

歯周組織の加齢変化が実験的な歯の移動に及ぼす影響について

京 面 伺 吾

Influences of Aging Changes in Periodontal Tissues on Experimental Tooth Movement

Shingo Kyomen

(平成6年1月27日受付)

緒 言

近年、歯科矯正臨床において、成人不正咬合患者の治療の機会が多くなってきた^{1,2)}。成人に対する歯科矯正治療においては、顎骨の成長を利用した不正咬合の改善が行えないこと、歯周疾患の罹患率がより高いこと、口腔衛生状態が不良な場合には矯正治療中に歯周組織の損傷が生じやすいことなど、歯の移動に影響を及ぼしうる複雑な要因が多く存在する³⁻⁶⁾。

このような種々の問題を有する成人不正咬合患者において、若年者の場合と同様に適切な歯の移動を遂行するためには、矯正力に対する歯周組織の反応の差異を明らかにした上で、これを十分に理解することが極めて重要と考えられる。

歯周組織の構成要素のうち、歯周靭帯は歯の移動時に極めて重要な役割を有する。歯周靭帯内に最も多く存在する線維芽細胞様細胞について、Totoら⁷⁾、Stahlら⁸⁾はその増殖活性が増齢的に低下することを報告した。さらに、Reitan⁹⁾、山内¹⁰⁾は成熟個体では成長期個体と比較して歯の移動量が少ないことを示した。また、成長期個体においては歯槽骨密度が低く、これが歯の移動量に影響を及ぼすことを実験的に明らかにした研究¹¹⁾も散見される。しかし、加齢に伴う歯周靭帯内細胞の増殖活性の低下が歯の移動に及ぼす影響についての検討は全く行われていない。

本研究においては、成長期ラットと成熟期ラットの実験的な歯の移動における歯周靭帯内の細胞増殖の様相を免疫組織化学的に評価し、両群における差異を明らかにすることを目的とした。

研究 方 法

1. 歯の移動実験

1) 実験動物

実験群として、6週齢(以下、Y群と略記)と14週齢(以下、A群と略記)のウィスター系雄性ラットを32匹づつ、対照群(YC, AC群)としてそれぞれ同週齢のラットをそれぞれ4匹づつ、計72匹を実験に供した。その平均体重は、6週齢で164.8±16.9g、14週齢で400.3±33.6gで、後者の方が有意に大きな値を示した。さらに実験群(Y, A群)のラットを10gの矯正力(light force)を加えたYL, AL群(それぞれ16匹づつ)、40gの矯正力(heavy force)を加えたYH群, AH群(それぞれ16匹づつ)に分類した(表1)。

各ラットの飼育は、週齢別に分けたケージ内にて可及的に同一条件下で行い、固形飼料(固形飼料MF,

表1 実験に供されたウィスター系雄性ラットの週齢と匹数

処 置	週齢と匹数	
	6週齢 (Y)	14週齢 (A)
対照群: 無処置 (C)	4	4
実験群: 矯正力負荷 10g (L)	16	16
40g (H)	16	16

広島大学歯学部歯科矯正学講座(主任:丹根一夫教授)本論文の要旨は、平成5年2月第72回広島大学歯学会例会、平成5年11月第52回日本矯正歯科学会大会および平成5年12月第41回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会において発表した。

オリエンタル酵母工業, 東京) および水 (水道水) を自由に摂取できるようにした。

2) 実験的な歯の移動方法

実験群における歯の移動には, Reitan と Kvam¹²⁾ の考案した固定式装置を一部改良して用いた。装置の作製は, ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg (ネンブタール 1 ml/kg, ダイナポット社, 大阪) と硫酸アトロピン 0.5 mg/kg (硫酸アトロピン注射液タナベ 1 ml/kg, 田辺製薬, 大阪) の混合麻酔下で採得した上顎の作業用模型上で行った。上顎切歯に矯正用バンド (ボンディングベース M, トミーインターナショナル, 東京) を作製し, これに主線として直径 0.7 mm のサンブラチナ線 (三金工業, 大阪) を蝋着した後, 歯の移動のための 0.010 インチの弾線 (Elgiloy, Rocky Mountain, USA) を主線に蝋着した。なお, 10 g の矯正力を負荷する場合には弾線にヘリックスを組み込んだものを, 40 g の矯正力を負荷する場合にはこれを組み込まないものを用いた (図 1)。

装置の装着にあたっては, 意図する矯正力が正確に発現されていることをダイヤルゲージ (山浦製作所, 東京) を用いて確認した。次に, 装置の適合性を十分に確かめた後, 矯正用接着レジン (オルソマイトスーパーボンド, サンメディカル, 京都) を用いて上顎切歯に装着した。なお, 対照群には装置の装着は行われなかった。

歯の移動期間は 1, 3, 7, 14 日間とし, その間に装置の脱落のないことを確かめるとともに, 移動開始後 1, 3, 5, 7, 10, 14 日目に体重測定を行った。

2. 歯の移動量の計測方法

移動開始直前および終了時に, 前述の方法による麻

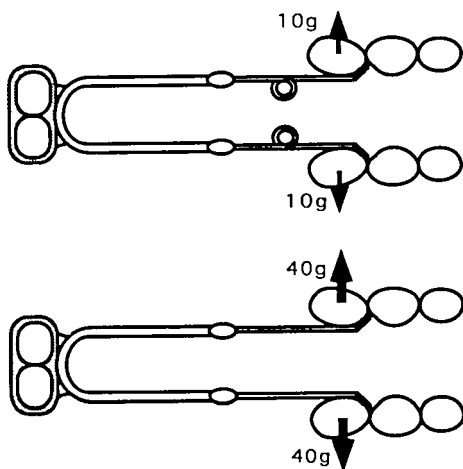


図 1 歯の移動装置。

酔下でシリコン印象材 (Xantopren L, Bayer Dental, Germany) を用いて上顎歯列の印象を採得した。これに歯科用超硬石膏 (ニューフジロック, 而至歯科工業, 東京) を注入して模型を作製した。次に, 模型上で両側上顎第一臼歯近心小窩間の距離をデジタルキャリパス (三豊製作所, 東京) を用いて計測し, 移動前後の距離の差を歯の移動量とした。

このようにして求めた歯の移動量について, t-検定を用いて実験群間における有意差の有無を検討した。

3. 歯の移動に伴う歯周靱帯内の組織変化ならびに細胞増殖度の検討

1) 組織切片作製法および免疫組織化学的染色法

歯の移動終了後, 免疫組織化学的染色に備え標識試薬として 5-Bromo-2'-deoxyuridine (Amersham International plc, England) (以下, BrdU と略記) を体重 100 g あたり 0.5 ml の割合で腹腔内注射により投与した。その 1 時間後, 麻酔下で 10% 中性緩衝ホルマリン溶液による灌流固定を行い, 上顎骨を摘出後, 一昼夜にわたり浸漬固定を行った。固定終了後, 14% エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム溶液 (pH=7.4) 中で二週間試料の脱灰を行った。次に, 上昇アルコール系列により脱水の後, 抗原性を失わないように処理温度を 62°C 前後に保ちながらパラフィンに包埋した。

根分岐部から根尖方向へ約 110~120 μm の深さの部位に最も明瞭な圧迫領域が出現することが予備実験において確認されたため, その部位を含む根分岐部から根尖へ向かって 0~270 μm の範囲について, 厚さ 4.5 μm の水平断切片を作製し, 1 枚おきに選んだ 30 切片を試料とした (図 2)。作製された 30 切片のうち, 10 切片目 (根分岐部より根尖方向へ 90 μm の部位) から 1 枚おきに選んだ 6 切片には免疫組織化学的染色を, 残りの切片にはヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 HE 染色と略記) を施した。

免疫組織化学的染色には, 細胞増殖検出キット (Amersham International plc, England) を用いた。通法にしたがい脱パラフィンを行った切片上で, 一次抗体として抗 BrdU モノクローナル抗体を室温, 湿箱中で 90 分間, 二次抗体として Peroxidase 標識抗マウス IgG_{2a} 抗体を同一条件下で 45 分間反応させた。次に, Diaminobenzidine (以下 DAB と略記, DAB 基質キット; Vector Laboratories, USA) を 10 分間反応させた。なお, 各ステップ間の組織切片の洗浄にはリン酸緩衝食塩水 (pH=7.2) を用いた。その後, ヘマトキシリンによる対比染色の後, 通法にしたがい封入, 歯周靱帯内細胞の観察を行った。

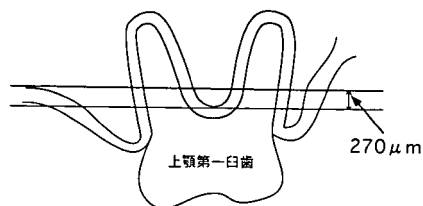


図2 組織変化の観察部位.

2) 組織変化の光顕的観察

HE染色を施した切片について、すべての実験群における経日的な組織変化を光学顕微鏡を用いて観察し、それぞれの対照群での組織変化との比較検討を行った。なお、組織変化の観察は口蓋側（牽引側）と頬側（圧迫側）に分けて行った。

3) 標識細胞数およびラベリングインデックス（以下、LIと略記）の算出

歯の移動装置から最も離れた部位であり、装置による歯肉の炎症などの影響が最も少ないと思われる近心頬側根について、以下の方法で標識細胞数およびLIを算定した。

まず、免疫組織化学的染色を施した切片の20倍拡大写真上で山部¹³⁾の方法に準拠して、歯槽骨中央線に対する垂線と近心頬側根の接点を求め、歯周靭帯を頬側と口蓋側に区分した（図3）。次に、近心頬側根周囲を100倍に拡大した写真上で歯根及び歯槽骨の外形をトレースし、それらに囲まれた歯周靭帯内に存在する線維芽細胞様細胞をはじめとした全ての細胞の数（全細胞数）、ならびにDABにより茶褐色に標識された細胞の数（標識細胞数）をハンディコロニーカウンター（柴田化学器械工業、東京）を用いて数えた。

次に、歯周靭帯内の細胞について増殖度の評価を行うため、全細胞数に対する標識細胞数の割合（LI）を求めた。LIを細胞増殖の評価として用いる場合、一実験動物あたりの基準として全細胞数が2000個以上であることが必要とされている¹⁴⁾。対照群および実験群の牽引側においてはその基準が充足されていたため、LIを細胞増殖度の指標として用いた。しかし、実験群の圧迫側ではこの基準を満たしていなかったため、一切片当たりの標識細胞数を歯周靭帯内の細胞増殖の評価に用いた。なお、標識細胞数は各動物の標識細胞総数を切片数で割ることにより算出した。

以上のLI、標識細胞数について、t-検定を用いて実験群間ならびに対照群との有意差の有無を検討した。

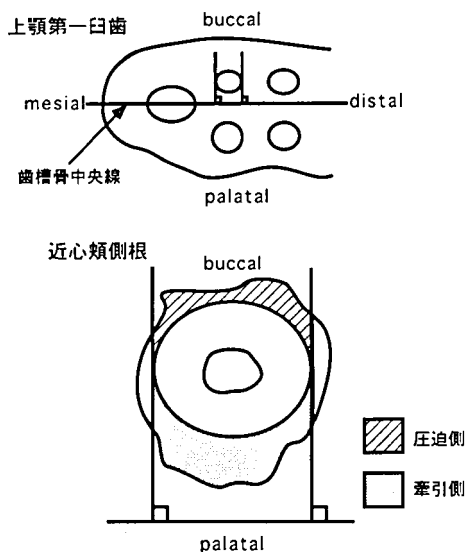


図3 牽引側・圧迫側の決定方法.

結 果

1. 実験期間中の体重変化

YL, YH 群については、実験開始後3日経過時まで体重の増加量がやや少ない傾向にあったが、その後はYC 群とほぼ同程度の増加を示した。一方、AL, AH 群では実験開始直後に一過性の体重減少が認められたが、3日目以降ではAC 群とほぼ同程度の体重増加を示した（図4）。

また、AC, AL, AH 群のラットにおける体重の増加量は、6週齢のYC, YL, YH 群のラットよりも小さい傾向にあった（図4）。

2. 歯の移動量

YL, YH 群では1日目に0.4~0.5mm、3日目に

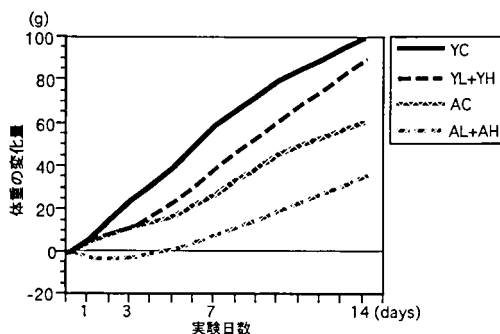


図4 実験開始時からの体重変化.

0.6~0.8 mm の歯の移動が生じたが、3日経過時と7日経過時の間にはほとんど差が見られなかった。また、14日経過時ではそれ以前と比べて大きな移動量を示し、YL 群では 0.98 mm、YH 群では 1.21 mm の大きな移動量が得られた (図 5)。

一方、AL、AH 群においては1日経過時と7日経過時の移動量はほとんど変わらず、0.3~0.4 mm の値を示した。その後、移動量は漸次増加し、14日目のAL 群では 0.60 mm、AH 群では 0.72 mm の大きな移動量が認められた (図 5)。

なお、3日経過時の歯の移動量についてはYL、AL 群間およびYH、AH 群間に、14日経過時の歯の移動量についてはYH、AH 群間にそれぞれ有意の差が明らかとなった (図 5)。すなわち、成長期ラットにおける歯の移動量は成熟期ラットと比べ明らかに大きいことが示された。一方、実験期間を通じてYL、YH 群間およびAL、AH 群間には有意の差が認められなかった。

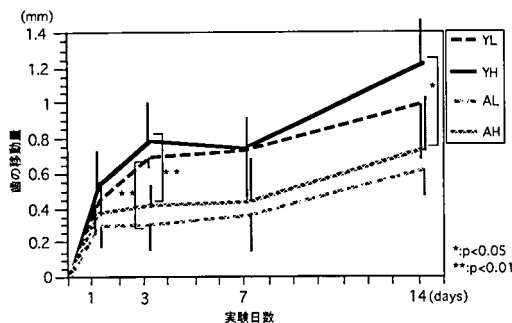


図 5 4 実験群における歯の移動量。

3. 歯周靭帯における組織変化

1) 対照群

歯周靭帯内の細胞分布はYC、AC 群のいずれにおいても類似した様相を示したが、毛細血管がAC 群においてやや少ない傾向にあった。さらに、YC 群では血管周囲に多くの細胞が分布していたのに対し、AC 群では多くの線維成分が認められた。また、歯周靭帯幅については、AC 群の方がやや狭窄している傾向を示した (図 6)。

2) 実験群

歯の移動1日目の牽引側では、歯根膜腔の拡大と線維の著明な伸展がいずれの群においてもほぼ同様に認められた (図 7-a)。また、免疫組織化学的染色を施した切片上の歯周靭帯全域において、標識細胞として主に紡錘形の線維芽細胞の分布が認められた。一方、圧迫側では広範囲にわたる硝子様変性組織ならびに細

胞核の濃縮、融解や細胞成分の消失が認められたが、YL 群ではAL 群と比較して細胞成分の減少は少なく、歯周靭帯の変性も軽度であった (図 7-b, d)。また、40 g の矯正力を用いたYH、AH 群では、歯根膜腔の著しい狭小化が認められ、YL、AL 群と比較して変性の度合いが顕著であった (図 7-c, e)。

移動3日目の牽引側では、毛細血管に近接して骨添加の開始を示す像が観察されたが、各実験群間に著明な差異は認められなかった (図 8-a)。一方、YL 群の圧迫側では硝子様変性組織の範囲が減少し、毛細血管や細胞が多く認められた。また、歯槽骨表面の吸収窩に接して破骨細胞の出現が認められ、活発な骨改造像が観察された (図 8-b)。他の3群では硝子様変性組織の範囲が1日目と比較してやや減少する傾向を示したものの、YL 群と比べると依然広く存在しており、歯槽骨表層に接する破骨細胞はほとんど認められなかった (図 8-c~e)。また、YH、AH 群では歯槽骨の穿下性吸収が主として認められたのに対し、10 g を負荷した群、特にYL 群では直接性吸収像が多く観察された (図 8-b~e)。

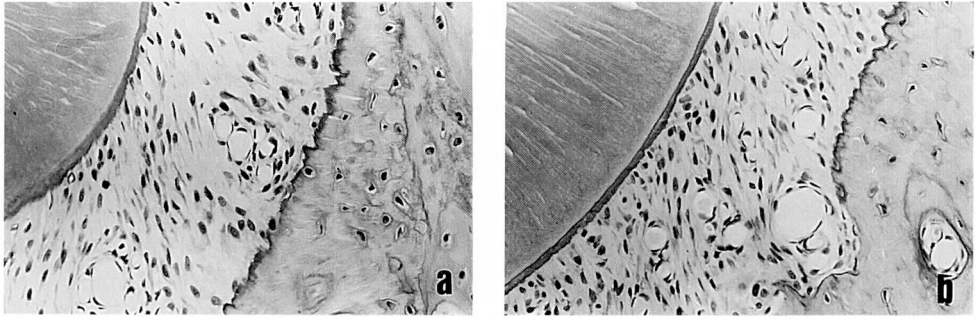
7日目の牽引側では、3日目よりも広範囲に骨添加像が観察された (図 9-a)。一方、圧迫側では、3日目の像と比べて大きな変化が見られ、いずれの実験群においても硝子様変性組織周囲での毛細血管および細胞数の増加、それに伴う変性組織範囲の大幅な減少、歯槽骨表面吸収窩における破骨細胞による骨の吸収像、歯周靭帯幅の回復などが明らかとなった (図 9-b~e)。また、この時期に特徴的な圧迫側の組織改造に関連する変化として、免疫組織化学的染色を施した切片上で、変性組織および毛細血管周囲に標識された単核・円形の細胞が主として認められた。さらに、YH、AH 群の一部においては、変性組織の残存や歯根表面の吸収などの異常所見が認められた (図 9-c, e)。

14日目の牽引側では、さらに広範囲に骨の添加像が認められたが、各群でその程度に著明な差は認められなかった (図 10-a)。一方、圧迫側においては、いずれの群においても硝子様変性組織がほとんど消失し、線維芽細胞様細胞が多く認められた。しかし、対照群で見られた歯周靭帯線維の規則正しい走行は未だ認められなかった (図 10-b~e)。また、40 g を負荷したYH、AH 群では一部に歯根象牙質にまで及ぶ吸収像が認められた (図 10-c, e)。

4. 歯周靭帯における細胞増殖の様相

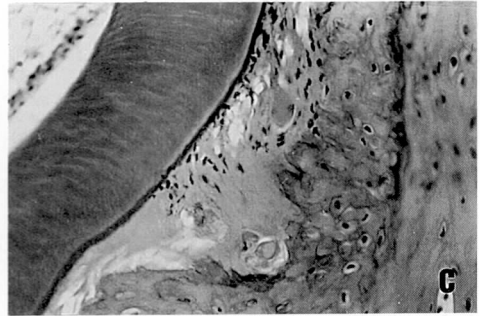
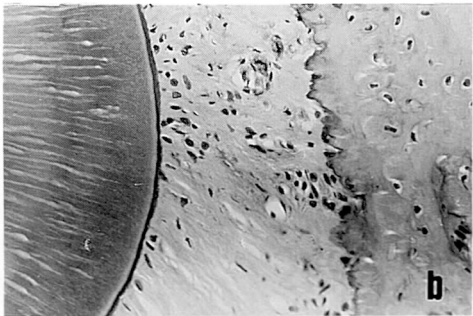
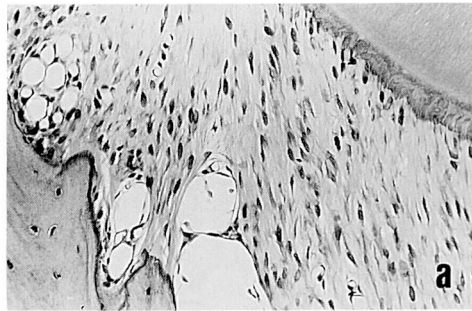
1) 対照群の比較

口蓋側、頬側ともにYC 群のLIはAC 群のほぼ2倍の値を示し、有意に大きな値が認められたことよ



(×180)

図6 歯の移動を行っていない対照群の光顕的組織像.
a. YC群 b. AC群



(×180)

図7 歯の移動1日目における光顕的組織像.

- a. YL群・牽引側
- b. YL群・圧迫側
- c. YH群・圧迫側
- d. AL群・圧迫側
- e. AH群・圧迫側

牽引側については、各実験群間で明らかな差異を認めなかったため、YL群のみ示す。

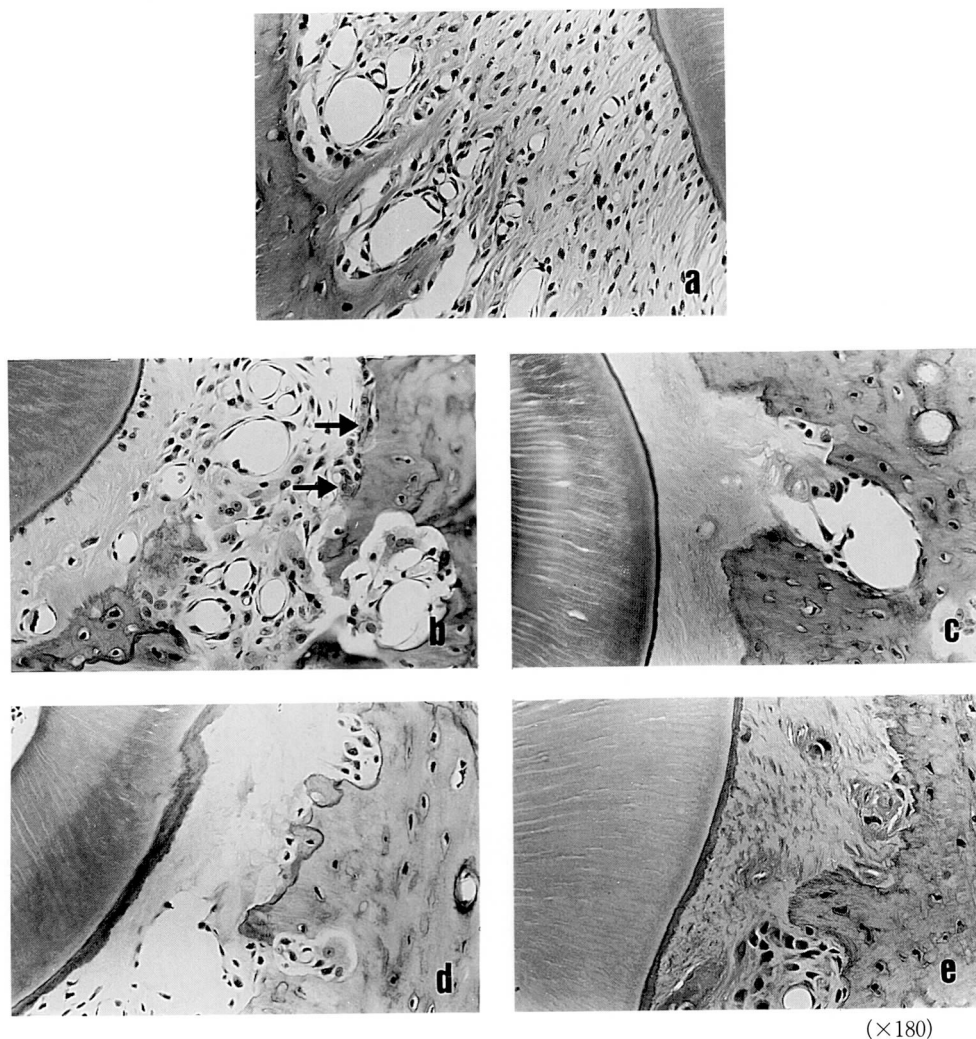


図8 歯の移動3日目における光顕的組織像。

- a. YL群・牽引側 b. YL群・圧迫側
 c. YH群・圧迫側 d. AL群・圧迫側
 e. AH群・圧迫側

矢印は破骨細胞を示す。

牽引側については、各実験群間で明らかな差異を認めなかったため、YL群のみ示す。

り、両群間における歯周靭帯内細胞の増殖活性の差異が明らかとなった(図11)。

2) 口蓋側(牽引側)におけるLIについての各実験群間の比較

口蓋側におけるLIの経日的変化を見ると、歯の移動1日目で著しい増加を呈した後、3日目へかけて漸次減少する傾向を示した。さらに、7、14日目では各実験群においてそれぞれの対照群にはほぼ近似した値が認められた(図12)。

歯の移動1日目では、いずれの群においてもLIは

それぞれの対照群の値と比較して有意に大きな値を示した。各実験群間の比較を見ると、YL, YH群の値がそれぞれAL, AH群よりも大きい傾向を示した。とりわけ、YL群はAL群と比べて有意に大きな値を示し、週齢による細胞増殖度の差が明らかとなった。なお、矯正力の大小による細胞増殖度に明確な差異は認められなかった(図13)。

移動3日目では、1日目と比較してLIの著しい減少が認められた。しかし、対照群と比べていずれの群も大きな値を示し、とりわけAL, AH群が有意に大き

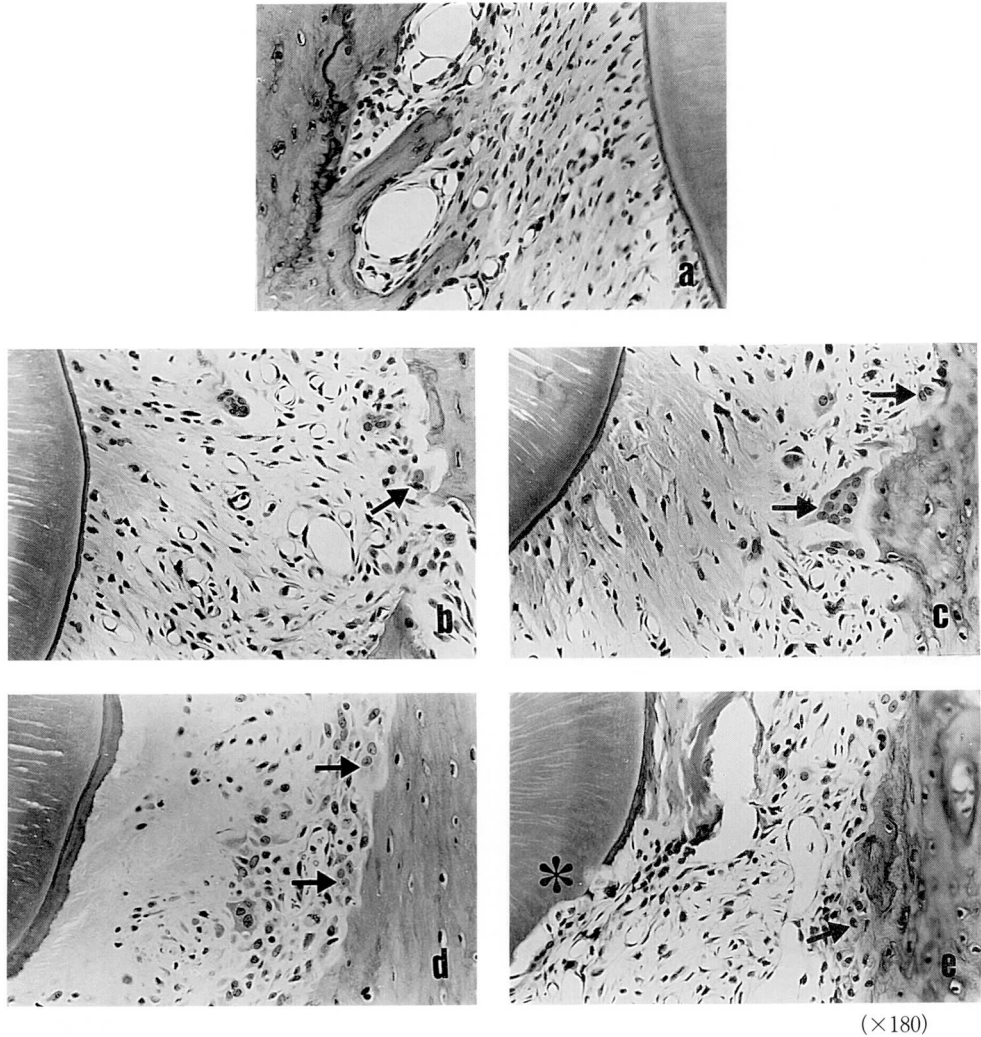


図9 歯の移動7日目における光顕的組織像。

- a. YL群・牽引側 b. YL群・圧迫側
 c. YH群・圧迫側 d. AL群・圧迫側
 e. AH群・圧迫側

矢印は破骨細胞を、*は歯根吸収を示す。

牽引側については、各実験群間で明らかな差異を認めなかったため、YL群のみ示す。

な値を示したことより、細胞増殖は依然として活発であることが認められた。なお、この段階では週齢の差による細胞増殖の程度に明確な差異が認められなかった(図14)。

7日目になると、いずれの群においても対照群とはほぼ同じレベルまで細胞増殖度が減少し、かつ各実験群間に有意の差は認められなかった。これらのことより、3日目以前に比べて細胞増殖度の著しい低下が明らかとなった(図15)。

14日目では、いずれの実験群においても対照群の値

とほぼ同じで、7日目に見られたのと同様の所見が認められた(図16)。

3) 頬側(圧迫側)における標識細胞数についての各実験群間の比較

頬側における標識細胞数の経日的変化を見ると、YL群では3日目に著しい増加が認められ、活発な細胞増殖が明らかとなった。一方、YH、AL、AH群では、3日目においても標識細胞数は少なく、細胞増殖は活発ではなかった。7~14日目においては、いずれの群においても標識細胞数は増加し、活発な細胞増殖

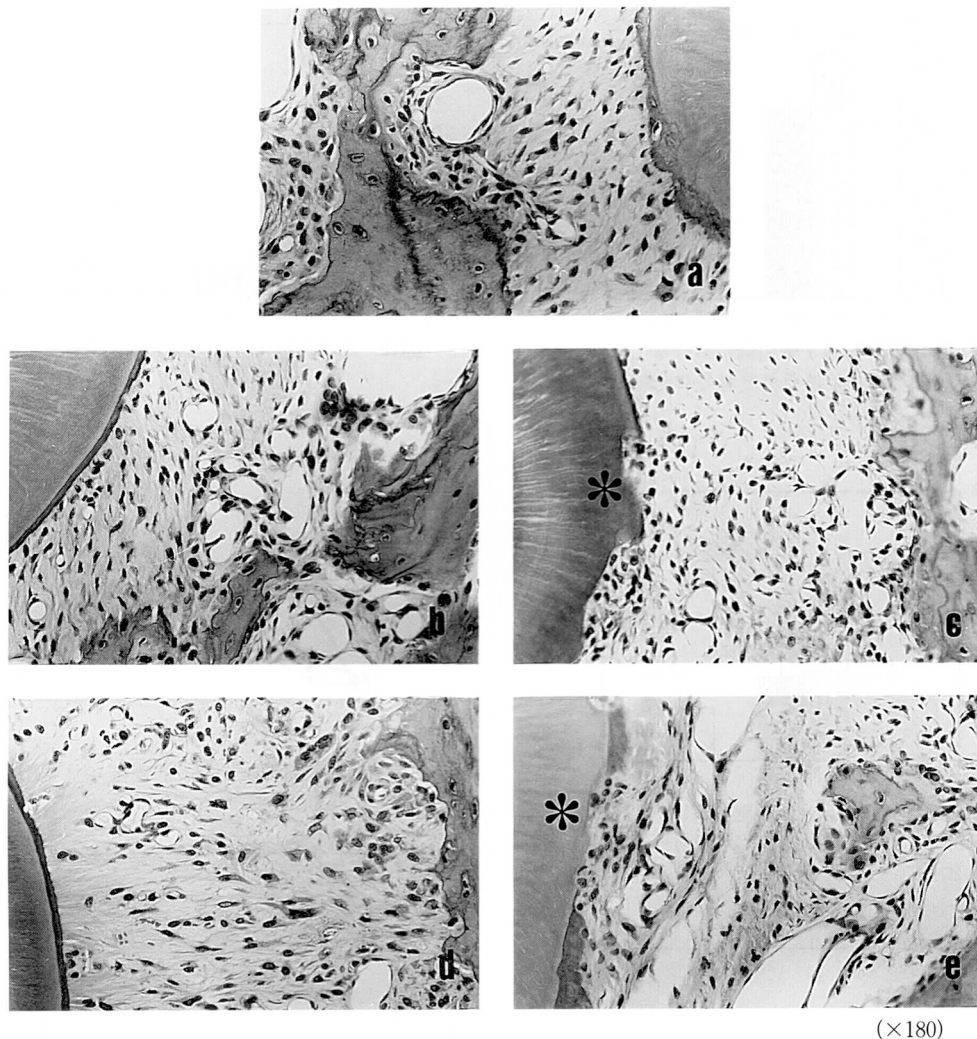


図10 歯の移動14日目における光顕的組織像.

- a. YL群・牽引側 b. YL群・圧迫側
- c. YH群・圧迫側 d. AL群・圧迫側
- e. AH群・圧迫側

*は歯根吸収を示す。

牽引側については、各実験群間で明らかな差異を認めなかったため、YL群のみ示す。

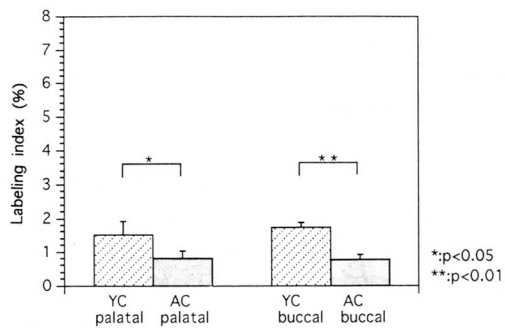


図11 対照群のLI.

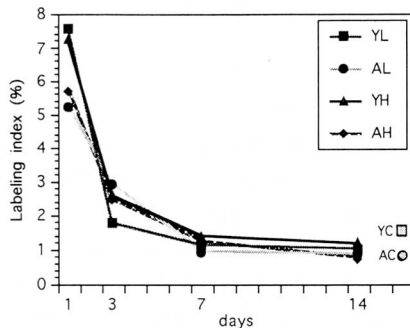


図12 LIの経日的変化(牽引側).

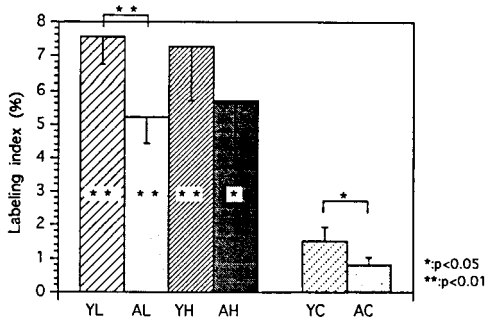


図13 菌の移動1日目・牽引側におけるLI. Bar中 asterisk はそれぞれの対照群との有意差を示す。

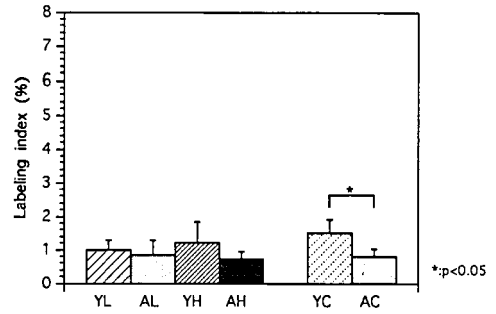


図16 菌の移動14日目・牽引側におけるLI.

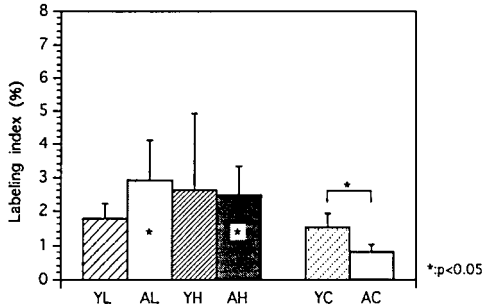


図14 菌の移動3日目・牽引側におけるLI. Bar中 asterisk はそれぞれの対照群との有意差を示す。

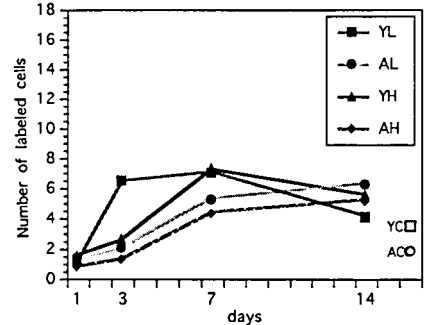


図17 標識細胞数の経日的変化 (圧迫側).

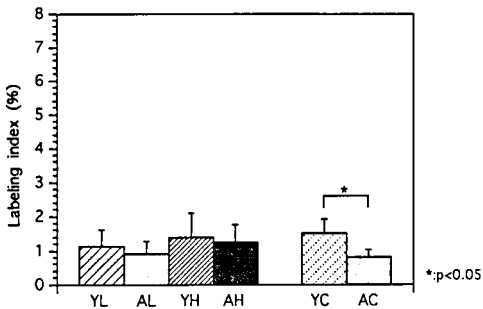


図15 菌の移動7日目・牽引側におけるLI.

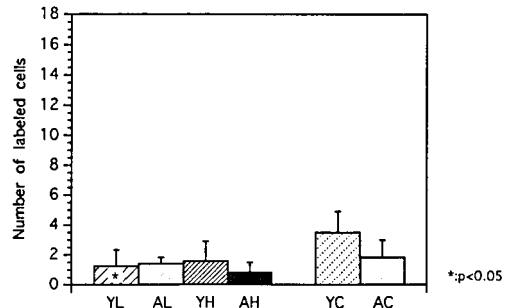


図18 菌の移動1日目・圧迫側における標識細胞数. Bar中 asterisk はそれぞれの対照群との有意差を示す。

が明らかとなった (図17)。

菌の移動1日目においては、いずれの群においても対照群と比べて標識細胞数が極めて小さな値を示した。また、この時点においては各実験群間に有意の差は認められなかった (図18)。

3日目においては、YL群のみが標識細胞数の著しい増加を示し、とりわけ、AL群との間には有意の差が認められた。これに対し、AL、YH、AH群においては対照群と比較しても小さな値を示し、細胞増殖活性

が低いことが認められた (図19)。このことより、週齢の増加、あるいは過度の矯正力の負荷により、圧迫側における細胞増殖の開始時期が遅延することが明らかとなった。

7日目では、いずれの群においても標識細胞数が著しく増加して、YL、AL、AH群では対照群より有意に大きな値を示した。特に、AL、AH群ではYL群より遅れ、この時点においてはじめて対照群より有意に大きな値を呈するに至った。また、YL群はAL群よりも有意に大きな値を示し、3日目に見られた所見と同

様に週齢の増加による細胞増殖の遅延が明らかとなった (図20)。

14日目では、YL, YH 群の標識細胞数が7日目と比較すると減少傾向を示し、逆に AL, AH 群ではわずかな増加傾向が見られた。このような変化により、YL, AL 群間および YH, AH 群間の差が認められなくなるとともに、AL, AH 群における細胞増殖の程度が対照群より有意に大きな値を示した (図21)。

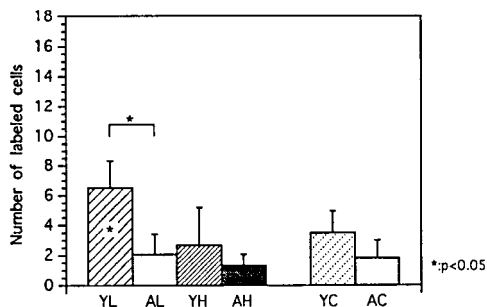


図19 歯の移動3日目・圧迫側における標識細胞数。Bar 中 asterisk はそれぞれの対照群との有意差を示す。

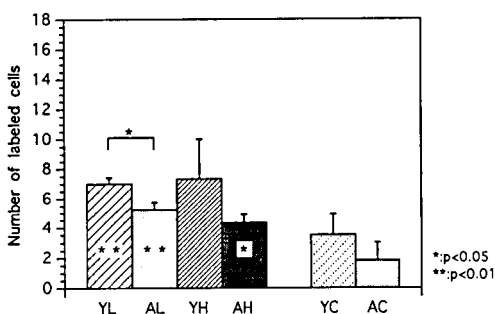


図20 歯の移動7日目・圧迫側における標識細胞数。Bar 中 asterisk はそれぞれの対照群との有意差を示す。

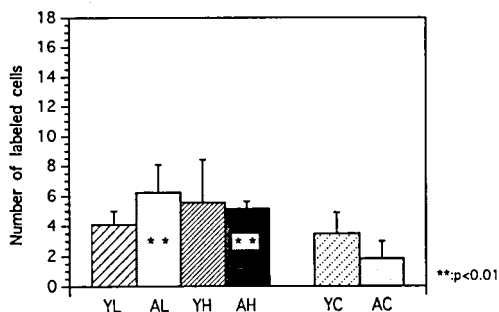


図21 歯の移動14日目・圧迫側における標識細胞数。Bar 中 asterisk はそれぞれの対照群との有意差を示す。

考 察

1. 実験方法について

1) 研究対象について

加齢現象は、広義のものと狭義のものに大別される。前者は出生時からの普遍的な成長変化を、後者は成熟後の変化のうちでも主に退行的なもの、すなわち、老化に伴う変化を意味する。加齢に際しては、生体において種々の形態的、機能的変化が認められるが、なかでも細胞の代謝活性の変化に代表される細胞性変化は、それらの基本となるものとして挙げられる¹⁵⁾。Tonna¹⁶⁾はマウス大腿骨骨膜における造骨系細胞の増殖能について検討した結果、生後8週齢で急激な減少が起こり、その後は活発な細胞増殖が生じなかったことを明らかにした。

本研究の実験動物として用いたラットは、加齢変化の検討には従来よりしばしば用いられてきた。Vogel¹⁷⁾は、4週齢ラットを young, 4カ月齢から1年齢を adult, 2年齢を adult senescent として扱い、体内結合組織の経時的変化について報告した。その結果、ラットのライフサイクルを成長期、成熟期、老齢期に分けた場合、結合組織(皮膚、腱)の含有コラーゲン量や、粘弾性などの機械的性状が三時期において大きく異なることを示した。

身体の成熟について考える場合、性成熟がひとつの指標となると思われる。性成熟とは生殖器が形態的、機能的に完成し、生殖可能な状態に達する過程を意味するが、雄性ラットにおいては、受精可能な活動性の精子が検出される60~70日齢が性成熟の時期であり、10週齢以上のものが繁殖に用いられる¹⁸⁾。

本実験に先立って行った予備実験において、3, 4, 6, 8, 10, 14, 20週齢の歯の移動を行っていないラット歯周靭帯の線維芽細胞様細胞の増殖度を免疫組織化学的染色を用いて調べたところ、6週齢以前と14週齢以降の動物では明らかな差が認められた。これは、Stahlら⁹⁾がラット歯周靭帯における細胞の増殖活性が10週齢前後で急激に低下することを明らかにした報告と一致する所見であった。

歯科矯正臨床における患者の年齢層を考慮した場合、歯周靭帯の老化に起因した反応性の差異について検討するよりも、成熟期にかけての歯周靭帯の加齢変化による影響を検討することがより重要と考えられる。そこで、本研究では20歳代の不正咬合患者を想定し、ほぼその時期に相当すると考えられる性成熟完了後約4週を経過した生後14週齢のラットを成熟期群として用いた。また、成長期群として白歯が咬合位に達して、機能を開始する時期である生後6週齢のものを

用いた。

なお、実験期間を通じて、6週齢、14週齢のいずれの群においても体重の増加が見られたが、1日あたりの体重増加量はYC群で7.1g、AC群で4.4gとYC群の方が大きかった。このことは、ラットにおいて性成熟後も生後一年くらいまでは体重の増加が認められ、徐々にその増加度が小さくなる¹⁹⁾、とした従来の報告に一致するものであった。また、実験開始前における両群ラットの平均体重を見ると成熟期ラットは成長期ラットよりも有意に大きい値を示し、両群は成長の程度が異なるラットから構成されていることが明らかとなった。これらの所見を総合すると、本研究で用いた6週齢と14週齢のラットは、それぞれ成長期、成熟期にある動物として極めて適切であったことが示唆される。

2) 実験的歯の移動方法について

従来、ラットの実験的歯の移動実験には種々の方法が用いられてきた。Waldoら²⁰⁾の方法はその代表であり、実験の再現性が高いこと、操作が容易であることなどの利点を有する。しかし、初期荷重が約200gとラット臼歯に対する矯正力としては強すぎること²¹⁾、エラスティックスの劣化、あるいはこれに伴う脱落が多いこと、歯の移動量の測定が困難であること、歯周組織の変化に対する歯の生理的な遠心移動の影響を考慮する必要があること、などの問題点も指摘されてきた。一方、ワイヤースプリングやコイルスプリングを利用した方法がこれに変わる方法として挙げられるが、装置の製作、力の大きさの調整が比較的容易であること、装着後の脱落が極めて少ないことなどより、ReitanとKvam¹²⁾の方法を一部改良して本実験に用いた。

実験で用いる矯正力の大きさに関しては、種々の値が示されている²¹⁻³⁰⁾。本実験では、毛細血管圧と歯根表面積を基に決定された最適矯正力80g/cm²の値³¹⁾をラット臼歯に換算したところ、約10gとなった²²⁾。そこで、この大きさの力をラット臼歯の移動に適した矯正力として用いた。さらに、従来のラットの実験的歯の移動実験において用いられた5~30gの矯正力の大きさ^{21,23-30)}を考慮して、過度の矯正力の範疇に含まれると考えられる40gの矯正力を用いることにした。なお、この矯正力は、本装置の弾線部のヘリックスを除き、10gの力とほぼ同じワイヤーの活性量を賦与した場合に発現されることが確認された。

また、装置装着による影響に関して、実験群14週齢ラットにおいて、歯の移動装置を装着した直後に、一時的な体重減少が認められたものの、ただちに対照群

と同じ変化を呈したことより、本装置の使用が実験結果に与える影響はほとんどなかったものと考えられた。

3) 免疫組織化学的染色法について

細胞増殖の評価には、従来³H-thymidineの取り込みを利用したオートラジオグラフィが用いられてきた^{7,14,32-43)}。しかし、本手法は放射性物質を取り扱うための特別な設備が必要であること、乳剤塗布後の露出時間が長いこと、などの多くの問題を有する⁴⁴⁾。

Gratznerら^{45,46)}は、これに変わる方法として、thymidineと同様に細胞分裂のS期(DNA合成期)にDNA内に取り込まれるthymidine類似構造を有するBrdUに対する抗体を開発し、これを用いた細胞増殖能の新しい評価法を考案した。同抗体は、変性DNA(単鎖DNA)上のBrdUのみと反応するため、これを検出するためにはDNAの変性が必要である。変性には通常酸処理が用いられていたが、細胞の形態変化や抗原性の失活などの問題が指摘された。次いで、Gonchoroffら^{47,48)}はDNAに対して核酸処理を行った核上でBrdUと反応する抗BrdU抗体を作製し、前述の欠点を排除した上で細胞増殖の評価が可能な手法を報告した。

このように、BrdUを細胞増殖の指標に用いた免疫組織化学的染色を応用した研究が、主として悪性腫瘍細胞の増殖の評価について多く行われてきたが⁴⁹⁻⁵¹⁾、実験的歯の移動についての報告は全く見られない。

本研究で求められたLIの値は、YC群の口蓋側で1.50±0.42%、頬側で1.72±0.16%であった。一方、³H-thymidineを用いた従来のオートラジオグラフィにより求められた歯周靭帯内細胞のLIは、生理的状态において6週齢ラットで1.4%¹⁴⁾、30日齢ラットで1.24~1.37%³²⁾であったことより、本研究結果にほぼ近似した値であった。従って、抗BrdU抗体を用いた免疫組織化学的染色法は、従来のオートラジオグラフィ法に代わって、歯周靭帯内の細胞増殖をより簡便、かつ確実に評価しうる手法と考えられた。また、細胞活性の変化は矯正力に対する歯周組織の反応の基本になっていると考えられるため、歯の移動における骨改造のひとつの指標として、歯周靭帯内の細胞増殖について検討を加えることは極めて意義のあることと考えられる。

今回、細胞増殖の評価に際して、対照群および実験群の牽引側においてはLIを用いた。しかし、硝子様変性組織が広範囲に生じ、細胞数が著しい減少を呈した圧迫側においては、LIの値が大きな変動を示し、細胞増殖度の評価には不適切と考えられたため、一切片上における各領域中の標識細胞の実数を算出して細

胞増殖の指標として用いた。このような2つの指標を用いたことにより、実際の歯の移動量の変化ならびに歯周組織の改造に対応した細胞増殖の変化を説明することが可能になったと考えられる。

2. 加齢に伴う歯周組織の変化について

ヒトの歯周組織における加齢変化としては、歯根膜腔の狭小化、歯周韧带内の細胞成分の減少、線維の硝子化および石灰化などが示されている⁵²⁾。

動物においても、Klingsbergら⁵³⁾が20日齢、200日齢、600日齢のラット、ハムスターについて報告したように、細胞成分ならびにその分布密度の減少、線維成分の増加など、ヒトにおいて示されたのと同様の所見が確認されている。

本研究に用いた6週齢と14週齢のラットを比較すると、歯周韧带における細胞分布の様相には明確な差異が認められなかったが、14週齢の群では毛細血管数が少なく、線維成分が多い傾向が認められた。小高ら⁵⁴⁾はラット歯周韧带において細胞数の減少は24～48週齢にかけて初めて生じることを示した。このことより、本実験に用いたラットについてもさらに週齢が大きくなるにしたがい、全細胞数の著明な減少が認められるものと考えられる。

Jensenら³²⁾は10～400日齢のラット第一臼歯歯周韧带内細胞をオートラジオグラフィにより検討し、400日齢ラットでも十分な修復能を有するものの、加齢により分裂能を有する細胞の減少が見られたと述べている。また、マウスについても加齢により細胞増殖が低下することがすでに示されている^{7,36)}。

本実験で用いた成長期ラットと成熟期ラットにおいては、細胞増殖度に以下のような差異があることが明らかとなった。すなわち、歯の移動を行っていない対照群(YC, AC群)のLIを比較した結果より、口蓋側、頬側の両部位において6週齢ラットは14週齢ラットよりも有意に大きな細胞増殖度を呈することが明らかとなった。このことより、矯正力などの刺激が加わっていない状態では、歯周韧带内細胞が加齢の影響を十分受けることが確認された。

さらに、一般結合組織において加齢による機械的性状の変化が明らかにされていることより¹⁷⁾、歯周組織を構成するコラーゲン線維や歯槽骨の外力に対する即時的応答性も低下し、その改造に何らかの変化が生じることが考えられる。従って、このような変化が本研究で明らかにされた歯の移動の遅延、細胞増殖の低下などに関与していた可能性も十分に示唆される。

3. 歯の移動に対する加齢変化の影響について

1) 歯の移動様相に対する影響

Reitan⁹⁾はヒト若年者(12歳)と成人(39歳)における歯の移動を比較し、成人の方が歯の移動量が少なかったこと、歯周韧带内線維の再構成に成人の方がより時間を要すること、などを報告した。また、成人の方が歯周韧带内全細胞数が少ないこと、細胞増殖に加齢の影響が見られること、についても言及した⁵⁵⁾。

山内¹⁰⁾は成長期ラットとして6週齢、成熟期ラットとして11週齢のものをを用い、第一臼歯の近心移動を14日間にわたって行った結果、移動量は6週齢群の方が大きかったと述べている。さらに、Bridgesら¹¹⁾は21～28日齢(young群)と90～100日齢(adult群)のラットにおいて、歯の移動速度はyoung群の方が大きいことから、加齢による骨密度の変化が歯の移動に影響を及ぼすことを示唆した。

本研究結果において、従来の報告に見られるように、歯の移動量については成長期ラットの方が成熟期ラットに比べて大きいことが明らかとなった。また、14日目においてYH, AH群間に有意の差が認められたことより、過度の矯正力を加えると、成長期ラットと成熟期ラット間の移動量の差がさらに顕著になることが示された。

一般に、歯の移動は、比較的大きな初期移動期(initial phase)、停滞期(lag phase)、これに続く大きな移動期(post-lag phase)という三相性を有することが知られている⁵⁶⁻⁵⁸⁾。また、Storey⁵⁶⁾は過度の矯正力を作用させた場合、二相目における歯の移動の停滞度がより強いものの、移動を妨げる変性組織が吸収され三相目に入ると、弱い矯正力を加えた場合に比べて、より早い速度で移動することを述べている。

本実験における歯の移動量の測定結果より、歯の移動の一相目はYL, YH群では移動開始後3日目まで、AL, AH群では1日目までであり、二相目はそれぞれ3～7日目と1～7日目であると考えられた。次いで、7日目以降はいずれの群においても歯の移動量は大きく、この時期が三相目に相当するものと思われる。

このように、成長期ラットと成熟期ラットでは、歯の移動の初期段階から移動量に差が生じること、成熟期ラットではlag phaseが長く、過度の矯正力を加えても大きな移動量が得られにくいこと、などが明らかにされた。このことより、加齢に伴う歯周組織の変化が歯の移動に大きな影響を与えていることが強く示唆された。

2) 歯周韧带の組織変化に対する影響

実験的な歯の移動における歯周韧带の経時的な組織

変化については、歯の移動初期の牽引側歯周韌帯幅の拡大および線維芽細胞の活発な増殖、圧迫側においては線維芽細胞の萎縮、線維の硝子化⁵⁹⁾、歯の移動後の歯周韌帯圧迫側変性組織におけるマクロファージによる吸収過程²⁴⁾、などが明らかにされてきた。また、市之川²⁹⁾は移動7～14日目の圧迫側歯周韌帯においては活発な組織改造が生じていること、奥村³⁰⁾は圧迫側歯根膜の硝子様変性組織の吸収に関与する多核性巨細胞の出現と消退について、7～14日目にかけて変性組織の異物化が著明であったことをそれぞれ明らかにした。さらに、甲斐⁶⁰⁾は酵素組織化学的観察により、歯の移動開始14日目に破骨細胞が多く見られたと述べている。また、Rygh²⁵⁻²⁸⁾は歯の移動開始後30分では細胞変化はほとんど見られないものの血流の停滞が生じ、6～12時間後に無細胞領域が出現すること、1～3日目で硝子様変性が進行し、5～7日目で吸収機転が開始すること、さらにそれ以降は本格的な改造が進み、硝子様変性組織はほとんど認められなかったこと、などを明らかにした。さらに、改造過程における細胞性反応についての電顕的観察により、Rygh²⁸⁾は変性組織に侵入した血液由来単核細胞が変性組織の吸収に強く関わっていたと述べ、Kurihara⁶¹⁾は前破骨細胞が単核・円形の未分化細胞として観察されたことについて言及した。

今回得られた結果より、10gの矯正力を用いた群の経日的な組織変化に関して、圧迫側における改造過程の初期において成長期群と成熟期群で最も大きな差異が認められた。すなわち、成熟期群では成長期群と比較して圧迫側における組織改造の開始時期が遅れることが明らかとなった。このことより、同じ大きさの力を加えた場合でも歯周組織の加齢変化により、圧迫側の変性組織の吸収遅延が起り、ひいては歯槽骨の改造機転にも遅れが生じることが示された。

加える矯正力の大きさと歯周韌帯の反応の差異については、Storey⁵⁶⁾は矯正力が大きいほどその初期変化は強く、変性の範囲も広いと述べている。また、Rygh^{25,26)}は5、10、25gの三段階の矯正力を用いてラットの歯の移動を行ったところ、5、10gでは組織変化の程度はほぼ同じであったが、25gを加えた場合は変性の程度が強く、過度に圧迫された領域がより広範囲であったと述べている。さらに、過度の矯正力と歯根吸収の関連性について、Reitan⁶²⁾は持続的な強い力で歯根吸収が起りやすいと報告しており、脇本⁵⁸⁾は17.9g、63.7gの二段階の力を用いてラットの歯の移動を30日間にわたって行ったところ、後者においては移動量が大きかったものの、歯根吸収面積も大きかったと述べている。同様の結果は、桐野ら²²⁾

の報告の中にも見られ、荷重が大きいかほど歯や歯周組織における歯根吸収等の病的変化の頻度が高く、その程度も大きかったことが示された。

今回、40gの矯正力を用いた群では、組織の損傷、とりわけ歯根象牙質にも及ぶ吸収が一部において認められたが、吸収の頻度あるいはその領域の広さについては、YH、AH群間で明らかな差は認められなかった。このように、矯正力が大きくなるにつれて歯周組織の損傷が起りやすくなることを考えると、実際の歯の移動においては、患者の年齢を問わず、必要以上に過度の矯正力を作用させないことが極めて重要であると考えられる。なお、Storeyら⁶³⁾は、移動量が最も大きくなる時の矯正力が至適矯正力であると述べているが、その決定にあたっては歯周組織の病的変化も十分考慮する必要があると考えられる²²⁾。

3) 歯周韌帯内の細胞増殖に対する影響

歯の移動時の歯周韌帯内においては、種々の細胞が組織反応に関与しているため、それらの増殖活性を骨改造の指標として検討することは極めて重要であると考えられる。このような観点より、本研究においては歯周韌帯内に含まれる線維芽細胞様の細胞をはじめとして全ての細胞を検討の対象とした¹⁴⁾。Leblondら⁶⁴⁾は、³H-thymidineを用いたオートラジオグラフィにより、細胞集団をstable cell populations (Group I)、growing cell populations (Group II)、renewing cell populations (Group III)の三群に分類した。これによると、本研究において検討の対象とした細胞は、Group IIに属するものである。この群の細胞の特徴としては、極めて少数ながら常に再生増殖を繰り返しており、環境に応じた分裂を呈することがその特徴として挙げられる。

歯の移動における環境変化は、歯周韌帯に対する矯正刺激である。その際の骨改造現象において、牽引側では骨芽細胞を主体に破骨細胞も密接な関わり合いを持ちながら改造が進行し、また圧迫側では破骨細胞のみが単独で働くのではなく骨芽細胞も相互に関連しながら改造効果を発揮するという、いわゆるカップリング現象が明らかにされてきた⁶⁵⁾。

歯の移動初期における牽引側でのLIの増加は、Baumrindら³⁴⁾や島田⁴³⁾によりすでに報告されている。本研究においても、1日目の牽引側で、標識された紡錘形の線維芽細胞が歯周韌帯全域にわたって多く観察された。これは、同側における骨添加反応に先立ち、骨芽細胞への分化、発生のための線維芽細胞の増殖の結果と考えられる。Robertsら^{41,42)}は線維芽細胞様細胞のうち約50%が骨芽細胞への分化、発生に関与しており、その際、矯正刺激を加えた10時間後に多く

の細胞が DNA 合成期に入り、S 期を迎える細胞数のピークは約20時間後であると述べている。本実験における歯の移動1日目に見られた活発な増殖は、このような所見との関連を有することが強く示唆された。なお、牽引側においては骨芽細胞系細胞に加え、歯周靭帯の線維の再構築のための線維芽細胞、骨芽細胞の相互作用を有する破骨細胞系細胞なども増殖しているものと考えられる。

一方、圧迫側における細胞増殖の経時的な変化に関する報告は比較的少ない。島田⁴³⁾は、歯の移動初期においては細胞増殖度は小さいものの、7日目に硝子様変性組織範囲の減少に伴って最大に達することを示した。また、組織改造に伴う標識細胞の増加は Kvam²³⁾によっても明らかにされている。本研究において、圧迫側で主に単核・円形の細胞が、変性組織や毛細血管付近で標識細胞として観察された。また、その増加と時期を同じくして、変性組織や歯槽骨の吸収が行われていたことを併せ考えると、標識細胞の増加は主として変性組織の吸収に必要な単球、マクロファージ系細胞、破骨細胞への分化のための前駆細胞を含む未分化間葉細胞の増殖の結果であると考えられる。さらに、牽引側におけるのと同様に破骨細胞の相互作用を有する骨芽細胞系細胞、線維再構築のための線維芽細胞なども増殖しているものと考えられる。

本研究の結果より、歯周靭帯の牽引側では、歯の移動1日目における細胞増殖が成熟期ラットよりも成長期ラットにおいてより活発であったことが示された。一方、圧迫側では、その骨改造段階において成熟期ラットの細胞反応の時間的な遅れが明らかとなったが、これは光顕的観察において成熟期ラットの初期に変性組織の吸収が遅延していた所見と一致する結果であった。また、Tonna ら³⁷⁾はマウスの歯肉切除を行い、その後の細胞増殖について調べたところ、加齢に伴い外傷治癒のための反応性細胞増殖の程度が減少し、そのピークが遅延すると報告した。このような従来の所見と本研究結果とを併せ考えると、何らかの外的刺激に対する細胞増殖に加齢変化の影響があることが強く示唆された。

細胞増殖の周期は、G₁期、DNA 合成期である S 期、G₂期、細胞分裂期である M 期に分けられる。また、細胞周期からはずれて増殖停止している G₀期の存在も知られているが、これが加齢により増加することが考えられる。G₀期細胞は何らかの外的刺激が加わった場合、再び細胞周期に戻ることが知られているが、三井⁶⁶⁾は加齢に伴う細胞増殖の様相の変化として、G₀期細胞の増加に加えて fixed non-dividing cell (細胞分裂が不可能になった細胞)が生じる可能性に

ついて述べている。

細胞の増殖度を左右する因子について統一した見解は未だ明らかにされていない。田内⁶⁷⁾は細胞分裂抑制因子の存在の可能性について示唆し、この抑制因子は細胞の分泌物であり、細胞分化に伴って増加し、同種の細胞に特異的に作用するものであろうと推論している。さらに、井出⁶⁸⁾は細胞培養系を用いた報告の中で、細胞増殖抑制因子が存在することについて強く示唆している。

以上のことから、矯正刺激により G₀期からの細胞の流入が起こり⁴³⁾、歯周靭帯内細胞の増殖度が増加する際、その流入の割合に成長期ラットと成熟期ラットでは差があるものと考えられる。また、fixed non-dividing cell が加齢的に増加することも、成長期ラットと成熟期ラットの歯の移動時における歯周靭帯内細胞増殖反応性の差異の原因となっていることが示唆される。

4. 臨床的示唆

本研究の結果より、成長期個体と成熟期個体の歯の移動においては、矯正力に対する歯周靭帯の初期の反応の差が顕著であるものの、ある程度期間を経過した後はほとんど差がなくなることが明らかとなった。すなわち、成長期個体と成熟期個体における矯正刺激への反応性の差異は、その程度よりもむしろ、反応時期の遅れにあることが明らかとなった。

このことより、成人患者に対しては過度の矯正力を加えないようにして、圧迫側における初期の変性変化をできるだけ軽度を抑えるとともに、歯の移動中においては来院間隔を十分にとって組織改造に必要な時間を与えることにより、的確かつ効果的な歯の移動が可能になることが示唆された。

結 論

歯周組織の加齢的变化が実験的な歯の移動に及ぼす影響について、6週齢および14週齢ラットを用いて歯の移動実験を行い、以下の結論を得た。

1) 歯の移動量は、実験期間を通じて成長期ラットの方が成熟期ラットより大きい傾向があった。また、40gの矯正力を加えた群では10gを加えたものよりも歯の移動量が大きかった。

2) 歯の移動を行わなかった場合の歯周靭帯内の細胞増殖は、成長期ラットにおいて成熟期ラットよりも活発に行われており、生理的状態下で両者の細胞増殖に明らかな差異が認められた。

3) 光顕的所見より、10gの矯正力を加えた成長期群、成熟期群の比較を行ったところ、圧迫側におい

て成長期ラットでは移動3日目に細胞成分が増加し、組織改造が早期に生じていたのに対し、成熟期ラットでは変性組織の残存が顕著であった。しかし、7日目で以降では両群とも同程度の組織改造が観察された。一方、40gの矯正力を加えた場合は、両群の経日的組織反応に著明な差は認められなかったが、圧迫側の組織改造は10g負荷群に比べて遅れる傾向があり、移動14日目において一部では歯根表面の吸収が認められた。

4) 歯の移動時において、牽引側ではいずれの実験群においても移動1日目で活発な細胞増殖が明らかとなったが、成長期ラットにおいては成熟期ラットよりもその度合いは強く、細胞増殖度に明確な差異が認められた。7日目で以降ではいずれの実験群もそれぞれの対照群とほぼ同程度の細胞増殖を呈した。

5) 圧迫側では、3日目に10gを負荷した成長期ラット群のみにおいて細胞増殖が活発となり、成熟期ラット群との間には大きな差が明らかとなった。7日目で以降は、いずれの実験群においても細胞増殖は活発になり、14日目においては成熟期ラットも成長期ラットと同様の細胞増殖度を示した。

以上の結果より、歯科矯正臨床において、成人症例に対して適切な歯の移動を行うにあたっては、より軽度の矯正力を加え、十分な間隔をおいた調整を行うことの重要性が強く示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、後校閲を賜りました広島大学山内和夫名誉教授、本学歯学部歯科矯正学講座丹根一夫教授に深甚なる謝意を表します。また、研究遂行および本論文作製に際し、終始御教示、御指導頂きました本学小児歯科学講座長坂信夫教授、口腔解剖学第一講座前田憲彦教授に心から御礼申し上げます。最後に、研究遂行に惜しめない御協力を頂きました本学歯科矯正学講座の教室員各位、ならびに関係各位に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Norton, L.A.: The effect of aging cellular mechanisms on tooth movement. *Dent. Clin. North Am.* **32**, 437-446, 1988.
- 2) 吉野清吉, 石田真奈美, 井藤一江, 松浦誠子, 太田佳代子, 小田義仁, 木村暢男, 呂 莉華, 山口和憲, 山内和夫: 広島大学歯学部附属病院矯正科における過去12年間の矯正患者の統計的観察. 中・四矯歯誌 **4**, 51-60, 1992.
- 3) 清村 寛: 矯正装置の種類とその利用法 [3] Minor tooth movement (M. T. M.); 歯科矯正学 (榎 恵監修). 第2版, 医歯薬出版, 東京, 436-437, 1979.
- 4) 篠倉 均, 花田晃治, 柳村光寛, 原 耕二: 矯正治療時の歯周組織の変化—矯正・歯周治療を行った成人の4症例—. 日矯歯誌 **46**, 397-413, 1987.
- 5) Årtun, J. and Urbye, K.S.: The effect of orthodontic treatment on periodontal bone support in patients with advanced loss of marginal periodontium. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **93**, 143-148, 1988.
- 6) Vanarsdall, R.L.: Treatment of the periodontally involved adult.; Mechanical and biological basics in orthodontic therapy (Hösl, E. and Baldauf, A., editors). Hüthig Buch Verlag, Heidelberg, 199-205, 1990.
- 7) Toto, P.D. and Borg, M.: Effect of age changes on the premitotic index in the periodontium of mice. *J. Dent. Res.* **47**, 70-73, 1968.
- 8) Stahl, S.S., Tonna, E.A. and Weiss, R.: The effect of aging on the proliferative activity of rat periodontal structures. *J. Gerontol.* **24**, 447-450, 1969.
- 9) Reitan, K.: Tissue reaction as related to the age factor. *Dent. Rec.* **74**, 271-278, 1954.
- 10) 山内恵美: ラットの歯の移動における年齢差の影響について. 日大口腔科学 **9**, 317-332, 1983.
- 11) Bridges, T., King, G. and Mohammed, A.: The effect of age on tooth movement and mineral density in the alveolar tissues of the rat. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **93**, 245-250, 1988.
- 12) Reitan, K. and Kvam, E.: Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod.* **41**, 1-14, 1971.
- 13) 山部智世子: プロスタグランジンの局所投与が歯の移動時の歯根に及ぼす影響. 広大歯誌 **24**, 250-262, 1992.
- 14) Roberts, W.E. and Jee, W.S.S.: Cell kinetics of orthodontically-stimulated and non-stimulated periodontal ligament in the rat. *Archs. Oral Biol.* **19**, 17-21, 1974.
- 15) 浦郷篤史: 加齢現象の概念. 老年歯学 **3**, 8-14, 1989.
- 16) Tonna, E.A.: The cellular complement of the skeletal system studied autoradiographically with tritiated thymidine (H^3 TDR) during growth and aging. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 813-824, 1961.
- 17) Vogel, H.G.: Influence of maturation and aging on mechanical and biochemical properties of connective tissue in rats. *Mechanisms of Ageing and Development* **14**, 283-292, 1980.
- 18) 農林水産省畜産局家畜生産課編: 第3の家畜—実験動物—ライフサイエンスの進展に対応した

- 実験動物産業基盤の確立., 地球社, 東京, 133-139, 1986.
- 19) 高垣善男: 付録Ⅱ 長期動物実験のための参考資料; 長期動物実験設問形式116問 (高垣善男編)., 清至書院, 東京, 351-355, 1981.
 - 20) Waldo, C.M. and Rothblatt, J.M.: Histologic response to tooth movement in the laboratory rat.—Procedure and preliminary observations. *J. Dent. Res.* **33**, 481-486, 1954.
 - 21) 古賀正忠: 人為的歯牙移動時の組織変化に関する研究—光学顕微鏡及び電子顕微鏡による観察. 歯科学報 **73**, 498-557, 1974.
 - 22) 桐野靖子, 土屋俊夫, 栗原三郎, 千葉元承, 三浦不二夫: 超弾性力による歯の移動実験. 日矯歯誌 **50**, 315-324, 1991.
 - 23) Kvam, E.: A study of the cell-free zone following experimental tooth movement in the rat. *Trans. Eur. Orthod. Soc.* **45**, 419-434, 1969.
 - 24) Kvam, E.: Cellular dynamics on the pressure side of the rat periodontium following experimental tooth movement. *Scand. J. Dent. Res.* **80**, 369-383, 1972.
 - 25) Rygh, P.: Ultrastructural vascular changes in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic movement. *Scand. J. Dent. Res.* **80**, 307-321, 1972.
 - 26) Rygh, P.: Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odont. Scand.* **30**, 575-593, 1972.
 - 27) Rygh, P.: Ultrastructural changes of the periodontal fibers and their attachment in rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Scand. J. Dent. Res.* **81**, 467-480, 1973.
 - 28) Rygh, P.: Elimination of hyalinized periodontal tissues associated with orthodontic tooth movement. *Scand. J. Dent. Res.* **82**, 57-73, 1974.
 - 29) 市之川正孝: 人為的歯牙移動時の組織変化に関する研究—酢酸塩時刻描記法による光顕および電顕的観察. 歯科学報 **75**, 1435-1472, 1975.
 - 30) 奥村英治: 硝子様変性組織の吸収過程に出現する多核性巨細胞の光学顕微鏡的および電子顕微鏡的研究. 日矯歯誌 **41**, 531-555, 1982.
 - 31) 近藤勝義: インピーダンス・プレクスモグラフィによる歯根膜循環動態の研究. 口病誌 **36**, 20-42, 1969.
 - 32) Jensen, J.L. and Toto, P.D.: Radioactive labeling index of the periodontal ligament in aging rats. *J. Dent. Res.* **47**, 149-153, 1968.
 - 33) Weiss, R., Stahl, S.S. and Tonna, E.A.: Functional demands on the cell proliferative activity of the rat periodontium studied autoradiographically. *J. Dent. Res.* **47**, 1153-1157, 1968.
 - 34) Baumrind, S. and Buck, D.L.: Rate changes in cell replication and protein synthesis in the periodontal ligament incident to tooth movement. *Am. J. Orthod.* **57**, 109-131, 1970.
 - 35) 出口敏雄: 歯の移動により誘発される細胞増殖について—Tritiated thymidine の取り込み. 日矯歯誌 **29**, 168-172, 1970
 - 36) Tonna, E.A., Weiss, R. and Stahl, S.S.: The cell proliferative activity of parodontal tissues in aging mice. *Archs. Oral Biol.* **17**, 969-982, 1972.
 - 37) Tonna, E.A. and Stahl, S.S.: Comparative assessment of the cell proliferative activities of injured parodontal tissues in aging mice. *J. Dent. Res.* **53**, 609-622, 1974.
 - 38) Roberts, W.E., Chase, D.C. and Jee, W.S.S.: Counts of labelled mitoses in the orthodontically-stimulated periodontal ligament in the rat. *Archs. Oral Biol.* **19**, 665-670, 1974.
 - 39) Toto, P.D., Rubinstein, A.S. and Gargiulo, A.W.: Labeling index and cell density of aging rat oral tissues. *J. Dent. Res.* **54**, 553-556, 1975.
 - 40) Smith, R.K. and Roberts, W.E.: Cell kinetics of the initial response to orthodontically induced osteogenesis in rat molar periodontal ligament. *Calcif. Tissue Int.* **30**, 51-56, 1980.
 - 41) Roberts, W.E. and Chase, D.C.: Kinetics of cell proliferation and migration associated with orthodontically-induced osteogenesis. *J. Dent. Res.* **60**, 174-181, 1981.
 - 42) Roberts, W.E., Goodwin, W.C. and Heiner, S.R.: Cellular response to orthodontic force. *Dent. Clin. North Am.* **25**, 3-17, 1981.
 - 43) 島田達雄: 歯の移動に伴う歯根膜細胞の応答性. 鶴見歯学 **17**, 169-185, 1991.
 - 44) 水平敏知: I 総論 生物医学的オートラジオグラフィ概論; オートラジオグラフィの手法〜ミクロから電顕まで〜(水平敏知編)., 学際企画, 東京, 1-14, 1985.
 - 45) Gratzner, H.G., Leif, R.C., Ingram, D.J. and Castro, A.: The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp. Cell Res.* **95**, 88-94, 1975.
 - 46) Gratzner, H.G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iodoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**, 474-475, 1982.
 - 47) Gonchoroff, N.J., Greipp, P.R., Kyle, R.A. and Katzmann, J.A.: A monoclonal antibody reactive with 5-bromo-2-deoxyuridine that does not require DNA denaturation. *Cytometry* **6**, 506-512, 1985.
 - 48) Gonchoroff, N.J., Katzmann, J.A., Currie, R.M., Evans, E.L., Houck, D.W., Kline, B.C., Greipp, P.R. and Loken, M.R.: S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. —Role of DNase pretreatment. *J. Immunol. Methods* **93**, 97-101, 1986.

- 49) 堤 寛：第六部 酵素抗体法の医・生物学への応用；酵素抗体法（渡辺慶一，中根一穂編）。改訂三版，学際企画，東京，381-387，1992。
- 50) Nishizaki, T., Orita, T., Saiki, M., Furutani, Y. and Aoki, H.: Cell kinetics studies of human brain tumors by *in vitro* labeling using anti-BUdR monoclonal antibody. *J. Neurosurg.* **69**, 371-374, 1988.
- 51) 松村耕治，佐々木功典，辻 龍雄，村上知之，高橋 学，篠崎文彦：免疫組織化学的 BrdUrd 染色：DNase による DNA 変性法の検討。山口医学 **38**, 163-169, 1989.
- 52) 下野正基：加齢と歯周組織。老年歯学 **4**, 108-112, 1990.
- 53) Klingsberg, J. and Butcher, E.O.: Comparative histology of age changes in oral tissues of rat, hamster, and monkey. *J. Dent. Res.* **39**, 158-169, 1960.
- 54) 小高 博，沼部真理子，沼部幸博，鴨居久一：ラット歯周組織の老化に関する時間病理学的研究。日歯周誌 **34**, 717-740, 1992.
- 55) Reitan, K.: Some factors determining the evaluation of forces in orthodontics. *Am. J. Orthod.* **43**, 32-45, 1957.
- 56) Storey, E.: The nature of tooth movement. *Am. J. Orthod.* **63**, 292-314, 1973.
- 57) 小沢 操：ラット上顎臼歯歯根吸収に及ぼす実験的歯の移動の影響。日矯歯誌 **41**, 616-630, 1982.
- 58) 脇本康夫：実験的歯の移動を行ったラット臼歯歯根吸収の走査型電子顕微鏡による観察。日矯歯誌 **45**, 618-637, 1986.
- 59) Macapanan, L.C., Weinmann, J.P. and Brodie, A.G.: Early tissue changes following tooth movement in rats. *Angle Orthod.* **24**, 79-95, 1954.
- 60) 甲斐哲也：圧迫側歯根膜に出現するマクロファージと破骨細胞に関する酵素組織化学的研究。日矯歯誌 **50**, 424-440, 1991.
- 61) Kurihara, S.: An electron microscopic observation on cells found in bone resorption area incident to experimental tooth movement. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* **24**, 103-123, 1977.
- 62) Reitan, K.: Effects of force magnitude and direction of tooth movement on different alveolar bone types. *Angle Orthod.* **34**, 244-255, 1964.
- 63) Storey, E. and Smith, R.: Force in orthodontics and its relation to tooth movement. *Aust. J. Dent.* **56**, 11-18, 1952.
- 64) Leblond, C.P., Messier, B. and Kopriwa, B.: Thymidine- H^3 as a tool for the investigation of the renewal of cell populations. *Lab. Invest.* **8**, 296-308, 1959.
- 65) 森田修一：歯の移動と骨形成，骨吸収のカップリング現象。日矯歯誌 **51** (特別号), 172-178, 1992.
- 66) 三井洋司：ヒト培養細胞の変化。細胞 **11**, 581-591, 1979.
- 67) 田内 久：老化と寿命をめぐって。日老医誌 **27**, 265-273, 1990.
- 68) 井出利憲：細胞の分裂寿命と不死化。細胞 **23**, 165-169, 1991.