

## Cotinine測定試薬

注：この使用説明書をよく読んでから使用して下さい。

## 【はじめに】

たばこ煙中の成分であるニコチンは、口腔・気道・胃・腸管などの粘膜でも吸収されますが、肺胞においてその吸収量は最大であり、吸収されたニコチンは血液を介して体内に分布します。

タバコ煙中の成分であるニコチンはその半減期が短く、生体内では主代謝産物であるコチニンに速やかに代謝され尿中に排泄されます。一方、コチニンの半減期は20時間と長く、血液、尿及び唾液などに存在します。このため近年、コチニンを喫煙マーカーとして利用した測定系が構築されています。

この度弊社では、唾液を試料に用いたELISA法によるコチニン測定用試薬を開発しました。

## 【特徴】

- 1) ニコチンとの交差反応性はほとんどありません。
- 2) 最小検出感度は0.75 ng/mLであり、高感度です。
- 3) 測定範囲が広く、0.75～200 ng/mLの定量が可能です。
- 4) 唾液を試料としているため、非侵襲的に試料を採取できます。

## 【試薬構成】

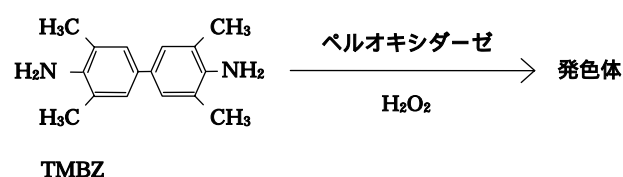
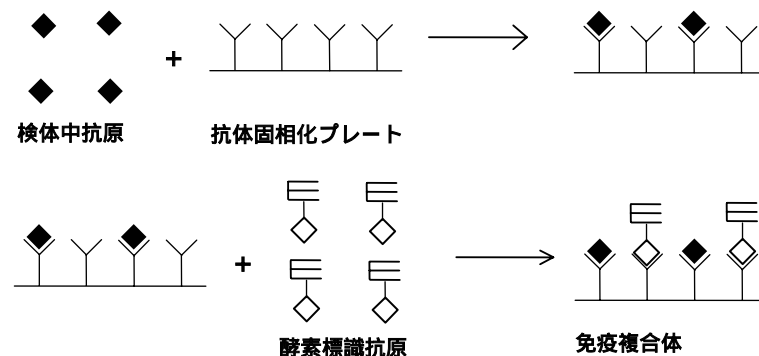
- 1) 抗体固相化プレート  
ウサギポリクローナル抗コチニン抗体
- 2) 酵素標識抗原液  
ペルオキシダーゼ結合コチニン
- 3) 標準溶液：コチニン  
標準溶液1 (0 ng/mL)  
標準溶液2 (1 ng/mL)  
標準溶液3 (2.5 ng/mL)  
標準溶液4 (5 ng/mL)  
標準溶液5 (10 ng/mL)  
標準溶液6 (25 ng/mL)  
標準溶液7 (50 ng/mL)  
標準溶液8 (100 ng/mL)  
標準溶液9 (200 ng/mL)
- 4) 発色液  
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、尿素過酸化水素
- 5) 洗浄原液
- 6) 反応停止液  
0.5 mol/L-硫酸

## 【測定原理】

本キットによる唾液中コチニンの測定は、固相競合法に基づいています。

つまり、マイクロプレートに固定されているウサギ抗コチニン抗体に対し、検体中の抗原（コチニン）を反応させ、さらにペルオキシダーゼ結合コチニンを反応させます。

固相に結合する酵素の量は、測定すべき抗原の量に反比例しますので、尿素過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMBZ) を基質として用い、遊離するTMBZ酸化物を比色定量して、その酵素活性を測定することにより、唾液中のコチニン濃度を測定することができます。



製造販売元



株式会社 カイノス

〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18 ☎03(3816)4485

【試薬調製法】

- ・抗体固相化プレート  
そのまま使用してください。
- ・酵素標識抗体液  
そのまま使用してください。
- ・標準溶液  
そのまま使用してください。
- ・発色液  
そのまま使用してください。
- ・洗浄液  
洗浄原液を精製水を用いて5倍希釈してください。
- ・反応停止液  
そのまま使用してください。

【操作方法】

1. 測定操作法

- 1) 検体又は各標準溶液2~9を標準溶液1で21倍希釈します。(例: 検体又は各標準溶液2~9 10 µL、標準溶液1 200 µL)
- 2) 抗体固相化マイクロプレートの各ウェルに各標準溶液及び検体をそれぞれ50 µLずつ分注します。  
注意: 唾液採取器の操作法に従って唾液を採取し、抽出して下さい。
- 3) 各ウェルに酵素標識抗体液を50 µLずつ分注します。
- 4) 攪拌後、室温で1時間静置します。
- 5) 反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を300 µL分注し液を除去します。この操作を3回行った後、ペーパータオル上で叩くなどして水滴を完全に除きます。
- 6) 発色液を各ウェルに100 µLずつ分注します。分注後、室温で30分遮光して静置します。
- 7) 反応停止液を各ウェルに100 µLずつ分注し、混和します。
- 8) 波長450 nmで吸光度を測定します。

2. Cotinine濃度算出方法

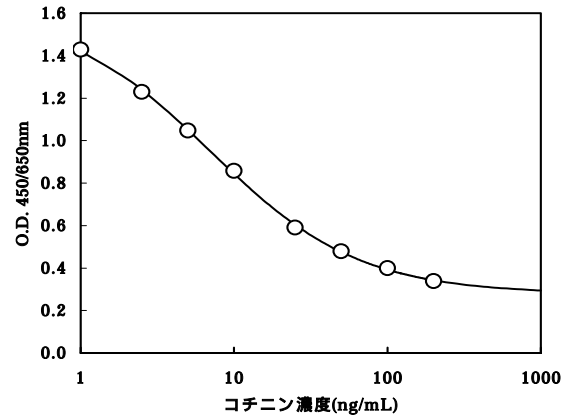
標準溶液1~9の吸光度を4-Parameter logisticsで検量線を作成し、それを基に検体の吸光度から検体中のCotinine濃度を読み取ってください。  
測定結果が200 ng/mLを超える場合は標準溶液1で検体を希釈し、再測定してください。

【操作上又は取扱い上の注意】

1. 本試薬による測定には、唾液を使用してください。
2. 唾液採取時には血液の混入を避けてください。
3. 検体はなるべく新鮮な唾液を使用してください。やむを得ない場合は、凍結して保存し、凍結融解の繰り返しは避けてください。
4. ヒト唾液の取り扱い  
唾液からの感染についての安全性が確認されていないので、感染の危険性のあるものとして取り扱いには充分注意してください。また、検体に接触した器具等は検体と同様、感染の危険性のあるものとして取り扱ってください。
5. 試薬が誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。反応停止液には、0.5 mol/L-硫酸を、発色液には尿素過酸化水素を使用していますので、特に取り扱いには注意してください。
6. 添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用方法及び使用目的外での使用につきましては測定値の信頼性を保証できません。
7. 各試薬は、すべて2~10 で遮光保存してください。
8. 開封後の試薬はなるべく早く使用し、保存する場合には、蓋を開けて2~10 で遮光保存してください。
9. 貯蔵方法に示した以外の保管条件では、有効期限内であっても十分に性能を維持できない場合があります。特に誤って凍結させた試薬は使用しないでください。
10. ラベル記載の有効期間内に使用してください。
11. ロットの異なる試薬を混合して使用しないでください。
12. 検量線は測定毎に作成してください。
13. 多検体を測定する場合は、各反応時間を定められた時間に統一するよう注意してください。
14. 使用後の容器は焼却処理するか、廃棄する場合には実施設の廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物または産業廃棄物等の区別をして処理してください。
15. 本キット中の標準溶液、希釈液、酵素標識抗体液及び洗浄原液はケーンソンCGを防腐剤として含有しております。廃棄する場合には大量の水と共に流してください。
16. 本試薬は研究用にもみ使用してください。

【性能】

1. 検量線



2. 再現性

同一検体を8回同時に測定するとき、測定値のCV値は10.0%以下です。

3. 測定範囲

測定範囲は、0.75~200 ng/mLまであります。

4. 交差反応性

ニコチンとの交差反応性は0.6%、ニコチンアミド、ニコチン酸の交差反応性は0%でした。

【貯法・有効期間】

貯法: 2~10 遮光保存  
有効期間: 製造後1年間

【包装単位】

管理コード	構成試薬	包装
PT-1000	抗体固相化プレート	96ウェル×5
	酵素標識抗原液	15 mL×2
	標準溶液 1	25 mL×5
	標準溶液 2	1.0 mL×1
	標準溶液 3	1.0 mL×1
	標準溶液 4	1.0 mL×1
	標準溶液 5	1.0 mL×1
	標準溶液 6	1.0 mL×1
	標準溶液 7	1.0 mL×1
	標準溶液 8	1.0 mL×1
	標準溶液 9	1.0 mL×1
	発色液	30 mL×2
	反応停止液	30 mL×2
PT-1200	Cotinine用 洗浄原液	1 L×1

【主要文献及び文献請求先】

1. 主要文献  
1) Neal L. Benowitz : Epidemiol. Rev., Vol. 18, No.2 : 188-204 (1996)
2. 文献請求先  
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18 ☎ 03(3816)4480  
株式会社カイノス 学術部