

研究用試薬

YK290 DHEA (Saliva) EIA キット

取扱説明書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 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	6～8
VII. 貯蔵法および有効期間	9
VIII. 文献	9
IX. 付録	10

YK290 DHEA (Saliva)EIA キット

I. はじめに

DHEA (デヒドロエピアンドロステロン、Dehydroepiandrosterone) は、主に副腎皮質から分泌されるホルモンで、テストステロンとエストロゲンを生合成する前駆体であります。DHEA の分泌量は思春期に急激に高まり 20 代でピークを迎え、40 代から急激に分泌量が減少し、50 代では約半分になり、その後減少が続き、70 代ではピーク時の 10%以下になります¹⁾。DHEA は組織において性ホルモン合成の前駆体として主な役割を果たし、自身もテストステロンの約 10%程度の活性作用を有する一方、生理的な役割がまだはっきり定義されていません。研究では、DHEA はコレステロールおよび脂質代謝、インスリン感受性と分泌^{2,3)}および免疫機能^{4,5,6)}に影響を与える可能性があります。統合失調症や肥満時に DHEA 血中濃度の異常が観測されています^{7,8)}。DHEA はまた神経組織で直接生成され、神経活性および神経保護因子としての働きがあると考えられます⁹⁾。

DHEA 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 DHEA の一部が唾液中に分泌されます。唾液中の DHEA はほとんどが非結合型で存在しています。また、唾液中の DHEA 濃度は唾液の分泌速度や唾液酵素の影響を受けにくいとされています。DHEA 分泌パターンも Cortisol と同様、朝覚醒後が一番高く夜まで下がり続ける二相性リズム (diurnal rhythm) 分泌を示しています¹⁰⁾

本キットは、前処理作業を必要とせず、唾液中の DHEA 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。

YK290 DHEA (Saliva) EIA キット	内容
▼ 22.2~5400 pg/mL の範囲で測定できます。	1) 測定プレート
▼ 41 検体を duplicate でアッセイできます。	2) 標準品
▼ 測定対象：唾液	3) 標識体
▼ 測定は 3.5 時間で終了します。	4) 緩衝液
▼ プレートは一行 (8 ウェル) 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。	5) 酵素基質液
▼ 同時再現性 CV (%) 1.7~3.6	6) 濃縮洗浄液
▼ 日差再現性 CV (%) 5.5~8.5	7) 酵素反応停止液
▼ 保存と安定性 2~8°C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。	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 DHEA 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 DHEA 特異抗体と HRP (horse radish peroxidase) 結合 DHEA 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 ウェル) の各ウェルには、抗 DHEA 抗体が固定されています。この各ウェ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。これによりウェ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 DHEA 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 ウェル	1 枚	固定化抗 DHEA 抗体
2.標準品	凍結乾燥品	36.45 ng	1 本	合成 DHEA、BSA、リン酸塩
3.標識体	液状	0.6 mL	1 本	HRP 標識 DHEA
4.緩衝液	液状	30 mL	1 本	乳蛋白含有クエン酸ナトリウム緩衝液
5.酵素基質液	液状	12 mL	1 本	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB)
6.濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% Tween20 を含む濃縮生理食塩液
7.酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸
8.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 (50 μ L~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
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：標準品の容器に針を刺し、真空を解除した後、緩衝液 450 μ L を加え、内容物を充分溶解させて、81,000pg/mL の標準液を作製する。この標準液 40 μ L を取り、予め 560 μ L の緩衝液を入れたポリプロピレンチューブに加え、5,400pg/mL の標準液を調製する。5,400pg/mL の標準液から 200 μ L を取り、400 μ L の緩衝液で希釈して 1,800pg/mL の標準液を作製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、600、200、66.7 および 22.2pg/mL の各標準液を調製する。0pg/mL 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：標識体の容器から標識体 533 μ L を取り、緩衝液 16mL 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) 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 $^{\circ}$ C)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. プレートを袋から出し、各ウェルに標準液または検体液 25 μ L を入れ、ついで標識体溶液 150 μ L を加える。
3. 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 3 時間反応させる。
4. 各ウェル中の液を除き、各ウェルに洗浄液 350 μ L 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 7 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. 各ウェルに酵素基質液 100 μ L を加える。
6. 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。
7. 各ウェルに酵素反応停止液 100 μ L 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、DHEA 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 DHEA 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、DHEA 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 0pg/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、DHEA の濃度を読み取る。

V. 操作上の注意

1. 唾液は流涎法で採取します。採取補助器具 Saliva Collection Aid (SCA、Salimetrics LLC、商品コード 5016.02) を使用するか、または溜めた唾液を直接ポリプロピレン材質の容器に吐き入れることによって採取してください。採取した唾液検体は、ただちに -30°C 以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 試験当日に凍結した検体を室温下で融解させ、3,000rpm で 15 分間遠心分離した後、上澄みを丁寧に別の容器に移してプレートを添加するまで室温に放置してください。
3. 唾液採取の 60 分前から食事を摂取しないようにしてください。
4. 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ください。
5. 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ください。
6. 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ください。ゆすいって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。
7. 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。
8. 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ください（測定系に影響を与える恐れがあります）。
9. 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

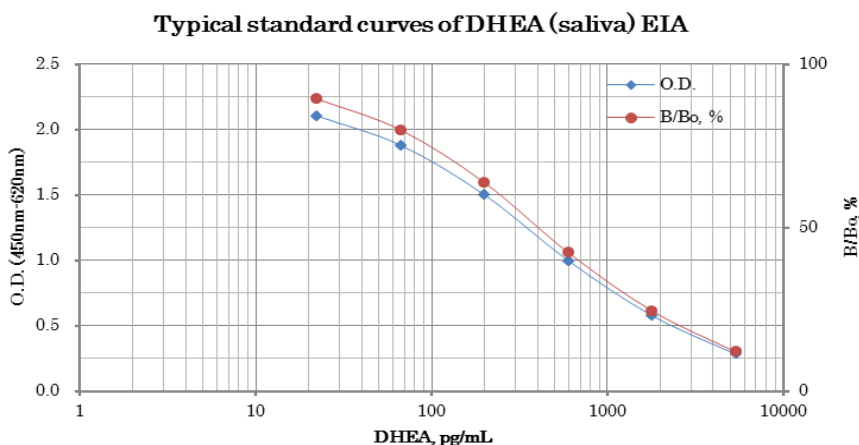
けるようにして、液を充分除き、残液が残らないように注意してください。

10. 検体をウェ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。
11. 標準液、検体ともに測定は二重以上の測定で行うようにしてください。
12. 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 81,000pg/mL 標準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。洗浄液および酵素反応停止液は室温保存でも構いません。希釈した各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。
13. 酵素基質の発色レベルは、反応温度、時間などに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℃）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。
14. 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。
15. 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。
16. 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。
17. 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 22.2~5400pg/mL

<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¹¹⁾。

$$\text{感度} = \frac{2 \times 0 \text{pg/mL 標準液の SD 値} \times 22.2 \text{pg/mL}}{0 \text{pg/mL 標準液の吸光度} - 22.2 \text{pg/mL 標準液の吸光度}}$$

<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

Saliva sample	同時再現性 (Mean±SD, n=10)		日差再現性 (Mean±SD, n=9)	
	測定値 (pg/mL)	CV, %	測定値 (pg/mL)	CV, %
1	145±6	3.6	150±13	8.5
2	888±19	2.1	909±53	5.9
3	2802±49	1.7	2915±159	5.5

<添加回収試験>

Saliva sample	DHEA added (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
A	0	37.9		
	65	96.2	102.9	93.5
	196	193.7	233.9	82.8
	588	541.1	625.9	86.4
B	0	189.4		
	65	257.7	254.4	101.3
	196	402.7	385.4	104.5
	588	819.2	777.4	105.4
C	0	85.6		
	65	144.3	150.6	95.9
	196	252.5	281.6	89.7
	588	607.4	673.6	90.2
D	0	99.2		
	65	169.6	164.2	103.2
	196	260.2	295.2	88.1
	588	568.5	687.2	82.7
E	0	72.4		
	65	133.6	137.4	97.3
	196	245.4	268.4	91.4
	588	619.7	660.4	93.8
F	0	52.1		
	65	113.5	117.1	96.9
	196	213.4	248.1	86.0
	588	577.9	640.1	90.3

< 希釈試験 >

Saliva sample	Dilution ratio, 1X	Observed(pg/mL)	Expected(pg/mL)	% Of expected
No.1	1	46.7		
	2	19.8	23.4	85.0
	4	9.6	11.7	91.9
	8	-	-	-
No.2	1	213.9		
	2	103.3	107	96.6
	4	46.7	53.5	87.2
	8	25.6	26.7	95.8
No.3	1	95.4		
	2	45.3	47.7	95.1
	4	18.1	23.8	75.9
	8	-	-	-
No.4	1	119.8		
	2	50.6	59.9	84.4
	4	22.0	29.9	73.4
	8	-	-	-
No.5	1	80.5		
	2	37.8	40.2	93.9
	4	16.8	20.1	83.3
	8	-	-	-
No.6	1	62.2		
	2	26.7	31.1	85.8
	4	15.3	15.6	98.3
	8	-	-	-
No.7	1	108.7		
	2	46.9	54.4	86.4
	4	25.1	27.2	92.4
	8	9.8	13.6	72.2
No.8	1	71.5		
	2	30.3	35.8	84.7
	4	14.9	17.9	83.1
	8	7.6	8.9	85.0

< 交差性 >

化学物質名	交差反応性(%)
DHEA-S	0.067
Androstenedione	2.178
Aldosterone	ND
Cortisone	ND
Corticosterone	ND
Cortisol	ND
11-Deoxycortisol	ND
21-Deoxycortisol	ND
Danazol	0.006
Estriol	0.007
Estrone	0.030
17β-Estradiol	0.004
Progesterone	0.059
11α-Hydroxyprogesterone	ND
17α-Hydroxyprogesterone	0.019
Testosterone	2.118
Triamcinolone	ND

B/Bo=50%における交差性;

ND=None detected (<0.001%)

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>

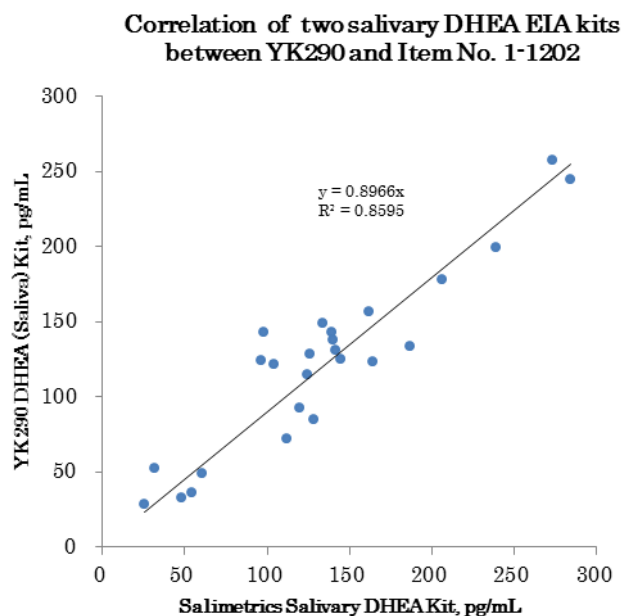
1 キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

VIII. 文献

1. J P Hinson and P W Raven: **DHEA deficiency syndrome: a new term for old age?** Journal of Endocrinology 163, 1-5, 1999
2. K Villareal DT, Holloszy JO: **Effect of DHEA on abdominal fat and insulin action in elderly women and men: a randomized controlled trial.** Jama 292:2243-8, 2004
3. Dhatariya K et al: **Effect of dehydroepiandrosterone replacement on insulin sensitivity and lipids in hypoadrenal women.** Diabetes 54:765-9, 2005
4. Casson PR et al : **Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women.** Am J Obstet Gynecol 169:1536-9, 1993
5. Rearte B et al: **Dehydroepiandrosterone and metyrapone partially restore the adaptive humoral and cellular immune response in endotoxin immunosuppressed mice.** Innate Immun 20(6):585-97, 2014
6. Prall SP, Muehlenbein MP: **Dehydroepiandrosterone and multiple measures of functional immunity in young adults.** Am J Hum Biol 27(6):877-80, 2015
7. Vuksan-Ćusa B et al: **The role of dehydroepiandrosterone (DHEA) in schizophrenia.** Psychiatr Danub 28(1):30-3, 2016
8. Akyürek N et al: **Is there a relationship between cardiovascular risk factors and dehydroepiandrosterone sulfate levels in childhood obesity?** J Pediatr Endocrinol Metab 28(5-6):545-50, 2015
9. Stárka L et al: **Dehydroepiandrosterone: a neuroactive steroid.** J Steroid Biochem Mol Biol 145:254-60, 2015
10. Hucklebridge F et al: **The diurnal patterns of the adrenal steroids cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in relation to waking.** Psychoneuroendocrinology 30(1):51-7, 2005
11. 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 25 検体を測定して、Salimetrics 社の Salivary DHEA Enzyme Immunoassay Kit (Item No. 1-1202) との比較試験を行った結果、図に示したように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 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

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

初版：2016年8月18日

更新：2018年3月16日