

光電変換色素膜による電気的刺激の研究

松浦 芳久

Study of Electrical Stimulation Using Photoelectric Dye-coupled Films

Yoshihisa MATSUURA

The aim of this study was to evaluate the effect of a photoelectric dye-coupled polyethylene film on bone formation, as a new application technique to activate osteogenesis in dentistry. Photoelectric dye was coupled with polyethylene films through amide linkages, which absorb light and convert photon energy to electric potentials. Histological investigation of bone formation following the electrical stimulation by photoelectric dye-coupled films with visible light irradiation was conducted.

In this study we used the photoelectric dye NK-5958 (3-(carboxymethyl)-2-[2-[4-(dimethylamino) phenyl]ethenyl]-naphtho[2,1-d]thiazolium bromide.

The dye was coupled with a polyethylene film through amide linkage. Carboxyl moieties were introduced to the polyethylene film surface by reacting with 97% fuming nitric acid at 78°C for 18 min in a flask. Then, the carboxyl moiety-bearing film underwent amide linkage through the formation of ethylene-diamine bonds between carboxyl moieties of the film and dye in the catalytic presence of dicyclohexylcarbo-diamide in a reaction solvent, chlorobenzene, at 35°C for 24 hours. The dye-coupled film was finally washed with chlorobenzene. These chemical processes were monitored by infrared and visible light absorption spectra to confirm successful reactions.

Osteoblast-like cells isolated from newborn rat calvaria using sequential enzyme digestion were applied to an *in vitro* experiment. The cells were cultured on dye-coupled films or dye-uncoupled plain films and irradiated with visible light (diode laser, wavelength : 532 nm, power dose : 2.0 mW/cm², 10 min/day) for 3 days. After the cell culture, the number of cells was counted to evaluate the effects of the electric stimulation on cell proliferation.

The proliferation of osteoblast-like cells cultured on dye-coupled films was promoted by electrical stimulation, and the number of cells was much greater than that of cells cultured on dye-uncoupled films.

These results indicate that photoelectric dye could be coupled to a polyethylene film, and this dye-coupled film combined with visible light irradiation could induce the proliferation of osteoblast-like cells.

key words : photoelectric dye, electric stimulation, bone formation

緒言

骨は重力によりその機能・形態を維持している。一度形成された骨は圧縮や引張りなどの機械的荷重（メカニカルフォース）に対応して常に三次元的な改造が行われ新生骨の添加による補強と不要部分の吸収が行われ、これは Wolff の法則として知られている¹⁻⁴⁾。最近の研究ではメカニカルフォースを骨組織が感知する機構として骨芽細胞と骨細胞にその受容体が存在することが指摘されており⁵⁻⁷⁾、骨細胞は骨組織 1 mm³に約25,000個存在し、機械的荷重により骨が変形すると骨小腔や骨細管内の細胞液が流動し刺激が認識され骨の改造が行われると考えられている。

これらメカニカルフォースと骨組織の関係を背景にして骨や軟骨の修復に関する物理的な治療は1950年代から検討され^{8,9)}、力学的な刺激が骨内部に電気現象を生じることで仮骨形成を促進することが確認されている。この原理は整形外科領域において骨折や偽関節などの骨治癒促進に物理療法^{10,11)}として応用され、埋入式あるいは半埋入式直流電流⁸⁾、静電結合電場（CCEF）^{12,13)}、パルス磁場（PEMF）¹⁴⁻¹⁶⁾、低出力パルス超音波（LIPUS）⁶⁾、交流電気刺激¹⁷⁾などが実用化されている。電氣的仮骨において保田らは⁸⁾陰極周辺では1~100 μ Aの電流で骨増生が盛んになると報告し、Friedenberg ら¹⁸⁾も5~20 μ Aにおいて陰極周囲に骨形成が明確であると報告している。

一方、歯科保存治療の対象となる顎骨においても形態形成および骨塩量の維持には咬むことによるメカニカルフォースが関わっていると考えられている¹⁹⁾。齶蝕、歯周病により歯を喪失すると、歯槽骨は次第に吸収して歯槽突起がほとんど消失することがある。このように顎骨はメカニカルフォースと密接に関連している組織であるが、これまで歯槽骨に応用されてきた骨再生療法は、骨欠損部への自家骨移植、人工骨補填材^{20,21)}や Guided Tissue Regeneration（GTR）²²⁾などを用いる方法であった。自家骨や人工骨補填材は有効な骨再生の手段であるが、生物由来材料は未知の疾患を引き起こす可能性があり、人工材料では副作用や生体適合性などの問題^{20,22,23)}を解決しなけ

ればならない。また、現行の骨再生療法では再生骨量の大きさは自然治癒力に依存しているため予定の骨量を得られないなどの問題がある。

そこで近年、歯科においても電気刺激による歯周組織への影響が検討され、電氣的刺激が歯槽骨のリモデリングや矯正処置における歯の移動を促進することなどが報告されている²⁴⁻²⁷⁾。これは直接的な電気刺激や外力により生じるピエゾ電流^{19,25)}による作用である。しかし、歯槽骨増生・維持の手段として電気刺激を応用する場合、数 μ A 程度の電流を持続的に流し続けるためには電源が必要になり装置はある程度の大きさとなるため、呼吸・咀嚼・発音と多くの機能を担当する口腔に常時設置するのは困難である。そこで、電源の不要な電気刺激手段として光電変換色素を GTR メンブレンに応用することを考えた。

光を電気に変換する技術としてはシリコン型太陽電池が一般的であるが基板に柔軟性がなく、歯槽骨再生のような狭く多様な形態をした部分に埋入することは困難である。一方、色素増感型薄膜太陽電池の多くは光電変換色素をポリマーに結合して電極とし²⁸⁾、電子をナノ結晶半導体膜に供給して電池としている。ポリマーを基板とする色素増感型太陽電池の構造は柔軟で歯科領域に応用しやすいと考えられる。このような光電変換色素結合ポリマー膜は人工網膜への応用が検討されている²⁹⁻³¹⁾。光電変換色素膜（人工網膜）が光を吸収して誘導する電位差により細胞のイオンチャンネルを開閉し、網膜細胞を刺激し視覚の回復を図っている。

光電変換色素を GTR メンブレンに応用して電氣的刺激による骨代謝の活性化を促し、目的の骨量を確実に得る能動的な骨増生手段は歯科領域においても有用と考えられる。

本研究では、光電変換色素膜を製作し、光エネルギーを電氣的刺激に変換することで骨形成の制御を検討した。

材料および方法

1. 光電変換色素結合膜の製作

光電変換色素を結合し配向させる基板には、松尾ら²⁹⁻³¹⁾の方法に従って、高密度型ポリエチレ

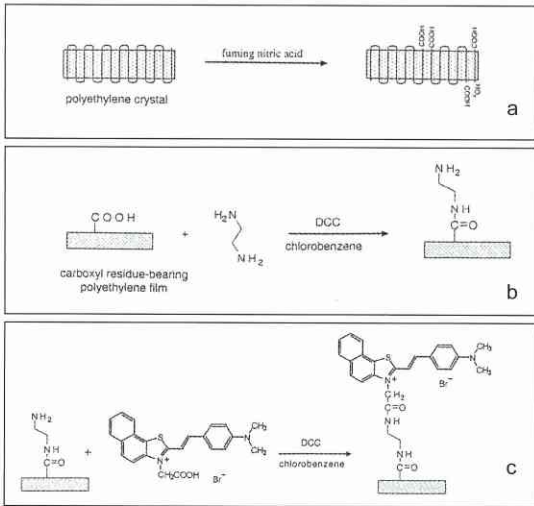


図1 ポリエチレンフィルム(PE)への光電変換色素結合過程
 a: PEへカルボキシル基を導入するための硝酸処理。
 b: 硝酸処理後PEのカルボキシル基へアゾ基の導入。
 c: アゾ基結合後PEへ光電変換色素(NK-5958)の導入。

ンフィルム (軟化温度80℃, 厚さ25 μ m, 以下PE) を用いた。PE へのカルボキシル基の導入は, 50ml 三角フラスコ内に97% 発煙硝酸 (和光純薬, 大阪) 20ml を入れ, 金線で PE を保持して液相中にて18分間78℃で加熱処理した。ポリエチレン鎖を部分的切断し表面にカルボキシル基を生成した。反応後 PE は中性になるまで蒸留水で流水洗浄し, 大気中にて自然乾燥させた (図1a)。つぎに, 光電変換色素結合の足場となるアゾ基をカルボキシル基に結合させるためエチレンジアミンと反応させた。エチレンジアミン (和光純薬) 1×10^{-5} mol をクロロベンゼン (和光純薬) 20ml に溶解し, さらに触媒として dicyclohexylcarbodiimide (和光純薬, 以下 DCC) を 1×10^{-5} mol 加えて 50 ml 三角フラスコ内にて硝酸処理後 PE と 35℃ に保温して 48 時間反応させた。反応後のアゾ基結合後 PE はクロロベンゼンで洗浄して大気中にて自然乾燥させた (図1b)。最終的なアゾ基結合後 PE と光電変換色素の結合は, 光電変換色素 NK-5958: 3-(Carboxymethyl)-2-[2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethenyl]-naphthol[2,1-d]thiazolium, bromide, (λ max = 556nm, MW=469.40, 林原生物化学

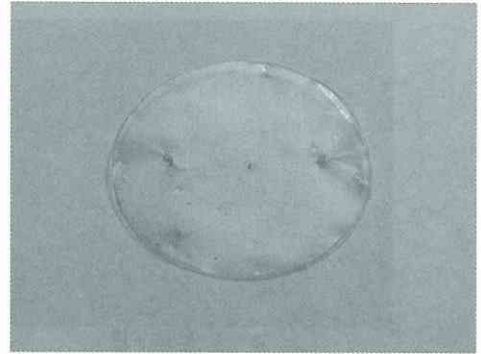


図2 製作された光電変換色素膜



図3 光電変換色素膜上の培養細胞に対して, インキュベーター内でプレート下面からレーザー光照射を行っている様子

研究所, 岡山) 1×10^{-5} mol をクロロベンゼン 20 ml に可及的に均一に分散させて触媒の DCC (1×10^{-5} mol) 加えた反応液 20ml を三角フラスコ内に入れ遮光し, 35℃ に保温して 24 時間反応させた。反応後, 光電変換色素結合 PE をクロロベンゼンにて洗浄後, 大気中にて自然乾燥させて光電変換色素膜 (図2) を作製した (図1c)。

2. 光電変換色素結合状態の分析

反応過程における PE 表面形態変化は走査電子顕微鏡 (SEM) (SEDEX Type N, 日立, 東京) を使用し観察した。処理過程の PE を試料台に導電性接着剤を用いて固定し, Pd 蒸着器 (イオンスパッター, E-1010, 日立, 東京) にて 60 秒間行い, 試料とした。また, PE 物質構造分析には近赤外分光光度計 (Nexus 670, サーモニコレー, 神奈川) を使用し, 分解能: 4 cm^{-1} , スキャン回数: 64 回, 透過法にて試料の赤外吸収スペクトルを測定した。また, 光電変換色素膜の吸光特性

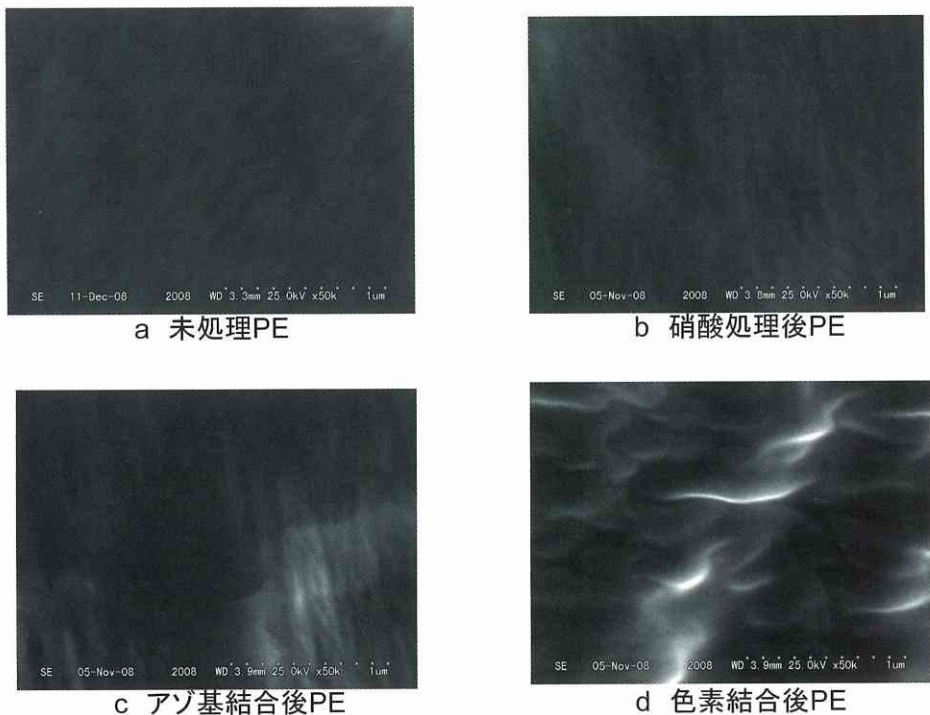


図4 光電変換色素膜の製作，各工程における走査顕微鏡像（倍率5万倍）

- a: 未処理PE
- b: 硝酸処理後PE
- c: アゾ基結合後PE
- d: 色素結合後PE

は紫外可視分光光度計（U-4000，日立，東京）を用いて，測定波長域：240～800nm，スキャンスピード：自動，スリット：2.00nmの条件で透過法にて測定した。

3. 光照射装置

光電変換色素膜の分極を誘導するための光源には，組織透過性の良いレーザー光を用いた。レーザー光は光電変換色素膜の光吸収特性に合わせて532nmの波長（緑色）を持つ試作半導体レーザー照射装置（出力2.0mW，吉田製作所，東京）を用いた。

4. 実験方法

培養実験に用いた細胞の採取は奥羽大学実験動物取り扱い基準に則って行った。

骨芽細胞様細胞の採取はYokose³²⁾らの方法に従った。エーテル麻酔下にて生後1日SDラット（日本クレア，東京）より頭蓋骨を無菌的に切り

出し，頭蓋骨組織を1mm角の小片に分割した。骨組織片に0.1% collagenase，0.05% trypsin，4mM EDTA-2Na（和光純薬）を添加し，phosphate buffered saline（PBS，ニッスイ製薬，東京）からなる酵素液を3ml加え，コンカルチューブ（Falcon，Labware，USA）内で37℃，20分間振盪し細胞を分離し，上澄みの細胞を含む酵素液を回収して遠心分離にて細胞成分を収集した。再度，残った骨組織片に酵素液を加えて同処理を6回繰り返し細胞を収集した。分離した骨芽細胞様細胞は150mmシャーレ（Falcon，Labware，USA）に10%仔ウシ血清とペニシリンGカリウム（100IU/ml，明治製菓，東京），硫酸ストレプトマイシン（100μg/ml，明治製菓，東京）を添加したα-minimum essential medium（α-MEM，Gibco Laboratories，USA）をインキュベーター（37℃，5% CO₂）内で培養した。

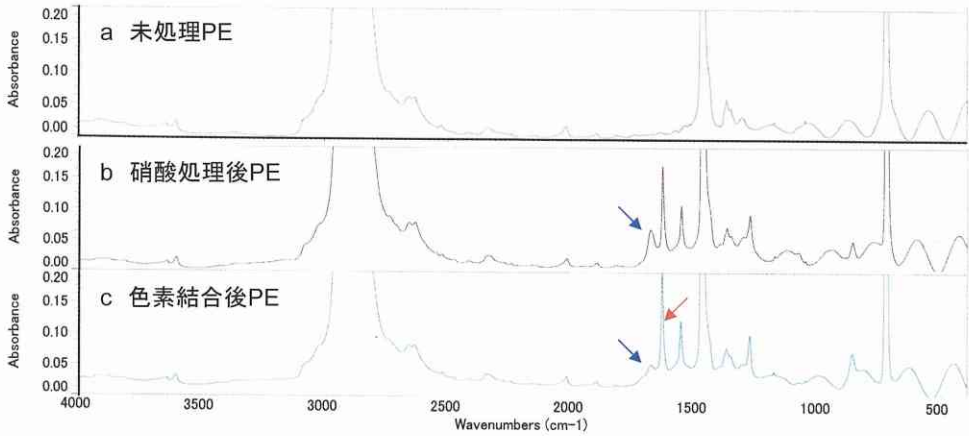


図5 光電変換色素膜の製作，各工程における赤外分光分析の結果

- a: 未処理PE
- b: 硝酸処理後PE
- c: 色素結合後PE

青矢印：硝酸処理後PE，色素結合後PEでカルボキシル基を示す特性スペクトルの増強が測定された。
 赤矢印：色素結合後PEでアゾ基を示す特性スペクトルの増強が計測された

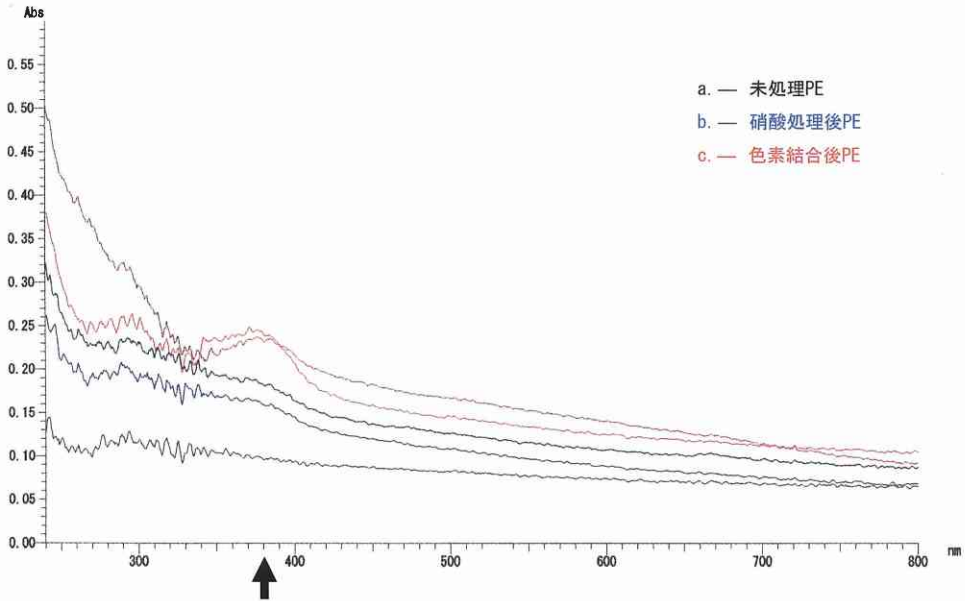


図6 光電変換色素膜の製作，各工程における紫外可視分光分析の結果

- a: 未処理PE — — —
- b: 硝酸処理後PE - - - -
- c: 色素結合後PE - · - · -

色素結合後PEの吸収スペクトルは380nm付近にピークが測定された(矢印)。

細胞が subconfluent に達したところで0.05 % trypsin, 4 mM 2NaEDTA を含む PBS buffer で細胞を剥離して回収し実験に用いた。

色素非結合 PE 膜 (対照群) と光電変換色素膜

(実験群) をそれぞれ0.4 μm Cell culture insert (Falcon, Labware, USA) の基底部に固定した。Cell culture insert 内側に骨芽細胞様細胞を細胞密度 (4×10⁵cells/well) で播種し, 10 % 仔ウシ

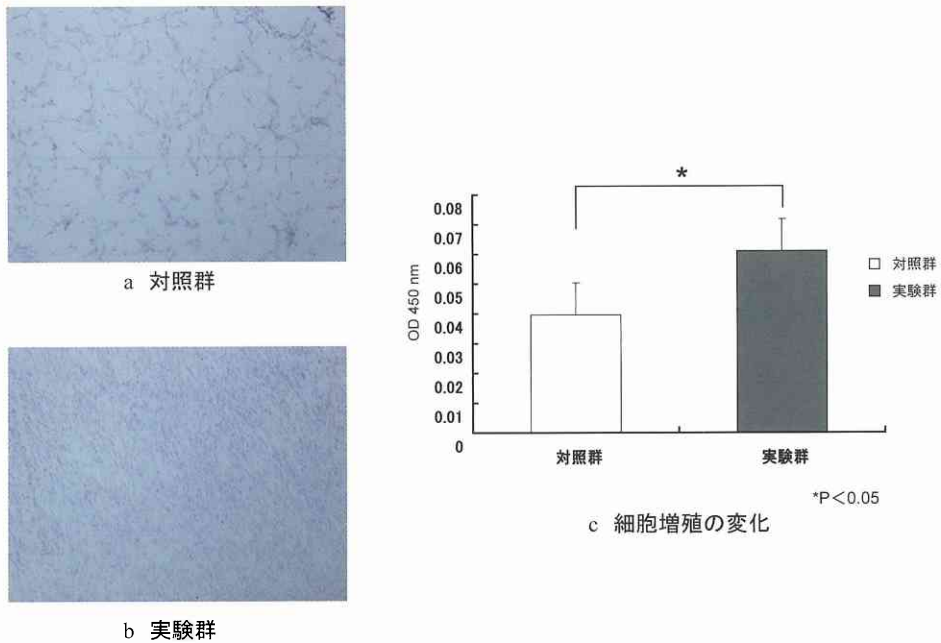


図7 骨芽細胞様細胞に対する光電変換色素膜の電氣的刺激効果

a: 照射3日目の対照群, 光電変換色素膜上の培養細胞に対するヘマトキシリン染色倍率40倍。

b: 照射3日目の実験群, 光電変換色素膜上の培養細胞に対するヘマトキシリン染色倍率40倍。

c: 照射3日目に対する細胞増殖の変化。

□; 対照群 ■; 実験群

血清添加 α -MEM を入れた6-multiwell plate (Falcon, Labware, USA) に挿入して実験に使用した。光電変換色素膜に対して, 培養開始後2日目より, インキュベーター内でプレート下面からレーザー光を出力2.0mW, 1日10分間ずつ照射し, 開始3日目に細胞の反応を比較検討した(図3)。

5. 培養細胞の細胞増殖について

培養細胞における光電変換色素膜の電氣的刺激効果について, 照射開始後3日目にて採取した細胞を cell counting kit (和光純薬) を用い, マニュアルに従って, 細胞増殖について測定した。6-multiwell plate の各細胞群を PBS で洗浄後, 各 well に500 μ l の Earle 液と100 μ l の反応液を加え, 37°C, 5% CO₂ の下で20分間培養した。その後, 培養上清を回収し, 波長450nm の吸光度を測定した。また, 採取した培養細胞を10% 中性緩衝ホルマリンにて固定した。エタノール脱水後ヘマトキシリン染色にて核染を行い, 光学顕微鏡下 (倍率40倍) にて形態を観察した。

6. 統計処理

培養細胞での実験群と対照群の細胞増殖の差は Mann-Whitney *U*-test により検定した。

結 果

1. 光電変換色素膜の製作過程における PE の構造分析

PE 表面構造を SEM で観察 (倍率5万倍) すると, 硝酸処理後 PE 表面は微細なヒダ状呈し, エチレンジアミンによるアゾ基結合後 PE では比較的滑らかな表面を呈していた。色素結合後 PE 表面では再び微細なヒダ状を呈していた (図4)。

PE の分子構造について近赤外吸光分析結果では, 未処理 PE に比較して硝酸処理後 PE および色素結合後 PE において, カルボキシル基を示す特性スペクトルの増強が Wavenumber : 1650cm⁻¹ 付近で確認された (図5)。また, 硝酸処理 PE 後に比較して色素結合 PE 後ではカルボキシル基の特性スペクトルの減弱が見られ, アゾ基を示す特性スペクトルの増強が Wavenumber : 1600cm⁻¹

付近で確認された。

光電変換色素膜の吸光特性について紫外可視分光分析により測定すると、未処理 PE、硝酸処理後 PE に比較して色素結合後 PE の吸収スペクトルでは 380nm 付近に吸収特性の増強が観察された (図 6)。

2. 骨芽細胞様細胞に対する光電変換色素膜の電氣的刺激効果

培養細胞の細胞増殖について、照射 3 日目では、実験群の光電変換色素膜上の骨芽細胞様細胞において、レーザー光が照射された部位を中心に増殖が見られた (図 7b)。しかし対照群では変化が見られなかった (図 7a)。照射群は対照群に比較し、細胞数は約 154% となり、有意な増加傾向が示された (図 7c)。

考 察

本研究では、新たな歯槽骨再生療法として従来の GTR メンブレンに比較して薄く柔軟な光電変換色素膜を製作し、光エネルギーを電氣刺激に変換することで骨形成の制御が可能か検討した。

光電変換色素はスチリル系色素 NK-5958 を用いた。スチリル系色素ではメチン鎖を挟んでアニリン側は電子ドナー性が高く、5 員環側は電子アクセプター性が高いので励起状態では 5 員環側に電子が多く集まる。本色素はクロモフォア (発色団共役骨格、5 員環側) と分子内に 4 級の窒素原子 (N) とカルボキシル基アンカーを連結する炭素が 1 個あるモノメチルスチリル色素でこの炭素に水素原子 (電子吸引基) が結合している。電子の移動は色素から基板に向かって生じるためクロモフォア (発色団本体) と基板との距離を短くする必要がある。可視光などを吸収して励起状態になると電離して分子内の窒素イオン (N^+) と臭素イオン (Br^-) とで対イオンを形成する。このイオンにより組織液を介して細胞膜の電位状態が変化すると考えられる³³⁾。

本実験で製作した光電変換色素膜の赤外吸光分析では色素結合後にカルボキシル基の消費とアミド結合の増強が確認され色素が結合していることが確認された。紫外可視分光分析における吸光特性では NK-5958 の最大吸光波長である 556nm と

比較して紫外側 380nm 付近に遷移しているが、発色団本体に構造変化を生じないので、PE に結合させたことにより変化したと考えられる。光電変換色素膜は複雑な電子回路の必要がないため埋入手術時に破損する危険性がなく、電源装置が不要なことが最大の利点である。また、光電変換色素膜の基板であるポリエチレンは化学的に非常に安定であるため生体内で分解し副作用を生じる可能性が少なく、生体不活性であるため持続的な埋入にも対応できると思われる。ポリエチレン膜は 25 μm と従来の GTR メンブレン (200~300 μm) に比較して薄く、適応部位の歯肉・歯槽粘膜に不必要な緊張を生じることがなく、メッシュ状に加工することにより組織液の透過性を持たせることも可能であり、縫合後の歯肉の裂開や壊死なども回避できると考えられる。

従来の歯槽骨再生療法では骨補填材や GTR メンブレンなどにより予定する骨の形態を作り上げるが、自然治癒力に頼った骨再生であるため自家骨移植を用いても移植骨の吸収を生じていた³⁴⁾。移植後の骨量保持および形態維持には生理学的な刺激を適度な頻度で与える手段が必要である⁵⁾。

一方、ヒトの骨組織では通常、骨表面に存在する活性期骨芽細胞部は 5% 程度と少なく破骨細胞が 1% でほとんどは休止期骨芽細胞 (94%) である³⁵⁾。骨形成には多くの骨芽細胞を必要とするため何らかの刺激で休止期骨芽細胞を活性化させるか³⁶⁾、間葉系細胞から骨芽細胞への分化を促進する必要がある²⁴⁾。歯槽骨再生療法において骨代謝を活性化するには、メカニカルフォースを簡便にかつ確実に作用させる方法が必要となる。

光電変換色素膜は歯槽粘膜を介して可視光照射を行うことで電氣刺激を与えるため、安全かつ簡便であると思われる。一般に電氣刺激では、電子の移動により陰極側で水酸化イオン (OH^-) が生成され陽極側で水素イオン (H^+) が生成される²⁵⁾。また、電氣刺激による局所的な酸素の欠乏と pH の上昇により骨形成が誘導されると報告されている³⁷⁾。また、組織液あるいは細胞質ゾルに生じた電位の傾きによりプロトン (H^+) が ATPase に作用し ATP が生成され、ATP は Na, K, Ca などのミネラルの細胞膜間移動において細胞

膜のイオンポンプを駆動する³⁸⁾。網膜細胞では光電変換色素によって Ca^{2+} チャンネルの開閉が確認されている²⁹⁻³¹⁾。細胞内外の Ca^{2+} 濃度の差は約 1 万倍あり、 Ca^{2+} チャンネルは細胞質ゾルから Ca^{2+} を外界に排出している。通常、細胞内 Ca^{2+} は非常に低くわずかな Ca^{2+} の流入でも濃度は大きく変動し、細胞外の変化が細胞膜を介して速やかに伝達される機構となっている³⁸⁾。光電変換色素膜による微量電気刺激により細胞膜の脱分極が誘導され、電位依存性イオンチャンネルの開口、および、ATP を介して細胞内のイオン応答タンパク質を活性化させる可能性が考えられる。ラットの骨芽細胞様細胞の培養実験において細胞数は対照群に比較して有意な細胞数の増加が見られたことより、光電変換色素膜の色素の発色団本体がレーザー光により励起状態となり、イオン化した分子により培養細胞の細胞膜に電位変化が惹起されて細胞増殖が活性化されたと考えられる³⁹⁾。

骨組織に直接与える電気刺激はこれまでの研究から数 μA 程度で有効であると考えられ⁴⁰⁾、骨形成は主に陰極側で著明であると報告されている^{19,37)}。本方法は増骨系細胞の細胞膜に光電変換色素分子のイオン化により直接電子が供給されるため電流を流す必要はなく、電離した Br^- は陰極として細胞膜に電位差を生じさせると考えられる。

結 論

本研究で製作した光電変換色素膜は、ポリエチレンフィルムに光電変換色素が化学的に結合していた。またレーザー光が電氣的刺激に変換され、骨芽細胞に作用し、細胞増殖を促進したことが確認された。以上のことから光電変換色素膜の生体応用への可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始直接ご指導、ご校閲を賜った奥羽大学大学院歯学研究科口腔健康科学領域保存修復学、横瀬敏志教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたりご協力を頂きました歯科保存学講座修復分野の教員各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第46回奥羽大学歯学会（平成20年11月8日 郡山市）において発表した。

文 献

- 1) Wolff, J. : Das Gesetz der Transformation der Knochen. A Hirshwald. 1 ; 1-152 1892.
- 2) Trock, D. H. : Electromagnetic fields and magnets : Investigational treatment for musculoskeletal disorders. Rheum. Dis. Clin. North Am. 26 ; 51-62 2000.
- 3) Roesler, H. : Some historical remarks on the theory of cancellous bone structure (Wolff's law). In Mechanical properties of bone (Ed., S. C. Cowin) ; 27-42 AMD New York ASME 1981.
- 4) Yeh, C-K. and Rodan, G. A. : Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. Calcif. Tissue Int. 36 ; 67-71 1984.
- 5) 川島博行 : メカニカルストレスにより誘導される骨芽細胞の分化と骨形成. 新潟歯学誌 30 ; 173-182 2000.
- 6) 弓削 類 : 物理療法における細胞・組織修復の効果と課題. 理学療法 21 ; 1342-1348 2004.
- 7) 新井嘉則, 宇田川信之, 小澤英浩, 高橋直之, 中村浩彰 : 硬組織の形態と形成 ; 24-45 Hard Tissue 硬組織研究ハンドブック. MDU 出版会 長野 2006.
- 8) 保田岩夫, 野口和彦, 佐多徹郎 : 力学的仮骨と電氣的仮骨. 日整会誌 28 ; 267-269 1954.
- 9) 大橋俊郎 : 骨折治療における電気刺激法の歴史と変遷. 日本生体電気刺激研究会 17 ; 1-9 2003.
- 10) 遠藤直人, 高橋栄明 : 骨と電気刺激. The Bone. 7 ; 49-53 1993.
- 11) 竹川 徹, 冬木寛義, 鈴木宏一 : 理学療法による骨折治癒. 総合リハ 32 ; 941-946 2004.
- 12) 伊東聡一郎, 四宮謙一, 湯川佳宣, 鈴木博之, 田代雅彦, 田中順三 : 骨電気刺激癒合装置 CCEF で治療した骨癒合遷延 2 症例. 日本生体電気刺激研究会 18 ; 33-36 2004.
- 13) Brighton, C. T., Wang, W., Seldes, R., Zhang, G. and Pollack, S. R. : Signal transduction in electrically stimulated bone cells. J. Bone Joint Surg. Am. 83 ; 1514-1523 2001.
- 14) 井上 望 : 電気・電磁場刺激. The Bone 18 ; 719-724 2004.
- 15) Bassett, C. A., Valdes, M.G. and Hernandez, E. : Modification of fracture repair with selected pulsing electromagnetic fields. J. Bone Joint Surg. Am. 64 ; 888-895 1982.
- 16) Bassett, C. A. : Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields (PEMFs). Crit. Rev. Biomed. Eng. 17 ; 451-529 1989.
- 17) 泉 俊彦, 中村雅洋, 肥後 勝, 三上武彦, 松

- 永俊二, 小宮節郎：軟骨無形成症における交流電気刺激装置の使用経験. 日本生体電気刺激研究会 **18** ; 45-49 2004.
- 18) Friedenberg, Z. B., Andrews, E. T., Smolenski, B. I., Pearl, B. W., and Brighton, C. T. : Bone reaction to varying amounts of direct current. *Surg. Gynecol Obstet.* **131** ; 894-899 1970.
- 19) Yasuda, I. : Electrical callus and callus formation by electret. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **124** ; 53-56 1977.
- 20) 符 義人：生体適合材料の素材. 生体適合材料；52-68 日本規格協会 東京 1993.
- 21) Itoh, S., Nakamura, S., Nakamura, M., Shinomiya, K. and Yamashita, K. : Enhanced bone ingrowth into hydroxyapatite with interconnected pores by electrical polarization. *Biomaterials* **27** ; 5572-5579 2006.
- 22) 佐藤温重：歯科材料の副作用と安全性. 口腔外科材料 **10** ; 128-136 1997.
- 23) 符 義人：材料と生体の相互作用. 生体適合材料；26-33 日本規格協会 東京 1993.
- 24) 鈴木弘之：微小電流による骨誘導に関する実験的研究. 九州歯会誌 **29** ; 399-416 1976.
- 25) Jacobs, J. D. and Norton, L. A. : Electrical stimulation of osteogenesis in periodontal defects. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **124** ; 41-52 1977.
- 26) Davidovitch, Z., Finkelson, M. D., Steigman, S., Shanfeld, J. L., Montgomery, P. C., and Korostoff, E. : Electric currents, bone remodeling, and orthodontic tooth movement. I. The effect of electric currents on periodontal cyclic nucleotides. *Am. J. Orthod.* **77** ; 14-32 1980.
- 27) Davidovitch, Z., Finkelson, M. D., Steigman, S., Shanfeld, J. L., Montgomery, P. C., and Korostoff, E. : Electric currents, bone remodeling, and orthodontic tooth movement. II. Increase in rate of tooth movement and periodontal cyclic nucleotid levels by combined force and electric current. *Am. J. Orthod.* **77** ; 33-47 1980.
- 28) Miyasaka, T., Ikeda, N., Murakami, T. and Teshima, K. : Light energy conversion and storage with soft carbonaceous materials that solidify mesoscopic electrochemical interfaces. *Chem. Lett.* **36** ; 480-487 2007.
- 29) Matsuo, T. : A simple method for screening photoelectric dyes toward their use for retinal prostheses. *Acta. Med. Okayama* **57** ; 257-260 2003.
- 30) Uji, A., Matsuo, T., Ishimaru, S., Kajiura, A., Shimamura, K., Ohtsuki, H., Dan-oh, Y., and Suga, S. : Photoelectric dye-coupled polyethylene film as a prototype of retinal prostheses. *Artif. Organs* **29** ; 53-57 2005.
- 31) Uji, A., Matsuo, T., Uchida, T., Shimamura, K., and Ohtsuki, H. : Intracellular calcium response and adhesiveness of chick embryonic retinal neurons to photoelectric dye-coupled polyethylene films as prototypes of retinal prostheses. *Artif. Organs* **30** ; 659-703 2006.
- 32) Yokose, S., Ishizuya, T., Ikeda, T., Nakamura, T., Tsurukami, H., Kawasaki, K., Suda, T., Yoshiki, S., and Yamaguchi, A. : An estrogen deficiency caused by ovariectomy increases plasma levels of systemic factors that stimulate proliferation and differentiation of osteoblasts in rats. *Endocrinology* **137** ; 469-478 1996.
- 33) 佐山和弘, 荒川裕則, 原浩二郎, 菅 貞治, 神宝 昭, 大賀保代：スリチル色素を光増感剤とする半導体電極, 光電変換素子及び光電気科学太陽電池. 公開特許広報 P2003-234133A 2003.
- 34) Curtis, T. A., Ware, W. H., Beirne, O. R. and Frankel, M. E. : Autogenous bone grafts for atrophic edentulous mandibles : a final report. *J. Prosthet. Dent.* **57** ; 73-78 1987.
- 35) Parfitt, A. M. : The physiological and clinical significance of bone histomorphometric data. *Bone Histomorphometry : Techniques and Interpretation.* CRC Press **9** ; 143-223 1983.
- 36) Chow, J. W., Wilson, A. J., Chambers, T. J. and Fox, J. W. : Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J. Bone Miner. Res.* **13** ; 1760-1767 1998.
- 37) Brighton, C. T., Adler, S., Black, J., Itada, N., and Friedenberg, Z. B. : Cathodic oxygen consumption and electrically induced osteogenesis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **107** ; 277-282 1975.
- 38) 大森豊明：中・西医結合医療による微弱電流の臨床. 生体物理刺激と生体反応. フジ・テクノシステム **4** ; 741-753 2004.
- 39) 大野朝也：微小電流刺激が顎骨骨欠損創の治癒過程に及ぼす影響に関する実験的研究. 歯科学報 **82** ; 57-87 1982.
- 40) 中島義真, 梅村幸生, 鶴町 仁, 大野朝也：微小電流刺激の骨組織におよぼす影響に関する研究. 奥羽大歯学誌 **19** ; 1-8 1992.

著者への連絡先：松浦芳久, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯周病学分野
Reprint requests : Yoshihisa MATSUURA, Division of Periodontology, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dntistry
31-1 Misumido, Tomita Koriyama, 963-8611, Japan