

《原 著》

Angiotensin radioimmunoassay による血漿 renin 活性の測定： その基礎的検討と bioassay との比較

岡田 克彦* 長谷川 汪**

緒 言

1959 年 Yalow および Berson¹⁾ が初めて insulin の測定に radioimmunoassay を導入して以来、その特異性、感度、精度、簡便さという点で従来から行なわれている方法に比べて優れているため、種々の蛋白性 hormone の測定方法^{2~4)}として広く用いられるようになった。最近ではその応用範囲も polypeptide、非蛋白物質にも拡大し、さらにその測定手技の改良に伴って感度および精度も飛躍的に向上し、これら一部のものは研究段階にとどまらず日常一般検査化している現状である。

最近では高血圧患者の診断にあたり renin-angiotensin 系の動態、特に renin 活性を検索することは不可欠なものとなっている。これは従来 bioassay^{7~10)} により行なわれていた。しかし bioassay は操作が煩雑であり、概して感度が低く、その測定方法により数値が異なり、また大量の検体を一度に測定することが不可能であった。従ってある限定された研究室で研究を目的として行なわれていたにすぎず、日常一般検査への活用には程遠かった。しかし 1964 年に Goodfriend¹¹⁾ らにより angiotensin の radioimmunoassay が試みられ、

1967 年には Valloton と Haber¹²⁾ によって人工 polymer を angiotensin に結合させ分子量を大きくする方法が行なわれ、感度および回収率が改善され、さらにその後種々の改良が加えられ、Boyd ら¹³⁾ は angiotensinase と converting enzyme の作用を阻害することにより angiotensin の radioimmunoassay を可能ならしめた。

renin の測定については renin それ自体では生物学的活性を有さないため、血漿を incubate し生じた angiotensin を測定することにより間接的に可能である。著者らはこれまで renin とその基質間の種属特異性を応用し、低 renin 血症の場合でもよく検出し得る荒川法¹⁴⁾ にて bioassay を行なってきた。しかしこの方法と従来より行なわれている bioassay と変わりなく、その手技の煩雑さおよびその検体処理能にも限りがある。したがって検体処理能、簡便さ、感度および精度という点でも bioassay よりはるかに優れている radioimmunoassay を assay 面にのみ応用、すなわち荒川法によって angiotensin 抽出操作を行なった試料につき radioimmunoassay にて angiotensin I および II を測定し、また同一試料について従来どおり bioassay にて angiotensin を測定し、両者の比較検討を行ない、また radioimmunoassay の手技につき基礎的検討を加えた。

材料および方法

血漿は heparin 加血液(血漿 1.0 ml に対して、heparin 10 単位)を 4°C 以下にて、10,000 r.p.m.

* 大阪医科大学第 3 内科
現 兵庫医科大学放射線医学教室

** 現 八尾市立病院内科
受付：51 年 8 月 9 日

別刷請求先：西宮市武庫川町 1 番 1 号 (〒663)
兵庫医科大学放射線医学教室
岡田 克彦

15分間遠沈分離し1Mの酢酸を加えpH6.0に調整し、測定まで-20°C以下にて凍結保存を行なった。その血漿1.0mlにCohnのヒト血漿蛋白分画IV-4(Fraction IV-4ミドリ)を190mgおよび0.1M diethylamine acetate bufferにてpH6.0に緩衝化したDowex 50W×2を500mg加え、37°Cにて18時間振盪下でincubationを行なった後、0.2N diethylamineで溶出、減圧乾固したものを生理食塩水2mlに溶解し、それをrat bioassayおよびradioimmunoassayの試料に供した(Fig. 1)。

Radioimmunoassayによるangiotensinの測定にはCEA-IRE-SORIN製のangiotensin IおよびII radioimmunoassay kitを用いた。

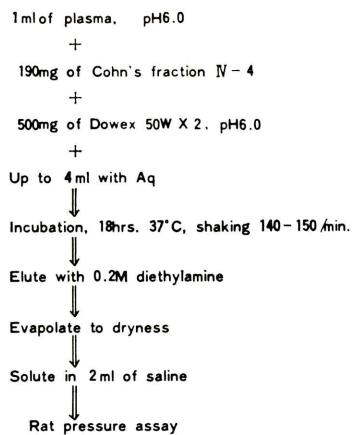


Fig. 1 Chemical steps in the bioassay of angiotensin I by Arakawa

Table 1 Radioimmunoassay procedure for angiotensin I.

Step	Group tube No	Total activity	Standard curve		Sample	
		1~2 (a)	3~4(b)	5~14(c)	37°C 15~57(d)	4°C 58~100(e)
(1) Buffer B		1.45 ml	0.90 ml	0.80 ml	0.85 ml	0.85 ml
(2) Standard solution		—	—	0.1 ml	—	—
(3) Sample		—	—	—	0.05 ml	0.05 ml
(4) ¹²⁵ I-Angiotensin I		0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
(5) Antiserum		—	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
(6) Incubation		mix → 4°C 20~24 hrs. → chill				
(7) Charcoal suspension		—	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
(8) Mix		vortex mixer → wait 10 min.				
(9) Centrifugation		3000~5000g. 10min. at room temperature				
(10) Decant						
(11) Count		Well-type scintillation counter				

Angiotensin I

- 1) ^{125}I -angiotensin I ($2.5 \mu\text{Ci}$ 凍結乾燥品)
- 2) anti-angiotensin I (凍結乾燥品)
- 3) angiotensin I standard (凍結乾燥品)
- 4) dextran-charcoal mixture (凍結乾燥品)
- 5) Tris acetate buffer (凍結乾燥品)

Angiotensin II

- 1) ^{125}I -angiotensin II ($2 \mu\text{Ci}$ 凍結乾燥品)
- 2) anti-angiotensin II (凍結乾燥品)
- 3) angiotensin II standard (凍結乾燥品)
- 4) dextran-charcoal mixture (凍結乾燥品)

これら試料の調整ならびに操作手技は kit の説明書に従った。詳細は Table 1, 2 に示すとくである。正確を期すために検体および標準液は 2 ないし 3 重測定方法を行なった。count に際しては島津製作所製の autowell type scintillation counter を使用し、標準曲線および data 处理にあたっては、NOVA の minicomputer を用いた。前記の radioimmunoassay kit の標準液は 5-isoleucine angiotensin II であるのに対し、bioassay に用い

Table 2 Radioimmunoassay procedure for angiotensin II.

Step	Group	(a) Blank "0 倍"	(b) Standard curve	(c) Activity control	(d) Sample
(1) Buffer B		0.6 μl	0.5 μl	0.9 μl	0.6 μl
(2) Angiotensin-free pooled plasma		0.2 μl	0.2 μl	—	—
(3) Sample		—	—	—	0.2 μl
(4) Standard solution		—	0.1 μl	—	—
(5) Anti-angiotensin II		0.1 μl	0.1 μl	—	0.1 μl
(6) Pre-incubation		mix \rightarrow 4°C 6 hrs.			
(7) ^{125}I -Angiotensin II		0.1 μl	0.1 μl	0.1 μl	0.1 μl
(8) Incubation		mix \rightarrow 4°C 24 hrs. \rightarrow chill			
(9) Charcoal suspension		0.5 μl	0.5 μl	—	0.5 μl
(10) Mix		vortex mixer			
(11) Centrifugation		3000~5000 r.p.m. 10 min. at 4°C			
(12) Decant					
(13) Counting		Well-type or liquid scintillation counter			

るそれは 5-valine angiotensin II であるため両者の抗原抗体反応における差を検討した。

荒川法による angiotensin 抽出液は生理食塩水で溶解しているため血漿と比較して粘稠度が不足している。したがって radioimmunoassay に際して dextran-charcoal の流出および吸着に関し種々の問題が考えられるため、粘稠度を加味する目的で ovalbumine あるいは angiotensin free の血漿を添加し粘稠度を血漿に近似させその差について検討を行なった。

さらに水の純度が radioimmunoassay に及ぼす影響について蒸留水および蒸留後脱イオン化を行なった純水を用いて検討を行なった。

Radioimmunoassay において使用試験管の種類により種々のバラツキが生じることはこれまで報告¹⁵⁾されている。このバラツキを少なくするため、すなわち管壁への吸着を少なくし安定した曲線を得るために lysozyme の添加が推奨されている。この添加の影響につき検討するため酢酸緩衝液に lysozyme を 2.5 mg/ml 加えて比較検討した。

また凍結融解を繰返すことによる renin 活性に及ぼす影響について検討するため凍結保存した血漿をある一定期間置き、凍結融解を繰返し行ないその活性を測定した。

著者らが bioassay 法として用いた荒川法は、incubation においては angiotensinase 阻害剤を全く使用せず、生じた angiotensin は添加されたイオン交換樹脂に直ちに吸着させ angiotensinase の作用を受けないようにしている。このようにして得られた angiotensin 抽出液を rat 升圧反応に用いて renin 活性を測定しているが、この抽出液に含まれている angiotensin が I なのかあるいは II なのか未だ判然としない。従って本法により得られた同一試料について bioassay ならびに radioimmunoassay を用い angiotensin I および II を測定し、その量的関係を検討した。

結 果

1) 標準曲線

Angiotensin I および II の標準曲線は Fig. 2-a,

2-bに示すとくである。これらの結合率は angiotensin I で 44~64%, angiotensin II では 32~54% の範囲内にあり満足すべき値であった。また Fig. 3 に示すとく 5-isoleucine angiotensin II と 5-valine angiotensin II の標準曲線を比較検討した結果、著明な差がみられず抗原抗体反応において両者の間に差がないと考えられた。なおこの時の結合率は 5-isoleucine angiotensin II 42.3%, 5-valine angiotensin II 46.1% であった。

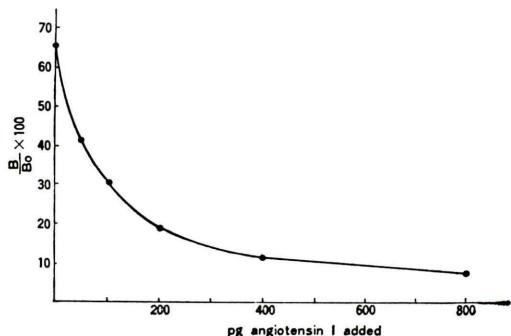


Fig. 2-a Standard curve of angiotensin I

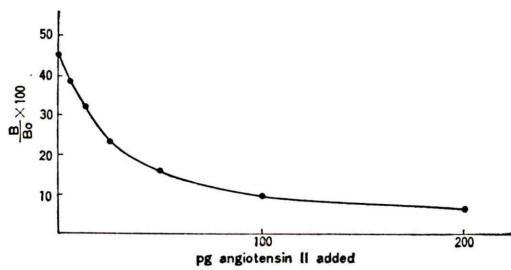


Fig. 2-b Standard curve of angiotensin II

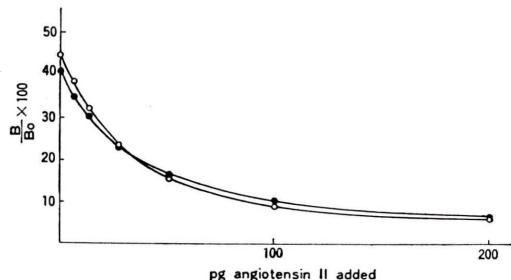


Fig. 3 Standard curves of isoleucine-5-angiotensin II (solid circle) and valine-5-angiotensin II (open circle)

2) Ovalbumine の影響

Ovalbumine 添加による試料の粘稠度の影響は Fig. 4 に示すとく、荒川法¹⁴⁾による抽出液に ovalbumine もしくは angiotensin free の血漿を添加して性状を血漿に近似させたが radioimmunoassay の測定値は両者の間に何らの差を認めなかった。

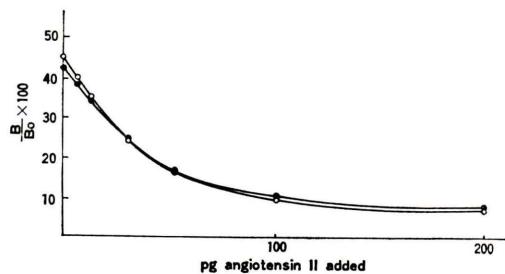


Fig. 4 Effect of ovalbumine on the stability. Solid circle represents the standard solution with ovalbumin added and open circle, the solution not added.

3) 水の純度の影響

Fig. 5 に示すように蒸留水を用いた標準曲線ではかなりバラツキがみられたが、蒸留後脱イオン化を行なった比抵抗 500Ω 以上の純水を用いた場合はバラツキが著明に減少している。

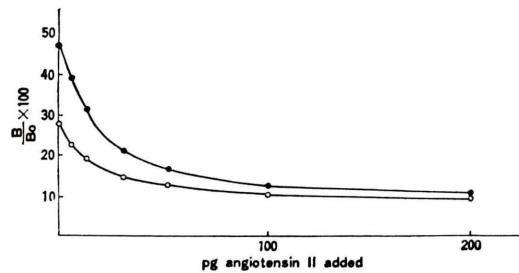


Fig. 5 Effect of quality of water on the stability. Solid circle represents the standard solution using deionized distilled-water and the open circle, the solution using distilled water.

4) Lysozyme の影響

Fig. 6 にみられるように radioimmunoassayにおいては lysozyme の添加により安定した曲線が得られることが明らかとなった。

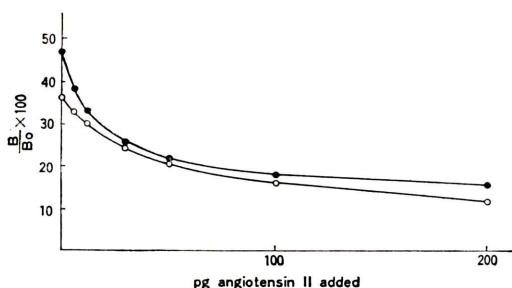


Fig. 6 Effect of lysozyme on the stability. Solid circle represents the standard solution with lysozyme added and open circle, the solution not added.

5) 回収率

検体血漿中へ既知量の標準 angiotensin I あるいは angiotensin II を加え、それらの回収率を求めた。すなわちそれぞれ既知量 8 ng, 4 ng を各検体に加え、その回収率を求めたところ angiotensin I では 95.78%, angiotensin II では 90.5% と良好な結果が得られた。

6) 凍結融解の影響

Fig. 7 に示すように採血後凍結保存することなく直ちに測定した renin 活性を 100% とすると凍結および融解を 1 回行なった場合は 96.5%，第 2 回目では 88.7% を示しかなりの活性が維持されていたが、第 3 回目では 74.2% と著しく低下していた。

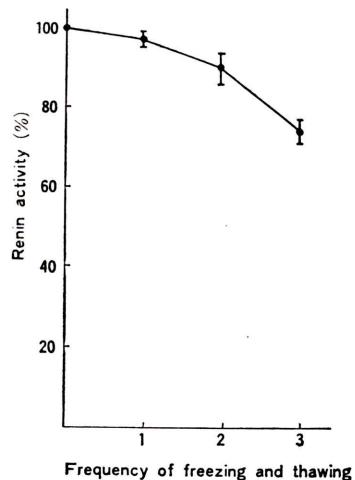


Fig. 7 Changes of plasma renin activity by freezing and thawing.

7) Radioimmunoassay と bioassay の比較

荒川法¹⁴⁾による抽出液を angiotensin I および II の radioimmunoassay kit にて同一試料を測定したところ、angiotensin I および II の両者よりもなることが明らかとなり、その量的関係では I の方がはるかに多く含まれていることが判明した。これを bioassay による angiotensin 濃度と比較すると、angiotensin II では bioassay で得られた値

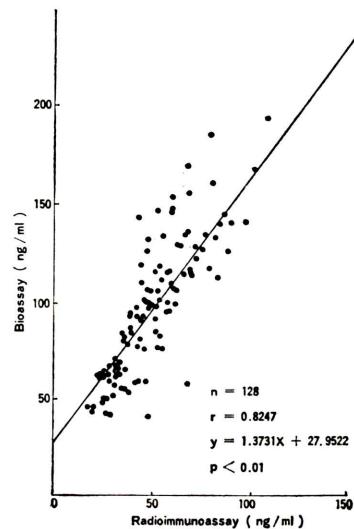


Fig. 8 Correlation between radioimmunoassay of angiotensin I and bioassay.

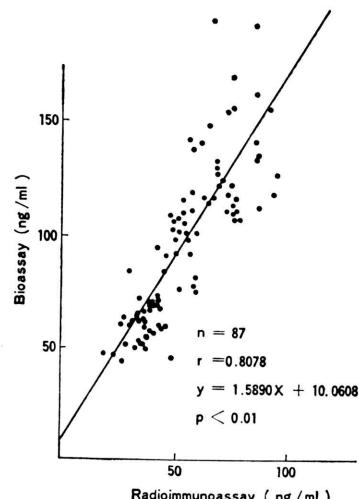


Fig. 9 Correlation between radioimmunoassay of angiotensin I+II and bioassay.

の約1/10を示したにすぎない。ちなみにこれらの相関関係を求めるとき angiotensin I では 0.825 ($n=128$, $P<0.01$), I と II の和では 0.808 ($n=87$, $P<0.01$) となり有意の相関を認めた(Fig. 8, 9)。

8) 臨床的検討

正常血圧患者の control 群 10 例の血漿 renin 活性値は bioassay 値で平均 56.1 ± 10.3 ng/angiotensin/ml, radioimmunoassay 値では平均 50.0 ± 9.3 ng/angiotensin I/ml であった。また腎血管性高血圧症および原発性 aldosterone 症の病例は Table 3 に示すごとく良好なる相関関係がみられた。

Table 3 Comparison with bioassay and radioimmunoassay.

Normotensive (10 cases)

	bioassay	radioimmunoassay
1.	36.1	32.3
2.	31.0	27.5
3.	89.3	82.8
4.	75.8	64.4
5.	44.8	40.2
6.	42.1	39.6
7.	34.2	30.8
8.	125.4	111.5
9.	63.6	55.9
10.	18.4	15.0

Essential hypertension (10 cases)

	bioassay	radioimmunoassay
1.	45.6	38.5
2.	35.8	32.1
3.	80.0	74.5
4.	66.0	60.7
5.	43.3	42.4
6.	19.2	17.5
7.	52.2	59.8
8.	22.8	20.4
9.	143.6	129.0
10.	95.2	84.2

Primary aldosteronism	M. K.	43 yo.	Female
			radioimmunoassay
bioassay		24.5	20.2
salt restriction		18.4	14.2

Renovascular hypertension	A. S.	7 yo.	Male
			radioimmunoassay
bioassay		109.9	102.4
R		63.1	58.0
L		80.0	76.8
D		79.0	72.8
E		81.4	77.9

bioassay: ng angiotensin/ml
radioimmunoassay: ng angiotensin I/ml

考 按

Angiotensin の radioimmunoassay による血漿 renin 活性の測定は感度、精度、簡便さなどの点で、従来の bioassay に比べ優れており、特に検体処理能に関しては bioassay の比ではない。したがって外来での高血圧症の screening などの大量の検体測定を要する場合に非常に有用であると考えられる。

CIS より供給されている kit 中の angiotensin の標準液は 5-isoleucine-angiotensin II であり bioassay に用いられてきたそれは 5-valine-angiotensin II である。このように第 5 番目の amino 酸の異なる化合物が抗原抗体反応系において同様の態度をとるか否かを検討したところ、著者らの行なった実験では両者に有意の差がみられなかつたが、生体内における生物学的活性あるいは生化学的反応における態度は異なっているかも知れない。事実 Hollemans ら¹⁶⁾ は natural angiotensin II と synthetic angiotensin II に対して異なる抗体が存在することを報告している。

血漿をそのまま radioimmunoassay に用いる場合にはかなりの粘稠度を有するため dextran charcoal の流出および吸着に関しては問題はないが、著者らが radioimmunoassay に応用した試料は荒川法¹⁴⁾により得たもので、生理食塩水に溶解しているため血漿に比し粘稠度の不足がある。したがって本試料の性状を血漿に近似させるため ovalbumine あるいは angiotensin free の血漿などを加えてみたが、有意な差は認められず厳密な操作を行なえば dextran charcoal に対する粘稠度の影響はないと考えられる。その結果著者らは以後試料の粘稠度に対する操作は加えなかつた。

radioimmunoassay においては angiotensin の測定に限らず各種抗原抗体反応において水に含まれている極く微量の不純物により種々の影響を受けるといわれているため、著者らも測定に用いる水の純度の radioimmunoassay に及ぼす影響を検討したところ、前述のごとく標準曲線に明らかな差が認められ、使用する水の純度の測定値に対する

る影響が大きいことが明らかとなった。従って測定にはできるだけ純度の高い水を用いることが精度の点から考えても望ましい。これに関して gastrin radioimmunoassay において風早ら¹⁷⁾が同様の報告をしている。また使用試験管の種類によりバラツキが生じるといわれており¹⁵⁾、このバラツキを少なくする目的で lysozyme の添加を行なったところ、明らかにより安定した標準曲線を得ることができた。したがって管壁への isotope や antibody などの付着を少なくし、安定した成績を得るために試験管の種類に関係なく lysozyme を添加すべきであると考える。しかしながら1975年5月以降の kit は tris 酢酸緩衝液から燐酸緩衝液に変わっており、この緩衝液の場合 lysozyme の添加がなされていない。著者らはこの点について未だ検討する機会を得ていないが、最近 lysozyme 添加 tris 酢酸緩衝液を用いた場合と lysozyme 添加のない燐酸緩衝液を用いた場合とでは測定値に有意の差がないとの報告¹⁸⁾を得ている。

著者らは試料を直ちに測定できない場合は-20°C 以下にて凍結保存を行ない測定直前に融解している。この凍結融解の血漿 renin 活性の影響をみると凍結融解を繰返すごとに血漿 renin 活性は明らかに低下を示した。また融解に際しては温水あるいは室温で行なった場合、4°C にて incubation を行なった検体の angiotensin I および II が高値を示すようになり血漿 renin 活性の精度が著しく低下する。従って試料の凍結融解を繰返すことはできる限り避け、融解にあたってはできる限り低温にて行なうべきであると考える。著者らは再検などにおける凍結融解の影響を避けるため血漿を少量ずつ分注し凍結保存を行なっている。

著者らがこれまで血漿 renin 活性測定にヒト血漿蛋白分画 IV-4 を renin 基質として添加している荒川法¹⁴⁾による bioassay を用いてきた理由として、renin-renin 基質反応における種特異性を重要視し、さらには基質添加によって低 renin 活性の測定を良好にしている点、その上 angiotensinase 阻害剤として EDTA の添加を行なわず rat assay 時の影響をなくしている点にある。従ってこの方

法により得た試料を radioimmunoassay に応用し、従来よりの bioassay における種々の欠点を補うことを企てた。しかしこの angiotensin 抽出液は angiotensin I であるのか II であるかは不明である。bioassay においては angiotensin I と II の和を測定している。すなわち抽出液中の angiotensin I は bioassay においては rat に注入されると直ちに converting enzyme により angiotensin II となり昇圧反応を示し、angiotensin I も angiotensin II として測定されている。しかし radioimmunoassay では angiotensin I および II は別々に測定を行なわねばならない。このため本抽出液について angiotensin I および II を別々に測定し、それらの関係について検討した。その結果 angiotensin I が II に比して大量に含まれていることが明らかとなった。特に angiotensin II は bioassay による値の約 1/10 を示したに過ぎなかった。このことについては開原ら¹⁹⁾も著者らと同様の結果を報告している。しかし EDTA を用いないで行なった incubation により得た試料においてはこれらの差が認められず、この差は incubation における EDTA による angiotensinase の阻害に基づくものとしている。しかしながら著者らは EDTA などの阻害剤を全く用いず、incubation 中に生じた angiotensin を直ちにイオン交換樹脂に吸着させるようにしており EDTA の影響は考えられない。むしろこのイオン交換樹脂の吸着能に問題があるのでないかとも考えたが、最近 Nielsen²⁰⁾が荒川法¹⁴⁾の原法である Boucher⁷⁾の方法によって得た試料では angiotensin II が少なく、もし radioimmunoassay による angiotensin II の値をもって renin 活性値として bioassay と比較するならば converting enzyme を含む血漿の添加を行なわねばならないと報告している。このようなことからイオン交換樹脂の吸着能にも関係なく、in vitro の反応系における血漿中の converting enzyme 活性になんらかの問題があるのではないかとを考えられる。ここで radioimmunoassay による angiotensin I と II の和ならびに angiotensin I と bioassay 値との相関係数を計算すると、前者では

0.808 ($P < 0.01$), 後者では 0.825 ($P < 0.01$) となり良好な相関を認めている。このような結果から renin 活性値の測定としては angiotensin I を用いた方が従来の bioassay により得られた値にほぼ等しい値が得られるため、より望ましいと考えられる。converting enzyme の活性の問題については今後さらに検討しなければならないと考える。

結 語

angiotensin I および II の radioimmunoassay kit を用いて基礎的検討を行なった。すなわち angiotensin II の標準液に用いた 5-isoleucine angiotensin II, および 5-valine angiotensin II の抗原抗体反応において差がみられなかった。また試料の粘稠度の差は何ら影響はなく、水はできるだけ純度の高いものを用い、lysozyme を添加することによりさらに安定した成績を得ることができる。凍結融解により renin 活性は低下し、3回の凍結融解で活性は 74.2% に低下した。回収率については、angiotensin I 95.8%, angiotensin II 90.5% と良好であった。bioassay 値と radioimmunoassay 値との相関関係は angiotensin I と II の和および angiotensin I とに有意の関係が認められた。本法は renin-angiotensin 系の臨床的研究に十分役立つと考えられる。

稿を終わるにあたり御指導をいただいた柏井忠治郎助教授(現: 大阪赤十字病院内科部長)ならびに well-type-scintillation counter および minicomputer の使用について種々の便宜を与えていただき、また御助言をいただきました大阪医科大学放射線医学教室赤木弘昭教授に深謝いたします。なお本論文の要旨は第 156 回日本医学放射線学会関西地方会にて発表した。

文 献

- Yalow RS and Berson SA: Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by immunological Methods. *Nature* **184**: 1648, 1959
- Odell WD, Willber JF and Paul WE: Radioimmunoassay of Thyrotropin in Human Serum. *J Clin Endocrinol* **25**: 1179, 1965
- Glick SM, Roth J, Yalow RS, et al: Immunoassay of Human Growth Hormone in Plasma. *Nature* **199**: 784, 1963
- McGuigan JE: Immunochemical studies with synthetic human gastrin. *Gastroenterology* **54**: 1005, 1968
- Unger RH, Eisentraut AM, McCall MS, et al: Glucagon antibodies and their use for immunoassay for glucagon. *Proc Soc Exp Biol Med* **102**: 621, 1959
- Oliver GC Jr., Parker BM, Brasfield DL, et al: The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. *J Clin Invest* **47**: 1035, 1968
- Boucher R, Veyrat R, Genest J, et al: New procedures for measurement of human plasma angiotensin and renin activity levels. *Canad Med Ass J* **90**: 194, 1964
- Skeggs LT, Kahn JR and Shumway NP: The Isolation and Assay of Hypertension from Blood. *J Exptl Med* **95**: 241, 1952
- Pickens PT, Bumpus FM, Lloyd AM, et al: Measurement of Renin Activity in Human Plasma. *Circul Res* **17**: 438, 1965
- Brown JJ, Davies DL, Lever AF, et al: The estimation of renin in human plasma. *Biochem J* **93**: 594, 1964
- Goodfriend TL, Levine L and Fosman GD: Antibodies to bradykinin and Angiotensin a use of Carbodiimides in immunology. *Science* **144**: 1344, 1964
- Vallotton MB, Page LB, Haber E: Radioimmunoassay of Angiotensin in Human Plasma. *Nature* **215**: 714, 1967
- Boyd GW, Landon J and Peart WS: Radioimmunoassay for determining plasma levels of Angiotensin II in man. *Lancet* **2**: 1002, 1967
- Arakawa K, Minohara A, Yamada J, et al: Micro-determination of Human Plasma Renin Activity with the Addition of Homologous Substrate. *Clin Chim Acta* **22**: 309, 1968
- 上柳英郎: ^{131}I と ^{125}I の計測法. *最新医学*, **26** (6): 1049, 1971
- Hollemans HJG, van der Meer J and Touber JL: Radioimmunoassay of Angiotensin. *Nature* **217**: 277, 1968
- 風早康弘, 稲原弘久: Gastrin radioimmunoassay Kit (CIS 製)に関する基礎的検討. *Medical Postgraduates* **11** (7): 404, 1973
- 風早康弘: 私信
- 開原成允, 上田英雄: Angiotensin II radioimmunoassay およびその問題点. *医学のあゆみ*, **70** (5): 220, 1969
- Nielsen I, Pouken K and Simonsen G: Determination of Plasma Renin Activity by Radioimmunoassay for Angiotensin II. *Acta Med Scand* **191**: 377, 1972

Summary

Measurement of Renin Activity by Radioimmunoassay of Angiotensin: Fundamental Evaluation and Comparison with Bioassay

Katsuhiko OKADA* and Hiroshi HASEGAWA**

Third Department of Internal Medicine, Osaka Medical College, Takatsuki, Osaka

** Department of Radiology, Hyogo College of Medicine*

*** Department of Internal Medicine, Yao Municipal Hospital, Yao Osaka*

A fundamental evaluation of measurement of renin activity was done by using radioimmunoassay of angiotensin I and II by comparison with radioimmunoassay and bioassay on renin activity in human plasma.

As for the antigen-antibody reaction, there was no difference in affinity between isoleucine-5-angiotensin II and valine-5-angiotensin II which was used as a standard for the bioassay method. Viscosity in a sample for radioimmunoassay brought no influence upon renin activity and steady

results were obtained by addition of lysozyme and by using quality deionized water. Renin activity after the third instance of freezing and thawing was reduced to 74.2%. Recovery ratio of angiotensin I and II were 95.0% and 90.5% respectively. Correlation between radioimmunoassay and bioassay were significant in the sum of angiotensin I and II.

These results suggest that radioimmunoassay method may be useful in the clinical field.