血漿レニン活性の固相法による RIA Kit の 基礎的検討と臨床的応用†

川添修身, 石澤 久*

聖マリアンナ医科大学東横病院放射線部, *同第一内科

211 神奈川県川崎市中原区小杉町3-435

1980年3月14日 受理

Key Words: antibody-coated tube, plasma renin activity RIA kit

1. はじめに

Plasma renin activity (PRA) の測定は高血圧症の病態, 予後判定に重要な意義をもっている。複雑な操作を伴う生物学的測定法^{1)~3)}に代わって1969年Haberら⁴⁾の RIA 法の導入以来いろいろの RIA-kit が市販されて PRA 測定は日常的検査となった。その後 Inagami⁵⁾, Dunn, Tannen^{6), 7)}, Laragh らの研究により低レニン性高血圧症の PRA 測定の重要性が広く認識されるに至ったが従来の RIA-kit は PRA 低値で測定不能, 高値で希釈が必要であり, また血漿 angiotensin I(ATI) と ¹²⁵I 標識 ATI の結合体, 非結合体の B/F 分離をシャープにするため Dextran-coated-charcoal (DCC) 法を用いていた。今回われわれはクリニカル・アッセイ社により開発された B/F 分離に「固相法」を用いるガンマ・コート PRA キットにつき検討する機会を得たので報告する。

2. 方 法

2.1 キットの組成

本キット (GammaCoat ¹²⁵I plasma renin activity kit: Ca-533) はチューブ内壁下部に抗 ATI 家兎血清をコーティングしてあるのでチューブ内の反応後, 液を吸引除去すれば容易に B/F 分離ができる。キットに含まれる試薬は Table 1 のとおりである。レニンは

pH5.5~6.0で活性が高く⁸⁾, またレニン基質からレニンにより産生する ATI は pH 7.3~7.4で最も安定⁹⁾であるため, 2種の buffer を検査目的に対応し ATI generation system では maleate (pH 6.0), phosphate (pH 7.4) の選択ができる。また ATI 変換酵素抑制には検体採血時の EDTA のみでは不十分なため phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を用いた。

Table 1 Components of kit (100 tubes)

Rabbit anti-angiotensin I serum coated tubes	100tubes
[¹²⁵ I] Angiotensin I tracer (37 kBq(1 μCi) /vial)	2 vials
Angiotensin I standards: 0.2, 0.8, 3.0, 10.0, 50.0 ng/ml	5 vials
Phenylmethylsulfonyl fluoride solution	1 vial
Maleate generation buffer solution	1 vial
Phosphate generation buffer solution	1 vial
Assay buffer concentrate	1 vial
3 Cycle semi-logarithmic graph paper	3 sheets

2.2 測定操作法

本キットの操作手順はFig. 1に示すとおりである。

2.3 PRA 値算出法

1 mlの検体を maleate buffer (pH 6.0) 0.1 ml および PMSF 0.01 ml で希釈したものを ATI generation のため4°C, 37°Cで90分間 incubate するので, 37°Cと4°C の検体0.1 ml濃度 (ng) の差に1.11/0.1×1/1.5=7.40 を乗じたものが求める PRA 値 (ng・ml⁻¹・hr⁻¹) である。検体を phosphate buffer (pH 7.4) で処理する場合 ATI generation を3時間行うのでその算出式は PRA(ng・ml⁻¹・hr⁻¹)=(ng at 37°C-ng at 4°C)×3.7

† Evaluation of Radioimmunoassay Kit Using Gamma-Coat Plasma Renin Activity. Osami KAWAZOE and Hisashi ISHIZAWA*: Department of Radiology, *First Department of Internal Medicine, Toyoko Hospital, St. Marianna Medical School, 3-435 Kosugi-cho, Nakahara-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken 211.

Fig. 1 Assay procedure of GammaCoat PRA kit.

となる。上記の計算式を用いない方法として、maleate buffer system および phosphate buffer system とともに、それぞれの 4°C ng ATI 値と 37°C ng ATI 値を専用計算尺、CA-953、レニンカリキュレータで直読する方法も実用可能である。

3. 成績および結果

3.1 標準曲線

本キットの flow chart にもとづき作成した標準曲線の一例を Fig. 2 に示す。横軸には standard ATI 濃度 (0.02, 0.08, 0.3, 1.0, 5.0 ATI ng/0.1ml) をとり、縦軸にはそれぞれの ATI 濃度に対応する反応後の ATI の bound count をプロットして sigmoid curve を作成する。統計学的なバラツキの少ない信頼度の高い標準曲線である。

Fig. 2 Standard curve of angiotensin I.

Table 2 Reproducibility of angiotensin I values by GammaCoat PRA kit

	Control I			Control II		
	n	M $\pm$ SD (ng $\cdot$ ml $^{-1}\cdot$ hr $^{-1}$)	CV (%)	n	M $\pm$ SD (ng $\cdot$ ml $^{-1}\cdot$ hr $^{-1}$)	CV (%)
Intraassay	5	2.32 $\pm$ 0.13	5.62	5	5.77 $\pm$ 0.18	3.16
Interassay	3	2.48 $\pm$ 0.15	5.86	3	6.36 $\pm$ 0.39	6.16

Day to day 1 week interval

3.2 再現性

市販のコントロール血漿2種を用いて maleate buffer system pH 6.0 generation で PRA 値を測定した結果を Table 2 に示す。用いたコントロール用血漿値の表示値は、control I: $2.26 \pm 0.44 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, control II: $6.33 \pm 0.92 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ で、intraassay, interassay ともに良好な結果を得た。

3.3 回収率

既知のプール血漿に standard 用 ATI 5種を添加し、それぞれの理論値および実測値 (三重測定) より回収率を求めた結果、平均回収率 101.2% を得た (Table 3)。

3.4 希釈試験

既知 ATI 1.24 ng/ml のプール血漿を 2, 4, 8 倍にておのおの四重測定をした結果を Table 4 に示す。

Table 3 Recovery test

Angiotensin I (ng/ml) $n=3$			Recovery (%)
Added	Calculated	Measured	
0.02	0.342	0.34	99.4
0.08	0.402	0.41	107.0
0.30	0.622	0.66	106.1
1.00	1.322	1.29	97.6
5.00	5.322	5.36	100.7
Recovery $M \pm SD$ (%)			101.2

Table 4 Sample dilution test

Dilution	$\times 2$	$\times 4$	$\times 8$
Original concentration 1.24	0.60	0.26	0.13
	0.58	0.30	0.10
	0.57	0.29	0.12
	0.58	0.28	0.12
$M \pm SD$	0.58 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.12 ± 0.01

(ng/ml)

3.5 臨床的検討

本キットの maleate buffer system を使用して, (i) 正常人30名について早朝安静臥位における PRA 値を測定した結果は $1.01 \pm 0.41 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$, (ii) 各種疾患について臥位の PRA 値を測定した結果は, 悪性高血圧症 (8名): 5.95 ± 2.74 , 腎性高血圧症で K^+ 欠乏のあるもの (6名): 3.86 ± 2.2 , 副腎髄質過形成 (8名): 0.92 ± 0.3 , 低レニン性高血圧症 (11名): 0.27 ± 0.12 , 原発性アルドステロン症およびその疑い (5

Fig. 4 Correlation between GammaCoat PRA kit and RENIN-RIAKIT.

名): 0.41 ± 0.17 , 本態性高血圧症 (12名): 0.84 ± 0.32 であった (Fig. 3)。

3.6 他キットとの比較検討

本キットとレニン・リアキット (ダイナボット社) と比較のため $n=15$ で assay した結果, 相関係数は 0.995, 回帰直線 $y=0.84x-0.02$ を得, 良好な相関を示した (Fig. 4)。

4. 総 括

GammaCoat ^{125}I plasma renin activity kit について基礎的検討を行った。まず, 本キットに含まれる2つの ATI generation buffer の pH を確認し, さらに標準曲線, 再現性, 回収率, 希釈試験の順で検討し良好

Subjects	n	0.1 1.0 10 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$M \pm SD$
Normal	30		1.01 ± 0.41
Malignant H	8		5.95 ± 2.74
K^+ deficient renal H	6		3.86 ± 2.20
Hyperplasia of adrenomedullar	8		0.92 ± 0.31
Low-renin H	11		0.27 ± 0.12
Primary aldosteronism or suspected	5		0.41 ± 0.17
Essential H	12		0.84 ± 0.32

Fig. 3 PRA values in normal or various diseases.

な結果を得た。

従来の方法では希釈せずに測定できる範囲が狭いのが悩みであったが本法の検量線である sigmoid curve はこの難点を解消する大きな長所を有する。また本キットの操作は従来の方法に比し、はるかに簡便で短時間ですむ。

われわれの実測試料の PRA 範囲は、 $0.09 \sim 32.23 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ で、これは測定範囲としては従来よりはるかに拡大されたと考える。

以上の結果から本法の利用によって PRA 値の測定はさらに簡素化され、一般日常検査法として普及していく可能性が高いと考える。

文 献

- 1) Helmer, O.M. and Judson, W.E.: *Circulation*, **27**, 1050 (1963)
- 2) Skinner, S.L.: *ibid.*, **27**, 391 (1967)
- 3) 木村武, 小田田宏, 仲本将人, 他: 岩手医学雑誌, **22**, 646 (1970)
- 4) Haber, E., Koerner, T., Page, L.B., Kliman, B. and Purnode, A.: *J. Clin. Endocrin.*, **29**, 1349 (1969)
- 5) Inagami, T., Murakami, K.: *J. Biol. Chem.*, **255** (9), 2978 (1977)
- 6) Dunn, M.J., Tannen, R.L.: *Kidney International*, **5**, 317 (1974)
- 7) Dunn, M.J., Tannen, R.L.: In Hypertension, 349, McGraw-Hill Book Comp., New York, (1977)
- 8) Laragh, J.H., Baer, R., Brunner, H.R., et al.: *Am. J. Med.*, **52**, 633 (1972)