

《原著》

Angiotensin I Radioimmunoassay を 用いた血漿レニン活性測定の基礎的検討

荻原俊男* 山本智英** 土井 啓**
大森清彦** 熊原雄一*

緒 言

Radioimmunoassay (以下 RIA) を応用した血漿レニン活性 (以下 PRA) の測定は、1969 年 Haber ら¹⁾により Angiotensin I の RIA を用いた方法、Gocke ら²⁾により Angiotensin II の RIA を用いた方法が報告されて以来、Boucher ら³⁾の Bioassay 法に比し、操作が簡便なことから、次第に普及しつつある。PRA 測定用としては Angiotensin II の RIA を用いる方法よりも、Angiotensin I の RIA を用いる方法の方がより直接的ですぐれた方法と考えられる。この方法はすでに Schwarz/Mann あるいは Sorin 社よりキットとして発売されており、臨床応用がなされているが⁴⁾、具体的な点に関しては、例え incubation の pH, inhibitor, 血漿蛋白の非特異的影響など明確に解決されているわけではなく、Haber らの方法とは異なる改良法が、福地ら⁵⁾、阿部ら⁶⁾により報告されている。一般臨床検査として用いるキットとしては簡便なこと、多数処理できること、安価なことなどが要求される。我々は最近開発されたダイナボット社製 Angiotensin I RIA による PRA 測定キットを用いて RIA による PRA 測

定の基礎的検討を行ったのでここに報告する。

方 法

患者血漿は EDTA・2Na (1 mg/ml) 入り氷冷試験管に採血、冷凍遠沈し、分離後凍結保存した。測定時、被験血漿 (1 ml 又は 0.5 ml) と等量の 0.2 M Acetate Buffer pH 5.5 (8-Hydroxyquinoline 2.64 mg/ml, Dimercaprol 8 μl/ml, Tween 20 0.1 μl/ml を含む) を混合し、37°C, 2 時間 incubate し直ちに 100°C で 10 分間煮沸 3000 rpm 20 分遠沈、脱蛋白を行つた。その上清を RIA に供した。RIA は上清 0.1 ml 又は標準 Angiotensin I 溶液 (0.5~8 ng/ml) 0.1 ml, ¹²⁵I-Angiotensin I 溶液 (0.09 μCi/ml) 0.1 ml, 抗 Angiotensin I 抗体 (10000 倍希釈) 0.1 ml を 0.1 M Tris acetate buffer pH 7.4 (0.1% Lysozyme, 0.0001% Thimerosal を含む) 1 ml に混じ、4°C 16~24 時間 incubate をする。標準曲線用試験管にはデキストランチャコール処理コントロール液 (プール血清に等量のデキストランチャコール液 (20 mg/ml) を加え攪拌、Angiotensin を吸着後、遠心、上清を煮沸し脱蛋白したもの) を加えておく。B-F 分離はデキストランチャコール液 (以下 D-C 液) (20 mg/ml) 0.2 ml を加え、Vortex mixer で 5 秒間攪拌後 4°C, 15 分間放置後 3000 rpm 15 分間遠心分離し上清をカウント、総放射能との比 (B/T) で表した。

正常値測定は外来患者を利用し立位は来院時採血、臥位は安静臥床 1 時間後に採血、一部患者についてフロセマイド 80 mg を前日に投与した

* 大阪大学医学部中央臨床検査部

** 大阪府立成人病センター

受付：48年 7月 25日

別刷請求先：大阪市福島区堂島浜通 3-1・2 合併地

(〒 553)

大阪大学医学部附属病院中央臨床検査部

熊原 雄一

後及び食塩3g負荷3日間後の2条件で再検した。

結 果

(1) RIA の検討

a) 時間反応曲線

^{125}I -Angiotensin I と抗体との結合を経時的に観察すると 4°C においては Fig. 1 に示すごと

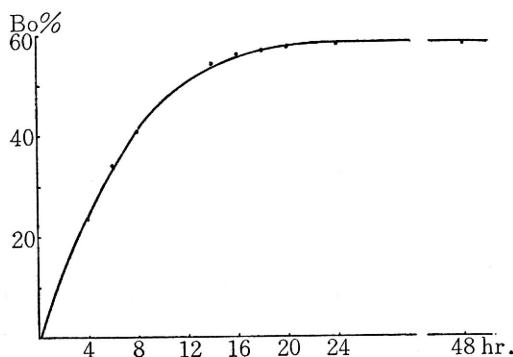


Fig. 1. Time response curve of Bo in Angiotensin I radioimmunoassay.

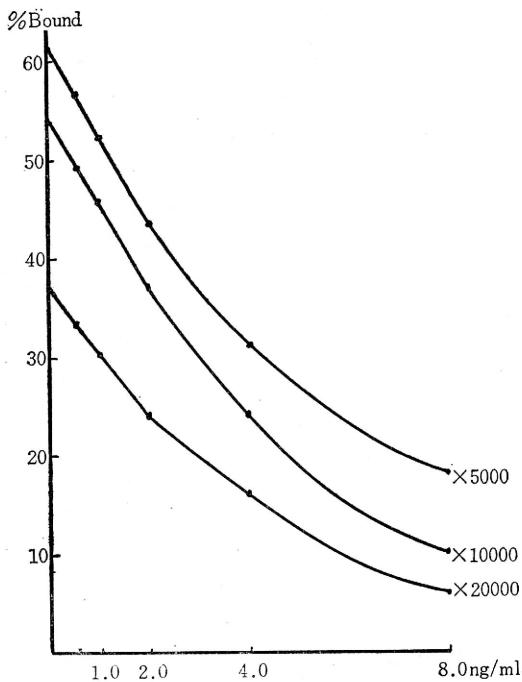


Fig. 2. Standard curve by serial dilution of antibody.

く Bo は14ないし16時間で平衡に達し、以後48時間までプラトーを示した。従つて以後の検討は 4°C 16時間 incubate で行つた。

b) 抗体量

抗体量を 0.1 ml (10000倍), 0.2 ml (5000倍), 0.05 ml (20000倍) 量で標準曲線を作成すると Fig. 2 に示すごとく 0.1 ml 量で 0~8 ng/ml にわたり、感度、精度上最も良好であり、この条件下における最少測定濃度は 0.25 ng/ml であつた。

c) 交叉性

Angiotensin II との交叉性を見るために Angiotensin II 1000 ng/tube まで検討したところ、検討範囲内では、Bound の低下が見られず、Angiotensin II との交叉性は極めて少ないものと考えられる。

d) 標準曲線

標準曲線用試験管に Angiotensin free control 液を添加した場合及び非添加時、更にアルドステ

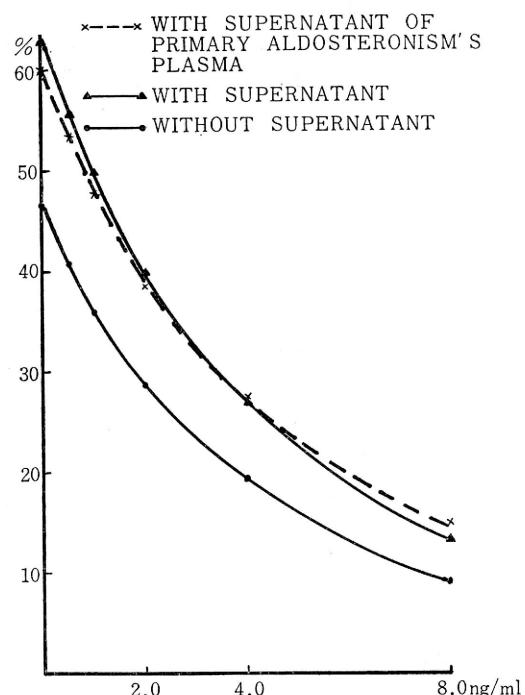


Fig. 3. Standard curve with or without deproteinized supernatant of angiotensin free serum.

ロン症患者血清及びプール血清 inhibitor 混液を加え煮沸除蛋白後の上清を加えた場合の標準曲線は Fig. 3 に示すとく、これら上清を添加した場合は、Bound 型の増加がみられた。この点に関して、Sorin 社キットの抗体、及び東北大福地より提供を受けた抗体ではこのような傾向は見られなかつた。また、Inhibitor 混液のみ、2NA-EDTA 液 (3×10^{-4} M) のみ及び生食液の添加では、その効果は見られなかつた。

e) 希釈曲線

Angiotensin I が高値であるサンプル、及び正常範囲のサンプルを 2 倍、4 倍、8 倍に希釈し測定したところ Fig. 4 に示すとく、その曲線は標準曲線とよく平行した。

(2) PRA 測定条件の検討

(a) レニン基質量について

被験血漿に更にレニン基質を加えることにより PRA、つまり Angiotensin I 産生の上昇の有無を調べた。初めに Skinner の方法⁷⁾により被験血漿を pH 3.5 で透析、内因性レニン基質を不活化し

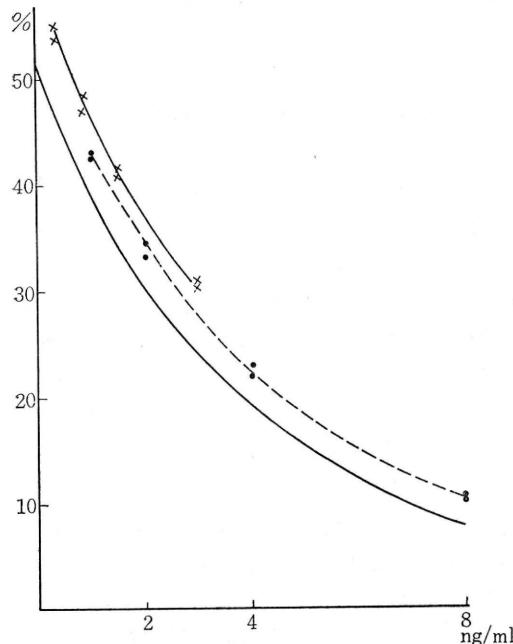


Fig. 4. Dilution curve of two human incubated samples.

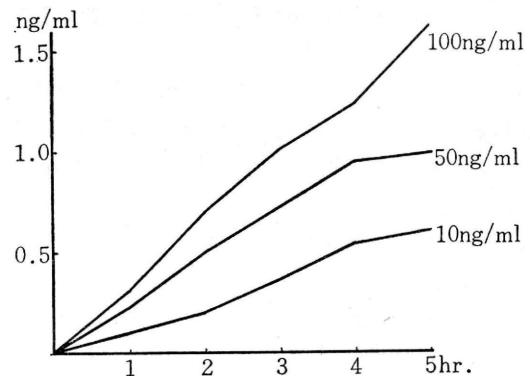


Fig. 5. Angiotensin I production by angiotensinogenfree serum enriched with various amount of Cohn fraction IV-4.

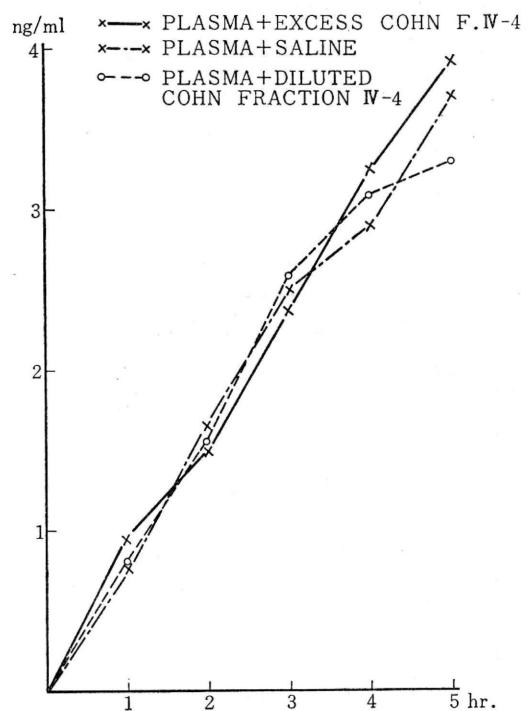


Fig. 6. Angiotensin I production by human plasma with or without Cohn fraction IV-4.

ておき、これに Cohn Fraction IV を 10 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml を加えると、Fig. 5 に示すとく Angiotensin I の産生が見られるよう

り、この Cohn Fraction IV をレニン基質として次の検討を行つた。すなわち被験血漿に Cohn Fraction IV 10 ng/ml、及び 100 ng/ml の少量及び大量を加え、Saline を control として加えた場合の 3 系列を 5 時間 incubate し Angiotensin I の产生量をみると Fig. 6 に示すとく、3 者はほとんど一致した直線を示した。

(b) Inhibitor について

被験血漿に過量の Angiotensin I を加え、その分解をみると Fig. 7 に示すとく、EDTA-2Na, 8-Hydroxyquinoline, BAL 3 者で十分な分解抑制が見られ、更に Tween 20 の添加により Angiotensinase, Converting Enzyme は 100% 抑制された。

(c) Incubation 時間の検討

本キットの Inhibitor 混液を加え、37°C で incubate し、Angiotensin I 产生量を継時的に 5

時間まで測定した。Fig. 8 に示すとく、3 時間までは全例で直線関係を示したが、一部例で 4 時間、5 時間の値が低下している例があつた。

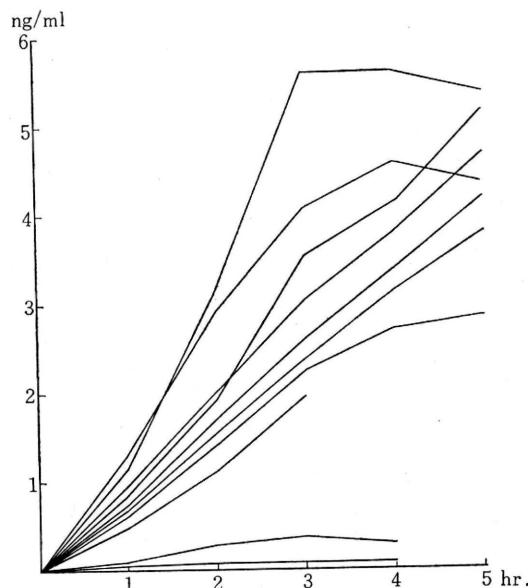


Fig. 8. Effect of incubation time to angiotensin I production.

(d) Incubation mixture の pH と Angiotensin I 产生量との関係

被験血漿と Inhibitor 混液との混合液の pH を 3 検体において測定したところ 6.4, 6.6, 6.7 であつた。これを pH 4.0~8.0 の各段階に調整し、incubate を行い、Angiotensin I の产生量を見ると pH 4.0, pH 8.0 では产生量は著しく少なく、pH 5.5 で最大値を示した。本キットの方法で測定した場合を矢印で示した (Fig. 9)。

(3) サンプル測定上の問題

(a) 回収率

被験試料に既知量の Angiotensin I を加え、その回収率を見ると 2~20 ng/ml の範囲で 90~110% (平均 97%) の回収率を示した。

(b) 同一測定内変動率、測定間再現性

平均値 0.55 ng/ml, 0.95 ng/ml, 1.65 ng/ml, 4.5 ng/ml の 4 サンプルを triplicate で測定した

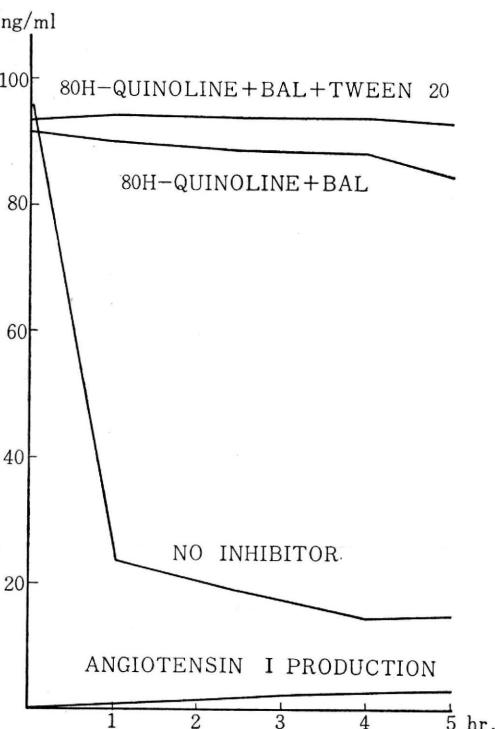


Fig. 7. Effect of enzyme inhibitors to degradation of angiotensin I added in human plasma.

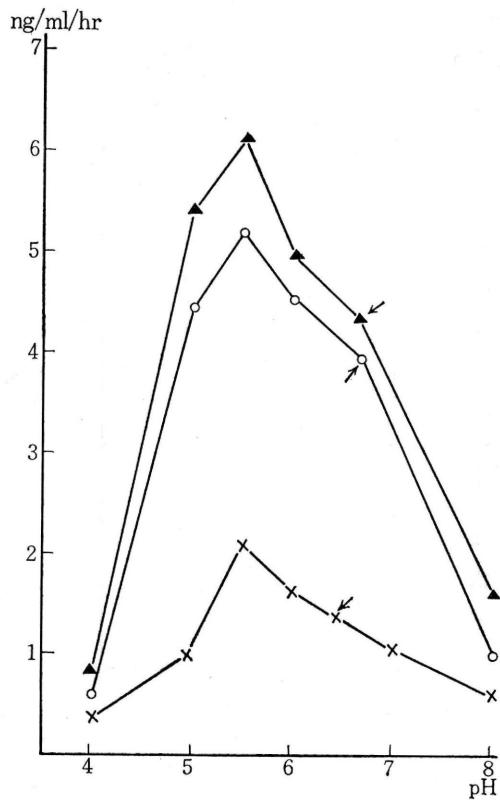


Fig. 9. Relationship between angiotensin I production and pH of incubation mixture. The arrow shows PRA in each plasma sample measured by this system.

場合の C. V. は各々 15%, 7%, 4%, 4% であり、低値においてはやや大なる変動を示した。同一サンプルを 1 週間以内に 2 回測定し再現性をみると 0.65~4.5 ng/ml の各濃度で C. V. 10% 以内の良好な再現性が認められた。

(c) サンプルの保存について

同一アンプルを -10°C に保存 4 週~8 週にわたり測定、さらに煮沸上清を -10°C に保存した場合と比較した (Fig. 10)。血漿のままで保存した場合 2 週目ですでに低下する例があり、4 週間後逆に上昇した例もあつた。しかし除蛋白後の上清液を凍結保存した場合は全例とも安定した値を示した。

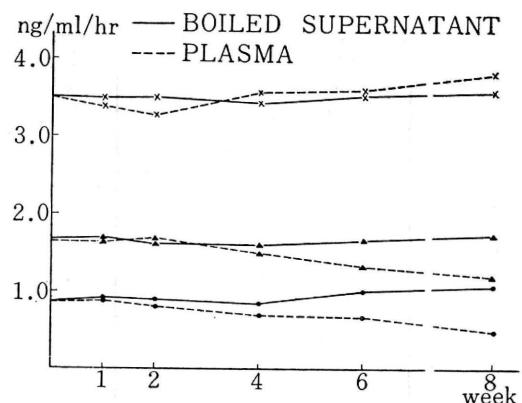


Fig. 10. PRA measured in different interval of storage of plasma samples.

(4) 測定値

健常者 50 名、及びフロセマイド負荷後 10 名、食塩負荷 3 日間後 5 名における測定値は Fig. 11 に示すごとく、常食下においては臥位 $0.7 \pm 0.4 \text{ ng/ml/hr}$ ($m \pm S. D.$)、立位 $1.4 \pm 0.4 \text{ ng/ml/hr}$ であり、フロセマイド負荷後は各々 $4.4 \pm 1.7 \text{ ng/ml/hr}$ 、 $6.0 \pm 2.0 \text{ ng/ml/hr}$ に上昇、増塩食後は各々 $0.4 \pm 0.2 \text{ ng/ml/hr}$ 、 $0.9 \pm 0.4 \text{ ng/ml/hr}$ と低下した。

考 按

現在普及している Angiotensin I RIA を用いた PRA の測定法は、Haber ら¹¹の方法に基づくものであるが、本法の問題点は、Angiotensin I 産生を行う pH が 7~8 の間であり、その産生量が少ないと、又直接 assay の為、蛋白の非特異的影响⁸⁾がある点などであるが、これらに対する改良法として、福地ら⁵⁾は pH 5.5 で incubate し buffer で希釈、煮沸除蛋白を行い RIA を行っている。又、阿部ら⁶⁾は $10 \mu\text{l}$ の少量を用いて直接 assay を行い、蛋白の影響を防いでいる。しかし incubate に当り、各サンプルの pH を 5.5 に adjust させることは多数検体の処理上は煩雑なことである。従つて本キットのような方法はこの点をある程度簡便化したといえるが、至適 pH で incubate しているわけではない。しかし測定サン

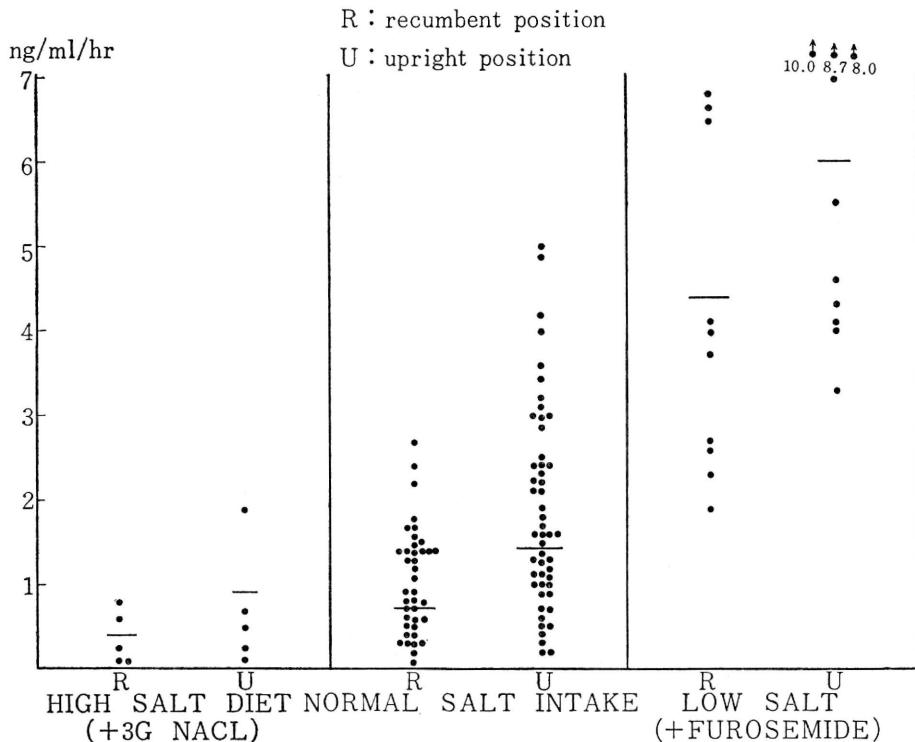


Fig. 11. PRA measured by this method of normal subjects on normal salt intake, salt restriction (with furosemide) and forced salt intake (3 days).

プルの pH はほぼ6.5近辺であり、Angiotensin I 產生量も十分多い故、実際の臨床応用上は問題ない。その他 Incubation の条件としては 8-hydroxyquinoline, Dimercaprol, Tween 20, EDTA · 2Na で Angiotensinase, Converting Enzyme を 100% Block しているが、incubate 時間による Angiotensin 產生量をみると、4時間以後では必ずしも直線を示さない例があり、この原因としては Inhibitor の問題、各種分解酵素の個人差、あるいは Renin inhibitor などレニン作用の Velocity に影響する物質⁹⁾などの関与が考えられるが、PRA 測定は3時間以内、本法のように2時間で行う限り問題ないと考えられる。従つて本法は2倍希釈して測定することになり、グラフから読みとる値そのものが Angiotensin I 產生量 ng/ml/hr として表わされるので、2時間の incubation time は實際上至便である¹⁰⁾。本法は、

自らの血漿中に含まれるレニン基質にレニンを働かせて Angiotensin I を産生させているわけであるが、Cohn fraction IV を加えた場合の Angiotensin I 產生量は加えない場合と比し著変はなく、この事実は血漿中には本来十分なレニン基質が含まれていることを示唆するが、経口避妊剤投与時におけるようにレニン活性とレニン含量に解離のあること^{11,12)}を見出すために不適当である。すなわち、測定値の解釈にあたつては、その原理、方法をよく理解しておくべきである。しかし、PRA の亢進又は抑制の事実を知るのが目的であれば、本法で十分であると考えられる。

抗原抗体反応に対する血漿蛋白の非特異的影響は Page ら⁸⁾により Angiotensin I の場合、分子量 14000 の蛋白の存在が知られているが、本抗体の場合、煮沸後の除蛋白上清を加えても Bound が上昇する傾向がみられた。この効果は Sorin

社、又は東北大福地により作成された抗体では見られず本抗体に特有なものと考えられる。しかもこの効果は Inhibitor 混液、生食水又は EDTA・2Na 溶液では認められず、塩類又は pH の影響とは考えられない。RIA における非特異的因子の影響は Yalow によると、その機序は抗原抗体反応、又は B-F 分離への干渉、抗原の damage 等の問題といわれ、本キットの場合も、B-F 分離直前に上清液を入れても Bo 上昇効果がある程度認められ、抗原抗体反応及び B-F 分離の両者に影響している可能性が強い¹⁰⁾。この現象を解決するため、調整液を標準曲線用試験管に加えることにより補正した標準曲線は、原発性アルドステロン症患者血漿、プール血清の煮沸除蛋白後上清液を加えた場合の標準曲線とほぼ一致しており、これにより実際のサンプルが測定可能である。Angiotensin I 濃度高値を示す血漿の希釈曲線は標準曲線とよく平行し既知量の Angiotensin I を添加した場合の回収率は97%と良好な結果を示した。同一測定内変動率、測定間再現性は満足すべき結果であった。サンプルの保存については一般にレニンそのものの活性低下のため、2週間以内に測定すべきであるが、サンプル数の都合により長期保存の必要あるときは煮沸上清を保存すべきである。この場合少なくとも2カ月間は安定である。

RIA による PRA 測定に当たつては、Bioassay 法との比較が常に問題になるが、この場合比較すべきサンプルの incubation の条件が同一である必要がある。Incubation の条件が異なるにもかかわらず両者が一致するという、例えば Habers ら¹¹⁾の報告はむしろ奇異である⁶⁾。本法による測定と Bioassay との比較は熊沢ら¹²⁾、多川ら¹³⁾により報告されており、いずれも良好な相関が得られている。正常値についても同様な理由により、各測定機関で決定する必要があるが、この場合は incubation の条件のみならず、患者の採血条件、すなわち食塩摂取量、体位、月経周期などを規定すべきである。我々の場合、健常男女（月経周期を考慮せず）50名であり、立位は来院時（入院患

者の場合4時間後）、臥位は安静1時間後と規定しており、さらにフロセマイド 80mg 前日投与後、又は食塩 3g 3日間負荷を行い、レニン分泌の異常検索に利用しており、これら三者を組み合わせ、低レニン、高レニン活性の診断を行つている。

結 語

ダイナボット社製レニン活性測定キットを用いレニン活性測定の基礎的検討を行い、pH の問題、inhibitor の問題、PIA の非特異的反応等に關し若干の実験を行つた。本法による PRA 測定法は簡便な点、多数を処理できる点から臨床検査法として有用と考えられる。

謝 辞

キットの提供を受けたダイナボット社に感謝します。及びアンギオテンシン I 抗体の提供をいただいた東北大福地総逸助教授に感謝します。

文 献

- Haber, E., T. Koerner, L. B. Page, B. Kliman and A. Purnode, J Clin Endocr and Metab 29 : 1349, 1969.
- Gocke, D. J., J. Gerten, L. M. Sherwood and J. H. Laragh, Circulation Research, Supple 1 vol XXIV and XXV : 131, 1969.
- Boucher, R., R. Veyrat, J. Dechamplain and J. Genest, Canad. Med. Ass. J. 90 : 194, 1964.
- 荻原俊男、熊原雄一、山本智英、臨床化学 8 : 1071, 1972.
- Fukuchi, S., T. Takeuchi and T. Torikai, Clinical Science 44 : 43, 1973.
- 阿部圭志、大塚庸一、斎藤鉄男、陳文軒、青柳春樹、宮崎青爾、色川伸夫、清野正英、三浦幸雄、小野磐夫、薬袋典児、小林清、閔敏克、佐藤辰男、吉永馨. Japanese Circulation J. 36 : 741, 1972.
- Skinner, S. L. Circ. Res. 20 : 391, 1967.
- Page, L. B., E. Dessauvages, S. Lagg and E. Haber, Clinica Chimica Acta 34 : 55, 1971.

- 9) Kotchen, J. A., T. W. Rice and D. R. Walters J Clin Endocr & Metab 34 : 928, 1972.
- 10) 荻原俊男, 山本智英, 土井啓, 熊原雄一. 最新医学, 28 : 11, 1973.
- 11) Cain, M. D., W. A. Walters, and K. J. Catt, J. Clin Endocr. 33 : 671, 1971.
- 12) Beckerhoff, R., J. A. Luetscher, R. Wilkinson, C. Gonzales, and G. W. Nokes, J. Clin. Endocrinol Metab 34 : 1067, 1972.
- 13) 第10回ラジオイムノアッセイ研究会 (1972, 京都)

* * *

* * *

* * *

*

*

*

*

Summary

Measurement of Plasma Renin Activity by Angiotensin I Radioimmunoassay

Toshio OGIHARA*, Toshihide YAMAMOTO**, Kei DOI**,
Kiyohiko OMORI** and Yuichi KUMAHARA**

*The Central Laboratory for Clinical Investigation,
Osaka University Hospital and **the Center
for Adult Diseases, Osaka.

Plasma Renin Activity (PRA) by radioimmunoassay (RIA) of Angiotensin I using commercial (PRA) kit was evaluated, which was provided by Dainabot Isotope Laboratory. The effects of variations in incubation time, kinds and amount of angiotensinases and/or converting enzyme inhibitors, optimal pH during incubation,

etc. were tested.

One particular problem with this assay, non specific effect of deproteinized supernatant of angiotensin free serum was found. Some data obtained with normal subjects on normal salt restriction and forced salt intake were enclosed.

* * *

* * * *

*

* *

*