蛍光偏光免疫測定法におけるジゴキシン様物質の発生と光散乱の関与

青野珠可, 河上直美, 加藤 敦, 川上純一*, 足立伊佐雄
富山医科薬科大学附属病院薬剤部†

Appearance of Digoxin-like Factor and Implication of Scattering-light in Fluorescence Polarization Immunoassay

Shuka Aono, Naomi Kawakami, Atsushi Kato, Junichi Kawakami* and Isao Adachi
Department of Hospital Pharmacy, Toyama Medical and Pharmaceutical University†

[Received September 4, 2000]
[Accepted December 10, 2000]

Digoxin-like factor (DLF) is known to interfere with a digoxin assay and falsely elevate the digoxin concentration. DLF has been reported in patients with liver and renal diseases, terminal pregnant women and infants. In this study, cholestatic rats induced by a surgical bile-duct ligation were used to clarify the appearance of DLF in a fluorescence polarization immunoassay (FPIA), and finally a precipitation method was improved. DLF increased immediately and reached about 0.4 ng/mL at 48 hrs after the bile-duct ligation. After centrifugal deproteinization with a precipitation reagent, 6 % sulfosalicylic acid aq. solution : MeOH mixture (1 : 1) (SSA), 69 and 202 µg of a residue were detected while using a membrane filter (cellulose acetate ; pore size, 0.45 µm) at room temperature for 20 and 60 min, respectively. The scattering-light intensity (480–490 nm) of the cholestatic plasma was 5.5 times higher than that of the normal plasma and moreover increased by 20% after 60 min of incubation at room temperature. However, this high scattering-light intensity diminished when kept at 4°C for 60 min after adding the precipitation reagent, and DLF could thus be reduced. Porphyrin, a mixture of bilirubin and urobilin, can easily be aggregated by increasing the ionic strength and acidity, therefore, the addition of NaCl into cholestatic plasma in order to elevate the ionic strength potentiated the scattering-light intensity and DLF. These findings suggested that DLF in the cholestatic plasma may arise as a result of the appearance of some large particles after centrifugation because of insufficient deproteinization, which can scatter excited light due to polarization.

Keywords — fluorescence polarization immunoassay (FPIA), digoxin like factor (DLF), digoxin-like immunoreactive factor (DLIF), cholestasis, scattering-light

緒 言

血漿中ジゴキシン濃度の測定法には HPLC や RIA を用いた方法があるが、操作性や、迅速性などの観点から臨床においては蛍光偏光免疫測定法 (FPIA), マイクロパーティクル酵素免疫測定法 (MEIA) および化学発光免疫測定法などが一般的に使用されている¹⁻³⁾。しか

し、腎機能障害患者、肝機能障害患者、妊娠後期の妊婦、新生児などの血中に、ジゴキシンの投与を受けていないにもかかわらず、測定上ジゴキシンが検出されることがある。このような現象は、血中にジゴキシン抗体と反応する物質が存在するためと考えられており、これをジゴキシン様物質 (DLF ; Digoxin Like Factor) と呼んでいる。DLF は FPIA において最も多く報告されてお

† 富山市杉谷2630 ; 2630, Sugitani, Toyama-shi, 930-0194 Japan

り⁴⁻⁸⁾、健常人であってもDLFが検出される場合も報告されている^{4,8)}。

FPIAは、トレーサー（蛍光標識ジゴキシン）およびジゴキシンがポリクローナル抗体と競合的に結合する抗原抗体反応を利用したものであり、抗体との結合量を蛍光偏光度の変化によって測定し、ジゴキシンの定量を行っている¹⁾。そのためこれまでのDLFに関する研究では、ジゴキシンポリクローナル抗体に反応し得るジゴキシンの構造類似物質の探索に重点が置かれてきた。その結果、すでにセンソに含まれているbufarinにジゴキシン抗体と交差性があることが明らかとなっており⁹⁾、また、牛の副腎皮質やヒトの尿中に内因性のジゴキシン類似物質が存在することも報告されている^{10,11)}。

FPIAは偏光励起光がトレーサーに照射され、偏光蛍光が発せられることを利用した測定法である¹⁾。そしてその偏光度(P)は式(1)のように表される。

$$P = \frac{I_h - I_v}{I_h + I_v} \quad (1)$$

P; 偏光度

I_h ; 励起光と平行な蛍光成分

I_v ; 励起光と垂直な蛍光成分

もし血漿中に励起光を散乱させるような巨大分子が存在すると、励起光が散乱し、偏光性を失った蛍光が生じる。その結果、蛍光偏光度は減少し、見かけのジゴキシンが実際よりも多く検出されることが考えられる。腎機能障害、肝機能障害時では通常排泄されるはずの物質が蓄積されている状態にあるため、除タンパク後にも散乱を惹起する物質が存在または出現している可能性がある。

そこで本研究では胆管閉塞により作成した胆汁うっ滞型の肝機能不全モデルのラットを用いて、その血漿の見かけのジゴキシン濃度と光散乱スペクトルを測定し、DLFと光散乱の関係について検討を行った。また、DLFを減少させる除タンパクの方法についても検討した。

材料と方法

1. 実験動物

Wistar系雄性ラット(260-330g;三協ラボサービス、東京)の胆管を結紮し、胆汁うっ滞ラットを作成した。またコントロールには偽手術を施した。

2. 測定材料

ヒトの検体は薬物血中濃度を測定する目的で本院薬剤部に提出された血清のうち、DLFが0.5ng/mL以上検出された検体を選んで実験に用いた。

3. 試薬

コントロールの血漿にジゴキシン(Aldrich Chemical Co., USA)を加え、ジゴキシン濃度が0.5-1.0ng/mLになるように調整した。

4. DLFまたはジゴキシンの血漿中濃度の測定

DLFまたはジゴキシンの血漿中濃度の測定は、FPIAによるジゴキシン測定キット(TDXTM-ジゴキシン「アボット」;ダイナボット、東京)を用い、TDXアナライザー(ダイナボット)にて測定した(検出限界は0.2ng/mL)。除タンパク剤には測定キットに付属する3%5-スルホサリチル酸を含む50%メタノール水溶液(SSA)を用いた。また除タンパク操作は、測定試薬キットの添付文書に記載されている方法(通常操作, standard method)に従って行った。すなわちTDX遠心用チューブに除タンパク剤およびサンプルをそれぞれ200μLずつ分注し、遠心チューブのふたをし、3~5秒間サンプルミキサーで攪拌した後、約90秒間遠心分離して透明な上清を得た。

5. 胆汁うっ滞ラットにおけるDLFの測定

コントロールと胆汁うっ滞のラットから、胆管結紮前、結紮後4, 8, 12, 24, 48時間に、軽いエーテル麻酔下、眼底静脈より血液500μLを採取し、FPIAにて血漿中のDLFを測定した。

6. ラット血漿の採取

偽手術終了後または胆管結紮48時間後、コントロールと胆汁うっ滞ラットの下行大動脈より採血し、遠心分離(1,000×g, 10min)によって血漿を得た。採取した血漿はただちに-20℃で測定時まで保存した。

7. DLFと除タンパク時間、温度の関係

胆管結紮48時間後のラットの血漿200μLと、既知量(約0.75ng/mL)のジゴキシンを添加したコントロールの血漿200μLにSSA200μLを加えて混和後、25℃または4℃にて1, 4, 8時間放置した。TDX専用遠心分離器にて遠心分離した後(9,500×g, 90sec)、ただちにFPIAにて上清中の見かけのジゴキシン濃度を測定した。

8. メンブランフィルターによるろ過

胆管結紮48時間後のラットの血漿200μLと、既知量のジゴキシンを添加したコントロールの血漿200μLに、SSAを200μL添加した。混和後、ただちにTDX専用遠心分離器にて遠心分離(9,500×g, 90sec)し、そ

の上清を0, 10, 20, 30, 60分間室温で放置した後, そのうち300 μ Lをメンブランフィルター (cellulose acetate, pore size 0.45 μ m)に通した. フィルターを2日間25 $^{\circ}$ Cで乾燥後, その重量をマイクロ天秤にて測定し, フィルター上の残存重量を算出した.

9. 光散乱スペクトルの測定

胆管結紮48時間後のラットの血漿200 μ Lと, 既知量のジゴキシンを添加したコントロールの血漿200 μ LにSSAを200 μ L添加した. 混和後, ただちにTDX専用遠心分離器にて遠心分離 (9,500 $\times$ g, 90sec)を行った. 遠心分離の直後または60分間室温で放置した上清をTDX希釈緩衝液 (ダイナボット) で10倍希釈し, ただちに蛍光分光光度計 (RF-5300PC; 島津製作所, 東京)を用い, 光散乱スペクトル (400–600nm)を測定した. またSSAを添加してから氷冷中で60分間放置した後, 遠心分離により得た上清についても同様に光散乱スペクトルを測定した. スペクトルの測定には, 励起波長と検出波長が同じ波長 (バンド幅1.5nm)で移動しながらスキャンする synchronous scan modeを用いた.

10. DLFおよび散乱光強度に及ぼすNaCl添加の影響

Pasternackらの方法に準じて¹²⁾, DLFおよび散乱光強度におよぼすNaCl添加の影響を調べた. すなわち, 胆汁うっ滞およびコントロールの血漿に, NaCl (ナカライテスク, 東京)を添加し, ポルフィリンが集合体を形成する1.5%にNaCl濃度を調整した. コントロール群にはNaCl溶液の代わりに蒸留水を加えた. これらの血漿200 μ LにSSAを200 μ L添加して混和後, ただちに遠心分離 (9,500 $\times$ g, 90sec)して, 上清を得た. その後, DLFをFPIAにより測定した. さらに光散乱スペクトルの実験と同様の方法で, 胆汁うっ滞とコントロールの血漿についてNaCl添加・非添加時の光散乱スペクトルをそれぞれ測定した.

11. 氷冷下除タンパク操作の有用性

胆汁うっ滞およびコントロールの血漿に0, 0.5, 1.0, 2.0ng/mLとなるようにジゴキシンを添加した. 各血漿200 μ Lに氷冷したSSAを200 μ L加え混和後, 氷冷にて1時間放置し, 遠心分離 (9,500 $\times$ g, 90sec)を行い上清の見かけのジゴキシニン濃度をFPIAにより測定した.

また, ジゴキシンの投与を受けていないヒトの血清を, 4 $^{\circ}$ Cで1時間の除タンパク操作を行いDLFをFPIAにより測定した.

12. 統計処理

対照群との有意差検定はF検定により等分散性が確認されたため, 対応のないStudent's *t*-testにて行い, $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した.

結 果

1. 胆汁うっ滞のDLFに与える影響

ジゴキシンを含まないにも関わらず, FPIAによりジゴキシニン濃度として検出された値をDLFとした. 胆管結紮後の血漿中DLFの推移をFig. 1に示した. 胆管結紮4時間後にはDLFの上昇がみられ, 48時間後で約0.45ng/mLを示した. 一方, コントロールではすべての点が0.2ng/mL以下であった. これにより, 胆汁うっ滞の血漿中にはDLFが存在し, ジゴキシニン測定値が実際よりも高くなることを確認した.

2. DLFと除タンパク時間, 温度の関係

SSAを添加後一定時間放置し遠心したときの, DLF濃度の経時的变化を測定した. ジゴキシニンを含むコントロールの血漿では, 放置時間, 温度に関係なく約0.75ng/mLで, 変動は測定誤差の範囲であった (データ示さず). 一方, 胆汁うっ滞の場合, DLF値は時間依存的に減少し, また4 $^{\circ}$ Cで除タンパク操作を行うとDLFはさらに低下した (Fig. 2).

3. フィルター残存重量の経時的变化

胆汁うっ滞ラットとコントロールの血漿をSSAにて除タンパクした後, 上清をメンブランフィルターでろ過した. フィルター残存重量の経時的变化をFig. 3に示す. 胆汁うっ滞ラットの血漿においては, フィルター上の残存重量は時間依存的に増加し, 室温で1時間放置することにより202 μ g増加していた. 一方ジゴキシンを添加したコントロールの血漿では, 残存重量の増加はみられなかった.

4. 光散乱スペクトルの測定

室温および氷冷下において除タンパク操作を行った血漿の400–600nmにおける光散乱スペクトルをFig. 4に, またFPIAの励起波長付近 (480–490nm)における散乱強度下面積をTable 1に示す. 胆汁うっ滞の血漿に除タンパク剤を加えて遠心し, その上清を室温で1時間放置すると, 光散乱は上昇した. 480–490nmの散乱強度下面積も, 室温で1時間放置することにより約20%増加した. 一方, 胆汁うっ滞の血漿に除タンパク剤を加えて, 4 $^{\circ}$ Cで60分間放置した後, 遠心して得た上清の光散乱スペクトルは, コントロール近くまで低下し, 480–

Fig. 1. Changes of DLF Concentration in the Plasma of Cholestasic (closed circle) and Control (open circle) Rats Measured by FPIA.

Each value represents mean $\pm$ SD of 3–5 rats.

**Significant different from the control ($p < 0.01$)

* Significant different from the control ($p < 0.05$)

Fig. 2. Decrease in DLF of Cholestasic Plasma Precipitated at 4°C (open circle) and 25°C (closed circle).

Each value represents mean $\pm$ SD of 3 rats.

* Significant different from the control ($p < 0.05$)

490nm における散乱強度も、通常操作を行った場合と比べて72%減少させることができた。コントロールでは、どの除タンパク条件においても大きな散乱強度の上昇はみられなかった。

Fig. 3. Residue Amount of Cholestasic (closed square) and Normal (open square) Plasma Samples After SSA Precipitation.

Each value represents mean $\pm$ SD of 3 data.

* Significant different from the control ($p < 0.01$)

Fig. 4. Scattering-Light Spectrum of Cholestasic and Normal Plasma Samples after SSA Precipitation. Spectra are not corrected for photomultiplier response

..... Cholestasic : precipitated after incubation at 25°C for 60min.

----- Cholestasic : precipitated after incubation at 25°C for 0 min.

- · - · - Cholestasic : precipitated after incubation at 4°C for 60min.

----- Normal : precipitated after incubation at 25°C for 60min.

———— Normal : precipitated after incubation at 25°C for 0 min.

- · - · - Normal : precipitated after incubation at 4°C for 60min.

Table 1. Scattering-light Intensity Area (480-490 nm) of Supernatant Prepared from Cholestatic and Normal Plasma by the Standard and Modified Methods.

	Scattering-light intensity area (intensity · area)		
	25°C, 0 min (standard method)	25°C, 60 min (modified method)	4°C, 60 min (modified method)
Cholestasis	1032.7 ± 457.4	1229.6 ± 574.2	292.5 ± 111.3 **
Normal	188.2 ± 44.0	279.7 ± 64.4 *	131.5 ± 57.8

Each value represents mean ± SD of 6 data.

** Significant different from the standard method $P < 0.01$.

* Significant different from the standard method $P < 0.05$.

5. DLF および散乱光強度に及ぼす NaCl 添加の影響

FPIA：イオン強度を上昇させる目的で NaCl を添加した胆汁うっ滞とコントロールの血漿において、DLF を FPIA により測定した結果を Fig. 5 に示す。コントロールの場合、NaCl を添加しても DLF は上昇せず、低値であった。一方、胆汁うっ滞の場合、NaCl を添加することにより DLF の上昇が見られた。コントロールと胆汁うっ滞の血漿に NaCl を添加したときの DLF の平均上昇度はそれぞれ、 -0.035 (ng/mL：ジゴキシンとして) および 0.123 (ng/mL：ジゴキシンとして) であり、胆汁うっ滞の血漿はコントロールに比べ有意に ($P < 0.05$) 上昇した。

散乱光の測定：NaCl を添加、または無添加の胆汁うっ滞とコントロールの血漿の光散乱スペクトルを

Fig. 5. Effect of NaCl on DLF Concentration in Cholestatic and Normal Plasma. Each point represents one datum and each line represents changes of data.

Fig. 6 に、また 480-490nm における散乱強度下面積を Table 2 に示す。コントロールの場合、NaCl を添加することにより光散乱スペクトルは上昇し、480-490nm における散乱強度は 25% 増加した。また胆汁うっ滞の場合も、NaCl を添加することにより、光散乱スペクトルは上昇し、480-490nm における散乱強度も 31% 増加した。しかし散乱強度レベルは胆汁うっ滞の方が高くコン

Fig. 6. Effect of NaCl on Scattering-light Spectrum of Cholestatic and Normal Plasma after Precipitation.

Spectra are not corrected for photomultiplier response.

..... Cholestasis : NaCl (+)
 Cholestasis : NaCl (-)
 - - - - Normal : NaCl (+)
 ——— Normal : NaCl (-)

Table 2. Effect of NaCl on Scattering-light Intensity (480-490 nm) of Supernatant Prepared from Cholestasis and Normal Plasma.

	Scattering-light intensity area (intensity · area)	
	NaCl (−)	NaCl (+)
Cholestasis	638.8 ± 277.1	837.4 ± 353.0
Normal	253.3 ± 52.0	317.5 ± 106.5

Each value represents mean ± SD of 3 data.

コントロールの2.6倍であった。

6. 氷冷下除タンパク操作の有用性

胆汁うっ滞およびコントロールの血漿にジゴキシンを添加し、通常操作を行った時と、氷冷下で除タンパク操作を行った時の見かけのジゴキシンの濃度を比較した。添加したジゴキシンの濃度と見かけのジゴキシンの濃度の相関を Fig. 7 に示す。通常操作の場合、胆汁うっ滞とコントロールの直線は、DLF の影響を受け平行になった。しかし、氷冷で1時間放置後に遠心することにより、両者の直線は、ほぼ同一直線上に重なり DLF の影響を減弱させることができた。

また、ジゴキシンの投与を受けていないヒトの検体においても DLF の影響を減少させることができた (Table 3)。しかし4℃で60分間のインキュベーションを行っても DLF を完全には除去することはできず、0.29–0.48 ng/mL の減少にとどまった。

考 察

われわれのこれまでの実験結果より、胆汁うっ滞ラットにおける DLF の出現には血漿中の光散乱が影響していると考えられる。胆汁うっ滞の血漿では、時間依存的にフィルターを通過できないような微粒子が生成しており、この微粒子は除タンパク処理後20分間放置することにより69μg も増加した。TDX™ アナライザーでジゴキシンを測定するには20分程度の時間が必要であり、除タンパク処理した検体をカートリッジに注入した後に析出してしまう微粒子によって、励起光の散乱が増大すると考えられる。NaCl を添加し溶液中のイオン強度を上昇させると、ポルフィリンの集合体が形成しやすくなり光散乱が上昇することが報告されている¹²⁾。胆汁うっ滞時には血中にビリルビンやウロビリリンなどのポルフィン構造を持つ物質が多く存在しており、ポルフィリンが集合体を形成しやすい状態にあると考えられる。NaCl の添加により、散乱強度とともに DLF が上昇したことから、DLF の発生原因として光散乱物質が考えら

Fig. 7. Apparent Digoxin Concentration after the Standard Method (A) and Improved Method (B) at 4 °C for 60 min.

Open circles and closed circles represent cholestatic and normal plasma, respectively.

Table 3. DLF Concentration in Human Sera after the Standard and the Improved Method.

patients	DLF concentration (ng/mL)	
	25°C, 0 min (standard method)	4°C, 60 min (improved method)
15 years man epilepsy	0.69	0.21
63 years man hepatocirrhosis	0.79	0.50
59 years man hepatocirrhosis	0.53	0.19

れ、その一つにポルフィリンなどの集合体が関与していると推測される。一方で、DLFを含む患者の血清を4°Cで1時間の除タンパク処理を行ってもDLFを完全には除去することができなかったことは、光散乱以外のDLFが存在している可能性も示唆しており、これらについてはさらなる検討が必要である。

除タンパク後に析出する光散乱物質は、血漿に除タンパク剤を加え氷冷中で1時間放置してから遠心することにより、効果的に除去することができる。氷冷下の除タンパク操作は、通常行っている除タンパク操作を部分的に改善するだけで、特別な試薬、煩雑な操作も必要なく、DLFを減少させることができ有用な方法であると考えている。そしてFig. 7の結果から、光散乱によるDLFはジゴキシンの添加濃度に関係なく、一定の見かけ濃度の上昇をおこしている。このことから、胆汁うっ滞ラットにおけるDLFにはジゴキシンの抗体に反応する免疫様物質の影響はないと考えられる。

ジゴキシンの血漿中濃度を測定する場合、治療域が0.8–2.0ng/mLと低く¹³⁾、FPIAで測定している他の薬剤に比べ非常に高い感度を必要とする。このため大量の検体を少ない希釈倍率で用いたり、ジゴキシンの抗体をあらかじめ小容量のカートリッジ内でインキュベーションした後、トレーサーを添加するといった一連の操作を行うことにより感度を高めている¹⁴⁾。しかしこれらの操作は逆に、光散乱の原因となりうる集合体を形成する時間を与えることになり、集合体の形成を促進させる要因となりうる。さらに検体の希釈倍率が小さいため、希釈緩衝液の緩衝作用が期待できず、除タンパク剤であるスルホサリチル酸の影響を強く受けてしまう。肝障害や胆道疾患ではビリルビンなどのポルフィリンが血中に多く存在しているが、ポルフィリンは酸性条件下において集合体を形成しやすいという性質を持つことから¹⁵⁾、光散乱の原因物質の一つとも推測される。光散乱によるDLF値の上昇はFPIA独特のものであり、ジゴキシンの

抗体に結合させた後、洗浄過程があるMEIAなどではおこらない。そしてこのことはFPIAにおいてDLFの報告が多い理由の1つであると考えられる。

以上より、胆汁うっ滞ラットにおけるDLFの上昇は、不十分な除タンパク操作のために遠心後析出してしまふ微粒子による光散乱であると考えられる。これまでDLFは、ジゴキシンの抗体との交差性のためにジゴキシンの血中濃度を見かけ上高くしてしまうと考えられてきた。しかし、今回のわれわれの研究において、交差性以外の光散乱によってDLFが出現しうることを示したことは新しい知見であり、またその改善方法を提案できたことは臨床的にも重要であると思われる。

引用文献

- 1) TDX™-ジゴキシシン「アボット」, 血中ジゴキシシン測定用キット取扱説明書, ダイナボット社, 東京(1996).
- 2) アキシムジゴキシシンダイナパック™・NPT, 血中ジゴキシシン測定用キット取扱説明書, ダイナボット社, 東京(1998).
- 3) ACS: Centaur 専用試薬, ケミルミ ACS-ジゴキシシンⅡ取扱説明書, バイエル メディカル, 東京(1999).
- 4) H. M. E. Azzazy, S. H. Duh, A. Maturen, E. Schaller, L. Shaw, et al., Multicenter study of Abbott AxSYM® Digoxin II assay and comparison with 6 methods for susceptibility to digoxin-like immunoreactive factors, *Clin. Chem.*, **43**, 1635–1640(1997).
- 5) P. Datta, V. Hinz and G. Klee, Comparison of four digoxin immunoassay with respect to interference from digoxinlike immunoreactive factors, *Clin. Biochem.*, **29**, 541–547(1996).
- 6) P. Datta, L. Xu, S. Malik, D. Landicho, L. Ferreri, K. Halverson, P. V. Roby, A. M. Zebelman, M. A. Kenny, Effect of antibody specificity on results of selected digoxin immunoassays among various clinical groups, *Clin. Chem.*, **42**, 373–379(1996).
- 7) A. Dasgupta and O. Trejo, Suppression of total digoxin concentrations by digoxin-like immunoreactive substances in the MEIA digoxin assay, *Am. J. Clin. Pathol.*, **111**, 406–410(1999).
- 8) J. J. Miller and R. Valdes, Jr, Approaches to minimizing interference by cross-reacting molecules in immunoassays, *Clin. Chem.*, **37**, 144–153(1991).
- 9) A. Dasgupta and P. Datta, Rapid deflection of cardioactive bufalin toxicity using fluorescence polarization immunoassay for digitoxin, *Ther. Drug Monit.*, **20**, 104–108(1998).
- 10) H. M. A. M Qazzaz and R. Valdes, Jr, Simultaneous isolation of endogenous digoxin-like immunoreactive factor, ouabain-like factor, and deglycosylated conge-

- ners from mammalian tissues, *Arch. Biochem. Biophys.*, **328**, 193–200 (1996).
- 11) C. De. Angelis, M. Riscuzzi, R. Salvini, A. Piccoli, C. Ferri and A. Santucci, Isolation and characterization of a digoxin-like immunoreactive substance from human urine by affinity chromatography, *Clin. Chem.*, **43**, 1416–1420 (1997).
 - 12) R. F. Pasternack, J. I. Goldsmith, S. Szep and E. J. Gibbs, A spectroscopic and thermodynamic study of porphyrin/DNA supermolecular assemblies, *Biophys. J.*, **75**, 1024–1031 (1998).
 - 13) L. Shargel and A. Yu, “Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, 4th edition”, Appleton & Lange, Inc., New York, 1999, pp. 732–733.
 - 14) 全自動血中濃度測定システム TDXTM 取扱説明書, アボット株式会社, 東京.
 - 15) R. F. Pasternack and P. J. Collings, Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation, *Science*, **269**, 935–939 (1995).