

# 小児腎疾患における CD68 染色の臨床的有用性

前川 講平<sup>\*1,2</sup> 柴野 貴之<sup>\*1</sup> 澤木 潤子<sup>\*1</sup> 前 寛<sup>\*1</sup>  
服部 益治<sup>\*1</sup> 谷澤 隆邦<sup>\*1</sup>

Clinical usefulness of CD68 staining in children with various glomerular diseases

Kohei MAEKAWA <sup>\*1,2</sup>, Takayuki SHIBANO <sup>\*1</sup>, Junko SAWAKI <sup>\*1</sup>, Hiromu MAE <sup>\*1</sup>,  
Masuji HATTORI <sup>\*1</sup>, and Takakuni TANIZAWA <sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup>Department of Pediatrics, <sup>\*2</sup>Department of General Medicine and Community Health Science Division of Pediatrics,  
Sasayama Medical Center, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan

## 要 旨

慢性腎疾患が末期腎不全へと進展する過程では、腎疾患の病因を問わず、腎障害の際にマクロファージや好中球に代表される炎症細胞の浸潤とそれに惹起された腎組織の線維化が認められることが知られている。われわれは、2007年6月～2009年11月に当科で腎生検を行った74例の慢性腎疾患患児の81腎組織を対象とし、CD68染色による糸球体と間質のマクロファージの浸潤を検討した。平均年齢は10.6±4.8歳(1.8～24歳, 中央値11.1歳), 男児39例, 女児35例であった。

対象疾患はIgA腎症21例, 23腎組織, 紫斑病性腎炎8例, 9腎組織, 膜性腎症3例, 3腎組織, 膜性増殖性腎炎1例, 1腎組織, メサングウム増殖性腎炎2例, 2腎組織, アルポート症候群1例, 1腎組織, ループス腎炎2例, 2腎組織, ネフローゼ症候群14例, 15腎組織, 基底膜菲薄化症候群8例, 8腎組織, 腎移植後4例, 7腎組織, 微小変化または正常組織10例, 10腎組織であった。その結果, 腎組織別では半月体形成性腎炎, 膜性増殖性糸球体腎炎, 巣状分節性糸球体硬化症においてCD68陽性細胞が増加しており, マクロファージ浸潤を強く認めた。糸球体内マクロファージ浸潤と血尿, 蛋白尿, AI, CI, IgA, C3, Fibの沈着と正の相関を, 腎機能(eGFR)とは負の相関を示した。

これらから, CD68染色でマクロファージの浸潤, 集積の状態を知ることによって, 腎疾患の急性期病変の活動性をより鋭敏に把握し評価することができると考えられた。CD68陽性細胞数が血尿, 蛋白尿とも相関することから急性期の腎病変を示している結果と考えられた。急性期の腎疾患では, 積極的にマクロファージを染色することで疾患活動性を把握できると考えられた。

**Purpose** : Glomerular macrophage accumulation is a common feature of proliferative forms of human glomerulonephritis and kidney injury. Our present study was designed to investigate the role of macrophages in pediatric kidney diseases by using CD68 staining.

**Material and Methods** : Seventy-four patients (39 boys and 35 girls) with pediatric kidney disease yielding 81 specimens were investigated. A monoclonal anti-human CD68 mouse antibody (KP1) was used as a macrophage marker in this study. Paraffin-embedded renal biopsy specimens were stained for immunohistochemical analysis. The average number of macrophages per glomerulus in each patient was calculated as the total number of CD68 (+) cells within all glomeruli divided by the total number of glomeruli in a single section and the average number of observed interstitial macrophages was calculated in 3~5 high power fields.

**Results** : Glomerular macrophage accumulations were increased with crescentic proliferative glomerulonephritis, mesangial proliferative glomerulonephritis, and focal segmental glomerulosclerosis. Glomerular and intersti-

tial macrophage accumulations were correlated with hematuria, proteinuria and renal function (eGFR). In particular, activity and chronicity index, as well as the severity of glomerular IgA, C3, and fibrinogen deposition were correlated with glomerular macrophage accumulation.

**Conclusions :** Macrophage accumulation observed by CD68 staining was a useful marker in providing a deeper understanding of the clinicopathologic state of children with chronic kidney diseases, and was effective in the selection of treatment.

Jpn J Nephrol 2014 ; 56 : 532-537.

**Key words :** CD68, macrophage, chronic glomerulonephritis, children, focal segmental glomerulosclerosis.

## はじめに

小児の慢性腎疾患では、腎組織の病理学的診断、また組織学的重症度によって末期腎不全へと進行するものもあれば全く進行しないものまでさまざまである。慢性腎疾患が末期腎不全へと進展する過程では、腎疾患の病因を問わず共通の進行機序として、腎障害の際にはマクロファージや好中球に代表される炎症細胞の浸潤とそれに伴う組織の線維化を認めることが知られている<sup>1~4)</sup>。特に IgA 腎症、紫斑病性腎炎、ループス腎炎の急性期では炎症が強いことから、これらの疾患ではマクロファージの浸潤を認め<sup>5~8)</sup>、その際にはヒトマクロファージマーカーとして CD68 染色が用いられ、腎組織の炎症の程度を評価することができる。CD68 は 110 kDa の膜糖蛋白質で LAMP ファミリーに属し、単球やマクロファージに発現する蛋白である。われわれは、マクロファージマーカーとして腎組織に対して CD68 染色を行い、各種小児腎疾患での発現を検討し、組織学的重症度分類を用いてマクロファージの発現との関係を検討した。

## 対象と方法

2007 年 6 月~2009 年 11 月に当科で腎生検を行った 74 例の慢性腎疾患患児の 81 腎組織を対象とした。平均年齢 10.6±4.8 歳 (1.8~24 歳, 中央値 11.1 歳), 男児 39 例, 女児 35 例であった。本検討を行うにあたり、腎生検施行時に腎組織検体の臨床研究への使用を患児または患児家族より書面で同意を得て、承諾された腎組織を使用した。また、本検討は兵庫医科大学倫理委員会の承認(兵庫医科大学倫理委員会 承認番号 1643 号)を得た。

対象疾患は IgA 腎症 21 例, 23 腎組織, 紫斑病性腎炎 8 例, 9 腎組織, 膜性腎症 3 例, 3 腎組織, 膜性増殖性腎炎 1 例, 1 腎組織, メサンギウム増殖性腎炎 2 例, 2 腎組織, アルポート症候群 1 例, 1 腎組織, ループス腎炎 2 例, 2

腎組織, ネフローゼ症候群 14 例, 15 腎組織, 基底膜非薄化症候群 8 例, 8 腎組織, 腎移植後 4 例, 7 腎組織, 微小変化または正常組織 10 例, 10 腎組織であった (Table 1)。

病理組織学的分類では、微小糸球体病変 (minor glomerular abnormalities : MGA) 26 例, 27 腎組織, 巣状分節性糸球体硬化 (focal segmental glomerulosclerosis : FSGS) 9 例, 12 腎組織, 膜性糸球体腎炎 (membranous glomerulonephritis : MGN) 3 例, 3 腎組織, 半月体形成性糸球体腎炎 (crescentic glomerulonephritis : cre GN) 10 例, 10 腎組織, メサンギウム増殖性糸球体腎炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis : mes PGN) 22 例, 25 腎組織, 膜性増殖性糸球体腎炎 (membranoproliferative glomerulonephritis : MPGN) 4 例, 4 腎組織であった (Table 2)。

われわれは腎生検組織のパラフィン切片を脱パラフィン後, 37°C でのトリプシン処理を行い, オートクレーブ後 1% 過酸化水素水で処理し, 内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。その後 PBS で洗浄後, 抗ヒト CD68 マウスモノクローナル抗体 (KP-1) (DAKO, USA) を用いて室温で 1 時間反応させ, 3,3'-ジアミノベンチジン・4HCl (DAB) 溶液による発色後, ヘマトキシリンで核を染色した (Fig. 1)。すべての糸球体内に発現している CD68 陽性細胞数を数え, 糸球体 1 個当たりの CD68 陽性細胞数, 間質 1 視野 (200 倍) 当たりの CD68 陽性細胞数を 3~5 視野観察して算出した。評価は糸球体内および間質内の CD68 陽性細胞数と以下の項目との比較検討で行った。

統計学的処理は、相関関係については Spearman's rank correlation を用い、多重比較は Kruskal-Wallis test を用いて有意差がみられたため、多重比較として Steel 検定を用い、 $p < 0.01$  を有意とした。

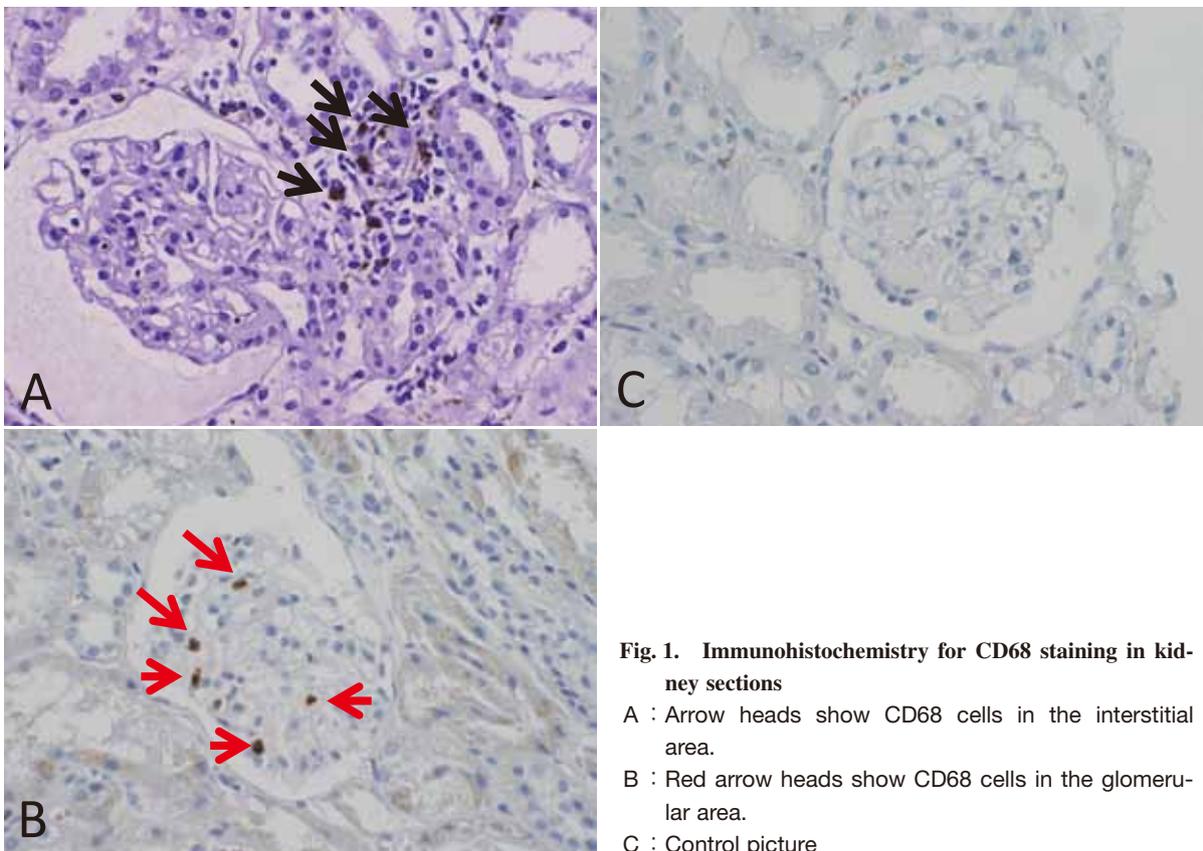
各評価項目は、CD68 陽性細胞と①各種腎病変ごとの比較、②組織学的重症度、③蛍光抗体所見、④蛋白尿、⑤血尿、⑥estimated glomerular filtration rate (eGFR) で比較検討を行った。蛋白尿の評価は尿蛋白/尿クレアチニン比を用いて定量化して行い、血尿は陰性から 3+ と定性で評価した。

**Table 1. Clinical diagnosis of patients and specimens**

Clinical diagnosis	n=74 (patients)	n=81 (specimens)
IgA nephropathy	21	23
Henoch-Schönlein purpura nephritis	8	9
Membranous nephropathy	3	3
Membranoproliferative glomerulonephritis	1	1
Mesangial proliferative nephritis	2	2
Alport's syndrome	1	1
Lupus nephritis	2	2
Nephrotic syndrome	14	15
Thin basement membrane syndrome	8	8
Post renal transplant kidney	4	7
Minor abnormality	10	10

**Table 2. Histological findings of patients and specimens**

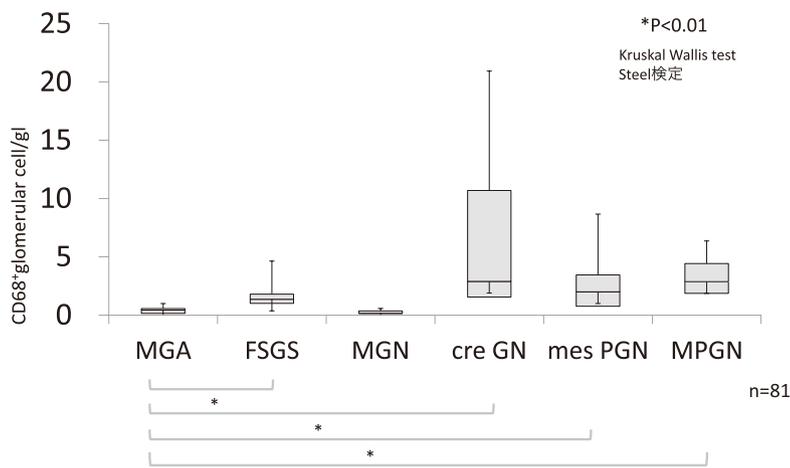
Light microscopy	n=74 (patients)	n=81 (specimens)
Minor glomerular abnormality (MGA)	26	27
Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)	9	12
Membranous glomerulonephritis (MGN)	3	3
Crescentic and necrotizing glomerulonephritis (cre GN)	10	10
Mesangial proliferative glomerulonephritis (mes PGN)	22	25
Membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN)	4	4

**Fig. 1. Immunohistochemistry for CD68 staining in kidney sections**

A : Arrow heads show CD68 cells in the interstitial area.

B : Red arrow heads show CD68 cells in the glomerular area.

C : Control picture



**Fig. 2. CD68+ glomerular cells in renal disease**

The number of CD68+ glomerular cells in FSGS, cre GN, mes PGN, MPGN group were significantly higher than that in the MGA groups (\* $p < 0.01$ ). Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean.

腎機能は Schwartz の式；身長(cm)  $\times K \div$  (血清クレアチニン+0.2) で eGFR を算出し評価した。組織学的重症度評価は Andreoli らの方法<sup>9)</sup>を用いて下記のように評価した。

Activity index (以下 AI, 最高 10 点)：①細胞性増殖 0~3, ②壊死の有無 0~1 点, ③間質単核球浸潤 0~3 点, ④半月体形成糸球体数 0~3 点(0=0%, 1=1~20%, 2=20~50%, 3 $\geq$ 50%), Chronicity index (以下 CI, 最高 12 点)：①線維性半月体形成率 0~3 点(AI の④の基準), ②Segmental sclerosis を示す糸球体数 0~3 点(同上), ③Global sclerosis を示す糸球体数 0~3 点(同上), ④尿管萎縮と間質線維化程度 0~3 点(同上)

## 結 果

### 1. 糸球体内 CD68 陽性細胞数と各種腎病変の比較 (Fig. 2)

各種腎疾患における糸球体内の CD68 陽性細胞数を Kruskal-Wallis test を用いて有意差を検討し, 多重比較として Steel 検定を行ったところ, MGA と FSGS ( $p < 0.01$ ), MGA と cre GN ( $p < 0.01$ ), MGA と mes PGN ( $p < 0.01$ ), MGA と MPGN ( $p < 0.01$ ) で有意差を認め, FSGS, cre GN, mes PGN, MPGN はマクロファージの浸潤が有意に多いことがわかった。

### 2. 糸球体内 CD68 陽性細胞数と尿所見, 組織学的重症度, 蛍光抗体染色, 腎機能の比較 (Table 3)

血尿 ( $r = 0.34$ ,  $p = 0.0022$ ), 蛋白尿 ( $r = 0.50$ ,  $p < 0.0001$ ),

**Table 3. Correlations between the glomerular CD68+ cell and various indices**

	r	p-value
Urinalysis		
hematuria	0.34	0.0022
proteinuria	0.5	<0.0001
Histological		
activity index	0.63	0.0001
chronicity index	0.33	0.0026
Immunofluorescent stain		
IgG	0.21	0.06
IgA	0.6	<0.0001
IgM	0.16	0.145
C3	0.53	<0.0001
C4	0.187	0.095
C1q	-0.07	0.52
Fibrinogen	0.47	<0.0001
Renal function		
eGFR	-0.31	0.0055

Glomerular macrophage accumulations were correlated with hematuria ( $p = 0.0022$ ), proteinuria ( $p < 0.0001$ ), AI, CI and eGFR ( $p = 0.0055$ ). In immunofluorescent staining, glomerular macrophage accumulations were correlated with depositions of IgA, C3, fibrinogen.

組織学的重症度分類 AI ( $r = 0.63$ ,  $p = 0.0001$ ), CI ( $r = 0.33$ ,  $p = 0.0026$ ), eGFR ( $r = -0.31$ ,  $p = 0.0055$ ) と有意差を認め, 相関関係にあった。蛍光抗体所見では IgA ( $r = 0.60$ ,  $p < 0.0001$ ), C3 ( $r = 0.53$ ,  $p < 0.0001$ ), Fib ( $r = 0.47$ ,  $p < 0.0001$ ) において有意差を認め相関関係にあることがわかった。

### 3. 間質内 CD68 陽性細胞数と尿所見, 組織学的重症度, 蛍光抗体染色, 腎機能の比較 (Table 4)

血尿 ( $r = 0.32$ ,  $p = 0.0036$ ), 蛋白尿 ( $r = 0.53$ ,  $p = 0.0001$ ), eGFR ( $r = -0.26$ ,  $p = 0.0212$ ) と有意差を認め, 相関関係にあった。しかし, 組織学的重症度分類, 蛍光抗体所見ではすべての染色において相関関係は認めなかった。

## 考 察

マクロファージの腎疾患との関係は, 1976 年の Atkins らの進行性糸球体腎炎でのマクロファージ浸潤で初めて報告されて以降<sup>1)</sup>, 糸球体や間質へのマクロファージの浸潤, 集積がさまざまな病態の慢性腎疾患の進行例に認められることがわかってきた。特に IgA 腎症ではマクロファージと重症度との関係性が報告されており, 予後決定因子として重要な役割があると考えられている<sup>4~8)</sup>。

**Table 4. Correlations between the interstitial CD68+ cell and various indices**

	r	p-value
Urinalysis		
hematuria	0.32	0.0036
proteinuria	0.53	0.0001
Histological		
activity index	0.1	0.37
chronicity index	0.09	0.42
Immunofluorescent stain		
IgG	-0.091	0.42
IgA	-0.05	0.66
IgM	-0.03	0.73
C3	-0.11	0.33
C4	0.1	0.35
C1q	0.14	0.71
Fibrinogen	0.16	0.16
Renal function		
eGFR	-0.26	0.0212

Interstitial macrophage accumulations were correlated with hematuria (P=0.0036), proteinuria (P=0.0001), and eGFR (P=0.0212).

今回われわれは、さまざまな小児腎疾患に対しマクロファージのマーカーとして抗ヒト CD68 マウスモノクローナル抗体を 74 例、81 腎組織に使用し CD68 陽性細胞を染色して評価したところ、光顕上異常を認めない組織群である MGA と比較して FSGS, cre GN, mes PGN, MPGN において糸球体内 CD68 陽性細胞の増加を有意に認めた。FSGS, cre GN, mes GN, MPGN では腎病変、特に糸球体病変でマクロファージの浸潤が関与していることがわかった。

蛍光抗体所見との比較検討で IgA, C3, フィブリノーゲンの沈着が相関していたことは、原疾患として IgA 腎症 23 例、紫斑病性腎炎 9 例と両疾患で全体の約 40% を占めていたことが影響していると考えられる。C3 については生物活性化を有した C3b が存在することによりマクロファージなどの炎症細胞浸潤が起こるため、メサンギウム領域に C3 が沈着する疾患群では CD68 の発現が増加してくると考えられた<sup>10)</sup>。つまり、C3 の沈着そのものがマクロファージの浸潤に関係しているのではないかと考えられる。

特発性ネフローゼ症候群では、FSGS がコントロールと比較して CD68 陽性細胞が有意に多かったことから、マクロファージの浸潤が FSGS の病態や初期像に関与していることが推測される。初回腎生検時には CD68 陽性細胞を認めなかった微小変化群が、FSGS を呈するときには CD68

陽性細胞が増多していたこともあった。今回の検討では FSGS の分類を詳細に行っていないが、成人の FSGS の collapsing type でマクロファージの浸潤、集積を認めるとの報告<sup>2)</sup>や cellular lesion での CD68 染色の有用性の報告<sup>11)</sup>もあることから、病状経過より難治性ネフローゼ症候群となり FSGS が強く疑われる場合には CD68 染色を積極的に行い、マクロファージの浸潤を評価することで疾患活動性を評価できる可能性がある。

重症度分類として使用した AI, CI との関係では、今回検討した糸球体内 CD68 陽性細胞数、間質内 CD68 陽性細胞数はともに AI と相関し、CI とは糸球体内 CD68 陽性細胞と相関を認めた。これらから、糸球体内のマクロファージの浸潤の増加と組織学的重症度とは密接な関連があることがわかった。糸球体内 CD68 陽性細胞数と細胞性半月体の割合、間質内 CD68 陽性細胞数と細胞性半月体の割合とはそれぞれ相関関係を認めたことから、急性期病変においてマクロファージの発現が疾患にかかわらず、糸球体内、間質内で顕著になると考えられた。以前からの報告でも、半月体形成を認めるような組織ではマクロファージの浸潤が著明となっていることがわかっている。今後、マクロファージの染色として CD68 染色だけでなく、CD169 (sialoadhesin) の染色を用いて活性化マクロファージの鑑別<sup>8)</sup>や M1 マクロファージ, M2 マクロファージの鑑別<sup>12,13)</sup>などを行い、更なる評価をする必要があると考えられた。

血尿、蛋白尿、腎機能との関係では、血尿の増加に伴い糸球体内および間質内 CD68 陽性細胞が出現していることから、血尿の程度は腎組織の急性期病変との関連が考えられた。蛋白尿についても糸球体内および間質内 CD68 陽性細胞と相関を認める (p<0.0001) ことから、腎炎で現われる蛋白尿はマクロファージの浸潤と関係があると思われる。今までの報告ではマクロファージと蛋白尿との関係性については関係があるとした報告<sup>13)</sup>、関係がないとした報告<sup>14,15)</sup>など賛否が分かれているが、今回のわれわれの検討では、蛋白尿と相関しているだけでなく FSGS にも相関していることがわかった。マクロファージの集積・浸潤は半月体などの急性炎症、メサンギウム細胞の増殖、基質の増加だけでなく、糸球体硬化の進行に対しても関与していると考えられる。

腎機能については eGFR を用いて評価し<sup>16)</sup>、糸球体内 CD68 陽性細胞との相関を認めたことから、マクロファージの浸潤をきたすような疾患活動性が高い組織では腎機能にも影響があると考えられた。

自験例で CD68 染色を IgA 腎症の扁摘パルス施行前後

で検討したところ、尿所見の消失した 3 例では治療後の腎生検において CD68 陽性細胞は消失していた。このことから、CD68 染色は疾患活動性の評価や治療の効果判定において有用であると考えられた。

今回われわれは、小児腎疾患患児 74 例、81 腎組織に CD68 染色を行い検討したところ、腎疾患の急性期での疾患活動性を把握できた。特に半月体を形成するような腎炎やネフローゼ症候群の組織では積極的に CD68 の染色が有用であると思われた。

## 結 論

- ・小児の慢性腎疾患の腎組織で CD68 染色を行ったところ、糸球体内のマクロファージの発現を強く認めた病理組織は FSGS, cre GN, mes PGN, MPGN であった。
- ・CD68 陽性細胞数が血尿、蛋白尿とも相関することから、急性期の腎病変を示している結果と考えられた。
- ・急性期の腎疾患では、積極的にマクロファージを染色することで疾患活動性を把握できると考えられた。
- ・特に難治性ネフローゼ症候群では、FSGS の可能性も考慮し積極的に CD68 染色を行うべきであると考えられた。

本論文の要旨は第 53 回日本腎臓学会学術集会(平成 22 年 6 月, 神戸市)にて報告した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、統計分野においてご協力していただきました兵庫医科大学公衆衛生学主任教授 島正之先生に深謝致します。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文 献

1. Atkins RC, Holdsworth SR, Glasgow EF, Matthews FE. The macrophage in human rapidly progressive glomerulonephritis. *Lancet* 1976 ; 307 : 830-832.
2. Bariety J, Nochy D, Mandet C, Jacquot C, Glotz D, Meyrier A. Podocytes undergo phenotypic changes and express macrophagic-associated markers in idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 1998 ; 53 : 918-925.
3. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 3522-3530.
4. Ikezumi Y, Hurst LA, Masaki T, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Adoptive transfer studies demonstrate that macrophage can induce proteinuria and mesangial cell proliferation. *Kidney Int* 2003 ; 63 : 83-95.
5. Nagata M, Akioka Y, Tsunoda Y, Komatu Y, Kawaguchi H, Yamaguchi Y, Ito K. Macrophages in childhood IgA nephropathy. *Kidney Int* 1995 ; 48 : 527-535.
6. Kawasaki Y, Suyama K, Go H, Imamura T, Ushijima Y, Sakai N, Hashimoto K, Hosoya M. Accumulation of macrophages expressing myeloid-related protein 8 associated with the progression of sclerotic changes in children with IgA nephropathy. *Tohoku J Exp Med* 2009 ; 218 : 49-55.
7. Ikezumi Y, Suzuki T, Imai N, Ueno M, Narita I, Kawachi H, Shimizu F, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Histological differences in new-onset IgA nephropathy between children and adults. *Nephrol Dial Transplant* 2006 ; 21 : 3466-3474.
8. Ikezumi Y, Suzuki T, Hayafuji S, Okubo S, Nikolic-Paterson DJ, Kawachi H, Shimizu F, Uchiyama M. The sialoadhesin (CD169) expressing a macrophage subset in human proliferative glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2005 ; 20 : 2704-2713.
9. Andreoli SP, Yum MN, Bergstein JM. IgA nephropathy in children : significance of glomerular basement membrane deposition of IgA. *Am J Nephrol* 1986 ; 6 : 28-33.
10. Goh JW, Tan YS, Dodds AW, Reid KB, Lu J. The class A macrophage scavenger receptor type I (SE-AI) recognizes complement iC3b and mediates NF- $\kappa$ B activation. *Protein Cell* 2010 ; 1 : 174-187.
11. 佐野 隆, 青山東五, 清水健史, 長場 泰, 竹内康雄, 坂本尚登, 鎌田貢壽. 一次性巣状分節性糸球体硬化症にみられる cellular lesion の特徴と由来についての検討. *北里医学* 2007 ; 37 : 7-11.
12. Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Kawachi H, Nikolic-Paterson DJ, Shimizu F, Uchiyama M. Contrasting effects of steroids and mizoribine on macrophage activation and glomerular lesions in rat thyl mesangial proliferative glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 2010 ; 31 : 273-282.
13. Arima S, Nakayama M, Naito M, Sato T, Takahashi K. Significance of mononuclear phagocytes in IgA nephropathy. *Kidney Int* 1991 ; 39 : 684-692.
14. Nolasco FE, Cameron JS, Hartley B, Coelho A, Hidreth G, Reuben R. Intraglomerular T cell and monocytes in nephritis : study with monoclonal antibodies. *Kidney Int* 1987 ; 31 : 1160-1166.
15. Hurtado A, Asato C, Escudero E, Stromquist CS, Urcia J, Hurtado ME, de La Cruz S, Wener MH, Zavala R, Johnson RJ. Clinicopathologic correlations in lupus nephritis in Lima, Peru. *Nephron* 1999 ; 83 : 323-330.
16. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann Jr CM, Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics* 1976 ; 58 : 259-263.