

# IgA 腎症における間質病変の重要性：色抽出による画像解析法を用いた間質面積の定量的評価

網代 晶子 内田 啓子 本田 一穂 新田 孝作  
二瓶 宏

Significance of interstitial lesions in IgA nephropathy : A quantitative evaluation of the interstitial area using an image analyzer for color extraction

Akiko AJIRO, Keiko UCHIDA, Kazuho HONDA, Kosaku NITTA, and Hiroshi NIHEI

Department of Medicine, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Progression to chronic renal failure is influenced by the extent of irreversible interstitial fibrosis. For a quantitative evaluation of interstitial fibrosis, we attempted color extraction of the interstitial area treated with Masson-Trichrome stain using an image analyzer. The subjects were 20 cases of IgA nephropathy with a mean age of  $33.4 \pm 12.3$  years. The interstitial lesions were graded simultaneously by renal pathologists without clinical information. In addition, immunohistochemical studies using specific antibodies against type III collagen,  $\alpha$ -smooth muscle actin and CD34 were performed to further characterize the interstitial lesions. The percentage of interstitium in the renal cortex evaluated by an image analyzer was significantly correlated with the pathological grade of fibrous interstitial damage ( $\sigma = 0.861$ ,  $p < 0.0002$ ), the type III collagen-positive area ( $\sigma = 0.954$ ,  $p < 0.0001$ ) and  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive area ( $\sigma = 0.686$ ,  $p = 0.0005$ ). Moreover, the percentage of interstitium was negatively correlated with 24-hr creatinine clearance ( $r = -0.744$ ,  $p < 0.0001$ ) and the numbers of peritubular capillaries detected by CD34 ( $r = -0.649$ ,  $p < 0.0014$ ). These findings suggest that color extraction of the interstitial area stained with Masson-Trichrome using image analysis is useful for a quantitative evaluation of the interstitial fibrous lesions in IgA nephropathy.

Jpn J Nephrol 2003 ; 45 : 84-90.

**Key words** : IgA nephropathy, interstitial fibrosis, Masson-Trichrome staining, color extraction, immunohistochemistry, image analyzer

## 緒 言

間質の線維化は、あらゆる腎疾患の慢性期に出現する共通の病変である。炎症と組織障害の結果、浸潤細胞や腎細胞から液性因子が分泌され、コラーゲンやフィブロネクチンなどの産生が刺激され組織に増生する<sup>1)</sup>。このような細胞外基質産生の亢進が組織の線維化を加速させ、腎臓の正常な形態と機能が失われる。慢性腎疾患の予後に関する臨床病理学的検討は精力的に行われてきたが、間質病変の機序を解明する研究は、まだ始まったばかりである<sup>2)</sup>。

間質病変の程度が腎機能とよく相関し<sup>3,4)</sup>、IgA 腎症を含め種々の腎疾患の予後を左右する重要な因子として注目されてきた<sup>5-10)</sup>。よって、腎生検時に間質病変を的確に評価することが重要な臨床的課題となっている。最近、重松は IgA 腎症の組織学的障害度(Grade)と進行度(Stage)の新しい分類を報告した<sup>11)</sup>。しかし、腎生検所見の判定は、腎病理医による主観的判断に依存することが多い。

そこでわれわれは、IgA 腎症の腎生検組織を用いて、色抽出画像解析法で間質病変の定量的評価を試み、腎病理医による定性的判断との関連性について検討した。また、

Masson-Trichrome 染色で判定した線維化の程度と collagen type III で染色された領域,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) 陽性細胞の分布あるいは CD34 陽性の傍尿管毛細血管 (peritubular capillary) との相関性を検討したので報告する。

## 対象と方法

### 1. 対象

1996年から1999年までに東京女子医科大学病院に入院し、臨床的所見および経皮的腎生検で IgA 腎症と診断された症例である。間質病変の半定量的評価は症例の臨床データを知らされていない2名の腎病理医にて、線維化の程度により4段階(なし, 軽度, 中等度, 高度)に分類されるが、各段階から5例ずつ計20例を選別した。また、この4段階の半定量的評価はグレード0; 線維化なし, グレード1; 線維化軽度, グレード2; 線維化中等度, グレード3; 線維化高度と数値化した。性別は男性6例, 女性14例で、年齢は  $33.4 \pm 12.3$  歳(16~57歳)である。発症から腎生検までの罹病期間は  $6.5 \pm 2.8$  年であった。すべての対象は、初回腎生検例で治療歴のない症例で、高血圧や高脂血症などの合併症のない症例を対象とした。また、間質拡大が急性病変による間質の浮腫や細胞浸潤による症例を除外するため、急性間質性変化のない症例を選別した。対照として、年齢を一致させた5例の微小変化群(生検時はネフローゼ期を離脱し、急性腎不全のない症例)の腎生検組織を用いた。

### 2. 形態学的検討

採取された組織は、10%ホルマリン緩衝液で固定し、アルコールおよびベンゼンで脱水、脱脂後パラフィンに包埋した。ミクロトームにより  $2 \mu\text{m}$  の薄切片を作製し、periodic acid-Schiff (PAS), periodic acid-silver methenamine

(PAM), Masson-Trichrome 染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

間質病変を定量化するために、以下の方法で面積率を計測した。

1) CCDカメラ(color chilled 3 CCDカメラ)(浜松ホトニクス社)にて Masson-Trichrome 染色標本の40倍画像を取り込む。

2) 取り込んだ画像から皮質のみを抽出する。

3) 細動脈までの血管系および糸球体を消去する。

4) 画像解析ソフト(Mac ASPECT, 三谷商事)を用いてアニリンブルー色素を色抽出し、その面積を算出する。

5) 標本の皮質部の全面積を求め、4)で求めた色抽出面積との比を計算し、その面積率を IgA 腎症の間質面積率(%)とした。

6) 同様に算定した微小変化群の生検組織の面積率を求め、対照間質面積(%)とした。

なお、浮腫による染色性の低下を伴った間質拡大を除外するため、同一切片中の動脈外膜コラーゲン色調を基準とした。

### 3. 免疫組織化学

酵素抗体法に使用した一次抗体は、抗ヒト collagen type III 抗体, 抗ヒト  $\alpha$ SMA 抗体および抗ヒト CD34 抗体である(Table 1)。Table 1 に示した二次抗体と反応させた後、CSA (Catalyzed Signal Amplification System, DAKO 社) で発色させた。なお、間質の線維成分である collagen type III 抗体の染色は、酵素前処理(プロナーゼ K<sup>®</sup>, 20分)を施行した。血管内皮細胞のマーカーである CD34 陽性の血管系は、CCDカメラで染色標本の皮質部を400倍で無作為に10視野抽出し、傍尿管毛細血管(peritubular capillary: PTC)の数を算出し平均化した。collagen type III 抗体陽性および  $\alpha$ SMA 陽性領域は、Masson-Trichrome 染色の場合と同様に CCDカメラにて染色標本の皮質部を

**Table 1. Characteristics of the antibody and the method of evaluation using immunohistochemistry on renal biopsy specimen**

First antibody	Anti-human $\alpha$ SMA (DAKO Inc.) (monoclonal)	Anti-human CD 34 (NOVO CASTRA Inc.) (monoclonal)	Anti-human collagen type III (SBA Inc.) (goat polyclonal)
Second antibody	Biotinylated goat anti-mouse Igs	Biotinylated goat anti-mouse Igs	Biotinylated rabbit anti-goat Igs
Third antibody	Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP
Enzyme treatment	(-)	(-)	Pronase K for 20 min.
Prevalence of results	Grading for three steps	Count for number of peritubular capillaries	Image analysis of color extraction

**Table 2. Clinical and histological features at the time of renal biopsy in 20 patients with IgA nephropathy**

Patient	Sex	Age (years)	Urinary protein (g/day)	24 hr Ccr (ml/min)	Pathological grade of interstitial change	Area of fibrous interstitium(%)
1	M	34	1.0	98.5	0	30.1
2	F	16	0.0	115.0	0	22.7
3	F	25	0.0	107.0	0	34.1
4	F	24	1.7	99.6	0	32.4
5	F	50	1.0	84.0	0	35.3
6	F	27	0.2	84.0	1	43.9
7	M	38	0.1	83.9	1	41.9
8	F	28	0.5	113.2	1	32.7
9	F	18	0.4	111.0	1	31.2
10	M	42	0.7	95.9	1	32.7
11	F	28	0.7	64.4	2	38.1
12	M	17	1.6	58.9	2	50.9
13	F	34	2.2	74.5	2	39.1
14	F	29	0.0	92.3	2	49.2
15	F	47	0.4	78.0	2	43.8
16	M	32	0.0	58.1	3	48.2
17	M	22	4.9	40.9	3	65.1
18	F	48	0.8	64.0	3	68.2
19	F	57	0.9	43.0	3	53.6
20	F	52	0.8	80.0	3	67.2
Mean±SD		33.4±12.3	0.9±1.1	79.1±28.6		

200倍で無作為に5視野抽出し、DAB(塩酸ジアミノベンチジン)色素を色抽出し、面積率(%)を算出し平均化した。 $\alpha$ SMA陽性領域は、染色性を3段階(0, 1, 2)に分類し数値化した。

#### 4. 統計処理

測定値は、すべて平均±標準誤差で表示した。統計処理は、Pearsonの相関係数またはSpearmanの順位相関係数を用い、FisherのZ変換でp値<0.01,あるいはr値±0.7で強い相関関係があると判定した。

## 結 果

今回の解析に用いた症例の臨床学的データおよび腎病理医による間質病変の4段階のグレード分類をTable 2に示す。腎生検時の尿蛋白は $0.9\pm 1.1$ g/日、24時間クレアチニンクリアランス(Ccr)は $79.1\pm 28.6$ ml/minであった。

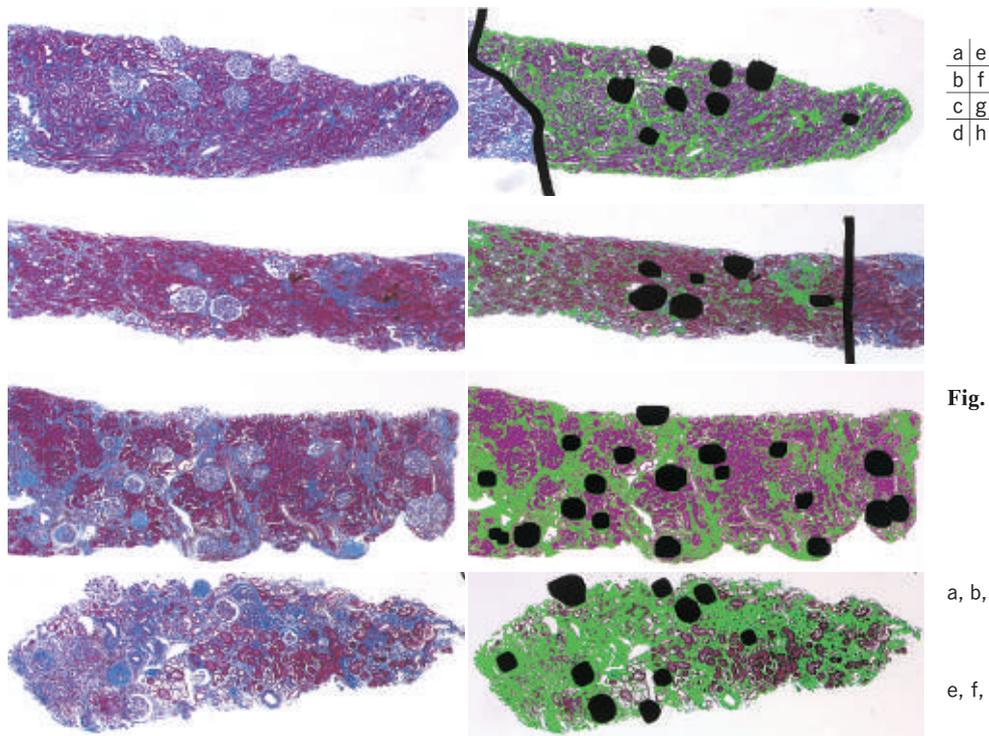
Fig. 1は、IgA腎症患者の腎生検組織におけるMasson-Trichrome染色標本を間質病変のグレードごとに取り込み(a, b, c, d),各々を色抽出した画像(e, f, g, h)である。黄緑色の部分が抽出部である。Fig. 1a, eは間質病変がグレー

ド0, Fig. 1b, fはグレード1, Fig. 1c, gはグレード2, Fig. 1d, hはグレード3の症例で、グレード0の間質面積は2.08%,グレード3の間質面積は37.1%であった。

算出された連続変数による間質の面積率と従来的間質病変の定性的診断(4段階評価0;なし, 1;軽度, 2;中等度, 3;高度と数値化)の関係をFig. 2に示す。その結果, $\sigma=0.861$ ,  $p<0.0002$ と色抽出画像解析法で求めた結果は当教室の腎病理医による間質病変の定性的評価とよく相関していた。

そこで、われわれが求めた間質面積と生検時の臨床データとの比較を行った。Fig. 3は、対照に比し増加した間質面積と24時間Ccrの相関を示したものであるが、両者の間には $r=-0.744$ ,  $p<0.0001$ の強い負の相関が認められた。尿所見と増加した間質面積との関係も検討したが、尿蛋白量あるいは血尿と増加した間質面積との間には、有意な相関は認められなかった。

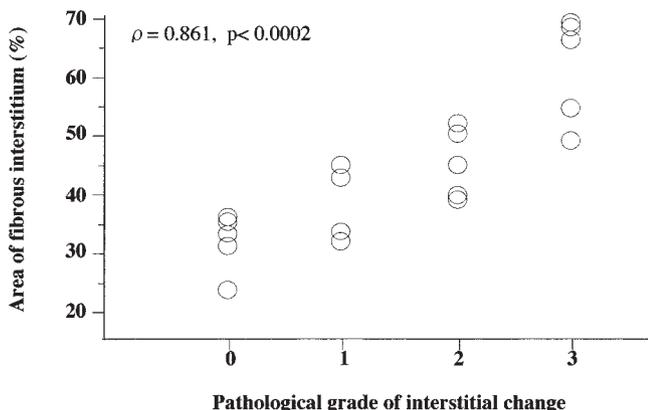
次に、線維化の程度を沈着した細胞外基質で評価した。collagen type IIIの染色性が軽度(Fig. 4a)と高度(Fig. 4b)の症例を示す。線維化が軽度の症例に比し高度の症例では明らかに褐色に染色されたcollagen type III陽性領域が拡大



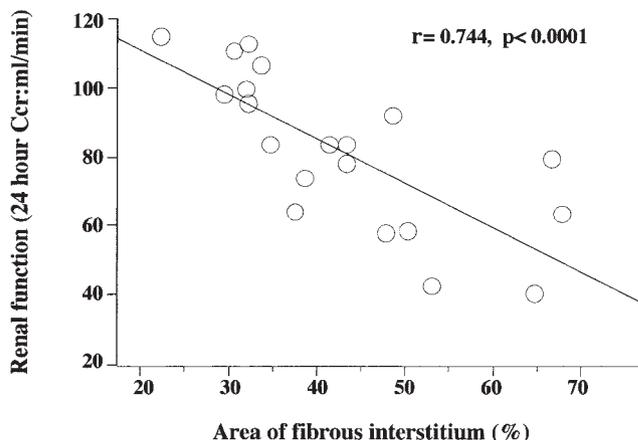
**Fig. 1.** A representative example of Masson-Trichrome staining and a color extraction image on a computer in renal biopsy specimens from a patient with IgA nephropathy

a, b, c, d : Masson-Trichrome staining with grade 0, 1, 2 and 3, respectively. ( $\times 40$ )

e, f, g, h : color extraction images of a, b, c and d, respectively. ( $\times 40$ )



**Fig. 2.** Correlation between the interstitial area evaluated by an image analyzer and pathological grade of interstitial damage in patients with IgA nephropathy



**Fig. 3.** Correlation between the interstitial area evaluated by an image analyzer and 24-hr creatinine clearance in patients with IgA nephropathy

しているのがわかる。Fig. 5は、算出した間質面積と collagen type IIIの染色陽性面積との関係をみたグラフであるが、両者の間には  $r=0.954$ ,  $p<0.0001$  の強い正の相関が認められた。

さらに、尿管萎縮により代償的に拡大した間質において尿管周囲に存在する PTC の増減を検討した。間質の線維化が軽度の症例(Fig. 6a)に比し、線維化が高度の症例(Fig. 6b)では CD34 陽性 PTC の減少が明らかである。PTC の数と間質面積との関係を示したのが Fig. 7であるが、 $r=-0.649$ ,  $p<0.0014$  と負の相関を認めた。間質の

線維化に先立って、間質の  $\alpha$ SMA 陽性細胞が増加することが知られているが、間質面積と  $\alpha$ SMA 陽性領域の間には  $r=0.686$ ,  $p<0.0005$  の正の相関関係が認められた。

### 考 察

IgA 腎症における間質の線維化が腎機能や腎予後に影響することは、1960年代から報告されてきた。しかし、尿管間質病変は細胞浸潤と細胞外基質の蓄積あるいは尿管炎など多彩な変化を包括しており、糸球体病変の進行に

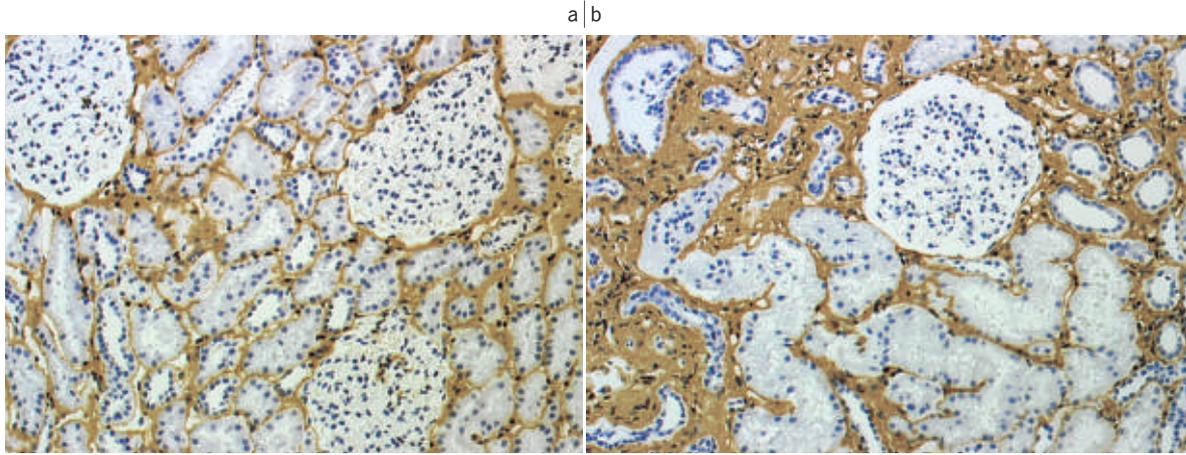


Fig. 4. Expression of type III collagen in renal biopsy specimens from patients with IgA nephropathy  
a : grade 1, b : grade 3 (×200)

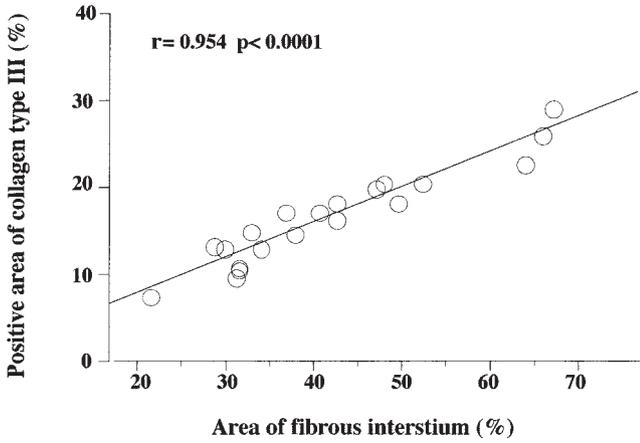


Fig. 5. Correlation between the interstitial area evaluated by an image analyzer and type III collagen-positive area in patients with IgA nephropathy (×200)

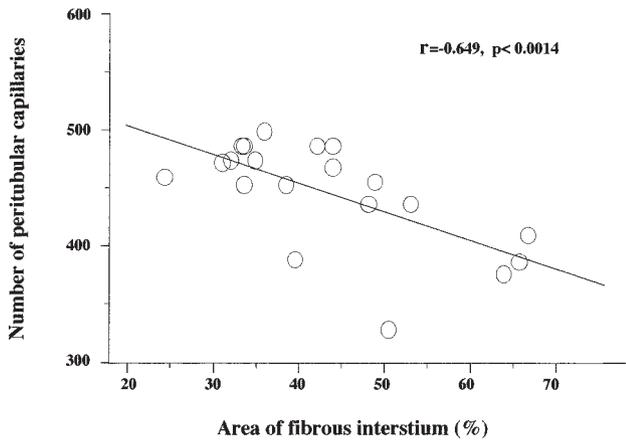


Fig. 7. Correlation between the interstitial area evaluated by an image analyzer and numbers of peritubular capillaries in patients with IgA nephropathy (×200)

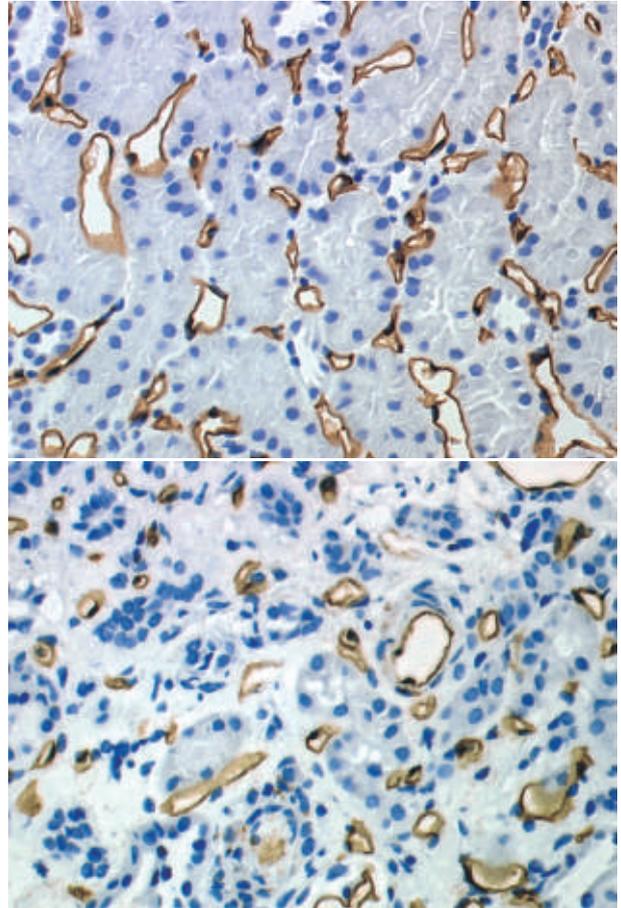


Fig. 6. CD34 expression on the peritubular capillaries in renal biopsy specimens from patients with IgA nephropathy  
a : grade 1, b : grade 3 (×200)

伴う二次的な変化であることもあり、その評価は困難であった。Striker ら<sup>12)</sup>による腎組織の定性的評価が報告されてから、各々の腎病理医が糸球体や間質病変を比較的簡

a  
b

単に数値化して報告するようになった。Bohleら<sup>13)</sup>により、この評価法を用いた注意深い観察により、間質の線維化があらゆる腎疾患の終末に出現する共通の病変であると認識されるようになった。

しかし、腎生検の診断に関与する腎病理医の主観が少なからず反映されることが、各施設間での腎疾患に伴う病理所見を比較するうえでの障害となってきた。また、上記の評価法は判定医の熟練度に左右され、一度の腎生検で確定診断がつかず、再生検が施行されることもある。このため、われわれは客観的に間質面積を定量化するために、色抽出画像解析法を用いた。今回の検討では、糸球体および血管を除いた腎皮質の純粋な間質面積を算出することが可能であり、従来の定性的評価と非常によく相関していた。また、どの施設でも間質病変評価のために用いられるMasson-Trichrome染色標本による色抽出法を用いれば、間質病変を順序変数で表すことができ、より正確に腎機能の予後予測が可能になると考えられた。

Collagen type IIIは、正常では間質や血管壁に存在する細胞外基質である<sup>14)</sup>。糸球体硬化や間質の線維化に伴って、メサンギウム領域や間質に増加することが報告されている<sup>15~17)</sup>。今回の検討で、Masson-Trichrome染色から算出した間質面積とcollagen type IIIおよび染色陽性面積との間には、正の相関が認められた。このcollagen type III陽性領域には、多数の $\alpha$ SMA陽性細胞が集簇していた。既報<sup>18,19)</sup>のごとくmyofibroblasts(MFB)がcollagen type IIIを産生する細胞の一つであると考えられた。TGF- $\beta$ は、間質細胞をMFBに形質転換させるとともに線維芽細胞を活性化し、間質型collagen産生を促進する<sup>20~22)</sup>。Hewitsonら<sup>23)</sup>は、IgA腎症において $\alpha$ SMA陽性細胞が糸球体および尿細管周辺の線維化しつつある間質に増加していることを報告した。この $\alpha$ SMA陽性領域は、間質の線維化の程度との間に正の相関を認めた。よって、Masson-Trichrome染色の画像解析は、間質型collagenの増加と対応していることが判明した。

PTCは尿細管およびその周囲を灌流しており、その障害により尿細管との相互作用が破綻すると考えられる。ヒト腎生検組織の間質面積が増大することにより、PTCが周囲から圧迫され内腔が狭くなり、結果として腎機能の低下を加速するという報告<sup>24,25)</sup>がある。このため、尿細管上皮細胞は虚血状態となることでサイトカインを産生し、さらに間質への細胞浸潤を促進すると考えられている。また、ラットにおける実験腎炎<sup>26)</sup>においても、間質病変の進行とともにPTCの内皮細胞障害と血管網の荒廃が進行

する。その部位に一致して著明な線維化と尿細管の萎縮が認められ、腎機能の低下と有意な相関が認められている。今回の検討では、PTCの数と増加した間質面積との間には負の相関を認めた。尿細管萎縮に先行してPTC障害をきたしているため、CD34染色によるPTC数の減少は、間質障害を予測する良い組織学的マーカーになる可能性がある。免疫染色に用いられ血管内皮のマーカーとして、第VIII因子関連抗原よりもCD34の特異性が高いとする報告<sup>27)</sup>があり、今回の検討ではPTCのマーカーとしてCD34を用いたが、CD34による染色が障害されたPTCの内皮細胞を検出しない可能性もあり、腎病理医による組織構造の観察結果と対比する必要がある。

IgA腎症の組織障害度を画像解析装置を用いて定量化する試みは、主に糸球体面積の測定から推測される糸球体肥大の評価が行われてきた<sup>28~30)</sup>。IgA腎症では、疾患の進行により個々の糸球体肥大の程度や肥大した糸球体の全体に占める割合が異なることが指摘されている。しかし、画像解析による間質障害の定量化に関する論文はみあたらない。最近、Howieら<sup>31)</sup>は、腎生検組織において血管を除いた硬化糸球体、線維化した間質、萎縮あるいは拡大した尿細管を画像に取り込んで、慢性障害の指摘を提唱し、予後との良い相関を認めることを報告している。糸球体、尿細管および間質を含めて判断する場合、小さい生検標本を用いるときに過大評価する危険がある。これらは、独立して評価する必要があると考えられる。われわれのMasson-Trichrome染色の抽出法を用いる場合、簡便に施行できる利点があり、腎病理医による組織構造の観察と併用することにより、経時的に腎生検所見を比較するのに有用であると考えられた。

## 結 論

色抽出画像解析法を用いて、IgA腎症における間質面積の定量化を試みた。本法は糸球体および血管を除いた腎皮質の純粋な間質面積を算出することが可能であり、従来の半定量的評価と非常によく相関していた。色抽出法を用いれば、間質病変を順序変数で表すことができ、腎病理医の組織構造の観察と併用することにより、IgA腎症における間質線維化の評価がより正確になると考えられた。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、臨床データの集積にご協力いただきまし

た第4内科学教室員諸兄に深謝いたします。また、病理標本の作製にご協力いただきました堀田 茂氏に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第44回日本腎臓学会学術総会(2001年、東京)において発表した。

## 文 献

- Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 1991 ; 39 : 550-6.
- Bohle A, Strutz F, Mueller GA. On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies. *Exp Nephrol* 1994 ; 2 : 205-10.
- Risdon RA, Sloper JC, De Wardener. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet* 1968 ; 1 : 363-6.
- Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE, Benditt. Structural-functional correlations in renal disease. Part II: The correlations. *Hum Pathol* 1970 ; 1 : 631-40.
- Bohle A, Christ H, Grund KE, Mackensen A. The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contrib Nephrol* 1979 ; 16 : 109-14.
- Eknoyan G, McDonald MA, Appel D, Truong LD. Chronic tubulo-interstitial nephritis : correlation between structural and functional findings. *Kidney Int* 1990 ; 38 : 736-43.
- Ibels LS, Gyory AZ. IgA nephropathy; Analysis of the natural history, important factors in the progression of renal disease, and a review of the literature. *Medicine* 1994 ; 73 : 79-102.
- Shigematsu H, Kobayashi Y, Tateno S, Hiki Y, Kuwao S. The significance of tubulointerstitial nephritis in IgA nephritis. *Jpn J Nephrol* 1994 ; 36 : 25-32.
- Albert CM, Fine LG. Loss of glomerular function and tubulointerstitial fibrosis : Cause or effect? *Kidney Int* 1994 ; 45 : 345-51.
- Freese P, Norden G, Nyberg G. Morphologic high-risk factors in IgA nephropathy. *Nephron* 1998 ; 79 : 420-5.
- 重松秀一. IgA 腎症の組織学的障害度(Grade)と進展度(Stage). *日腎会誌* 1996 ; 38 : 315-22.
- Striker GE, Schainuck LI, Cutler RE, Benditt EP. Structural-functional correlations in renal disease. Part I : A method for assaying and classifying histopathologic changes in renal disease. *Hum Pathol* 1970 ; 1 : 615-30.
- Bohle A, Mackensen-Haen S, Gise H, Grund KE, Wehrmann M, Batz CH, Bogenschutz O, Schmitt H, Nagy J, Muller C, Muller G. The consequences of tubulo-intestinal changes for renal function in glomerular patients. *Pathol Res Pract* 1990 ; 186 : 135-44.
- Scheinman JI, Foidart JM, Michael AF. The immunopathology of glomerular antigens. V. The collagenous antigens of the glomerulus. *Lab Invest* 1980 ; 30 : 373-81.
- Yoshioka K, Takemura T, Tohda M, Akano N, Miyamoto H, Ooshima A, Maki S. Glomerular localization of type III collagen in human kidney disease. *Kidney Int* 1989 ; 35 : 1203-11.
- 大図弘之. IgA 腎症における I 型, III 型 collagen の出現 2 に関する臨床病理学的研究. *日腎会誌* 1992 ; 6 : 647-56.
- Razzaque MS, Koji T, Taguchi T, Harada T, Nakane PK. *In situ* hybridization of type III and type IV collagen-expressing cells in human diabetic nephropathy. *J Pathol* 1994 ; 174 : 131-8.
- Gabbiani G. The biology of myofibroblast. *Kidney Int* 1992 ; 41 : 530-2.
- Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 1992 ; 20 : 1-17.
- Border WA. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994 ; 10 : 1286-92.
- Okuda S. Process of tubulointerstitial injury in progressive renal diseases. *Clin Exp Nephrol* 1999 ; 3 : 65-74.
- Wardle EN. Renal collagen synthesis and its control. *Nephron* 1999 ; 83 : 106-10.
- Hewitson TD, Becker G. Interstitial myofibroblasts in IgA glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 1995 ; 15 : 111-7.
- Bohle A, Mackensen-Haen S, Wehrmann M. Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. *Kidney and Blood Press Res* 1996 ; 19 : 191-5.
- Thomas SE, Anderson S, Gordon KL, Oyama TT, Shankland SJ, Johnson RJ. Tubulointerstitial disease in aging; Evidence of underlying peritubular capillary damage, potential role for renal ischemia. *J Am Soc Nephrol* 1998 ; 9 : 231-42.
- Ohashi R, Kitamura H, Yamanaka N. Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; 11 : 47-56.
- Ramani P, Bradley NJ, Fletcher CD. QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium : Assessment of its diagnostic utility in paraffin sections. *Histopathology* 1990 ; 17 : 237-42.
- Toth T, Takebayashi S. Glomerular hypertrophy as a prognostic marker in childhood IgA nephropathy. *Nephron* 1998 ; 80 : 285-91.
- Daimon S, Koni I. Glomerular enlargement in the proliferative glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1998 ; 49 : 145-52.
- 中内みゆき, 波多野道康, 土谷 健, 岩井幸子, 二瓶宏. 慢性糸球体腎炎における腎機能と形態的評価の関連. *日腎会誌* 1999 ; 42 : 737-46.
- Howie AJ, Ferreira MAS, Adu D. Prognostic value of simple measurement of chronic damage in renal biopsy specimens. *Nephrol Dial Transplant* 2001 ; 16 : 1163-9.