

Legionella 実験肺炎モデルにおける rG-CSF, ceftazidime の併用効果

宮 良 高 維

琉球大学医学部第一内科*

(平成5年3月22日受付・平成5年6月11日受理)

Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (rG-CSF) の *Legionella* 感染実験肺炎に対する効果を検討した。亜致死量 (1×10^4 CFU/body) のレジオネラを感染せしめたモルモットの循環血中の好中球数は増加し、これは肺胞腔内にも浸潤していた。感染12時間後から $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の rG-CSF を1日2回投与すると、循環血中とBALF中の好中球数は対照群より多く保たれる傾向が観察された。*Legionella* に対する *in vitro* での抗菌活性は強いが、細胞内移行が不良なために *Legionella* 肺炎に無効である ceftazidime を rG-CSF と併用投与することにより、亜致死量感染下のモルモットの肺では生菌数の減少する傾向があることが観察された。同様の治療を致死量 (5×10^6 CFU/body) 感染モルモットに施した場合は生存率の有意な上昇が観察され、体重変化の観察においても上記2者の併用療法は rG-CSF 単独あるいは抗生剤単独の治療群と比較して体重の減少が有意に少なかった。以上より細胞内増殖菌である *Legionella* に対して、抗生剤とともに rG-CSF を併用投与すると、好中球の数と機能を上昇させ、その結果感染初期の菌量を減少せしめる効果があり、治療効果が得られることが示唆された。

Key words: *Legionella pneumophila*, recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (rG-CSF), polymorphonuclear leucocyte

Legionella pneumophila は通性細胞内寄生菌であり、ヒトとモルモットのマクロファージ内で増殖可能である^{1,2)}。その感染防御の主体は他の細胞内寄生菌と同じく、細胞性免疫と考えられている³⁾。そして、活性化されたマクロファージがその増殖を抑制するようになることが知られている⁴⁾。しかし、細胞性免疫が成立し、モルモットにおいてマクロファージが *Legionella* の増殖を抑制し始めるのは感染4日目以降とされている⁴⁾。したがってこれ以前の時期の *Legionella* による肺感染初期の防御は肺胞に浸潤してくる好中球や未活性化マクロファージ等による非特異的生体防御機構が大きな役割を果たしていると考えられる。

当教室の大湾⁵⁾は、この感染初期の非特異的生体防御の活性化を macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) の投与により試みた。M-CSF の前投与により、単独では *Legionella* 感染に対して無効な β ラクタム系抗生剤を併用することで、実験肺炎モデルのモルモットの生存率を上昇せしめることが証明された⁶⁾。

一方、最近では *Legionella* の初期感染防御としての好中球の重要性を示唆する報告がなされている^{7,8)}。すなわち、*Legionella* は活性化されていないマクロファージの殺

菌機構を離脱し、その内部で増殖し得るが^{9,10)}、好中球内では通常生菌を観察できないこと⁹⁾、好中球を減少させたモルモットでは *Legionella* に対する感受性が上昇することなどである^{7,8)}。以上のような事実から *Legionella* 感染初期にマクロファージよりも量的に多く、殺菌力の強い好中球を rG-CSF を投与することでその数を増やし機能を活性化することで、肺炎を軽症化することが可能ではないかと考え本研究を行った。

I. 材料と方法

1. 使用菌株

本邦初の臨床分離菌株である *Legionella pneumophila* serogroup 1 (80-045 株) を用いた¹⁰⁾。本菌をモルモット腹腔内に投与して、4日目に死亡した個体の肺内より回収することを3回繰り返した後、BCYE- α 寒天培地上で 37°C 、72時間培養した菌を血清保存チューブに分注し、スキムミルク中で -70°C に保存した。この保存菌を各実験毎に BCYE- α 寒天培地上で 37°C 、72時間の再培養を行って用いた。また本菌のモルモット肺炎における LD_{50} 値は 2.1×10^5 CFU/body であった。

* 沖縄県西原町上原 207

2. rG-CSF と抗生物質

中外製薬より分与された rG-CSF¹¹⁾ を -70°C に保存し、使用直前にこれを融解して用いた。

抗生物質は ceftazidime (CAZ; 日本 Glaxo) を用いた。 *L. pneumophila* 80-045 株に対する MIC 値は微量液体希釈法にて $0.0625 \mu\text{g/ml}$ であった。

3. 感染動物

Hartley 系モルモット (SPF, 雄, 日本 SLC), 体重 280 g を実験を通じて用いた。実験前に 4~7 日間の観察期間をおいた。

4. 好中球の調製

Xyladine chloride (Bayer Japan Inc.) と ketamin chloride (三共製薬) をそれぞれ 80 mg/kg および 5 mg/kg の混合液としてモルモットの全身麻酔に用いた。採血はヘパリン加シリンジでモルモットの心臓より行った。3% デキストラン生食で赤血球を分離後、Ficall-Paque (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) による密度勾配遠心法で好中球を回収し、さらに残存する赤血球を低調溶血で除去した。好中球は pH 7.4 の Ca^{2+} free Krebs Ringer 磷酸緩衝液 (KRP) に浮遊し 95% 以上の viability があることを trypanblue 染色で確認して用いた。

5. FMLP, PMA による活性酸素産生に対する rG-CSF の priming 効果

pH 7.4 の Ca^{2+} free KRP に 1×10^6 個/ml に浮遊した好中球を 50 ng/ml の rG-CSF と 37°C で 10 分間反応させた後、最終濃度がそれぞれ 3×10^5 個/ml の好中球、 5.4 mM の glucose と $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ の cytochrome C (Sigma chemical Co., St. Louis U.S.A.) の混合物に刺激剤を添加して測定した。刺激剤は N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP; $1 \times 10^{-7} \text{ M}$; Sigma Chemical Co.) と phorbol myristate acetate (PMA; 0.1 mg/l ; Sigma Chemical Co.) を dimethyl sulphoxide (DMSO) 中で -80°C で保存したものを用時に希釈調整して用いた。

O_2^- の産生量の測定はチトクローム C の還元能を二波長吸光度計 (Shimadzu UV-3000; Shimadzu Corp.) により 550 nm , 540 nm の吸光度を測定し、 5×10^5 個の好中球の 1 分間あたりの産生量で表した。

6. rG-CSF 皮下注後の末梢血中の好中球数

モルモットに rG-CSF $100 \mu\text{g/kg/ml}$ を皮下注し、皮下注直前と 4 時間毎の 24 時間までと 30 時間目に麻酔下に眼窩採血を行った。Tuerk 液で希釈して総白血球数を計数し、May-Giemsa 染色を施した塗末標本で分画を算定した。対象群には生食を皮下注し、同

様の計測を行った。

7. Legionella 肺炎モデルの作製

モルモットに対する肺炎の作製は斎藤ら¹²⁾の方法で行った。麻酔下に前頸部皮膚を切開して、気管を露出し、致死量感染モルモットには 5×10^6 CFU を、亜致死量感染モルモットには 1×10^4 CFU の菌量を 0.2 ml の生食に懸濁して接種した。

8. 治療方法

rG-CSF の投与量は、予備実験の結果よりその末梢血好中球数の増加が投与量依存であったことと、好中球上昇の持続時間から $100 \mu\text{g/kg}$ の 1 日 2 回皮下注とした。抗生剤 (CAZ) の投与量はヒトの常用投与量の 40 mg/kg に換算し 1 日 2 回に分けて腹腔内注射とした。

動物は治療法別に 4 群に分けた。すなわち、rG-CSF 単独治療群、CAZ 単独治療群、両者の併用治療群および対象群であった。対象群は生理食塩水の皮下注と腹腔内注射を治療期間中に行い、rG-CSF と CAZ の単独治療群ではそれぞれ生食の腹腔内注射と皮下注射を追加して行った。

治療開始後の感染菌量は 4 日目以降は減少を始めることから治療期間を 5 日間とし、さらに 3 日間観察して毎日体重を測定した。生存期間は Kaplan-Meyer 法で算出した。

9. 末梢血中好中球数と肺胞洗浄液 (BALF) 中の好中球数の計数

亜致死量感染モルモットの感染後 rG-CSF による治療を上記のように行い 2 日目、4 日目および 5 日目に末梢血と BALF 中の好中球数を調べた。BALF 採取法は河野ら¹³⁾の方法に準じて行った。すなわち、全身麻酔下に心臓採血にて十分脱血した後、前頸部を切開して気管を露出し、polyethylene カテーテルを挿入して結紮固定後、 5 ml のヘパリン加生食を注入し、これを回収する方法であった。この操作を繰り返し、回収量が 25 ml となった時点で 4°C , $150 \times \text{g}$, 10 min. の遠沈を行い EDTA 加生食 2 ml に再浮遊した。総白血球数と白血球分画は末梢血中の場合と同様に行った。

10. 肺内生菌数の測定

亜致死量感染モルモットに対し治療効果の検討の項と同じく治療を行い、治療 2 日、4 日および 5 日後の肺内生菌数を調べた。

全身麻酔下に胸部を広範にイソジン消毒後、心臓より十分脱血し無菌的に両肺を摘出した。生食で洗浄後、容量 10 ml となるように pH 7.0 の PBS を加えて氷水中でホモジナイズした。この検体を希釈して

BCYE- α 寒天培地上に展開し、37°C、72 時間培養後のコロニー数で生菌数 (CFU) を表した。

11. 統計学的処理

平均値の差の検定は Student の t-test により、平均生存期間は Kaplan-Mayer 法により算出し、generalized Wilcoxon test により生存期間の差を検定した。p 値が 0.05 以下の場合に有意差ありとした。

II. 結 果

1. 正常モルモット好中球に対する rG-CSF の影響

Table 1 に示したように、正常 (非感染) モルモットに対する rG-CSF 100 μ g/kg 皮下注時の好中球数増加のピークは 8 から 12 時間目にあり、好中球数は 8,000/mm³ 程度まで上昇し、その後速やかに減少した。投与量はヒトの場合と比較して大量であったが、好中球数の経時変化のパターンは正常ヒトの場合とほぼ同様であった。

FMLP および PMA による活性酸素産生に対する rG-CSF の priming 効果は Fig. 1 に示したようにヒト好中球の反応と同じく、この 2 つの刺激剤のうちで FMLP を使用した場合にのみ有意な活性酸素産生量の上昇をきたす priming 効果を認めた。

2. 亜致死量感染時の末梢血中、BALF 中好中球数の経時変化

Table 2 および 3 に亜致死量感染時の末梢血および BALF 中の好中球数の経時変化を示した。

Table 2 に示したように感染のみで末梢血好中球は

上昇するが、感染 2 日後に peak に達し、感染極期である 4 日目から回復期にはいる 5 日目にかけて漸減した。しかし、rG-CSF による治療群では、好中球を含めた白血球の減少の程度が低い傾向が見られ、2 日目と 5 日目の間には有意差が見られた ($p < 0.01$)。同

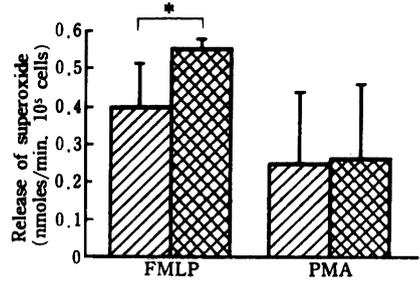


Fig. 1. Priming capacity of rG-CSF for release of superoxide from PMNLs.

Total superoxide production of rG-CSF treated PMNLs stimulated with FMLP (0.1 μ M) and PMA (0.1 mg/l). Each column represents the average of three independent experiments. The cross-hatched shaded column represents data from the rG-CSF treated PMNLs, and the oblique line shaded column represents that of controls.

Error bars represent the standard error of the mean.

* $p < 0.05$ compared with control.

Table 1. Changes in peripheral leucocytes and PMNLs after administration of a single dose of rG-CSF (100 μ g/kg) (n=4 and 3)

Hours after injection	Total leucocyte count (/mm ³)		PMNL count (/mm ³)	
	G-CSF (100 μ g/kg, s.c)	control	G-CSF (100 μ g/kg, s.c)	control
0	2,941 \pm 531 ^{a)}	4,448 \pm 490	1,716 \pm 152 ^{a)}	2,429 \pm 177
4	5,993 \pm 997 ^{a)}	5,325 \pm 1,188	3,724 \pm 2,396 ^{a)}	3,952 \pm 818
8	9,439 \pm 2,409	5,069 \pm 671 ^{a)}	7,922 \pm 2,113*	4,392 \pm 617 ^{a)}
12	8,695 \pm 2,291	4,210 \pm 725 ^{a)}	6,676 \pm 1,729*	3,261 \pm 548 ^{a)}
16	6,853 \pm 1,264	4,780 \pm 1,825	5,081 \pm 1,119	3,385 \pm 953
20	7,450 \pm 1,230	4,658 \pm 504	4,658 \pm 1,726	3,248 \pm 470
24	6,443 \pm 1,459	4,003 \pm 948 ^{a)}	4,357 \pm 379	2,638 \pm 1,022 ^{a)}
30	5,725 \pm 977	4,071 \pm 620	3,627 \pm 974	2,553 \pm 260

(n=3 and 4)

^{a)} n=3

* $p < 0.05$ compared with control.

Table 2. Effect of rG-CSF treatment on peripheral leucocyte and PMNL counts in circulating blood

peripheral blood	Total leucocyte count (/mm ³)		PMNL count (/mm ³)	
	G-CSF treated	control	G-CSF treated	control
days after infection				
0*		2,971±1,031		925± 275
2	8,119±3,025	7,350±1,274	5,587±2,487	4,664±1,076
4	2,993±1,401	2,115± 760	2,033±1,044	669± 317
5	4,098± 820	611± 130	1,997± 737**	131± 47

(n=4)

* before injection

** p<0.01 compared with control.

Table 3. Effect of rG-CSF treatment on leucocyte and PMNL count in BALF

BALF	Total leucocyte count (/mm ³)		PMNL count (/mm ³)	
	G-CSF treated	control	G-CSF treated	control
days after infection				
0*		256±156		28± 23
2	1,151± 375	765±333	730±283	503±215
4	722± 184	655±258	463±130	284±173
5	724± 292	326±107	356±195	204± 50

(n=4)

* before injection

様の現象は Table 3 に示したごとく BALF 中の好中球数の経時変化でも認められた。

3. 肺内生菌数の経時変化

Fig. 2 に示すように、亜致死量感染を行った対照群のモルモットでは感染 4 日目までの肺内生菌数は増加を続けた。rG-CSF 単独治療群の肺内生菌数は対照群との比較では有意差はみられなかったものの感染の経過中は常に低い傾向であった。CAZ 単独治療群では、さらに生菌数が減少したもののこれに rG-CSF を加えた併用治療群が感染経過中を通じてもっとも生菌数が低い傾向が認められた。

4. Legionella 肺炎モデルの治療

致死量感染モルモットにおける各治療群の生存曲線を Fig. 3 に示した。対照群が 5 日目までにすべて死亡するのに対して、rG-CSF, CAZ の両者の併用群では生存率が有意に上昇した (p<0.05)。両者併用治療群と単独治療群の間には有意な差は認められなかった。Fig. 4 に示した体重変化の経時的観察では併用治療群とその他の群の間で有意な差が認められた (p<0.05)。

III. 考 察

細胞内増殖菌である *Legionella* の主な感染防御機構は細胞性免疫であるとされている³⁾。また、*Legionella* によるモルモットの実験肺炎では感染初期に肺胞内には大量の好中球の浸潤が認められ、これに遅れてマクロファージが遊走してくることが知られている¹⁴⁾。

マクロファージ内には生菌を認めるが、好中球内では菌抗原や菌体の破片を認めても生菌を認めることが少ないことから⁷⁾、*Legionella* 感染初期の感染防御には好中球を中心とした非特異的生体防御の重要性が予想されていた。事実、モルモットの好中球を選択的に減少させた場合には *Legionella* に対する感受性が上昇することが報告されている^{6,7)}。

また、大瀧ら⁵⁾によるマクロファージの活性化を行った *Legionella* 肺炎モデルの検討では、M-CSF を感染前から投与開始し、単独投与では *Legionella* 肺炎に対して無効な β -ラクタム系抗生剤である CAZ との併用により有意に生存率を上昇せしめている⁵⁾。

M-CSF と同じく、近年あらたに開発された組み替

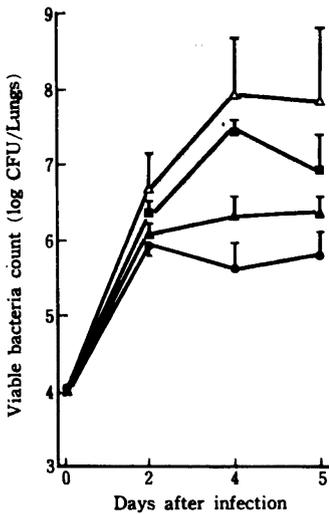


Fig. 2. Effect of rG-CSF on multiplication of *Legionella pneumophila* in lungs of sublethally infected guinea pigs.

Viable bacteria were counted at intervals after guinea pigs had been inoculated intratracheally with 1×10^4 CFU of the organism. Treatment: closed squares: rG-CSF (100 μ g/kg twice a day, n=3); closed triangles: CAZ (40 mg/kg per day, n=4); closed circles: rG-CSF (100 μ g/kg twice a day) plus CAZ (40 mg/kg per day, n=4); open triangles: saline.

え型サイトカインの一つである rG-CSF はヒト末梢血好中球数を増加させ¹⁵⁾、活性酸素産生能を高め、chemokinesis や chemotaxis、食食能、殺菌能等の好中球機能を高める作用があることが報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。

ヒトの組み替え型 G-CSF は Table 1 や Fig. 2 に示した結果から、モルモット好中球に対してもヒトの場合とほぼ同様に作用すると考えられ、治療実験にはこの rG-CSF を用いた。また、併用する抗生剤としては、細胞内移行の不良な β -ラクタム系抗生剤¹⁹⁾ は、細胞内寄生菌である *Legionella* に対して、臨床的にも²⁰⁾ *in vivo* での実験的検討²¹⁾ でも効果が認められない。その中で CAZ は *in vitro* での MIC 値が低く、細胞外に存在する菌に対しては抗菌力を発揮することが予想されるので、本実験では CAZ を用いた。

この両者の併用により、好中球に食食された菌は rG-CSF により活性化された殺菌能により殺菌され、細胞外に存在する菌に対しては CAZ により殺菌されることが推測され、相加あるいは相乗効果が予想され

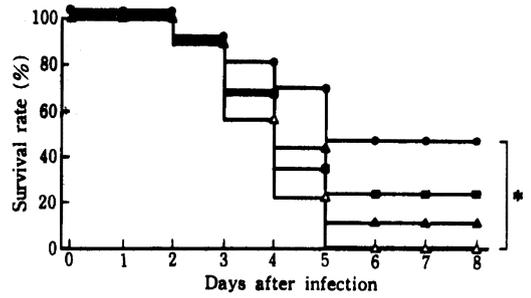


Fig. 3. Therapeutic effects of rG-CSF in experimental *Legionella pneumophila* pneumonia in guinea pigs.

The guinea pigs were inoculated with 5×10^6 CFU of *L. pneumophila* pneumonia. Treatment: closed squares: rG-CSF (100 μ g/kg twice a day); closed triangles: CAZ (40 mg/kg per day); closed circles: rG-CSF (100 μ g/kg twice a day) plus CAZ (40 mg/kg per day); open triangles: saline. Each treatment group consisted of 9 guinea pigs.

* $p < 0.05$ compared with control.

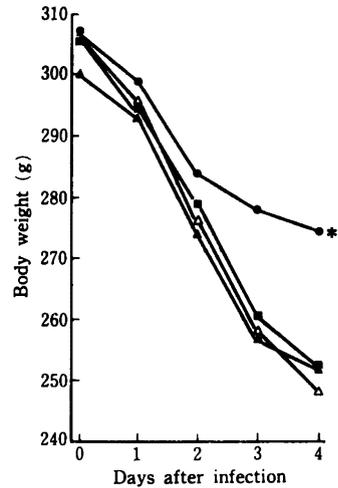


Fig. 4. Weight changes in lethally infected guinea pigs.

Treatment: closed squares: rG-CSF (100 μ g/kg twice a day); closed triangles: CAZ (40 mg/kg per day); closed circles: rG-CSF (100 μ g/kg bid) plus CAZ (40 mg/kg mid); open triangles: saline.

* $p < 0.05$ compared with other treatment and control groups.

た。

亜致死量感染による治療実験系の末梢循環血中、ならびに肺胞内の好中球動態は、感染2日目から極期である感染4日目の間の好中球の減少が、rG-CSFの投与群では対照群より軽減している傾向があった。これは投与されたrG-CSFにより、末梢血中の好中球数の増加と遊走能が高められ、炎症の場における好中球浸潤を対照群より増加させたためと考えられた。また、同じ系で検討した肺内生菌数の経時変化からは、この好中球動態が肺内の生菌数の減少に寄与している可能性が考えられた。この肺内生菌数はCAZとの併用でさらに減少する傾向が観察されており、両者の併用効果がみられるものと解釈される。致死量感染実験系での生存率の上昇は、この生菌数の減少が関与している可能性が考えられた。

感染局所に浸潤した好中球はその機能も上昇していることが十分考えられるが、浸潤した好中球を機能面で評価する有用な方法はまだ確立したものが無い。本検討で行った浸潤好中球の量の評価は、rG-CSF治療群と対照群で有意差はなかったが、感染症に対するrG-CSF投与の効果は好中球の数のみによるものではないと考えられるため、機能面での差の検討が可能となれば、あわせて評価することで有意差が得られる可能性はある。

致死量感染実験の結果は感染12時間後からのrG-CSFの投与でもCAZを併用することで対照群と比較して有意な生存率の上昇がみられた。さらに、各治療群の体重の経時的観察では、併用治療群とその他の群との間で平均体重の有意な上昇が見られた。

これらの結果より細胞内寄生菌である*Legionella*の肺感染の初期に、好中球を中心とした非特異的生体防御が重要であることが示唆され、早期のrG-CSFによる好中球の活性化が、単独では治療効果のみられない抗生剤との併用によりすぐれた治療効果をもたらすことが明らかになった。rG-CSFと抗生剤との併用効果については*Legionella*の感染以外でもすぐれた併用効果を示す報告がなされつつあり²²⁻²⁴⁾、細胞移行率の高い抗生剤とrG-CSFにとの併用でも同様にすぐれた治療効果が期待できるものと思われる。

謝 辞

本研究を行うに当たって御指導と御校閲を頂きました斎藤厚教授、ならびに種々の検討では御指導を頂きました草野展周先生、大瀧勤子先生に感謝致します。

文 献

1) Horowitz M A, Silverstein S C: Legionnaires',

disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. J Clin Invest 66: 441~450, 1980

- 2) Kishimoto R A, White J D, Shirey F G, McGann V G, Berndt R F, Larson E W, Hedlund K W: In vitro response of guinea pig peritoneal macrophages to *Legionella pneumophila*. Inf Immun 31: 1209~1213, 1981
- 3) Horowitz M A. Cell-mediated Immunity in Legionnaires', disease. J Clin Invest 71: 1686~1697, 1983
- 4) Nikaido Y, Yoshida S, Goto Y, Mizuguchi Y, Kuroiwa A: Macrophage-activating T-cell factor (s) produced in an early phase of *Legionella pneumophila* infection in guinea pig. Inf Immun 57: 3458~3465, 1989
- 5) Owan I, Saito A: Effect of human urinary colony-stimulating factor on experimental *Legionella pneumophila* infection in guinea pigs. J Antimicrob Chemother 26: 831~840, 1990
- 6) Fitzgeorge R B, Featherstone A S R, Baskerville A: Effects of polymorphonuclear leucocyte depletion on the pathogenesis of experimental Legionnaires', disease. Br J Exp Path 69: 105~112, 1988
- 7) Gerald S D, Washington C W Jr, John W C: Role of recruited nonimmunologic defense in Legionnaires', disease. Chest 95: 232 (S)~233 (S), 1989
- 8) Horowitz M A, Silverstein S C: Interaction of Legionnaires', disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. 1 *L. pneumophila* resists killing by polymorphonuclear leucocyte, antibody, and complement. J Exp Med 153: 386~397, 1981
- 9) Lochner J E, Bigley R H, Iglewski B H: Defective triggering of polymorphonuclear leucocyte oxidative metabolism by *Legionella pneumophila* toxin. J Infect Dis 151: 42~46, 1985
- 10) 斎藤 厚, 下田照文, 長沢正夫, 田中 光, 伊藤直美, 重野芳輝, 山口恵三, 広田正毅, 中富昌夫, 原耕平: 本邦ではじめての Legionnaires', disease (レジオネラ症) の症例と検出菌の細菌学的性状. 感染症誌 15: 124~128, 1981
- 11) Nomura H, Imazeki I, Oheda M, Kubota N, Tamura M, Ono M, Ueyama Y, Asano S: Purification and characterization of human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). EMBO J 5: 871~876, 1986
- 12) Saito A, Sawatari K, Fukuda Y, Nagasawa M, Koga H, Tomonaga A, Nakazato H, Fujita K, Shigeno Y, Suzuyama Y, Yamaguchi K, Izumikawa K, Hara K: Susceptibility of *Legionella pneumophila* to ofloxacin in vitro and in experimental *Legionella* pneumonia in guinea pigs. Antimicrob Agents Chemother 28: 15~20, 1985
- 13) Kohno S, Koga H, Yamaguchi K, Masaki M,

- Inoue Y, Dothu Y et. al.: A new macrolide, TE-031 (A-56268), in treatment of experimental Legionnaires' disease. J Anti microb Chemother 24: 397~405, 1989
- 14) Gerald S D, Washington C W Jr, Dieter W G, Harry N B: The kinetics of early inflammatory events during experimental pneumonia due to *Legionella pneumophila* in guinea pigs. J Inf Dis 148: 823~834, 1983
- 15) Asano S, Ono M: Human granulocyte-colony stimulating factor: Its biological action and clinical implication. Acta Haematol Jpn 50: 1550~1556, 1987
- 16) Fujisawa M, Kobayashi Y, Okabe T, Fumimaro T, Komatsu Y, Seiga I: Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor induces granulocytosis *in vivo*. Japan J Cancer Res 77: 866~869, 1986
- 17) Uzumaki H, Okabe T, Sasaki N, Hagiwara K, Takaku F, Itoh S: Characterization of receptor for granulocyte-colony stimulating factor on human circulating neutrophils. Biochem Biophys Res Commun 156: 1026~1032, 1988
- 18) Yuo A, Kitagawa S, Tetsuro O, Urabe A, Komatsu Y, Itoh S: Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor repairs the abnormalities of neutrophils in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelogenous leukemia. Blood 70: 404~411, 1987
- 19) Kitsukawa K, Hara J, Saito A, Inhibition of *Legionella pneumophila* in guinea pig peritoneal macrophages by new quinolone, macrolide and other antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother 27: 343~353, 1991
- 20) Fraser D W, Tsai T R, Orenstein W, Parkin W E, Beecham H J, Sharrar R G, Harris J, Mallison G F, Martin S M, McDade J E, Shepard C C, Brachman P S, Field Investigation Team: Legionnaires' disease description of an epidemic of an pneumonia. New Eng J Med 297: 1189~1197, 1977
- 21) Fraser D W, Wachsmuth I K, Bopp C, Feeley J C, Tsai T F: Antibiotic treatment of guinea pigs infected with agent of Legionnaires' disease. Lancet, I: 175~178, 1978
- 22) Yasuda H, Akiji Y, Shimosato T, Kasahara M, Kawada H, Iwata M: Therapeutic efficacy of granulocyte-colony stimulating factor alone and in combination with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. Inf Immun 58: 2052~2059, 1990
- 23) Matsumoto M, Matsubara S, Yokota T: Effect of combination therapy with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor and antibiotics in neutropenic mice unresponsive to antibiotics alone. J Antimicrob Chemother 28: 447~453, 1991
- 24) 藤沢道夫, 岡部哲郎, 四元秀毅, 矢崎義雄, 米田修一: MRSA 感染マウスに対する cefodizime, rG-CSF, γ -globulin の併用効果. Chemotherapy 39: 1034~1039, 1991

Synergistic effect of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (rG-CSF) and ceftazidime in the treatment of experimental *Legionella* pneumonia in guinea pigs

Takayuki Miyara

The First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nisihara-cho, Okinawa 903-01, Japan

We investigated the antimicrobial chemotherapy-enhancing effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (rG-CSF) in treating experimental pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain No. 80-045). Polymorphonuclear leucocytes (PMNLs) increased in circulating blood and the pulmonary air spaces of sublethally infected (1×10^4 CFU/body) guinea pigs following administration of rG-CSF ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ twice a day). The increased number and heightened function of PMNLs contributed to a reduction in the number of bacteria in the lung, leading to a significantly increased survival rate in guinea pigs with lethal pulmonary infections (5×10^6 CFU/body), when combined with ceftazidime, which has strong *in vitro* antimicrobial activity against *L. pneumophila* but is ineffective in *Legionella* infection because of its lower cell penetration. These findings show the importance of PMNLs in nonimmunospecific defences against *Legionella* pneumonia, and suggest the usefulness of rG-CSF in combination with antimicrobial therapy.