

## Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* に対する rG-CSF, $\gamma$ -globulin と各種抗生物質の併用効果

藤沢 道夫・山根 章・岡部 哲郎

四元 秀毅・矢崎 義雄

東京大学医学部第三内科\*

米田 修一

埼玉県立がんセンター呼吸器科

(平成6年1月19日受付・平成6年6月15日受理)

Cyclophosphamide により白血球減少を誘起し、各種抗生物質に耐性 (MIC: 0.78~1,600  $\mu\text{g/ml}$ ) の methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA T4 株) を投与したマウス敗血症モデルにおいて、recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF),  $\gamma$ -globulin 投与時の、各種抗生物質との併用効果を生存率を指標として検討した。

1. rG-CSF (30  $\mu\text{g/kg}$ ) 単独使用の場合には  $3.5 \times 10^4$  CFU/ml 以下の接種菌量の MRSA 感染に対し強力な感染防御作用を示した。また  $\gamma$ -globulin (50 mg/kg) を併用するとその作用が増加した。

2. rG-CSF,  $\gamma$ -globulin と各種抗生物質との併用の場合には、vancomycin (MIC: 0.78  $\mu\text{g/ml}$ ) では 60 mg/kg の投与で感染防御効果があり、flomoxef (MIC: 50  $\mu\text{g/ml}$ ), ceftazidime (MIC: 200  $\mu\text{g/ml}$ ) ではそれぞれ 400, 1,500 mg/kg の投与で良好な感染防御作用を示した。Cefodizime (MIC: 1,600  $\mu\text{g/ml}$ ) は、1,500 mg/kg の投与では効果が認められなかった。

**Key words:** MRSA, rG-CSF,  $\gamma$ -globulin, mouse

前回の報告で我々は cefodizime (CDZM) に耐性の methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) T3 株 (CDZM MIC: 200  $\mu\text{g/ml}$ ) を用いて、CDZM 単独では MRSA に効果が認められないが<sup>3</sup>, recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rG-CSF),  $\gamma$ -globulin を併用すると、CDZM の投与量に比例して生存率が増加し、体重当り MIC 数値の 7.5 倍の投与量 (mg/kg) で生存率が 67% になることをマウス敗血症のモデル系で示した<sup>1)</sup>。rG-CSF は好中球系幹細胞に造血刺激因子として特異的に働き、その分化と増殖<sup>2)</sup>を促すばかりでなく、好中球の機能をも亢進させることが知られている。好中球機能亢進作用としては、寿命の延長、遊走因子により誘導されるスーパーオキシド産生能増加、貪食能の増加、NBT 還元能の増加、細胞間接着分子の 1 つである C3 bi レセプターの発現の増加、それに伴う粘着能の亢進、ADCC 活性の増強、ロイコトリエンの産生増強、殺菌能の増強などが報告されている<sup>3)</sup>。これらのことから、臨床においても

最近 rG-CSF は抗癌剤投与による白血球減少時に使用され<sup>4)</sup>感染予防の効果が確認されており、さらに好中球数が正常である患者の重症感染症にも効果が期待されている<sup>5)</sup>。

MRSA は基礎疾患を持った患者に発症することが多い重篤な疾患である。感染が明らかになった際には、早急に適切な薬剤の選択をする必要があるが、大部分の抗生物質に耐性であり、対応に苦慮するところである。今回各種の薬剤に対して、MIC 0.78~1,600  $\mu\text{g/ml}$  を示す MRSA T4 株を用いたマウス *in vivo* 実験において、CDZM 以外の抗生物質においても MRSA に対する MIC から判断される以上の併用効果が認められるか否かを検討した。

### I. 材料と方法

#### 1. 実験動物

BALB/c, 雌 8 週齢マウス (日本 SLC) を用いた。

#### 2. 使用菌株

実験に用いた MRSA T4 株は当科の呼吸器疾患患者より分離されたものである。菌の培養はプレーンハ

\* 東京都文京区本郷 7-3-1

ートインフュージョン寒天培地で行い、寒天培地より1標準白金耳(10 mg)掻きとり、滅菌生理食塩水に浮遊させた( $10^8$  CFU/ml)。

### 3. 抗生物質の最小発育阻止濃度(MIC)測定

MICの測定は日本化学療法学会標準法<sup>9)</sup>に従い、寒天平板希釈法で行った。MIC測定のための薬剤は、以下のものを用いた。

CAZ(モダシン<sup>®</sup>, 日本グラクソ, 90041), CDZM(ケニセフ<sup>®</sup>, 大鵬, 0E761), DMPPC(スタフシリン<sup>®</sup>, 萬有, 7V001P), FMOX(フルマリン<sup>®</sup>原末, 塩野義, 0Z01), FOM(ホスミン<sup>®</sup>原末, 高田製薬, 0140000265), IPM/CS(チェナム<sup>®</sup>, 萬有, 6B042P), LMOXシオマリン<sup>®</sup>原末, 塩野義, BP1087), MPIP(シグマ, 70H0172), VCM(バンコマイシン<sup>®</sup>原末, 塩野義, 1006)。

Mueller-Hinton培地(Difco)9 mlに各々の濃度に調製した薬剤1 mlを加え混合し、ポリシャーレに移し平板を作製した。各平板に調製した菌液 $10^8$  CFU/mlを1白金耳接種した。37°Cで18時間培養し、MICを測定した。

### 4. マウス投与薬剤および投与方法

抗生物質は, ceftazidime (CAZ, モダシン<sup>®</sup>, 田辺製薬), cefodizime (CDZM, ノイセフ<sup>®</sup>, ヘキストジャパン), methicillin (DMPPC, スタフシリン<sup>®</sup>, 萬有製薬), flomoxef (FMOX, フルマリン<sup>®</sup>, 塩野義製薬), fosfomycin (FOM, ホスミン<sup>®</sup>, 明治製薬), imipenem/cilastatin sodium (IPM/CS, チェナム<sup>®</sup>, 萬有製薬), latamoxef (LMOX, シオマリン<sup>®</sup>, 塩野義), vancomycin (VCM, バンコマイシン<sup>®</sup>, 塩野義製薬)を使用した。

CAZ, CDZM, FOMは286 mg/ml, FMOXは76 mg/ml, LMOX, IPM/CS, VCMは38 mg/mlに滅菌注射用蒸留水で調製し, 4°Cに保存した。各種抗生物質の投与はマウスの皮下に, MRSA接種2および8時間後に行い, 翌日からは同じ時間に1日2回, 5日間投与した。

Cyclophosphamide (CY, エンドキサン<sup>®</sup>, 塩野義製薬)は用時注射用蒸留水に溶解し用いた。これを4 mg/0.2 ml/mouse (200 mg/kg)となるように調製し, 腹腔内に投与した。rG-CSF (KRN-8601, グラン<sup>®</sup>, キリンビール)は滅菌生理食塩水で60  $\mu$ g/mlになるように溶解し, 0.1 mlずつ分注し4°Cに保存した。これを使用時に滅菌生理食塩水で10倍に希釈し, その0.1 mlをマウスの皮下に注射した(30  $\mu$ g/kg)。rG-CSFの投与はCY投与6時間後より8日間連続投与した。

$\gamma$ -globulin (ガンマベニン<sup>®</sup>, ヘキストジャパン)は100 mg/mlに注射用蒸留水で溶解し, 使用時10倍に希釈し, 0.1 mlずつマウスの皮下に注射した。投与はMRSA接種2および8時間後に行い, 各種抗生物質と同様に1日2回投与した。

### 5. MRSA接種方法

Mucin (半井化学薬品株式会社)は蒸留水で10%に調整し滅菌(121°C, 15 min)した。前記のように調整したMRSA T4 1 mlを10% Mucin溶液9 mlに加え $10^7$  CFU/mlとし, その0.5 mlをマウスの腹腔内に接種した。

### 6. 投与スケジュールと生存率の判定

このスケジュールは前回の実験<sup>1)</sup>で, CY 200 mg/kg単独投与の場合, 投与前では白血球数3,996/ $\mu$ l, 2日後1,929/ $\mu$ l, 4日後で1,221/ $\mu$ lと最小になり, 6日後1,671/ $\mu$ l, 8日後4,233/ $\mu$ lと回復し, またrG-CSF 30  $\mu$ g/kgを併用すると, CY投与4日後に2,135/ $\mu$ lと最小になり, その後急速に増加を示し, 6日後には10,627/ $\mu$ l, 8日後で, 11,042/ $\mu$ lになることより, 白血球数が最小となる4日後にMRSA菌の接種を行い, Fig. 1に示した。生存は1日2回生死を観察し, 14日目までの生存率で表した。

### 7. 薬剤投与量

前回の実験でMIC: 200  $\mu$ g/mlのCDZMが1,500 mg/kgの投与で効果を示したので, 今回の各薬剤の効果の比較に当たっては, それぞれの薬剤のMICを調べ, その値を7.5倍し, mg/kgの単位で投与した。CDZMはMIC: 1,600  $\mu$ g/mlと高値であり, 前回と同じ1,500 mg/kg投与した。

## II. 結 果

### 1. MRSA株の最小発育阻止濃度(MIC)

実験に用いた薬剤のMRSA T4に対するMICをTable 1に示した。MRSA T4は各種抗生物質に対しMICが200  $\mu$ g/ml程度の感受性を持つ菌株の中から選定した。MICはVCMの0.78  $\mu$ g/mlを除いて, 調べた抗生物質に対しすべて25  $\mu$ g/ml以上と耐性であった。

### 2. rG-CSF, $\gamma$ -globulinの感染防御効果

rG-CSFを前投与し, CY200 mg/kgで処理した一群3匹のマウスに対し, 4日後に各菌数のMRSA T4を接種し, rG-CSF,  $\gamma$ -globulinを併用しその生存率をFig. 2に示した。rG-CSFを併用しない場合は $3.5 \times 10^1$  CFU/mouseの菌数の接種でも全例死亡したが, rG-CSF 30  $\mu$ g/kgを投与すると生存はMRSA T4  $3.5 \times 10^4$  CFU/mouse以下の菌数では100%であり,  $3.5 \times 10^7$  CFU/mouse以上では0%となり, rG-

	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4 ~	14 days
CY	▲									
rG-CSF	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Assessment
γ-globulin					○	○	○	○	○	
antibiotic					○	○	○	○	○	↑

CY ; 200 mg/kg  
 rG-CSF ; 30 μg/kg  
 r-globulin ; 50 mg/kg

Fig. 1. Time schedule. BALB/c female mice were injected intraperitoneally with cyclophosphamide. The mice received a daily injection of recombinant granulocyte colony-stimulating factor subcutaneously for 8 days. MRSA T4 strain was inoculated intraperitoneally on the 4th day after administration of cyclophosphamide. The subcutaneous injection of γ-globulin and antibiotics started immediately after inoculation of MRSA T4 twice a day for 4 days.

Table 1. MICs (μg/ml) of various antibiotics against MRSA T4

Drug	CAZ	CDZM	FMOX	FOM	IPM/CS	LMOX	VCM	DMPPC
MIC (μg/ml)	200	1,600	50	200	25	100	0.78	100

CAZ: ceftazidime, CDZM: cefodizime, FMOX: flomoxef, FOM: fosfomycin, IPM/CS: imipenem/cilastatin sodium, LMOX: latamoxef, VCM: vancomycin, DMPPC: methicillin

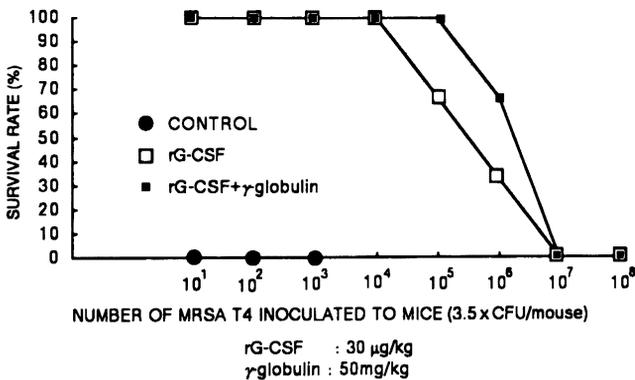
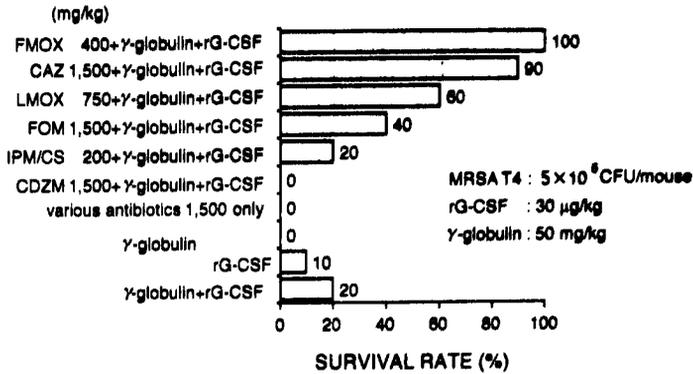


Fig. 2. Effects of rG-CSF and γ-globulin on survival rate of neutropenic mice inoculated with MRSA T4.

CSF 単独でも  $3.5 \times 10^4$  CFU/mouse 以下の MRSA に対しては感染防御作用を示した。また rG-CSF に γ-globulin を併用すると、接種菌数が  $3.5 \times 10^5$  CFU/mouse までは 100% の生存率を示し、効果の増大が見られた。

3. 各種抗生物質と rG-CSF, γ-globulin の併用  
 一群 10 匹で行い、MRSA 接種後連日観察し、14

日目の生存率を Fig. 3 に示した。3 日目まで生存したマウスは以後 14 日まで生存していた。すなわち、死亡例はすべて 2 日以内に死亡した。DMPPC 以外の各種抗生物質 (1,500 mg/kg) 単独、rG-CSF, γ-globulin, rG-CSF + γ-globulin 投与群の生存率はそれぞれ 0, 0, 10, 20% であり、Fig. 2 に示した rG-CSF, γ-globulin の効果を反映していた。それに比



FMOX: floximef, CAZ: ceftazidime, LMOX: latamoxef, FOM: fosfomicin, IPM/CS: imipenem/cilastatin sodium, CDZM: cefodizime

Fig. 3. Combined effects of various antibiotics and rG-CSF and γ-globulin on survival rate of neutropenic mice inoculated with MRSA T4.

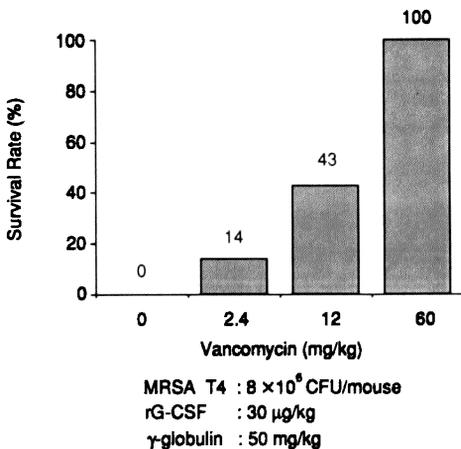


Fig. 4. Dose dependent effect of vancomycin on the survival rate of neutropenic mice inoculated with MRSA T4.

し CAZ 1,500 mg/kg, FMOX 400 mg/kg 投与群は生存率 90, 100%と有意に高値を示した。

#### 4. Vancomycin と rG-CSF, γ-globulin の併用

VCM は MRSA T4 に対し MIC が  $0.78 \mu\text{g/ml}$  と低値を示したため, 上記の実験とは別に, VCM 2.4, 12.0, 60.0 mg/kg (一群 10 匹) を投与し, 投与 14 日目の生存率を調べ結果を Fig. 4 に示した。VCM の濃度に依存的に生存率は上昇し, 60 mg/kg の投与では生存率 100% を示した。ED<sub>50</sub> は 12 mg/kg であった。

### III. 考 察

前回の報告<sup>1)</sup>で我々は今回と同様の CY による白血球減少 MRSA 感染症マウスのモデル系で, CDZM (MIC:  $200 \mu\text{g/ml}$ ) を用いて, rG-CSF, γ-globulin を併用し, CDZM の投与量 0, 250, 500, 1,500 mg/kg に応じて生存率が 0, 17, 33, 67% と増加し, 抗生物質の選択によれば, 耐性の MRSA に対しても効果が出現することを示した。CDZM は *in vitro* で白血球の殺菌能, 単球の貪食能を増強し<sup>7)</sup>, さらに動物実験では, MIC から予想される以上の効果を示すため<sup>8)</sup>, MRSA に対する効果はこの CDZM にかなり特異的な現象と考えた。

しかし今回の実験により, CDZM 以外の抗生物質においても, CAZ, FMOX で生存率はそれぞれ 90, 100% と高値を示し MRSA に対する良好な感染防御効果が認められ, この rG-CSF, γ-globulin の併用療法は種々の抗生物質においても有効であることが判明した。最近 CAZ, FMOX 等にも *in vitro* で白血球, マクロファージの殺菌作用の増強等を示す報告<sup>9)</sup>, あるいは FMOX などの PBP 2' の誘導能低値の報告<sup>10)</sup> が出てきたことにより, CDZM 以外にも他の抗生物質で効果を示したのは当然の結果と考えられる。また Fig. 3 において rG-CSF 非投与群に VCM を含む各種の抗生物質 1,500 mg/kg と γ-globulin を併用投与したが, 生存率は 0% で効果なく, 生存率をあげるには rG-CSF の投与が必須であった。抗生物質の特性を発揮させるには rG-CSF との併用が重要であることが推察された。臨床的に問題になるのはど

の抗生物質がどのような MRSA に有効であるかである。この CY 処理による白血球減少敗血症マウスはこれまでも薬剤の効果を調べるために用いられているが、rG-CSF を用いない場合でも、ペニシリン、セフェム系薬剤では、感受性のある菌に対して 500~600 mg/kg までの量が用いられこの量で効果が発揮している。今回の実験においては各種の薬剤を比較するため、また臨床的に用いる限界量を考え、前回の実験の結果を考慮し、MIC 数値を基に一律に投与量を計算したが、ペニシリン、セフェム系では人の常用量に換算すると 3 倍程度と思われる。CDZM は MRSA T4 に対して MIC 1,600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と高度耐性であり、そのままの計算量で投与すると、臨床不可能な投与量となり、1,500 mg/kg 投与したが効果はなかった。高度耐性菌には実際的には使用困難である。また FOM は臨床的には MRSA の治療にはセフェム系等との併用薬の 1 つとして使用されることの多い抗生物質であるが<sup>11)</sup>、今回の実験のように単独投与では生存率は 40% とやや低かった。VCM は MIC が 0.78  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と低値であるが、これを反映して 60 mg/kg の投与で 100% の生存率が得られ、他の薬剤に比べ少ない投与量で良好な感染防御作用が認められた。IPM/CS は MIC が 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と低く効果が期待されたが、この実験系では効果が認められなかった。MIC が 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と低くそのため投与量が 200 mg/kg と他の薬剤に比して低値になった。この投与量が菌数に対して有効な量に達していなかったこと、また抗生物質の投与が皮下からであったため血中移行度が抗生物質により異なり、MIC の結果を必ずしも反映しないことが考慮された。この投与菌数と血中移行度は今回の実験の結果を左右する問題であり、抗生物質の有効度を比較することはこの実験系では困難である。

臨床上の病変の進展度、重症度の問題は、この実験系では MRSA T4 の接種菌数に当たると考えられる。Fig. 2 に示したように、少量の菌数でも rG-CSF を投与していなければマウスは 2 日以内に死亡する。感染初期の菌数が少ない時点においては rG-CSF は単独でも効果がある。5 $\times$ 10<sup>6</sup> CFU/mouse の大量の接種菌数では rG-CSF、 $\gamma$ -globulin を併用すれば耐性株においても FMOX、CAZ では感染防御効果が認められた。さらに菌数を増大させ 3.5 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mouse 接種し、Fig. 3 とまったく同様の実験系で調べた結果、どの抗生物質の投与でも生存率は 0% であった(データ未掲)。菌数の変化がこの実験系において生存率の変化をもたらすことは、炎症部位が広範囲、または、敗血症に至り菌数が生体内で増加した場

合、効果は期待できないことを示すものと思われる。rG-CSF の投与の時期であるが、この実験系では CY の処理とともにあらかじめ rG-CSF を投与した。感染と同時に rG-CSF を投与しても生存率は増加せず、あらかじめ rG-CSF を投与し、白血球数を増やしておく効果があるとの報告がある<sup>12)</sup>。我々のデータ<sup>11)</sup>では rG-CSF を投与しても白血球数が最も低下する時期に MRSA 菌を接種しており、このことから必ずしも白血球数が増加していなくても、数日間(我々のデータでは 4 日間)投与すれば、白血球の機能改善、亢進があると思われる。我々は感染菌として MRSA を用いたが、緑膿菌などの多剤耐性菌に対しても rG-CSF が感染予防に有用であるとの報告がある。MRSA のみでなく、その他の起炎菌に対しても、MIC で中等度耐性の範囲内であるならば、rG-CSF、 $\gamma$ -globulin の併用を考慮する余地があると思われる。以上述べたことから、MRSA が検出されるか、または MRSA の感染の危険性の高い、免疫能の低下を伴う基礎疾患を持っている患者で感染症が発生する可能性がある場合は、発症以前に rG-CSF を投与し、好中球数の増加、機能改善を図ることが感染症の予防ばかりでなく、感染症を併発した場合の予後にも効果があると考えられる。

#### 謝 辞

MRSA 菌株の選定にご協力を戴いた東大病院中央検査部の奥住捷子主任に感謝致します。

#### 文 献

- 1) 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,  $\gamma$ -globulin の併用効果。Chemotherapy 39: 1034~1039, 1991
- 2) Fujisawa M, Kobayashi Y, Okabe T, Takaku F, Komatsu Y, Itoh S: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor induces granulocytosis. Jpn. J. Cancer Res. 77: 866~869, 1986
- 3) 吉竹裕子, 佐藤 清: 好中球の貧食, 殺菌機能及び活性酸素産生能に及ぼす KW-2228 の効果。Jpn. J. Antibiotics 45-1: 112~120, 1992
- 4) Asano S, Ono M: Human granulocyte colony-stimulating factor: Its applications and clinical implication. Acta. Haematol. Jpn. 50: 1550~1556, 1987
- 5) 熊川寿郎, 森真由美: 顆粒球コロニー刺激因子の臨床応用 9 老人性肺炎。治療学 25: 1486~1489, 1991
- 6) 日本化学療法学会: 最小発育濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76-79, 1981
- 7) 三宅美行, 朝長正志, 東岡俊之, 山田雄次, 石田直文, 兵岡昭夫, 井上松久, 三橋 進: Cefodizime の

- 実験的感染防御能低下マウスにおける治療効果について。Chemotherapy 36 (S-5):128~139, 1988
- 8) Kasai K, Tsuji A, Miyazaki S, Goto S, Fujimoto K, Masuyoshi, S, Arai S: In vivo antibacterial activity of cefodizime, a new cephalosporin antibiotic. Japanese. J. Antibiotics 37:1306~1312, 1984
- 9) 田中恭子, 田中輝和, 田中真紀子, 入野昭三, 根ヶ山清, 山岡源治, 永山在明: Ceftazidime の MRSA に対する *in vivo* 効果と Fosfomycin との併用による *in vitro* 効果。化学療法の領域 5: 926~932, 1989
- 10) 横田 健, 鈴木映子, 新井京子, 加藤尚代: 新しい oxacephem, (Flomoxef) の試験管内抗菌力,  $\beta$  lactamases 安定性, 作用点ペニシリン結合蛋白 (PBP) に対する安定性, および血清補体と白血球との協力的食菌, 殺菌作用。Chemotherapy 35 (S-1): 33~43, 1987
- 11) 林 泉: 肺癌末期に MRSA, 緑膿菌の複数感染を来した症例に FOM, CAZ 時間差攻撃治療を行い奏功した例。化学療法の領域 6: 1049~1054, 1990
- 12) Roilides E, Walsh T J, Pizzo P A, Rubin M: Granulocyte colony stimulating factor enhanced the phagocytic and bactericidal activity of normal and defective human neutrophils. J. Infect. Dis. 163: 579~583, 1991

### Combined effects of rG-CSF, $\gamma$ -globulin and various antibiotics on survival rate of neutropenic mice with MRSA infection

Michio Fujisawa, Akira Yamane, Tetsuro Okabe,  
Hideki Yotsumoto and Yoshio Yazaki

The Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo,  
7-3-1, Hongo, Bunkyo, Tokyo 113, Japan

Shuichi Yoneda

Pulmonary Medicine Clinic, Saitama Cancer Center

We evaluated the effects of 7 antibiotics combined with rG-CSF and  $\gamma$ -globulin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in cyclophosphamide-treated mice. Antibiotics were chosen by the MIC, which ranged from 0.78 to 1,600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  against MRSA. The dose of antibiotics administered to mice was calculated from the MIC of each drugs, and amount of MRSA inoculated in the mice was determined by the criterion that rG-CSF did not affect the survival rate of mice. The results indicated that combined therapy using antibiotics with rG-CSF and  $\gamma$ -globulin in which MIC was less than 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  enhanced the survival rate of neutropenic mice inoculated with MRSA.