

《ノート》

血中 Digoxin の Radioimmunoassay

—Amerlex 抗 digoxin 血清懸濁液を用いた方法
に関する基礎的検討とその臨床応用—

Fundamental and Clinical Evaluation of Amerlex Digoxin Radioimmunoassay 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

Digitalis 剤は、古くから臨床的に広く活用されている。Digitalis 配糖体、およびその類似薬には、digoxin, digitoxin, deslanoside, lanatoside C, strophanthidin G, proscillarin などが知られている。とりわけ、digoxin は、腸管からの吸収および排泄が digitoxin と strophanthidin の中間に位置するため、臨床的にも広く利用されている。

Digitalis 製剤は、治療に必要な量、つまり有効血中濃度と、中毒をおこす量、つまり中毒発現濃度とが近接し、さらに吸収率や、血中からの消失速度が、それぞれの薬剤個別の性状以外に、投与された患者により異なる。一方、digitalis 剤の中毒症状である不整脈が、本来の心疾患に由来するものかどうかの区別が容易でない。したがって日常臨検上、digitalis 製剤を適確に投与することは、必ずしも簡単だとはいえない^{1~3)}。

心筋内 digoxin 濃度と、血中 digoxin 濃度とはよく相関することから⁴⁾、血中 digoxin 濃度を

digitalis 治療の指標にしようとする試みに関心が向けられるようになった。

一方、ラジオイムノアッセイの登場によって、血中 digitalis 濃度の測定が容易となった。初期には、³H で標識する方法が中心であったが、放射性同位元素による標識技術の進歩により、¹²⁵I による標識が可能となり、日常臨床検査法として活用されるまでになった。

血中 digitalis 濃度の測定は、その測定目的から、短時間に、簡便に測定結果がえられることが必要である。そのため、簡便に、迅速に、しかも正確に測定する方法の開発が種々試みられている。

今回、われわれは、固相法のもつ簡便性と迅速性と、溶液性のもつ均一性とを合わせ持つ、Amerlex 粒子に抗 digoxin 抗体を結合させた懸濁液を用いる新しい方法につき、その基礎的検討と臨床応用を試みたので、その成績につき報告する。

II. 方法および対象

検討には、Amerlex Digoxin radioimmunoassay system (科研化学株式会社) を用い、実際の手順は Fig. 1 に示すごとく行った。

* 兵庫医科大学病院 RI センター診療部

受付：57年2月1日

最終稿受付：57年5月17日

別刷請求先：西宮市武庫川町1-1 (番663)

兵庫医科大学病院 RI センター診療部

森 田 俊 孝

Key words: Digoxin, Radioimmunoassay, Solid phase, Amerlex.

Fig. 1 Assay procedure of Amerlex Digoxin radioimmunoassay system.

- (1) Standards or Assay samples 50 μ l
- (2) I-125-Digoxin solution 200 μ l
- (3) Amerlex-Anti-digoxin antibody solution 200 μ l
- Mix carefully
and incubate for 30 min at room
temperature
- (4) Centrifuge for 20 min at 1,500 g in room
temperature
- (5) Decant the incubation mixture
- (6) Count and calculate the assay results

1. 基礎的検討

1) 標準曲線に関する検討

異なる5回の測定でえられた標準曲線を mean \pm S.D. で求め、感度、安定性、および再現性につき検討した。

2) 特異性に関する検討

本測定法に用いられている抗体の特異性をみる目的で、 β -methyl-digoxin, digitoxin および digoxin を、本測定系に添加し、抑制効果の有無と、その程度につき検討した。

3) 回収率に関する検討

血清試料に、濃度の異なる5種類のdigoxinを添加した際の、回収率について検討した。

4) 再現性に関する検討

濃度の異なるおのの3種類の血清試料を用い、同一測定内($n=5$)、および異なる5回の測定間ににおける再現性を検討した。

5) 希釈試験に関する検討

比較的血中 digoxin 濃度が高値を示す血清を用い、1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 と段階的に希釈し、その際の希釈曲線と標準曲線との間の平行性の有無を検討した。

2. 臨床的検討

1) 本測定法の臨床応用

本測定法の臨床的評価を目的として、血中 digoxin 濃度の測定を依頼された145症例につき、本測定法でその血中 digoxin 濃度を測定した。これらの症例の中には、臨床的症状および心電図所見などから、digitalis 中毒の症状を伴う1例が含まれていた。また、治療経過中の血中 digoxin 濃

度を経時に測定依頼された7例について測定し、血中 digoxin 濃度測定が臨床的にどのように活用されているかをさぐらんとした。

2) 従来法との測定値の比較

血中 digoxin 濃度を測定した187検体については、さらに従来法、すなわち Digoxin RIA Pack (科研化学株式会社)でも、血中 digoxin 濃度を測定し、両測定法でえられた測定値を比較した。

3) 同一キットの分割使用に関する検討

臨床的には、血中 digoxin 濃度の測定が、散発的に依頼され、しかも直ちに測定し、その結果を報告する必要がある。そこで、同一測定キットを分割頻回使用することの可否につき、測定値をもとに比較検討した。

4) 3 point assay と full point assay の比較に関する検討

血中 digoxin 濃度の測定を、より迅速に行う目的で、標準 digoxin 濃度を 0.33 ng/ml, 1.47 ng/ml, 5.03 ng/ml と 3 点使用した場合(以下、3 point assay と略す)と 0 ng/ml, 0.33 ng/ml, 0.66 ng/ml, 1.47 ng/ml, 2.63 ng/ml, 5.03 ng/ml と総ての標準 digoxin 濃度を使用した場合(以下 full point

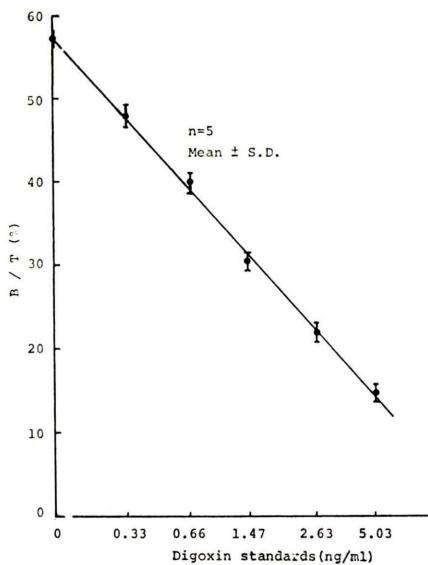


Fig. 2 Standard curve of Amerlex Digoxin radioimmunoassay system.

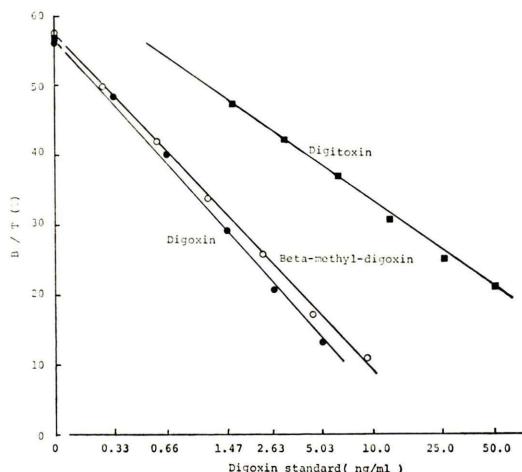


Fig. 3 Specificity of Amerlex Digoxin radioimmunoassay system.

assay と略す) につき 187 検体を用いえられた測定値を比較した。

III. 成 績

1. 基礎的検討

1) 標準曲線に関する検討

異なる 5 回の測定でえられた標準曲線を $mean \pm S.D.$ で求め、Fig. 2 に示した。Fig. 2 でも明らかなごとく、直線性を示す良い安定した標準曲線がえられることが確かめられた。

2) 特異性に関する検討

Table 1 Recovery of digoxin added to serum sample measured by Amerlex Digoxin radioimmunoassay system.

Serum value (ng/ml)	Added digoxin (ng/ml)	Assay results (ng/ml)	Recovery	
			Calculated value (ng/ml)	percent (%)
0.339	0.165	0.478	0.139	84.2
	0.330	0.679	0.340	103.0
	0.735	1.090	0.751	102.2
	1.320	1.490	1.151	87.2
	2.520	2.930	2.591	102.8
			Mean	95.88

本測定系に用いられている抗 digoxin 抗体の特異性をみた成績を Fig. 3 で示した。現在、臨床的によく利用されている β -methyl-digoxin と標準 digoxin とは、ほぼ同様の抑制を示す成績がえられた。ところが digitoxin との交叉性は、digoxin を 100% としたとき、5.4% の交叉性が認められた。

3) 回収率に関する検討

血清試料に、濃度を異にする 5 種類の digoxin を添加し、その回収率を求めた成績を Table 1 で示した。回収率は、87.2% から 102.8% の範囲を示し、平均 97.0% であった。

4) 再現性に関する検討

濃度の異なるおののおの 3 種類の血清試料を用い、同一測定内 ($n=5$)、および異なる 5 回の測定間に

Table 2 Intraassay and interassay reproducibility of Amerlex Digoxin radioimmunoassay system

(1) Intraassay reproducibility

No. of assay	Assay results (ng/ml)							C. V. (%)
	1	2	3	4	5	Mean	S. D.	
Sample A	0.41	0.45	0.44	0.39	0.38	0.41	0.03	6.6
Sample B	1.21	1.23	1.24	1.24	1.22	1.24	0.03	2.2
Sample C	3.19	3.11	3.08	3.17	3.10	3.13	0.04	1.4

(2) Interassay reproducibility

No. of assay	Assay results (ng/ml)							C. V. (%)
	1	2	3	4	5	Mean	S. D.	
Sample D	0.47	0.44	0.47	0.47	0.49	0.47	0.02	3.5
Sample E	1.21	1.24	1.38	1.43	1.24	1.30	0.09	6.8
Sample F	3.28	3.14	3.13	3.24	3.06	3.17	0.08	2.5

おける再現性を検討した成績を Table 2 に一括した。同一測定内における再現性は C. V. でみると 6.6%, 2.2%, 1.4% であった。一方、異なる 5 回の測定間の再現性を C. V. でみると 3.5%, 6.8%, 2.5% であった。

5) 希釈試験に関する検討

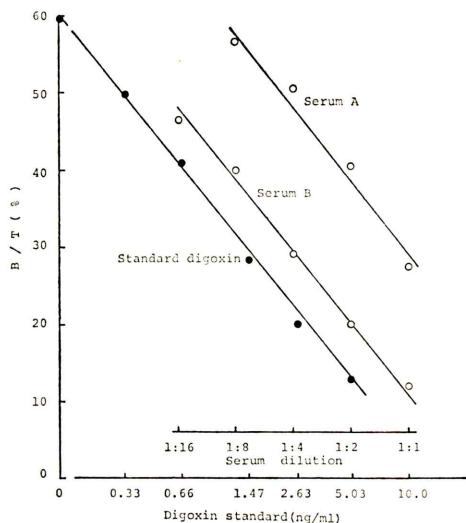


Fig. 4 Dilution test of serum digoxin measured by Amerlex Digoxin radioimmunoassay system.

血中 digoxin 濃度の異なる 2 種類の血清試料を用い希釈試験を行った成績を Fig. 3 で一括した。Fig. 4 でも明らかにごとく、希釈曲線と標準曲線との間には、良好な平行性を示すことが確かめられた。

2. 臨床的検討

1) 本測定法の臨床応用

本測定法で血中ジゴキシン濃度を測定した 145 例の測定結果を、その測定値をもとに A, B, C, D の 4 群に分類し、Fig. 5 でまとめた。これら症例の血中 digoxin 濃度は 0.11 ng/ml から 5.08 ng/ml の範囲を示した。細部についてみると、0.5 ng/ml 以下の未飽和域症例が 17 例、治療域である 0.5~2.0 ng/ml の範囲に 117 例が、治療域と中毒域の重複域である 2.0~3.0 ng/ml に 9 例が、また、中毒域とされている 3.0 ng/ml 以上の領域に 2 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 2 例のうち、臨床症状および心電図所見などから明らかに digitalis 中毒症状を有する症例は 1 例で、他の 1 例は臨床的に全く中毒症状を認めえなかった。

また、経時的に血中 digoxin 濃度の測定を行った 7 例については、その経時的血中 digoxin 濃度

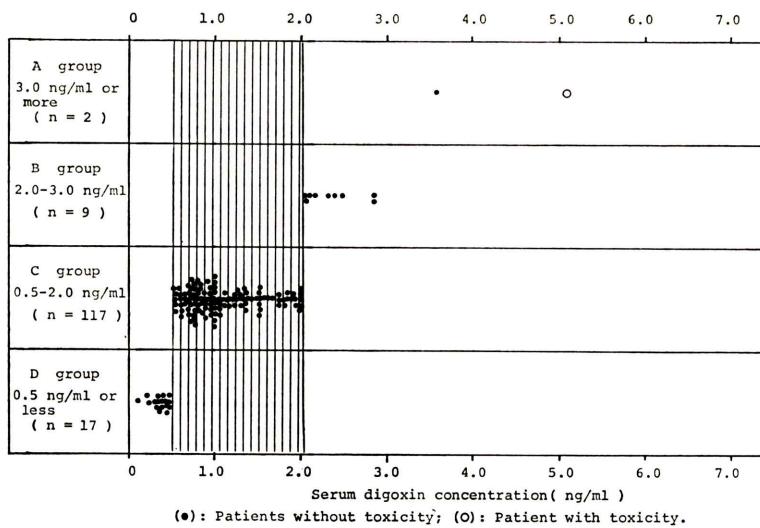


Fig. 5 Assay results of serum digoxin concentration measured by Amerlex Digoxin radioimmunoassay system in various cardiac diseases.

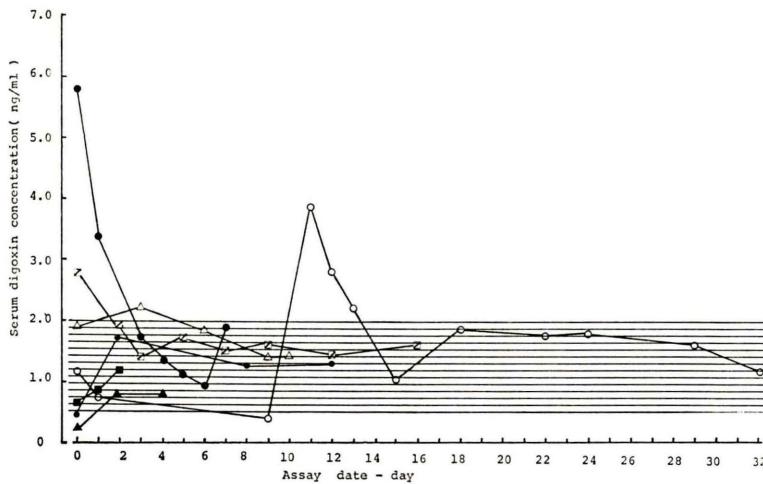


Fig. 6 Changes of serum digoxin levels in the course of digoxin treatment in seven patients with various cardiac diseases.

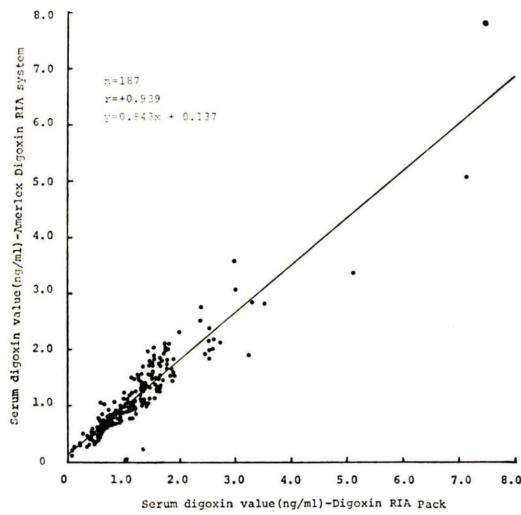


Fig. 7 Correlation of serum digoxin value between Amerlex Digoxin radioimmunoassay system and Digoxin RIA Pack.

を Fig. 6 で一括した。

2) 他の測定法との測定値の比較

本測定法で血中 digoxin 濃度を測定した 187 検体については、同時に他の測定法、すなわち Digoxin RIA Pack でもその血中 digoxin 濃度を測定し、両測定法でえられた測定値を比較した (Fig. 7)。両者の間には $r=+0.939$ 、回帰直線 $y=0.843x+0.137$ と良好な相関関係が認められた。

3) 同一キットの分割使用に関する検討

本測定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、血中 digoxin 濃度の異なる 3 種類の血清試料を用い検討した成績を Table 3 で一括した。Table 3 でも明らかなごとく 6 日目までの分割使用では、C. V. はおのおの 4.1%, 6.7%, 2.5% となり、異なる測定間における C. V. の範囲にとどまることが確かめられた。

Table 3 Interassay reproducibility of serum digoxin value measured by a same Amerlex Digoxin radioimmunoassay kit.

Assay date	Assay results (ng/ml)						C. V. (%)	
	First day	2 days after	3 days after	4 days after	6 days after	Mean		
Sample A	0.472	0.474	0.438	0.499	0.472	0.471	0.02	4.14
Sample B	1.206	1.244	1.375	1.431	1.240	1.299	0.09	6.74
Sample C	3.131	3.141	3.281	3.057	3.241	3.170	0.08	2.54

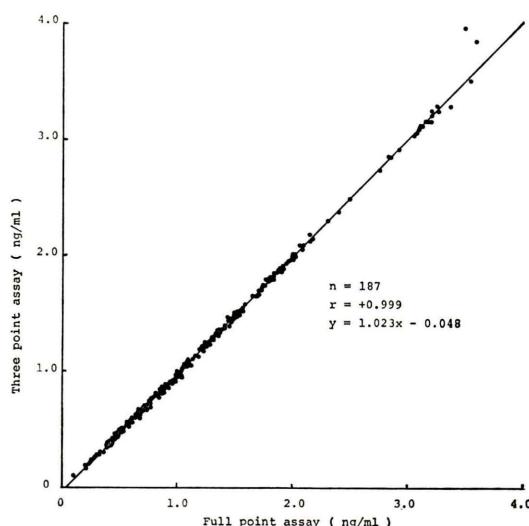


Fig. 8 Correlation of serum digoxin value between assay with three point standards and those full point standards.

4) 3 point assay と full point assay の比較に関する検討

血中 digoxin 濃度の測定を、より迅速に行う目的で、3 point assay の可否につき 187 検体を用い full point assay と比較した成績を Fig. 8 に一括した。両者の間には、相関係数 $r = +0.999$ 、回帰直線 $y = 1.023x - 0.048$ と良好な相関関係が認められた。

IV. 考 案

Digitalis 剤の投与方法として、飽和療法が主流であった。しかし、digitalis 剤の陽性変力作用は、正常筋でも dose dependent に起こることが明らかにされ、すぐれた利尿剤の普及や、血中 digitalis 濃度の測定が可能となったこととあいまって、初期投与時から維持量を投与する方法にかわってきた⁸⁾。しかし、digitalis 剤は、有効血中濃度と、中毒発現濃度がきわめて近接している上に、吸収率や維持時間が患者により異なるため、その使用は決して単純ではなかった。事実 Smith ら⁹⁾は digitalis 剤投与患者に高率に中毒症状が認められると指摘している。Digitalis 中毒の程度は、投与

量と関係し、投与量は血中 digitalis 濃度と関係することが知られるようになり¹⁰⁾、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にされている^{4,11)}。以上の理由により臨床的には、血中 digitalis 濃度を測定することは、きわめて意義のあることだといえる。そのために血中 digitalis 量の測定が種々試みられてきた^{12~14)}。しかし、臨床的に広く利用されている digoxin は、血中濃度が微量であるため、その測定法の確立は、他の製剤に比べ一段と困難であった。1967 年、Butler ら¹⁵⁾により digoxin に特異的な抗体の作成が成功し、これを機会に、Smith ら⁵⁾により、digoxin のラジオイムノアッセイの確立が報告された。血中 digoxin のラジオノムノアッセイとしては、最初 ^3H による標識がほとんどであったため、取扱いが煩雑で臨床検査法として注目されるまでは至らなかった。近年、放射性同位元素による標識技術の進歩にともない、 ^{125}I による標識が可能となり、臨床的にも関心が向けられるようになった。血中 digoxin の測定は、その目的から簡便で迅速に測定結果がえられることが必要条件となる。この主旨に沿って、種々工夫がなされてきたが、その中心は B·F 分離法の改良にあったといえる。つまり、初期にはデキストラン炭末法や二抗体法が利用されていたが、その後 Polyethylene glycol 法が提供され、さらに簡便に迅速に測定結果がえられる固相法に関心が向けられるようになった。

今回、われわれが検討した Amerlex Digoxin radioimmunoassay system は、一定の直径を有する Amerlex 粒子に抗 digoxin 抗体を安定結合させ、長時間にわたり一様な懸濁状態を保ち、遠心分離により簡単に液相から分離できるように工夫されているため B·F 分離が簡便となっている。測定の手順も、Table 1 で示したごとく室温で 30 分間反応させることでよく、迅速に測定結果をうることができる。本測定法は、すでに成績の項で示したごとく、測定法に要求される諸条件、すなわち、感度、精度、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、特異性などで満足できる成績がえられた。特に特異性の検討で、標準 digoxin と β -methyl-digoxin とは、ほぼ同様の抑制効果を示す結果であった。現在、 β -methyl-digoxin は臨床的に広く利用されている薬剤であり、本測定法の臨床的有用性を示す成績といえる。一方、実際の臨床応用の成績でも、患者の管理上有用な情報がえられた。血中 digoxin 濃度の測定意義は、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、今回、本測定法を用いわれわれが検討した 145 例の血中 digoxin 濃度は、未だ飽和域に達していないものが 17 例、治療域にあるもの 117 例、治療域と中毒域の境界域にあるもの 9 例、中毒域にあるものが 2 例であった。これらの成績は、その後の患者の治療にきわめて有用であった。特に今回の検討で臨床的に注目された点が 2 点あった。その一つは Fig. 6 で示したごとく、血中 digoxin 濃度の測定が、投与量の指標に活用されていることが確認できたことである。さらにもう一つは、治療域にある症例が 80.7% とほとんどを占め、治療域と中毒域の境界域にある症例が 6.2%、中毒域にある症例が 1.4%、未飽和域にある症例が 11.7% であったことである。以前に同様の検討を行った成績¹⁶⁾では、治療域にある症例が 62.5%，治療域と中毒域の境界域にある症例が 20.2%，中毒域にある症例が 10.6%，未飽和域にある症例が 6.7% であった。今回の成績と比べると、治療域と中毒域との境界域の症例および中毒域の症例が著しく減少していることがわかる。その理由として、サンプリングが適切に行われるようになったことを挙げることができる。投与された digoxin の血中濃度が、組織内濃度を反映するのは、静注法で 3~4 時間後、経口法で 6~8 時間後、筋注法で 10~12 時間後とされている⁸⁾。血中 digoxin 濃度の測定に際しては、これらの点を十分考慮に入れてサンプリング時間を決める必要がある。血中 digoxin 濃度の測定が臨床検査法として定着するにつれ、この点への配慮が広く普及したものといえる。しかし、今回の検討で中毒域にある 2 例のうち、臨床的にも、また心電図所見などからも、

明らかに中毒症状を有すると判断できたのは 1 例のみであり、他の 1 例は digoxin 投与からサンプリングまでの時間が短かったためと考えられる症例であった。このことは、血中 digoxin 濃度の測定に際し、サンプリング時期がきわめて重要であることを示すとともに、単に血中 digoxin 濃度のみで digoxin 中毒を論ずることに問題があることを示しているといえる。

一方、血中 digoxin 濃度の測定は、臨床的には緊急検査に属する。したがって、検体が一定数に達してから測定するという体制は許されない。そのためには、同一キットを数回に分割して使用することや、標準 digoxin の数を必要最少限使用するなどの方法も考慮する必要がある。これに関し、今回、われわれは、キットの分割使用の可否を検討したが、Table 3 に示したごとく Amerlex Digoxin radioimmunoassay system では特に問題はないとの結論であった。一方、標準 digoxin の数については、キットに含まれている総ての標準品を使用する、いわゆる full point assay と、3 種類の標準品を使用する、いわゆる 3 point assay につき比較したが、Fig. 8 に示したごとく、十分臨床的に利用できることが確かめられた。しかし、時間の節約という点からは、期待した程の利点はなく、むしろ慎重をきすには、いわゆる full point assay が望ましいとの結論であった。

他の測定法との比較では、両者の間に良好な相関が認められ、細部についてみても特に問題がないことから、本測定法でえられる測定値についても十分信頼できるとの成績であった。

V. 結 語

Amerlex Digoxin radioimmunoassay system につき検討し、以下の結論をえた。

- 1) 固相法であるため B·F 分離が容易で、室温で、わずか 30 分インキュベートすることで測定に必要な反応を終えることができる。
- 2) 本測定系は、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などから、臨床検査法として有

用との結果をえた。

- 3) 実際の運用にあたっては、同一キットを分割して使用することが可能である。
- 4) 血中 digoxin 濃度の測定にあたっては、血中濃度が組織内濃度を反映する時期を考慮してサンプリングを行う必要がある。

稿を終わるにあたり、Amerlex Digoxin radioimmunoassay system を提供いただいた科研化学株式会社に謝意を表します。

文 献

- 1) 宮下英夫, 他: ジギタリスと利尿薬治療の進歩と実際. 内科 **33**: 657, 1974
- 2) 村上元孝, 他: 心不全の考え方と治療. 内科 **33**: 670, 1974
- 3) 開原成允: ジギタリス剤, ラジオイムノアッセイ (入江実編) p 376, 講談社, 1973
- 4) Doherty JE, et al: The distribution and concentration of tritiated digoxin in human tissues. Ann Int Med **66**: 116, 1967
- 5) Smith TW, et al: Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentration by radioimmunoassay. New Engl J Med **281**: 1212, 1969
- 6) Smith TW, et al: Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glyco-
- side digitoxin. Biochemistry **9**: 331, 1970
- 7) Smith TW: The clinical use of serum cardiac glycoside concentration measurements. Amer Heart J **82**: 883, 1971
- 8) 関 隆: 強心配糖体. 新薬と治療 **30**: 28, 1980
- 9) Smith TW: Digitalis toxicity: Epidemiology and clinical use of serum concentration measurement. Amer J Med **58**: 470, 1975
- 10) Smith TW, Haber E: Digitoxin intoxication; the relationship of clinical presentation to serum digoxin concentration. J Clin Invest **49**: 2377, 1970
- 11) Doherty JE, Perkins WH: Tissue concentration and turnover of tritiated digoxin in dog. Amer J Cardiol **17**: 47, 1966
- 12) Lowenstein JM, Corrill EM: An improved method for measuring plasma and tissue concentration of digitalis glycosides. J Lab Clin Med **67**: 1048, 1966
- 13) Lukas DS, 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, 1966
- 14) Burnett GH, Conklin RL: The enzymatic assay of plasma digitoxin levels. J Lab Clin Med **71**: 1040, 1968
- 15) Butler VP Jr, Chen JP: Digitoxin-Specific antibodies. Proc Nat Acad Sci **57**: 71, 1967
- 16) 森田俊孝, 他: 試験管固相法による血中 Digoxin の Radioimmunoassay—スペック, ジゴキシン・キットに関する基礎的ならびに臨床的検討—. 核医学 **18**: 353, 1981