

〔原 著〕

## 実験的歯の移動に伴うラットセメント細胞の形態変化

西山 博雅<sup>1)</sup>, 浜谷 明里<sup>1)</sup>, 矢嶋 俊彦<sup>2)</sup>, 坂倉 康則<sup>2)</sup>, 溝口 到<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座

<sup>2)</sup>北海道医療大学歯学部口腔解剖学第一講座

### Morphological changes of cementocytes in cellular cementum during experimental tooth movement

Hiromasa NISHIYAMA<sup>1)</sup>, Meiri HAMAYA<sup>1)</sup>, Toshihiko YAJIMA<sup>2)</sup>,  
Yasunori SAKAKURA<sup>2)</sup>, Itaru MIZOGUCHI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Orthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

<sup>2)</sup>Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

#### Abstract

This study examined morphological changes in cementocytes of the cellular cementum on the pressure side during experimental tooth movement, using hematoxylin and eosin-stained sections, an immunohistochemical method with antibody for single stranded-DNA, and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The upper first molars of 8-week-old Wistar rats were forced to move buccally by nickel-titanium wire.

The following results were obtained :

1. Nuclear condensation and fragmentation appeared in several cementocytes adjacent to the hyalinized PDL. These cells showed a positive reaction to the antibody for single stranded DNA.
2. The number of cementocytes with apoptosis progressively increased up to 2 days.
3. At 4 days, the number of cementocytes, which were positive for the single stranded-DNA antibody had decreased, and the number of empty lacunae increased.

These results demonstrate that cementocytes in the cellular cementum adjacent to the hyalinized PDL underwent cell death via apoptosis.

**Key words** : cementocyte, cellular cementum, apoptosis, tooth movement.

受付：平成16年4月1日

## I 緒言

歯に矯正力を加えると、歯根膜には圧迫力、および牽引力負荷部位が生じる。圧迫側においては、歯根膜の圧迫による血流の阻害、および硝子様変性部位の出現、マクロファージ系の細胞による変性組織の吸収、そして破骨細胞による歯槽骨の吸収（穿下性吸収）がおこる。一方、牽引側では、歯根膜が牽引されることにより血流が活性化され、骨芽細胞、線維芽細胞が増殖し骨形成が行われる。このように、矯正学的歯の移動は、外力に対する歯周組織の一連の反応と位置づけることができる。

矯正力による歯の移動に伴う歯周組織の変化については、従来より数多くの報告がある。1904年Sandstedt<sup>1)</sup>は、イヌを用いた実験的観察から、圧迫側歯根膜に均質無構造の硝子様変性組織が出現し、それに隣接する歯槽骨に穿下性骨吸収が行われることを初めて報告した。その後、Schwarz<sup>2)</sup>、Oppenheim<sup>3)</sup>、WaldoとRothblatt<sup>4)</sup>、Macapanpanら<sup>5)</sup>、Reitan<sup>6-8)</sup>、ReitanとKvam<sup>9)</sup>、Rygh<sup>10)</sup>により硝子様変性組織付近では、骨の吸収および添加と同時に歯根表面の吸収がみられると報告された。しかし、従来の歯の移動に伴う歯周組織の反応に関する研究では、破骨細胞、骨芽細胞、あるいは線維芽細胞などの歯根膜組織を対象にしたものがほとんどであった。

歯は、生理的条件下で常に改造現象が起こっている骨と比較し吸収されにくい。矯正治療はこの両者の吸収に対する抵抗性の差を利用し歯の移動を行っている。しかし、臨床的には歯の矯正移動により歯根の短小化などの歯根吸収<sup>11-15)</sup>がしばしば観察される。矯正臨床で認められる歯根吸収の多くは、歯根表層あるいは歯根尖に限局した小さなものであり、最終的にはセメント芽細胞による吸収窩の修復機転が起き<sup>10,16,17)</sup>、临床上大きな問題とはならない。し

かし、歯根尖が広範に吸収され歯の著しい動揺をきたし、歯の機能と安定性に大きな影響を及ぼすことが稀にある。このような重度の歯根吸収の原因に関しては、過大な矯正力<sup>10)</sup>、治療期間の長期化<sup>13,14,16,18)</sup>、歯根形態の異常<sup>15)</sup>、歯の外傷の既往、舌や口唇の習癖、全身的な代謝障害、ホルモンバランスの異常などの様々な要因が指摘されているが、その正確な原因に関しては明らかではない。

セメント質は歯根象牙質の表面を覆う石灰化組織であり、歯根膜および歯槽骨とともに歯を支持している。一般にセメント質は無細胞セメント質と有細胞セメント質とに分類され、ヒト、ラットおよびマウス等において、無細胞セメント質は歯頸側歯根に、有細胞セメント質は根尖側歯根に分布している。形態的には有細胞セメント質は、骨小腔および骨細管と同様のセメント小腔およびセメント細管のなかに、セメント細胞およびその突起を入れていることなど多くの点で骨組織に類似する<sup>19-21)</sup>が、血管を含まないこと、吸収されにくいことなど、骨組織とは異なる特性を有することが報告されている。しかし、いまだにその本態や矯正力に対する反応性に関しては不明な点が多く、歯を構成する硬組織のなかで最も知見に乏しい組織である。

そこで本研究では、矯正力に対するセメント質の反応を明らかにすることを目的として、圧迫側有細胞セメント質中のセメント細胞の経時的な形態変化について検討を行った。

## II 材料および方法

### 1. 実験動物

実験動物には、生後8週齢のWistar系雄性ラット74匹を用いた。すべての実験動物は、北海道医療大学動物実験センターにて飼育し、通常のラット用固形飼料（オリエンタル酵母工業、東京）と水を十分に与え、自由摂食させた。な

お、すべての実験動物の取り扱い、北海道医療大学動物実験の指針に基づいて行った。

## 2. 実験的歯の移動方法

実験的歯の移動は、Igarashiらの方法<sup>22)</sup>に準じ、矯正用ニッケルチタンワイヤー（直径0.012 inch, 長さ18.5 mm, Rocky Mountain Morita）を用いて初期荷重約60gfで上顎第一臼歯の頬側移動を行った（図1）。

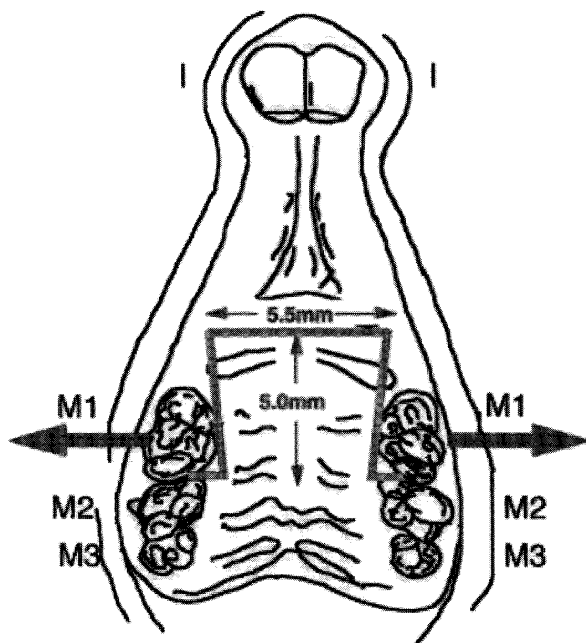


図1 本研究で用いた歯の移動装置の模式図  
⇔：歯の移動方向、I：前歯、  
M1：第一臼歯、M2：第二臼歯、M3 第三臼歯

## 3. 実験期間

実験群には、装置装着後、3, 6, 12時間、1, 2, 4, 7日を各8匹、対照群として装置未装着の8週齢および実験群と同様に観察期間を設けた4, 7日後のラットを各6匹用いた。

## 4. 試料の作製

各実験期間終了後、実験動物はペントバルビタール（40mg/kg）による麻酔下にて、4%paraformaldehyde（0.1M PB,pH7.4）固定液を用い、上行大動脈より灌流固定を30分行った。その後、上顎骨を摘出し、同固定液を用いて4℃で12時間の浸漬固定を施した。固定終了後4℃で10%EDTA溶液（0.01M PBS,pH7.4）による

6週間の脱灰後、通法に従いアルコール系列で脱水し、透徹後、パラフィンに包埋した。臼歯部咬合面に平行に、厚さ5μmの連続横断切片を根分岐部より根尖部まで作製した。切片には、Hematoxylin-Eosin重染色（H-E）を施した。

## 5. アポトーシスの観察

上記パラフィン切片を用いて、アポトーシスに特有な一本鎖DNA（断片化部位）に対する抗体<sup>23,24)</sup>を用いた免疫染色を施し、光学顕微鏡を用いて観察した。

免疫染色は内因性ペルオキシダーゼの除去をIsobe法<sup>25)</sup>により5mM過ヨウ素酸水溶液と3mM水素化ホウ素ナトリウムを用いて行い、5%正常ヤギ血清によるブロッキングを行った後、一次抗体は抗ss-DNAウサギポリクローナル抗体（DAKO JAPAN）を反応させ、二次抗体にはHRP抱合ヤギ抗ウサギIg G（BIO SOURCE International）を用いアポトーシスに特有なss-DNAの標識を行った。その後、DAB（武藤化学）により発色し、対比染色はメチルグリーンにて行った。

## 6. 共焦点レーザー顕微鏡によるセメント細胞の観察

各実験期間終了後、実験動物はペントバルビタール（40mg/kg）による麻酔下にて、4%paraformaldehyde（0.1M PB,pH7.4）固定液を用い、上行大動脈より灌流固定を30分行った。その後、上顎骨を摘出し、同固定液を用いて4℃下で12時間の浸漬固定を施した。固定終了後4℃下で10%EDTA溶液（0.01M PBS,pH7.4）による6週間の脱灰後、シヨ糖溶液に浸漬後、ドライアイスとアセトンを使用し、OCT compoundに包埋した。試料は、凍結切片作製まで-80℃に保存した。通法に従い、臼歯咬合面に平行な20μmの横断連続凍結切片をクライオスタット（CM1850, LEICA, Germany）にて根分岐部より根尖部まで作製した。薄切後、Alexa

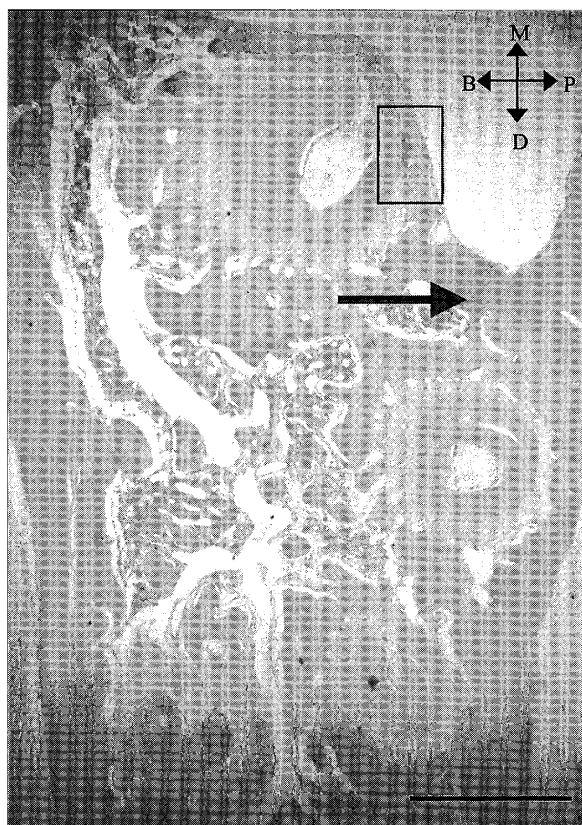


図2 ラット上顎右側第一臼歯部の脱灰横断切片 (H-E染色像)  
 近心根, 近心舌側根, 近心頬側根, 遠心舌側根, 遠心頬側根の5根が認められる.  
 黒枠は, 本研究の観察部位である近心根の圧迫側を示す. 歯根の移動方向を矢印にて示す.  
 M: 近心, D: 遠心, B: 頬側, P: 口蓋側 (bar = 500 $\mu$ m)

488標識phalloidinによるF-actin染色, ならびに4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) による核染色を施し, PermaFluor (Thermo Shandon, USA) にて封入を行った<sup>19,26)</sup>. その後, 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) (TCS NT, LEICA) を用い励起波長488nmおよびUV (347nm) にて観察を行った.

### 8. 観察部位

観察部位は, 歯の移動群において根尖側の硝子様変性組織が出現する第一臼歯近心根の口蓋側セメント質とした (図2).

## III 結果

### 1. H-E染色所見

対照群の歯根膜は, 全周にわたってほぼ均一

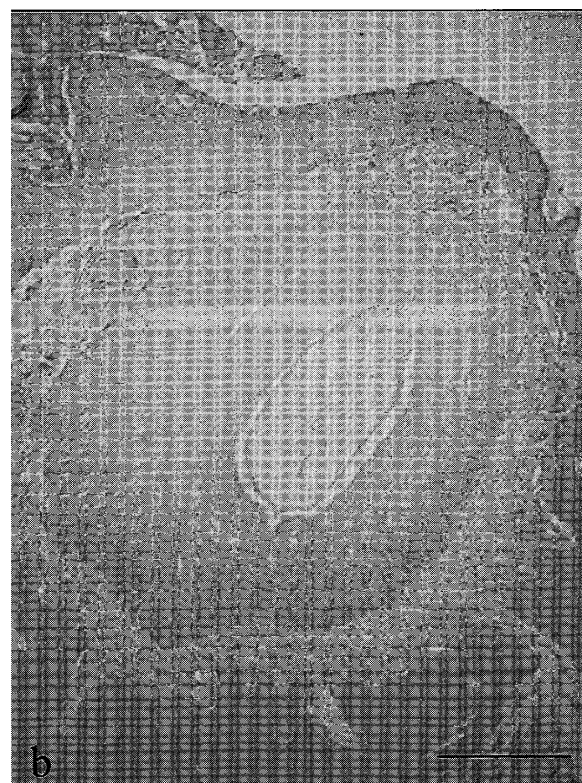
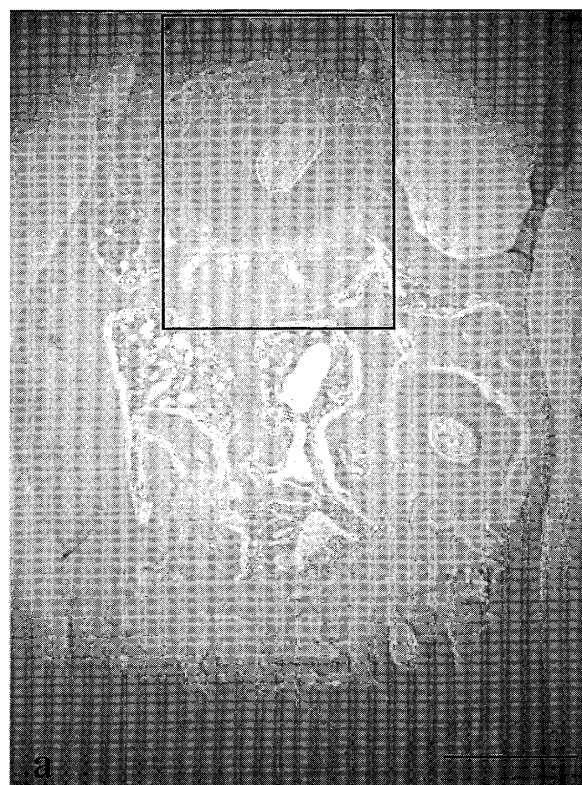


図3: 上顎左側第一臼歯部の脱灰横断切片 (H-E染色像)  
 対照群の根尖部切片を示す. bはaの黒枠部分の拡大像.  
 bar(a) = 500 $\mu$ m. bar(b) = 100 $\mu$ m.

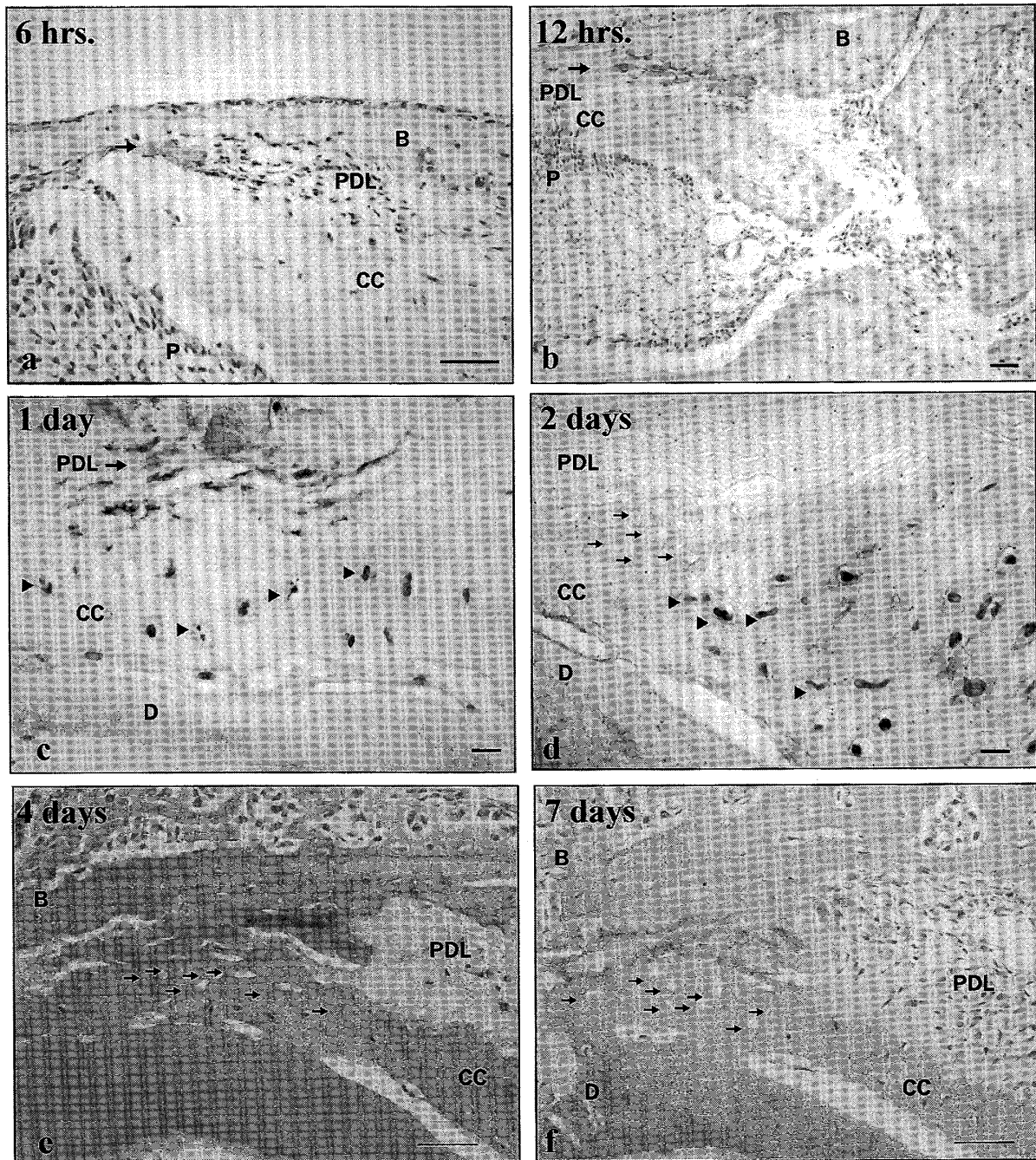


図4： 歯の移動に伴う第一臼歯近心根根尖圧迫部位の経時的変化（H-E染色）  
 a：荷重負荷後6時間。圧迫された歯根膜に硝子様変性組織の出現がみられる。（矢印）  
 b：12時間。歯根膜の硝子様変性組織の範囲の増加がみられる。（矢印）  
 c：1日。硝子様変性組織（矢印）に隣接した有細胞セメント質に核の濃縮および断片化（矢頭）が認められる。  
 d：2日。セメント細胞の核の断片化（矢頭）と空胞化したセメント小腔（矢印）が認められる。  
 e：4日。セメント細胞の消失したセメント小腔（矢印）が認められる。  
 f：7日。セメント細胞の消失したセメント小腔（矢印）の範囲はセメント質表面から深層に拡大している。  
 bar (a, b)=50 $\mu$ m. bar (c, d)=10 $\mu$ m.

な幅を示していた（図3）。対照群では術後4,7日のいずれにおいても移動前の試料とほぼ同様な結果が得られた。歯根全周にわたり有細胞セメント質の厚い層が観察された。

歯に荷重負荷後6, 12時間, 1, 2, 4, 7日のH-E染色像を図4に示す。荷重負荷後3時間で第一臼歯近心根歯根膜に一部圧迫像がみられ,6時間よりエオジン好染色性の硝子様変性組

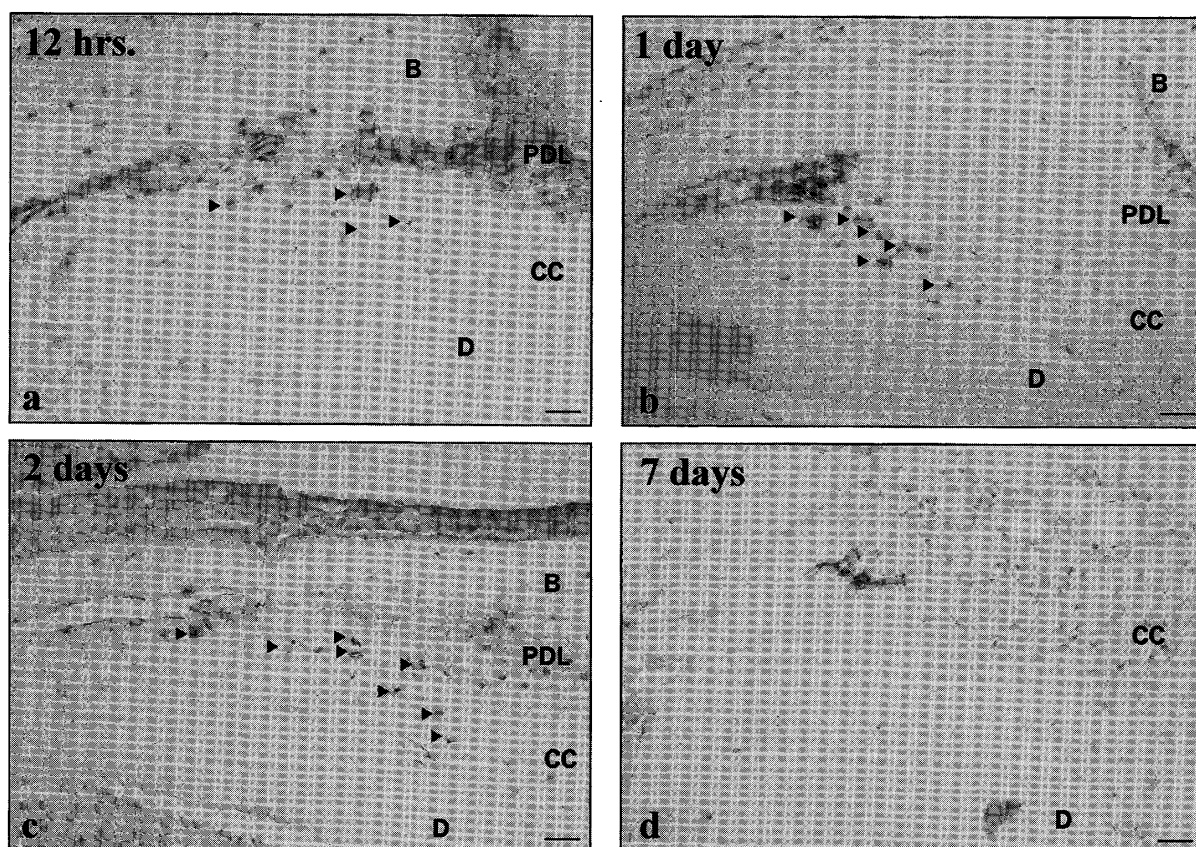


図5：歯の移動に伴う第一臼歯近心根尖圧迫部位の経時的変化（免疫染色）

- a：硝子様変性組織に隣接する表層の細胞に抗ss-DNA抗体に対する陽性反応が認められる（矢頭）  
 b, c：抗ss-DNA抗体陽性反応を示すセメント細胞（矢頭）の増加がみられる。  
 d：抗ss-DNA抗体陽性反応を示すセメント細胞は消失した。

bar=10µm

織が出現した（図4 a）。その後、硝子様変性組織の範囲の増加が認められた。1日で変性組織に隣接する有細胞セメント質内のセメント細胞の一部に核の濃縮および断片化が観察された（図4 c）。2日より、核の濃縮および断片化は減少し空のセメント小腔が多く観察されるようになった。4日以降ではセメント小腔の空胞化が顕著となった。

## 2. 免疫染色所見

荷重負荷後12時間より硝子様変性組織に隣接するセメント質において、抗ss-DNA抗体に対する陽性反応が認められた（図5 a）。1日でセメント細胞にはっきりとした陽性反応が観察されるようになり（図5 b）、2日ではさらに多数のセメント細胞において抗ss-DNA抗体陽性反応がみられた（図5 c）。4日では硝子様変性組織に隣接するセメント質中に陽性反応を示す細胞は減

少し、7日ではほとんど反応は認められなかった。

## 3. 共焦点レーザー顕微鏡所見

荷重負荷後12時間で変性組織に対応する有細胞セメント質のセメント細胞の一部に核の濃縮、断片化がみられたが、セメント質表面の細胞との突起のコンタクトは残存していた（図6 a, b）。1日では、セメント細胞の核の濃縮および断片化が観察されるのに加え、セメント細胞の突起の消失、および細胞質におけるF-actinの染色性の低下がみられた（図6 c, d）。2日ではさらにセメント細胞におけるF-actinの染色性の消失も認められた（図6 e, f）。4日ではセメント細胞の細胞質や核の染色性はほとんど消失し（図6 g）、7日では細胞の変化はさらに進行し、萎縮した細胞質がわずかに残存しているのが認められた（図6 h）。

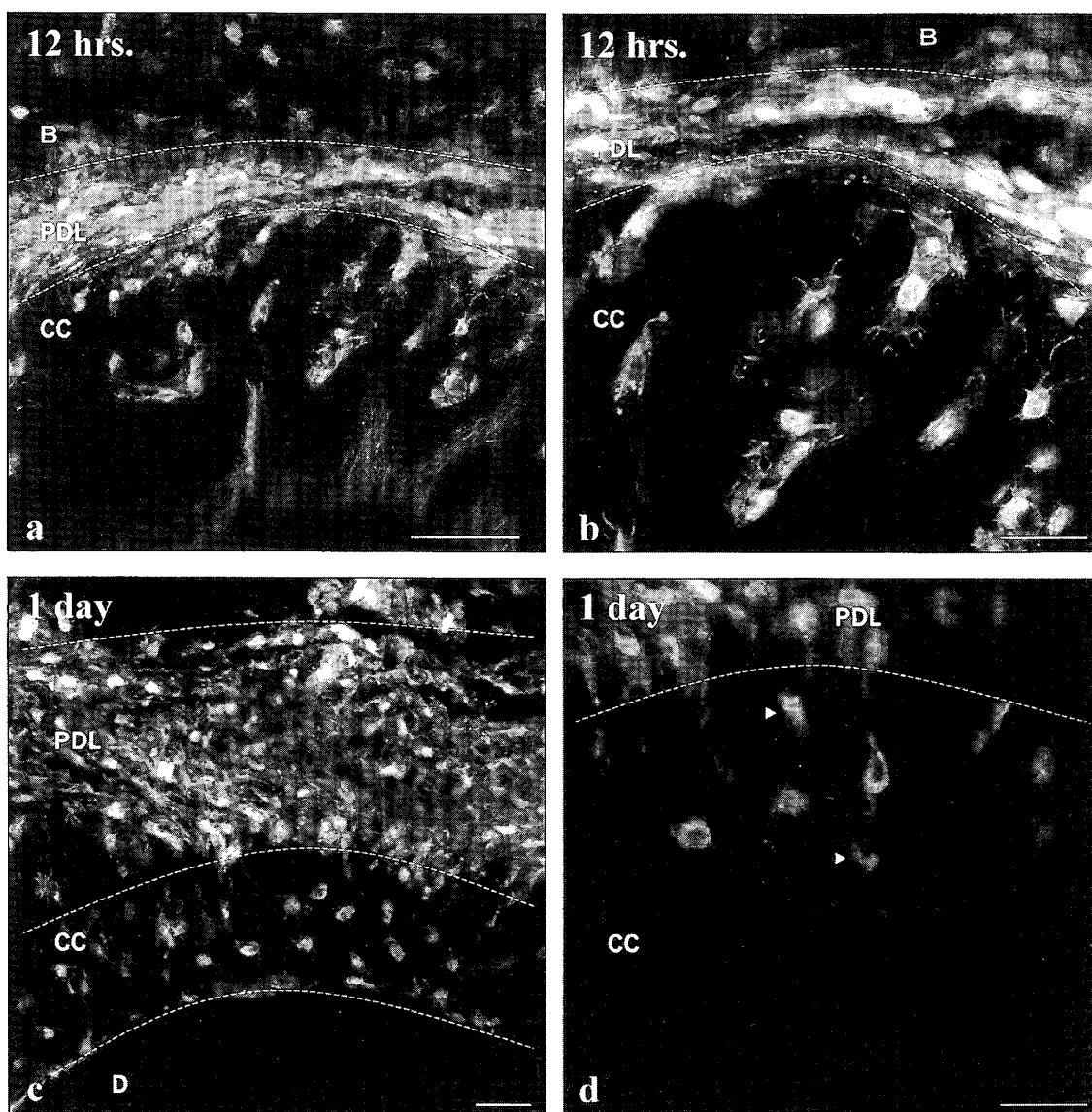


図6：共焦点レーザー顕微鏡所見  
 a, b：荷重負荷後12時間。歯根膜の硝子様変性組織に隣接するセメント細胞の一部に核の濃縮がみとめられるものの、セメント細管の突起は残存している。  
 c, d：荷重負荷後1日。濃縮した核と断片化（矢頭）が認められ、セメント細胞の突起の消失、および細胞質のF-actinに対する染色性が著しく低下した。  
 B：歯槽骨 CC：有細胞セメント質 D：象牙質 P：歯髄 PDL：歯根膜  
 bar (a, c)=50μm. bar (b, d)=20μm.

#### IV 考 察

##### 1. 歯の移動方法について

本実験に用いた歯の移動方法は、Igarashiらの方法<sup>22)</sup>に準じて行った。この方法では、ニッケルチタン合金ワイヤーの超弾性の特性を利用しているため、任意の矯正力を歯に持続的に負荷することを可能にしている。また、この方法

では、根尖側に近い部位を回転中心とした傾斜移動を示すため、硝子様変性組織は根尖部口蓋側に出現する。

本研究の目的は、変性組織が出現する圧迫側におけるセメント細胞の組織変化をみることを目的としている。したがって、本研究では、予備実験として、有細胞セメント質が分布する根尖部に硝子様変性組織が広範に出現する力の大

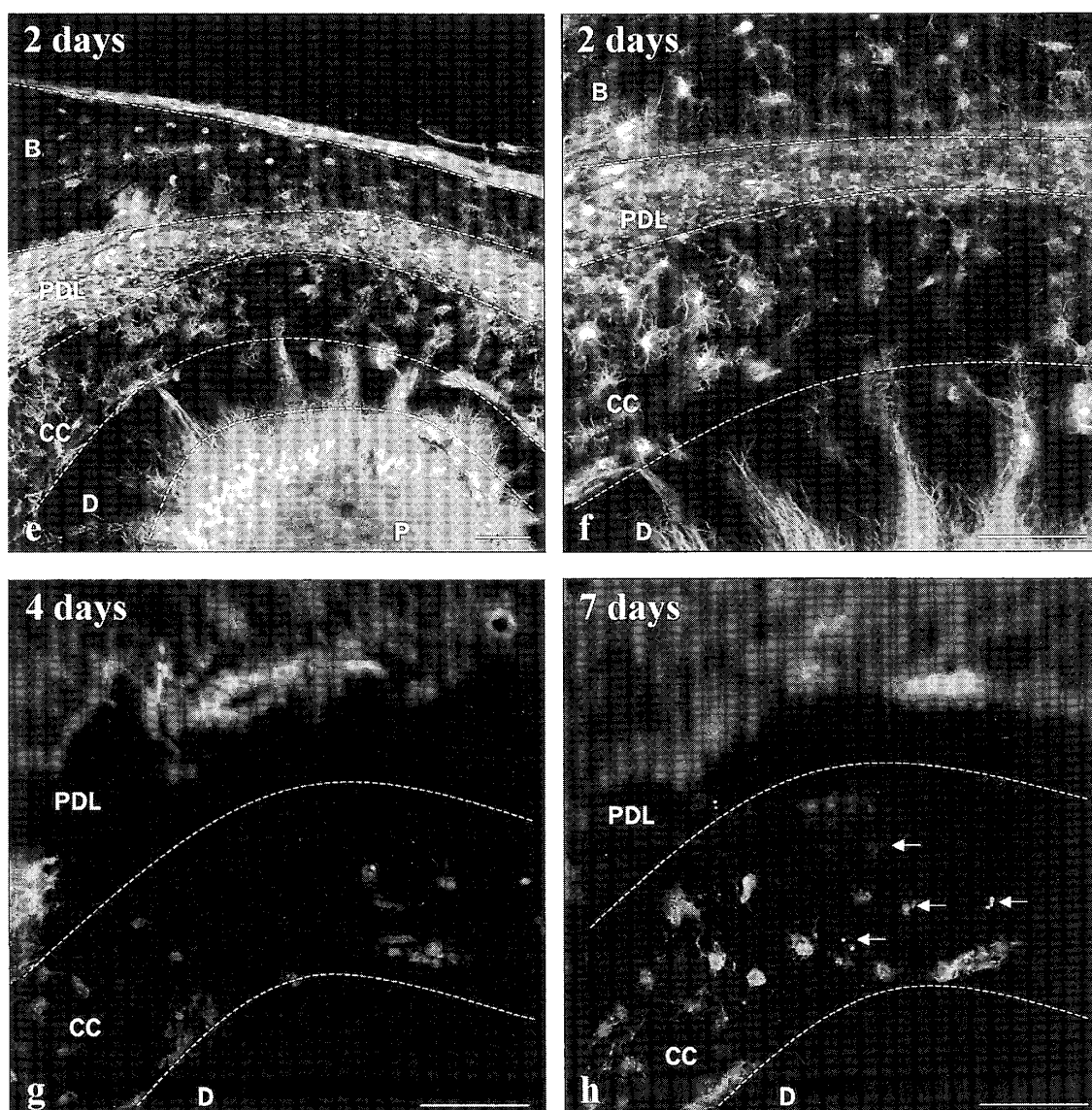


図6：共焦点レーザー顕微鏡所見

e, f：荷重負荷後2日．歯根膜圧迫部位に隣接するセメント細胞のF-actinの染色性はさらに低下し，小腔内の核の染色性も消失した．

g：荷重負荷後4日．セメント細胞の細胞質や核の染色性はほとんど消失している．

h：荷重負荷後7日．萎縮した細胞質がわずかに残存するのみとなっている（矢印）．

B：歯槽骨 CC：有細胞セメント質 D：象牙質 P：歯髄 PDL：歯根膜

bar=50 $\mu$ m.

きさを確認するため，初期荷重20gf, 40gf, 60gfの移動実験を行い，変性組織の出現様相を比較検討した．その結果，いずれの力の条件においても変性組織の出現が見られたが，特に60gfの初期荷重によって，広範な変性組織が根尖部に形成されていることが明らかとなったため，本研究では，60gfの初期荷重を歯の移動に適用することとした．

## 2. セメント細胞の観察方法について

本研究では，骨細胞の細胞質と核の形態を同時に把握するため，蛍光標識されたphalloidinによる細胞質染色<sup>19,26,27</sup>とDAPIによる核染色<sup>28,29</sup>の二重染色を行った．有細胞セメント質に存在するセメント細胞は，骨細胞に比較して，その細胞突起が少ないことが指摘されている<sup>19</sup>．しかし，蛍光強度が強く，また退色しづらいという特徴を有しているAlexa488標識phalloidinを用いることによって，十分セメント細



胞の細胞突起を含めた形態を把握することができた。Phalloidinは毒キノコ的一种である *Amanita phalloides* から抽出された bicyclic peptides であり、F-actin に特異的に結合することが知られている<sup>27)</sup>。本研究では、予備実験として、F-actin に対する抗体を用いた免疫組織化学染色と蛍光標識された phalloidin による蛍光染色との比較検討を行った。その結果、phalloidin による染色法では、その適用が凍結切片に限られるものの、抗体法に比べてその染色性が強く、セメント細胞や骨細胞の細胞突起の細部にわたって反応性を示すことが明らかになった。また、併せて Alexa488 標識と FITC 標識の phalloidin についても染色性の比較を行った結果、前者は蛍光強度が強く、また退色しづらいという特徴を有しており、共焦点レーザー顕微鏡による観察により適しているものと考えられた。しかし、荷重負荷 1 日以降では、細胞死を示すセメント細胞の染色性が低下しており、セメント細胞の形態を観察することは困難であった。これは、細胞死に伴う F-actin の分解によるものと考えられる。

一方、核染色には DAPI<sup>28,29)</sup>、PI<sup>19)</sup>、YOYO-1 iodine<sup>30)</sup> などの様々な染色方法が適用されているが、本研究で用いた DAPI 法は、mRNA との交差反応による細胞質の染色が無いこと、他の方法で行う塩酸と protease K 処理の操作<sup>30)</sup> が不要でないという利点を有していた。以上の予備実験の結果により本実験では、Alexa488 標識 phalloidin による細胞質染色と DAPI による核染色の二重蛍光染色を用いた。

### 3. セメント細胞の形態変化について

アポトーシス細胞の形態学的特徴には、細胞の縮小、クロマチンの凝縮、核の断片化、細胞表面の平滑化、細胞の断片化があげられる。また、生化学的には、ヌクレオソーム単位の DNA の断片化が観察され、遺伝子に支配された細胞死と定義されている。一方、ネクローシ

スは不可逆性の損傷により生じる病理的な死と定義される。その形態学的特徴としては、ミトコンドリアや小胞体の膨化、細胞の膨化と溶解、イオン輸送系の崩壊、細胞内容物の流出などがあげられ、アポトーシスとは明確に区分されている。

本研究においては、歯に荷重負荷後 12 時間から 2 日にかけて硝子様変性組織に隣接したセメント細胞にクロマチンの凝縮、核および細胞の断片化、ss-DNA 抗体陽性反応などの典型的なアポトーシスの特徴を示す細胞が多数観察されたことから、歯の移動初期に認められた細胞形態の変化は、アポトーシスであると考えられた。今回の実験系で認められた変化は、歯根膜の虚血・低酸素状態がストレスとして作用し、隣接しているセメント細胞にアポトーシスを引き起こしたと考えられる。

骨細胞や軟骨細胞におけるアポトーシス細胞の処理に関して、アポトーシス小体が周囲細胞の食作用により早期に処理されない状況下においては、アポトーシス細胞がネクローシスに移行するとの報告がある<sup>31,32)</sup>。本研究と同じ実験系で行われたラット歯槽骨骨細胞の細胞死に関する研究<sup>33)</sup>でも、同様の細胞形態変化が観察されている。

### 4. 歯根吸収について

一般的に歯根表層に存在するセメント質は、骨組織に比べて組織活性や組織改造能が低く、吸収されにくい組織とされている。しかし、Ketcham<sup>11)</sup> は、臨床的な観点から、歯根吸収が矯正学的歯の移動と密接な関連性を有することを報告した。その後、多くの研究者によって矯正学的歯の移動時に圧迫側歯根膜に形成される硝子様変性組織に対応した歯根表層に高い頻度で吸収が認められること、および硝子様変性組織の吸収過程で出現するマクロファージ、異物巨細胞、あるいは破歯細胞によってセメント質の吸収が起きることが明らかにされた<sup>5,8-10,17,34-37)</sup>。

しかし、豊城<sup>37)</sup>によると、歯根吸収は硝子様変性組織の出現部位だけでなく、牽引側歯根膜領域あるいは生理的な歯の移動時においても認められることが報告されており、その正確な発現機序に関しては不明のままである。

本研究では、硝子様変性組織に隣接するセメント細胞が細胞死を起こすことを明らかにした。最近の骨細胞の組織学的研究から、骨細胞の細胞死と骨吸収の関連性が指摘されている。Nobleら<sup>38)</sup>は、骨細胞のアポトーシスが、胎生期の骨組織、成人の異所性骨形成、および骨関節炎周囲のosteophyteに認められることから、アポトーシスと骨改造の関連性を指摘した。また、Hamayaら<sup>39)</sup>は、歯の移動に伴い出現する変性組織に隣接する骨細胞においてアポトーシスを認めたことから、骨細胞のアポトーシスが歯槽骨の吸収機転と関係していることを示唆している。もちろん、骨組織とセメント質ではその生物学的特性が異なっているが、前述した骨組織において示唆されている骨吸収の機序が、矯正学的歯の移動におけるセメント細胞の細胞死と歯根吸収との関係にも適用できる可能性が考えられる。今後、セメント細胞の細胞死と歯根吸収の変化をより長期的にみていき、両者の関連性、ならびに歯根吸収の機序を証明していきたいと考えている。

## V 結 論

ラットを用いた実験的歯の移動によって、以下のことが明らかになった。

1. H-E染色所見より、圧迫側歯根膜に生じた硝子様変性組織に隣接するセメント細胞の形態変化が観察された。荷重負荷後1日よりセメント細胞の一部に核の濃縮と断片化が認められた。2日では変化を示すセメント細胞は深部に及んだ。
2. 抗ss-DNA抗体を用いた免疫染色より、変性組織に隣接するセメント細胞に陽性反応が認

められた。12時間より陽性反応はみられ、2日で最も多くのセメント細胞に陽性反応が認められた。その後反応は減少した。

3. 共焦点レーザー顕微鏡所見より、12時間で変性組織に隣接するセメント細胞の一部に核の濃縮、断片化がみられたが、セメント細管の細胞突起は残存していた。1日では核の濃縮および断片化が観察されるのに加え、細胞突起の消失および細胞質のF-actinに対する染色性の低下がみられた。2日ではさらにセメント細胞の染色性の低下がみられ、4日後ではセメント細胞および核の染色性はほとんど消失し、萎縮した細胞質がわずかに残存しているのが認められた。

以上の結果より、実験的歯の移動によって、圧迫側歯根膜に生じた硝子様変性組織に隣接する有細胞セメント質のセメント細胞にアポトーシスが示された。

## 文 献

1. Sandstedt C : Einige Beitrage zur Theorie der Zahnregulierung. Nord Tandilakere Tidssker, **4** : 236-245, 1904.
2. Schwarz AM : Tissue changes incidental to orthodontic tooth movement. Int J Orthodont Oral Surg, **18** : 331-352, 1932.
3. Oppenheim A : A Possibility for physiologic orthodontic movement. Am J Orthodont Oral Surg, **30** : 277-328, 1944.
4. Waldo CM and Rothblatt JM : Histologic response to tooth movement in the laboratory rat. J Dent Res, **33** : 481-486, 1954.
5. Macapanpan LC, Weinmann JP and Brodie AG : Early tissue changes following tooth movement in rats. Angle Orthod, **24** : 79-95, 1954.
6. Reitan K : Some factors determining the evaluation of forces in orthodontics. Am J Orthodont, **43** : 32-45, 1957.
7. Reitan K : Effects of force magnitude and direction of tooth movement on different alveolar bone types. Angle Orthod, **34** : 244-255, 1964.
8. Reitan K : Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment.

- Am J Orthod, **53** : 721-745, 1967.
9. Reitan K and Kvam E : Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod*, **41** : 1-14, 1971.
  10. Rygh P : Orthodontic Root Resorption Studied by Electron Microscopy. *Angle Orthod*, **47** : 1-16, 1977.
  11. Ketcham AH : A progress report of an investigation of apical root resorption of vital permanent teeth. *Int J Orthod*, **5** : 310-328, 1929.
  12. Newman WG : Possible etiologic factors in external root resorption. *Am. J. Orthod*, **67** : 522-539, 1975.
  13. Kennedy DB, Joondeph DR, Osterberg SK and Little RM : The effect of extraction and orthodontic treatment on dentoalveolar support. *Am J Orthod*, **84** : 183-190, 1983.
  14. McFadden WM, Engstrom C, Engstrom H and Anholm M : A study of the relationship between incisor intrusion and shortning. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, **96** : 390-396, 1989.
  15. 達谷窟佳子, 清水義之, 古田樹己, 三谷英夫 : 矯正治療に伴う歯根吸収のリスクの診断法に関する研究 (第1法). *Orthod Waves*, **57** : 359-368, 1998.
  16. Harry MR and Sims MR : Root resorption in bicuspid intrusion : A scanning electron microscope study. *Angle Orthod*, **52** : 235-258, 1982.
  17. Brudvik P and Rygh P : Root resorption beneath the main hyalinized zone. *Eur J Orthod*, **16** : 249-263, 1994.
  18. Langford SR and Sims MR : Root surface resorption, repair, and periodontal attachment following rapid maxillary expansion in man. *Am J Orthod*, **81** : 108-115.
  19. Kagayama M, Sasano Y, Mizoguchi I and Takahashi I : Confocal microscopy of cementocytes and their lacunae and canaliculi in rat molars. *Anat Embryol*, **95** : 491-496, 1997.
  20. 加賀山 学, 笹野泰之 : セメント質の発生. *解剖誌*, **75** : 365-369, 2000.
  21. Freeman E : Periodontium in : *Oral histology* (edited by Ten Cate AR) 4th ed. 276-312, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, 1994.
  22. Igarashi K, Mitani H, Adachi H and Shinoda H : Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, **106** : 279-289, 1994.
  23. Naruse I, Keino H and Kawabata Y : Antibody against single-stranded DNA detects both programmed cell death and drug-induced apoptosis. *Histochemistry*, **101** : 73-78, 1994.
  24. Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T, Kawasaki H, Sugiyama T, Kawarada Y and Tanigawa N : Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods. *Jpn J Cancer Res*, **90** : 188-193, 1999.
  25. Isobe Y, Chen ST, Nakane PK : Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium 1 Improvements in the peroxidase-labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. *Acta Histochem Cytochem*, **10** : 161-171, 1977.
  26. Kagayama M, Sasano Y, Hirata M, Mizoguchi I and Takahashi I : An improved mounting method for observation of thick specimens using confocal microscopy. *Biotech Histochem*, **71** : 231-233, 1996.
  27. Cooper JA : Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*, **105** : 1473-1478, 1987.
  28. Williamson DH and Fennell DJ : The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. *Methods Cell Biol*, **12** : 335, 1974.
  29. Akimoto Y, Obinata A, Endo H and Hirano H : Distribution of  $\beta$  1 integrin during development of chick tarsometatarsal skin in vivo and in vitro. *J Histochem Cytochem*, **44** : 411-422, 1996.
  30. Liu S, Weaver DL and Taatjes DJ : Three-dimensional reconstruction by confocal laser scanning microscopy in routine pathologic specimens of benign and malignant lesions. *Histochem Cell Biol*, **107** : 267-278, 1997.
  31. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M and Kroemer G : The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, **15** : 1573-1581, 1997.
  32. Roach HI and Clarke NM : "Cell paralysis" as an intermediate stage in the program-med cell death of epiphyseal chondrocytes during development. *J Bone Miner Res*, **14** : 1367-1378, 1999.
  33. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T and Abiko Y : Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int*, **70** : 117-126, 2002.

34. Azuma M : Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement. Bull Tokyo Med Dent Univ, **17** : 149-178, 1970.
35. 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.
36. 佐藤嘉晃, 石川博之, 中村進治, 脇田 稔 : 矯正力を加えた際の圧迫側歯周組織の経時的な変化. 日矯歯誌, **54** : 177-192, 1995.
37. 豊城あずさ : 実験的歯の移動に伴う歯根吸収の開始機序に関する組織学的研究. Orthod Waves, **57** : 213-229, 1998.
38. Noble BS, Stevens N and Reeve J : Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. Bone, **20** : 273-282, 1997.