

質疑応答

(質問)ジギタリス様免疫活性物質(DLIS)と
内因性ジギタリス様物質(EDLF)
についてご教示下さい

(大阪府：Y. I.)

(回答)加藤 隆 児*

DLIS って何ですか？

DLIS とは digitalis-like immunoreactive substances の略で、抗 digoxin 抗体と交叉反応を示す物質である^{1~15)}。DLIS は高血圧、心不全、腎不全、肝障害のある患者、さらに妊婦や胎児・新生児などの血中や尿中に存在することが知られている^{1~15)}。

臨床で薬物血中濃度測定(TDM)を行う場合、迅速・簡便な酵素免疫法(Enzyme Immuno Assay)が一般的に用いられており、使用している抗 digoxin 抗体と交差(交叉)性のある物質が DLIS の基本型である。現在 digoxin の血中濃度測定で用いられている測定法としては、FPIA, MEIA, MARKIT, ACMIA の4種類が汎用されている^{8,9)}。

DLIS が出現するためには、次の3つの条件が考えられる。

1. 抗 digoxin 抗体の交差反応性(cross reactivity)が高い場合：各測定法により異なる抗 digoxin 抗体を使用しているが、その抗体の特異性が低いと DLIS が出現する。

2. 測定される物質の量(digoxin の場合 1ng/mL と微量)が微量である場合：Back ground(bilirubin など)が妨害物質となることがある。

3. DLIS ではなく EDLF である場合：肥大型心筋症(HCM)のように、digoxin 様物質を自身で合成している時に出現する DLIS を内因性 digoxin 様物質(endogenous digitalis-like factor, EDLF)という¹¹⁾。

FPIA は、1, 2 の何れも適合するため DLIS の出現しやすい測定法であり、市場から減少傾向にある。

DLIS と EDLF の違いは何ですか？

DLIS は元来生体に存在する digitalis 様物質であり、Na⁺-K⁺ ATPase を阻害し血圧・体液量調節系へ作用する因子とも考えられている^{1~6,10,11)}。この場合、DLIS は特に、EDLF と称され、厳密には DLIS と区別されることもある。DLIS や EDLF の化学構造は、現在のところステロイド骨格を有したウアインと極めて相同性の高い物質であるという考え方が一般的であるが^{2,3)}、正確な由来や生理的意義は未だ不明なところも多い。

Digoxin と構造式が似ている spilonolactone, canrenoate, eprelenone は、DLIS の可能性がありますか？

FPIA, MEIA, MARKIT, ACMIA の4機種の測定により、交差反応試験を行った^{8,9)}。Spilonolactone, canrenoate の臨床用量単独投与で、FPIA で DLIS が出現する。一方、spilonolactone, canrenoate と digoxin を併用すると MEIA で、digoxin 濃度が低下する⁸⁾。MEIA は、抗原抗体結合した抗体と結合していない抗体(B(bond)/F(free)分離)を行って測定する。B/F 分離時に固相の抗 digoxin 抗体に結合した spilonolactone, canrenoate が洗い流されるためと考えられている。

Eprelenone は digoxin 高濃度時、FPIA で digoxin

*大阪薬科大学循環病態治療学研究室

測定値が上昇する可能性がある⁹⁾。MARKIT、ACMIAの各抗 digoxin 抗体は、spilonolactone, canrenoate, eprelone との交差反応性が低いと考えられる^{8,9)}。

妊婦と胎児の DLIS^{12,13)}の正体は何？

19名の妊婦の出産時に、妊婦の末梢血(母体血)と臍帯血を FPIA 法および MEIA 法で測定した。その結果、MEIA 法では DLIS はほとんど検出されなかった。FPIA 法では、母体血から 0.23 ± 0.11 ng/mL、臍帯血から 0.55 ± 0.22 ng/mL の DLIS が検出され、有意差が認められた。このことから、FPIA 法において測定されたこれらの DLIS は EDLF である可能性は少なく、MEIA 法では測定し得ない夾雑物質であると考えられた。

そこで、頸管熱化ホルモンの dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) と黄体ホルモンである progesterone を用いて cross-reaction test を行った。その結果は、MEIA は無反応であった。一方、FPIA 法では DHEA-S (0.1%)、progesterone (0.04%) において、0.1% 以下の cross reactivity (CR) が確認された。言い換えると、DHEA-S の血中濃度が $1.0 \mu\text{g/mL}$ 以上、progesterone は $0.5 \mu\text{g/mL}$ 以上である場合、FPIA 法では 0.2 ng/mL の digoxin (DLIS) として測定される可能性があること確認された。

対象者の血中ホルモン濃度を radioimmunoassay で測定すると、DHEA-S は母体血 ($2,918 \pm 1,002 \mu\text{g/mL}$) と臍帯血 ($1,957 \pm 377 \mu\text{g/mL}$) で有意差は認められなかった。一方、progesterone は母体血 ($26.4 \pm 38.5 \text{ ng/mL}$)、臍帯血 ($310.0 \pm 85.7 \text{ ng/mL}$) で有意差が認められた。

母体血 ($0.23 \pm 0.11 \text{ ng/mL}$) の DLIS はほぼ DHEA-S であり、臍帯血 ($0.55 \pm 0.22 \text{ ng/mL}$) の DLIS は DHEA-S および progesterone の両方を測定したものと考えられた¹³⁾。

Digoxin と同じステロイド骨格をした内因性ホルモンと交差反応を示すことがある。薬剤として大量投与する progesterone 製剤(抗がん薬として用いられる MPA: ヒスロン H, 不妊治療時の大量 progesterone 陰製剤)、大量投与する頸管熱化ホルモン薬の DHEA-S 製剤(マイリス: 2007 年製造中止)など、投与中の患者の静脈血から、DLIS として検出されることがある。

新生児および乳児の DLIS¹⁴⁾は？

新生児と胎児の DLIS の違いを検討するために、新生児 10 例(生理的黄疸 5 例, 黄疸なし 5 例)と健常乳児 10 例(2 ヶ月~1 歳)を対象として、FPIA 法および MEIA 法にて DLIS の測定を行った。さらに FPIA 法測定時の蛍光バックグラウンド(blank-I) 値および bilirubin 値を測定し、これらの値の関連性について検討した。黄疸が出現し光線療法を受けた新生児黄疸 5 例の FPIA 法における DLIS 濃度は光線療法前が $0.58 \pm 0.13 \text{ ng/mL}$ 、後が $0.35 \pm 0.06 \text{ ng/mL}$ 、blank-I 値は前; $2,598 \pm 408$ 、後; $1,886 \pm 237$ で、光線療法前の方が後よりも、それぞれ有意に高値を示した。光線療法前における新生児 DLIS 濃度、blank-I 値は、健常新生児の FPIA 法によるそれらの値(DLIS; $0.34 \pm 0.04 \text{ ng/mL}$ 、blank-I; $1,764 \pm 278 \text{ ng/mL}$) よりも、それぞれの値が有意に高値を示した。既述した全ての値は、健常乳児の値(DLIS; $0.12 \pm 0.06 \text{ ng/mL}$ 、blank-I; $400.7 \pm 4.6 \text{ ng/mL}$) よりも有意に高値を示した(健常成人・妊婦や胎児の blank-I 値は 400 ng/mL 前後であった)。しかし、MEIA 法による DLIS 濃度は、黄疸を呈した新生児 ($0.07 \pm 0.11 \text{ ng/mL}$)、健常新生児 ($0.08 \pm 0.11 \text{ ng/mL}$) および健常乳児 ($0.08 \pm 0.08 \text{ ng/mL}$) の間に有意差が認められなかった。一方、bilirubin 値は光線療法の前後 ($17.98 \pm 1.13 \text{ mg/dL}$ vs. $15.16 \pm 2.07 \text{ mg/dL}$) で有意に改善し、新生児黄疸例 > 健常新生児 ($10.37 \pm 4.54 \text{ mg/dL}$) > 健常乳児 ($0.42 \pm 0.13 \text{ mg/dL}$) の順に低下した。したがって、FPIA 法により検出された新生児における DLIS 値は、上昇した blank-I 値および上昇した bilirubin 値の影響を受けていると考えられた。

以上の結果から、新生児の血漿中に検出された DLIS は EDLF ではなく、妊婦や胎児の DLIS とは異なり、back ground を bilirubin 関連物質が夾雑したものと考えられた。一方、back ground の影響を受けにくい固層法を用いた MEIA では、bilirubin 関連物質の干渉は受けなかったが、液相法により測定される FPIA 法は新生児、特に黄疸児の bilirubin 関連物質を DLIS として測定したと考えられる¹⁴⁾。

以上から、高 bilirubin 血症患者(肝不全、グルクロン酸抱合酵素欠損者など)に DLIS が出現する可能性がある。

健常成人男子の尿の DLIS¹⁵⁾の正体は？

Bilirubin, urobilinogen, creatinine の cross-reaction test を実施し、さらに、5名の健常男子の血漿と尿をサンプルとして FPIA 法と MEIA 法にて測定を行った。Cross-reaction test の結果、MEIA 法においては、いずれの物質からも DLIS は検出されなかった。また、FPIA 法においても、bilirubin, creatinine から DLIS は検出されなかった。しかし、FPIA 法において、10 μ g/mL 以上の濃度の urobilinogen からは、DLIS が検出された (0.65 \pm 0.56ng/mL)。一方、5名中4名の尿 (0.56 \pm 0.52ng/mL) から DLIS が検出されたが、血漿から DLIS はまったく検出されなかった。尿中 urobilinogen の正常値は 10 μ g/mL 程度であり、blank-I 値は、DLIS として測定された urobilinogen 10 μ g/mL 以上になると上昇した。同様に、尿中における blank-I 値 (8,267.37 \pm 3,290.07) は、血漿中のそれ (97.67 \pm 11.67) より有意に高かった ($p < 0.05$)。したがって、urobilinogen やこれを含有する尿は、blank-I 値が上昇したことによって DLIS として測定されたと考えられた。健常成人男子の尿中 DLIS は、新生児 DLIS と同様、FPIA による back ground の bilirubin 関連物質の干渉である¹⁵⁾。

腎不全患者は、尿が出にくくなるため血液中に urobilinogen が残留し、DLIS として出現する可能性がある。

肥大型心筋症患者 (HCM) の DLIS¹¹⁾とは？

肥大心を呈する代表的な疾患に高血圧性心疾患 (HHD) や HCM がある。HHD 症例 40 例および HCM 症例 77 例を対象に FPIA による血漿中 DLIS 濃度測定を行うと、HCM 患者 77 例中 18 例 (23.4%; 0.56 \pm 0.37 ng/mL) の血漿中から検出され、一方、HHD 患者では 40 例中 3 例 (7.5%; 0.23 \pm 0.02ng/mL) の血漿中から検出された。陽性例における血漿中 DLIS 濃度は、HCM 群が HHD 群に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$)。HCM 患者のうち血漿中に DLIS を検出した症例と未検出症例との群間で、血行動態の各種指標を比較した結果、DLIS 検出群は左室拡張終期圧 (LVEDP)、左房径 (LAD) で高値を示した ($p < 0.05$)。また心係数 (C.I.) は、DLIS 検出群が正常範囲内で有意に低値を示した ($p < 0.05$)。なお、心筋組織の線維化 (Fib) や心筋細胞横径

(diameter) では有意差が認められなかった。一方、光顕的免疫組織化学では、HCM 患者 20 例中 12 例に陽性所見が認められ、電顕的には心筋細胞の形質膜や心筋細胞内の介在板、Z 帯に一致して陽性像を認めた。また 12 例の陽性所見の中には、血漿中 DLIS 未検出例 2 例が含まれていた。HCM 患者の左室心筋細胞の細胞内に、服用していない digoxin (EDLF) が観察された。これらの結果から、HCM の患者には血漿中および心筋細胞内に EDLF が存在していることが確認された。血行動態的には、LVEDP、LAD の値が高値を示した患者の血漿中に EDLF が検出され、Fib や diameter には影響されなかったことから、血漿中 EDLF は心筋細胞の変性よりもむしろ、心機能が低下し血行動態が悪化することにより出現するものと考えられた。また血漿 EDLF 検出例は非検出例と比べて、C.I. 値が正常範囲内で低値を示したことから、EDLF は心機能を維持するために心筋細胞に代償的に作用している可能性もある¹¹⁾。

文 献

- 1) Gruber KA, Whitaker JM, Buckalew VM Jr: Endogenous digitalis-like substance in plasma of volume-expanded dogs. *Nature* 1980; 287: 743-5.
- 2) Seccombe DW, Pudek MR, Nowaczynski W, et al: Digoxin-like immunoreactivity, displacement of ouabain and inhibition of Na⁺/K⁺ATPase by four steroids known to be increased in essential hypertension. *Clin Biochem* 1989; 22: 17-21.
- 3) Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, et al: Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1992; 86: 420-5.
- 4) Graves SW, Brown B, Valdes R Jr: An endogenous digoxin-like substance in patients with renal impairment. *Ann Intern Med* 1983; 99: 604-8.
- 5) Kulaots IA, Pudek MR, Seccombe DW: Endogenous digoxin-like immunoreactive substances eliminated from serum samples from patients with liver disease by the EMIT column digoxin assay. *Clin Chem* 1987; 33: 1490-1.
- 6) Graves SW, Valdes R Jr, Brown BA, et al: Endogenous digoxin-like immunoreactive substance in human pregnancies. *J Clin Endocrin Metab* 1984; 58: 748-51.
- 7) Seccombe DW, Pudek MR, Humphries KH, et al: A study into the nature and organ source of digoxin-like immunoreactive substance (s) in the perinatal period. *Biol Neonate* 1989; 56: 136-46.
- 8) Steimer W, Müller C, Eber B: Digoxin assays: frequent,

- substantial, and potentially dangerous interference by spironolactone, canrenone, and other steroids. *Clin Chem* 2002; 48: 507-16.
- 9) Yamada T, Suzuki K, Iguchi K, et al: Interference between eplerenone and digoxin in fluorescence polarization immunoassay, microparticle enzyme immunoassay, and affinity column-mediated immunoassay. *Ther Drug Monit* 2010; 32: 774-7.
 - 10) Lloyd MA, Sandberg SM, Edwards BS: Role of renal Na^+ , K^+ -ATPase in the regulation of sodium excretion under normal conditions and in acute congestive heart failure. *Circulation* 1992; 85: 1912-7.
 - 11) Hayashi T, Ijiri Y, Toko H, et al: Increased digitalis-like immunoreactive substances in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2000; 21: 296-305.
 - 12) Diamandis EP, Diamandi AP, Soldin SJ: Digoxin immunoreactivity in cord and maternal serum and placental extracts. Partial characterization of immunoreactive substances by high-performance liquid chromatography and inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase. *Clin Biochem* 1985; 18: 48-55.
 - 13) Ijiri Y, Hayashi T, Kamegai H, et al: Digitalis-like immunoreactive substances in maternal and umbilical cord plasma; a comparative sensitivity study of fluorescence polarization immunoassay and microparticle enzyme immunoassay. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 234-9.
 - 14) Ijiri Y, Hayashi T, Ogihara T, et al: Increased digitalis-like immunoreactive substances in neonatal plasma measured using fluorescence polarization immunoassay. *J Clin Pharm Ther* 2004; 29: 565-71.
 - 15) Kato R, Hirotsu Y, Tsukura Y, et al: Cross-reactivity between urobilinogen and digoxin; a comparative sensitivity study of FPIA and MEIA - A relationship between urobilinogen and digitalis-like immunoreactive substances in human urine -. *Probl Ter Monit* 2008; 19: 3-9.