

令和 6 年 9 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08355

研究課題名（和文）小児生体腎のネフロン数推算方法の確立

研究課題名（英文）Direct Estimation of the Total Number of Nephrons in Living Pediatric Patients Using Nephrectomy Specimens

研究代表者

平野 大志（Hirano, Daishi）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：90424663

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腎摘出術を受けた片側性腎腫瘍の小児患者を調べた。非硬化性糸球体の体積と密度を決定するために、断面および皮質の領域の立体評価を行った。糸球体密度は、スキャンした標本をPASとHEで染色した高解像度デジタル画像で測定し、皮質と糸球体の面積を測定した。対象は21例。推定されたネフロン数は成人患者の報告よりも有意に多かった。患者1人当たり測定された糸球体の数の中央値は64（IQR、60-78）であり、腎臓当たりのネフロンの総数の中央値は950846（IQR、868760-1049293）であった。これは、小児の生体腎のネフロン数を推定した最初の研究の一つである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴うネフロンの消失の影響を除外できる小児例を対象とした総ネフロン数の計測の意義は非常に大きいと考えられる。今後はさらに症例数を増やし、ネフロン数決定因子の探索、腎機能障害や将来的な腎予後評価について検討したい。

研究成果の概要（英文）：We examined pediatric patients with unilateral renal tumors undergoing nephrectomy. Stereological assessments of the areas of the cross-sections and cortex were performed to determine the volume and density of nonsclerotic glomeruli. Glomerular density was measured on high-resolution digital images of scanned specimens stained with PAS and HE, and measurement of the cortical and glomerular areas. The number and area of the glomeruli were measured. Kidneys from 21 children were examined. The estimated number of nephrons was significantly higher than reported for adult patients. The median number of glomeruli measured per patient was 64 (IQR, 60-78), and the median total number of nephrons per kidney was 950846 (IQR, 868760-1049293). This is one of the first studies to estimate the number of nephrons in the kidneys of living children. We contend that our results will provide a foundation for accurately determining the intrinsic renal reserve capacity.

研究分野：小児腎臓

キーワード：ネフロン数

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎臓の機能単位であるネフロン数は、腎臓の健康状態を決定する重要な要因である。慢性腎臓病 (CKD) は主にこの機能的なネフロン数の減少によって引き起こされる。1988年、Brennerらはネフロン数の減少に起因する糸球体濾過表面積の減少が、成人における高血圧および腎疾患の進行のリスク因子であると提唱した。近年、健全な腎機能を有する個体の剖検研究により、ネフロン数に顕著な個体間変動が認められ、長期的な腎機能予後を予測する上で、ネフロン数の差異が重要であることが強調された。

ネフロン数は遺伝的要因、人種的要因、出生前後の要因 (出生体重や在胎週数を含む) によって影響を受ける。健全腎提供者を対象とした横断研究では、年齢に関連した非硬化糸球体の減少と硬化糸球体の増加が示され、加齢に伴うネフロン硬化および瘢痕化の進行が示唆された。したがって、小児におけるネフロン数の推定は、加齢に伴うネフロン喪失の交絡効果を除外し、将来の腎機能評価のベースラインを提供するという点で極めて重要である。

従来、ネフロン数の推定は死後解析によってのみ行われてきた。しかしこの方法は、多大な時間と資源を要し、生体被験者には実用的ではなかった。近年、造影 CT 画像と病理学的腎標本の三次元構造解析を用いた新たなアプローチが、生体腎におけるネフロン総数の推定に導入され、成人コホートに適用された。

### 2. 研究の目的

本研究は、Denicらが記述した手法[15]を用いて、外科的腎摘出術を受ける小児患者におけるネフロン数を推定することを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究は、ヘルシンキ宣言の理念および日本の厚生労働省による疫学研究に関する倫理指針に則って実施された。東京慈恵会医科大学倫理審査委員会より倫理承認を得た (承認番号: 30-394(9415))。研究の後ろ向き性質を鑑み、インフォームド・コンセントおよび公表に関する同意要件は免除された。

#### (1). 患者選択

研究対象集団は、2010年1月1日から2021年1月31日の間に、順天堂大学病院および東京都立小児総合医療センターにおいて腎腫瘍に対する腎摘出術を受けた小児患者で構成された。包含基準は、腎腫瘍に対する腎摘出術を受け、術前に造影 CT 検査を受けた小児とした。除外基準は、両側性腫瘍、染色体異常を有する小児、または測定に必要な病理標本や CT 画像に問題がある症例とした。

#### (2). 定義

早産は在胎週数 37 週未満、低出生体重は出生体重 2500g 未満と定義した。蛋白尿は尿中蛋白:クレアチニン比  $\geq 0.20$  g/gCr と定義した。血尿は尿沈渣の顕微鏡検査で高倍率視野あたり赤血球  $\geq 5$  個と定義した。推定糸球体濾過量 (eGFR) は、上村らの式に基づき血清クレアチニン (sCr) と身長から算出した。

#### (3). 術後腎組織の形態計測および立体計測

術後腎組織標本はホルマリン固定後、パラフィン包埋した。連続する 2 枚の  $3\mu\text{m}$  厚切片を periodic acid-Schiff (PAS) 染色または hematoxylin & eosin (H&E) 染色し、Aperio AT2 スキャナー (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて高解像度デジタル画像にスキャンした。微細構造を著しく歪める人工産物のない組織切片で、少なくとも  $12\text{mm}^2$  の皮質面積と 50 個以上の糸球体を含むものを解析対象とした。母集団が正規分布でなくても、サンプルサイズ  $\geq 30$  では標本平均の分布はほぼ正規分布となる。そのため、本研究では最小糸球体数を 50 と設定した。非硬化性糸球体の密度は、生検標本で同定された断面面積と皮質面積の立体計測評価に基づいて算出した。糸球体密度は、摘出された H&E または PAS 染色標本を高解像度デジタル画像にスキャンし、皮質および糸球体面積を測定することで決定した。画像は Leica Aperio Image Scope ソフトウェア ([www.aperio.com](http://www.aperio.com)) を用いて評価した。

平均糸球体面積は、各腎組織セグメントにおける全系球体の総面積を総糸球体数で除して算出した。平均糸球体体積は、測定された平均糸球体面積から以下の式で推定した:

$$\text{糸球体体積} = (\text{糸球体面積})^{3/2} \times \pi / d$$

ここで、 $\pi$  は無次元の形状係数 (球体の場合  $\pi = 1.382$ )、 $d$  は糸球体サイズの変動性を考慮するためのサイズ分布係数 ( $d = 1.01$ ) である。

#### (4). 腎皮質体積および腎実質体積の測定

腎実質および皮質体積は、ITK-SNAP version 3.8.0 (<http://www.itksnap.org>) を用いて、CT 血管造影の動脈相で得られた横断像上で皮質および髄質を半自動的にセグメント化することにより、先行研究の方法に従って測定した。測定は正常側のみで行った。造影剤注入後の動脈相で得られた造影画像から、三次元皮質画像を半自動的に構築した。腎動脈、腎静脈、腎盂、尿管、腎洞、腎洞内脂肪、隣接組織、および隣接臓器は、作成された全ての画像から除外した。

#### (5). ネフロン数の推定

総ネフロン数は、Denic らの式を用いて皮質面積と糸球体密度に基づいて推定した[15]。ただし、本研究では片側のみが正常腎であったため、原式で使用されていた係数 1/2 は計算から省略した。したがって、本研究では以下の式を用いた：

$$\text{推定糸球体数/腎臓} = (\text{皮質体積} \times \text{糸球体密度}) / (1.43^* \times 1.268^{**})$$

ここで、\*は生検切片のホルマリン固定およびパラフィン包埋による 43%の組織体積収縮を考慮した補正係数、\*\*は腎生検後の灌流喪失による 26.8%の組織体積収縮を考慮した補正係数である。糸球体密度（皮質 1 平方ミリメートルあたり）は、Weibel-Gomez の立体計測法を用いて以下のように算出した：

$$\text{糸球体密度} = 1 / \left( \text{総糸球体数/皮質面積} \right)^{3/4} / \left( \text{総糸球体面積/皮質面積} \right)$$

ここで、 $\frac{3}{4}$  は無次元の形状係数（球体の場合  $\frac{3}{4} = 1.382$ ）である。

### 3-6. 統計解析

連続変数は中央値および四分位範囲（IQR）で、カテゴリー変数は頻度で表した。個別の要因と背景因子との関連を検討するため、連続変数には Wilcoxon の順位和検定を、カテゴリー変数には Fisher の正確確率検定を適宜用いた。ネフロン数と背景因子との相関を評価するため、Spearman の相関係数を算出した。さらに、ネフロン数と臨床因子との関連を評価するため、線形回帰分析を実施した。統計解析には STATA (version 16.0; Stata Corp, College Station, TX, USA) を使用した。全ての解析において、 $P < 0.05$  を統計学的有意とした。

## 4. 研究成果

### (1). 結果

本研究の包含基準を満たした小児は 21 名であった。対象集団は 13 名の男児（61.9%）と 8 名の女児（38.1%）で構成され、腎摘出時の年齢中央値は 2.5 歳であった。腎臓 1 個あたりの推定ネフロン数の中央値は 950,846（四分位範囲：868,760-1,049,293）であった。ネフロン数は、腎摘出時の年齢（ $r = 0.47$ ,  $P = 0.034$ ）、体表面積（ $r = 0.45$ ,  $P = 0.036$ ）および腎皮質体積（ $r = 0.51$ ,  $P = 0.034$ ）と有意な正の相関を示した。

### (2). 結論

本研究は小児におけるネフロン数について新たな知見を提供し、長期的な腎機能予後を予測する上で早期のネフロン評価が重要であることを強調している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂口晴英
2. 発表標題 生体腎を用いた小児の総ネフロン数推算方法の確立
3. 学会等名 日本小児腎臓病学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	神崎 剛  (Kanzaki Go)  (00816473)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教    (32651)	
研究分担者	湯坐 有希  (Yuza Yuki)  (30277090)	地方独立行政法人東京都立病院機構東京都立小児総合医療センター（臨床研究部）・その他・部長    (82686)	
研究分担者	西崎 直人  (Nishizaki Naoto)  (30561435)	順天堂大学・医学部・先任准教授    (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------