

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656198

研究課題名(和文)放電プラズマと殺菌剤前駆物質を用いる選択的細胞破壊に関する研究

研究課題名(英文) Selective sterilization utilizing discharge plasma and additive

研究代表者

高島 和則 (Takashima, Kazunori)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60303707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：放電プラズマによる殺菌、ウイルス不活化メカニズムの解明のため、コートタンパクと核酸のみからなるバクテリオファージを検体とするシンプルな実験系を構築した。この実験系では分子生物学的手法によりコートタンパクと核酸を個別に解析することが可能であり、プラズマによっていずれに与えられたダメージが致命的であるかを実験的に調べることが可能である。ファージを用いた実験から、誘電体バリア放電に曝露されたファージの不活化は主としてコートタンパクの損傷に起因するものであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： For the study of mechanism of plasma sterilization and / or inactivation of viruses, a simple experimental system using bacteriophage, which consists of nucleic acid and coat protein was developed. In this experimental system, coat protein and nucleic acids can be analyzed separately. Therefore it enables to determine which damage is more fatal to the phase activity -- damage on coat protein or damage on nucleic acid.

Experimental results suggest that inactivation of lambda phage using dielectric barrier discharge plasma can be ascribed to a damage on the coat protein rather than the nucleic acid.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電力工学・電力変換・電気機器

キーワード：プラズマ 殺菌 ウイルス 不活化

1. 研究開始当初の背景

プラズマは、高速電子と気体分子との衝突に伴う電離により生じ、気体分子の電離や解離により、イオン、ラジカル、電子、紫外線等の反応性に富んだ粒子を生成する。近年、減圧を必要としない、大気圧や液中での低温プラズマの発生法が研究・開発が進展し、低温プラズマの医療応用に関する研究が行われるようになってきた。

低温プラズマの生体や生物組織への直接照射が癌細胞の死滅や皮膚疾患治療・創傷治療への画期的な有効性を示す実験結果が相次いで報告され、プラズマの医療応用に関する研究が近年急速に進展している。しかし、その多くは放電生成条件や処置時間を試行錯誤的に変化させた結果の報告ではあるため、系統的な作用機序の解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究では安全・安心な医療技術の開発をめざし、プラズマと生体や細胞・ウイルスとの相互作用に関する知見を得、プラズマの作用を制御する手法に関する基礎研究を行うことを目的としている。

従来、プラズマ照射が生体に及ぼす影響を明らかにしようという研究は専ら、印加電圧・ガス組成・対象物との距離など放電条件・放電状態の異なるプラズマに曝露した検体の生存率や生物学的活性の測定結果からプラズマと生体との相互作用を推論するものがほとんどであった。しかしながら、これらの研究においてはいずれも気相で発生させたプラズマによって生成された何らかの化学種が生体表面（液相とみなすことができる）に輸送・溶解され、更に液相での化学反応を経た後に生体と相互作用するという、非常に複雑な生成・輸送過程が関与している。また多くの先行研究は、細胞や組織を対象として行われており、プラズマへの曝露に対して極めて複雑な応答をすることが予想される。

そこで、本研究ではコートタンパクと核酸のみからなるバクテリオファージを検体とするシンプルな実験系の構築を行う。放電プラズマへの曝露によるバクテリオファージ不活化の実験結果からプラズマ曝露による致命的な損傷がコートタンパクあるいは核酸のいずれかに与えられたものであるかの解析を行う。

3. 研究の方法

バクテリオファージを用いたプラズマ照射による損傷部位同定実験の概略図を図1に示す。本研究ではバクテリオファージλを用いた。これらのバクテリオファージは核酸とそれをコートするコートタンパクのみからなるシンプルな構造を有しており、プラズマへ

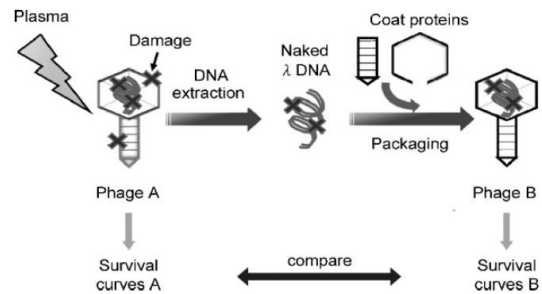


図1: バクテリオファージを用いた損傷部位同定実験概略図

の曝露による損傷は核酸あるいはコートタンパクのいずれか（もしくは両方）に与えられることになる。バクテリオファージに対しては分子生物学的手法を用いて様々な操作を行うことが可能である。これを利用してプラズマに曝露したバクテリオファージから核酸だけを抽出し、新たなコートタンパクを用いて再パッケージングすることによって、損傷を受けた核酸を無傷のコートタンパクでコートしたバクテリオファージを作成することができる。従って、両者の感染能の比較から、コートタンパクの損傷と核酸の損傷とを分離して評価することが可能になる。

本実験では、誘電体バリア放電（DBD）をプラズマ源として用い、所定の濃度に調製されたバクテリオファージ懸濁液をガラス基板上にスポットしたものをサンプルとして用いた。実験は室温、大気圧下、空気中で行った。なお、本実験のプラズマ照射条件においては熱の影響はないことを確認している。

4. 研究成果

プラズマ照射によるバクテリオファージλの不活化特性を図2に示す。プラズマに曝露したサンプルおよびプラズマに曝露したサンプルを新たなコートタンパクを用いて再パッケージングしたサンプルの感染能がそれぞれ破線と実線で表されている。プラズマ照

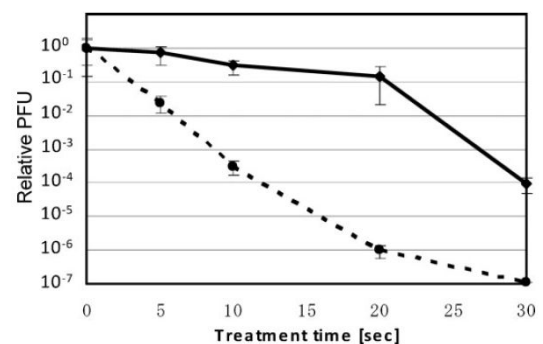


図2: プラズマ照射によるバクテリオファージλの不活化特性

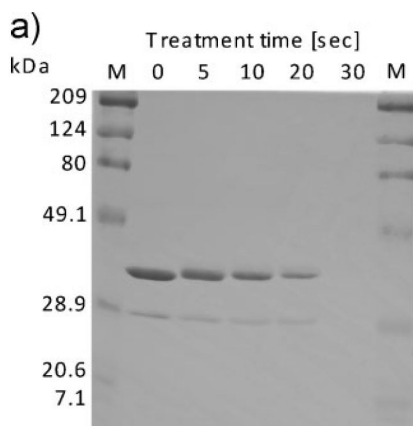
射によりバクテリオファージλの感染能がほぼ指数関数的に低下し、照射時間 20sec では約 6 桁の低下が見られた。一方、再パッケージングしたサンプルではプラズマ照射時間 20sec 以内では感染能の低下は限定的であり、照射時間 20sec で約 1 桁の低下にとどまった。プラズマ曝露サンプルではコートタンパク及び核酸に損傷が考えられる一方、再パッケージングしたサンプルではコートタンパクは損傷を受けていないとみなせることから判断すると、照射時間 20sec 以内のサンプルに観察された不活化はコートタンパクの損傷に起因する可能性が示唆された。

図 3 にプラズマを照射したバクテリオファージλのコートタンパクおよび DNA の電気泳動結果を示す。図 3(a)より、6 桁の顕著な不活化が見られたプラズマ照射時間 20sec においてもある程度の量のコートタンパクが存在していることから、プラズマ曝露による分解は顕著ではないことがわかった。また、コートタンパクのバンドが照射時間と共に上方向にシフトしていることから、プラズマ照射によって化学的修飾が起きていることが示唆された。図 3(b)から、プラズマ照射時間 20sec 以内では DNA の断片化(分解)や

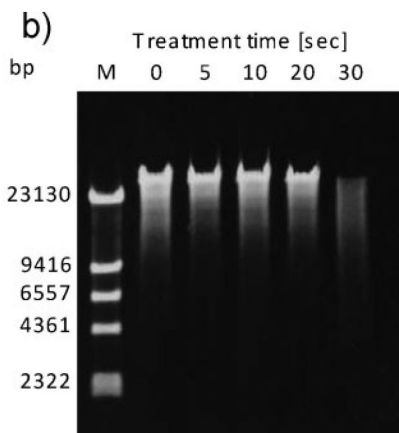
化学修飾はほとんど見られないことが分かった。

また、バクテリオファージλのコートタンパクのみおよび DNA のみに同一条件でプラズマを照射し、これらと無傷の DNA およびコートタンパクでそれぞれ再パッケージングしたコートタンパクのみに損傷を有するバクテリオファージλと DNA のみに損傷を有するバクテリオファージλとの感染能の比較結果から、コートタンパクに損傷がある場合の方が感染能の低下がより顕著であることが分かった。本実験においては DNA が直接プラズマに曝露されていることから、バクテリオファージλへのプラズマ照射に比べて DNA への損傷が過大になっているにもかかわらず、同一照射条件に対して DNA よりもコートタンパクの方がプラズマによって不活化につながる損傷を受けやすいという結果が得られた。

以上の実験結果から、DBD プラズマ曝露によるバクテリオファージλの不活化は主としてコートタンパクの化学的修飾等による損傷が原因で生じているということが示唆された。



(a) コートタンパク



(b) DNA

図 3: バクテリオファージλのコートタンパクおよび DNA の電気泳動結果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- [1] Y. Tanaka, H. Yasuda, H. Kurita, K. Takashima, and A. Mizuno, "Analysis of the inactivation mechanism of bacteriophage φX174 by atmospheric pressure discharge plasma," IEEE Transactions on Industry Applications, vol. 50, pp. 1397-1401 (2014)
- [2] 三浦卓也, 安田八郎, 水野 彰, "ウイルスなどバイオパーティクルの大気圧プラズマによる不活化とそのメカニズム (特集 大気圧プラズマが拓くあたらしい技術)," 化学工学, vol. 75, pp. 353-355 (2011)
- [3] 安田八郎, 水野彰, "講座プラズマ滅菌・殺菌 10 大気圧プラズマによるバイオパーティクルの不活化とそのメカニズム," 防菌防黴, vol. 395, pp. 555-561 (2011)

[学会発表](計 12 件)

- [1] H. Yasuda, T. Miura, H. Kurita, K. Takashima and A. Mizuno, "Inactivation Mechanism of Single-Stranded DNA Bacteriophage Treated with Atmospheric Pressure Cold Plasma", 4th International Conference on Plasma Medicine (2012)
- [2] Y. Tanaka, H. Yasuda, H. Kurita, K. Takashima and A. Mizuno, "Analysis of the inactivation mechanism of bacteriophage MS2 and φX174 by atmospheric pressure non-equilibrium plasma", Plasma

Conference 2011

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://ens.tut.ac.jp/electrostatics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高島和則 (TAKASHIMA Kazunori)

豊橋技術科学大学・環境・生命工学系・准
教授

研究者番号：60303707

(2) 研究分担者

水野彰 (MIZUNO Akira)

豊橋技術科学大学・環境・生命工学系・教
授

研究者番号：20144199

栗田弘史 (KURITA Hirofumi)

豊橋技術科学大学・環境・生命工学系・助
教

研究者番号：70512177

(3) 連携研究者

()

研究者番号：