[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
[技術報告]
17(3) 167-172 (1991)]

血清中ジゴキシン濃度測定のための Enzyme Immunometric Assay の評価

西原カズヨ*, 春山尚美
東京大学医学部附属病院薬剤部†

Evaluation of Enzyme Immunometric Assay for Determination of Serum Digoxin Concentration

KAZUYO NISHIHARA*, NAOMI HARUYAMA
Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tokyo†

(Received January 18, 1991)

Enzyme immunometric assay (EIMA method) for determination of serum digoxin concentration was evaluated. The coefficient of variation of within-run and between-run precision for 3 concentrations of digoxin in serum (0.85, 1.5, 3.0 ng/ml) was less than 6.0%. The serum digoxin (47 samples) concentrations were determined by EIMA method and compared with those determined by fluorescence polarization immunoassay (FPIA method). There were good agreement between results by FPIA method and those by EIMA method, where correlation coefficient was more than 0.993. The cross-reactivities of methyl digoxin, lanatoside C, digoxigenin, digitoxin, proscillaridin and k-strophanthin at 2 ng/ml were found. No clinically significant interference was observed with endogenous substances at concentrations below 415 mg/dl hemoglobin, 400 mg/dl cholesterol, 500 mg/dl triglycerides and 10 mg/dl bilirubin. The digoxin-like substances in plasma of renal insufficient patients caused minimal interference. From these results, EIMA method may be useful for serum drug-level monitoring of patients under the digoxin therapy.

Keywords—enzyme immunometric assay; serum digoxin concentration; cross-reactivities; digoxin-like substances

血清中のジゴキシン濃度測定法としては、蛍光偏光免疫測定法 (fluorescence polarization immunoassay, FPIA 法) および酵素免疫測定法などが一般的に臨床応用されている。しかし、これら市販キットの中には、腎障害患者などの血漿を用いた場合測定値が高くなることが報告されている^{1,2)}。その原因物質は特定されていないが、

ジゴキシン様物質と呼ばれている。最近、そのジゴキシン様物質による測定値の昇が少ないと報告された^{2,3)} enzyme immunometric assay (EIMA 法) を用いたキットの特性を評価する機会を得たので、EIMA 法で測定したジゴキシン濃度を FPIA 法による測定値と比較検討した。ジゴキシン類似構造薬物 (メチルジゴキシン, ラナトシド C, プロスシラリジン), 併用薬物, およびジゴキシンの代謝物であるジゴキシゲニンの抗

† 東京都文京区本郷7丁目3-1, Hongo 7-cho-me, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

体に対する交差反応試験を行い、本EIMA法のキットが臨床応用可能か否かを検討した。

実験の部

1. 測定キットおよび測定原理

EIMA法の測定キット・機器：酵素-抗体試薬および capture phase 試薬を含むバイアルホルダーとその付属品、セラライザー® ジゴキシン試験紙、検量線用血清およびコントロール血清は、マイルス・三共株式会社より提供を受けた。測定装置はサンプルプロセッサ（幅 12.7cm, 長さ 23cm, 高さ12.7cm）, セラライザー®III 電動ピペットを連結したセラライザー®III リフレクタンスフォトメータ（幅 28cm, 長さ 46cm, 高さ 14cm, マイルス・三共）を用いた。

EIMA法の測定操作：ジゴキシン含有血清試料 30 μ l を酵素-抗体試薬瓶に加える。バイアルホルダーをサンプルプロセッサにセットする。1回の操作に6本のホルダーがセットできる。サンプルプロセッサでは8分間の抗原抗体反応後、4分間ジゴキシンと結合していない酵素-抗体と capture phase 試薬との結合反応を行う。Capture phase 試薬瓶にフィルターを挿入してろ液を得る。そのろ液 30 μ l をリフレクタンスフォトメータに装着したジゴキシン試験紙の試験部分に滴下する。60秒間酵素反応を行い、呈色の度合いを 630nm における反射光の強度で読み取る。6血清試料の測定には約25分を要する。

検量線は2標準血清を用いて作成すると記憶されるので、日常業務では1点のコントロール血清を用いて測定値の妥当性を検討する。検量線作成時の室温から $\pm 6^{\circ}\text{C}$ 以上になると、コントロール血清の値が許容値である $\pm 10\%$ の範囲外になるので、再度検量線を作成する必要がある。

FPIA法：測定キットはアボットTDX ジゴキシン（ダイナボット）を用いた。血清中ジゴキシン濃度は、全自動蛍光偏光光度計アボットTDX（ダイナボット）を用いて測定した。

2. 測定試料

再現性試験には、健康成人血清でジゴキシン濃度を 0.85, 1.5, 3.0ng/ml に調製した試料を用

いた。

EIMA法とFPIA法との比較試験には、当院に通院あるいは入院中の44名の患者血清47試料を用いた。これらの患者の中の1名は、仮死状態で緊急入院して、ジゴキシンおよびフェノバルビタールを投与された生後4カ月の小児である。仮死状態で乏尿のためフロセミドなどを併用投与している時、誤ってジゴキシンを10倍量静脈内投与された。この患者について経時的に採取した血清中のジゴキシンおよびフェノバルビタール濃度を測定した。フェノバルビタールの血清中濃度はFPIA法により測定した。この患者では幸いにもジゴキシンによる重篤な中毒症状は認められなかった。

ジゴキシンの代謝物および類似構造薬物の交差反応試験には、健康成人血清でジゴキシン濃度を 1.0ng/ml, 試験薬物濃度をジゴキシン 2ng/ml にほぼ相当するように、2.0ng/ml（スピロノラクトンのみ 5 μ g/ml）に調製した試料を用いた。それらの血清で交差反応が認められた場合には、試験薬物濃度をさらに1.0, 0.5, 0.25ng/ml（スピロノラクトンのみ2.5, 1.25, 0.625 μ g/ml）に調製した試料を用いた。試験に用いた類似構造薬物は、スピロノラクトン、プロスシラリジン（大日本製薬）、メチルジゴキシン（山之内製薬）、ラナトシドC（三共製薬）、k-ストロファンチン、g-ストロファンチン（Sigma chemical）、ジギトキシゲニン、ジゴキシゲニン（Aldrich chemical）、ジギトキシン（和光純薬）の9種類である。

コレステロールおよびトリグリセリド、ビリルビンの影響を検討する目的で、市販のコレステロール、トリグリセリドおよびビリルビンの各測定キット（マイルス・三共）付属の標準品にジゴキシンを添加して交差反応を検討した。ヘモグロビンを含む血清は、健康成人の血球を水で溶血した後血清で希釈して調製した。ヘモグロビン濃度はヘモグロビン試験紙（マイルス・三共）を用いて測定した（4.15g/dl）。薬物を含まない血清で希釈した種々のヘモグロビン濃度の血清にジゴキシンを含む血清を添加して、本ジゴキシン測定キットに及ぼすヘモグロビンの妨害について検討した。

腎機能障害患者の血漿は、腎機能障害により当院の泌尿器科に入院してシクロスポリン投与を行っている腎移植前後の患者血漿 18 試料である。これらの患者には、ジゴキシンは投与されておらず、血漿中クレアチニン濃度 3~9.5mg/dl が 13 試料で 1.5~2.9mg/dl が 5 試料である。

結 果

EIMA-キットの特性

3 濃度のジゴキシンを含む血清の同時再現性および日差再現性を Table 1 に示した。同時再現性試験の変動係数は 4 % 以下で、日差再現性試験の変動係数は 6 % 以下であった。日差再現性試験では測定日より室温が異なったが、その変化は検量線作成日の室温の $\pm 5^{\circ}\text{C}$ であり、再度検量線を作成する必要はなかった。

FPIA 法と EIMA 法とによる測定値の回帰直線は、 $y=1.01x+0.07$ で、相関係数は 0.993 と良い相関性がみられた (Fig. 1)。

誤ってジゴキシンを大量に投与された患児における血清中ジゴキシンおよびフェノバルビタールの濃度推移を Fig. 2 に示した。この患者では入院初日に排尿がなく、2 日目から 7 日目までの尿量はそれぞれ 144, 171, 729, 237, 278 および 274 ml であった。血清中ジゴキシン濃度推移は、一次速度式では表わせなかった。この患児での最終ジゴキシン投与後 57.5hr と 81.5hr の 2 点から求めた消失半減期は 29.1hr であった。

ジゴキシンの代謝物および類似構造薬物の交差

反応試験を EIMA-キットを用いて試験した。免疫測定法において交差反応率を表わす方法として、20%あるいは30%の交差反応を示す濃度が用いられるが、本報では 1.0ng/ml のジゴキシン濃度に対して20%の交差反応を示す代謝物および類似構造薬物の濃度をもって表わした (Table 2)。交差反応が20%以上を示したメチルジゴキシンは、ジゴキシンとはほぼ同等の交差反応を呈した。スピロノラクトンは、1.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上で20%以上の交差反応を示した。

コレステロール、トリグリセライド、ビリルビ

Fig. 1. Comparison of Serum Digoxin (DGX) Concentration Determined by Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA method) and Enzyme Immuno-metric Assay (EIMA method)
 $y=1.01x+0.07$, $r=0.993$, $n=47$

Table 1. Within-run and Between-run Precision of Serum Digoxin (DGX) Concentrations Determined by Enzyme Immunometric Assay

Specimen No.	Within-run				Between-run			
	DGX concn. (ng/ml)		C.V. (%)	n	DGX concn. (ng/ml)		C.V. (%)	n
	Mean	S.D.			Mean	S.D.		
1	0.85	0.033	3.9	10	0.86	0.050	5.8	10
2	1.50	0.049	3.3	10	1.56	0.067	4.3	10
3	3.00	0.086	2.9	10	3.03	0.092	3.0	10

Fig. 2. Serum Digoxin (DGX) and Phenobarbital (PB) Concentration-Time Courses after Large Dosing of DGX and PB in a Patient with Heart Failure (H.K., male, 4 months)

● : Enzyme immunometric assay

△, ○ : Fluorescence polarization immunoassay

Table 2. Concentration of an Added Compound Necessary to Produce a Maximum Quantitation Error of 20% in a Sample Containing 1ng/ml Digoxin by Enzyme Immunometric Assay

Added compound	Concentration to produce a maximum quantitation error of 20%
Methyldigoxin	0.25ng/ml
Lanatoside C	0.25ng/ml
Digoxigenin	0.25ng/ml
Digitoxin	0.50ng/ml
Proscillaridin	2.00ng/ml
k-Strophanthin	1.00ng/ml
g-Strophanthin	>2.00ng/ml
Digitoxigenin	>2.00ng/ml
Spironolactone	1.5 µg/ml

ンおよびヘモグロビンは、それぞれ 400mg/dl, 500mg/dl, 10.0mg/dl および 415mg/dl の高濃度まで EIMA-ジゴキシン測定に影響が認められ

なかった。

ジゴキシンを投与されていない腎障害患者血漿を用いて、ジゴキシン様物質の影響を EIMA 法により検討した結果、いずれも 0.1ng/ml の感度以下であった。一方、同じ血漿について FPIA キットを用いて測定した結果、18 試料中 11 試料が 0.1~0.3ng/ml の値を示した。

考 察

ジゴキシンの EIMA-キットでは、サンプルプロセッサでの抗原抗体反応に 1 回の操作で 6 試料しかセットできず、反応時間が 12 分必要であることから、全測定には 25 分を要する。18 試料の測定には約 1 時間かかる。一方、FPIA-キットでは 6 試料の測定では約 20 分を要するが、20 試料の測定でも約 30 分でよい。このことから、EIMA-キットは FPIA-キットに比べて多数の試料を測定する施設では不便である。しかし、検量線は 2 点測定でよく、室温の変化が ±6°C 以内で試薬のロット変更がないかぎり、再度検量線を作成する必

要がなく、測定機器などがコンパクトであることから、1回の測定試料数が少ない施設あるいは病室などでは非常に便利である。

また、EIMA-キットに必要な測定試料量は30 μ l で、FPIA-キット(試料量200 μ l)に比べて小児患者などでは有益である。Fig. 2 に示したジゴキシンを誤って大量に投与された小児患者では、大量投与後約2日間はジゴキシンの血清中濃度推移がゆるやかであったが、尿量の増加に伴いその後は一次速度で血清中から消失している。このジゴキシンの血清中からの消失速度の変化は、ジゴキシンの主として腎から排泄されることから⁴⁾、腎機能の回復に伴うジゴキシンの腎排泄の正常化によるものと考えられる。

EIMA-キットの同時再現性および日差再現性の変動係数は6%以下と小さく、またFPIA-キットと相関性が良いことから(Fig. 1, Fig. 2, Table 1)、EIMA-キットは従来の測定キットに匹敵する精度を有することがわかった。さらに、生体成分であるトリグリセライド、コレステロール、ビリルビンは高濃度であっても血清中ジゴキシンの濃度の測定値に影響を与えないことから、高脂血清、高コレステロール血清であってもEIMA法ではジゴキシンの濃度測定ができることがわかった。高濃度のヘモグロビン血清はEIMA法によるジゴキシンの濃度の測定系には影響しないが、ジゴキシンの血清中よりも血球中に高い濃度で存在している^{5,6)} ことから、溶血血清では真の値より高めの値が得られる。このことから、血清中ジゴキシンの濃度測定としては溶血血清の使用は避ける方がよい。

ジゴキシンの代謝物および類似構造薬物の交差反応については、代謝物およびスピロラクトンを除いた類似構造薬物が高い交差反応を示したが(Table 2)、臨床上併用投与されることは少ない。しかし、ジゴキシンの同等の交差反応を示したメチルジゴキシンの治療量での血清中濃度がジゴキシンの治療濃度範囲に近く⁷⁾、消失半減期も約20時間⁸⁾ あるいは43時間⁹⁾ と長い。したがって、メチルジゴキシンの処方変更後1週間以内にEIMA-キットを用いてジゴキシ

ンの濃度を測定した場合、メチルジゴキシンの血清中に存在している可能性があるため、真のジゴキシンの濃度は得られない危険性に注意が必要である。スピロラクトンは降圧利尿薬としてしばしばジゴキシンの併用投与される。その体内からの消失は速く(半減期10分)¹⁰⁾、スピロラクトンの交差反応性は極めて小さかったが(Table 2)、種々のジゴキシンの測定キットでスピロラクトンの代謝物との交差反応性が報告されている³⁾。スピロラクトンの代謝物によるEIMA法での交差反応の程度は、FPIA法と同じであり^{11,12)}、カンレノンを含む種々の代謝物の影響が考えられている。

FPIA-キットで0.1ng/ml から0.3ng/ml の偽陽性を呈した腎障害患者血漿でも、EIMA-キットでは0.1ng/ml の測定感度以下であることから、腎障害患者血漿中に存在することが報告されている^{1,2)} ジゴキシンの様物質の影響は、FPIA-キットに比べてEIMA-キットでは小さいことが確認できた。FPIA-キットでのジゴキシンの様物質による本報での偽陽性値は最高0.3ng/mlであったが、薬物血中濃度モニタリングにおけるひとつの役割としての患者での服薬の有無を確認するためには、この値は無視することができない。

以上のことから、臨床における血清中ジゴキシンの濃度測定にEIMA法は十分に適用できると考えられる。

文 献

- 1) R. G. Sommer, T. L. Belchak, M. L. Błoczynski, S. J. Boguslawski, D. L. Clay, P. F. Corey, M. M. Foltz, R. A. Fredrickson, B. L. Halmo, R. D. Johnson, K. L. Marfurt, H.-V. Runzheimer and D. L. Morris, *Clin. Chem.*, **36**, 201-206 (1990).
- 2) M. Matheke and R. Valdes, Jr., *Ann. Clin. Laborat. Sci.*, **19**, 168-174 (1988).
- 3) M. Iosefsohn, S. J. Soldin and J. M. Hicks, *Ther. Drug Monitor.*, **12**, 201-205 (1990).
- 4) M. H. Gault, D. Sugden, C. Maloney, M. Ahmed and M. Tweeddale, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **25**, 499-513 (1979).
- 5) J. Karjalainen, K. Ojala, and P. Reissell, *Acta*

- Pharmacol. Toxicol.*, **34**, 385-390 (1974).
- 6) R. Gorodischer, W. J. Jusko and S. J. Yaffe, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **19**, 256-263 (1976).
- 7) 若松良隆, 小川宏一, 鈴木与志和, 大久保満, 柿沢紀夫, 吉田守宏, 中村修之, 伊藤隆之, 伴昌明, 塩津初寿, 水野和夫, 神川 正, 山崎昇, 基礎と臨床, **10**, 499-506 (1976).
- 8) D. Larbig, F. Scheler, H. J. Schmidt, G. Betzien und B. Kaufmann, *Klin. Wschr.*, **49**, 604-607 (1971).
- 9) H. Rennekamp, C. Rennekamp, U. Abshagen, K. V. Bergmann, and N. Rietbrock, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **273**, 172-174 (1972).
- 10) A. Karim, J. Hribar, W. Aksamit, M. Doherty and L. J. Chinn, *Drug Metab. Dispos.*, **3**, 467-478 (1975).
- 11) J. Lichey, R. Schroder and N. Rietbrock, *Int. J. Clin. Pharmacol.*, **15**, 557-559 (1977).
- 12) J. Stone, P. Bunting and S. J. Soldin, *Clin. Chem.*, **34**, 1252 (1988).