フロリジル法による plasma angiotensin II の radioimmunoassay の開発と検討

スペシャルレファレンスラボラトリー

森 本 妙 子, 青 山 正 明

横浜市立大学医学部第二内科

後 藤 英 司, 塩 之 入 洋

A Method of Radioimmunoassay of Plasma Angiotensin II Using Florisil

Taeko MORIMOTO, Masaaki AOYAMA

Department of Laboratory
Special Reference Laboratories, Inc.
Tokyo, Japan

Eiji GOTOH, Hiroshi SHIONOIRI

Second Department of Internal Medicine
University of Yokohama-City Medical School
Yokohama, Japan

Several methods for determination of angiotensin II (AII) in human plasma had been reported. Most popularized method was extraction method using Dowex (H^+) resin. Direct method and extraction method using acetone-petroleum ether were also used. However these methods have several defects, such as intricate procedure, low sensitivity or low rate of extraction. Therefore we developed a new method for AII in human plasma which was used florisil adsorption and elution with acetone-hydrochloric acid solution.

In our method compared with the method using acetone-petroleum ether or the direct method, the extraction rate was 84% and minimum detectable value was 0.75pg/tube (B/Bo 95% intercept value).

Reproducibility of intra-assay and inter-assay were 11.7% and 12.9%, respectively. This our method was more sensitive, specific and simple, and was useful for routine clinical investigation.

We studied the untreated 21 patients with essential hypertension (containing 11 males and 10 females, their averaged age was 41.5 years old, and blood pressure on admission was 175.8/112.5mmHg).

We measured plasma renin activity (PRA) and AII (florisil-method) in venous blood before and after intravenous injection of 20mg furosemide and oral administration of 25mg

captopril. After the furosemide administration, AII in venous blood significantly increased to $35.0 \pm 8.0 \text{ pg/ml}$ (Mean $\pm$ SE) from $14.6 \pm 2.6 \text{ pg/ml}$ ($p < 0.001$), and PRA also increased to $2.40 \pm 0.89 \text{ ng/ml/hr}$ from $0.92 \pm 0.21 \text{ ng/ml/hr}$. Although after captopril administration PRA significantly increased to $2.56 \pm 1.02 \text{ ng/ml/hr}$ from $1.05 \pm 0.32 \text{ ng/ml/hr}$ ($p < 0.01$), AII decreased to $8.2 \pm 2.2 \text{ pg/ml}$ from $15.2 \pm 3.1 \text{ pg/ml}$ ($p < 0.001$). Moreover, AII levels in arterial and venous blood were $27.8 \pm 7.8 \text{ pg/ml}$ and $28.8 \pm 6.7 \text{ pg/ml}$, respectively.

緒 言

ペプチドホルモンである angiotensin II (AII) は現在までのところ、生体内において最も昇圧活性の高い物質である。その作用としては末梢細動脈収縮作用とアルドステロン分泌増加作用、さらに血管運動中枢などに対する作用などが知られている。この AII は血漿 α_2 -グロブリン分画に属する angiotensinogen (renin substrate) に対し、renin と angiotensin I 変換酵素 (ACE) が相次いで作用し、angiotensin I (AI) を経て生成される。血漿 AII の測定は高血圧症の病態生理や病因などの解明に重要であると考えられており、これまでも血漿 AII の radioimmunoassay (RIA) について、いくつかの論文が発表されている。その多くは Dowex^{1) 4) 7) 9)} (H^+) resin 抽出法、アセトーン-石油エーテル⁶⁾法および直接法⁸⁾を用いて測定している。

著者らは Goodfriend⁵⁾の方法に準じ、抗 AII 抗体を作成し、得られた特異抗体を用いて直接法、アセトーン-石油エーテル法およびフロリジル法の三法につき基礎検討をおこない、同時再現性、添加回収試験、希釈試験および最小検出感度などの成績を比較検討した。また、臨床的な有用性を検討するため、furosemide 投与前後および captopril 投与前後における血漿レニン活性 (PRA) および AII を測定した。

実験材料および方法

1) 試薬

a) 標識抗原—NEN (New-England-Nuclear Corp.) より入手した標識抗原 (^{125}I -AII) を 0.05M borate buffer (pH 8.5, 0.2% BSA, 0.5% NaCl, 0.1% EDTA-2 Na を含む) にて total count を 10000 cpm に調整して使用した。比放射能は $1200 \sim 1500 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。

b) 各種ペプチド—AI, [Ile⁵]-AII, angiotensin III (AIII), [Sar¹, Ala⁸]-AII, bradykinin は大阪ペプチド研より, antidiuretic hormone は Sigma Chemical Company より, des- [Arg¹, Asp²]-AII (3-8 AII) は California Medical Corporation より入手した。各ペプチドは 0.1M 酢酸にて溶解した。

c) その他—その他の試薬および溶媒は各メーカーより購入した。1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide (Calbiochem, Behring Corp.), Complete Freund's adjuvant (ヤトロン), Bovine γ -globulins (Sigma Chemical Company), 第二抗体; anti-rabbit- γ -globulin antibody (栄研イムノケミカル), 2, 3-Dimercaptopropanol-(1) (MERK), Polyethylen glycol; carbowax 6000 (キシダ化学), Bovine serum albumin, フロリジル; 100~200 mesh, 8-hydroxyquinoline, アセトン, 酢酸, 石油エーテル (和光純薬)。

2) AII 測定の基礎的検討

a) 抗 AII 抗体の作成

合成 AII 5.6mg と BSA 25mg を再蒸留水 6ml にて溶解した。スターラーにて攪拌を続けながら, Carbodiimide (60mg/ml) 0.25ml を滴下した。Visking 透析膜を用いて再蒸留水 (4℃) にて 48 時間透析後, 凍結乾燥し, 4℃ にて保存した。抗体作成には AII-BSA 結合物 1mg を生食 1.0ml にて溶解後, 等量の complete Freund's adjuvant と十分に混和し, New Zealand white rabbit の四肢近位部に隔週に皮下注射をおこなった。投与開始後 1~2 週間おきに耳静脈から採血をおこない, 抗体産生の程度を確認した。10 週目に最終希釈倍率 40 万倍で RIA 使用に十分な抗体価に達したことを確認したのち全採血を実施した。

b) 直接法 (direct method)

AII の direct method には 0.05M の borate buffer (pH 8.5, 0.2% BSA, 0.5% NaCl, 0.1% EDTA-2 Na を含む) を, ACE および angiotensinase の阻害剤として inhibitor 液 (8-hydroxyquinoline を 2.6mg/ml, 2, 3-dimercaptopropanol-(1) を 0.1mg/ml になるように酢酸 buffer pH 5.0 にて溶解したもの) を用いた。測定は血漿量 200 μ l, assay buffer 300 μ l, 抗体 100 μ l (最終希釈倍率 28×10^4), inhibitor 液 25 μ l を混和し, 4℃ にて一晚放置後, 標識抗原 100 μ l (10000cpm) を添加し, 6 時間後に二抗体法にて B・F 分離をおこなった。

c) アセトン-石油エーテル法

kobayashi ら⁶⁾の方法に準じておこなった。血漿 0.6ml に冷却アセトン 1.2ml を加え, 攪拌したのち 5 分間遠心した。その上清に石油エーテルを 2cc 加え, 攪拌したのち遠心分離し, 上清の石油エーテル層を吸引除去し, 下層のアセトンを 45℃ の恒温溶槽にて窒素ガスで蒸発乾固させた。この乾固物を buffer で溶解し, RIA に用いた。RIA 法は florasil 法での RIA と同様におこなった。

d) フロリジル法

Beardwell ら²⁾の方法に準じて作成した活性化フロリジルを用い, 血漿中の AII を吸着し, 溶出には 0.5N 塩酸-アセトンを用いた。フロリジル量および血漿量の適当量を決めるにあたり, AII のフロリジルへの吸着時間および溶出時間の検討, AII 値への影響ならびに血漿量と AII 値との関係を検討した。フロリジル法による測定は図 1 に従い, その再現性, 添加回収試験および希釈試験などの検討をおこなった。

3) 臨床的検討

横浜市立大学医学部第二内科に入院中の本態性高血圧患者 21 例を対象とした。そのうちわけは, 男性 11 例, 女性 10 例, 年齢は 24~25 才であり, 入院時血圧は平均 175.8/112.5mmHg で WHO I・II 期の症例であった。本態性高血圧の診断は, 病歴, 一般検査所見, 経静脈的腎盂造影および各種内分泌学的検査により, 二次性高血圧症を除外したのち決定した。

入院 2 週間以上前から降圧剤および利尿剤投与を中止し, 入院後, 食塩摂取量を 1 日 7~10g とした。午前 9 時頃, 安静臥床 30 分以上経過後, 肘静脈および股動脈より採血し, furosemide 20mg 静脈内投与あるいは captopril (SQ 14225) 25mg 経口投与をおこない, 30 分後に投与前と同様に採血し, PRA, AI および AII を測定した。AI および AII はフロリジル法にて同時抽出したのち, それぞれの RIA で測定した。RIA には 0.05M borate buffer (pH 8.5, 0.2% BSA, 0.5% NaCl, 0.1% EDTA-2 Na を含む) を用いた。AI の抗体は AII と同様な方法で家兎に免疫して作成したのちを用いた。PRA 測定にはダイナボット社のレニンリアキットを用いた。各測定値は平均値 $\pm$ 標準誤

差で示し, 推計学的検定は Student's *t* 検定によった。

Fig. 1. Extraction and assay procedure for measurement of PAII by florisol adsorption.

結 果

1) 抗 AII 抗体の特異性

50%法 (B/Bo%表示) にて得られた抗 AII 抗体の特異性を図 2 に示す。本抗体 (最終希釈倍率 48 万倍) の各種ペプチドに対する交叉反応性は A I と 0.3%, [Val⁵]-AII と 100%, [Sar¹, Ala⁸]-AII と 10⁻⁴% であり, 特に AIII および 3-8 AII との交叉性は従来の一部の報告^{4) 8) 10)} 値 (81~100%) に比較すると低く, それぞれ 30.8% および 46.0% であった (Fig 2)。

2) 直接法による AII 値

直接法において添加インヒビターの適量を決定するため, AII フリー血漿に既知濃度の AII ならびにインヒビター液 12.5~50 μ l 添加し, AII 値の安定性を検討した。4°C にて一晩放置後, 存在する immunoreactive な AII を測定したが, インヒビター添加量の差による変化は認められなかった。

最小検出感度は 15.5 pg/ml (B/Bo 95% intercept 値) であった。添加回収試験は濃度の異なる 4 種類の血漿についておこない, 平均回収率は 89.5% であった。希釈試験は 3 種類の血漿を用いておこなった結果, 原点を通る直線性を示した。

3) アセトン-石油エーテル法

125 I-A IIを用いてアセトン-石油エーテル法における抽出率を求めたところ、血漿量300~600 μ lの範囲で70~75%であった。添加回収試験においては、回収率が100%を超える結果が得られた。すなわち、フロリジル法において添加量と回収値において直線性が得られたが、アセトン-石油エーテル法の場合には直線関係は得られなかった。また、アセトン-石油エーテル法とフロリジル法により得られたA II値には $\gamma=0.945$ ($n=32$, $P<0.001$)の相関関係が得られたが、フロリジル法に比し高値を示す傾向がみられ、それは低濃度域で顕著であった。

4) フロリジル法

a) 抽出条件

フロリジル量と血漿量との関係はA II値に大きな影響を及ぼした。つまり、フロリジル量が過少(20mg)の場合には吸着率の低下がみられ、フロリジル過剰(40mg)の場合には溶出率の低下ならびに非特異的因子の混入による高値の傾向が認められた。フロリジル過少および過剰の場合ともに血漿量(300, 600, 1200 μ l)と測定値の間には原点を通る直線性が得られなかったが、フロリジル30mgの場合には血漿量と測定値との間には原点を通る直線性が認められ、再現性も良好であった(Fig. 3)。フロリジルへのA IIの吸着時間は5~10分間が溶出時間は5分間が適当であった。

b) 最小検出感度

本法での最小検出感度は0.75pg (B/Bo% 95% intercept 値)であり、0.45~500pg/tubeの間で安定した標準曲線が得られた(Fig. 4)。

c) 同時再現性

濃度の異なる3種類の血漿を用い、おのおの10回測定して得られた変動係数は6.3~18.4%であった(Table 1)。

d) 経時再現性

濃度の異なる3種類の血漿を用いて7回測定した。その変動係数は9.4~16.0%であった(Table 2)。

e) 添加回収試験

添加回収試験は2通りの方法でおこなった。1つは抽出前の血漿に既知のA IIを添加し、抽出操作およびRIAを経てその回収率を求める場合で、1つは抽出操作後に既知のA IIを添加し、その回

収率を求める場合である。前者は 2 種類の血漿を用い 0 ~ 31.3pg の A II を添加し, 後者の場合には 3 種類の血漿を用い 0 ~ 50pg の A II を添加し, それぞれ回収率を求めた。その結果, 平均でそれぞれ 102.0% および 96.0% であった。

Fig. 3. Relationship between plasma volume and florilisil quantity.

Fig. 4. Averaged standard curve of angiotensin II.

Table 1. Reproducibility of intra- and inter-assay.

intra-assay	n	$\bar{x}$ pg/ml	SD	CV%
Sample 1	9	13.0	2.39	18.4
2	9	22.7	2.39	10.5
3	9	44.0	2.78	6.3
Mean 11.7%				
inter-assay	n	$\bar{x}$ pg/ml	SD	CV%
Sample 4	5	24.4	3.91	16.0
5	6	58.8	7.90	13.4
6	6	105.2	9.85	9.4
Mean 12.9%				

Table 2. Recovery test.

Recovery was decided with two cases,

case a : known quantity of angiotensin II was added to plasma sample, and extracted.

case b : plasma sample was extracted, and known quantity of angiotensin II was added.

2 - a

	added	measured	recovery %
Sample 1	0 (pg/tube)	0 (pg/tube)	
	7.9	8.1	102
	15.6	18.3	117
	31.3	31.3	100
2	0	5.9	
	7.9	12.7	82
	15.6	20.4	92
	31.3	42.7	115

2 - b

	added	measured	recovery %
Sample 3	0 (pg/tube)	0 (pg/tube)	
	6.2	6.0	96
	12.5	11.0	88
	25.0	22.2	89
	50.0	48.5	97
4	0	9.0	
	6.2	15.0	98
	12.5	23.0	112
	25.0	34.5	102
	50.0	51.5	85
5	0	11.0	
	6.2	16.4	87
	12.5	23.8	102
	25.0	37.3	105
	50.0	60.0	98

f) 希釈試験

希釈試験は 3 種類の血漿を用い, AII フリー血漿で 16 倍まで希釈した。それらの測定値には原点を通る直線性が認められた。

Fig. 5. Dilution test with A II free plasma.

g) A I 値との相関および PRA との相関

本法により得られた A II 測定値は A I 値とは $r=0.893$ ($n=71$), PRA とは $r=0.926$ ($n=30$) の相関を示した。

Fig. 6. Relationship between plasma angiotensin I and plasma angiotensin II.

Fig. 7. Relationship between plasma angiotensin II and plasma renin activity (PRA).

5) 臨床的検討の結果

a) furosemide 投与前後の PRA, AI および AII 値

本態性高血圧症患者15例に furosemide 20mg 静脈内投与をおこなった。PRA は投与前 0.92 ± 0.21 ng/ml/hr より投与後30分で 2.40 ± 0.89 ng/ml/hr と有意 ($P < 0.01$) に上昇, AI 値は投与前 98.0 ± 30.5 pg/ml より投与後 366.0 ± 181.3 pg/ml と有意 ($P < 0.001$) に上昇, AII 値も投与前 14.0 ± 2.6 pg/ml より投与後 35.0 ± 8.0 pg/ml と有意 ($P < 0.01$) に上昇した (Fig 8)。

Fig. 8. Plasma renin activity and plasma angiotensin II during one hour upright posture after i.v. injection of 20mg of furosemide.

b) Captopril 投与前後の PRA, AI および AII 値

本態性高血圧患者20例に captopril 25mg 経口投与をおこなった。PRA は投与前 1.05 ± 0.32 ng/ml/hr より投与後30分で 25.6 ± 1.02 ng/ml/hr と有意 ($P < 0.01$) に上昇, AI 値も投与前 102.1 ± 28.2 pg/ml より投与後 212.5 ± 48.2 pg/ml と有意 ($P < 0.01$) に上昇した。しかし, AII 値は投与前 15.2 ± 3.1 pg/ml に比し, 投与後 8.2 ± 2.2 pg/ml と有意に下降を示した (Fig 9)。

c) 動脈血および静脈血における AII 値

13例において, 動脈血および静脈血を同時に採取した。動脈血における AII 濃度は 28.8 ± 7.8 pg/ml, 静脈血における AII 濃度は 28.8 ± 6.7 pg/ml で, 両者間には $\gamma = 0.926$ ($P < 0.001$) の正相関を認めた (Fig 10)。

Fig. 9. Plasma renin activity and plasma angiotensin II before and after (30 min.) administration of captopril (25mg).

Fig. 10 Relationship between angiotensin II concentration of human arterial and venous blood.

考 察

AII の簡便で正確な測定方法を確立するため抗 AII 抗体を作成し, 本抗体を用いて直接法, アセトン-石油エーテル法およびフロリジル法について基礎的検討をおこなった。また, 入院本態性高血圧患者の血漿濃度を測定し, 臨床的検討を加えた。

直接法による AII 値とフロリジル法による AII 値には $\gamma=0.948$ と良好な相関を認めた (Fig 11)。しかし, 直接法の場合には最小検出感度が 15.5pg/ml と高く, フロリジル法の 4.0pg/ml (0.75pg/tube) に比し約 4 倍であった。著者らの今回の検討から, AII の直接法は更にその測定感度の改善がなされれば簡易な測定法と考えられたので現在, 改善検討中である。

Fig. 11. Relationship between direct and florisil method for plasma angiotensin II determination.

アセトン-石油エーテル法は簡便な抽出方法と考えられる。しかし, 添加回収試験および希釈試験において満足できる結果が得られなかった。また, 低濃度域での AII 濃度が高い傾向があった。これは測定値が未知の因子によって干渉を受けているように思われた (Fig 12)。

Fig. 12 Relationship between acetone-petroleum ether method and florisil method for plasma angiotensin II determination.

フロリジル法はフロリジルが低分子量の物質を非特異的に吸着する現象を利用したものである。フロリジルによる吸着を用いた測定方法は1971年 Beardwell²⁾によるADHの測定が最初とされている。著者らの経験においてもフロリジルを用いた測定方法は、オキシトシン、LH-RH、インスリン、PTH等においても有効な抽出方法であった。

フロリジル吸着法を用いた測定法を確立する場合、最も重要なことは、添加フロリジル量と血漿量の相互関係を十分に検討することにあつた。血漿量0.3~1.0mlの場合、フロリジルが40mg以上添加されると、検体量と測定値の間には原点を通る直線性が認められなかった。これは、フロリジルの増量により、未知の非特異的因子が吸着され、測定系に干渉するためと考えられる。

フロリジルを用いた場合、測定値の変動が大きくなるという意見もあるが、著者らの検討においては、抽出条件を厳密に設定することにより解決可能であつた。測定値の変動が大きくなる原因は、吸着および洗浄操作にあつた。すなわち、吸着時間が短い場合(5分以下)には吸着率が安定しないことや水洗操作によりA IIが洗い流される等の事実が明らかになった。その他、測定値に影響を与える因子として検体の蛋白濃度の影響が考えられた。図13に示すごとく、フロリジル法およびアセトン-石油エーテル法の両方において、蛋白濃度の増加とともに抽出率の低下の傾向が認められたが、数%であり、誤差の大きな因子とは考えられなかった。フロリジル吸着による抽出方法は、

吸着, 洗淨, 溶出, 脱脂と4段階よりなる。今後, 精度をより向上させるため step の短縮を検討することが必要と考えられる。また, 今回の検討においては RIA を delayed 法でおこなったが, competitive 法においても最小検出感度を保ちつつ, delayed 法と同等値が得られることを確認している。更に competitive 法にすることにより, 抗体の A I との交叉性が減少した (0.3から0.1%に減少)。

extraction rate

Fig. 13. Extraction rates of florisil and acetone-petroleum ether methods were affected by plasma protein concentration.

臨床検討においては captopril 投与後において PRA および A I の有意な上昇に対し, A II は有意に下降した。furosemide 投与後では PRA および A I とともに A II は上昇した。また, 動静脈間の immunoreactive な A II については差が認められなかった。これは Cain³⁾らの報告と異なるため, 今後検討が必要である。

以上のことから, 著者らが作成した抗 A II 抗体を用いてのフロリジル法による血漿 A II の radioimmunoassay は基礎検討において従来の測定法よりも優れており, その測定系は簡便で臨床的にも広く応用可能であると考えられる。

結 論

フロリジル吸着を用いた血漿 A II の測定方法を開発した。本法での最小検出感度は 0.75pg/tube, であり, 血漿 0.6ml で測定可能であった。

本測定のために作成した抗 A II 抗体は特異性にかなり優れており, A I, A III および 3-8 A II に対する交叉性はそれぞれ 0.3%, 30.8% および 46.0% であった。

臨床検討においては captopril 投与後, PRA および A I の有意な上昇に対し, A II は有意に下降した。furosemide 投与後では PRA および A I とともに A II は上昇した。

以上の成績から新たに開発した A II 測定系は臨床応用の可能な有用な A II 測定方法である。

本論文の要旨は第20回核医学会および第28回臨床病理学会にて発表した。

文 献

- 1) Barrett, J.D., Eggena, P. and Sambbi, M.P.: Extraction and Measurement of Circulating Angiotensin I and II. *Clin. Chem.*, 23: 464–468, 1977.
- 2) Beardwell, C.G.: Radioimmunoassay for Arginine Vasopressin in Human Plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33: 254–260, 1971.
- 3) Cain, M.D., Catt, K.J., Coghlan, J.P.: Effect of Circulating Fragments of Angiotensin II on Radioimmunoassay in Arterial and Venous Blood. *J. Clin. Endocrinol.*, 29: 1639–1643, 1969.
- 4) Düsterdieck, G. and McElwee, G.: Estimation of Angiotensin II Concentration in Human Plasma by Radioimmunoassay. Some application to physiological and clinical statis. *Europ. J. Clin. Invest.*, 2: 32–38, 1971.
- 5) Goodfriend, T.L., Levine, L. and Fasman, G.: Antibodies to Bradykinin and Angiotensin: A Use of Carbodiimides in Immunology. *Science*, 144: 1344–1346, 1964.
- 6) Kobayashi, H., Shimamoto, K., Moriguchi, O. and Miyahara, M.: A Sensitive Radioimmunoassay for the Determination of Plasma Angiotensin II in Human Subjects. *Jap. Circ. J.*, 43: 727–732, 1979.
- 7) Kosunen, K.T.: A Simple Method for Measurement of Angiotensin II in Plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 36: 467–472, 1976.
- 8) Lijmen, P.J., Anery, A.K., Fagard, R.H. and Katz, F.H.: Radioimmunoassay of Angiotensin II in Unextracted Plasma. *Clinica. Chimica. Acta*, 88: 403–412, 1978.
- 9) Page, L.B., Haber, E., Kimura, A.Y. and Purnode, A.: Studies with the Radioimmunoassay for Angiotensin II and Its Application to Measurement of Renin Activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29: 200–206, 1969.
- 10) Sundsfjord, J.A.: Radioimmunoassay of Angiotensin II in Plasma. *Acta Endocrinol.*, 64: 181–192, 1970.

(受付日: 57. 6. 14)