

《原 著》

Radioimmunoassay による 血漿レニン活性測定法の検討

多 川 齊* 前 畑 英 介** 石 井 当 男*** 池 田 寿 夫***

1969年 Haber¹⁾が angiotensin I のradioimmunoassay を利用した血漿レニン活性 (plasma renin activity; PRA) の測定法を開発して以来, 本法やその改良法が広く使われ, 最近キットが市販され, 従来の bioassay に代りつつある。

しかし, その定量感度はなお満足できず, 特に本態性高血圧症における低レニン例の選別には不十分であると批判されている²⁾。

著者らは, さきにレニン・リアキット (ダイナボット) の使用経験を発表³⁾し, また従来から阿部ら⁴⁾の方法を検討してきたが, 今回これらを若干 modify した方法を考察した。本稿では, その方法を紹介し, あわせて本法と bioassay 法, ならびにキットによる他の radioimmunoassay 法とを比較報告する。

方 法

1) ¹²⁵I 標識 angiotensin I, 抗体, および標準 angiotensin I

大阪大学蛋白質研究所ペプチド奨励会より供与された angiotensin I を用いた。これに Hunter と Greenwood⁵⁾の方法に従って ¹²⁵I を標識した。また, carbodiimide により angiotensin I とウサギγグロブリンを結合させ, これをウサギに反覆注射して得られた抗血清を使用した。ダイナボット RI 研究所より市販されている「レニン・リ

アキット」中の製品を用いても良好な結果が得られるので, 最近はこの製品を使用している。

2) 採 血

Ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA-Na₂) 7.5mg 入り市販試験管に 5ml 採血し, 直ちに冷却遠心して血漿を分離し, 冷凍保存した。

3) 標準曲線の作製

原則として氷冷下で操作した。ポリエチレン試験管に 0.2 mol tris acetate buffer (pH 7.4, lysozyme 1mg 1ml, EDTA-Na₂ 0.5 mg/ml 添加) 1.0ml と ¹²⁵I-angiotensin I 0.1ml (10,000—15,000cpm) をとる。これに tris acetate buffer で希釈した標準 angiotensin I (0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0ng/ml) 0.1ml と, angiotensin I 抗体 0.1 ml を加えて混和する。この series は duplicate で作成した。ついで, 4°C で 16~24

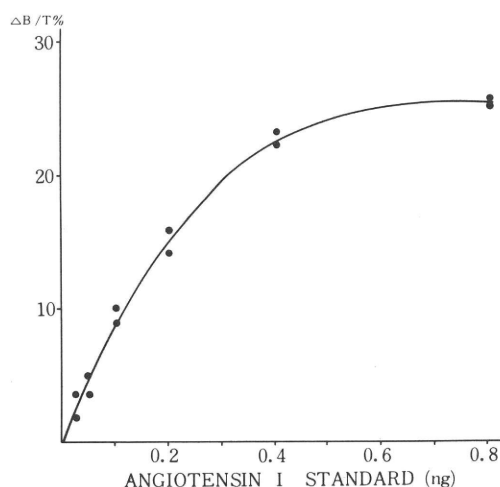


図 1 標準曲線の 1 例

*三井記念病院内科腎高血圧科

**同 中央検査部

***東京大学第 2 内科

受付: 1974 年 5 月 9 日

別刷請求先: 東京都千代田区神田和泉町 1 (〒101)

三井記念病院内科腎高血圧科

多 川 齊

時間 incubate し、冷却したまま well counter により放射能を測定する (全カウント)。つぎに、dextran-coated charcoal 液 (0.25% dextran, 2.5% charcoal 溶液を用時 buffer で20倍希釈) 1.0 ml を添加し、20分間放置後、冷却遠心した。上清を分離して放射能を測定し、上清カウント/全カウント比すなわち結合率 (B/T%) により表現した。対照 (angiotensin 0 の標準液) の結合率を基準とし、他の濃度ではその結合率と対照の結合率との差を plot して、標準曲線を作成した(図1)。

4) 血漿レニン活性 (PRA) の測定

血漿を融解して 1.0ml ずつ2本のポリエチレン試験管に採り、氷冷下で 1N HCl 1滴と 1 mol acetate buffer (pH5.5) 0.1ml を加え、pH を 5.5 とする。さらに、5% diisopropyl fluorophosphate (DFP) isopropanol 溶液 1滴を加えて混和した後、1本は冷却した状態に保ち、他の1本は 37°C 温浴で3時間 incubate した。

以上の操作で産生された angiotensin I 量を assay した。この過程は duplicate で行った。標準曲線作成に準じて、tris acetate buffer 1.0ml, ^{125}I -angiotensin I 0.1ml, 上のよう処理した血漿 20 μl と抗体 0.1ml を順次加えた後、4°C で 16~24時間 incubate し、charcoal で分離して放射能を測定し、結合率を求めた。37°C で incubate した検体と incubate しなかった検体の結合率の差を前出の標準曲線にあてはめて、incubation により産生された angiotensin I 量を算出し、PRA (ng/ml/hr) と表現した。

5) 臨床的検討

早朝空腹時30分以上安静臥位後に採血した。正常血圧の入院患者で、PRA の異常を報告されている心不全、肝硬変、ネフローゼ、甲状腺疾患などを除外して、正常対照者とした。年齢分布は22~53歳、平均42.6歳であった。あらかじめ降圧利尿剤を服用していないことを確認した。食塩摂取量は1日 0~15g とし、尿中Na排泄量を測定した。

一部の症例では、レニン分泌刺激試験を行った。すなわち、(1) 起立試験：起立歩行1時間後、お

よび再び臥床させて1時間後に再採血し、(2) furosemide 試験：臥位のまま furosemide 20mg を静注し、20分後再採血した。

日内変動をしらべるために、午前7時から午後9時まで7回採血した。対象は、正常3例、本態性高血圧症、慢性腎炎各1例であった。体位と食餌摂取の影響を除外するために、一日中臥位をとらせ、また摂食後1時間以上経過してから採血した。

結 果

1) 標準曲線

結合率は、対照 (angiotensin I=0) で 35~50%、最大量 0.8ng では 10~15% であった。angiotensin I 量を対数で、結合率を logit で plot すると、この関係は直線で表わされた。

著者らは、前述のように、各標準液と対照の結合率の差を plot して標準曲線を作成した(図1)。対照と分離可能な標準 angiotensin I の最小量は 0.025ng であった。この angiotensin I 量は PRA 0.4ng/ml/hr に相当し、従ってこれを PRA の検出限界と仮定した。

2) Incubation 時間

Incubation が3時間以内では、angiotensin I 生成量は incubation 時間に比例したが、6時間では減少する検体もみられた。したがって、3時間の incubation が妥当と考えた。

3) 測定精度

a) 再現性：Intra-assay variation の変動係数 (CV) は 9.2—15.7% であった (表1)。また、同一血漿につき1カ月間にわたり7回の測定を行ったところ、PRA は $4.07 \pm 0.19 \text{ ng/ml/hr}$ ($m \pm \text{SD}$) で、inter-assay variation の変動係数は 4.7% と良好であった。また、検体は少なくとも1カ月間は保存可能と判断された。検体量を 20 μl から 10 μl または 5 μl に減ずると、intra-assay の変動係数はそれぞれ 19.5%、31.3% に増加し、精度が著しく低下した。

b) 添加回収試験：37°C で incubate した検体 1ml に標準 angiotensin I を 0.5, 1.0, 2.0, 4.0ng

表 1 Intra-assay variation

No.	N	PRA(ng/ml/hr)		
		mean	SD	CV
1	10	4.24	0.57	13.4%
2	10	1.98	0.19	9.7
3	10	2.13	0.33	15.7
4	10	1.63	0.15	9.2

ずつ添加して直ちに assay した。平均回収率は 101.2%と良好であった。

c) 希釈試験：PRA 高値の血漿を buffer で 2～10倍の 3～4 段階に希釈して assay し、希釈倍率で補正して原血漿の PRA を求めた(表 2)。どの希釈度でもほぼ、同一の結果が得られ、高レニンの血漿は希釈して PRA を測定し得ることを示している。

表 2 血漿希釈時の PRA (ng/ml/hr)

No.	希釈倍率					
	原血漿	2倍	4倍	6倍	8倍	10倍
1	6.3	7.5	7.0	7.0	—	—
2	—	—	10.7	12.6	11.4	10.9
3	—	—	11.4	10.3	—	12.5

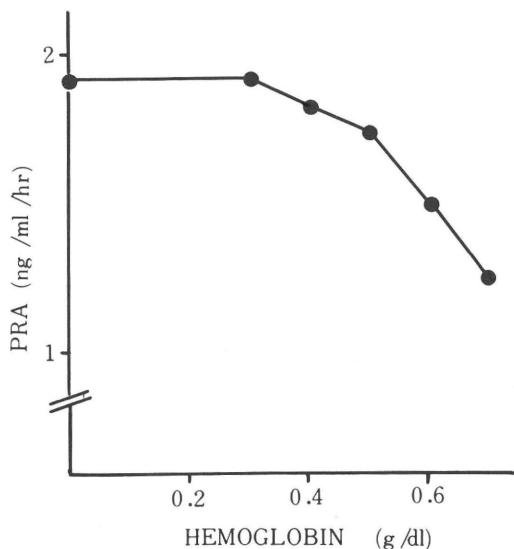


図 2 溶血が血漿レニン活性に及ぼす影響

4) 溶血の影響

血漿分離後、血球を冷凍して溶血させ、これを血漿に添加して、溶血による PRA の変動を観察した(図 2)。肉眼的に僅かな溶血 ($Hb < 0.4g/dl$) では、この影響は無視し得るものと考えられる。

5) 他法との相関

同一血漿について、他の方法により PRA を測定した。本法と bioassay 法 (Pickens の金子変法⁶⁾) による値は高度の相関を示した ($r=0.905$; 図 3)。2 種の市販 radioimmunoassay kit 法 (レニンリアキット, CEA-IRE-SORIN キット) による値とも良好な相関を示した(図 4)。なお、本法では、キット法よりも検体間の分離が良好であった。

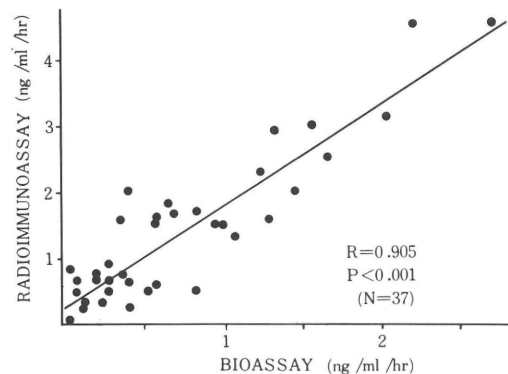


図 3 本法と bioassay による測定値の比較

6) 臨床成績

正常対照者 (22～53歳, 平均 42.6歳) の PRA は、Na 排泄量の増大に伴って減少する傾向がみられた(図 5)。しかし、1 日尿中 Na 排泄量 50～200mEq の範囲では、PRA のバラツキは比較的小さく、 $1.10 \pm 0.58ng/ml/hr$ ($m \pm SD$) であった。食塩摂取量 7～13g/日の正常対照者の PRA は、 $1.14 \pm 0.65ng/ml/hr$ であった。起立や furosemide 静注によるレニン分泌刺激試験(図 6)では、PRA は平均約 2 倍に増加し、起立により増加した PRA は臥床 1 時間後にはほぼ前値に復した。日内変動(図 7)は比較的小さく、また一定の傾向を認めなかった。

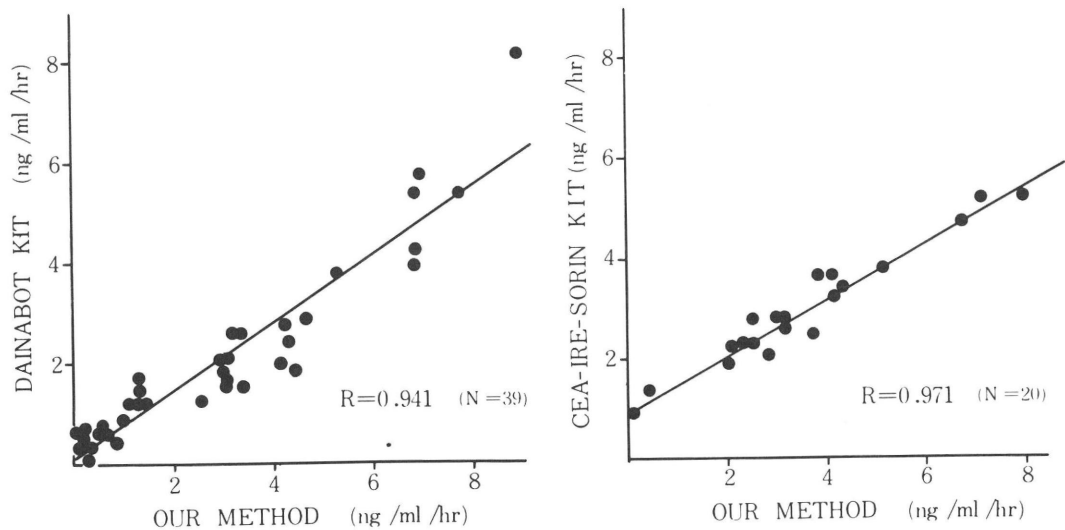


図4 本法と radioimmunoassay kit による測定値の比較

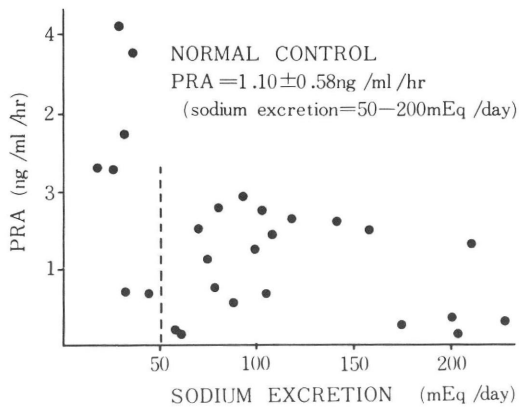


図5 血漿レニン活性と尿中 Na 排泄量との関係 (正常対照者)

考 按

Angiotensin I の radioimmunoassay による血漿レニン活性の測定法について検討した。本法は十分な測定精度を有し、他の測定法と良好な相関があることが認められた。

この原理により PRA を測定するには、血漿中のレニンを基質に反応させて定量的に angiotensin-I を生成させ、かつ converting enzyme の阻害剤を添加して angiotensin II への転換を遮断する必要がある。このため、本法ではレニンの最

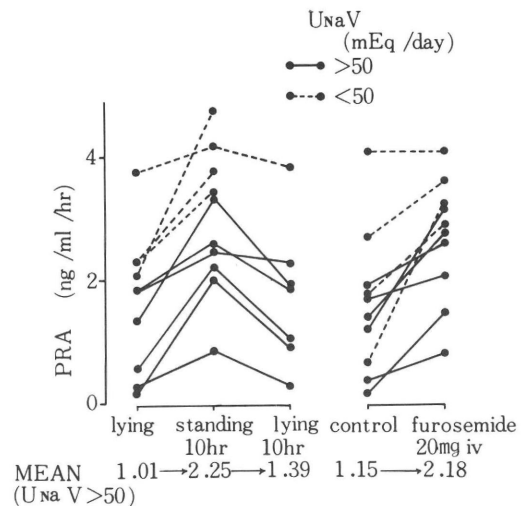


図6 レニン分泌刺激試験の効果 (正常対照者)

適 pH である 5.5 に調整した。また, converting enzyme の阻害剤として, Haber ら¹⁾は EDTA に加えて BAL と 8-hydroxyquinoline を用いたが, Sealey と Laragh²⁾は, converting enzyme の阻害は EDTA のみで十分であり, angiotensinase を阻害するために DFP の添加が望ましいと述べており、本法はこれに従った。Incubation 時間は Haber らの原法¹⁾と同じく 3 時間とした。Incubation 時間を 6 時間とすると, angiotensin

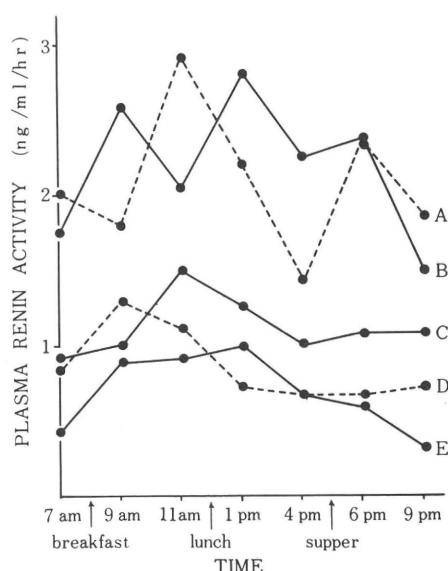


図 7 日内変動

A: 慢性腎炎; B,D,E: 正常対照
C: 本態性高血圧症

I 生成量が減少する検体があり, angiotensin 分解酵素の阻害が不完全である可能性も否定できない。

Incubate しない検体に含まれる angiotensin I はごく少量であり, 従ってその結合率は対照標準液の結合率にほぼ一致するはずであるが, 実際には必ずしも一致をみない。従来, radioimmunoassay による PRA 測定に際しては, 各標準液の結合率を plot して標準曲線を作成し, incubate した検体としなかった検体に含まれる angiotensin I 量を算出して, この差をもって表現している。この方法では, ときに PRA が算出できない例がある。すなわち, 低レニン血漿では, incubation により結合率が低下し angiotensin I の生成が示唆されるにもかかわらず, incubate した検体の結合率がなお対照標準液の結合率より大きいことがある。しかし, この検体を bioassay で測定すると, 低値ではあるが PRA が検出される。これは, 従来, 他の radioimmunoassay 法による PRA 測

定法を検討した時にも遭遇したトラブルである。その理由として, 標準液に含まれない未知の物質が検体に含まれており, これが免疫反応に関与する可能性が示唆される。そこで, 血漿採取量は, 測定精度の許容限界である $20\mu\text{l}$ とした。また, 標準液の性状を検体に近似させるために, 標準液に蛋白を添加してみた。ウシ血清アルブミン, 市販標準血清 (Chemvarion), dextran-coated charcoal で処理し既存の angiotensin を吸着した血漿などを試みたが, 標準曲線の有意な変化を来さなかった。血漿蛋白の影響を除外するために, angiotensin I 産生後に検体を煮沸し除蛋白する方法がある⁷⁾。レニンを不活性化し, 以後の操作で酵素反応が更に進行する可能性を除外する効果を兼ねるが, angiotensin の一部が蛋白と結合して沈殿するおそれ⁹⁾があろう。そこで, 著者らは前述の算定法を採用してこの問題点の解決をはかった。

本法による PRA の正常値は $1.10 \pm 0.58 \text{ ng/ml/hr}$ で, Haber ら¹⁾の報告に近似した。本法と bioassay による値は高度の相関を有したが, 前者の値は後者の平均 1.5 倍であった。両法における angiotensin 産生の方法はほぼ同一であるので, この差異の理由は明らかではないが, 免疫活性があるにもかかわらず生物活性がない angiotensin が存在する可能性があろう。Laragh ら⁸⁾は同様な比較を行い, radioimmunoassay 値が bioassay 値の 2.2 倍であると述べている。本法による PRA は, radioimmunoassay キットによる値と有意に相関するが, 後者より検体間の測定値の分離が良好であった。

起立または furosemide 静注により PRA は明らかに増加した。しかし, 原発性アルドステロン症の症例では, 安静時にも刺激負荷時にも PRA は検出されず, これらの事実も本法の妥当性を支持するものと思われる。

従来, PRA には日内変動があり, 早朝高値で夕刻低値となると報告されている¹⁰⁾⁻¹²⁾が, 著者らはこれを確認できなかった。

結 語

Radioimmunoassay による血漿レニン活性測定法を提示し、その基礎的検討を行った。とくに低レニン血漿における問題点を除外するため、検体を incubate して生じた angiotensin I を assay するとともに、incubate しない対照についても assay し、両者の B/T% の差から PRA を求めた。本法は十分な測定精度を有し、また bioassay 法とも高度の相関を示しており、臨床検査法として有用と考えられる。

御指導、御校閲をいただいた東京大学第2内科村尾 覚教授、横浜市立大学第2内科金子好宏教授、三井記念病院内科 田中 茂部長に深謝する。また、三井記念病院中央検査部高松みつ子氏ならびに内科 山門 実学士から多大の協力を得た。

本稿の要旨は、第16回日本腎臓学会総会および第21回日本臨床病理学会総会で発表した。

文 献

- 1) Haber, E., Koerner, T., Page, L.B., Kliman, B. & Purnode, A.: Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol.*, **29**:1349, 1969.
- 2) Sealey, J.E. & Laragh, J.H.: Searching out low renin patients: Limitations of some commonly used methods. *Am. J. Med.*, **55**:303, 1973.
- 3) 前畑英介, 高松みつ子, 中 甫, 多川 齊: ラジオイムノアッセイによる血漿レニン活性測定用キット (レニンリアキット, ダイナボット) の検討. 臨床検査, **18**: 878, 1974.
- 4) 阿部圭志ら: Angiotensin I の Radioimmunoassay による血漿 Renin 活性の測定法— Haber 法の改良法. 日循誌, **36**: 741, 1972.
- 5) Hunter, W.M. & Greenwood, F.C.: Preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, **194**:495, 1962.
- 6) 金子好宏: 内分泌機能検査. *Renin*. 日本臨床, **27**: 400, 1969.
- 7) 福地総逸: 最近開発された Radioimmunoassay. *Angiotensin*. 最新医学, **26**:1110, 1971.
- 8) Laragh, J.H., Baer, L., Brunner, H.R., Buhler, F.R., Sealey, J.E. & Vaughan, E.D.: Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. *Am. J. Med.*, **52**:633, 1972.
- 9) Gordon, D.B.: Binding of angiotensin I and angiotensin II to plasma proteins precipitated by ammonium sulfate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **142**:283, 1973.
- 10) Gordon, R.D., Wolfe, L.K., Island, D.P. & Liddle, G.W.: A diurnal rhythm in plasma renin activity in man. *J. Clin. Invest.*, **45**:1587, 1966.
- 11) Michelakis, A.M. & Horton, R.: The relationship between plasma renin and aldosterone in normal man. *Circulat. Res.*, **26 & 27** (Suppl. I): 185, 1970.
- 12) Williams, G.H., Cain, J.P., Dluhy, R.G. & Underwood, R.H.: Studies of the control of plasma aldosterone concentration in normal man. I. Response to posture, acute and chronic volume depletion, and sodium loading. *J. Clin. Invest.*, **51**:1731, 1972.

Summary

Measurement of Plasma Renin Activity by Radioimmunoassay

Hitoshi TAGAWA, Eisuke MAEHATA, Masao ISHII and Toshio IKEDA

*Dept. of Medicine and Central Clinical Laboratories, Mitsui Memorial Hospital,
and 2nd Dept. of Medicine, Tokyo University Hospital.*

Modified method of radioimmunoassay of angiotensin I for measurement of plasma renin activity (PRA) was reported.

Standard angiotensin I was pipetted to tubes containing tris acetate buffer (pH7.4), ^{125}I -angiotensin I and antiserum (supplied by Dainabot RI Lab), and they were kept overnight at 4°C. Dextran-coated charcoal was used for separation of B and F. Standard curve was depicted by plotting the difference of B/T% between each angiotensin standard and 0-standard containing no angiotensin.

In order to assay PRA, 5ml of blood was taken into a tube containing EDTA- Na_2 , and plasma was stored frozen. After thawing, the sample was divided to two, and was adjusted to pH 5.5. Diisopropyl fluorophosphate was added. One was 'incubated' for 3 hrs at 37°C, and another was kept at 4°C ('unincubated'). Twenty microliter of the treated sample was taken and assayed in duplicate in the same way as angiotensin. Angiotensin I produced by incubation was calculated from the difference of

B/T% between incubated and unincubated samples, which was expressed as PRA (ng/ml/hr). This procedure seemed to eliminate the possible error occurring especially in low-renin samples, which might be caused by the presence of factors in plasma.

Both intra- and inter-assay variations were small. Recovery and dilution experiments gave excellent results. This method gave results correlated well with bioassay ($r=0.905$) and with two commercially available radioimmunoassay kits ($r=0.941$ and 0.971).

In normotensive controls, PRA showed a tendency of inverse correlation with sodium excretion; when sodium excretion was 50–200 mEq/day, however, PRA fell within a relatively small range, which was $1.10 \pm 0.58 \text{ ng/ml/hr}$ ($m \pm \text{SD}$) in the fasting state during recumbency. PRA nearly doubled by stimulation with either standing for an hour or IV injection of furosemide. We could not confirm consistent diurnal rhythm in 5 patients.