

シバヤギアッセイ

(None GLP)

[受託測定案内]

富士フイルムワコーシバヤギ株式会社

〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1

TEL:0279-25-0279 FAX:0279-23-0313

<E-mail>wksb-info@fujifilm.com

<URL><http://www.shibayagi.co.jp>

2018.5.10

受託測定 について

受託する測定は研究目的に限ります。

測定は弊社製造の ELISA キット(製品品質検査適合品)を使用します。

測定は原則として1検体につき3重測定を行います。検体量の都合による場合、ご指定の場合は2重測定で行います。

ご依頼前の 留意点

各測定項目の対象動物、測定範囲、検体条件・注意事項・必要量・保存条件、本案内書記載事項をご依頼前に必ずご一読ください。

測定費用 について

受託測定費用は全てお見積りとなります。取扱販売店へお問合せください。

測定の ご依頼

受託測定依頼書に必要事項をご記入の上、取扱販売店営業担当者へお渡しください。

[受託測定依頼書はホームページよりダウンロードできます。](#)

検体発送

・検体発送の際は検体の保存条件にあった方法を選択してください。

・宅配業者により輸送温度は異なります。冷凍状態で送る際はドライアイスを到着日まで残るように入れてください。

・検体到着日が弊社営業時間内となるよう発送してください。

受託測定 の流れ (概略)

お問合せを頂いた後、受託測定見積書を作成

見積書ご確認後受託測定依頼書送付(取扱販売店経由)

↓

受託測定依頼書の確認と返信(取扱販売店経由)

↓

検体発送、検体到着後報告予定日の連絡(直接または取扱販売店経由)

↓

測定、報告書作成、報告書と報告書受領書を郵送(お客様へ直接郵送)

↓

報告書受領書(お客様から弊社へ郵送)

↓

取扱販売店より測定費用のご請求

* 詳しくは別紙【受託測定の流れ】をご参照ください。

測定報告

結果のご報告までの所要日数は測定項目により異なります。通常 10 営業日以内でご報告しておりますが、状況により遅くなる場合は検体到着時にご連絡致します。

免責事項

・各測定項目に設定されている標準操作法で行い、操作法に誤りが無く、標準品、ポジティブコントロールの測定が正常にできている場合で検体の測定ができなかった場合は、弊社では一切の責任を負うことはなく、正規の金額をご請求させていただきます。

・測定結果および測定結果報告などに起因する争議に関して、弊社では一切の責任を負いません。

【受託測定の流れ】

①お問い合わせ

弊社ホームページお問合せフォームへ必要事項をご記入の上、ご送信ください。

[受託測定お問合せ・お見積もりフォーム](#)

ご不明な点がございましたら、お問合せフォームから、もしくはお電話にてお問い合わせください。

TEL: 0279-25-0279

②見積書作成

ご依頼の内容に基づき、見積書を作成し取扱販売店よりご案内します。

③秘密保持契約

お客様からのご要望がある場合は、「秘密保持契約書」を作成し締結致します。

④受託測定依頼書の作成

測定費用、免責事項をご承諾頂いた上で、弊社で用意した受託測定依頼書の書式を用いて作成してください。

取扱販売店より弊社へ FAX または e-mail でご送付ください。

⑤検体送付

受託測定依頼書を確認後返信致します。その後、検体を検体保存条件にあった輸送方法で発送してください。

検体到着後報告予定日をご連絡します。

検体発送はご依頼者から直接でも取扱販売店からでもどちらでも構いません。送料は発送元払いをお願いします。

⑥測定・報告

測定を行います。測定後報告書を作成しご依頼者様へ郵送致します。お急ぎの場合は PDF ファイルで e-mail に添付しご報告も可能ですが、その際は事前に弊社まで報告先アドレスから e-mail を送信してください。

⑦報告書受領書の返送

報告書に[報告書受領書]を同封致しますのでご捺印後弊社まで郵送してください。

⑧ご請求

取扱販売店より測定費用をご請求させていただきます。

測定済み検体について

測定済み検体については報告後 2 週間保管します。

その後廃棄処分致します。残検体のご返却をご要望の場合は予めご依頼時にお申し付けください。送料は着払いをお願いします。

【良い結果を出すためのポイント】

測定試料のポイント; 試料が測定結果に影響する要因について

◎溶血について

測定系により影響するヘモグロビン濃度が異なりますので事前に確認してください。

溶血を抑制する為に抗凝固剤(ヘパリン、EDTA-2Na等)を添加した採血管での採血をお勧めしますが、弊社測定系にはヘパリン使用ができない系がありますので事前にお問い合わせください。

◎酵素阻害剤の微量含有について

保存剤として使用されるアジ化ナトリウム(NaN_3)、抗凝固剤として使用されるフッ化ナトリウム(NaF)がプレコーティングされている採血管は使用を避けてください。

◎乳びについて

高脂質検体は測定に影響がありますので事前にお問い合わせください。

◎pHについて

pHは6.5～7.5の範囲内で調整してください(特に培養検体でC-ペプチド測定する際は注意してください)。血清、血漿、培養液などは保存中に炭酸ガスを失って塩基性が強くなる傾向があります。

◎検体希釈率について

原液検体で測定可能な測定系と最低希釈率が必要な系があります。

測定範囲は標準曲線範囲です。検体を希釈して測定する場合は標準曲線から求めた濃度に検体希釈率を乗じ濃度を算出します。

◎不溶解物の混入、粘性が高い検体、高蛋白検体、高塩濃度(0.5 M以上)について

測定値に影響がでる可能性があります。

◎有機溶媒(過剰なエーテル麻酔)・界面活性剤の混入について

抗原抗体反応を阻害します。

◎抗凝固剤について

測定系によりヘパリン採血検体は使用できないものがありますので、事前に確認してください。

ヘパリン使用ができない測定項目 ; ◆抗マウス dsDNA-IgG ◆抗マウス ssDNA-IgG

アプロチニンを添加する場合で、ヘパリンとの組み合わせでは凍結検体を融解した際、フィブリンの析出がないかどうかご確認ください。フィブリンの析出がある場合、測定値に影響が出ることがあります。

◎ヒト用採血管の流用について

市販されているヒト用採血管を流用して採血しないでください。薬剤の検体中濃度が設計値よりも高くなり測定に影響が出る可能性があります。

◎阻害剤添加について

採血時に分解酵素阻害剤添加が必要な測定項目があります。

◆GLP-1(7-36)amide(添加必須) ◆プロインスリン、インスリン、C-ペプチド(添加推奨)

◎培養上清検体について

培地中の測定系への影響物質を事前確認が必要です。

◎検体の繰り返しの凍結融解について

凍結融解の繰り返しは測定値に影響を与えます。

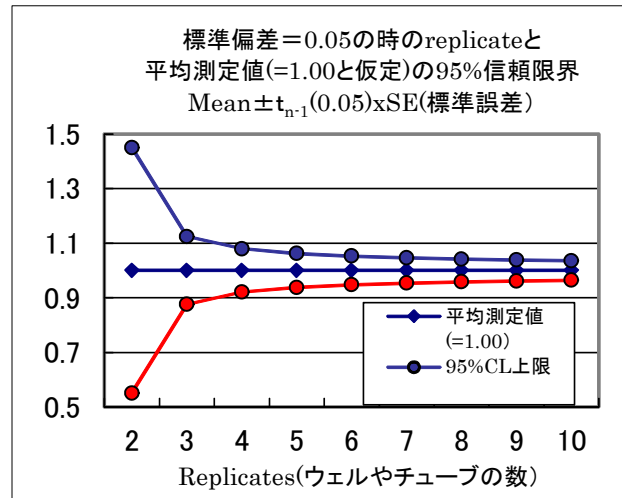
◎ストレスと麻酔について

採血時のストレス、絶食の有無、使用する麻酔薬により血中濃度の変動するものがあります。

■ 1 試料 3 重測定をお勧めします。

1 試料 1 ウェルの場合には自由度がゼロになります。従って統計学的には信頼度はゼロです。2 重、3 重測定ならば測定値の 95 %信頼限界が判定できます。標準誤差は試料数の平方根に反比例します。従ってレプリケートの数が多ければ平均値の信頼限界は狭くなり信頼度は上がります。一方、標本の分布の形を示す標準偏差は試料数に関係なくほぼ一定ですが、その信頼度は試料数に依存します。

右のグラフをご覧ください。このグラフは平均測定値を 1、標準偏差を 0.05 (つまり相対標準偏差或いは変動係数を 5 %と仮定した時)、測定の繰り返し、即ちウェルの数と求められた平均値の 95%信頼区間を示したものです。シングルアッセイは論外ですが、2 重測定での平均値の信頼区間は上下約 50 %となります。3 重測定で区間は上下約 10 %強です。通常 2 重測定が行われておりますが、弊社では 3 重測定を推奨しております。



検体量が少ない場合で 3 重測定することが不可能な場合は 2 重測定での測定も受け付け可能です。ただし、シングルアッセイは受け付けできません。

memo

ICH (International Conference of Harmonization、日米 EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議) で検討され実施項目とされている分析能パラメータがあり、厚生省の医薬審第 338 号で厚生省医薬安全局審査管理課長から各都道府県衛生主管部宛に通達され、第 14、15 改正日本薬局方の参考情報にも記されています。その内容は次のようなものです。

- 1) 分析法 (Analytical procedure) (定義)
- 2) 特異性 (Specificity)
種々の共存物の存在下で分析対象物を正確に測定できるか。
- 3) 真度 (Accuracy, Trueness)
真の値 (認証、合意された値) と実測値との一致の程度。
- 4) 精度 (Precision)
均質な検体から多数回採取した複数の試料の測定値間の一致の程度。
 - 4.1) 併行精度 (Repeatability)
短時間の間に同一条件下で測定する場合の精度 (= intra-assay precision)。
 - 4.2) 室内再現精度 (Intermediate precision)
同一施設内で試験日、実施者、器具、機器等を変えて測定する場合の精度。
 - 4.3) 室間再現精度 (Reproducibility)
異なった施設間で測定する場合の精度。
- 5) 検出限界 (Detection Limit)
分析対象物の検出可能な最低の量をいう。定量出来る必要は無い。
- 6) 定量限界 (Quantitation Limit)
適切な精度と真度で定量できる分析対象物の最小の量。
- 7) 直線性 (Linearity)
一定の範囲内で試料中の分析対象物の量と直線関係にある測定値を与える能力。
(イムノアッセイの場合には厳密には成立しない)
- 8) 範囲 (Range, 測定範囲)
適切な真度、精度、直線性を与える試料等の分析対象物の上限および下限の間隔。
- 9) 頑健性 (Robustness)
少くも分析法の条件が変わっても測定値が影響を受けにくい能力。

測定項目一覧(ELISA 法)

◆糖尿病・肥満マーカー研究測定シリーズ

測定項目	動物種	検体	必要量	保存	容器
高分子アディポネクチン	マウス/ラット	血清・血漿	50 μ L	冷凍	PP,PE
アポリポrotein B-48	ウサギ*1	血清・血漿	50 μ L	冷凍	PP,PE
アルブミン	マウス/ラット	血清・血漿・尿	50 μ L	冷凍	PP,PE
	イヌ/ウサギ/ウシ				
インスリン	サル*2/ハムスター ブタ/マウス/ラット	血清・血漿	80 μ L	冷凍	PP,PE
プロインスリン	マウス/ラット	血清・血漿	100 μ L	冷凍	PP,PE
レプチン	マウス	血清・血漿	100 μ L	冷凍	PP,PE
C-ペプチド	マウス/ラット	血清・血漿	100 μ L	冷凍	PP,PE
GLP-1(7-36)amide	マウス/ラット	血清・血漿	100 μ L	冷凍	PP,PE

*1 報告予定日が他の項目と異なります(15 営業日)。事前にご確認ください。

*2 サル検体においては、Bウイルス, SIV, 虫卵検査, ランブル鞭毛虫, ミクロフィラリア, 赤痢アメーバ, 赤痢菌, サルモネラ菌, マラリア, ツベルクリン反応検査を行い陰性であったことが確認された個体から採血されていることを事前に確認させていただきます。いずれかにおいて陽性の場合には検体の受け入れができません。

◆下垂体マーカー研究測定シリーズ

測定項目	動物種	検体	必要量	保存	容器
FSH	ラット	血清・血漿	150 μ L	冷凍	PP,PE
GH	ラット	血清・血漿	100 μ L	冷凍	PP,PE
LH	ラット	血清・血漿	150 μ L	冷凍	PP,PE
TSH	ラット	血清・血漿	200 μ L	冷凍	PP,PE

◆免疫系関連マーカー研究測定シリーズ

測定項目	動物種	検体	必要量	保存	容器
IgE	マウス/ラット	血清・血漿	50 μ L	冷凍	PP,PE
マウス抗 OVA-IgE	マウス	血清・血漿	50 μ L	冷凍	PP,PE
マウス抗 OVA-IgG ₁	マウス	血清・血漿	50 μ L	冷凍	PP,PE
マウスリウマチ因子-IgG	マウス	血清・血漿	50 μ L	冷凍	PP,PE
マウスリウマチ因子-IgM	マウス	血清・血漿	50 μ L	冷凍	PP,PE
マウス抗 dsDNA-IgG	マウス	血清・血漿	50 μ L	冷凍	PP,PE
マウス抗 ssDNA-IgG	マウス	血清・血漿	50 μ L	冷凍	PP,PE

☆検体必要量は 3 重測定を行い、低希釈率の場合で再測定分を考慮して設定しております。

☆血清または血漿の場合、必要量の 2 倍～3 倍量を目安に採血を行ってください。

☆冷凍は-35 $^{\circ}$ C以下。

PP(ポリプロピレン)、PE(ポリエチレン)

■測定項目

◆糖尿病・肥満研究関連

高分子アディポネクチン	
測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス/ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8%)のいずれかを使用してください。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

・溶血検体は避けてください。

測定範囲

・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 3.13~200 ng/mL です。血清、血漿は 25~50 倍に希釈して測定。検量線範囲から外れた場合は再測定します。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。

アディポネクチンについて

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるサイトカインすなわち adipocytokine (adipokine) のひとつで脂肪代謝とインスリン感受性を制御し、抗糖尿病、抗アテローム(抗粥状硬化症)、抗炎症性作用を示す重要な物質です。血中アディポネクチンは単量体が集合して 3 量体、6 量体あるいは 12-18 量体を形成しています。3 量体(LMW)はコラーゲン領域にある三重鎖ヘリックスの非共有結合相互作用と球状 C1qドメインにある疎水性交互作用によって形成されます。3 量体が集まって 6 量体(MMW)やもっと大きな複合体(HMW)を形成します。Adiponectin はさまざまな成長因子と明瞭な親和性で結合し、隔離することで細胞の成長と血管新生、組織の再構成に影響を及ぼすとされています。

血中 HMW の測定値はトータルアディポネクチンよりも BMI や性別、体重減少の影響、グルコース・トレランス、肝臓のインスリン感受性、メタボリック症候群や 2 型糖尿病をより明確に反映するとされています。従って HMW の測定はトータルアディポネクチンを測定するより、メタボリック症候群や DM2 の解析により役に立つことが期待されます。

memo

■精度 (precision) に関するパラメータと計算

ICH では精度 (precision, 均質な検体から多数回採取した複数の試料の測定値間の一致の程度) に関して 3 種類の区別をしております。即ち併行精度(Repeatability)、室内再現精度(Intermediate precision)、室間再現精度(Reproducibility)です。最後の室間再現性については臨床検査においては重要なことです。

■併行精度 (repeatability) と室内再現精度 (intermediate precision) の計算

併行精度は、短時間の間に同一条件下で測定する場合の精度、とされ、intra-assay precision と同義であるとされています。これまでは単に測定精度、precision、あるいは同時再現性とされてきたものに相当します。

室内再現精度とは、同一施設内で試験日、実施者、器具、機器等を変えて測定する場合の再現性の精度で、これまで使われてきた再現性(reproducibility)あるいは日差再現性に相当します。室間再現性として“reproducibility”が使われてしまっているので、混同しないようご注意ください。

いずれの場合にも変動係数(Coefficient of variation、CV)で表現されます。即ち、

$$\text{変動係数(CV)} = (\text{標準偏差(SD)} / \text{平均値}) \times 100 (\%)$$

CV のことを別称、相対標準偏差(Relative standard deviation, RSD)ともいいます。

これら変動係数は、併行精度の場合は intra-assay coefficient of variation、within-assay coefficient of variation、室内再現精度の場合は inter-assay coefficient of variation、between-assay coefficient of variation と呼ばれています。

アポリポタンパク質 B-48

測定方法	ELISA 法
対象動物	ウサギ *報告までの時間が他の項目と異なります(15 営業日)。
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

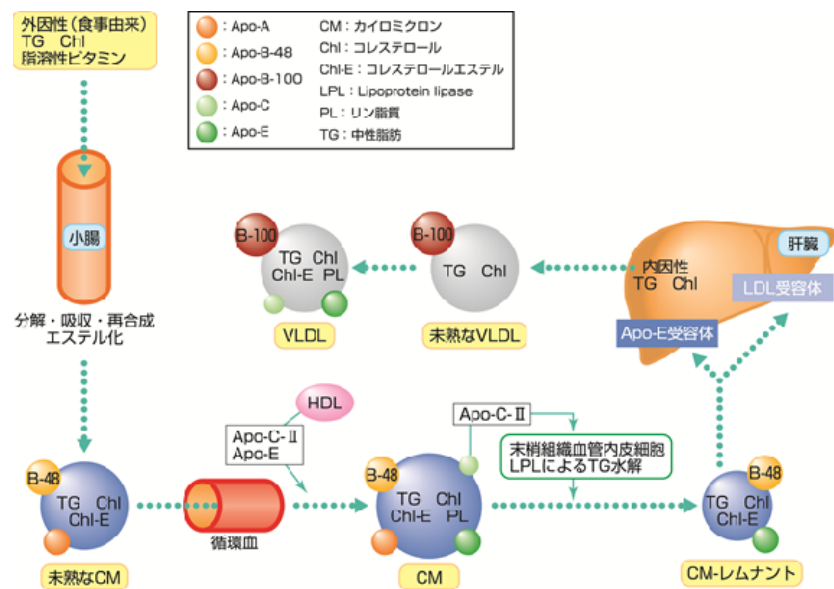
・溶血検体は避けてください。

測定範囲

・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 19.5~1,250 ng/mL です。血清、血漿の希釈目安は 10 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。

アポリポタンパク質 B-48 について

血漿リポタンパク質 (plasma lipoprotein) とは一定の割合の脂質とタンパク質からなる複合体で血清脂質の輸送を担っています。その構造の表面にはアポリポタンパク質があり、リポタンパク質の構造の安定化や、リポタンパク質代謝に関連する酵素の活性化、細胞表面にあるリポタンパク質受容体との結合など重要な役割を果たしています。アポリポタンパク質 B48(ApoB-48) は分子量 264kDa、構造的には、他の肝臓由来の血漿リポタンパク質で内因性脂質を輸送する VLDL、LDL、HDL に存在するアポリポタンパク質



B100 の 48% のアミノ酸配列を持っています。食物等に由来する外因性脂質を肝臓や末梢組織に輸送するリポタンパク質キロミクロン (Chylomicron、CM) は小腸で作られますが ApoB-48 は CM に特異的な構造タンパク質です。従って ApoB-48 を測定することは摂食後のリポタンパク質の観察には最適です。また同一試料で LDL、HDL-コレステロールと B48 を測定することにより、外因性コレステロール、内因性コレステロールの変化を解析できます (参考文献 2)。心臓脈管系における粥状硬化症の原因の一つと見られている CM の残渣 (CM レムナント) の評価にも役立つと考えられています。

リポタンパク質代謝には種差があってヒトやウサギでは CETP (Cholesterol ester transport protein、コレステロールエステル輸送タンパク質) が多く存在するが、ラットやマウスでは欠如しています。従ってこの領域ではウサギが実験動物として使用されます。この測定キットがウサギ用に作られているのはそのためです。

1: Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA.

Kinoshita, M., Kojima, M., Matsushima, T., and Teramoto, T.
Clinica Chimica Acta, 351:115-120, 2005

2: Effects of intensive atorvastatin and rosuvastatin treatment on apolipoprotein B-48 and remnant lipoprotein cholesterol levels.

Otokozawa, S., Ai, M., Van, Himbergen, T., Asztalos, BF., Tanaka, A., Stein, EA., Jones, PH., Schaefer, EJ.

Atherosclerosis, 205:197-201, 2009

アルブミン	
測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス/ラット
検体	血清・血漿・尿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)を推奨。 他の抗凝固剤ご使用については事前にご相談ください。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態
検体注意事項	
<ul style="list-style-type: none"> ・尿を検体とする場合は、pH が中性付近(6.5~7.5)にあることをご確認ください。畜尿時間が長くなると pH の変動、濃縮が起きる可能性があります。また、濁り、不溶解物が無いことをご確認ください。 ・溶血検体は避けてください。 	
測定範囲	
<ul style="list-style-type: none"> ・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 50~1,000 ng/mL です。血清、血漿は 10,000~50,000 倍に希釈して測定。尿検体は 100 倍に希釈し測定します。検量線範囲から外れた場合は再測定します。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。 	
アルブミンについて	
<p>アルブミンは細胞や体液中に含まれ、水溶性の高い主として単純タンパク質ですが、糖を含むものも見出されています。血清アルブミンは血漿タンパク質中の 56-60 %を占める分子量約 69,000、等電点 4.9 の単純タンパク質で、肝細胞で合成されます。血清アルブミンは血清タンパクの大半以上を占め、浸透圧維持に重要な役割を果たし、水に難溶性の物質、例えば生理的には脂肪酸、ビリルビン、チロキシンなどと結合してこれらの運搬作用に寄与しています。血清アルブミンの濃度は、肝硬変などでのアルブミンの生合成低下、栄養不良や熱性疾患での体タンパク質損耗に基づく血液中のアルブミンの消費、腎障害による尿への漏出等で低下します。</p> <p>健常人での尿中への血清アルブミンの排泄は通常ごく僅かで 1 日 30 mg 以下ですが、腎疾患に際して尿中への漏出が増大するので糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症等の腎疾患で尿中アルブミンレベルは増大します。また発熱、高血圧、うっ血性心不全、尿路感染症などの場合に尿中アルブミンレベルが増加することがあります。健常人でも過激な運動や筋肉労働後、熱い湯での入浴後、精神的興奮、ストレス、多量のタンパク質の摂取後および月経前などに尿中アルブミンの一過性増加がみられ、生理的または機能的タンパク尿或いは運動性蛋白尿と言われます。また主に若年者において、しばしば起立時にのみタンパク尿がみられることがあります。</p> <p>ヒトで低アルブミン血症と呼ばれるまれな先天性疾患があり、無アルブミン血症とも呼ばれますが正確にはごく少量のアルブミンがあり、臨床症状は軽度の浮腫と中等度の低血圧であり、肝機能異常やタンパク尿は認められないようです。動物ではラットに無アルブミン血症 analbuminemia のモデルがあります。佐々木研究所の長瀬スミ先生が Sprague-Dawley rat (SD ラット)から開発されたもので、NAR (Nagase analbuminemia rat)と呼ばれています。</p>	

インスリン

測定方法	ELISA 法
対象動物	イヌ／ウサギ／ウシ／サル／ハムスター／ブタ／マウス／ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2～12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3～0.8%)のいずれかを使用してください。
検体必要量	80 μL(3重測定の場合) (2重測定の場合、条件により 50 μLでも受付可)
検体保存	冷凍(-35℃以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

- ・検体にはインスリン分解酵素の働きを抑えるためのアプロチニン(最終濃度 100～500 KIU/mL)の添加をお勧めします。
- ・マウスとラットについてはプロインスリンとの交差性を 5%以下で測定できる系もご用意しています。ご依頼の際にご指定ください。
- ・絶食により血中濃度が変化しますのでご依頼前に事前に絶食の有無をお知らせください。
- ・溶血検体は避けてください。

測定範囲

・測定に使用する ELISA の検量線範囲はイヌ／ブタの場合は 188～12,000 pg/mL です。それ以外の動物種については 156～10,000 pg/mL が標準です。マウス／ラットにおいてはさらに低濃度から測定できる系もご用意しています(マウスは少量検体で測定可能)。詳しくはお問い合わせください。血清、血漿は通常希釈せずに測定します。検量線範囲から外れた場合は希釈を行い再測定します(ご送付いただく検体量によっては再測定できない場合もあります)。

インスリンについて

インスリンは膵臓のランゲルハンス島(膵島)のβ細胞から分泌されるホルモンで、分子量は約 5,800、等電点 5.4 付近の蛋白質です。A6-A11、A7-B7、A20-B-19 で S-S 結合を形成し、酸性或いは Zn の存在しない中性水溶液では 2 量体を形成しますが、中性で Zn 存在下では Zn₂ 個を含む 6 量体を形成します。肝、筋肉、脂肪組織が主要な標的組織ですが、それぞれに次のような作用を示します。

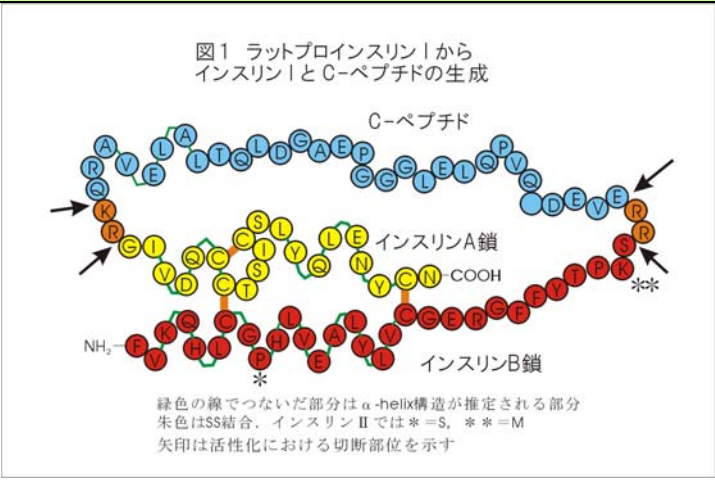
肝: グリコーゲン合成促進、蛋白合成促進、脂肪酸合成促進、糖利用の促進、糖新生抑制。

筋肉: 糖、アミノ酸、K の細胞膜透過性増大、グリコーゲン合成促進、蛋白合成促進、蛋白分解抑制。

脂肪組織: グルコースの細胞膜透過性増大、脂肪酸合成促進。

インスリンは細胞内で1本鎖のプロインスリンの形で合成された後、S-S 結合が形成され、酵素分解による活性化がおこって C-ペプチドとインスリンが分離します。

Insulin の WHO 第 4 次国際標準品(1958)は Bovine Insulin 52%と Porcine Insulin 48%の混合物で、カ価は、24 IU/mg(0.04167mg/IU)と定められていました。その後インスリンの精製度が進み、WHO はヒトインスリンの 1st International Standard、1986 として 26 IU/mg(0.038 mg/IU)の精製品を提供しております。同時にウシインスリンについて 1st International Standard、1986、25.7 IU/mg、ブタインスリン 1st International Standard、1986、26 IU/mg を提供するようになりました。それ以前にヒトインスリンのイムノアッセイ用標準品 1st International Reference Preparation、1974 があります。これは 1 アンプルあたり 3IU とされており、ヒトの場合、治療用に用いられますから、それに合わせてヒトの臨床検査での測定値も IU で表現する方が便利なのでしょうが、動物では重量で扱った方が良いでしょう。上記のように精製インスリンはヒトで 26 IU/mg、ウシで 25.7 IU/mg、ブタで 26 IU/mg となっていますので、大体種を問わず 26 IU/mg 程度であると考えても良いでしょう。



プロインスリン	
測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス/ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8%)のいずれかを使用してください。
検体必要量	100 μ L(3重測定の場合)(2重測定の場合、条件により 50 μ Lでも受付可)
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

- ・検体にはプロインスリン分解酵素の働きを抑えるためのアプロチニン(最終濃度 100~500 KIU/mL)の添加をお勧めします。
- ・絶食により血中濃度が変化しますのでご依頼前に事前に絶食の有無をお知らせください。
- ・溶血検体は避けてください。

測定範囲

・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 0.156~10 pmol/L(1.47~94.3 pg/mL)です。血清、血漿は 5 倍希釈が標準的です。検体の最低希釈率は 2.5 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します(ご送付いただく検体量によっては再測定できない場合もあります)。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。

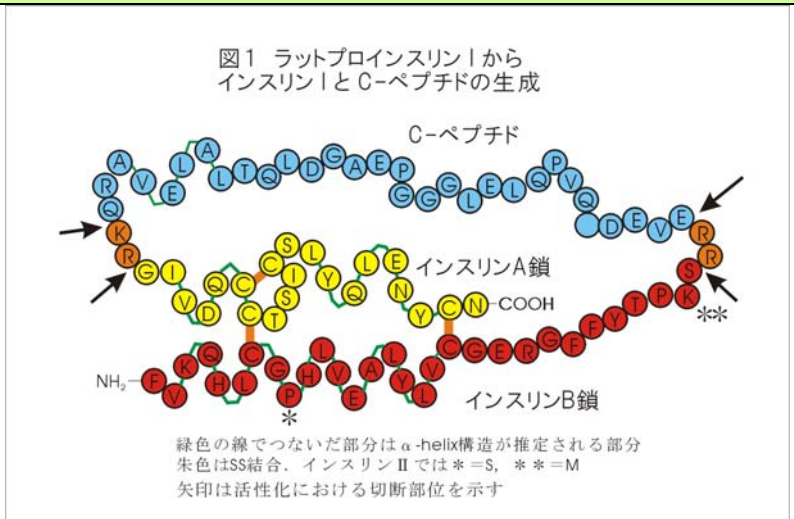
プロインスリンについて

プロインスリンはインスリンの前駆体で膵島 B 細胞内でアミノ酸 86 個からなる分子量約 9,400 の 1 本鎖の形で合成された後、分泌顆粒に移行する過程で S-S 結合が形成され、更にて酵素分解によりインスリンと C-ペプチドとなります。分泌顆粒には、分解し残りのプロインスリンも 10%程度存在し、顆粒が分泌される際に共に血中に放出されます。プロインスリンの生理活性はインスリンの 5-10%であると言われております。

血中のインスリンや C-ペプチドをイムノアッセイで測定すると、一般的にはこのプロインスリンも測定してしまうことになります。プロインスリンのインスリンに対する割合は、インスリン生合成過程の状況を反映している可能性があります。

NIDDM(II 型糖尿病)では空腹時やグルコース負荷時、共に血中プロインスリンレベルは健常者に比べて高く、インスリンに対する割合も増加し、空腹時血糖値が高い場合や肥満の際にはこの傾向は顕著となります。高血糖による持続的なインスリンの分泌が未成熟分泌顆粒まで放出される可能性が考えられます。またインスリノーマでは高プロインスリン血症が歴然と現れます。

家族性高プロインスリン血症では遺伝的にプロインスリンからインスリンへの転換酵素の異常やプロインスリン遺伝子の異常により転換酵素の作用を受けないプロインスリンが作られるなどが原因で、分泌顆粒中の IRI の大半をプロインスリンが占めます。甲状腺機能高進の場合も、甲状腺ホルモン過多による糖新生に伴う血糖上昇がインスリン産生放出を促進し分解し残りのプロインスリン放出も多くなります。



レプチン	
測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8%)のいずれかを使用してください。
検体必要量	100 μ L(3重測定の場合)(2重測定の場合、条件により 50 μ Lでも受付可)
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

- ・絶食により血中濃度が変化しますのでご依頼前に事前に絶食の有無をお知らせください。
- ・高脂質検体は測定に影響があります。
- ・溶血検体は避けてください。

測定範囲

- ・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 20.6~5,000 pg/mL です。血清、血漿は 5 倍希釈が標準的です。検量線範囲から外れた場合は再測定します(ご送付いただく検体量によっては再測定できない場合があります)。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。

レプチンについて

レプチンは主に白色脂肪組織で作られますが、褐色脂肪組織、胎盤、卵巣、骨格筋、胃底部、乳腺上皮細胞、骨髄、下垂体、肝臓にも発現している分子量 16 kDa のタンパク質で、ラットとマウスでは 97% のホモロジーがあります。レプチンは突然変異種の肥満マウスで見出されたもので、食欲と代謝の調節を通してエネルギーバランスに関与する重要なホルモンです。血中のレプチン濃度は絶食や低カロリー食で減少しますが、摂食直後の増加は顕著ではなく、肥満即ち脂肪組織量の増大で増加し、体脂肪量を反映します。レプチンは脳内に入り、視床下部神経核のニューロペプチド Y(NPY) やアグーチ関連ペプチド(AgRP) 発現神経の受容体に抑制的に作用し、また α -MSH 発現神経を活性化して食欲の低下と摂食の抑制を起こすとされています。しかし、高度の肥満者は血中レプチンが非常に高いにもかかわらずレプチンに対して抵抗性があり、レプチンの摂食抑制作用が発揮できません。全身性脂肪萎縮性に見られるようなレプチン産生の低下と欠乏はインスリン抵抗性、糖尿病、脂肪肝、高中性脂肪血漿を惹き起こします。この他、レプチンは粥状動脈硬化に対する免疫反応、エネルギーバランスと性サイクルの関連、肺胞のサーファクタント産生等にも関与していると考えられています。

memo

■真度(accuracy, trueness) を評価する試験法の実際

真度は以前「正確さ、正確度」と呼ばれてきました。アッセイ系の真度、つまりアッセイ系が正しい値を示すものであること証明するには、いくつかの試験法があります。希釈試験、添加回収試験、他の測定系との比較試験などです。

1. 希釈試験(特に血液成分の影響の有無)(dilution linearity test)

血清(血漿)をアッセイバッファーで倍々希釈して測定し、横軸に希釈度の逆数を取り、縦軸に測定値をとった時(希釈曲線)、原点を通る直線となることが必要です。直線にならない場合、まず血液成分の影響を疑い、測定対象物質を含まない血清(フリー血清)で希釈をして、希釈曲線を描いてみる。それでも直線にならないときには、標準曲線を作るための系にフリー血清を加えてみます。

2. 添加回収試験(recovery test, spike recovery test)

測定試料にある量の標準品(spike)を加えて測定し、測定値から原試料の測定値を差し引いた時、加えた標準品の量が回収されるか否かを検討します。誤差(バラツキ)の範囲内で 100% 回収されていることが必要です。

3. 他のアッセイ系との相関性試験

すでに確立されている測定法が他にあるとき、同一試料(試料数を多く、出来るだけ含量の範囲を広くとって)をその測定系と検討中の測定系で測り、横軸に確立されている測定系の測定値、縦軸に検討中の測定系での測定値をとって二つの測定系の相関グラフつまり散布図を作り検討します。相関係数が出来る限り 1 に近いこと、回帰直線の勾配がバラツキの範囲内で 1 に近いこと、が必要です。

C-ペプチド	
測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス/ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8%)のいずれかを使用してください。
検体必要量	100 μ L(3重測定の場合)(2重測定の場合、条件により 50 μ Lでも受付可)
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態
検体注意事項	
<ul style="list-style-type: none"> ・検体には C-ペプチド分解酵素の働きを抑えるためのアプロチニン(最終濃度 100~500 KIU/mL)の添加をお勧めします。 ・絶食により血中濃度が変化しますのでご依頼前に事前に絶食の有無をお知らせください。 ・溶血検体は避けてください。 	
測定範囲	
<p>・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 46.9~3,000 pg/mL です。血清、血漿は 5 倍希釈が標準です。検体の最低希釈率は 2.5 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します(ご送付いただく検体量によっては再測定できない場合もあります)。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。</p>	
C-ペプチドについて	
<p>インスリンは細胞内で 1 本鎖のプロインスリンの形で合成された後、S-S 結合が形成され、酵素分解による活性化がおこって C-ペプチドとインスリンが分離します。</p> <p>インスリン部分のアミノ酸配列はマウス、ラット共通ですが、C-ペプチドの部分は多少違います。マウス C-ペプチド 1 はアミノ酸 29 個、2 は 31 個の単鎖ペプチドです。</p> <p>C-ペプチドはプロインスリンから分離したあと、インスリンとともに分泌されます。</p> <p>C-ペプチドは長い間生理作用がなく、インスリン生合成の過程において A 鎖と B 鎖が正しい形で折りたたまれ、正しい組み合わせの S-S 結合ができるようにする作用のほかには生理作用は特に無いと考えられていましたが、近年の研究の積み重ねにより様々な生理作用のあることが明らかになって来ました。まず C-ペプチドは 10^{-9}M 程度で内皮細胞、腎尿細管細胞や繊維芽細胞の表面の恐らく G タンパクにカップルした受容体に結合し、カルシウムイオン依存性の細胞内シグナルを活性化すること、$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ を活性化し、内皮細胞の NO 合成を促進すること、受容体との結合には立体的特異性があり、インスリン、プロインスリン、IGF-I、-II、NPY との交差性がないことが示されています。また C-ペプチドを欠いている I 型糖尿病患者に C-ペプチドを投与することにより、骨格筋と皮膚の血流が増強され、腎糸球体の hyperfiltration を低下させ、尿中へのアルブミンの排泄を抑制し、神経機能を改善するが健康人には作用が現われないことが示されています。このことから I 型糖尿病患者にはインスリンのみでなく C-ペプチドの同時投与が合併症の阻止に有用であることが示唆されます。</p> <p>C-ペプチドの C 末端部のペプタペプチド(27-31) が受容体との結合に重要で、この部分の欠如した Des(27-31) C-ペプチドはその作用を失うとされています。このペプタペプチドは C-ペプチドと受容体との結合を完全に replace することができ、$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ を活性化します。Des(27-31) C-ペプチドの存在量は新生仔ラットでは C-ペプチドの約 37%、成熟ラットでは 8.5%を占めるという報告があります。</p> <p>C-ペプチドの血中における寿命はインスリンよりも数倍長いという特徴を持ちます。そこで、C-ペプチドの血中レベル測定は臨床的にはインスリン合成、分泌機能を観察するのに用いられます。また尿中に多量に排泄され、血中のレベルとよく相関することから、尿を検体として測定することも出来ます。</p> <p>また、インビトロで培養されたランゲルハンス島(膵島)からのインスリン分泌の指標として C-ペプチド測定は有用です。なぜなら、培養液にはインスリンが添加されることが多いので、培養後培養中のインスリンを測定すると、分泌されたインスリンと添加されたインスリンの区別がつかなくなってしまう、培養開始時の量を差し引かなければなりません。その場合、分泌されたインスリン量が少ないと測定誤差の影響が大きくなり正確な判定が出来なくなります。この時、C-ペプチドを測定してやれば、インスリンと等モルで分泌されますから、分泌されたインスリンを正確に判定できるというわけです。</p> <p>弊社で使用する測定系は C-ペプチド 1,2 の共通部分を認識しますので、トータルの C-ペプチドが測定されます。</p>	

GLP-1(7-36)amide	
測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス/ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8%)のいずれかを使用してください。
検体必要量	100 μ L(3重測定の場合)(2重測定の場合、条件により 50 μ Lでも受付可)
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態
検体注意事項	
<ul style="list-style-type: none"> ・検体には DPP-IV(Dipeptidyl peptidase IV)の働きを抑えるためのアプロチニン(最終濃度 100~500 KIU/mL)の添加またはその他の DPP-IVインヒビターの添加を行ってください。 ・絶食により血中濃度が変化しますのでご依頼前に事前に絶食の有無をお知らせください。 ・エーテル麻酔は影響があります。 ・溶血検体は避けてください。 	
測定範囲	
<p>・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 1.56~50 pg/mL です。血清、血漿は 5 倍希釈が標準です。検体の最低希釈率は 2.5 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します(ご送付いただく検体量によっては再測定できない場合もあります)。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。</p>	
GLP-1 について	
<p>GLP-1(Glucagon-like peptide-1)はグルカゴン前駆体の一部に包括されています。グルカゴン前駆体は膵臓と下部小腸、および視床下部で発現していますが、この前駆体の構造の中には糖代謝に関連する様々な生理活性物質(グルカゴン、グリセンチン、オキシントモジュリン、GLP-1、GLP-2)アミノ酸配列が含まれています。発現部位にあるプロセシング酵素の特異性によって、膵臓では主としてグルカゴンが、下部小腸ではグリセンチン、オキシントモジュリンが生成することになります。GLP-1とGLP-2はグルカゴン前駆体の後半の構造中に含まれます。GLP-1は37個のアミノ酸から成り、活性型としてはGLP-1(7-36)amideおよびGLP-1(7-37)があります。両者ともに下部小腸、膵臓、視床下部に存在しますが、GLP-1(7-36)amideは視床下部ではイムノリアクティブGLP-1(IR-GLP-1)の55-94%、小腸では27-73%を占めますが、膵臓ではごく僅かしか存在しないと言われています。GLP-1の構造は多くの哺乳類(ヒト、ラット、マウス、ウシ、イヌ等)で共通です。</p> <p>GLP-1: hdeferhaegtftsdrvssylegqaakefiawlvkgrg GLP 1(7-37): haegtftsdrvssylegqaakefiawlvkgrg GLP 1(7-36)amide: haegtftsdrvssylegqaakefiawlvkgr-NH₂</p> <p>GLP-1は上部小腸から分泌されるGIPと共にインクレチンと呼ばれ、グルコース依存的にインスリンの分泌を促進します。また胃の運動と胃酸の分泌を抑制し、グルカゴン分泌を抑制し、ソマトスタチンの分泌を促し、食欲を減退させ、腸管上皮の成長を促進し、末梢組織ではインスリン非依存的にグルコースの消費を進め、細胞の増殖を促進します。下垂体ホルモンの分泌にも関与すると報告されています。</p> <p>GLP-1(7-36)amideは生体内では迅速に代謝され、DPP-IV(dipeptidyl peptidase IV)によってN-末端の2個のアミノ酸を失いGLP-1(9-36)amideとなり、GLP-1(7-37)はGLP-1(9-37)となり活性を失います。<i>In vitro</i>でイヌの血漿中での半減期はGLP-1(7-36)amideは61\pm9分、GLP-1(7-37)は132\pm16分という報告があります。従ってGLP-1の測定にはサンプリングに当たってDPP-IVのインヒビターを使用する必要があります。</p> <p>インクレチンのもう一方、GIPは最も強力にGLP-1の分泌を促進します。回腸からのGLP-1分泌は食物による直接的な腸への刺激ではなく、コリン性およびペプチド性の刺激によるものとされています。</p>	

◆下垂体前葉ホルモン

FSH(Follicle Stimulating Hormone)	
測定方法	ELISA 法
対象動物	ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)を推奨。 他の抗凝固剤ご使用については事前にご相談ください。
検体必要量	150 μ L(3重測定の場合)(2重測定の場合、条件により 70 μ Lでも受付可)
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

- ・血清分離の際に分離促進剤入り採血管は使用しないでください。
- ・エーテル麻酔は影響があります。
- ・溶血検体は避けてください。

測定範囲

・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 0.4~20 ng/mL です。血清、血漿は 2.5 倍希釈が標準です。検体の最低希釈率は 2.5 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します(ご送付いただく検体量によっては再測定できない場合もあります)。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。

FSH について

FSH は下垂体前葉(腺下垂体)の好塩基性性腺刺激ホルモン産生細胞(ゴナドトロフ)で LH と共に産生、貯蔵され、視床下部ホルモン GnRH(LHRH ともいう)の刺激で分泌されます。また、ラット、マウスの卵巣及び精巣で FSH が発現していることが報告されています。FSH は分子量:約 35,000 の糖蛋白質で、LH、TSH と共通の α サブユニットと、FSH 特有の β サブユニットからなるヘテロダイマーです。

FSH の標的器官は雌では卵巣(濾胞、ovarian follicle)の顆粒膜細胞で、濾胞の発育と成熟、エストロゲンの産生分泌促進。雄では精巣の精細管細胞で精細管の発育と精子形成促進。これにはアンドロゲンの強力作用が必要とされています。受容体は膜 7 回貫通-G 蛋白共役型 PKA 系です。

FSH が欠損すると、精子形成不良、性腺萎縮、卵子の成熟停止、肥満、エストロゲン分泌低下、毛髪形成不良などが起こります。また、過剰に分泌されると、二次性器肥大、多数の濾胞成熟、及びエストロゲン分泌高進が起こります。GnRH の他にもうひとつの調節因子としてはアクチビン(activin)があり、FSH β サブユニット遺伝子の転写を促進することによって産生を促進します。FSH 分泌増加をもたらす生理状態としては、性周期に伴う変動(特に排卵前期、卵胞期)、更年期-閉経後の血中性ステロイドの低下などがあります。FSH の直接的分泌抑制因子として見出されたものにインヒビン(inhibin)、フォリスタチン(follistatin)があります。インヒビンは FSH の合成を選択的に抑制し、フォリスタチンはアクチビンに結合することによって間接的に FSH の合成を抑制します。PACAP(pituitary adenylatecyclase activating peptide)も FSH の合成を抑制しますが、これはフォリスタチンの産生を促進することによる間接的な作用です。ステロイドホルモンは抑制的に働きますが、FSH 遺伝子に働く可能性があります。またステロイドホルモンは視床下部に働いて GnRH の放出を抑制することで間接的に FSH の合成と放出を抑制します。FSH を低下させる生理状態として血中性ステロイドの増加、幼小児期、妊娠時、産褥期などがあります。

GH(Growth Hormone)	
測定方法	ELISA 法
対象動物	ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)を推奨。 他の抗凝固剤ご使用については事前にご相談ください。
検体必要量	100 μ L(3重測定の場合)(2重測定の場合、条件により 50 μ Lでも受付可)
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態
検体注意事項	
<ul style="list-style-type: none"> ・血清分離の際に分離促進剤入り採血管は使用しないでください。 ・エーテル麻酔は影響があります。 ・溶血検体は避けてください。 	
測定範囲	
<ul style="list-style-type: none"> ・測定に使用するELISAの検量線範囲は0.0313~2.0 ng/mLです。血清、血漿は10倍希釈が標準です。検量線範囲から外れた場合は再測定します。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。 	
GHについて	
<p>成長ホルモン(Growth hormone、別名 Somatotrop(h)ic hormone、STH、Somatotrop(h)in)は主として下垂体前葉の好酸性ソマトロフ(GH 産生細胞)で産生分泌される単純タンパク質ホルモンです。脳やリンパ細胞などでも発現しています。ヒトの場合、胎盤でGHに極めて類似性の高いGH2が発現します。GHは肝、筋肉、腎、軟骨細胞、繊維芽細胞、胸腺上皮細胞に働き、IGF-1を介して、軟骨細胞の増殖、コンドロイチン硫酸の合成、肝その他の臓器での細胞肥大增殖、蛋白同化などにより成長促進作用、胸腺細胞からチミュリン分泌促進などを起こします。</p> <p>GHは一時的にはインスリン様作用を示しますが、その後、脂肪細胞での脂肪分解による遊離脂肪酸の増加、血糖上昇、インスリン拮抗作用として糖分解抑制、筋肉中のグリコゲン含量増大、末梢組織でのインスリン感受性低下を起こすという代謝面では二相性の作用を持っています。</p> <p>プロラクチンに類似するNa、K、Mg、Ca、Pの貯留、小腸でのCa吸収促進、乳腺発育、乳汁分泌作用、などの作用もあります。</p> <p>GHの合成分泌は、GHRH、グレリン、甲状腺ホルモン、コルチゾル、レチノイン酸によって促進されます。またグルカゴン、バゾプレッシン、2-デオキシ-D-グルコース負荷、アルギニン等のアミノ酸負荷、タンパク質摂取、TF5、β-エンドルフィン、L-ドーパ、エピネフリン α 受容体刺激などにより分泌が増大します。</p> <p>GH分泌を促進する生理状態としては、低血糖、ストレス(発熱、外傷、出血、エーテル麻酔、精神不安)、絶食、運動、徐波睡眠などがあります。</p> <p>GH分泌の抑制はソマトスタチン(SRIF)、アクチビン、エピネフリン β 受容体刺激、グルコース、遊離脂肪酸、副腎皮質ステロイド投与、高濃度のIGF-I、高濃度のGHで起こります。</p> <p>GH分泌を抑制する生理状態として高血糖、血中脂肪酸増加、逆説睡眠、などがあります。</p> <p>GHの分泌はepisodicであることが知られています。つまり血中濃度はある間隔をおいて急激に上昇し下降するのです。従って無作為に採血した場合には血中レベルのバラツキはかなり大きいものになります。</p>	

LH(Luteinizing Hormone)	
測定方法	ELISA 法
対象動物	ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)を推奨。ヘパリンの使用はできません。 他の抗凝固剤ご使用については事前にご相談ください。
検体必要量	150 μ L(3重測定の場合)(2重測定の場合、条件により 50 μ Lでも受付可)
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態
検体注意事項	
<ul style="list-style-type: none"> ・血清分離の際に分離促進剤入り採血管は使用しないでください。 ・エーテル麻酔は影響があります。 ・溶血検体は避けてください。 	
測定範囲	
<p>・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 0.313~10 ng/mL です。血清、血漿は 5 倍希釈が標準です。検体の最低希釈率は 2.5 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します(ご送付いただく検体量によっては再測定できない場合もあります)。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。</p>	
LH について	
<p>LH は下垂体前葉(腺下垂体)の好塩基性性腺刺激ホルモン産生細胞(ゴナドトロフ)で FSH と共に産生、貯蔵され、視床下部ホルモン LHRH の刺激で分泌されます。精巣にも LH 様の物質が存在するという報告があります。動物種における分布は魚類-哺乳類の全脊椎動物に及びます。ラット下垂体での LH の含量は、雄では 6~7 μg/gland、雌では 3~4 μg/gland(NIH-LH1 S1 換算)とオスのほうが多く、雌では性周期に伴い変動します。</p> <p>LH は分子量:約 29,000 の糖蛋白質で、TSH、FSH と共通の α-サブユニットと、LH 特有の β-サブユニットからなるヘテロダイマーです。</p> <p>LH の標的器官は、雌では卵胞の成熟顆粒膜細胞で、FSH と協力して卵胞の成熟とエストロゲン産生、排卵を誘発し、排卵後黄体化した後はプロゲステロン産生分泌を促進します。雄では精巣の間質細胞(Leydig 細胞)でアンドロゲン産生分泌促進、アンドロゲンを介し 2 次的に精子形成促進に関与します。受容体は膜 7 回貫通-G 蛋白共役型 PKA 系です。</p> <p>従って LH が不足すると性ステロイド分泌低下、間質細胞萎縮、排卵黄体化停止などが起こり、過剰状態では精巣間質細胞肥大とそれに続く萎縮、エストロゲン、アンドロゲンの分泌増大、早発過排、性成熟促進等が起こります。</p> <p>LH の分泌は GnRH (LHRH)によって直接的に促進され、生理状態としては血中性ステロイドの低下(間接、直接)、性周期による変動(特に排卵前期)、更年期-閉経後に分泌は増大します。</p> <p>男性でも加齢によって増加します。発情前期に大量に分泌されるエストロゲンは、ポジティブフィードバックによりLHRHを介してLHの一過性大量分泌(LHサージ)を引き起こし、排卵を誘起します。</p> <p>LH の分泌は血中性ステロイドの増加(間接、直接)、オピオイドペプチド特に β-エンドルフィン、幼小児期、妊娠時、産褥期などで抑制されます。</p>	

TSH(Thyroid-Stimulating Hormone)

測定方法	ELISA 法
対象動物	ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)をご使用ください。 他の抗凝固剤ご使用については事前にご相談ください。
検体必要量	200 μ L(3重測定の場合)(2重測定の場合、条件により 100 μ Lでも受付可)
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

- ・血清分離の際に分離促進剤入り採血管は使用しないでください。
- ・エーテル麻酔は影響があります。
- ・溶血検体は避けてください。

測定範囲

・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 0.287~28 ng/mL です。血清、血漿は 2.5 倍希釈が標準です。検体の最低希釈率は 2.5 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します(ご送付いただく検体量によっては再測定できない場合もあります)。読み取った濃度に検体希釈率を乗じます。

TSH について

TSH(Thyroid-stimulating hormone、別名 Thyrotropin, チロトロピン)は分子量約 28,000 の糖タンパク質で、LH、FSH と共通の構造をもつ α -サブユニットと、TSH に特異的構造の β -サブユニットからなるヘテロダイマーです。糖鎖構造の違いに由来する等電点の異なる数種の分子種があります。TSH は全脊椎動物で、脳下垂体前葉のチロトロフと呼ばれる好塩基細胞で産生分泌されます。その作用は無機ヨウ素の摂取とチログロブリンのヨウ素化促進を通して甲状腺ホルモンの合成分泌を増大させ、脂肪組織でのグルコース、脂肪分解を高進させ、また眼球突出を起こします。その分泌は直接的には TRH(thyrotropin-releasing hormone)、またエストロゲン、インスリンによって間接的に促進されます。また寒冷ストレスで高進します。ソマトスタチン、甲状腺ホルモン、成長ホルモン、グルココルチコイド、オピオイドペプチド特に β -エンドルフィン、生理状態として交感神経刺激性のストレス、飢餓などで分泌が抑制され、血中濃度には日内変動があります。

TSH は α と β サブユニットのヘテロダイマーです。競合的結合原理に基づく RIA は抗原認識部位が 1 箇所であるため、 β -サブユニットを測り込んでしまう可能性があります。一方、弊社の ELISA キットは α -サブユニット、および β -サブユニットを認識する 2 種類の抗体を使用しているため、native な TSH に対する特異性が高くなっています。したがって例えば甲状腺摘出後や抗甲状腺薬投与による血中 TSH の測定値などが、今まで報告されている RIA での測定値とは必ずしも一致しないかも知れません。

参考文献: Mori M, Oshima K, et al. Acta Endocrinol, 105: 49-56, 1984

◆免疫研究関連

IgE	
測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス/ラット
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8 %)のいずれかを使用してください。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態
検体注意事項	
・溶血検体は避けてください。	
測定範囲	
・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 1.0~100 ng/mL です。血清、血漿は 10 倍希釈が標準です。検量線範囲から外れた場合は再測定します。	
IgE について	
<p>IgE (Immunoglobulin E、免疫グロブリン E)は 5 番目に発見された免疫グロブリンで、ドメイン 5 個(VH、CHϵ 1~4)から構成されている Hϵ 鎖 2 本と L 鎖 2 本からなる分子量約 190,000 の糖タンパク質で、電気泳動的には γ1 領域に移動します。代謝半減期は約 3 日で、正常人の血清中での濃度はきわめて低く 300 ng/mL 程度ですが、寄生虫の感染や枯草熱で増加します。アレルギーに関与する IgE はレアギンと呼ばれていますが、アレルギーで感作された際増加したレアギンは皮膚、呼吸器、消化器などに存在する好塩基性顆粒球や肥満細胞の FcϵR1 受容体と Fc 部位で結合し、細胞を感作し、これにアレルギーが結合すると細胞は脱顆粒を起こしてヒスタミン、セロトニン、プロテアーゼ、ヘパリン、化学走性因子、プロスタグランジン、ロイコトリエン等を放出させ、気管支収縮や粘膜浮腫、分泌高進などにより、気管支喘息、一部のじんま疹、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー等の I 型アレルギー反応を惹き起こします。</p>	

memo

- 検出限界(Detection limit)と定量限界(Quantitation limit)
検出限界と定量限界は次式で表されます。

$$DL=3.3SD/a \quad QL=10SD/a$$

SD: ブランクの標準偏差、 a: ブランク付近の検量線の勾配

検出限界は測定物質の存在が分かる最少量です。
定量限界は測定物質の量が分かる最少量です。

- 抗体の測定対象物質に対する親和性: 絶対的要因。

親和性が強いほど感度は高くなる。

親和性は結合定数または解離定数で表されます。

ポリクローナル抗体の場合は

$$K_a(\text{結合定数})=[Ag \cdot Ab]/([Ag] \cdot [Ab])$$

$10^{12} \sim 10^{13} \text{ M}^{-1}$ 程度

$$K_d(\text{解離定数})=1/K_a$$

$10^{-12} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 程度

両者の単位に注意してください。

ELISA のような非競合的結合(サンドイッチ結合)の場合には、測定対象物質を捉えるためにウエルに固相化する抗体は多いほうが良いし、標識抗体も多いほうが良い。

マウス抗 OVA-IgE

測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8 %)のいずれかを使用してください。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

・溶血検体は避けてください。

測定範囲

・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 1.88~120 U/mL です。血清、血漿は 10 倍以上に希釈する必要があります。検量線範囲から外れた場合は再測定します。

マウス抗 OVA-IgG1

測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8 %)のいずれかを使用してください。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

・溶血検体は避けてください。

測定範囲

・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 1.88~120 mU/mL です。血清、血漿は 100 倍以上に希釈する必要があります。検量線範囲から外れた場合は再測定します。

マウス リウマチ因子-IgG

測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8 %)のいずれかを使用してください。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

- ・加熱非動化した検体は使用できません。
- ・溶血検体は避けてください。

測定範囲

- ・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 15.6~1,000 mU/mL です。血清、血漿の希釈目安は 51 倍、101 倍、201 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します。

マウス リウマチ因子-IgM

測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス
検体	血清・血漿
血漿分離条件	ヘパリン(最終濃度 1.2~12 U/mL)、EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8 %)のいずれかを使用してください。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

- ・加熱非動化した検体は使用できません。
- ・溶血検体は避けてください。

測定範囲

- ・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 15.6~1,000 mU/mL です。血清、血漿の希釈目安は 21 倍、51 倍、101 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します。

リウマチ因子について

リウマチ因子は慢性関節リウマチ患者血清の 70~80 %に認められる IgG の Fc 部分に対する自己抗体で、病態と密接に関連していると考えられています。ヒトと同様な自己免疫疾患を自然発症する実験動物や人工的に炎症を発症させた実験動物を使用して自己免疫疾患の機序解明と新薬の研究が今日進められています。自然発症する代表的なマウスの系統としては MRL/lpr マウスが多くの実験に使用されています。MRL/lpr マウスはリンパ節腫瘍と共に腎炎、血管炎、関節炎をかなり高率に発症するので、ヒト慢性関節リウマチ(RA)のモデルを含むヒトの自己免疫疾患の発生機序を解明する有効なモデルとなっています。MRL/lpr マウスの血清中に検出される自己抗体には、IgG 型リウマチ因子(RF)、IgM 型リウマチ因子(RF)、抗 ssDNA 抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 Sm 抗体等があります。弊社の用いる測定系はこれら疾患動物血清中の IgG 型リウマチ因子の抗体価を標準抗体価検量線を用い、ユニット換算させることにより測定間での数値的な比較を可能にしました。

マウス抗 dsDNA-IgG

測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス
検体	血清・血漿
血漿分離条件	EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8 %)のいずれかを使用してください。ヘパリンの使用はできません。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

- ・加熱非動化した検体は使用できません。
- ・溶血検体は避けてください。

測定範囲

- ・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 15.6~1,000 mU/mL です。血清、血漿の希釈目安は 51 倍、101 倍、201 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します。

マウス抗 ssDNA-IgG

測定方法	ELISA 法
対象動物	マウス
検体	血清・血漿
血漿分離条件	EDTA-2Na(最終濃度 1.0 mg/mL)、クエン酸-Na(最終濃度 0.3~0.8 %)のいずれかを使用してください。ヘパリンの使用はできません。
検体必要量	50 μ L
検体保存	冷凍(-35 $^{\circ}$ C以下)
保存容器	PP,PE 製
検体輸送	凍結状態

検体注意事項

- ・加熱非動化した検体は使用できません。
- ・溶血検体は避けてください。

測定範囲

- ・測定に使用する ELISA の検量線範囲は 15.6~1,000 mU/mL です。血清、血漿の希釈目安は 51 倍、101 倍、201 倍です。検量線範囲から外れた場合は再測定します。

自己抗体について

DNA に対する自己抗体のタイプには IgG および IgM があり、天然の二本鎖 DNA(dsDNA)に反応するもの、一本鎖 DNA(ssDNA)に反応するもの、その両方に反応するものがあります。ヒト全身性エリテマトーデス(SLE)では抗 dsDNA IgG 抗体が高率に検出されます。SLE における血中の抗 dsDNA 抗体価は DNA-抗 DNA 複合体価や低補体価とも相関し、疾患の活動性を知る指標となっています。ヒトと同様な自己免疫疾患を自然発症する実験動物や人工的に炎症を発症させた実験動物を使用して自己免疫疾患の機序解明と新薬の研究が今日進められており、自然発症する代表的なマウスの系統としては MRL/lpr マウスが多くの実験に使用されています。MRL/lpr マウスはリンパ節腫瘍とともに腎炎、血管炎、関節炎をかなり高率に発症するのでヒト慢性関節リウマチ(RA)のモデルを含むヒトの自己免疫疾患の発生機序を解明する有効なモデルとなっています。MRL/lpr マウスの血清中に検出される自己抗体には IgG 型リウマチ因子(RF)、IgM 型リウマチ因子(RF)、抗 ssDNA 抗体、抗 dsDNA 抗体などがあります。 弊社の用いる測定系は疾患マウス血中の IgG タイプの dsDNA 自己抗体価を標準抗体価検量線を用いユニット換算させることにより測定間での数値的な比較を可能にしたものです。