

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 理 学 )	氏名	工藤 健一
学位授与の要件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
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)			
論文審査担当者			
主 査 教 授 井出 博 審査委員 教 授 山本 卓 審査委員 教 授 坂本 敦 審査委員 准教授 寺東 宏明 (佐賀大学総合分析実験センター)			
〔論文審査の要旨〕			
<p>                     プラズマは、電子、イオン、中性粒子からなる部分的あるいは完全にイオン化されたガスであり、近年、環境および医療分野における利用が進んでいる。プラズマは、物理的衝撃波や高電界に加え、活性酸素種 (ROS) や紫外線などの傷害因子を発生することにより、有機物の分解促進作用や殺菌効果を示すことから、産業分野では廃水浄化、医療分野では滅菌や癌治療に利用されつつある将来性の高い有用な技術である。プラズマの殺菌作用については、1996 年以降、物理的衝撃波、高電界、ROS、紫外線による作用メカニズムが報告されているが、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、プラズマ技術応用においては、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。本研究では、廃水処理に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機構を検討した。                 </p> <p>                     本研究では、まず、共同研究者である猪原 (佐賀大学) が開発した水中放電プラズマ処理装置を改良し、処理容量を 2 l に減らした小型装置を作製した。また、水中放電プラズマでは水が高い通電性を示すため、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るが、本研究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率で必要電圧の低減を可能にした。                 </p> <p>                     次に、改良した水中放電プラズマ処理装置を用い、環状 pUC19 プラスミド DNA の処理を行い、DNA 損傷発生を調べた。DNA 一本鎖切断 (SSB) および DNA 二本鎖切断 (DSB) は、プラスミドのコンフォメーション変化により検出した。塩基損傷は、酸化塩基損傷を認識する二価性 DNA グリコシラーゼ (Endo III, Fpg) 処理後のコンフォメーション変化から検出した。これらの検討結果から、DNA に SSB, DSB, 酸化塩基損傷が発生していることが明らかとなった。また、同位体希釈質量分析法により、酸化塩基損傷である 8-oxoguanine (8-oxoG) の生成を確認した。投入エネルギーあたりの DNA 損傷生成収率は、比較検討のために行った X 線照射による DNA 損傷の生成収率と同程度であることを示し                 </p>			

た。さらに、大腸菌をモデルとして用い、水中放電プラズマ処理後の生存率とゲノム損傷を分析した。修復野生株と 8-oxoG 修復酵素である Fpg 欠損株の生存率を比較した結果、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、ゲノム損傷 (DSB) も高収率であることを示した。以上の結果から、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 の酸化傷害が重要であることを示した。

次に、水中放電プラズマの殺菌作用に関与する ROS を検討した。ROS には様々な分子種が存在するが、ここでは強い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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を測定した。 $\cdot\text{OH}$  はテレフタル酸トラップ生成物の蛍光測定、 $\text{H}_2\text{O}_2$  はトリンダー試薬を用いた比色測定で定量した。その結果、 $\cdot\text{OH}$  および  $\text{H}_2\text{O}_2$  の生成量が処理時間とともに増加することを示した。この結果を比較実験として行ったガンマ線の結果と比較すると、投入エネルギーあたりの  $\cdot\text{OH}$  の生成収率は同程度であるのに対し、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の生成収率は水中放電プラズマの方が高く、水中放電プラズマに特徴的であることが明らかとなった。 $\cdot\text{OH}$  は、拡散距離が短く細胞膜を通過して細胞内に侵入しにくいのに対し、 $\text{H}_2\text{O}_2$  は、細胞膜を通過して細胞内に拡散できることから、 $\text{H}_2\text{O}_2$  が主に関与する水中放電プラズマに特徴的な殺菌機構が示唆された。水中放電プラズマ処理した大腸菌のゲノム損傷を同位体希釈質量分析法で分析し、既に同定していた 8-oxoG に加え、5-hydroxycytosine (5-hoC) の生成を確認した。平行して、pUC19 プラスミドのプラズマ処理を行い、処理プラスミドを大腸菌に形質転換し、DNA 損傷に由来する突然変異誘発を解析した。得られた突然変異スペクトルは、8-oxoG および 5-hoC の両塩基損傷の生成から予想されるものと一致した。

本研究の結果、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が明らかとなった。得られた知見は、水中放電プラズマの殺菌機構解明に寄与するとともに、水中放電プラズマの環境および医療分野への応用にも貢献が期待される。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

- (1) Quantitative analysis of oxidative DNA damage induced by high-voltage pulsed discharge with cavitation.

Ken-ichi Kudo, Hironori Ito, Satoshi Ihara, and Hiroaki Terato

Journal of Electrostatics, 73, 131-139 (2015)

- (2) Oxidative DNA damage caused by pulsed discharge with cavitation on the bactericidal function.

Ken-ichi Kudo, Hironori Ito, Satoshi Ihara, and Hiroaki Terato

Journal of Physics D: Applied Physics, 48, 365401(12pp) (2015)