

《ノート》

## 固相法を使用する血漿レニン活性 Radioimmunoassay キットの基礎的検討と臨床応用

An Evaluation of a Plasma Renin Activity (PRA) Radioimmunoassay  
by Solid-Phase Method

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*

### I. 緒 言

血漿レニン活性(PRA)の測定は、1969年、Haberら<sup>1)</sup>が、レニンにより血中に存在するアンジオテンシンⅠから産出されるアンジオテンシンⅡ(AI)をradioimmunoassay(RIA)によって測定する方法を報告して以来、各種の高血圧症の鑑別診断のほか、病態生理の研究および治療法の選択に必要不可欠な検査法の一つとなつた。

現在、本邦において数種のPRA測定用キットが販売されているがroutineの検査法としては多少繁雑である。最近、固相法を利用するPRA RIAキットがダイナボット・ラジオアイソトップ研究所により開発された。本キットは抗AI血清をコーティングしたプラスチックビーズを使用しているので、結合分画と遊離分画の分離がきわめて簡単な上に、内因性AI量、AI変換酵素および血中レニン基質の濃度の点についても検討された新しいキットである。われわれは、本キットの基礎的検討を行うとともに、本法による各種疾

患患者のPRAの測定値と、現在販売されている同研究所製PRA RIAキットの測定値と比較検討した。その結果、臨床上、充分に使用し得ることを明らかにしたので報告する。

### II. 実験方法

#### 1) キットの内容

50検体用のキットの内容をTable 1に示す。

#### 2) 測定法

肘静脈よりEDTA・2Na(5 mg/5 ml)入り試験管に採血後、冷却遠心機により血漿を分離し、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。まずFig. 1に示すごとく、4本の試験管に測定試料(血漿)0.2 ml、pH調整液(0.6 M-citrate緩衝液)0.02 mlならびにphenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)(あらかじめ10 mg/mlになるようにエタノールで溶解)0.01 mlを入れ、vortex mixerで振盪後、2本の試験管を37°Cに、のこりの2本を4°Cにおいて、いずれも1時間incubateしてAIを產生させた。次いで、<sup>125</sup>I-AI液(5.5 mg/mlのpepstatin-Aメタノール溶液に、10倍量の1M-tris塩酸緩衝液(pH 8.0)を加えて<sup>125</sup>I-AIを稀釈)0.1 ml(約10,000

\* 福島医科大学第三内科

受付: 56年5月18日

最終稿受付: 56年8月24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

**Key words:** plasma renin activity, angiotensin I, radioimmunoassay, solid-phase method, hypertension.

Table 1 Reagents of PRA RIA kit.

1) $^{125}\text{I}$ -AI tracer	0.5 $\mu\text{Ci}/\text{vial}$	1 vial
2) rabbit anti-AI serum coated bead		50 beads
3) AI standard	0, 0.2, 0.8, 2, 8, 20 ( $\text{ng}/\text{ml}$ )	6 vials
4) citrate generation buffer solution	2 ml (pH 6.0)	1 vial
5) tris-HCl buffer solution	5 ml (pH 8.0)	1 vial
6) formic acid solution with 10% BSA	5.5 ml	1 vial
7) pepstatin-A solution	0.5 ml	1 vial
8) phenylmethylsulfonyl fluoride solution	1 ml	1 vial

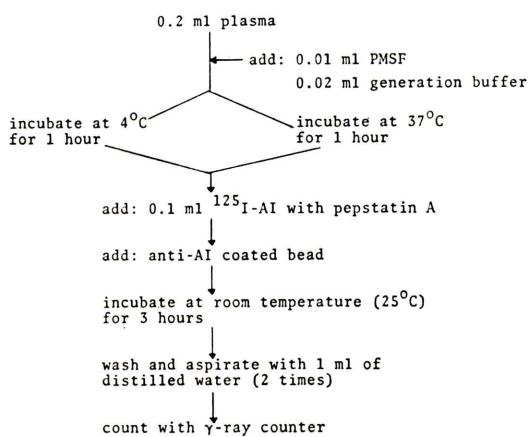


Fig. 1 Procedure in PRA RIA kit.

cpm) ならびに抗 AI 血清コーティングビーズを 1 個を加えて良く振盪後, 25°Cにおいて 3 時間 incubate した。次いで、蒸留水 1 ml を加えてビーズを洗滌後上清を吸引除去(2 回くり返す)し、抗 AI 血清コーティングビーズに付着した結合分画の放射能をガンマー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、標準曲線用試験管に、pH 調整液 0.02 ml および標準用調整液 <10% BSA 蟻酸溶液 0.1 ml を加えておく> の 0, 0.02, 0.08, 0.2, 0.8 および 2.0 ng)を入れた試験管に  $^{125}\text{I}$ -AI 液 0.1 ml ならびに抗 AI 血清コーティングビーズ 1 個を加え、未知試料測定の場合と同様、RIA 法により計測した。血漿レニン活性は、37°Cにおいて 1 時間 incubate により

產生した AI 量から、4°Cにおいて 1 時間 incubate により產生した AI 量を差し引くことにより算出した。

### 3) 対象

臨床対象例は、入院中の本態性高血圧症 43 例のほか、原発性アルドステロン症 11 例、特発性アルドステロン症 3 例、甲状腺機能亢進症(治療前)7 例、腎血管性高血圧症 6 例のほか悪性高血圧症、低レニン性選択性の低アルドステロン症、浮腫を伴う心不全およびネフローゼ症候群の各 4 例、浮腫を伴う肝硬変症 3 例、17α-hydroxylase 欠乏症および褐色細胞腫の各 1 例であった。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を 1 日 153 mEq として、早朝安静臥床空腹時に採血後、furosemide 1 mg/kg 静注 2 時間立位(2 者)負荷試験を施行し、現在販売されているダイナボット PRA RIA キットを用いて測定した場合、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<sup>2)</sup>。対照として、正常者 19 例を選び、1 週間以上食塩摂取量 1 日 153 mEq として後、早朝安静臥床空腹時に採血して測定した。

### 4) 方法の検討

本キットを用いて、以下に記す基礎的検討を行った。すなわち、(1) AI 产生と時間の関係をみるために、自家製プール血漿 3 検体を 25°C に、それぞれ 30 分、1 時間、2 時間および 3 時間 incubate して、产生する AI 量を測定した。(2) PMSF の AI 変換酵素阻害効果をみるために、濃度の異なる既知量の AI(2, 8 および 20 ng) および PRA O 血漿を加え、25°C において 1, 2 および 3 時間 incubate し RIA を施行した。(3) 本抗 AI 血清の特異性をみるために、AI のほか、sarcosine<sup>1</sup>, threonine<sup>8</sup>-angiotensin II (sar<sup>1</sup>, thr<sup>8</sup>-AII), sarcosine<sup>1</sup>, valine<sup>5</sup>-angiotensin II (sar<sup>1</sup>, val<sup>5</sup>-AII), angiotensin II (AII), desasp<sup>1</sup>-angiotensin II (AIII), lysin-8-vasopressin, oxytocin ならびに kallikrein の抗体との結合性を検討した。交叉反応性は抗 AI 血清と  $^{125}\text{I}$ -AI と

の結合性を 1 とした場合、50% の displacement を生じる AI の量と各種のポリペプチドホルモンの量の比で表わした。(4) AI 産生の至適温度をみるため、4°C, 25°C および 37°C の温度で 3 時間 incubate 後、RIA を施行した。(5) RIA における incubation 時間を検討するため、25°C にて 1, 2, 3, 5 および 16 時間 incubate して測定した。(6) 測定値の信頼性を検討するため AI 濃度の異なる 3 検体を生理的食塩水で 16 倍まで段階的に稀釈して後 RIA を施行した。(7) 回収率を検討するため AI 量の異なる 2 検体を incubation して後、AI 量の既知量 (0~48.1 ng) を添加して RIA を施行した。(8) intra および interassay variability を検討するため 10 検体について triplicate で測定した。(9) 本法による結果と現在販売されているダイナボット社製キットによる結果を比較するため 42 検体について両方法により同時に測定した。

### III. 結 果

AI 産生は Fig. 2 に示すごとく、いずれも時間とともに直線的に上昇した。PMSF は、Fig. 3 に示すごとく、いずれの濃度においても AI を減少させず、AII 産生を充分に抑制した。本抗 AI 血清の sar<sup>1</sup>, thr<sup>8</sup>-AI, sar<sup>1</sup>, val<sup>5</sup>-AII, AII および AIII に対する交叉反応性は、AI に対する結合性を 1.0 とした場合、 $2 \times 10^{-6}$  以下であって、他のポリペプチドとも有意の結合性を示さなかった(Table 2)。本抗 AI 血清と <sup>125</sup>I-AI との結合率は Fig. 4 に示すごとく、4°C では 42.2%, 25°C では 53.3%, 37°C では 49.1% であった。本 RIA の測定感度は AI 量として 0.02 ng, PRA として 0.2 ng/ml/h であった。

RIA の incubation 時間を検討した結果、本抗体は Fig. 5 に示すごとく、1 時間では <sup>125</sup>I-AI の 30.6%，3 時間以上では 50% 以上と結合した。

生理的食塩水で 16 倍まで段階的に稀釈した AI 濃度の異なる 3 検体の測定値は、Fig. 6 のごとく、いずれも原点を通る直線を示した。

回収率は Table 3 に示すごとく  $103.7 \pm 9.0\%$  であった。

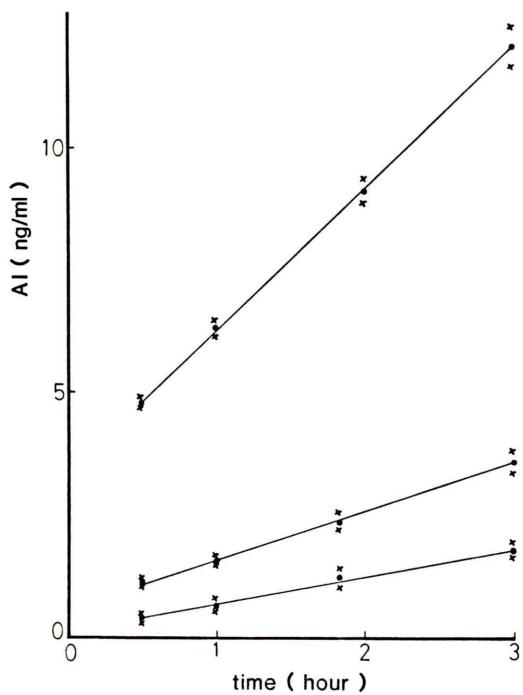


Fig. 2 Determination of angiotensin I (AI) generated for various incubating time (25°C).

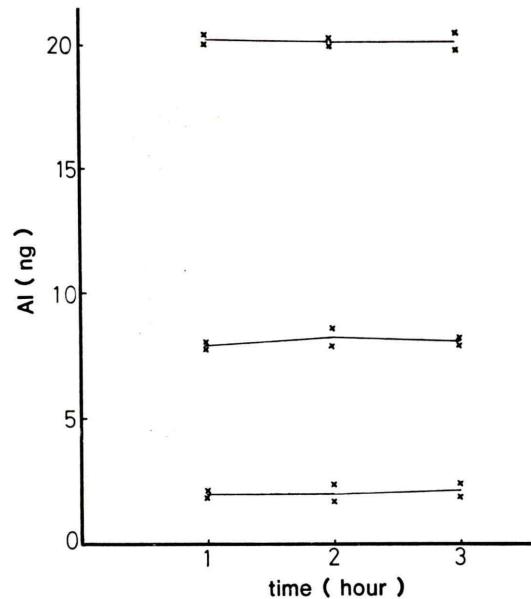
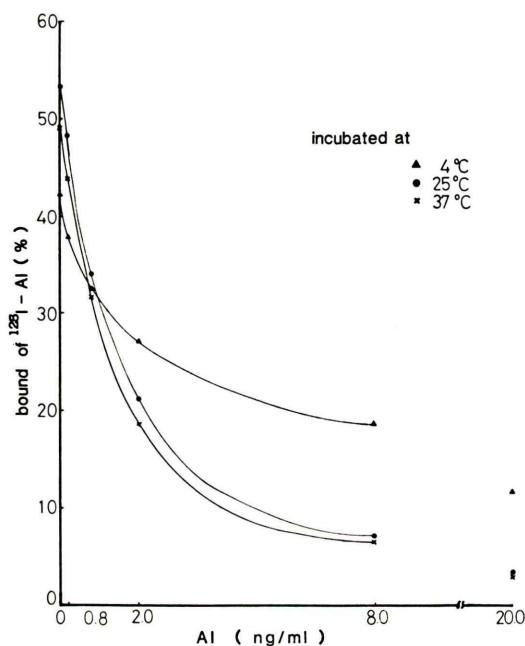


Fig. 3 Effects of PMSF on angiotensin I (AI) generation.

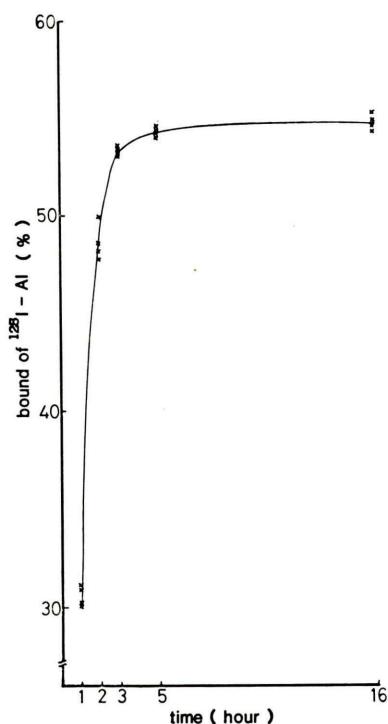
**Table 2** Specificity of angiotensin I (AI) anti-serum.

AI	I
sar <sup>1</sup> , thr <sup>8</sup> -AII	$2 \times 10^{-6}$
sar <sup>1</sup> , val <sup>5</sup> -AII	$2 \times 10^{-6}$
AII	$1 \times 10^{-6}$
AI <sub>III</sub>	$1 \times 10^{-6}$
lysine-8-vasopressin	$1 \times 10^{-6}$
oxytocin	$1 \times 10^{-6}$
kallikrein	$1 \times 10^{-6}$

**Fig. 4** Standard curve of angiotensin I (AI) at various temperatures (for 3 hours, incubation).

10検体の intraassay variability は  $8.4 \pm 5.1\%$ , interassay variability は  $11.9 \pm 6.8\%$  であった。

本キットによる PRA の測定値は、Fig. 7 に示すとく正常対照19例では  $1.4 \pm 0.6$  (mean  $\pm$  SD) ng/ml/h であった。2 者負荷試験により本態性高血圧症のうち低レニン群11例では  $0.4 \pm 0.1$  ng/ml/h から  $0.6 \pm 0.2$  ng/ml/h にわずかに上昇し、正常レニン群19例では  $1.4 \pm 0.7$  ng/ml/h から  $3.7 \pm 1.5$  ng/ml/h に、高レニン群13例では  $3.2 \pm 1.0$  ng/ml/h から  $9.2 \pm 3.2$  ng/ml/h に上昇した。原発性アルドステロン症および特発性アルドステロン症ではそれ

**Fig. 5** Bound of  $^{125}\text{I}$ -angiotensin I (AI) with angiotensin I anti-serum for various incubating times (25°C).

ぞれ  $0.1 \pm 0.1$  ng/ml/h,  $0.2 \pm 0.1$  ng/ml/h といずれも著明な低値、低レニン性選択的低アルドステロン症および  $17\alpha$ -hydroxylase 欠乏症ではそれぞれ  $0.4 \pm 0.1$  ng/ml/h,  $0.3$  ng/ml/h と低値であった。腎血管性高血圧症ならびに悪性高血圧症ではそれぞれ  $7.4 \pm 1.9$  ng/ml/h,  $9.3 \pm 4.6$  ng/ml/h と著明な高値、甲状腺機能亢進症では  $3.7 \pm 1.1$  ng/ml/h、褐色細胞腫では  $3.0$  ng/ml/h、心不全では  $3.4 \pm 0.7$  ng/ml/h、ネフローゼ症候群では  $4.0 \pm 2.1$  ng/ml/h および肝硬変症では  $3.7 \pm 1.2$  ng/ml/h であった。

42検体について同時に本キットとダイナボット社製キットによって測定した値は、Fig. 8 に示すとく、ほぼ同一の値を示したが、本法による測定値がやや高値であった ( $Y = 1.19X + 0.06$ , 相関係数 0.991,  $p < 0.001$ , Y: 本キットによる測定値, X: ダイナボット社製キットによる測定値)。

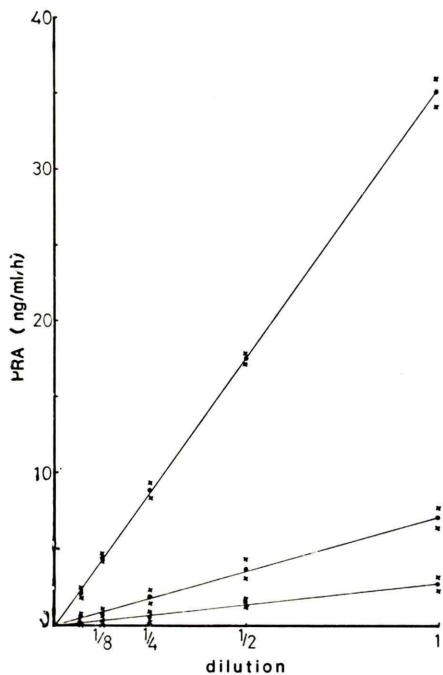


Fig. 6 Changes of PRA values by diluted plasma.

Table 3 Recovery test of PRA.

	add [ng/ml/h]	assayed value [ng/ml/h]	recovery [%]	Mean ± SD
Sample A	0	0.4	—	
	1.9	2.7	117.4	
	3.8	3.9	92.9	
	7.5	8.0	101.2	
	15.0	16.7	108.4	103.7 ± 9.0
sample B	30.0	34.1	112.2	9.0
	0	2.6	—	(CV:
	3.0	5.8	103.6	8.6%)
	6.0	7.7	89.5	
	12.0	13.9	95.2	
	24.1	29.2	109.4	
	48.1	54.3	107.1	

#### IV. 考 察

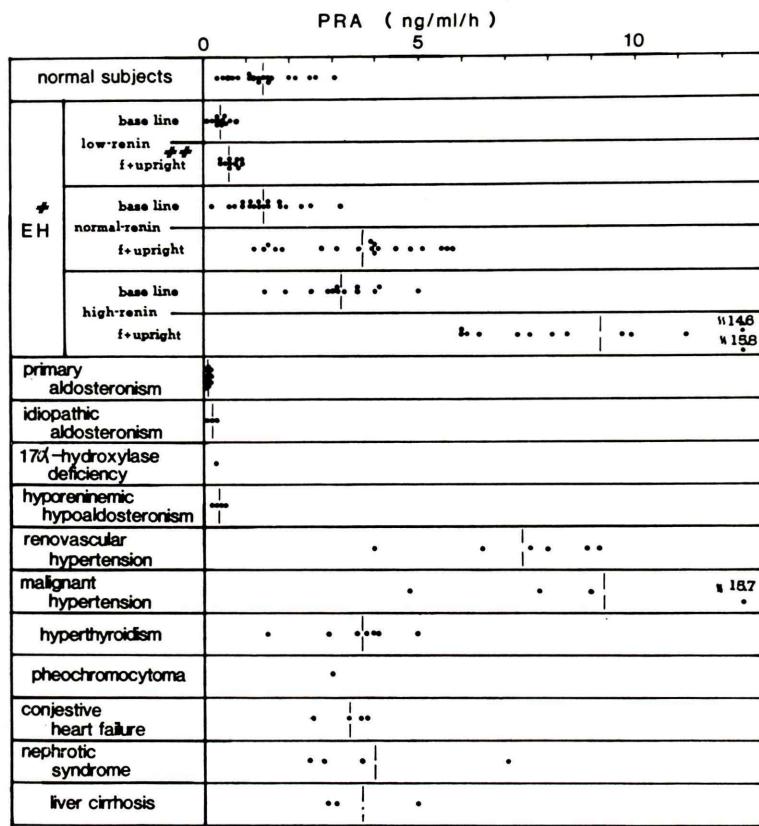
血中レニン含量の測定には、ヒト・レニンを純化して抗体を作製し RIA により直接測定する方法<sup>3)</sup>が理想的であるが、現在のところ、いまだキットとして販売されるほど簡単で安定した成績を示す方法は発表されていない。そこで、血中レニ

ンがレニン基質に作用して、産生されるアンジオテンシン I を RIA 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および血中のレニン基質の濃度や内因性アンジオテンシンなどの測定値におよぼす影響が問題である。

まず、アンジオテンシン I 产生 pH としては、至適 pH である 6.0 を用いる方法<sup>4)</sup>と、生理的条件と同じ pH 7.4 を用いる方法<sup>1)</sup>とがある。しかし、pH 7.4 における測定値は全般に低値<sup>5)</sup>で、正常人ならびに本態性高血圧症の安静時と 2 者負荷試験後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。本キットではアンジオテンシン I 产生の至適 pH の 6.0 を使用しており、2 者負荷による血漿レニン活性の上昇は著明で、またレニン分泌亢進を伴う疾患の測定値も明らかに高値を示したので臨床上有用な方法といえる。

変換酵素阻害剤としては、従来より diisopropyl fluorophosphate (DFP) が使用されていたが、毒性が強く、キットに用いることはできない。一方、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 8-hydroxy-quinoline ならびに dimercaprol などでは阻害効果が不充分である。これに対し、PMSF は強力な阻害効果を有し<sup>6)</sup>、毒性も少ないとから、すぐれた阻害剤として諸家により用いられている。本研究でも、PMSF のアンジオテンシン I 変換酵素およびアンジオテンシネースの阻害効果は充分であると考えられる結果が得られた。さらに、RIA の段階で、強力なレニンの活性阻害剤である pepstatin-A を使用しているので、本法による測定値は検体内のアンジオテンシン I 量を正確に測定していると言える。

アンジオテンシン I 产生に対するレニン基質量の影響に関して、Sealey ら<sup>7)</sup>は、レニン基質が、レニンに対して過度に少ない場合、アンジオテンシン I 产生が遅延するとしている。現在多用されているダイナボット社製キットでは、血漿を緩衝液で 2 倍に稀釈するので、血漿中のレニン基質ば



\* EH means essential hypertension

\*\* f+upright means 2 hours upright position with furosemide (1 mg/kg) administration

Fig. 7 PRA determined by the method in normal subjects and patients with various diseases.

かりでなく、レニンの濃度も2分の1となるので、アンジオテンシンⅠ産生は不变である。これに対し、本キットでは、血漿0.2mlに阻害剤およびpH調整液の量としてわずか0.03mlを加えるのみなので、血漿の稀釀度は小である。それゆえ、レニン基質の絶対量は変わらないが濃度が大であるため、アンジオテンシンⅠ産生が速やかに行なわれる利点があり、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除去する方法として、現在多用されているダイナボット社製キットでは、煮沸による除蛋白を行ない、血漿中に微量に存在

するアンジオテンシンⅠを無視して測定している。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で産生されたアンジオテンシンⅠ量から4°Cでincubateして生ずるアンジオテンシンⅠ量を差し引くことによって蛋白の非特異的な抑制作用を除外している。それゆえ、測定時にすでに含まれているアンジオテンシンⅠ量の影響も取り除くので、血漿中のレニン活性を正確に測定することができる。

RIAのincubationの温度に関して、本抗血清と<sup>125</sup>I-アンジオテンシンⅠとの結合率は、25°Cおよび37°Cで差がなかったことから、室温下で

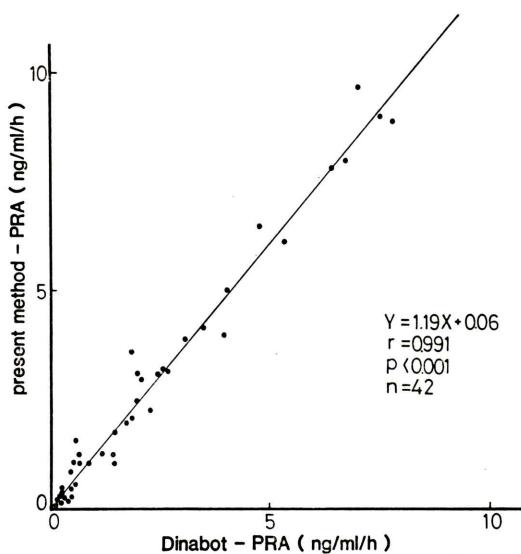


Fig. 8 PRA values by the method-PRA and Dinabot-PRA kits.

の incubation も可能であることを示している。さらに incubation の時間は 1 時間では測定感度が悪く、3 時間から 16 時間の間に有用であった。

結合分画と遊離分画の分離には、従来 clextran coated charcoal が用いられていたので、遠心分離の操作が必要で、繁雑な上に時間を要した。これに対し、本キットでは、固相法を使用しているので、アンジオテンシン I 産生から定量まで、同一試験管内で連続して操作を行うことができ、きわめて簡単で、全測定過程をわずか 1 日で終了することが可能である。稀釀試験、回収率試験ならびに intra および interassay variability のいずれも満足する結果が得られた。

本法による測定値と現在多用されているダイナボット社製キットによる測定値とは、きわめて良く一致したが、 $Y = 1.19X + 0.06$  と本キットの測定値が比較的高値の傾向を示した。すなわち、レニン抑制を伴う疾患の両法による測定値の間に差がなかったが、レニン分泌亢進を伴う疾患の症例の測定値は、本キットの方がより高値であった。この理由として、本法では、測定すべき血漿の稀釀度が小で、アンジオテンシン I の産生が速やかに進行することと、PMSF の変換酵素阻害効果が

充分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きわめて低値、低レニン性選択性の低アルドステロン症および 17 $\alpha$ -hydroxylase 不全症では低値、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 RIA に基づき、血漿レニン活性を測定する方法で、操作がきわめて簡単な上に、測定時間も短かく、再現性も良好であった。本キットの測定値は、現在多用されているダイナボット社製キットの測定値と良く一致したことから、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

- Haber E, Koerner TJ, Page LE, 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
- Fukuchi S, Takenouchi T and Nakajima K: Effect of furosemide administration and upright position on renin activity and angiotensin II in hypertension. *Tohoku J Exp Med* **111**: 71-78, 1973
- Galen FX, Guguenne TT, Devaux C, et al: Direct radioimmunoassay of human renin. *J Clin Endocrinol Metab* **48**: 1041-1043, 1979
- Laragh JH, Baer L, Brunner HR, et al: Renin angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertension vascular diseases. *Am J Med* **52**: 633-652, 1972
- Fukuchi S, Takenouchi T and Torikai T: Determination of plasma renin activity by radioimmunoassay of angiotensin I. *Clin Sci* **44**: 43-54, 1973
- Kodish ME and Katz FM: Plasma renin concentration: comparison of angiotensinase inhibitors and correlation with plasma renin activity and aldosterone. *J Lab Clin Med* **83**: 705-715, 1974
- Sealey JE and Laragh JH: Searching out low renin patients; Limitations of some commonly used method. *Am J Med* **55**: 303-313, 1973