

[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<sup>1,2)</sup>。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上昇が少ないと報告された<sup>2,3)</sup> 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: 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いないかを検討した。

## 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 $\mu$ l を酵素-抗体試薬瓶中に加える。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 $\mu$ 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 $\mu$ g/ml）に調製した試料を用いた。こ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 $\mu$ 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）、ジギトキシングニン、ジゴキシングニン（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ライド、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、トリグリセライドおよびビリルビンの各測定キット（マイルス・三共）附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い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濃度のジゴキシンの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±5°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274ml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、ジゴキシンとほぼ同等の交差反応を呈した。スピロノラクトンは、1.5μg/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

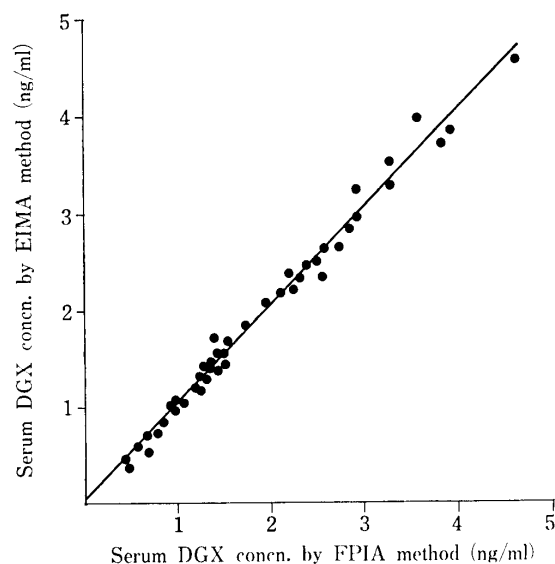


Fig. 1. Comparison of Serum Digoxin (DGX) Concentration Determined by Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA method) and Enzyme Immunoassay (EIMA method)  
 $y=1.01x+0.07$ ,  $r=0.993$ ,  $n=47$

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

| 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 |

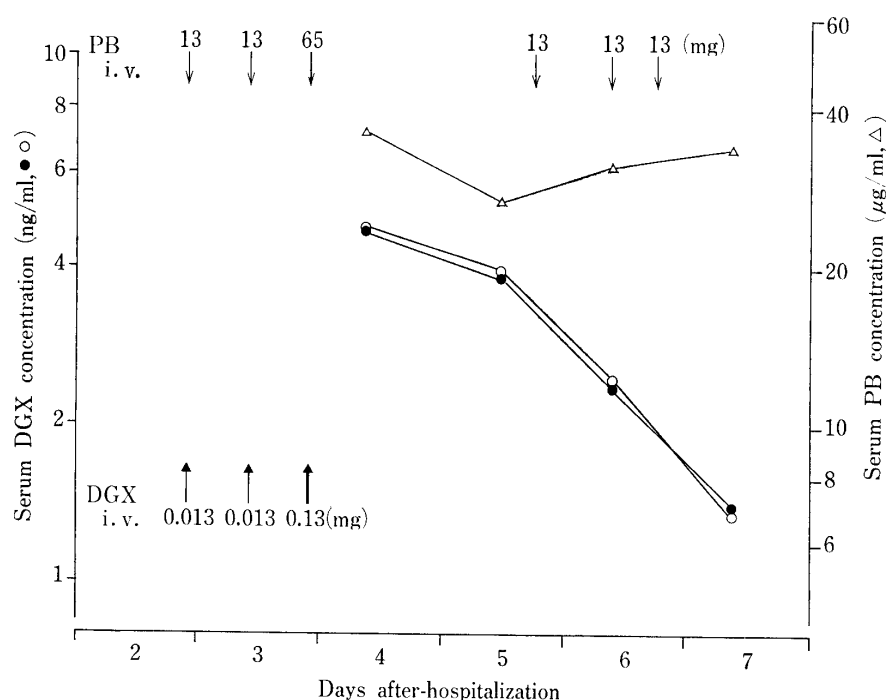


Fig. 2. Serum Digoxin (DGX) and Phenobarbital (PB) Concentration-Time Courses after Large Dosing of DGX and PB in a Patient with Heart Failure (H.K., male, 4 months)

● : 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

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ノ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), 临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は、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<sup>7)</sup>、消失半減期も約20時間<sup>8)</sup>あるいは43時間<sup>9)</sup>と長い。したがって、メチルジゴキシンからジゴキシンへ処方変更後1週間以内に EIMA-キットを用いてジゴキシ

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

- 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).