

《ノート》

固相法を使用する血漿レニン活性 RIA キットの臨床応用に対する基礎的検討

Measurement of Plasma Renin Activity by Solid-Phase Radioimmunoassay

春山 和見* 山崎 正明* 土岐 高久* 福地 総逸*

Kazumi HARUYAMA, Masaaki YAMAZAKI, Takahisa TOKI and Soitsu FUKUCHI

Third Department of Internal Medicine, Fukushima Medical College, Fukushima, Japan

I. 緒 言

血漿レニン活性 (PRA) の測定は、各種の高血圧症の鑑別診断や治療法の選択および病態生理の研究に不可欠であって、はじめ、アンジオテンシンの昇圧作用を利用する生物学的測定法¹⁾ により行われていた。1969年、Haber ら²⁾は血中のレニンによって産生されるアンジオテンシン I (AI) を radioimmunoassay (RIA) によって測定する方法を報告して以来、本測定法は急速に普及して routine にも行われる検査法となった。

現在、本邦において数種の PRA 測定キットが販売されているが、最近 GammaCoat ¹²⁵I PRA キット (CA-533) が日本トラベノール社により開発された。本キットは、AI の結合分画と遊離分画の分離に固相法を利用しているので、測定過程が簡単な上に、AI 産生の pH、交換酵素およびアンジオテンシネースの阻害などの点に工夫のみられる新しいキットである。今回、われわれは本キットの基礎的検討を行うと共に本法により各種疾患患者の PRA を測定し、現在多用されている

Dinabot 社製 PRA RIA キットの測定値と比較検討した。その結果、臨牀上、充分に使用し得ることが明らかとなったので報告する。

II. 実験方法

1) キットの概要

本キットでは、試験管内壁下部に抗 AI 家兎血清がコーティングしてある。それ故、試験管内で assay を行い incubation 後試験管内容液を吸引除去することにより、結合分画と遊離分画を分離することが可能である。レニンのアンジオテンシン I 産生能は pH 6.0 付近で高く³⁾、またレニン基質からレニンにより産生される AI は pH 7.3～7.4 で最も安定⁴⁾であるため、本キットでは、pH 6.0 の maleate と pH 7.4 の phosphate generation buffer の 2 種類が含まれている。また、産生された AI が AII に変換するのを防ぐ阻害剤として、従来から使用されている 8-hydroxyquinoline および dimercaprol よりも、さらに強力で毒性の少ない phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)⁵⁾ が用いられている。

2) キットの内容

100 検体用 (Cat. No. CA-533) のキットの内容を Table 1 に示す。

Key words: Solid-phase, Plasma renin activity, Angiotensin I, radioimmunoassay, hypertension.

* 福島医科大学第三内科

受付：56年2月10日

最終稿受付：56年3月31日

別刷請求先：福島市杉妻町4-45 (〒960)

福島医科大学第三内科

春山 和見

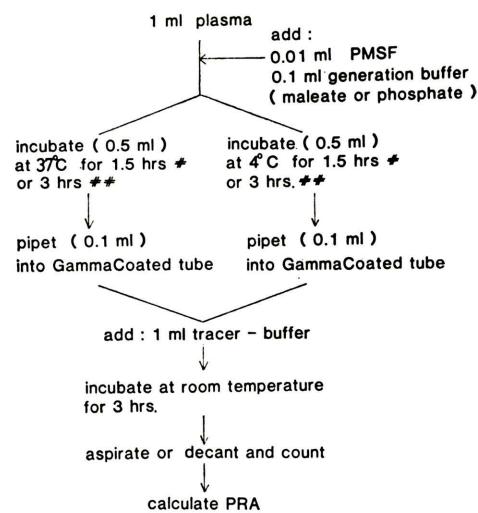
Table 1 Reagents of Gamma Coat PRA RIA Kit (CA-533)

| | | |
|--|-----------------------------------|-----------|
| 1) ^{125}I -angiotensin I tracer | 1 $\mu\text{Ci}/\text{vial}$ | 2 vials |
| 2) rabbit anti-angiotensin I serum coated tube | | 100 tubes |
| 3) angiotensin I standard | 0.2, 0.8, 3.0, 10.0, 50.0 (ng/ml) | 5 vials |
| 4) phenyl methyl sulfonyl fluoride solution | 1 ml | 1 vial |
| 5) maleate generation buffer solution | 5 ml (pH 6.0) | 1 vial |
| 6) phosphate generation buffer solution | 5 ml (pH 7.4) | 1 vial |
| 7) assay buffer | 10 ml (pH 7.6) | 1 vial |

3) 測定法

肘静脈より EDTA・2Na (5mg/5ml) 入り試験管に採血後、冷却遠心機で血漿を分離し、測定時まで -20°C に保存した。測定はすべて採血後 2 週間以内に行った。AI の產生には、Fig. 1 に示す如く、測定試料 1 ml に PMSF 溶液 10 μl を加えた後、maleate generation buffer (pH 6.0) 0.1 ml を加えて振盪した。次いで、この混和液の 0.5 ml を 37°C に、残りのうち 0.5 ml を 4°C に、いずれも 90 分間 incubate し、その 0.1 ml を、それぞれ 2 本の抗 AI 家兎血清処理試験管に入れて後、tracer buffer (あらかじめ ^{125}I -AI に対し 10 倍量の assay 用緩衝液を加えて充分に混和) の 1 ml を加えて振盪、室温にて 3 時間 incubate した。次いで、反応液を吸引除去し、試験管内壁に付着した結合分画の放射活性をガンマカウンターで測定した。標準曲線作製のためには添付の標準 AI (あらかじめ蒸留水 2.0 ml を加えて混和) の 0.02, 0.08, 0.3, 1.0 および 5.0 ng を抗 AI 家兎血清処理試験管に入れ、未知試料測定の場合と同様、tracer buffer を加えて RIA を行った。PRA は Table 2 に示す方法により計算した。

臨床対象例は入院中の本態性高血圧症 37 例、甲状腺機能亢進症 8 例および原発性アルドステロン症 4 例のほか腎血管性高血圧症、低レニン性選択的低アルドステロン症および浮腫を伴う心不全各 3 例、特発性アルドステロン症および悪性高血圧症各 2 例、 17α -hydroxylase 欠乏症 1 例であった。



* maleate buffer system (pH 6.0 generation)
** phosphate buffer system (pH 7.4 generation)

Fig. 1 Procedure in Gamma Coat PRA RIA Kit (CA-533)**Table 2** Calculation of PRA

| |
|---|
| 0.1 ml sample maleate generated (pH 6.0) for 1.5 hrs. |
| ng/ml/hr: (ng at 37°C - ng at 4°C) |
| $\times \frac{1.11}{0.1} \times \frac{1}{1.5} = (\text{net ng}) \times 7.4$ |
| or |
| 0.1 ml sample phosphate generated (pH 7.4) for 3 hrs |
| ng/ml/hr: (ng at 37°C - ng at 4°C) |
| $\times \frac{1.11}{0.1} \times \frac{1}{3.0} = (\text{net ng}) \times 3.7$ |

本態性高血圧症においては、採血施行前の 2 週間前よりあらゆる薬剤の投与を中止した。さらに 1 週間以上、食塩摂取量 1 日 153 mEq として後、早朝空腹安静臥床時に採血後、furosemide 1 mg/kg 静注 2 時間立位 (2 者) 負荷試験を施行し、負荷後の PRA が 1.0 ng/ml/h 以下の症例を低レニン群、1.0~6.0 ng/ml/h の症例を正常レニン群、6.0 ng/ml/h 以上の症例を高レニン群と分類した。対照として、正常者 16 例を選び 1 週間以上、食塩摂取量 1 日 153 mEq としてのち早朝空腹安静臥床時に採血して測定した。

III. 結 果

本抗 AI 血清の特異性を検討するため、アンジオテンシン II [1-sarcosine, 8-isoleucine] およびレニン基質を各々 $10\mu\text{g}$ まで測定用試験管に添加して RIA を施行したところ、Fig. 2 の如く、交叉反応性はほとんど認められなかった。抗 AI 家兎

血清処理試験管の抗体は非標識 AI を加えなかつた場合に、 $^{125}\text{I}-\text{AI}$ の 43.6% に結合した (Fig. 3)。本 RIA の測定感度は 0.02 ng 以下、最小測定濃度 (PRA 値) は 0.15 ng/ml/h であった。10 検体を測定した場合の intraassay variability および interassay variability を検討するため、濃度の異なる 2 種類の血漿につき、同一キットおよび異なるキットを

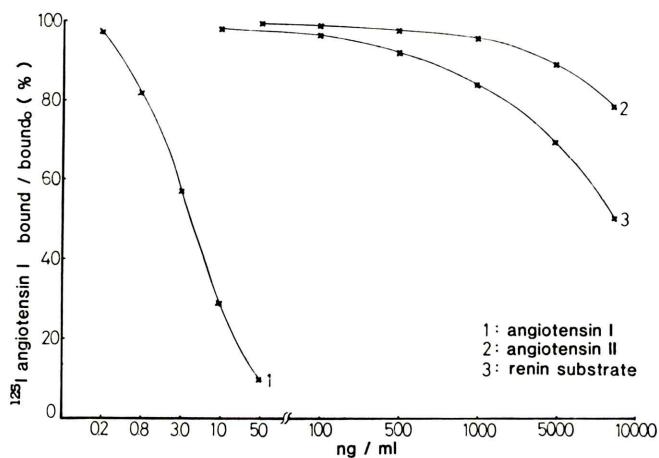


Fig. 2 Specificity of angiotensin I anti-serum in maleate buffer, pH 6.0.

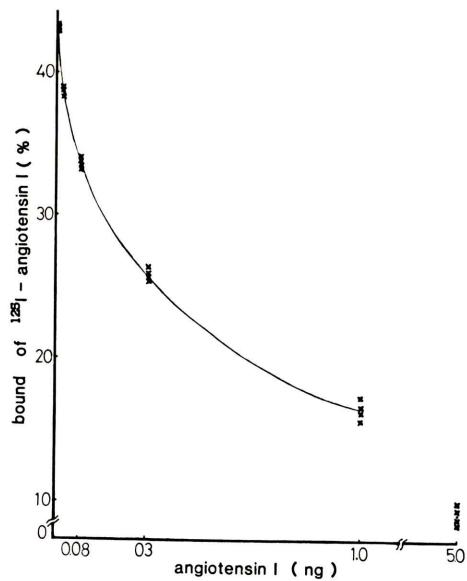


Fig. 3 Standard curve of angiotensin I.

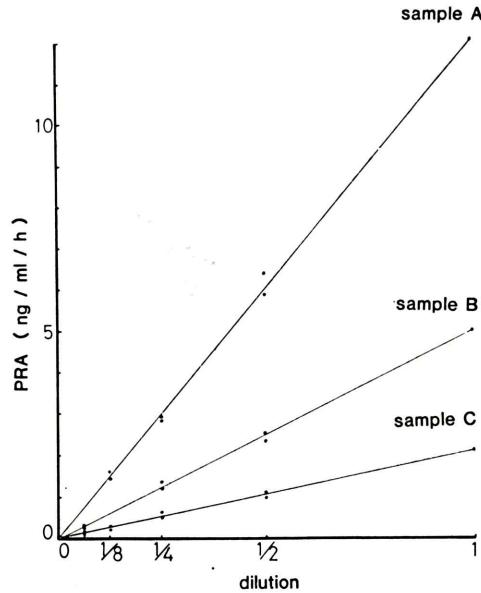


Fig. 4 Change of PRA value by diluting plasma.

用いてそれぞれ10回測定した結果、平均値±標準偏差(%)は、 7.2 ± 6.8 および 10.9 ± 8.9 であった。

pH 6.0 により產生された AI 濃度の異なる3検体について、キット添付の assay 用緩衝液で16倍まで段階的に稀釈を行い、RIA を施行して PRA を測定したところ、Fig. 4 の如く、すべて原点を通る直線を示した。38検体について本キットと Dinabot 社製キットを用いて同時に測定したところ、Fig. 5 に示す如く、著明な正の相関($Y = 0.734x + 0.122$ 、相関係数 0.974、 $p < 0.001$)を示した。

本キットによる正常対照16例の PRA の測定値は、Fig. 6 に示す如く 1.3 ± 0.7 ng/ml/h であった。本態性高血圧症のうち低レニン群9例では、2者負荷試験により 0.4 ± 0.2 ng/ml/h から 0.5 ± 0.2 ng/ml/h にわずかに上昇したにすぎなかった。正常レニン群21例では2者負荷試験により 1.3 ± 0.6 ng/ml/h から 3.7 ± 0.9 ng/ml/h に、高レニン群7例

では 3.9 ± 0.7 ng/ml/h から 9.9 ± 3.1 ng/ml/h に上昇した。原発性アルドステロン症では 0.05 ± 0.06

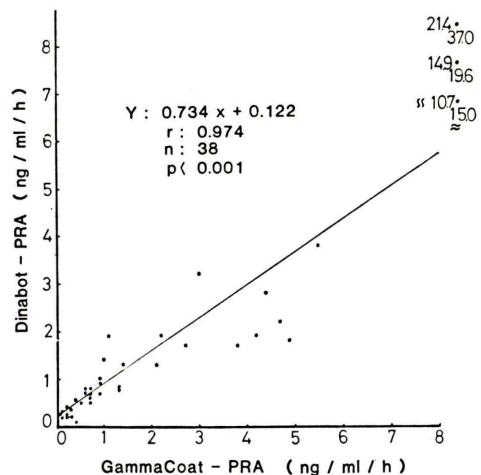
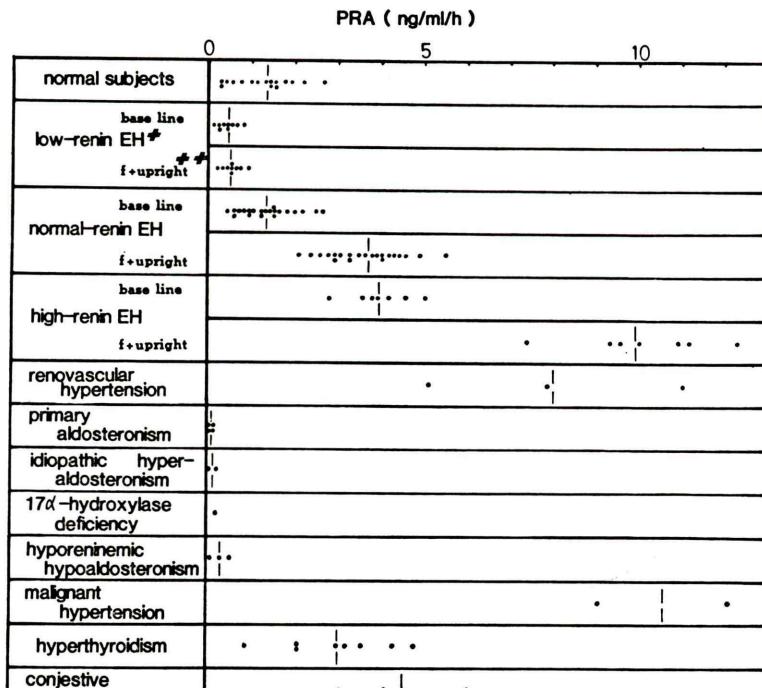


Fig. 5 PRA values by the Dinabot-PRA and Gamma Coat-PRA Kits.



essential hypertension

2 hours upright position with furosemide administration

Fig. 6 Plasma renin activity (PRA) in normal subjects and patients with various diseases.

ng/ml/h, 特発性アルドステロン症では 0.15 ± 0.07 ng/ml/h と著明な低値, 低レニン性選択的低アルドステロン症では 0.3 ± 0.1 ng/ml/h, 17 α -hydroxylase 欠乏症では 0.2 ng/ml/h といずれも低値であった。腎血管性高血圧症では 8.0 ± 2.9 ng/ml/h, 悪性高血圧症では 10.5 ± 2.1 ng/ml/h, 浮腫を伴う心不全では 4.4 ± 1.5 ng/ml/h, 甲状腺機能亢進症では 3.0 ± 1.3 ng/ml/h といずれも高値を示した。

IV. 考 察

血中レニン含量の測定には, ヒトレニンを純化して抗体を作製し radioimmunoassay により直接測定する方法が理想的である⁶⁾。しかし, 現在のところ, 未だ測定キットとして販売される程簡単で安定した成績を示す方法は発表されていない。現在の所, 血中レニンがレニン基質に作用して, 產生されるアンジオテンシン I を radioimmunoassay により測定する方法が行なわれている。この場合, アンジオテンシン I 產生の至適 pH, アンジオテンシン I 変換酵素やアンジオテンシネースの活性の抑制, 血中のレニン基質の濃度や内因性アンジオテンシン I 量などの測定に及ぼす影響の問題があるが, 本キットは, これらの問題をある程度考慮した測定法といえる。

まず, アンジオテンシン I 產生の pH としては, Haber ら²⁾の如く, 生理的条件である pH7.4 を用いる方法⁴⁾と, 至適 pH である 6.0 付近を用いる方法⁷⁾とがある。本キットでは, pH 7.4 および 6.0 のいずれでも良いとされているが, 著者のうちの福地⁸⁾がすでに発表した如く pH7.4 における測定値は全般に低値で, 正常人ならびに本性高血圧症の, 安静時と furosemide 静注後立位負荷時の測定値の差が小ないので, レニン抑制を来たす疾患の鑑別は困難となる。これに対し, pH 6.0 で incubate した場合は, 血漿レニン活性の 2 者負荷による上昇は著明で, さらに, レニン分泌亢進を伴う症例の測定値も明らかに高値を示す⁸⁾ことから, pH 6.0 による測定法がより有用であると考えられる。

変換酵素阻害剤としては, 従来よりは, ethylene-

diaminetetraacetic acid (EDTA), 8-hydroxyquino-line ならびに dimercaprol などが使用されていたが, 阻害効果が不充分である。diisopropyl fluorophosphate (DFP) は阻害効果は強力であるが, 毒性が強くキットに用いることはできない。これに対し, 本キットでは PMSF を使用している。PMSF は毒性が少なく, pH7.4 および pH6.0 のいずれでも強力な阻害効果を有することから, 優れた阻害剤として諸家により用いられている^{5,9)}。

レニン基質量のアンジオテンシン I に対する影響に関して, Sealey ら³⁾は, レニン基質量がレニンに対して過度に少ないと, アンジオテンシン I の產生が低下するとしている。本邦で主に使用されている Dinabot 社製キットでは, 血漿を緩衝液で 2 倍に稀釀するので, 血漿中の基質ばかりでなく, レニンの濃度も 2 分の 1 になるので, アンジオテンシン I 產生の低下は考えられる。これに対し, 本キットでは, 血漿 1 ml に対して阻害剤, pH 緩衝液の量として $110 \mu\text{l}$ を加えるのみなので, その稀釀の度合はわずかである。それ故, レニン基質の濃度が高いので, Dinabot 社製キットに比べてアンジオテンシン I の產生が速やかに行われる利点があり, アンジオテンシン I の測定値が比較的高値を示すと考えられる。

蛋白の非特異的な影響を取り除く方法として, Dinabot 社製キットでは, 煮沸による除蛋白を行っている。この方法では血中に微量に存在するアンジオテンシン I を無視して測定することになる。これに対し, 本キットでは, 同一検体を 37°C と 4°C で incubate して後, 37°C において產生されたアンジオテンシン I 量から, 4°C で incubate して生じたアンジオテンシン I の量を差し引くことによって測定している。それ故, 内因性アンジオテンシン I の量による影響を除去することが可能なので, 血漿中のレニン活性を正確に測定することができる。また, 採血後, 検体を長時間室温に放置しておくと, アンジオテンシン I が產生され, 4°C で incubate した後のアンジオテンシン I 量の測定値が高値となるので, 血漿レニン活性の測定値は低値を示すことになる。すなわち, 4°C での

値から検体の保存状態を知り得る利点がある。

結合分画と遊離分画の分離には、従来 dextran coated charcoal が使用されていたので、遠心分離の操作が必要で、繁雑な上に長時間を要した。これに対し、本キットでは固相法を使用しているので、簡単で、全測定過程をわずか1日で終了することが可能である。それ故、本法による intra ならびに interassay variability のいずれも満足する結果が得られた。

本キットによる測定値と Dinabot 社製キットによる測定値とは極めて良く一致したが、 $Y = 0.734X + 0.122$ と、本キットの測定値がやや高値の傾向を示した。すなわち、レニン抑制を伴う症例の両法による測定値の間には差がなかったが、レニン分泌亢進を伴う症例の測定値は、本キットの方がより高値を示した。この理由として、本法では、測定すべき血漿の稀釀度が小さく、アンジオテンシン I の産生が速かに進行することと、交換酵素阻害剤としての PMSF の効果が 8-hydroxyquinaline や dimercapro に比べ、より強力であることによると考えられる。

本法による測定値は、原発性および特発性アルドステロン症では極めて低値、低レニン性選択的低アルドステロン症および 17 α -hydroxylase 欠乏症では低値、悪性高血圧症、腎血管性高血圧症、甲状腺機能亢進症ならびに浮腫を伴う心不全では高値を示し、臨床上、routine の検査法として有用と考えられる。

V. 結 語

本キットは固相法による radioimmunoassay に基いて、血漿レニン活性を測定する方法で、操作が簡単で測定時間が短かく、再現性も良好であった。さらに、本キットの測定値はDinabot 社製キ

ットの測定値と良く相關したことから、今後、臨床上、routine の検査法として利用価値の高い測定法といえる。

文 献

- 1) Helman OM, Judson WE: The quantitative determination of renin in the plasma of patients with arterial hypertension. *Circulation* **27**: 1050-1060, 1963
- 2) Haber E, Koerner TJ, Page LB, et al: Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **29**: 1349-1355, 1969
- 3) Sealey JE, Laragh JH: Searching out low renin patients; Limitations of some commonly used methods. *Am J Med* **55**: 303-313, 1973
- 4) Oparil S, Koerner TJ, Haber E: Inhibitors on apparent generation of angiotensin I in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **39**: 965-968, 1974
- 5) Kodish ME, Katz FH: Plasma renin concentration: comparison of angiotensinase inhibitors and correlation with plasma renin activity and aldosterone. *J Lab Clin Med* **83**: 705-715, 1974
- 6) Galen FX, Guyenne TT, Devaus C, et al: Direct radioimmunoassay of human renin. *J Clin Endocrinol Metab* **48**: 1041-1043, 1979
- 7) Laragh JH, Baer L, Brunner HR, et al: Renin angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertension vascular disease. *Am J Med* **52**: 633-652, 1972
- 8) Fukuchi S, Takenouchi T, Torikai T.: Determination of plasma renin activity by radioimmunoassay of angiotensin I. *Clin Sci* **44**: 43-54, 1973
- 9) 萩原俊男, 西 啓子, 圓山アンナ, 中 透, 中丸光昭, 宮井 潔, 熊原雄一, 岩永圭市: ガンマー・コート [^{125}I] PRA Kit の基礎的検討ならびに臨床応用. ホルモンと臨床, **28**: 63-69, 1980
- 10) Fahrney DE, Gold AM: Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterase. I. Rate of reaction with acetylcholinesterase, α -chymotrypsin, and trypsin. *J Am Chem Soc* **85**: 997-1000, 1963