

研究用試薬

YK340 Substance P (Saliva) 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	4
IV. 操作法	5～6
V. 操作上の注意	7
VI. 基本性能	8～10
VII. 貯蔵法および有効期間	10
VIII. 文献	11

YK340 Substance P (Saliva) EIA キット

I. はじめに

サブスタンス P は 11 個のアミノ酸からなるペプチドで、タキキニンと呼ばれる類似構造を持つペプチド群の一つです。

サブスタンス P は初めに神経伝達物質としての機能が見いだされ、その後の研究により中枢および末梢神経系に止まらず、末梢の非神経系細胞での発現も認められ、現在では広範な生理機能への関与に伴い、様々な病態にも関連している事が知られています。

肺炎は日本における高齢者の大きな死亡原因の一つとされていますが、サブスタンス P の分泌量低下は、正常な嚥下反射および咳嗽反射の低下を招き、これにより不顕性誤嚥が増加し、結果として誤嚥性肺炎を引き起こすリスクが高まる事が懸念されています。

唾液は容易かつ非侵襲的に採取が可能であり、唾液中のサブスタンス P 濃度は有用な生体指標であると考えられます。

本キットは、唾液中に存在するサブスタンス P を特異的かつ簡便に測定できます。

YK340 Substance P (Saliva) EIA キット

- ▼ ヒト唾液中 Substance P 測定用です。
- ▼ 6.859~5,000 pg/mL の範囲で測定できます。
- ▼ 40 検体を duplicate で測定できます。
- ▼ 測定は 1 晩 (18 時間) + 1.5 時間で終了します。
- ▼ 唾液の測定ができます。
- ▼ 検体量は 50 μ L です。緩衝液で 4 倍希釈します。
- ▼ プレートは 1 列 (8 ウェル) 毎に取り外しできますのでキットの分割使用が可能です。

- 内容
- 1) 測定プレート
 - 2) 標準品
 - 3) 標識抗原
 - 4) 特異抗体溶液
 - 5) SA-HRP 溶液
 - 6) 酵素基質液
 - 7) 酵素反応停止液
 - 8) 緩衝液
 - 9) 濃縮洗浄液
 - 10) プレート密閉用シール

保存と安定性 2~8°Cで保存してください。
製造日より 18 ヶ月間は安定です。

II. 特 徴

本キットはヒトの唾液中に含まれる **Substance P** 濃度を測定するためのものです。本キットによる **Substance P** の測定は簡便でしかも特異性、定量性に優れ、体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点を備えています。

<特異性>

本キットは **Substance P (3-11)amide** に 86.5%、**Substance P (4-11)amide** に 99.1%、**Substance P (7-11)amide** に 48.8%の交差反応性を示します。**Substance P (1-4)** に対する反応性は 0.1%以下となっております。

タキキニンファミリーに対する交差反応性はニューロキニン A には 0.3%、ニューロキニン B には 0.1%、ヘモキニン-1 (Human)には 86.2%となっております。

<測定原理>

本アッセイ系は特異性の高いウサギ抗 **Substance P** 抗体を用い、競合反応を応用したものであり、ビオチンとアビジンの高い親和性を応用した発色を組み合わせた測定法です。96 ウェルプレートの各ウェルにはヤギ抗ウサギ IgG 抗体が固定化されおり、この各ウェルに標準液（または検体）、標識抗原、および特異抗体を順次加えて競合反応させます。これに HRP 結合ストレプトアビジンを加え、ウェル上に HRP 結合ストレプトアビジン-ビオチン化抗原-抗体複合体を形成させます。最後にこの複合体中の酵素（HRP）活性を測定することにより、検体中の **Substance P** 濃度を求めることができます。測定範囲は、6.859~5,000 pg/mL です。

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 プレート		ヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体
2. Standard (標準品)	凍結乾燥品	5,000 pg/vial	1 本	Substance P (1-11) amide
3. Labeled antigen (標識抗原)	凍結乾燥品	1 vial	1 本	ビオチン化 Substance P
4. Antibody solution (特異抗体溶液)	液状	7 mL	1 本	ウサギ抗 Substance P(1-11) amide 抗体
5. SA-HRP solution (SA-HRP 溶液)	液状	12 mL	1 本	HRP 標識ストレプトアビジン
6. Enzyme substrate solution (TMB) (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)
7. Stopping solution (酵素反応停止液)	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
8. Buffer solution (緩衝液)	液状	30 mL	1 本	リン酸緩衝液
9. Washing solution (concentrated) (濃縮洗浄液)	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
10. Adhesive foil (プレート密閉用シール)			3 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~1 mL) ; 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 450 nm で吸光度 3.0 まで測定できる装置)
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液、希釈検体の調製に使用するガラス製試験管
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 (1,000 mL)
7. 蒸留水または脱イオン水

<唾液の採取方法>

唾液の採取には、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) を使用してください。唾液の採取は、採取器具の取扱説明書に従って行ってください。採取した唾液検体はただちに -30°C 以下で凍結保存し、測定前に室温に戻して攪拌した後、遠心分離 (3,000 rpm \cdot 15 分間) を行ってください。凍結保存は、可能であれば -80°C で行う事を推奨します。

<試薬の調製>

1. 標識抗原の調製法: 添付緩衝液 7 mL を凍結乾燥状態の標識抗原に加え溶解させた後、転倒攪拌により混合する。
2. 標準液の調製法: 標準品の容器に緩衝液 1.0 mL を加え、溶解する。その後、内容物を十分に攪拌し、5000 pg/mL の標準液とする。この標準液 0.1 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 1666.7 pg/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、555.556, 185.185, 61.728, 20.576, 6.859 pg/mL の各標準液を調製する。0 pg/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
<測定範囲> 有効測定範囲 6.859 pg/mL~5000 pg/mL
3. 洗浄液の調製法: 濃縮洗浄液 50 mL (全量) を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。希釈した洗浄液を冷蔵保存した場合は、完全に室温に戻してから使用する。
4. その他の試薬はそのまま<測定操作>に従って使用する。

<希釈検体の調製>

凍結保存していた唾液検体は、室温で融解後、遠心分離（3,000 rpm・15 分間）を行ってください。回収した唾液検体をよく攪拌した後、緩衝液で 4 倍希釈し、希釈検体の調製を行ってください。

1. 唾液検体数のガラス試験管を準備し、各試験管に緩衝液を 150 μL ずつ入れる。
2. 各唾液検体を 50 μL ずつ添加し、よく攪拌する。

<測定操作>

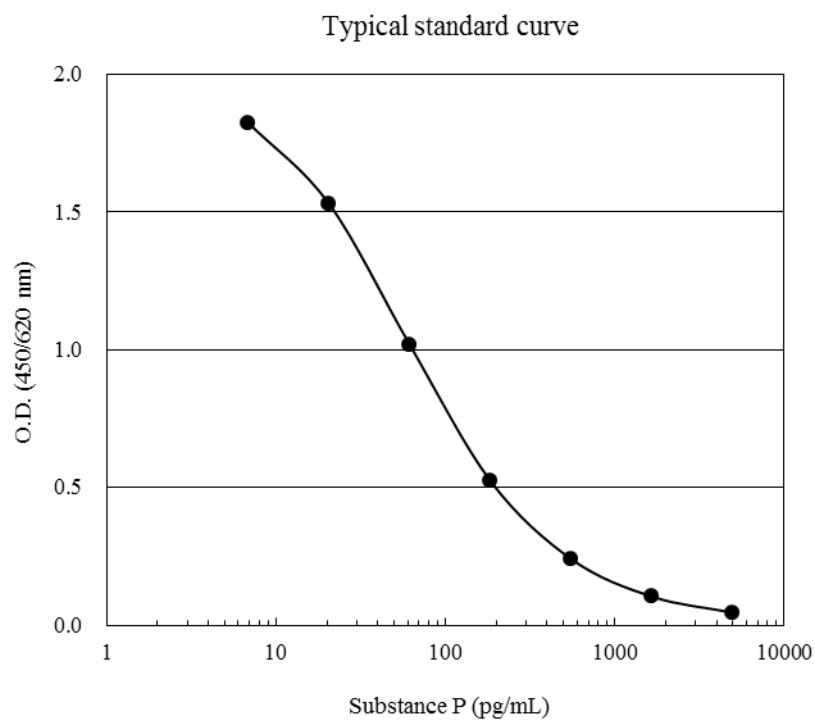
1. キット内容を室温（20～30℃）に戻す。
標準液、標識抗原溶液、洗浄液および希釈検体を上記の方法に従って調製する。
2. 測定プレートの各ウエルに、洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てた後、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに2回繰り返し、合計3回の洗浄操作を行う。
3. 各ウエルに標準液（0, 6.859, 20.576, 61.728, 185.185, 555.556, 1666.7, 5000 pg/mL）または希釈検体 50 μL を加え、ついで標識抗原溶液 50 μL を加え、さらに特異抗体溶液 50 μL を加える。
4. プレート密閉用シールでシールし、室温で 18 時間振とうする（約 100 rpm）。
5. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 5 回行う。
6. 各ウエルに SA-HRP 希釈液 100 μL を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 1 時間振とうする（約 100 rpm）。
8. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 5 回行う。
9. 各ウエルに酵素基質液 100 μL を加え、遮光の状態ですべて静置し、室温で 30 分間反応させる。
10. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
11. マイクロプレート用吸光度計にて 450 nm/620 nm の吸光度を測定する。
12. 市販のソフトウェアを用いて、5（or 4）-Parameter の回帰式を使用し、標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、希釈検体の Substance P 濃度を求める。求めた濃度を 4 倍し、元の唾液検体中の Substance P 濃度を算出する。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て標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、Substance P の濃度を読み取る。

V. 操作上の注意

1. 測定系は界面活性剤の影響を受けますので、唾液検体への歯磨き粉や洗口剤などの混入が起こらないよう注意してください。界面活性剤による影響の一例として、測定時に高い吸光度を示す傾向が確認されております。
2. 唾液検体は -30°C 以下で凍結保存してください。可能であれば、 -80°C での保存を推奨します。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
3. 緩衝液および特異抗体溶液は難溶性の沈殿物が発生する場合がありますので、使用前に転倒攪拌を行った後、使用してください。なお、この沈殿物による測定結果への影響はございません。
4. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品は調製後、直ちに使用してください。分割使用の際は $5,000\text{ pg/mL}$ の標準液から新たに希釈調製を行ってください。溶解後の標準品 ($5,000\text{ pg/mL}$) および標識抗原は、 4°C の冷蔵保存で4週間安定です。なお、 -30°C 凍結保存は、性能的には4週間安定である事が確認されましたが、凍結に伴い難溶性の沈殿物が発生しますので、試薬の凍結保存は推奨しません。
5. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
6. 各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また検体をウエルに注入する場合は、検体ごとに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。
7. 希釈検体が $5,000\text{ pg/mL}$ を超える高値検体の場合は、緩衝液による希釈率を4倍希釈からさらに増やして測定を行ってください。
8. 室温での反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうしてください（呈色反応の場合を除く）。なお、振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようにゆっくりと行ってください（約 100 rpm ）。
9. 測定はすべて2重測定で行ってください。
10. 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。
11. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが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。
12. 各試薬の保存中もしくは使用中には、これらに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使用しないでください。
14. 酵素基質液は遮光しながら室温に戻し、使用してください。

VI. 基本性能

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

<ヒト唾液 A>

Added Substance P (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
0	21.6		
15	36.1	36.6	98.6
200	240.9	221.6	108.7
1,000	1004.1	1021.6	98.3

<ヒト唾液 B>

Added Substance P (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
0	42.1		
15	64.3	57.1	112.6
200	273.4	242.1	112.9
1,000	1033.6	1042.1	99.2

<ヒト唾液 C>

Added Substance P (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
0	25.2		
15	42.6	40.2	106.0
200	272.2	225.2	120.9
1,000	1020.9	1025.2	99.6

<ヒト唾液 D>

Added Substance P (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
0	11.7		
15	27.4	26.7	102.6
200	232.2	211.7	109.7
1,000	1068.0	1011.7	105.6

<ヒト唾液 E>

Added Substance P (pg/mL)	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
0	20.6		
15	41.9	35.6	117.7
200	277.4	220.6	125.8
1,000	1249.8	1020.6	122.5

<希釈試験> (希釈調製前の唾液検体を x1 とする。x3 は参考値。)

<ヒト唾液 A>

Sample preparation	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	% of Expected (%)
x3	36.1	108.3	123.1
x4	22.0	88.0	
x6	13.7	82.2	93.4
x8	10.0	80.0	90.9

<ヒト唾液 B>

Sample preparation	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	% of Expected (%)
x3	61.4	184.2	111.0
x4	41.5	166.0	
x6	27.3	163.8	98.7
x8	21.0	168.0	101.2

<ヒト唾液 C>

Sample preparation	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	% of Expected (%)
x3	43.9	131.7	119.7
x4	27.5	110.0	
x6	17.4	104.4	94.9
x8	13.2	105.6	96.0

<ヒト唾液 D>

Sample preparation	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	% of Expected (%)
x3	22.4	67.2	108.4
x4	15.5	62.0	
x6	9.6	57.6	92.9
x8	6.9	55.2	89.0

<ヒト唾液 E>

Sample preparation	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	% of Expected (%)
x3	32.7	98.1	110.5
x4	22.2	88.8	
x6	13.6	81.6	91.9
x8	11.7	93.6	105.4

<交差反応性>

関連ペプチド	交差反応性 (%)
Substance P (1-4)	< 0.1
Substance P (3-11) amide	86.5
Substance P (4-11) amide	99.1
Substance P (7-11) amide	48.8
Neurokinin A	0.3
Neurokinin B	0.1
Hemokinin-1 (human)	86.2

<再現性試験>

同時再現性： CV(%) 2.8~5.6

日差再現性： CV(%) 6.1~10.9

<測定範囲>

6.859~5,000 pg/mL

VII. 貯蔵法および有効期間

<貯法>

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 ヶ月間（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. U.S.v. Euler and J.H.Gaddum (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *The Journal of Physiology* 72 (1): 74-87
2. M.M. Chang and S.E. Leeman (1970) Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *Journal of Biological Chemistry* 245: 4784-4790
3. A. Kuwahara, N. Yanaihara et al. (1983) Distribution of neurons containing immunoreactivity for gastrin-releasing peptide (GRP), substance P, and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the rat gastric wall. *Biomedical Research* 4: 473-478
4. Y. Tsutsumi, N. Yanaihara et al. (1984) Histochemical studies of metaplastic lesions in the human gallbladder. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 108: 917-921
5. T. Uchida, N. Yanaihara et al. (1985) Occurrence and projections of three subclasses of met-enkephalin-arg⁶-gly⁷-leu⁸ neurons in the guinea-pig duodenum: immunoelectron microscopic study on the co-storage of met enkephalin-arg⁶-gly⁷-leu⁸ with substance P or PHI (1-15). *Biomedical Research* 6: 415-422
6. Y. Tsutsumi (1990) Immunohistochemical analysis of neuroendocrine substances in non neoplastic lung and in neuroendocrine lung tumors. In: *Endocrine Pathology Update* (Eds. J. Lechago and T. Kameya) Field & Wood Philadelphia 1: 189-213
7. M. Yazawa, N. Yanaihara et al. (1990) Immunohistochemical demonstrations of peptide histidine methionine and substance P immunoreactive nerves in endoscopically biopsied rectal mucosa. *The Autonomic Nervous System* 27: 130-136
8. H. Suzuki (2002) Tachykininergic neurotransmission in the central nervous system. *J Nippon Med Sch.* 69 (4): 322-7
9. M. Paul E. et al. (2003) Aspiration pneumonia and dysphagia in the elderly. *Chest.* 124: 328-336

<お問合せ先>

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

www.yanaihara.co.jp ask@yanaihara.co.jp

2022年12月27日 改訂