血漿 Renin 活性測定法に関する我々の検討

第2報 産生 Angiotensin の精製法について

弘前大学泌尿器科
(主任: 舟生富寿教授)

二 川 原 和 男
寺 山 百 合 子
館 山 松 男
瀬 野 俊 治
白 岩 康 夫
新 谷 洋 三
舟 生 富 寿

A METHOD FOR THE MEASUREMENT OF PLASMA RENIN ACTIVITY: (II)

Kazuo Nigawara, Yuriko Terayama, Matsuo Tateyama, Toshiharu Seno,
Yasuo Shiraiwa, Yozo Shinya and Tomihisa Funyu
Department of Urology, Hirosaki University School of Medicine
(Director: Prof. T. Funyu)

In a previous report, we mainly described suppression of angiotensinase (ATase) activity and relation between renin and angiotensinogen (ATogen) concentration. The present paper concerns with the purification of angiotensin (AT) produced.

We tried to purify and condense AT in plasma with ethanol, propanol, butanol extraction, ion exchange chromatography or evaporation in reduced pressure. We made it a rule to use the combination of n-butanol and water extraction combined with ion exchange chromatography. The recovery rate of added AT was 70 percent (range from 55 to 85%) by this method.

Combining this method with that in the previous report, we decided to determine plasma renin activity as follows. Ethylenediaminetetraacetate and diisopropyl-fluorophosphate are added to 10 ml of heparinized plasma sample to suppress ATase activity. The mixture is incubated at pH 5.5 and 37°C. After 2 hours incubation, it is acidified and saturated with Na Cl, and then extracted with n-butanol. The separated butanol fraction is added with petroleum ether, and another extraction was made with distilled water. The water fraction is percolated through the ion exchange resin column (Dowex 50). The column is washed with a small amount of phosphate buffer (pH 6.0) and water. Finally, AT is eluted from the resin with 0.1 N Na OH. The eluate is neutralized and assayed in rats biologically. The plasma renin activities in the normotensives were in the range from 0.6 to 2.5 $\mu\text{g}/1/2 \text{ hr.}$ by our method.

To bring in vitro renin activity close to in vivo activity, we believe that change of the composition of original plasma samples should be avoided and the duration of incubation should be as short as possible. However, under these conditions, it is frequently required to condense the assaying solution. AT concentration in the assaying solution is about 3 fold larger than before the extraction treatment, but this rate of condensation is still not enough, nor was the recovery of AT. Nevertheless, we consider that our method is clinically applicable.

緒 言

われわれは前報において、間接法による血漿中のrenin 活性測定の際にはまず血漿中に混在する angiotensinase (ATase) 活性を抑制しなければならず、そのためには EDTA および DFP を最終濃度で各 3×10^{-3} , 1×10^{-3} M, pH 5.5 とすべきこと、また incubation 時間は測定結果の定量性を考慮するならばできるだけ短時間で済ませるべきであることから一応 37°C , 2 時間とした¹⁾。併しこのような条件下で incubate し反応を停止させた状態での産生 angiotensin (AT) 量は、特に正常者の場合には rat による生物検定法の検出下限界付近にあるため検定に困難を伴う。

そこでわれわれは検定に用いる 試料中の AT 濃度を高めるために、種々の alcohol による抽出、イオン交換樹脂などによる精製濃縮を試み、この成績および第 1 報の実験成績を根拠としたわれわれの renin 活性測定方法を述べ、さらに renin 活性測定法に対する考察を加えた。

AT の検定方法及び実験材料

1 AT の検定方法

前報同様、AT の測定は pentobarbital または phenobarbital で麻酔、節遮断剤として pentolinium または hexamethonium を投与した rat の股静脈より試料を注入し、その際の平均頸動脈圧変化を電気血圧計に記録させ、合成 AT II (Hypertensin Ciba) 溶液を規準に判定する生物学的検定法によつた¹⁾。

2 試薬および使用器械

試薬: Ethanol, n-propanol, n-butanol, hydrochloric acid, acetic acid, sodium hydroxide, ammonium hydroxide, sodium chloride, disodium hydrogen phosphate, potassium dihydrogen phosphate, ammonium acetate, petroleum ether, bromthymol blue (BTB) は何れも和光純薬工業 K.K. 製試薬特級を用いた。その他陽イオン交換樹脂 Dowex 50 W-X 2, H^{+} 型, 100~200 mesh (Dow Chemicals Co.) および heparin 添加豚血漿を使用した。

機器: pH は pH 計 (日立製作所, M-4) に常温用標準形または試験管用複合電極を装着して測定, 溶液の減圧濃縮はロータリーエバポレーター (柴田化学工業 K.K., C-A) と水流ポンプを用い, 40°C 以下で操作した。その他脚懸垂型遠心機 (国産遠心機 K.K. H 100 B 3), 万能シェーカー (イワキ K.K., V-D) を使用した。

実験成績

われわれはまず濃縮法において最も簡単な Pickens らの方法²⁾に準じて、pH 5.0 とした豚血漿に合成 AT 100 ng を添加、これに等容の蒸留水を加えた後沸騰水中に 10 分間浸漬、遠心分離した上清の一定量をロータリーエバポレーターで減圧乾固、残渣を蒸留水に溶解し生物検定を行なつてみた。この方法は任意の倍率に濃縮でき、操作も簡単であるという利点はあるが、濃縮に使用できる量は全量の 70% 前後に過ぎないこと、また減圧乾固後の残渣を溶解する際に不溶性の物質が残る、この物質に吸着されるためとも推定されるが 30% 程度の AT 回収率の低下、生物検定において一過性の降圧作用が現われることなどの欠点のみられた。

故にわれわれは種々の alcohol による抽出ならびにイオン交換クロマトグラフィーの利用について検討した。

1. イオン交換クロマトグラフィー

Dowex 50W-X₂ の陽イオン交換容量は膨潤した樹脂 1 ml 当り 0.7 mEq とされている。AT II を仮に 1 分子、1 当量とした場合、これは AT II 約 0.7 g に相当するが、AT 1 分子が 1 当量とは考えられず、また有機物のイオン交換樹脂への吸着はイオン反応以外の機構でも行なわれる可能性があるため、一応 Dowex 50W-X 2 の合成 AT 吸着能力を実験的に検討した。

a. 吸着の予備実験。シリコン処理した三角フラスコに合成 AT II 10 μg を含む生理的食塩水 40 ml を入れ、これに予め蒸留水、0.1N HCl, 蒸留水の順に処理した樹脂 1 ml を加え室温で 20 分間水平振盪後内径 6 mm のガラス製カラムに移し、樹脂を少量の蒸留水で洗滌後 0.1N NaOH 10 ml で溶出液には pH 指示薬として BTB 溶液 3 滴を加え、2N HCl で中和後 AT 含量を測定し

第 1 図 イオン交換樹脂への AT の吸着条件
(a) バッチ法 (室温, 15 ~ 20 分間振盪) (b) カラム法 (6 mm $\times$ 3.5 cm, 流速 0.5)

た。

その結果は数度の測定において添加量の80～100%となつた。添加した AT が多量のため正確な数値は得られなかつたが80%程度は回収されると思われた。すなわち、この樹脂 1 ml は合成 AT II 8 μ g 以上は吸着する能力を有するものと考えられ、renin 活性測定の際の AT の精製には十分用いるとみなした。

b. 吸着の条件. AT を樹脂に吸着させる場合における樹脂の交換基の種類、pH の影響について調べた。

1) バッチ法. イオン交換樹脂の交換基については、市販 Dowex 50 W-X₂ (H⁺型) をさらに 0.1N HCl で処理し、これを H⁺型、別にこの H⁺型樹脂を 1N NaOH 乃至 NH₄OH で処理したものを夫々 Na⁺型、NH₄⁺型として用いた。イオン交換樹脂はイオンを吸着したとき溶液の pH を変化させるので、これを防止するために H⁺型および Na⁺型樹脂においては 0.1M phosphate 緩衝液、NH₄⁺型樹脂の場合、pH 6.0 以下では 0.1M ammonium acetate 緩衝液、6.5 以上では phosphate 緩衝液を用いて処理し使用に供した。

合成 AT II 1 μ g を含む pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 の生理的食塩水 10 ml を夫々シリコン処理した遠沈管にとり、さらに各 pH の緩衝液で処理した 3 種の樹脂を 1 ml ずつ添加、室温で 15～20 分間水平振盪後樹脂を内径 6 mm のガラス製カラムに移し換へ、数 ml の対応する緩衝液、続いて蒸溜水で洗滌し、最後に 0.1N NaOH 3 ml で溶出、溶出液は中和後生物検定した。

その結果、AT 検出値を添加量に対する回収率として示すと第 1 図 a の如く、H⁺型では pH 6.0 を頂点に (回収率 75%) その前後の pH では回収率は低下する傾向を示し、NH₄⁺型では pH 5.5 で最高 (75%) を示し、pH 6.5 ではやや変則的に低くはなつたが総じて pH が高くなるにつれて回収率は漸減する傾向がみられた。Na⁺型では 3 点のみの実験が行なわれたに過ぎなかつたが他 2 種の樹脂に比較し回収率は幾分下廻つた。H⁺型および NH₄⁺型について同様の操作で再度検討した成績を同図に点線で示したが、pH 6～6.5 を頂点とする前回に類似した成績が得られた。

2) カラム法. H⁺型および NH₄⁺型樹脂について、予め緩衝液で処理した場合およびしない場合での AT 吸着条件を探索した。H⁺型および NH₄⁺型樹脂カラム (6 mm × 3.5 cm) を各 10 本用意し、その半数には pH 5.0 から 7.5 までの phosphate 乃至 ammonium acetate 緩衝液を通過させて処理した。即ち緩衝液で処理したもの

および処理しないものの 2 通りを作製し、これらに合成 AT II 1 μ g を含む pH 5.0～7.5 の生理食塩水 30 ml を通した。液が通過後少量の対応する pH の緩衝液で洗滌し、さらに蒸溜水で洗滌後 0.1N NaOH 3 ml で溶出、中和し生物検定した。

その成績は第 1 図 b に示した如く、H⁺型樹脂緩衝液使用の場合は pH 5.5～6.5 で回収率 71～72%、それ以外の pH では低下しており、H⁺型で緩衝液処理を行なわなかつたものでは pH 6.0 を頂点に (回収率 75%) その前後の pH では回収率は低率であつた。即ち両者において pH 5.5 での回収率以外は凡そ近似の傾向とみなされた。NH₄⁺型の緩衝液使用の場合 pH 6.0 で幾分低い回収率を示したが、pH 5.5 での回収率 75% を最高にその前後の pH では漸減するように思われ、NH₄⁺型緩衝液処理をしない場合の結果も pH 6.0 を除いてはほぼ同様の成績であつた。

以上 2 つの実験から、H⁺型樹脂を使用する場合には pH 6.0 が、NH₄⁺型樹脂では一致しない点もあつたが一応 pH 5.5 が適当と思われた。また緩衝液については使用しなくても概ね同じ結果であつた。われわれは成績が比較的一定しているとの理由から、H⁺型樹脂を pH 6.0 phosphate 緩衝液で処理、これに通す AT 溶液も pH 6.0 とする条件を採用した。

c. 溶出液の検討. 前項の実験においては樹脂に吸着させた AT を 3 ml の 0.1N NaOH で溶出したが、さらに 0.2N NaOH、0.2N NH₄OH を使用した場合の回収率の差について検討した。

H⁺型樹脂を内径 6 mm のガラス製カラムに高さ 3.5 cm となるように充填後 pH 6.0 の phosphate 緩衝液を流出液が pH 6.0 となるまでこれに通し、続いて合成 AT 1 μ g を含む pH 6.0 の生理的食塩水 30 ml を通した。液の通過後約 3 ml の phosphate 緩衝液および蒸溜水で洗滌、0.1N および 0.2N NaOH または 0.2N NH₄OH を 1 ml ずつ 5 回加えて溶出、溶出液は各回毎に集め夫々に含まれる AT 量を測定した。

その結果は第 2 図の如く、NaOH 溶液に比べて NH₄OH 溶液では明らかに溶離が不良であつた。NaOH 溶液の場合、0.2N では初めの 1 ml で 60% が溶出され、以後 7, 5, 2, 1% と減少した。0.1N の場合には最初の 1 ml で 58%、以後 7, 6, 2.5, 1.5% と減少し、第 1 回目の溶出では 0.2N の方が幾分高かつたが第 3 回目以後は寧ろ 0.1N の方が多いと思われる成績であつた。併しこの両者での差は明瞭ではなく、溶出液の

第2図 イオン交換樹脂からのATの溶出

増加に伴って回収された AT 量を積算すると, 0.1N NaOHの場合 1 ml では58, 2 ml で65, 3 ml で71, 4 ml で73.5, 5 ml で75となり, 0.2Nではそれぞれ60, 67, 72, 74, 75%となる. さらに溶出液量を増すならば当然回収率も上昇すると推定されるが, このクロマト

グラフィーは AT 溶液の精製のみならず濃縮の意味もあることから, 一応分離に有効な範囲は3 ml とみなした. また NaOH 溶液の濃度に関しては, 0.1Nおよび 0.2Nの間に明瞭な差がなかったことから 0.1Nを用いることにした.

2 Ethanol による抽出法

a. Ethanol 抽出と減圧乾固. 合成 AT 100 μ g を含む pH 5.5の豚血漿10ml に4容の ethanol を加えて数分間強く振盪後遠心し, 分離した上清を丸底フラスコに移し取り, 残渣には80% ethanol 20ml を加えて2回同様に操作し洗滌, 洗滌液は先の上清と混和しロータリーエバポレーターで減圧乾固した. これを一定量の蒸留水に溶解後生物検定した結果第1表の如く, AT の回収率は145%と添加量を遙に越えて検出され, AT を加えずに同様の操作を行なった対照においては, 最初に明瞭な降圧作用, 続いて強い昇圧効果が現われた. この方は Serobrovskaya らが用いた方法³⁾に類似しているが, 操作による人為的な昇圧, 降圧物質の存在も考えられた.

b. Ethanol 抽出とイオン交換クロマトグラフィー.

a 法と同様に血漿から AT を ethanol で抽出し減圧乾

第1表 ATの精製法と回収率

	Ethanolを用いる抽出法				Propanolを用いる抽出法				Butanolを用いる抽出法			
	操 作				操 作				操 作			
	血漿 ↓ 4容のC ₂ H ₅ OHを添加, 振盪後遠心 ↓ 変性蛋白質 ↓ 洗滌(80% C ₂ H ₅ OH 20ml, 2回) ↓ 減圧乾固後蒸留水に溶解 ↓ イオン交換カラム (Dowex 50W-X2) ↓ 樹脂の洗滌 (pH 6, phosphate 緩衝液) 蒸留水 ↓ 溶出(0.1N NaOH 3ml) ↓ 中 和 ↓ (a)				血漿 ↓ 4容のC ₃ H ₇ OHを添加, 振盪後遠心 ↓ 変性蛋白質 ↓ 洗滌(80% C ₃ H ₇ OH 20ml, 2回) ↓ 減圧乾固後蒸留水に溶解 ↓ イオン交換カラム (Dowex 50W-X2) ↓ 樹脂の洗滌 (phosphate 緩衝液) 蒸留水 ↓ 溶出(0.1N NaOH, 3ml) ↓ 中 和 ↓ (a)				血漿 ↓ pH 1.5となし, NaCl 5g 添加後 C ₄ H ₉ OH 10ml を加え振盪, 遠心 ↓ 変性蛋白質 ↓ 洗滌(C ₄ H ₉ OH 10ml, 5ml 各1回) ↓ C ₄ H ₉ OH抽出液に3容の石油エーテル 添加後蒸留水 抽出(20ml, 5ml 各1回) ↓ 減圧乾固後 蒸留水に溶解 ↓ pH 6に調節 ↓ イオン交換カラム (Dowex 50W-X2) ↓ 洗 滌 (phosphate 緩衝液) 蒸留水 ↓ 溶出(0.1N NaOH 3ml) ↓ 中 和 ↓ (a)			
AT添加量	0	100 μ g	0	100 μ g	0	100 μ g	0	100 μ g	0	100 μ g	0	100 μ g
検出量	50 $\pm$ 20	145 $\pm$ 20	20 $\pm$ 10	120 $\pm$ 15	30 $\pm$ 5	90	15	65	25 $\pm$ 10	110 $\pm$ 20	—	70 $\pm$ 15
降圧 (AT 相当量)	-15 $\pm$ 15	-10 $\pm$ 10	-15 $\pm$ 15	-10 $\pm$ 10	-10	—	—	—	-5 $\pm$ 5	-5 $\pm$ 5	—	—

±は範囲

固した残渣を少量の蒸留水に溶解, pH 6.0 phosphate 緩衝液で処理した Dowex 50 W-X 2 カラム (6 mm× 3.5 cm) に通し, 液の通過後 phosphate の緩衝液 3 ml, 続いて蒸留水 3 ml でこれを洗滌し, 0.1N NaOH 3 ml で溶出, 溶出液は BTB 溶液を pH 指示薬として 2N HCl で中和後生物検定した。

添加した AT の回収率は 120% となり, AT を混入していない対照にも降圧, 次いで昇圧作用が示された。この方法は Paladini らの旧法⁴⁾と類似しているが, 彼らも後に butanol 抽出などの操作を追加する改良を行なっている⁵⁾⁶⁾。

3 Propanol による抽出法

a. Propanol 抽出と減圧乾固. 前記の方法における ethanol 抽出を n-propanol 抽出に置き換えて行ってみた。即ち 100ng の合成 AT II を加えた豚血漿に 4 容の n-propanol を加えて振盪, 遠心分離した上清液およびその沈渣の洗滌液は混和し減圧乾固後蒸留水に溶解して生物検定した。AT の回収率は 90% であったが, 対照には依然降圧作用がみられた。

b. Propanol 抽出とイオン交換クロマトグラフィー血漿を n-propanol で処理, 抽出液を減圧乾固後蒸留水に溶解しイオン交換カラムクロマトグラフィーを行ない, 0.1N NaOH で溶出, 中和後生物検定した。添加した AT の回収率は 65% と低率になったが, 対照において降圧作用は認められず, また昇圧作用も比較的軽度で改善された。

4 Butanol による抽出法

Clark らは pH 1.5, NaCl 飽和の溶液から AT は n-butanol に定量的に抽出され, この butanol 抽出液に 3～4 倍量の ethyl ether を加えることにより AT を析出せうと報告している⁷⁾。われわれはこの方法を参照として抽出を試みた。

a. Butanol および水抽出と減圧乾固. 合成 AT II 100ng を加えた pH 1.5 の豚血漿 10ml に約 5 g の NaCl を加えて飽和させ, さらに 10ml の n-butanol を添加し 5 分間強く振盪後遠心, 分離した butanol 層を分液漏斗に移し, 残った下層は 10 ml および 5 ml の n-butanol で各 1 回同様に抽出を行なった。集めた butanol には約 75ml の petroleum ether および 20ml の蒸留水を加えて 5 分間振盪後数十分間放置, 分離した水層を丸底フラスコに移し, butanol-ether 層には 5 ml の蒸留水を加えて再び振盪抽出した。これらの水抽出液は混和後減圧乾固し, 少量の蒸留水に溶解, 生物検定した。添加した

AT の回収率は 110% で, 対照には降圧および昇圧作用がみられた。

b. Butanol および水抽出とイオン交換クロマトグラフィー. 先と同様に, n-butanol 抽出に続いて butanol-petroleum ether 層から蒸留水で逆抽出を行ない, この水抽出液の pH を 6.0 に調節後イオン交換樹脂カラムに通した。液の通過後 pH 6.0 の phosphate の緩衝液および蒸留水各 3 ml で洗滌し 0.1N NaOH 3 ml で溶出, これを中和後生物検定した。AT の回収率は 70% で, 対照には降圧および昇圧作用は殆んど認められなかった。

以上の結果から AT の抽出法としては, n-butanol 抽出, 水抽出, およびイオン交換クロマトグラフィーによる方法を採用した。この方法による回収率は 70±15% 程度の範囲に存したが, 対照における降圧, 昇圧作用が認められなかったからである。

5 Butanol 抽出, 水抽出, イオン交換クロマトグラフィー法を用いた場合の各種昇, 降圧物質の回収率

この精製法により抽出される有機物について考察するに, まず酸性で食塩飽和の状態における n-butanol 抽出では, peptides, amino acids, lipids, amines, phenols および carbohydrates などが一応抽出される可能性がある。併し次の butanol-ether 層から酸性の水層へ移行する

第 2 表 我々の AT 精製法による諸種昇, 降圧物質の回収率

	添加量	回収率 (%)	範囲 (%)
Synthetic Val ⁵ -AT II -amide	100ng	70	55~85
Lysine Vasopressin	0.2単位	8	
Norepinephrine	10μg	3	
Serotonin	50μg	29	
Histamine	100μg	42	

ものはかなり少なくなり, peptides や amino acids, amines, carbohydrates の一部, さらに pH 6.0 の陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーでは peptides, amino acids および amines に限定されるものと推測される。

そこで血圧に影響を与える amines や peptides の中の幾つか, 即ち第 2 表に示した 5 つの昇, 降圧物質についてこの方法ではどの程度回収されるかを検討した。Lysine-vasopressin, Noradrenalin の回収率は夫々 8 および 3% で問題にはならず, Serotonin および Histamine では 29, 42% とやや高率に回収されるが実際臨床的には血漿中の含量が極めて微量であることから, 前者同様 renin 活性測定時の誤差参与因子として取り上げる必要

第3表 諸種疾患患者の血漿 Renin 活性

■ 症 例	性	年 令	血 圧	血漿 Renin 活性 ($\mu\text{g/l/2hr}$)		病 名
				動 脈 血	静 脈 血	
1	♂	65	130～ 80	0.8～ 1.4	1.0～ 1.4	前 立 腺 肥 大 症
2	♂	68	120～ 68	0.9	0.6	〃
3	♂	61	134～ 84	2.4	1.8	神 經 因 性 膀 胱
4	♂	35	112～ 60	2.1～ 2.7	1.9～ 2.5	遊 走 腎
5	♀	43	118～ 60	1.2	1.6	〃
6	♀	35	130～ 80	0.6	0.6	〃
7	♂	27	116～ 77	1.6	1.6	〃
8	♀	54	132～ 88	0.7	0.7	〃
9	♂	23	160～ 95	2.5～ 2.7	2.5～ 2.7	糸 球 体 腎 炎
10	♀	59	148～ 90	1.3～ 1.7	1.6～ 2.2	左 腎 動 脈 瘤
11	♀	17	180～ 130	2.5～ 3.2	2.3	左 腎 腫 瘍
12	♀	37	160～ 100	1.4	1.4	遊 走 腎
13	♀	11	180～ 95	4.8～ 5.5	5.0～ 5.6	両 側 水 腎 症
14	♀	17	225～ 175	4.9～ 6.2	4.7～ 6.0	褐 色 細 胞 腫
15	♀	15	210～ 110	9.0～ 9.6	9.5～11.0	〃
16	♀	45	240～ 160	0.4～ 0.6	0.3～ 0.6	原 発 性 アルドステロン症

は認められない。

我々の血漿 renin 活性測定法

以上の実験、即ち第1報¹⁾ およびこの成績を根拠としてわれわれは血漿 renin 活性の測定を次の如き方法で行なっている。即ち heparin 溶液 (1,000単位/ml) 0.2 ml を混和し採取した血液20 ml 3,000 rpm で15分間遠心、分離した血漿10 ml に5% EDTA 溶液0.25ml および5% DFP isopropanol 溶液45 μ l を加え、2N HCl にてpH 5.5となした後37℃で振盪しながら incubate、2時間後に2N HCl でpHを 1.5に調節し、さらに約5 g の NaCl を加えて飽和させ、以下第1表の如く butanol 抽出、水抽出、イオン交換クロマトグラフィーの順に産生された AT を精製しその一部を rat の静脈内に注入、生起した昇圧効果から AT 量を判定しこれを renin 活性とした。

血漿に合成 AT II を混合後直ちに抽出を行ないその回収率を検討した結果55～85%、平均70%であつた。他方、われわれの測定法で臨床患者の血漿 renin 活性を測定した結果は第3表の如くで、正常は一応 2.5 $\mu\text{g/l/2hr}$ まで、3.0 $\mu\text{g/l/2hr}$ 以上を高値と判定しているが、同一試料について数回検定した成績をみると、症例1では動脈血 0.8～1.4、静脈血 1.0～1.4 $\mu\text{g/l/2hr}$ となり、測定値の差は 0.4～0.6 $\mu\text{g/l/2hr}$ であつた。また症例4においては動脈血 2.1～2.7、静脈血 1.9～2.5でその差

は 0.6 $\mu\text{g/l/2hr}$ 症例9では動脈血、静脈血ともに 2.5～2.7で差は 0.2 $\mu\text{g/l/2hr}$ 、となつている。併し renin 活性値が高くなるに従つて差も大きくなり、症例13での差は 0.6～0.7 $\mu\text{g/l/2hr}$ 、症例14では 1.3、症例15では 0.6～1.5 $\mu\text{g/l/2hr}$ であつた。故にわれわれの測定法における測定値の変動範囲は正常域値 2.5 $\mu\text{g/l/2hr}$ 以下では凡そ 0.6 $\mu\text{g/l/2hr}$ 、活性値が上昇するに従つて少しく増加し 10 $\mu\text{g/l/2hr}$ 付近では 1.5程度と推察された。

考 按

前報¹⁾に述べた如く、われわれの renin 活性測定法における AT の産生量は incubation の時間を2時間に制限しているため少なく、生物検定の際に十分な昇圧効果をうるためには AT の濃縮、精製を行なう必要がある。この操作を行なうについては Khairallah らのいう Vasopressor Lipid⁹⁾ の排除を考えるならば当然必要ともみなされるが、反面この操作に伴う回収率の影響が極めて重要な問題となる。

最近の諸家の報告のうち AT の精製操作を加えているものには、Yoshinaga ら⁹⁾、Warzinski ら¹⁰⁾、Boucher ら¹¹⁾、De Vitoら⁵⁾などの方法がある。このうち Warzinski ら、Yoshinaga らおよび De Vito らの方法はいずれも butanol による抽出操作を含むが、全体の操作は順次複雑になつており、回収率は Warzinski らの方法については記載なく、Yoshinagai らおよび De Vito らの方法

では夫々50および50~65%と報告されている。Boucherらの方法はイオン交換およびペーパークロマトグラフィーでATの精製を行なうものであるが、回収率は平均84%とかなり高い値が示されている。抽出操作を加える場合にはさらに Khairallah らが指摘している如く、操作自体による人為的な昇圧ないし降圧物質の生起に注意する必要がある¹²⁾。われわれの行なっている方法では対照をおいて検討した成績からこれらの因子は除外でき、抽出操作における合成ATの回収率は70%であった。

ここで諸家の血中 renin 測定方法と測定値を通覧する。これらの方法は incubation の際の AT ogen の使い方から2大別できるが、まず内因性の AT ogen のみを利用している方法では、Helmerの方法¹³⁾を簡便化し用いている Gunnells らは透析血漿をpH 5.5, 37°Cで1時間 incubate し、正常者の値は臥位で25~243ng/dl/hr, 平均105ng/dl/hr¹⁴⁾, Yoshinaga らは血漿をpH 5.5で2時間 incubation 後ATの抽出を行ない、生物検定の誤差±20%, 全操作での回収率30~35%, 正常値0~2.0 μg/l/2hr, 平均1.0 μg/l/2hrとしている⁹⁾。また Boucher らは血漿にイオン交換樹脂を加えpH 5.5で3時間 incubate, さらにクロマトグラフィーによる精製を行なつて、生物検定の精度は90%, ATの回収率84%, 正常値0~570ng/dl/3hrで平均154ng/dl/3hr¹¹⁾, DeVito らは血漿をpH 5.1で2時間 incubate した後抽出を行ない、生物検定の標準誤差は20%, 回収率50~65%で正常値は0.2以下~0.5 ng/ml/2hr⁵⁾, Pickens らは透析血漿をpH 5.5で4時間 incubate し、生物検定の誤差は±5% (S.D.), 全操作での回収率85%, 正常値6~50 ng/10ml/4hr, 平均26 ng/10ml/4hrと報告している²⁾。

Incubation 時間の長いものでは、Skinner は透析血漿をpH 7.5で incubate し、72時間までの3点で測定を行ない単位時間当りに換算し表現しているが、同一試料を反覆測定した場合の標準偏差は±14%, 正常値は0.7 ng/ml/hr 以上で平均1.7ng/ml/hrとし¹⁵⁾, Kaneko らは血漿をpH 5.5で24時間 incubate, 反覆測定した場合の差は平均10.7%, 回収率98%, 正常値は3~10 ng/ml/24hrで平均6.4ng/ml/24hrとしている¹⁶⁾。

一方 incubation の際に AT ogen を添加する方法では、Brown らは血漿からクロマトグラフィーを用いて renin を精製し、これに牛の AT ogen を加えてpH 5.7, 37°Cで incubate, 回収率は37%, 正常値は2~18 units/l で平均8.2 units/l¹⁷⁾, Gould らは透析した血清に豚の ATogen を添加しpH 7.5, 38°Cで16時間 incubate, 場合

によつては同時に AT ogen 含量を調べ一次反応速度の式を用いて renin 量を算出しているが、回収率は95.3%, 正常値は痕跡~ 2.6×10^{-4} Goldblatt units/ml¹⁸⁾, Hass らもこれとほぼ同様の方法で正常値は平均 0.96×10^{-4} Goldblatt units/ml としている¹⁹⁾。また Skinner は内因性の AT ogen を破壊後羊の AT ogen を加えpH 7.5, 37°Cで incubate した場合、正常値は4 units/ml 以上で平均9.1 units/ml と報告している¹⁵⁾。

以上の諸家の測定値を比較するために、一応われわれの方法の如く血漿1 l 当り、2時間 incubate した場合の量に換算してみると、われわれの0.6~2.5に対して Gunnells らの場合0.5~4.9で平均値は2.1, Yoshinaga らは0~2.0, 平均1.0, DeVito らは0~0.5, Boucher らは0~3.8, 平均1.0, Pickens ら0.3~2.5, 平均1.3, Kaneko らは0.2~0.8, 平均0.6, Skinner の場合は立位での値であるが1.4以上, 平均3.4となり、これらの上限値には幾分差がみられる。これには採血時の体位による差や日内変動, Na 摂取量による変化などの問題も存するが、主として AT ase 活性の抑制法, incubation の pH および時間, AT 抽出精製法の回収率, 生物検定の精度などの差によるものとみなされる。

そこで、まずこれらの成績を incubation pH から観察すると、換算値の最も小さかつた DeVito らはpH 5.1, その他はpH 5.5で行なつていた (Skinner の場合は立位での成績であるため一応除外)。われわれがpH 5.5で incubate している理由は既述の如く、renin 活性の至適 pH は5.5より高い領域にあると思われたが AT ase 活性の抑制がpH 6以上では不完全であるからである。次に pH 5.5で行なっている前記各方法の換算値を夫々が採用している incubation 時間から観察すると、1時間の場合は Gunnells らの0.5~4.9, 平均2.1, 2時間ではわれわれの0.6~2.5, Yoshinaga らの0~2.0, 平均1.0, 3時間は Boucher らの0~3.8, 平均1.0, 4時間は Pickens らの0.3~2.5, 平均1.3, 24時間は Kaneko らの0.2~0.8, 平均0.6となる。傾向としては incubation 時間が長くなるにつれて換算値は低くなり、また上下限の差も小さくなるが、これは酵素反応の一般的性質を考え合わせても incubation 時間は可能な範囲で短縮すべきであることを示唆するものと思われる。

Incubation 前後の諸操作についてみると、Gunnells ら, Skinner, Pickens らの如く incubation の前に透析を行なつて予め低分子物質を除去し、incubation 後にはあ

まり、操作を加えずに検定を行なう場合と、Yoshinagaら、Boucherら、DeVitoらの如く incubation 前の操作は少なくし、incubation 後に AT を精製する場合とに分けることができる。前者の場合、透析により incubation 溶液の組成は変化するがそれによつて renin の活性が影響される可能性があり、また incubation 中に AT 以外の昇圧乃至降圧物質が生じた場合でも検定にはそのままの溶液が用いられることになるが、後者の場合、AT 精製操作の回収率、被抽出物の選択性、人為的な昇、降圧物質の混入などの問題があり、夫々に長短は存するがわれわれは前述の実験成績に基づき後者を採用した。

AT ogen を添加して行なう測定法では夫々が用いている単位の基準が異なるために正確とはいえないが、一応比較の目安として単位時間当りの AT 産生量に換算してみると、Brown らの場合正常値は 1~9, 平均 4.2 $\mu\text{g/l/hr}$, Gould らは痕跡~4.9, 平均 1.2 $\mu\text{g/l/hr}$, Haas らは平均 2.7 $\mu\text{g/l/hr}$, Skinner は立位での平均 9.1 $\mu\text{g/l/hr}$ となり、かなりの差が認められる。勿論 Incubation pH 温度、回収率などに幾分の差は存在するとしても夫々が使用した AT ogen の相違が大きく影響しているものと思われ、単位を同一とする立場からは比較できないが、唯 AT 産生量に関しては内因性 AT ogen のみを利用する方法よりも多い。

このように renin の測定法は細くは種々の観点から分けうるが根本的には次の 2 つの点から分けられると考える。1 つは incubation の際の AT ogen の用い方から、また 1 つは測定結果の表現法において、Yoshinaga らや Boucher ら¹¹⁾ の如く単に一定条件下で incubate した後の AT 産生量を用いる場合、および Helmer¹³⁾, Gould ら¹⁸⁾, Imai ら²⁰⁾ の如く AT 産生量以外にその血漿の AT ogen 含量を測定し、これらを一次反応速度論から導かれる式

$$RK = \frac{1}{t} \ln \frac{A}{S-A}$$

但し A=AT 産生量, K=一次反応速度定数

R=renin 量, S=AT ogen 含量

t=incubation 時間

に導入し renin 量 (定数を含めて表現する場合もある) を求める場合であるが、これらのいずれに属するかでその方法が、血中に放出されている renin 量そのものの定量を目的としているのか、種々の因子を含めた血漿中での総合的な AT 産生能力の測定を目的とするのかに区別されると考える。

血中 renin 総量を測定するには、通常多量の精製 AT

ogen を試料に添加して incubate し、AT 産生速度の最大値を求めることによつて判定している。この場合、AT ogen が多量に存するから反応の零次で進行する範囲も延長し、incubation 時間を長くすることができるため使用血漿の少量化が可能になるとともに、試料中に renin に対する拮抗的反応阻害物質が存在するような場合でもその作用を阻止することができる。併しヒトの AT ogen を得るのは困難であるため他の動物の AT ogen を用いることになるが、この場合 AT ogen は単一な物質ではなく夫々 renin との反応性も異なるといわれており^{21)~24)}、従つて AT ogen を提供する個体および AT ogen の精製法の差異によつて測定結果が影響される可能性も推測される。唯、Hass らは対照として常に一定量のヒト renin を用い測定値を補正すれば、AT ogen の異質性による影響のみならずイオン強度や蛋白質濃度など反応系の組成の差異による影響も消去できると述べている¹⁹⁾。また前述の如く一次反応として扱い renin 量を算出する方法もあるが、renin-AT ogen の反応が一次とは確定していない以上²⁵⁾その意味については多少問題があるように思われる。

血漿中での総合的な AT 産生能力、即ち renin 活性を測定する方法は比較的簡便ではあるが、試料に混在する AT ase による AT の分解、AT ogen 含量と零次反応との関連、さらに血漿中に renin の反応阻害物質が存在する可能性などの問題も存する。第 1 の AT ase 活性については EDTA および DFP を各 3×10^{-3} , $1 \times 10^{-3} \text{M/l}$ の濃度に混合することによりほぼ満足できる程度の抑制が可能となり、血漿中の AT ogen 含量と零次反応との関連については AT 産生量を存在する AT ogen 量の $1/10$ 程度以下を目標とする根拠が明らかとなつた¹⁾。

血漿中の AT ogen 量に関する諸家の報告をみると、合成 AT 相当量として表わされた値であるが、正常者については Skinner は $1,110 \pm 300 \text{ng/ml}^{15)}$, Pickens らは $510 - 1,010 \text{ng/ml}^{12)}$, Gould ら $505 - 880 \text{ng/ml}^{18)}$, Maebashi ら $900 - 1,200 \text{ng/ml}^{26)}$ とし、疾患例では、Gould らが腹水を伴う肝硬変患者では存在が認められない場合もあると報じている如く¹⁸⁾、一般に肝疾患の存する場合は低値となつているが、その他の場合、諸種高血圧では Pickens らは $370 - 1,320 \text{ng/ml}^{12)}$, Aida らは $500 - 1,300 \text{ng/ml}^{27)}$, Gould らは $588 - 2,100 \text{ng/ml}^{13)}$, また妊娠婦人では Pickens らは $1930 - 3240 \text{ng/ml}^{12)}$, Gould らは $2230 - 3860 \text{ng/ml}^{18)}$ とかなり高い値が報告されている。以上の如くの AT ogen 量の下ではわれわれ

の方法による AT の産生は十分零次反応の範囲内で遂行されているものとみなされた。

血漿中に存在が推定されている renin の反応阻害物質については、肯定する報告^{2)11)28)~35)}と共に否定的な報告もみられ、いまだ確実な証明はなされていない。この他人為的なものとして Sealey らは heparin による反応阻害作用を報告しているが³⁸⁾, Skinner は20単位/ml 程度の使用では影響はないとし¹⁵⁾, Kaneko らも 100 単位/ml 以上では影響を認めるが40単位/ml 以下であれば問題はないとしている¹⁶⁾。また AT ase 活性の抑制剤として用いた EDTA および DFP には AT I が AT II へと変化する反応に関与する AT converting enzyme の活性阻害作用があるとの報告もみられるが³⁹⁾⁴⁰⁾, AT の検出をわれわれのような生物学的方法で行なう場合には一応問題はないと考える⁴¹⁾。

このように、renin の測定には夫々に種々の問題が付随するが、ここで重要な問題は測定 の 目標をいわゆる renin 量におくべきか、renin 活性におくべきかということであるが、これは換言すれば血中の AT 量は renin 量に比例するのがあるいは renin 活性に比例するのかわかると考える。この場合、各測定法に付随する種々の問題の中でも血漿中での反応阻害物質の存在の如何が1つの焦点となると思われるが、前述の如くその存在の確証は得られていない。故にわれわれはこのような反応阻害機構の有無に拘らず、産生 AT を反応の初速に近い状態においてとらえるのが妥当と考え、incubation 前の試料に加える操作はできるだけ少くし、また incubation 時間もできるだけ短縮することにした。

以上、われわれの renin 活性測定法の基礎的研究、手技などについて述べたが、renin 活性測定法には生物学的検定における AT 検出および精度の限界、採取しうる血液量の限度、AT 精製法の回収率などの問題のみならず、renin, ATase, converting enzyme などの酵素の本態は不明であり、さらに AT ogen も数種類報告されているなど本質的に解明するべき問題も多く、今後の研究に期待される。

結 語

以上、血漿 renin 活性測定の際の産生 AT の抽出精製法について検討し、第1報とを合わせてわれわれの血漿 renin 活性測定法となしたが、その内容を要約すると次の如くである。

1. 産生 AT の精製法. 種々のアルコールによる抽出、イオン交換クロマトグラフィーなどについて検討し

た結果、butanol および水抽出、イオン交換クロマトグラフィーによるのが最も良好と思われ、その方法による合成 AT の回収率は70%であつた。

2. われわれの血漿 renin 活性測定法と測定成績. Heparin 添加血漿10ml に EDTA および DFP を加え、pH 5.5, 37°C で2時間 incubation 後、butanol および水抽出、イオン交換クロマトグラフィーの順に産生 AT を精製、これを生物検定した。この方法を臨床患者に応用した結果、正常血圧者は概ね 0.6~2.5 μ g/l/2hr の範囲にあつた。

3. われわれの測定法に対する考察. 血漿 renin 活性の測定においては、できるだけ血漿の組成の変化を避けかつ incubation は短時間にすべきと考えられた。但しこの場合、AT 産生量の少いことが多いために精製濃縮を行なう必要がある。われわれの方法における試料の濃縮率は約3倍、回収率は70%で、これらの値は高いとはいえないが臨床的には充分応用可能と思われた。

文 献

- 1) 二川原和男, 寺山百合子, 館山松男, 瀬野俊治, 白岩康夫, 舟生富寿: 日泌尿会誌, **62**, 131, 1971.
- 2) Pickens, P.T., Bumpus, F.M., Lloyd, A.M., Smeby, R.R. and Page, I.H.: Circulation Res., **17**, 438, 1965.
- 3) Serobrovskaya, Yu. A., Vadakovskaya, Yu. D. and Dervova, I.E.: Terapevt. Arkh., **25**, 56, 1953.
- 4) Paladini, A.C., Braun-Menendez, E., Frade, I.S. and Massani, Z.M.: J. Lab. Clin. Med., **53**, 264, 1959.
- 5) Scornik, O.A. and Paladini, A.C.: Am. J. Physiol., **201**, 526, 1961.
- 6) De Vito, E. and Fasciolo, J.C.: Acta Physiol. Latino Am., **15**, 129, 1965.
- 7) Clark, L.C., Winkler, C., Gollan, F. and Fox, R.P.: J. Biol. Chem., **206**, 717, 1954.
- 8) Khairallah, P.H. and Page, I.H.: Am. J. Physiol., **199**, 341, 1960.
- 9) Yoshinaga, K., Aida, M., Maebashi, M., Sato, T., Abe, K. and Miwa, I.: Tohoku J. Exp. Med., **80**, 32, 1963.
- 10) Warzinski, R., Demirjian, Y. and Hoobler, S.: Canad. Med. Ass. J., **90**, 225, 1964.
- 11) Boucher, R., Veyrat, R., de Chanplain, J. and Genest, J.: Canad. Med. Ass. J., **25**, 194, 1964.
- 12) Khairallah, P.H. and Page, I.H.: Nature, **206**, 835, 1965.
- 13) Helmer, O.M. and Judson, W.E.: Circulation

- 27**, 1050, 1963.
- 14) Gunnells, J.C., Jr., Grim, C.E., Roginson, R.R. and Wildermann, N.M.: Arch. Intern. Med., **119**, 232, 1967.
- 15) Skinner, S.L.: Circulation Res., **20**, 391, 1967.
- 16) Kaneko, Y., Ikeda, T., Takeda, T. and Ueda, H.: J. Clin. Invest., **46**, 705, 1967.
- 17) Brown, J.J., Davis, D.L., Lever, A.F., Robertson, J.I.S. and Tree, M.: Biochem. J., **93**, 594, 1964.
- 18) Gould, A.B., Skeggs, L.T. and Kahn, J.R.: Lab. Invest., **15**, 1802, 1966.
- 19) Haas, E., Gould, A.B. and Goldblatt, H.: Lancet, **1**, 657, 1968.
- 20) Imai, M. and Sokabe, H.: Jap. Heart J., **8**, 607, 1967.
- 21) Skeggs, L.T., Lentz, K.E., Hochstrasser, H. and Kahn, J.R.: J. Exp. Med., **118**, 73, 1963.
- 22) Skeggs, L.T., Lentz, K.E., Hochstrasser, H. and Kahn, J.R.: Canad. Med. Ass. J., **90**, 185, 1964.
- 23) Skeggs, L.T., Lentz, K.E., Kahn, J.R. and Hochstrasser, H.: Circulation Res., **20—21** (suppl. II) 91, 1967.
- 24) Skeggs, L.T., Lentz, K.E., Kahn, J.R. and Hochstrasser, H.: J. Exp. Med., **128**, 13, 1968.
- 25) Hass, E. and Goldblatt, H.: Circulation Res., **20**, 45, 1967.
- 26) Maebashi, M., Yoshinaga, K., Aida, M., Okuyama, M. and Oikawa, A.: Tohoku J. Exp. Med., **85**, 299, 1965.
- 27) Aida, M., Maebashi, M., Yoshinaga, K. and Ichinohe, F.: Tohoku J. Exp. Med., **87**, 35, 1965.
- 28) Carrettero, O. and Gross, F.: Circulation Res. **20—21** (suppl. II) 115, 1967.
- 29) Montague, D.: Am. J. Physiol. **215**: 78, 1968.
- 30) Maebashi, M., Miura, Y. and Yoshinaga, K.: Lancet, **1**, 1408, 1968.
- 31) Sen, S., Smeby, R.R. and Bumpus, F.M.: Biochemistry, **6**, 1572, 1967.
- 32) Smeby, R.R., Sen, S. and Bumpus, F.M.: Circulation Res., **20—21** (suppl. II) 129, 1967.
- 33) Osmond, D.H., Levis, L.A., Smeby, R.R. and Bumpus, F.M.: J. Lab. Clin. Med., **73**, 795, 1969.
- 34) Sen, S., Smeby, R.R. and Bumpus, F.M.: Am. J. Physiol., **216**, 499, 1969.
- 35) Schaechtelin, G., Baechtold, N., Haefeli, L., Regoli, D., Gaudry-Paredes, A. and Peters, G.: Am. J. Physiol., **215**, 632, 1968.
- 36) Blaquier, P., Basso, N. and de la Riva, I.: Circulation Res., **20—21** (suppl. II), 109, 1967.
- 37) Bing, J.: Acta pathol. microbiol. scand., **75**, 33, 1969.
- 38) Sealey, J.E., Gerten, J.N., Ledingham, K.G. G. and Laragh, J.H.: J. Clin. Endocr., **27**, 699, 1967.
- 39) Page, I.H. and Bumpus, F.M.: Physiol. Rev., **41**, 331, 1961.
- 40) Gocke, D.J., Sherwood, L.M., Oppenhoff, I., Gerten, J. and Laragh, J.H.: J. Clin. Endocr., **28**, 1675, 1968.
- 41) NG, K. K.F. and Vane, J.R.: Nature, **218**, 144, 1968.

(1970年12月19日受付)