

201413005A・B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業
(腎疾患対策研究事業)

新規消化管ペプチドグレリンによる
慢性腎臓病新規治療戦略の確立

平成24年度－平成26年度

総合研究報告書

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 裕

平成27(2015)年5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業
(腎疾患対策研究事業)

新規消化管ペプチドグレリンによる
慢性腎臓病新規治療戦略の確立

平成24年度—平成26年度

総合研究報告書

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 裕

平成27(2015)年 5月

目 次

平成24年度—平成26年度 総合研究報告書 -----5

I. 平成24年度—平成26年度 総合研究報告書

新規消化管ペプチドグレリンによる慢性腎臓病新規治療戦略の確立

-----9

伊藤裕 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

II. 研究成果の刊行に関する一覧 -----41

平成26年度 総括・分担研究報告 -----45

I. 平成26年度総括研究報告

グレリンの腎保護作用を腎不全患者への応用 -----49

伊藤裕 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

II. 平成26年度分担研究報告

グレリン受容体欠損マウスを用いたグレリンの腎保護作用に関する研究

----- 93

徳山博文 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

脇野 修 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

糖尿病性腎症に対するグレリン長期投与による腎保護効果の検討

-----101

篠塚 圭祐 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

脇野 修 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

臨床試験「新規消化管ペプチド「グレリン」による慢性腎臓病患者に対する安全性の確認
試験 -----109

中谷英章 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

脇野 修 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

III. 研究成果の刊行に関する一覧 -----153

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----155

**平成24年度—平成26年度
総合研究報告書**

I. 平成24年度—平成26年度 総合研究報告

総合研究報告書

グレリンの腎保護作用を腎不全患者への応用
慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 伊藤 裕

研究要旨 国民医療費の増加の一因である慢性腎臓病(CKD)に対し新たな病態の解明と治療戦略の構築が必要である。申請者はエネルギー代謝異常という独自の視点から、CKDの新たな病態として腎性インスリン抵抗性症候群（Renal Insulin Resistance Syndrome、RIRS）の概念を提唱した（別添図1）。通常インスリン抵抗性（IR）がCKDを引き起こすがCKDでは酸化ストレスの亢進および尿毒素の蓄積により、IRを惹起する事を明らかにした。このRIRSはミトコンドリア（Mit）機能障害とエネルギーの利用障害を引き起こす。さらにCKDでは尿毒素蓄積による食思不振が重積し、エネルギー消耗状態である protein-energy wasting syndrome (蛋白質・エネルギー消耗症候群、PEW)に陥り、PEWはCKD進展に寄与する。申請者はPEWにおけるMit機能異常の重要性を証明した。一方、新規CKD治療法の開発を目指し、わが国で発見された消化管ペプチド、グレリンに注目した。グレリンは抗酸化作用、Mit機能の改善効果および食欲増進作用を有し、RIRSからPEWに至る複数の病態に対し有効であると想起した。申請者はグレリンが抗酸化作用を介し腎障害を改善させること、糖尿病性腎症の進行を抑制することを明らかにした。以上の背景より本研究ではグレリンを新規CKD治療法へと臨床応用させ透析進行を予防することを目的とする医師主導の臨床治験を施行した。Phase I試験として非透析CKD患者6症例で安全性を確認した（UMIN000011673）。グレリン持続点滴投与を行い血中濃度は腎機能に影響されないこと。有害事象も消化管の運動亢進症状以外認められないことを明らかとした。平成27年度から平成30年度までに投与用量の調節のためのPhase II試験、有効性確認のためのPhase III試験を施行する。

A. 研究目的

国民医療費増大の一因である慢性腎臓病(CKD)に対し新たな病態の解明と治療戦略の構築が必要である。申請者はエネルギー代謝異常という独自の視点から、CKDの新たな病態として腎性インスリン抵抗性症候群（Renal Insulin Resistance Syndrome、RIRS）の概念を提唱した（別添図1）。通常インス

リン抵抗性（IR）がCKDを引き起こすがCKDでは酸化ストレスの亢進と尿毒素の蓄積により、IRを惹起する事を申請者は明らかにした。このRIRSはミトコンドリア（Mit）機能障害とエネルギーの利用障害を引き起こす。さらにCKDでは尿毒素蓄積による食思不振が重積し、エネルギー消耗状態である protein-energy wasting syndrome

(蛋白質・エネルギー消耗症候群、PEW)に陥り、PEWはCKD進展に寄与する。申請者はPEWでのMit機能異常の重要性を証明した(BBRC 2008, Diabetes 2009、Kidney Int 2013)。一方、新規CKD治療法の開発を目指し、消化管ペプチド、グレリンに注目した。グレリンは抗酸化作用、Mit機能の改善効果および食欲増進作用を有し、RIRSからPEWに至る複数の病態に対し有効であると想起した。グレリンは共同研究者が発見し(Nature 1999)、既にいくつかの消耗性疾患に有効性、安全性が証明されているが、非透析CKD患者での臨床評価は皆無である。申請者はグレリンが抗酸化作用を介し腎障害を改善させること(PLoS One. 2014)、腎臓の酸化ストレスの調節に重要であること、糖尿病性腎症の進行を抑制することを明らかとした。本研究では申請者独自の臨床概念と研究成果を総合しグレリンを新規CKD治療法へと臨床応用させることを目的とする。

B.研究方法

in vivo(マウス)での検討

16週齢マウスC57BL/6 miceにAIIをオスモティックミニポンプで持続静注し、4週間飼育する。飼育開始2週間後よりグレリン群にはグレリンを100 μ g/kg/dayを連日腹腔注射した。ARB群ではイルベサルタンを50mg/kg/dayを混餌で投与した。次にGhrelinの降圧作用による効果を除外する目的で同等に降圧してHydralazine 250mg/dl投与群との比較を検討した。さらに、Ghrelinの抗加齢抗老化のメカニズムをGhrelin receptorの発現が証明されているin vivo(尿細管細胞株を用いた系)でも検討した。更に内因性

GhrelinのAII依存性腎障害抑制効果についてGrowth Hormone secretagogue receptorノックアウトマウスを用いて検討した。さらにこのマウスに近尿細管特異的にGHSRを発現させるようNDRG-Creマウスを掛け合わせ

近位尿細管特異的な内因性Ghrelin/GHSRの機能を明らかとした。

さらに糖尿病性腎症に対するGhrelinの効果を検証する目的で肥満型糖尿病であるdb/dbマウス、STZ誘発糖尿病マウスを用いて検討した。

医師主導臨床治験

ヒトへのグレリン投与については、京都大学医学部探索医療センター・グレリン創薬プロジェクトにおいて、健常人にグレリンを静脈内投与した際の安全性、体内動態、薬理作用を検討し、重篤な有害事象を発生しないことが確認され報告されている。

(Akamizu et al. Eur J Endocrinol. 2004; 150: 447-55)。さらに、グレリンに関する臨床試験・治験として、摂食不振患者や変形性股関節症による人工股関節置換術患者を対象とした臨床第2相試験が実施されている。一方、アスピオファーマ株式会社では、ヒトグレリンの製造、製剤化に成功し(Makino T et al. Biopolymers. 2005; 79: 238-47.)、グレリンの工業的生産法を確立し、さらに、グレリンの前臨床試験や健常人での安全性や作用を確認し、神経性食欲不振症、ならびにカヘキシアを対象とした臨床第2相試験を、日本、及び欧米で開始している。また、血液透析患者に投与した報告もあり、有効性、安全性が示されている。(Damien R. Ashby et al. Kidney International 2009; 76: 199-206)

C. 研究結果

In vivo(マウス)のデータ

まず収縮期血圧は、Ghrelin は A II による血圧上昇を有意に低下させた (図 1)。

次に Ghr による腎障害抑制効果に関しては、尿細管障害のマーカーである尿中 NAGL および NAG は A II 投与で有意に増加したが、これらの尿細管障害を Ghr は有意に抑制した。しかし、ヒドララジン投与では抑制は出来なかった。また、尿蛋白は A II 投与で増加し、Ghr、ヒドララジン投与で有意に抑制された。以上より Ghr で認められた尿細管保護作用は降圧に依存せず、その一方で尿蛋白抑制効果は降圧に依存すると考えられた (図 2)。

A II による腎障害の要因の一つに酸化ストレスの上昇が知られている。そこで腎組織の酸化ストレスのレベルを 4HNE 染色で検討した。A II で腎皮質において 4HNE 染色が上昇し、Ghr がこれを顕著に抑制していたのを認め、この作用はヒドララジンによる降圧で認められなかった(図 3)。すなわち Ghr による抗酸化作用も血圧非依存性に働いていることが分かった。さらに、この抗酸化作用が腎老化反応抑制効果につながるかどうか検討した。腎皮質領域の SA- β -GAL 染色では、A II 投与群で染色が強く認められ、Ghrelin 投与群で染色が低下しているのを認めた。A II 投与による細胞老化を、Ghrelin 投与により抑制されたのが示唆された。またヒドララジンによる降圧は A II による組織の老化を抑えることは出来なかった (図 4)。老化関連因子である p53、p21 についても検討したが、A II により p53 の発現が誘導され、この誘導を Ghr は有意に抑制した。

同様の結果が p21 についても認められた(図 5)。

次に老化細胞が発現する TGF- β と PAI-1 の発現調節を RT-PCR 法で検討したが、A II 投与により発現誘導された TGF- β 、PAI-1 両者とも Ghr 投与群で抑制されていた(図 6)。

TGF- β 及び PAI-1 は組織の線維化に関わるサイトカインであることが知られている。そこでマッソントリクローム染色で腎組織の線維化を検討した。A II 投与群で NS 群と比較し有意に間質に強い線維化の亢進が認められ、Ghr 投与群で有意に線維化が低下していた。しかし、ヒドララジン投与群では線維化の低下を認めなかった(図 7)。

近年 Ghr の抗酸化作用に関しては明らかになっており、Ghr は神経細胞において、ミトコンドリアの脱共役蛋白である UCP2 の発現を上昇させ、その結果ミトコンドリアの膜電位を低下させ O₂-の産生が抑制された。その結果ミトコンドリア数の増加が認められた報告がされている。そこで我々は Ghr は抗酸化作用を介して組織保護に働くことが示唆され、その分子メカニズムを検討した。抗酸化の鍵分子である UCP2 の mRNA 発現は Ghr 投与した腎臓で有意に上昇していた。また、catalase の発現は 3 群間で有意差を認めなかった。さらに A II による活性酸素産生に参与する NADPH オキシダゼの isoform である NOX1 と NOX4 は A II 投与で上昇していた。またサブユニットである p22phox も A II 投与で上昇していた。これらを Ghr は有意に低下させた(図 8)。

さらに mitochondria 生合成の鍵分子である PGC1 α の発現は A II で低下し、Ghr で有意に増加し、その結果、Ghr 投与のマウスにおいては mitochondria の数が増加していた

(図 9)。以上 2 つの効果より、Ghr は UCP2 の発現上昇を介しミトコンドリア維持効果をきたしこれが組織保護効果を示したと考えられた。

Ghr は A II により誘導された酸化ストレスの上昇、老化反応、組織障害を抑制した。更に加齢関連のサイトカインである TGF- β および PAI-1 の発現を抑制し、抗線維化作用を示した。また Ghr は UCP2、PGC1 α の発現を誘導し、抗酸化作用、mitochondria の維持効果を示した。これが Ghr の腎障害保護作用、腎の老化反応抑制を引き起こしたと考えられた。これらの Ghr の作用は血圧非依存性であり尿細管細胞への直接効果と考えられた。

GHSR ノックアウトマウスでの検討

さらに内因性 Ghrelin の AII 依存性腎障害抑制効果について Growth Hormone sequestrating receptor ノックアウトマウスを用いて検討した。GHSR ノックアウトマウスについて、GHSR の遺伝子上流にトランスクリプションブロッキングカセットを組み込んである total の GHSR ノックアウトマウスを用い、genotyping を行った。更に RT-PCR でノックアウトの確認をした(図 10)。

WT と WT に AII500ng/kg/min を投与したものの、GHSR ノックアウトマウス (KO) と GHSR ノックアウトマウス (KO) に A II 500ng/kg/min を投与したものの 4 群を比較した。まず収縮期血圧では WT 群と KO 群で比較し、KO 群で有意に血圧が上昇していたのを認めた(図 11)。その変化は A II 投与

群でも同様のことが確認された。尿蛋白、尿細管障害のマーカーである NGAL、NAG は WT 群と KO 群で比較し、KO 群で有意な増加を認めた。A II 投与に関してはその差ははっきりしなかった(図 12)。

腎皮質領域の老化反応を引き起こす酸化ストレスを 4HNE 染色で検討すると、WT 群に比較し、KO 群が強く染色されていた(図 13)。また SA- β -GAL 染色は 4HNE 染色と同様に WT 群に比較し、KO 群が強く染色されていた(図 14)。内因性 Ghr が抗老化、抗酸化作用をもつことが確認された。最後に MT 染色で腎線維化を検討したが、KO 群で有意に腎線維化が認められた(図 15)。また腎臓の近位尿細管領域の電顕所見で、ミトコンドリアは酸化ストレスを受けると変形伸展拡大することが報告されているが、KO 群で有意にミトコンドリアの変形、伸展を認めた。さらにミトコンドリアの数は GHSR ノックアウト群で有意に低下していた(図 16)。GHSR ノックアウトマウスは WT と比較して老化の促進、線維化の亢進、酸化ストレスの上昇、腎機能障害の増悪が認められた。

腎近位尿細管特異的 Ghrelin レセプター発現マウスを用いた検討

最後に、腎近位尿細管特異的 Ghrelin レセプター発現マウスを用いた検討を行った。Flox -GHSR 1(Ghrelin receptor)null マウスと NDRG (n-myc downstream regulated gene 1) Cre マウスを交配させると transcriptional blocking cassette(TBC)の両端の loxP が外れ、これらにより下流の GHSR 遺伝子が転写される。よって、近位尿細管

のみ GHSR が発現するマウスが作成出来、近位尿細管特異的な Ghrelin の作用の検討が可能なる。具体的な実験方法は F1 同士をかけあわせて得られた 12 週の Flox -GHSR 1null/NDRG Cre マウスに 5 日間 Tamoxifen 1mg/mouse/day で腹腔内連日投与を行った。タモキシフェン投与群とタモキシフェン非投与群とで表現型を比較した。まず GHSR のレセプターの免疫染色を行ったところ、GHSR ノックアウト NDRGCre マウスでは近位尿細管の GHSR の回復を確認した (図 17)。次に 16 週のタモキシフェン非投与群とタモキシフェン投与群の表現型を比較したが収縮期血圧と体重には変化は認められなかった (図 18、19)。次に生化学所見である血清 BUN と Cr はタモキシフェン非投与群とタモキシフェン投与群の両者に有意差は認められなかったが (図 20、21)、尿蛋白と尿細管マーカーである NAG はタモキシフェン非投与群と比較しタモキシフェン投与群で有意に減少していた (図 22、23)。さらに腎組織の所見を検討したところ、酸化ストレスマーカーである 4HNE 染色では近位尿細管領域を中心にタモキシフェン非投与群と比較しタモキシフェン投与群が有意に酸化ストレスが低下していた (図 24)。しかし腎線維化は明らかな有意差を認められなかった (図 25)。このことより Mitochondria の多く局在する近位尿細管領域の GHSR が Ghrelin を介した抗酸化ストレス作用に重要な役割を担っていることが示唆された。

糖尿病性腎症における Ghrelin の効果

2 型糖尿病のモデルマウスである db/db マウスで検討を行った。16 週齢での尿検査で

は、尿蛋白および尿アルブミンのグレリン投与による抑制効果は認めなかった。(図 26) 血液検査での UN、Cr でもグレリン投与による差は認めなかった。(図 27) 体重は、対照群である m/m マウスではグレリン投与による差はなかったが、db/db マウスではグレリン投与により体重が増加した。(図 28) しかし、摂食量はグレリン投与でも変わらなかった(図 29)ため、グレリン投与による代謝の変化により体重が増加したことが示唆された。

次に、1 型糖尿病モデルとして STZ 投与マウスでの検討を行った。24 週齢での尿検査では尿アルブミンは STZ 投与の糖尿病発症で増加し、グレリンの長期投与でその増加が抑制された。尿蛋白でも、同様の傾向が見られた(有意差はなかった)。尿細管マーカーである NAG では、この傾向はなかった。(図 30) 血液検査では UN には STZ 投与で悪化し、グレリン長期投与により悪化が抑制される傾向にあった(有意差はなかった)。Cr には差を認めなかった。(図 31) 体重は STZ 投与による 1 型糖尿病発症により減少し、グレリンの長期投与によりその減少は抑制された。(図 32) 摂食量はグレリンの長期投与では変わなかった。(図 33) これらにより代謝の変化によって体重減少を抑制したことが示唆された。また、糖尿病性腎症に対する腎保護効果の機序を解明すべく、24 週齢マウスの sacrifice 後の腎臓を電子顕微鏡で観察した。すると、糸球体では、STZ 投与の群では基底膜が肥厚して凹凸が見られるのに対し、グレリンの長期投与にてその変化が抑制された。また、STZ 投与の群では podocyte の open slit pore は減少し close slit pore は増加するが、これらの変化はグレ

リンの長期投与した群は弱い変化であった。(図 34) 尿細管細胞では、STZ 投与によりミトコンドリアが全体的に大きく swelling と呼べるような変化をきたしており、内部構造のクリステは粗雑な印象であった。(図 35)

医師主導臨床試験

倫理審査(添付資料)を経て、Phase I 試験として非透析 CKD 患者 6 症例で安全性を確認した(UMIN000011673、図 36)。グレリン持続点滴投与を行い血中濃度は腎機能に影響されないこと(図 37, 38, 39)。有害事象も消化管の運動亢進症状以外認められないことを明らかとした(図 40)。

D. 考案

世界に先駆けて超高齢社会を迎える日本では、国民が単に長生きをするだけでなく、いかに「健康寿命」を伸ばすかが大きな課題である。政府の「日本再興戦略」において『国民の「健康寿命」の延伸』がテーマの一つに掲げられ、健康増進法に基づく「健康・医療戦略推進法」では健康長寿社会の形成が厚生労働行政の大きな課題として掲げられている。本研究の大きな特徴であり長所は従来の腎臓病という単一臓器の疾患にとらわれる事無く全身の代謝破綻および、sarcopenia、lipodystrophy という CKD 患者の QOL を脅かす PEW をも標的にした CKD 治療法を実現することである。RIRS および PEW の影響は CKD 進展のみならず、sarcopenia による転倒、lipodystrophy による糖脂質代謝異常から引き起こされる心血管合併症等健康長寿を脅かすものであり、グレリン補充はこの脅威に直接対応する。この臓器治療から全身治療の方針は CKD 治

療の大きなパラダイムシフトであり、疾病治療(臓器)から健康寿命達成(個体)までを追及する厚生行政の施政方向に合致する。しかも透析導入遅延効果は、医療経済上もその社会的貢献が極めて高い。共同研究者の寒川らが発見したペプチドを用いた translational research でありわが国発の世界に誇る研究であり、学術的にも特許取得上も国際展開に有利な治療方策であると考えられる。結論

新規ペプチドグレリンの腎不全への適応をめざし基礎および臨床研究を開始した。今後実施への基礎データの構築を目指したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 藤村慶子、脇野修、水口斉、原義和、長谷川一宏、徳山博文、林晃一、伊藤裕 アンジオテンシン II による腎老化作用に対する Ghrelin の腎保護効果、第 84 回日本内分泌学会学術集会、2011 年
2. 藤村慶子、脇野修、林晃一、伊藤裕 アンジオテンシン II による老化作用に対する Ghrelin の腎保護効果、第 54 回日本腎臓学会学術集会、2011 年
3. 藤村慶子、脇野修、水口斉、原義和、長谷川一宏、山口慎太郎、本間康一郎、神田武志、徳山博文、林晃一、伊藤裕 Angiotensin II による腎老化作用に対する Ghrelin の腎保護効果、第 34 回日本高血圧学会学術集会、2011 年
4. Keiko Fujimura, Shu Wakino, Hitoshi Minakuchi, Kazuhiro Hasegawa, Koichi Hayashi and Hiroshi Itoh. Ghrelin suppresses angiotensin II-induced

- premature renal senescence by reducing oxidative stress、ASN 2011
5. 藤村慶子、脇野修、水口斉、長谷川一宏、徳山博文、林晃一、伊藤裕
Angiotensin II による腎老化作用に対する Ghrelin の腎保護効果、日本心血管内分泌学会、2011 年
 6. 藤村慶子、脇野修、林晃一、伊藤裕
Angiotensin II による腎障害に対する Ghrelin の腎保護効果、第 55 回日本腎臓学会学術集会、2012 年
 7. 藤村慶子、脇野修、篠塚圭祐、徳山博文、林晃一、伊藤裕、消化管ペプチド Ghrelin の腎臓における生理的意義、第 57 回日本腎臓学会学術総会、2014 年、横浜。(日本腎臓学会誌、56 : 3, 303, 2014.)
 8. 脇野修、藤村慶子、篠塚圭祐、徳山博文、林晃一、伊藤裕、消化管

ホルモン Ghrelin の腎臓における作用、第 17 回日本心血管内分泌学会、2014 年、横浜。(日本内分泌学会雑誌、90 : 2, 752, 2014.)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

糖尿病性腎症予防治療薬特許申請準備中
発明者：伊藤 裕、脇野 修、中谷 英章、藤村 慶子、篠塚 圭祐、寒川 賢治
出願者：慶應義塾

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

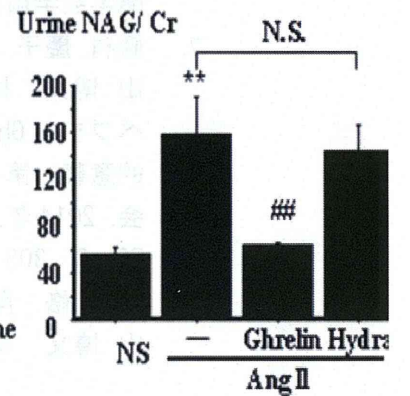
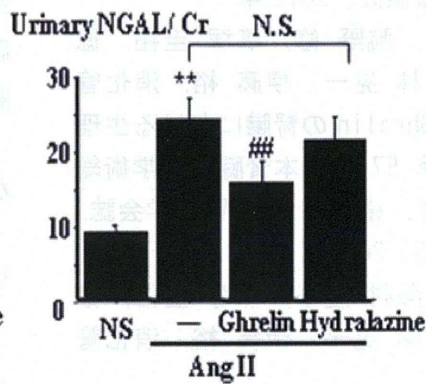
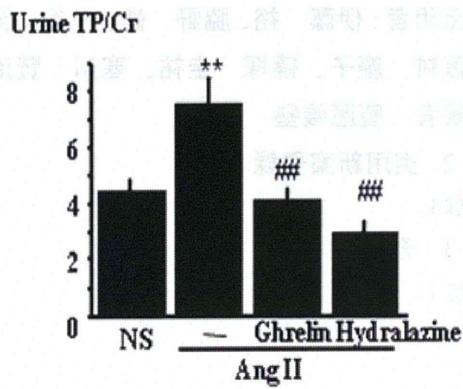
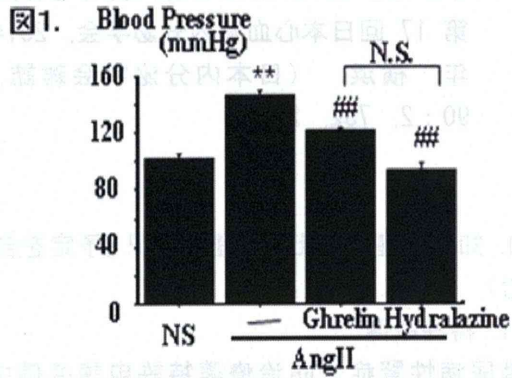


図3. 4HNE staining

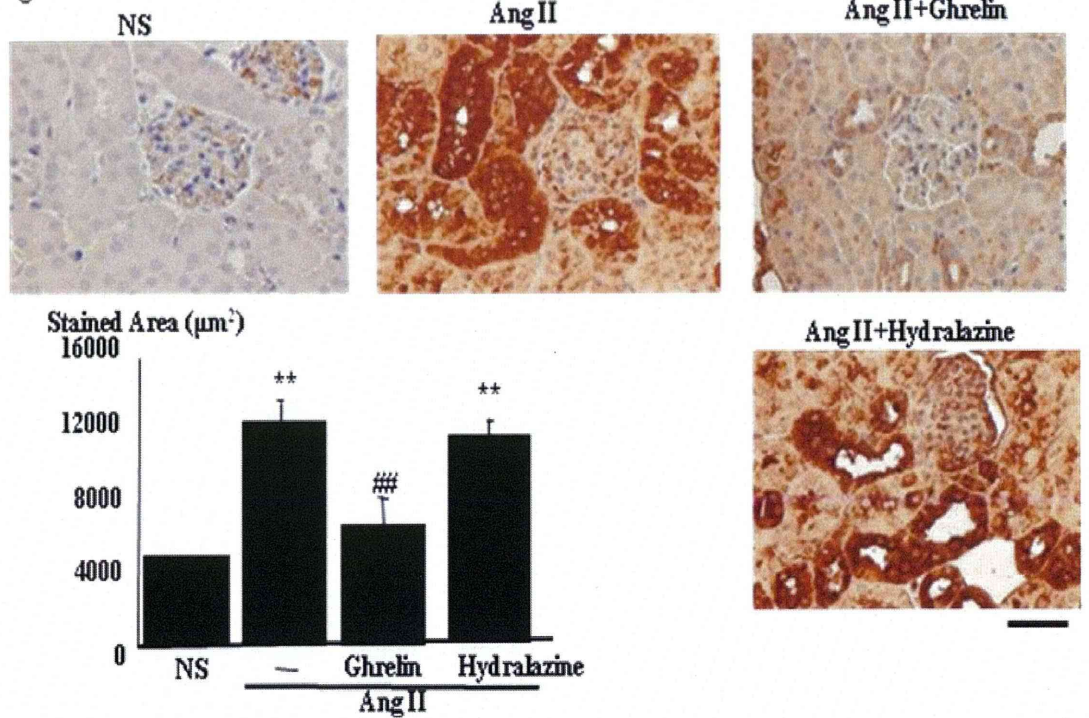


图4. SA-β Gal staining



图5.

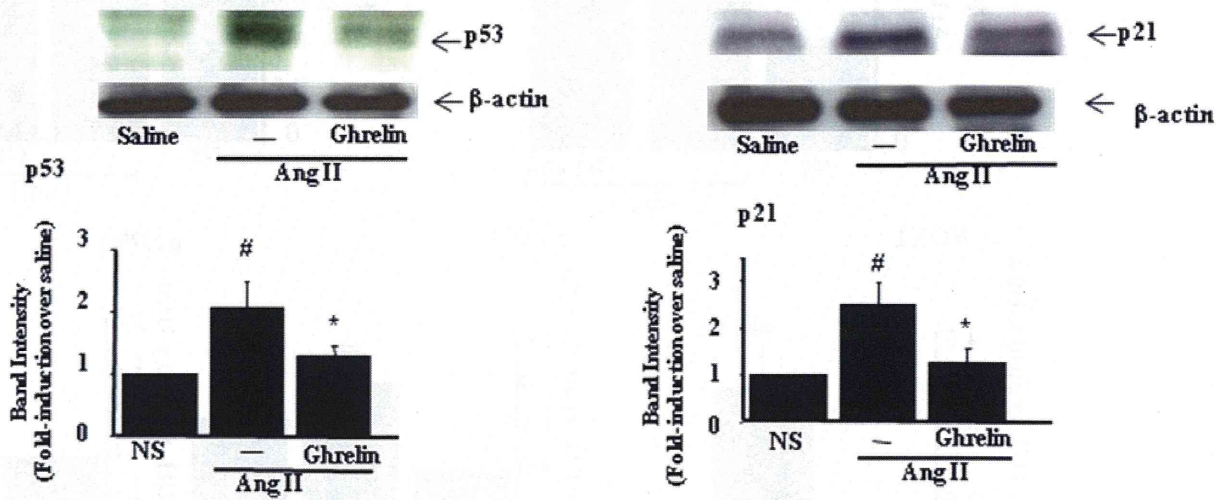


图6.

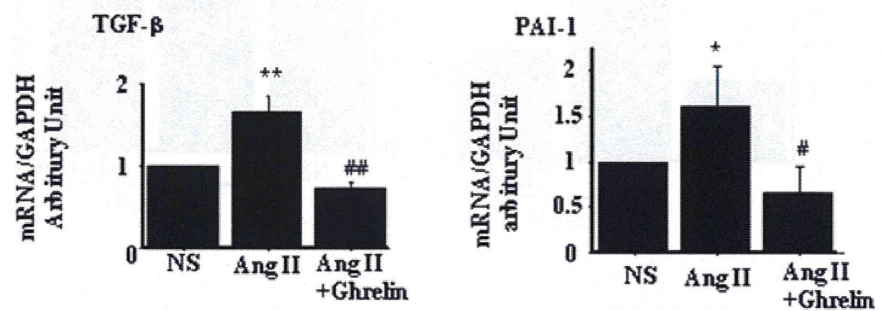


图7.

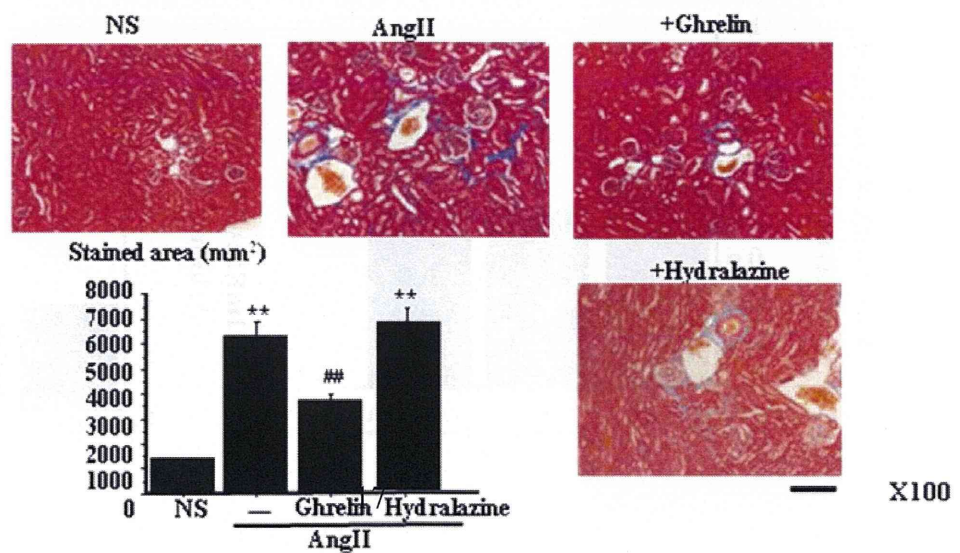
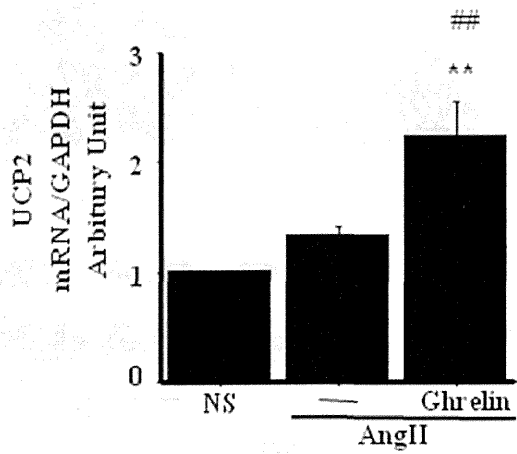
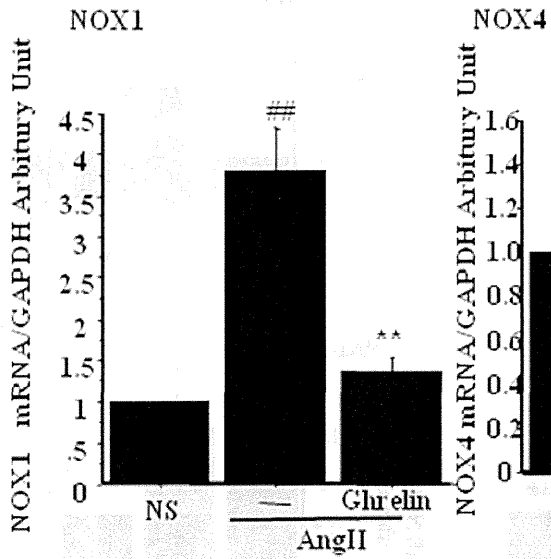
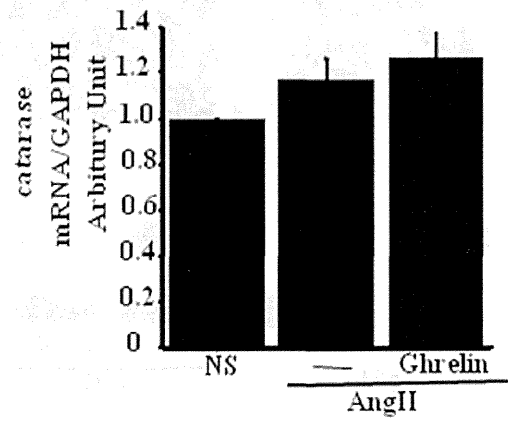


図8.
UCP2



catalase



p22^{phox}

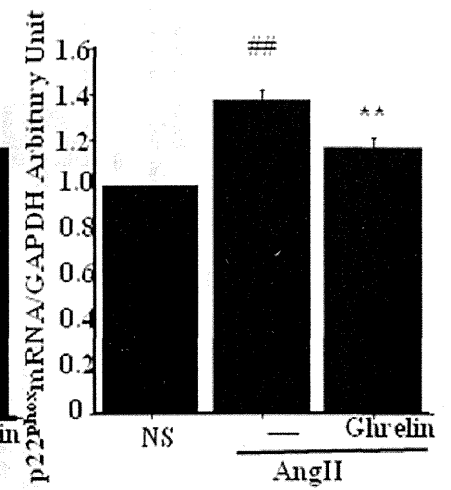
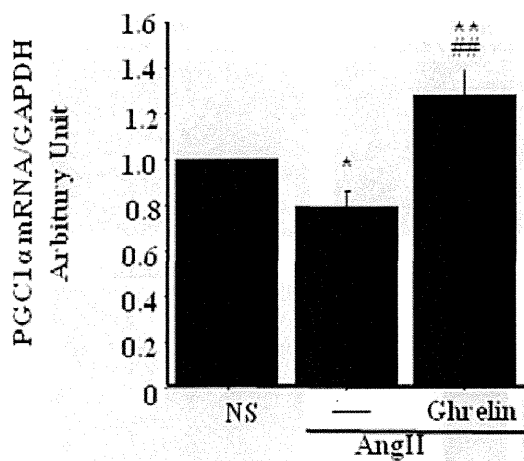
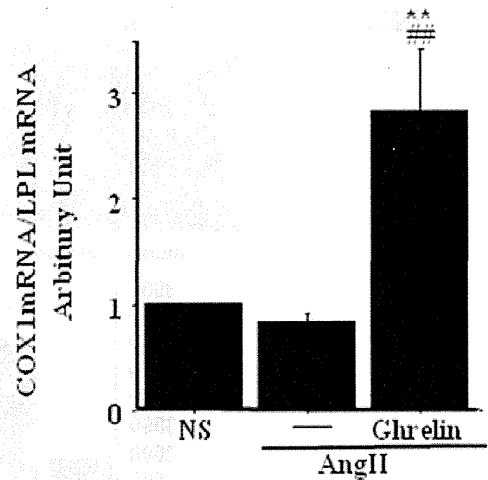


図9 PGC1 α



ミトコンドリア数



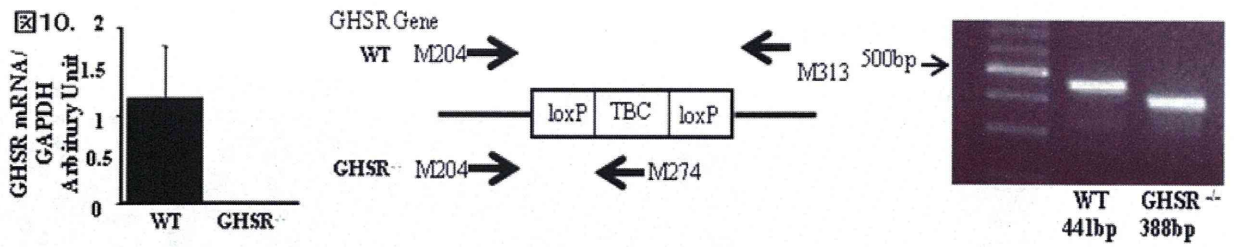


图11. Blood Pressure (mmHg)

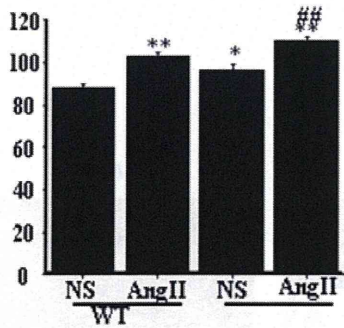
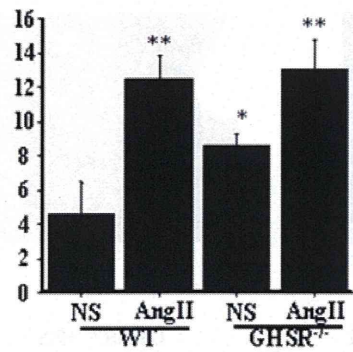
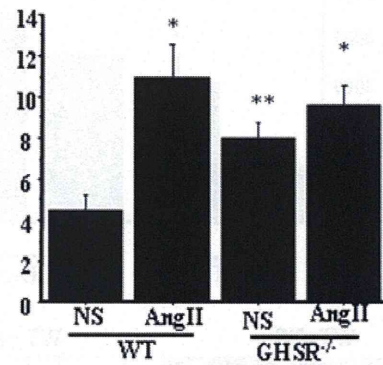


图12. Urinary TP/Cr



Urinary NAGL/Cr



Urinary NAG/Cr

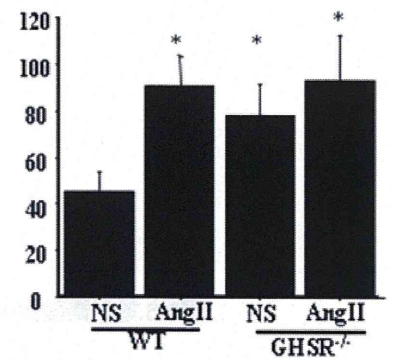


图13. 4HNE染色

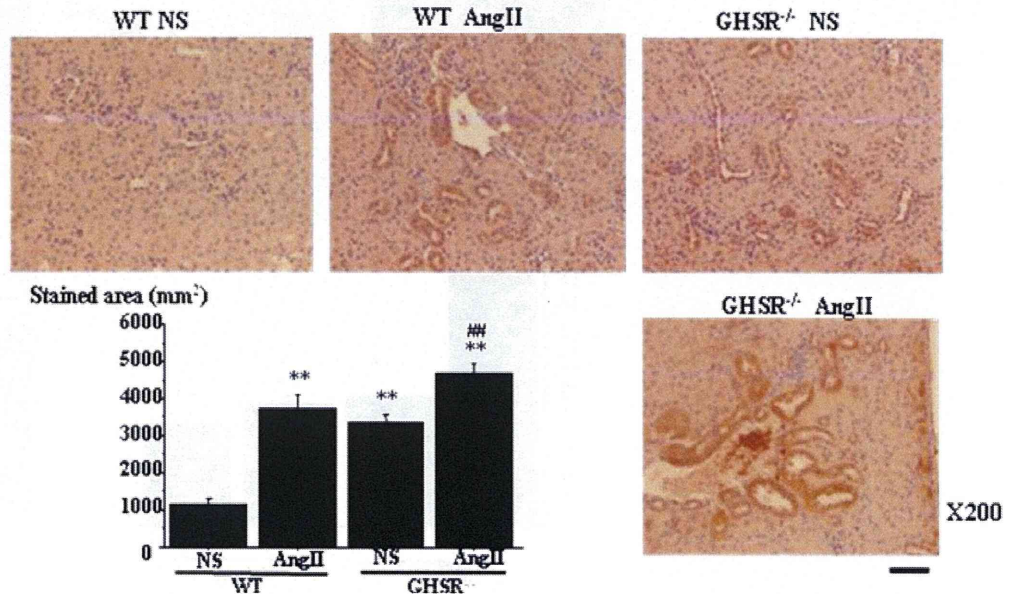
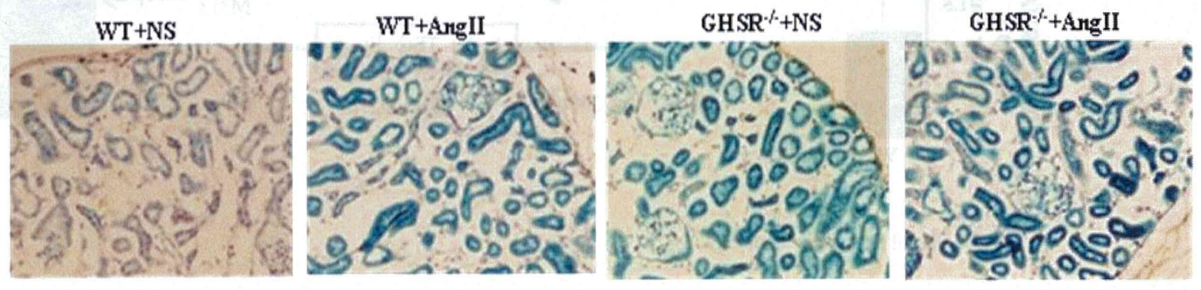
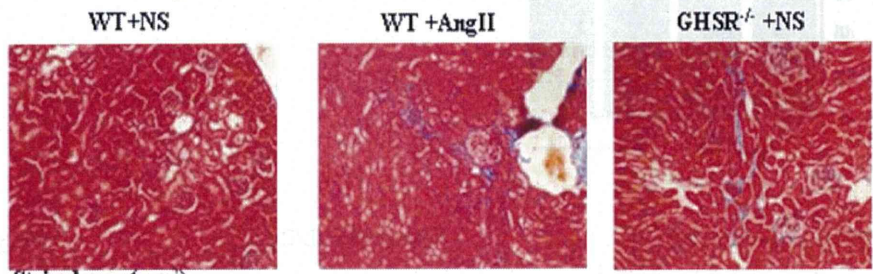


図14. SA-β Gal staining

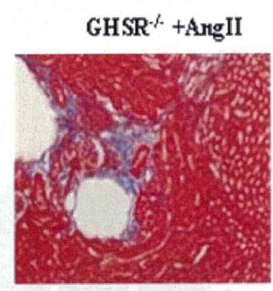
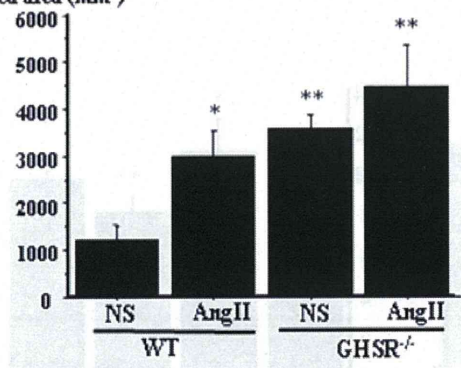


X200

図15. Masson Tricrome staining

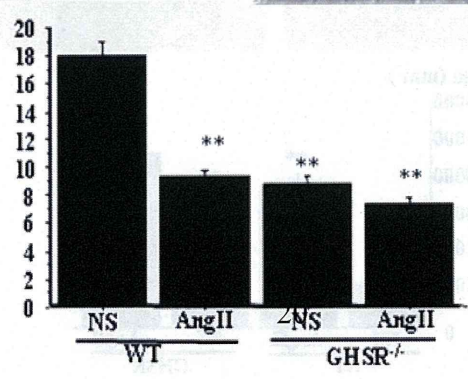
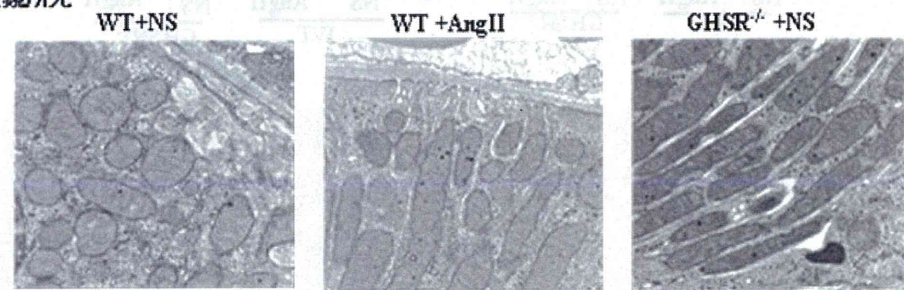


Stained area (mm²)



X100

図16.電子顕微鏡所見



X18400

図17. GHSR の免疫染色

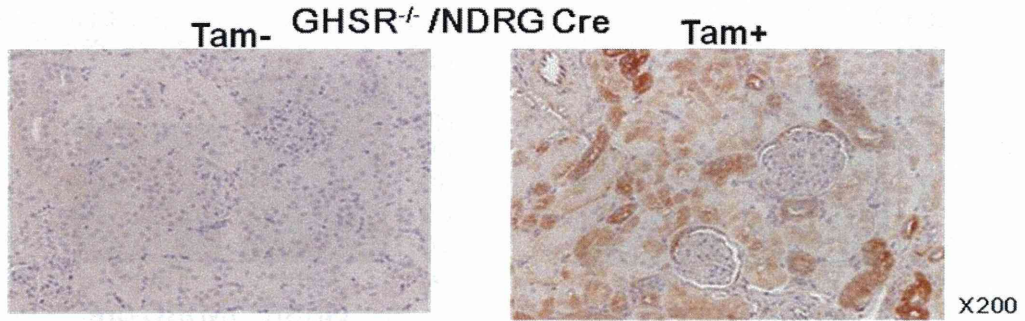


図18. 収縮期血圧

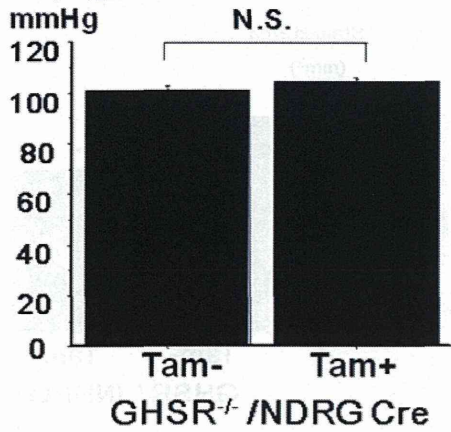


図19. 体重

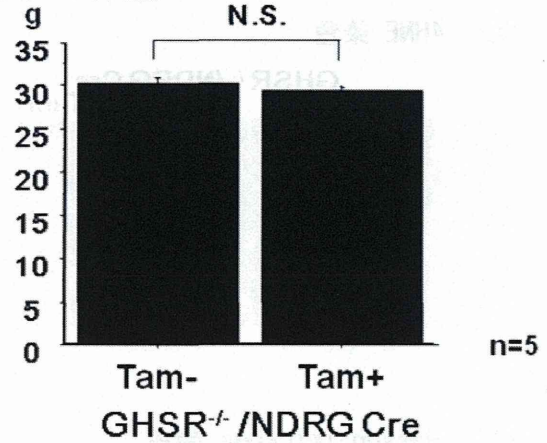


図20. 血清BUN

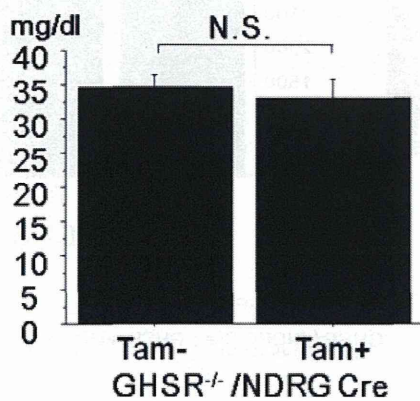


図21. 血清Cr

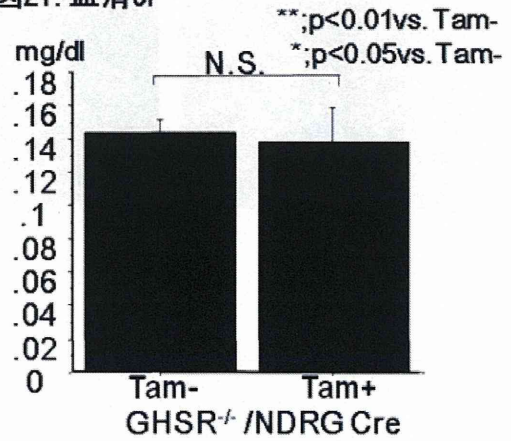


图22. 尿 TP/Cr

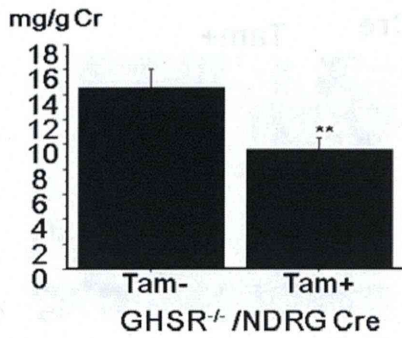


图23. 尿 NAG/Cr

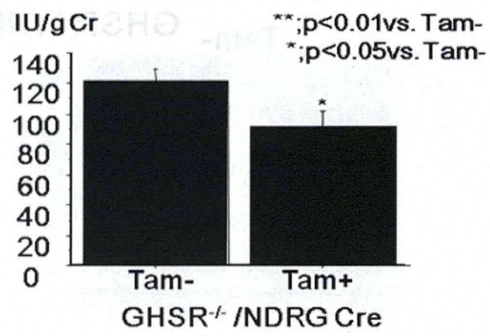


图24. 4HNE 染色

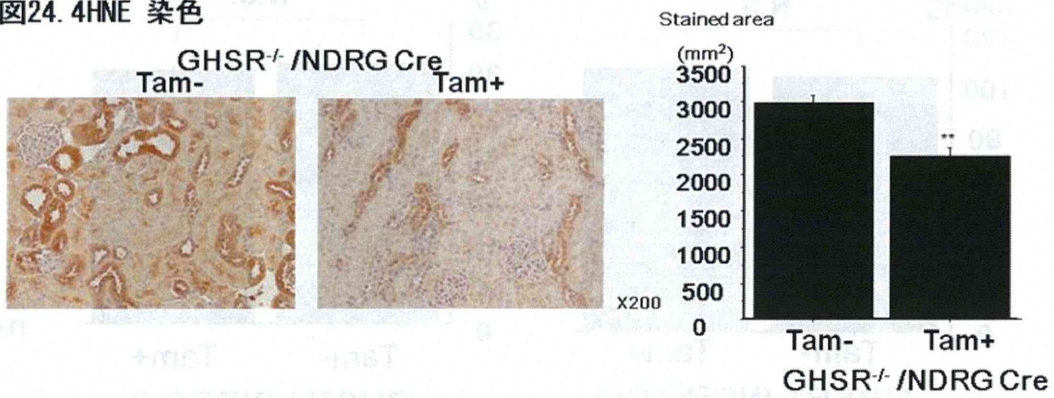
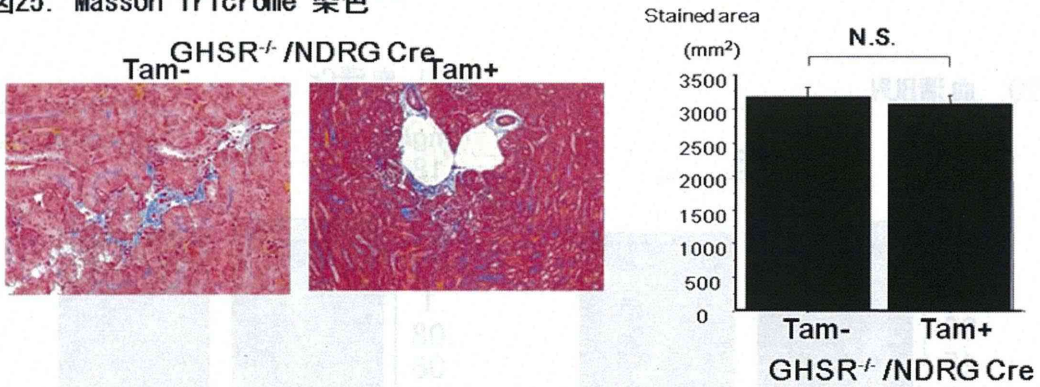


图25. Masson Tricrome 染色



GHSR^{-/-}; GHSR-null mice

GHSR^{-/-}/NDRG Cre; GHSR-null/NDRG Cre mice
; p < 0.01 vs. Tam-

图24. 4HNE 染色

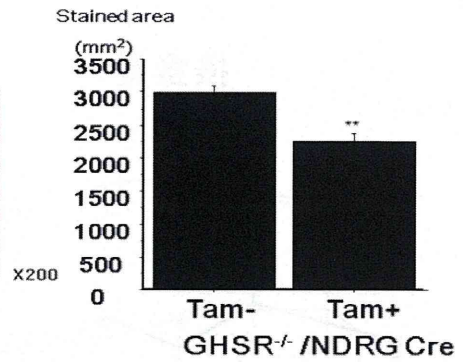
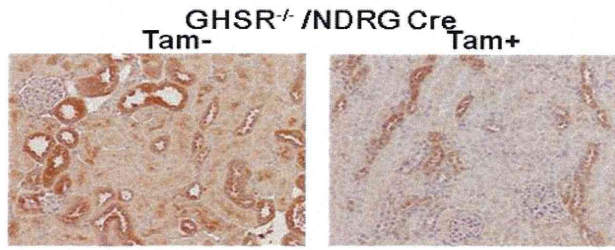
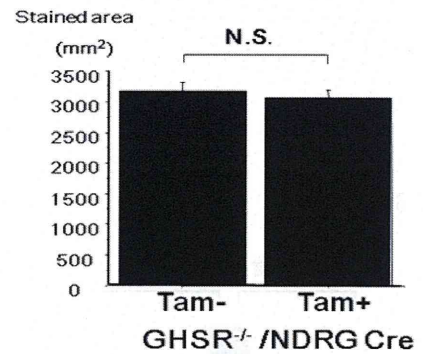
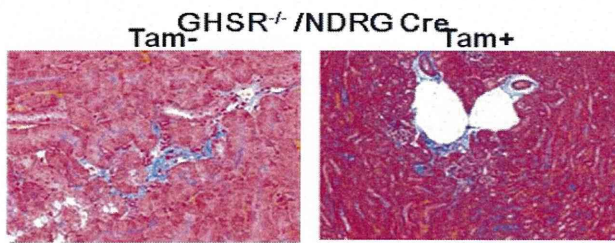


图25. Masson Tricrome 染色



**; p < 0.01 vs. Tam-

图 26

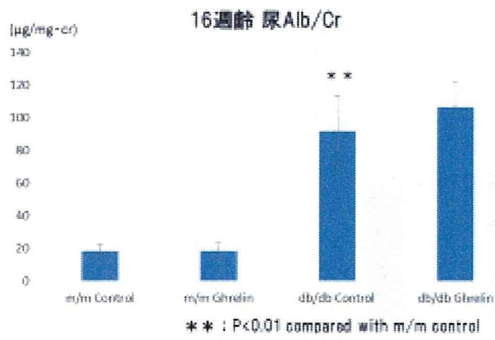


图 27

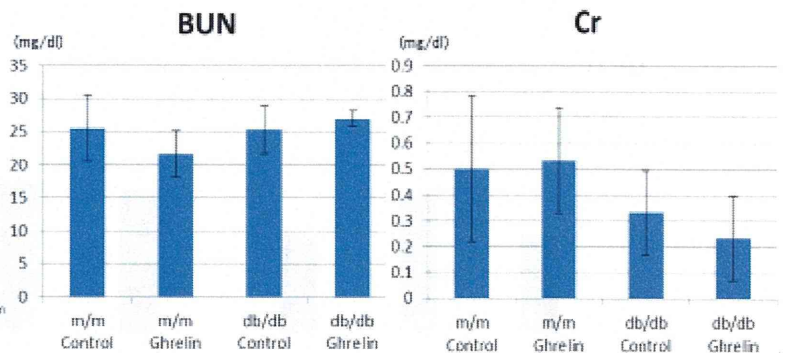


图 28

