Falsely Elevated Plasma Aldosterone Concentration by Direct Radioimmunoassay in Chronic Renal Failure

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8071

金沢大学十全医学会雑誌　第97巻　第5号　1020－1031（1988）

慢性腎不全における血漿アルドステロン濃度測定に関する研究
－ラジオイムノアッセイの問題点について－

金沢大学医学部内科学第二講座（主任：竹田亮祐教授）
越　田　英　夫

（昭和63年10月28日受付）

慢性腎不全において，血漿アルドステロン濃度（plasma aldosterone concentration, PAC）のラジオイムノアッセイ（radioimmunoassay, RIA）の妥当性について，3種の直接法 RIA キットを用いて検討した．正常腎機能者の血漿では，いずれのキットによっても，ジクロロメタン抽出操作を加えて測定した PAC と直接法 RIA による PAC はほぼ一致したが，血液透析中および非透析慢性腎不全患者の血漿では，3種のキットともジクロロメタン抽出操作を加えた PAC は，直接法 RIA に比し有意に低値を示した．血漿を Sep-pak C_{18} カートリッジで抽出し，逆相高速液体クロマトグラフィーで分取後各キットで RIA を行った．正常腎機能者では，アルドステロン以外の分画にアルドステロン様免疫活性は認めなかったが，血液透析中および非透析慢性腎不全患者では，3種のキットともアルドステロンよりも極性分画に強い免疫活性を，また極性の低い分画に若干の免疫活性を認めた．非血液透析慢性腎不全患者の血漿中の極性アルドステロン様免疫活性と，血清クレアチニン濃度は正相関を示した．以上の結果より，血液透析中および非透析慢性腎不全患者の血漿中には，腎機能の低下と共に増加する極性アルドステロン様免疫活性物質と，極性の低いアルドステロン様免疫活性物質が存在し，これらにより PAC は異常高値を示すものと推察された．従って，慢性腎不全患者の PAC 測定に際しては，抽出操作およびクロマトグラフィー操作後，RIA を行う必要があると結論された．

Key words　aldosterone, chronic renal failure, radioimmunoassay

アルドステロンは副腎皮質球状層から分泌される最も強力な鉱質コルチコイドであり，生体の水，電解質平衡の重要な調節因子として病態生理学的にも各種浮腫，高血圧，腎および内分泌疾患における役割について非常に多くの研究がなされてきた[1)2)]．

しかし，その測定は当初尿についてのみ行われ，バイオアッセイ[3)]，ブルーテトラゾリウム[4)]を用いる比色法といった感度，特異性とも不良な測定方法であったが二重標識誘導体法[5)]によりはじめて血漿濃度の測定が可能となった．しかし，本法は頻回にペーパークロマトグラフィーを必要とし，極めて繁雑な測定方法であったため普及しなかった．ステロイドホルモンのラジオイムノアッセイ（radioimmunoassay, RIA）の開発[5)]に伴い，Mayes ら[7)]および Bayard ら[8)]によって初めて血漿アルドステロン濃度（plasma aldosterone concentration, PAC）の RIA が確立され，簡便で高感度な血漿濃度の測定が可能となった．その後も多くの改良が重ねられ極めて良質な抗アルドステロン抗体が作製され，これにより今日ではクロマトグラフィー，抽出操作ともに必要としない直接測定法による RIA キット[9)~13)]が一般化し，日常臨床の場で PAC 測定に広く用いられるに至っている．しかし，これらの直接測定法による RIA キットは，主として正常者の血漿を対象として確立された測定法であり，個々の病態においてその妥当性は検討されていない．事実酵素欠損症の一部の症例[14)]，および慢性腎不全患者，特に血液透析中の患者では PAC は異常高値を示す症例が見られるため，直接測定法 RIA キットによ

Abbreviations: HPLC, high-pressure liquid chromatography; PAC, plasma aldosterone concentration; RIA, radioimmunoassay.

る PAC 測定の基礎的検討と慢性腎不全患者の血漿における測定上の問題点について検討した．

対象および方法

I．対　象

20才から70才（平均年齢53.9才）の正常腎機能者82名，血液透析療法を行っている25才から73才（平均年齢50.8才）の慢性腎不全患者60名（透析直前の平均血清クレアチニン濃度 12.3mg/dl），および血液透析を行っていない24才から68才（平均年齢52.6才）の慢性腎不全患者55名（平均血清クレアチニン濃度 3.6mg/dl）から得た血漿を対象として以下の実験を行った．血液透析中の慢性腎不全患者は，週２～３回，１回４～６時間の透析を，少なくとも６ケ月間受けている．血液透析中および非透析の慢性腎不全患者の病因は，慢性糸球体腎炎，慢性腎う腎炎，糖尿病性腎症，閉塞性尿路疾患，多発性嚢胞腎などであり，これらの疾患は両群間でほぼ同数に認められた．採血は臥位にて午前８時から11時の間にヘパリン添加採血管で行い，速やかに遠心分離後，測定まで－20°Cに凍結保存した．血液透析中の慢性腎不全患者では透析直前に採血をおこなった．

II．方　法

Aldosterone RIA kit II[11]（ダイナボット社，東京；ロット ZALZ36, 38, AALZ04, ,06; キットA），Aldosterone kit[13]（Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA；ロット 124, 144；キットB），および Aldosterone test Shionogi[12]（塩野義製薬，大阪；ロット WN02; キットC）の３種の市販 PAC 測定用直接法 RIA キットを使用した．いずれのキットも標識核種として ^{125}I を使用している．キットAの手技は，標識アルドステロン，各サンプルにアルドステロン-３-オキシム-ウシ-γ-グロブリンに対する第一抗体を加え，20～30°Cで２時間インキュベート後，ポリエチレングリコール添加第２抗体で B/F 分離を，キットBは固相法で標識アルドステロン，各サンプルをアルドステロン-３-カルボキシメチル-オキシム-ウシ血清アルブミンに対する抗体を吸着させたポリプロピレンチューブに加え，37°Cで３時間インキュベート後，固相化抗体に結合した放射能を測定した．キットCも２抗体法で，標識アルドステロン，各サンプルに６α-ヘミコハク酸-ウシ血清アルブミンに対する第一抗体とで，４°Cで16～24時間インキュベート後，第二抗体で B/F 分離を行う．測定感度はキットA，B，Cで各々 10.5, 13.2, 14.5pg/ml であった．これら３種のキットを用いて以下の実験を行った．

１．直接法とジクロロメタン抽出法の比較

ジクロロメタンによる抽出操作を加えることにより，PAC が変化するか否かを検討した．すなわち，３群の各血漿１ml にジクロロメタン５ml を加え試験管で２分間激しく攪汨した後，ジクロロメタン層を N_2 気流下で乾固しこれを各キットの 0 pg/ml の標準液

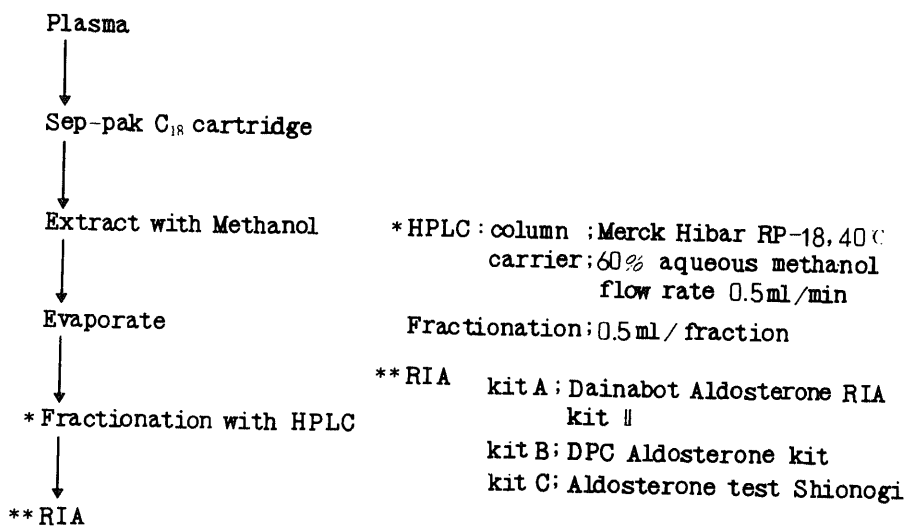

Fig. 1. Procedure of experiment 2 for the study of RIA of aldosterone combined with HPLC.

に再溶解し，PAC 測定を各キットの使用法に従って二重測定を行った．この値と無抽出で各キット測定法に従って二重測定で行った PAC を比較した．

2．高速液体クロマトグラフィーによる検討(図1)

各群から無作為に選んだ2例の血漿（0.1～0.5ml）を，メタノール2ml 次いで蒸留水5ml であらかじめ前処置した Sep-pak C_{18} カートリッジ（Warers, Milford, MA）に吸着させ，蒸留水5ml で洗浄後メタノール3ml で抽出した．抽出溶液を乾固後，高速液体クロマトグラフィー（high-pressure liquid chromatography, HPLC）に注入し1分間ずつ分取し，各分画を乾固後各キットの0pg/ml 標準液で溶解し，各キットで RIA を行った（HPLC-RIA）．予備実験で，試料注入後20分以降は全くアルドステロン様免疫活性は検出されなかったので，20分までのみ分画採取した．HPLC には，LC-5A 型ポンプ（島津，京都），FRAC-100 型フラクション・コレクター（Pharmacia, Uppsala, Sweden），カラムは Hibar RP-18（4×250mm；粒径5μm，E. Merck, Darmstadt, F. R. G.）を使用した．移動相はメタノール/水＝3/2（v/v）で流速は0.5ml/分，カラム温度は40°Cで行った．溶媒はすべて液体クロマトグラフィー用（和光，大阪）を用いた．また，同様な方法で血液透析中および非透析慢性腎不全患者の血漿各4例について HPLC-RIA で PAC を測定した（ただし，RIA はキットAのみ使用した）．

3．腎機能との関係についての検討

非透析慢性腎不全患者の血漿を対象として，実験2と同様の方法で，血漿を Sep-pak C_{18} カートリッジで抽出後，HPLC で分離した各分画を RIA に供した．このうち極性アルドステロン様免疫活性分画と血清クレアチニン濃度との関係を検討した．

同一血漿を直接法，ジクロロメタン抽出法および HPLC 法で測定する場合，測定間誤差を避けるため同一測定内で行った．直接法ジクロロメタン抽出法および HPLC 法での測定内，測定間誤差は総て10％以下であった．ジクロロメタン抽出法，HPLC 法の回収率は各々，99.4±0.7％（±SD），79.5±7.2％であった．

Ⅲ．統計学的検定

測定値はすべて mean±SEM で示した．統計学的検定は，paired Student's t-test，および Spearman's rank correlation test により行った．

成　　績

Ⅰ．直接法とジクロロメタン抽出法の比較

正常腎機能者では，いずれのキットを用いても直接法，ジクロロメタン抽出法による PAC に有意差を認めなかった（図2）．直接法，ジクロロメタン抽出法による PAC は，キットAでは，172.3±15.7，171.8±15.5pg/ml，キットBでは，150.2±13.3，148.0±13.2pg/ml，キットCでは，164.9±15.2，161.3±14.9pg/mlであった．また，いずれのキットによって

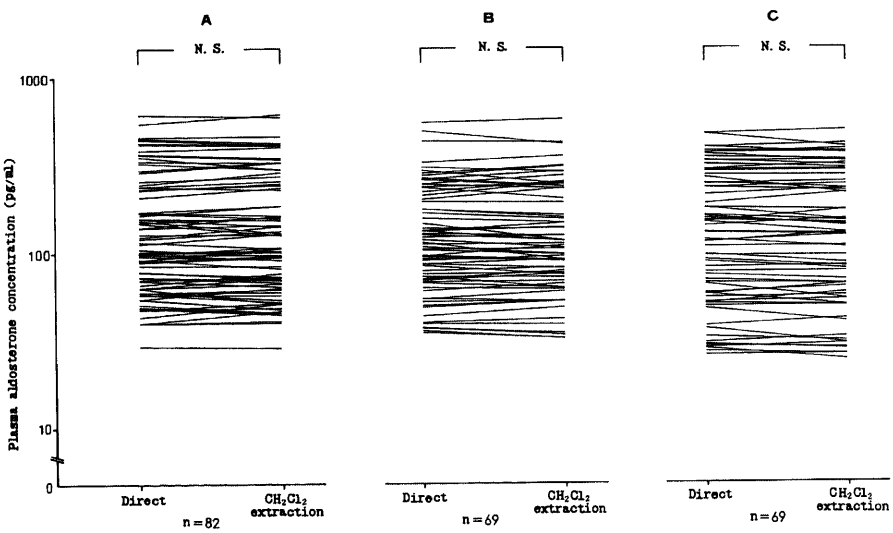

Fig. 2. Comparison of plasma aldosterone concentrations between direct and CH_2Cl_2 extraction methods by 3 different RIA kits (A, B, and C) in normal subjects.

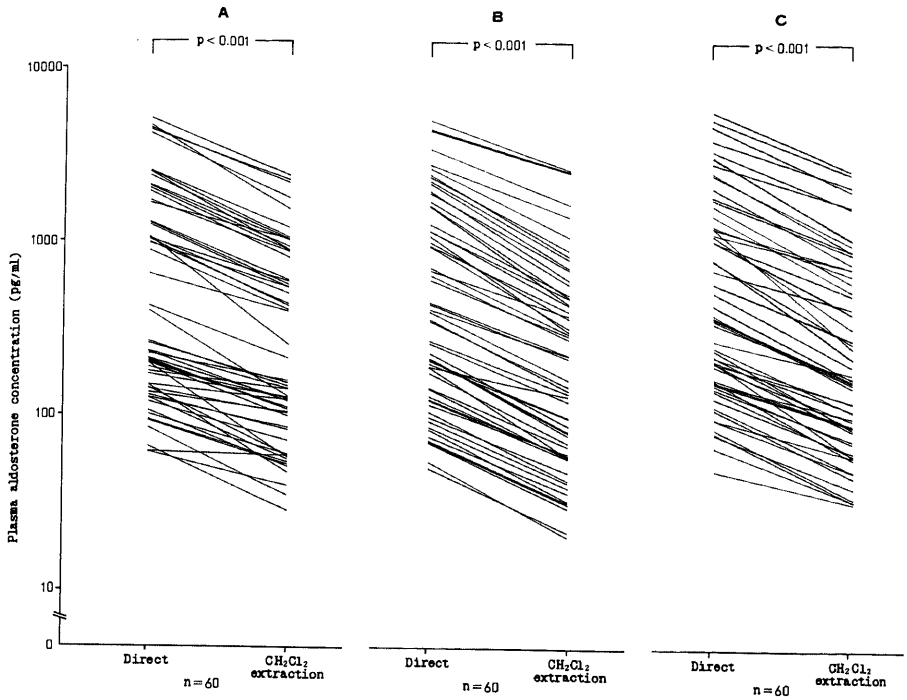

Fig. 3. Comparison of plasma aldosterone concentrations between direct and CH_2Cl_2 extraction methods by 3 different RIA kits (A, B, and C) in patients with chronic renal failure on hemodialysis.

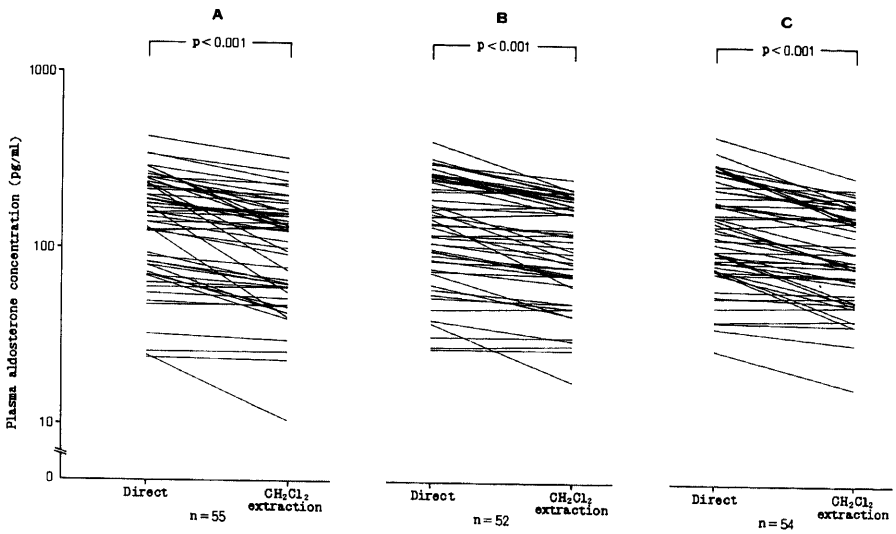

Fig. 4. Comparison of plasma aldosterone concentrations between direct and CH_2Cl_2 extraction methods by 3 different RIA kits (A, B, and C) in chronic renal failure without hemodialysis.

も直接法，ジクロロメタン抽出法による PAC は互いに強い正相関を示した．キットAでは，r＝0.988（p<0.001），キットBでは，r＝0.989（p<0.001），キットCでは，r＝0.994（p<0.001）であった．これに対し，血液透析中の慢性腎不全患者ではいずれのキットでも，直接法に対し，ジクロロメタン抽出法により PAC は有意に低値を示した（図3）．直接法，ジクロロメタン抽出法による PAC は，順に，995.7±159.8，485.1±77.7pg/ml（p<0.001），キットBでは，957.0±154.3，418.8±79.1pg/ml（p<0.001），キットCでは，1043.5±177.5，459.9±82.3pg/ml（p<0.001）であった．しかし，両方による PAC に

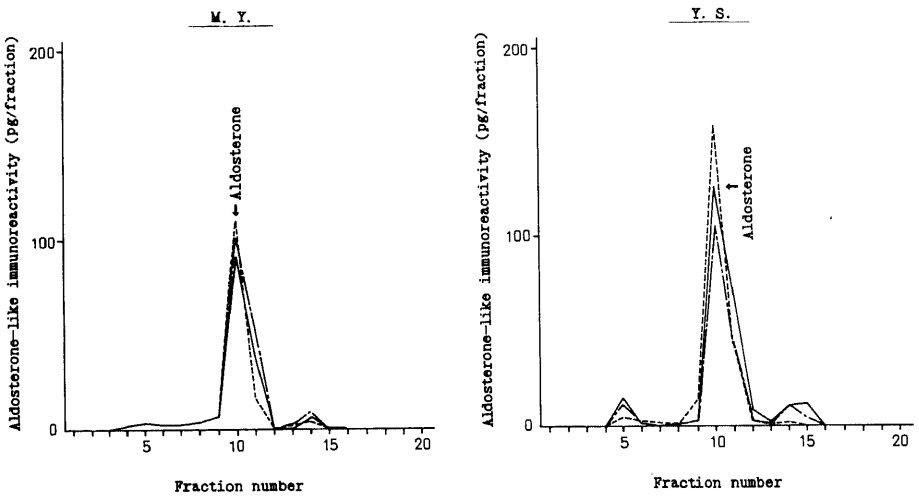

Fig. 5. HPLC profiles of aldosterone-like immunoreactivities measured by 3 RIA kits of plasma extracts taken from 2 normal subjects.
(——), kit-A ; (– – –), kit-B ; (·····), kit-C.

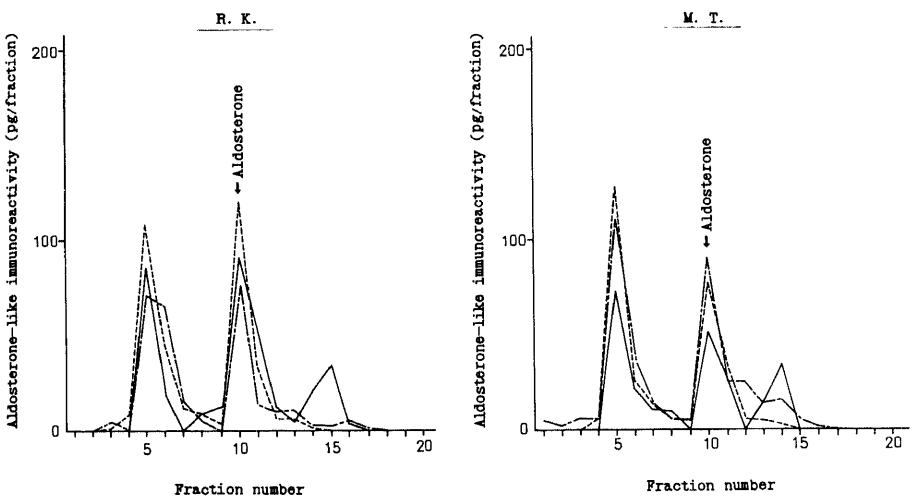

Fig. 6. HPLC profiles of aldosterone-like immunoreactivities measured by 3 RIA kits of plasma extracts taken from 2 patients with chronic renal failure on hemodialysis.
(——), kit-A ; (– – –), kit-B ; (·····), kit-C.

はやはり強い正相関を認めた．キットAでは，r＝0.967（p<0.001），キットBでは，r＝0.992（p<0.001），キットCでは，r＝0.976（p<0.001）であった．また，非透析慢性腎不全患者においてもジクロロメタン抽出法は有意に低い PAC を与えた（図4）．キットAでは，160.9±12.5，118.9±9.4pg/ml（p<0.001），キットBでは，159.6±13.3，122.7±9.4pg/ml（p<0.001），キットCでは，157.6±13.3，115.1±8.5pg/ml（p<0.001）であった．また，両方は強い正相関を示した．キットAでは，r＝0.848（p<0.001）キットBでは，r＝0.941（p<0.001），キットCでは，r＝0.908（p<0.001）であった．

II．高速液体クロマトグラフィーによる検討

HPLC-RIA によりアルドステロン様免疫活性は，正常腎機能者の血漿では，アルドステロンに一致する分画にのみ認めたにすぎなかった（図5）が，血液透析中慢性腎不全患者および非透析慢性腎不全患者においては，アルドステロンに一致する分画のほかに，ど

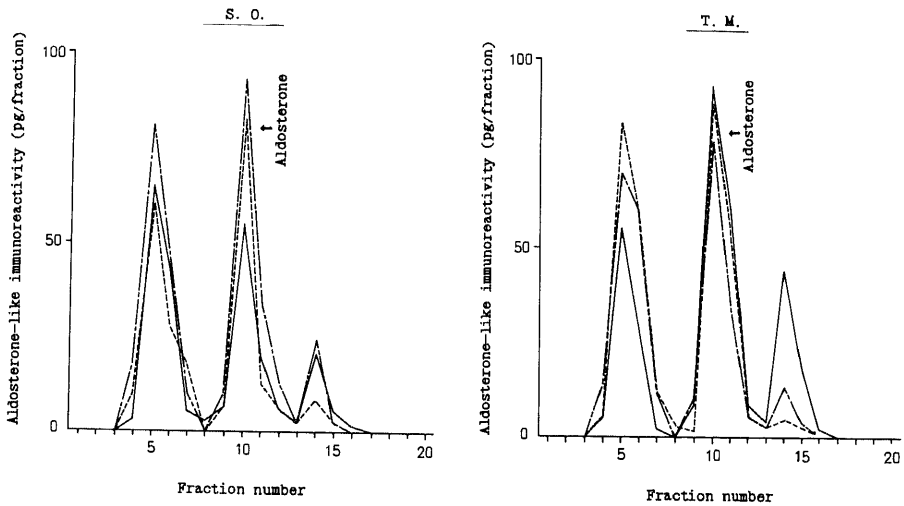

Fig. 7. HPLC profiles of aldosterone-like immunoreactivities measured by 3 RIA kits of plasma extracts taken from 2 patients with chronic renal failure without hemodialysis.
(——), kit-A ; (—·—), kit-B ; (·····), kit-C.

Table 1. Plasma aldosterone concentrations in hemodialyzed and undialyzed patients with chronic renal failure.

Patient	A		B		C		HPLC-RIA
	Direct	Extract	Direct	Extract	Direct	Extract	
Hemodialyzed chronic renal failure							
R.K.	975.5	489.9	1,662.5	455.5	714.7	426.1	409.7
M.T.	1,282.2	607.5	950.6	400.8	1,484.3	542.5	396.5
F.O.	2,088.6	898.2	1,926.2	617.7	2,529.7	989.0	818.9
K.N.	430.0	213.6	453.2	228.8	398.3	150.6	146.0
Undialyzed chronic renal failure							
T.H.	220.6	200.3	268.0	212.9	308.1	217.6	175.1
K.H.	93.2	63.2	97.4	72.2	111.0	82.0	60.5
K.M.	151.4	127.4	165.0	90.3	154.9	99.1	105.6
S.A.	337.6	268.5	308.0	222.3	271.2	196.7	200.1

All values are expressed in pg/ml.
Each sample was measured by direct and CH_2Cl_2 extraction methods using 3 different RIA kits (A, B, and C) and by HPLC-RIA using kit-A.

のキットによっても，アルドステロンよりも極性分画に強いアルドステロン様免疫活性を，また，アルドステロンより極性の低い分画に若干の免疫様活性を認めた（図6, 7）．表1に血液透析中の慢性腎不全患者，非透析慢性腎不全患者各々4名の直接法，ジクロロメタン抽出法，HPLC-RIA 法による PAC を示した．キットにより測定値にはかなりの差異があるが，いずれの症例でも実験1の成績と同じく，直接法に比しジクロロメタン抽出法はかなり低い値を示し，HPLC-RIA ではさらに低値であった．

Ⅲ．腎機能との関係についての検討

図8に示すように非透析慢性腎不全患者血漿中の極性アルドステロン様免疫活性と血清クレアチニン濃度には，強い正相関を認めた（$r=0.746$, $p<0.001$, $n=45$）．

考　　察

慢性腎不全，ことに血液透析中の患者の PAC は文献上極めて広い値を示し[15)~18)]，時には原発性アルドステロン症で観察される高値を呈する．一方，腎不全に合併した原発性アルドステロン症の症例報告[19)20)]によると，正常腎機能者と異なり必ずしも血漿レニン活性は抑制されないため，腎不全に合併した原発性アルドステロン症の診断は一層困難となる．一方，慢性腎不全における高カリウム血症の機序しとて低アルドステロン血症の果たす役割を示唆する報告や[21)22)]，難治性高血圧を合併する慢性腎不全患者では，他の慢性腎不全患者よりも PAC が高値を呈することが報告[23)]されており，正確な PAC 測定は慢性腎不全におけるアルドステロンの病態生理学的意義の研究および合併する高血圧の鑑別診断上極めて重要である．

今回の成績では，慢性腎不全患者の PAC は，ジクロロメタン抽出を加えた場合，直接測定法に比し著しく低値を示し，HPLC-RIA による分析結果では，その血漿中にはアルドステロン以外にも，明らかな強いアルドステロン様免疫活性が極性分画に，また，極性の低い分画にも若干の同免疫活性が存在することが示され，これらの物質によって慢性腎不全においては PAC が見かけ上高値を示したものと考えられた．近年，他のステロイドホルモンの直接法 RIA においても同様の報告が見られるようになった．Nolan ら[24)]は，慢性腎不全患者の血漿を対象に4種のコルチゾール直接法 RIA キットについて検討し，抽出法，ペーパークロマトグラフィーによりその値がかなり低下す

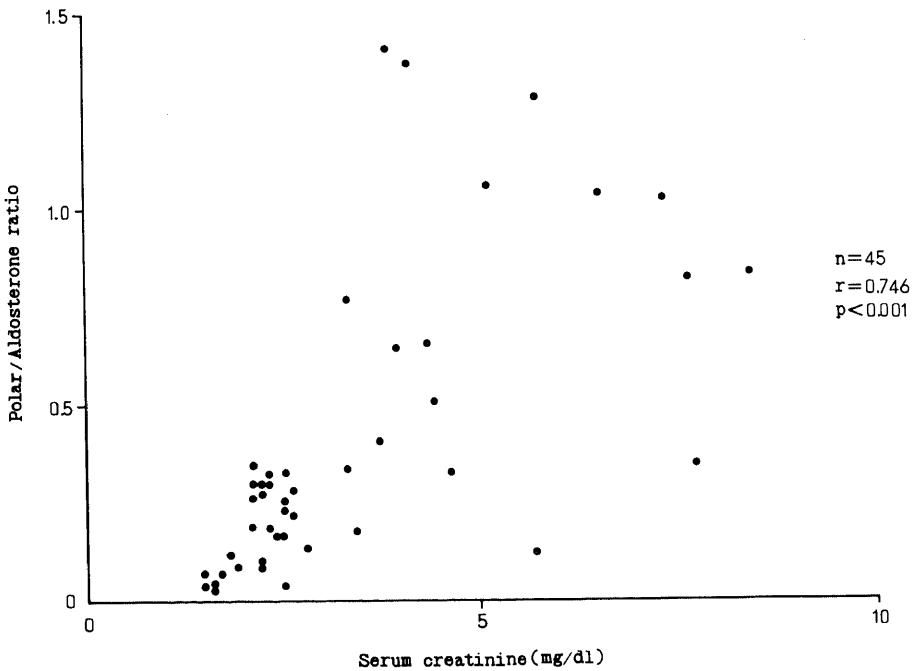

Fig. 8. Correlation between serum creatinine concentration and the ratio of aldosterone-like immunoreactivities of polar fraction to aldosterone in patients with chronic renal failure without hemodialysis.

ることを示し，抗体の特異性などから，コルチゾール抱合体，11-デオキシコルチゾール等との交差反応によるものと推定している．また，テストステロン[25)~27)]，エストラジオール[28)29)]の直接法 RIA においても抽出操作により測定値が著しく低下した例が報告されている．

HPLC-RIA において認められたアルドステロン以外の免疫活性物質の本体については未同定で今後の検討課題であるが，Jones ら[30)]は，フランス原子力庁製 PAC 直接法 RIA キットで血症透析中の慢性腎不全の血漿を測定し，今回の検討と同様に異常に高い PAC 値が得られたことを報告しているが，この血漿を β-グルクロニダーゼで加水分解すると，ペーパークロマトグラフィー上テトラハイドロアルドステロンに一致する物質が得られたことより，3α，5β-テトラハイドロアルドステロン-3-グルクロニドがこの見かけ上の PAC 高値の原因になっていると推論している．肝で生成される 3α，5β-テトラハイドロアルドステロン-3-グルクロニド[30)]，肝と腎で生成されるアルドステロン-18-グルクロニド[31)]はアルドステロンの主たる代謝物であるが，慢性腎不全ではアルドステロン分泌量は増加していること[33)]，アルドステロン総代謝率は増加していること[34)35)]，また，これらの抱合体の排泄が遷延すること[36)]よりこれらの代謝物が血液中に蓄積されることが容易に想像される．慢性腎不全では血漿中の17-ハイドロキシコルチコステロイド抱合体が増加していること[37)38)]，また，慢性腎不全を合併した妊娠では，エストロゲン抱合体（特にエストリオールグルクロニド）が正常妊娠に比べ著増していることが報告されている[39)40)]．実際，寺山ら[41)]はアルドステロンについても，血液透析中の慢性腎不全患者の血漿中 3α，5β-テトラハイドロアルドステロン-3-グルクロニド濃度は1150－33400pg/ml（正常範囲 ： 56.0～820.0 pg/ml），血漿中アルドステロン-18-グルクロニドの濃度は，160～3400pg/ml（正常範囲 ： 25.0－113.0pg/ml）と報告しており，いずれも正常腎機能者の血漿中の濃度をはるかに上回っている．抗アルドステロン抗体の 3α，5β-テトラハイドロアルドステロン-3-グルクロニド対する交差反応は，文献によると0.3%[42)]，10%[43)]，アルドステロン-18-グルクロニドに対する交差反応は，本研究で使用したキットでは0.003～0.02%であった．3α，5β-テトラハイドロアルドステロン-3-グルクロニドの交差反応が比較的高いことは，3位に蛋白を結合させたアルドステロンを免疫源として抗アルドステロン抗体が作製されており，3位付近の構造変化に対する抗体特異性が低いため[44)]と推定される．これらの血中濃度，交差反応性より，アルドステロン（代謝物）の抱合体による交差反応によって見かけ上の PAC 高値を充分説明し得る．しかし，抱合体以外のステロイド，他の干渉物質の可能性もあり今後の更に詳細な分析が必要である．

HPLC 上，アルドステロンよりも極性の低い免疫活性物質についても未同定であるが，著者の予備的実験では，この分画は本研究に用いた HPLC システム，他の 2 種の HPLC システムで 3α，5β-テトラハイドロアルドステロン，および21-デオキシアルドステロンに一致した．本研究に使用した RIA キットの抗アルドステロン抗体の交差反応は，前者が0.1～0.6%，後者が2.8～14.0%であった．前述の様に，慢性腎不全ではアルドステロンの分泌量は増加していること[33)]，心拍出量が増加しているため肝血流量もふえて肝における代謝が亢進している[35)]と推定されることより，主として肝で代謝生成される 3α，5β-テトラハイドロアルドステロンが血中で増加していると考えられる．また，21-デオキシアルドステロンは，アルドステロンから腸管内で Eubacterium lentum により生成されることが in vitro[45)]および in vivo[46)]で示されているが，慢性腎不全において肝での代謝が亢進しているため，腸肝循環を経て血中に蓄積される量も増加している可能性も否定できない．

血中17-ハイドロキシコルチコステロイド抱合体濃度がクレアチニンクリアランスと逆相関を示すことが既に報告されている[37)]．このことは，17-ハイドロキシコルチコステロイドは94%が血漿蛋白に結合しているのに対し，17-ハイドロキシコルチコステロイドグルクロニドは65%に過ぎず，これにより17-ハイドロキシコルチコステロイド抱合体は糸球体での濾過が容易となるためと解釈される[47)]．アルドステロンの抱合体が血漿蛋白と結合する割合は，3α，5β-テトラハイドロアルドステロン-3グルクロニドでは35～39%，アルドステロン-18-グルクロニドでは54～57%と報告されている[48)]ので，腎機能の低下と共に極性アルドステロン様免疫活性物質が増加するという今回の成績は，極性アルドステロン様免疫活性物質がステロイド抱合体である可能性を示唆する．

結　　論

PAC 直接測定法 RIA キット 3 種を用い，以下の結果を得た．

1．正常腎機能者の血漿では，いずれのキットによっても直接測定法による PAC，ジクロロメタン抽出操作を加えた PAC はほぼ一致したが，血液透析中

および非透析慢性腎不全患者の血漿では，3種のキットとも直接測定法による PAC に比し，ジクロロメタン抽出操作を加えた PAC は有意に低値となった．

2．血漿を Sep-pak C_{18} カートリッジで抽出し，逆相 HPLC で分取後各キットで RIA を行った．その結果，正常腎機能者ではアルドステロンに相当する分画にのみアルドステロン様免疫活性を認めたが，血液透析中および非透析慢性腎不全患者では，いずれのキットによってもアルドステロン以外に，アルドステロンより極性分画に強いアルドステロン様免疫活性を認め，また極性の低い分画にも若干のアルドステロン様免疫活性を認めた．

3．非血液透析慢性腎不全患者の血漿中の極性アルドステロン様免疫活性と，血清クレアチニン濃度は正相関を示した．

以上の実験結果より，血液透析中および非透析慢性腎不全患者の血漿中には，腎機能の低下と共に増加する極性アルドステロン様免疫活性物質と，極性の低いアルドステロン様免疫活性物質が存在し，これらにより PAC は異常高値を示すものと推察された．従って，慢性腎不全患者の PAC 測定に際しては，抽出操作およびクロマトグラフィー操作後，RIA を行う必要があると思われる．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，終始御指導，御校閲を賜った竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します．また，直接御指導，御助言を頂いた金沢大学医学部内科学第二講座宮森勇講師，ならびに多大な御協力を戴きました金沢大学第二内科第二研究室A，同第三研究室の各位に深く感謝致します．

なお，本論文の要旨は，第30回日本腎臓学会総会，第85回日本内科学会講演会，および第8回国際内分泌学会で報告した．

文　　献

1) **Vecsei, P., Hackenthal, E. & Ganten, D.:** The renin-angiotensin-aldosterone system. Klin. Wochenschr., **56** (suppl. I), 5-21 (1978).

2) **福地総逸**：研究検査法の進歩と問題点．アルドステロン．総合臨床，**23,** 1931-1936 (1974).

3) **Axelrad, B. J., Cates, J. E., Johnson, B. B. & Luetscher, J. A. Jr.:** Bioassay of mineralocorticoids: relationship of structure to physiological activity. Endocrinology, **55,** 568-574 (1955).

4) **Nowaczynski, W., Koiw, E. & Genest, J.:** Chemical method for the determination of urinary aldosterone. Can. J. Biochem. Physiol., **35,** 425-443 (1957).

5) **Peterson, R. E.:** The miscible pool and turnover rate of adrenocotical steroids in man. Recent Prog. Horm. Res., **15,** 231-274 (1959).

6) **Abraham, G. E.:** Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17β. J. Clin. Endocrinol. Metab., **29,** 866-870 (1969).

7) **Mayes, D., Furuyama, S., Kem, D. C. & Nugent, C. A.:** A radioimmunoassay for plasma aldosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab., **30,** 682-685 (1970).

8) **Bayard, F., Beitins, I. Z., Kowarski, A. & Migeon, C. J.:** Measurement of plasma aldosterone by radioimmunoassay. J. Clin. Endocrinol. Metab., **31,** 1-6 (1970).

9) **Ogihara, T., Iinuma, K., Nishi, K., Arakawa, Y., Takagi, A., Kurata, K., Miyai, K. & Kumahara, Y.:** A non-chromatographic non-extraction radioimmunoassay for serum aldosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab., **45,** 726-731 (1977).

10) **宮森　勇，金　敬洙，山本郁夫，内田健三，森本真平，竹田亮祐：**^{125}I-アルドステロン測定用キットによる血漿アルドステロンの Radioimmunoassay. Radioisotopes, **27,** 334-337 (1978).

11) **古池隆明，竹内憲子，小関祥代，横山貴美江，沢田武司：**アルドステロンラジオイムノアッセイキットIIの基礎的検討．Radioisotopes, **35,** 192-195 (1986).

12) **佐合正義，林　真，岡千津子，中山一彦，今井行雄，巣組一男，西村恒彦，高宮　誠：**Aldosterone 測定用 RIA キット（“3401-S”）の基礎的検討および臨床的応用．ホルモンと臨床，**34,** 735-741 (1986).

13) **西川哲男，吉田明子，三上恵只，田村　泰，吉田尚：**チューブ固相法による aldosterone RIA kit の基礎的および臨床的検討．ホルモンと臨床，**35,** 643-651 (1987).

14) **竹田亮祐：**ミネラロコルチコイド分泌代謝異常の臨床．日内会誌，**75,** 1189-1203 (1986).

15) **ϕlgaard, K.:** Plasma aldosterone in anephric and non-nephrectomized dialysis patients in relation to changes in plasma potassium without change in total potassium balance. Acta. Med. Scand., **198,** 213-218 (1975).

16) **Weidmann, P., Maxwell, M. H., Lima, J., Hirsch, D. & Franklin, S. S.:** Control of aldosterone responsiveness in terminal renal failure. Kid. Int., **7,** 351-359 (1975).

17) **Vetter, W., Záruba, K., Armbruster, H.,**

Beckerhoff, R., Nussberger, J., Furrer, J., Fontana, A. & Siegenthaler, W.: Control of plasma aldosterone during hemodialysis in patients with terminal renal failure. Neptron, **18**, 114-123 (1977).

18) Farinelli, A., Squerzanti, R., De Paoli Vitali, E., Bagni, B., Cavallini, A. R., Gilli, P. & Bedani, P. L.: Response of plasma aldosterone to sequential ultrafiltration, dialysis and conventional hemodialysis. Nephron, **26**, 274-279 (1980).

19) Iyori, S., Saruta, T., Kondo, K., Ozawa, Y., Hata, J. & Shimizu, K.: Renin and juxtaglomerular apparatus in a patient with primary aldosteronism complicated by chronic renal failure. South. Med. J., **69**, 951-952 (1976).

20) Nakada, T. & Kimura, M.: Primary aldosteronism associated with chronic renal failure. report of a case. Int. Urol. Nephrol., **16**, 165-173 (1984).

21) Sebastian, A., Schambelan, M., Lindenfeld, S. & Morris, R. C. Jr.: Amelioration of metabolic acidosis with fludrocortisone therapy in hyporeninemic hypoaldosteronism. N. Engl. J. Med., **297**, 576-582 (1977).

22) Schambelan, M., Sebastian, A. & Biglieri, E. G.: Prevalence, pathogensis, and functional significance of aldosterone deficiency in hyperkalemic patients with chronic renal insufficiency. Kid. Int., **17**, 89-101 (1980).

23) Weidmann, P., Maxwell, M. H. & Lupu, A. N.: Plasma aldosterone in terminal renal failure. Ann. Intern. Med., **78**, 13-18 (1973).

24) Nolan, G. E., Smith, J. B., Chavre, V. J. & Jubiz, W.: Spurious overestimation of plasma cortisol in patients with chronic renal failure. J. Clin. Endocrinol. Metab., **52**, 1242-1245 (1981).

25) Ismail, A. A. A., Astley, P., Cawood, M., Short, F., Wakelin, K. & Wheeler, M.: Testosterone assays: guidelines for the provision of a clinical biochemistry service. Ann. Clin. Biochem., **23**, 135-145 (1986).

26) Weeler, M. J., Shaikh, M. & Jennings, R. D.: An evaluation of 13 commercial kits for the measurement of testosterone in serum and plasma. Ann. Clin. Biochem., **23**, 303-309 (1986).

27) Wheeler, M. J. & Lowy, C.: Warning on serum testosterone measurement. Lancet, **II**, 514-515 (1987).

28) Nisbet, J. A. & Jomain, P. A.: Discrepancies in plasma estradiol values obtained with commercial kits. Clin. Chem., **33**, 1672 (1987).

29) Diver, M. J. & Nisbet, J. A.: Warning on plasma oestradiol measurement. Lancet, **II**, 1097 (1987).

30) Jones, J. C., Carter, G. D. & Macgregor, G. A.: Interference by polar metabolites in a direct radioimmunoassay for plasma aldosterone. Ann. Clin. Biochem., **18**, 54-59 (1981).

31) Luetscher, J. A., Camargo, C. A., Cohn, A. P., Dowdy, A. J. & Callaghan, A. M.: Observations on metabooism of aldosterone in man. Ann. Intern. Med., **59**, 1-7 (1963).

32) Cheville, R. A., Luetscher, J. A., Hancock, E. W., Dowdy, A. J. & Nokes, G.W.: Distribution, conjugation, and excretion of labeled aldosterone in congestive heart failure and in controls with normal circulation: development and testing of a model with an analog computer. J. Clin. Invest., **45**, 1302-1316 (1966).

33) Cope, C. L. & Pearson, J.: Aldosterone secretion in severe renal fallure. Clin. Sci., **331-341 (1963).**

34) Balikian, H. M., Brodie, A. H., Dale, S. L., Melby, J. C. & Tait, J. F.: Effect of posture on the metabolic clearance rate, plasma concentration and blood production rate of aldostreone in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., **28**, 1630-1640 (1968).

35) Corvol, P., Bertagna, X. & Bedrossian, J.: Increased steroid metabolic clearance rate in anephric patients. Acta Endocrinol. (Copenh), **75**, 756-762 (1974).

36) Luetscher, J. A., Dowdy, A. J., Callaghan, A. M. & Cohn, A. P.: Studies of secretion and matabolism of aldosterone and cortisol. Trans. Assoc. Am. Physicians, **75**, 293-300 (1962).

37) Englert, E. Jr., Brown, H., Willardson, D. G., Wallach, S. & Simons, E. L.: Metabolism of free and conjugated 17-hydroxycorticosteroids in subjects with uremia. J. Clin. Endocrinol. Metab., **18**, 36-48 (1958).

38) Kasanen, A., Pekkarinen, A. & Thomasson, B.: On the 17-hydroxycorticosteroid content in the

plasma and its daily rhythm in renal insufficiency. part II: the conjugated 17-OHCS. Acta Endocrinol. (Copenh), **30**, 353-368 (1959).

39) Marwood, R. P., Ogg, C. S., Coltart, T. M. & Klopper, A. I.: Plasma oestrogens in a pregnancy associated with chronic haemodialysis. Br. J. Obstet. Gynaecol., **84**, 613-617 (1977).

40) Levitz, M., Kadner, S. & Young, B. K.: Profile of serum estriol and its conjugates at delivery and in the immediate postpartum period in a patient with severe polycystic kidney disease : a comparison with normal pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., **145**, 465-468 (1983).

41) 寺山百合子，古川利有，江場秀夫，二川原和男，鈴木唯司，平山順朗，舟生富寿：血中および尿中aldosterone, aldosterone-18-glucuronide, tetrahydroaldosterone-glucuronideの動態について．ホルモンと臨床，**34**, 713-719 (1986).

42) Vecsei, P., Abdelhamid, S., Bubel, P., Haack, D., Lewicka, S.,Lichtwald, K. & Mittelstaedt, Gv.: Radioimmunologic methods in aldosterone diagnosis. In Kaufmann, W. et al. (eds), Mineralocorticoids and Hypertension, p62-77, Springer-Verlag, Berlin, 1983.

43) Brown, R. D., Swander, A. & Mckenzie, J. K.: Urine aldosterone radioimmunoassay : validation of a method without chromatography. J. Clin. Endocrinol. Metab., **42**, 894-900 (1976).

44) Abraham, G. E.: Radioimmunoassay of steroids in biological materials. Acta Endocrinol. (Copenh), **75** (suppl. 183), 7-42 (1974).

45) Bokkenheuser, V. D., Winter, J., Honour, J. W. & Shackleton, C. H. L.: Reduction of aldosterone by anaerobic bacteria : origin of urinary 21-deoxy metabolites in man. J. Steroid Biochem., **11**, 1145-1149 (1979).

46) Miyamori, I., Koshida, H., Matsubara, T., Ikeda, M., Takeda, Y., Takeda, R. & Vecsei, P.: Role of intestinal bacteria in the metabolism of aldosterone in man. Horm. Res., **29**, 147-150 (1988).

47) Daughaday, W. H.: Binding of corticosteroids by plasma proteins. I. dialysis equilibrium and renal clearance studies. J. Clin. Invest., **35**, 1428-1433 (1956).

48) Möhring, J., Möhring, B. & Siegenthaler, W.: Zum extrahepatischen Stoffwechsel von Aldosteron. II Mitteilung. Plasmaeiweiβ bindung und renale Clearance von Tetrahydroaldosteronglucuronid und 18-Aldosteronglucuronid beim Menschen. Z. Gesamte Exp. Med., **146**, 329-335 (1968).

Falsely Elevated Plasma Aldosterone Concentration by Direct Radioimmunoassay in Chronic Renal Failure

Hideo Koshida, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920−J. Juzen Med. Soc., 97, 1020-1031 (1988)

Key words: aldosterone, chronic renal failure, radioimmunoassay

Abstract

The plasma aldosterone concentration (PAC) in patients with chronic renal failure were measured by radioimmunoassay (RIA) with and without dichloromethane extraction. Blood samples were obtained from patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis, chronic renal failure without hemodialysis, and age-matched normal subjects. In 3 RIA kits tested, direct assays gave PAC values comparable to those obtained after prior dichloromethane extraction in normal subjects, whereas direct-RIAs yielded higher values than those obtained after extraction in patients with chronic renal failure with ($p<0.001$) and without hemodialysis ($p<0.001$). When the plasma was further analyzed by

high-pressure liquid chromatography (HPLC) using a reverse phase column, and each fraction was assayed for PAC using the RIA kits, high immunoreactivities were found in polar fractions in the plasma of chronic renal failure with and without hemodialysis, but not in normal plasma. The ratios of immunoreactivities of polar fractions to aldosterone determined after HPLC separation showed a significant positive correlation ($r=0.746$, $p<0.001$) to the serum creatinine concentrations in chronic renal failure without hemodialysis. These results indicate that PAC yields falsely elevated values in chronic renal failure when PAC is measured by RIA kits without prior extraction. Further, the plasma from patients with chronic renal failure may contain a polar substance that cross-reacts with aldosterone antibodies. Although unidentified, this substance may increase with advancing renal impairment, and extraction or chromatographic procedures are necessary for PAC determinations by RIA in these instances.