研究用試薬

YK240 Corticosterone EIA

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	6～10
Ⅶ．貯蔵法および有効期間	11
Ⅷ．文献	11-12
Ⅸ．付録	13

YK240 Corticosterone EIA キット

Ⅰ． はじめに

コルチコステロン（Corticosterone）は、コルチゾール、コルチゾンと同様に副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドの一種であり、ライヒシュタインの H 物質、ケンドルの B 化合物ともいいます。コルチコステロンは体内でコレステロールから一連の酵素反応を経て合成され、脳下垂体前葉ホルモン ACTH により分泌がコントロールされています。また、コルチコステロン自身、アルドステロンの合成前駆体となります。コルチコステロンは糖質代謝、電解質代謝に影響を及ぼし、また免疫抑制作用、抗炎症作用などを示します。一方、副腎の 17α-ヒドロキシラーゼ活性がほとんどない動物（ラット、マウス、ウサギ、鳥類、両生類、爬虫類など）では唯一のグルココルチコイドとなります。コルチコステロンの日内変動についてはよく知られており、夜行性のラットなどでは、ヒトとは異なり、夜明け前の分泌が低く、夕方が最も高いパターンを示し、睡眠ー覚醒に決定的な役割を果たしているとされています[1)]。また、その分泌はストレスとの関連性が高く、尿中濃度の測定など非侵襲手法によるストレス度測定に有効なバイオマーカーとして注目されています[2)]。その他、コルチコステロンとストレスの関係については、ストレスによる長期記憶力損失の回復[3)]、食事制限による慢性的な分泌増加とストレス応答の増加[4)]、熱傷に対する分泌応答[5)]など幅広い領域で研究されています。

コルチコステロンは血中ではその 80%以上が Corticosteroid Binding Globulin (CBG)と呼ばれるたんぱく質と結合しているため、従来、血中コルチコステロンの測定に際しては、CBG 結合の影響を取り除くため煩雑な抽出作業を行わなければなりませんでした。今回矢内原研究所が新たに開発した「コルチコステロン EIA キット」は、そうした抽出作業を必要とせず、検体をキット添付の希釈液で希釈するだけで検体中のコルチコステロンを直接測定することができる、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。

YK240　コルチコステロン EIA キット

▼ 0.21～50ng/mL 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：血漿、血清、尿、細胞・組織培養液など
▼ 測定は 2.5 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 (%)　2.5～4.7
▼ 日差再現性
CV (%)　7.7～9.8

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）特異抗体
5）酵素基質液
6）酵素反応停止液
7）標識体溶解液
8) 検体希釈液
9）濃縮洗浄液
10) プレート密閉用シール

Ⅱ． 特徴

本キットはラット、マウスなどの血漿、血清、尿または組織細胞培養液中に含まれるコルチコステロン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）する必要なく、キット中の検体希釈液で検体を希釈したものを用いることができます。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１０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＞

本アッセイ系はウサギ抗コルチコステロン特異抗体と HRP（horse radish peroxidase）結合コルチコステロン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、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定されています。この各ウエルに標準品または希釈検体、標識体およびウサギ抗コルチコステロン特異抗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。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中のコルチコステロン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. 測定プレート		96 ウエル	1 枚	固定化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体
2. 標準品	凍結乾燥品	50 ng	1 本	合成コルチコステロン
3. 標識体	液状	0.3 mL	1 本	HRP 標識コルチコステロン
4. 特異抗体	液状	7 mL	1 本	ウサギ抗コルチコステロン抗体
5. 酵素基質液 (TMB)	液状	12 mL	1 本	3,3,'5,5'-ﾃﾄﾗﾒﾁﾙﾍﾞﾝｼﾞｼﾞﾝ
6. 酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸
7. 標識体溶解液	液状	10 mL	1 本	BSA 含有リン酸緩衝液
8. 検体希釈液	液状	50 mL	1 本	CBG 置換剤配合緩衝液
9. 濃縮洗浄液	液状	25 mL	1 本	1% Tween20 を含む濃縮生理食

塩液

10. 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（10μL～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ガラス製試験管
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. メスシリンダー (500mL)
7. 蒸留水または脱イオン水

＜試薬の調製＞

1. 標準液の調製法：標準品の容器に検体希釈液 1mL を加え、内容物を充分溶解させ、50ng/mL の標準液を作製する。この標準液 0.2mL を取り、これを検体希釈液 0.4mL で希釈し 16.67ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、5.56、1.85、0.62、0.21ng/mL の各標準液を調製する。0ng/mL の標準液は検体希釈液をそのまま使用する。
2. 標識体溶液の調製法：標識体の容器から 0.25mL を取り、標識体溶解液 7mL を加え、よく混合させて使用する。
3. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 25mL (全量)を蒸留水または脱イオン水 475mL 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。

＜検体の希釈＞

1. マウス、ラットの血清、血漿：試験管に検体 10μL と検体希釈液 400μL を加え混合させた後、室温で 10 分間静置してから使用する。
2. マウス、ラットの尿：試験管に検体 10μL を取り、検体希釈液で 40-100 倍に希釈、室温で 10

分間静置後使用する。(注 : 測定値にそれぞれ希釈倍率を掛けた後の値が実際の検体の濃度となります)。

3. 細胞培養液(培地 RPMI1640、FCS 添加または未添加):試験管に検体 50μL と検体希釈液 250μL を加え混合させた後、室温で 10 分間静置してから使用する。
4. その他の試料 : 試料中のコルチコステロン濃度を考慮し、まず検体希釈液で倍倍希釈することにより最適希釈倍率を決めてから使用する。

＜測定操作＞

1. キット内容を室温(20～30℃)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。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（洗浄操作は 1 回のみ)。
3. 各ウエルに標準液または希釈検体 100μL を入れ、ついで標識体溶液 50μL を加え、さらに特異抗体 50μL を加える。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールで密閉し、プレートシェーカー（速度 210-220rpm）にて室温で 2 時間反応させる。
5. 各ウエル中の液を除き、洗浄液 350μL を満たした後、２．と同様の洗浄操作を合計 5 回行う。
6. 各ウエルに酵素基質液 100μL を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールで密閉し、プレートシェーカー（速度 210-220rpm）にて室温で遮光しながら 30 分間反応させる。
8. 各ウエルに酵素反応停止液 100μL を加える。
9. マイクロプレート用吸光度計にて 450nm の吸光度を測定する。
10. 市販のソフトウェアを用い、4（or 5）－Parameter、もしくは Log-Logit の回帰式を使用し、コルチコステロン標準液の各濃度（６ポイント）の測定値から標準曲線を作成してから、検体のコルチコステロン濃度を求める。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、コルチコステロンの濃度を読み取る。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 0ng/mL 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、コルチコステロンの濃度を読み取る。

Ⅴ． 操作上の注意

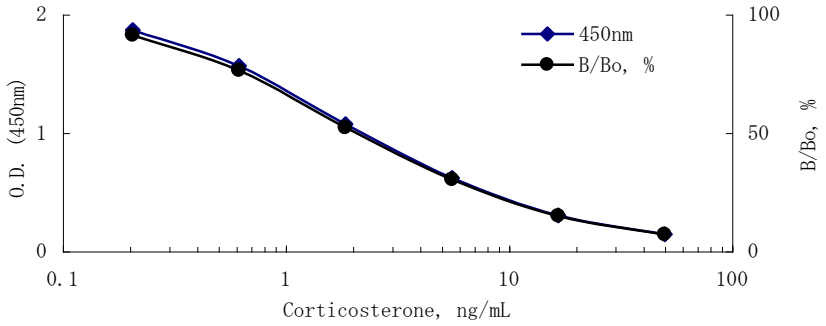
1. 血清または血漿分離後ただちに測定出来ない場合は適宜小分けし、−30℃以下で凍結保存してください（長期保存の場合、−８0℃の超低温冷凍庫に保存してください)。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。検体の実際の濃度は測定値に希釈倍率を掛けて求めてください。
2. 試薬は、用時調製・希釈を原則としてください。
3. 動物種によって検体中のコルチコステロンの濃度が著しく異なります。また同じ動物でも 1 日の内で大きく変動しますので、マウス、ラットの推奨希釈倍率は２０－１００倍であり、マウス、ラット以外の動物検体を測定するときは、予め最適な希釈倍率を決めておく必要があります。また、妊娠中の動物は血中のプロゲステロン濃度が著しく高くなりますので、このような検体の場合、交差反応性（１０頁を参照）に留意し、測定を行ってください。
4. 検体は検体希釈液で希釈した後必ず 10 分間以上室温に置いてください。
5. 洗浄時にウエルに残液が残らないように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いて残液が残らないように注意してください。
6. 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ってください。
7. 標準液、検体ともに測定は二重以上の測定で行ってください。
8. キットを分割使用する場合、溶解した試薬（50ng/mL の標準液と標識体溶液）の残液および他の試薬は 4℃にて保存し、2 週間以内に使用してください。洗浄液および停止液は室温保存でも構いません。他の希釈した標準液は次のアッセイに再利用しないでください。
9. 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、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
10. 発色反応は必ずプレートを遮光して行ってください。
11. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
12. 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。
13. 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でください。

Ⅵ. 基本性能

＜測定範囲＞　測定範囲　0.21~50ng/mL

＜標準曲線の 1 例＞

Typical standard curves of corticosterone EIA



＜感度＞

アッセイの感度は次の式で求めることができます[6)]。

$$\text{感度} = \frac{2\times 0\text{ng/mL 標準液の SD 値}\times 0.21\text{ng/mL}}{0\text{ng/mL 標準液の吸光度} - 0.21\text{ng/mL 標準液の吸光度}}$$

＜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

	同時再現性(Mean±SD, n=10)		日差再現性　(Mean±SD, n=9)	
	測定値 (ng/mL)	CV, %	測定値 (ng/mL)	CV, %
検体１	0.767±0.036	4.7	0.767±0.063	8.2
検体２	2.802±0.105	3.7	2.655±0.205	7.7
検体３	7.837±0.197	2.5	6.951±0.683	9.8

＜添加回収試験＞

マウス血清	Corticosterone added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
No. 1	0	5.933		
	1.52	7.728	7.453	103.7
	4.55	10.202	10.483	97.3
	13.64	18.696	19.573	95.5
No. 2	0	4.660		
	1.52	5.854	6.180	94.7
	4.55	8.464	9.210	91.9
	13.64	15.779	18.300	86.2
No.3	0	2.629		
	1.52	3.943	4.149	95.0
	4.55	6.530	7.179	91.0
	13.64	14.148	16.269	87.0

マウス血漿	Corticosterone added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
No.1	1.52	4.257	4.358	97.7

	4.55	6.577	7.388	89.0
	13.64	14.120	16.478	85.7
No.2	0	2.843		
	1.52	4.215	4.363	96.6
	4.55	6.569	7.393	88.9
	13.64	14.267	16.483	86.6
No.3	0	2.855		
	1.52	4.197	4.375	95.9
	4.55	6.915	7.405	93.4
	13.64	14.801	16.495	89.7

ラット血清	Corticosterone added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
No.1	0	4.908		
	1.52	6.711	6.428	104.4
	4.55	9.888	9.458	104.5
	13.64	20.396	18.548	110.0

ラット血清	Corticosterone added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
No.2	0	5.462		
	1.52	6.317	6.982	90.5
	4.55	10.117	10.012	101.0
	13.64	19.222	19.102	100.6
No.3	0	4.043		
	1.52	5.194	5.563	93.4
	4.55	8.209	8.593	95.5
	13.64	16.777	17.683	94.9

ラット血漿	Corticosterone added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
No.1	0	6.755		
	1.52	7.777	8.275	94.0
	4.55	11.546	11.305	102.1
	13.64	22.639	20.395	111.0
No.2	0	6.567		
	1.52	7.645	8.087	94.5
	4.55	10.816	11.117	97.3
	13.64	22.094	20.207	109.3
No.3	0	4.463		
	1.52	5.589	5.983	93.4
	4.55	8.824	9.013	97.9
	13.64	18.032	18.103	99.6

マウス尿	Corticosterone added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
No.1	0	6.332		
	1.52	8.340	7.852	106.2
	4.55	12.603	10.882	115.8
	13.64	22.998	19.972	115.2
No.2	0	2.578		
	1.52	4.476	4.098	109.2
	4.55	7.957	7.128	111.6
	13.64	18.517	16.218	114.2

培地	Corticosterone added (ng/mL)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Recovery (%)
RPMI-1640	0	2.379		

	1.52	3.711	3.899	95.2
	4.55	6.821	6.929	98.4
	13.64	16.496	16.019	103.0
RPMI-1640+	0	0.723		
10% FCS	1.52	2.031	2.243	90.5
	4.55	5.105	5.273	96.8
	13.64	14.881	14.363	103.6

注：サンプルを所定の方法で希釈してから添加回収試験を行っています。

＜希釈試験＞

マウス血清	Dilution ratio (1X)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	% Of expected
No.1	1	6.550		
	2	3.368	3.275	102.8
	4	1.700	1.638	103.8
	8	0.936	0.819	114.3
No.2	1	5.408		
	2	2.707	2.704	100.1
	4	1.450	1.352	107.2
	8	0.808	0.676	119.5
No.3	1	3.792		
	2	1.968	1.896	103.8
	4	1.022	0.948	107.8
	8	0.526	0.474	111.0

マウス血漿	Dilution ratio (1X)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	% Of expected
No.1	1	3.033		
	2	1.532	1.517	101.0
	4	0.808	0.758	106.6
	8	0.430	0.379	113.4
No.2	1	2.894		
	2	1.559	1.447	107.7
	4	0.838	0.724	115.8
	8	0.436	0.362	120.5
No.3	1	2.486		
	2	1.121	1.243	90.2
	4	0.564	0.622	90.7
	8	0.308	0.311	99.1

ラット血清	Dilution ratio (1X)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	% Of expected
No.1	1	7.660		
	2	3.414	3.830	89.1
	4	1.690	1.915	88.3
	8	0.895	0.958	93.5
No.2	1	6.692		
	2	3.201	3.346	95.7

	4	1.618	1.673	96.7
	8	0.765	0.837	91.5
No.3	1	4.797		
	2	2.302	2.399	96.0
	4	0.981	1.199	81.8
	8	0.583	0.600	97.2

ラット血漿	Dilution ratio (1X)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	% Of expected
No.1	1	6.674		
	2	3.123	3.337	93.6
	4	1.666	1.669	99.9
	8	0.786	0.834	94.2
No.2	1	8.323		
	2	3.969	4.162	95.4
	4	1.831	2.081	88.0
	8	0.981	1.040	94.3

ラット血漿	Dilution ratio (1X)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	% Of expected
No.3	1	4.635		
	2	2.359	2.318	101.8
	4	1.186	1.159	102.4
	8	0.595	0.579	102.7

マウス尿	Dilution ratio (1X)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	% Of expected
No.1	1	7.841		
	2	3.642	3.921	92.9
	4	2.011	1.960	102.6
	8	1.095	0.980	111.7
No.2	1	2.912		
	2	1.479	1.456	101.6
	4	0.874	0.728	120.1
	8	0.536	0.364	147.3

培地	Dilution ratio (1X)	Observed (ng/mL)	Expected (ng/mL)	% Of expected
RPMI-1640	1	2.710		
	2	1.330	1.355	98.2
	4	0.652	0.678	96.2
	8	0.320	0.339	94.5
RPMI1640+ 10% FCS	1	0.866		
	2	0.586	0.433	135.3
	4	0.240	0.217	110.9
	8		0.108	

注：サンプルを所定の方法で希釈してから希釈試験を行っています。

＜交差性＞

抗コルチコステロン抗体の各種ステロイド類化合物との交差反応性

化学物質名	交差反応性(%)
Corticosterone	100
11-Deoxycorticosterone	15.5
Progesterone	<5.9
Androstenedione	<5.4

Testosterone	<3.9
Aldosterone	<1.7
Cortisol	<0.5
Cortisone	<0.4
Prednisolone	<0.34
Betamethasone	<0.1
Dexamethasone	<0.09
Triamcinolone	<0.08
Prednisone	<0.06
Pregnenolone	<0.06
DHEA	<0.05
Estradiol	0
Cholesterol	0

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２４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. Vázquez-Palacios G, Retana-Marquez S et al: **Further definition of the effect of Corticosterone on the sleep-wake pattern in the male rat.** *Pharmacol Biochem Behav* 70:305-310, 2001
2. Goymann W, Möstl E and Gwinner E: **Corticosterone Metabolites can be Measured Noninvasively in Excreta of European Stonechats (*Saxicola torquata rubicola*).** *The Auk* 119:1167-1173. 2002
3. Hupe JM, James AC et al: **Cortical feedback improves discrimination between figure and background by V1, V2 and V3 neurons.** *Nature* 394:784-787, 1998
4. Kitaysky AS, Kitaiskaiya EV et al: **Dietary restriction causes chronic elevation of corticosterone and enhances stress response in red-legged kittiwake chicks.** *J Comp Physiol B: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 171:701-709, 2001
5. Thelling O, Noel G et al: **Stress hormone secretion and gut signal transducer (STAT)**

proteins after burn injury in rats. *Shock* 16:393-397, 2001

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1 (1989), Vallanova, PA: NCCLS
7. Takaya J, Iharada A, et al: **Upregulation of Hepatic 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 Expression in Calcium-Deficient Rats.** *Ann Nutr Metab.* 59:73-78, 2011
8. Satoh S, Suzuki H et al: **Casted-immobilization downregulates glucocorticoid receptor expression in rat slow-twitch soleus muscle**. *Life Sciences*. 89:962–967, 2011
9. Ekuni D, Tomofuji K et al: **Occlusal disharmony increases amyloid-β in the rat hippocampus,** *NeuroMolecular Medicine*, 13:197-203, 2011
10. Irie K, Ekuni D et al: **Occlusal disharmony induces BDNF level in rat submandibular gland.** *Archives of Oral Biology*. 56:35-40, 2011
11. Yamawaki Y, Fuchikami M et al: **Antidepressant-like effect of sodium butyrate (HDAC inhibitor) and its molecular mechanism of action in the rat hippocampus.** *World Journal of Biological Psychiatry*. 2011 Aug 3. [Epub ahead of print]
12. Takei Y, Bartolo RC et al: **Water deprivation induces appetite and alters metabolic strategy in Notomys alexis: unique mechanisms for water production in the desert.** *Proc Bio Sci,* 2012 Mar 7. [Epub ahead of print]

（注：参考文献 No.7-12 は本キットを利用して発表された一部の研究報告です。）

＜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：２００９年９月２９日

改訂：２０１２年４月１８日

＜発売元＞

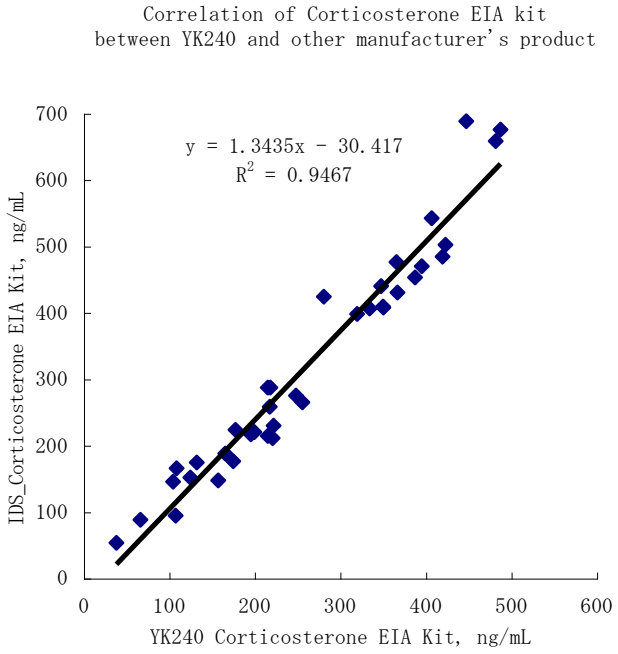
SCETI　セティ株式会社

〒100-0013　東京都千代田区霞が関 3-6-7

TEL 03-5510-2652　FAX 03-5510-0133

www.sceti.co.jp　e-mail：medical@sceti.co.jp

Ⅸ. 付録

他社キットとの相関関係

マウスおよびラットの血清または血漿 37 検体を I 社の Corticosterone EIA キット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。