

《ノート》

試験管固相法による血中 Digoxin の Radioimmunoassay
 —スパック・ジゴキシン・キットに関する、基礎的ならびに臨床的検討—
 Fundamental and Clinical Evaluation of SPAC Digoxin Kit

森田 俊孝* 福地 稔* 永井 清保*

Toshitaka MORITA*, Minoru FUKUCHI* and Kiyoyasu NAGAI*

Division of Nuclear Medicine, RI Center, Hyogo College of Medicine

I. はじめに

ジギタリス剤が心不全の治療に広く活用されるようになってから、多くの人命が救われるようになった。ジギタリス配糖体および類似薬としては、digoxin, digitoxin, deslanoside, lanatoside C, strophanthin G, proscillarinなどが知られている。このうち digoxin は、腸管からの吸収および排泄が digitoxin と strophanthin の中に位置し、臨床的にも広く活用されている。

ジギタリス剤は、有効血中濃度と中毒発現濃度とがきわめて近接し、さらに吸収率や維持時間が、薬剤個々の性状以外に個体差により左右されるため、適確に投与することは必ずしも容易ではなかった。

一方、血中微量物質の測定法として、radioimmunoassay が広く普及するようになり、ジギタリス剤の血中濃度の測定にも応用されるまでになった^{1~3)}。ところが、初期には³Hで標識した方法が主流であったが、標識技術の進歩に伴い¹²⁵Iでの標識も可能となり、臨床的にも広く関心が向かれるようになった。

血中ジギタリス濃度の測定は、その検査目的から短時間に測定結果をうる必要があり、この主旨に沿ってより簡便な、より迅速な測定法の開発が種々試みられている。

今回、われわれは、最近、血中 digoxin 濃度の簡便迅速測定法として開発された試験管固相法について、基礎的および臨床的検討を行ったので、その成績につき報告する。

II. 方法および対象

検討には、スパック・ジゴキシン・キット（第一ラジオアイソトープ研究所製）を用い、実際の測定の手順は、Table 1 に示すごとく行った。

1. 基礎的検討

Table 1 Assay procedure of SPAC Digoxin Kit.

- | | |
|--|--------|
| 1. Add Digoxin Standards or Assay Samples to the antibody-coated tubes | 0.1 mL |
| 2. Add Tracer-Buffer Reagent | 1.0 mL |
| ↓ Incubate for 60 min at 37°C in water bath. | |
| 3. Decant the contents of the antibody-coated tubes. | |
| 4. Add distilled water to the antibody-coated tubes | 3.0 mL |
| 5. Decant the contents of the antibody-coated tubes. | |
| 6. Count the each assay tubes. | |
| 7. Determine the Digoxin concentration of each assay samples. | |

Key words: Radioimmunoassay, Digoxin, Antibody-coated tube

* 兵庫医科大学病院 RI センター診療部

受付：55年6月5日

最終稿受付：55年8月22日

別刷請求先：西宮市武庫川町1-1 (〒663)

兵庫医科大学病院

福地 稔

異なる8回の測定でえられた標準曲線を基に、その安定性と再現性を検討した。血中 digoxin 濃度の異なる2種の血清を用い、異なる6回の測定でえられたおののの測定値を基に、interassay における再現性を検討した。また、血中digoxin 濃度の異なる3種類の血清試料を用い、同一測定内($n=5$)における再現性についても合わせ検討した。血中 digoxin 濃度の異なる3種類の血清試料に、濃度の異なる5種の標準 digoxin を添加した際の回収率についても検討した。一方、血中 digoxin濃度が比較的高値を示す血清試料を1/1, 1/2, 1/4, 1/8, および1/16, と段階的に希釈した際の希釈曲線を求め、標準曲線との間の平行性の有無についても検討した。本測定系の特異性をみる目的で、digitoxin(日本トラベノール), deslasoside(藤沢薬品株式会社), estradiol(第一ラジオアイソotope研究所), progesterone(第一ラジオアイソotope研究所), および cortisol(栄研イムノケミカル)を本測定系に添加し、交叉性の有無とその程度をみた。また、インキュベーション時間および温度が本測定系にあたえる影響をみる目的で、インキュベーション時間を30分, 60分, 90分, および120分、とかえた際の標準曲線、およびインキュベーション温度を4°C, 25°C および37°Cとかえた際の標準曲線についても比較検討した。

2. 臨床的検討

本測定法の臨床的検討を目的として、昭和54年10月から昭和55年3月までの間に、兵庫医科大学病院 RI センター診療部に、血中 digoxin の測定の依頼のあった症例のうち、任意に選んだ104症例につき、その血中 digoxin 濃度を本測定法で測定した。この104検体には、臨床症状および心電図所見から、ジキタリス中毒の病状を伴う6例の血清試料が含まれていた。また、本測定法の評価を目的として、他の測定法によっても同時に測定し、両者でえられた測定値を比較した。なお、他の測定法としては、ジゴキシン・リアパック(科研化学)を使用した。

一方、血中 digoxin 濃度の測定をより迅速に行うため、標準 digoxin 濃度を0 ng/ml, 2.0 ng/ml,

5.0 ng/mlと3点採用した場合(以下、3 point assay と略す)と、0 ng/ml, 0.4 ng/ml, 1.0 ng/ml, 2.0 ng/ml, 3.0 ng/ml, 5.0 ng/mlとすべての標準digoxin濃度を採用した場合(以下 full point assay と略す)につき、えられた測定値を比較した。また、血中 digoxin 濃度の測定が散発的に依頼されることが多いことを考慮して、同一キットを分割して頻回にわたり使用した際の測定値についても合わせ比較検討した。

III. 成 績

1. 基礎的検討

異なる8回の測定でえられた標準曲線を、mean \pm S.D. で求め、Fig. 1 に示した。Fig. 1 でも明らかなごとく、良好な安定した標準曲線がえられた。各濃度における C.V. をみたところ、0.4 ng/ml で 2.2%, 1.0 ng/ml で 3.2%, 2.0 ng/ml で 5.0%, 3.0 ng/ml で 6.0%, 5.0 ng/ml で 6.7%, との成績がえられた。Interassay および intraassay における再

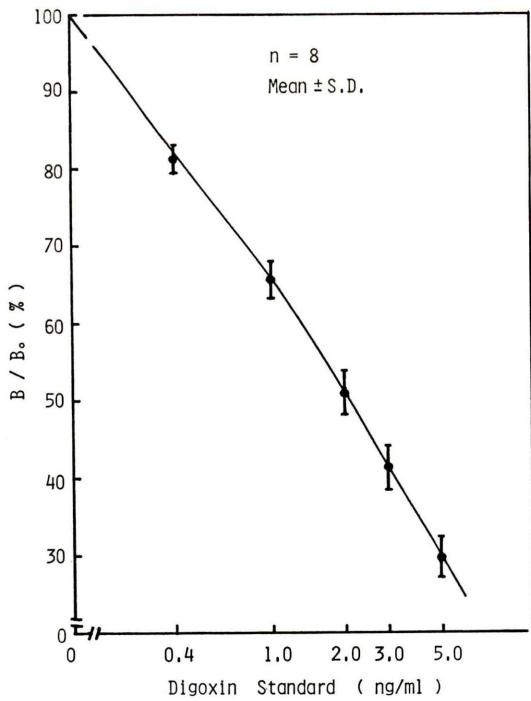


Fig. 1 Standard curve of SPAC Digoxin Kit.

現性をみた成績を、Table 2, で一括した。Table 2 でも明らかなごとく、interassay の再現性は、血清試料 A. で 8.1%, B. で 8.9% であった。また、intraassay における再現性は、血清試料 C. で 8.8%，D. で 4.7%，E. で 3.6% であった。異なる 3 種類の血清試料に添加した 5 種の標準 digoxin の回収率をみた成績を Table 3 で示した。Table 3, でも明らかなごとく、回収率は 70% から 120% の範囲を示し、平均 98.9% であった。

希釈試験の成績を Fig. 2 で示したが、標準曲線との間に良好な平行性を示すことが確かめられた。

本測定系の特異性を検討した成績を Fig. 3 で一括した。Estradiol, progesterone, および cortisol との間には、検討範囲内では有意の抑制効果を認めなかった。ところが、digitoxin および deslanoside との間には Fig. 3 で示すとき交叉性が認められた。インキュベーション時間および温度が本測定系の標準曲線にどのような影響をあたえるかをみた成績を Fig. 4 で示した。Fig. 4 でも明らかなごとく、インキュベーション時間が 30 分, 60 分, 90 分, 120 分と長くなる程、B/Bo (%) の低下が認められたが、60 分と 90 分の間には有意の差が認めら

Table 2 Interassay and intraassay reproducibility of SPAC Digoxin Kit.

I. Interassay reproducibility

No. of Assay	Assay result — ng/ml						C.V. (%)		
	1	2	3	4	5	6			
Sample A	3.05	3.00	3.50	3.50	3.70	3.65	3.40	0.27	8.09
Sample B	1.60	1.82	2.05	1.95	1.62	1.80	1.80	0.16	8.90

II Intraassay reproducibility

No. of Assay	Assay results — ng/ml					C.V. (%)		
	1	2	3	4	5			
Sample C	0.61	0.55	0.62	0.70	0.56	0.60	0.05	8.79
Sample D	2.05	2.30	2.30	2.20	2.10	2.19	0.10	4.65
Sample E	4.60	4.25	4.40	4.70	4.40	4.47	0.16	3.58

Table 3 Recovery of Digoxin added to serum samples in SPAC Digoxin Kit.

Serum Digoxin value (ng)	Added Digoxin (ng)	Assay result (ng)	Calculated value (ng)	Recovery (%)	Mean (%)
0.21	0.2	0.35	0.14	70	87
	0.5	0.61	0.40	80	
	1.0	1.02	0.81	81	
	1.5	1.55	1.34	89	
	2.5	3.12	2.91	116	
0.75	0.2	0.90	0.15	75	102
	0.5	1.28	0.53	106	
	1.0	1.80	1.05	105	
	1.5	2.35	1.60	106	
	2.5	3.70	2.95	118	
2.00	0.2	2.18	0.18	90	107
	0.5	2.52	0.52	104	
	1.0	3.20	1.20	120	
	1.5	3.75	1.75	116	
	2.5	4.70	2.70	108	

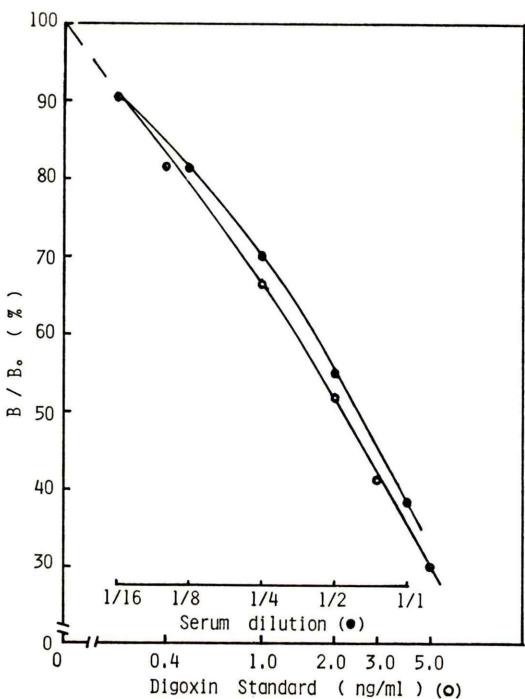


Fig. 2 Dilution curve of serum sample on SPAC Digoxin Kit.

れなかった。また、インキュベーション温度は、37°Cで最も良好な標準曲線がえられた(Fig. 4)。

2. 臨床的検討

血中 digoxin 濃度を測定した 104 例の測定結果を、その血中 digoxin 濃度を基に A, B, C, D の 4 群に分類し、Fig. 5 に一括した。これらの症例の血中 digoxin 濃度は 0.25 ng/ml から 7.4 ng/ml の範囲を示し、細部についてみると、0.5 ng/ml 以下を示す未飽和域症例が 7 例みられ、治療域である 0.5~2.0 ng/ml の範囲に 65 例が、治療域と中毒域の重複域である 2.0~3.0 ng/ml に 21 例が、また、中毒域とされている 3.0 ng/ml 以上の領域に 11 例がそれぞれ分布する成績がえられた。血中 digoxin 濃度が 3.0 ng/ml 以上を示す 11 例のうち、臨床症状および心電図所見から明らかな digoxin 中毒症状を有する症例は 6 例のみであったが、いずれも血中 digoxin 濃度は 3.5 ng/ml 以上であった。一方、これら 104 例の検体を同時に他の測定法でも測定し、両測定値を比較したところ、Fig. 6 に示すごとく両者の間には相関係数 $r=+0.962$ ($p<$

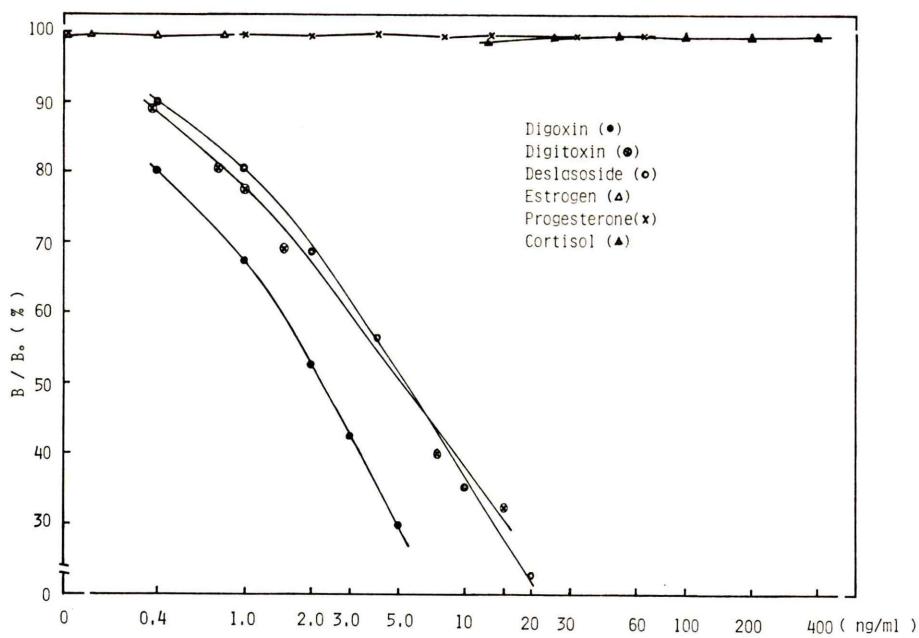


Fig. 3 Specificity of SPAC Digoxin Kit.

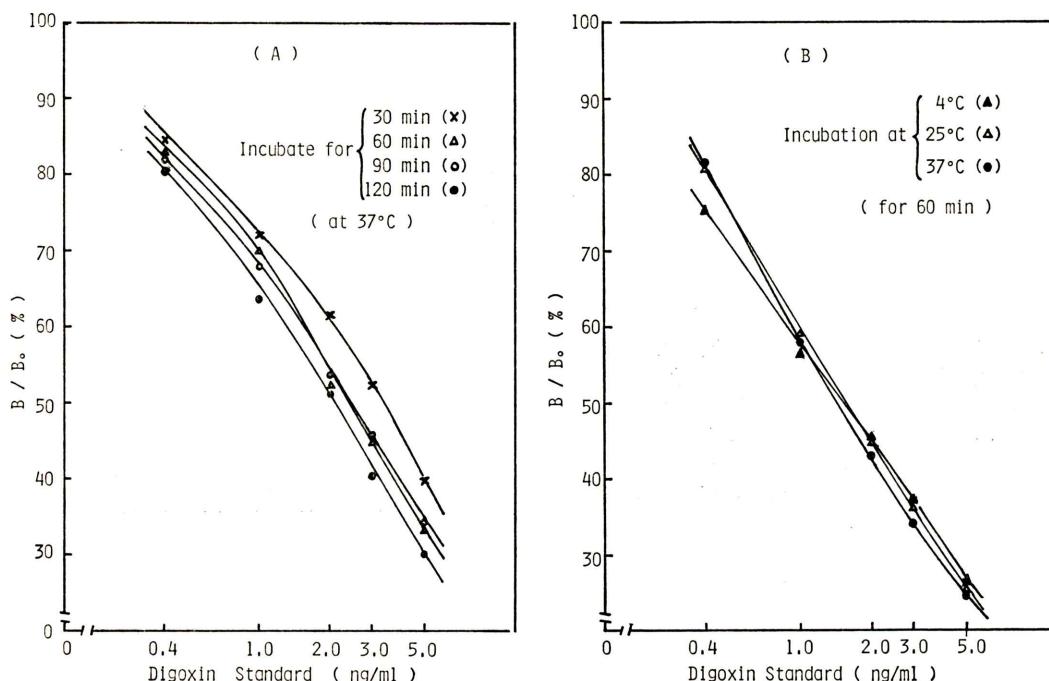


Fig. 4 Effect of incubation time and incubation temperature on standard curve of SPAC Digoxin Kit.

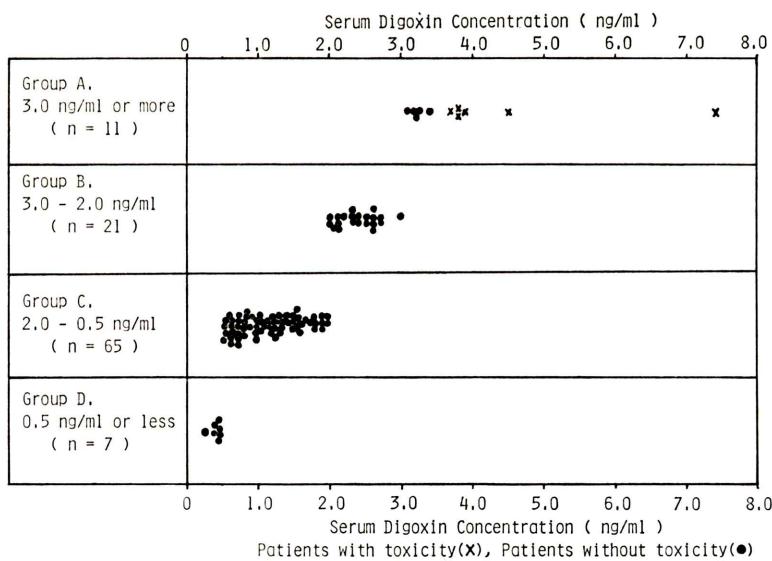


Fig. 5 Assay results of serum digoxin concentration by SPAC Digoxin Kit.

0.01), $y = 0.9x + 0.2$ と良好な相関関係を示すことが確かめられた。さらに測定に際し、標準 digoxin 濃度を 0 ng/ml, 0.4 ng/ml, 1.0 ng/ml, 2.0 ng/ml,

3.0 ng/ml, 5.0 ng/ml と 6 点使用した場合の各検体の測定値と、標準 digoxin 濃度を 0 ng/ml, 2.0 ng/ml, 5.0 ng/ml と 3 点使用した場合の各検体の

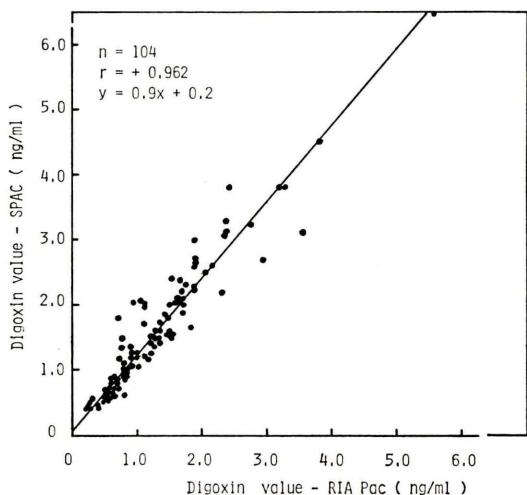


Fig. 6 Correlation of serum digoxin value between SPAC Digoxin Kit and Digoxin RIA PAC.

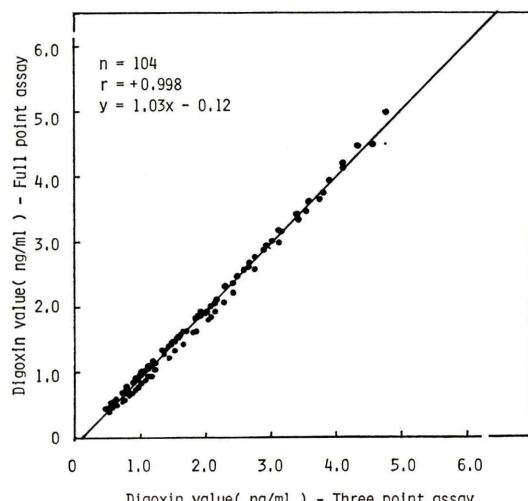


Fig. 7 Correlation of serum digoxin value between assay with full point standard and those with three point standard.

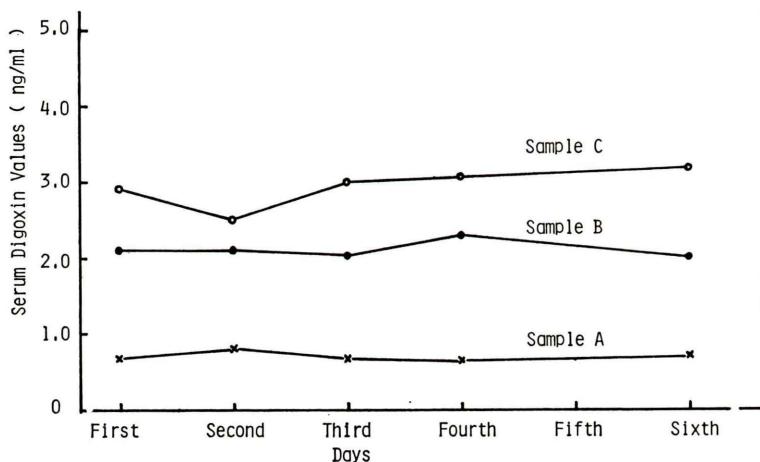


Fig. 8 Interassay reproducibility of serum digoxin value using same SPAC Digoxin Kit.

測定値を比較したところ、Fig. 7 のごとく両者の間には相関係数 $r=+0.998$, $y=1.03x-0.12$ と良好な相関が認められたが、絶対値についてみると、3点測定法がやや高値を示す傾向にあった。一方、スパック・ジゴキシン・キットを少量分割使用した際の同一キット内での測定値をみた成績を Fig. 8 で示した。Fig. 8 でも明らかなごとく、6日目までの検討では、血清試料 A の C.V. は 8.3%, B の C.V. は 6.4%, C の C.V. は 7.8% と

なり、いずれも interassay の C.V. の範囲にとどまることが確かめられた。

IV. 考 案

従来、ジギタリス剤の投与法として、飽和療法が代表的であった。近年、ジギタリス剤の陽性変力作用は、正常筋でも dose dependent に起ることが知られるようになり、強力な利尿剤の出現や血中ジギタリス濃度測定法の確立とあいまって初期

投与時から維持量を投与する方法がとられるようになった⁴⁾。ところがジギタリス剤は、有効血中濃度と中毒発現濃度とがきわめて近接している上に、吸収率や維持時間に個体差があり、その使用は決して単純とはいえない。事実、Smith ら⁵⁾は、ジギタリス剤投与患者に高率に中毒症状が認められることを指摘している。ジギタリス中毒の程度は、投与量と関係し、投与量は血中ジギタリス濃度と関係することが明らかにされ⁶⁾、特に心筋中の濃度と血中濃度との比が一定であることも明らかとなっている^{7,8)}。このように臨床的には、血中ジギタリス濃度を測定することがきわめて有用であるといえる。事実、歴史的にもジギタリス剤測定法の開発が種々試みられてきた^{9~11)}。ところが、臨床的に広く利用されている digoxin は、血中濃度が微量のため、その測定法の確立は、他の製剤に比べ一段と困難であると考えられていた。しかし、1967年 Butler ら¹²⁾により digoxin に特異的な抗体の作成が成功し、これを契機として Smith ら¹⁾により digoxin の radioimmunoassay (RIA) が確立され、一躍注目を集めた。血中 digoxin の RIA として、初期には ³H で標識した方法が主であったが、³H はその取り扱いが煩雑で、一般的普及の障害となっていた。近年、放射性同位元素による標識技術の進歩に伴い、¹²⁵I による標識が可能となり、臨床的にも広く関心が向けられるようになった。血中 digoxin の測定は、その目的から迅速に測定結果がえられることが絶対的条件であるといえる。そのため種々の工夫が試みられてきたが、その中心は、B., F. 分離にあったといえる。すなわち、初期にはチャコール法や二抗体法が応用されていたが、その後 PEG 法が提供され、さらにより簡便に、より迅速に測定結果をうるために、固相法の中でも最も進んだ方法といえる抗体チューブ法が開発された。今回、われわれが検討したスパック・ジゴキシン・キットがその抗体チューブ法であるが、あらかじめ測定試験管に抗 digoxin 抗体を結合させているため、B., F. 分離に必要な一連の機器や操作が不要であり、取り扱いもきわめて簡便となっている。すなわち、抗体チ

ューブに標準 digoxin または測定試料と ¹²⁵I-digoxin を添加、37°C で60分インキュベーション後、反応液を除去し、洗浄後放射活性を測定することで測定値をうることができる。スパック・ジゴキシン・キットは、すでに成績で示したごとく、測定法に要求される諸条件、すなわち標準曲線の安定性、同一測定内および異なる測定間での再現性、回収率、希釈試験、特異性など、いずれも満足できる成績であった。特異性については、検討範囲内では digitoxin と deslasoside で交叉性が認められたが、抗 digoxin 抗体に対し、digoxin と構造の似たものにあっては高い交叉性を示すことがすでに知られており¹³⁾、特に問題となる成績とはいえない。一方、実際の臨床応用の成績でも、臨床病態をよく反映したきわめて有用な病態情報がえられた。血中 digoxin 濃度の測定の意義は、投与量や投与方法が適切であるか否かを知ることにあるといえる。その点、われわれが今回測定した104例の血中 digoxin 濃度は、未だ飽和域に達していないものが 7 例、治療域 (0.5~2.0 ng/ml) にあるものが 65 例、治療域と中毒域の境界域 (2.0~3.0 ng/ml) にあるものが 21 例、中毒域 (3.0 ng/ml 以上) にあるものが 11 例であった。これらの成績は、いずれも臨床上、その後の治療方針の決定にきわめて有用であった。ところが、中毒域にある 11 例中、臨床症状や心電図所見などから明らかに中毒症状を有すると判断できたのは 6 例であり、その血中 digoxin 濃度はいずれも 3.5 ng/ml 以上であった。残りの 5 例は、臨床的にも全く中毒症状を有しないため、その理由につき検討したところ、全例が digoxin 投与からサンプリングまでの時間が短すぎた例であった。投与された digoxin の血中濃度が組織内濃度を反映するのは、静注で 3~4 時間、経口投与で 6~8 時間、筋注で 10~12 時間後とされている⁴⁾。これらの点を十分考慮してサンプリングを行う必要があるといえる。しかし、実際には、4 時間おきの digoxin 投与をうけている症例もあり、単に血中 digoxin 濃度を基に digoxin 中毒を論ずることには問題があり、当然のことながら、臨床症状や心電図所見も合せ考慮

する必要があると思われた。一方、血中 digoxin 濃度の測定は、臨床的には緊急検査的性格を持つといえる。したがって、検体が一定数に達してから検査を施行するという方法は許されない。そのためには、キットを分割して使用することや、標準 digoxin を最低限に割愛することも考慮せざるをえない場合がありうる。これらに関連して、今回われわれは、キットの分割使用を試みたが、十分分割使用が可能との結論であった。ところが、標準 digoxin については、キットに含まれるすべての標準品を使用する、いわゆる full point assay と 0, 2.0, 5.0 ng/ml の 3 つの標準品を使用する、いわゆる 3 point assay とを比較したところ、両者でえられた血清 digoxin の測定値は、相関係数 $r = +0.998$, $y = 1.03x - 0.12$ と良好な相関関係が認められたが、個々の絶対値についてみると、3 point assay でやや高値となる傾向にあり、慎重をきすためには、キットに含まれるすべての標準品を使用する full point assay が望ましいと考えられた。一方、他の測定法と比較した成績では、両者の間に良好な相関が認められ、本測定法が測定値においても十分満足できることを示す成績がえられた。

V. 結 語

今回、われわれが検討したスパック・ジゴキシン・キットは、抗 digoxin 抗体をあらかじめ試験管に結合させた、いわゆる抗体チューブ法であるため、B., F. 分離が不要で、60 分で反応を終えることができる。しかも、測定法に要求される諸条件を十分満足しており、臨床応用の成績や、他の測定法と比較した成績から、臨床的に有用との結論をえた。一方、血中 digoxin 濃度の測定にあって、キットを分割して使用することも可能であり、臨床的要求に十分こたえうる測定法といえる。また、サンプリングに際しては、血中濃度が組織内濃度を反映する時期を十分考慮して採血する必要がある。

稿を終るにあたり、スパック・ジゴキシン・キットの提供をいただいた、第一ラジオアイソトープ研究所に謝意を表します。

文 献

- Smith TW, Butler VP Jr and Haber E: Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentration by radioimmunoassay. *New Engl J Med*, **281**: 1212-1216, 1969
- Smith TW, Butler VP Jr and Haber E: Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digitoxin. *Biochemistry*, **9**: 331-337, 1970
- Smith TW: The clinical use of serum cardiac glycoside concentration measurements. *Amer Heart J*, **82**: 833-837, 1971
- 関 隆: 強心配糖体. *新薬と治療* **30**: 28-30, 1980
- Smith TW: Digitalis toxicity; Epidemiology and clinical use of serum concentration measurements. *Amer J Med*, **58**: 470-476, 1975
- Smith TW and Haber E: Digitoxin intoxication; the relationship of clinical presentation to serum digoxin concentration. *J Clin Invest*, **49**: 2377-2386, 1970
- Doherty JE and Perkins WH: Tissue concentration and turnover of tritiated digoxin in dogs. *Amer J Cardiol*, **17**: 47-52, 1966
- Doherty JE, Perkins WH and Flanigan WJ: The distribution and concentration of tritiated digoxin in human tissues. *Ann Intern Med*, **66**: 116-124, 1967
- Lowenstein JM and Corrill EM: An improved method for measuring plasma and tissue concentration of digitalis glycosides. *J Lab Clin Med*, **67**: 1048-1052, 1966
- Lukas DS and Peterson RE: Double isotope dilution derivative assay of digitoxin in plasma, urine, and stool of patients maintained on the dog. *J Clin Invest*, **45**: 782-795, 1966
- Burnett GH and Conklin RL: The enzymatic assay of plasma digitoxin levels. *J Lab Clin Med*, **71**: 1040-1044, 1968
- Butler VP Jr and Chen JP: Digitoxin-specific antibodies. *Proc Nat Acad Sci*, **57**: 71-78, 1967
- 開原成允, 太田昭夫: 血中 Digoxin の Radioimmunoassay, *内科* **30**: 434-438, 1972