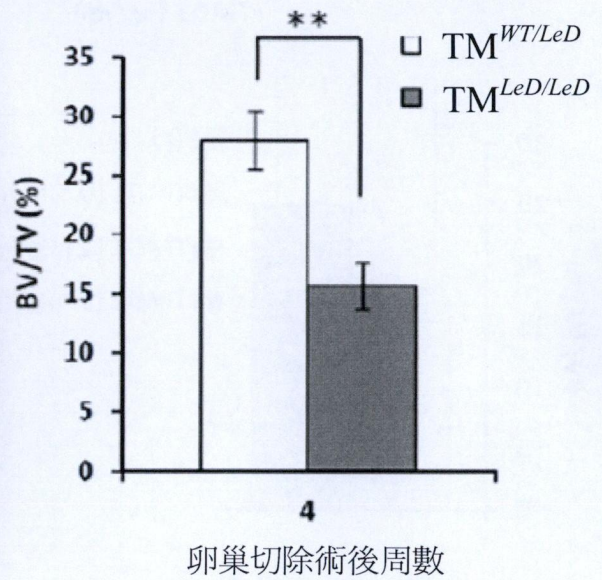
B



C



D



E



圖 5

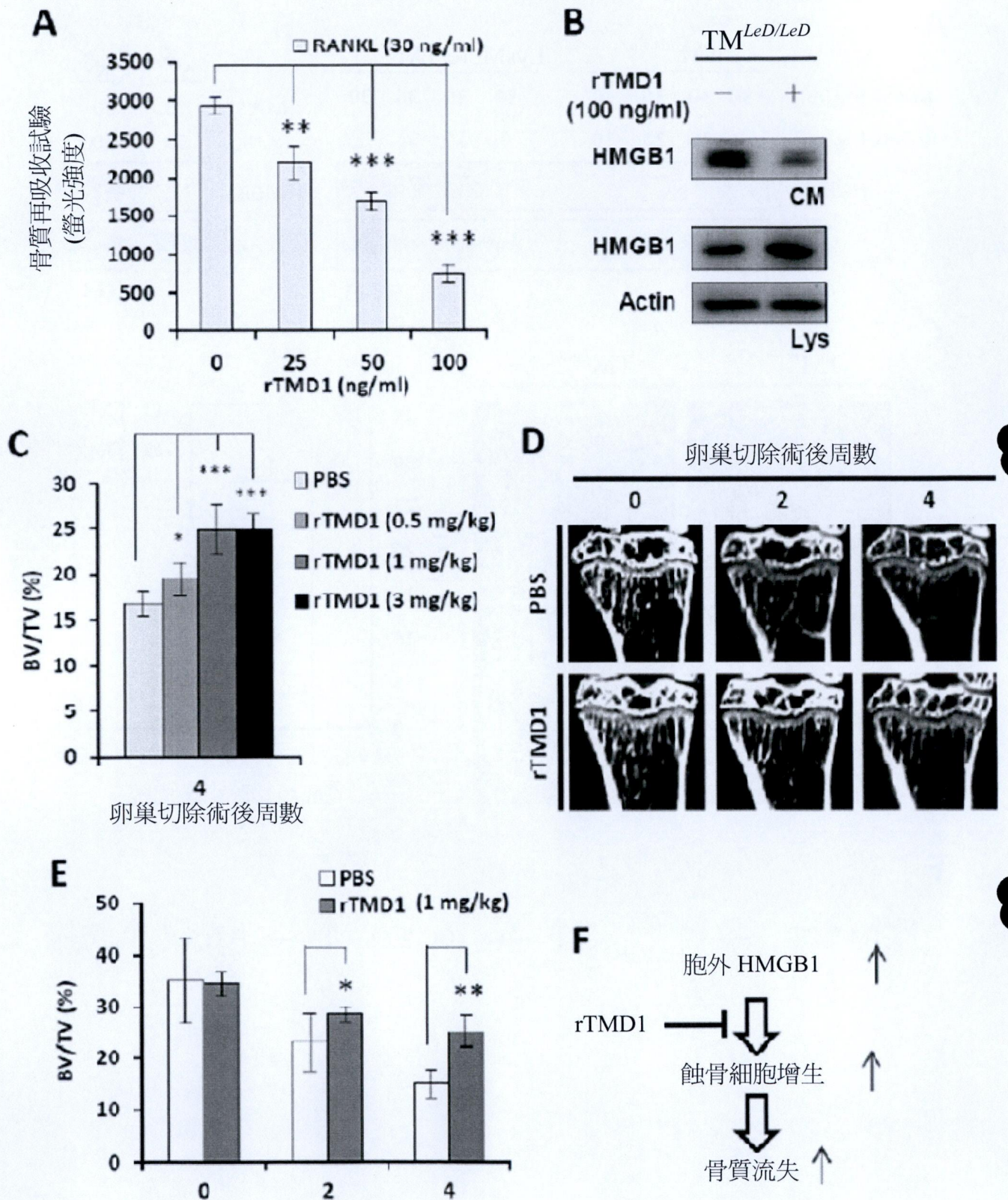


圖 6

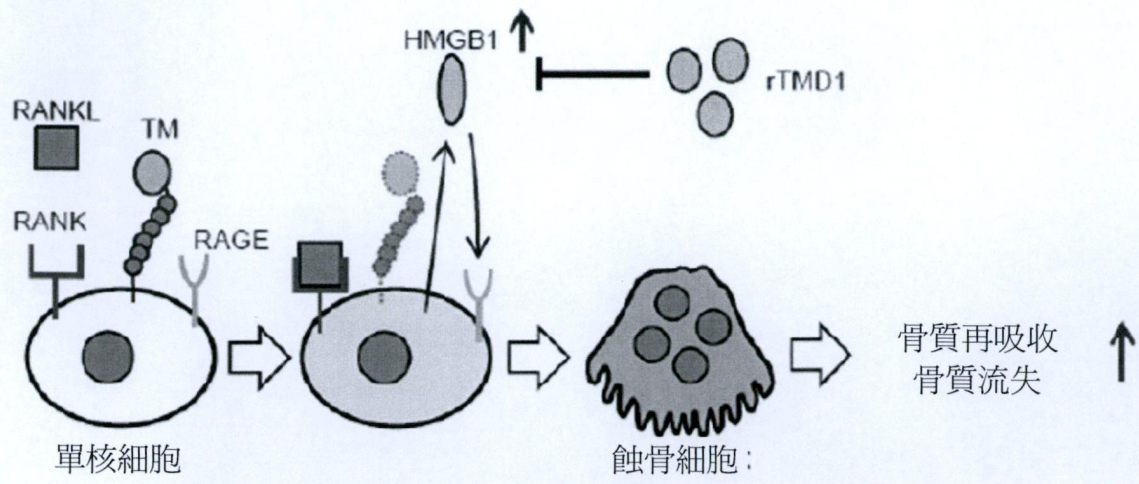


圖 7