

《ノート》

## Digoxin-<sup>125</sup>I-Imusay® Diagnostic Kit による血中 Digoxin 濃度の測定について

### Determination of Serum Digoxin Concentration by Digoxin-<sup>125</sup>I-Imusay® Diagnostic Kit

西川 光重\* 大石まり子\*\* 蔵田駿一郎\*\*\* 稲田 満夫\*

Mitsushige NISHIKAWA, Mariko OISHI, Shunichiro KURATA and Mitsuo INADA

\* 2nd Division, Department of Internal Medicine, Kyoto University School of Medicine,

\*\* Department of Internal Medicine, Kyoto National Hospital, and

\*\*\* Endocrine Section, Department of Internal Medicine, Tenri Hospital

#### I. はじめに

Radioimmunoassay による血中 Digoxin 濃度測定は1967年 Butler ら<sup>1)</sup>による Digoxin に対する抗体の産生にはじまり, 1969年, Smith ら<sup>2)</sup>により確立された。そしてその後, 測定方法がさらに改善されて一般に普及しつつある<sup>3)-7)</sup>。

これらは核種として <sup>3</sup>H を使用するものであるが, このような汚染処理, 計測などの点で複雑な <sup>3</sup>H を使用するもの以外に, 最近では <sup>125</sup>I を使用するキットが市販されるようになった。かくして, 血中 Digoxin 濃度測定は日常検査として広く行なわれるようになってきている<sup>8)-10)</sup>。

著者らはダイナボット RI 研究所より, Digoxin-<sup>125</sup>I-Imusay® Diagnostic Kit の提供をうけ, 種々の検討を行なったので, その成績を報告する。

#### II. 測定方法

Digoxin-<sup>125</sup>I-Imusay® Diagnostic Kit は <sup>125</sup>I 標

識 Digoxin, Digoxin 標準溶液, 抗 Digoxin 家兔血清およびポリエチレングリコール (PEG) より成り, その使用法は, 概略次の通りである (Fig. 1)。

Digoxin 標準溶液 (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ng/ml の各濃度に調節されている。) または被検血清 (あるいは血漿) 0.1 ml に抗 Digoxin 家兔血清 0.3 ml を加え, 振盪混和後, <sup>125</sup>I 標識 Digoxin 0.1 ml を加え, 再び振盪混和する。室温にて30分間インキュベーション後, Total count tube をのぞく全試験管に18% PEG 2.0ml を手速く (5分間以内に) 加え, Vortex mixer で混和後, 3,000 rpm にて10分間遠心分離を行なう。上清を捨て, 沈澱 (抗原抗体結合物) の Radioactivity を測定して Total count に対する% (% Bound) を求める。この%値を標準液の Digoxin 濃度に従って方眼紙上にプロットして検量線を得ると同時に, 各被検血清 (又は血漿) 中の濃度を読み取る。

被検血清は Digoxin 投与直前に採血されたものを, 主として使用し, 測定まで4°C, または室温で保存されたが, その期間はほぼ2時間以内であった。

#### III. 成績

##### 1) 標準曲線と稀釈テスト (Fig. 2)

Fig. 2 は本法における標準曲線の1例と稀釈テ

**Key words:** Digoxin radioimmunoassay, Serum digoxin concentration, Digoxin intoxication

\* 京都大学医学部第2内科

\*\* 国立京都病院内科

\*\*\* 天理よろづ相談所病院内分泌内科

受付: 53年3月13日

最終稿受付: 53年3月13日

別刷請求先: 京都大学左京区聖護院川原町 54 (☎ 606)

京都大学医学部第2内科

稲田 満夫

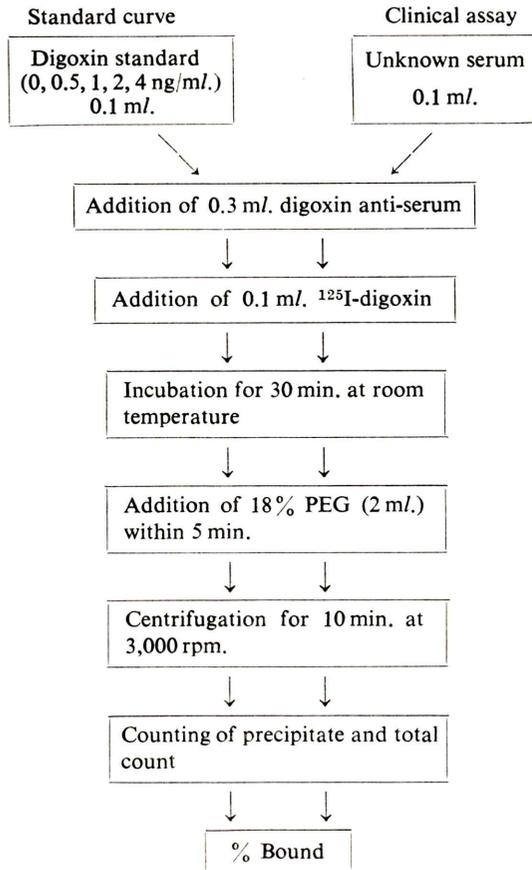


Fig. 1. Assay procedure

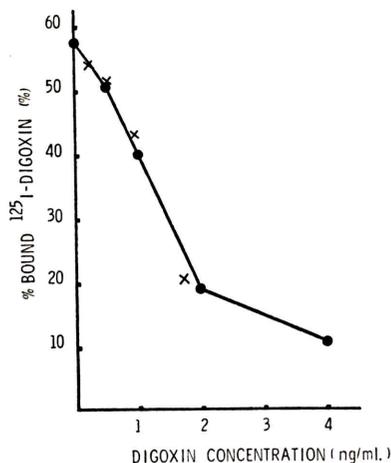


Fig. 2. Standard curve and dilution test

ストの結果である。Digoxin 濃度が 0 ng/ml の % Bound は約 57%，4 ng/ml のそれは約 9.5% で、50% inhibition を示す Digoxin 濃度は約 1.5 ng/ml であり、良好な標準曲線が得られた。

また、Fig. 2 の×印は Digoxin 濃度 1.74 ng/ml を示す患者血清を 0 ng/ml の標準 Digoxin 溶液にて種々に倍数希釈した時のそれぞれの % Bound を示すが、それは標準曲線とほぼ平行に変動した。

## 2) 標準曲線の再現性 (Table 1)

標準曲線の再現性をみると、同一 Lot の Kit では Digoxin 濃度 0~4 ng/ml の範囲で、それぞれの % Bound 値の変動係数は 0.75~3.32% を極めて良好な再現性を示した (Table 1, 下)。

一方、異なった Lot 間での検討では Digoxin 濃度が 1 ng/ml 以下ではそれぞれの % Bound 値の変動係数は 10% 以下と再現性はほぼ良好であったが、それより濃い濃度ではそれぞれの % Bound 値に若干のばらつきが認められた (Tab. 1, 上)。

## 3) 測定感度 (Fig. 3)

本 assay 系の測定感度を検討する為、Digoxin 1.0 ng/ml, 0.5 ng/ml, 0.25 ng/ml, 0.125 ng/ml の各濃度における % Bound 値と 0 ng/ml での % Bound 値との間の有意差検定を行なった所、Fig. 3 に示すごとく、0.125 ng/ml での値と 0 ng/ml

Table 1. Reproducibility of the standard curves between the kit with different lot number

Digoxin Concentration (ng/ml.)	Mean ± SD	CV (%)
0	55.9 ± 2.9	5.25
0.5	48.6 ± 2.7	5.44
1	37.5 ± 3.7	9.83
2	18.3 ± 2.0	11.04
4	9.5 ± 1.1	11.64

Within the kit with same lot number (Lot No. 974)		
Digoxin Concentration (ng/ml.)	Mean ± SD	CV (%)
0	58.3 ± 1.1	1.95
0.5	50.1 ± 1.7	3.30
1	38.5 ± 0.3	0.75
2	17.2 ± 0.6	3.32
4	9.8 ± 0.3	2.92

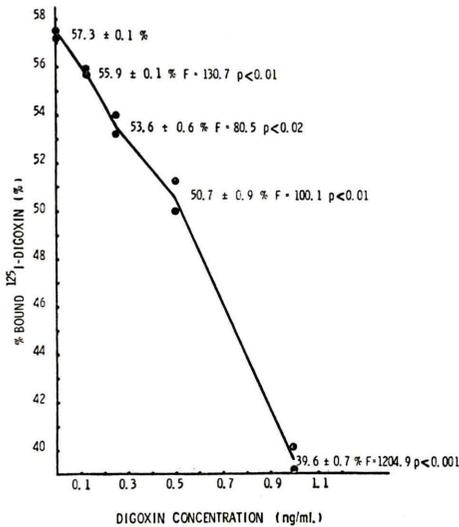


Fig. 3 Sensitivity of the kit

での値の間に1%以下の危険率で有意の差が認められ、測定感度は0.125 ng/ml以下と考えられた。

#### 4) インキュベーション時間の影響 (Fig. 4)

インキュベーション時間を30分、60分、90分、120分と変えてその影響を検討した。検討時間内ではインキュベーション時間を長くする程% Bound

値が高くなる傾向がみられた。これは Digoxin 濃度の低い方が著明であった。特に120分のインキュベーションを行なうと、0 ng/ml と 0.5 ng/ml の濃度における % Bound 値の差はあまり顕著でなくなった。したがってインキュベーション時間は30分が適当で、各試験管のインキュベーション時間を一定にする必要があると考えられた。

#### 5) 交叉試験 (Fig. 5)

Kit に添付された Digoxin 抗血清の反応特異性を検討するために、Lanatoside C, Digitoxin, Testosterone, Cortisol, Cholesterol について交叉反応の有無を調べた。

Fig. 4 に示すごとく、Lanatoside C とは約35%の強い交叉現象がみられ、Digitoxin とは約5%の交叉がみられた。Cortisol, Cholesterol, Testosterone とは全く交叉しなかった。

#### 6) 回収率試験 (Fig. 6)

正常血清に3種の異なる濃度の Digoxin を加え、回収率試験を行なうと、平均回収率は101.1 ± 10.0%であった。

#### 7) 再現性

次いで本キットによる測定値の再現性を種々の

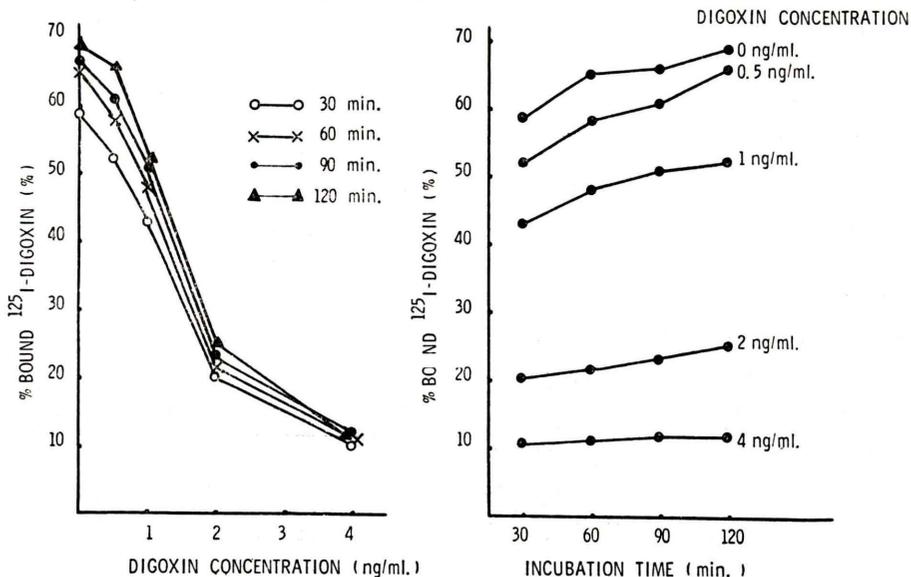


Fig. 4 Effect of incubation time.

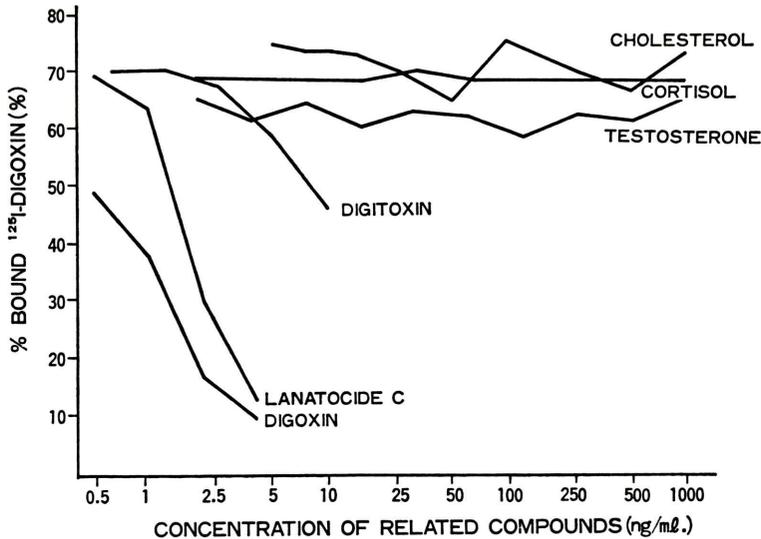


Fig. 5 Specificity of digoxin autiserum.

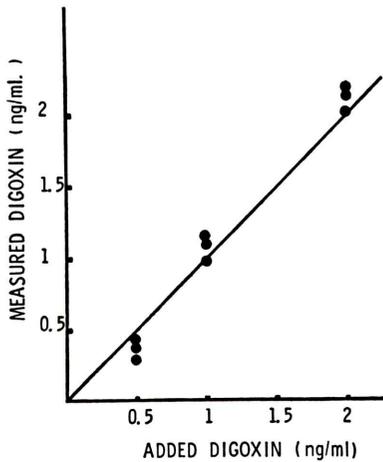


Fig. 6. Recovery test

方法により検討した。

5種の検体を同一 Lot にて日をかえて各々5回測定して、測定値の日差変動をみた所、それらの測定値の変動係数は2.46%と5.79%の間であった。(Table 2, 上), また4種の検体を同時に5回測定して、多重測定における再現性を検討した所、それらの測定値の変動係数は、1.57%と3.04%の間であった (Table 2, 下)。

同一検体を Lot 番号の異なる7つの Kit にて

Table 2 Reproducibility (I)

Repeated determinations on different days

	Digoxin concentration (ng/ml)				
	0.78	0.79	1.15	1.42	1.57
	0.80	0.79	1.10	1.57	1.67
	0.83	0.85	1.13	1.48	1.50
	0.80	0.85	1.10	1.62	1.55
	0.75	0.90	1.16	1.52	1.73
Mean	0.79	0.84	1.13	1.52	1.61
SD	0.03	0.05	0.03	0.08	0.09
CV (%)	3.72	5.62	2.46	5.10	5.79

Replicate determinations

	Digoxin concentration (ng/ml)			
	0.88	1.24	1.85	1.88
	0.84	1.20	1.83	1.89
	0.88	1.25	1.75	1.85
	0.83	1.26	1.77	1.92
	0.83	1.27	1.77	1.85
Mean	0.85	1.24	1.79	1.88
SD	0.03	0.03	0.04	0.03
CV (%)	3.04	2.17	2.42	1.57

測定し、その測定値の再現性をみた所、その測定値は、 $1.15 \pm 0.07$  ng/ml で変動係数は6.09%であった (Table 3, 上)。

Digoxin 濃度測定はその臨床における性格上、

**Table 3** Reproducibility (II)

Difference among digoxin concentrations determined by the kit of different lot number

Lot number	Digoxin concentration (ng/ml)
902	1.09
906	1.28
916	1.13
974	1.10
976	1.15
979	1.20
1011	1.07
Mean	1.15
SD	0.07
CV (%)	6.09

Difference among digoxin concentrations determined by 5 technicians

Technician	Digoxin concentration (ng/ml)		
A	0.80	1.15	1.72
B	0.70	1.08	1.67
C	0.82	1.18	1.65
D	0.84	1.06	1.65
E	0.83	1.10	1.67
Mean	0.80	1.11	1.67
SD	0.06	0.05	0.03
CV (%)	7.11	4.47	1.71

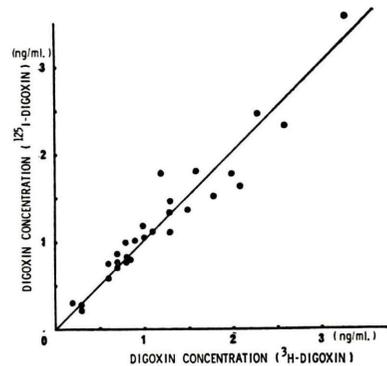
依頼されると速やかに報告する必要があり、測定者がその都度変わる可能性がある。そこで、5人の検査技師が3種の同一検体を測定した時の測定値を比較した。それらの測定値の検査技師が変わることによる変動係数は1.7%~7.1%と低く、したがって測定者がかわることによる変動は小さいと考えられた (Table 3, 下)。

### 8) 抗凝固剤の影響 (Table 4)

4種の検体で、血清と、血液にそれぞれヘパリンまたは EDTA を添加した場合の3通りの方法で血中 Digoxin 濃度を比較検討した。Table 4 に示すように、血清中の Digoxin 濃度はヘパリンまたは EDTA を添加した場合の血漿中の Digoxin 濃度に比べて、推計学的に有意の差は認められなかった (各々  $0.1 < P < 0.2$  および  $0.6 < P < 0.7$ )。したがって、抗凝固剤の影響はほとんどないと考えられた。

**Table 4** Effect of anti-coagulants on digoxin concentration

	Serum	Heparin	EDTA
Digoxin concentration (ng/ml)	0.68	0.60	0.62
	0.77	0.70	0.83
	1.22	1.15	1.14
	1.78	1.80	1.80

**Fig. 7.** Comparison of digoxin concentrations determined by two different kits

### 9) <sup>3</sup>H による Radioimmunoassay Kit との比較 (Fig. 7)

Fig. 7 は Digoxin 服用者30例において、同一検体を用いて、本法と従来の <sup>3</sup>H を用いた Radioimmunoassay による血中 Digoxin 濃度を比較したものである。両者の測定値間には良好な正相関が認められ、その相関係数は +0.960 であった ( $Y = 0.9396X + 0.0940$ )

### 10) Digoxin 服用量と血中 Digoxin 濃度との関係 (Fig. 8)

Digoxin 服用量と血中 Digoxin 濃度との関係を見るために、Digoxin 0.125 mg/day, 0.25 mg/day, 0.375 mg/day, 0.5 mg/day 服用中の各患者の血中 Digoxin 濃度を測定した。それぞれ  $0.107 \pm 0.181$  ng/ml,  $0.855 \pm 0.522$  ng/ml,  $1.262 \pm 0.441$  ng/ml,  $1.387 \pm 0.576$  ng/ml と段階的に増加する傾向がみられたが、かなり測定値に重なり合いがみられた。なお、図中○印は臨床症状、心電図所見などを総合して Digitalis 中毒と判定された患者の血中 Digoxin 濃度を示し、それらは 1.75 ng/ml 以上で

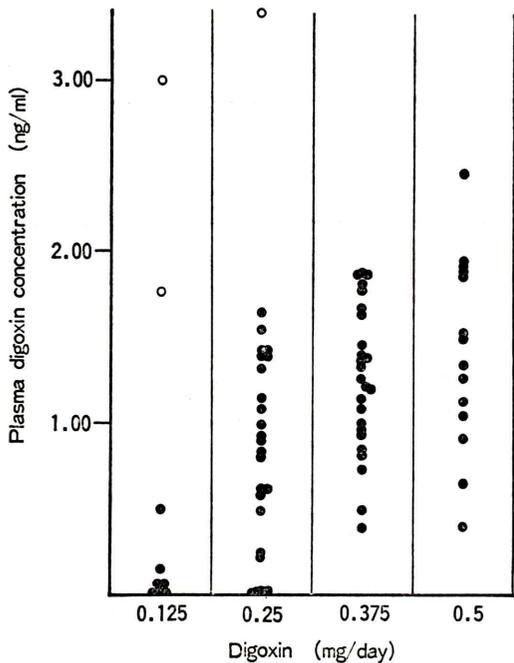


Fig. 8. Serum digoxin concentrations at various maintenance doses of digoxin  
 ●: Non-toxic patient  
 ○: Toxic patient

あった。

#### IV. 考 察

Digitalis 剤は古く、200年前より心疾患の治療に用いられているが、現在においてもその強心作用において Digitalis 剤に優る薬剤は見出されず、その临床上の有用性は依然として高い。しかし Digitalis 剤は治療域と中毒域の差が比較的小さく、また、個人個人の感受性の違いによるためか、各個人における至適投与量の決定に開しては困難を伴うことがしばしばある。そこで Digitalis 中毒の診断に開してその血中濃度測定が有用な検査法と考えられ、Butler ら<sup>1)</sup>、Smith ら<sup>2)</sup>による Radioimmunoassay が開発された。そしてその後測定方法がさらに改善されて临床上の有用性が確かめられている<sup>3)-7)</sup>。

これらは核種として <sup>3</sup>H を使用しており、液体シンチレーションカウンターが必要で計測が煩雑

であり、また、汚染処理に関しても問題があった。そのため、最近では <sup>125</sup>I を使用した Kit が市販されるようになり、血中 Digoxin 濃度測定は臨床ルーチン検査として広く行なわれるようになってきている<sup>8)-10)</sup>。今日市販されている Kit には数社のものがあり、いずれもよく血中濃度を反映する<sup>10)</sup>とされているが、今回われわれは Abbott 社の Digoxin-<sup>125</sup>I-Imusay<sup>®</sup> Diagnostic Kit を使用する機会を得、詳細な基礎的検討を行なった。

本 Kit の Digoxin 抗血清は  $\beta$ -methyl digoxin とはほぼ 100% 交叉し<sup>8)</sup>、Deslanoside, Digitoxin ともある程度の交叉を示すと報告されている<sup>11)</sup>。今回の検討では Lanatoside C と約 35%、Digitoxin と約 5% の交叉を示した。

稀釈試験ではその曲線は標準曲線とよく一致し、回収率試験ではその回収率は  $101.1 \pm 10.0\%$  であった。

測定感度の検討では Digoxin 0 ng/ml の % Bound 値と 0.125 ng/ml の % Bound 値との間に有意 ( $p < 0.01$ ) の差が認められ、測定感度は 0.125 ng/ml 以下と考えられた。

測定値の再現性をみると、同一 assay 内で 5 回測定した測定値の変動係数は 1.57~3.04% であり、日をかえて 5 回測定した日差変動ではその変動係数は 2.46~5.79% であった。また Kit の Lot 間の測定値の変動係数は 6.09% であり、いずれも非常に良好な再現性を示した。次に標準曲線の再現性では異なった Lot 間では標準曲線に多少の変動がみられたが、同一 Lot 番号の各 Kit 間ではそれぞれの標準曲線の再現性は良好であった。したがって、各 Kit に標準曲線が添付されれば、検査に際してその 1 点ないし 2 点をチェックするのみでその標準曲線を使用することができる。かくして、測定の都度標準曲線を作成する手間がはぶけ、検査時間を短縮することが可能と考えられた。

Digoxin 濃度測定はその臨床における性格上、依頼されるとすみやかに報告する必要があり、したがって、測定者がその都度変わる可能性がある。そこで、測定者による変動を複数の検査技師が同一検体を測定して検討した所、その測定値の再現

性は良好であった。これは測定者による Kit 操作上での誤差の少ないことを物語っており、本 Kit の信頼性を示す結果であると考えられた。

心筋中の Digoxin 濃度がよく血中 Digoxin 濃度に反映されることは Doherty ら<sup>12)</sup> により示され、さらに Digitalis 投与量が増加するとその血中濃度も上昇する傾向のあることも多く報告されている<sup>2), 5), 13)</sup>。そして Digitalis 中毒症と非中毒症の鑑別に血中濃度が有用であるとする報告が多い。しかし、最近、果たして血中 Digoxin 濃度が正確に Digitalis 中毒を反映しているかという反省がなされ<sup>14), 15)</sup>、Digitalis 中毒の診断に関して Digitalis 投与量、腎機能、血清 K 値、心臓の状態など臨床より得られる知見以上のものが血中 Digoxin 濃度測定により得られるかは疑問であるとされている<sup>15)</sup>。そして Digoxin 濃度は単に 1 つの情報にすぎず、Digitalis 中毒の診断に関してその他の多くの情報を総合すべきであるといわれている。確かに著者らの成績でも Digoxin 投与量と血中濃度は必ずしも平行せず、そこに種々の因子が関与していることが想像された。さきに著者ら<sup>7)</sup> は、Digoxin 濃度は Digoxin 投与量が多くなるとより多く腎機能に規定されることを示し、内因性 Creatinine clearance と Digoxin 濃度の相関図より投与量を決定する方法を報告した。この様に、臨床所見および従来の検査所見に加えて、血中 Digoxin 濃度が知られれば、それらを総合してより安全な Digitalization が可能と考えられた。

## V. 結 語

<sup>125</sup>I による Digoxin Radioimmunoassay Kit の検討を行ない、以下の結果を得た。

1) 測定値の intraassay での変動係数は 1.57～3.04%、日差変動での変動係数は 2.46～5.79%、Lot 間での変動係数は 6.09% といずれも良好な再現性を示した。測定者の違いによる変動も少なく、安定した測定値が得られた。

2) 同一 Lot 番号での標準曲線の変動は少なく、同一 Lot では各 Kit 毎に標準曲線を作成する必要はなく、検査時間が短縮された。

3) 抗体の特異性、稀釈試験、回収率試験も充分満足できるものであり、測定感度は 0.125 ng/ml 以下とすぐれていた。

4) かくして本キットは測定値の再現性、測定の簡便性に、とくにすぐれており、日常の臨床に充分応用できると考えられた。

5) 臨床応用に関しては、臨床症状および他の検査成績を総合して、Digitalis 中毒の診断を行なうのに意義があると考えられた。

井村裕夫教授の御校閲に深謝すると共に、本キットを提供されたダイナボット RI 研究所に謝意を表します。また、実験に種々御協力を頂いた春名桃江氏に感謝します。

本論文の要旨は第 7 回近畿核医学研究会にて発表した。

## 文 献

- 1) Butler VP Jr and JP Chen: Digoxin specific antibodies. *Proc Nat Acad Sci*, **57**: 71-78, 1967
- 2) Smith TW, VP Butler Jr and E Haber: Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentrations by radioimmunoassay. *N Engl J Med* **281**: 1212-1216, 1969
- 3) 久保田治代, 黒崎浩己, 開原成允他: 血中 Digoxin 濃度の Radioimmunoassay による測定. *核医学* **9**: 255-263, 1972
- 4) 平盛勝彦, 高橋早苗, 松本陽子他: 血中ジゴキシン濃度の測定法と臨床的意義. *ホルモンと臨床* **23**: 489-493, 1975
- 5) 塘 二郎, 田中孝生, 土居義典: Radioimmunoassay による血中 Digoxin 濃度の測定. *ホルモンと臨床* **24**: 463-466, 1976
- 6) Besch HR Jr and AM Watanabe: Radioimmunoassay of digoxin and digitoxin. *Clin Chem* **21**: 1815-1826, 1975
- 7) 稲田満夫, 白浜禱宣, 真城 巖他: Radioimmunoassay による血清中 Digoxin 濃度の測定とその臨床応用について. *心臓* **5**: 1682-1688, 1973
- 8) 金尾啓右, 本田 稔, 石原静盛他: <sup>125</sup>I を用いたラジオイムアッセイキット (PEG 法) による血清中ジゴキシン濃度の測定. *核医学* **12**: 637-644, 1975
- 9) 鈴木 伸, 田崎慎介, 土井 豊他: <sup>125</sup>I ジゴキシンキットによる血清ジゴキシンの Radioimmunoassay, *ホルモンと臨床* **25**: 75-79, 1977
- 10) Battaglia, DJ and ML Cianci: Iodine-125-digoxin radioimmunoassay: Comparison of commercial Kits, *J Nucl Med* **17**: 847-849, 1976
- 11) Smith TW, VP Butler Jr and E Haber: Character-

- ization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digoxin. *Biochemistry* **9**: 331-336, 1970
- 12) Doherty JE, WH Perkins and WJ Flanigan: The distribution and concentration of tritiated digoxin in human tissues. *Ann Int Med* **66**: 116-124, 1967
- 13) Smith TW: Digitalis toxicity: epidemiology and clinical use of serum concentration measurements. *Am J Med* **58**: 470-476, 1975
- 14) Ingelfinger JA and P Goldman: The serum digitalis concentration—Does it diagnose digitalis toxicity? *N Engl J Med* **294**: 867-870, 1976
- 15) Lasagna L: How useful are serum digitalis measurements? *N Engl J Med* **294**: 898-899, 1976