



Title	ヒトレニンの直接ラジオイムノアッセイに関する研究
Author(s)	檜垣, 實男
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34918
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	ひ 檜	がき 垣	じつ 實	お 男
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6707	号	
学位授与の日付	昭和60年2月26日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	ヒトレニンの直接ラジオイムノアッセイに関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 熊原 雄一			
	(副査) 教授 園田 孝夫 教授 宮井 潔			

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

生体の強力な昇圧酵素であるレニンの測定は高血圧の研究上極めて重要であるが、ヒトレニンの精製が困難なことより直接ラジオイムノアッセイ(RIA)法が開発されておらず、測定はレニン活性によって行われている。しかしレニン活性測定法は測定条件などに問題があり、レニンそのものの血行動態を把握するためには直接RIA法の開発が必要である。ヒトレニン簡易精製法の確立とそれをを用いた直接RIA法の確立は、レニン動態の研究に新しい方法を提供し、高血圧症をはじめ各種疾患におけるレニン-アンジオテンシン系の解明に有用である。

(方 法)

(1) ヒトレニン精製法：ヒトレニン精製は独自に開発した簡易精製法によって行った。すなわちヒトレニンの粗抽出物であるハースレニン49gを0.2M Na acetate buffer pH 6.5, 1M NaCl, 0.2mM DFPに溶解し、ペプスタチンアミノヘキシルアガロースを担体とするアフィニティカラムにかけたのち、結合したレニンを0.15M Tris-acetate buffer pH 7.5により溶出した。この分画を25mM Imidazole buffer pH 6.5 に対して透析後クロマトフォーカシングカラムにかけ、ポリバッファー・74pH 4.0を流すことにより、pH 5.5~4.5の間にレニン活性の高い分画が溶出された。さらに溶出されたレニンをウルトロジェル AcA 44カラムにかけると、レニンは分子量40,000の位置に溶出された。次にこの分画を0.02M Na-phosphate buffer pH 6.2に対し透析後、DEAEセルロースカラムにかけ、NaClによるグラジェントを用いてレニンを溶出した。レニンは2つのピーク(Peak I, II)に溶出されるが比活性のより高いpeak IIレニンを生化学的検定および直接RIA法に用いた。

(2) 直接RIA法：上記精製法によって得られたヒトレニンを家兎に免疫することにより30,000倍希釈で使用可能な抗ヒトレニン抗体を得た。直接RIAは200 μ lの検体血漿に100 μ lの抗ヒトレニン抗体を加え、4°C、24時間放置後、クロラミンT法で標識した P^{25} -レニン100 μ lを加え、さらに4°C、24時間放置するdelayed tracer addition法を用いた。その後抗家兎ヒツジIgGを加えたB/F分離を行い、抗体結合レニンの放射活性を γ -シンチレーションカウンターにより測定した。さらに新しく開発されたレニン直接RIA法を用い基礎的検討を行うとともに正常人および各種患者でのレニン濃度の測定を行い、従来のレニン活性測定法との比較検討を行った。

(結 果)

- (1) ヒトレニン精製：既述4段階のカラム操作により1.3 mgの純粹レニンを得た。精製されたレニンはSDS電気泳動法により分子量40,000の位置にピークを示し、等電点は5.6。比活性940 Goldblatt unit/mg 蛋白最終精製倍率は480,000倍、収率28%であった。
- (2) 直接RIA法：新しく開発したRIA法によりレニン濃度0.2から8.0 ng/mlに渡り良好な標準曲線が得られた。本法によるレニンの最小測定感度は40pg (1 femtomole)であり低レニン血漿に対しても十分臨床応用可能である。また使用した抗レニン抗体はカテプシンD、トリプシン、およびマウス、イヌ、ブタレニンと交叉せず、ヒトレニンに特異的であった。直接RIA法によるレニン濃度と従来のレニン活性測定法による値を比較すると、直接RIA法によるレニン濃度はトリプシン活性化による総レニン活性とよく相関 ($r=0.78, P<0.01$)し、血漿レニン活性とも弱い相関 ($r=0.44, P<0.001$)がみられた。また正常人において直接RIA法によるレニン濃度は立位一時間、フロセミド静注後立位一時間のレニン分泌刺激に対して上昇を示した。正常人のレニン濃度は0.7~1.7 ng/mlであったが、この値は本態性高血圧患者のレニン濃度(0.8~1.9 ng/ml)と有意差を認めなかった。また各種疾患でのレニン濃度は、腎血管性高血圧(1.6~2.7 ng/ml)、悪性高血圧(28, 34 ng/ml)およびバーター症候群(18, 25 ng/ml)で高く、原発性アルドステロン症では低値(0.4~0.8)を示した。

(総 括)

- (1) ヒトレニンの簡易精製法を開発し、これを用いてレニンの精製を行い、ヒトレニンの直接RIA法を確立した。
- (2) 本測定法は感度が良く臨床応用可能であり、本法によるレニン濃度測定結果は従来のレニン活性測定法による結果とよく一致した。
- (3) 本研究は高血圧症および各種疾患でのレニン-アンジオテンシン系の解明に有用な手段を提供するものである。

論文の審査結果の要旨

生体の強力な昇圧酵素であるレニンの測定は高血圧の研究上極めて重要であるが、ヒトレニン精製が困難なことから直接ラジオイムノアッセイ法(直接RIA法)が開発されておらず、測定はレニン活性測

定法によって行なわれている。しかしレニンそのものの血行動態を把握するには直接RIA法の開発が必要である。この目的のため、まずヒトレニン精製法を開発し、次に得られたレニンを用いた直接RIA法を確立し、その基礎的検討を行なった。

(レニン精製法)

ハースレニンを材料として用い、ペプスタチンカラムを中心とする4段階のカラム操作で純粋ヒトレニン1.3 mgを得た。ヒトレニンの性状は分子量40,000, 等電点5.6, 比活性940 Goldblatt unit/mg 蛋白であった。

(直接RIA法)

精製レニンを用いて抗体を作成、ヒトレニンの直接RIA系を確立した。最小測定感度は40pg(1fmole)でヒトレニンに特異的であり、本抗体は活性型、不活性型レニン双方を認識し、臨床測定値は総レニン活性と相関した。健常人ではフロセミド負荷によりレニンRIA値は上昇、生食水負荷では不変であった。本系は原発性アルドステロン症、腎血管高血圧など低レニン、高レニン疾患の診断に有用であった。

本測定系の確立はレニン-アンジオテンシン系解明に新たな手段を提供し、臨床上新しい知見を得るなど、有意義な研究と思われる。