

研究用試薬

# ヒト多量体アディポネクチン分別測定キット

商品コード: 376405

## ユーザーズマニュアル

本キットは研究用試薬であり、疾病の診断若しくはその補助の目的で使用することはできません。又、取扱説明書に記述されている説明に従って操作を行い、操作上の留意事項を考慮して使用してください。

積水メディカル株式会社

## 【開発経緯】

アディポネクチンは、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの1つで、244個のアミノ酸からなる蛋白質であり、血中には3量体を基本構造として数種の多量体として存在することが報告されています<sup>1)~3)</sup>。アディポネクチンには、抗動脈硬化作用、インスリン抵抗性改善作用や肝線維化防止作用などの生理活性を有することが報告されていますが、近年、これらの生理作用と多量体構造の役割の関係について注目されており、高分子(HMW: High molecular weight) 構造体のアディポネクチンやその総濃度に対する比率を測定することで、より病態を反映する報告もなされています<sup>4)~7)</sup>。最近、ヒト血漿から多量体アディポネクチンを分別精製した結果より、新たに判明したアルブミン結合型3量体を加えた、主に4種類の多量体構造の解明がなされました<sup>8)</sup>。さらに、ある種のプロテアーゼを作用させることで、ヒト血中に存在する多量体アディポネクチンを特異的に消化できることが報告され、この検体処理工程を組み合わせることにより各分画のアディポネクチンを直接及び間接的に分別測定する方法が提案されています<sup>9)</sup>。本キットは、この検体処理原理を採用し、且つアディポネクチン測定系であるELISAを組み合わせることで構成されており、アディポネクチンの総量、各分画濃度、そして総量に対する比率を、共通した検出系で算出できる利点を有しています。又、最近脳髄液(CSF)中にも極微量のアディポネクチンが存在することが報告され、その中枢作用に関しても注目されています<sup>10)</sup>。本キットは、プロトコールを変更することで、ヒトCSF中の多量体アディポネクチンの分別測定にも対応しています<sup>11)</sup>。

## 【測定原理】

本キットは、2種類の抗ヒトアディポネクチンモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法(ELISA法)を基本原理として、予め検体に下記に示す前処理を施すことにより、総量及び各多量体構造のアディポネクチンを、直接及び間接的に分別測定します(図1)。

又、本キットでの多量体アディポネクチンの分類は以下の4画分です。

- ①全アディポネクチン画分:「Total-Ad」とします。
- ②高分子量アディポネクチン(12-18量体相当);「HMW-Ad」とします。
- ③中分子量アディポネクチン(6量体相当);「MMW-Ad」とします。
- ④低分子量アディポネクチン(3量体相当でアルブミン結合型を含む);「LMW-Ad」とします。

## 《検体の前処理》

### ◆ Total-Ad濃度:

SDSを含む酸性緩衝液による処理により、主に2量体への構造変換を行います。

### ◆ HMW-Ad濃度:

多量体構造の内、LMW-Ad及びMMW-Adを特異的に分解するプロテアーゼを作用させ、残存するHMW-AdをSDSを含む酸性緩衝液により、2量体への構造変換を行うと同時に、プロテアーゼの消化反応を停止させます。

### ◆ MMW-AdとHMW-Adの合計濃度:

多量体構造の内、LMW-Adのみを特異的に分解するプロテアーゼを作用させ、残存するMMW-Ad及びHMW-AdをSDSを含む酸性緩衝液により、2量体への構造変換を行うと同時に、プロテアーゼの消化反応を停止させます。

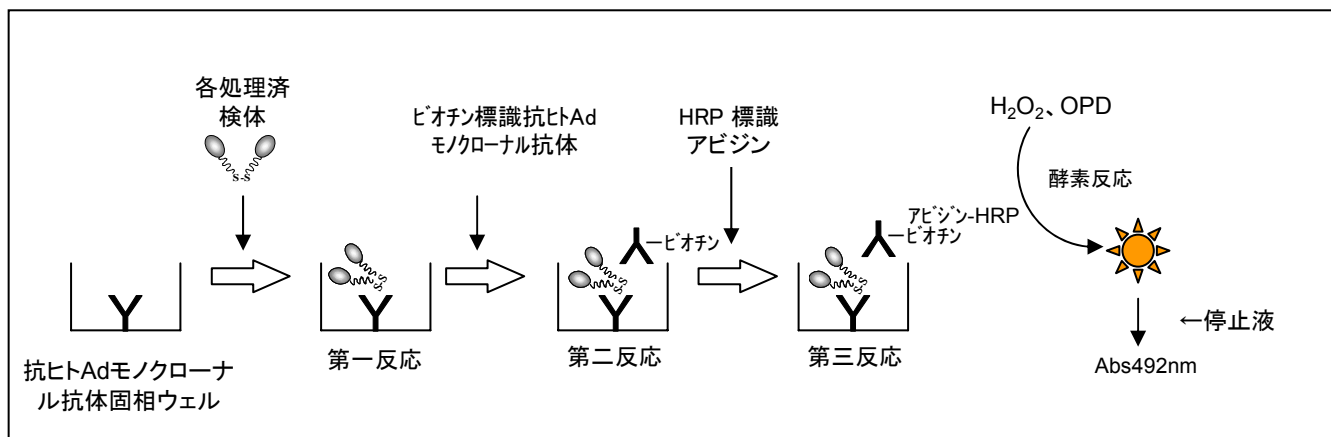
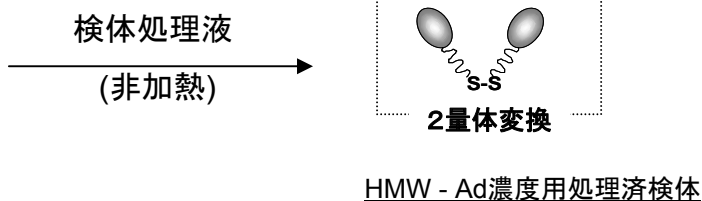
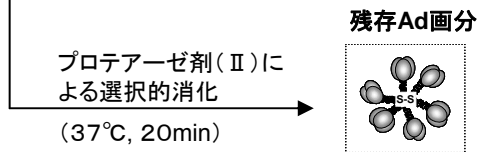
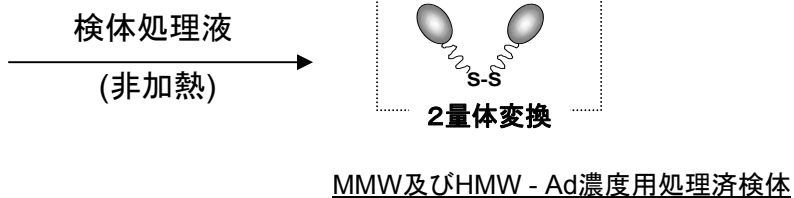
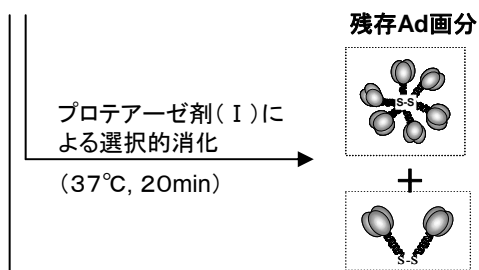
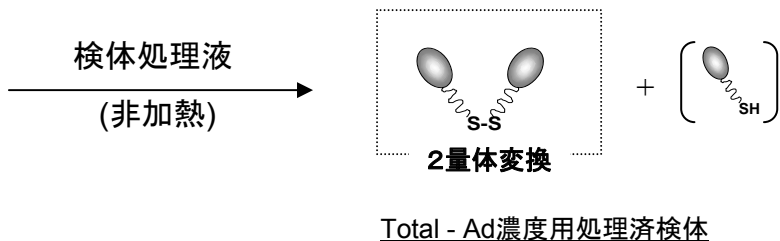
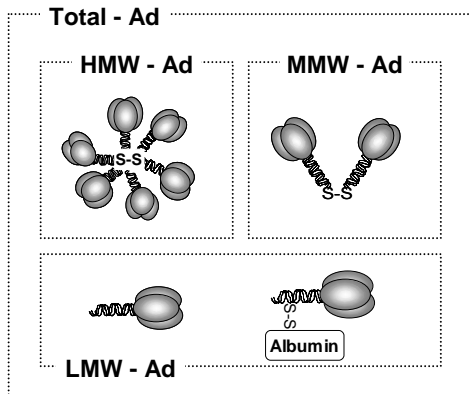
標準液及び前処理した検体を、抗ヒトアディポネクチンモノクローナル抗体を固定したプレートに加えて反応させ、これにビオチン標識抗ヒトアディポネクチンモノクローナル抗体を加え反応させ、更に西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え反応させます。これにo-フェニレンジアミン(基質液)を加えて発色させ、その吸光度を測定し、同時に測定した標準液の吸光度から各前処理後の検体中のアディポネクチン濃度を算出します。標準品には、ヒト新鮮血漿から分別精製したHMW-Adの蛋白質濃度を元にした1次標準品を基準に、値付けされたヒト新鮮血清を検体処理液で処理したものを用いています。

## 【特徴】

前述した前処理操作を検体に施すことにより、総濃度、HMW-Ad濃度及びMMW-AdとHMW-Adの合計濃度を、同一プレート内で直接測定できます。さらにMMW-Ad濃度は、MMW-AdとHMW-Adの合計濃度からHMW-Ad濃度を差し引くことにより、LMW-Ad濃度は、総濃度からMMW-AdとHMW-Adの合計濃度を差し引くことにより、間接的に算出することができます。

# 図1. 測定原理

## ヒト血中多量体アディポネクチン



## 【試薬構成】

	構成試薬名	成分	容量・本数
1	①濃厚洗浄液	緩衝液 他	100mL × 1ボトル
2	②検体処理液	緩衝液、SDS 他	50mL × 1ボトル
3	③希釈液	緩衝液、BSA 他	100mL × 1ボトル
4	④抗体プレート	抗ヒトアデノネクチンモノクローナル抗体 他	96ウェル × 1枚
5	⑤標準品	検体処理済みヒト血清	0.25mL × 1チューブ
6	⑥ビオチン標識抗体液	ビオチン標識抗ヒトアデノネクチンモノクローナル抗体 他	6.0mL × 1ボトル
7	⑦酵素標識 streptavidin液	西洋ワサビペルオキシダーゼ 標識streptavidin	6.0mL × 1ボトル
8	⑧基質剤	o-フェニレンジアミン 他	6mL用 × 2バイアル
9	⑨基質溶解液	過酸化水素 他	15mL × 1ボトル
10	⑩停止液	硫酸 他	15mL × 1ボトル
11	⑪プロテアーゼ剤 (I)	プロテアーゼ 他	10mL用 × 1バイアル
12	⑫プロテアーゼ剤 (II)	プロテアーゼ 他	10mL用 × 1バイアル
13	⑬プロテアーゼ溶解液	緩衝液 他	50mL × 1ボトル

## 【必要器具等】

- マイクロピペット(2~20  $\mu$ L) ※検体のサンプリングを正確に行う為、ピペットの校正を行って下さい。
- メスピペット
- オクタペット(50  $\mu$ L)
- 検体処理用マイクロチューブ 及びチューブラック
- 希釈用チューブ
- 恒温槽(ウォーターバス:37°C)
- プレートリーダー(測定波長:492nm)

## 【試薬の調製方法】

全ての試薬は室温に戻してから使用します。

### 1. 洗浄液

濃厚洗浄液を精製水で10倍に希釈し洗浄液とします。調製後は2～10℃に保存します。

### 2. 検体処理液

析出している白色沈殿(SDS)を室温放置又は加温して完全に溶解させ、十分に攪拌したものを検体処理液としてそのまま用います。調製後は室温で保存します。

### 3. 希釈液

そのまま使用します。残った液は2～10℃で保存します。

### 4. 抗体プレート

そのまま使用します。使用しないモジュールはラミネート袋に入れて、2～10℃で保存します。

### 5. 標準液

注意) チューブ内に沈殿が析出している場合があるので、室温放置後十分に攪拌してから用います。

標準品を希釈液で**101倍希釈**した後、さらに以下の例に従って希釈し、各希釈標準液を調製します。残った標準品は2～10℃で保存し、再度測定を行う場合には同じ操作を行い調製します。

※標準品を希釈液で希釈する際に、一時的に沈殿が認められるので十分な攪拌を行います。

又、標準液の調製は検体処理後の希釈操作と同時期に行い、処理検体及び標準液を続けて抗体プレートに添加します。

#### 《希釈系列調製例》

101倍表示濃度 (ng / mL)	<b>4.8</b>	<b>2.4</b>	<b>1.2</b>	<b>0.6</b>	<b>0.3</b>	<b>0.15</b>	<b>0.075</b>	<b>0</b>
101倍希釈標準液(μL)	適量	→ 150	→ 150	→ 150	→ 150	→ 150	→ 150	0
希 釈 液 (μL)	0	150	150	150	150	150	150	適量

※101倍希釈した後の濃度は、標準品のラベルに記載されています。

### 6. ビオチン標識抗体液

そのまま使用します。残った液は2～10℃で保存します。

### 7. 酵素標識ストレプトアビジン液

そのまま使用します。残った液は2～10℃で保存します。

### 8. 基質液

使用直前に基質剤1本 あたり6mLの基質溶解液にて溶解し、基質液とします。調製後は速やかに使用し、残った調製液の保存はしません。

### 9. 停止液

そのまま使用します。残った液は室温で保存します。

### 10. プロテアーゼ液 (I)

プロテアーゼ剤 (I) にプロテアーゼ溶解液10mLを加え、室温にて15～30分間ウェイブローターなどで攪拌し完全に溶解させます。調製後のプロテアーゼ液は、2～10℃で保存した場合、2日以内であれば再使用でき、また-30℃以下で凍結保存した場合は一回に限り融解して再使用できます。

### 12. プロテアーゼ液 (II)

プロテアーゼ剤 (II) にプロテアーゼ溶解液10mLを加え、室温にて15～30分間ウェイブローターなどで攪拌し完全に溶解させます。調製後のプロテアーゼ液は2～10℃で保存した場合、2日以内であれば再使用でき、また-30℃以下で凍結保存した場合は、一回に限り融解して再使用できます。

## 【操作方法】

### 1) 検体の前処理

#### 前処理方法① Total-Ad濃度測定

血清又は血漿 10  $\mu$ L にプロテアーゼ溶解液 100  $\mu$ L を加え、更に、検体処理液 400  $\mu$ L を加え、十分に攪拌します(51倍希釈)。

#### 前処理方法② MMW-Ad及びHMW-Ad 合計濃度測定

血清又は血漿 10  $\mu$ L にプロテアーゼ液(Ⅰ) 100  $\mu$ L を加え、37°Cで20分間加温します。さらに、検体処理液 400  $\mu$ L を加え十分に攪拌します(51倍希釈)。

#### 前処理方法③ HMW-Ad濃度測定

血清又は血漿 10  $\mu$ L にプロテアーゼ液(Ⅱ) 100  $\mu$ L を加え、37°Cで20分間加温します。さらに、検体処理液 400  $\mu$ L を加え十分に攪拌します(51倍希釈)。

### 2) 前処理検体の希釈

希釈液1.0mLに①～③の前処理検体を10  $\mu$ L 添加し、希釈検体とします(101倍希釈、最終5151倍希釈)。この際に、一時的に沈殿が認められるので、十分な攪拌を行います。

### 3) 測定方法

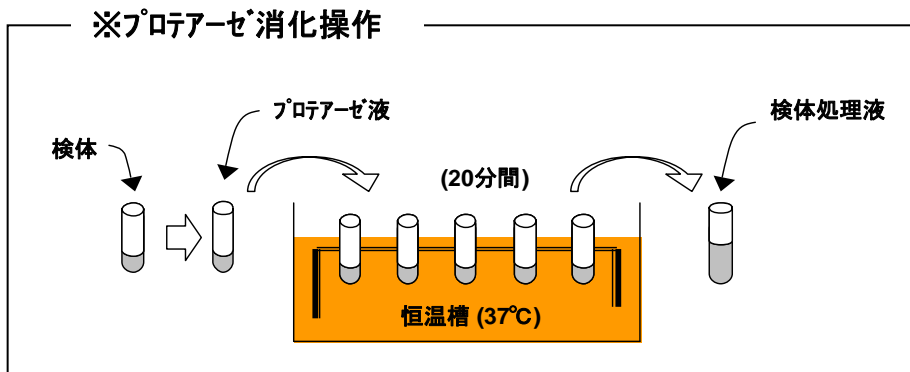
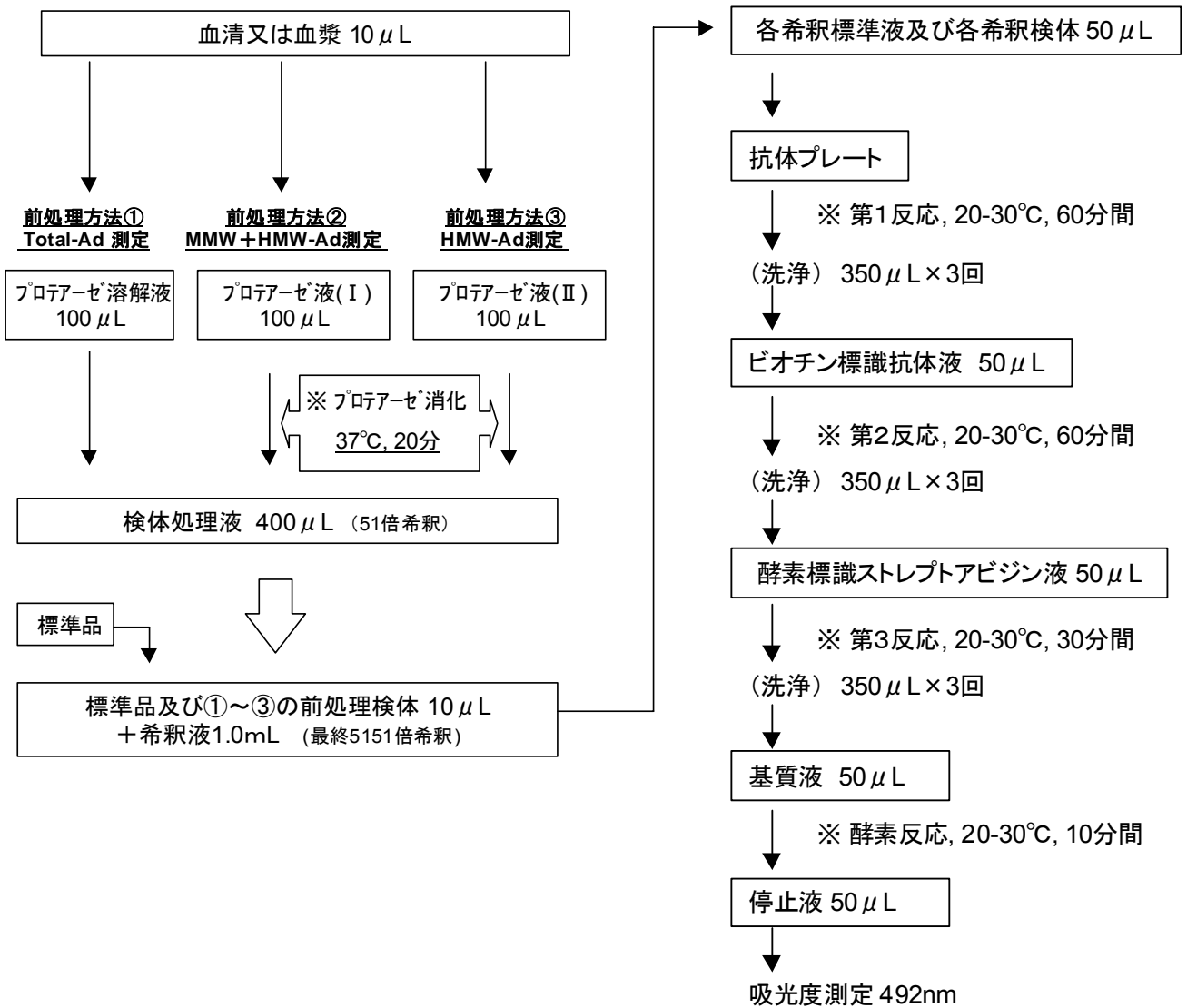
- (i) 抗体プレートをラミネート袋より必要量取り出し、各ウェルに調製した各標準液及び希釈検体を50  $\mu$ L ずつ加え、20～30°Cで60分間静置反応させます。
- (ii) 反応終了後、内容物を吸引除去し、続いて洗浄液を各ウェルに350～400  $\mu$ L ずつ加え、洗浄液を吸引除去します。この洗浄操作をさらに2回繰り返します。
- (iii) 洗浄済みウェルにビオチン標識抗体液を50  $\mu$ L ずつ加え、20～30°Cで60分間静置反応させます。
- (iv) (ii)と同様に、洗浄操作を行います。
- (v) 洗浄済みウェルに酵素標識ストレプトアビジン液を50  $\mu$ L ずつ加え、20～30°Cで30分間静置反応させます。
- (vi) (ii)と同様に洗浄操作を行います。
- (vii) 洗浄済みウェルに基質液を50  $\mu$ L ずつ加え、20～30°Cで10分間静置反応させた後、停止液を50  $\mu$ L 加えます。
- (viii) プレートリーダーにより、波長492nmにて各ウェルの吸光度を測定します(二波長測定の場合は対照波長を600-700nmとします)。

### 4) 多量体アディポネクチン分別濃度の算出法

各濃度の標準液及び検体の吸光度から、標準液0ng/mLの吸光度を差し引き、平均値を求め、横軸にアディポネクチンの濃度、縦軸に吸光度の平均値をプロットして、検量線(例えば、両対数変換の二次回帰式等)を作成します。検体の吸光度を検量線に当てはめアディポネクチンの濃度を算出し、最終的に希釈倍率(5151倍)を乗じて、各前処理方法①～③によるアディポネクチン濃度とします。尚、多量体アディポネクチン各画分の濃度算出は以下に従います。

- Total-Ad: 前処理方法①による算出濃度
- HMW-Ad: 前処理方法③による算出濃度
- MMW-Ad: 前処理方法②による算出濃度 - (HMW-Ad濃度)
- LMW-Ad: (Total-Ad濃度) - 前処理方法②による算出濃度

図2 測定フローチャート



## 【 操作上の留意事項 】

1. 検体は、血清、EDTA血漿又はヘパリン血漿を用いることができます。クエン酸血漿では測定値が低値化する傾向がありますので使用しないでください。

※【性能】5. 血清・血漿検体 のデータ参照

2. 同一血清又は血漿中の分別測定を行う際には、同一プレート内で行い、同一ロットであっても、プレート間での算出は行わないでください。

3. 同一ロットのキットを同時に2キット以上使用する場合も、抗体プレート毎に検量線を作成してください。

4. 標準液及び検体ともに2重測定が望ましいです。

5. 検量線範囲を超える高濃度検体は、検体前処理後の希釈操作で、希釈倍率を変えて測定してください。

6. 反応は時間及び温度を厳守してください。プロテアーゼ前処理操作については特に注意してください。

※【性能】7、8. プロテアーゼ消化時間及び温度の影響 のデータ参照

7. キットは2回までの分割使用が可能です。残った試薬等は各調製試薬の保存方法に従って保存し、キットの使用期限内に使用してください。

8. 多数検体を測定する時などで、検体処理段階で操作を2時間以上中断する場合、検体処理液を加えた段階で室温にて保存し、前処理検体を希釈液で希釈後は速やかに抗体プレートに加えてください。

※【性能】6. 検体の安定性 のデータ参照

9. 洗浄操作では、洗浄液は完全に除去してください。

10. 洗浄後のウェルを乾燥させたり、傷つけたりしないでください。

11. 操作は直射日光を避けて行ってください。

## 【 使用上又は取扱い上の注意 】

1. 感染の予防上、検体の取扱いには十分注意してください。

2. 本キットの構成試薬中、標準品はHBs抗原、HIV抗体及びHCV抗体陰性を確認した血清から調製されていますが、使用の際には手袋等を着用し、検体と同様感染の危険があるものとして十分注意をして取扱ってください。

3. 本キットの構成試薬中、停止液には硫酸が含まれていますので、目や皮膚に付着させないよう十分に注意をして取扱ってください。

4. 試薬が目や口に入った場合や皮膚に付着した場合には速やかに水で十分に洗い流し、必要あれば医師の手当て等を受けてください。

5. 使用後の容器、チップ等を廃棄する際には、焼却処理するか、廃棄物に関する規定に従って、医療廃棄物又は産業廃棄物等に区別して処理してください。

6. 本キットは研究用試薬であり、疾病の診断若しくはその補助の目的で使用することはできません。

# 【性能】

## 1. 感度

標準液(4.8ng/mL)を測定した際の吸光度は、0.9 OD以上です。

本品の測定範囲は、【 操作方法 】に従って測定した場合、0.075~4.8ng/mLの範囲で測定可能です。又、最小検出感度は、0.038ng/mLでした。

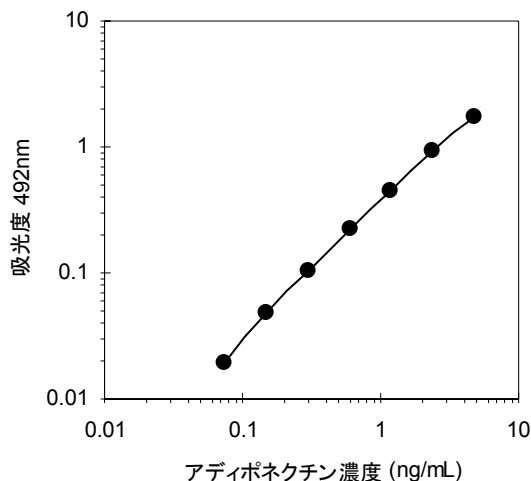


図.3 両対数変換の二次回帰による検量線例

## 2. 再現性

### ・ 同時再現性

ヒト血清を、検体の前処理(①~③)操作を含めて同時に8回測定した時、総Ad量、MMW+HMW-Adの合計量及びHMW-Ad量のそれぞれの変動係数(CV)は、15%未満でした。尚、計算によって算出したMMW-Ad及びLMW-Adの変動係数は、バラツキが付加される為、大きくなります。

#### 測定結果例

	ヒト血清 1			計算値	
	総 アディポネクチン	MMW+HMW アディポネクチン	HMW アディポネクチン	MMW アディポネクチン	LMW アディポネクチン
平均値 ( $\mu$ g/ml)	3.98	2.16	1.08	1.08	1.82
SD ( $\mu$ g/ml)	0.21	0.11	0.05	0.11	0.13
CV (%)	5.4	5.0	5.0	10.2	7.3

	ヒト血清 2			計算値	
	総 アディポネクチン	MMW+HMW アディポネクチン	HMW アディポネクチン	MMW アディポネクチン	LMW アディポネクチン
平均値 ( $\mu$ g/ml)	9.22	6.60	4.53	2.08	2.62
SD ( $\mu$ g/ml)	0.48	0.27	0.15	0.29	0.34
CV (%)	5.3	4.1	3.3	13.7	13.0

### ・ 日差再現性

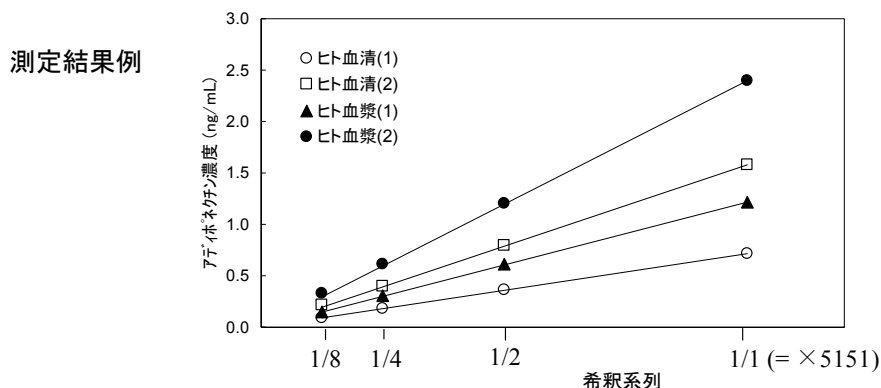
同一ヒト血清を、日を替えて8回測定した時、総Ad量、MMW+HMW-Adの合計量及びHMW-Ad量のそれぞれの変動係数(CV)は、15%未満でした。

#### 測定結果例

	ヒト血清 3		
	総 アディポネクチン	MMW+HMW アディポネクチン	HMW アディポネクチン
平均値 ( $\mu$ g/ml)	7.66	5.35	3.45
SD ( $\mu$ g/ml)	0.38	0.32	0.20
CV (%)	5.0	6.0	5.7

### 3. 希釈直線性

前処理方法①で処理したヒト血清及び血漿を希釈液で希釈した後(5151倍希釈液)、さらに希釈液で1/2ずつ段階希釈を行いキットを用いて測定した時、希釈直線性が得られました。



### 4. 添加回収

精製ヒトHMW-Adを濃度を変動させてヒト血清に添加したものを検体として、キットを用いて測定した時、添加回収率は、±10%以内でした。

測定結果例

	添加HMW-Ad (μg/ml)	測定値 (μg/ml)	理論値 (μg/ml)	回収率 (%)
総アディホネクチン	0.00	7.33	7.31	100
	1.14	8.51	8.46	101
	2.29	9.88	9.60	103
	4.57	11.8	11.9	99
	9.14	16.9	16.5	103
MMW+HMW アディホネクチン (プロテアーゼ I 処理)	0.00	5.69	5.69	100
	1.14	7.02	6.83	103
	2.29	8.14	7.98	102
	4.57	10.8	10.3	105
	9.14	16.2	14.8	109
HMW アディホネクチン (プロテアーゼ II 処理)	0.00	3.88	3.89	100
	1.14	5.01	5.03	100
	2.29	6.26	6.17	101
	4.57	8.89	8.46	105
	9.14	12.6	13.0	97

### 5. 血清・血漿検体

4人の健常者より、同時に採血した血清及び血漿(EDTA, ヘパリン, クエン酸)をキットを用いて測定した時、血清との比較では、クエン酸血漿のみ低値化傾向を認めました。

測定結果例

	検体 (n=4)	平均値 (μg/ml)	回収率(血漿/血清) (%)
総アディホネクチン	血清	5.84	100
	EDTA 血漿	5.37	93
	ヘパリン 血漿	5.37	94
	クエン酸 血漿	4.45	76
MMW+HMW アディホネクチン (プロテアーゼ I 処理)	血清	3.69	100
	EDTA 血漿	3.72	102
	ヘパリン 血漿	3.77	101
	クエン酸 血漿	3.12	83
HMW アディホネクチン (プロテアーゼ II 処理)	血清	2.77	100
	EDTA 血漿	2.56	94
	ヘパリン 血漿	2.63	94
	クエン酸 血漿	2.20	79

## 6. 検体の安定性

### ・凍結融解の影響

ヒト血清を3回凍結溶解した後、キットで測定した時、回収率は±10%以内でした。

測定結果例

検体 (n=4)	平均値(μg/ml)	回収率 (%)		
		凍/融1回	凍/融2回	凍/融3回
総アディポネクチン	8.34	99	92	95
MMW+HMW アディポネクチン	6.60	92	91	92
HMW アディポネクチン	4.41	97	100	98

### ・凍結保存安定性

ヒト血清を-30°Cに保存し、経時的にキットで測定した時、少なくとも1年は安定でした。

測定結果例	コントロール血清 (μg/ml)	回収率 (%)			
		1.5ヶ月	4ヶ月	8ヶ月	13ヶ月
総アディポネクチン	7.75	105	102	96	95
MMW + HMW アディポネクチン	5.65	95	93	87	89
HMW アディポネクチン	3.63	97	97	88	95

### ・前処理済検体の安定性

ヒト血清(n=4)及び血漿(n=4)を、前処理方法①で処理した後4°C及び25°Cに保存し、キットで測定した時、少なくとも2日間は安定でした。(注意:前処理後の検体を低温で保存した場合は、標準品同様、SDSの沈殿が析出しますので、一度室温に戻して沈殿を溶解してから、サンプリングして下さい。)

測定結果例

検体 (n = 8)	平均値(μg/ml)	回収率 (%)			
		4°C, 1day	4°C, 2day	25°C, 1day	25°C, 2day
総アディポネクチン	7.19	95	93	98	100

### ・前処理済検体の希釈液による希釈後の安定性

前処理方法①で処理したヒト血清(n=4)及び血漿(n=4)を、さらに希釈液で希釈した後(5151倍希釈液)、室温にて放置による経時変化を測定した時、少なくとも2時間は安定でした。(注意:前処理後の希釈液による希釈後の検体は、経時的に測定値が低下傾向を示しますので、長時間の放置は避けてください。)

測定結果例

検体 (n = 8)	平均値(μg/ml)	回収率 (%)			
		0.5hr	1hr	2hr	4hr
総アディポネクチン	7.82	97	95	96	92

## 7. プロテアーゼ消化時間の影響

ヒト血清(n=8)を、37°Cにおいてプロテアーゼ液(Ⅰ)及び(Ⅱ)による消化時間を0~60分間で変化させ処理した後、キットを用いて測定した時、設定消化時間の20分間に対して、15~25分間による消化時間の変動では、測定値に有意差を認めませんでした。

測定結果例

		検体 (n=8)	0 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min	60 min
プロテアーゼ(Ⅰ) 処理	平均値 (µg/ml)	10.18	6.63	6.31	6.16	6.09	5.91	5.43	
	SD	1.5	1.0	1.0	0.8	0.9	0.9	0.7	
プロテアーゼ(Ⅱ) 処理	平均値 (µg/ml)	10.18	4.41	4.17	4.08	3.97	3.85	3.48	
	SD	1.5	0.8	0.7	0.7	0.6	0.6	0.7	

## 8. プロテアーゼ消化温度の影響

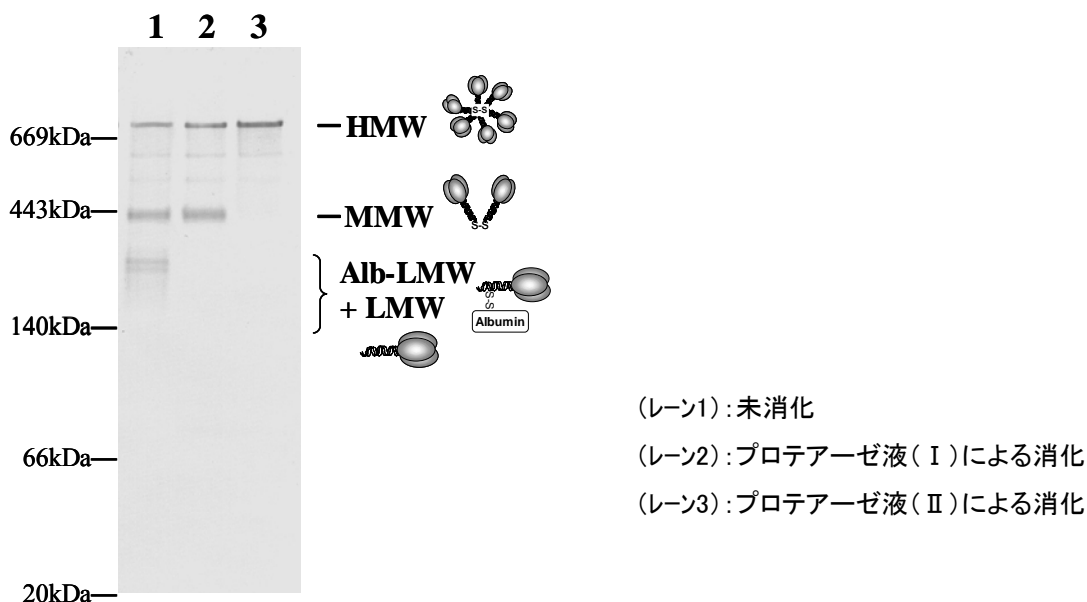
ヒト血清(n=4)及び血漿(n=4)を、プロテアーゼ液(Ⅰ)及び(Ⅱ)による消化時間を20分間で処理する温度を、33~41°Cの間で変化させ処理した後、キットを用いて測定した時、設定消化温度の37°Cに対して、プロテアーゼ液(Ⅰ)では消化温度変化の影響を若干受けました。又、プロテアーゼ液(Ⅱ)では、消化温度の影響をほとんど受けませんでした。

測定結果例

		検体 (n=8)	33°C	35°C	37°C	39°C	41°C
プロテアーゼ(Ⅰ) 処理	平均値 (µg/ml)	6.17	6.13	5.92	5.77	5.48	
	SD	0.74	0.68	0.64	0.70	0.56	
プロテアーゼ(Ⅱ) 処理	平均値 (µg/ml)	4.01	4.01	3.96	3.93	3.92	
	SD	0.39	0.37	0.35	0.31	0.44	

## 9. プロテアーゼの消化選択性

ヒト血清を、未消化及びプロテアーゼ液(Ⅰ)又は(Ⅱ)により消化処理後、native-PAGEにて分離しウェスタンブロットにて解析した時、ヒト多量体Adは分子量の大きい順に分離され、プロテアーゼ液(Ⅰ)処理では、LMW-Adのバンドが消化によって消失し、プロテアーゼ液(Ⅱ)処理では、LMW及びMMW-Adのバンドが消化によって消失されることが観察されました<sup>9)</sup>。



Ebinuma H, et al. *Clinica Chimica Acta* 2006, 372.

## 10. 交差反応

・ヒト以外のアディポネクチンへの反応性は、各種動物の血清(マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ、サル)を用いて確認した時、サルの血清以外には反応は認めませんでした。

・他のヒト由来アディポサイトカイン(レジスチン、レプチン、THF- $\alpha$  及びIL-6)を測定した時、100ng/mLでは反応は認めませんでした。

## 11. 市販Ad測定試薬(ELISA)との相関性

36名のボランティア血清(M/F = 18/18)血清を用いて、キットの総Ad濃度測定と5種類の市販総Ad測定ELISAキットとの相関性を比較した時、キットによって算出された濃度に違いは認められましたが、相関係数は、 $r=0.98$ 以上と高い相関性が認められました。

X	Y	第一化学 総アディポネクチン ELISA
市販ELISA キット ①		$y = 0.663x - 0.894$ ( $r = 0.992$ )
” ②		$y = 0.547x + 0.412$ ( $r = 0.991$ )
” ③		$y = 0.889x + 0.479$ ( $r = 0.994$ )
” ④		$y = 1.031x + 0.688$ ( $r = 0.980$ )
” ⑤		$y = 0.453x + 1.436$ ( $r = 0.994$ )

## 12. 健常者におけるヒト多量体Adの測定例

48名のボランティア血清(M/F = 27/21)血清を、キットを用いて分別測定した時、総Ad、HMW-Ad濃度及びHMW-Ad/総Ad比(HMWR)で性差が認められ、女性が高い傾向でした<sup>9)</sup>。

男性 (n = 27)

	Total-Ad	HMW-Ad	MMW-Ad	LMW-Ad
平均値( $\mu\text{g/mL}$ )	4.30	1.62	1.15	1.54
SD	1.76	1.02	0.38	0.50
	HMWR	MMWR	LMWR	
平均値(%)	34.5	27.9	37.6	
SD	11.1	5.41	7.78	

女性 (n = 21)

	Total-Ad	HMW-Ad	MMW-Ad	LMW-Ad
平均値( $\mu\text{g/mL}$ )	6.62	3.24	1.70	1.68
SD	3.04	2.13	0.68	0.46
	HMWR	MMWR	LMWR	
平均値(%)	44.5	26.7	28.8	
SD	12.3	4.47	10.3	

Ebinuma H, et al. *Clinica Chimica Acta* 2006, 372.

## 【参考文献】

- 1) Waki H, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003; 278: 40352-40363.
- 2) Pajvani UB, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003; 278: 9073-9085.
- 3) Tsao TS, et al. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2003; 278: 50810-50817.
- 4) Pajvani UB, et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; 279: 12152-12162.
- 5) Tonelli J, et al. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 1621-1629.
- 6) Kobayashi H, et al. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 2004; 94: e27-31.
- 7) Hara K, et al. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2006;29: 1357-62.
- 8) Hada Y, et al. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356: 487-93.
- 9) Ebinuma H, et al. A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clinica Chimica Acta* 2006; 372: 47-53.
- 10) Kubota N, Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab*. 2007; 6: 55-68.
- 11) Ebinuma H, et al. Improved ELISA for selective measurement of adiponectin multimers and identification of adiponectin in human cerebrospinal fluid. *Clin Chem*. 2007; 53: 1541-4.