

研究助成 2023 – 感染症領域 –

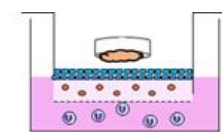
研究成果報告書（最終）＜概要＞

現 所 属	新潟大学医歯学総合研究科 口腔健康科学講座 う蝕学分野
氏 名	外園真規
研 究 テーマ	免疫細胞を含む新規歯肉上皮モデルを用いた、宿主免疫機構とデンタルバイオフィーム細菌叢の相互作用の解明

- 研究助成報告として財団ホームページ等に公表するので、その点を留意すること。
- 構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果等 1 ページにまとめること。（図表、写真等の貼付を含む）

1. Reconstructed Human Gingiva モデルの発展

歯周病の主因は口腔に生息する微生物が歯面に形成するデンタルバイオフィーム(dental biofilm; DB)であるが、宿主-DB 間の相互作用が疾患の発生に重要であると考えられている。現在、宿主-細菌または宿主-バイオフィーム間の相互作用を検討するための宿主歯肉モデルとして、RHG; Reconstructed Human Gingiva が頻繁に用いられており、申請者もこの歯肉モデルを用いて研究を行ってきた(Sotozono M et al. Microbiota and Host 3 (1), e240008, 2025)。しかし、このモデルは歯周病の発生および進行に重要な役割を果たす好中球などの免疫細胞を含んでおらず、

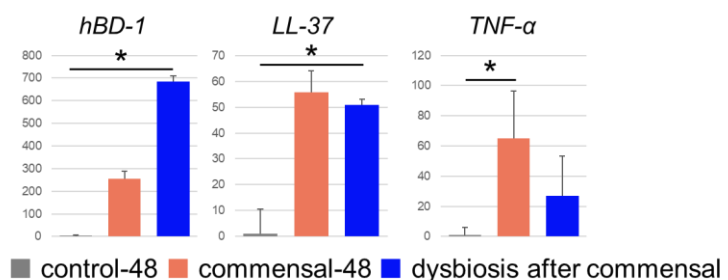


- 歯肉線維芽細胞(CRL-4061)
- 歯肉上皮細胞(CRL-3397)
- 好中球様細胞(HL-60)
- コラーゲンゲル
- 細胞培養培地
- DB サンプル

疾患発生を模倣するには不十分である。そこで、本研究では RHG を培養するセルインサート下に免疫細胞様細胞を添加し、歯肉モデルの発展を試みた。本研究で使用した RHG の模式図を上図に示す。

2. 人工的 dysbiosis を生じたヒト由来デンタルバイオフィームを使用した実験の実施

DB の細菌叢の乱れや変化 (dysbiosis) は、宿主免疫機構に影響を及ぼし、疾患の発生に寄与する。本研究では、この dysbiosis を模倣するため、上記 1. で示した免疫細胞を含む歯肉モデルに、申請者らのグループが開発した *in situ* DB モデル(Sotozono M et al. Scientific reports 11(1) 138-138 2021)を用いて形成した実験的 DB(commensal DB)と、実験的 DB を SHI-modified medium を用いて嫌気条件下で培養し人工的に dysbiosis を生じさせた dysbiosis DB を暴露させた。人工的に dysbiosis を生じさせた場合には、元の *in situ* DB と明らかに異なる細菌叢を持つようになることを確認した。人工的に dysbiosis を生じさせたバイオフィームを RHG に暴露する研究は過去にも実施されているが、本研究では、臨床に即して DB が健康側から疾患側へ変化することを想定し、dysbiosis を生じていない DB を 24 時間暴露した後に dysbiosis を人工的に引き起こした DB を 24 時間 RHG に暴露した (commensal after dysbiosis 群)。比較対象として、採取直後の *in situ* DB を 48 時間暴露する commensal-48 群と DB を暴露しない control-48 群を設定した。リアルタイム PCR により、RHG における遺伝子発現を定量した結果、hBD-1, LL-37 は dysbiosis after commensal 群でコントロールと比較し有意に上昇した。


3. 今後の課題

好中球様細胞の RHG 内への遊走の有無を調べるためには免疫組織学的検討が必要であり、現在抗体の選定等を行っている途中である。今後の課題として、免疫組織染色方法の確立を進めていく必要がある。

様式 4-3①

研究助成 2023 – 感染症領域 –
研究成果報告書（最終） <発表実績/予定一覧>

現 所 属	新潟大学医歯学総合研究科 口腔健康科学講座 う蝕学分野
氏 名	外園真規
<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として財団ホームページ等に公表するので、その点を留意すること。 ● 欄が足りない場合は増やして記入すること。 	
1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成交付後のものに限る。 ● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入すること。なお、著者名は省略せず全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引くこと。 ● 国内外雑誌を問わない。 ● 印刷中は in press と記入し、投稿中の論文および学会のabstractは含めないこと。 	
1	佐藤大地, 大倉直人, 外園真規, Rosa Baldeon Gutierrez, Susan Gomez-Kasimoto, 高原信太郎, Jutharat Manuschai, 井田貴子, 竹中彰治, 野村由一郎, ヒト歯髄幹細胞およびマウス前骨芽細胞における歯周病関連細菌 Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum が放出する外膜小胞の内在化機構解析, BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM, 39 in press, 査読無
2	外園 真規, 高橋 竜平, 井田 貴子, 永田 量子, Niraya Kornsobut, 齋藤 瑠郁, Jutharat Manuschai, 佐藤 大地, 竹中 彰治, 野村 由一郎, 歯肉上皮モデルが in situ デンタルバイオフィルム細菌叢に及ぼす影響 BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM 38, 19-24, 2024, 査読無
3	Maki Sotozono, Ryouhei Takahashi, Takako Ida, Ryoko Nagata, Rui Saito, Niraya Kornsobut, Jutharat Manuschai, Shoji Takenaka, Yuichiro Noiri, Interaction between the human dental microbiome and host gingival model. Microbiota and Host 3: e240008(online), 2025 査読有
4	Niraya Kornsobut, Shoji Takenaka, Jutharat Manuschai, Maki Sotozono, Ryoko Nagata, Takako Ida, Risako Sato, Rui Saito, Ryouhei Takahashi, Daichi Sato, Yuichiro Noiri, Effects of Tooth Desensitizers on Streptococcus mutans Biofilm Formation Using a Modified Robbins Device Flow Cell System. International Journal of Molecular Sciences 25, 10703(online), 2024 査読有
5	Manuschai J, Sotozono M, Takenaka S, Kornsobut N, Takahashi R, Saito R, Nagata R, Ida T, Noiri Y: In Vitro Inhibitory Effect of Silver Diamine Fluoride Combined with Potassium Iodide against Mixed-Species Biofilm Formation on Human Root Dentin Antibiotics 13, 743(online), 2024 査読有
6	Niraya Kornsobut, Shoji Takenaka, Maki Sotozono, Ryoko Nagata, Takako Ida, Jutharat Manuschai, Rui Saito, Ryouhei Takahashi, Yuichiro Noiri: Antibiofilm Properties and Demineralization Suppression in Early Enamel Lesions Using Dental Coating Materials. Antibiotics 13, 106(online), 2024 査読有
7	大倉直人, Baldeon Gutierrez Rosa Edith, 高原信太郎, Gomez Kasimoto Susan Kiara, 枝並直樹, 井田貴子, 外園真規, 永田量子, 竹中彰治, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 野村由一郎: 歯髄創傷治癒および歯髄再生過程におけるリン酸トランスポーター(Pit-1)の免疫組織学的解析, 日本歯科保存学会雑誌, 165-173, 2024. 査読有

様式 4-3②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入すること。 ● 国内外を問わない。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2025年7月12日	令和7年度新潟歯学会第1回例会 佐藤莉沙子、外園真規、竹中彰治、野村由一郎 口腔ケアロボット g.eN の歯ブラシ機能の有用性とマウススクリーンジェル (MA-T) の効果に関する研究
2	2025年7月6日	第39回日本バイオフィルム学会学術集会 佐藤大地、大倉直人、外園真規、Rosa Baldeon Gutierrez、Susan Gomez-Kasimoto、高原信太郎、Jutharat Manuschai、井田貴子、竹中彰治、野村由一郎 ヒト歯髄幹細胞およびマウス骨芽細胞における歯周病関連細菌 Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum が放出する外膜小胞の内在化機構解析
3	2025年5月24日	第68回春季日本歯周病学会学術大会 佐藤 莉沙子, 野村 由一郎, 外園 真規 全自動歯ブラシ g.eN の有用性とマウススクリーンジェル (MA-T®) の効果に関する研究
4	2024年11月21日	第161回日本歯科保存学会学術大会 外園真規、高橋竜平、井田貴子、永田量子、Niraya Kornsobut、齋藤瑠郁、Jutharat Manuschai、佐藤大地、竹中彰治、野村由一郎
5	2024年11月21日 ~22日	第161回日本歯科保存学会学術大会 永田量子、竹中彰治、外園真規、野村由一郎 デンタルバイオフィルムからの Helicobacter pylori の分離培養法の確立 を目指した研究（第一報）ポリクローナル抗体結合磁気ビーズ法を用いた H. pylori の検出
6	2024年11月21日 ~22日	第161回日本歯科保存学会学術大会 井田貴子、枝並直樹、外園真規、竹中彰治、野村由一郎 Epigallocatechin-3-gallate(EGCG)によるマクロファージ極性制御誘導の検討
7	2024年7月26日	第38回日本バイオフィルム学会学術集会 外園真規、高橋竜平、井田貴子、永田量子、Niraya Kornsobut、齋藤瑠郁、Jutharat Manuschai、佐藤大地、竹中彰治、野村由一郎 歯肉上皮モデルが in situ デンタルバイオフィルム細菌叢に及ぼす影響。
8	2024年7月27日 (シンポジウム)	第38回日本バイオフィルム学会学術集会 外園真規、野村由一郎 In situ デンタル バイオフィルムモデルを用いたヒトデンタルバイオフィルムの多面的解析
9	2024年5月16日	第160回日本歯科保存学会学術大会 Jutharat Manuschai、外園真規、竹中彰治、Niraya Kornsobut、高橋竜平、齋藤瑠郁、永田量子、井田貴子、野村由一郎 The effect of silver diamine fluoride combined with potassium iodide against cariogenic biofilm formation: In vitro.
10	2024年4月13日	第57回新潟歯学会総会 Niraya Kornsobut, 竹中彰治, 外園真規, Jutharat Manuschai, 野村由一郎 Antibiofilm properties and demineralization suppression in early enamel lesions using dental coating materials.
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2026年 投稿予定	Journal of Microbiology, Immunology and Infection



2	2025 年 9 月 投稿中	Archives of Oral Biology
---	-------------------	--------------------------