

Micro-osteoperforations がラットの実験的歯の移動に及ぼす影響

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻
杉森 匡

(指導：葛西 一貴 教授)

本稿は、主となる参考論文 Micro-osteoperforations accelerate orthodontic tooth movement by stimulating periodontal ligament cell cycles (*American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics* 掲載予定 共著) および副となる参考論文 Micro-osteoperforations によるラット歯根膜の GeneChip 遺伝子発現プロファイリング (日本成人矯正歯科学会雑誌 23 (2) ; 2-5. 2016 共著) をまとめたものである。

Abstract:

Introduction: The purpose of this study was to investigate the mechanism how micro-osteoperforations (MOPs) accelerate tooth movement.

Methods: Eleven-week-old male Wistar rats were divided into 2 groups: 10 g orthodontic force applied to the maxillary first molar (tooth movement : TM), force application plus 3 small perforations of the cortical plate (TM+MOPs). On 12 hours after force application, we extracted the periodontal ligament (PDL) of the first molar and analyzed gene expression profiling of the PDL using Agilent GeneSpring software. Furthermore, on days 1, 4, 7, 10 and 14, we investigated the tooth movement and alveolar bone microstructure using micro-computed tomography (n=5). We also determined the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) on a pressure side of PDLs via an immunohistochemical analysis. The expression of apoptotic cells was also determined by the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method.

Results: The TM+MOPs group exhibited a 1.4-fold increase in tooth movement with decreased bone volume / tissue volume ratio (BV/TV) and bone mineral density (BMD) around the first molars compared with the TM group on 14 day. In the TM+MOPs group , 23 gene expressions related to cell cycle on a pressure side of PDLs showed changes greater

than 2-fold compared to the TM group after 12 hours. The ratios of TNF- α -positive cells in the TM+MOPs group were increased on days 1, 4, 7, 10 compared with the TM group. The ratios of PCNA-positive cells in the TM+MOPs group were increased on days 1, 4 and 7 compared with the TM group, and the ratios of TUNEL-positive cells in the TM+MOPs group were increased on days 1 and 7 compared with the TM group.

Conclusions: These results suggested that MOPs may accelerate tooth movement through activation of cell proliferation and apoptosis of PDL cells.

Key words: Micro-osteoperforations, Orthodontic tooth movement, Periodontal ligament, Cell proliferation, Apoptosis, Cell cycle

緒言

歯科矯正学的歯の移動は、機械的刺激に対し歯周組織の反応によって特徴づけられる生物学的プロセスであり、歯根膜および歯槽骨のリモデリングによってもたらされる現象である。弱い矯正力は歯槽骨の直接性骨吸収作用を引き起こし、過度の矯正力は歯根膜組織にて局所的虚血、硝子様変性と細胞死を誘発する。近年、歯科矯正治療における歯の移動によって誘発されるストレスが歯根膜細胞において interleukin (IL)-1 α と IL-1 β の増加を引き起こすとの報告[1]や、実験的歯の移動において、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor-alpha : TNF- α) , prostaglandin E2 (PGE2) , cyclooxygenase2 (COX2) , interferon- γ (IFN- γ) などの炎症性ケミカルメディエーターの発現が歯根膜組織に観察されたとの報告がある[2]。また TNF- α は骨芽細胞と歯根膜細胞においてアポトーシスを誘発するとの報告があり[3]、炎症反応を媒介することで歯の移動において重要な役割を果たすことが示唆される。以上のことから歯科矯正学的歯の移動には、炎症性ケミカルメディエーター及びアポトーシス誘発因子が関連していると考えられる。

一方、歯科矯正学の進歩により歯列及び咬合の不正を矯正しようとする成人の患者数が増加している。しかしながら、顎骨の成長・発育のコントロールに適切な時期が完了している成人患者は、歯科矯正治療が歯槽部に限局されるため治療が複雑になる傾向にある。さらに、成人の歯槽骨は成長・発育が完了されていない若年者比べて厚く、海綿骨が少なく、血液供給が少ない。このため、歯の移動速度が緩慢に

なり、治療期間が長くなるなどの問題がある。

Al-Naoum ら[4]は、皮質骨を切削するコルチコトミーが矯正治療における歯の移動速度を促進させることを報告した。しかし、コルチコトミーは外科的侵襲が大きく、患者の負担が大きいことから、より侵襲の少ない簡便な方法として近年、微小骨穿孔術 (Micro-osteoperforations : MOPs) が考案された。Alikhani ら[5]は MOPs により、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α の増加を誘導することで、歯科矯正治療における歯の移動速度が促進することを報告している。移動歯の歯周組織に適切な炎症を誘導することで、骨のリモデリングが促進される可能性が考えられるが、そのメカニズムについては細胞生物学的、病理組織学的に未だ十分に検討されていない。

DNA microarray 法により、DNA データベースにある多数の遺伝子の発現量解析が可能である。歯科の分野では歯周病における病態遺伝子発現パターンの解析やバイオマーカー検索のため、DNA microarray 法が用いられている。本研究では、MOPs が歯科矯正治療における歯の移動に及ぼす影響を解明する研究の一環として、ラットにおける実験的歯の移動時に MOPs を施した時の圧迫側歯根膜組織の遺伝子発現変動を DNA microarray 法にて解析した。また、Micro-CT 画像にて牽引歯の移動距離の測定と骨微細構造解析を行い、さらに病理組織学的染色と免疫組織化学染色にて圧迫側歯根膜細胞における炎症性サイトカインと細胞増殖因子、及びアポトーシス誘発因子の発現を観察し、歯の移動速度促進のメカニズムを検討した。

資料および方法

実験動物および飼育条件

本動物実験は日本大学松戸歯学部動物実験倫理に関する指針（承認番号 第 AP14MD008 号）に準じて行った。実験には 11 週齢の Wistar 系雄性ラット（300 ± 30g）を合計 56 頭用い、飼育管理を日本大学松戸歯学部実験動物センターにて SPF クリーンラック内で行い、固形飼料、飲料水、床敷ならびにケージは全て滅菌したものを使用した。実験動物は無作為に tooth movement (TM) 群と TM+MOPs 群に分類した。装置の装着および MOPs は、三種混合麻酔薬（塩酸メドミジン 0.15mg/kg, ミダゾラム 2mg/kg, 酒石酸ブトルフェール 2.5mg/kg, 生理食塩水 1.8625mg/kg）を腹腔内注射し、全身麻酔下で実施した。上顎左側第一臼歯の近心移動は Asano ら[6]の方法に従い、コイルスプリング（太さ:0.005inch, 直径:1/12inch, Accurate Sales Co. Chiba, Japan）と上顎左側第一臼歯をステンレススチールの結紮線（太さ:0.008inch, Tomy International Inc. Tokyo, Japan）で結び、コイルスプリングの他方を前歯と結んで行った。矯正力は Nakano ら[7]に従い 10.0g とした。TM+MOPs 群にはコイルスプリングを装着し、MOPs は Teixeira ら[8]の方法に従い、上顎左側第一臼歯近心頬側の歯から 5mm の位置の歯槽骨 3 部位を、歯肉切開、剥離し歯科用エンジンと直径 0.25mm のラウンドバーにて、皮質骨 0.25mm の深さまで切削した。実験的歯の移動は合計 14 日間行った (Figs. 1, 2A and B)。

歯の移動距離測定と骨微細構造解析

牽引 0, 1, 4, 7, 10, 14 日後に *in vivo* μ -CT system (Rigaku- μ CT®, Tokyo, Japan) にて Micro-CT 撮影を行った。撮影条件は管電圧 90 kv, 管電流 88 μ A, 17 秒 360 度回転とした。撮影した Micro-CT 画像 (ボクセル解像度 30 \times 30 \times 30 μ m) にて牽引歯の移動距離測定を行った。移動距離は、移動歯エナメル質の最遠心点と第二臼歯の最近心点を結ぶ直線距離とした。また、撮像された Micro-CT 画像より、三次元骨梁構造計測ソフト TRI/3D-BON (Ratoc System engineering, Japan) を用いて、牽引歯の歯根周囲の歯槽骨の骨梁体積率 (bone volume / tissue volume ratio : BV/TV, %)、と骨密度 (bone mineral density : BMD, mg/cm³) を計測した。関心領域 (region of interest : ROI) は、Cheung ら[9]の方法に従い、牽引歯の歯根周囲 1mm 以内の歯槽骨とした。

DNA microarray 法

TM 群と TM+MOPs 群において、牽引 12 時間後に三種混合麻酔薬の腹腔内注射による全身麻酔下にて牽引歯を抜去し、圧迫側歯根膜を採取した (n=3)。歯根膜組織から Total RNA を抽出し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, CA, US) を用いて RNA の品質検定を行った。Cy3-CTP 存在下で *In vitro* transcription (IVT) 法を施し、Ovation Pico WTA System V2 (NuGEN, CA, USA) を用いて mRNA の増幅をし、その後 SureTag Complete DNA Labeling Kit (Agilent) を用いて標識を行った。標識試料は SurePrint G3

Rat GE 8x60K Microarray (Agilent) 上でハイブリダイゼーションを行い洗浄後、蛍光スキャナーにて各遺伝子のデータを取得した。GeneSpring 解析ソフト (Agilent) にて遺伝子発現の比較を行った。

標本作製

当該期間を経過したラットは、三種混合麻酔薬で深麻酔した後、生理食塩水と 10 % 中性緩衝ホルマリンで灌流固定した。さらに上顎骨を剔出して、10 % 中性緩衝ホルマリンにて 4 °C で 24 時間浸漬固定後、試料を 10 % EDTA 溶液 (pH 7.4) にて 4 週間脱灰処理を行った。脱灰した試料は、流水洗浄し、通法に従ってパラフィン包埋ブロックを作製後、当該臼歯を横断方向厚さ 4 μ m の薄切切片を作製し、各染色法を行った。染色された各陽性細胞の観察は Gonzales ら[10]の報告に従い、上顎第一臼歯遠心頬側の根分岐部より根尖へ 300 μ m の圧迫側で行った。観察領域は Kawasaki ら[11]の報告に準拠し上顎第一大臼歯遠心頬側根、根分岐部より近心根中心と遠心頬側根中心とを結んだ線と直行する線とでなす領域の近心部 4 分の 1 の歯根膜をとした(Fig. 3)。

病理組織学的染色法および免疫組織化学染色法

ヘマトキシリン・エオジン重染色 (以下, H.E. 染色) は、試料の脱パラフィン後、通法に従いヘマトキシリン溶液とエオジン溶液を用いて施行した。免疫組織化学染色は、試料の脱パラフィン後、通法に従い施行した。一次抗体には、polyclonal ヤギ抗 TNF-

α 抗体 (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA; 希釈倍率 1:100), monoclonal マウス抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体 (PC10, Cell Signal Technology, Inc. Tokyo, Japan; 希釈倍率 1:100) を用いた。各切片は, 脱パラフィン後 0.5 % 過酸化水素メタノール溶液に室温で 30 分間反応させ, 内因性ペルオキシダーゼ反応の除去を行った。各切片は, tris-buffered saline (TBS) で洗浄し, 前述の一次抗体を室温で 1 時間反応させた。抗 TNF- α 抗体反応後に二次抗体として Histofine Simple Stain MAX-Po (G) kit (Nichirei, Co. Tokyo, Japan) を, 抗 PCNA 抗体反応後に二次抗体として Histofine Simple Stain MAX-Po (Multi) kit (Nichirei, Co. Tokyo, Japan) を使用し, プロトコールに従い二次抗体反応を行った。各切片は TBS で洗浄し, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にて発色後, マイヤーヘマトキシリン液を用いて対比染色を行い, アルコール・キシレン系列にて脱水および透徹を行い, マリノールにて封入を行った。

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 法

アポトーシス細胞検出のための TUNEL 法は, 試料の脱パラフィン後, TACS 2TdT-DAB In Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) を用いてプロトコールに従い染色を行った。

切片は脱パラフィン後, プロテナーゼ K を含む TBS 溶液中で 37°C にて 15 分間, 3% 過酸化水素で 5 分間インキュベーションした後蒸留水で洗浄した。この切片を

terminal deoxynucleotide transferase (TdT), ビオチン化 dUTP にて 37°C にて 1 時間インキュベーションした後, streptavidin-horseradish peroxidase (Strep-HRP) にて処理し, DAB にてアポトーシス細胞を発色後, 1% methyl green にて対比染色を行った。

細胞陽性率

染色された切片の歯根膜圧迫側観察部位範囲から無作為に強拡大で 5 視野撮映し, 全紡錘形細胞数と各陽性細胞数を計測した。Sato[12]らの方法に従い以下の式で陽性率を算出した:

$$\text{陽性率} = (\text{陽性細胞数} / \text{全紡錘形細胞数}) \times 100$$

統計解析

移動距離, BV/TV, BMD 及び細胞陽性率は各群平均値と標準偏差を求めた。二群間の差の検定は, Mann-Whitney の U 検定を用いた。有意水準は $P < 0.05$ 及び $P < 0.01$ とした。

結果

歯の移動距離

牽引歯の移動距離は TM+MOPs 群では TM 群と比較し, いずれの計測日においても高値であり, 牽引 4, 7, 10, 14 日後に有意差が認められた。牽引 14 日後, 移動距離は

約 1.4 倍有意に高値であった (Fig. 4)。

骨微細構造解析

TM+MOPs 群の牽引歯の歯根周囲の歯槽骨の BV/TV は TM 群と比較し、いずれの計測日においても低値であり、牽引 1, 7, 10, 14 日後に有意差を認めた。また牽引歯の歯根周囲の歯槽骨の BMD においても TM+MOP 群は TM 群と比較し、いずれの計測日においても低値であり、牽引 7, 14 日後に有意差を認めた。 (Figs. 5A, B)。

DNA microarray 解析

牽引 12 時間後の、圧迫側歯根膜細胞において、TM+MOPs 群では TM 群と比較し、細胞周期の進行に関与する minichromosome maintenance (MCM) のうち 8 種の遺伝子が、またその誘導因子である cell division cycle (CDC) のうち 15 種の遺伝子が 2 倍以上発現が増加した (Figs. 6A, B)。

病理組織学的所見 (H.E. 染色)

牽引 1 日後、両群とも線維性結合組織と線維芽細胞の不規則な走行が認められ、また TM+MOPs 群においては破骨細胞とそれに伴う骨吸収窩も認められた。牽引 4 日後には、TM 群にも骨吸収窩を認めるが、全ての実験期間において、TM+MOPs 群は TM 群と比較し、多数の骨吸収窩が認められた (Fig. 7)。

免疫組織化学的所見

圧迫側歯根膜における TNF- α 陽性細胞は, TM+MOPs 群では牽引 1, 4, 7, 10 日後とも TM 群と比較し有意に高値だった。PCNA 陽性細胞は, TM+MOPs 群では牽引 1, 4, 7 日後とも TM 群と比較し有意に高値であった。アポトーシス細胞も, TM+MOPs 群では TM 群と比較し牽引 1, 7 日後に有意に高値であった (Figs. 8-10)。

考察

実験的歯の移動時に MOPs を行うことにより, 移動歯周囲の歯槽骨は BV/TV と BMD が低下し, 骨の微細構造は変化し移動距離が有意に増加した (Figs. 4, 6A and B)。この結果は Alikhani ら[5], Cheung ら[8]の報告と一致する。Alikhani ら[5]は, MOPs により移動歯の歯肉溝滲出液中に炎症性ケミカルメディエーターである IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, CCL-2, CCL-3 及び CCL-5 が増加すると報告している。本研究においても, 免疫組織化学染色により TM+MOPs 群の圧迫側歯根膜での TNF- α 陽性細胞の有意な増加が認められた (Fig. 8)。MOPs により生じた炎症反応が移動歯の歯根膜に波及したことで移動速度が促進されたと考えられるが, MOPs を施した時の歯槽骨のリモデリングについては十分に検討されていない。

そこで本研究では, 歯科矯正学的歯の移動における, 歯根膜の細胞増殖, アポトーシスと細胞周期に着目した。移動歯圧迫側の歯根膜細胞の遺伝子発現量を DNA microarray 法にて解析したところ, 歯の移動の際の MOPs により細胞周期の進行に関与する多数の遺伝子が 2 倍以上発現することが認められた。さらに免疫組織化学染色

と TUNEL 染色により、歯の移動の際に MOPs を行うと細胞増殖関連因子 PCNA の増加と、アポトーシスの活性化が認められた。McCulloch ら [13] は、歯根膜細胞は細胞増殖と細胞死の平衡を保つことによって、恒常性を維持していると報告し、Mabuchi ら [14] は、歯根膜細胞はメカニカルストレスを加えると、細胞増殖が活発になり、その後アポトーシスによる細胞死がなされると報告した。Funakoshi ら [15] は歯根膜細胞に持続的な圧迫力を加えると細胞周期が活発化することを報告し、Kyomen ら [16] は、歯の移動距離が加齢により減少する要因として、歯根膜の細胞周期活性の低減化を指摘している。また、本研究にて MOPs により圧迫側歯根膜での TNF- α 陽性細胞の有意な増加が認められたが、Thammasitboon ら [3] は、歯根膜細胞は炎症反応時に TNF- α を介して、アポトーシスを活発化させると報告している。すなわち、歯根膜細胞において TNF- α はアポトーシスを誘発させる重要な因子であり、MOPs による歯の移動速度促進においてもアポトーシスを活発化していると考えられるが、MOPs と TNF- α の関係性についてはさらなる研究が必要である。

結論

MOPs が歯科矯正治療における歯の移動に及ぼす影響についてラットにて実験的歯の移動を行い検討した結果、以下の結論を得た。

1. 牽引 14 日後、TM+MOPs 群では TM 群と比較し、移動距離は約 1.4 倍有意に

高値であった。

2. TM+MOPs 群の牽引歯の歯根周囲の歯槽骨の BV/TV は TM 群と比較し牽引 1, 7, 10, 14 日後において有意に低値であった。TM+MOPs 群の牽引歯の歯根周囲の歯槽骨の BMD は TM 群と比較し牽引 7, 14 日後において有意に低値であった。

3. 牽引 12 時間後の、圧迫側歯根膜細胞において、TM+MOPs 群では TM 群と比較し、23 種の細胞周期関連遺伝子発現が 2 倍以上増加した。

4. 圧迫側歯根膜における TNF- α 陽性細胞は、TM+MOPs 群では牽引 1, 4, 7, 10 日後とも TM 群と比較し有意に高値であった。PCNA 陽性細胞は、TM+MOPs 群では牽引 1, 4, 7 日後とも TM 群と比較し有意に高値であった。アポトーシス細胞も、TM+MOPs 群では TM 群と比較し牽引 1, 7 日後とも有意に高値であった。

以上のことから、歯の移動時に MOPs を行うことで、圧迫側の歯根膜では炎症反応と細胞周期がさらに活性化され、矯正力による骨リモデリングサイクルが活発になり、移動速度が促進されることが示唆された。

参考文献

1. Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Kim YJ, Damião de Sousa-Neto M, Chan Cirelli C, Cirelli JA. Orthodontic force increases interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α expression and alveolar bone loss in periodontitis. *J Periodontol.* 2013; 84:1319-26.
2. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am.* 1988; 32:411-35.
3. Thammasitboon K, Goldring SR, Boch JA. Role of macrophages in LPS-induced osteoblast and PDL cell apoptosis. *Bone.* 2006; 38:845-52.
4. Al-Naoum F, Hajeer MY, Al-Jundi A. Does alveolar corticotomy accelerate orthodontic tooth movement when retracting upper canines? A split-mouth design randomized controlled trial. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 72:1880-9.
5. Alikhani M, Raptis M, Zoldan B, Sangsuwon C, Lee YB, Alyami B, Corpodian C, Barrera LM, Alansari S, Khoo E, Teixeira C. Effect of micro-osteoperforations on the rate of tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013; 144:639-48.
6. Asano M, Yamaguchi M, Nakajima R, Fujita S, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. IL-8 and MCP-1 induced by excessive orthodontic force mediates odontoclastogenesis in periodontal tissues. *Oral Dis.* 2011; 17:489-98.

7. Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Saito K, Kasai K. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. *Eur J Orthod.* 2011; 33:335-43.
8. Teixeira CC, Khoo E, Tran J, Chartres, Liu Y, Thant LM, Khabensky I, Gart LP, Cisneros G, Akikhani M. Cytokine expression and accelerated tooth movement. *J Dent Res.* 2010; 89:1135-41.
9. Cheung T, Park J, Lee D, Kim C, Olson J, Javadi S, Lawson G, McCabe J, Moon W, Ting K, Hong C. Ability of mini-implant-facilitated micro-osteoperforations to accelerate tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2016; 150:958-67.
10. Gonzales C, Hotokezaka H, Yoshimatsu M, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N. Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod.* 2008; 78:502-9.
11. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med.* 2000; 26:282-91.
12. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, Hashimoto S, Shimono M. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis.* 2010; 16:263-8.
13. McCulloch CA, Barghava U, Melcher AH. Cell death and the regulation of populations of cells in the periodontal ligament. *Cell Tissue Res.* 1989; 255:129-38.

14. Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. *J Periodontal Res.* 2002; 37:118-24.
15. Funakoshi M, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Kasai K. Effect of compression force on apoptosis in human periodontal ligament cells. *J Hard Tissue Biol.* 2013; 22:41-50.
16. Kyomen S, Tanne K. Influences of aging changes in proliferative rate of PDL cells during experimental tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 1997; 67:67-72.

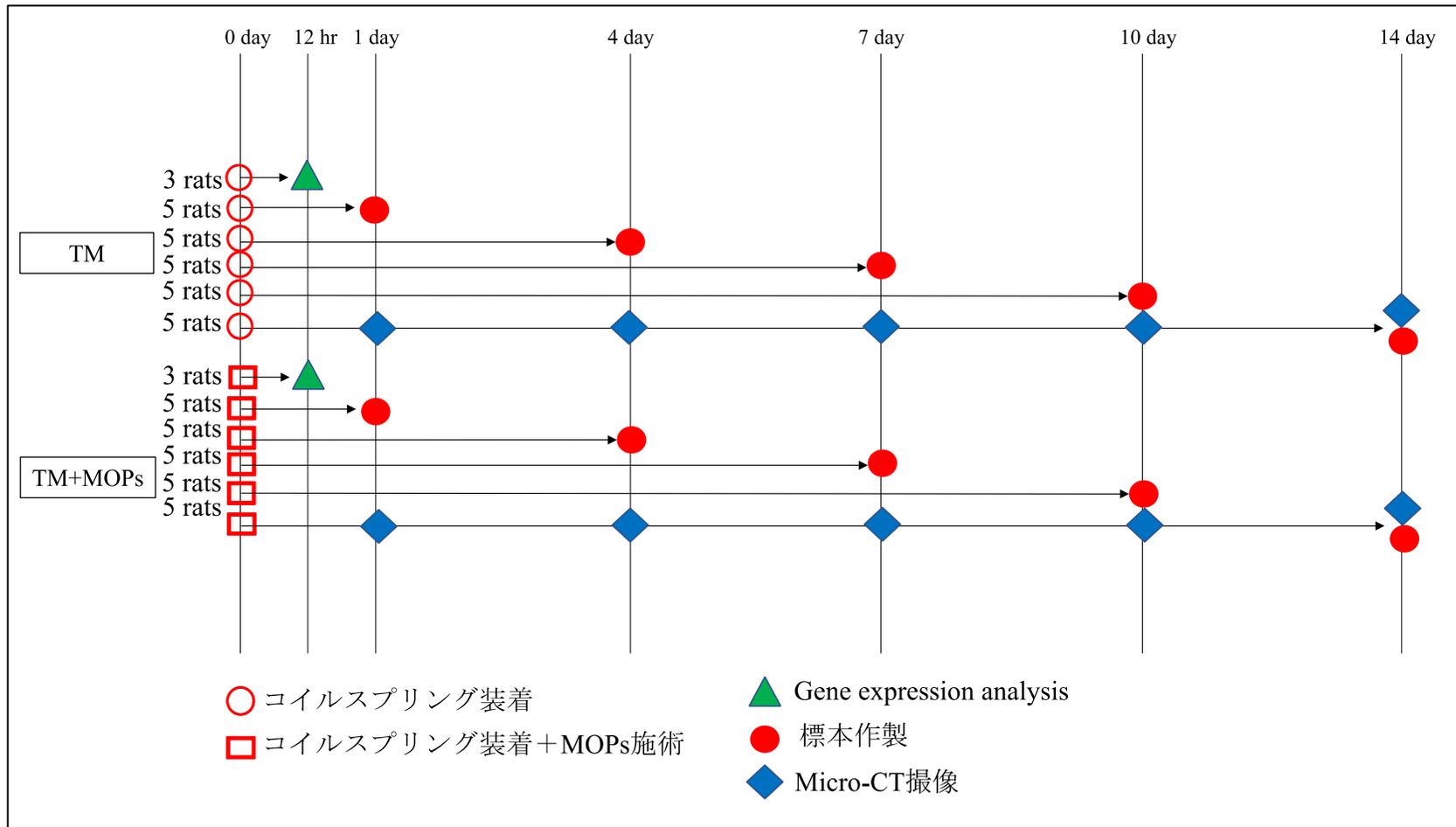


Fig. 1 実験スケジュール

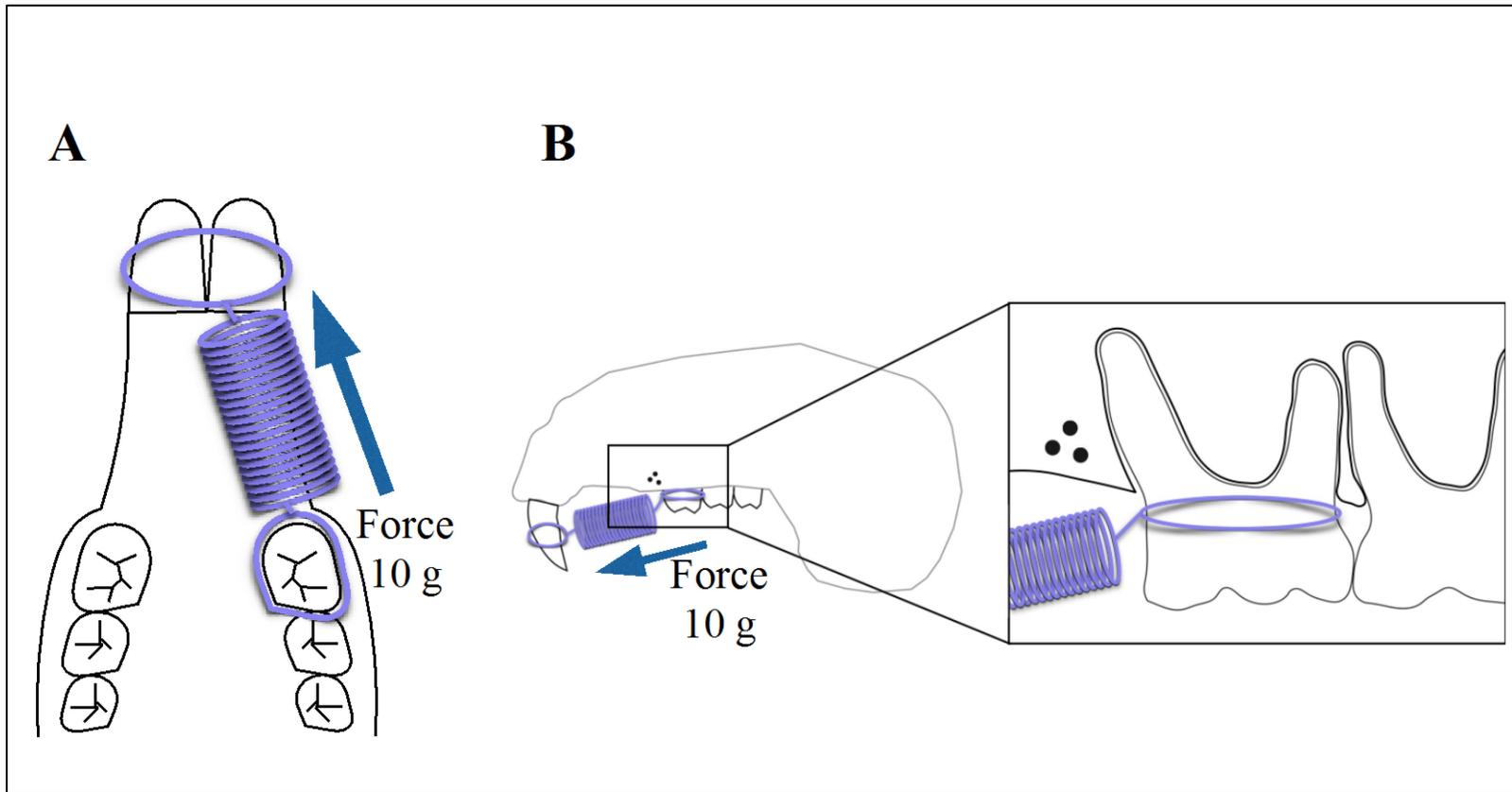


Fig. 2A, B コイルスプリング装着と MOPs 術式

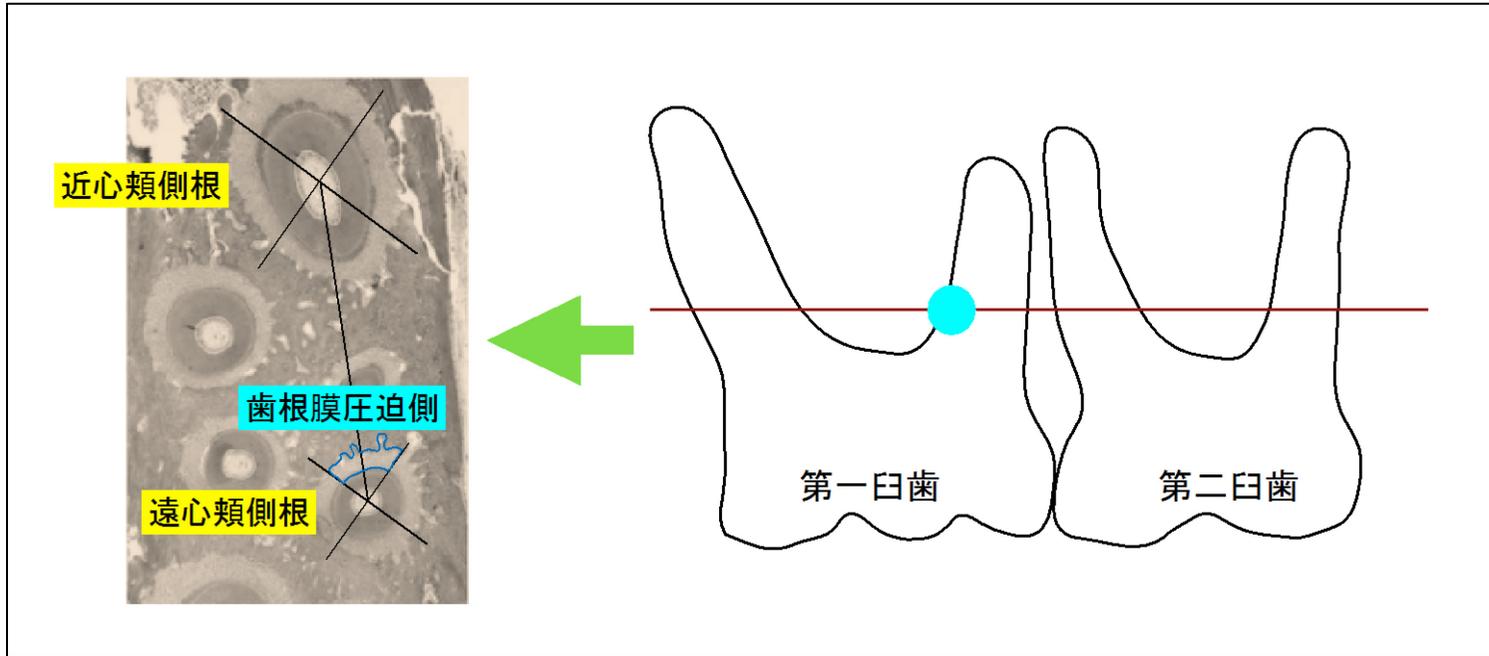


Fig. 3 標本作製と観察領域

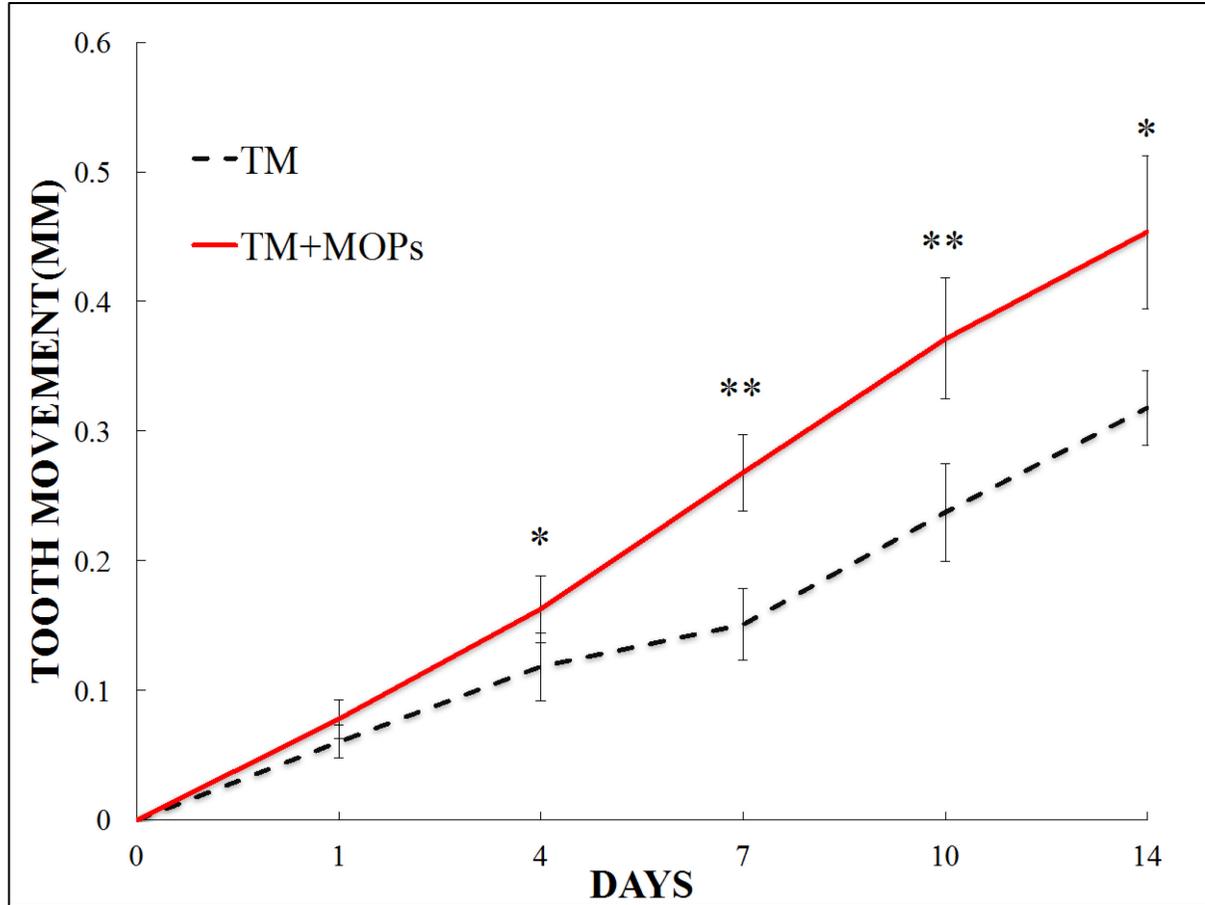


Fig. 4 歯の移動距離の推移

(*P<0.05 及び **P<0.01)

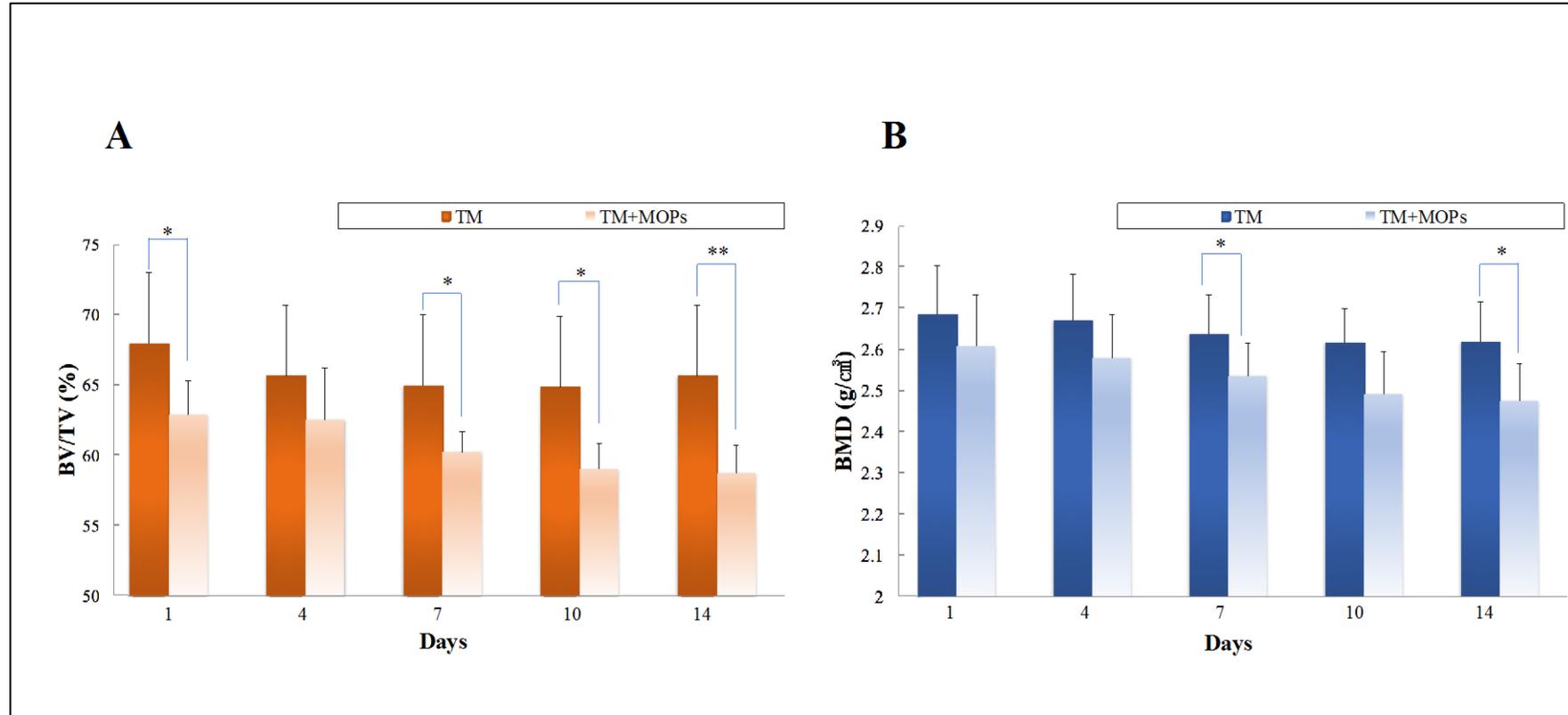


Fig. 5 A: BV/TV の推移 B: BMD の推移

(*P<0.05 及び **P<0.01)

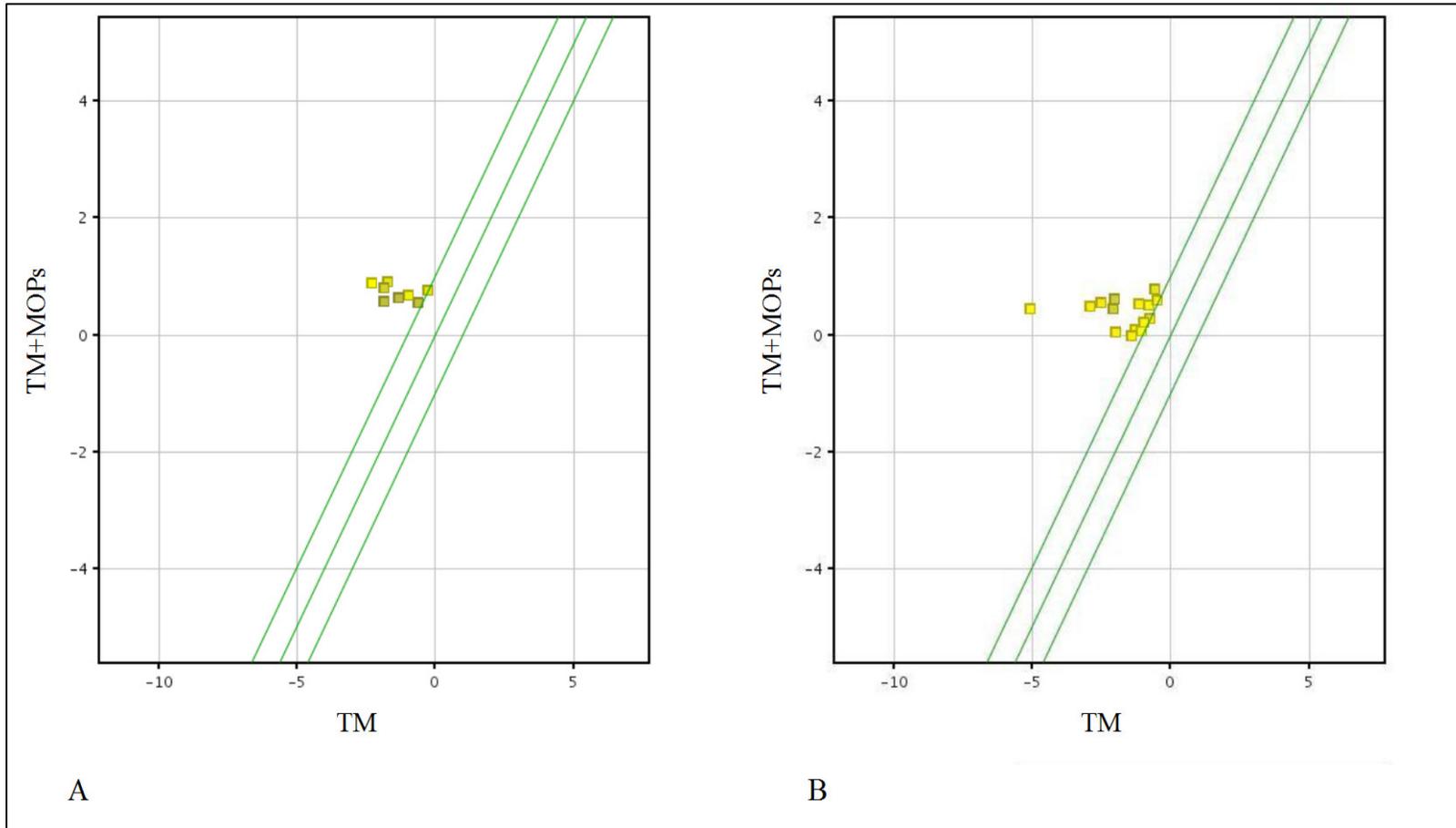


Fig. 6 A: MCM 遺伝子発現量の比較 B: CDC 遺伝子発現量の比較

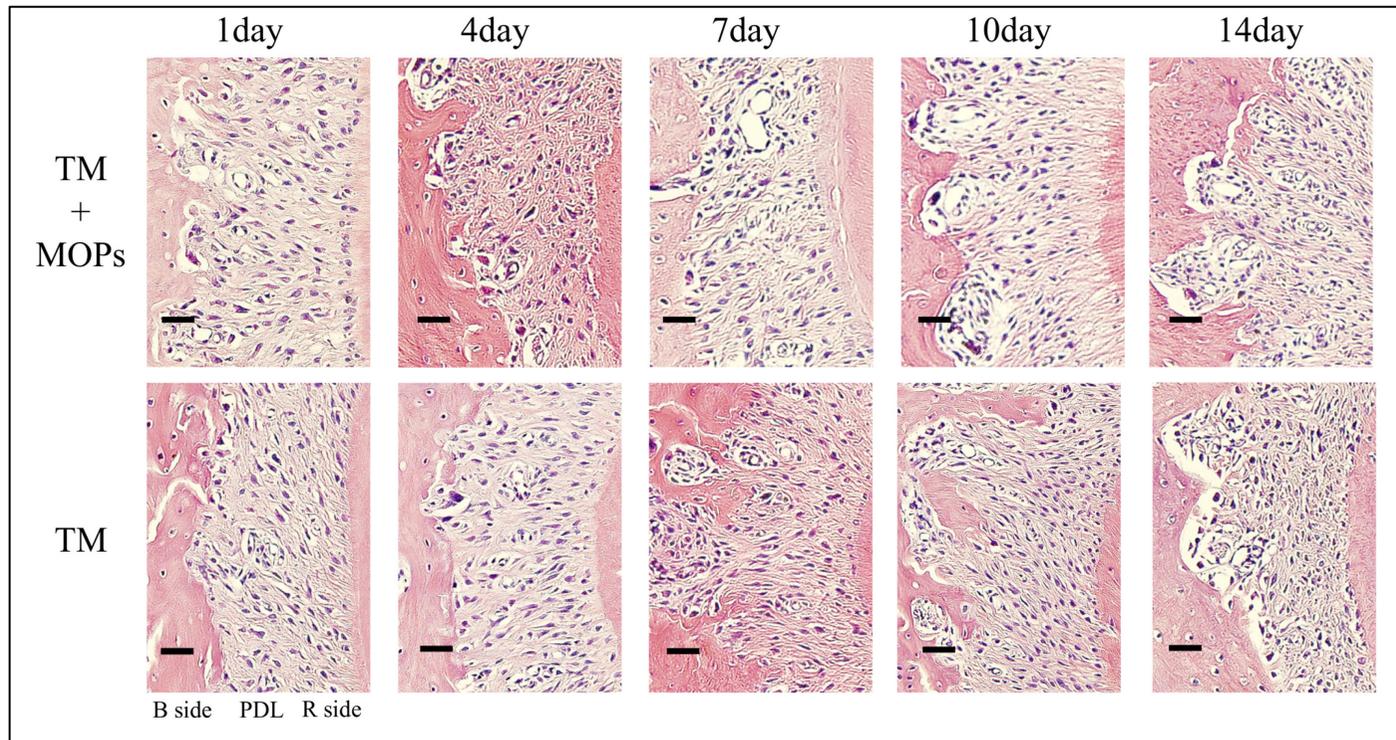


Fig. 7 病理組織学的染色結果 (H.E. 染色)

B side: 齒槽骨側, R side: 齒根側, PDL: 齒根膜 200 倍, Bar: 50 μ m.

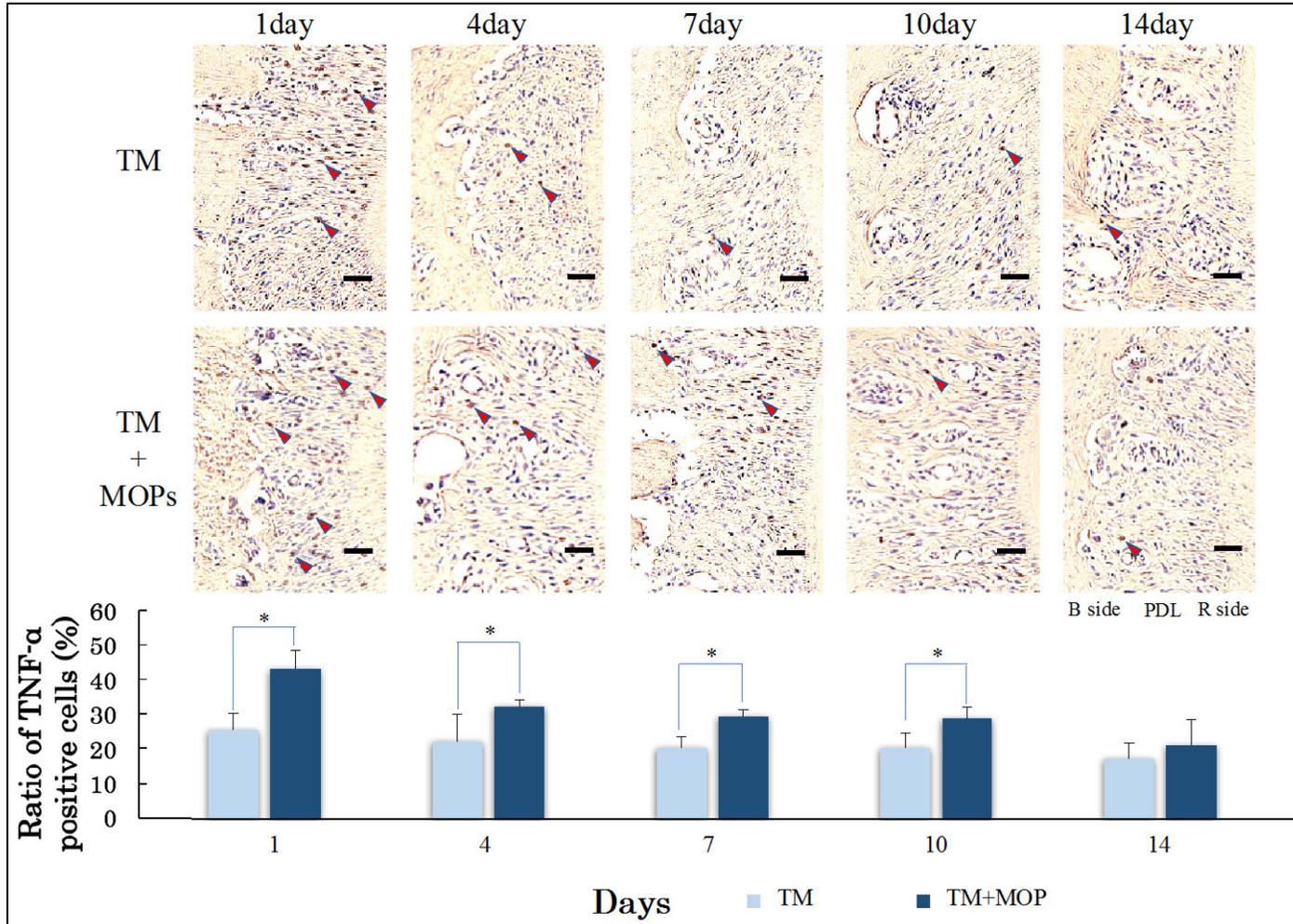


Fig. 8 免疫組織化学染色結果 (TNF- α) と陽性率の2群間比較
 B side: 齒槽骨側, R side: 齒根側, PDL: 齒根膜 200倍, Bar: 50 μ m. *P < 0.05.

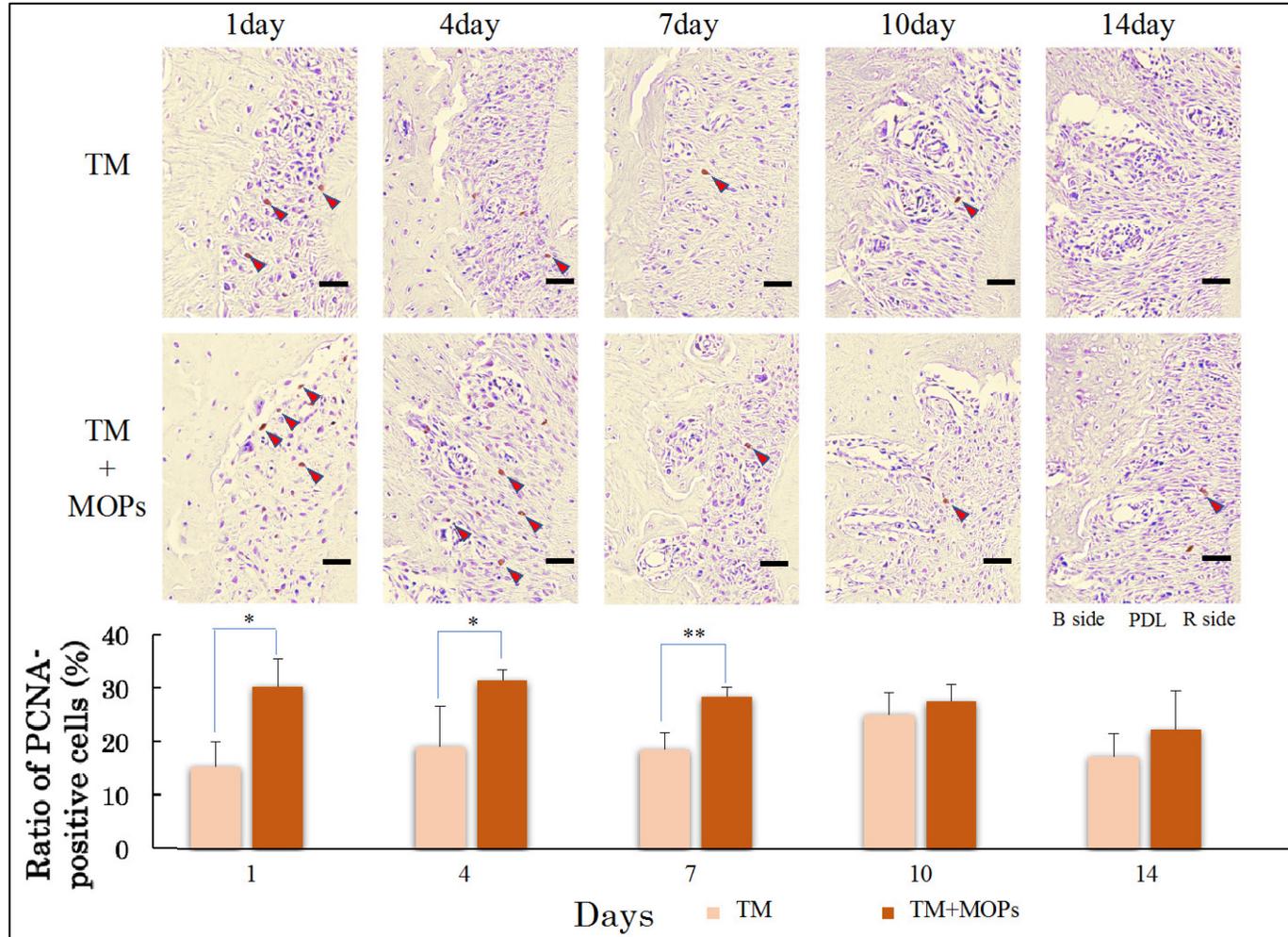


Fig. 9 免疫組織化学染色結果 (PCNA) と陽性率の2群間比較

B side: 歯槽骨側, R side: 歯根側, PDL: 歯根膜 200倍, Bar: 50 μm. *P < 0.05, **P < 0.01.

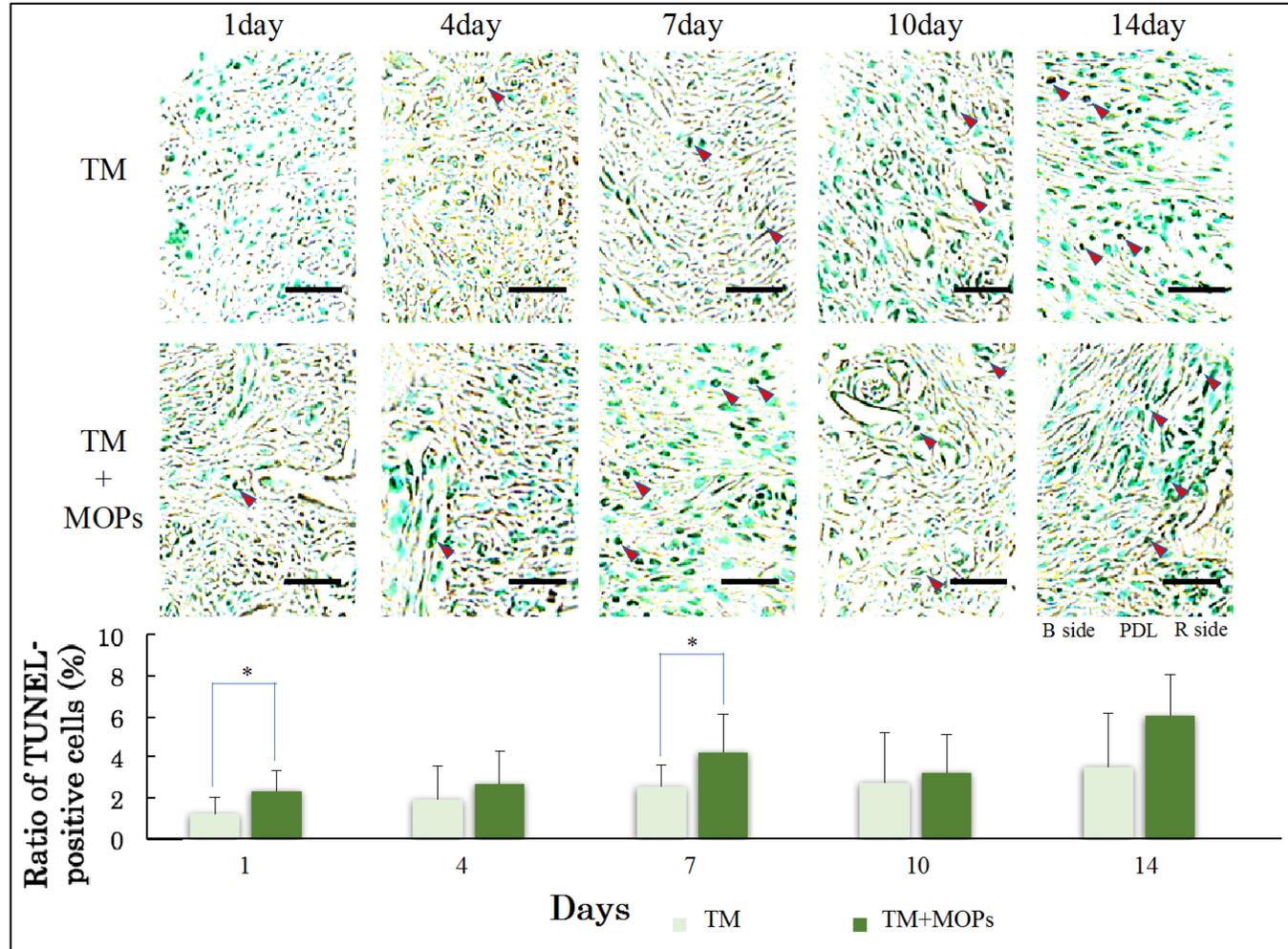


Fig. 10 TUNEL 染色結果と陽性率の 2 群間比較

B side: 齒槽骨側, R side: 齒根側, PDL: 齒根膜 400 倍, Bar: 50 μ m. *P < 0.05.