

学位論文(博士)

Deep Ultraviolet Light-Emitting Diode Light Therapy
for *Fusobacterium nucleatum*

(*Fusobacterium nucleatum*に対する深紫外線発光ダイオード光療法)

氏名 伊藤 駿介

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器内科学講座

令和4年1月

目次

1,	要旨	4
2,	研究の背景	5~6
3,	対象・方法	6~8
(1)	使用菌株・培養条件	6
(2)	DUV-LED の照射条件	6
(3)	DUV-LED 光による殺菌作用の定性試験	7
(4)	DUV-LED 光による殺菌採用の定量試験	7
(5)	ヒト上皮細胞に対する DUV-LED 光の毒性	7
(6)	ELISA による DNA 傷害の測定	8
(7)	統計解析	8
4,	結果	8~10
(1)	DUV-LED 光による殺菌作用の定性試験	8
(2)	DUV-LED 光による殺菌作用の定量試験	9
(3)	DUV-LED 光による HaCaT 細胞への ダメージの評価	9~10
(4)	ピリミジン二量体形成による DUV-LED 光誘導 DNA 損傷の検出	10

5,	考察	11~12
6,	謝辞	12
7,	利益相反	12
8,	参考文献	12~15

1. 要旨

【背景】近年、歯周炎や歯肉炎に関連する嫌気性グラム桿菌である *Fusobacterium nucleatum*(*F. nucleatum*)は大腸がんの発生や進行に関与することが報告されている。この菌の制御が大腸がんの予防につながる可能性があると考え、深紫外線発光ダイオード(DUV-LED)による *F. nucleatum* の殺菌効果を検討した。【方法】 DUV-LED の *F. nucleatum* に対する殺菌効果を定性的、定量的に評価した。ピーク波長が 265 nm と 280 nm の 2 種類の DUV-LED を使用した。*F. nucleatum* の DNA に対するダメージは、シクロブタンピリミジン二量体(CPD)とピリミジンピリミドン光生成物(6-4PP)の生成で評価した。【結果】 DUV-LED での 265 nm または 280 nm の波長を 3 分間照射したところ、コロニーの成長は観察されなかった。265 nm の DUV-LED 光照射下における *F. nucleatum* の生存率は 10 秒照射で 0.0014%、20 秒照射で 0%に低下した。同様に、280 nm の DUV-LED 光照射では、10 秒照射で 0.00044%、20 秒照射で 0%に低下した。DUV-LED から 35 mm の距離での放射照度は、265nm の LED で 0.265 mW/cm²、280 nm の LED では 0.415 mW/cm²であった。従って、致死量を示す放射エネルギーは 265 nm LED は 5.3 mJ/cm²、280 nm LED は 8.3 mJ/cm²であった。265 nm と 280 nm の DUV-LED 光を *F. nucleatum* に照射した際の CPD と 6-4PP の量はそれぞれ 6.548 ng/ μ g、1.333 ng/ μ g であった。【結論】 DUV-LED 光は、*F. nucleatum* に対して、ピリミジン二量体を形成することにより殺菌効果を発揮した。

2. 研究の背景

消化器がんの発生には、飲酒、喫煙[1]、肥満[2]、食習慣[3]などの生活習慣と、ある種の感染症[4]が関与している。国際がん研究機関（IARC）は、1994年に疫学調査から *Helicobacter pylori* を胃がんの確実な発がん因子と認定し[5]、*Helicobacter pylori* 除菌療法が胃がんの発生を抑制することが示されている[6, 7]。胃がんとは異なり、日本では大腸がん（colorectal cancer : CRC）による死亡率が著しく上昇しているため、CRCを予防する有効な方法が求められている。

腸内細菌の異常はCRCの発症と関連している[8]。最近の研究では、*Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)、*Streptococcus bovis*、*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis*、*Enterococcus faecalis*、*Escherichia coli*、*Peptostreptococcus anaerobius* がCRCと関連する可能性のある病原体とされている[9]。*F. nucleatum*は、CRC組織内に検出されることが報告されている[10]。*Fusobacterium*は健常者の口腔内や消化管内に存在する嫌気性グラム陰性桿菌であり[11]、*F. nucleatum*は歯周炎や歯肉炎などの口腔炎症性疾患と関連している[12, 13, 14]。2012年、Kosticらは全ゲノムシーケンスを用いて大腸癌の微生物叢の傾向を解析し、*Fusobacterium*の配列が癌に多いことを示した[15]。また、Castellarinらは、RNAシーケンスを用いて、*F. nucleatum*のみが対照検体に対してCRCで有意に増加することを明らかにした[16]。Mimaらは、CRC組織中の*F. nucleatum*のDNA量がCRC患者の生存期間の短縮と関連することを報告し[17]、Yamaokaらは、予後バイオマーカーとして機能する可能性があることを見いだした[18]。このように、*F. nucleatum*がヒトにおけるCRCの発症および進行に関連することを示唆する証拠が蓄積されている。

いくつかの研究により、*F. nucleatum*がCRCの発生に寄与するメカニズムが明らかにされた。Rubinsteinらは、*F. nucleatum*のFadA adhesinがE-cadherinに結合してCRC細胞の β -cateninシグナルを活性化し、c-Mycとcyclin-D1の転写によってCRCの成長が誘導されることを明らかにした[19]。Yangらは、ヌードマウスにおいて*F. nucleatum*に感染したCRC細胞株が、感染していないCRC細胞株に比べてより急速に大きな腫瘍を形成することを示した。*F. nucleatum*を細胞に感染させると、MYD88へのTLR4シグナルを活性化することでmiR21の発現が増加し、核因子NF κ Bの活性化につながった[20]。Yuらは、化学療法後に再発した患者のCRC組織に*F. nucleatum*が豊富に存在することを発見した。*F. nucleatum*は、TLR4およびMYD88自然免疫シグナルと特定のマイクロRNAを標的として、オートファジー経路を活性化し、CRCの化学療法への感受性を低下させた[21]。Gurらは、*F. nucleatum*のFap2タンパクがT細胞免疫グロブリンおよびITIMドメイン（TIGIT）と直接相互作用し、NK細胞の細胞傷害性の抑制につながることを発見した[22]。*F. nucleatum*は、CRC細胞に付着・侵入した後、発がん反応や炎症反応を誘導し、その増殖を促す。

*F. nucleatum*は歯周ポケット内でバイオフィルムを形成するため、抗菌剤を注入しても十分な殺菌効果が得られず、感染が再発することが多い[23]。LEDは発光する半導体素子であり、機器の小型化に適している[24]。近年、紫外線を発光するLEDが開発され[25]、深紫外線発光ダイオード（DUV-LED）が細菌や真菌に対して様々な殺菌効果を有することが in

in vitro で確認されている[26]。本研究では、DUV-LED の *F. nucleatum* に対する殺菌効果について検討した。

3. 対象・方法

(1) 使用菌株・培養条件

F. nucleatum (ATCC 25586) と *Escherichia coli* (NBRC3972) は NITE Biological Resource Center (NBRC) から購入した。*F. nucleatum* の凍結菌体を岐阜県嫌気性培地 (GAM) 寒天培地で 37°C、72 時間培養し、大腸菌をハートインフュージョン培地 (栄研化学株式会社、東京) で 37°C、16 時間培養し、リン酸緩衝塩 (PBS) により細胞懸濁液を調製した。

(2) DUV-LED の照射条件

ピーク波長が 265 nm と 280 nm の 2 種類の DUV-LED (VPS131 (265 nm LED)、VPS161 (280 nm LED)、日機装株式会社、東京、日本) を使用した (図 1)。DUV-LED の総放射束は、波長 265 nm で 9.4 mW、280 nm で 17.0 mW であった。LED の半値角度は 130 度であるため、LED とプレートとの距離を 35 mm に設定し、DUV-LED を均一に照射することができた (図 2)。なお、同社が設定した 265 nm の LED の定格電流は 350 mA である。定電流モードの直流安定化電源 (PW36-1.5AD, TEXIO TECHNOLOGY CORPORATION, Yokohama, Japan) を使用した。電流は 350 mA または 50 mA に設定し、LED 光を照射した。照射量は MCPD-9800 アレイ分光器 (大塚電子、大阪、日本) を用いて測定した。

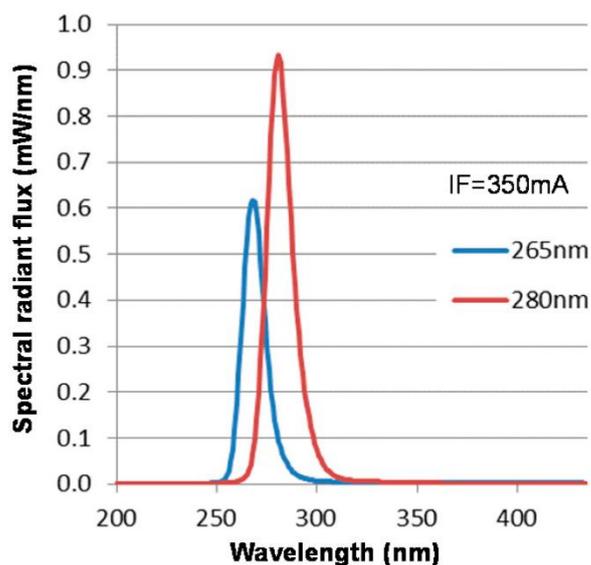


図 1 DUV-LED 光の波長分布

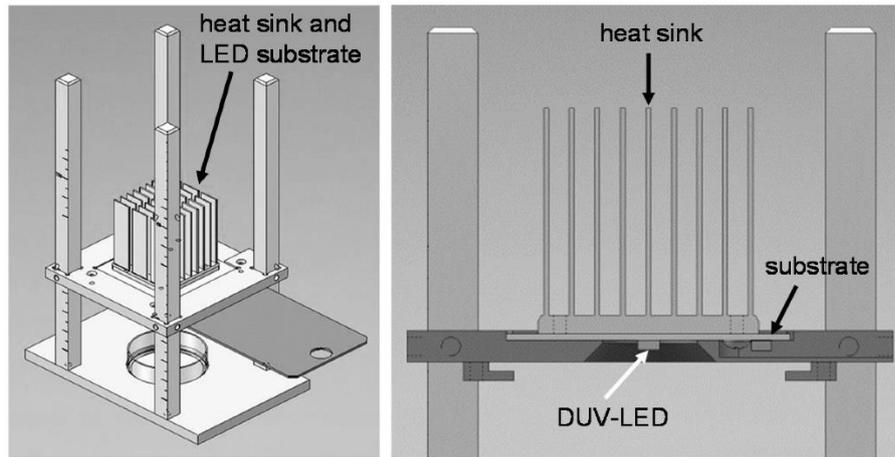


図2 DUV-LED 光の照射装置

(3) DUV-LED 光による殺菌作用の定性試験

F. nucleatum の懸濁液を PBS を用いて McFarland 標準濁度 1 に調整し、GAM 寒天培地プレート（直径 35 mm）に綿棒でまいた。照射時間を 0、10、20、30、60、180 秒として時系列試験を行い、6 日間嫌気培養した後、*F. nucleatum* のコロニーを観察した。非照射対照として、DUV-LED 照射と同じ時間、*F. nucleatum* を大気中に放置した。

(4) DUV-LED 光による殺菌作用の定量試験

殺菌効果はコロニー形成アッセイを使用して測定した。*F. nucleatum* の細胞懸濁液を 1.0×10^6 colony forming units (CFU) /mL に調整した。細胞懸濁液 1 mL を 35 mm ディッシュに分注し、DUV-LED 光を照射した。次に、細胞懸濁液の 10 倍連続希釈液 $10 \mu\text{L}$ を GAM 寒天培地に 4 回に分けてプレーティングし、 37°C 、6 日間培養した。その後、コロニー数をカウントし、生存率を非照射対照に対するパーセンテージで表した。実験は 3 回行い、*F. nucleatum* の生存率の平均を評価した [27, 28]。

(5) ヒト上皮細胞に対する DUV-LED 光の毒性

ヒト不死化角化細胞株である HaCaT 細胞は、L-グルタミンを含むダルベッコ変法イーグル培地-高グルコース (4.5 g/L) および 10% 牛胎児血清添加ピルビン酸ナトリウム (Capricorn) で培養した。HaCaT 細胞 (4.0×10^5 /dish) を 35 mm ディッシュに播種し、 37°C 、5%CO₂ で 24 時間培養した後、PBS で 2 回洗浄し、その後直ちに DUV-LED 光を照射した。その後、新鮮な培地 2 mL を加え、24 時間培養した後、細胞を採取し、トリパンブルー染色により細胞生存率を評価した。生存細胞数をカウントし、非照射対照に対する生存率を百分率で表した。実験は 3 回行い、生存している HaCaT 細胞の平均的なパーセンテージを評価した。

(6) ELISA による DNA 傷害の測定

F. nucleatum の DNA 損傷は、OxiSelect™ UV-Induced DNA Damage ELISA Kit (CELL BIOLABS Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、シクロブタンピリミジン二量体 (CPD) とピリミジン (6-4) ピリミドン光産物 (6-4PP) の生成に基づいて評価した。菌懸濁液は、McFarland 標準濁度 2 で調整した。QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) を用いて、1.8 mL の菌液から DNA を抽出した。ELISA 法は、製造元のプロトコールに従って実施した。ポジティブコントロールとして UV ランプからの DUV を照射した大腸菌の DNA 試料を、ネガティブコントロールとして DUV を照射せずに培養した *F. nucleatum* の DNA 試料を使用した。紫外線ランプ (GL-15, 東芝, 日本) は、安全キャビネット (パナソニックヘルスケア, 東京, 日本) 内に設置した。

(7) 統計分析

265 nm DUV-LED と 280 nm DUV-LED の生存率の差は、StatFlex Ver. 6.0 (Artech Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて t 検定で解析した。

4. 結果

(1) DUV-LED 光による殺菌作用の定性試験

ピーク波長 265 nm と 280 nm の DUV-LED は、寒天培地表面で培養した *F. nucleatum* に対して、時間依存的に同様の殺菌効果を示した。265 nm または 280 nm の DUV-LED を 180 秒間照射しても、コロニーの増加は観察されなかった (図 3)。この実験では、滅菌したディッシュを培養に戻しても、菌の増殖は観察されなかった。また、DUV-LED に 350 mA の電流を供給しても、周囲温度の上昇が観察されないことを確認した。

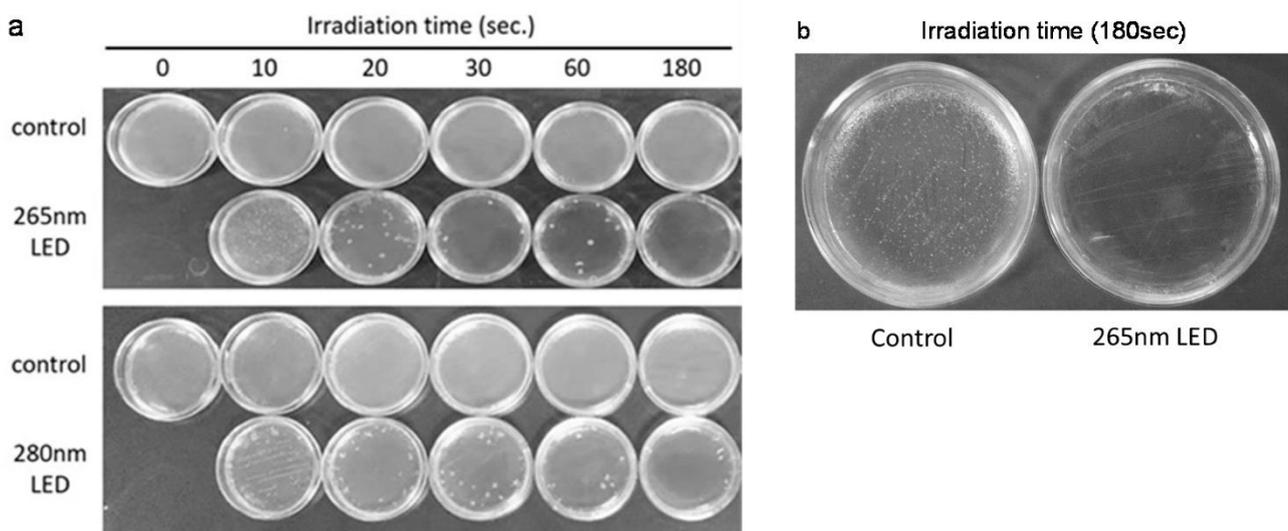


図3 深紫外LED光265 nmと280 nmによる殺菌作用の定性試験の結果

(2) DUV-LED光による殺菌作用の定量試験

DUV-LEDに350 mAの電流を流すと、265 nmのDUV-LED光照射下での*F. nucleatum*の生存率は10秒間で0.0014%、20秒間で0%（検出限界以下）にまで低下した。同様に、280 nmのDUV-LED光照射下での*F. nucleatum*の生存率は、10秒照射で0.00044%、20秒照射で0%（検出限界以下）にまで低下した（図4）。DUV-LEDに50 mAを供給した場合、265 nmのDUV-LED光照射下での*F. nucleatum*の生存率は、10秒照射で45.34%、20秒照射で16.13%であった。一方、280 nmのDUV-LEDを照射した*F. nucleatum*の生存率は、10秒照射で54.72%、20秒照射で21.34%であった（図4）。*F. nucleatum*の生存率は、265 nm DUV-LEDと280 nm DUV-LED照射の間で大きな差はなかった。生存菌の有無を確認するため、これらの残留懸濁液の0.5 mLを液体培地で培養したが、*F. nucleatum*の増殖は認められなかった。DUV-LEDに350 mAの電流を供給した場合、DUV-LEDから35 mmの距離での放射照度は、265 nmのLEDで0.265 mW/cm²、280 nmのLEDで0.415 mW/cm²であった。生存率が0%となった265 nmおよび280 nmのDUV-LED光の照射時間は20秒であり、致死量の放射エネルギーは265 nmのLEDで5.3 mJ/cm²、280 nmのLEDで8.3 mJ/cm²であった。

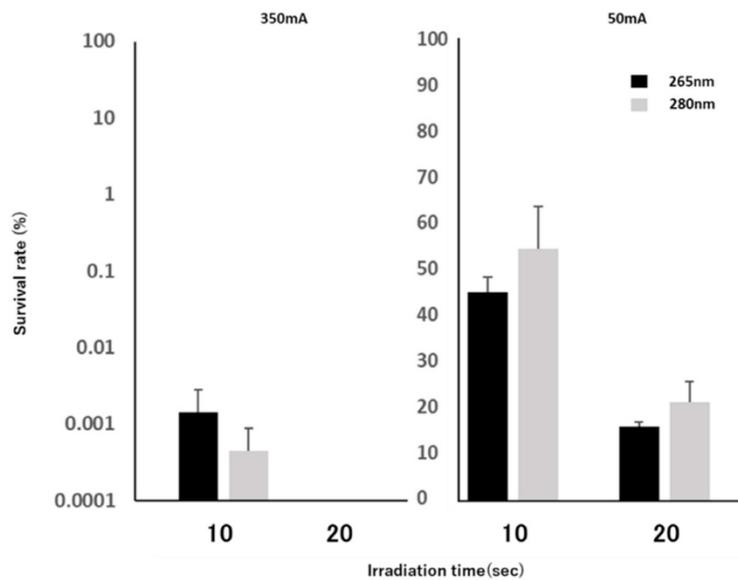


図4 DUV-LED光による*F. nucleatum*の生存率

(3) DUV-LED光によるHaCaT細胞へのダメージの評価

DUV-LEDに350 mAの電流を供給したところ、265 nmのDUV-LED光照射下でのHaCaT細胞の生存率は、10秒照射で4.38%、20秒照射で2.08%であった。同様に、280 nmのDUV-LED光照射下でのHaCaT細胞の生存率は、10秒照射で3.31%、20秒照射で2.26%に低下した（図5）。DUV-LEDに50 mAを供給した場合、265 nmのDUV-LED光照射下でのHaCaT細胞の生存率は、10秒照射で90.14%、20秒照射で48.29%となったが、280 nmのDUV-LED光照射下でのHaCaT細胞は10秒で90.06%、20秒で47.76%だった（図5）。HaCaT細胞の生細胞率は、265 nmと280 nmの

DUV-LED光照射の間で有意な差はなかった。

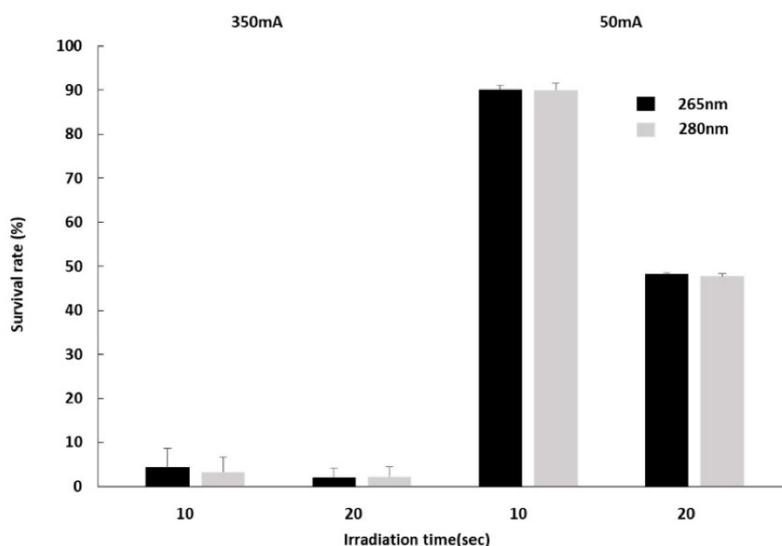


図5. DUV-LED光によるHaCaT細胞の生細胞率

(4) ピリミジン二量体形成によるDUV-LED光誘導DNA障害の検出

DUV-LED光を照射した *F. nucleatum* のDNA試料からCPDと6-4PPをELISA法で検出した。265 nmのDUV-LEDを照射した *F. nucleatum* のCPDと6-4PPの量はそれぞれ6.548 ng/ μ gと1.333 ng/ μ gであり、280 nmのDUV-LEDを照射した *F. nucleatum* のそれは7.963 ng/ μ gと1.593 ng/ μ gであった。対照として、紫外線ランプを照射した大腸菌を用意した。大腸菌中のCPDと6-4PPのそれぞれの量は、2.622 ng/ μ gと0.276 ng/ μ gであった(図6)。

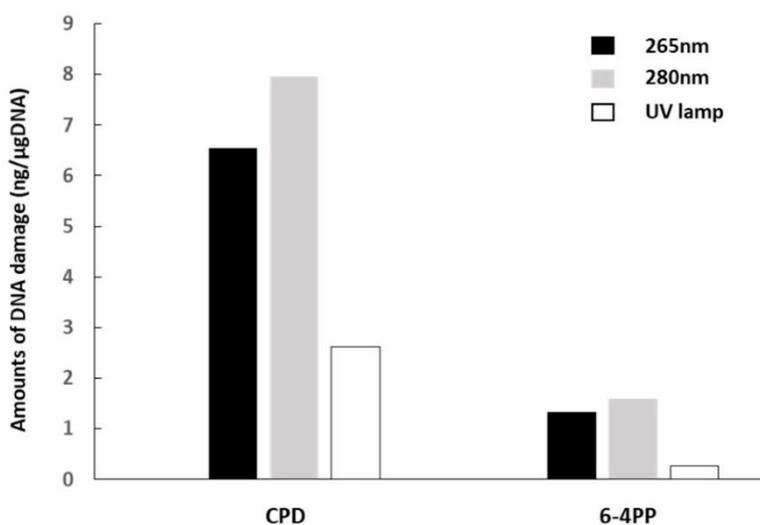


図6 ELISA法によるCPD、6-4PPの検出結果

5. 考察

DUV-LED からの光照射は、*F. nucleatum* に対して時間依存的に殺菌効果を発揮した。我々は以前、グラム陰性菌である緑膿菌や大腸菌が DUV-LED の光に高い感度を持つことを報告した [28]。*F. nucleatum* は嫌気性グラム陰性菌であり、細胞壁がグラム陽性菌より薄いため、他のグラム陰性菌と同様に DUV-LED に感受性がある [29]。試験管内でバイオフィルムを形成する実験を行わなかったことは、本研究の限界である。

波長 260 nm 付近の DUV 光は DNA に吸収される [30]。細胞に紫外線が照射されると、ピリミジン塩基が隣接するチミンまたはシトシン塩基と共有結合を形成し、ピリミジン二量体が生成される。これらの二量体は、DNA の複製と転写を妨害し、細胞死、突然変異、染色体不安定性を引き起こすことがある [31]。DUV-LED を照射した *F. nucleatum* から抽出した DNA にはピリミジン二量体が含まれていることから、DUV-LED が発揮する殺菌効果のメカニズムは、DNA 損傷によるものと考えられている。280 nm 付近の光はタンパク質に吸収されるが、細胞膜のタンパク質にどのような影響を与えるかが今後の検討課題の一つである。

fusobacteria は CRC 組織内で発見されているが [10, 15, 16, 17, 18]、それらが CRC に特異的に局在化するメカニズムについてはあまり研究されていない。Abed らは、*fusobacteria* の Fap2 と宿主の Gal-GalNAc が *fusobacteria* の CRC への局在と濃縮に関与していることを示唆した。彼らは、静脈内注射した *F. nucleatum* が Fap2 依存的にマウス腫瘍組織に局在することを示し、菌が血行性ルートを使って CRC 組織に到達することを示唆した [32]。小宮らは、CRC 患者の 75% (6/8) が CRC と唾液検体で *F. nucleatum* の同一株を認めたと報告している [33]。また、歯周病では一過性の菌血症がよく見られ、ヒトでは歯磨き後 15 分で血中の菌量が 10^4 個/mL に達する [34]。これらのことから、CRC における *F. nucleatum* は口腔内に由来することが示唆される。DUV-LED 光で口腔内の *F. nucleatum* を殺菌することで、腸内の *F. nucleatum* を減少させ、CRC の予防につながる可能性があると考えている。また、*F. nucleatum* のコピー数が多いステージ IV の CRC 患者は、コピー数が少ない患者に比べて全生存期間が有意に短いことを以前に示されており [18]、DUV-LED 療法は進行した CRC 患者の生存率を改善する可能性があることが示された。

DUV による DNA 損傷は微生物だけでなくヒトの細胞でも誘発され、DUV 光への慢性的な暴露はヒトの健康被害として確立されている [35]。マウスモデルでは、254 nm の DUV を 4500 mJ/cm^2 で慢性的に照射したところ、表皮に著しい過形成と細胞間浮腫が誘発された [36]。本研究では、*F. nucleatum* の致死に必要な放射エネルギーは、265 nm の LED で 5.3 mJ/cm^2 、280 nm の LED で 8.3 mJ/cm^2 と非常に少なかった。LED に供給する電流を減らすことで、HaCaT 細胞の生存率は上昇した。動物モデルで *F. nucleatum* を選択的に不活性化できる DUV の適切な投与量をまず決定する必要がある。DUV-LED 光治療は、ワクチンのように特定の病原体を標的とした治療法ではないため、口腔内の細菌叢を乱す可能性がある。すべての口腔内細菌に影響を与える治療は、唾液中の一酸化窒素濃度を変化させ、血圧の調節に悪影響を及ぼす可能性がある [37]。一方、一般的な口腔ケアの場合、細菌数は 60~70% 減少するが、これは誤嚥性肺炎の予防に有効である [38]。したがって、1 種類の菌だけを抑制するのではなく、

複数の種類の菌を全体的に減らすことが臨床的に有用と考えられる。これも動物実験による検証が必要だと考えている。

LEDは小型で耐久性があり、発熱が少ないという特徴があるため、DUV-LEDは口腔内のような狭い空間にも適用可能である。DUV-LEDの光を口腔内の局所的な感染症に照射するための有効な装置として、マウスピース型の光線治療器を検討する必要がある。もしくは歯周ポケットにDUVを照射するためには、細いファイバーを使用する必要があるかもしれない。

6. 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご指導いただきました西川潤先生をはじめ、共同執筆者となっていたいただいた福田総一郎様、基礎検査学講座のスタッフの方、歯科口腔外科学講座の三島克章先生、原田耕志先生、臨床検査・腫瘍学講座の山崎隆弘先生、末広寛先生に厚く御礼申し上げます。

7. 利益相反

開示すべき利益相反はない。

8. 参考文献

1. Steevens, J.; Schouten, L.J.; Goldbohm, R.A.; van den Brandt, P.A. Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: A prospective cohort study. *Gut* **2010**, *59*, 39-48.
2. Aune, D.; Greenwood, D.C.; Chan, D.S.; Vieira, R.; Vieira, A.R.; Navarro Rosenblatt, D.A.; Cade, J.E.; Burley, V.J.; Norat, T. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: A systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann. Oncol.* **2012**, *23*, 843-852.
3. Magalhães, B.; Peleteiro, B.; Lunet, N. Dietary patterns and colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer Prev.* **2012**, *21*, 15-23.
4. Selgrad, M.; Malfertheiner, P.; Fini, L.; Goel, A.; Boland, C.R.; Ricciardiello, L. The role of viral and bacterial pathogens in gastrointestinal cancer. *J. Cell Physiol.* **2008**, *216*, 378-388.
5. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Infection with *Helicobacter pylori*. *IARC Monger Eval. Carcinog Risks Hum.* **1994**, *61*, 177-240.
6. Uemura, N.; Mukai, T.; Okamoto, S.; Yamaguchi, S.; Mashiba, H.; Taniyama, K.; Sasaki, N.; Haruma, K.; Sumii, K.; Kajiyama, G. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent

- development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **1997**, *6*, 639-642.
7. Fukase, K.; Kato, M.; Kikuchi, S.; Inoue, K.; Uemura, N.; Okamoto, S.; Terao, S.; Amagai, K.; Hayashi, S.; Asaka, M. Japan Gast Study Group. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: An open-label, randomised controlled trial. *Lancet* **2008**, *372*, 392-397.
 8. Chattopadhyay, I.; Dhar, R.; Pethusamy, K.; Seethy, A.; Srivastava, T.; Sah, R.; Sharma, J.; Karmakar, S. Exploring the Role of Gut Microbiome in Colon Cancer. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *25*.
 9. Cheng, Y.; Ling, Z.; Li, L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 615056.
 10. Liu, Y.; Baba, Y.; Ishimoto, T.; Iwatsuki, M.; Hiyoshi, Y.; Miyamoto, Y.; Yoshida, N.; Wu, R.; Baba, H. Progress in characterizing the linkage between *Fusobacterium nucleatum* and gastrointestinal cancer. *J. Gastroenterol.* **2019**, *54*, 33-41.
 11. Signat, B.; Roques, C.; Poulet, P.; Duffaut, D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2011**, *13*, 25-36.
 12. Yang, N.Y.; Zhang, Q.; Li, J.L.; Yang, S.H.; Shi, Q. Progression of periodontal inflammation in adolescents is associated with increased number of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, and *Fusobacterium nucleatum*. *Int. J. Paediatr. Dent.* **2014**, *24*, 226-233.
 13. Kistler, J.O.; Booth, V.; Bradshaw, D.J.; Wade, W.G. Bacterial community development in experimental gingivitis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71227.
 14. Fujii, R.; Saito, Y.; Tokura, Y.; Nakagawa, K.I.; Okuda, K.; Ishihara, K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* **2009**, *24*, 502-505.
 15. Kostic, A.D.; Gevers, D.; Pedamallu, C.S.; Michaud, M.; Duke, F.; Earl, A.M.; Ojesina, A.I.; Jung, J.; Bass, A.J.; Taberner, J.; et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* **2012**, *22*, 292-298.
 16. Castellarin, M.; Warren, R.L.; Freeman, J.D.; Dreolini, L.; Krzywinski, M.; Strauss, J.; Barnes, R.; Watson, P.; Allen-Vercoe, E.; Moore, R.A.; et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* **2012**, *22*, 299-306.
 17. Mima, K.; Nishihara, R.; Qian, Z.R.; Cao, Y.; Sukawa, Y.; Nowak, J.A.; Yang, J.; Dou, R.; Masugi, Y.; Song, M.; et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* **2016**, *65*, 1973-1980.
 18. Yamaoka, Y.; Suehiro, Y.; Hashimoto, S.; Hoshida, T.; Fujimoto, M.; Watanabe, M.; Imanaga, D.; Sakai, K.; Matsumoto, T.; Nishioka, M.; et al. *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. *J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 517-524.

19. Rubinstein, M.R.; Wang, X.; Liu, W.; Hao, Y.; Cai, G.; Han, Y.W. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 195-206.
20. Yang, Y.; Weng, W.; Peng, J.; Hong, L.; Yang, L.; Toiyama, Y.; Gao, R.; Liu, M.; Yin, M.; Pan, C.; et al. *Fusobacterium nucleatum* increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by activating Toll-like receptor 4 signaling to nuclear factor- κ B, and up-regulating expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology* **2017**, *152*, 851-866.
21. Yu, T.; Guo, F.; Yu, Y.; Sun, T.; Ma, D.; Han, J.; Qian, Y.; Kryczek, I.; Sun, D.; Nagarsheth, N.; et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. *Cell* **2017**, *170*, 548-563.
22. Gur, C.; Ibrahim, Y.; Isaacson, B.; Yamin, R.; Abed, J.; Gamliel, M.; Enk, J.; Bar-On, Y.; Stanietsky-Kaynan, N.; Copenhagen-Glazer, S.; et al. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack immunity. *Immunity* **2015**, *42*, 344-355.
23. Kanwar, I.; Sah, A.K.; Suresh, P.K. Biofilm-mediated antibiotic-resistant oral bacterial infections: Mechanism and combat strategies. *Curr. Pharm Des.* **2017**, *23*, 2084-2095.
24. Wu, C.Y.; Wu, T.F.; Tsai, J.R.; Chen, Y.M.; Chen, C.C. Multistring LED backlight driving system for LCD panels with color sequential display and area control. *IEEE Trans. Ind. Electron.* **2010**, *55*, 3791-3800.
25. Hirayama, H.; Noguchi, N.; Yatabe, T.; Kamata, N. 227 nm AlGaIn light-emitting diode with 0.15 mW output power realized using a thin quantum well and AlN buffer with reduced threading dislocation density. *Appl. Phys. Express* **2008**, *1*, 051101-3.
26. Takagi, T.; Nishikawa, J.; Yanagihara, M.; Fukuda, S.; Kubota, N.; Kobayashi, Y.; Otsuyama, K.I.; Nojima, J.; Tsuneoka, H.; Sakai, K.; et al. Microbicidal effect of deep ultraviolet light-emitting diode irradiation. *Lasers Med. Sci.* **2020**, *9*.
27. Thomas, P.; Sekhar, A.C.; Mujawar, M.M. Nonrecovery of varying proportions of viable bacteria during spread plating governed by the extent of spreader usage and proposal for an alternate spotting-spreading approach to maximize the CFU. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 339-350.
28. Okamoto, T.; Nishikawa, J.; Yanai, H.; Nakamura, H.; Takeuchi, H.; Kurai, S.; Akada, J.K.; Sakaida, I. In vitro bactericidal effects of near-ultraviolet light from light-emitting diodes on *Helicobacter pylori*. *Scan. J. Gastroenterol.* **2013**, *48*, 1484-1486.
29. Kim, D.K.; Kim, S.J.; Kang, D.H. Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. *Food Res. Int.* **2017**, *97*, 280-287.
30. Tataurov, A.V.; You, Y.; Owczarzy, R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophys. Chem.* **2008**, *133*, 66-70.
31. Sinha, R.P.; Häder, D.P. UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 225-236.

32. Abed, J.; Enggård, J.E.; Zamir, G.; Faroja, M.; Almogy, G.; Grenov, A.; Sol, A.; Naor, R.; Pikarsky, E.; Atlan, K.A.; et al. Fap2 mediates *Fusobacterium nucleatum* colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 215-225.
33. Komiya, Y.; Shimomura, Y.; Higurashi, T.; Sugi, Y.; Arimoto, J.; Umezawa, S.; Uchiyama, S.; Matsumoto, M.; Nakajima, A. Patients with colorectal cancer have identical strains of *Fusobacterium nucleatum* in their colorectal cancer and oral cavity. *Gut* **2019**, *68*, 1335-1337.
34. Ashare, A.; Stanford, C.; Hancock, P.; Stark, D.; Lilli, K.; Birrer, E.; Nymon, A.; Doerschug, K.C.; Hunninghake, G.W. Chronic liver disease impairs bacterial clearance in a human model of induced bacteremia. *Clin. Transl. Sci.* **2009**, *2*, 199-205.
35. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH®). *2017 TLVs and BEIs Book*; American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH®): Cincinnati, OH, USA, 2017; ISBN 978-1-607260-90-5.
36. Narita, K.; Asano, K.; Morimoto, Y.; Igarashi, T.; Nakane, A. Chronic irradiation with 222-nm UVC light induces neither DNA damage nor epidermal lesions in mouse skin, even at high doses. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0201259.
37. Barbadoro, P.; Ponzio, E.; Coccia, E.; Prospero, E.; Santarelli, A.; Rappelli, G.G.L.; D'Errico, M.M. Association between hypertension, oral microbiome and salivary nitric oxide: A case-control study. *Nitric Oxide* **2021**, *106*, 66-71.
38. Yoneyama, T.; Yoshida, M.; Matsui, T.; Sasaki, H. Oral care and pneumonia. Oral Care Working Group. *Lancet* **1999**, *354*, 515.