

報告書（個別報告①）

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-241120-21

2025 年 1 月 14 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 (HGF)	6
2-5	ELISA 測定 (EGF)	7
2-6	ELISA 測定 (β -NGF)	8
2-7	ELISA 測定 (MCP-1)	9
2-8	解析	10
III.	結果	11
1.	VEGF	11
1-1	解析結果	11
2.	HGF	13
2-1	解析結果	13
3.	EGF	14
3-1	解析結果	14
4.	β -NGF	16
4-1	解析結果	16
5.	MCP-1	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-241120-21

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	2024 年 11 月 19 日
検体受け取り	2024 年 11 月 25 日
ELISA 開始 (1 回目測定)	2024 年 11 月 28 日
ELISA 終了 (1 回目測定)	2024 年 12 月 2 日
速報値提出	2024 年 12 月 4 日
検体受け取り (追加検体)	2024 年 12 月 11 日
ELISA (再測定サンプル分)	2024 年 12 月 12 日
速報値提出	2024 年 12 月 4 日
報告書案提出	2024 年 12 月 24 日
報告書提出	2025 年 1 月 14 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 No.	サンプル名
3-②	ARC-YS/P2-20240823
7-①	基礎培地 (AOF)
6-②	参考：他社製造品 (乳歯歯髄由来幹細胞培養上清液)

1-2 ELISA

1-2-1 各種血清中抗体

1. VEGF
2. HGF
3. EGF
4. β -NGF
5. MCP-1

1-2-2 測定キット

1. Human VEGF Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00216)
2. Human HGF Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00168)
3. Human EGF Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00138)
4. Human beta-NGF Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00174)
5. Human MCP-1 Sandwich ELISA Kit (proteintech, KE00091)

1-3 使用機器

1-3-1 マイクロプレートリーダー

- VMax (Molecular Devices)

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 (1 回目)
 1. VEGF：検体 55 μ L + Sample Diluent PT 4B1 55 μ L (2 倍希釈)
 2. HGF：検体 105 μ L (未希釈)
 3. EGF：検体 7 μ L + Sample Diluent PT 1-ef 105 μ L (16 倍希釈)

4. β -NGF：検体 55 μ L + Sample Diluent PT 1B1 55 μ L (2 倍希釈)

5. MCP-1：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°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°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 μ L 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 μ L 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 (HGF)

2-4-1 スタンドールの調製 (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

2-4-2 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。

2-4-3 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 2-4-1 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。

2-5 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 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 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 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 μ L 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 μ L 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 (β -NGF)

2-6-1 スタンダードの調製 (β -NGF)

- 1) キット付属の Protein standard (500 pg/bottle) へ Sample Diluent PT 1B1 を 2 mL 添加して 250 pg/mL のスタンダードを調製し、STD7 とした。
- 2) 以降は Sample Diluent PT 1B1 で 2 倍希釈を行い STD 6~1 とした。
- 3) blk は blank (Sample Diluent PT 1B1) 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	250
STD 6	125
STD 5	62.5
STD 4	31.25
STD 3	15.625
STD 2	7.813
STD 1	3.906

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 (β -NGF 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 60 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 (MCP-1)**2-7-1 スタンダードの調製 (MCP-1)**

- 1) キット付属の Protein standard (1000 pg/bottle) へ Sample Diluent PT 1 を 1 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 1 で 2 倍希釈を行い STD 5~1 とした。
- 3) blk は blank (Sample Diluent PT 1) 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 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×)を ELIX 水で 20 倍希釈した。
- 2-7-3 ELISA 測定 (MCP-1 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 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 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 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 μ L 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 μ L 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

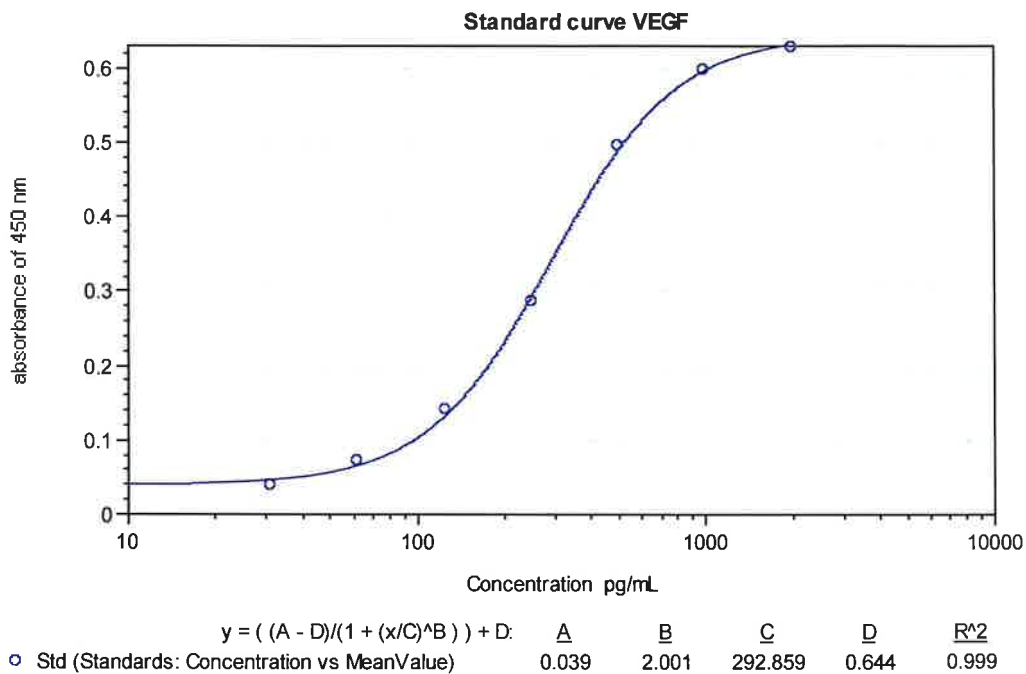
1. VEGF

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	31.25	B1	0.032	0.038
		B2	0.044	
STD 2	62.5	C1	0.068	0.071
		C2	0.073	
STD 3	125	D1	0.133	0.14
		D2	0.146	
STD 4	250	E1	0.268	0.285
		E2	0.301	
STD 5	500	F1	0.492	0.495
		F2	0.498	
STD 6	1000	G1	0.597	0.598
		G2	0.599	
STD 7	2000	H1	0.627	0.628
		H2	0.628	

スタンダードカーブ



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 No.	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度	元濃度
3-②	F5	0.538	636.123	657.756	1315.512
	F6	0.549	679.389		
7-①	F7	0.006	Range?	Range?	検出限界値 以下
	F8	0.006	Range?		
6-②	E7	0.071	69.415	67.67	135.34
	E8	0.068	65.925		

Range?・・・スタンダード下限値 (31.25 pg/mL) 以下

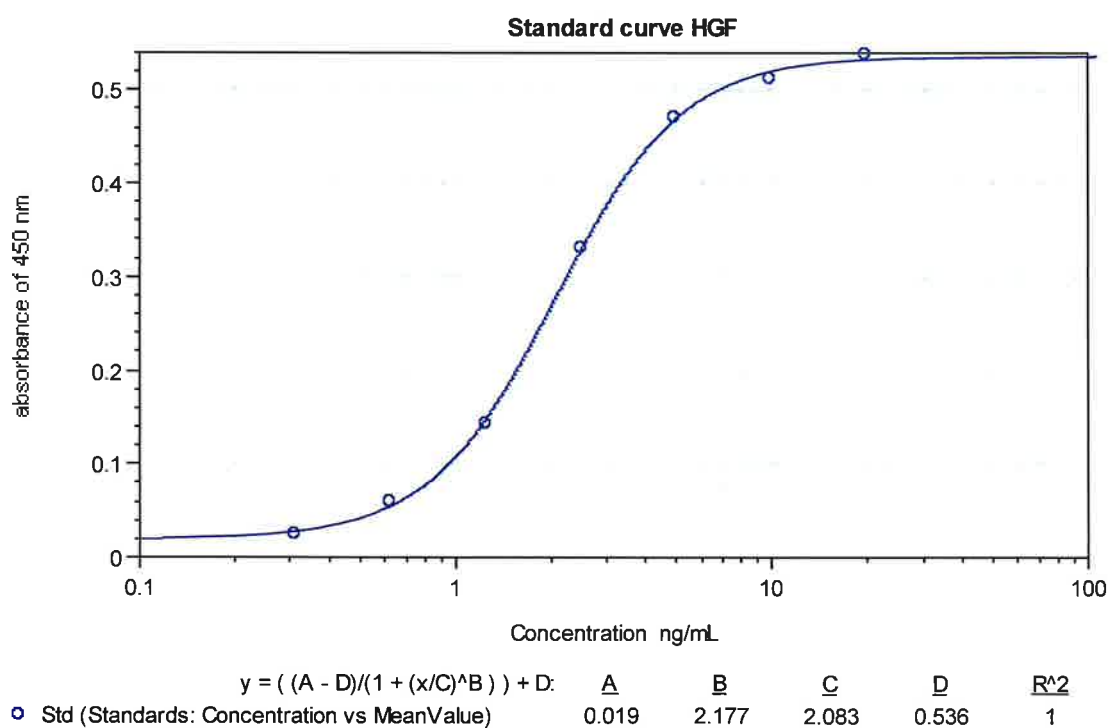
2. HGF

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 ng/mL	Wells	測定値	平均値
STD1	0.313	B1	0.025	0.025
		B2	0.024	
STD2	0.625	C1	0.064	0.059
		C2	0.053	
STD3	1.25	D1	0.161	0.143
		D2	0.124	
STD4	2.5	E1	0.341	0.331
		E2	0.32	
STD5	5	F1	0.478	0.469
		F2	0.46	
STD6	10	G1	0.513	0.513
		G2	0.512	
STD7	20	H1	0.535	0.538
		H2	0.54	

スタンダードカーブ



2-1-2 サンプル解析結果 (濃度 ng/mL)

サンプル No.	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度
3-②	F5	0.265	1.995	1.991
	F6	0.264	1.988	
7-①	F7	-0.024	Range?	Range?
	F8	-0.037	Range?	
6-②	E7	-0.01	Range?	Range?
	E8	-0.035	Range?	

Range?・・・スタンダード下限値 (0.313 ng/mL) 以下

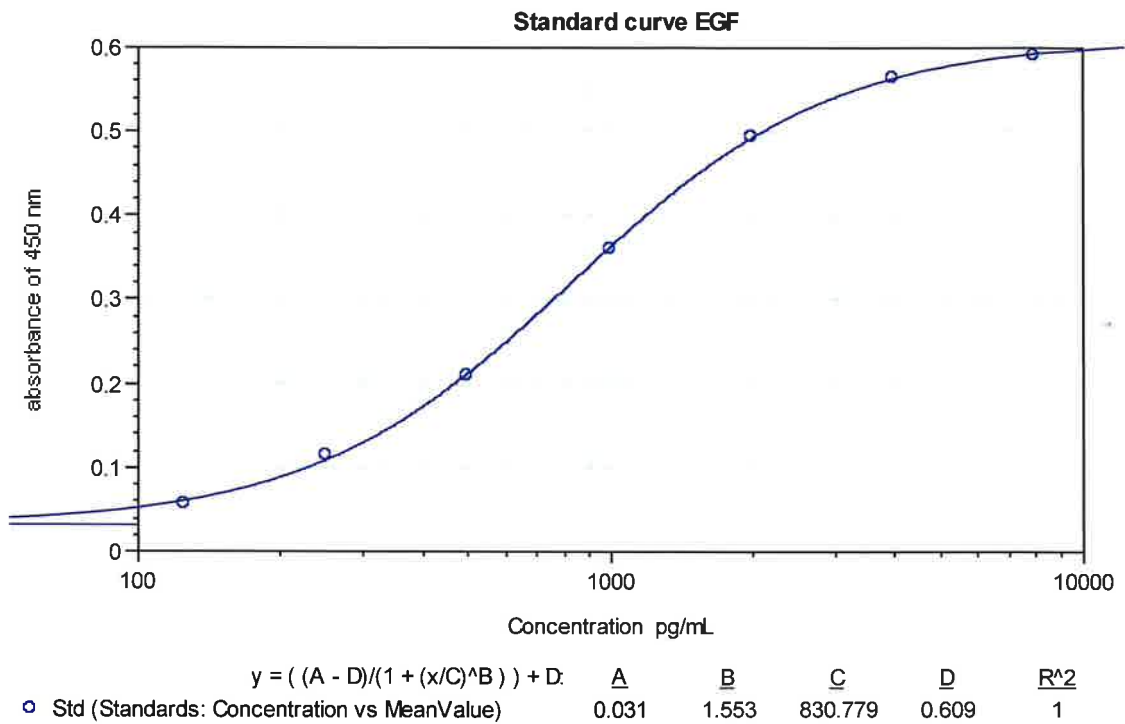
3. EGF

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	125	B1	0.059	0.057
		B2	0.055	
STD2	250	C1	0.118	0.114
		C2	0.11	
STD3	500	D1	0.22	0.209
		D2	0.199	
STD4	1000	E1	0.371	0.36
		E2	0.349	
STD5	2000	F1	0.503	0.494
		F2	0.485	
STD6	4000	G1	0.564	0.563
		G2	0.562	
STD7	8000	H1	0.589	0.591
		H2	0.594	

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 (16 倍希釈) を戻した値 (pg/mL)

サンプル No.	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度	元濃度
3-②	F5	0.185	432.435	449.899	7198.384
	F6	0.199	467.363		
7-①	F7	0.449	1540.246	1566.687	25066.99
	F8	0.455	1593.127		
6-②	E7	0.268	656.805	662.895	10606.32
	E8	0.272	668.985		

Range?・・・スタンダード下限値以下

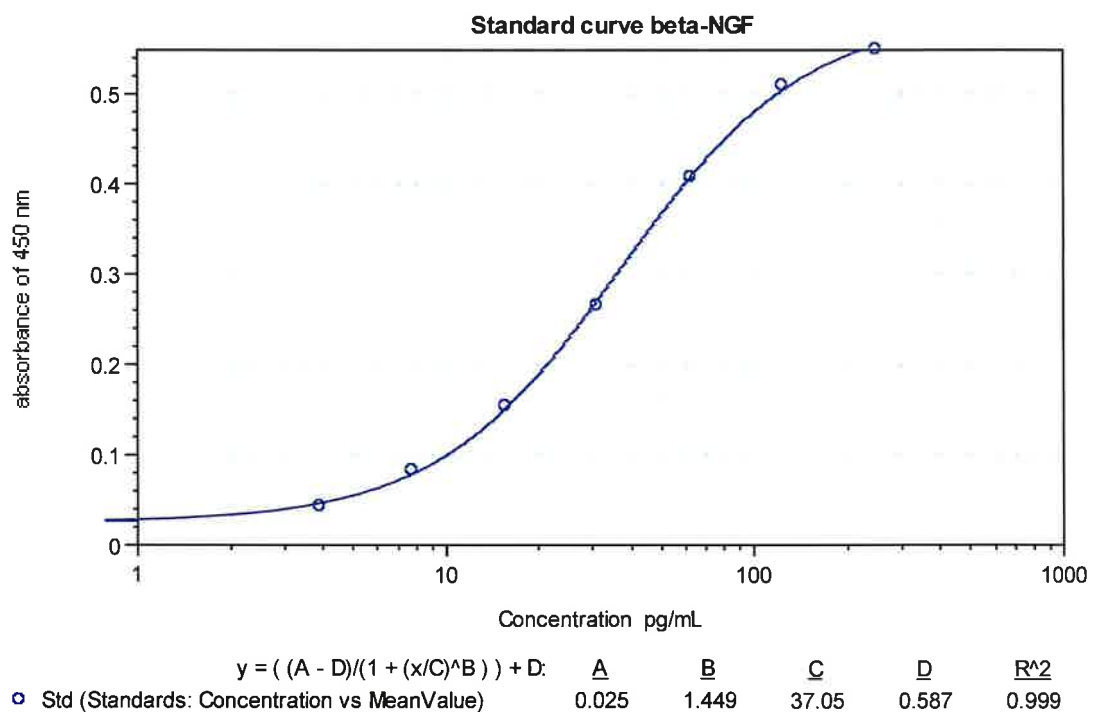
4. β -NGF

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 pg/mL	Wells	測定値	平均値
STD1	3.906	B1	0.044	0.042
		B2	0.039	
STD2	7.813	C1	0.085	0.082
		C2	0.078	
STD3	15.625	D1	0.155	0.155
		D2	0.154	
STD4	31.25	E1	0.268	0.265
		E2	0.262	
STD5	62.5	F1	0.416	0.409
		F2	0.401	
STD6	125	G1	0.51	0.511
		G2	0.512	
STD7	250	H1	0.549	0.55
		H2	0.551	

スタンダードカーブ



4-1-2 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 No.	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度	元濃度
3-②	F5	0.126	13.012	15.91	31.82
	F6	0.178	18.808		
7-①	F7	-0.014	Range?	Range?	検出限界値 以下
	F8	0	Range?		
6-②	E7	-0.014	Range?	Range?	検出限界値 以下
	E8	0	Range?		

Range?・・・スタンダード下限 (3.906 pg/mL) 値以下

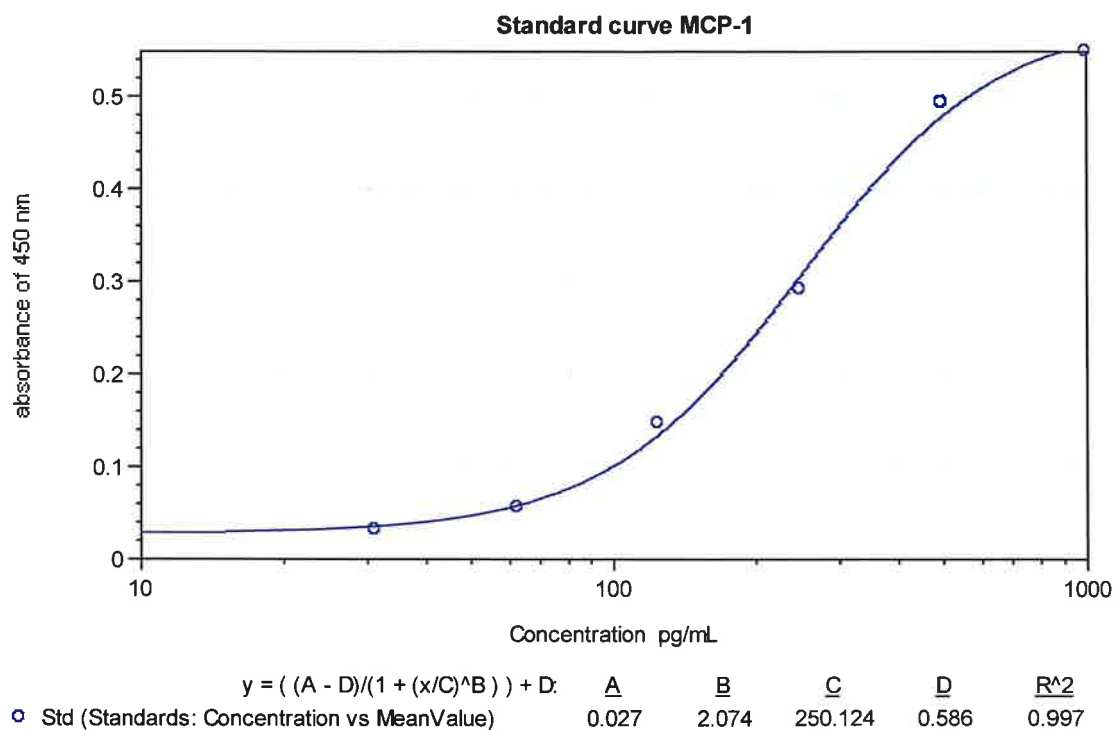
5. MCP-1

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	31.25	B1	0.051	0.032
		B2	0.013	
STD2	62.5	C1	0.064	0.055
		C2	0.047	
STD3	125	D1	0.156	0.147
		D2	0.139	
STD4	250	E1	0.293	0.292
		E2	0.291	
STD5	500	F1	0.506	0.494
		F2	0.483	
STD6	1000	G1	0.55	0.549
		G2	0.549	

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 No.	Wells	測定値	測定濃度	平均濃度
3-②	F5	0.339	279.223	273.512
	F6	0.327	267.8	
7-①	F7	0.003	Range?	Range?
	F8	0	Range?	
6-②	E7	0.016	Range?	Range?
	E8	0.013	Range?	

Range?・・・スタンダード下限値 (31.25 pg/mL) 以下

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

サイトカイン	VEGF	HGF	EGF	β -NGF	MCP-1
サンプル名	濃度 pg/mL	濃度 pg/mL	濃度 pg/mL	濃度 pg/mL	濃度 pg/mL
ARC-YS/P2-20240823	1315.5	1991.0	7198.4	31.8	273.5
基礎培地 (AOF)	検出限界値 以下	検出限界値 以下	25067.0	検出限界値 以下	検出限界値 以下
参考：他社製造品 (乳歯歯髓由来幹細胞培養 上清液)	135.3	検出限界値 以下	10606.3	検出限界値 以下	検出限界値 以下