

氏名(本籍)	三浦幸雄
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第632号
学位授与年月日	昭和45年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専門課程	東北大学大学院医学研究科 (博士課程)内科学系専攻
学位論文題目	Improved Method for Measurement of Renin Activity in Human Plasma (ヒト血漿レニン活性測定の改良法)

(主査)

論文審査委員 教授 鳥飼 龍生 教授 菊地 吾郎
教授 中村 隆

論 文 内 容 要 旨

序 論

1898年Tiegerstedtにより腎性昇圧物質として発見されたreninは、1934年Goldblattが腎血管性高血圧犬の作成に成功したことを契機に、改めてその高血圧の成因的意義をめぐり注目を集めた。PageやBraun-Menéndezらはreninがそれ自体では昇圧活性をもたない酵素であり、昇圧活性を示すのはその酵素作用によつて生成されるangiotensinであることを明らかにしたが、更にこのpeptideのaldosterone分泌刺激作用が解明されるに及び、これら一連の物質は生体のhomeostasisに關与する調節系、即ちrenin-angiotensin-aldosterone系(以下RAA系)として、その動態が追究されるようになった。他方、この間に臨床的研究も急速に進展し、原発性aldosterone症、腎血管性高血圧、悪性高血圧およびその他の続発性aldosterone症の病態生理に対するRAA系の病因的關与が明らかにされ、これらの疾病の研究や臨床に、RAA系全体の正確な把握が重要視されるようになった。その中で、血漿renin活性(以下PRA)の測定は比較的早期に実用化され、現在まで多数の方法が開発されている。その測定法の原理はangiotensinaseを非働化した特定の条件下で一定量の血漿中のreninとrenin基質とを反応させ、一定時間内に生成されるangiotensinの生物学的活性を検定する方法である。しかし、現行の測定法の中で、臨床的に適した標準的な方法は未だ存在していない。そこで私はできるだけ自然に近い条件下で、正確に、しかも簡易に実施でき、感度が高く、特に正常以下の低値も測定できるPRA測定法の確立を試みた。

方 法

(1) 試料の調整：ヘパリン加血液を遠沈し、分離した血漿をdeep freezer内に凍結保存した。測定時には、血漿を溶解させ、その2.0～3.0 mlを遠沈管(15 ml)に採り、その1/10容量の1M acetate buffer (pH 5.5)と、angiotensinase非働化のため2～3滴の6.7% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)と2～3滴の5% diisopropyl fluorophosphate (DFP)、および静菌剤として5% Fradiomycinの1滴とを加え、1-2N HClでpH 5.5に調整した後、37.5℃で16時間incubateした。(2) 抽出精製：incubation終了後、2容量の生食を加え、pH 5.5に調整した後5～10分間煮沸し、冷却後遠沈して上清を分離した。沈渣には更に生食を加え、遠沈して上清を分離し、これらの上清を併せて2N HClでpH 1.0～1.5に調整し、Dowex 50W×4(200-400 mesh, H⁺型)のガラスカラムで濾した。次いで、0.2M acetate buffer (pH 6.0)でカラムをpH 6.0に平衡させ、3.0 mlの水で洗滌した後、3.0 mlの0.1N NaOHでangiotensinを溶出し、溶出液をpH 7.0に調整して、deep freezer内に保存した。(3) 生物学的検定：溶出液中のangiotensin量をpentobarbital麻酔、atropin, hexamethonium bromide投与ラットにおける昇圧反応により検定した。

方法に対する検討

(1) Renin-renin 基質反応に対する pH, EDTA および DFP の影響: 血漿を種々の pH (4.5~7.4) に調整し, EDTA 単独または EDTA と DFP とを加えた際の angiotensin 生成量と angiotensinase の非働化率を検討した。Angiotensin 生成量は pH 5.5 で EDTA と DFP とを加えた場合に最大であつた。Angiotensinase の非働化率は血漿に合成 angiotensin (Hypertensin, 25 ng/ml) を加え, その回収率から算定比較したが, pH 5.5 で EDTA と DFP とを加えた場合に最大 (96%) であつた。(2) Angiotensin 生成の時間的経過: angiotensin 生成量は経時的に増加し, incubation 中に起る活性低下は無視できる量 (5% 以下) であつた。(3) 回収率と再現性: 血漿に加えた合成 angiotensin の回収率は 84~98% (6 例の平均 92 ± 5.3 (SD) %), 同一血漿を 5 回測定した平均値は 16.4 ± 0.66 (SD) ng/ml であつた。(4) 測定法の特異性: 本法で抽出された物質は chymotrypsin と incubate すると容易に失活し, そのラットにおける昇圧反応曲線は合成 angiotensin のそれと同型であり, 血漿中での生成条件は renin-renin 基質反応の生化学的性状に一致した。本法では血中の catecholamine や Arneil 因子は抽出されず, bradykinin 様活性は 1~4% 抽出されたが, ラットの血圧には影響しなかつた。

各種高血圧および正常人における PRA

検索対象は普通食を摂り, 未治療の各種高血圧例および正常対照例で, 早朝臥位での末梢静脈血について測定した。PRA は incubation 中に生成された angiotensin の量で表現した。正常人 (30 例) の PRA は $3.0 \sim 17.0$ ng/ml 血漿 (平均 7.9 ± 4.7 (SD) ng/ml)。本態性高血圧 21 例中 19 例では正常範囲内 (平均 7.5 ng/ml) にあり, 他の 2 例は軽度上昇を示した。腎血管性高血圧例中, 片側腎動脈狭窄例 6 例では明らかな上昇 ($20 \sim 84$ ng/ml) を示し, 両側狭窄例 1 例では正常値を示した。大動脈縮窄例と悪性高血圧例では著明な上昇を示した。一方, 原発性 aldosterone 症 (3 例) では正常以下の低値であることが確認された。

考 案

1. 血漿 renin 濃度の直接的測定法は現在実用化されておらず, renin の酵素反応で生成される angiotensin を測定する間接法が一般的である。しかし間接法においては, 現在方法論上以下の諸点が問題になつている。(1) 間接法で測定感度を高めるためには, angiotensinase の非働化が最も重要であるが, 現行の方法では必ずしも完全ではない。更にその操作は renin 自体の反応に影響する可能性がある。(2) PRA が血漿 renin 濃度を正確に反映するためには, renin の酵素反応が零次反応で進むように充分量の基質が必要である。通常, 血漿中には充分量の基質が含まれているが, 肝硬変などで減少している場合には補充する必要がある。(3) その他, 現行の測定法で実施上問題になる諸点について言及した。

2. 著者の PRA 測定法の主な改良点は次の諸点である。(1) incubation 時間を延長することにより, 測定に要する血漿量を節減し, angiotensin の濃縮過程を省略した。(2) EDTA と DFP とを血漿に直接添加し, 透析操作を省略した。(3) 簡易な抽出精製操作により, 生物学的検定に支障となる EDTA や他の生物活性物質を除去し, 測定の特異性を向上させた。(4) 操作を簡略化すると共に, 回収率を高め, 再現性を保ち, 高感度で正常値以下の低値をも測定可能にした。

結 語

PRA 測定法の改良を検討した。改良法は比較的簡易に実施でき臨床上有用と思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

血漿 renin 活性(以下 PRA)の測定は、原発性ならびに続発性 aldosterone 症の診断上に重要な意義を有する。しかし現在行なわれている PRA 測定法は、あるものは感度が低く、他のものは極めて煩雑で、いずれも実用上に難点が多い。そこで著者は、簡易に実施でき、しかも感度が高く、とくに正常以下の低値をも正確に測定できる PRA 測定法の開発を試みた。

方法：血漿 2.0 ~ 3.0 ml に、angiotensinase inhibitor として ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) と diisopropyl fluorophosphate (DFP), また 拮菌剤として Fradiomycin を加え、pH 5.5, 37.5°C で、16 時間 incubate し、この間に生成された angiotensin を Dowex-resin の column chromatography により精製した後、ラットにおける昇圧効果により検定した。

結果：I この方法について検討した結果、(1) angiotensin 生成量は pH 5.5 で EDTA と DFP とを加えた場合に最大となり、angiotensinase 非働化率も最高 (92 ± 5.3 (SD) %) であることを認めた。生成された angiotensin は全操作を通じて安定であり、十分な再現性を示した。(2) 本法で抽出精製された物質の生成条件は renin-renin 基質反応の生化学的性状に一致し、その活性は angiotensin の生化学的・生物学的性質に合致した。

II 本法により正常人および各種高血圧における臥位の末梢静脈血 PRA を測定した結果では、正常値は 3.0 ~ 17.0 ng/ml で、本態性高血圧および慢性糸球体腎炎や慢性腎不全例では、大部分正常範囲にあり、腎血管性高血圧では、片側狭窄例で高値を、両側狭窄例で正常値を示し、大動脈縮窄や悪性高血圧例では著明な上昇を示した。これらに対して、原発性 aldosterone 症では正常以下の低値を示した。

考按：I 血中 renin 濃度の測定は、直接法が未だ実用化されておらず、in vitro で renin の酵素反応により生成される angiotensin を測定する間接法が現在一般的である。後者では方法論上、PRA が血中 renin 濃度を正確に反映するためには、angiotensinase の非働化、renin 基質量および反応条件についての検討が最も重要であり、更に実施上操作が簡便でかつ高感度で再現性に優れていることが望ましい。

II 著者は従来の測定法を検討し、次の諸点を改良した。(1) incubation 時間を延長することにより、測定に要する血漿量を節減し、angiotensin の濃縮操作を省略した。(2) angiotensinase inhibitor として EDTA と DFP とを直接血漿に加え、透析操作を省略した。(3) 簡易な抽出精製操作により、測定の特異性を向上させた。(4) 再現性を保ち、高感度で正常以下の低値をも測定可能にした。

以上、この論文は PRA 測定法に検討を加え、比較的簡易に実施でき、高感度で、広範な臨床研究上の目的に有用な方法を開発したもので、学位に値するものと認める。