

不織布フィルターを用いた閉鎖系デバイスによる
顎骨骨髓からの間葉系幹細胞分離に関する研究

落合 幸彦

明海大学 歯学部 口腔生物再生医工学講座 歯周病学分野

(指導：申 基喆教授)

Isolation of Mesenchymal Stem Cell from Gnathic Bone Marrow
by a Closed System Device Using Nonwoven Fabric Filter

Yukihiko OCHIAI

Division of Periodontology, Department of Oral Biology & Tissue Engineering

Meikai University School of Dentistry

(Mentor : Prof. Kitetsu SHIN)

歯乙 第 596 号 2014 年 3 月 26 日

要 旨

近年、組織工学の進歩により、歯周組織やインプラント周囲組織の再生において、間葉系幹細胞の移植が臨床的に有効であることが示されている。本研究の目的は、間葉系幹細胞に親和性が高い不織布フィルターを組み込んだ閉鎖系デバイスが、顎骨からの骨髄間葉系幹細胞の分離において、有用であるか否かを評価することである。44検体の顎骨骨髄液を、インプラント埋入手術時に患者35人から採取した。回収した細胞は、細胞培養用シャーレに播種した。また、コントロールとして、本デバイスを用いず、遠心分離して上清を除き、細胞を直接シャーレに播種した。培養14日後に顕微鏡観察にてコロニー形成を確認した。その結果、本デバイスを用いたところ、30検体中10検体(33.3%)からコロニー形成が認められた。一方、コントロールでコロニー形成が確認されたのは、14検体中3検体(21.4%)であった。本研究結果から、不織布フィルターを用いたデバイスにより、顎骨から骨髄間葉系幹細胞を閉鎖系で効率よく分離できる可能性が示唆された。

索引用語: 間葉系幹細胞, 顎骨, 不織布フィルター, 再生療法

Abstract

Recent advances in tissue engineering have demonstrated the clinical utility of mesenchymal stem cell (MSC) transplantation for both periodontal and peri-implant tissue regeneration. The purpose of this study was to evaluate the usefulness of a device with a nonwoven fabric filter, which selectively traps MSC based on affinity, for isolation of MSC from gnathic bone marrow. A total of 44 bone marrow aspirates were obtained from 35 patients during surgery for dental implant placement. The isolated cells were then seeded on tissue culture dishes. As a control, without using the device, the cells harvested by centrifugation were directly seeded on the dishes. After 14 days of culture, colony formation was confirmed by observation using microscopy. As a result, colony forming cells by using the device were detected in 10 of 30 samples (33.3%). The colony forming cells without using the device were obtained in 3 of 14 samples (21.4%). It was thus suggested that the use of the device with a nonwoven fabric filter may allow efficient isolation of MSC from gnathic bone marrow in a closed system.

Key words: mesenchymal stem cell, gnathic bone, nonwoven fabric filter, regeneration therapy

緒言

歯周治療においては、組織再生誘導法¹⁾やエナメルマトリックスタンパク質を用いた歯周組織再生療法²⁾を行うことにより、歯周病によって失われた組織の再生が可能となってきた。また、インプラント治療では、遮蔽膜や移植骨を用いた歯槽堤の増大手術も行われるようになってきている³⁾。しかしながら、これらの再生療法の適応範囲は狭く、長い治療期間を要し、限られた効果しか期待できない。また、用いられる材料の中には、異種由来のものや他家由来のものもあり、それらを用いた場合、牛海綿状脳症や未知の感染症に罹患するリスクを完全に排除することはできない。

近年、歯周治療およびインプラント治療における組織再生を目的として、間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell, MSC）を用いた再生療法が検討されている⁴⁻⁸⁾。この治療法は、患者の腸骨骨髓液からMSCを分離し、体外で培養した後移植するもので、必要とされる組織を効果的に再生させることが期待されている。また、患者自身の細胞を用いることから、ウイルス等の感染や拒絶反応のリスクがなく、倫理的な問題も回避できるという利点を有している。しかしながら、培養のために専用の培養室など大きな設備を必要とすることや、骨髓液を腸骨から採取することなどにより、限られた施設でしか実施することが

できないという難点がある。

MSC の供給源として、これまで主に腸骨骨髓が利用されてきた^{7, 8)}。腸骨骨髓からは大量の MSC を回収することが可能であるが、外科的な侵襲が大きいという欠点がある。歯髓組織⁹⁾あるいは歯根膜組織¹⁰⁾も MSC の供給源として検討されているが、歯を抜去しなければならず、回収できる細胞数が少ないという欠点がある。それに対し顎骨の骨髓は、薄い口腔粘膜直下に存在していることから、外科的にアクセスするのは容易であり、腸骨と比較して外科的な侵襲が小さく、骨髓液採取に併発する疼痛などの不快症状の発生頻度も低いことが予想される。また、抜歯時、歯周外科手術時、あるいは歯科用インプラント埋入時等、直接的に骨髓にアクセスできる機会も多い。しかしながら、これまで顎骨から MSC の分離を試みた研究は少ない^{11, 12)}。

最近、骨髓液から MSC リッチ画分を、簡便かつ安全に、そして効率的に分離できる間葉系幹細胞分離デバイスが開発された¹³⁾。このデバイスは、MSC に親和性が高いレーヨンおよびポリエチレンより合成された不織布フィルターを用いたもので、少量の骨髓液から MSC を短時間で効率よく分離することができる。したがって、本デバイスを用いることにより、顎骨から採取できる少量の骨髓液から MSC を分離できる可能性がある。また、本デバイスは、通常の遠心分離器を用いる方法とは異なり、閉鎖系で MSC を分離することがで

きることから、微生物などが混入する危険性が低いという利点も有している。

本研究の目的は、間葉系幹細胞分離デバイスを用いた歯周組織再生療法およびインプラント埋入時の歯槽堤増大法を新たに開発することを前提として、顎骨骨髓からの MSC 分離における本デバイスの有用性を評価し、顎骨から安全かつ簡便に MSC を分離・培養できる方法を確立することである。

材料と方法

1. 被験者

明海大学歯学部附属明海大学病院歯周病科に来院し、インプラント治療を行った患者 35 人を被験者とし、合計 44 検体を採取した。被験者の平均年齢は 56.1 ± 12.6 歳で、男性 12 人、女性 23 人であった。本研究は、明海大学歯学部倫理委員会の承認（A0904）のもと、被験者には十分に研究の説明を行った後、同意書を得て行った。

2. 骨髓液の採取

顎骨からの骨髓液は、骨髓穿刺針または注射針を用いて採取した。骨髓穿刺針を用いる方法では、骨面に起始点を形成した後に、骨髓穿刺針（SIL-181，タスク，栃木）を用いて皮質骨を穿孔した。骨髓穿刺針は中空の外筒と中空部分を封鎖する内筒で構成されており、穿刺し先端部分が骨髓に到達した後に内筒を抜き取ることにより、針の中に骨が目詰まりすることなく骨髓液を採取できる。内筒除去後、2.5 ml のシリンジ（ss-02Sz，テルモ，東京）を装着し、陰圧にて骨髓液を採取した（Fig 1）。注射針を用いる方法では、注水下にてインプラント埋入窩形成用のドリルー式（Zimmer Dental, Carlsbad, CA, USA）を用いて埋入窩を形成した後に、滲出してきた骨髓液を 2.5 ml のシリンジを装着した 18

ゲージの注射針 (NN-1838R, テルモ) を用いて採取した (Fig 2). ヘパリンナトリウム (100 IU/ml, 田辺三菱製薬, 大阪), その後, ペニシリン (200 IU/ml, Gibco BRL, Rockville, MD, USA), ストレプトマイシン (200 µg/ml, Gibco BRL), およびアンフォテリシン B (500 ng/ml, Gibco BRL) を添加した滅菌生理食塩水 1 ml に, 採取した骨髄液を注入し, 転倒混和後, 4°Cにて保存した.

3. 間葉系幹細胞の分離および培養

MSC 分離には, 間葉系幹細胞分離デバイス (株式会社カネカ, 大阪) を用いた (Fig 3). まず, 滅菌生理食塩液を通液してカラムのプライミングをした後, 生理食塩液にて希釈した検体を, デバイスに通液した. 次に滅菌生理食塩液を骨髄液と同じ方向に通液し, フィルターに付着していない赤血球等を洗い流した後, 逆方向から細胞培養培地 50 ml を注入することにより, フィルターに付着した細胞を回収用バッグに回収した. 細胞培養培地には, 10 %ウシ胎仔血清 (和光純薬工業, 大阪) 含有 α -minimum essential medium (Gibco BRL) 培地を用いた. また, デバイスへの通液は, すべて一定の流速 (6 ml/min) で行った. 回収した細胞は, 直径 10 cm の培養用シャーレ (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) に播種し, 37°C, 5 % CO₂ 下で培養を行った. 2日から4日おきに各シャーレの培地を交換し, 浮遊細胞を除去した. そして, 培養 14 日後に顕微鏡観察にてコロニー形成の有無を観察した. また, コントロールとして, 全骨

髄播種法により MSC を分離した。全骨髄播種法では、デバイスを用いず、検体を $500 \times g$ にて 5 分間遠心分離して上清を除き、骨髄細胞を細胞培養液に懸濁後シャーレに播種した。細胞播種密度は、デバイスを用いた方法と全骨髄播種法ともに、 $0.026 \text{ ml 骨髄液/cm}^2$ とした。

4. 細胞表面抗原分析

コロニーを形成した細胞の一部は、間葉系幹細胞のポジティブマーカーである CD73, CD90, および CD105, ネガティブマーカーである CD14, CD19, CD34, CD45, および HLA-DR の発現について検討した。シャーレに付着した細胞をトリプシン様酵素 (TrypLE™ Select, Gibco BRL) を用いて回収し, single cell suspension とした細胞 ($1 \times 10^5 \text{ cells/500 } \mu\text{l}$ 生理食塩水) を, 室温で 30 分間 FITC 標識マウス抗ヒト CD73 (希釈倍率 1 : 50), CD90 (希釈倍率 1 : 100), CD105 (希釈倍率 1 : 100), CD14 (希釈倍率 1 : 50), CD19 (希釈倍率 1 : 50), CD34 (希釈倍率 1 : 500), CD45 (希釈倍率 1 : 50), および HLA-DR (希釈倍率 1 : 50) モノクローナル抗体 (BD Bioscience) と反応させた後, FACS Calibur (BD Bioscience) を用いたフローサイトメトリー法により表面抗原を検出した。

5. 統計分析

コロニー形成検体率の統計学的比較は, Fisher の直接確率計算法を用いた。また, 各要因がコロニー形成の有無に及ぼす影響は, ロジスティック回帰分析

により検討した。各統計処理には統計処理ソフト IBM SPSS statistics 20（日本アイ・ビー・エム，東京）を用いて行った。

結 果

1. コロニー形成細胞の顕微鏡観察

顎骨骨髓液から間葉系幹細胞分離デバイスまたは遠心分離機を用いて処理後、培養用シャーレに形成されたコロニーを顕微鏡下にて観察した。コロニーを形成していた細胞は、MSC の特徴である線維芽細胞様形態を呈していた (Fig 4)。

2. コロニー形成細胞の表面抗原分析

コロニーを形成した 13 検体のうち 8 検体については細胞表面抗原の分析を行った (Table 1)。間葉系幹細胞のポジティブマーカーである CD105 は、すべての検体において陽性率は 95%以上であった。ネガティブマーカーである CD34 および CD45 は、すべての検体において陽性率は 2%以下であった。さらに、1 検体については、ポジティブマーカーとして CD73,CD90,CD105 を検索したところ、いずれも 99%以上の陽性率を示し、ネガティブマーカーである CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR は、いずれも陽性率 1%未満であった。

3. 間葉系幹細胞分離デバイスと全骨髓播種の比較

間葉系幹細胞分離デバイスを用いて MSC の分離を試みたところ、30 検体中 10 検体 (33.3%) の検体からコロニー形成細胞がみられた (Table 2)。一方、間葉系幹細胞分離デバイスを用いず、全骨髓播種法によりコロニー形成が確認

されたのは、14 検体中 3 検体 (21.4%) であった。コロニー形成検体率は、デバイスを用いた方が高い傾向がみられたが、統計学的に有意な差ではなかった。また、コロニー形成がみられた 13 検体のうち、コロニー数が 1 個のものが 6 検体、2 個のものが 5 検体、4 個のものが 1 検体、そして 10 個のものが 1 検体であった。

4. 骨髄穿刺針と注射針の比較

間葉系幹細胞分離デバイスを用いて分離した検体において、骨髄液を採取する際に骨髄穿刺針を用いた方法では、15 検体中 6 検体 (40.0%) においてコロニー形成が確認されたのに対し、注射針を用いた方法では 15 検体中 4 検体 (26.7%) であった (Table 3)。また、全骨髄播種法により分離した検体においては、骨髄穿刺針を用いた方法では 7 検体中 2 検体の 28.6%、注射針を用いた方法では 7 検体中 1 検体の 14.3% であった。いずれの分離方法においても、注射針を用いる方法よりも、穿刺針を用いる方がコロニーを形成する検体の割合が高い傾向がみられたが、統計学的有意差はみられなかった。

5. 性別による比較

男性と女性に分けて比較したところ、コロニー形成検体率は、デバイスを用いた場合には男性で 36.4%、女性では 31.6%、全骨髄播種法を用いた場合には、男性で 25.0%、女性で 20.0% であり、いずれの方法においても統計学的に有意

な差はみられなかったものの、コロニー形成検体率はデバイスの使用の有無に関わらず、わずかであるが女性の方が低かった (Table 4).

6. 年齢別による比較

年代別に分けてみたところ、デバイスを用いた場合には 50 歳代では 11 検体中 4 検体で 36.4%，60 歳代では 13 検体中 6 検体で 46.2%の検体からコロニー形成細胞が分離されたが、20 歳代、30 歳代、40 歳代、および 70 歳代では検体数が少ないものの、1 検体も分離されなかった (Table 5)。デバイスを用いなかった場合では、60 歳代で 8 検体中 3 検体からコロニー形成細胞が分離されたが、40 歳代の 1 検体、50 歳代の 5 検体からは分離されなかった。

7. 上顎と下顎の比較

採取した部位を上顎と下顎に分けてみたところ、デバイスを用いた場合には上顎と下顎はともにコロニー形成検体率は 33.3%であった (Table 6)。全骨髄播種法の場合では、上顎では 1 検体もコロニー形成が認められず、下顎では 27.2%から分離されたが、有意な差はみられなかった。

8. 採取部位による比較

採取部位を前歯部、小臼歯部、および大臼歯部に分けて比較したところ、デバイスを用いた場合には、コロニー形成検体率は小臼歯部で最も高く 60.0%，前歯部では 40.0%，大臼歯部では 25.0%であった (Table 7)。デバイスを用いな

かった場合においても，コロニー形成検体率は小臼歯部で最も高く 40.0%，前歯部では 0.0%，大臼歯部では 14.3%であった．いずれの分離方法でも小臼歯でコロニー形成検体率が高い傾向がみられたが，統計学的に有意な差ではなかった．

9. 採取量による比較

骨髓液採取量で分類したところ，デバイスを用いた場合には 151~200 μl で 12 検体中 5 検体の 41.7%と最もコロニー形成検体率が高く，201~300 μl で 33.3%，300 μl 以上では 28.6%と，骨髓液採取量が多いほど，コロニー形成率が高いという傾向は見られなかった (Table 8)．全骨髓播種法を用いた場合では，300 μl 以上で最もコロニー形成検体率が高い傾向がみられたが 2 検体中 1 検体と検体数が少ないため，統計学的に有意な差はみられなかった．

10. ロジスティック回帰分析

各要因がコロニー形成に及ぼす影響をロジスティック回帰分析により検索したところ，いずれの要因も有意差はみられなかったが，オッズ比では，小臼歯から採取した場合が 6.809 と最も高く，次にデバイスを用いる場合が 4.090 と高い傾向がみられた (Table 9)．

考 察

再生医療に必要な 3 要素は、成長因子、足場、幹細胞であるとされている¹⁴⁾が、成長因子と足場に関する臨床研究と比較して、幹細胞に関する口腔領域における臨床研究は非常に少ない。また、顎骨由来の骨髄 MSC を用いた再生療法の報告はまだない。本研究で、顎骨骨髄からデバイスを用いて MSC を分離できることが示されたことにより、顎骨由来 MSC を用いた新しい再生療法を開発できる可能性が示唆された。

MSC は、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞など、様々なタイプの細胞に分化し、かつ自己複製能力を有する未分化な細胞で、骨髄から採取された細胞のうち、プラスチックに付着し、線維芽細胞様のコロニーを形成する細胞として分離された¹⁵⁾。The International Society for Cellular Therapy の委員会報告書によると、ヒト MSC の定義は、1) 組織培養用フラスコで培養するとプラスチックに付着すること、2) 細胞表面に CD105, CD73, および CD90 を発現し、かつ CD45, CD34, CD14 (または CD11b), CD79 α (または CD19), および HLA-DR を発現していないこと、3) 骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨芽細胞に分化できること、としている¹⁶⁾。本研究においては、コロニーを形成した細胞はプラスチック付着性があり、線維芽細胞様の形態を有することをすべての検体で確認

した. また, 一部の検体では, フローサイトメトリーにより, 細胞表面に CD105, CD73, および CD90 を発現し, かつ CD45, CD34, CD14, CD19, および HLA-DR を発現していないことを確認した.

歯周組織およびインプラント周囲組織の再生のために顎骨から MSC を採取することにはいくつかの利点がある. まず, 歯科医師は顎骨の解剖学的な基礎知識を備え, 臨床経験が豊富であることから, 腸骨などの他の部位とは異なり, アプローチしやすく, 採取するにあたり, 患者からの同意も得やすいと考えられる. また, 顎骨から分離された MSC は腸骨などの他の部位から分離された MSC よりも, 臨床的に顎顔面領域の再生に適している可能性がある. 発生学的にも, 頭蓋顎顔面は神経堤細胞から形成されるのに対し, 腸骨稜などの体幹部の骨格は中胚葉から形成されることから, 顎骨骨髓由来の MSC は他の部位由来の MSC と異なる性質を有することが考えられる. 顎骨由来の間葉系幹細胞は, 腸骨由来のものと比較して, 軟骨細胞および脂肪細胞への分化能は低く, 骨芽細胞への分化能が高いことが報告されている¹⁷⁾.

これまで, 顎骨から MSC を分離した報告として, Matsubara ら¹²⁾は, インプラント埋入窩から 9 検体を採取し, 全骨髓播種法により, 3 検体, 33.3%からコロニー形成細胞を分離したと報告している. 検体数が少ないものの, 本研究のデバイスを用いた場合と同等の成績である. しかしながら, 彼らの研究では,

分離後の培養に成長因子として basic fibroblast growth factor (bFGF) を添加している点が本研究とは条件が異なる。bFGF は、MSC の増殖を促進することが明らかにされているが¹⁸⁾、将来的に臨床応用を考えるのであれば、bFGF を添加することなく MSC を分離できた方が望ましいと考えられる。その点では、本研究では、bFGF を用いることなく同等の分離に成功できたことは、臨床的に意義があると思われる。

骨髓液採取の方法として注射針を用いた方法よりも、穿刺針を用いた方法の方が、コロニー形成検体率が高い傾向がみられた。穿刺針を用いた方法では、骨髓への侵襲を最小限に抑えて骨髓液を陰圧で採取できる。それに対して、注射針を用いて採取する方法では、ドリリングの際の注水によって骨髓液が一部洗い流されてしまう可能性があることと、ドリリングによって骨髓内の血管を損傷し、骨髓液だけではなく、血液が混入していた可能性があることが影響しているものと推察された。Morikawa ら¹⁹⁾は、MSC の骨髓内での局在について、マウスにおいては皮質骨の骨内膜直下に多く存在することを報告している。したがって、穿刺針は必ずしも骨髓内深く挿入する必要はなく、針先が皮質骨直下に位置するのが望ましいと考えられる。

MSC は加齢と共に骨髓内の数が減少することが示されており^{20, 21)}、顎骨からの MSC 分離の成功率は若年者の方が高く、再生医療が必要となる中高年者にな

るほど分離が困難であると報告されている^{12, 22)}。本研究の被験者は若年者の割合が低く、そのような傾向はみられなかったが、60歳代という高齢者からもデバイスを用いることにより46%分離できたことは、再生療法を必要とする患者の多くが中高年者であることを考慮すると臨床的な意義は大きいと考えられる。

採取する部位としては、小臼歯部でコロニー形成検体率が高い傾向がみられた。前歯部は骨髓腔の容積が小さいため、採取できる骨髓液量が限られている。また、大臼歯部は骨髓穿刺針などの器具を到達させることが困難な場合が多く、さらに、皮質骨が厚いため、穿孔させることが困難な場合も多い。したがって、臨床的にも小臼歯部は骨髓液採取に適していると考えられる。

腸骨骨髓から骨髓液を採取した場合、通常すべての検体からコロニー形成細胞が分離される^{13,23)}が、本研究においては、デバイスを用いてもコロニー形成細胞が分離できた検体は33.3%と低かった。これは、顎骨から採取できた骨髓液量が少なかったことが最も大きな要因であったと考えられる。腸骨骨髓から骨髓液を採取した場合、通常数mlから数10ml採取できる^{13,23)}のに対して、本研で顎骨から採取した検体は、44検体中35検体(79.5%)が300 μ l未満であった。300 μ l以上採取できた検体においてもデバイスを用いた場合でコロニー形成検体率は28.6%と高くはなかった。採取量が多かった検体は骨髓液だけではなく、血液が混入した可能性があり、それが結果に影響したと考えられる。骨

髄液の採取量のレベルは大きく異なるが、腸骨から骨髄液を採取する場合においても、採取量が多くなると骨芽前駆細胞の分離率が低下することが報告されている²³⁾。骨髄液には様々な細胞が含まれているが、本来、MSC の数は造血細胞と比較して非常に少なく、有核細胞の 0.001~0.01%とされている²⁴⁾。MSC の細胞密度は骨の部位によって異なるが、腸骨では 1 ml 当たり 400~500 個と報告されている²⁵⁾。顎骨における MSC の細胞密度は不明である。

近年、MSC は、組織の再生のみならず感染や炎症にも関与していることが明らかにされつつある²⁶⁾。興味深いことに、口腔顔面骨由来の間葉系幹細胞は、長管骨由来のものとは異なる性質を有しており、マウスの *in vitro* の実験において T 細胞の増殖を抑制するなど、免疫系においても重要な役割を担っていることが報告されている²⁷⁾。本デバイスを用いて顎骨から間葉系幹細胞を分離して分析すれば、歯周病などの顎骨に特異的に発症する疾患の病態解明にも寄与できる可能性がある。

本研究で用いたデバイスにより、顎骨から MSC を簡便かつ安全に分離・培養する方法が確立されれば、歯科医療の現場で MSC を用いた再生治療が飛躍的に普及するものと推測される。また、分離した MSC を凍結保存すれば、他の全身疾患の治療にも利用できることから²⁸⁾、全身的に様々な組織の再生医療へ MSC を供給できる方法となる可能性をも秘めている。本研究結果から、顎骨から MSC

を採取するためには、採取器具、採取部位、分離方法などが影響を及ぼしている可能性が示唆されたが、いずれも有意な差ではなく、顎骨からの MSC を分離するための最適なプロトコルを確立するためには、さらなる研究が必要である。

結 論

本研究結果から、不織布フィルターを用いたデバイスにより、顎骨から MSC を閉鎖系で分離できることが示された。また、骨髄穿刺針を用いて小臼歯部から骨髄液を採取し、本デバイスを用いることにより、顎骨から MSC をより効率よく分離できる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究に御指導，御高閲を賜りました明海大学歯学部口腔生物再生医工学講座歯周病学分野歯周病学分野の申 基喆教授に深甚なる謝意を表します．また，御校閲を賜りました同形態機能生育学講座口腔解剖学分野の羽毛田 慈之教授，同口腔生物再生医工学講座微生物学分野の大森 喜弘教授，同機能保存回復学講座歯科補綴学分野の藤澤 政紀教授に深く感謝の意を表します．そして，本研究の遂行に当たり，器材等をご提供して頂きました株式会社カネカ，御協力を頂きました歯周病学分野の先生方に深く御礼申し上げます．

Table 1 Positive rate of surface markers in colony formed cell

Surface markers (%)								
No.	CD105	CD90	CD73	HLA-DR	CD14	CD19	CD34	CD45
1	95.7	-	-	-	1.0	-	0.1	0.6
2	99.5	-	-	-	-	-	0.1	0.2
3	99.4	-	-	-	-	-	0.0	0.2
4	96.8	-	-	-	-	-	2.0	1.7
5	99.9	-	-	-	-	-	0.1	0.1
6	99.2	99.7	100	0.3	0.7	0.4	0.0	0.4
7	99.8	-	-	-	-	-	0.0	0.0
8	99.0	-	-	-	-	-	0.1	0.2

Table 2 Effects of device usage on *ex vivo* expansion of alveolar MSC

	Device (+)	Device (-)
Total number of samples	30	14
Number of samples with colony formation	10	3
Colony formation rate (%)	33.3	21.4

Table 3 Effects of puncture needle usage on *ex vivo* expansion of alveolar MSC

	Device (+)		Device (-)	
	Puncture needle	18G needle	Puncture needle	18G needle
Total number of samples	15	15	7	7
Number of samples with colony formation	6	4	2	1
Colony formation rate (%)	40.0	26.7	28.6	14.3

Table 4 Effects of sex on *ex vivo* expansion of alveolar MSC

	Device (+)		Device (-)	
	Male	Female	Male	Female
Total number of samples	11	19	4	10
Number of samples with colony formation	4	6	1	2
Colony formation rate (%)	36.4	31.6	25.0	20.0

Table 5 Effects of age on *ex vivo* expansion of alveolar MSC

Age (years old)	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
Device (+)						
Total number of samples	3	1	1	11	13	1
Number of samples with colony formation	0	0	0	4	6	0
Colony formation rate (%)	0.0	0.0	0.0	36.4	46.2	0.0
Device (-)						
Total number of samples	0	0	1	5	8	0
Number of samples with colony formation	0	0	0	0	3	0
Colony formation rate (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	37.5	0.0

Table 6 Effects of sampling site (maxilla vs mandible) on *ex vivo* expansion of alveolar

MSC

	Device (+)		Device (-)	
	Maxilla	Mandible	Maxilla	Mandible
Total number of samples	6	24	3	11
Number of samples with colony formation	2	8	0	3
Colony formation rate (%)	33.3	33.3	0.0	27.2

Table 7 Effects of sampling site (anterior, premolar, or molar) on *ex vivo* expansion of alveolar MSC

	Device (+)			Device (-)		
	Anterior	Premolar	Molar	Anterior	Premolar	Molar
Total number of samples	5	5	20	2	5	7
Number of samples with colony formation	2	3	5	0	2	1
Colony formation rate (%)	40.0	60.0	25.0	0.0	40.0	14.3

Table 8 Effects of sample volume on *ex vivo* expansion of alveolar MSC

Sample volume (μl)	-100	101-150	151-200	201-300	301-
Device (+)					
Total number of samples	5	3	12	3	7
Number of samples with colony formation	1	1	5	1	2
Colony formation rate (%)	20.0	33.3	41.7	33.3	28.6
Device (-)					
Total number of samples	3	2	7	0	2
Number of samples with colony formation	0	0	2	0	1
Colony formation rate (%)	0.0	0.0	28.6	0.0	50.0

Table 9 Logistic regression analysis for use of device, use of puncture needle, sex, age, mandibular, premolar, and volume in relation to the *ex vivo* expansion of alveolar MSC

Valuables	Odds ratio	95% confidence interval	<i>p</i> value
Device	4.090	0.623 to 26.833	0.142
Puncture needle	1.326	0.297 to 5.916	0.711
Sex (male)	1.583	0.284 to 8.840	0.601
Age	1.106	0.998 to 1.224	0.054
Mandibular	0.537	0.065 to 4.429	0.563
Premolar	6.809	0.964 to 48.110	0.055
Volume	1.002	0.998 to 1.005	0.278

引用文献

- 1) Karring T, Nyman S, Gottlow J and Laurell L: Development of the biological concept of guided tissue regeneration - animal and human studies. *Periodontol* 2000 **1**, 26-35, 1993
- 2) Hammarström L: Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* **24**, 658-668, 1997
- 3) Buser D, Bragger U, Lang NP and Nyman S: Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue generation. *Clin Oral Implants Res* **1**, 22-32, 1990
- 4) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y and Kurihara H: Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* **75**, 1281-1287, 2004
- 5) Yamada Y, Ueda M, Hibi H and Nagasaka T: Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. *Cell Transplant* **13**, 343-355, 2004

- 6) McAllister BS, Haghghat K and Gonshor A: Histologic evaluation of a stem cell-based sinus-augmentation procedure. *J Periodontol* **80**, 679-686, 2009
- 7) Razzouk S and Schoor R: Mesenchymal stem cells and their challenges for bone regeneration and osseointegration. *J Periodontol* **83**, 547-550, 2012
- 8) Jakobsen C, Sørensen JA, Kassem M and Thygesen TH: Mesenchymal stem cells in oral reconstructive surgery: a systematic review of the literature. *J Oral Rehabil* **40**, 693-706, 2013
- 9) Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG and Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 13625-13630, 2000
- 10) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY and Shi S: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149-155, 2004
- 11) Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, Nishimura M, Saito M, Nakagawa K, Yamanaka K, Miyazaki K,

- Shimizu M, Bhawal UK, Tsuji K, Nakamura K and Kato Y: Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* **20**, 399-409, 2005
- 12) Lee BK, Choi SJ, Mack D and Oh SH: Isolation of mesenchymal stem cells from the mandibular marrow aspirates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **112**, e86-93, 2011
- 13) Ito K, Aoyama T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Jin Y, Nasu A, Ueda M, Kasai Y, Ashihara E, Kimura S, Maekawa T, Kobayashi A, Yoshida S, Niwa H, Otsuka T, Nakamura T and Toguchida J: A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by nonwoven fabric. *Tissue Eng Part C Methods* **16**, 81-91, 2010
- 14) Langer R and Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* **260**, 920-926, 1993
- 15) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147,

1999

- 16) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ and Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317, 2006
- 17) Akintoye SO, Lam T, Shi S, Brahim J, Collins MT and Robey PG: Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone* **38**, 758-768, 2006
- 18) Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R and Quarto R: Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* **287**, 98-105, 2003
- 19) Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H and Matsuzaki Y: Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* **206**, 2483-2496, 2009

- 20) D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA and Howard GA:
Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* **14**, 1115-1122, 1999
- 21) Stolzing A, Jones E, McGonagle D and Scutt A: Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* **129**, 163-173, 2008
- 22) Han J, Okada H, Takai H, Nakayama Y, Maeda T and Ogata Y:
Collection and culture of alveolar bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells from older individuals. *J Cell Biochem* **107**, 1198-1204, 2009
- 23) Muschler GF, Boehm C and Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* **79**, 1699-1709, 1997
- 24) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147, 1999
- 25) McLain RF, Fleming JE, Boehm CA and Muschler GF: Aspiration of

- osteoprogenitor cells for augmenting spinal fusion: comparison of progenitor cell concentrations from the vertebral body and iliac crest. *J Bone Joint Surg Am* **87**, 2655-2661, 2005
- 26) Raghuvanshi S, Sharma P, Singh S, Van Kaer L and Das G: *Mycobacterium tuberculosis* evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21653-21658, 2010
- 27) Yamaza T, Ren G, Akiyama K, Chen C, Shi Y and Shi S. Mouse mandible contains distinctive mesenchymal stem cells. *J Dent Res* **90**, 317-324, 2011
- 28) Kim RH, Mehrazarin S and Kang MK: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for oral and systemic diseases. *Dent Clin North Am* **56**, 651-675, 2012

Figure legends

Fig 1 Sampling method using a puncture needle. A: Internal needle and external cylinder of the puncture needle. B: Tip of the internal needle and external cylinder. C: Diagram of the sampling. D: Insertion of the puncture needle into the bone marrow. E: Aspiration of bone marrow fluid. F: Transfer of bone marrow aspirate from syringe to tube container.

Fig 2 Sampling method using a 18G needle. A: Aspiration of bone marrow fluid from drilled hole for implant placement using a syringe with 18G needle. B: Diagram of the sampling.

Fig 3 Flow diagram of the Bone Marrow MSC Separation Device. ①: Priming the column, ②: Processing bone marrow through the column, ③: Washing the column, ④: Harvesting MSC.

Fig 4 Spindle shaped stem cells in culture. Phase contrast microscopy, original magnification: X100.

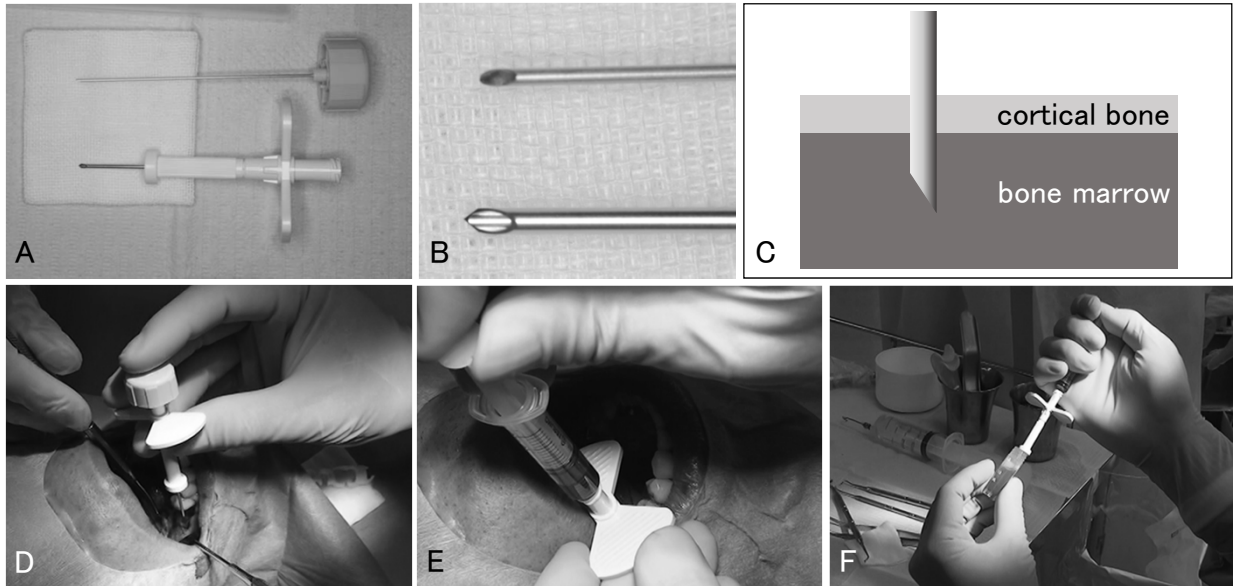


Fig 1

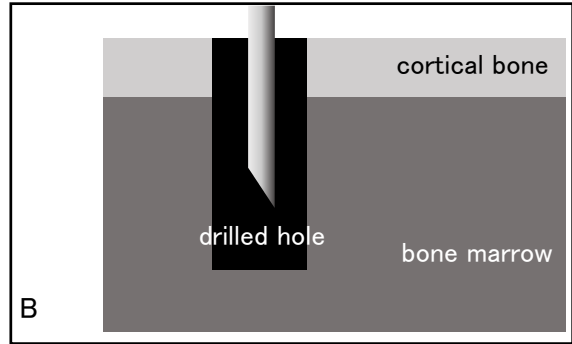
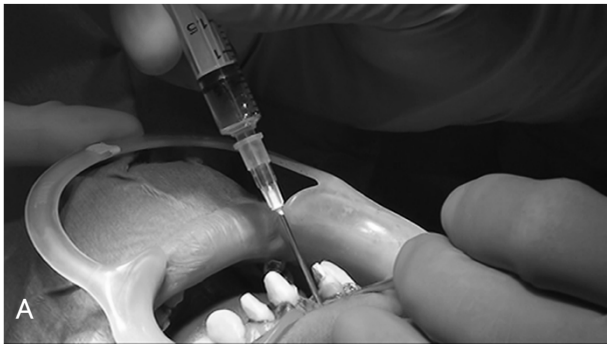


Fig 2

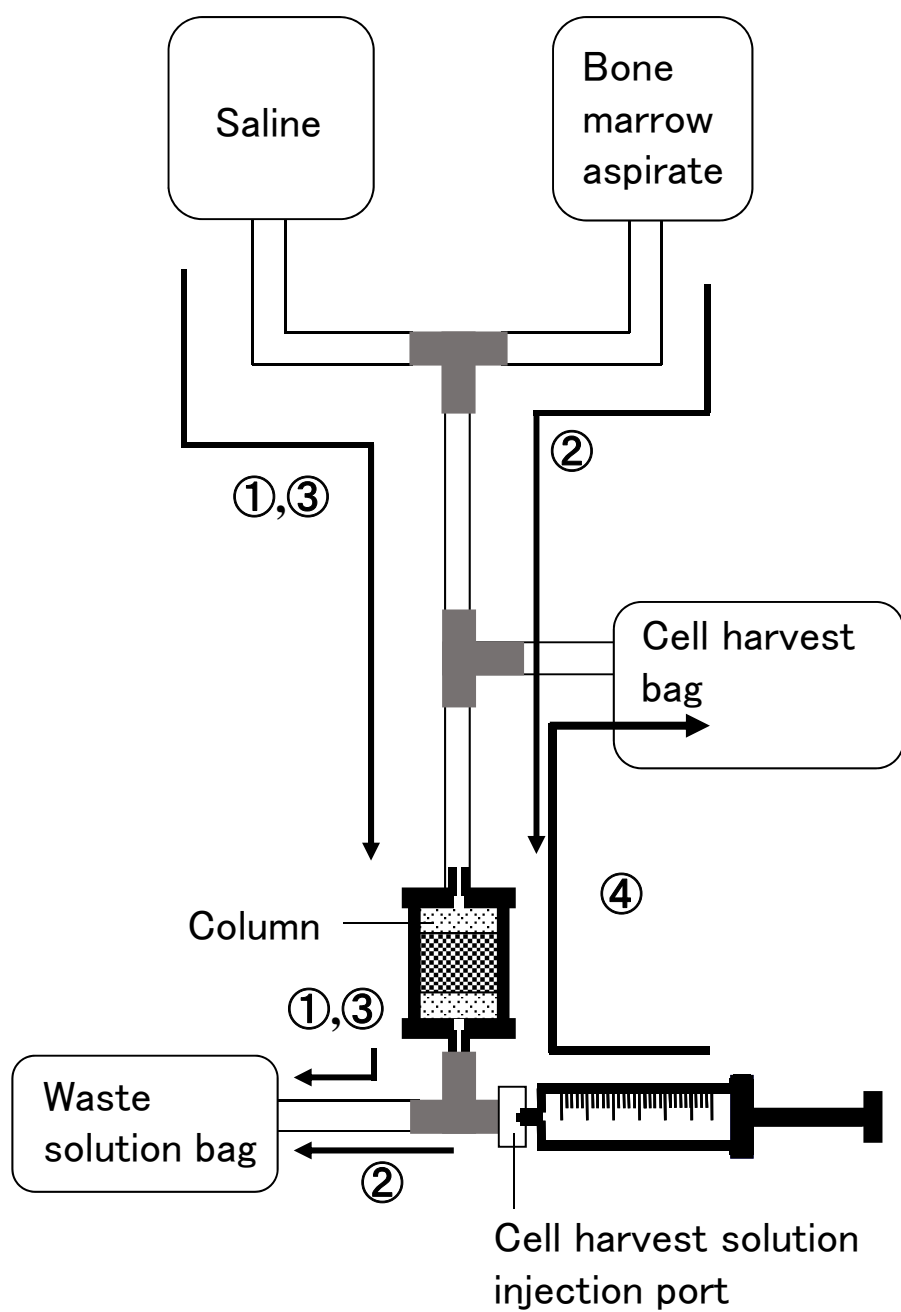


Fig 3

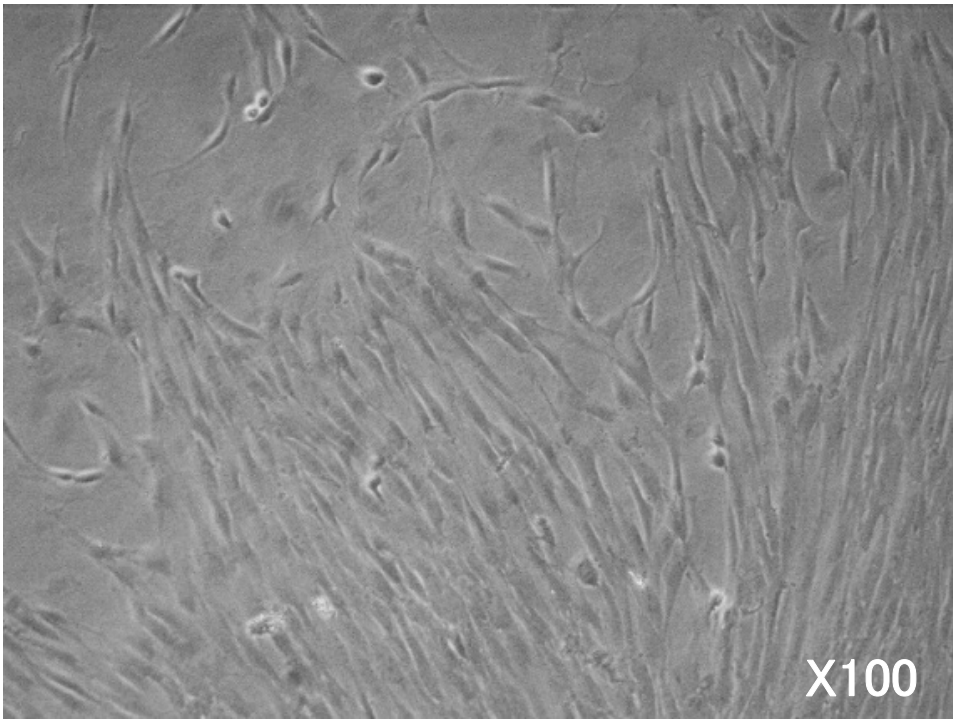


Fig 4