

2020年 2月 26日

徳島県鳴門市瀬戸町明神字板屋島124-4
株式会社アンテグラル
TEL 088-683-7211 FAX 088-683-7212

受託分析報告書

報告書番号	AMP024014
ご依頼元	株式会社 夢ふおと 林 さゆり 様
分析内容	ヒト唾液 オキシトシン ELISA測定

確認者





自然免疫
応用技研
株式会社

2020年2月17日
試験番号: 19-210

Oxytocin ELISA 測定 報告書

自然免疫応用技研株式会社
〒761-0301 香川県高松市林町2217-6 2F
Tel: 087-867-7712 / Fax: 087-867-7737
E-mail: macrophi@macrophi.co.jp

株式会社 夢ふとお
林 さゆり 様

表1.測定結果

検体 No	サンプル情報		カラム精製 濃縮率	Oxytocin* (pg/mL)
1	1	-A	7	0.6
2		-B	7	1.3
3	2	-A	7	2.4
4		-B	7	2.7
5	3	-A	7	0.7
6		-B	7	2.8
7	4	-A	5	2.4
8		-B	5	3.3
9	5	-A	7	1.6
10		-B	7	1.9
11	6	-A	7	1.9
12		-B	7	1.6
13	7	-A	7	1.3
14		-B	7	1.5
15	8	-A	7	1.3
16		-B	7	4.3
17	9	-A	4	2.7
18		-B	4	3.4
19	10	-A	7	2.8
20		-B	7	3.7

検体 No	サンプル情報		カラム精製 濃縮率	Oxytocin* (pg/mL)
21	11	-A	7	2.6
22		-B	7	2.2
23	12	-A	4	1.4
24		-B	4	2.1
25	13	-A	7	3.0
26		-B	7	2.9
27	14	-A	7	1.7
28		-B	7	5.7
29	15	-A	5	2.0
30		-B	5	1.6
31	16	-A	7	1.4
32		-B	7	1.1
33	17	-A	7	1.9
34		-B	7	2.2
35	18	-A	7	3.5

*オキシトシンの測定値は、濃縮率で補正した値。

7倍濃縮時のOxytocin測定の定量限界は、2.3pg/mL。検出限界は、2.1pg/mL。

5倍濃縮時のOxytocin測定の定量限界は、3.1pg/mL。検出限界は、3.0pg/mL。

4倍濃縮時のOxytocin測定の定量限界は、3.8pg/mL。検出限界は、3.9pg/mL。

定量限界以下の値は参考値となる。

測定担当者 天野 里子
測定責任者 西澤 孝志

【個別データ】

●Oxytocin

表2-1.生データ plate1 (405nm-570nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.001	0.200	0.481	0.571	0.540	0.571	0.585	0.573	0.571	0.533	0.594	0.550
B	-0.001	0.179	0.458	0.558	0.532	0.535	0.542	0.534	0.526	0.537	0.548	0.544
C	1.648	0.249	0.513	0.531	0.546	0.537	0.560	0.538	0.576	0.548	0.566	0.507
D	1.702	0.263	0.506	0.555	0.565	0.572	0.569	0.532	0.578	0.567	0.559	0.544
E	0.002	0.318	0.543	0.530	0.553	0.551	0.501	0.531	0.565	0.473	0.566	0.588
F	0.000	0.320	0.541	0.543	0.534	0.565	0.525	0.513	0.569	0.520	0.574	0.580
G	0.631	0.403	0.575	0.562	0.562	0.543	0.568	0.544	0.542	0.554	0.542	0.585
H	0.580	0.382	0.592	0.601	0.553	0.594	0.552	0.534	0.522	0.569	0.561	0.581

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PB/ank	Standards						Unk Dilution				
B	BL	01	05	02	06	10	14	18	22	26	30	34
C	Unk D...	02	06	03	07	11	15	19	23	27	31	35
D	36	02	06	03	07	11	15	19	23	27	31	35
E	37	03	07	04	08	12	16	20	24	28	32	
F	37	03	07	04	08	12	16	20	24	28	32	
G	08	04	01	05	09	13	17	21	25	29	33	
H	08	04	01	05	09	13	17	21	25	29	33	

図1-1.プレートテンプレート plate1

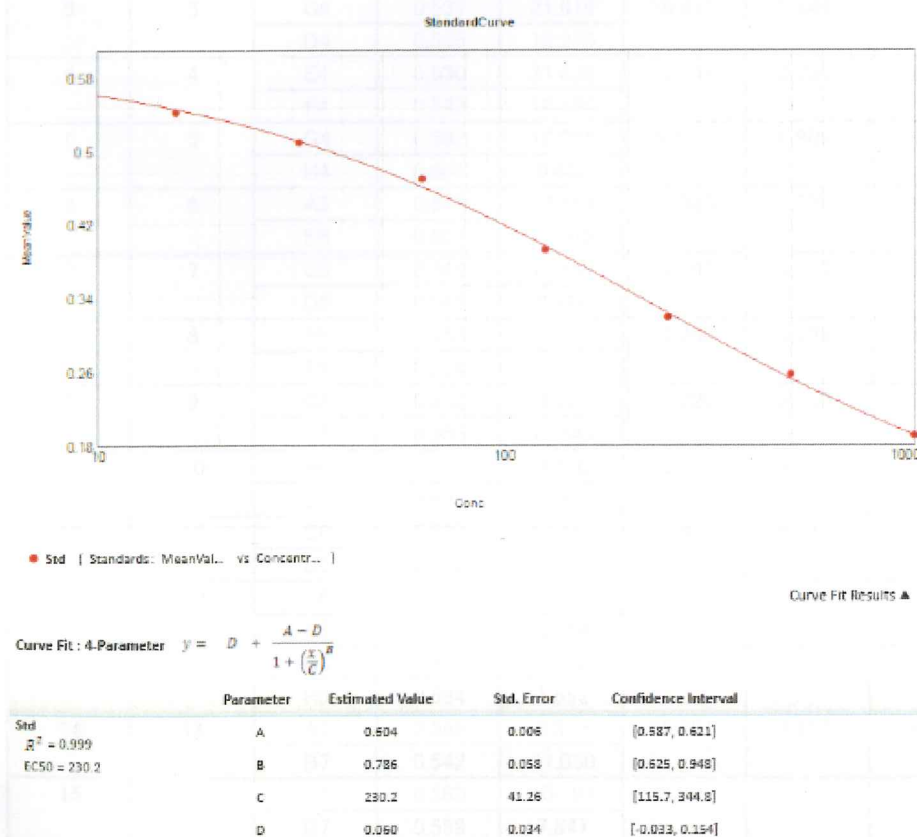


図1-2.検量線 plate1

表2-2.詳細データ plate1 Standard

Sample	Oxytocin pg/mL	Wells	Value	Mean Value	SD	CV
1	1000	A2	0.200	0.190	0.015	7.9
		B2	0.179			
2	500	C2	0.249	0.256	0.010	3.9
		D2	0.263			
3	250	E2	0.318	0.319	0.001	0.4
		F2	0.320			
4	125	G2	0.403	0.393	0.014	3.7
		H2	0.382			
5	62.5	A3	0.481	0.470	0.016	3.5
		B3	0.458			
6	31.3	C3	0.513	0.509	0.005	1.0
		D3	0.506			
7	15.6	E3	0.543	0.542	0.001	0.2
		F3	0.541			
8	0	G1	0.631	0.605	0.036	5.9
		H1	0.580			

表2-3.詳細データ plate1 Sample(1)

Sample		Wells	Value	Result	Mean Result	SD	CV	Dilution	AdjResult
1	1	G3	0.575	6.061	4.004	2.909	72.6	0.14	0.572
		H3	0.592	1.947					
2	2	A4	0.571	7.168	9.246	2.939	31.8	0.14	1.321
		B4	0.558	11.324					
3	3	C4	0.531	21.619	16.917	6.649	39.3	0.14	2.417
		D4	0.555	12.215					
4	4	E4	0.530	21.836	19.198	3.731	19.4	0.14	2.743
		F4	0.543	16.560					
5	5	G4	0.562	10.032	5.217	6.809	130.5	0.14	0.745
		H4	0.601	0.402					
6	6	A5	0.540	17.664	19.340	2.370	12.3	0.14	2.763
		B5	0.532	21.015					
7	7	C5	0.546	15.447	12.182	4.617	37.9	0.20	2.436
		D5	0.565	8.918					
8	8	E5	0.553	13.024	16.700	5.199	31.1	0.20	3.340
		F5	0.534	20.377					
9	9	G5	0.562	9.805	11.326	2.150	19.0	0.14	1.618
		H5	0.553	12.846					
10	10	A6	0.571	7.110	13.533	9.083	67.1	0.14	1.933
		B6	0.535	19.955					
11	11	C6	0.537	19.165	12.979	8.749	67.4	0.14	1.854
		D6	0.572	6.793					
12	12	E6	0.551	13.633	11.275	3.334	29.6	0.14	1.611
		F6	0.565	8.918					
13	13	G6	0.543	16.833	9.193	10.806	117.6	0.14	1.313
		H6	0.594	1.552					
14	14	A7	0.585	3.373	10.201	9.657	94.7	0.14	1.457
		B7	0.542	17.030					
15	15	C7	0.560	10.522	9.185	1.892	20.6	0.14	1.312
		D7	0.569	7.847					

表2-4.詳細データ plate1 Sample(2)

Sample		Wells	Value	Result	Mean Result	SD	CV	Dilution	AdjResult
16	16	E7	0.501	36.541	30.392	8.696	28.6	0.14	4.342
		F7	0.525	24.243					
17	17	G7	0.568	7.937	10.677	3.875	36.3	0.25	2.669
		H7	0.552	13.417					
18	18	A8	0.573	6.622	13.520	9.756	72.2	0.25	3.380
		B8	0.534	20.419					
19	19	C8	0.538	18.632	19.931	1.837	9.2	0.14	2.847
		D8	0.532	21.230					
20	20	E8	0.531	21.706	25.924	5.966	23.0	0.14	3.703
		F8	0.513	30.142					
21	21	G8	0.544	16.250	18.250	2.828	15.5	0.14	2.607
		H8	0.534	20.250					
22	22	A9	0.571	7.110	15.359	11.666	76.0	0.14	2.194
		B9	0.526	23.608					
23	23	C9	0.576	5.786	5.544	0.343	6.2	0.25	1.386
		D9	0.578	5.301					
24	24	E9	0.565	8.824	8.217	0.859	10.5	0.25	2.054
		F9	0.569	7.609					
25	25	G9	0.542	17.148	21.318	5.897	27.7	0.14	3.045
		H9	0.522	25.488					
26	26	A10	0.533	20.887	19.964	1.305	6.5	0.14	2.852
		B10	0.537	19.042					
27	27	C10	0.548	14.808	11.631	4.493	38.6	0.14	1.662
		D10	0.567	8.454					
28	28	E10	0.473	53.312	39.917	18.943	47.5	0.14	5.702
		F10	0.520	26.522					
29	29	G10	0.554	12.425	10.091	3.300	32.7	0.20	2.018
		H10	0.569	7.758					
30	30	A11	0.594	1.456	8.076	9.362	115.9	0.20	1.615
		B11	0.548	14.696					
31	31	C11	0.566	8.731	9.726	1.407	14.5	0.14	1.389
		D11	0.559	10.721					
32	32	E11	0.566	8.546	7.443	1.560	21.0	0.14	1.063
		F11	0.574	6.340					
33	33	G11	0.542	16.951	13.540	4.824	35.6	0.14	1.934
		H11	0.561	10.129					
34	34	A12	0.549	14.179	15.273	1.546	10.1	0.14	2.182
		B12	0.544	16.366					
35	35	C12	0.507	33.292	24.771	12.050	48.6	0.14	3.539
		D12	0.544	16.250					
36	TA	C1	1.648	Range?	Range?	Range?	Range?	1.00	Range?
		D1	1.702	Range?					
37	NSB	E1	0.002	Range?	Range?	Range?	Range?	1.00	Range?
		F1	0.000	Range?					

【サンプル】

ヒト唾液 35検体

2020年1月14日および27日に受領した。

受領したサンプルは-80℃にて凍結状態で保存した。

【測定方法】

1) Oxytocin

①サンプル調製方法(検体回収～カラム精製)

1.75mLのサンプルをカラム精製に供試し、7倍濃縮した。

サンプルが1.75mLに足りないものは、できるだけ濃縮率が大きくなりようにカラム精製した。

Szeto Aらの報告(※)に記載されている方法を参考にし、一部改変して実施した。(改変部位はカラムの平衡化と洗浄の部分で、それぞれ0.1%TFAを3mL流す工程を1回ずつ追加し、溶出に用いる60%アセトニトリルの量を6mLに変更した。)

回収したカラム精製液の入ったコニカルチューブを-80℃にて凍結させた後、凍結乾燥した。

凍結乾燥したサンプルは、Assay Buffer(Oxytocin ELISA kitの一部)を250 μ L加えた。

ボルテックスミキサーを用いて、攪拌して溶解させた。

本液を精製原液とした。

その後、遠心分離(800 $\times$ g)を5分間行い、上清をELISA測定に供した。

※参考文献

Szeto A et al.

「Evaluation of enzyme immunoassay and radioimmunoassay methods for the measurement of plasma oxytocin.」

Psychosom Med. 2011 June ; 73(5): 393-400.

※測定に使用したカラム

Waters

Sep-Pak Vac 3cc (200mg) C18 Cartridges

Catalog No. WAT054945

②ELISA測定

Oxytocin ELISA kit (Enzo Life Sciences)を使用した。

ELISA測定は、測定キットに添付の説明書に従って実施した。

n=2で実施した。希釈倍率は、一律1倍希釈(精製原液)とした。

※測定に使用したキット

Oxytocin EIA kit (Enzo Life Sciences)

Catalog No. ADI-900-153A

Lot:10051807H

Expires: 31 Oct 2020

【測定に使用した装置および器具】

1. プレートリーダー Molecular Devices SpectraMax Plus384
2. コンピュータ Dell Latitude E6540
3. データ解析ソフトウェア Molecular Devices SoftMax Pro ver.6
4. ボルテックスミキサー Scientific Industries Vortex-genie2
5. プレートミキサー ASONE NS-4P
6. プレートウォッシャー BIO-RAD Model 1575
7. マイクロピペット Eppendorf
8. 8連マルチチャンネルピペット HTL
9. テーブルトップ遠心機 KUBOTA 5220
10. 冷蔵庫 National NR-C374M-H
11. 冷凍庫 NIHON FREEZER GSS-3156HC
12. 超低温冷凍庫 SANYO MDF-0383
13. 凍結乾燥機 EYELA FDU-2100
14. ドライチャンバー EYELA DRC-1N
15. オイルフィルトレーション付真空ポンプ EYELA GCD-136XNF