

短 報

## 紫外発光ダイオードを利用した MRSA のバイオフィーム形成抑制

山田陽一<sup>1)\*</sup>, 島田莉奈<sup>1)</sup>, 山本宗市<sup>1)</sup>, 毎熊隆誉<sup>1)</sup>,  
布隼人<sup>2)</sup>, 田中利夫<sup>2)</sup>, 工藤季之<sup>1)</sup>, 塩田澄子<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>就実大学薬学部, <sup>2)</sup>ダイキン工業株式会社

### Reduction of MRSA biofilm formation with ultraviolet light emitting diode

Yoichi Yamada<sup>1)\*</sup>, Rina Shimada<sup>1)</sup>, Soichi Yamamoto<sup>1)</sup>, Takayoshi Maiguma<sup>1)</sup>,  
Hayato Nuno<sup>2)</sup>, Toshio Tanaka<sup>2)</sup>, Toshiyuki Kudo<sup>1)</sup>, Sumiko Shiota<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Molecular Biology, School of Pharmacy, Shujitsu University,

<sup>2)</sup> DAIKIN INDUSTRIES, LTD.

(Received 5 November 2021; accepted 28 December 2021)

---

#### Abstract

Bacteria escape from the host's immune system by forming a biofilm (BF), and disinfectants become less effective. It is therefore considered that the use of ultraviolet (UV) light is effective as a bactericidal method that does not use disinfectant agents. In this study, we investigated the inhibitory effect of a UV-light emitting diode (LED) on Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) BF formation using, which causes nosocomial infection and opportunistic infection. UV-LED irradiation of MRSA was performed at 20, 200, and 1000 mJ / cm<sup>2</sup>. Our results showed that UV-LED irradiation of the MRSA BF formed within 3 hours suppressed the subsequent BF formation, but UV-LED irradiation of the MRSA BF formed over 24 hours did not significantly suppress the subsequent BF formation. We concluded that UV could suppress the subsequent formation of MRSA BF by killing the bacteria inside.

Keywords: MRSA, biofilm, UV, LED

---

#### 緒言

病原因子の一つであるバイオフィーム(BF)は、細菌が産生する粘性物質である。BF は主に多糖

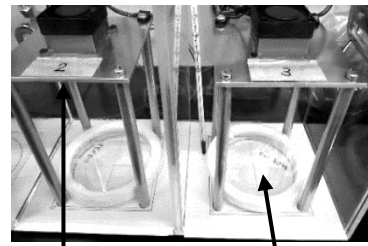
類, タンパク質, 細胞外 DNA から構成され, 細菌の物体表面への付着に関与している<sup>1)</sup>。また, BF は消毒薬, 抗菌薬, さらに免疫系細胞の攻

撃から菌体を保護する役割も担っている。そのため、BF の抑制や除去は感染症対策や環境改善に有効であり、BF 阻害剤の開発など様々な方法が考案されている<sup>2)</sup>。しかし、BF は粘性が高く、いったん形成されるとその除去は困難である。

黄色ブドウ球菌は様々な病原因子を産生し、菌血症、肺炎、心内膜炎などヒトに様々な感染症を引き起こす。さらに、黄色ブドウ球菌の中でも、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は様々な抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌であり、その感染症の治療は困難である。

感染症対策として、医療現場や公共施設などでは消毒や除菌が行われている。ヒトに直接、触れない場所での消毒法として、簡便に行えるUV は広く利用されている。特に、UV の中でも、UVC に分類される265 nmより短い波長のUV は殺菌効果とヒトへの影響がともに強い。緑膿菌などの環境常在菌の水中浮遊菌に対する殺菌効果の研究や、その殺菌に伴うBF 形成の阻害、さらには長時間形成させたBF 中の細菌への殺菌効果などが研究されてきた<sup>3)</sup>。黄色ブドウ球菌では、10 mJ/cm<sup>2</sup> のUV ランプでの照射でおよそ99.9%を殺菌できるとされている<sup>4)</sup>。

Light emitting diode (LED)は通常のランプなどの光源とは異なり、特定の波長の光のみを放出できる。さらに、発熱量が少なく、電力の利用効率が高く、寿命もランプより長い。そのため、近年は様々な光源がLED に置き換わっている。LED が開発された当初は、波長の短い光を得ることは難しかった。しかし、技術革新の結果、UVC を発するUV-LED も開発され、UV-LED を活用した感



UV-LED(下向き) 石英ガラス

図1. UV-LED の照射装置

染症対策への応用が望まれている。新型コロナウイルスに効果を発揮するUVC の光源として222 nm のLED も開発、商品化されているが<sup>5)</sup>、UV-LED の感染予防効果の情報はUV ランプに比べるとまだまだ不足している。さらに、スペクトルの狭いUV-LED がBF へ与える影響と、そこに含まれるMRSA の菌体に与える影響は研究されていない。

そこで、我々は中心波長265 nm のUV-LED がMRSA の初期または成熟期の状態の異なるBF 形成に与える影響を測定した。その結果、初期BF に含まれるMRSA の殺菌にUV-LED が効果的であることを明らかにした。

方法

UV-LED 照射装置(ダイキン工業株式会社, 図1); 定格消費電力50 mW. 中心波長265 nm. 照射距離13 cm. シャーレの平均照度0.087 mW/cm<sup>2</sup>.

BF 形成量の測定; BF が表面に形成されたカバーガラスを対象とし、初期BF や成熟BF、静置したもの、およびUV 照射後にBF 追加形成を行ったものを精製水で洗浄し、1%クリスタルバイオレット(CV)水溶液で染色した。カバーガラスを精製水で再び洗浄し、乾燥させた。30%酢酸でCV

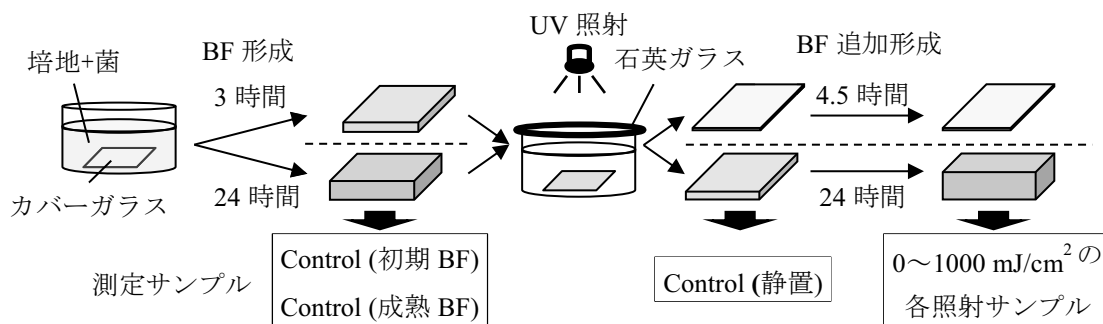


図2. 実験手順

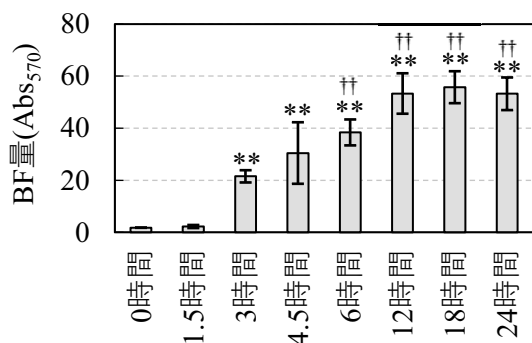


図3. MRSAのBF形成 各群mean ± SD (n = 5)で示した. \*\*P<0.001 vs 0時間, ††P<0.001 vs 3時間

を溶出し、570 nm の吸光度を測定した。実験データを元に SD を算出し、図中に示した。

**BF 形成** ; MRSA N315 株を Brain Heart Infusion (BHI)培地(Becton Dickinson and Company)を用いて、37°Cで1晩、培養した。菌を加えた1%グルコース含有 BHI 培地を、シャーレに 20 mL ずつ分注し、滅菌したカバーガラスを沈め、37°Cで静置培養した。3時間後及び24時間後にカバーガラスを取り出し、滅菌 MilliQ で洗浄した後、それぞれの初期 BF 量および成熟 BF 量を測定した。

**UV 照射** ; 500 倍希釈した nutrient broth (NB 培地)(栄研化学(株))をシャーレに 20 mL ずつ分注し、BF が形成されたカバーガラスを入れ、石英製の蓋をした。20 mJ/cm<sup>2</sup> (照射時間 3.8 分)、200 mJ/cm<sup>2</sup> (照射時間 36.2 分)、1000 mJ/cm<sup>2</sup> (照射時間 172.6 分)の UV-LED の照射を行った。照射時間に応じて装置の電源を切り、1000 mJ/cm<sup>2</sup> (照射時間 172.6 分)の照射時間が終了時にすべてのサンプルを回収した。172.6 分間の UV 照射中静置しておいた場合の BF 量を測定し、コントロールとした。

**BF 追加形成** ; 1%グルコース含有 BHI 培地を、シャーレに 20 mL ずつ分注し、カバーガラスを滅菌 MilliQ で洗浄して沈めた。37°Cで 4.5~24 時間、静置培養した。

**統計処理** ; すべての結果は mean ± SD で示した。多群間の比較には一元配置分散分析(ANOVA)で解析後、Tukey's test による多重比較を行った。統

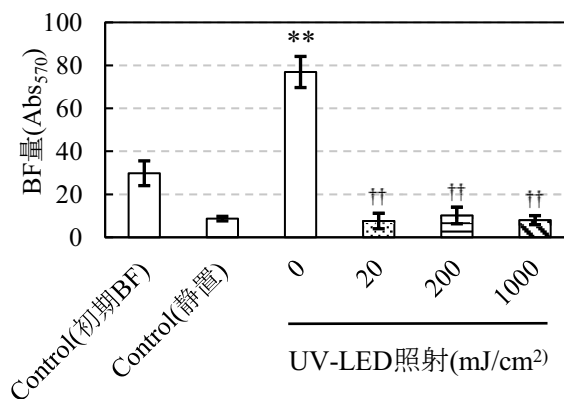


図4. 初期BFへのUV-LED照射によるBF増加抑制効果 各群mean ± SD (n = 4 - 5)で示した. \*\*P<0.001 vs Control(静置), ††P<0.001 vs UV-LED照射 0 mJ/cm<sup>2</sup>

計解析には JMP<sup>®</sup> software ver. 16.1(SAS institute inc.)を用いた。なお有意水準が 5%未満の場合を統計学的に有意な差があるとした。

### 結果・考察

MRSA N315 株の BF 形成量を測定した(図 3)。3, 24 時間の BF 形成量は 0 時間に比べ、有意に増加した(P<0.001)。また、24 時間の BF 形成量は 3 時間に比べ、有意に増加した(P<0.001)。そこで、通常、BF 形成実験で使用される 24 時間で形成された BF(成熟 BF)と、BF 形成が始まった 3 時間での BF(初期 BF)に対して UV-LED の照射効果を測定した。

次に、BF 追加形成量が BF 中の初期菌量によって影響を受けるかを調べた。MRSA N315 株の BF を形成させ、UV 照射と同様に静置した後に、BF 追加形成を行った。その結果、BF 形成量は 24

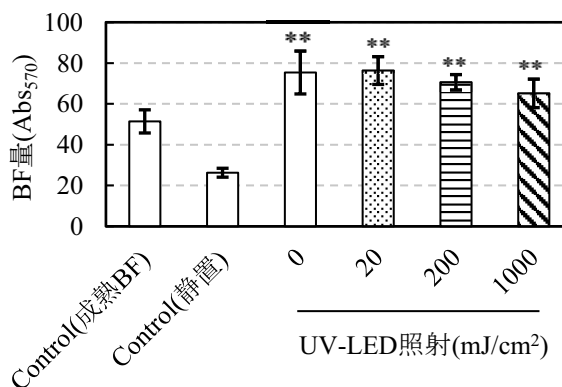


図5. 成熟BFへのUV-LED照射によるBF増加抑制効果 各群mean ± SD (n = 5)で示した. \*\*P<0.001 vs Control(静置)

時間にかけて徐々に増加した(data not shown). そのため, 24 時間までの培養においては追加形成される BF 量は元々の BF 中に含まれている初期菌量に依存すると考えられた.

初期 BF に対して UV-LED を照射した(図 4). 3 時間で形成させた MRSA N315 の初期 BF 量(Control(初期 BF))に比べ, BF 量(Control(静置))は約 3.5 分の 1 となり, 静置している間に自然に剥がれたと考えられた. 続けて, UV-LED の照射を行い, BF 追加形成を 4.5 時間行った.UV-LED 照射 0 mJ/cm<sup>2</sup> の BF 形成量は Control(静置)に比べ有意に増加した(P<0.001)が, UV-LED 照射 20~1000 mJ/cm<sup>2</sup> の BF 形成量は増加しなかった. 一方で, UV-LED 照射 20~1000 mJ/cm<sup>2</sup> の BF 形成量は UV-LED 照射 0 mJ/cm<sup>2</sup> に比べ有意に減少していた(P<0.001). そのため, UV-LED 照射 20 mJ/cm<sup>2</sup> 以上では BF 中の MRSA N315 がほぼ死滅しており, BF 追加形成において BF 量は増加しなかったと考えられた.

次に, 成熟 BF に対して UV-LED を照射した(図 5). MRSA N315 の成熟 BF 量(Control(成熟 BF))に比べ, BF 量(Control(静置))は約 1/2 となり, 初期 BF の場合と同様に自然に剥がれたと考えられた. しかしながら, その減少割合は初期 BF の時より少なかったことから, 成熟 BF はより強固であると推測された. 続けて, UV-LED 照射を行い, BF 追加形成を 24 時間行った.UV-LED 照射 0 ~1000 mJ/cm<sup>2</sup> の全ての BF 形成量は Control(静置)に比べ有意に増加した(P<0.001). 一方で, UV-LED 照射 20~1000 mJ/cm<sup>2</sup> の BF 形成量は UV-LED 照射 0 mJ/cm<sup>2</sup> に比べ減少していなかった. そのため, 成熟 BF への 1000 mJ/cm<sup>2</sup> 以下の UV-LED 照射では BF 中の MRSA N315 はほとんど殺菌されていないと考えられた.

以上の結果より, 黄色ブドウ球菌が BF を形成し始める初期においては, 使用した UV-LED 照射 20 mJ/cm<sup>2</sup>(照射時間 3.8 分)以上で BF 内の菌をほとんど死滅できると考えられ, 本 UV-LED が感染症対策に役立つ可能性が示された. 一方で,

黄色ブドウ球菌が BF を成熟させた後では, UV-LED 照射 1000 mJ/cm<sup>2</sup>(照射時間 172.6 分)でも BF 内の細菌を死滅させることはできなかった. この原因として, ①BF が厚くなったことによって UV の透過性が低下した, ②BF に含まれる DNA などの核酸類に UV が吸収され, UV が内部の MRSA まで届かなかった, ③成熟した BF 内では MRSA が休眠様の活動状態に移行し, 環境要因に対して耐性を示すなどの可能性が考えられた<sup>6)</sup>. 265 nm を中心波長とする UV-LED は MRSA の菌体への殺菌効果, 初期 BF 中の MRSA の殺菌効果を有し, MRSA 感染症対策に応用できる可能性が示された.

#### 利益相反

本研究は, ダイキン工業株式会社の奨励寄付金で実施した.

#### 引用文献

- 1) Katrin S., Alexander R. H.: Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies, *Microbiol Mol Biol Rev.* 84 (3), MMBR.00026-19, (2020).
- 2) Ito Y. *et al.*: Antimicrobial and antibiofilm effects of abietic acid on cariogenic *Streptococcus mutans*, *Odontology.*, 108(1), pp.57-65, (2020).
- 3) Xueru L. *et al.*: Advances in application of ultraviolet irradiation for biofilm control in water and wastewater infrastructure, *J. Hazard. Mater.*,421(5), Epub, (2022).
- 4) 河端俊治, 原田常雄, 殺菌灯による水の消毒, *照明学会誌*, 36(3), pp.89-96, 1952
- 5) ウシオ電機株式会社, 222 nm 紫外線殺菌・ウイルス不活化モジュール「Care222」, 米国大手照明器具メーカーへの供給を開始, プレスリリース, (2020)
- 6) Elaine M. W. *et al.*: Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells?, *PLoS Pathog.*, 12(12), e1006012, (2016)