

歯の移動初期における歯根膜組織の大規模三次元イメージング

高橋 春香

緒言

矯正歯科治療においては、矯正力を歯に加えることで歯根膜に人為的に圧迫側と牽引側をつくり、圧迫側では骨吸収が、牽引側では骨形成が発現することによって歯は移動する^{1,2)}。特に圧迫側では、歯根膜に対するメカニカルストレスによって歯根膜の血管分布および血流を変化させることで圧迫側周囲歯槽骨のリモデリングが生じる²⁾。矯正的歯の移動では、歯根膜に加えられるメカニカルストレスの負荷によって大きく3段階の変化が生じる：

- (1) 歯根膜の変形による初期の移動
- (2) 圧迫側の歯根膜細胞の壊死による一時的な移動の停止または減速
- (3) 歯槽骨のリモデリングによる移動の再開^{3,4)}

このように歯根膜は矯正的歯の移動において、歯槽骨の改造を先導する重要な役割を担っており、従来から小動物による矯正的歯の移動モデルを用いた歯根膜の応答に関して数多くの研究が報告されている^{5,6,7)}。

歯根膜は歯根膜線維を主体とする線維性結合組織である。歯根膜線維はほとんどがコラーゲン線維から成り、その両端はセメント質と歯槽骨に進入するシャーパー線維 (Sharpey's fiber) として、ヒトでは約 200 μm の幅に広く分布する^{8,9)}。コラーゲン線維束の一本あたりの直径は約 4.5 μm で Shackleford らは Scanning Electron Microscope (SEM) を用いて細胞成分を取り除いたラットの歯根膜を詳細に観察し、歯根膜線維を太い主線維と細い中立線維に区別することで、主線維は常にセメント質から歯槽骨壁に向かって走るが中立線維は特定の方向性を持たないことを示した。さらに主線維と中立線維は相互に吻合する様子から、あらゆる方向からのメカニカルストレスに対する局所的な応力集中を軽減していると述べた¹⁰⁾。平嶋らは Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope (FIB-SEM) を用いてマウスの下顎第一大臼歯の歯周組織を三次元観察し、正常な歯根膜のコラーゲン線維束において水平線維群、斜走線維群、根尖線維群では線維束の形態が異なり、斜走線維群と根尖線維群に比較して水平線維群は分岐が多く直径が太いことを示した¹¹⁾。

このように歯根膜に富むコラーゲン線維の解析は進んでいるものの、歯の移動初期における歯根膜の変形は歯根膜が圧縮する大きな構造変化が生じるにも関わらず、その全貌の詳細な三次元解析は行われていない。これは、FIB-SEM による観察は深さ方向の分解能が切片の厚さに依存することから解像度と観察範囲のトレードオフの問題が生じることが原因と考えられる。つまり、高い解像度による観察は観察範囲を制限する。FIB-SEM は集束イオンビーム (FIB) による試料表層の切削と、その切削面の SEM 観察を繰り返すことで (シリアルセクションング)、高い分解能で細胞や組織の三次元再構築を行う連続スライス SEM 法を可能にしている^{12,13)}。一般的な FIB のイオン源にはガリウム (Ga) の液体イオン源が用いられる。Ga イオンビームは数 kV から数 10 kV の高電圧により加速され、レンズによりそのビーム径を数～数 100 nm まで集束することで数 nm の位置精度で微細加工を行うことができる¹⁴⁾。加工速度はイオンビームの電流に依存するが、Ga イオンビームの場合は電流値が 0.5～45 nA 程度と小さいことから、現実的には加工体積の最大値は 20～30 μm^3 に制限され、高い解像度で広範な領域を観察することは

困難である¹²⁾。

近年、大面積加工に対する要求が高くなっていることから、キセノン (Xe) プラズマ等のガスイオン源を使ったプラズマ FIB の利用が進められている¹⁴⁾。この Xe プラズマ FIB-SEM は上記の観察サイズの問題を一挙に解決することができる。最近の技術の進展により、Xe プラズマイオンビームは Ga イオンビームと比較して約 50 倍の電流 (1.5 pA~2.5 μ A) で、高速かつ数 $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ の広範な領域の加工が可能となった^{15,16)}。Xe イオンビームによって切削された試料表面は、従来と同様に内部組織のコントラストを二次電子あるいは反射電子によって SEM で観察できることから、Xe プラズマ FIB-SEM ではナノスケールの高解像度が保たれた¹⁵⁾。本研究では、歯の移動初期における歯根膜組織の詳細な三次元解析を行い、さらに歯根膜コラーゲン線維束の構造変化に関する知見を獲得することを目的とし、Xe プラズマ FIB-SEM を用いて歯根膜の三次元観察を行い、コラーゲン線維束の三次元形態計測を行った。

FIB-SEM より得られた連続 SEM 像からの組織抽出には、これまで主に目視判定(セグメンテーション)による手動抽出が行われてきた。約 1000 枚全ての SEM 像から組織を手動抽出するには数ヶ月単位の時間を要する。また手動抽出では、組織抽出を行う観察者間の能力差や観察者内エラーにより結果が左右され、領域抽出の再現性が低下する可能性がある。Tabata らは、マウスの大腿骨を FIB-SEM で観察し、人工知能 (AI) の一分野である機械学習 (ランダムフォレスト法) を用いることで、得られた連続 SEM 像から骨細胞突起と骨細管の領域抽出に成功した¹⁷⁾。機械学習技術の進歩は大量の医用画像データの処理を容易にすると考えられていたが、有用性には制限があることが知られるようになった。これは既に学習されたデータと適合しにくい複雑なデータが入力されると機械学習による領域抽出が非常に不正確になり、処理に多くの時間が消費されることがわかったためである。機械学習の最も新しい手法である深層学習は、脳神経回路の構造をヒントにした多層ニューラルネットワーク (Deep Neural Network) を用いることで人間の認識精度を大きく上回り、大量のデータを短時間で処理することを可能とした^{18,19,20)}。2015 年に発表された深層学習モデルである U-Net は、生物医科学を対象として開発され、多層ニューラルネットワークに畳み込み層 (Convolution Layer) を追加した畳み込みニューラルネットワーク (Convolutional Neural Network) を取り入れた。U-Net における畳み込み層では、教師画像を領域の重複を含む複数の小さな Patch に分割してそれぞれ学習することでデータを増強し、少ない教師画像であっても高精度な領域抽出を可能とした。さらに物体の局所的特徴と位置情報を統合して学習することで細胞の識別に適することがわかっている²¹⁾。そこで我々は、歯根膜におけるコラーゲン線維束および細胞核の組織抽出に機械学習だけでなく深層学習モデル U-Net を応用した。

材料および方法

1. 実験動物

本研究は、岡山大学動物実験委員会 (OKU-2021451) のもと、すべての動物実験を実施した。実験には、8 週齢の ICR マウス (日本クレア, 東京) を用いた。実験の間、室温を 21 から 24°C の間に保ち、粉餌と水道水を自由に摂取できる状態とした。

2. 矯正的歯の移動方法

これまでの報告⁷⁾を参考に、上顎左側第一大臼歯と切歯の間に直径 0.1 mm、長さ 5.0 mm のニッケルチタンコイルスプリング (トミーインターナショナル, 東京) を装着した (図 1)。装置の装着は、マウスの腹腔内に三種混合麻酔薬 (塩酸メドミン 0.3 mg/kg, ミダゾラム 2 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg) を投与した後、仰臥位に固定して行った。コイルスプリングは臼歯および切

歯に対してそれぞれ直径 0.16 mm のステンレス線で結紮して固定した。コイルスプリングは 10 gf の力で至適矯正力が負荷されるように活性化した。

3. 試料作製および組織染色

歯の移動開始 24 時間後に 4%パラホルムアルデヒド固定液 (PFA) を用いて灌流固定を行った。灌流固定後に上顎骨を採取し、装置を装着した上顎左側第一大臼歯の周囲歯周組織を Orthodontic tooth movement (以下, OTM) 群, 装置を装着していない右側第一大臼歯の周囲歯周組織を Control 群とした。採取した組織は, 4%PFA に浸透し 4°Cで 24 時間の後固定を行った後, 4°Cで 24 時間 OSTEOSOFT (Merck Millipore, USA) にて脱灰し, HEPES 緩衝液で十分に洗浄した。HEPES 緩衝液は, HEPES 120mM (片山化学工業株式会社, 大阪), 塩化ナトリウム 200 mM (ナカライテスク株式会社, 京都) を 1000 ml の純水に溶解させ, 1M 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 7.4 に調整したのち 443.9 mM の塩化カルシウム (ナカライテスク株式会社, 京都) を加えた。洗浄後は電子染色を行った。電子染色は 4%四酸化オスミウム (TAAB, GBR) と HEPES 緩衝液で希釈した 3%フェロシアン化カリウム三水和物 (Sigma Aldrich, USA) を同量合わせた溶液に 4°Cで 1 時間浸漬した。HEPES 緩衝液で十分洗浄し, 次に 106 mM チオカルボキシヒドラジド溶液に室温で 40 分間浸漬した。純水で十分に洗浄後, 2%四酸化オスミウム溶液に 4°Cで 1 時間浸漬し, 試料をエタノール系列 (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%無水エタノール) でそれぞれ 20 分ずつ脱水し酸化プロピレンで置換した。脱水後, 酸化プロピレンとエポキシ樹脂 EPON812 (Agar Scientific, GBR) の酸化プロピレン : エポキシ樹脂 = 2 : 1 の混合物, 等量混合物, 1 : 2 の混合物にそれぞれ 6 時間浸漬後, 真空下でエポキシ樹脂に一晩浸漬した。エポキシ樹脂に包埋し, 60°Cの常温器で 2 日間重合させた。

包埋した試料は, 第一大臼歯の歯根 1/2 程度の高さとなるように規定し水平断面と平行に研磨し, SEM で予備観察を行った。次に, Xe プラズマ FIB-SEM を用いて取得する断面 SEM 像を冠状断面と規定し, 冠状断面と平行に研磨することで Xe プラズマ FIB-SEM の観察領域が試料のエッジと一致するように作製した。その後, クロスセクションポリッシャー (CP) で研磨を行いさらに歪みのない観察面を作製した。

4. 観察領域

マウス第一大臼歯に矯正力を付与すると, 根尖部を抵抗中心とし臼歯は近心方向へ傾斜移動する^{22,23)}。したがって本研究では, 観察領域が第一大臼歯口蓋根の頬舌的に 1/2 程度の範囲かつ高さは歯根の 1/2 程度となる様に試料を作製した。歯の移動および観察領域の確認のためマイクロ CT (SkyScan1174, Bruker, BE) を用いて撮影した (図 2)。

5. Xe プラズマ FIB-SEM を用いた歯周組織の三次元観察

試料の観察は国立研究開発法人物質・材料研究機構所有の Xe プラズマ FIB-SEM (Helios 5 PFIB UXe, Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。本研究では, イオンビームに Xe を用いた。FIB 加工の加速電圧は 30kV, SEM 加速電圧は 2kV に設定した。SEM の検出器は, レンズ下のリトラクタブル反射電子検出器を使用した。

断面 SEM 像は Control 群において $73.4 \times 133.5 \mu\text{m}^2$ の領域を 1468×2670 pixel に設定した。観察試料の深さは FIB によるセクションングピッチを 50 nm に設定し, 1706 枚の SEM 像を取得した。 $50 \times 50 \times 50 \text{ nm}^3$ のボクセルサイズで $73.4 \times 133.5 \times 85.3 \mu\text{m}^3$ の領域のデータを得た。

OTM 群では, $218.4 \times 127.4 \mu\text{m}^2$ の領域を 4368×2548 pixel に設定した。試料の深さは FIB による

セクションングピッチを 50 nm に設定し, 1538 枚の SEM 像を取得した. $50 \times 50 \times 50 \text{ nm}^3$ のボクセルサイズで $218.4 \times 127.4 \times 76.9 \text{ } \mu\text{m}^3$ の領域のデータを得た.

取得した連続 SEM 像はソフトウェア Dragonfly (Comet Technologies Canada Inc, CA) を用いて三次元再構築を行い, 取得した断層面とは別の任意の断層面も観察することを可能とした. つまり, 冠状断面 (y-z 平面) の連続 SEM 像から三次元再構築によって水平断面 (x-z 平面) と矢状断面 (x-y 平面) を確認することができた. なお, 画像は観察が容易になるように白黒反転し, TEM 様の画像に変換した.

6. 人工知能を用いた歯根膜におけるコラーゲン線維束と細胞核の抽出

領域抽出は, ソフトウェア Dragonfly の拡張機能である Segmentation Wizard を, 学習初期に機械学習 (ランダムフォレスト法) として入力画像である連続断層画像の一部を使用し, コラーゲン線維束, 細胞核の 2 つの構造に目視判定で特徴ピクセル値を設定し教師画像を作成した. 本研究では, コラーゲン線維束の走行方向を確認できる矢状断面像を用いて教師画像を作成した. 特徴ピクセル値は, ランダムフォレスト法をもとにランダムに複数選択され, 複数個の決定木で得られる重ね付き平均確率に基づいて識別させた²⁴⁾. 識別された画像 (推論画像) では, 全ピクセルがコラーゲン線維束, 細胞核または周囲基質のいずれかに識別される. ここで識別を誤ったピクセルを手動で修正し, 正確な教師画像を作成した. その後, さらに高精度な領域抽出のため深層学習 (U-Net) に移行した. 機械学習によって作成された教師画像を 64×64 の小さな Patch に分割し, そのうち 80% は学習に, 20% は領域抽出の精度検証に使用した. 学習に使用した Patch は, 拡大縮小・回転・反転等され学習データを増強した. 学習モデルを客観的に評価するために, 学習には用いられていない検証データの精度を評価基準とした¹⁹⁾. このように教師画像の作成, 学習と評価, 推論画像の生成と修正, 学習と評価の一連の流れを繰り返すことで学習精度を向上させた. Control 群では $73.4 \times 133.5 \times 85.3 \text{ } \mu\text{m}^3$ の領域を関心領域 (ROI) として組織抽出を行い, OTM 群では $78.9 \times 51.4 \times 10 \text{ } \mu\text{m}^3$ の領域の組織抽出を行った.

7. 歯根膜におけるコラーゲン線維束と細胞核の生体ボリュームイメージの作成

人工知能によって領域抽出されたコラーゲン線維束, 細胞核の矢状断面像からソフトウェア Dragonfly を用いて三次元再構築を行い領域抽出した矢状断面像で線維束の走行方向を確認し, さらに走行方向に垂直な線維束の断面像も観察した.

8. 歯根膜におけるコラーゲン線維束の断面形態の解析

人工知能が領域抽出したコラーゲン線維束のみを三次元再構築し, コラーゲン線維束の走行方向に垂直な断面像を取得した. 断面像では, コラーゲン線維束とその他組織を二値化した. 続いてセメント質および歯槽骨に接する断面を規定し, セメント質側および歯槽骨側における線維束断面像の二値化データを得た. 二値化データから, $32.5 \times 32.5 \text{ } \mu\text{m}^2$ の範囲を単位面積と規定しソフトウェア Image J fiji (US National Institutes of Health, USA) を用いて Control 群, OTM 群のセメント質側と歯槽骨側における線維束の断面積と断面の長径, 短径を計測した. さらに長径に対する短径の割合を扁平率とし評価した. つまり, 扁平率が 1 に近づくほど線維束断面形態が正円に近似するように規定した. Control 群, OTM 群それぞれにおける断面積と扁平率の値をセメント質側と歯槽骨側で比較した. 次にセメント質側における扁平率の値を Control 群, OTM 群で比較した. 歯槽骨側における扁平率の値を Control 群, OTM 群で比較した. セメント質側における断面積の値を Control 群, OTM 群で

比較した。歯槽骨側における断面積の値を Control 群, OTM 群で比較した。

9. 統計解析

実験から得られたデータは、平均値±標準誤差 (SE) として表した。各群の平均値の比較は、F 検定を行って等分散性を確認した後、Student の t 検定を用いた。検定の多重性に伴う P 値の補正は Bonferroni 法を用いた。すべての分析は、Microsoft Excel for Mac version 16.49 を用いた。有意水準は 5%とした。

結果

1. 矯正歯の移動による組織学的変化

電子染色を行った水平断切片を SEM で観察 (図 3) し、歯の移動開始 24 時間で上顎左側第一大臼歯の圧迫側歯根膜の圧縮および牽引側歯根膜の伸展を確認することができた。矯正力を付与していない第二大臼歯歯根膜は近心側、遠心側で均等な厚みを認めた。圧迫側歯根膜の観察のため、Xe プラズマ FIB-SEM における観察範囲を図 3 白枠と規定した。

2. Xe プラズマ FIB-SEM を用いた歯周組織の高詳細三次元観察

Xe プラズマ FIB-SEM を用い、Control 群では上顎右側第一大臼歯の近心側歯周組織における $73.4 \times 133.5 \times 85.3 \mu\text{m}^3$ の領域を、 $50 \times 50 \times 50 \text{nm}^3$ のボクセルサイズの解像度で撮影した (図 4)。図 4A に連続 SEM 像を三次元構築した像、図 4B には連続 SEM 像を再構築した矢状断面 SEM 像を示した。象牙質 (D) や、セメント質 (C) から歯槽骨 (AB) の間に介在する歯根膜 (PDL) 全体を観察することができた。歯根膜内には血管 (BV) を認めた。図 4C, D には、図 4B の拡大像を示した。歯根膜に富むコラーゲン線維束 (FB) や歯根膜細胞 (PDC) を観察することができた。図 4C では、歯槽骨内に骨細胞 (OCY) を観察することができた。コラーゲン線維束はセメント質側 (図 4D) に比較し歯槽骨側 (図 4C) が太く観察された。

OTM 群では、上顎左側第一大臼歯の圧迫側歯周組織における $218.4 \times 127.4 \times 76.9 \mu\text{m}^3$ の領域を、 $50 \times 50 \times 50 \text{nm}^3$ のボクセルサイズの解像度で撮影した (図 5)。図 5A に連続 SEM 像を三次元構築した像、図 5B には連続 SEM 像を再構築した矢状断面 SEM 像を示した。象牙質や、セメント質から歯槽骨の間に介在する歯根膜全体を観察することができた。歯根膜内には血管を観察することができた。図 5C, D には、図 5B の拡大像を示した。図 5C では、歯根膜内にコラーゲン線維束を観察することができた。図 5D では、歯槽骨内には破骨細胞 (OC) を観察することができた。

3. 歯根膜におけるコラーゲン線維束と細胞核の生体ボリュームイメージの観察

歯根膜の詳細な三次元観察を行うため、コラーゲン線維束の走行方向を確認できる矢状断面像を用いて人工知能による組織の自動抽出を行い、境界明瞭に抽出されたコラーゲン線維束 (ピンク色) と細胞核 (緑色) を図 6 に示した。このように連続 SEM 像の一枚一枚を組織抽出し、OTM 群における $51.4 \times 78.9 \times 10 \mu\text{m}^3$ の領域に対して三次元構築を行った (図 7)。図 7A~C は Xe プラズマ FIB-SEM で取得した SEM 像を三次元構築し、図左から順に Y 軸を中心にそれぞれ 0 度、160 度、320 度回転させたものを示す。図 7D~F は抽出したコラーゲン線維束と細胞核を全て表示し、図 7A~C に合わせて回転させたものを示す。図 7G~I は抽出したコラーゲン線維束と細胞核のみを表示し、同様に回転させたものを示す。コラーゲン線維束は、セメント質から歯槽骨壁に向かって互いに分岐、吻合しながら規則性を持って走行していた。また、コラーゲン線維束の走行方向と細胞核の長軸方向は異なっていることが観察された。

次に $73.4 \times 133.5 \times 85.3 \mu\text{m}^3$ の領域の Control 群に対して三次元構築を行った (図 8) . 図 8A~C は Xe プラズマ FIB-SEM で取得した SEM 像を三次元構築し, 図左から順に Y 軸を中心にそれぞれ 0 度, 160 度, 320 度回転させたものを示す. 図 8D~F は抽出したコラーゲン線維束と細胞核を全て表示し, 図 8A~C に合わせて回転させたものを示す. 図 8G~I は抽出したコラーゲン線維束と細胞核のみを表示し, 同様に回転させたものを示す. 層状に折り重なった網目状のコラーゲン線維束の周囲に存在する多数の細胞核を三次元的に観察することができた.

4. 歯根膜におけるコラーゲン線維束の断面形態の解析

人工知能 (ランダムフォレスト法, U-Net) によって領域抽出されたコラーゲン線維束のみをその他組織と二値化し, セメント質側および歯槽骨側における線維束断面像を得た (図 9) .

Control 群, OTM 群における線維束の断面積と扁平率をセメント質側, 歯槽骨側でそれぞれ計測し, 解析を行ったところ, Control 群ではセメント質側に比較し歯槽骨側の断面積が有意に大きかった (セメント質側: $3.00 \pm 0.30 \mu\text{m}^2$, 歯槽骨側: $14.43 \pm 1.95 \mu\text{m}^2$) (図 10A) . 扁平率は有意な差を認めなかった (セメント質側: 0.64 ± 0.01 , 歯槽骨側: 0.63 ± 0.03) (図 10B) . OTM 群ではセメント質側に比較し歯槽骨側の断面積が有意に大きかった (セメント質側: $3.24 \pm 0.27 \mu\text{m}^2$, 歯槽骨側: $9.24 \pm 1.29 \mu\text{m}^2$) (図 11A) . 扁平率は歯槽骨側に比較しセメント質側が有意に小さく, 断面形態は扁平にであった (セメント質側: 0.56 ± 0.01 , 歯槽骨側: 0.67 ± 0.02) (図 11B) .

セメント質側と歯槽骨側における線維束の扁平率を Control 群, OTM 群でそれぞれ比較したところ, セメント質側において Control 群と比較し OTM 群は有意に扁平であった (Control 群: 0.64 ± 0.01 , OTM 群: 0.56 ± 0.01) (図 12A) . 歯槽骨側において Control 群と OTM 群は有意な差を認めなかった (Control 群: 0.63 ± 0.03 , OTM 群: 0.67 ± 0.02) (図 12B) .

セメント質側と歯槽骨側における線維束断面積を Control 群, OTM 群でそれぞれ比較したところ, セメント質側において Control 群と OTM 群は有意な差は認めなかった (Control 群: $3.00 \pm 0.30 \mu\text{m}^2$, OTM 群: $3.24 \pm 0.27 \mu\text{m}^2$) (図 13A) . 歯槽骨側において Control 群と比較し OTM 群は有意に小さかった (Control 群: $14.43 \pm 1.95 \mu\text{m}^2$, OTM 群: $9.24 \pm 1.29 \mu\text{m}^2$) (図 13B) .

考察

歯根膜は, 矯正歯科治療において歯の移動を先導する重要な役割を担っている^{1,2)}. これまでに歯根膜のほとんど占めるコラーゲン線維束の観察には SEM や FIB-SEM が用いられてきた^{10,11)}. しかしながら, 解像度と観察範囲のトレードオフの問題から, 歯根膜の全貌を詳細かつ三次元的に把握することは困難であった. そこで今回, Xe プラズマ FIB-SEM を用いることで, 約 $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ にわたる広範な領域をボクセルサイズが $50 \times 50 \times 50 \text{nm}^3$ の高解像度で観察することができた. これにより歯槽骨とセメント質に介在する歯根膜を詳細に観察することが可能となった.

Xe プラズマ FIB-SEM は高いビーム電流持つことから, 主に材料および半導体研究において開発され, 生体組織の観察に関する報告が数少ない新しい顕微鏡である¹⁵⁾. 本研究では, Xe プラズマ FIB-SEM を用いてマウス上顎第一大臼歯の歯周組織の約 $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ にわたる広範な領域をボクセルサイズが $50 \times 50 \times 50 \text{nm}^3$ の高解像度で観察することに成功した. これにより歯根膜に広く分布するコラーゲン線維束の一本一本の全長や血管, 歯根膜細胞や, 加えて歯槽骨に存在する破骨細胞, 骨細胞を詳細に観察することが可能となった.

取得した連続 SEM 像はソフトウェア Dragonfly を用いて三次元再構築することで, 微細な構造物の三

次元観察を行うことができる。本研究では、取得した冠状断面だけでなく矢状断面を観察することで冠状断面では観察することが不可能であったセメント質側から歯槽骨側へ向かって一定の規則性を持ってコラーゲン線維束が走行する様子を観察することが可能となった。

次に、機械学習だけでなく深層学習などの人工知能を応用することで歯根膜におけるコラーゲン線維束と細胞核の自動抽出に成功した。これによりコラーゲン線維束はセメント質側から歯槽骨側に向かって互いに分岐、吻合しながら規則性を持って走行していることが明らかになった。歯根膜のコラーゲン線維束は、I型コラーゲンが主体を成し、I型コラーゲンはヒトの皮膚や腱、筋膜、骨など多くの組織の構成要素を担っている²⁵⁾。過去の報告におけるヒトの腱の観察では、筋肉と骨を連結する腱の主成分であるコラーゲン細線維の規則的な走行を明らかにしており²⁶⁾、本研究の結果と相似する。さらに層状に折り重なった網目状のコラーゲン線維束の周囲に存在する多数の細胞核を三次元的に観察することができた。これはコラーゲン線維束が複数の歯根膜細胞に覆われている¹¹⁾という以前の文献と同様の結果を示唆していると考えられる。機械学習は人工知能の一分野であり、連続SEM像の一部を用いて、抽出したい組織の特徴づけ（教師データの作成）を観察者が行い、データの規則性を人工知能が自動で発見する。その規則を残りの数1000枚のSEM像に応用して自動的に領域抽出を行う。しかしながら本研究においては、広範な領域を高解像度に観察することで細胞群や血管、コラーゲン線維束などの識別が困難な多数の構造物の情報を得ており、大量なデータ処理が必要とされるため、機械学習のみによる目的組織の抽出は困難となることが予想された。そこで機械学習だけでなく機械学習の最も新しい手法である深層学習を応用した。深層学習は人間が過程を追えないほど複雑な多層ニューラルネットワークを用いることで、大量のデータを高精度に短時間で処理することを可能とした^{20,21)}。加えて機械学習において人間が行う教師データの作成が深層学習では自動化されている。このことから、深層学習の特徴として学習開始時点において教師データの十分な蓄積が必要とされる²⁰⁾。そこで本研究では学習開始時点では機械学習を用い、簡易的に教師データの作成を行った。ある程度機械学習が進行し十分なデータが蓄積された時点で深層学習に移行し、学習を続けた。このようにして先に述べた問題を回避し、より短時間で高精度な領域抽出ができたと考えられる。

さらに、人工知能を応用して抽出したコラーゲン線維束に対してソフトウェアDragonflyを用いて三次元再構築することで、線維束の走行方向と、走行方向に垂直な線維束の断面を確認することができた。そこで、セメント質側と歯槽骨側に分けてそれぞれのコラーゲン線維束両端の断面形態を解析し、歯の移動初期におけるコラーゲン線維束の形態変化を解析することが可能となった。コラーゲン線維は3重螺旋構造を示すトロポコラーゲンが規則正しく約67nmずつずれて架橋結合することにより合成されるコラーゲン細線維の束で、引張応力を加えることでコラーゲン分子の緩みや架橋構造の密度変化が生じ、変形することが示唆されている²⁷⁾。本研究ではコラーゲン線維がさらに束となったコラーゲン線維束の形態変化を観察しており、矯正力による変形や断面積の変化が予想された。したがってそれぞれの断面形態の比較について実験結果をもとに考察する。

1) 部位別(セメント質側, 歯槽骨側)の比較

Control群とOTM群はともにセメント質側よりも歯槽骨側の線維束断面積が有意に大きいことがわかった。これはセメント質側から徐々に複数のコラーゲン線維束が合流していくことに起因すると考えられる。一方でHashimotoらは、ニワトリの頭蓋骨の詳細な観察から脳の成長に伴って骨組織の成長方向に伸展力が生じることで、束状構造をなしたコラーゲン細線維が骨梁の長軸方向に多く走行するよう

になると提唱した²⁸⁾。このようにコラーゲン線維の合成、成熟、走行はメカニカルストレスと密接に関連していると考えられる。歯根膜が歯を支持し、歯に加えられた多方面のメカニカルストレスを緩衝する形態学的適応の証左を示す可能性がある。

2) 矯正歯の移動による変化

矯正歯の移動によって、セメント質側の断面形態は有意に扁平に変形し、歯槽骨側の断面積は有意に小さくなることがわかった。セメント質側の変化に関しては矯正力による局所的な圧縮力によるコラーゲンの架橋結合の変化が原因と考えられる。歯槽骨側の変化に関しては、線維束の小型化が著明であり、コラーゲン代謝が活性化されたことが要因ではないか考えられる。歯根膜のコラーゲン代謝活性は皮膚や歯肉と比較してかなり高く²⁹⁾、さらに歯の移動初期から圧迫側でカテプシン K やコラゲナーゼの発現が上昇することがわかっている^{30,31,32)}。コラゲナーゼは細胞外マトリックスを基質とするタンパク分解酵素群の Matrix metalloproteinases (MMPs) の1つで組織の吸収や改造に関与している³³⁾。中でもコラーゲンを基質としたコラゲナーゼ群と呼ばれる MMP-1, MMP-8, MMP-13 は骨中の有機成分の分解に重要な役割を果たし³²⁾、圧迫側の歯槽骨表層や骨細胞、骨芽細胞に発現する。歯根膜では圧迫側歯根膜細胞において一時的に発現する^{32,35)}。今回我々が行ったコラーゲン線維束の断面形態の検討において、歯の移動初期における歯槽骨側のみ断面積が有意に減少したことは、歯槽骨に存在する骨細胞や骨芽細胞がメカニカルストレスを感受することが引き金となってコラゲナーゼが発現することが線維束の形態変化に関与しているのではないかと推測した。今後はコラゲナーゼの局在や経時的な発現の確認を行うことで、メカニカルストレスに応答する細胞の挙動とそれに伴う組織学的な変化が示唆された。

以上のように本研究により、歯の移動初期における歯根膜組織の詳細が三次元的に明らかになった。今回の研究では歯の移動後 24 時間の圧迫側組織を観察したが、今後は牽引側についても検討を進める必要があると考えられた。

結言

Xe プラズマ FIB-SEM は、マウス上顎第一大臼歯の歯周組織をボクセルサイズが $50 \times 50 \times 50 \text{ nm}^3$ の高解像度で明瞭に観察することができ、一本一本のコラーゲン線維束の全長や、血管、歯根膜細胞、破骨細胞、骨細胞などの詳細な観察を広範な領域で行うことが可能となった。取得した連続 SEM 像の組織抽出に機械学習に加えて深層学習などの人工知能を応用してコラーゲン線維束と細胞核の自動抽出することに成功した。組織抽出したコラーゲン線維束と細胞核は三次元再構築することで、コラーゲン線維束はセメント質側から歯槽骨側に向かって一定の規則性を持って互いに分岐、吻合を繰り返しながら走行しており、層状に折り重なった網目状の線維束の周囲に存在する多数の細胞核を三次元的に観察できた。さらにコラーゲン線維束の断面形態を解析した結果、Control 群と OTM 群はともにセメント質側よりも歯槽骨側の線維束断面積が有意に大きいことが明らかになった。さらに歯の移動によって、セメント質側の断面形態は有意に扁平に変形し、歯槽骨側の断面積は有意に小さくなる。本研究によって、歯の移動初期におけるコラーゲン線維束の断面形態の変化は、局所的な圧縮力によるコラーゲンの結合変化やコラーゲン代謝の活性化など、メカニカルストレスとの関与が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導と御校閲を受け賜りました岡山大学学術研究院医歯薬学域歯科矯正学分野の上岡寛教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御指導御協力いただ

きました岡山大学学術研究院医歯薬学域歯科矯正学分野の橋本真奈助教に謹んで感謝の意を表します。さらに本研究の立案当初から終始懇切なる御助言、御指導を頂きました岡山大学歯学部先端領域研究センター長岡紀幸先生、国立研究開発法人物質・材料研究機構原徹先生、原由佳様、株式会社マックスネット上村逸郎様に謹んで感謝の意を表します。さらに本研究を行うにあたり、多くの貴重な御援助と御協力をいただきました岡山大学学術研究院医歯薬学域分子医化学分野の大野充昭准教授、歯科矯正学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1 Melsen B. Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 1999; 69(2): 151-158.
- 2 Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 129(4): 469.
- 3 Storey E. Tissue response to the movement of bones. *Am J Orthod.* 1973; 64(3): 229-247.
- 4 Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Fatemeh, Fukunaga T, Seiryu M, Daimaruya T, Takeshita N, Kamioka H, Adachi T, Ida H, Mayama A. Synergistic acceleration of experimental tooth movement by supplementary high-frequency vibration applied with a static force in rats. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 13969.
- 5 Ren Y, Maltha J C, Kuijpers-Jagtman A M. The rat as a model for orthodontic tooth movement-a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod.* 2004; 26(5): 483-490.
- 6 Kirschneck C, Proff P, Fanghaenel J, Behr M, Wahlmann U, Roemer P. Differentiated analysis of orthodontic tooth movement in rats with an improved rat model and three-dimensional imaging. *Ann Anat.* 2013; 195(6): 539-553.
- 7 Odagaki N, Ishihara Y, Wang Z, Ei Hsu Hlaing E, Nakamura M, Hoshijima M, Hayano S, Kawanabe N, Kamioka H. Role of Osteocyte-PDL Crosstalk in Tooth Movement via SOST/Sclerostin. *J Dent Res.* 2018; 97(12): 1374-1382.
- 8 Berkovitz B K. The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur J Orthod.* 1990; 12(1): 51-76.
- 9 Beertsen W, McCulloch C A, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997; 13: 20-40.
- 10 Shackelford J M. The indifferent fiber plexus and its relationship to principal fibers of the periodontium. *Am J Anat.* 1971; 131(4): 427-441.
- 11 Hirashima S, Ohta K, Togo A, Nakamura K I. 3D mesoscopic architecture of a heterogeneous cellular network in the cementum-periodontal ligament-alveolar bone complex. *Microscopy (Oxf).* 2022; 71(1): 22-33.
- 12 Inkson B J, Mulvihill M, Mobus G. 3D determination of grain shape in a FeAl-based nanocomposite by 3D FIB tomography. *Scripta Materialia.* 2001; 45(7): 753-758.
- 13 Schneider P, Meier M, Wepf R, Müller R. Serial FIB/SEM imaging for quantitative 3D assessment of the osteocyte lacuno-canalicular network. *Bone.* 2011; 49(2): 304-311.
- 14 Zhao L, Cui Y, Li J, Xie Y, Li W and Zhang J. The 3D Controllable Fabrication of Nanomaterials with FIB-SEM Synchronization Technology. *Nanomaterials (Basel).* 2023; 13(12):1839.

- 15 Burnett T L, Kelley R, Winiarski B, Contreras L, Daly M, Gholinia A, Burke M G, Withers P J. Large volume serial section tomography by Xe Plasma FIB dual beam microscopy. *Ultramicroscopy*. 2016; 161: 119-129.
- 16 Liu J, Niu R, Gu J, Cabral M, Song M, Liao X. Effect of Ion Irradiation Introduced by Focused Ion-Beam Milling on the Mechanical Behaviour of Sub-Micron-Sized Samples. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 10324.
- 17 Tabata K, Hashimoto M, Takahashi H, Wang Z, Nagaoka N, Hara T, Kamioka H. A morphometric analysis of the osteocyte canaliculus using applied automatic semantic segmentation by machine learning. *J Bone Miner Metab*. 2022; 40(4): 571-580.
- 18 Motozawa N, An G, Takagi S, Kitahata S, Mandai M, Hirami Y, Yokota H, Akiba M, Tsujikawa A, Takahashi M, Kurimoto Y. Optical Coherence Tomography-Based Deep-Learning Models for Classifying Normal and Age-Related Macular Degeneration and Exudative and Non-Exudative Age-Related Macular Degeneration Changes. *Ophthalmol Ther*. 2019; 8(4): 527-539.
- 19 Falk T, Mai D, Bensch R, Cicek O, Abdulkadir A, Marrakchi Y, Bohm A, Deubner J, Jackel Z, Seiwald K, Dovzhenko A, Tietz O, Dal Bosco C, Walsh S, Saltukoglu D, Tay T L, Prinz M, Palme K, Simons M, Diester I, Brox T, Ronneberger O. U-Net: deep learning for cell counting, detection, and morphometry. *Nat Methods*. 2019; 16(1): 67-70.
- 20 Manco L, Maffei N, Strolin S, Vichi S, Bottazzi L, Strigari L. Basic of machine learning and deep learning in imaging for medical physicists. *Phys Med*. 2021; 83: 194-205.
- 21 Olaf R, Philipp F, Thomas B. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. *Lecture Notes in Computer Science*. 2015; 9351.
- 22 Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod*. 1967; 53(10): 721-745.
- 23 Ibrahim A Y, Gudhimella S, Pandruvada S N, Huja S S. Resolving differences between animal models for expedited orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2017; 20: 72-76.
- 24 Speiser J L, Miller M E, Tooze J, Ip E. A Comparison of Random Forest Variable Selection Methods for Classification Prediction Modeling. *Expert Syst Appl*. 2019; 134: 93-101.
- 25 Ruth N, Pauzi M R, Hasnah B. Current Insights into Collagen Type I. *Polymers (Basel)*. 2021; 13(16): 2642
- 26 Svensson R B, Herchenhan A, Starborg T, Larsen M, Kadler K E, Qvortrup K, Magnusson S P. Evidence of structurally continuous collagen fibrils in tendons. *Acta Biomater*. 2017; 50: 293-301.
- 27 Depalle B, Qin Z, Shefelbine S J, Buehler M J. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015; 52: 1-13.
- 28 Hashimoto M, Nagaoka N, Tabata K, Tanaka T, Osumi R, Odagaki N, Hara T, Kamioka H. Three-dimensional morphometry of collagen fibrils in membranous bone. *Integr Biol (Camb)*. 2017; 9(11): 868-875.
- 29 Sodek J. A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Arch Oral Biol*. 1977; 22(12): 655-665.

- 30 Domon S, Shimokawa H, Matsumoto Y, Yamaguchi S, Soma K. In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. Arch Oral Biol. 1999; 44(11): 907-915.
- 31 Ohba Y, Ohba T, Terai K, Moriyama K. Expression of cathepsin K mRNA during experimental tooth movement in rat as revealed by in situ hybridization. Arch Oral Biol. 2000; 45(1): 63-69.
- 32 Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae J W, Mitani H, Okazaki M, Sasano Y. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. J Dent Res. 2003; 82(8): 646-651.
- 33 Nagase H, Woessner J F. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999; 274(31): 21491-21494.
- 34 Nakamura H, Sato G, Hirata A, Yamamoto T. Immunolocalization of matrix metalloproteinase-13 on bone surface under osteoclasts in rat tibia. Bone. 2004; 34(1): 48-56.
- 35 Redlich M, Reichenberg E, Harari D, Zaks B, Shoshan S, Palmon A. The effect of mechanical force on mRNA levels of collagenase, collagen type I, and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingivae of dogs. J Dent Res. 2001; 80(12): 2080-2084.

脚注

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 65 回歯科基礎医学会学術大会（2023 年 6 月，東京）

第 82 回日本矯正歯科学会学術大会(2023 年 11 月，新潟)

図の説明

図 1 実験的歯の移動方法

マウスにおける実験的歯の移動に関する模式図と口腔内写真. ニッケルチタン (Ni-Ti) コイルスプリングを切歯と上顎左側第一大臼歯 (M1) に対して結紮した. それぞれ矢印 (f) は矯正力の作用方向, M2 は第二大臼歯, M3 は第三大臼歯を示している.

図 2 マイクロ CT 立体構築画像と水平断面像, 矢状断面像による観察位置の確認

- (A) Control 群（上顎右側）における CT 像の立体構築像.
- (B) Control 群（上顎右側）における第一大臼歯口蓋根の高さ 1/2 程度のレベル（図 2C 点線）の水平断面像. 点線は第一大臼歯口蓋根の頬舌的に 1/2 程度のレベルを示す.
- (C) Control 群（上顎右側）における第一大臼歯口蓋根の頬舌的に 1/2 程度のレベル（図 2B 点線）の矢状断面像. 点線は第一大臼歯口蓋根の高さ 1/2 程度のレベルを示す.
- (D) OTM 群（上顎左側）における CT 像の立体構築像.
- (E) OTM 群（上顎左側）における第一大臼歯口蓋根の高さ 1/2 程度のレベル（図 2F 点線）の水平断面像. 点線は第一大臼歯口蓋根の頬舌的に 1/2 程度のレベルを示す.
- (F) OTM 群（上顎左側）における第一大臼歯口蓋根の頬舌的に 1/2 程度のレベル（図 2E 点線）の矢状断面像. 点線は第一大臼歯口蓋根の高さ 1/2 程度のレベルを示す. 矯正力の作用方向である近心側の歯根膜腔の幅が縮小, 遠心側が拡大するそれぞれ圧迫側と牽引側を確認することができた.

スケールバーは 500 μm である。それぞれ矢印 (f) は矯正力の作用方向, M1 は第一大臼歯, M2 は第二大臼歯, M3 は第三大臼歯を示している。

図 3 SEM による OTM 群水平断面 (咬合面) の観察

取得した SEM 像は白黒反転させている。

SEM で取得した第一大臼歯 (M1) および第二大臼歯 (M2) の水平断面像。第一大臼歯口蓋根における圧迫側歯根膜の圧縮と牽引側歯根膜の伸展を観察することができた。第二大臼歯頬側近心根, 口蓋根における歯根膜は近心側, 遠心側で均等な厚みを認めた。白枠に Xe プラズマ FIB-SEM の観察範囲を示す。スケールバーは 500 μm である。

図 4 Xe プラズマ FIB-SEM による Control 群歯周組織の観察

取得した SEM 像はすべて白黒反転させている。

- (A) Control 群近心側歯周組織において Xe プラズマ FIB-SEM で取得した SEM 像 (y-z 平面) を三次元構築した像。X=73.4 μm , Y=133.5 μm , Z=85.3 μm の領域をボクセルサイズが $50 \times 50 \times 50 \text{ nm}^3$ の解像度で取得した。
- (B) SEM 像を三次元再構築することで取得した矢状断面 (x-y 平面) の像。象牙質 (D) に接するセメント質 (C) から歯槽骨 (AB) の間に介在する歯根膜 (PDL) 全体を観察することが観察できた。歯根膜内には血管 (BV) を観察することができた。
スケールバーは 25 μm である。
- (C) (B) 黒点線枠の拡大像。歯根膜内の歯根膜細胞 (PDC), コラーゲン線維束 (FB) や, 歯槽骨内に存在する骨細胞 (OCY) を明瞭に観察することができた。
スケールバーは 10 μm である。
- (D) (B) 白点線枠の拡大像。コラーゲン線維束 (FB) の周囲に存在する多数の歯根膜細胞 (PDC) を観察することができた。コラーゲン線維束はセメント質側 (図 4D) に比較し歯槽骨側 (図 4C) が太いことを観察することができた。
スケールバーは 10 μm である。

図 5 Xe プラズマ FIB-SEM による OTM 群歯周組織の観察

取得した SEM 像はすべて白黒反転させている。

- (A) OTM 群近心側歯周組織において Xe プラズマ FIB-SEM で取得した SEM 像 (y-z 平面) を三次元構築した像。X=218.4 μm , Y=127.4 μm , Z=76.9 μm の領域をボクセルサイズが $50 \times 50 \times 50 \text{ nm}^3$ の解像度で取得した。
- (B) SEM 像を三次元再構築することで取得した矢状断面 (y-z 平面) の像。象牙質 (D) に接するセメント質 (C) から歯槽骨 (AB) の間に介在する歯根膜 (PDL) 全体を観察することが観察できた。歯根膜内には血管 (BV) を観察することができた。
スケールバーは 25 μm である。
- (C) (B) 黒点線枠の拡大像。歯根膜内のコラーゲン線維束 (FB) や, 歯槽骨内に存在する破骨細胞 (OC) を明瞭に観察することができた。

スケールバーは 10 μm である。

- (D) (B) 白点線枠の拡大像. コラーゲン線維束 (FB) の周囲に存在する多数の歯根膜細胞 (PDC) を観察することができた。

スケールバーは 10 μm である。

図 6 人工知能によるコラーゲン線維束と細胞核の抽出

取得した SEM 像はすべて白黒反転させている。

- (A) OTM 群における矢状断面 SEM 像。

- (B) 人工知能により自動抽出したコラーゲン線維束 (ピンク色), 細胞核 (緑色) を示す. 周囲基質と境界明瞭に抽出することに成功した。

スケールバーは 10 μm である。

図 7 OTM 群歯根膜コラーゲン線維束と細胞核の生体ボリュームイメージの観察

取得した SEM 像はすべて白黒反転させている。

X=51.4 μm , Y=78.9 μm , Z=10 μm の領域を三次元構築した。

- (A)~(C) Control 群近心歯周組織において Xe プラズマ FIB-SEM で取得した SEM 像を三次元構築した像. 左から順にそれぞれ Y 軸を中心に 0 度, 160 度, 320 度で回転させている. AB は歯槽骨, C はセメント質を示す。

- (D)~(F) 人工知能を用いて領域抽出した歯根膜コラーゲン線維束 (ピンク色) と細胞核 (緑色) をすべて表示した. (A)~(C)に合わせて回転させている。

- (G)~(I) 人工知能を用いて領域抽出した歯根膜コラーゲン線維束と細胞核を三次元構築した像. (A)~(C)に合わせて回転させている。

図 8 Control 群歯根膜コラーゲン線維束と細胞核の生体ボリュームイメージの観察

取得した SEM 像はすべて白黒反転させている。

X=73.4 μm , Y=133.5 μm , Z=85.3 μm の領域を三次元構築した。

- (A)~(C) Control 群近心歯周組織において Xe プラズマ FIB-SEM で取得した SEM 像を三次元構築した像. 左から順にそれぞれ Y 軸を中心に 0 度, 160 度, 320 度で回転させている. AB は歯槽骨, C はセメント質を示す。

- (D)~(F) 人工知能を用いて領域抽出した歯根膜コラーゲン線維束 (ピンク色) と細胞核 (緑色) をすべて表示した. (A)~(C)に合わせて回転させている。

- (G)~(I) 人工知能を用いて領域抽出した歯根膜コラーゲン線維束と細胞核を三次元構築した像. (A)~(C)に合わせて回転させている。

図 9 コラーゲン線維束の断面形態の観察

人工知能を用いて領域抽出したコラーゲン線維束を三次元再構築し, 線維束の走行方向に垂直な線維束の断面を観察することができた。

スケールバーは 5 μm である。

図 10 Control 群におけるコラーゲン線維束の断面形態の解析

図 9 で示した単位面積あたりの線維束の断面形態を解析した。

- (A) 単位面積あたりの線維束の断面積 (μm^2) をセメント質側, 歯槽骨側で計測した。セメント質側 (白抜きのバー) に比較し歯槽骨側 (黒塗りのバー) の断面積が有意に大きい。
- (B) 単位面積あたりの線維束の扁平率 (短径/長径) をセメント質側, 歯槽骨側で計測した。セメント質側 (白抜きのバー) と歯槽骨側 (黒塗りのバー) の扁平率は有意な差を認めない。

エラーバーは標準誤差, ***は有意差あり ($p < 0.001$), ns は有意差なし ($p > 0.05$) をそれぞれ示す (Student の t 検定; セメント質側 $n = 401$, 歯槽骨側 $n = 93$) 。

図 11 OTM 群におけるコラーゲン線維束の断面形態の解析

図 9 で示した単位面積あたりの線維束の断面形態を解析した。

- (A) 単位面積あたりの線維束の断面積 (μm^2) をセメント質側, 歯槽骨側で計測した。セメント質側 (白抜きのバー) に比較し歯槽骨側 (黒塗りのバー) の断面積が有意に大きい。
- (B) 単位面積あたりの線維束の扁平率 (短径/長径) をセメント質側, 歯槽骨側で計測した。歯槽骨側 (黒塗りのバー) に比較しセメント質側 (白抜きのバー) の扁平率は有意に小さい。

エラーバーは標準誤差, ***は有意差あり ($p < 0.001$), ns は有意差なし ($p > 0.05$) をそれぞれ示す (Student の t 検定; セメント質側 $n = 412$, 歯槽骨側 $n = 150$) 。

図 12 Control 群と OTM 群におけるコラーゲン線維束の断面形態の比較 (扁平率)

- (A) セメント質側における Control 群と OTM 群の比較. Control 群 (白抜きのバー) に比較し OTM 群 (黒塗りのバー) の扁平率は有意に小さい。

エラーバーは標準誤差, ***は有意差あり ($p < 0.001$) をそれぞれ示す (Student の t 検定; Control 群 $n = 401$, OTM 群 $n = 412$)

- (B) 歯槽骨側における Control 群と OTM 群の比較. Control 群 (白抜きのバー) と OTM 群 (黒塗りのバー) の扁平率に有意な差は認めなかった。

エラーバーは標準誤差, ns は有意差なし ($p > 0.05$) をそれぞれ示す (Student の t 検定; Control 群 $n = 93$, OTM 群 $n = 150$)

図 13 Control 群と OTM 群におけるコラーゲン線維束の断面形態の比較 (断面積)

- (A) セメント質側における Control 群と OTM 群の比較. Control 群 (白抜きのバー) と OTM 群 (黒塗りのバー) の断面積は有意な差を認めない。

エラーバーは標準誤差, ns は有意差なし ($p > 0.05$) をそれぞれ示す (Student の t 検定; Control 群 $n = 401$, OTM 群 $n = 412$)

- (B) 歯槽骨側における Control 群と OTM 群の比較. Control 群 (白抜きのバー) に比較し OTM 群 (黒塗りのバー) の断面積は有意に小さい。

エラーバーは標準誤差, *は有意差あり ($p < 0.05$) をそれぞれ示す。 (Student の t 検定; Control 群 $n = 93$, OTM 群 $n = 150$)

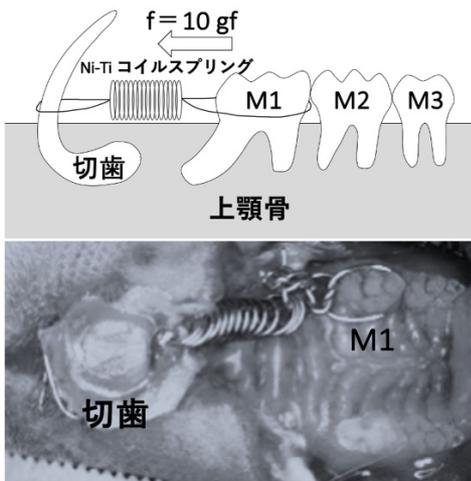


図 1

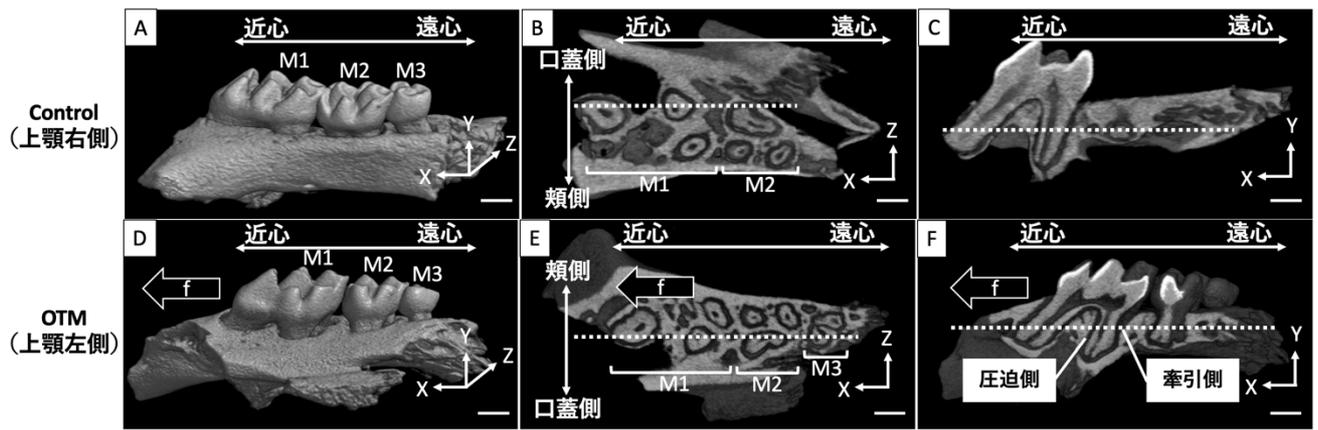


図 2

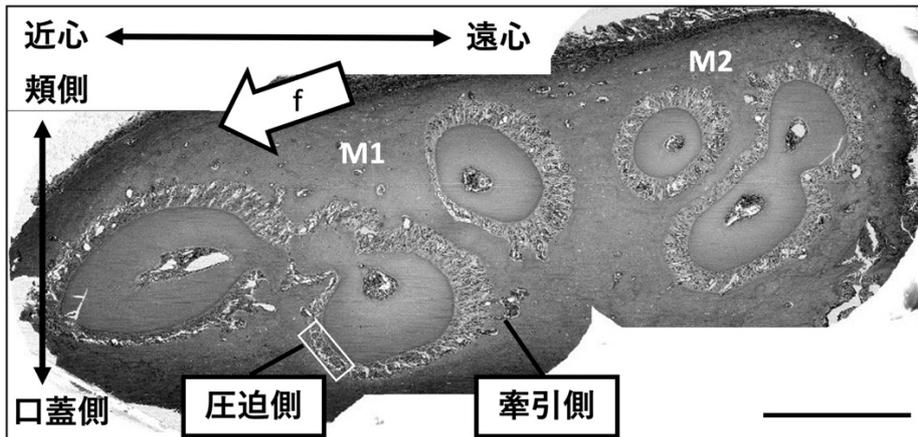


図 3

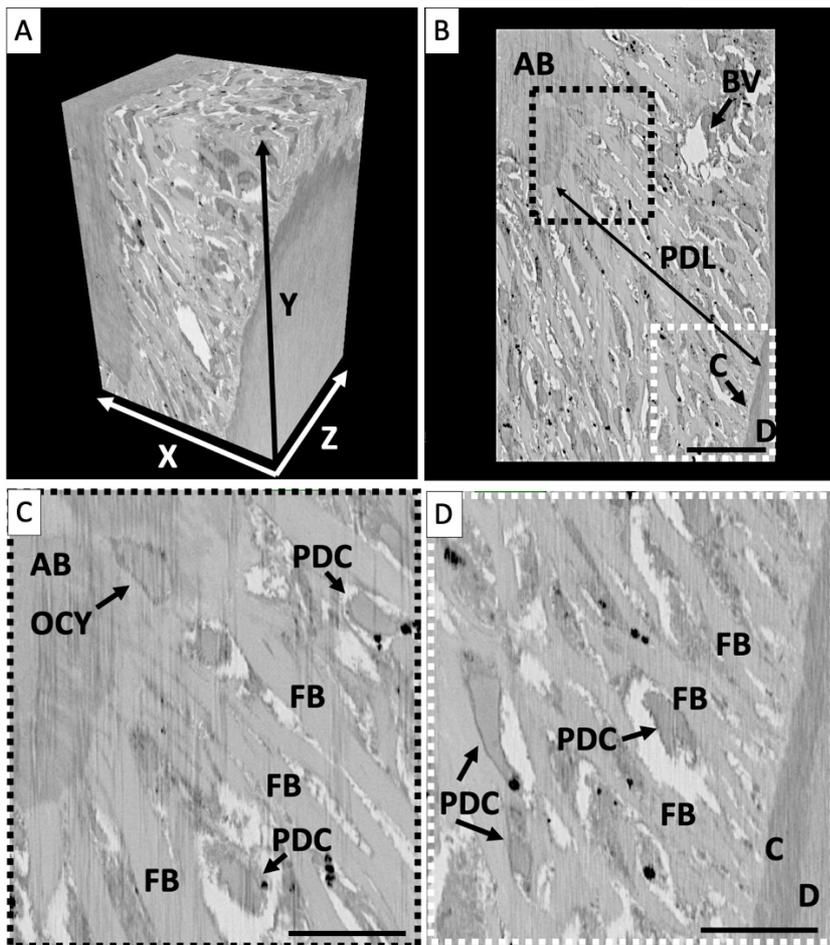
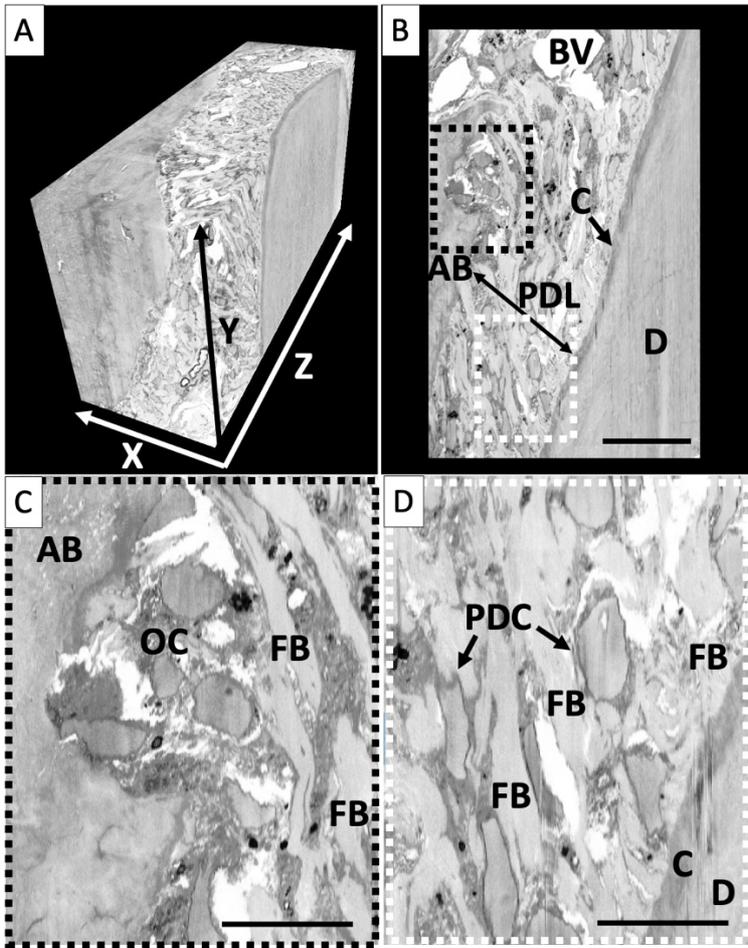


图 4



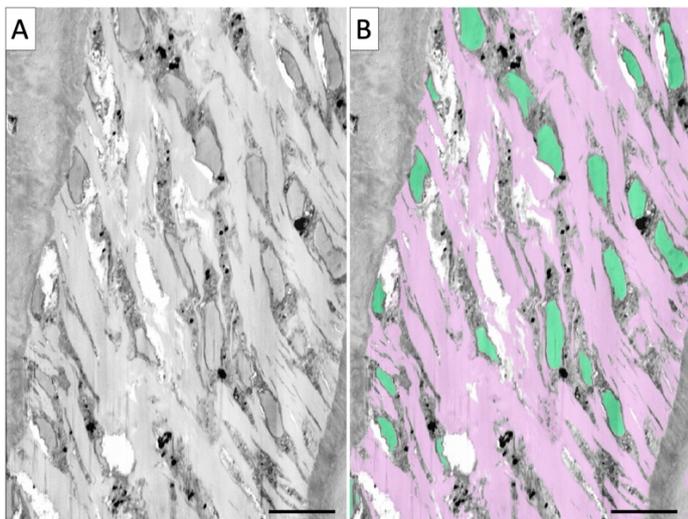


图 6

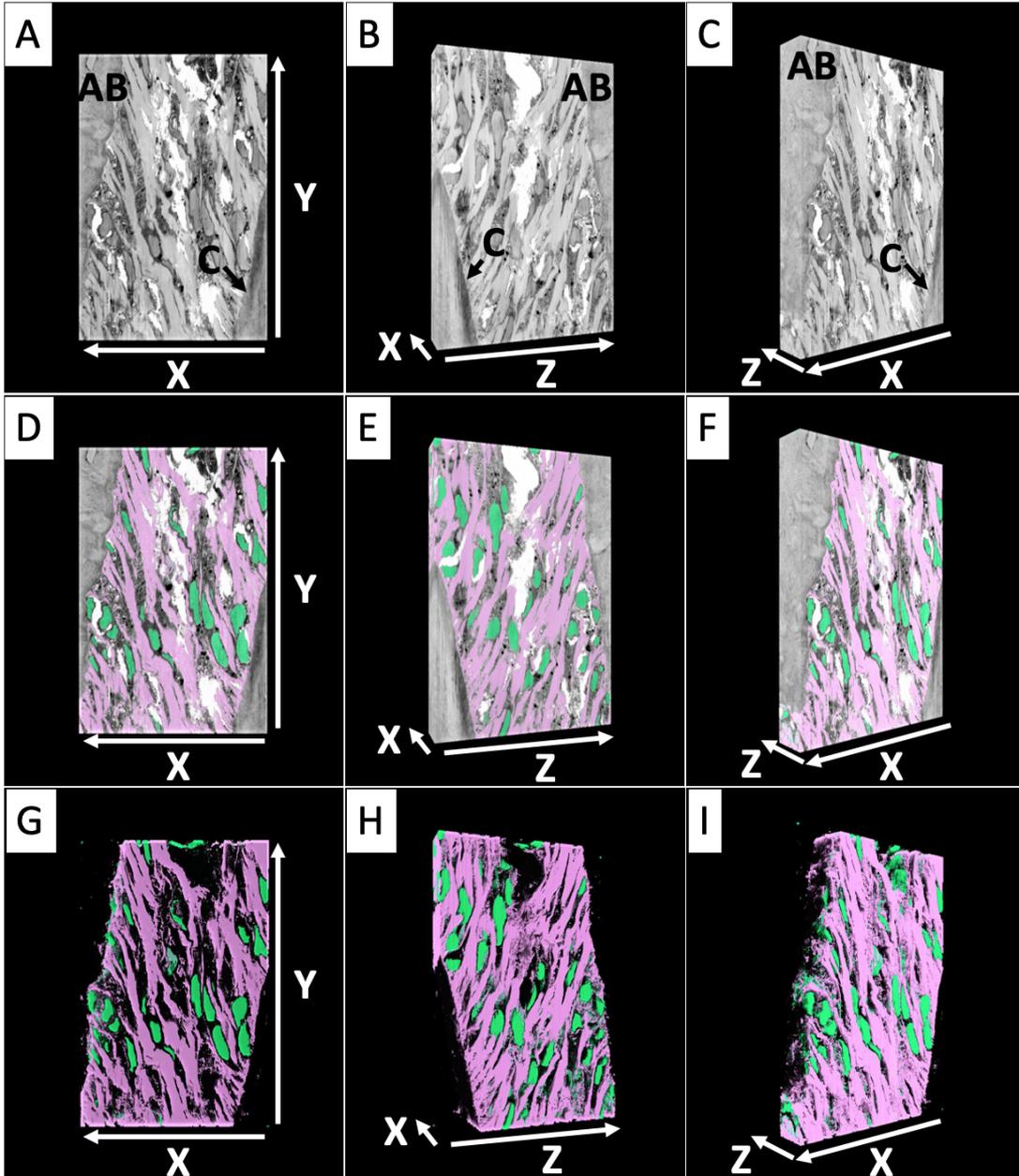


图 7

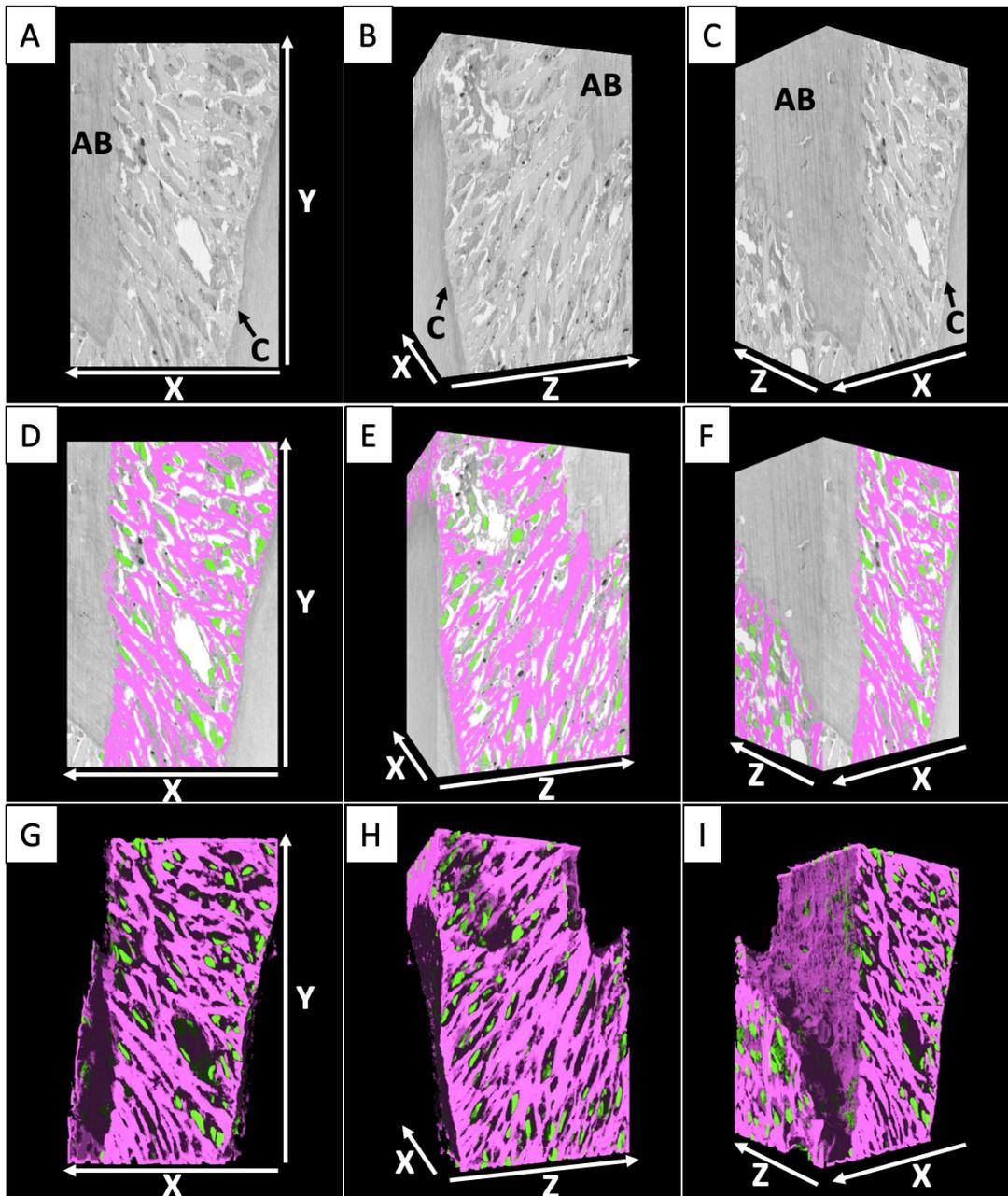
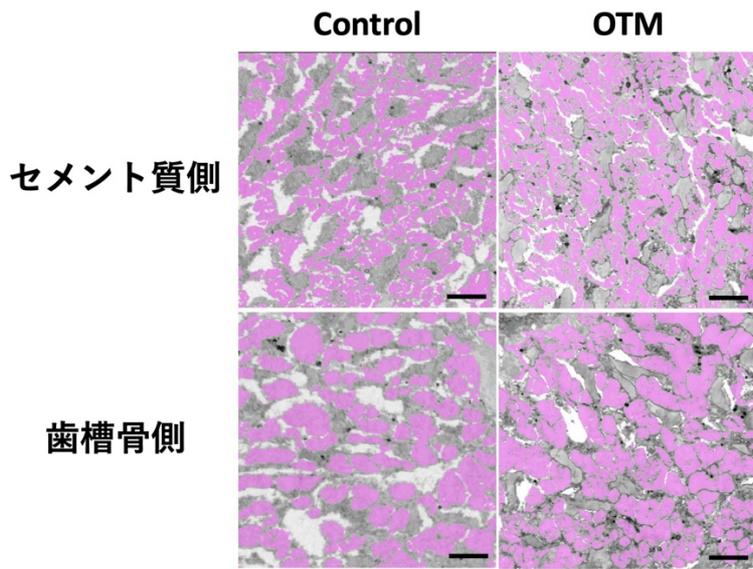


图 8



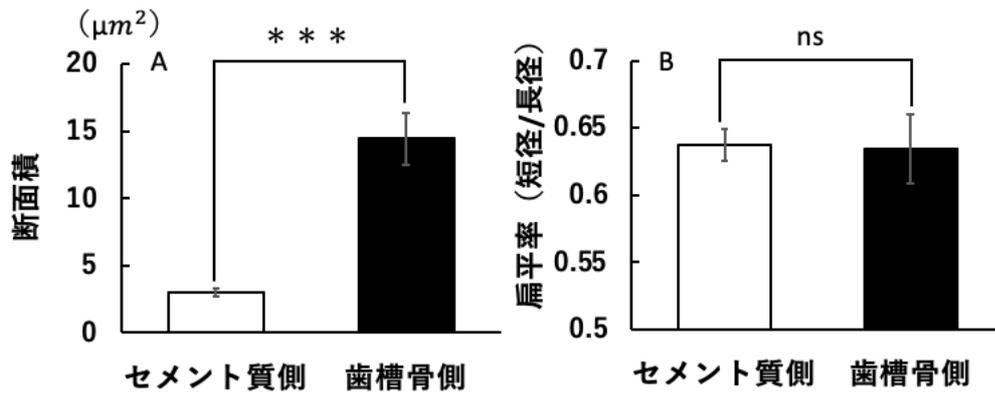


図 10

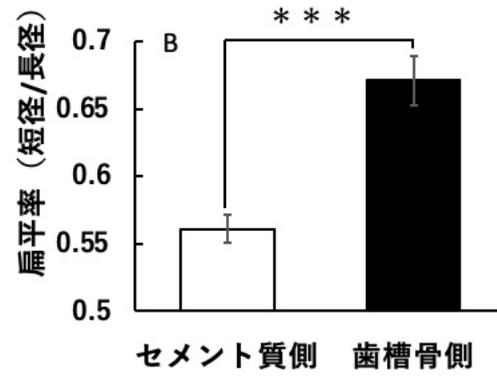
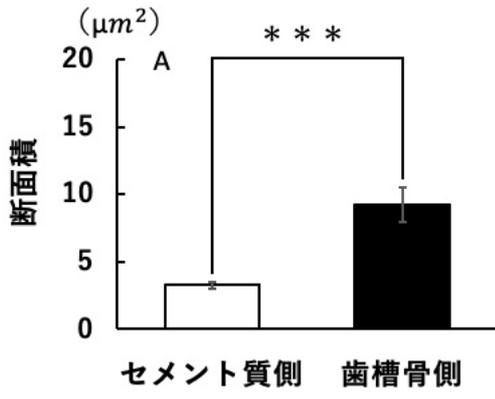


図 11

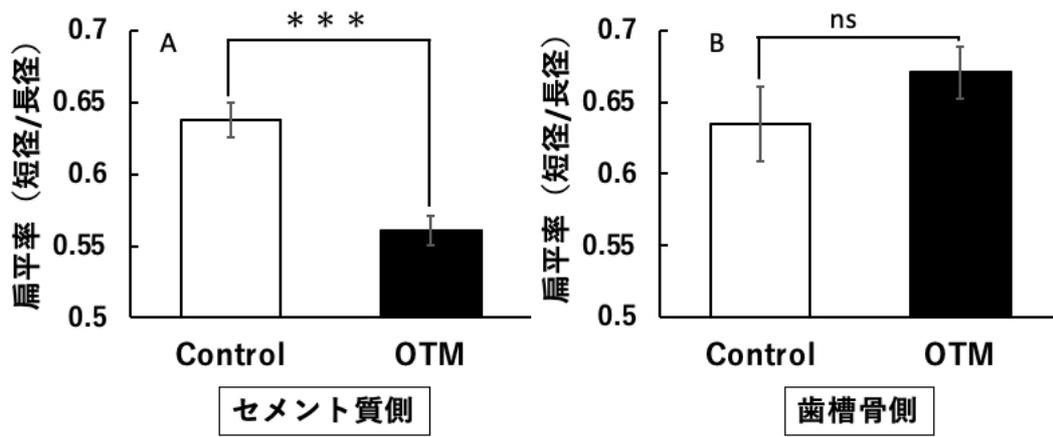


図 12

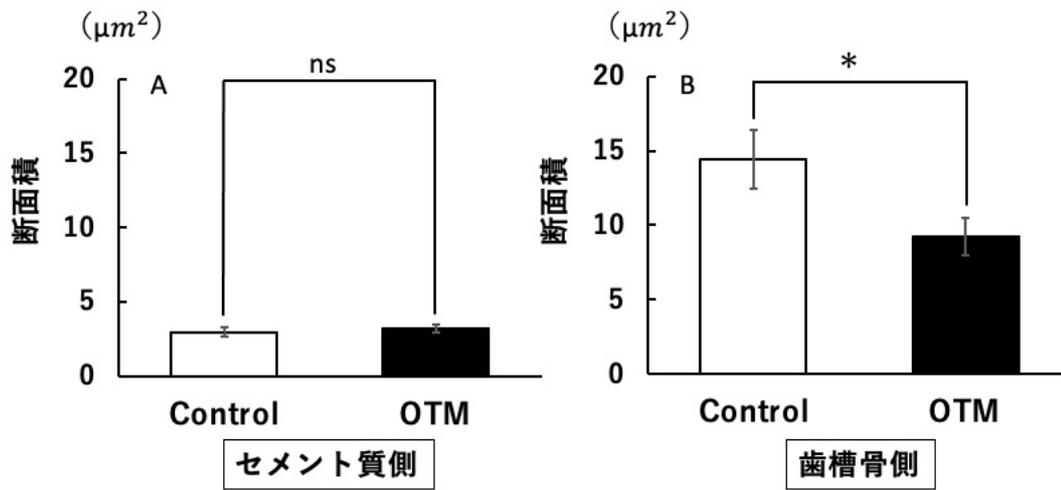


図 13