

《原著》

## 血中 Digoxin 濃度の Radioimmunoassay による測定

久保田 治代\* 黒崎 浩巳\*\* 開原 成允\*  
飯尾 正宏\* 村尾 覚\* 太田 昭夫\*\*\*

### 緒 言

1960年 Berson と Yalow<sup>1)</sup> が radioimmunoassay をインシュリンの測定に導入して以来各種の蛋白性ホルモンの定量に著しい効果を発揮してきた。最近では抗体作製法の進歩によって radioimmunoassay によって測定し得る物質は polypeptide や steroid にまで及ぶようになった。

1967年 Butler<sup>2)</sup> 等は digoxin に対する抗体の產生に成功し、radioimmunoassay による血清中 digoxin 濃度の測定を可能にした。

次いで、1969年 Smith<sup>3)</sup> 等によってこの方法が確立された。

著者等は、これらの報告をもとにして抗体を作製し血清 digoxin 濃度の radioimmunoassay による測定を試み、測定法について改良を加え臨床的に充分用い得るとの結論を得たのでその結果を発表する。

### I 抗体の作製

#### 1. 方法

##### a) 人工抗原の作製

digoxin (Dig) の分子量は 780 と小さいため、それ自身単独では、抗原性を有しない。そこで高分子化合物である bovine serum albumin (BSA) と結合させ Dig-BSA conjugate を作製して抗原として用いた。

Coupling は Butler, Chen 等の方法に準じて行なっ

た。方法は図 1 に示した通りで、その詳細は原著<sup>2)</sup> を参考されたい。

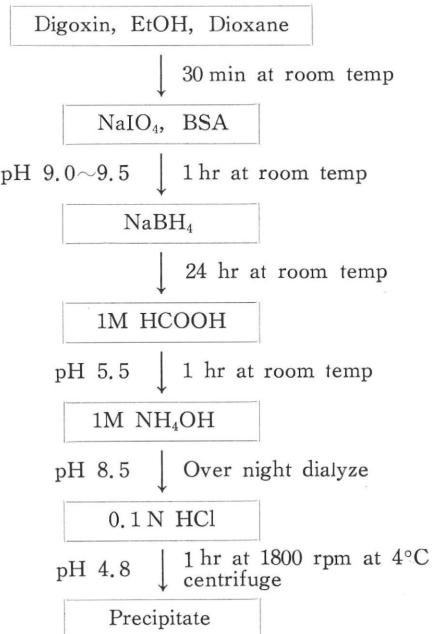


Fig. 1. Preparation of protein-digoxin conjugate

得られた conjugate の検定は可視部と紫外部の吸収スペクトラムを比較して行なった。

まず Dig-BSA conjugate と、結晶標準 digoxin を 83% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> に溶解し、可視部において両者の吸収曲線を作成する。ついで Dig-BSA conjugate と BSA 単独を、どちらも 0.1 N NaHCO<sub>3</sub> 溶液に溶解し、紫外部における吸収曲線を作成した。

##### b) 抗血清の作製と検定

免疫方法は Dig-BSA conjugate の凍結乾燥物 20mg

\*東大第2内科

\*\*第一ラジオアイソトープ研究所

\*\*\*心臓血管研究所

受付：1972年1月

別刷請求先：東京都文京区本郷 7-3-1 (〒 113)

東大病院 第2内科

開原成允

を 0.05 N-NaHCO<sub>3</sub> 1 ml, に溶解し、これに同量の Freund's complete adjuvant (Difco 社製) を加え、充分に乳化させた後、家兎の皮下又は筋肉内に 0.2 ml づつ注射して行なった。週 1 回、計 6 回免疫後ブースター 1 回ない 7~10 日後に採血して抗体を得た。

抗体価の検定は免疫の途中で各家兎から少量づつ数回採血して、抗体価の上昇度を調べた。すなわち数段階に希釈した抗血清をそれぞれ 0.1 ml づつ試験管にとり、これに <sup>3</sup>H-digoxin (New England Nuclear 社製、比放射能 9~12 Ci/mM) 0.1 ml を加え、0.1 M phosphate buffer 0.3 ml を加えて混合後、一夜 incubate、dextran-coated charcoal 1 ml を加えて混合後、遠心分離 (3500 rpm 15 min) し、上清を試験管に移し、これに Bray scintillator 15 ml を加え、60°C、20 分 加熱し、蛋白を変性させた後、遠心分離 (2000 rpm 5 min) し、上清を測定用バイヤルに移し、液体シンチレーションカウンターで測定した。加えた <sup>3</sup>H-digoxin の全放射能 (Total count) に対する抗体と結合した <sup>3</sup>H-digoxin の放射能 (Bound count) の比を計算して、抗体価を相互に比較した。一方特異性の検討のため、類似物質との交叉反応を調べた。これについては別に発表するので参照されたい<sup>4)</sup>。

## 2. 結果

digoxin 219 mg と BSA 280 mg を反応させ conjugate を作製した結果、薄黄色針状結晶が 239 mg 得られ、收量は約 48% であった。

conjugate の吸収スペクトラム測定による検定結果は、次に述べる通りであった。

可視部吸収曲線は図 2 に示す如く、conjugate と標準 digoxin いづれも吸収極大が 390 mμ と 470 mμ の近く

に見られる。このことから conjugate が digoxin を含んでいることが確認された。

しかし、正確な吸収極大値は、conjugate と標準 digoxin の間に 5 mμ 位の差が見られる。このことは Conjugate は、その分子内に digoxin を含んでいるが他の物質であることを説明している。

紫外部の測定では図 3 に示す如く conjugate と BSA のいづれも 280 mμ に吸収極大が見られるので conjugate が BSA を含んでいることが確認できた。

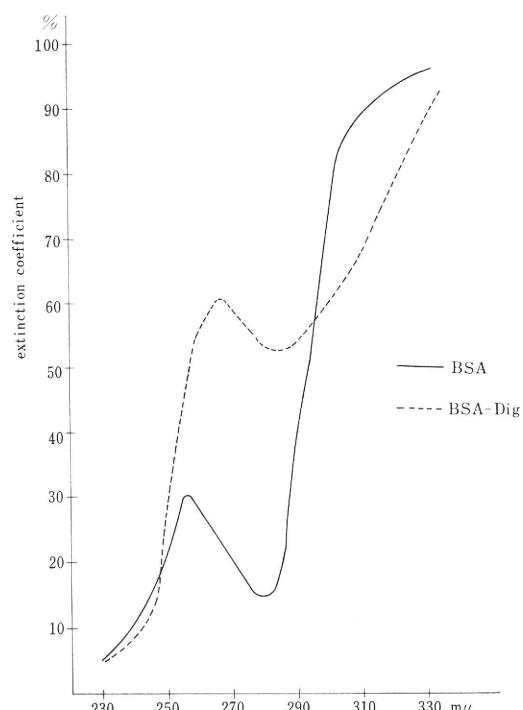


Fig. 3. Spectrophotometry of protein-digoxin conjugate (ultra violet)

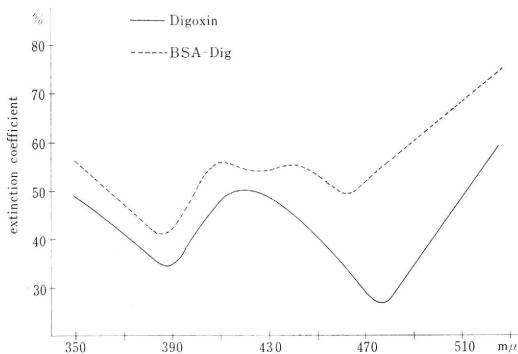


Fig. 2. Spectrophotometry of protein-digoxin conjugate

前記の方法により、家兎 8 羽について免疫を行なった結果は当然のことながらなりの個体差が見られた。そのうちの 2 例について免疫開始後の経過日数と抗体価の上昇過程とを図 4 に示した。図から明らかな如く、免疫 30 日後では抗体価の上昇が見られないが、その後急激に上昇している。70 日経過後には、家兎 B の抗血清は、 $2 \times 10^4$  倍の希釈率でも 60% の結合が見られる程、高い抗体価を有する抗体が得られた。

各種化合物との交叉反応の相違を検討した結果、得られた抗血清は digoxin との結合が最も強く、次いで

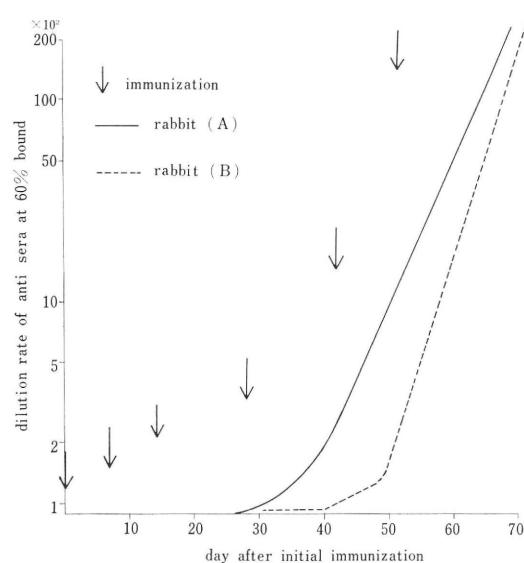


Fig. 4. Increase in anti digoxin sera titre

digitoxin, gitoxin の順で弱くなっている。digoxin の反応性は digitoxin の約 100 倍であった。

digoxin 分子を構成する digoxigenin と digitoxose の交叉反応を調べた結果は、digoxigenin には強い反応が見られたが、digitoxose にはほとんど反応が認められなかった。

また一般のステロイド化合物である cholesterol, estron, progesterone などとは、ほとんど交叉反応が見られなかった。

## II 測定法の基礎的検討

### 1. 方 法

用いた試薬は下記の如くである。

1. 抗 体 ……高抗体価を得た抗血清を  $1 \times 10^4$  倍に希釈して用いた。
2.  $^3\text{H}$ -digoxin …New England Nuclear 社製比放射能  $9 \sim 12 \text{ Ci}/\text{mM}$  を buffer で  $4 \times 10^3$  に希釈し、その  $0.1 \text{ ml}$  ( $0.01 \mu\text{Ci}$ ) を使用した。
3. 標準digoxin…結晶 digoxin を少量のアルコールで溶解した後蒸溜水で希釈して用いた。
4. Dextran coated charcoal<sup>5)</sup> veronal buffer に charcoal と

dextran それを良く溶解し、両液を混合して coated charcoal として用いた。

### 5. シンチレータ

組成は、トルエン  $1100 \text{ ml}$ , PPO  $4 \text{ g}$ , POPOP  $0.1 \text{ g}$ , ライトン  $\times -100$   $400 \text{ ml}$  とした。

### 6. $0.1 \text{ M}$ . PH 7.6 phosphate buffer

測定法の基礎的検討として、従来の radioimmunoassay の方法を用いて、incubation 時間と温度の検討、抗原、抗体の反応時における添加順序の相違による影響<sup>6)</sup>について、また安定剤としての血清蛋白添加の必要性、および、シンチレータ組成の検討を行なった。

### 2. 結 果

#### a) Incubation 時間と温度

温度条件を  $4^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  とし、反応時間を、5, 15, 30, 60 分, 36, 12, 48 時間、のそれぞれについて検討した結果を図 5 に示した。いずれの条件においても in-

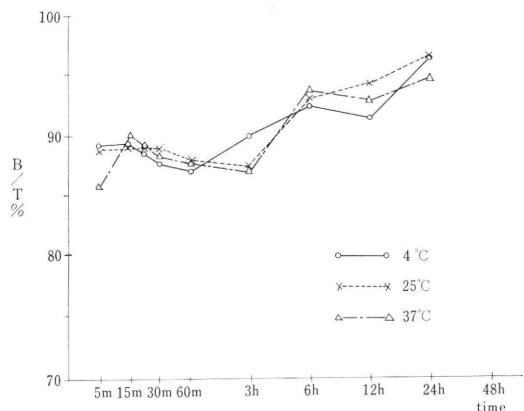


Fig. 5. B/T ratio in various temperatures and various incubation times

cubation 5 分後に、すでに 85% 以上の結合が見られ、温度条件による差は見られなかった。さらに温度条件を  $25^\circ\text{C}$  とし 5 分以内の反応時間についても検討を加えた結果は、図 6 に示す如く、反応時間 5 分までは上昇が見られるが、その後は一定であった。

以上のことから digoxin と抗血清の反応においては温度条件はあまり問題にならず、また反応時間は、非常に短かいことが明らかになった。

現在、室温 15 分の incubation 条件を採用している。

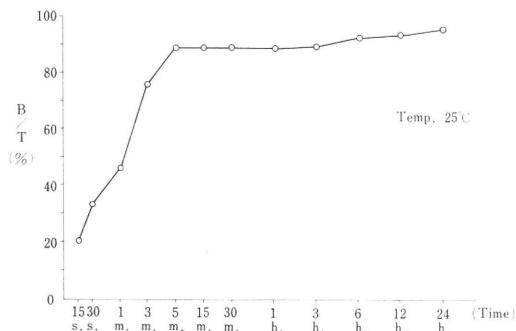


Fig. 6. Relationship between B/T ratio and incubation time at 25°C

#### b) 抗原、抗体の添加順序

添加順序を変えて standard curve を作製した結果を図 7 に示した。図から明らかな如くまず、<sup>3</sup>H-digoxin と抗体とを反応させた後、標準 digoxin を加える方法では、標準 digoxin 濃度の増加に伴う、% bound の低下がほとんど見られず、ほぼ同時に抗原と抗体を反応さ

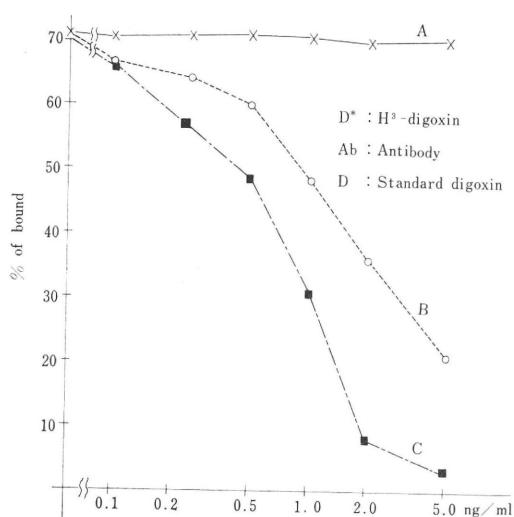


Fig. 7. Standard curves in the following conditions

Condition	1st Step	2nd Step
A ×—×	D* Ab	D
B ○—○	D* D	Ab
C □—□	D Ab	D*

せる方法では、傾斜のゆるやかな curve が得られ、まず標準 digoxin と抗体とを反応させた後 <sup>3</sup>H-digoxin を加えて、さらに反応させる方法が最も感度の高い curve が得られた。このように添加順序の相違によって、かなりの影響が見られたので、最も感度の良い方法として、まず標準 digoxin と抗体とを反応させた後、<sup>3</sup>H-digoxin を添加する方法を採用することとした。

#### c) 安定剤として血清蛋白添加の必要性

血清添加量を、0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5ml として、<sup>3</sup>H-digoxin と抗体を加えて反応させた結果を図 8 に示した。血清を添加しない場合は、B/T % は著しく低く、反応時に血清の存在が重要であることが明らかになった。

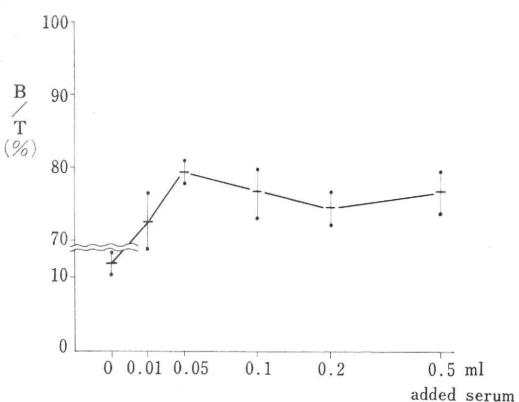


Fig. 8. B/T ratio versus amounts of carrier serum

添加量については、0.01ml と 0.5ml の間に大きな差が認められないので、血清量は、あまり問題にならないと考えられる。

測定の際、被検血清 0.2ml を用いるので、standard curve 作成の場合にも安定剤として血清 0.2ml を加えて蛋白濃度を同一にした。

#### d) シンチレータ組成の検討

ジオキサン系シンチレータを用いて加熱蛋白除去を行なって測定する方法と、界面活性剤の一種であるトライトン X-100 を用いて蛋白を溶解させ、直接測定する方法とを比較して、standard curve を作成した結果、誤差範囲内で同一の curve が得られ、トライトン X-100 による方法でも、充分測定が可能であることが判った。

以上の検討の結果、測定法を図 9 の如く、標準化した。

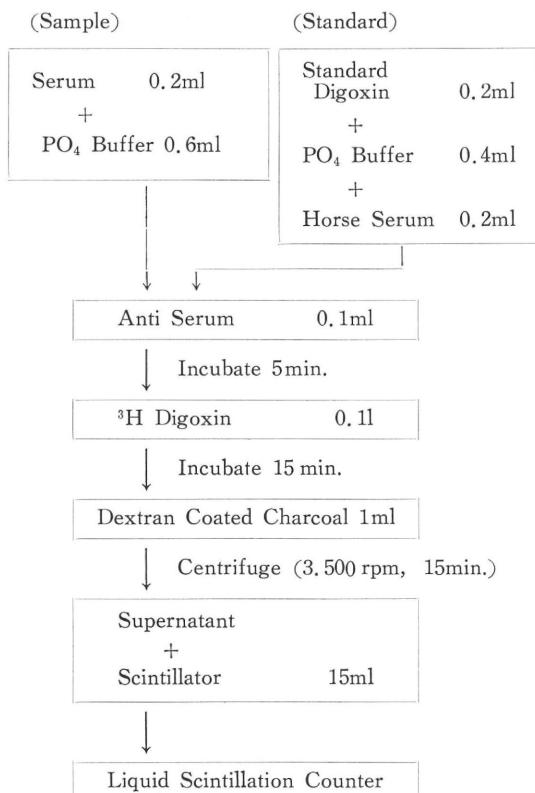


Fig. 9. Procedure of assays.

まず標準 digoxin 溶液 0.2ml づつを小試管にとり、安定剤として馬血清 0.2ml を加え、buffer 0.4ml を加える。一方被検血清 0.2ml に buffer 0.6ml を加えておく。

以上の試験管に抗血清 0.1ml 加え、混合後 5 分放置し、後、<sup>3</sup>H-digoxin 0.1ml を加え、さらに 15 分室温で incubation する。

次いで dextran coated charcoal 1.0ml を加え、良く混合後、3500 rpm 15 分遠心分離し、上清を試験管を傾斜してバイヤルに移す。15ml シンチレータを加えて良く混合した後、液体シンチレーションカウンターで測定する。

Count は、automatic external standardization 方式で quenching を補正し、総放射能に対する % bound を求めた。横軸に digoxin 濃度 ng/ml を対数でとり、縦軸に % bound をとてグラフ上にプロットして standard curve を作成し検体中の digoxin 濃度を読み取った。

### III 本法の臨床応用

#### 1 方 法

前記の radioimmunoassay によって、digoxin 投与中の患者血清の測定を行ない、臨床的測定法の検討を試みた。

測 定 法	原 理	問 題 点	感 度	報告者, 年 代
Bioassay	雌ガモの胎児の心臓が digitalis の稀薄溶液に敏感に反応することを応用。	実験動物を扱うので操作が煩雑、かつ熟練を要する。	25 m $\mu$ g/ml	Friedman <sup>9)</sup> (1947)
Rb 法	強心配糖体が赤血球中の K 濃度を減少させる能力をもとにして、Rb 赤血球摂取率阻害を測定。	生きた赤血球の取り扱いが煩雑。	1 m $\mu$ g/ml	Lowenstein & <sup>10)</sup> Corrill (1966)
Double isotope dilution derivative assay	<sup>3</sup> H-digitoxin acetic-anhydride- <sup>14</sup> C を用いて、一般的な double isotope dilution derivative 法を用いた。	操作が煩雑、かつ測定に時間を要する。測定のために大量 (50ml) の静脈血を必要とする。	10 m $\mu$ g/ml	Lukas & <sup>11)</sup> Peterson (1966)
<sup>125</sup> I digitoxin を利用した Radioimmunoassay	<sup>125</sup> I 標識 digitoxin と血中 digitoxin が抗体と競合反応を起すことを利用。	<sup>125</sup> I による標識が難しい。血清中からの抽出を必要とする。	1 m $\mu$ g/ml	Oliver & <sup>12)</sup> Parker (1968)
Adenosine triphosphatase による enzymatic assay	Digitoxin が Na と K の存在下で adenosine triphosphatase の活性を阻害する性質を利用。	Dsgoxin の測定ができない。脳皮質からの酵素の抽出が煩雑。Digitoxin の血清中からの抽出を要する。	10 m $\mu$ g/ml	George & <sup>13)</sup> Robert (1968)

表 1 血中ジギタリス測定法の比較

測定値の精度を知るため、被検血清を複数で同時に測定した値の標準偏差を求め、standard curve の部位による測定値の精度を調べた。一方、測定ごとの測定値の再現性を検討するため、digoxin 含有の pool plasma を用意し、測定値の標準偏差を求めた。同じく pooled plasma を用いて添加 digoxin の回収率テストを行なった。臨床的測定結果の検討として digoxin 投与量と血中濃度との関係を調べた。これについては先に発表<sup>12</sup>した。

## 2 結 果

前記の方法で作成した standard curve の一例を図10に示した。測定し得る感度は 0.1 ng/ml で、高濃度では 4～5 ng/ml まで測定し得る。

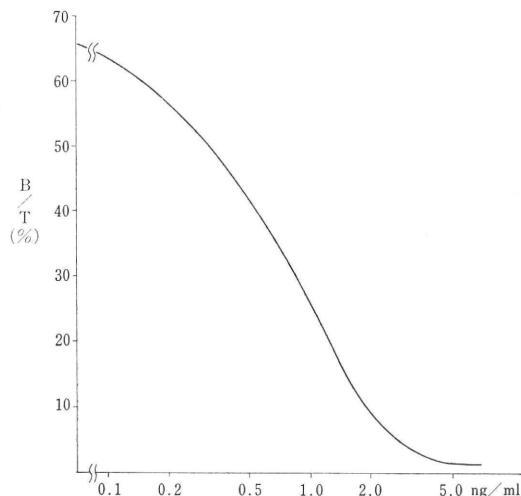


Fig. 10. Standard curve

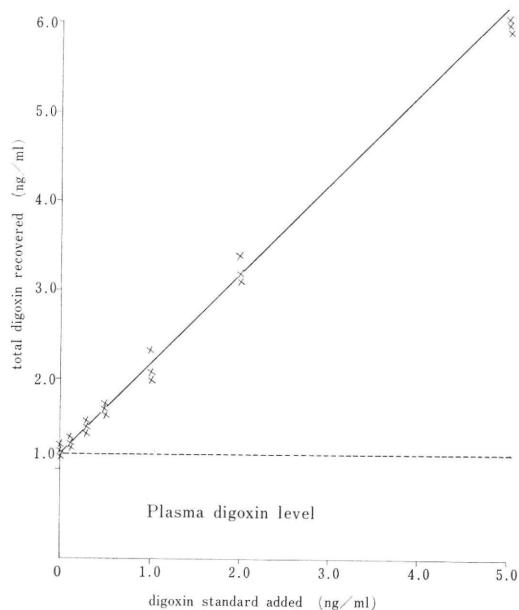
Standard curve の部位による測定値の精度の相違を調べた結果は下記の如くであった。

各範囲における標準偏差と、その相対標準偏差（カッコ内）を示すと、血中 digoxin 濃度 0.0~0.5 ng/ml の範囲では  $\pm 0.04$  ng/ml (8.8%), 0.5~1.5 ng/ml では  $\pm 0.03$  ng/ml (3.2%), 1.5~3.5 ng/ml では  $\pm 0.06$  ng/ml (2.4%) であった。

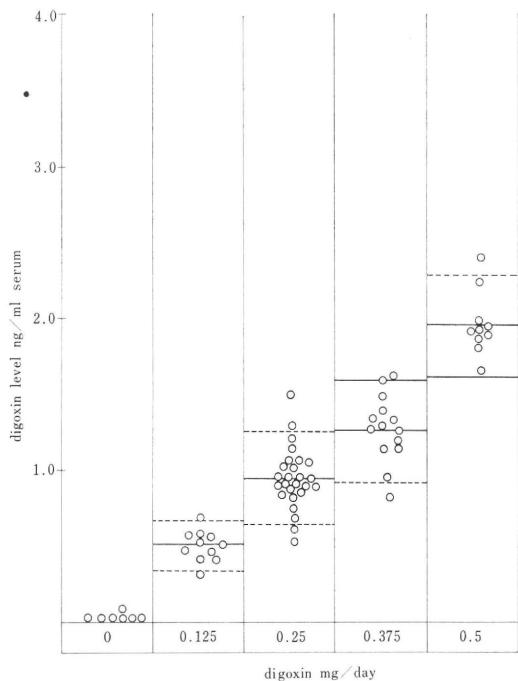
Pooled plasma を用いて測定値の再現性を検討した結果、標準偏差は  $1.14 \pm 0.04$  ng/ml で、相対標準偏差は 3.7% であった。

Pooled plasma に標準 digoxin を添加し、従来の方法で測定し、total digoxin 濃度を求め、添加 digoxin の回収率を検討した結果を図11に示した。図の如く良好な結果を得た。

被検血清測定の結果から、投与量と血中濃度との関係を図12に示した。



**Fig. 11.** Recovery test



**Fig. 12.** Serum digoxin concentration at various maintenance doses of digoxin

維持量 0.125 mg/day の血中濃度は、 $0.51 \pm 0.91$  ( $0.32 \sim 0.71$ ) ng/ml, 0.25 mg/day では  $0.95 \pm 0.201$  ( $0.52 \sim 1.50$ ) ng/ml, 0.375 mg/day では  $1.28 \pm 0.221$  ( $0.82 \sim 1.63$ ) ng/ml, そして 0.5 mg/day 投与では  $1.98 \pm 0.224$  ( $1.65 \sim 2.240$ ) ng/ml であり、維持量と血中濃度との間に有意の相関が見られた。

また digoxin 投与していない患者検点は、誤差範囲内で 0 であった。

#### IV 考 案

Digitalis は、ほぼ世紀の長期に渡って心不全の治療剤として広く用いられてきたが、digitalis 服用中の患者の生体内濃度を化学的に定量することは困難であった。

1967年 Doherty, Perkins 等<sup>8)</sup>は、患者に直接  $^3\text{H}$ -digoxin を静注して、その後 7 日間に渡って、又、患者死亡後に至るまで組織内の分布と濃度を検討した。その結果 digoxin 静注後30分後には心筋に digoxin が到達し、1時間後にピークに達し、ほぼ26時間に渡って同一濃度を維持すること、また血中濃度は 6 ~ 7 時間後に一定となり、その後24時間以上維持することを見出した。一方血清中濃度に対する各組織の濃度比は腎臓、心筋などで高値を示し、中でも、血清と心筋との濃度比が最も高く、長時間経過後においても、その比は、ほぼ一定に保たれていることが見い出された。

このように血中 digoxin 濃度は、ほぼ心筋中の digoxin 濃度を代表するので血中濃度測定が臨床的に、充分、意味があると考えられる。

血中 digitalis 濃度測定法については種々の方法が報告されている<sup>9)10)11)12)</sup>。それ等の方法、原理感度などについては、表 1 に示す通りである。

これらの方は、臨床的な routine 検査法としては、操作が複雑であるか、測定に時間を要し、適していない。

一方 Smith 等によって確立された digoxin の radioimmunoassay は、特異性と感度が優秀であると共に、測定が比較的簡便である点で、臨床検査法として優れた方法である。

著者等がここに報告した方法は、この Smith 等の方法にさらに改良を加えて、下記のような利点を得た。

Smith 等<sup>3)</sup>の方法では、測定に要する被検血清量が 1.0 ml であったのに比し、われわれの方法では 0.2 ml の微量で充分測定し得る。

測定操作としては、放射能測定の際のシンチレータを、従来のジオキサン系のものから、界面活性剤の一種であるトライトン X-100 含有のシンチレータを用いること

によって、蛋白加熱、遠心分離による、蛋白除去の煩雑な操作を簡略化した。

感度については、Smith 等<sup>3)</sup>の方法が  $0.2 \text{ m}\mu\text{g}/\text{ml}$  であったのに比し、 $0.1 \text{ m}\mu\text{g}/\text{ml}$  と、2倍の感度が得られた。

こうして、radioimmunoassay による digoxin の測定は、かなり簡略化されたが、いづれも標識 digoxin として  $^3\text{H}$  標識物質を使用しているので、液体シンチレーションカウンタを必要とする点が、多少問題であろう。

表 2 に示した、Oliver, Parker 等<sup>12)</sup>の  $^{125}\text{I}$  標識による digitoxin の測定は、一般に広く普及している  $\gamma$  線測定用のウェル型カウンターで測定できる点が簡便である。

#### V ま と め

Radioimmunoassay によって血清 digoxin 濃度測定を試みた。

Digoxin と bovine serum albumin を coupling して人工抗原とし、ウサギを免疫して抗体を作製した。標識抗原としては  $^3\text{H}$ -digoxin を用いた。

測定法の基礎的検討の結果、反応条件は、室温とした。また液体シンチレーションカウンタによる測定の際のシンチレータは、トライトン X-100 含有のものを用い、加熱蛋白除去の操作を省略した。

被検血清測定の結果、投与量と血中濃度の間に相関が見られた。

Pooled plasma による測定間の再現性の検討の結果、測定値の standard deviation は、3.7% であった。

Standard digoxin 添加による回収率テストの結果、良好な成績が得られた。

本測定法の感度は 0.1 ng/ml であった。

#### 文 献

- Yalow, R. S., and Berson, S. A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* **39** 1157 (1960)
- Butler, V. P. and Chen, J. P.: Digoxin-specific antidy. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **57** 71 (1967)
- Smith, T. W., Butler, V. P. and Haber, E.: Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentrations by radioimmunoassay. *New. Eng. J. Med.* **281** 1212 (1969)
- 黒崎浩巳、久保田治代、開原成允、小川 弘、中沢信彦、岡野淳二：Digoxin の Radioimmunoassay I. II. 薬学雑誌 投稿中

- 5) Herbert, V., Lau, K. S., Gottlieb, C. W. and Bleicher, S. J.: Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocr.* **25** 1375 (1965)
- 6) 久保田治代, 黒崎浩巳, 開原成允, 村尾 覚: Radioimmunoassay における抗原抗体の添加順序—Digoxin の測定について—. *医学のあゆみ* **78** 26 (1971)
- 7) 太田昭夫, 飯沼宏之, 藤井諄一, 野村誠一, 浦岡忠夫, 小山晋太郎, 久保田治代, 開原成允, 杉下靖郎, 中西淳雄, 村尾 覚, 黒崎浩巳: 日本循環器学会, 関東甲信越地方会, 第60回 例会, 発表。
- 8) Doherty, J. E., Perkins, W. H., and Flanigan, W. J.,: The distribution and concentration of tritiated digoxin in human tissues. *Ann. Int. Med.* **66** 116 (1967)
- 9) Friedman, M. and Bine, R. Jr.: Employment of the embryonic duck heart for the detection of minute amounts of a digitalis glycoside. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* **64** 162 (1947)
- 10) Lowenstein, J. M. and Corrill, R. M.: An improved method for measuring plasma and tissue concentrations of digitalis glycosides. *J. Lab. Clin. Med.* **67** 1048 (1966)
- 11) Lukas, D. S., Peterson, R. E.: Double isotope dilution derivative assay of digitoxin in plasma, urine and stool of patients maintained on the drug. *J. Clin. Invest.* **45** 782 (1966)
- 12) Oliver, G. C., Parker, B. M., Brasfield, D. L. and Parker, C. W.: The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.* **47** 1035 (1968)
- 13) George, H. B. and Robert, L. C.: The enzymatic assay of plasma digitoxin levels. *J. Lab. & Clin. Med.* June, (1968)

\* \* \*

\* \*

\* \*

\*

\*

\*

## Summary

### Radioimmunoassay of Serum Digoxin

Haruyo KUBOTA, Shigekoto KAIHARA, Masahiro IIO and Satoru MURAO  
*The Second Internal Medicine, University of Tokyo*

Hiromi KUROSAKI  
*Daiichi Radiosotope Laboratories*

Akio OHTA  
*Cardiovascular Institute*

A rapid, sensitive method for measuring a plasma digoxin concentration has been developed by the radioimmunoassay technique.

Digoxin-BSA (bovine serum albumin) conjugate was prepared by a technique originally described by Butler and Chen.

Ten rabbits were immunized by the injection of Digoxin-BSA conjugate with six injections in the foot pads over a 60 day period.

The assay was performed by incubation in small test tubes, to which 0.2 ml of sample or standard serum, 0.1 ml of anti-serum and 0.6 ml of buffer solution. Then tubes were shaken and stood at room temperature for 5min. after that 0.1ml of <sup>3</sup>H-digoxin was added, and incubated again at room temperature for 15 min.

Separation of bound from free labeled digoxin was achieved by dextran coated charcoal.

The Supernatant phase was added to 15 ml of liquid scincillator which consisted of toluene and Triton

X-100 and counted in a liquid scintillation counter.

Correction for quenching was made by automatic external standardization.

A standard curve was constructed by use of solutions of known concentrations of standard digoxin.

The precision of the assay showed that for serum levels in the range 0.0~0.5 m $\mu$ g/ml the relative standard deviation was 8.8%, in the range 0.5~1.5 m $\mu$ g/ml was 3.2%, and in the range of 1.5~3.5 m $\mu$ g/ml was 4.4%.

A similar analysis was performed on pooled serum by repeated measurement.

The relative standard deviation was 1.145±0.042 m $\mu$ g/ml.

The results of assays performed upon clinical cases who were administered various doses of digoxin showed digoxin levels in the range 0.0~4.5 m $\mu$ g/ml.

There is positive correlation between maintenance dosage and plasma digoxin concentration.

\* \* \* \* \*