

## 学位論文要旨

### Contribution of oxidative DNA damages to bactericidal effects caused by pulsed discharge with water-cavitation

(水中パルス放電の殺菌効果における DNA 酸化損傷の寄与)

氏名 工藤 健一

プラズマは、電子、イオン、中性粒子からなる部分的にまたは完全にイオン化されたガスであり、近年、環境問題の解決や、医療現場において応用範囲が拡大している。具体的には、その物理的な衝撃波や高電界自身、さらには活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) や紫外線 (Ultraviolet: UV) などの傷害因子を生じることにより、微生物の殺菌や有害化合物の分解を行い、産業廃水を浄化したり、医療分野では癌治療および廃棄機器の滅菌などの医療処置として利用されつつある将来性の高い有用な技術である。

本学位請求論文では、廃水処理により有効であると考えられる水中放電プラズマ法における殺菌作用の分子メカニズムの研究がまとめられている。

前述のように、プラズマ技術は様々な産業応用が始まっており、中でも、その重要な用途である殺菌作用については、1996年以降、物理的衝撃波、高電界、ROS、UVなどの作用メカニズムが報告されてきた。しかし、どの機構が重要であるかについては明らかになっていない。また、プラズマ技術においては、気相プラズマが主流であるが、廃水処理に関しては水中プラズマの方が有用である。しかし、水中プラズマについては、気相プラズマと比較して研究が少なく、その殺菌メカニズムについても不明な点が多い。よって、水中プラズマの殺菌メカニズムの分子機構を明らかにすることは、その産業応用における効率的な殺菌作用提供の上で大変重要と考えられる。

申請者は、この水中放電プラズマにおける殺菌作用の表出機構を分子レベルで解明するために、過去の知見で提案されている機構のうち、ROSに注目し、その発生とそれによる生体傷害、特にDNA損傷について詳細な検討を行っている。まず、最初に共同研究者 (Ihara S) が開発した水中放電プラズマ処理装置の改良から検討を始め、実験スケールを小さくするために、処理容量を2Lまで縮小した小さなパイロット装置を作製した。また、水中放電プラズマでは水が高い通電能を示し、プラズマ発生のために高電圧が必要となる。その必要電圧を下げるためにガスを導入することが一般的に行われているが、ここではプラズマ発生モジュールの形状を見直し、キャビテーションを発生させることにより、ガス導入と同等の効果で必要電圧の低減に成功している。次に、その水中プラズマ装置で、精製DNA分子を用いた処理実験を行い、ROSによって生じる酸化DNA損傷発生を確認した。DNAはDNA損傷検査で頻用される環状プラスミドDNA、pUC19を用い、DNA修復酵素による酸化塩基損傷分析 (Terato et al, 2008) により、DNA二本鎖切断 (Double Strand Break: DSB)、酸化塩基損傷各種を生じていることを明らか

にした。また、質量分析法により、主要な酸化塩基損傷である 8-オキソグアニン (8-oxoguanine: 8-oxoG) の生成も確認した。それら損傷の生成収率は、処理時間に比例しており、比較検討のために同時に行ったエックス線照射の結果とも同等であることを示した。さらに、大腸菌細胞を用いて生存率とゲノム DNA 損傷を確認した。ここでは、菌株として、8-oxoG 修復酵素である Fpg の野生株と欠損株を比較し、Fpg 欠損株が水中放電プラズマ処理に対して高感受性であり、ゲノム DNA 損傷 (DSB) も高収率であることを示した。以上の結果で、水中放電プラズマの殺菌作用において、プラズマによって生じる ROS を介した DNA の酸化傷害経路が重要であることを示した。

次に、申請者は先の結果をより強固なものにするために、実際に ROS が発生しているかどうかを検討した。ROS には様々な分子種が存在するが、ここでは最も重要な傷害性を示すヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )、およびその二次生成分子である過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) の測定を行い、それらが処理時間に応じて生成収率を上昇させることを示した。ここで、水中プラズマに特徴的なことは、比較対照実験のガンマ線による生成収率と比較すると、 $\cdot\text{OH}$  は同等であったが、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の収率が高かったことである。このことは、水中放電プラズマの傷害メカニズムにおいて重要な考察を導くものであり、電荷の問題から細胞膜を通過して細胞外から細胞内に侵入することが困難な  $\cdot\text{OH}$  ではなく、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の傷害作用への関与と、そのことによる水中放電プラズマの殺菌作用の高さを示唆すると考えられる。続いて、プラズマ処理細胞のゲノム中に DNA 損傷が生じているかどうかを、先の精製 DNA 分子処理と同様に分析したところ、8-oxoG の生成とともに、チミンの酸化損傷である 5-ヒドロキシシトシン (5-hydroxycytosine: 5-hoC) の生成を認めた。同時に行った処理プラスミド DNA の変異生成の実験結果は両酸化塩基損傷の生成を示唆するものである。

これら損傷生成が大腸菌細胞の生存率低下と同時発生していることを踏まえ、申請者の研究成果は、水中放電プラズマの殺菌作用に ROS が極めて重要な役割を果たしていることを示している。すなわち、申請者の研究は、水中放電プラズマの殺菌作用における重要な分子機構を初めて明らかにするものであり、水中放電プラズマ法の応用展開に有用な情報を与える大きな価値をもつものである。