研究用試薬

YK241 Cortisol（Saliva）EIA / New type

取　扱　説　明　書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社　　矢内原研究所

〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770　TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp　E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目　次

Ⅰ．はじめに	2
Ⅱ．特徴	3
Ⅲ．キットの構成	3
Ⅳ．操作法	4～5
Ⅴ．操作上の注意	5～6
Ⅵ．基本性能	7～9
Ⅶ．貯蔵法および有効期間	9
Ⅷ．文献	9～10
Ⅸ．付録	10

YK241　Cortisol（Saliva）EIA / New type

Ⅰ．はじめに

コルチゾール(cortisol, hydrocortisone, compound F）は、副腎皮質から分泌されるホルモンで、主な糖質コルチコイドの一種です。糖代謝をはじめ、タンパク代謝、脂質代謝、電解質の代謝、骨代謝、さらに免疫機構にも関与しており、生命維持に不可欠なホルモンです。コルチゾールは炎症反応を強力に抑制する作用があります。また、ストレスに関与し、過度なストレスを受けると分泌量が増加し、その反応はとても敏感であることから、ストレスホルモンとも呼ばれています。コルチゾールの概日リズム（circadian rhythm）についてはよく知られており、朝の分泌が最も高く、夜が最も低いパターンを示し[1)]、そのストレスによる上昇が概日リズムに依存しないとされています[2)]。

コルチゾールは血中ではその 90%以上が Corticosteroid Binding Globulin (CBG)と呼ばれるタンパク質と結合しています。非結合型コルチゾールの一部は唾液中に分泌されます。唾液中のコルチゾールはほとんどが非結合型で存在しています。また、唾液中のコルチゾール濃度は唾液の分泌速度に影響されず、酵素による分解や凍結融解に相対的に安定であるとされています[3)]。

本キットは、前処理作業を必要とせず、唾液中のコルチゾールを短時間に直接定量することができる、きわめて簡便かつ有効なツールとして活用できるものであります。

YK241　Cortisol (Saliva) EIA / New type

▼ 0.012～3.000μg/dL の範囲で測定できます。
▼ 41 検体を duplicate でアッセイできます。
▼ 測定対象：唾液
▼ 測定は 1.5 時間で終了します。
▼ プレートは一列（8 ウエル）ずつ取り外しができますので、キットの分割使用が可能です。
▼ 同時再現性
CV (%)　3.9～4.6
▼ 日差再現性
CV (%)　4.3～5.9

保存と安定性
2～8℃で保存してください。使用期限はキット外箱のラベルに表示しています。

内容
1）測定プレート
2）標準品
3）標識体
4）緩衝液
5）酵素基質液
6）濃縮洗浄液
7）酵素反応停止液
8）プレート密閉用シール

Ⅱ． 特徴

本キットは唾液中に含まれるコルチゾールを定量的に測定するためのキットです。本キットによる測定に際しては、検体を前処理（抽出操作）する必要がなく、さらに測定は短時間で終了しますので、非常に簡便であり、かつ測定系の感度が高く定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点があります。

＜特異性＞

特異性については 8 ページの交差反応性データを参照してください。

＜測定原理＞

本アッセイ系は抗コルチゾール特異抗体と HRP（horse radish peroxidase）結合コルチゾールを標識体として用いる競合法による測定法です。

測定プレート（96 ウエル）の各ウエルには、抗コルチゾール抗体が固定されています。この各ウエルに標準品または検体および標識体を順次加えて競合反応させます。これによりウエル上に抗原あるいは HRP 結合抗原-抗体複合体が形成されます。最後に HRP 結合抗原-抗体複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中のコルチゾール濃度を求めることができます。

Ⅲ． キットの構成

試薬・器具	形状	規格		内容物
1. Antibody Coated Plate (測定プレート)		96 ウエル	1 枚	固定化抗コルチゾール抗体
2. Cortisol Standard (標準品)	凍結乾燥品	0.12 μg	1 本	合成コルチゾール
3. HRP-Labeled Cortisol (標識体)	液状	0.15 mL	1 本	HRP 標識コルチゾール
4. Buffer Solution (緩衝液)	液状	30 mL	1 本	BSA 含有リン酸緩衝液
5. TMB Substrate (酵素基質液)	液状	12 mL	1 本	3,3',5,5'-ﾃﾄﾗﾒﾁﾙﾍﾞﾝｼﾞｼﾞﾝ (TMB)
6. Washing Solution (concentrated) (濃縮洗浄液)	液状	50 mL	1 本	1% Tween20 を含む濃縮生理食塩液
7. Reaction Stopping Solution (酵素反応停止液)	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸
8. Adhesive Foil (プレート密閉用シール)			2 枚	

Ⅳ. 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。

(注意：キットに含まれるすべての試薬は室温に戻してから測定を始めてください。)

＜使用器具および装置＞

1. マイクロピペットおよびチップ（50μL～1mL）；8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計 (測定波長 450nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
3. 標準液および検体希釈の調製に使用するポリプロピレンチューブまたはガラス試験管
4. プレートシェーカー（最大速度 250rpm まで可能な仕様）
5. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます
6. 蒸留水または脱イオン水およびメスシリンダー (1000mL)

＜試薬の調製＞

1. 標準液の調製法：標準品の容器に緩衝液 1mL を加え約 5 分静置後、内容物をよく撹拌し溶解させ、12μg/dL の標準液を調製する。この標準液 0.2mL を取り、これを緩衝液 0.6mL で希釈し 3μg/dL の標準液を調製する。3μg/dL の標準液から 0.2mL を取り、これを 0.4mL の緩衝液で希釈して 1μg/dL の標準液を作製する。 以下同様の希釈操作を繰り返し、0.333、0.111、0.037 および 0.012μg/dL の各標準液を調製する。0μg/dL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
2. 標識体溶液の調製法：標識体の容器を軽く遠心してから標識体 85μL を取り、緩衝液 17mL で希釈して使用する。
3. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50mL (全量) 1 本を蒸留水または脱イオン水 950mL にて希釈し使用する。
4. その他の試薬はそのまま＜測定操作＞に従って使用する。

＜測定操作＞

1. キット内容を室温(22～25℃)に戻す。標準液、標識体溶液および洗浄液を上記＜試薬の調製＞に従って調製する。
2. 各ウエルに標準液または検体 50μL を入れ、ついで標識体溶液 150μL を加える。
3. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、プレートシェーカー（速度 210-220rpm）にて室温で 1 時間反応させる。

4. 各ウエル中の液を除き、各ウエルに洗浄液 350μL を加え、30 秒以上放置した後、プレートを反転して液を除く。この洗浄操作を合計 5 回行う。最後に反転したプレートを紙タオルなどにやや強くたたきつけるようにして液を充分除く。
5. 各ウエルに酵素基質液 100μL を加える。
6. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、遮光の状態で室温で静置し 30 分間反応させる。
7. 各ウエルに酵素反応停止液 100μL を加える。
8. マイクロプレート用吸光度計にて 450nm/620nm の吸光度を測定する。
9. 市販のソフトウェアを用い、4（or 5）－Parameter の回帰式を使用し、コルチゾール標準液の各濃度（6 ポイント）の測定値から標準曲線を作成してから、検体のコルチゾール濃度を求める。片対数方眼紙を用いる場合は、横軸（Log 側）に標準液の濃度を、縦軸 (linear 側)に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、コルチゾールの濃度を読み取る。相対結合率で計算する場合、まず各標準液濃度および検体の吸光度の 0μg/dL 濃度標準液の吸光度に対する相対結合率（B/Bo%）を計算し、横軸（Log 側）に標準液の濃度を、縦軸 (linear 側)に標準液各濃度の相対結合率をプロットし、標準曲線を作成する。検体の相対結合率を標準曲線に当てはめ、コルチゾールの濃度を読み取る。

Ⅴ． 操作上の注意

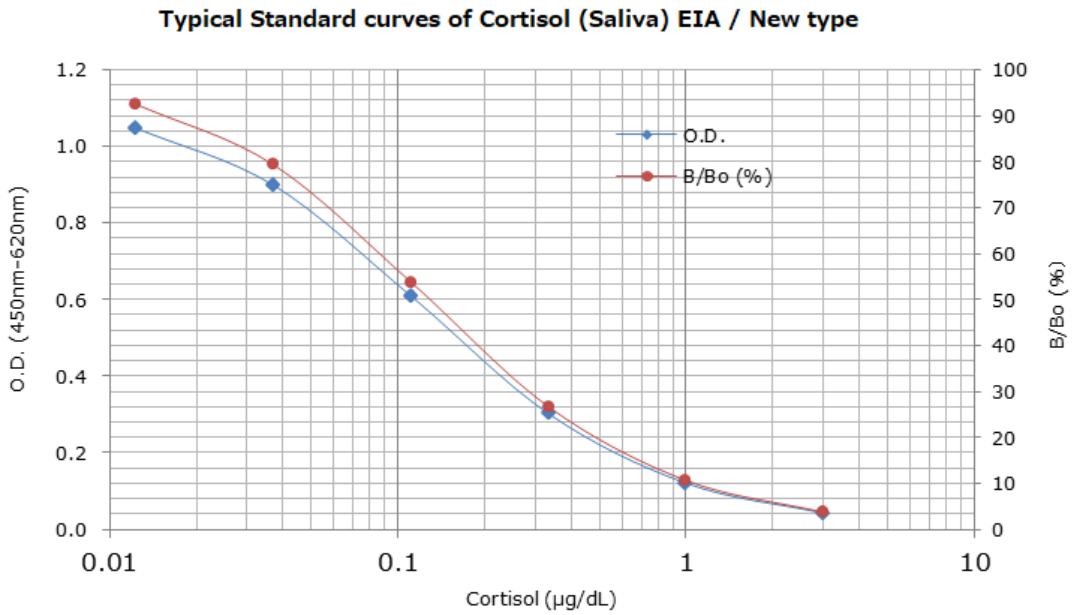
1. 唾液の採取には、サリベット（ザルスタット株式会社　商品コード 51.1534 もしくは 51.1534.500)、オーラルスワブ＋保存用チューブ（フナコシ株式会社　商品コード 5001.02＋5001.05）、Saliva Collection Aid＋Cryovial（フナコシ株式会社　商品コード 5016.04＋5004.01～06）のいずれかを使用し、それぞれの取扱説明書に従って行ってください。サリベットまたはオーラルスワブ＋保存用チューブを使用する場合、採取した唾液検体は遠心分離（3000rpm・15 分間）を行った後、ただちに－30°C以下で凍結保存してください。Saliva Collection Aid＋Cryovial を使用する場合は、採取した唾液検体をただちに－30°C以下で凍結保存し、測定前に室温に戻して撹拌した後、遠心分離（3000rpm・15 分間）を行ってください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 唾液採取の 60 分前から食事を摂取しないようにして下さい。
3. 唾液採取の 12 時間前からアルコール類の摂取を行わないようにして下さい。
4. 唾液採取前に糖分・酸度の高い飲み物やカフェイン飲料の摂取を行わないようにして下さい。
5. 唾液採取前に食事の影響を除去するため、口の中を水で充分ゆすいで下さい。ゆすいでから唾液採取まで少なくとも 10 分間以上、時間を空けてください。歯磨きは原則薦めません。

6. 血液が混入した唾液サンプルは測定に使用しないようにしてください。
7. 採取した唾液サンプルにアジ化ナトリウム（保存剤）を添加しないようにして下さい（測定系に影響を与える恐れがあります)。
8. キットの試薬は、用時調製・希釈を原則としてください。
9. 検出上限を超えるような予測濃度の高い検体を測定する場合は、予め緩衝液で希釈してから測定するようにしてください。
10. Prednisolone および dexamethasone 含有薬で治療中、または 21-hydroxylase deficiency（21OHD）症患者の場合、交差反応性（８頁を参照）に留意し、測定を行うようにしてください。
11. 洗浄時にプレートを反転して液を除く際は、反転したプレートをやや強くたたきつけるようにして、紙タオルなどの上に充分叩き、残液が残らないように注意してください。
12. 検体をウエルに注入する場合は、検体ごとに必ず新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。なお、ピペットの操作は丁寧かつ正確に行うようにしてください。
13. 標準液、検体ともに測定は二重測定で行うようにしてください。
14. キットを分割使用する場合、標識体は必要な分だけを希釈調製するようにしてください。溶解した 12μg/dL 標準液の残液および他の試薬は 4°Cにて保存し、2 週間以内に使用してください。洗浄液および酵素反応停止液は室温保存でも構いません。希釈した標準液および標識体溶液は次のアッセイに再利用しないようにしてください。
15. 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間などでわずかながら影響を受けることがありますので、推奨している室温（22-25°C）で測定を行うようにしてください。標準曲線は必ず測定ごとに作成するようにしてください。
16. 発色反応は必ずプレートを遮光して行うようにしてください。
17. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行うようにしてください。
18. 試薬の保存中もしくは使用中は、強い光が当たらないように注意してください。
19. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないようにしてください。

Ⅵ. 基本性能

＜測定範囲＞　測定範囲　0.012~3.000μg/dL

＜標準曲線の 1 例＞



＜感度＞

アッセイの感度は次の式で求めることができます[4]。

$$感度＝\frac{2×0\mu g/dL\ 標準液の\ SD\ 値×0.012\mu g/dL}{0\mu g/dL\ 標準液の吸光度－0.012\mu g/dL\ 標準液の吸光度)}$$

＜再現性＞

濃度が異なる検体の同一アッセイ内（同時再現性）または複数回アッセイ間（日差再現性）の変動率

Saliva sample	同時再現性(Mean±SD, n=10)		日差再現性　(Mean±SD, n=8)	
	測定値（μg/dL)	CV, %	測定値（μg/dL)	CV, %
1	0.246±0.010	4.1	0.241±0.014	5.9
2	0.671±0.031	3.9	0.653±0.028	4.3
3	1.033±0.041	4.6	0.982±0.058	5.9

＜添加回収試験＞

Saliva sample	Cortisol added (μg/dL)	Observed (μg/dL)	Expected (μg/dL)	Recovery (%)
A	0	0.225		
	0.067	0.282	0.292	96.6
	0.2	0.411	0.425	96.7
	0.8	0.964	1.025	94.1
B	0	0.232		
	0.067	0.296	0.299	99.0
	0.2	0.397	0.432	91.9
	0.8	0.984	1.032	95.3
C	0	0.253		
	0.067	0.339	0.320	105.9
	0.2	0.469	0.453	103.5
	0.8	1.017	1.053	96.6
D	0	0.460		
	0.067	0.514	0.527	97.5
	0.2	0.625	0.660	94.7
	0.8	1.138	1.260	90.3
E	0	0.282		
	0.067	0.356	0.349	102.0
	0.2	0.482	0.482	100.0
	0.8	1.054	1.082	97.4
F	0	0.262		
	0.067	0.329	0.329	100.0
	0.2	0.462	0.462	100.0
	0.8	0.968	1.062	91.1

＜希釈試験＞

Saliva sample	Dilution ratio (1X)	Observed (μg/dL)	Expected (μg/dL)	% Of expected
No.1	1	0.237		
	2	0.122	0.119	102.5
	4	0.065	0.059	110.2
	8	0.036	0.030	120.0
No.2	1	0.250		
	2	0.123	0.125	98.4
	4	0.061	0.063	96.8
	8	0.031	0.031	100.0.
No.3	1	0.287		
	2	0.141	0.144	97.9
	4	0.074	0.072	102.8
	8	0.043	0.036	119.4
No.4	1	0.464		
	2	0.236	0.232	101.7
	4	0.122	0.116	105.2
	8	0.063	0.058	108.6
No.5	1	0.324		
	2	0.164	0.162	101.2
	4	0.085	0.081	104.9
	8	0.050	0.041	122.0
No.6	1	0.279		
	2	0.127	0.140	90.7
	4	0.059	0.070	84.3
	8	0.026	0.035	74.3

＜交差性＞

化学物質名	試験濃度(μg/dL)	交差反応性(%)
Prednisolone	10	11.159
Prednisone	100	0.301
Cortisone	100	1.980
Corticosterone	100	3.563
21-Deoxycortisol	10	11.436
11-Deoxycortisol	100	2.949
11-Dehydrocorticosterone	100	2.649
11-Deoxycorticosterone	100	0.704
Progesterone	1000	0.044
17α-Hydroxyprogesterone	100	0.602
11α-Hydroxyprogesterone	1000	0.007
Testosterone	1000	0.012
Aldosterone	1000	0.084
Betamethasone	100	0.393
Dexamethasone	10	24.045
DHEA	1000	0.026
4-Androstene-3,17-dione	1000	0.005
17β-Estradiol	1000	0.005
Triamcinolone	1000	0.014
Cholesterol	1000	Not detected

Ⅶ. 貯蔵法および有効期間

＜貯蔵＞

遮光し、2～8℃にて保存してください。

＜有効期間＞

製造日より１８ヶ月（使用期限は外箱に表示）

＜包装＞

1 キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

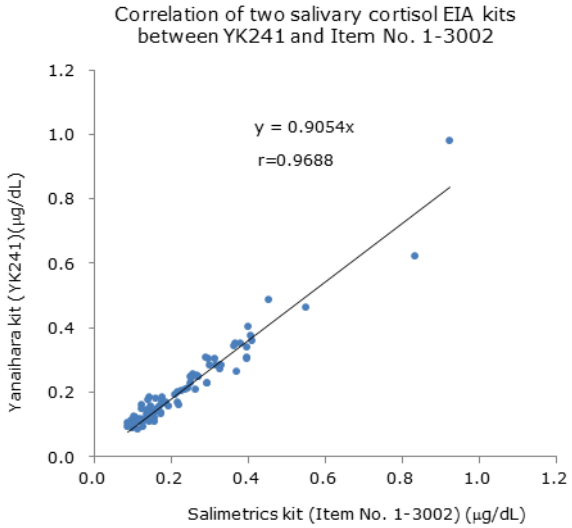
Ⅷ. 文献

1. Knutsson U, Dahlgren J et al: **Circadian cortisol rhythms in heathy boys and girls: Relationship with age, growth, body composition, and pubertal development.** *J Clin Endocrinol Metab* 82:536-40, 1997
2. Miller GE, Chen E et al: **If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary adrenocortical axis in humans .** *Psychol Bull* 133:25-45, 2007

3. Carde AH, and Hansen AM: **Long-term stability of salivary cortisol.** *Scan J Clin Lab Invest* 65:433-6, 2005
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1 (1989), Vallanova, PA: NCCLS

IX. 付録 (他社キットとの相関関係)

健常者の唾液 91 検体を測定して、Salimetrics 社の High Sensitivity Salivary Cortisol Enzyme Immunoassay Kit（Item No. 1-3002）との比較試験を行った結果、図に示したように良好な相関が認められています。



＜お問い合わせ先＞

株式会社　矢内原研究所

〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770　TEL: 0544-22-2771

http://www.yanaihara.co.jp　ask@yanaihara.co.jp

初版：２０２３年１１月２７日