

ラットおよびヒトにおける正常糸球体上皮細胞の形態計測

菱木俊匡 白土 公 富野康日己

Morphometric analysis of normal glomerular epithelial cells in rat and human

Toshimasa HISHIKI, Isao SHIRATO, and Yasuhiko TOMINO

Division of Nephrology, Department of Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

It has been postulated that morphological changes of podocytes might be related to glomerular sclerotic lesions in experimental models and patients with glomerular diseases. To estimate the absolute number of podocytes in mammalian normal glomerulus, we analyzed normal glomeruli in four rats and six humans. In PAS-stained light microscopic sections, at least 25 midsections of open glomeruli were photographed. Stereologic estimation was performed to obtain the following values : absolute values of glomerular volume (V), glomerular surface area (S), podocyte and intraglomerular cell number per glomerulus (P and IGC), glomerular surface area covered by one podocyte (S/P) and glomerular volume occupied by one intraglomerular cell (V/IGC). The glomerular volume, glomerular surface area, and podocyte and intraglomerular cell numbers per glomerulus of human were significantly increased compared with those of the rat ($V:2.70\pm0.86>0.89\pm0.19$, $S:4.84\pm1.26>1.88\pm0.26$, $P:407.7\pm88.2>153.8\pm84.0$, $p<0.01$ vs rat). On the other hand, there were no significant differences in glomerular surface area covered by one podocyte and glomerular volume occupied by one intraglomerular cell between the humans and rats ($S/P:1.25\pm0.20$, 1.29 ± 0.05 , $V/IGC:2,471\pm487$, $2,227\pm201$, $p<0.01$ vs rat). These data were almost the same as previously reported values. It appears that these values can be considered as standards for rats and humans in morphometric analysis of the glomerulus.

Jpn J Nephrol 1999 ; 41 : 764-768.

Key words : podocytes, absolute values, morphometric analysis

要 旨

【目的】 糸球体上皮細胞の形態学的変化は硬化病変の形成に関与していることが注目されている。今回、ラットおよびヒトにおける正常糸球体上皮細胞の形態学的指標を、形態計測的手法を用い解析した。

【方法】 11週齢の正常雄性SDラット(4匹)と高血圧や腎炎の基礎疾患のない16~47歳のヒト(6例)の光顕PAS染色標本を用い、それぞれ25~50個の糸球体を計測した。Weibel³⁾の方法をもとに糸球体体積(V)、糸球体表面積(S)、糸球体上皮細胞数(P)を求めた。これらの値より1個の糸球体上皮細胞が覆う糸球体基底膜の表面積を算出した。

【結果】 糸球体体積(V)、糸球体表面積(S)、糸球体上皮細胞総数(P)のいずれもヒトがラットより有意に大きかった($V:2.70\pm0.86>0.89\pm0.19$, $S:4.84\pm1.26>1.88\pm0.26$, $P:407.7\pm88.2>153.8\pm84.0$, $p<0.01$ vs ラット)。一方、1個の糸球体上皮細胞が覆う糸球体基底膜の表面積(S/P)は、ヒトとラットでほとんど差はみられなかった(1.25 ± 0.20 , 1.29 ± 0.05 , $p<0.01$ vs ラット)。

【結論】 正常糸球体では、種差にかかわらず1個の糸球体上皮細胞が覆う基底膜の表面積は一定で、糸球体表面積の大きいヒトではラットに比べ糸球体1個あたりの糸球体上皮細胞総数が多いことが明らかにされた。以上の所見は、諸家のこれまでの報告ともほぼ一致しており、今後の

研究の基準値になりうると思われた。

緒 言

糸球体硬化の形成にはメサンギウム基質の産生異常や構成成分の変化が関与しているとされてきたが、近年、糸球体上皮細胞の剝離・脱落とそれに続くボウマン嚢との癒着も重要であることが、種々の動物実験により明らかにされてきている^{1,2,5)}。

胎生後糸球体上皮細胞は細胞分裂せず^{1,2,4~7)}、剝離・脱落により細胞数が低下するため、糸球体上皮細胞数は糸球体硬化の一つの指標になりうると思われる。Pagtalunan⁸⁾もインスリン非依存性糖尿病性腎症症例において糸球体上皮細胞数と疾患活動性との関連性を指摘し、1個の糸球体上皮細胞が覆う基底膜の表面積の算出も試みている。しかし、その基準値はいまだ不明であり、種々の動物実験においてもその算出はなされていない。これらの基準値を知ることが、今後の糸球体上皮細胞と糸球体硬化との関連性を明らかにするうえで大変重要である。

今回、われわれはラットおよびヒトの正常糸球体上皮細胞数を形態計測的手法を用いて算出・解析し、これまでの報告と比較し、種差を超えた指標についても考察を加えたので報告する。

対象と方法

1. 対象

雄性SDラット4匹とヒト健常腎組織6例を使用した。雄性SDラットは11週齢で、体重300~350gであった。ヒト健常腎としては腎癌症例で高血圧や腎炎を認めないものを選択し、摘出腎の正常部位のみを使用した。男女比は4対2、平均年齢は36.7歳(16~47歳)であった。

2. 方法

形態学的解析：腎組織をホルムアルデヒド固定後パラフィン包埋し、厚さ3 μ mの連続切片を30枚以上作製した。腎切片はperiodic-acid Schiff(PAS)染色を行い、糸球体は皮質外側に存在する最大径に最も近いもの(midsection)のみを25~50個(平均32.6個)選択し、100倍で写真撮影を行った。形態学的計測のために写真をさらに500倍と1,000倍に拡大コピーし、糸球体係蹄壁をペンシルマーカーで注意深くトレースした。

糸球体係蹄壁で囲まれた部分の全面積(AG)といった糸球体構成物の面積や全長はデジタイザーとNikon COSM-

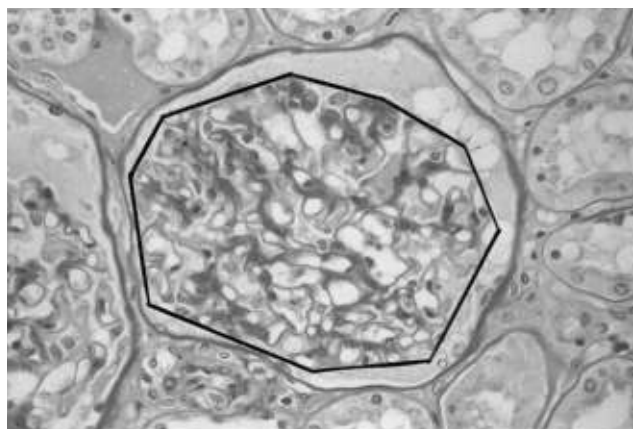


Fig. 1

The glomerulus on the sampling section is enclosed in a minimal string polygon which is used for the estimation of the profile area.

The profile density $[N_A(\text{pod})]$ of the podocyte nuclei is determined by dividing the number of podocyte nucleus by profile area.

OZON-IS(画像解析システム)を用いて測定した。糸球体体積(V)は、以下の公式より算出した。

$$V = (\beta/k) (AG)^{3/2}$$

Weibel³⁾の方法(stereological methods)より、ラットおよびヒトのshape coefficientである β は1.38とし、size distribution coefficient for spheresであるkは1.1とした。糸球体係蹄壁の面積密度(surface density of the peripheral capillary wall)と糸球体構成物の体積密度(volume density of glomerular components)もWeibel³⁾の方法に従って算出した。

糸球体構成物の体積と面積の絶対値は適当な密度に糸球体体積を乗じて算出し、上皮細胞総数(P)も以下のような手順で求めた。まず、500倍の拡大コピーを使用して、糸球体のprofile areaを計測した。糸球体のprofile areaは糸球体係蹄壁で囲まれた部分の全面積(AG)を大まかに近似した面積に相当し、デジタイザーとNikon COSMOZON-IS(画像解析システム)とで自動算出できた(Fig. 1)。糸球体上皮細胞の核のprofile density $[N_A(\text{pod})]$ とは糸球体のprofile area内に含まれる糸球体上皮細胞の核の数の単位面積当たりの数密度であり、その値は糸球体上皮細胞の核の数をprofile areaで除することで算出した。次に、1,000倍の拡大コピーを使用して上皮細胞の核のvolume fraction $[V_V(\text{pod})]$ を求めた。上皮細胞の核のvolume fraction $[V_V(\text{pod})]$ は、上皮細胞の核の線面積を糸球体のprofile areaで除して、上皮細胞総数(P)は糸球体上皮細胞の核のnumeric number $[N_V(\text{pod})]$ に糸球体体積(V)を乗じて求め

Table. Data of morphometric analysis(human & rat)

	V($\times 10^6 \mu\text{m}^3$)	S($\times 10^5 \mu\text{m}^2$)	P(/glomerulus)	S/P(μm^2)	IGC(/glomerulus)	V/IGC(μm^3)
Rat(4 cases, 175 glomeruli)	0.87 \pm 0.19	1.88 \pm 0.26	153 \pm 13	1,297 \pm 84	393 \pm 54	2,227 \pm 201
Human(6 cases, 225 glomeruli)	2.70 \pm 0.86*	4.84 \pm 1.27*	407 \pm 88*	1,249 \pm 241	1,026 \pm 201*	2,471 \pm 487

V : average glomerular volumes, S : average glomerular surface area, P : average number of podocytes in a glomerulus, S/P : average glomerular surface areas covered by one podocyte, IGC : average number of intraglomerular cells in a glomerulus, V/IGC : average glomerular volume occupied by one intraglomerular cell, *p<0.05 vs rat

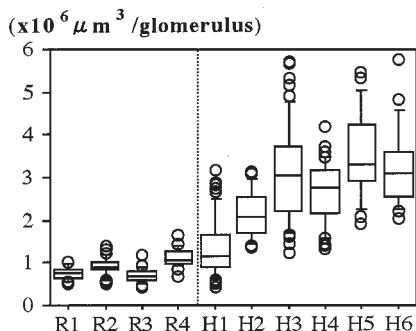


Fig. 2. Average glomerular volume

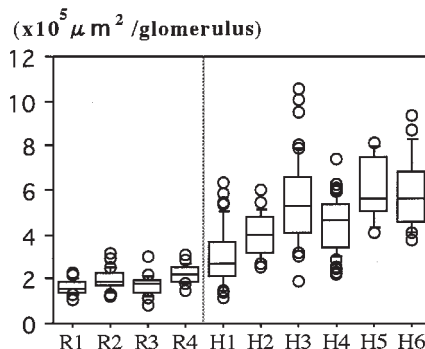


Fig. 3. Average glomerular surface area

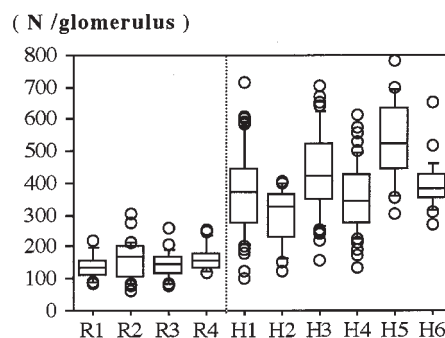


Fig. 4. Average number of podocytes in a glomerulus

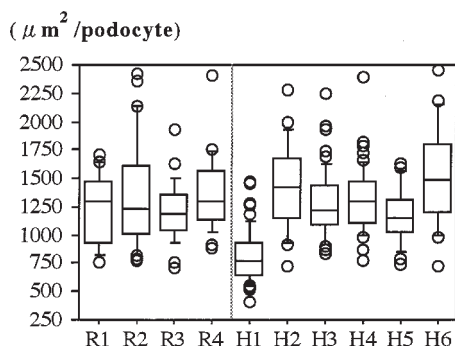


Fig. 5. Average glomerular surface areas covered by one podocyte

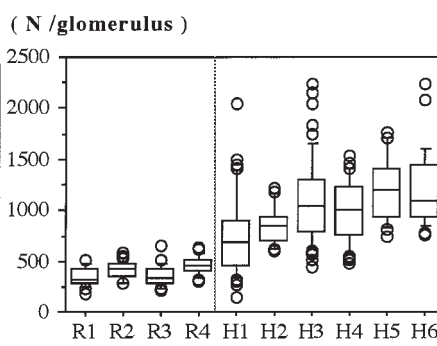


Fig. 6. Average number of IGC in a glomerulus

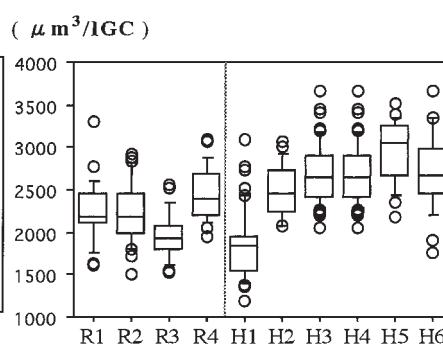


Fig. 7. Average glomerular volumes occupied by one IGC

Fig. 2~7. R1-4 : rat renal tissues, H1-6 : human renal tissues, IGC : average number of intraglomerular cells

た。上皮細胞の核の numeric number[Nv(pod)]は以下の公式より算出した。

$$Nv(pod) = 1/\gamma[(NA(pod))^3/(Vv(pod))]^{1/2}$$

Shape constant である γ は上皮細胞の核が回転楕円体であるという仮定で算出し、ラットとヒトそれぞれ 20 個の糸球体上皮細胞の長軸長と短軸長との比から 1.72 と 1.52 となった。非上皮細胞総数(IGC)も同様の方法で shape constant である γ をそれぞれ 1.62 と 1.47 と求めた後、以下の公式より算出した。

$$Nv(IGC) = 1/\gamma[(NA(IGC))^3/(Vv(IGC))]^{1/2}$$

これらの数値を用いて上皮細胞 1 個が被覆する糸球体表

面積(S/P)と非上皮細胞 1 個が占める糸球体体積(V/IGC)の絶対値を算出した。

統計学的解析：雄性 SD ラットと健常人はノンパラメトリック検定である Mann-Whitney U test で検定し、箱ヒゲ図にて表示した。それぞれの値は、平均 \pm 1 標準偏差(mean \pm SD)で示した。統計学的有意差は、p<0.05 とした。

結果

雄性 SD ラットおよび健常人の形態学的分析データは、

TableとFig. 2~7に示した。糸球体体積(V) ($\times 10^6 \mu\text{m}^3$)はラットが 0.87 ± 0.19 , ヒトが 2.70 ± 0.86 , 糸球体表面積(S) ($\times 10^5 \mu\text{m}^2$)はラットが 1.88 ± 0.26 , ヒトが 4.84 ± 1.27 であり, 糸球体上皮細胞総数(P)はラットが 153 ± 13 , ヒトが 407 ± 88 であった。また, 糸球体非上皮細胞総数(IGC)はラットが 393 ± 54 , ヒトが $1,026 \pm 201$ であった。いずれの値もヒトがラットより有意に大きかった ($p < 0.01$ vs ラット)。

一方, 1個の糸球体上皮細胞が覆う糸球体基底膜の表面積(S/P) (μm^2)は, ラットが $1,297 \pm 84$, ヒトが $1,249 \pm 241$, 1個の糸球体非上皮細胞が占める糸球体体積(V/IGC) (μm^3)は, ラットが $2,227 \pm 201$, ヒトが $2,471 \pm 487$ であった。両者にはS/PおよびV/IGCともにほとんど差はみられなかった。

考 察

今回, ラットおよびヒトの正常糸球体の形態計測にWeibelの方法(stereological methods)を用いて解析を行い, 糸球体体積, 糸球体表面積, 糸球体上皮細胞数, 糸球体非上皮細胞数を求めた。それぞれの値は, 標本の収縮率や疾患の有無によって左右される。標本の収縮率については当教室ではパラフィン固定で88%と判明しており, 疾患の有無についても腎疾患, 高血圧のない若年者を選択しているため公正に評価できると思われた。Ryanら⁹⁾は, unbiased stereological methodsを用いてラットの糸球体体積を $0.6628 \pm 0.1001 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, Rennkeら⁸⁾はヒトの糸球体体積を $2.60 \pm 0.3 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ と算出している。これは今回の検討結果(ラット $0.87 \pm 0.19 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, ヒト $2.70 \pm 0.86 \times 10^6 \mu\text{m}^3$)とほぼ一致していた。

糸球体表面積については, ラットに関する報告は少ないが, ヒトに関してはRennkeら⁸⁾が腎移植ドナーの糸球体を用いて $3.12 \pm 0.41 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ と報告しており, これは当データ $4.84 \pm 1.27 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ とほぼ一致していた。糸球体上皮細胞数については, われわれと同様の手法で, Kritzらは⁵⁾はSDラットを用いて 160 ± 16 個, Friesら⁴⁾はMunich-Wistarラットを用いて 142 ± 11 個, さらにBartram⁹⁾はunbiased stereological methodsでSDラットを用いて 181 ± 53 個と算出している。これらの数値は, いずれも当データの 153 ± 13 個に極めて近かった。また, Pagtalunan⁸⁾は, ヒトの糸球体上皮細胞数を 575 ± 45 個と算出しており, 当データの 407 ± 88 個と少々隔たりがあったが, 標準偏差を考慮すれば有意差はないと思われた。

1個の糸球体上皮細胞が覆う糸球体基底膜の表面積は, ヒトではPagtalunan⁸⁾が $900 \pm 100 \mu\text{m}^2$ と報告しているが, 標準偏差を考慮すれば当データの $1,249 \pm 241 \mu\text{m}^2$ と有意な差はないと思われた。また, 今回の検討ではヒトが $1,249 \pm 241 \mu\text{m}^2$, ラットが $1,297 \pm 84 \mu\text{m}^2$ とほぼ一致していた。したがって, 1個の糸球体上皮細胞が覆う糸球体基底膜の表面積は, 種差を超えたパラメーターの一つになりうると思われた。

糸球体非上皮細胞数についてはヒトではPagtalunan⁸⁾が $1,118 \pm 122$ 個と報告し, ラットではBartram⁹⁾がSDラットを用いて内皮細胞数 248 ± 53 個, メサングウム細胞数 245 ± 45 個と報告している。これは標準偏差を考慮すれば当データのヒト $1,026 \pm 201$ 個, ラット 393 ± 54 個とは有意な差はないと思われた。1個の糸球体非上皮細胞が占める糸球体体積については今までに報告がないため比較はできないが, 糸球体体積および糸球体非上皮細胞数などのデータより妥当な絶対値と思われた。当データではヒトが $2,471 \pm 487 \mu\text{m}^3$, ラットが $2,227 \pm 201 \mu\text{m}^3$ と有意差なく, 1個の糸球体非上皮細胞が占める糸球体体積も種差を超えたパラメーターになりうると思われた。

以上, 今回の検討結果は数は少ないもののこれまで報告された値とほぼ一致しており, ラットおよびヒトの糸球体上皮細胞の形態学的研究において重要な基準値になりうると思われた。本報告では, 皮質外側の糸球体を対象に形態学的絶対値(糸球体体積, 糸球体表面積, 糸球体上皮細胞数, 糸球体非上皮細胞数)を算出した。今後, 皮質内側のものも使用して検討すれば, 上述した形態学的絶対値が当教室にてすでに算出されているIgA腎症(in submitting)や皮髄境界部より発症する巣状糸球体硬化症の病変との比較においてより有効と思われる。

結 語

ヒトとラットの形態学的な基準値は, 糸球体体積, 糸球体表面積, 糸球体上皮細胞数, 糸球体非上皮細胞数ともに異なっていた。しかし, ヒトとラットで1個の糸球体上皮細胞が覆う糸球体基底膜の表面積と1個の糸球体非上皮細胞が占める糸球体体積に種差が認められなかった点は, 大変興味深い所見である。これらの形態学的計測は種差を超えた指標になりうると思われる。

本報告の要旨は第41回日本腎臓学会で報告した(平成10年5月12日, 東京)。

文 献

1. Shirato I, Hiltraud H, Kimura K, Sakai T, Tomino Y, Kritz W. The development of focal segmental glomerulosclerosis in Masugi nephritis is based on progressive podocyte damage. *Virchows Arch* 1993 ; 429 : 255-73.
2. Kritz W, Kretzer M, Nagata M, Provoost AP, Shirato I, Uiker S, Sakai T, Lemley KV. A frequent pathway to glomerulosclerosis : Detection of tuft architecture-podocyte damage-segmental sclerosis. *Kidney Blood Press Res* 1996 ; 19 : 245-53.
3. Weibel ER. *Stereological methods Vol. 1. Practical methods for biological morphometry*. London : Academic Press Inc, 1979 : 40-116.
4. Fries JW, Sandstorm DJ, Meyer TW, Rennke HG. Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab Invest* 1989 ; 60 : 205-18.
5. Nagata M, Kritz W. Glomerular damage after uninephrectomy in young rat II. Mechanical stress on podocyte as a passway to sclerosis. *Kidney Int* 1992 ; 42 : 148-60.
6. Rennke HG. How dose glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? *Kidney Int* 1994 ; 45 : S58-63.
7. Floege J, Radeke HR, Johnson RJ. Glomerular cells *in vivo* versus the glomerulus *in vivo*. *Kidney Int* 1994 ; 45 : 360-8.
8. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplson NS, Sun L, Meyer TW. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* 1997 ; 99 : 342-8.
9. Bartram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, Ryan GB. Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. *Cell Tissue Res* 1992 ; 270 : 37-45.