

一般演題2 O2-2

高気圧酸素分圧暴露による黄色ブドウ球菌 (SA) の生菌抑制効果

右田平八¹⁾ 渡辺 渡¹⁾ 宮本朋幸¹⁾明石 敏²⁾ 吉武重徳³⁾

- | | | |
|----|----------|------------|
| 1) | 九州保健福祉大学 | 生命医科学科 |
| 2) | 九州保健福祉大学 | 動物生命薬科学科 |
| 3) | 九州保健福祉大学 | 大学院保健科学研究科 |

【はじめに】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: SA) に対する HBO の臨床効果は知られており、我々は *in vitro* 実験から高気圧酸素分圧 (hyperbaric oxygen partial pressure: HBOp) 暴露による SA 増殖抑制を九州高気圧環境医学会で報告した (21st KSHM 2021.)。今回、追加実験として HBOp の暴露によって SA の呼吸活性を有する菌を定量確認し、生菌の抑制効果が示唆されたので報告する。本演題に関連して開示すべき利益相反 (COI) 関係にある企業などはない。

【対象および方法】

SA 標準菌株 (ATCC 6538) を対象にトリプチケースソイ寒天培地 (TM) に播種し 35°C のインキュベータ内で 24 時間培養した。その後、smear から掻き取った SA を 10 万倍希釈して更にインキュベータ培養し、24 時間と 48 時間後に各 1 回の HBOp 処置を行った。HBOp は実験装置 (Barotec Hanyuda P-5100) を用い 2.4 ATA 下で 60 min の暴露を行った。

HBOp 後に呼吸活性陽性菌を検出する 5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) 法を用いた蛍光二重染色法 (CTC/DAPI) による SA の呼吸活性陽性菌の定量、およびカウンター染色の DAPI で膜損傷に関わりなく蛍光 (青色) に染まった核酸細胞を活性菌と非活性菌 (全菌) とし、CTC で蛍光 (赤色) に染色されたものを呼吸活性菌 (生菌) とした。

検鏡には蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X710) を用いた。保存した TIFF 画像をアメリカ国立衛生研究所 (National Institute of Health: NIH) がサイエンス向けの画像処理ソフトとして開発した画像解析ソフト imageJ を用いて生菌を自動計数し、統計には Paired *t*-test から $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

HBOp 処置 24 時間後の DAPI と CTC (count: 全菌 / 生菌) は 1,273/1,192 であった。コントロールの nonHBOp は 1,267/1,049 であった。HBOp 処置 48 時間後は 1,227/425, nonHBOp は 1,648/768 であった。24 時間後の生菌陽性率は HBOp: 83%, nonHBOp: 93% であった。48 時間後の生菌陽性率は HBOp:

35%, nonHBOp: 47% であった。マルチウエルプレート上で希釈した観察では、24 時間後の HBOp: 416/146, nonHBOp: 882/528, 48 時間後の HBOp: 398/186, nonHBOp: 459/233 であり、24 時間後の生菌陽性率は HBOp: 35%, nonHBOp: 60%, 48 時間後の生菌陽性率は HBOp: 47%, nonHBOp: 51% であった。24 時間後の DAPI の全菌数は双方に有意差はなかったが、コントロールに比して CTC は HBOp が多くカウントされ、48 時間後に有意 ($p < 0.05$) に減少した。HBOp 処置の SA は、24 時間後に著明に増加し、48 時間後に急激に減少する傾向を得た [Fig.1]。

【考察】

通性嫌気性菌である SA は酸素の存在下では好気呼吸で ATP を生成してエネルギーを獲得する。培養された SA は大気圧下、HBOp 共に 24 時間後に急激に増殖するが、その後、徐々に減衰され、HBOp では有意に抑制することを KSHM 2021. で報告した。今回の実験でも同様に一過性に呼吸活性が進展し、その後減衰することが検証された。HBOp では、ヘンリーの法則に従って培地に溶解する酸素は分圧に比例して増加し、理論値は $DO_2: 5.7 \text{ vol}\%$ となる。増加した酸素と直接暴露される酸素によって菌のエネルギー代謝を亢進させ、細胞質構成成分 (細胞膜、細胞壁、外膜) の菌増殖サイクルを阻害して増殖を終息させ、その作用機序として、HBOp の SA に対する毒性は、酸素の還元によって生じた活性酸素種 (ROS) を不活化中和する一部酵素を SA が持っていないため、これらの ROS が DNA、蛋白などに損傷を与えて細胞破壊が起きると推測された。これは、希釈したサンプルの HBOp の陽性率が経時的に低下したのに対して、nonHBOp は関連なく増加したことが支持していると考えられた。

蛇足であるが、高分圧酸素の生体への直接暴露は酸素の薬理効果を吸入気と相まって効果的に行える酸素加圧式装置が空気加圧式よりも有利である。

【結語】

HBOp には SA に対する生菌増殖サイクルを阻害して有意に抑制する効果が示唆された。

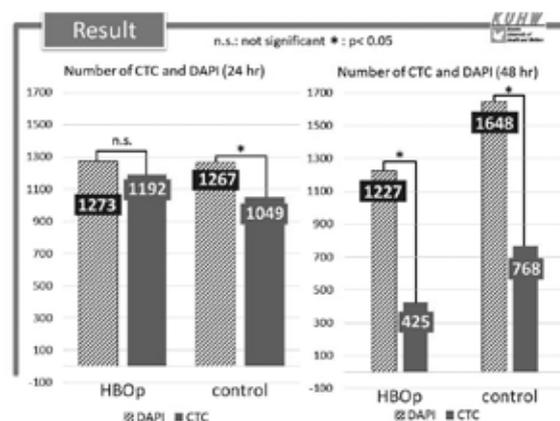


Fig.1