

DNA切断頻度を指標とした 放電生成物を放出する家電製品の生体に対する安全性評価

栗田 弘史^{*、1}, 水野 彰^{*}

(2013年3月29日受付; 2013年4月24日受理)

Safety Evaluation of Home Electric Appliances Equipped with Discharge Devices Based on Single-molecule Measurement of Strand Breaks on Large DNA

Hirofumi KURITA^{*、1} and Akira MIZUNO^{*}

(Received March 29, 2013; Accepted April 24, 2013)

We report a single-molecule-based analysis of strand breakages on large DNA molecules induced by substances emitted from home electric appliances equipped with discharge devices, such as an air purification system. We exposed DNA solution and bacteria to the air containing the substances or gamma-rays; single-molecule observation that involved molecular combing was then used to measure the length of individual DNA molecules. The measured DNA length showed that the substances from the discharge devices caused a marked change in length of DNA molecules. These results indicated that the commercialized home electric appliances equipped with discharge devices induced strand breakage on large random-coiled DNA molecules.

1. はじめに

近年, 新型インフルエンザの流行やいわゆる PM2.5 と呼ばれる粒子状物質による大気汚染問題が広く社会に認知されたことから, 医療現場はもとより一般家庭においても室内環境の清浄化に対する関心がいっそう高まっている. このことから空気清浄機をはじめとして多種多様な家電製品が普及し, これらの一部に空気中への特殊な物質の放出により, 空気中での除菌効果やウイルスの不活化をうたう製品が市販されている. これらの家電製品の多くは放電デバイスを内蔵していることから, 各種イオン, オゾン, 窒素酸化物などが放電により生成されると考えられる. 具体例として, 空気中での放電では窒素酸化物イオンとアンモニウムイオンが生成されやすい傾向にあることが長門により報告されている¹⁾. これらの効果について, 各社独自の試験方法による報告がカタログやメーカー発表の論文などに示されている^{2,4)}. しかし, その試験条件が実際の使用条件とかけ離れた非現実的なものであったり, その詳細な結果について不明瞭なケースがあったりするほか, 統一した試験方法が制定されていないことも問題である. さらに, 西村はこれらの殺菌

効果は装置近傍でしか期待できず, それに寄与する物質は, メーカーが主張するような各種イオンではなく, オゾンである可能性が高いと報告している⁵⁾. このように, 放電装置を内蔵する家電製品の除菌効果・ウイルス不活化効果などについて賛否両論がある. 加えて, 人体への影響に関する知見が不足しており, 安全性について十分な議論がなされているとは言い難い. 効果の有無をさらに突き詰めるには, 細胞の構成分子である核酸・タンパク質の損傷を検証する必要があると考えられるが, これまでにこれらの損傷を分子レベルで検証した例は少ない.

本研究ではこのような家電製品による生体分子への影響の有無とその定量化の指標として DNA 鎖切断に着目した. 近年, 大気圧低温プラズマの医療応用に関する研究が急速に進展し, 生物に普遍的に存在する DNA 分子への大気圧低温プラズマの影響は, 発がんやアポトーシスなどに関わるため, DNA 損傷が解析されている^{6,9)}. これらの報告で, DNA 鎖切断は放電で直接または間接に生成される OH ラジカルなどによる酸化的損傷であることがゲル電気泳動により解析されている. さらに筆者らはゲル電気泳動では解析困難な長鎖 DNA の鎖長を 1 分子単位で計測し, 鎖長と簡単な数理モデルから切断頻度を定量的に算出する方法¹⁰⁻¹³⁾ で大気圧プラズマジェットによる DNA 切断を定量化している¹⁴⁾. この数理モデルは吉川らにより提起され, 放射線¹⁰⁻¹²⁾ やタバコ煙抽出液¹³⁾ による DNA 切断に適用されているほか, 抗酸化物質による切断抑制効果も定量化されている. この DNA 切断頻度による放電生成物の影響評価は, 従来の微生物

キーワード: 室内空気浄化, 放電生成物, 殺菌, DNA 損傷, 1 分子計測

* 豊橋技術科学大学 大学院工学研究科 環境・生命工学系 (441-8580 愛知県豊橋市天伯町字雲雀ヶ丘 1-1)

Department of Environmental and Life Sciences, Graduate School of Engineering, Toyohashi University of Technology

¹ kurita@ens.tut.ac.jp

の生存率を指標とした評価と異なり、培養プロセスを必要とせず、迅速な安全性評価方法になり得る。

本研究では、放電装置を内蔵する家電製品によるDNA切断の定量的解析と従来法である微生物の生存率評価を実施し、さらに放射線滅菌に用いられているガンマ線によるDNA切断の解析結果と比較・考察した。

2. 実験方法

2.1 試験装置

図1に試験装置を示す。試験には数ある家電製品からA社の両極性イオンを発生する製品 α と、B社のナノサイズのミストを発生する製品 β を使用した。製品から放電デバイスを取り出し、内容積30Lのアクリル製チャンバー内に設置した。製品 α の放電デバイスは複数の正または負イオンを発生するイオン発生電極が交互に配置され、発生した正イオンと負イオンが空間中で混合されている。一方、製品 β は負極性のミストを発生するミスト電極で構成されている。イオン発生電極またはミスト発生電極とサンプルとの距離 d は3, 50, 100 mmのいずれかとした。製品 α の $d=3$ mmの場合は、負イオンを発生する電極の直下にサンプルを設置した。また d が50, 100 mmの場合は電極デバイス横にファンを設置しサンプル近傍で0.6~0.8 m/sの風速条件にてイオン発生電極近傍の空気をサンプルに吹き付けるように構成した。実際の製品において、放電生成物放出部に活性炭フィルタなどの放電放出物を分解除去する機構は備わっていない。従って、放電デバイスを取り出したとしても風量を揃えれば実際の運転条件と同様になる。実験はすべて室温(18~22°C)、相対湿度50~70%RHの範囲で行った。運転時の設定は、製品 α は「強モード」、製品 β は「ターボモード」とした。アクリル製チャンバー内のオゾン濃度はオゾンモニタ(EG-2001F, 荏原実業)により測定した。

2.2 サンプル調製

本研究でのサンプルは、DNA溶液および微生物細胞を塗布した寒天培地の2種類とした。直鎖状長鎖DNAとして λ DNA(48.5 kbp, ニッポンジーン)を用いた。このDNAを、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂ 緩衝液に6.2 ng/ μ lとなるように希釈したものをDNA溶液とした。DNA溶液100 μ lをポリスチレン製の96穴マイクロプレートに滴下し、図1のように試験装置に設置した。所定時間処理した後、スピнкаラム(CHROMA SPIN+TE 1,000 Columns, Clontech)を用いてゲルろ過を行い、Tris/EDTA緩衝液に置換した。

一方、微生物サンプルには表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus*

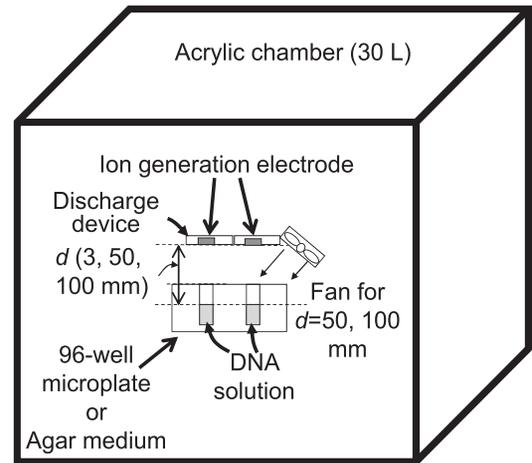


図1 実験装置図
Fig.1 Experimental setup.

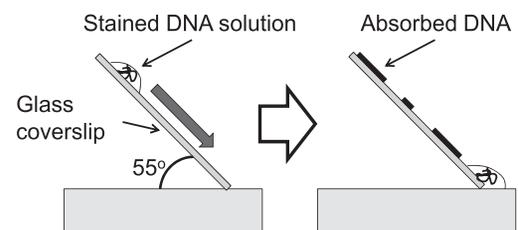


図2 DNA分子のガラス基板への伸張固定
Fig.2 Stretching and immobilizing DNA molecules.

epidermidis, NBRC12993)を用いた。まず規定の培養液で35°C, 18時間培養した後、細胞懸濁液を0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過し、滅菌生理食塩水で洗浄し、滅菌水に回収した。これを滅菌生理食塩水で適宜希釈して、TSA培地(Trypticase Soy Agar)に細菌数として約300個を培地表面に塗布し、図1の試験装置に $d=100$ mmの条件で設置した。所定時間処理後に35°C, 18時間培養し培地に形成したコロニー数を計数して生存率を算出した。

2.3 放射線照射

比較のために、2.2で調製したDNA溶液および寒天培地に対し放射線照射を行った。DNA溶液はポリスチレン製の96穴マイクロプレートに入れ、表皮ブドウ球菌を塗布した寒天培地とともに同時にガンマ線に曝露した。コバルト60線源のガンマ線で照射量は0.1~2,000 Gyの範囲とし、照射時間は1時間に固定した。照射後直ちに冷蔵保存を行い、DNA溶液については3時間以内に2.2と同様にスピнкаラムのゲルろ過、寒天培地については培養後に生存率を算出した。

2.4 DNA分子鎖長計測と切断頻度の算出

精製後のDNAは0.1 μ M蛍光色素YOYO-1で蛍光染色した。個々のDNAを伸張させるため分子コーミング

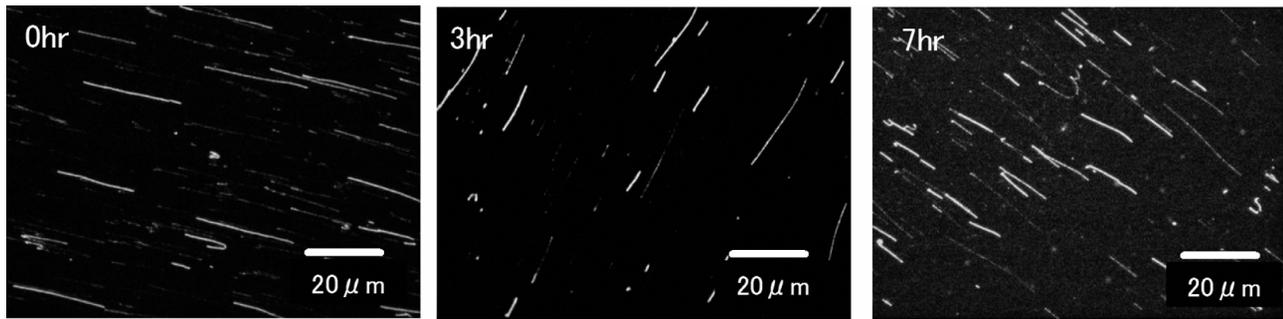


図3 照射後に蛍光染色・伸張固定した DNA の蛍光像. 図中左上に照射時間を示す.

Fig.3 Typical photographs taken during the fluorescence observation of DNA molecules. Exposure time is indicated in each photograph.

法によりガラス基板上に伸張固定した(図2)^{14,15)}. ガラス基板(24 × 60 mm, 0.17 mm 厚, マツナミ)の片側を約 55° 持ち上げ, その上端部に DNA を含む溶液を滴下した後, 液滴を重力によりスライドさせて行った. これにより溶液中の DNA は界面の移動に伴いガラス基板上に伸張固定される. このガラス基板を蛍光観察し, 個々の DNA 鎖長から DNA 切断を評価した.

個々の DNA 鎖長から 2 本鎖切断を定量的に解析するため, 以下に示す計算式を用いた¹⁰⁻¹³⁾. 照射前の平均 DNA 鎖長を L_0 (単位は μm), 照射後に観察された平均 DNA 鎖長を L (単位は μm), 1 分子の DNA に起こる 2 本鎖切断の回数を n として, 次式を仮定する.

$$L = L_0 / (n+1) \quad (1)$$

ここで切断回数 n が照射時間 t (単位は hr) に比例すると仮定すると,

$$n = kt \quad (2)$$

ここで k (単位は hr^{-1}) は切断頻度となる. 上の 2 式から, 以下の関係式が得られる.

$$L/L_0 = 1/(kt+1) \quad (3)$$

鎖長計測により得られた L/L_0 を照射時間毎にプロットし, (3) 式にフィッティングすることで切断頻度 k を得た.

放射線照射の場合は (3) 式において t をガンマ線照射線量 D (単位は Gy) に置き換えた関係式, すなわち

$$L/L_0 = 1/(k'D+1) \quad (4)$$

により同様に切断頻度 k' (単位は Gy^{-1}) を得た¹⁰⁻¹²⁾.

3. 実験結果

図3に製品 α により, $d = 3 \text{ mm}$ 条件で 0, 3, 7 時間処理後に観察した DNA 断片の蛍光像を示す. 同様の操作を各条件に対して行い, 1 条件に対し 100 分子以上の DNA 断片の鎖長を計測した. 図3を見ると, 処理後に鎖長の短い DNA 断片数が増加していることが確認された. 図4, 5 に各デバイスにより断片化した相対 DNA 鎖長と処理時間との関係を示す. 図4, 5 を見ると, 照射

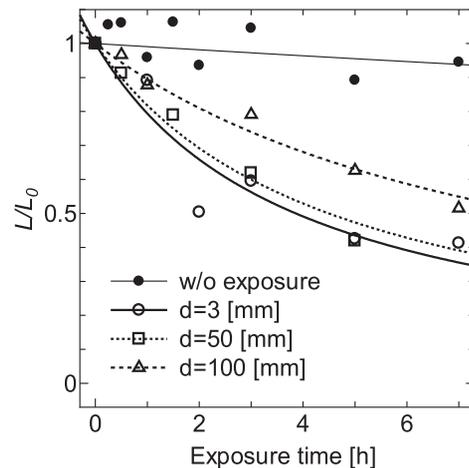


図4 放電デバイス α により断片化した相対 DNA 鎖長の経時変化.

Fig.4 Time course of change in relative length of DNA induced by discharge products from a discharge device α . The relative length L/L_0 is plotted as a function of the exposure time. The curves were drawn using $L/L_0 = 1/(kt+1)$.

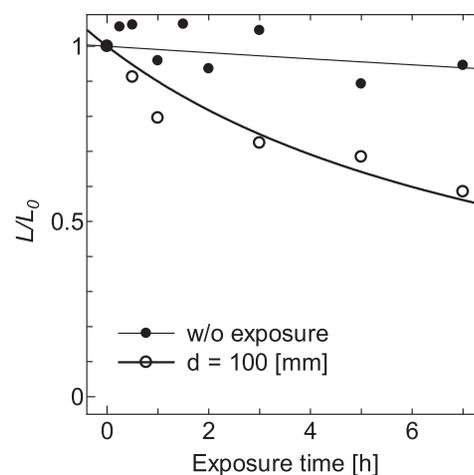


図5 放電デバイス β により断片化した相対 DNA 鎖長の経時変化.

Fig.5 Time course of change in relative length of DNA induced by discharge products from a discharge device β . The relative length L/L_0 is plotted as a function of the exposure time. The curves were drawn using $L/L_0 = 1/(kt+1)$.

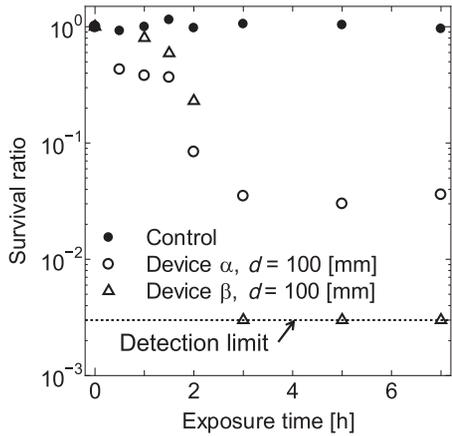


図6 放電デバイス α , β の表皮ブドウ球菌に対する殺菌効果.
Fig.6 Time course of change in the survival ratio of *Staphylococcus epidermidis* induced by discharge products from discharge devices (α , β).

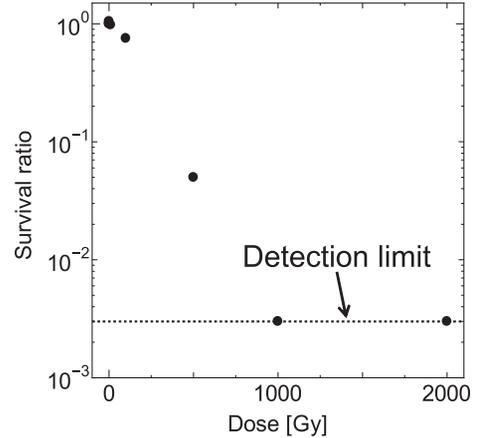


図8 表皮ブドウ球菌のガンマ線による殺菌
Fig.8 Change in survival ratio of *Staphylococcus epidermidis* induced by gamma-rays.

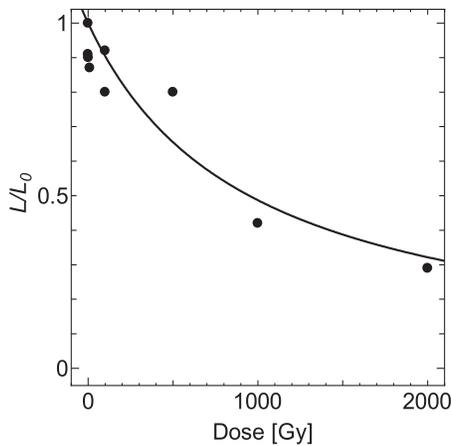


図7 相対 DNA 鎖長とガンマ線量との関係
Fig.7 Change in relative length of DNA induced by gamma-rays. The relative length L/L_0 is plotted as a function of dose of gamma-rays. The curves were drawn using $L/L_0 = 1/(k^2D+1)$.

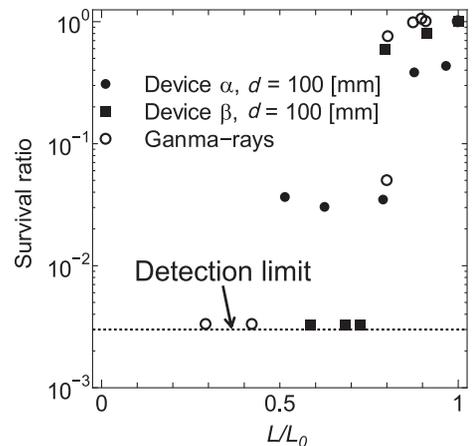


図9 相対 DNA 鎖長と生存率との関係
Fig.9 The relationship between L/L_0 and survival ratio of *Staphylococcus epidermidis* induced by discharge products from discharge devices (α , β) and gamma-rays.

時間の経過に伴って相対鎖長が非照射の場合と比較して顕著に減少していることが分かる。DNA の相対鎖長 L/L_0 を照射時間の関数として (3) 式から近似曲線を描き、このフィッティングから切断頻度 k を求めた。製品 α の場合、 d が 3 mm, 50 mm, 100 mm での切断頻度 k はそれぞれ 0.259, 0.223, 0.108 hr^{-1} であった。図 5 より製品 β の d が 100 mm で切断頻度は 0.118 hr^{-1} であった。ここで製品 α について、 $d = 50$ mm と 100 mm を比較すると切断頻度が約半分に低下しているのに対し、 $d = 3$ mm と 50 mm を比較すると切断頻度に大きな違いが見られない。これは $d = 3$ mm と 50 mm で実験条件が異なるためと考えられる。具体的に $d = 3$ mm の場合には、2 種類あるイオン発生電極のうち負イオンを発生する電極の直下に DNA 溶液を設置しているのに対し、50 mm の場合

には正負イオン両方の寄与とファンによるイオンなどの搬送も考えられる。

図 6 に放電デバイスによる表皮ブドウ球菌の殺菌実験結果を示す。2 時間曝露では 77~91% の殺菌率を示した。製品 β の 3 時間以上の条件では、培地上に形成したコロニーは無かったため、殺菌率としては 99.7% 以上であった。図 6 では便宜上、検出限界である生存率 3.0×10^{-3} を表記している。製品 α , β の生存率の経時変化を比較すると、製品 β のほうが短時間で検出限界に至っている。そこで、製品 α , β のアクリル製チャンバー内のオゾン濃度を測定したところ、製品 α の場合 2 時間で 0.23 ppm まで大きく上昇するが、それ以降上昇速度は遅く 5 時間以上で約 0.3 ppm で飽和した。一方、製品 β は製品 α よりも全体的に高いオゾン濃度であるが、オゾン濃度の上

昇特性は類似しており、測定開始1時間で1.50 ppmまで上昇するが、2時間以降は大きな変化はなく、飽和濃度は約1.7 ppmであった。図6で製品 α の場合の表皮ブドウ球菌生存率の経時変化をみると、3時間以降横ばいとなっている。このことから製品 α 、 β のオゾン放出特性の違いが表皮ブドウ球菌生存率の経時変化に影響していると考えられる。また、オゾンの安全性や基準濃度について、空気清浄機使用時のオゾン濃度の上限を0.05 ppmとする日本電機工業会(JEMA)での基準がある。本研究での測定濃度は30 Lチャンバー内の濃度であるため、基準を大きく上回ったと考えられる。

図7にガンマ線照射時の L/L_0 の経時変化を示す。図7においては、(4)式からDNA鎖長変化の近似曲線を描き、切断頻度 k を求めた。ガンマ線1,000 Gyで L/L_0 が約0.4まで減少した。減少曲線は(4)式でよく近似でき、切断頻度 k は 1.04 mGy^{-1} と計算された。

図8にガンマ線照射時の表皮ブドウ球菌の生存率と照射線量の関係を示す。図8を見ると表皮ブドウ球菌は、500 Gyで95%の殺菌率であった。1,000 Gy以上では、培地上に形成したコロニーは無かったため、図8では便宜上、検出限界である生存率 3.0×10^{-3} を表記している。

4. 考察

製品 α 、 β の $d=100 \text{ mm}$ 条件とガンマ線照射条件のそれぞれについて L/L_0 と表皮ブドウ球菌の生存率の関係をプロットした結果を図9に示す。図9は生存率と相対鎖長の相関関係を表しており図4~8をまとめている。特筆すべき点は、 L/L_0 が0.8~1の範囲での表皮ブドウ球菌生存率変化に対し、 L/L_0 が0.8を下回るとその生存率が急激に低下する点、およびその傾向が放電デバイスとガンマ線で共通している点である。図6で議論したように、放電デバイスによる殺菌効果はチャンバー内のオゾン濃度の経時変化と飽和オゾン濃度に依存することが考えられるが、ガンマ線の場合には照射開始直後から時間的変動のない放射線が照射されている。この点で両者に違いがあるにも関わらず同様の傾向を示すことは非常に興味深い。また放電デバイスとガンマ線で共通する点を考えると、共に水中にOHラジカルなどを生成する点が挙げられる。以上のことから、放電デバイスから、主としてオゾンなどの空中放出物が水中に溶解したことによりOHラジカルなどを生成し、DNAに酸化的損傷を与えたと考えられる。しかし、放電デバイスによる殺菌およびDNA切断の主因をOHラジカルと断定するにはさらなる検討が必要である。また、通常生存率の算出を計測するには培養プロセスが不可欠であるが、図9の関

係から鎖長計測により迅速な生存率の予測が可能になると考えられる。

これまでに、大気圧低温プラズマあるいは放射線による溶液中DNA損傷は主として1本鎖切断であることが示されている^{9,16)}。本研究での蛍光顕微鏡を用いた1分子観察ではDNA鎖長の減少、すなわち2本鎖切断が観察された。この理由として、1本鎖切断によるDNA立体構造の不安定化が挙げられる。2重らせんの片方の鎖に1本鎖切断が起こると立体構造が不安定化し、相補的な部位に過度の物理的なストレスが生じると考えられる。長鎖DNAの場合その影響は顕著となり、1本鎖切断と分子コーミングや溶液中ブラウン運動による物理的なストレスにより2本鎖切断が観察されたと考えられる。従って本研究で得られた切断頻度はこれらの複合的な要因を含んだものであると考えられる。

放電生成物、ガンマ線いずれの照射においてもDNAへのダメージはランダムに誘導されると考えられる。DNA切断が溶液中のDNA分子にランダムに導入される時、平均切断回数と損傷を受けた分子数の関係はポアソン分布に従うと考えられる。ポアソン分布に従うと、平均1回の切断が導入される時、切断を受けない分子は約37%で残りの約63%には1箇所以上の切断が導入される。実験結果で示したように、放電電極とDNA溶液との距離、すなわち d が100 mmの条件では、製品 α 、 β の切断頻度はそれぞれ 0.108 、 0.118 hr^{-1} であったことから10時間の照射で半数以上の分子に損傷が導入されると考えられる。一方、典型的な放射線源であるガンマ線によるDNAの切断頻度は 1.04 mGy^{-1} と計算された。この切断頻度をもとにして平均1回の切断を導入するためにそれぞれどれだけの照射量が必要かを考える。上述のように放電デバイスの場合 d が100 mmの条件では、製品 α 、 β ともに平均1回の切断を起こすためには約10時間の照射が必要になる。放射線の場合、切断頻度 k は 1.04 mGy^{-1} であったため同じく平均1回の切断を起こすためには約1,000 Gyのガンマ線照射が必要となる。両者を平均1回の切断を基準に比較すると、放電デバイスの近傍100 mm以内に置いたDNA溶液に放電デバイスからのイオン等を10時間照射すると、1,000 Gyのガンマ線照射に相当するDNA切断を誘導することが考えられる。一般的な放射線治療での総線量は数十Gyであり、分割照射の場合の1回当たりの線量は数Gyであることを考えると、室内環境浄化を目的とした放電デバイスにおいても非常に近接した条件では生体分子への損傷を誘導する可能性が高い。また、放射線照射の場合、溶液中のDNA分子に均一に損傷が導入されるのに対し、

放電デバイスの場合には、特に溶液と気相の界面付近の分子にはこれよりもさらに多数の分子に損傷を与えていることが考えられる。

今回検証した製品 α と β は、 d が 100 mm 以内の条件で非照射群と比較して明瞭な DNA 切断が観察されたことから、空中放出物が水中に溶解し生体高分子に損傷を与える可能性が高いと考えられる。

5. まとめ

長鎖 DNA の 1 分子観察法と簡単な数理モデルを用いることで、空中浮遊物放出を伴う放電デバイスによる DNA 損傷の定量的な解析が可能であることを確認した。その結果、除菌、ウイルス不活化効果をうたう家電製品 2 機種の放電デバイスの近傍 100 mm 以内で溶液に懸濁した DNA の鎖切断が存在する可能性が高いことが示唆された。また放電デバイスの近傍 100 mm 以内に置いた DNA 溶液に放電デバイスからのイオン等を約 10 時間照射すると、1,000 Gy のガンマ線照射に相当する DNA 切断を誘導すると推測された。

放電生成物による DNA 切断のメカニズムは、各種イオン、オゾン、窒素酸化物の複合要因と推測されるが、今後は化学種の同定など詳細なメカニズム解明を行うことで、より安全な家電製品の開発推進に寄与できるものと考えられる。

参考文献

- 1) 長門研吉：空気中の放電で発生するイオン種と化学反応過程。静電気学会誌, **35** (2011) 102
- 2) 小林寅哲, 金山明子, 今井健之, 須田 洋, 浅野幸康：静電霧化装置の各種抗菌薬耐性菌に対する殺菌作用に関する検討。防菌防黴, **40** (2012) 679
- 3) 西川和男：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。シャープ技報, **94** (2006) 20
- 4) 中村美咲, 西川和男：プラズマクラスターイオンによる除菌作用の原理と応用。生活衛生, **53** (2009) 239
- 5) 西村秀一：殺菌性能を有する空中浮遊物質の放出を謳う各種電気製品の寒天平板培地上の細菌に対する殺菌能の本体についての解析。日本感染症学会誌, **86** (2012) 723
- 6) G. Li, H.-P. Li, L.-Y. Wang, S. Wang, H.-X. Zhao, W.-T. Sun, X.-H. Xing and C.-Y. Bao: Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium. Appl. Phys. Lett., **92** (2008) 221504
- 7) S. Ptasińska, B. Bahnev, A. Stypczyńska, M. Bowden, N. J. Mason and N. S. J. Braithwaite: DNA strand scission induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet. Phys. Chem. Chem. Phys., **12** (2010) 7779
- 8) A. Stypczyńska, S. Ptasińska, B. Bahnev, M. Bowden, N. S. J. Braithwaite and N. J. Mason, "The influence of amino acids on DNA damage induced by cold plasma radiation. Chem. Phys. Lett., **500** (2010) 313
- 9) D. O'Connell, L. J. Cox, W. B. Hyland, S. J. McMahon, S. Reuter, W. G. Graham, T. Gans and F. J. Currell: Cold atmospheric pressure plasma jet interactions with plasmid DNA. Appl. Phys. Lett., **98** (2011) 043701
- 10) Y. Yoshikawa, T. Mori, N. Magome, K. Hibino and K. Yoshikawa: DNA compaction plays a key role in radioprotection against double-strand breaks as revealed by single-molecule observation. Chem. Phys. Lett., **456** (2008) 80
- 11) M. Suzuki, C. Crozatier, K. Yoshikawa, T. Mori and Y. Yoshikawa: Protamine-induced DNA compaction but not aggregation shows effective radioprotection against double-strand breaks. Chem. Phys. Lett., **480** (2009) 113
- 12) Y. Yoshikawa, T. Mori, M. Suzuki, T. Imanaka and K. Yoshikawa: Comparative study of kinetics on DNA double-strand break induced by photo- and gamma-irradiation Protective effect of water-soluble flavonoids. Chem. Phys. Lett., **501** (2010) 146
- 13) H. Kurita, T. Takata, H. Yasuda, K. Takashima and A. Mizuno: A kinetic analysis of strand breaks on large DNA induced by cigarette smoke extract. Chem. Phys. Lett., **493** (2010) 165
- 14) H. Kurita, T. Nakajima, H. Yasuda, K. Takashima, A. Mizuno, J. I. B. Wilson and S. Cunningham: Single-molecule measurement of strand breaks on large DNA induced by atmospheric pressure plasma jet. Appl. Phys. Lett., **99** (2011) 221504
- 15) M. Oshige, K. Yamaguchi, S.-i. Matsuura, H. Kurita, A. Mizuno and S. Katsura: A new DNA combing method for biochemical analysis. Anal. Biochem., **400** (2010) 14
- 16) S. J. McMahon and F. J. Currell: A robust curve-fitting procedure for the analysis of plasmid DNA strand break data from gel electrophoresis. Radiat. Res., **175** (2011) 797