

報告書（個別報告③）

ヒト乳歯歯髄由来幹細胞培養上清液の ELISA 測定試験

試験番号：MG-251110-21

2025年12月25日作成

ユニテック株式会社

UNITECH

Genomics & Proteomics & Antibody

目次

I.	試験概要	3
1.	試験名	3
2.	試験番号	3
3.	試験委託者	3
4.	試験目的	3
5.	試験実施施設	3
6.	試験実施日程	3
II.	材料と方法	4
1.	試験材料	4
1-1	検体	4
1-2	ELISA	4
1-3	使用機器	4
1-4	解析ソフト	4
2.	試験方法	4
2-1	キットの準備	4
2-2	検体の希釈	4
2-3	ELISA 測定 (VEGF)	5
2-4	ELISA 測定 (TGF beta 1)	6
2-5	ELISA 測定 (EGF)	7
2-6	ELISA 測定 (HGF)	8
2-7	ELISA 測定 (FGF2)	9
2-8	解析	10
III.	結果	11
1.	VEGF	11
1-1	解析結果	11
2.	TGF beta 1	13
2-1	解析結果	13
3.	EGF	14
3-1	解析結果	14
4.	HGF	16
4-1	解析結果	16
5.	FGF2	17
5-1	解析結果	17
IV.	結果まとめ	19
1.	データまとめ	19

I. 試験概要

1. 試験名

ヒト乳歯歯髄由来幹細胞培養上清液の ELISA 測定試験

2. 試験番号

MG-251110-21

3. 試験委託者

一般社団法人輝実会 青山レナセルクリニック
代表理事 土屋太郎 様

4. 試験目的

ヒト乳歯歯髄由来幹細胞培養上清液の ELISA 測定試験を行う。

5. 試験実施施設

〒369-1802 埼玉県秩父市荒川上田野 1646
ユニテック株式会社 荒川研究所

6. 試験実施日程

ELISA キット受け取り	2025 年 11 月 6 日
検体受け取り	2025 年 11 月 10 日
ELISA 開始 (1 回目測定)	2025 年 11 月 19 日
ELISA 終了 (1 回目測定)	2025 年 11 月 20 日
速報値提出	2025 年 11 月 21 日
ELISA 開始 (追加・再測定分)	2025 年 12 月 4 日
ELISA 終了 (追加・再測定分)	2025 年 12 月 5 日
速報値提出	2025 年 12 月 5 日
ELISA (再測定 2 回目分)	2025 年 12 月 13 日
速報値提出	2025 年 12 月 15 日
報告書案提出	2025 年 12 月 22 日
報告書提出	2025 年 12 月 25 日

II. 材料と方法

1. 試験材料

1-1 検体

1-1-1 検体

サンプル番号	サンプル名
4-1	ARC-YS/P3-20250802
C1	ベース培地 (AOF)

1-2 ELISA

1-2-1 各種血清中抗体

1. VEGF
2. TGF beta 1
3. EGF
4. HGF
5. FGF2

1-2-2 測定キット

1. Human VEGF Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00216)
2. Human TGF-beta1 Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00002)
3. Human EGF Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00138)
4. Human HGF Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00168)
5. Human FGF2 Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00129)

1-3 使用機器

1-3-1 マイクロプレートリーダー

- ImmunoMini NJ-2300

1-4 解析ソフト

- VMax 付属ソフト SoftMax (Molecular Devices)

2. 試験方法

2-1 キットの準備

- 1) 各キット、試薬は室温に戻してから使用した。

2-2 検体の希釈

- 1) 検体はキットの必要サンプル量に応じて分取、希釈した。
- 2) 検体の希釈 (VEGF, EGF, HGF, FGF2 : 1 回目測定、TGF beta 1 : 再測定 2 回目)
 1. VEGF : 検体 55 μ L + Sample Diluent PT 4B1 55 μ L (2 倍希釈)
 2. TGF beta 1 : 検体 20 μ L + Sample Diluent PT 1-ec 80 μ L + 1 N HCl 20 μ L + 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES 20 μ L (7 倍希釈)
 3. EGF : 検体 55 μ L + Sample Diluent PT 1-ef 55 μ L (2 倍希釈)
 4. HGF : 検体 105 μ L (未希釈)

5. FGF2：検体 105 μ L (未希釈)

2-3 ELISA 測定 (VEGF)

2-3-1 スタンダードの調製 (VEGF)

- 1) キット付属の Protein standard (4000 pg/bottle) へ Sample Diluent PT 4B1 を 2 mL 添加して 2000 pg/mL のスタンダードを調製し、STD7 とした。
- 2) 以降は Sample Diluent PT 4B1 で 2 倍希釈を行い STD 6~1 とした。
- 3) blk は blank (Sample Diluent PT 4B1) とした。
- 4) 希釈量はキットプロトコールに従って行った。
- 5) 各キットのスタンダードの終濃度は以下の通りとした。

	濃度 (pg/mL)
blk	0
STD 7	2000
STD 6	1000
STD 5	500
STD 4	250
STD 3	125
STD 2	62.5
STD 1	31.25

2-3-2 アッセイ試薬の調製

- 1) 抗体：必要量の Detection Antibody 及び HRP-conjugated antibody を Detection Diluent で以下の割合で希釈した。
 - ・ Detection Antibody：100 倍希釈
 - ・ HRP-conjugated antibody：100 倍希釈
- 2) 洗浄液：必要量の Wash Buffer Concentrate (20 \times)を ELIX 水で 20 倍希釈した。

2-3-3 ELISA 測定 (VEGF 測定)

- 1) 必要量のストリップを準備した。
- 2) 2-2 及び 2-3-1 で調製した希釈済サンプル及びスタンダード 100 μ L を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 3) 37 $^{\circ}$ C で 2 時間静置した。
- 4) 反応終了後、シールを剥がしデカントで内容液を廃棄した。廃棄後はペーパータオルへプレートを叩きつける様に当て余分な洗浄液を除いた。
- 5) 350 μ L/well \times 4 回洗浄液で洗浄した。洗浄後はペーパータオルへ強く叩きつける様に 10 回ほど当てて余分な洗浄液を除いた。
- 6) 希釈した Detection Antibody 100 μ L を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 7) 37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置した。
- 8) 4)~5)と同様にして洗浄を行った。
- 9) 希釈した HRP-conjugated antibody 100 μ L を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。

- 10) 37°C で 40 分間静置した。
- 11) 4)~5)と同様にして洗浄を行った。
- 12) TMB 溶液 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 13) 37°C で 15 分間静置した。
- 14) 15 分経過後、Stop Solution 100 μL を各 well へ加え反応を停止させた。
- 15) 攪拌後 450 nm の波長で吸光度を測定した。

2-4 ELISA 測定 (TGF beta 1)

2-4-1 スタンダードの調製 (TGF beta 1)

- 1) キット付属の Protein standard (2000 ng/bottle) へ Sample Diluent PT 1-ec を 2 mL 添加して 1000 pg/mL のスタンダードを調製し、STD7 とした。
- 2) 以降は Sample Diluent PT 1-ec で 2 倍希釈を行い STD 6~1 とした。
- 3) blk は blank (Sample Diluent PT 1-ec) とした。
- 4) 希釈量はキットプロトコールに従って行った。
- 5) 各キットのスタンダードの終濃度は以下の通りとした。

	濃度 (pg/mL)
blk	0
STD 7	1000
STD 6	500
STD 5	250
STD 4	125
STD 3	62.5
STD 2	31.25
STD 1	15.625

2-4-2 アッセイ試薬の調製

- 1) 抗体：必要量の Detection Antibody 及び Streptavidin-HRP を Detection Diluent で以下の割合で希釈した。
 - ・ Detection Antibody：100 倍希釈
 - ・ Streptavidin-HRP：100 倍希釈
- 2) 洗浄液：必要量の Wash Buffer Concentrate (20×)を ELIX 水で 20 倍希釈した。

2-4-3 ELISA 測定 (TGF beta 1 測定)

- 1) 必要量のストリップを準備した。
- 2) 2-2 及び 2-4-1 で調製した希釈済サンプル及びスタンダード 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 3) 37°C で 2 時間静置した。
- 4) 反応終了後、シールを剥がしデカントで内容液を廃棄した。廃棄後はペーパータオルへプレートを叩きつける様に当て余分な洗浄液を除いた。
- 5) 350 μL/well×4 回洗浄液で洗浄した。洗浄後はペーパータオルへ強く叩きつける様に 10 回ほど当てて余分な洗浄液を除いた。

- 6) 希釈した Detection Antibody 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 7) 37°C で 1 時間静置した。
- 8) 4)~5)と同様にして洗浄を行った。
- 9) 希釈した Streptavidin-HRP 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 10) 37°C で 40 分間静置した。
- 11) 4)~5)と同様にして洗浄を行った。
- 12) TMB 溶液 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 13) 37°C で 15 分間静置した。
- 14) 15 分経過後、Stop Solution 100 μL を各 well へ加え反応を停止させた。
- 15) 攪拌後 450 nm の波長で吸光度を測定した。

2-5 ELISA 測定 (EGF)

2-5-1 スタンダードの調製 (EGF)

- 1) キット付属の Protein standard (16000 pg/bottle) へ Sample Diluent PT 1-ef を 2 mL 添加して 8000 pg/mL のスタンダードを調製し、STD7 とした。
- 2) 以降は Sample Diluent PT 1-ef で 2 倍希釈を行い STD 6~1 とした。
- 3) blk は blank (Sample Diluent PT 1-ef) とした。
- 4) 希釈量はキットプロトコールに従って行った。
- 5) 各キットのスタンダードの終濃度は以下の通りとした。

	濃度 (pg/mL)
blk	0
STD 7	8000
STD 6	4000
STD 5	2000
STD 4	1000
STD 3	500
STD 2	250
STD 1	125

2-5-2 アッセイ試薬の調製

- 1) 抗体：必要量の Detection Antibody 及び HRP-conjugated antibody を Detection Diluent で以下の割合で希釈した。
 - ・ Detection Antibody：100 倍希釈
 - ・ HRP-conjugated antibody：100 倍希釈
- 2) 洗浄液：必要量の Wash Buffer Concentrate (20 \times)を ELIX 水で 20 倍希釈した。

2-5-3 ELISA 測定 (EGF 測定)

- 1) 必要量のストリップを準備した。
- 2) 2-2 及び 2-5-1 で調製した希釈済サンプル及びスタンダード 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 3) 37°C で 2 時間静置した。

- 4) 反応終了後、シールを剥がしデカントで内容液を廃棄した。廃棄後はペーパータオルへプレートを叩きつける様に当て余分な洗浄液を除いた。
- 5) 350 $\mu\text{L}/\text{well} \times 4$ 回洗浄液で洗浄した。洗浄後はペーパータオルへ強く叩きつける様に 10 回ほど当てて余分な洗浄液を除いた。
- 6) 希釈した Detection Antibody 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 7) 37°C で 1 時間静置した。
- 8) 4)~5)と同様にして洗浄を行った。
- 9) 希釈した HRP-conjugated antibody 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 10) 37°C で 40 分間静置した。
- 11) 4)~5)と同様にして洗浄を行った。
- 12) TMB 溶液 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 13) 37°C で 15 分間静置した。
- 14) 15 分経過後、Stop Solution 100 μL を各 well へ加え反応を停止させた。
- 15) 攪拌後 450 nm の波長で吸光度を測定した。

2-6 ELISA 測定 (HGF)

2-6-1 スタンドアードの調製 (HGF)

- 1) キット付属の Protein standard (40 ng/bottle) へ Sample Diluent PT 1-ec を 2 mL 添加して 20 ng/mL のスタンダードを調製し、STD7 とした。
- 2) 以降は Sample Diluent PT 1-ec で 2 倍希釈を行い STD 6~1 とした。
- 3) blk は blank (Sample Diluent PT 1-ec) とした。
- 4) 希釈量はキットプロトコールに従って行った。
- 5) 各キットのスタンダードの終濃度は以下の通りとした。

	濃度 (ng/mL)
blk	0
STD 7	20
STD 6	10
STD 5	5
STD 4	2.5
STD 3	1.25
STD 2	0.625
STD 1	0.3125

2-6-2 アッセイ試薬の調製

- 1) 抗体 : 必要量の Detection Antibody, HRP-conjugated を Detection Diluent で以下の割合で希釈した。
 - ・ Detection Antibody, HRP-conjugated : 100 倍希釈
- 2) 洗浄液 : 必要量の Wash Buffer Concentrate (20 \times)を ELIX 水で 20 倍希釈した。

2-6-3 ELISA 測定 (HGF 測定)

- 1) 必要量のストリップを準備した。
- 2) 2-2 及び 2-6-1 で調製した希釈済サンプル及びスタンダード 100 μ L を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 3) 37°C で 2 時間静置した。
- 4) 反応終了後、シールを剥がしデカントで内容液を廃棄した。廃棄後はペーパータオルへプレートを叩きつける様に当て余分な洗浄液を除いた。
- 5) 350 μ L/well \times 4 回洗浄液で洗浄した。洗浄後はペーパータオルへ強く叩きつける様に 10 回ほど当てて余分な洗浄液を除いた。
- 6) 希釈した Detection Antibody, HRP-conjugated 100 μ L を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 7) 37°C で 40 分間静置した。
- 8) 4)~5)と同様にして洗浄を行った。
- 9) TMB 溶液 100 μ L を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 10) 37°C で 15 分間静置した。
- 11) 15 分経過後、Stop Solution 100 μ L を各 well へ加え反応を停止させた。
- 12) 攪拌後 450 nm の波長で吸光度を測定した。

2-7 ELISA 測定 (FGF2)

2-7-1 スタンダードの調製 (FGF2)

- 1) キット付属の Protein standard (2000 pg/bottle) へ Sample Diluent PT 1ef を 2 mL 添加して 1000 pg/mL のスタンダードを調製し、STD6 とした。
- 2) 以降は Sample Diluent PT 1ef で 2 倍希釈を行い STD 5~1 とした。
- 3) blk は blank (Sample Diluent PT 1ef) とした。
- 4) 希釈量はキットプロトコールに従って行った。
- 5) 各キットのスタンダードの終濃度は以下の通りとした。

	濃度 (pg/mL)
blk	0
STD 6	1000
STD 5	500
STD 4	250
STD 3	125
STD 2	62.5
STD 1	31.25

2-7-2 アッセイ試薬の調製

- 1) 抗体 : 必要量の Detection Antibody 及び Streptavidin-HRP を Detection Diluent で以下の割合で希釈した。
 - Detection Antibody : 100 倍希釈
 - Streptavidin-HRP : 100 倍希釈

- 2) 洗浄液：必要量の Wash Buffer Concentrate (20×)を ELIX 水で 20 倍希釈した。

2-7-3 ELISA 測定 (FGF2 測定)

- 1) 必要量のストリップを準備した。
- 2) 2-2 及び 2-7-1 で調製した希釈済サンプル及びスタンダード 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 3) 37°C で 2 時間静置した。
- 4) 反応終了後、シールを剥がしデカントで内容液を廃棄した。廃棄後はペーパータオルへプレートを叩きつける様に当て余分な洗浄液を除いた。
- 5) 350 $\mu\text{L}/\text{well} \times 4$ 回洗浄液で洗浄した。洗浄後はペーパータオルへ強く叩きつける様に 10 回ほど当てて余分な洗浄液を除いた。
- 6) 希釈した Detection Antibody 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 7) 37°C で 1 時間静置した。
- 8) 4)~5)と同様にして洗浄を行った。
- 9) 希釈した Streptavidin-HRP 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 10) 37°C で 40 分間静置した。
- 11) 4)~5)と同様にして洗浄を行った。
- 12) TMB 溶液 100 μL を各 well へ加えプレートシールで蓋をした。
- 13) 37°C で 15 分間静置した。
- 14) 15 分経過後、Stop Solution 100 μL を各 well へ加え反応を停止させた。
- 15) 攪拌後 450 nm の波長で吸光度を測定した。

2-8 解析

- 1) 各 Blank、スタンダード、サンプルのデュプリケイトの数値の平均値を出した。
- 2) 各数値の平均値から Blank を引いた。
- 3) スタンダードから適切な検量線を作成した。
- 4) 測定サンプルの数値 (2)) を検量線の数式に代入し濃度を算出した。
- 5) 測定濃度は希釈したサンプルの濃度とした。
- 6) 元濃度は測定濃度から希釈率を戻した濃度とした。

III. 結果

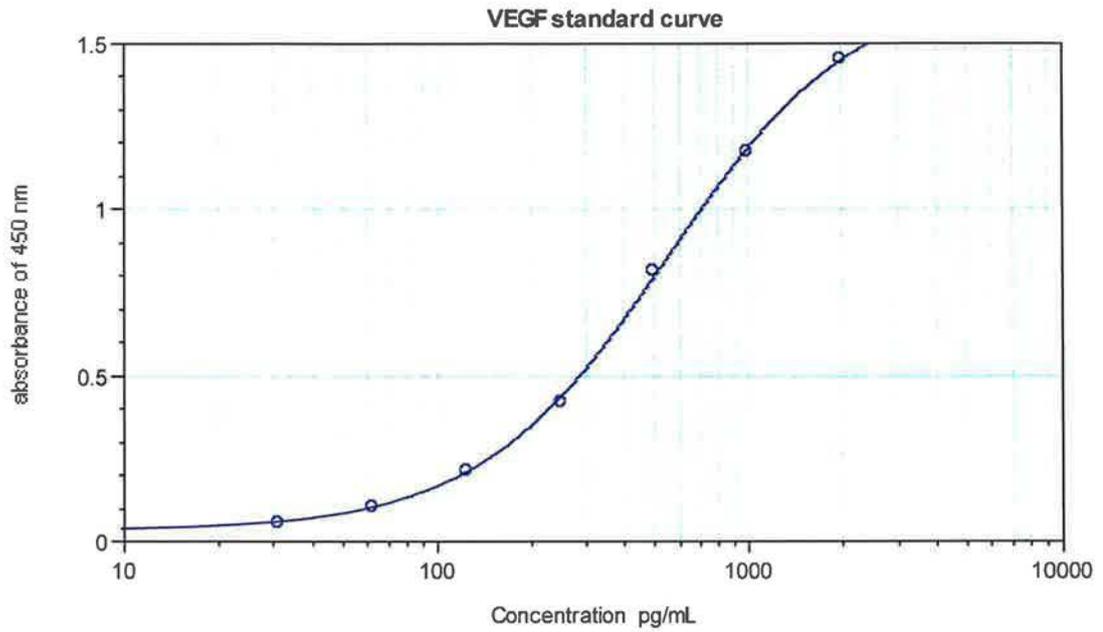
1. VEGF

1-1 解析結果

1-1-1 スタンダード解析

スタンダード	濃度 pg/mL	Wells	測定値	平均値
STD 1	2000	H1	1.457	1.452
		H2	1.446	
STD 2	1000	G1	1.182	1.171
		G2	1.16	
STD 3	500	F1	0.792	0.813
		F2	0.834	
STD 4	250	E1	0.442	0.42
		E2	0.398	
STD 5	125	D1	0.213	0.213
		D2	0.212	
STD 6	62.5	C1	0.106	0.104
		C2	0.102	
STD 7	31.25	B1	0.053	0.057
		B2	0.06	

スタンダードカーブ



$y = ((A - D) / (1 + (x/C)^B)) + D$

	A	B	C	D	R ²
Std (Standards: Concentration vs MeanValue)	0.031	1.43	548.071	1.67	1

1-1-2 サンプル解析結果

元濃度はサンプルの希釈倍率 (2 倍希釈) を戻した値 (pg/mL)

サンプル番号	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度	元濃度
4-1	E5	1.355	1496.083	1474.087	2948.174
	E6	1.344	1452.09		
C1	H7	-0.001	Range?	Range?	検出限界値 以下
	H8	-0.002	Range?		

Range?・・・スタンダード下限値 (31.25 pg/mL) 以下

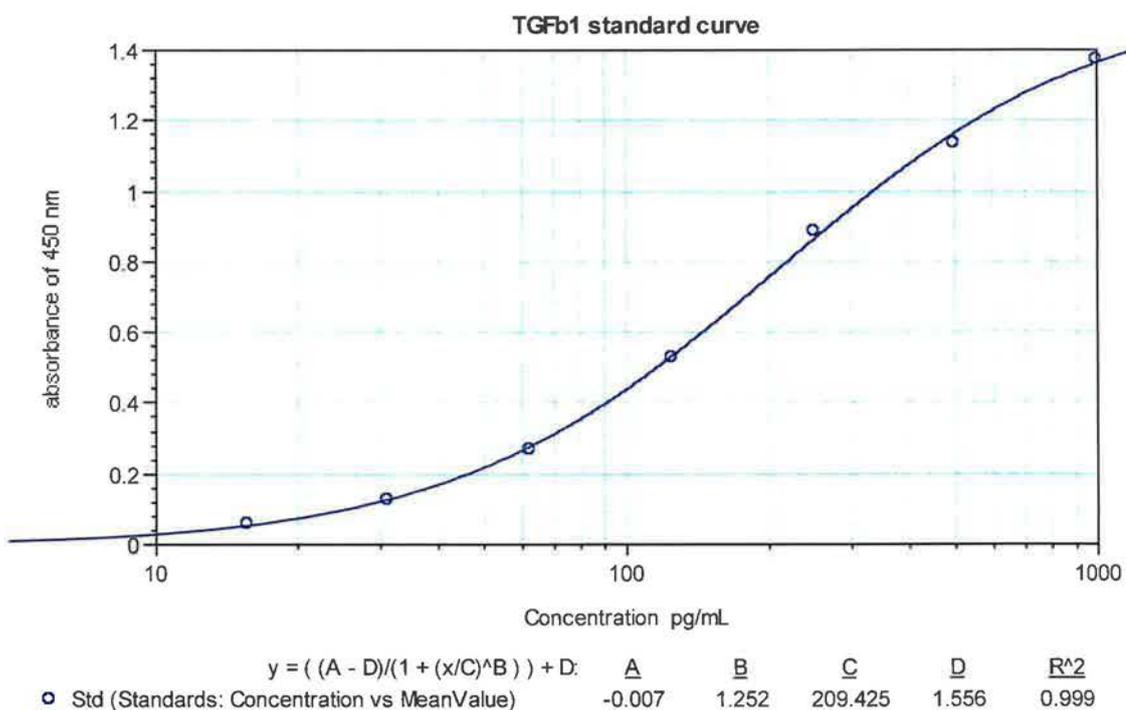
2. TGF beta 1

2-1 解析結果

2-1-1 スタンダード解析

スタンダード	濃度 pg/mL	Wells	測定値	平均値
STD1	1000	H1	1.429	1.424
		H2	1.419	
STD2	500	G1	1.159	1.154
		G2	1.149	
STD3	250	F1	0.889	0.885
		F2	0.88	
STD4	125	E1	0.537	0.533
		E2	0.529	
STD5	62.5	D1	0.283	0.285
		D2	0.287	
STD6	31.25	C1	0.136	0.136
		C2	0.136	
STD7	15.625	B1	0.07	0.072
		B2	0.073	

スタンダードカーブ



2-1-2 サンプル解析結果 (濃度 pg/mL)

元濃度はサンプルの希釈倍率 (7 倍希釈) を戻した値 (pg/mL)

サンプル番号	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度	元濃度
4-1	E5	1.089	414.494	419.647	2937.529
	E6	1.099	424.801		
C1	H7	0.17	40.56	38.709	270.963
	H8	0.152	36.857		

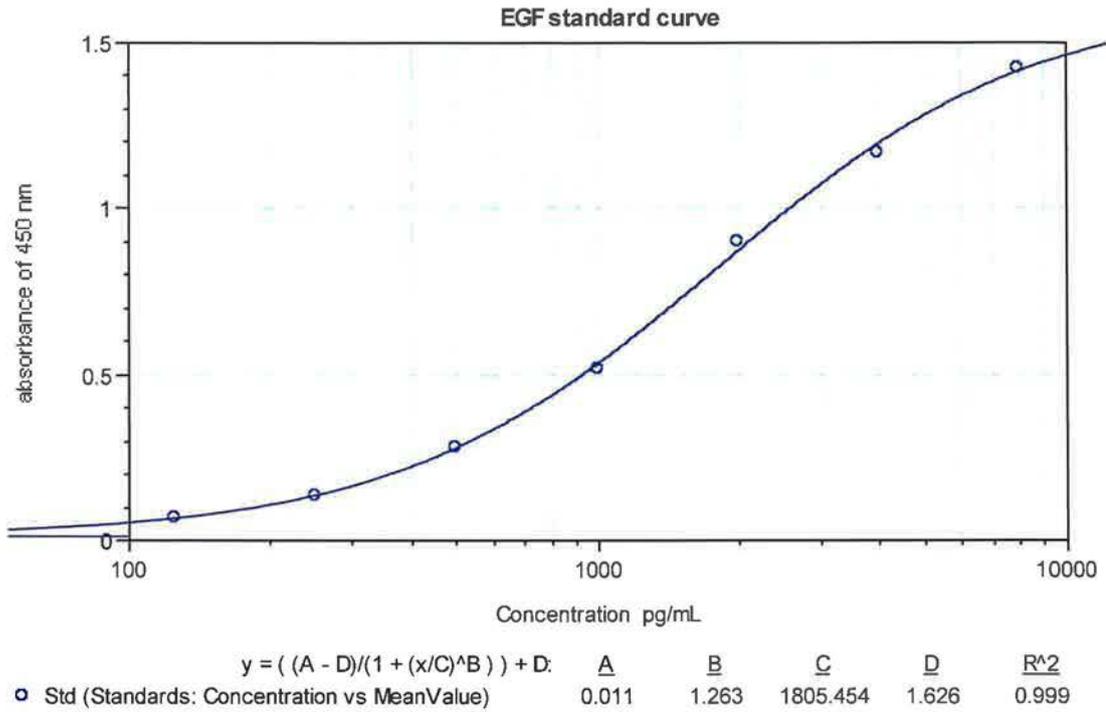
3. EGF

3-1 解析結果

3-1-1 スタンダード解析

スタンダード	濃度 pg/mL	Wells	測定値	平均値
STD1	8000	H1	1.423	1.422
		H2	1.421	
STD2	4000	G1	1.174	1.168
		G2	1.161	
STD3	2000	F1	0.91	0.9
		F2	0.889	
STD4	1000	E1	0.527	0.515
		E2	0.502	
STD5	500	D1	0.28	0.278
		D2	0.276	
STD6	250	C1	0.136	0.135
		C2	0.134	
STD7	125	B1	0.068	0.066
		B2	0.063	

スタンダードカーブ



3-1-2 サンプル解析結果

元濃度はサンプルの希釈倍率 (2 倍希釈もしくは 5 倍希釈) を戻した値 (pg/mL)

サンプル番号	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度	元濃度
4-1	E5	0.313	564.204	575.16	1150.32
	E6	0.325	586.115		
C1	A3	1.361	6201.401	5634.728	28173.64 ※
	B3	1.301	5068.055		

※ 5 倍希釈にて検査を実施

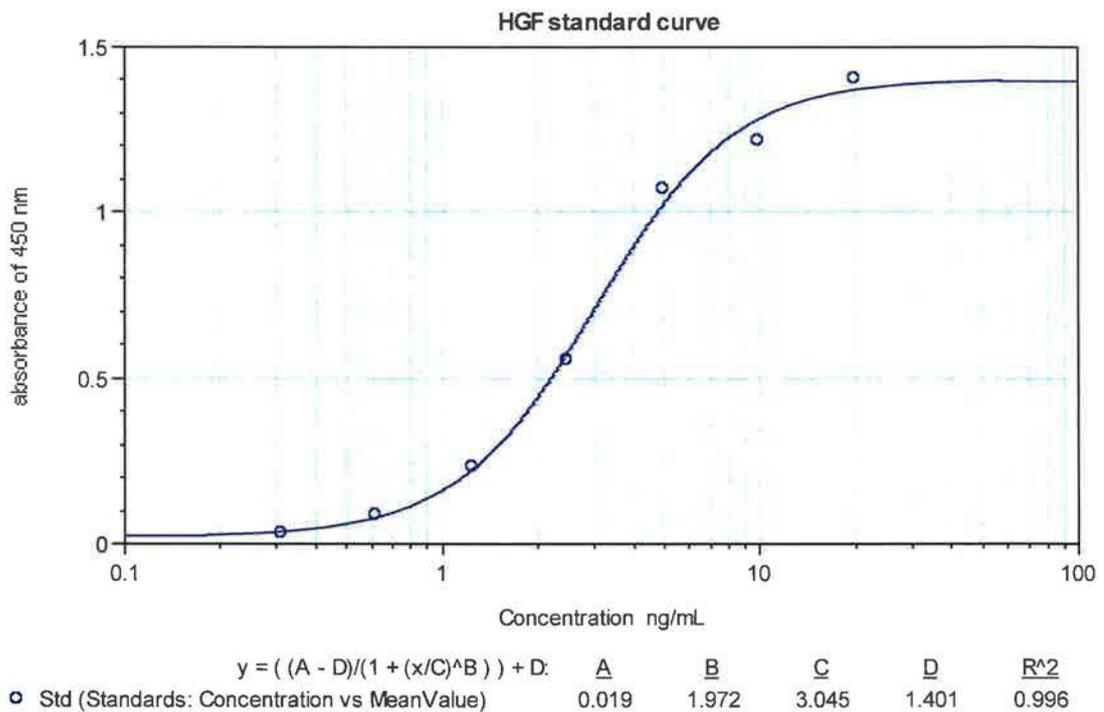
4. HGF

4-1 解析結果

4-1-1 スタンダード解析

スタンダード	濃度 ng/mL	Wells	測定値	平均値
STD1	20	H1	1.405	1.404
		H2	1.404	
STD2	10	G1	1.216	1.215
		G2	1.214	
STD3	5	F1	1.066	1.068
		F2	1.071	
STD4	2.5	E1	0.564	0.555
		E2	0.547	
STD5	1.25	D1	0.221	0.228
		D2	0.236	
STD6	0.625	C1	0.068	0.082
		C2	0.097	
STD7	0.313	B1	0.015	0.031
		B2	0.048	

スタンダードカーブ



4-1-2 サンプル解析結果

サンプル番号	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度	元濃度
4-1	E5	1.196	7.38	7.622	7622
	E6	1.217	7.865		
C1	H7	-0.015	Range?	Range?	検出限界値 以下
	H8	-0.003	Range?		

Range?・・・スタンダード下限値 (0.313 ng/mL) 以下

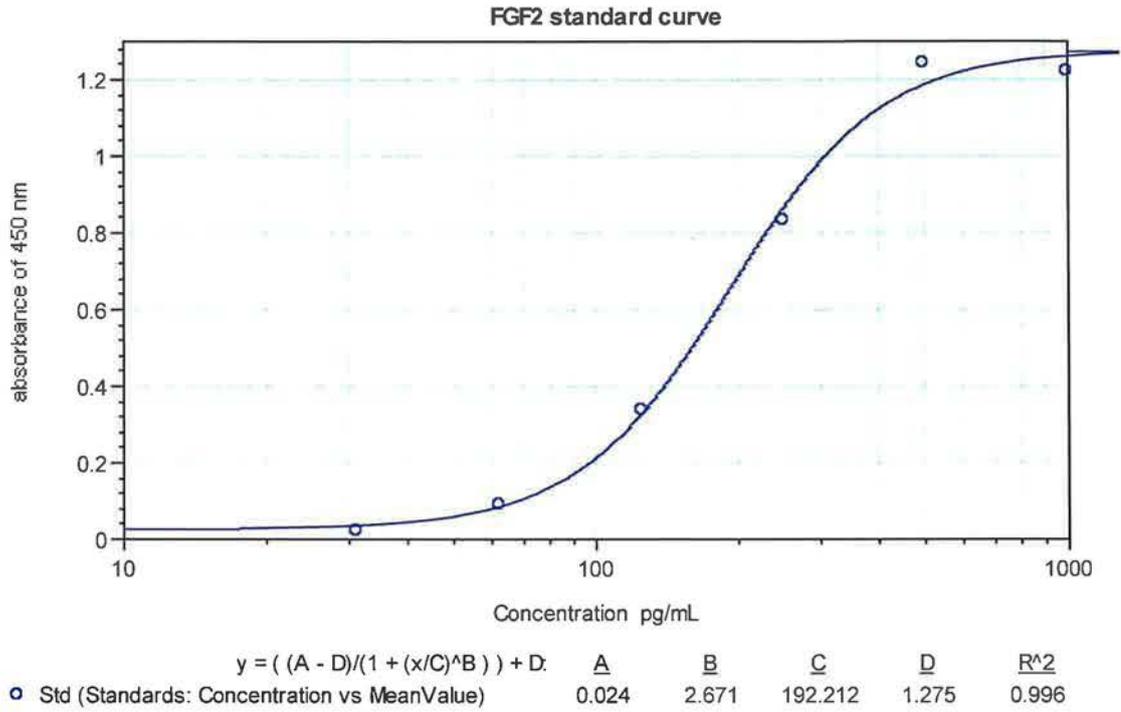
5. FGF2

5-1 解析結果

5-1-1 スタンダード解析

スタンダード	濃度 pg/mL	Wells	測定値	平均値
STD1	1000	G1	1.224	1.221
		G2	1.218	
STD2	500	F1	1.257	1.242
		F2	1.227	
STD3	250	E1	0.855	0.833
		E2	0.811	
STD4	125	D1	0.332	0.339
		D2	0.345	
STD5	62.5	C1	0.088	0.092
		C2	0.096	
STD6	31.25	B1	0.021	0.021
		B2	0.021	

スタンダードカーブ



5-1-2 サンプル解析結果 (濃度 pg/mL)

サンプル番号	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度	元濃度
4-1	E5	-0.023	Range?	Range?	検出限界値 以下
	E6	-0.02	Range?		
C1	H7	1.403	Range?	Range?	上限値超え ※
	H8	1.397	Range?		

Range?・・・スタンダード下限値 (31.25 pg/mL) 以下もしくはスタンダード上限値 (1000pg/mL) 以上

※ 5 倍希釈しても上限値 (1000 pg/mL)を超えているため 5000 pg/mL 以上と推定される

IV. 結果まとめ

1. データまとめ

1-1-1 記載結果について

- ・元濃度 (希釈率を戻した値) を記載
- ・濃度は pg/mL へ統一して記載

サンプル名	サイトカイン				
	VEGF	TGF beta 1	EGF	HGF	FGF2
	濃度 pg/mL	濃度 pg/mL	濃度 pg/mL	濃度 pg/mL	濃度 pg/mL
ARC-YS/P3-20250802	2948.2	2937.5	1150.3	7622	検出限界値 以下
ベース培地 (AOF)	検出限界値 以下	271.0	28173.6 ※1	検出限界値 以下	上限値超え ※2

※1 5倍希釈にて検査を実施

※2 5倍希釈しても上限値 (1000 pg/mL)を超えているため 5000 pg/mL 以上と推定される