



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

研究用

企画 コラーゲン技術研修会

〒204 清瀬市上清戸1-10-1

改訂 1991. 8. 1. 初版 1983. 4. 1.

「血中 Type II コラーゲン抗体の検索システム」

はじめに

Type II コラーゲン「K41」「K42」は、研究者の皆様のご要望により、1982年、わが国で初めて製品化いたしました。以来、多くの皆様にご利用いただいております。特に、大手製薬企業では、90%以上で使用され、「コラーゲン関節炎動物」の誘発剤として、いまや「基準品」とみなされていると自負しております。

一方、他分野、例えば、培養や病理の研究者の皆様からも種々のご要望をいただき、その都度特別に調製したり、専門家をご紹介したり、ご便宜をはかってまいりました。

今回、ご紹介する「血中 Type II コラーゲン抗体の検索システム」もその一つです。

現在、血中 Type II コラーゲン抗体の存在は、主として関節リウマチ(RA)患者について論議されています。その主な意見は、次のようなもので、未だ一致をみておりません。

- 1) 健康人、RA患者および非RA患者の抗体出現率
- 2) 初期RA患者には高頻度に出現するが、慢性RA患者では低下する
- 3) 肝疾患など、他疾病での出現率

この論議を進める上で、誰もが手軽に使い、感度の良い検索システムである、ELISA法を以下に詳しく述べたいと思います。

なお、本品は「コラーゲン関節炎動物」の抗体価測定に広く利用されているものです。



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

1 試薬 (品番 K73 / 液型 / 00 / 02)

A	マウス用タイプ2コラーゲン (ウシ)	100 μ l / V	-20 C 保存 (長期)
B	コラーゲン溶解剤	12 ml	
C	酵素標識抗体 (マウス用) (10ul/v) 希釈後	11 ml	遮光保存
	* 使用時に、添付の「C-2. 酵素標識抗体希釈液 11 ml」で 容器内を洗い出して希釈する。		
D	検体希釈液 (濃縮)	20 ml	
E	発色基質液	10 ml	遮光保存
F	反応停止液	5 ml	
G	洗浄液 (濃縮)	20 ml	

* 保存温度は、「A (10日以内は4~8 C可)」を除き、4~8 C。
長期保存した「A」は使用時、4~8 Cで溶解させ、充分混和する。

2 試薬の調整 用時に行なう。

1) コラーゲン液

・「B コラーゲン溶解剤」9.9 ml に、「A マウス用タイプ2コラーゲン (ウシ由来)」100 μ l を加え、4~8 Cで混和する。

2) 洗浄液

・「G 洗浄液 (濃縮)」1容に、精製水14容を加える。

3) 検体希釈液

・「D 検体希釈液 (濃縮)」1容に、PBS (pH7.4、各自作製) 4容を加える。
2~8 Cで10日間保存可。

4) 使用時

・全試薬と検体を室温に戻し、浮遊・沈殿物が完全に無くなるよう、静かに混和。

3 検体の調整

1) マウス血清 (又はマウス関節液) 1~5 μ l を、検体希釈液で、通常1000~2000倍に希釈して用いる。抗体価に応じて、希釈倍数は、調整する。

2) その他

・検体の希釈剤として、異種動物血清 (ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ウシ、ウマ他) の濃度を工夫し、用い得る。

・検体の比較には健常群を用い、OD値を比較する。

又は、健常群のOD値を「1単位」とし、陽性検体が健常群と同じOD値を示すまで希釈する。この希釈倍数を「単位の数値」とする。

* 構成試薬の凍結融解は、繰り返しを避ける。

* 試薬、検体の取扱いに際しては、皮膚、衣服に付着しないよう、充分留意する。

万一、付着した時は、直ちに大量の水で洗い流し、専門家の処置を受ける。

4 操作手順 (液型)

マイクロプレート (96well) を用意。

コラーゲン液 $100\mu\text{l}$ / well を加える。

1夜放置 (4C、16時間) 後、上清を吸引除去。

洗浄 ($300\mu\text{l} \times 1$ 回) 後、ペーパータオル上にプレートを伏せ、
水分を吸い取る (以下同)。

ブランクを除き、各ウェルに検体 $100\mu\text{l}$ を加える。

*プレートを、緩やかに、15秒間、混和。

室温で2時間放置後、上清を吸引除去。続いて洗浄 ($300\mu\text{l} \times 3$ 回 以下同)

「酵素標識抗体」 $100\mu\text{l}$ を加え、軽く混和。

カバーし、室温で1時間放置後、上清を吸引除去。続いて洗浄。

「発色基質液」 $100\mu\text{l}$ を加え、軽く混和。

カバーなしで、室温で5~30分放置。(青色の強さを目安にする)

「反応停止液」 $50\mu\text{l}$ を加え、軽く揺すって混和。直ちに、 450nm で測定。

5 キットの貯法と有効期限

- 未開封時、遮光下 $2\sim 8\text{C}$ で2ヵ月。

6 問合せ先

- コラーゲン技術研修会 (Fax. 0424-95-1990) 又は、お近くの試薬販売店へ。
- 万全を期して出荷しておりますが、万一、構成試薬の不足、変質等がありましたら、直接ご連絡下さい (Tel. 0424-95-1995)。
- 特種項目の開発、製造にも応じています。ご相談下さい。

7 製品のご紹介

- 「K11」コラゲノキット
東京医科歯科大学永井裕教授、テネシー大学K. Terato助教授のご指導、ご助言により、世界で最初に開発されたコラゲナーゼ活性測定試薬。
発売以来25年、国内外での使用例、記載文献多数。
 - 「K41」「K42」タイプIIコラーゲン (ウシ由来)
リウマチ関節炎を研究目的に、1981年、世界で最初に製品化され、この分野での標準品として、使用されています。
 - 独自の精製法による各種動物由来のタイプIIコラーゲン
免疫用に、K40 (ラット), K43 (ニワトリ), K44 (ブタ)。
ELISA に、K45 (ラット), K46 (ウシ), K47 (ニワトリ), K48 (ブタ), K49 (ヒト)。
その他 K49S (サル, 500ug 凍結乾燥品)
 - 「K71」「K72」「K73」抗タイプIIコラーゲン抗体検索システム
ヒト用、ラット用及びマウス用の3種。
 - 蛍光標識タイプI (ウシ), タイプII (ウシ関節)、タイプIV (ヒト胎盤)。
MMPs 活性の測定用基質に、代謝研究に。
高感度ザイモグラフィー (従来比10倍) の基質に (Pat. P)。
 - 「K34」タイプIVコラーゲン (ヒト胎盤由来)
ザイモグラフィーにも、お試し下さい。分子サイズは、再精製で、均一化。
国内で最もお使い易い価格 (1mg/ ¥34,000)。
 - 「K61」コラーゲンステインキット
コラーゲンの簡便染色定量キットとして世界で最初に製品化されたもの。
姉妹品「K62コラーゲンレッド」は組織切片の染色に。
 - 「K81 デオキシピリジノリン」「K82 ピリジノリン」 骨粗鬆症の研究に。
- [腎炎関連試薬]
- 「K35 NC1」 腎炎モデルの作製に。ウシ腎糸球体タイプIVコラーゲンNC1。
 - 「K36」 腎炎での抗NC1抗体測定キット
ヒト用、動物用 (Pat.)。
 - 「K35 MONO 抗NC1モノクローナル抗体」
免疫組織染色で障害腎のみを染色し、健常腎を染色しない特異性 (Pat. P)。
 - 「K79H」「K79L」タイプIVコラーゲン測定キット (ELISA、コート済)
ヒト用、動物用の2種。

研究試薬のご案内

1. コラーゲン関節炎の作製に

「K41 タイプIIコラーゲン液」 「K42 末」

コラゲナーゼ (MMPs) 活性測定試薬

「K11 コラゲノキットCLN100」

- ・世界で最初に製品化され30年
- ・国内外の文献に多数紹介されています
- ・抗タイプIIコラーゲン抗体測定キットもあります

2. 腎炎モデルの作製に

「K35 NC1」

- ・腎糸球体よりタイプIVコラーゲンNC1領域を精製
- ・簡単な投与で、確実に発症し、長期に観察できます
- ・腎疾患治療薬の開発、スクリーニングに
- ・薬剤の腎機能低下者への影響予測に
- ・自己免疫の研究に

3. ヒト及び動物腎炎での抗体測定に

「K36 抗NC1抗体測定キット ELISA」

4. 障害腎の免疫組織染色に

「K35M0N0 抗NC1モノクローナル抗体」

- ・健常腎を染色せず、障害腎のみを染色します

●お問い合わせ先

販売 コスモ・バイオ(株) Tel. 03-5632-9610

Fax. 03-5632-9619

開発 コラーゲン技術研修会

CRC



COLLAGEN RESEARCH CENTER

1-10-1 Kamikiyoto, Kiyose, Tokyo 204-0013, Japan
Tel+81-424-95-1995 Fax+81-424-95-1990