

正極性と負極性のクラスターイオンによる細菌不活化メカニズム

The Mechanism of Bacteria Inactivation by Positively and Negatively Charged Cluster Ions

西川 和 男*

Kazuo Nishikawa

要 旨

正極性と負極性のクラスターイオンによる細菌の不活化メカニズムについて検証を行った。細菌の細胞質タンパク質、表面膜タンパク質そしてDNA(デオキシリボ核酸)を電気泳動法により調べた。また、正と負イオンの反応により生成されるラジカルの同定も行った。この結果、正と負のイオンにより、細菌の表面膜タンパク質は断片化されていることが確認され、細菌内部の細胞質のタンパク質およびDNAには変化が無いことを確認した。細菌は表面の膜タンパク質を断片化されることにより、膜が破れて、膜機能不全を引起し死滅することがわかった。さらに、正と負のイオンによりOHラジカルが生成していることも確認した。

We conducted verification tests on the mechanism of bacteria inactivation by positive-ly and negatively charged cluster ions. Electrophoresis methods were used to analyze bacterial cytoplasmic proteins, surface membrane proteins, and DNA (deoxyribonucleic acid). In addition, radicals generated by reaction of positive and negative ions were identified.

It was observed that bacterial surface membrane proteins were fragmented while cytoplasmic proteins and DNA in the bacteria remained intact. It was concluded that the fragmentation of the surface membrane proteins causes rupture in the surface membrane of the bacteria, which causes membrane malfunction and eventually its death. We also confirmed that OH radicals are generated by reaction of positive and negative ions.

まえがき

近年、大気環境汚染や住環境の高気密化に伴い、空気中の有害分子や浮遊細菌を取り除き、健康で快適な環境を作りたいという要望がますます強くなっている。このため、空気中での放電プラズマを応用して、化学反応性の強いオゾンやラジカル¹⁾を生成し、空気環境を浄化する研究が活発に行われている。

当社は大気圧下でのプラズマ放電により空気中の酸素分子と水分子を電離させ、正イオン $H^+(H_2O)_m$ (m は自然数)と負イオン $O_2^-(H_2O)_n$ (n は0および自然数)のクラスターイオンを生成するイオン発生素子²⁾を開発した。さらに、正イオンと負イオンによる空気浄化効果について、世界の学術研究機関と共同で、浮遊する細菌・カビ・ウイルス・アレルゲンに対する効果^{3)~5)}を実証してきた。

今回、細菌の不活化メカニズムに注目して、イオン発生素子から生成した $H^+(H_2O)_m$ 正極性クラスターイオンおよび $O_2^-(H_2O)_n$ 負極性クラスターイオンについて、細菌のタンパク質およびDNAの分析の結果、正と負のイオンの相互作用によって細菌表面の膜タンパク質を断片化していることを見出した。本論文では、正と負のイオンによる細菌不活化メカニズムについて報告する。

1. 実験装置および方法

1・1 実験装置

容積4.1L(縦21×横14×高さ14cm)の亚克力製チャンバー内にイオン発生素子を高さ10cmの壁面に設置、直径9cmのシャーレを床中央に設置した。また、イオ

* 電化システム事業本部 電化商品開発センター 第1開発室

ン濃度は、シャーレ上で正負イオンが各約5,000個/cm³としており、オゾン濃度は0.05ppm未満とした。

1・2 細菌の不活化試験

細菌として *Enterococcus* (腸球菌) を用い、菌数は37度で8時間培養を行い、コロニー数を計測した。また、細菌の生死判定はLiveDeadR Kitを用いて染色法により判定した。

1・3 タンパク質および DNA の分析

細菌よりタンパク質を抽出し、一次元および二次元 SDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリドアミドゲル) 電気泳動法によりタンパク質の分子量の測定を行った。さらに、等電点電気泳動を pH3 ~ 10 のグラジエントをかけ、ゲルはコマシーブルー染色液 (PageBlue, Fermentas 社) で染色し、ゲルを取り込んだ後、タンパク質密度分布を画像解析した。また、DNA はアガロース電気泳動法により分子量を測定した。

1・4 ラジカルの同定

1・1で記載の条件において、シャーレにWST-1(2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2, 4-ジサルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム, モノソリウム サルト) 試薬を入れ、イオンを照射することによる反応吸光度分析を行った。

2. 実験結果および考察

2・1 細菌の不活化効果

図1はイオン照射時間による菌のブランク比残存率を示す。イオン照射時間が長くなるにつれ菌の残存率も減少することを確認。本試験条件では、イオンを180分照射すると残存率がほぼ0%になることが確認され

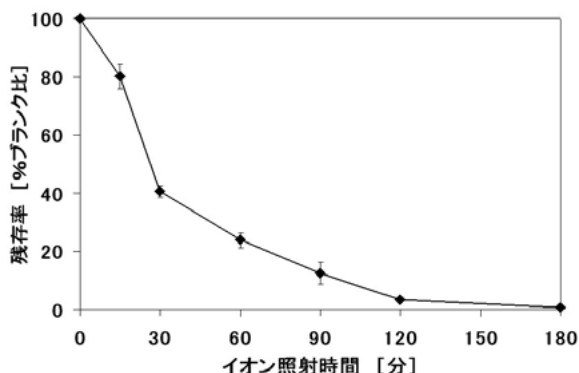


図1 イオン照射時間による細菌の残存率変化

Fig. 1 Change of survival rate of bacteria from exposure to ions over time.

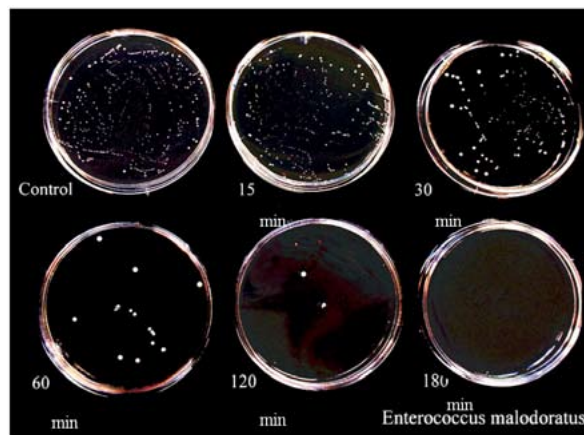


図2 イオン照射時間による細菌コロニー写真

Fig. 2 Photo of bacteria colonies from exposure to ions over time.

た。図2は、イオン照射時間毎の *Enterococcus* (腸球菌) のコロニー形成状態を示した写真である。イオン照射時間180分ではコロニーの形成が見られなかった。続いて、LiveDeadR Kitを用いて細菌の生死の評価を行い、イオン照射により細菌が死滅していることを確認した。正と負のイオンより、菌を不活化する効果があることがわかった。

2・2 細菌の細胞質タンパク質の変化

Enterococcus (腸球菌) にイオン2時間照射後、細菌内部の細胞質タンパク質を抽出し、二次元 SDS-Page 電気泳動法によってタンパク質の質量分布の測定を行った。図3に細胞質のタンパク質の電気泳動マップを示す。イオン照射とブランクでは変化が見られなかった。さらに、図4はイオン照射した場合とブランクでの、細胞質のタンパク質密度分布を示す。明るい部分はタンパク質が存在していることを示す。この結果より、イ

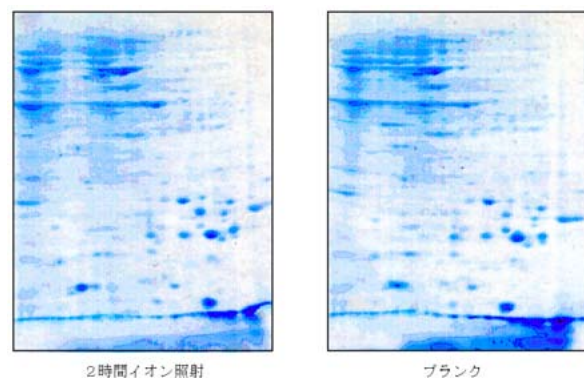


図3 細胞質のタンパク質の2次元電気泳動マップ

Fig. 3 2D SDS-PAGE map of cytoplasm proteins in bacteria cells.

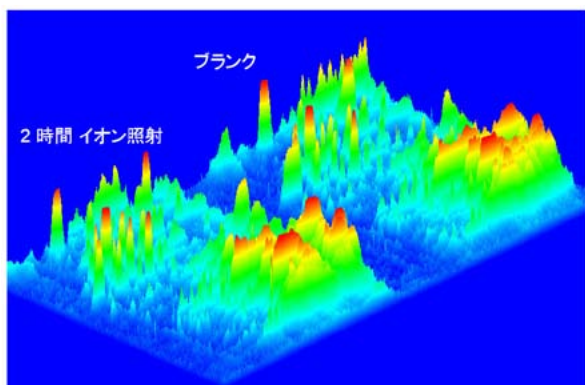


図4 細胞質のタンパク質分布
Fig. 4 Distribution of cytoplasm proteins in bacteria cells.

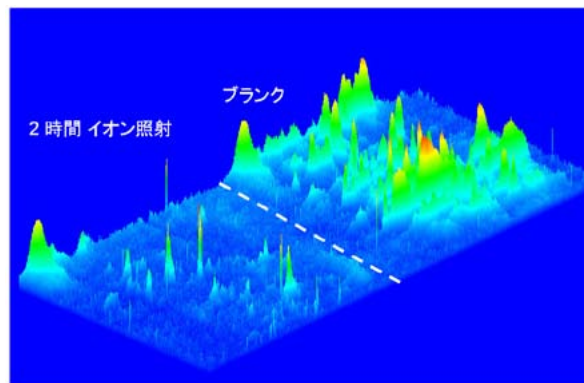


図6 表面細胞膜のタンパク質分布
Fig. 6 Distribution of membrane proteins on surface of bacteria cells.

オン照射で細菌内部の細胞質のタンパク質が変化していないことが確認された。

2・3 細菌表面の膜タンパク質の変化

Enterococcus (腸球菌) にイオン2時間照射後、細菌の表面膜タンパク質を抽出し、二次元SDS-Page電気泳動法によってタンパク質の質量分布の測定を行った。図5に膜タンパク質の電気泳動マップを示す。イオン照射とブランクで大きな変化が見られた。さらに、図6はイオン照射した場合とブランクでの膜タンパク質密度分布を示す。明るい部分はタンパク質が存在していることを示す。イオンを照射することにより、膜タンパク質が無くなっている事が確認された。さらに、分子量93kDaの膜タンパク質のイオン照射時間による変化を調べた。図7はイオン照射時間による分子量29kDaから220kDaのタンパク質の電気泳動マップを示す。イオン照射することにより分子量93kDaの蛍光が消え、分子量34kDaの部分に蛍光の出現が確認された。さらに、分子量93kDaと34kDaのタンパク質濃度相対比の経時変化を図8に示す。イオン照射により質量

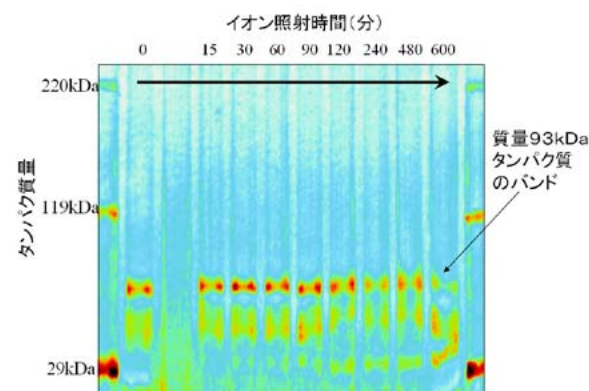


図7 細菌の表面細胞の膜タンパク質の電気泳動マップ
Fig. 7 Electrophoresis map of membrane proteins on surface of bacteria cells.

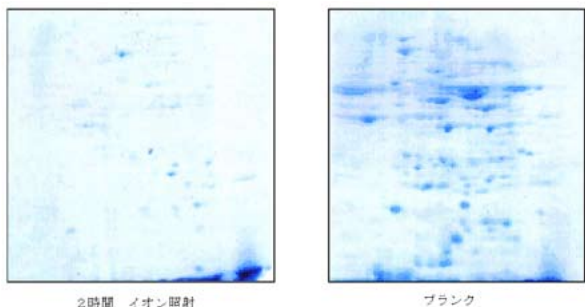


図5 表面細胞膜のタンパク質の2次元電気泳動マップ
Fig. 5 2D SDS-PAGE map of membrane proteins on surface of bacteria cells.

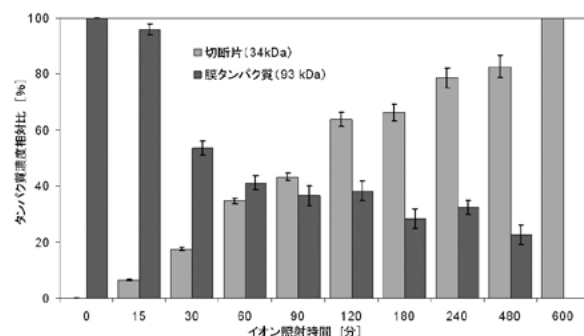


図8 イオン照射時間による膜タンパク質の濃度相対比変化
Fig. 8 Relative change in concentration of membrane proteins from exposure to ions over time.

93kDaタンパク質が減少、質量34kDaタンパク質が増加している。これは質量93kDaのタンパク質が断片化されて、質量34kDaに切断されたことを示している。

2・4 細菌の DNA (デオキシリボ核酸) の変化

Enterococcus (腸球菌) にイオンを照射し、1時間および2時間照射後に、細菌内部のDNAを抽出し、電気泳動法によってDNAの質量変化の測定を行った。図9に電気泳動マップを示す。イオン照射と blanks ではDNAの変化が見られなかった。この結果より、イオン照射で細菌のDNAが変化していないことが確認された。

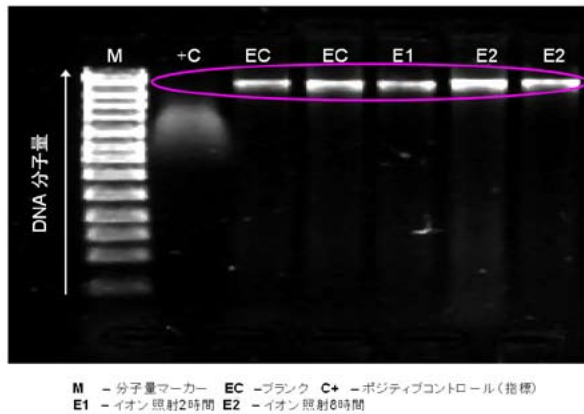


図9 細菌の DNA の電気泳動マップ
Fig. 9 Electrophoresis map of DNA of bacteria cells.

なお、図9において、最左端の棒Mはマーカー、最左端から二番目の棒C+はポジティブコントロール、最左端から三、四番目の棒ECは blanks、最左端から五、六番目の棒E1はイオン照射1時間、最左端から七、八番目の棒E2はイオン照射2時間である。

2・5 ラジカルの同定

正と負のイオンの反応により生成されるラジカル種を同定するために、WST-1試薬による反応吸光度分析を行った。図10は縦軸は吸光度を示し、横軸は波長を示す。イオン照射の場合は、ヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)との反応による波長430nm付近に吸光スペクトルが確認された。イオン照射なしの場合、吸光スペクトルは確認されなかった。これより、イオン照射によりOHラジカルが生成されることがわかった。さらに、過酸化水素およびスーパーオキシドの生成についても調べたが生成は見られなかった。

2・6 正と負のイオンによる細菌不活化メカニズム

これまでの実験結果より、イオン発生素子から発生した正と負のクラスターイオンによる細菌の不活化メ

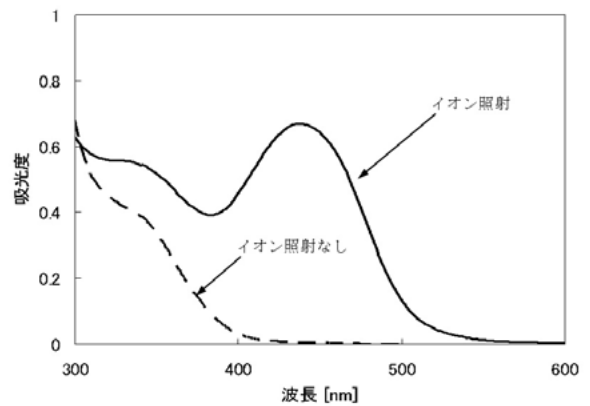


図10 イオン照射による試薬の吸光度スペクトル
Fig. 10 Absorption spectrum of test reagent resulting from exposure to ions.

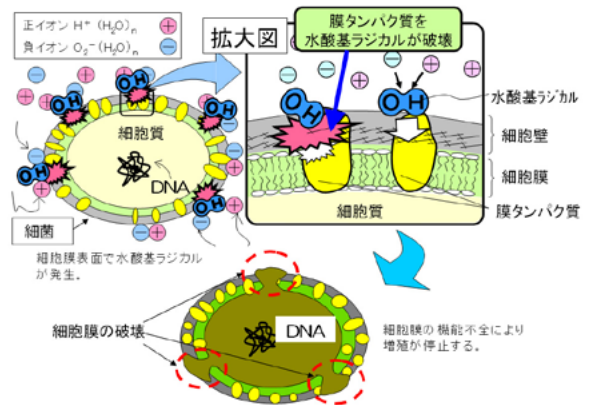


図11 細菌の不活化効果メカニズム
Fig. 11 A mechanism for inactivation effect of bacteria.

カニズムを解明した。図11は正と負のクラスターイオンによる細菌の不活化メカニズムのフロー図を示す。細菌にクラスターイオンが衝突して、正極性クラスターイオン H^+ (H_2O)_mと負極性クラスターイオン O_2^- (H_2O)_nが細菌の表面上で反応、非常に活性が高いOHラジカルが生成される。この活性種は細菌表面の膜タンパク質と反応してタンパク質を断片化する。そして細菌の表面膜に穴が開くことにより、細菌が膜機能不全を引起し死滅する。また、細菌内部の細胞質タンパク質およびDNAには影響を及ぼさずに表面膜のみを構造的に破壊している。図12はイオンを2時間照射したときの大腸菌の透過型電子顕微鏡写真を示す。イオンを照射することにより、膜が破れ内部が流出していることが観察された。

むすび

イオン発生素子より生成された正および負のイオン

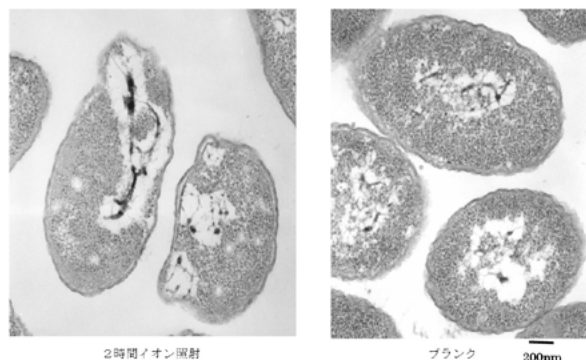


図 12 細菌の透過型電子顕微鏡写真
Fig. 12 TEM photo of bacteria cells.

による細菌の不活化メカニズムについて調べた。その結果、次の諸点が明らかになった。

(1) 正と負のイオンにより細菌は表面の膜タンパク質を断片化されている。

(2) 正と負のクラスターイオンの作用は細菌の表面のみで細菌内部に侵入して細胞質のタンパク質やDNAに損傷を与えない。

(3) 正と負のクラスターイオンの反応によりOHラジカルが生成されている。

今回、正と負のクラスターイオンによる細菌不活化メカニズムを解明したことで、放射線や紫外線などの

ようなDNAに損傷を与える細胞の癌化の可能性があるような不活化方法ではなく、表面を構造的に破壊する安全な不活化方式であることが解った。さらに、表面にタンパク質を有する物質や微生物についても幅広く効果が期待できることが解った。

謝辞

タンパク質の分析において、ドイツ アーヘン応用科学大学Prof. Gerhard Artmannに御協力頂きましたので、ここに感謝致します。

参考文献

- 1) 小田哲治, 他, “放電による環境対策技術の将来”, 応用物理学会誌, 69, pp. 263 - 289 (2000).
- 2) K. Nishikawa, H. Nojima, “Jpn. J. Appl. Phys. 40, L835-L836 (2001).
- 3) 西川和男, 野島秀雄, “プラズマにより生成したクラスターイオンを用いた空気浄化技術”, シャープ技報, 82, pp. 11-15 (2002).
- 4) 西川和男, 野島秀雄, “放電プラズマにより生成したクラスターイオンを用いた気中ウイルス不活化技術”, シャープ技報, 86, pp. 10 - 15 (2003).
- 5) 西川和男, 米田哲也, “放電プラズマにより生成したクラスターイオンを用いた室内浮遊アレルゲン失活技術”, シャープ技報, 89, pp. 55 - 60 (2004).

(2006年7月7日受理)