

【原著】

HBO環境の肺炎球菌の増殖に対する効果

河野圭将^{1,2)}, 蛭原康生³⁾, 右田平八¹⁾, 明石 敏¹⁾, 渡辺 渡¹⁾
九州医療科学大学大学院 保健医療学研究科¹⁾
独立行政法人地域医療機能推進機構 南海医療センター²⁾
医療法人仁愛会 横山病院³⁾

【要約】

肺炎連鎖球菌（肺炎球菌）は、肺炎の原因菌として最も多くを占め、敗血症などの死亡率が高い疾患の原因としても重要である。高気圧酸素治療（hyperbaric oxygen therapy : HBO）はある種の細菌感染症に対して効果があるとされているが、臨床上重要である肺炎球菌に対する報告は少ない。本研究では、HBO環境が肺炎球菌の増殖に与える影響を明らかにすることを目的とした。使用した肺炎球菌は American Type Culture Collection (ATCC) の #10813 株など 5 株であり、実験用装置 (P-5100, パロテックハニユウダ社) を用いて、2.4 ATA, 100% O₂ で 1 時間行うことを experimental HBO (eHBO) と定義して実施した。出現したコロニー数とコロニーの大きさを計測した結果、コロニー数は変化せず、コロニーの大きさは eHBO 処置により抑制されていたため、コロニーの単位面積を算出した。コロニーの単位面積は、対照群に対し eHBO 群で #10813 株をはじめ 5 株すべてにおいて、程度の差はあるが減少していた。特に #10813 株および #49619 株では、それぞれ 33.1% および 21.6% と有意に減少した。また、eHBO は肺炎球菌の増殖の盛んな時期でもコロニーの単位面積を抑制したため、感染進行中でも eHBO は効果を発揮する可能性があると考えられた。本研究により、HBO 環境による肺炎球菌の増殖抑制効果が確認された。

キーワード

実験的 HBO, #10813, コロニー数, コロニーの単位面積

【Original】

The effects of hyperbaric oxygen therapy on the growth of *Streptococcus pneumoniae* in vitro

Keisuke Kawano^{1,2)}, Kousei Ebihara³⁾, Heihachi Migita¹⁾, Toshi Akasi¹⁾, Wataru Watanabe¹⁾

- 1) Kyusyu University of Medical Science, Graduate school of Medical Life Science, Department of Medical Life Sciences
- 2) Japan Community Healthcare Organization Nankai Medical Center
- 3) Yokoyama Hospital

【abstract】

[Background] *Streptococcus pneumoniae* is the most common cause of pneumonia and is also an important cause of sepsis and other diseases with high mortality rates. In recent years, the emergence of resistant bacteria has become a medical problem, and new treatment methods are required. Hyperbaric oxygen therapy (HBO) is effective against some bacterial infections, but reports of HBO effects on the clinically important *Streptococcus pneumoniae* are few.

[Purpose] This study aimed to determine the effects of the HBO environment on the growth of *Streptococcus pneumoniae* in vitro.

[Materials and methods] Five strains of *Streptococcus pneumoniae* (SP) were obtained from

American Type Culture Collection (ATCC) in this study. HBO was performed using experimental Equipment (P-5100, Barotec Hanyuda) at 2.4 ATA in 100% O₂ for 1 hour, which was defined as experimental HBO (eHBO). SP was seeded in the Sheep Blood Ager medium and treated by eHBO. After eHBO treatment, the culture dishes were incubated in 5% CO₂ at 36°C for approximately 20 hours. After the incubation, the numbers of colonies and the colony sizes were measured.

[Results] In five strains of SP, the numbers of colonies were not suppressed but the sizes of colonies were suppressed due to eHBO treatment. Particularly, the unit area of colonies of #10813 and #49619 strains of SP significantly ($P < 0.05$) decreased 33.1% and 21.6% compared to the control, respectively. In addition, eHBO clearly suppressed the unit area of colonies of the #10813 strain in the growth phase of SP, suggesting that the HBO should be effective even during the progress of infection.

[Conclusion] This study indicates that the HBO environment slows down the growth of *Streptococcus pneumoniae* *in vitro*.

Keywords

experimental HBO (eHBO), #10813, Numbers of colonies, Unit area of colonies

【緒言】

肺炎は、本邦における成人死亡原因第4位の疾患であり、肺炎の原因菌として大部分を占めるのは肺炎連鎖球菌 *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) である^{1,2)}。肺炎球菌は通性嫌気性のグラム陽性双球菌であり、健常人の咽頭に常在する常在菌である³⁾。肺炎球菌は上気道の常在菌であり無症候性のことも多いが、免疫力が低下した高齢者やもともと免疫力の低い小児などに日和見感染を引き起こすことが知られている⁴⁾。通常、肺炎球菌に感染した場合は抗菌薬投与が治療の第一選択である。しかし、近年ではペニシリン耐性肺炎球菌をはじめ、多剤耐性肺炎球菌が出現し、医療上の問題となっている⁵⁾。このことから、耐性菌を考慮した抗菌薬投与が必要となり、肺炎球菌感染症に対する新たな治療法が求められている。

高気圧酸素治療 (hyperbaric oxygen therapy : HBO) は嫌気性菌感染症などのある種の細菌感染症に対して有効とされている⁶⁾。HBOの細菌感染症への効果は、好中球による酸素依存性殺菌機構 (oxidative killing) による殺菌効果であるとされている^{6,7)}。しかし、HBOによる細菌への殺菌効果の報告において、臨床上重要である肺炎球菌感染症に対する報告は少ない^{8,9)}。

Lercheらは、感染性心内膜炎の最も主要な原因菌であり、通性嫌気性のグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に対して、病原性を抑制するためにHBOが有効であったと報告している¹⁰⁾。また、Memarらは、HBOは活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の形成による直接的な抗菌効果により、好気性菌および嫌気性菌に対して静菌効果または殺菌効果が働き、感染症の治癒を促進すると報告している¹¹⁾。これらのことから、HBOは肺炎球菌に対しても効果を発揮する可能性があると考え、本研究ではHBO環境が肺炎球菌の増殖に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】**1. 材料**

肺炎球菌は American Type Culture Collection (ATCC) より入手した #10813 株, #700670 株, #49619 株, #6314 株および #6303 株の5株を使用した。今回用いた肺炎球菌の特徴を Table 1 に示した。培地は極東バイタルメディア社製羊血液寒天培地を用いた。

2. 実験用 HBO 装置による O₂ 曝露

実験用 HBO 装置 (P-5100, バロテックハニューダ社) を用いて、2.4 ATA, 100% O₂ 下で1時

Table 1. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* strains.

| Strain* | Serotype | Capsule type |
|---------|----------|--------------|
| #10813 | 3 | mucoid |
| #700670 | 6B | normal |
| #49619 | 19F | normal |
| #6314 | 14 | normal |
| #6303 | 3 | mucoid |

*ATCC number

間曝露することを experimental HBO (eHBO) と定義して実施した。

3. 基本的実験方法

肺炎球菌の菌液は、マクファーランド比濁法を用いて調製し、希釈した菌液を羊血液寒天培地に播種した¹²⁾。播種後に eHBO を実施し、5% CO₂、36℃のインキュベータで20時間培養を行った。対照群は同時に室温の開放系に静置した。出現したコロニーを写真撮影し、アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health : NIH) の画像解析ソフトである「image J」を用いて解析を行い¹³⁾、コロニー数とコロニーの単位面積を計測した。統計解析には、Mann-Whitney *U*-test を用いて、有意水準は $P < 0.05$ とした。

4. #10813 株および他の 4 株に対する eHBO の効果の検討

#10813 株を含む 5 株の肺炎球菌に対し、播種直後に eHBO を 1 回実施し、対照は同時に室温の開放系に静置した。処置後、5% CO₂、36℃のインキュベータで20時間培養を行った。その後、出現したコロニーの数とコロニーの単位面積を計測した。本検討では、#10813 株に対して 6 回、#700670 株に対して 6 回、#49619 株、#6314 株および #6303 株に対して 3 回の試験をそれぞれ実施した。

5. コロニーの経時的な変化の観察

#10813 株に対し播種直後に eHBO を 1 回実施し、対照は同時に室温の開放系に静置した。その後、5% CO₂、36℃のインキュベータで播種 20 時

間後まで培養した。培養中は 2 時間おきに出現したコロニーの変化を観察した。本検討は、対照群と eHBO 群でそれぞれ羊血液寒天培地プレートを 2 枚ずつ使用し、1 回の試験を実施した。

6. #10813 株の増殖の盛んな時期に対する eHBO の効果の検討

#10813 株の増殖の盛んな時期 (対数増殖期) である播種 6 時間後に eHBO を 1 回実施した¹⁴⁾。対照は同時に室温の開放系に静置した。eHBO 群、対照群ともに菌の播種から eHBO 処置までの間インキュベートした。eHBO 処置後、5% CO₂、36℃のインキュベータで20時間培養を行った。その後、出現したコロニーの数とコロニーの単位面積の計測を行った。

【結果】

1. #10813 株および他の 4 株に対する eHBO の効果

#10813 株は成人の侵襲性肺炎球菌性感染症の一般的な血清型である 3 型であり、病原性の高いムコイド型である。そこで、#10813 株を代表として使用し、他の 4 株に対しても eHBO の効果を検討した。#10813 株を含む 5 株に対し播種直後に eHBO を実施し、出現したコロニーの数およびコロニーの単位面積を計測した結果を Fig. 1, 2 に示した。対照群と eHBO 群間では、#10813 株はじめ、どの菌株においてもコロニー数には明確な差を認めなかった (Fig. 1)。しかし、eHBO 群のコロニーの大きさは抑制されていたため、単位面積を算出して比較した (Fig. 2)。eHBO 処置により、対照群と比較して程度の差はあるがどの菌株においてもコロニーの単位面積は減少していた。特に #10813 株および #49619 株においては、それぞれ 33.1% および 21.6% と有意に減少した ($P < 0.05$)。このように eHBO により肺炎球菌の増殖が抑制され、結果的としてコロニーの面積の抑制が認められた。

2. #10813 株のコロニーの経時的な変化

#10813 株の播種直後に eHBO を実施し、時間経過によるコロニーの変化を観察した結果を Table 2 に示した。コロニー数には特徴的な変化がなかった

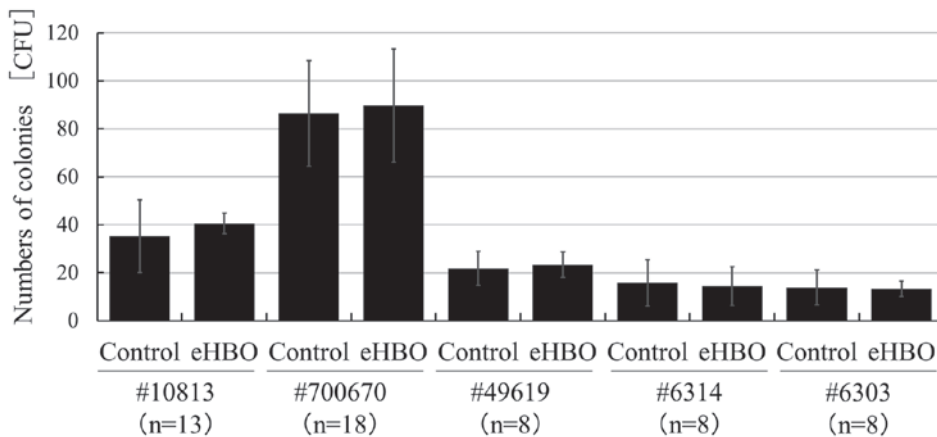


Fig. 1 : Effects of eHBO on the numbers of colonies of *Streptococcus pneumoniae*. The data represents mean \pm standard deviations of value from eight to eighteen samples for the five strains of *Streptococcus pneumoniae*.

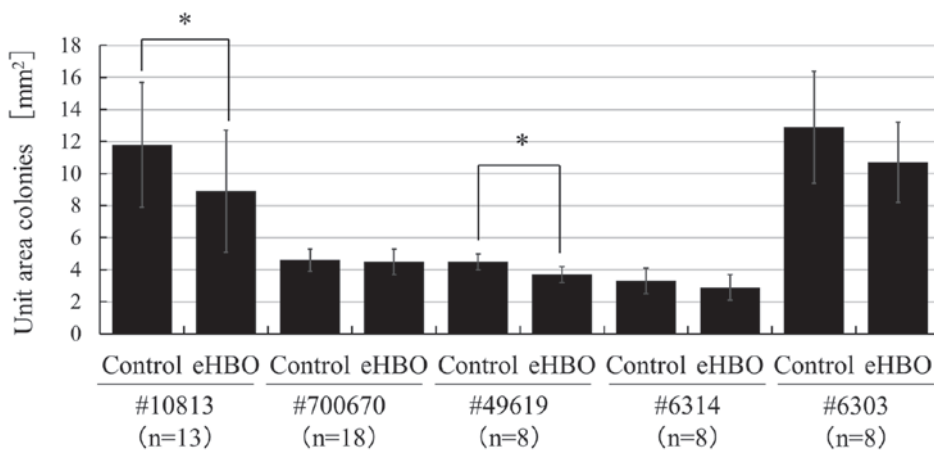


Fig. 2 : Effects of eHBO on the unit area of colonies of *Streptococcus pneumoniae*. The data represents mean \pm standard deviations of value from eight to eighteen samples for the five strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Significantly different from Control at $P < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test).

Table 2. The effects of eHBO on the unit area of colonies of the #10813 strain of *S. pneumoniae* over time after *S. pneumoniae* seeding.

| Treatment | Unit area of colonies [mm ²] | | | | | |
|---------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 2~10 hrs | 12 hr | 14 hr | 16 hr | 18 hr | 20 hr |
| Control (n=2) | 0 | 0.49 \pm 0.05 | 1.20 \pm 0.01 | 2.58 \pm 0.26 | 5.12 \pm 0.70 | 7.13 \pm 0.18 |
| eHBO (n=2) | 0 | 0.31 \pm 0.05 | 0.90 \pm 0.15 | 1.81 \pm 0.14 | 3.72 \pm 0.01 | 5.41 \pm 0.01 |

The data represents mean \pm standard deviations of values of two control or eHBO treatment on the course of time after *S. pneumoniae* seeding.

ため、コロニーの単位面積で示した。対照群と eHBO 群間でコロニーが解析可能な大きさになったのは播種 12 時間後であり、経時的なコロニー数の変化もなかった。しかし、コロニーの単位面積は経時的な拡大を示し、対照群と比較して eHBO 群の方が抑制されていた。

3. #10813 株の対数増殖期に対する eHBO の効果

対数増殖期である播種 6 時間後に、#10813 株に対し eHBO を実施した結果を Fig. 3 に示した。播種直後に eHBO を実施した結果と同様に、コロニー数では対照群と eHBO 群で大きな差はなかった。しかし、コロニーの単位面積では eHBO 群は対照群に対して 33.1% 有意に減少した ($P < 0.05$)。

【考察】

本研究では、HBO 環境が肺炎球菌に与える影響について検討した。肺炎球菌は莢膜血清型により 90 種類以上に分類され、特に血清型 3 型の菌株はより厚い莢膜を有しており、成人の侵襲性肺炎球菌感染症で最も分離率が高いことが知られている^{15,16}。本研究には計 5 株の肺炎球菌を用いたが、このような背景から血清型 3 型であり、より病原性の高いムコイド型である #10813 株を代表として用いて研究を進めた¹⁷。Fig. 1, 2 で示した #10813 株と他の 4 株に対する eHBO の効果の検

討では、播種直後に eHBO を実施し、出現したコロニーの数とコロニーの大きさを計測した。先行研究では、HBO による細菌への効果は静菌効果または殺菌効果であるとされており¹¹、eHBO によるコロニー数の減少を期待したが、本研究では全ての菌株でコロニー数は変化しなかった (Fig. 1)。ところが、コロニーの大きさが抑制されていたため、コロニーの単位面積を算出して比較したところ、5 株中 2 株で対照群に対して eHBO 群が有意に減少した (Fig. 2)。これらのことから、eHBO はコロニー数を減少させないため、肺炎球菌への殺菌効果がないことが確認できた。しかし、コロニーの単位面積は有意に減少したことから、eHBO は肺炎球菌に対して増殖抑制効果があると考えられた。さらに Fig. 2 で示したように、#700670 株を除く 3 種類の菌株に対しても eHBO による増殖抑制傾向が見られた。この効果は肺炎球菌の血清型や莢膜型の差異が関与している可能性があるため、追実験を行う必要性があると考えられた。

Table 2 に示した #10813 株の時間経過によるコロニーの変化の観察では、播種直後に eHBO を実施した後、出現したコロニーを 2 時間おきに経時的に計測した。対照群と eHBO 群間でコロニーが出現した時間には差はなく、コロニー数にも変

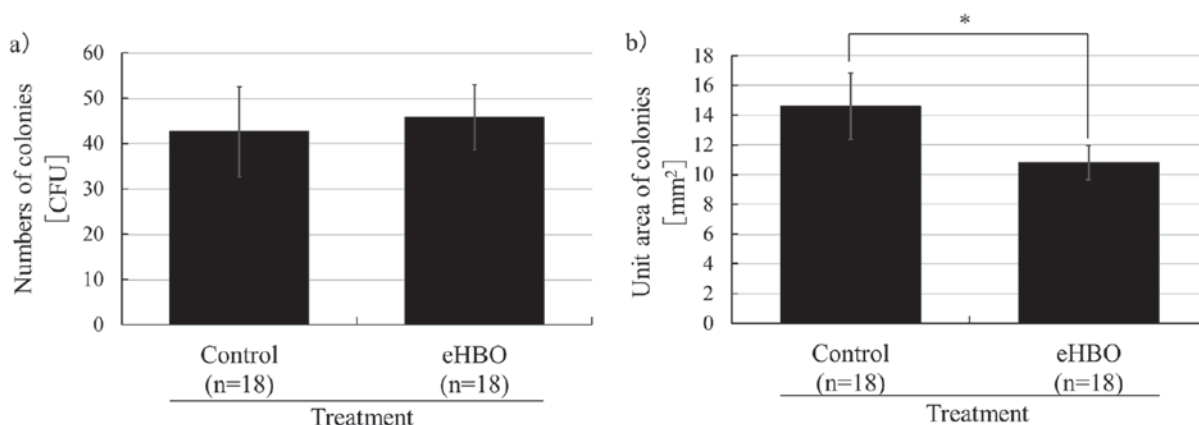


Fig. 3 : Effects of eHBO treatment at 6 hours after the bacterial seeding on the growth of the #10813 strain of *Streptococcus pneumoniae*. a) Numbers of colonies. b) Unit area of colonies. Treatment of eHBO was carried out 6 hours after *Streptococcus pneumoniae* seeding. The data represents mean \pm standard deviations of values of eighteen control or eHBO treatment. *Significantly different from Control at $P < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test).

化はなかった。そして経時的な変化の観察から、eHBOによるコロニーの単位面積の抑制は、菌の増殖抑制を反映した結果であることが再確認できた。これらの結果を受け、さらに肺炎球菌の播種6時間後ではすでに対数増殖期に入っているとの報告から¹⁴⁾、播種6時間後でのeHBOの効果を検討した(Fig. 3)。eHBOによる増殖抑制効果は、肺炎球菌の増殖が盛んな時期においても確認され、HBOは臨床においても効果を発揮する可能性が高いことが示唆された。

これまで報告されているHBOの抗菌効果のメカニズムは、菌体内でのROSの産生誘導による核酸等の損傷であり、黄色ブドウ球菌を始めとして複数の細菌について報告されている¹⁸⁻²¹⁾。一方、肺炎球菌では他の菌と異なりこのROSに対する抗酸化酵素であるカタラーゼが欠損しているが、それを補完する高活性のチオールペルオキシダーゼを有しているとの報告もある²²⁾。本研究でeHBOにより殺菌効果が得られなかったのは、このような肺炎球菌の酸化ストレスに対する特殊性が関与している可能性が高く、今後検証していきたい。

本研究により得られたHBO環境による肺炎球菌への増殖抑制効果は最も効果が得られた#10813株で30%程度であるが、これはeHBO(2.4 ATA, 100% O₂, 1hr)を1回のみ施行したという限られた条件であった。そのため、施行回数、設定圧力および施行時間の変更により、肺炎治療に活用できる高い効果が得られる可能性が高い。今後、HBOを肺炎球菌による感染症の治療あるいは補助療法として確立するために、さらに追実験を実施してHBOによる効果を裏付ける予定である。

【結語】

HBO環境における肺炎球菌への効果は、増殖抑制効果であった。また、HBO環境による増殖抑制効果は肺炎球菌の対数増殖期においても確認され、HBOは臨床の場でも効果を発揮する可能性が示された。

【謝辞】

本研究に関連した研究情報をご提供いただいた医療法人宝持会池田病院の佐藤優哉氏に深く感謝申し上げます。尚、本研究は2023年に開催された第57回日本高気圧環境・潜水医学会学術集会の一般演題で発表しました。本研究の著者ならびに共著者は開示すべき利益相反(COI)はありません。

参考文献

- 1) 鷺尾昌一, 石崎達郎, 植木章三, 他.: 高齢者の市中肺炎(院外肺炎)の危険因子とインフルエンザワクチン・肺炎球菌ワクチン: 公衆衛生モニタリング・レポート委員会報告. 日本公衆衛生雑誌 2023; 70: 351-358.
- 2) 木村聡一郎, 館田一博: 肺炎球菌の病原性. 臨床と微生物 2016; 43: 315-320.
- 3) Domon H, Terao Y: The role of neutrophils and neutrophil elastase in pneumococcal pneumonia. Front Cell Infect Microbiol 2021; 11: 615959.
- 4) Li L, Ma J, Yu Z, et al.: Epidemiological characteristics and antibiotic resistance mechanisms of Streptococcus pneumoniae: An updated review. Microbiol Res 2023; 266: 127221.
- 5) 今村圭文, 河野茂: 肺炎診療ガイドライン: 日本における総括と今後への展望. 日本内科学会誌 2015; 104: 2228-2236.
- 6) 柳下和慶: 高気圧酸素治療の適応疾患—概論—. In: 鈴木信哉(編). 高気圧酸素治療法入門第6版. 東京: 一般社団法人日本高気圧環境・潜水医学会. 2017; pp. 109-116.
- 7) Oley MH, Oley MC, Wewengkang LAJW, et al.: Bactericidal effect of hyperbaric oxygen therapy in burn injuries. Ann Med Surg (Lond) 2022; 74: 103314.
- 8) 久保健児, 千代孝夫, 岡本洋史, 松島暁: 電撃性紫斑病の臨床的検討—本邦における原因菌の特徴を含めて—. 感染症学雑誌 2009; 83: 639-646.
- 9) 鮫島浩司, 川内義久, 丸山裕之, 他.: 感染性脊椎疾患に対する高気圧酸素療法を併用した保存療法. 整形・災害外科雑誌 2007; 56: 211-213.
- 10) Lerche CJ, Schwartz F, Pries-Heje MM, et al.: Potential Advances of adjunctive hyperbaric oxygen therapy in infective endocarditis. Front Cell Infect Microbiol 2022; 12: 805964.
- 11) Memar MY, Yekani M, Alizadeh N, Baghi HB: Hyperbaric oxygen therapy: Antimicrobial mechanisms and clinical application for infections. Biomed Pharmacother 2019; 109: 440-447.
- 12) 中山浩次: レンサ球菌. In: 吉田眞一, 柳雄介, 吉開泰

- 信 (編). 戸田新細菌学改訂 34 版. 東京; 南山堂. 2015 ; pp. 245-256.
- 13) Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ: Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004 ; 11 : 36-42.
- 14) 宮下勝人: 薬剤耐性遺伝子型別に基づく *Streptococcus pneumoniae* の増殖能に関する解析. *感染症学雑誌* 2008 ; 82 : 292-299.
- 15) 河原隆二, 山口貴弘, 安楽正輝, 他.: 大阪府における侵襲性肺炎球菌感染症由来菌株の血清型分布: 2018-2021 年. *IASR* 2023 ; 44 : 7-8.
- 16) 千葉菜穂子: わが国における侵襲性肺炎球菌感染症の実態とその予防としての肺炎球菌ワクチン. *日本化学療法学会雑誌* 2011 ; 59 : 561-572.
- 17) 川崎聡, 青木信樹, 田端篤, 本間康夫: ムコイド型, 非ムコイド型肺炎球菌性市中肺炎の比較. *日本化学療法学会雑誌* 2016 ; 64 : 280-285.
- 18) Schwartz FA, Lerche CJ, Christophersen L, et al.: Distinct contribution of hyperbaric oxygen therapy to human neutrophil function and antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*. *APMIS* 2021 ; 129 : 566-573.
- 19) 松下一信: 細菌呼吸鎖の特徴—チトクロムオキシターゼの多様性と可変性—. *日本農薬学会誌* 1996 ; 21 : 97-103.
- 20) 石田恒雄: 銅 (II) イオン溶液によるバクテリアの溶菌・殺菌過程と DNA 塩基対損傷. *Biomedical Research on Trace Elements* 2016 ; 27 : 151-161.
- 21) Cabisco E, Tamarit J, Ros J: Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 2000 ; 3 : 3-8.
- 22) Hajaj B, Yesilkaya H, Benisty R, et al.: Thiol peroxidase is an important component of *Streptococcus pneumoniae* in oxygenated environments. *Infect Immun* 2012 ; 80 : 4333-4343.