[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
17(6) 428-434 (1991)

血清中ジゴキシン濃度測定における CEDIA 法の評価

柴田隆司*, 山下知子, 森田修之
倉敷中央病院薬剤部†

Evaluation of the Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA) Method for Determination of Serum Digoxin Concentrations

TAKASHI SHIBATA*, TOMOKO YAMASHITA, SHUSHI MORITA
Pharmaceutical Division, Kurashiki Central Hospital†

(Received April 9, 1991)

Serum levels of digoxin and methyl digoxin were measured with the cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA) method and the fluorescence polarization immunoassay (FPIA) method. In other samples, both of those cardiac glycosides were measured with FPIA method and radioimmunoassay (RIA) method.

There was a significant correlation ($r=0.835$, $n=85$) between CEDIA and FPIA methods in serum levels of digoxin and an apparent that of methyl digoxin. But in some patients, especially in infants, the values of the CEDIA method were lower than those of FPIA method. In contrast, there was a higher significant correlation ($r=0.939$, $n=63$) between FPIA and RIA methods in serum levels of both cardiac glycosides. These results may indicate that sensitivities of these methods to the interfering substances (ex. endogenous digoxin-like substance) differ each other.

Keywords—serum digoxin concentration; cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA); fluorescence polarization immunoassay (FPIA); methyl digoxin

緒 言

ジゴキシンは各種うっ血性心不全、心房細動・粗動による頻脈等の治療に用いられ、その臨床上の重要性は大きい。しかしながら、ジゴキシンの治療域血清中濃度は狭く、 $0.5\sim 2.0\text{ng/ml}$ あるいは $0.8\sim 2.3\text{ng/ml}$ といわれ、一方、中毒症状の発現頻度は、 2.0ng/ml 以上では、急激に高くなる¹⁾。また、剤形により吸収率の違いがみられる。しかも、ジゴキシンに対する反応性には個人

差があり、高齢者や腎機能低下の患者や低カリウム血症の患者等では、比較的少量で中毒症状を示す²⁾。さらに、中毒症状の一つである不整脈は、本来の疾患に由来するものか、過量投与によるものかの判定が難しい¹⁾。これらのことから、ジゴキシンによる治療においては、血清中濃度モニタリングは極めて有用な指標を提供する。血清中ジゴキシン濃度測定は、従来、放射性免疫測定法 (RIA) やホモジニアス EIA (Emit®), ヘテロジニアス EIA (MARKIT®, Enzymun-Test®) 等の酵素免疫測定法 (EIA) および、蛍光偏光免疫測定法 (FPIA) により行われてきた。最近、

† 倉敷市美和1-1-1; 1-1-1, Miwa, Kurashiki-shi, 710 Japan

DNA 組換え技術を応用した新しいホモジニアス EIA が開発された。このホモジニアス EIA は、DNA 組換え技術を用いて β -ガラクトシダーゼを β -ガラクトシダーゼ由来相補反応受容体と β -ガラクトシダーゼ由来相補反応供与体とに二分割している。それぞれは単独では酵素活性を示さないが、水溶液中において自然会合し再び酵素活性を示す。反応供与体には、ジゴキシンを結合させてあり、抗ジゴキシン特異抗体と抗原抗体反応をさせることにより、反応供与体と反応受容体との会合が阻害される。よって、ジゴキシン共存下では検体ジゴキシン濃度に比例して、 β -ガラクトシダーゼの形成量が増加する。その活性量を、発色基質 (o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド) の加水分解物で比色測定し、ジゴキシン濃度を求める方法である。

今回、我々は上記の新測定法「セディアー-ジゴキシン®」(山之内製薬: Cloned Enzyme Donor Immunoassay; CEDIA) を試用する機会を得たので、FPIA 法と比較しその検討結果を報告する。

実験の部

1. 対象

ジゴキシン (ジゴシン®, 中外製薬) あるいは、 β -メチルジゴキシン (ラニラピッド®, 山之内製薬) 服用の入院患者の内、血清中濃度 (ジゴキシン当量濃度) の TDX 測定値が 0.2ng/ml 以上の濃度を示し、血清検体量の多かったものを選んだ (Table 1)。

2. 方法

1) CEDIA 法

COBAS-MIRA (日本ロシュ) を用いて測定した。試薬は山之内製薬より提供された「セディアー-ジゴキシン®」EA (Enzyme Acceptor; β -ガラクトシダーゼ由来相補反応受容体) 試薬, ED (Enzyme Donor; β -ガラクトシダーゼ由来相補反応供与体) 試薬, 標準液 (標準液 0; 0ng/ml, 標準液 2; 2.0ng/ml, 標準液 4; 4.0ng/ml) を用いた。酵素反応速度は、反応開始後 450 秒から 950秒までの500秒間の 405nm 吸光度変化を測定することにより求めた。試料 150 μ l を測定に供した。検量線は測定毎に作成した。

2) FPIA 法

TDX 全自動蛍光偏光免疫測定装置 (ダイナボット) を用いて測定した。試薬は TDX ジゴキシン「アボット」, ジゴキシンキャリブレーター, ジゴキシンコントロール (L; 0.75ng/ml, M; 1.5ng/ml, H; 3.5ng/ml) を用いた。200 μ l の試料血清に除蛋白操作を行い、上清 250 μ l 以上を測定に供した。検量線は、試薬ロット毎に作成した。

3) RIA 法

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) を用いて測定した。ジゴキシンゲン-L-ヨードチロシン (3-エステル) (125 I) 液を標識抗原とし、標準ジゴキシン溶液 (0ng/ml, 0.4ng/ml, 1.0ng/ml, 2.0ng/ml, 3.0ng/ml, 4.0ng/ml) を用いた。試料 100 μ l を1回の測定に用いた。検量線は測定毎に作成した。

3. 相関性

ジゴキシン (ジゴシン®) 服用患者血清38検体および β -メチルジゴキシン (ラニラピッド®) 服用患者血清47検体について、CEDIA 法と FPIA 法で測定し、両法での測定値の相関性を検討し

Table 1. 患者背景 (数値は平均と変動幅を示す)

薬 物	年齢 (歳)	サンプル数	体重 (Kg)	血清クレアチニン	BUN
ジゴキシン (ジゴシン®)	若齢群 4 (0.5~17)	17	14.2 (4.2~84.0)	0.6 (0.3~1.9)	27.3 (9~63)
	高齢群 64.1 (50~89)	21	53.2 (34.4~86.0)	1.0 (0.5~2.1)	20.5 (10~50)
β -メチルジゴキシン (ラニラピッド®)	62.6 (29~82)	47	53.3 (32.0~100)	1.5 (0.5~13.6)	24.5 (8~111)

(血清クレアチニンと BUN の単位は mg/dl)

た。

これとは別にジゴシン®服用患者血清49検体およびラニラピッド®服用患者血清14検体について、FPIA法とRIA法で測定し両測定間の相関性を検討するとともに、上記CEDIA法とFPIA法との相関性を比較検討した。

結 果

1. 同時測定内再現性

3濃度のLyphochek®(ヒト管理血清)を各々同時に10回測定した。変動係数は、低濃度では8.20%、中濃度では3.28%、高濃度では2.62%と

Table 2. CEDIA法の同時測定内再現性

	Digoxin 濃度		
	低濃度	中濃度	高濃度
平 均 (ng/ml)	0.61	1.83	3.43
標 準 偏 差 (ng/ml)	0.05	0.06	0.09
変 動 係 数 (%)	8.20	3.28	2.62
サンプル数	9	10	10

Digoxin 濃度は Lyphochek® 中 digoxin の測定値である。(低濃度において一例を異常値と見なし削除した)

なった(Table 2)。なお、低濃度において一例を異常値とみなして削除した。濃度が高くなるほど変動係数は小さくなり、再現性が高くなった。

2. 測定間再現性

3濃度のLyphochek®(ヒト管理血清)を各々同時に3回測定し、それを5回繰り返した。変動係数は、低濃度では10.7%、中濃度では4.46%、高濃度では2.37%となった(Table 3)。

同時測定内再現性と同様に、濃度が高くなるほど変動係数は小さくなり、再現性は高くなった。

3. CEDIA法とFPIA法の相関性

CEDIA法による測定値 Y_1 と FPIA法によ

Table 3. CEDIA法の測定間再現性

	Digoxin 濃度		
	低濃度	中濃度	高濃度
平 均 (ng/ml)	0.84	2.02	3.38
標 準 偏 差 (ng/ml)	0.09	0.09	0.08
変 動 係 数 (%)	10.7	4.46	2.37
サンプル数	5	5	5

Digoxin 濃度は Lyphochek® 中 digoxin の測定値である。(各測定値は三重測定の平均)

Fig. 1. 全測定における CEDIA 法と FPIA 法との相関性

る測定値 X との間には、回帰式 $Y_1=1.015X-0.131$ が得られ、相関係数 $r=0.8348$ ($n=85$) であった (Fig. 1).

服用薬物別に相関性を検討してみると、ジゴシ

ン® 服用患者群においては、回帰式 $Y_1=1.055X-0.265$ 、相関係数 $r=0.8066$ ($n=38$) が得られた (Fig. 2). ジゴシンの場合、Table 1 のように患者群が若齢群と高齢群にはっきりと二分さ

Fig. 2. ジゴシン® 服用患者における CEDIA 法と FPIA 法との相関性

Fig. 3. 6歳以下を除くジゴシン® 服用患者における CEDIA 法と FPIA 法との相関性

れ、とくに若齢群において、両法による測定値にちがいの大きい例が多く見られた。そこで、後述する理由により6歳以下を除外したジゴシン®服用患者群における CEDIA 法と FPIA 法の相関性を検討すると、回帰式 $Y_1=0.9673X-0.0146$,

相関係数 $r=0.8989$ ($n=23$) となり、良好な相関性が見られた (Fig. 3)。ラニラピッド®服用患者群においては、回帰式 $Y_1=1.034X-0.0621$, 相関係数 $r=0.8946$ ($n=47$) が得られた (Fig. 4)。

Fig. 4. ラニラピッド®服用患者における CEDIA 法と FPIA 法との相関性

Fig. 5. RIA 法と FPIA 法との相関性

4. RIA 法と FPIA 法の相関性

RIA 法による測定値 Y_2 と FPIA 法による測定値 X との間には、回帰式 $Y_2 = 1.001X + 0.0935$ 、相関係数 $r = 0.9391$ ($n = 63$) という良好な相関関係が見られた (Fig. 5)。

考 察

CEDIA 法によるジゴキシン測定キットは、高濃度においては同時測定内再現性での変動係数が 3%未満、測定間再現性での変動係数も 3%未満と優れた精度を示すが、その一方、低濃度においては変動が大きく、あまり良好な精度とはいえない難かった。そこで、この変動が測定機器の精度によるものかどうかを検討した。妨害因子が少ないと考えられる標準液において、濃度計算に用いる実測値 (500 秒間の吸光度差) の測定間の変動係数は 2%以下であり (Table 4)、試薬および測定機器による測定誤差変動は少ないと推察された。しかし、作成した検量線の勾配の低さからすれば、計算結果への影響は大きいと判断される。よって、検量線の勾配を増加すると考えられるインキュベーション時間や反応時間あるいは検体量や試薬量等の測定条件に改善の余地があると思われる。

CEDIA 法と FPIA 法の相関性は、相関係数 $r = 0.8348$ ($n = 85$) であり、RIA 法と FPIA 法の相関性が $r = 0.9391$ ($n = 63$) と高いものであったことと比較すると、あまり良好とはいえない難かった。CEDIA 法と FPIA 法において、ジゴキシン®服用群とラニラピッド®服用群、各々の相関性を見ると、ジゴキシン®服用群においては相関係数 $r = 0.8066$ ($n = 38$) とさらに相関性は低くなるが、ラニラピッド®服用群においては相関係数 r

$= 0.8946$ ($n = 47$) と良好な相関性を示した。ラニラピッド®服用群の年齢層は、29~82歳 (平均年齢 62.6歳) であり、ジゴキシン®服用群の年齢層は、若齢層 0.5~17歳 (平均年齢 4歳) と高齢層 50~89歳 (平均年齢 64.1歳) とに二分しており、このうちジゴキシン®服用群若齢層の 6歳以下において測定値のちがいが大きくなった。ジゴキシン®服用群の 6歳以下を除外した場合、CEDIA 法と FPIA 法の相関性を見ると相関係数は $r = 0.8989$ ($n = 23$) となり、対象の患者年齢層が類似するラニラピッド®服用患者群の結果と概ね一致した。このことから、相関性を低くする要因は、ジゴキシンと β -メチルジゴキシンのメチル基の有無という構造上の違いによるものではなく、患者側の条件にあるのではないかと考えられる。6歳以下の患者群において CEDIA 法と FPIA 法の相関性を低くしている原因の一つとして、内因性ジゴキシン様物質 (Endogenous digoxin-like immunoreactive substances; EDLS) に対する両測定法の感度の相違が考えられる。EDLS は近年各種測定法が確立されるに従い、心臓手術後患者、新生児、妊婦、腎障害時等に血中に存在することが報告されている³⁾。さらに、新生児のみならず 6歳以下の小児の血中に存在することも報告されている⁴⁾。当院における 6歳以下被験者の疾患をみると、ほとんどが先天性の心臓奇形を有しており、代償的に EDLS を有している可能性は高い。6歳以下被験者における CEDIA 法と FPIA 法の測定値を比較すると、CEDIA 法の測定値の方が低い傾向にあり、CEDIA 法の測定可能域を下まわった例があった。これは RIA 法と FPIA 法の間にはみられなかったことである。このことより、FPIA 法と比較して CEDIA 法においては、EDLS をジゴキシンとして測定する可能性が低いと考えられる。

FPIA 法では前処理として除蛋白操作を行うが、この除蛋白により EDLS が遊離されジゴキシンとして測定される可能性が示唆されている⁵⁾。一方、RIA 法では反応時間が 60 ± 5 分と長い、60 分より短ければ、EDLS による分析妨害を受けない可能性がある。ところが、除蛋白処理が不

Table 4. 標準液における実測値 (500秒間の吸光度差) の変動

	Digoxin 標準液の濃度 (ng/ml)		
	0.0	2.0	4.0
平均 (吸光度差)	0.3328	0.4039	0.4631
標準偏差 (吸光度差)	0.0059	0.0044	0.0058
変動係数 (%)	1.77	1.09	1.25
サンプル数	14	14	14

要で反応時間も短い CEDIA 法では EDLS を測定しないか、あるいは低い割合でしか測定しないという可能性が考えられる。

結 語

新しいジゴキシン測定法である CEDIA 法は、除蛋白の前処理操作や、結合体と非結合体との分離操作を必要とせず、検体量も少量で測定可能である。従来の測定法の一つである RIA 法は、検体のインキュベーションに 60 ± 5 分と長時間を要する上、結合体と非結合体との分離操作を必要とするため、ジゴキシン中毒の判定のような緊急要請に十分答え得るかどうか疑問である。また、現在、繁用されている FPIA 法も蛋白除去の前処理を必要とし、かつ検体量も多く必要とするため、緊急測定依頼時や未熟児等の検体量の少ない場合に若干の問題があると思われる。以上の点を考慮に入れると、CEDIA 法は従来の測定法と比較して迅速簡便な測定法である。測定精度の一層

の向上のためには抗体の特異性の向上や反応時間等の測定条件の改善も望まれるが、同法は今後、有用なジゴキシン測定法の一つになり得るものと考ええる。

謝辞 セディアージゴキシン測定キットをご提供いただいた山之内製薬株式会社に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 幸田幸直, 西原カズヨ, “改訂薬物血中濃度測定の実際”, 田村善蔵, 堀岡正義編, 薬業時報社, 東京, 1984, pp.283-302.
- 2) 関 顕, 藤井 潤, “新治療指針”, 内藤周幸, 松尾 裕, 稲田 豊, 玉熊正悦編, 医歯薬出版, 東京, 1984, pp.131-143.
- 3) M.L.Matheke and R.Valdes, Jr., *Ann.Clin.Lab.Sci.*, 19, 168-174 (1989).
- 4) S.J.Phelps, C.A.Kamper, M.B.Bottorff and B.S.Alpert, *J.Pediat.*, 110, 136-139 (1987).
- 5) W.F.Skogen, M.R.Rea and R.Valdes, Jr., *Clin.Chem.*, 33, 401-404 (1987).