日消外会誌　28（3）：679～688，1995年

重症腹膜炎に対するgranulocyte colony-stimulating factorの治療効果に関する実験的研究

群馬大学医学部第1外科（主任：長町幸雄教授）
黒　岩　　実

重症腹膜炎ラットにヒト型顆粒球刺激因子（G-CSF）を投与し，その有用性，安全性を検討した．ラットの生存率は抗生物質（LMOX）およびG-CSF単独投与で上昇したが（85％および70％），LMOXとG-CSF併用群ではさらに生存率が高まった（100％）．また併用群では，1）末梢血白血球数が薬剤非投与（P群），LMOX，G-CSF単独投与群に比べて上昇し（$p<0.01$），70％を好中球が占めた．2）単位好中球あたりのO_2産生能は他の治療群に比べ有意に高かった（$p<0.01$）．3）G-CSF投与群ではP群と比較して，動脈血PH，HCO_3，BEが改善したが，PO_2，PCO_2の変化は他の治療群との間に有意差を示さなかった．4）肺の組織学的検討結果では併用群の多核白血球浸潤などの急性肺障害の所見は軽快していた．以上の結果から，腹膜炎治療に際し，G-CSF投与は感染防御能を改善し，臨床上有用であることが明らかとなった．また従来不明であった急性肺障害誘発や増悪の可能性も否定され，G-CSFは安全に使用可能であることがわかった．

Key words: granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), peritonitis, leukopenia, superoxide anion (O_2)

緒　言

重症腹膜炎ではオプソニン活性の低下や末梢血白血球数の減少が見られ，さらに好中球機能も低下する[1)2)]．好中球の減少ならびに機能不全は続発症の発生や感染重篤化をもたらすことから，好中球の数と機能は感染防御機構上極めて重要な意義を有する[3)]．

Granulocyte colony-stimulating factor[4)5)]（以下，G-CSFと略記）は末梢血中の好中球を著明に増加させ，同時に成熟好中球の機能を高める[6)]ことが明らかにされている．重症腹膜炎症例へのG-CSF投与により，末梢血の白血球減少や好中球機能低下が改善されれば，低下した非特異的免疫能が改善し生存率が向上する可能性も考えられる．

一方，好中球は急性肺障害あるいは成人呼吸窮迫症候群（以下，ARDSと略記）の発生にかかわる[7)]．G-CSF投与によりプライミングされた好中球を増加させることは急性肺障害を誘発・増悪させる可能性もあり，重症感染症におけるG-CSF投与の是非については意見の統一をみていない．

＜1994年11月9日受理＞別刷請求先：黒岩　　実
〒371　前橋市昭和町3－39－15　群馬大学医学部第1外科

本研究では重症腹膜炎を作製したラットを用い，重症腹膜炎治療の際G-CSF投与がラット生存率を改善するか否かを明らかにし，さらに生存率向上の機序を末梢白血球動態および好中球機能の点から検討した．同時に好中球による急性肺障害の誘発・増悪の可能性について調べた．

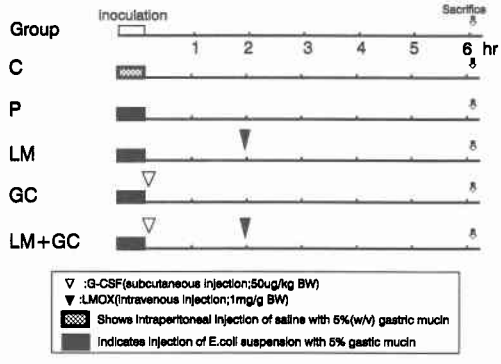
材料ならびに方法

実験動物には体重200gから250gのWistar系雄性ラットを用いた．

A．腹膜炎作製

起炎菌は腹膜炎による敗血症で死亡した患者の血中より分離されたLatamoxef（以下，LMOXと略記）感受性大腸菌SH1（血清型：0126）を用いた．Dorset egg medium（Nissui，Tokyo，Japan）から白金耳で菌を採取し，Mueller-Hinton broth（Defco Laboratories，UK）を用い37℃，15時間培養した．培養液の細菌数はKletto-Summerson photoelectoric calorimeter（Klett Mfg.，Co.，New York，USA）を用いて決定した．この培養液を10％ムチン生理的食塩水（以下，生食水と略記）で1：1（V/V）に希釈した．ラットを12時間禁食（飲水は自由）後，Ether麻酔下に5％ムチン生食水あるいは5％ムチン大腸菌液を腹腔内に注入

Fig. 1　Treatment regimen in experimental groups Control (C) received intraperitoneal injection of saline with 5% (w/v) gastric mucin. Other groups (P, LM, GC and LM+GC) were given 2.5×10^6 cfu E. coli/100g BW intraperitoneally.



した．ラットへの投与菌数は予備実験で決定した菌数を用いた．すなわち投与されたラットの半数が死亡する菌数（体重100gあたり2.5×10^8CFU/ml）とし，薬剤投与の仕方でラットを以下の5群に分けた．腹膜炎群としては5％ムチン大腸菌液を腹腔内投与した群（P群，n=24），P群と同様に腹膜炎を作製し，2時間後にLMOX（1mg/g体重）を尾静脈より投与した群（LM群，n=20），腹膜炎作製直後にG-CSF（50μg/kg体重）を皮下注射した群（GC群，n=38）および腹膜炎作製直後にGC群と同量のG-CSFを皮下投与し，2時間後にLM群と同量のLMOXを静注した群（LM+GC群，n=20）の4群を作製した．対照には5％ムチン生食水（1ml/100g体重）を腹腔内投与した群（C群，n=20）を当てた（**Fig. 1**）．

B．投与薬剤

(1) G-CSF：Kirin Brewery Co. から供与されたrecombinantのヒト型G-CSF（KRN 8601）．

(2) 抗生物質：LMOX．

(3) ムチン（和光純薬，東京）：ブタ胃粘膜由来のもの．

C．採血法と血液学的検査

採血（加EDTA-2K）は腹腔内注入前に尾静脈より行った．ムチン生食水あるいは菌液を腹腔内注入後6時間でEther麻酔下に大腿動脈を露出，24G静脈留置針を挿入後，EDTA-2Kおよびヘパリン加動脈血を採取した．脱血死させたラットは開腹し，腹膜炎の存在を確認し腹膜炎の存在が不確実な場合は実験検討例から除外した．

1．血算ならびに血液像

白血球数の算定はBürker-Türk算定盤を用い，血液像はWright-Giemsa染色を行って算定した．

2．好中球機能検査

白血球の分離は採取したヘパリン加動脈血よりデキストラン沈降法[8]で行った．すなわち血液2容に対し1容の6％デキストラン生食水を混和し，室温に30分静置後，上澄（buffy coat）を4℃，200Gにて遠沈，沈渣中に含まれる赤血球を低張性溶血で除去した．Modified-Hanks' Balanced Salt Solution（m-HBSS, Sigma Co., USA）を用いて2回洗浄後，Hanks（ニッスイ製薬，東京）液に浮遊させて白血球浮遊液を作製した[9]．好中球機能はO_2^-産生能ならびにMyeloperoxidase（以下，MPOと略記）活性を測定して調べた．

(1) 好中球O_2^-産生能[9]：O_2^-と特異的に反応して発光するCypridina Luciferin Analog，2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-hydroimidazo [1,2-α] pyrazin-3-one（以下，MCLAと略記）を用いMCLA依存性発光（以下，MCLA-CLと略記）を測定して求めた．

(2) MPO活性：Luminol (Sigma, USA) を用いた化学発光（以下，L-CLと略記）法でOCL⁻産生能を測定することにより求めた[10][11]．好中球刺激剤としてopsonized zymosan（以下，OZと略記），phorbol-myristate-acetate（以下，PMAと略記）ならびにN-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine（以下，FMLPと略記）を用いた．

(3) MCLA-CL測定法の実際：Hanks液に好中球7×10^4個を入れ，Luminescence Reader（BLR-102，アロカ社）中で37℃，3分間preincubateした後，刺激剤（OZ 1.6mg，PMA 1μg，FMLP 1μM）とMCLA（0.5μM）を同時に加えて反応を開始し，最大発光強度をもって産生能とした．

(4) L-CL測定法の実際：好中球数は4×10^5，発光試薬はLuminol（1μM）を用い，OZ（1.6mg）で刺激し，これら以外はMCLA-CLと同一の系で測定した．

3．血清オプソニン活性

オプソニン活性はL-CLによる化学発光法により測定した[12]．すなわち健常ラットから分離した5×10^5個の好中球に50μMのLuminolを入れた後，Zymosan（4mg）と被検血清あるいはプール血清を加え，生じた発光の最大値を求めた．プール血清の発光最大値を1.0とし，被検血清のオプソニン活性を表した．

4．血清endothelin-1

腹腔内注入後6時間で採取した血漿を－40℃で凍結

保存した．endothelin-1濃度はradioimmunoassay(2抗体法)[13]で測定した．すなわち保存血漿に60%アセトニトリル/trifluoroacetic acidを加え，endothelinを抽出した後，抽出液に緩衝液，抗endothelin血清(BML社，東京)を加え，4℃で24時間incubateした．次いで^{125}I標識endothelin抗体（Amersham社製，England）を加えて48時間incubateし，最後に第二抗体（第一ラジオアイソトープ，東京）とポリエチレングリコールを加え遠沈した．得られた沈渣の放射能をγ counter (LKB社，Finland) にて測定し，標準曲線を用いてET-1量を算出した．

5．血中endotoxin測定

endotoxin測定のための血小板血漿は，無菌操作で採取したヘパリン加動脈血をendotoxinフリー試験管（生化学工業，東京）を用い4℃で冷却遠沈して分離，−80℃で凍結保存した．被検血漿は合成器質発色法[14](エンドスペーシー，生化学工業，東京)により測定した．

6．動脈血ガス分析

腹膜炎作製後6時間でラットにネンブタール（70 mg/kg/体重)を筋肉内注射した．約30分後の呼吸状態が安定した時点で動脈採血し，ABL300 (Radiometer Co., Copenhagen)を用いて動脈血ガス分析を行った．

7．肺の組織学的検査

肺の組織学的検索は脱血死させたラットの右肺上葉を摘出し，緩衝ホルマリンで固定後，Giemsaあるいはhematoxyline-eosine染色を行って検鏡した．peribroncho-vascular cuff，肺胞内出血の有無ならびに組織中への浸潤白血球数（PMN/alveolusで表示し，肺胞1個あたりの好中球数を表す）を検討した．

8．統計学的処理

本文中の数値は平均値±標準偏差で表した．生存率はLogrank検定で比較し，平均値の比較はWilcoxon検定あるいはStudent's t検定を用いて行った．血中ET値はMann-Whitney U検定を使用し，$p<0.05$をもって有意差ありとした．

結　果

A．G-CSF投与時の末梢血白血球数

末梢血白血球数は1回のG-CSF投与により，1時間後に一過性に減少し，以後12時間までは経時的に増加した．すなわち投与前の$1.34\pm0.23\times10^4$から12時間後には$3.32\pm0.07\times10^4$にまで増加し，24時間後も$1.98\pm0.36\times10^4$と高値を持続し，48時間後に投与前値に戻った．

末梢血中では好中球系の特異的な増加が見られ，1回投与時の好中球の比率は6時間で50%，12時間で65%であった（**Fig. 2**）．

B．生存率

ラット生存数を腹膜炎作製後48時間まで検討し，各群の生存率をKaplan-Meier法で示した．C群は全例生存した．P群の生存率は42%，LM群85%，GC群68%，LM+GC群100%であった．薬剤投与群（LM, GC）の生存率はP群に比べて高く，中でもLM+GC群は著明に生存率が改善された（**Fig. 3**）．

C．末梢血白血球数，好中球比率

C群の白血球数は腹腔内注入前後で差を認めなかったが，腹膜炎群(P, LM, GC, LM+GC)の白血球数はいずれの群でも有意な減少を示した．P群の白血球数は$0.22\pm0.16\times10^4$と最も減少した．LM群，GC群の白血球数はそれぞれ，$0.70\pm0.43\times10^4$，$0.74\pm0.34\times$

Fig. 2 Kinetics of leukocyte counts and PMN/leukocyte ratio in peripheral blood
G-CSF was given to rats at a dose of 50μg/kg subcutaneously. Marked leukocytosis and selective neutrophilia were induced by the single injection.

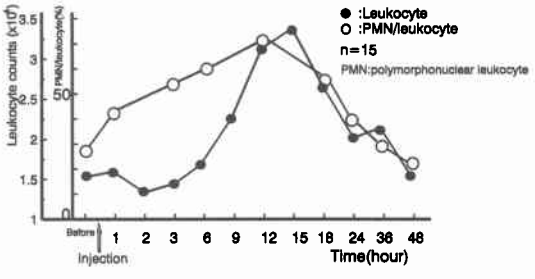
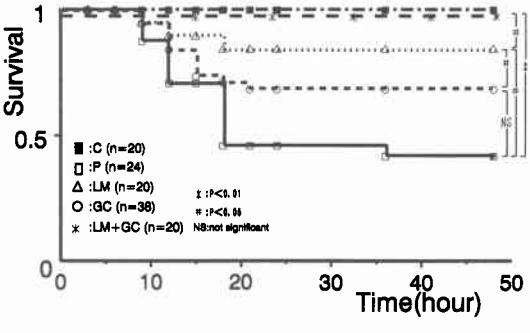


Fig. 3 Survival in groups after intraperitoneal injection
Survival in LM and LM+GC showed marked improvement compared with that in P.



10^4で，LM+GC群では0.99±0.46×10^4であった．好中球比率はP群の20%に対し，LMOXあるいはG-CSFの単独投与では40%となり，LM+GC群では70%に達した（**Fig. 4**）．

D．好中球機能

腹膜炎群のMCLA-CL（O_2^-産生能）はC群に比べて高く，腹膜炎群の中ではLM+GC群がP群，LM群，GC群に比べ有意に（$p<0.01$）増大していた．このLM+GC群のMCLA-CLの増大はOZ，FMLPで白血球を刺激した場合にのみ認められ，PMAによる場合には認められなかった．

腹膜炎群のL-CL（MPO活性）はC群に比べて高い傾向を示したが，腹膜炎各群間には有意な差を認めなかった（**Fig. 5**）．

E．血清オプソニン活性

血清オプソニン活性（以下，OAと略記）は腹膜炎作製群がC群に比べ高かったが，LM群，GC群，LM+GC群間に差を認めなかった（**Fig. 6**）．

F．血中endothelin-1

腹膜炎群のendothelin-1（以下，ET-1と略記）はC群に比べ有意に増加していた．P群のET-1値はLMOXあるいはG-CSFの投与で低下し，LM+GC群のET-1値が最も低かった（**Fig. 7**）．

G．血中endotoxin

腹膜炎群の血中endotoxin（以下，ETと略記）値は5%ムチン生食水を注入したC群に比べ有意に高値

Fig. 4　Peripheral leukocyte counts and PMN/leukocyte ratio before and 6h after the bacterial inoculation
The decreased leukocyte counts and PMN/Leukocyte ratio in nontreated rats (P) were improved by the administration of LMOX and/or G-CSF.

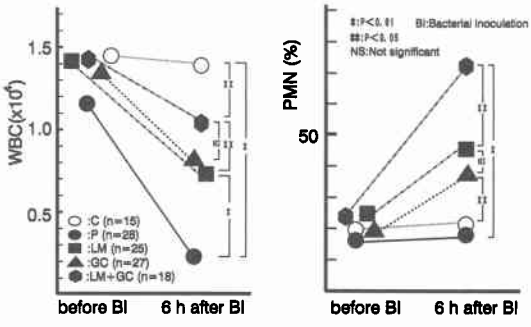


Fig. 5　Ability of PMN to generate O_2^- and MPO activity
When PMN was stimulated with OZ or FMLP only, the ability of PMN to generate O_2^- in rats treated with LMOX and G-CSF was significantly increased compared with other groups.

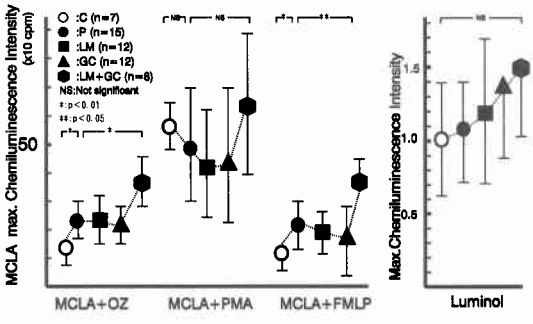


Fig. 6　Opsonic Activity
There were no significant differences between P and other treated groups.

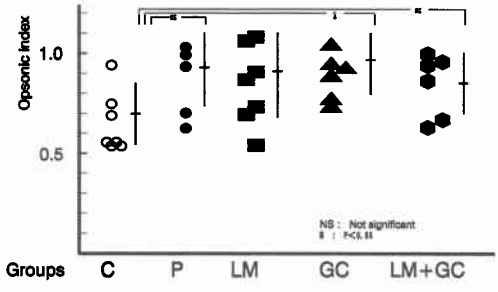


Fig. 7　Plasma endothelin-1 level
The plasma endothelin-1 concentrations in four peritonitis groups (P, LM, GC and LM+GC) were much higher than in the control (C). The administration of two drugs (LMOX and G-CSF) significantly decreased plasma endothelin-1 in the nontreated groups (P).

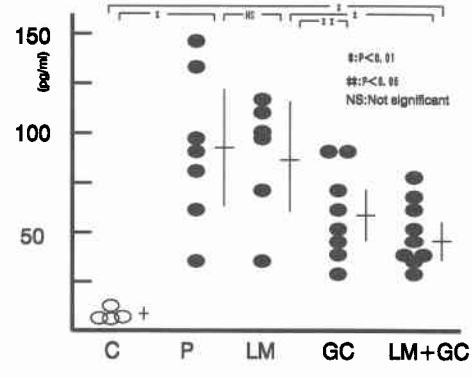
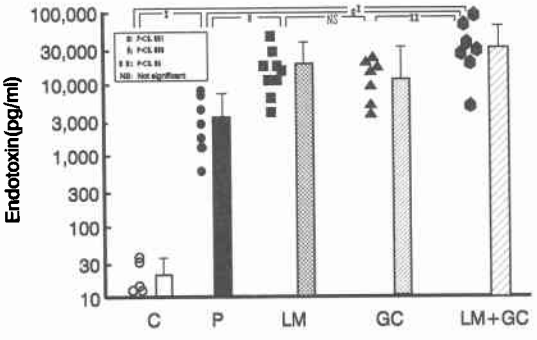


Table 1 Results of arterial blood gas analysis

Group	pH	$PaCO_2$	PaO_2	HCO_3^-	ABE	SBE
P	7.29±0.09	36.3±5.9	97.6±10.9	18.0±5.3	−8.0±6.9	−7.5±6.3
LM	7.37±0.02	41.8±6.1	104.2±10.7	24.4±3.8*	−0.5±3.3*	−0.4±3.6*
GC	7.40±0.02	36.6±7.4	80.5±16.7	22.0±3.7	−2.1±2.6	−2.4±3.2
LM+GC	7.38±0.06	40.6±6.4	91.8±7.1	23.6±0.6	−1.2±1.3	−1.1±0.8

n=7 Single asterisk indicates $p<0.05$ versus group P

Fig. 8 Serum endotoxin concentration in each group
The injection of E. coil increased serum endotoxin. The administration of LMOX or/and G-CSF did not decrease endotoxin in spite of improved survival.



を示した．P群のET値は$0.4\pm0.31\times10^4$pg/mlで，LMOX投与により$2.1\pm1.80\times10^4$に，G-CSF投与により$1.5\pm0.32\times10^4$と上昇した．LM群のET値は$2.1\times1.80\times10^4$pg/mlでP群にくらべ有意に高く($p<0.01$)，LM+GC群のET値は$3.8\pm3.4\times10^4$pg/mlとさらに増加($p<0.01$)を示した(**Fig. 8**)．

H．動脈血ガス分析結果

P群の動脈血ガス分析結果によれば，敗血症に基づく代謝性アシドーシスが認められるもののPO_2の低下はなく，C群と差はなかった．LM群，GC群，LM+GC群のPH，PO_2，HCO_3^-，SBEなどはP群との間に有意な差を認めなかった(**Table 1**)．

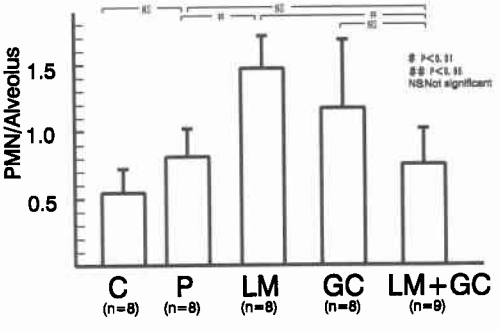
I．肺組織所見

肺の組織学的検索により，肺胞出血やperibroncho-vascular cuffを認めたラット数はP群がC群に比べ明らかに増加していたが，LM+GC群では逆に減少した(**Table 2**)．LM群，GC群のPMN/alveolusはP群に比べ有意に増加したが，LMOXとG-CSFの併用投与により減少し，P群と同一レベルになった(**Fig. 9**)．肺組織像ではP群の末梢肺動脈周囲に著明な浮腫

Table 2 Histopathological findings in lung injury
The cranial lobe of the right lung was excised at 6h after bacterial inoculation. A section of the lung was stained with hematoxylin and eosine. The whole lobe was studied at ×100 and ×400.

Group	Number	Peribronchovascular cuff	Alveolar hemorrhage
C	8	1/8(12.5%)	3/8(37.5%)
P	8	5/8(62.5%)	5/8(62.5%)
LM	8	6/8(75%)	5/8(62.5%)
GC	8	4/8(50%)	3/8(37.5%)
LM+GC	9	2/9(22.2%)	4/9(44.4%)

Fig. 9 Number of PMN per alveolus in lung tissue
The PMN counts increased considerably with LM and GC, but not with LM+GC. There was no significant difference between P and LM+GC.



をみとめ，外套様(peribroncho-vascular cuff)であるのに対し，LM+GC群では浮腫は軽減し，ほとんど認められない(**Fig. 10**)．肺胞組織では腹膜炎群で浸潤白血球の増加を認めるものの，LM+GC群がP群に比べ増悪している所見はなかった(**Fig. 11**)．

考　察

近年，G-CSFは抗生物質やγグロブリン製剤投与が奏効しない重症感染症や難治性感染症に使用され，有効であったとの報告[15)~17)]が散見される．また，感染動物モデルでG-CSF投与の有効性も調べられている[18)]

Fig. 10 Edema formation in the peribroncho-vascular area in groups Peribroncho-vascular cuff of LM+GC (a) was attenuated compared to that of P (b), resulting in the same grade as in the control. Arrows show the peiribroncho-vascular edema (cuff).

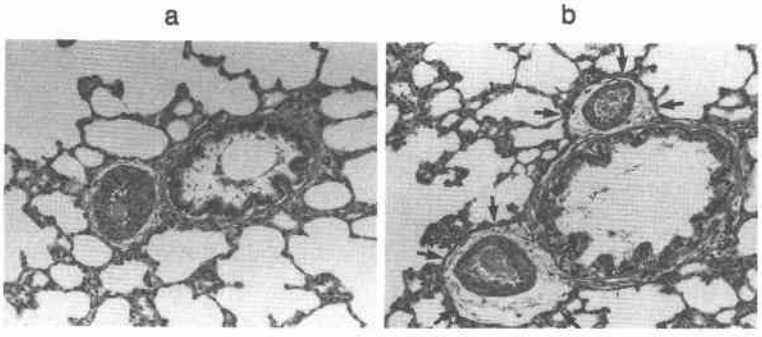
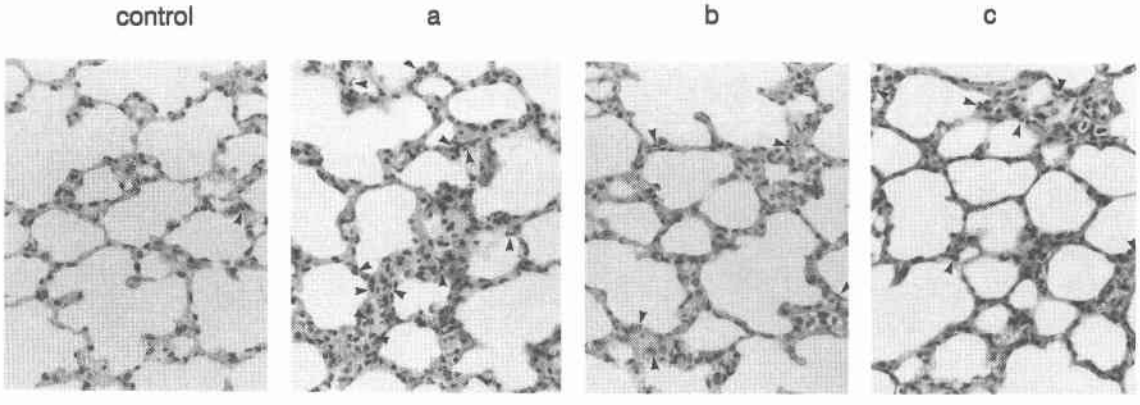


Fig. 11 Histological features of the lung at 6h after bacterial challenge PMN markedly infiltrated the pulmonary septa in LM (a). In LM+GC (b) infiltration by PMN was reduced and comparable to that in P(c). Increased alveolar edema in LM was attenutated by G-CSF administration. Arrow heads indicate the infiltrating PMN.



が，腹膜炎モデルを用いた報告は少数[19)20)]で，抗生物質との併用の面から詳細に検討した報告はない．

一方，急性肺障害の誘発，増悪という点からは，重症感染時に白血球数を増加させることの是非は明らかでない．

本研究では腹膜炎ラットモデルを作製し，腹膜炎治療におけるG-CSF投与の有効性を検討した．通常，抗生物質は腹膜炎発生後投与されることから，本実験ではLMOX静注は2時間後とした．また臨床的ではないものの，G-CSF投与はその有効性が最も発揮されると予想される腹膜炎発生の直後とした．その結果，G-CSF単独あるいは抗生物質との併用投与により，重症腹膜炎ラットの生存率に改善を認めた．Matsumotoら[21)22)]は白血球を減少させたマウスに，数種類の細菌あるいは真菌を感染させ，G-CSF投与が生存率を有意に改善すること，また抗生物質，抗真菌剤の大量投与のみではマウスの死亡を阻止できなかったが，G-CSF投与により生存可能となり，抗生物質を減量しえたことを示し，好中球の重要性を示唆するとともにG-CSF投与の有用性を明らかにした．O' Reillyら[20)]は腹膜炎マウスに抗生物質とG-CSFを投与し，併用時にマウス生存率が最も高く，G-CSF投与後に末梢血好中球数の有意な増加を認めており，著者の成績と同様であった．彼らは好中球増加とその機能的亢進が生存率の改善に結びついたと結論したが，後者の検討はなされていない．また，Todaら[19)]は盲腸結紮・穿刺(以下，CLP

と略記）を行ったラットの腹腔内にG-CSFを投与し，投与時期と生存率の関連を検討している．彼らによれば，CLP施行前3時間でのG-CSF投与，あるいはCLPと同時に投与した場合に最も生存率が高く，CLP後6時間あるいはCLP前9時間の投与では対照と差を認めず，生存率の改善は皮下投与でも得られたと報告した．Cariosら[23]はB群溶連菌を感染させた新生ラットに，抗生物質，G-CSFを腹腔内投与し，G-CSFの単独投与よりも併用時により生存率が高い事実を認め，感染作製と同時にG-CSFを投与しても，また予防的前投与でも有効であると報告している．すなわち，ラットの生存率はG-CSFの投与法よりもむしろ投与時期による影響が大で，腹膜炎発生後一定時間を経過するとその効果は期待できず，high risk患者では予防的投与が，また腹膜炎例であれば可及的早期のG-CSF投与が高い有効率を得る可能性がある．しかし，G-CSFの至適投与量，投与時期あるいは投与期間にいまだ一定の基準はなく，予防的投与も含め今後更に検討が必要と考えられる．

本実験の抗生物質は起炎菌に感受性のあるものを使用したが，臨床上は必ずしも治療初期から感受性の高い抗生物質が投与されるとは限らない．しかし，重症腹膜炎例には通常複数の広域抗生物質が投与され，治療開始初期であっても感受性のない，あるいは感受性の極めて乏しい抗生物質が投与される可能性は低いと考えられる．仮にそうであっても，今回の結果や動物実験結果[19]から，G-CSFの併用投与は一定の治療効果を有すると推測される．事実，腹膜炎などから顆粒球減少を伴う敗血症に陥った症例にG-CSFを投与し，4/5の症例で好中球の増加と症状の改善を認め，救命し得たと報告[16][24]されている．

重症感染症時の白血球減少は消費の亢進によるものとみなされ，その程度は重症度の指標となる．今回の検討によれば，P群の白血球数は腹膜炎作製後6時間で，腹膜炎作製前値の約20%に低下したが，LMOXあるいはG-CSF投与によりその減少度が有意に軽減し，ことにLM+GC群では前値の80%にまで回復した．白血球分画を検討すると，P群の白血球減少時の好中球比率（20%）はC群と差を認めなかった．このP群の好中球比率はLMOXあるいはG-CSFの単独投与で約2倍になり，LM+GC群では70%に上昇した．遠藤ら[16]によれば敗血症患者の好中球比率は40.2±10.2%と正常範囲内であり，Todaら[19]はラット腹膜炎モデルで末梢血リンパ球の絶対数減少を指摘，感染によるリンパ球産生の減少を確認している．すなわち腹膜炎時には好中球のみでなく，他の白血球も減少することが明らかにされており，今回の実験でもP群とC群の好中球比率は一致しており，これを裏付けている．

好中球は刺激により，活性酸素種ならびにchemical mediatorを産生，放出するが，好中球の刺激物質は多種多様で物質により膜への作用機序も異なる[25]．本実験では，O_2^-産生能の向上がG-CSFによるものであることを確認するため作用機序の異なる3種類の刺激物質を使用した．OZは膜C3bi受容体に，PMLPも好中球膜に存在する特異的受容体に結合し，膜代謝亢進を誘導し好中球を活性化する[26]．これに対し，PMAは膜受容体ではなく膜内のprotein kinase Cを直接活性化することで膜の代謝を誘導する．今回の実験では腹膜炎作製群の好中球O_2^-産生能は，C群と比較してOZ，FMLP刺激時にのみ高く，特にLM+GC群は他の治療群に比べ約2倍に増大していることが明らかとなった．このLM+GC群の好中球O_2^-産生能の増大は膜受容体を介して刺激された場合にのみ認められた．この事実はG-CSFが好中球膜受容体を介して代謝を誘導する機序[26]と一致しており，今回のO_2^-産生能の増大はG-CSFの生物学的作用の結果もたらされたと考えられる．また，G-CSF投与によってラットの好中球O_2^-産生能が高まるばかりでなく，他の好中球機能の亢進（貪食能の増強，組織内での寿命延長，ロイコトリエンの産生増加ほか）も期待できる可能性がある．一方，PMA刺激時にはO_2^-産生能はむしろ減弱し，腹膜炎群間で有意な差を認めなかった．LM+GC群以外の腹膜炎群のO_2^-産生能がC群に比べて高まった原因は，炎症由来のchemical mediator，種々のcytokineやET，あるいは炎症で生じた補体分解産物（C5a）などにより好中球がプライミングされた結果と考えられる．しかし，LM+GC群のO_2^-産生能のみが他の腹膜炎群に比べて有意に高まった機序はなお明らかでなく，今後の検討を待ちたい．腹膜炎ラットの生存率の向上は，好中球を主体にした著明な白血球数の回復，G-CSFのプライミングによる好中球O_2^-産生能の向上，および抗生物質併用による細菌増殖や補体活性化の抑制などを反映した結果と思われる．

オプソニンは好中球の細菌への接着・貪食を促進する物質で，オプソニン活性（OA）の亢進は好中球による細菌の貪食・殺菌を促進し，感染防御に深く関与する．今回の検討結果では，腹膜炎群のOAはC群に比

べ上昇していた．これは炎症に対する合目的反応と考えられるが，各腹膜炎群の間では差を認めず，腹膜炎群間の生存率の相違はOAに依存していないことが明らかとなった．

血清ET-1値は腹膜炎により有意に上昇した（P群）が，薬剤単独投与により減少し，LMOXとG-CSFの併用群で最低となった．Pittetら[27]は敗血症患者でET-1値を検討し，心拍出量および重症度とET-1値が相関したと報告しており，今回の報告もこれを裏付けた．これに反し，血中ET値はラットの生存率と相関しなかった．ET値は，死亡率の最低であったLM+GC群で著明な高値を示し，逆に死亡率の高かったP群では低く，高ET血症が必ずしも高死亡率に結び付くとは限らなかった．グラム陰性菌重症感染症への抗生物質投与は，その種類によって破壊した菌体から多量のET放出が起こるため，高ET血症をもたらすことがある[28]．LM群で認められる高ET血症の説明は前述の機序から説明可能であるが，G-CSF投与群のETがP群に比べ高かった機序は不明で，今後さらに検討が必要と考えられる．近年，血中ETの高値が必ずしも致死的でないことが指摘[25]され，感染個体の致死的ショックは必ずしも血中ETに依存しておらず，敗血症性ショックはET自体の作用ではなく，ETに反応して生体内で産生されるインターロイキン1（以下，IL-1と略記）/腫瘍壊死因子（以下TNFと略記）によって誘導される[29]と考えられるようになった．Yoshimotoら[30]はETによりIL-1やTNF産生が誘導され，同時に血清インターロイキン6(以下，IL-6と略記)が上昇することを明らかにした．すなわちIL-6の上昇は宿主がETやIL-1あるいはTNFに暴露されていること，およびこうした刺激に対する宿主のもつ感受性の程度を示していると報告している．今回の研究では血中TNF，IL-1，IL-6を測定していないのでETに対する個体感受性の程度やIL-1/TNFが死亡と関連するか否かを示しえないが，ラットの死亡率と血中ET値との関連が認められなかった事実の説明は可能かもしれない．

好中球はETとともに急性肺損傷あるいはARDSの発生に深くかかわる[7][31]．ET血症に陥り易いグラム陰性菌重症感染治療の際にG-CSFを投与し，primed neutrophilを増加させることは急性肺障害を誘発あるいは増悪する可能性がある．Todaら[19]は，対照群で見られた肺胞壁の著明な好中球とmacrophageの浸潤がG-CSF投与により健常肺と同等にまで改善したと述べている．またKanazawaら[32]は，G-CSFを投与しあらかじめ白血球数を増加させておき，その後ETを投与して好中球の急性肺障害に及ぼす影響を検討している．その結果，あらかじめ白血球を増加させておいても急性肺障害は増悪せず，むしろ抑制されたと報告している．この機序の説明として，G-CSF投与により増加する末梢血好中球はdeformabilityが変化しており，肺微小循環で補足され難いとして，その原因を好中球・内皮細胞間における接着低下に求めている．本研究においても動脈血ガス分析および肺組織学的検索結果からG-CSFが急性肺障害を誘発・増悪させる確証は得られなかった．重症・難治性感染症に対してG-CSFを投与後，急性肺障害が誘発されたり増悪した報告は検索し得た限りではなく，重症腹膜炎治療でG-CSFを投与しても急性肺障害を誘発・増悪する危険性は少ないものと考える．

以上の結果から，重症腹膜炎治療において抗生物質とともに投与されたG-CSFは末梢血好中球数を増加させ，同時に好中球機能を高めることにより，低下した宿主の感染防御能を改善して生存率を向上させることが判明した．G-CSF投与は腹膜炎の治療上，合目的かつ有効であることが明らかとなった．

稿を終えるにあたり，この研究の機会を与えられ，御指導，御校閲を賜りました群馬大学医学部第1外科学教室長町幸雄教授に心から深謝致します．

なお本論文の要旨は第42回日本消化器外科学会総会（1993年7月，大阪），第6回日本外科感染症研究会（1993年12月広島）ならびに第43回日本消化器外科学会総会（1994年2月，東京）において発表した．

文　献

1) Alexander JW, McClellan MA, Ogle CK et al: Comsumptive opsoninopathy: possible pathogenesis in lethal and opportunistic infections. Ann Surg **184**: 672—678, 1976
2) Solomkin JS, Bauman MP, Nelson RB et al: Neutrophil dysfuction during the course of intra-abdominal infection. Ann Surg **149**: 9—17, 1981
3) Solomkin JS, Jenkins MK, Nelson RD et al: Neutrophil dysfunction in sepsis. II. Evidence for the role of complement activation products in cellular deactivation. Surgery **90**: 319—327, 1981
4) Nagata S, Tsuchiya M, Asaano S et al: Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. Nature **319**: 415—418, 1986

5) Souza LM, Boone TC, Gabrilove J et al: Recombinat human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. Science 232: 61—65, 1986
6) 黒岩　実, 長町幸雄, 松山四郎ほか：悪性腫瘍化学療法後の好中球減少症に対するG-CSFの効果に関する検討．一臨床的有用性およびin vitroでの好中球に及ぼす効果について一．日小児外会誌 29: 816—822, 1993
7) Tate RM, Repine JB: Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 128: 552—559, 1983
8) Rosen H, Klebanoff SJ: Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase-dificient leukocytes. J Clin Invest 58: 50—60, 1976
9) Nakano M: Detection of superoxide radical and singlet oxygen based on chemiluminescence of luciferin analogs. Edited by Packer L, Glazer AN. Method in Enzymology, vol 186. Academic Press, New York, 1990, p585—591
10) DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS et al: Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. J Immunol 129: 1589—1593, 1982
11) 中野　稔：発光化合物を用いる顆粒球，マクロファージの酸化種生成能の測定法．炎症　5: 277—284, 1985
12) Easmon CSF, Cole PJ, Williams AJ et al: The measurement of opsonic and phagocytic function by Luminol-dependent chemiluminescence. Immunology 41: 67—74, 1980
13) Ando K, Hirata Y, Shichire M et al: Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. FEBS Lett 245: 164—166, 1989
14) Iwanaga S, Morita T, Harada T et al: Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme. Its application for the assay of bacterial endotoxins. Haemostasis 7: 183—188, 1978
15) 下山順子, 丸川征四郎, 速水　弘ほか：好中球減少を伴う重症感染症治療におけるG-CSF併用の効果．ICUとCCU　17: 85—90, 1993
16) 遠藤重厚, 稲田　也, 井上義博ほか：敗血症に伴う顆粒球減少症に対するG-CSF投与の効果．日救急医会誌　2: 995—995, 1991
17) Roberts RL, Szelc CM, Scates SM et al: Neutropenia in an extremely premature infant treated with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Am J Dis Child 145: 808—812, 1991
18) Yasuda H, Ajiki Y, Shimozato T et al: Therapeutic efficacy of granulocyte colony-stimulating factor alone and in combination with antibiotics against pseudomonas aerginosa infections in mice. Infect Immun 58: 2502—2509, 1990
19) Toda H, Murata A, Matsuura N et al: Therapeutic efficacy of granulocyte colony stimulating factor against rat cecal ligation and puncture model. Stem Cells 11: 228—234, 1993
20) O'Reilly M, Silver GM, Greenhalgh DG et al: Treatment of intra-abdominal infection with granulocyte colony-stimulating factor. J Trauma 33: 679—682, 1992
21) Matsumoto M, Matsubara S, Matsuno T et al: Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor on microbial infection in neutropenic mice. Infect Immun 55: 1715—1720, 1987
22) Matsumoto M, Matsubara S, Yokota T et al: Effect of combination therapy with recombinant human granulocyte colony-stimulation factor (G-CSF) and antibiotics in neutropenic mice unresponsive to antibiotics alone. J Antimicrob Chemother 28: 447—453, 1991
23) Cario MS, Mauss D, Kommareddy S et al: Prophylactic or simultaneous administration of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in the treatment of Group B streptococcal sepsis in neonatal rats. Pediatr Res 27: 612—616, 1990
24) 遠藤重厚, 山田裕彦, 高桑徹也ほか：顆粒球減少をともなう敗血症に対するrhG-CSF投与効果の検討．侵襲と免疫　5: 29—31, 1992
25) 竹重公一郎, 高杉紳一郎, 水上茂樹：B活性酸素の細胞・顆粒での生成，白血球．蛋・核・酵　33: 2744—2755, 1988
26) Yuo A, Kitagawa S, Ohsaka A et al: Recombinant human granulocyte colony stimulating factor as an activator of human granulocytes: potentiation of responses triggerd by receptor-mediated agonists and stimulation of C3bi receptor expression and adherence. Blood 74: 2144—2149, 1989
27) Pittet JF, Morel DR, Hensen B et al: Elevated plasma endothelin-1 concentration are associated with the severity of illness in patients with sepsis. Ann Surg 213: 261—264, 1991
28) Shenep JL, Morgan KA: Kinetics of endotoxin release during antibiotic therapy for experimental gram-negative bacterial sepsis. J Infect Dis 150: 380—387, 1984
29) Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK et al:

Staphylococcus epidermidis induces compliment activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to Eschelichia coli. J Clin Invest **87**：1925—1935, 1991

30) Yoshimoto T, Nakanishi K, Hirose S et al: High serum IL-6 level reflects susceptible status of the host to endotoxin and IL-1/tumor necrosis factor. J Immunol **148**：3596—3603, 1992

31) Brigham KL, Meyreck B: Endotoxin and lung injury. Am Rev Respir Dis **133**：913—927, 1986

32) Kanazawa M, Ishizaka A, Suzuki Y et al: Granulocyte colony-stimulating factor does not enhance endotoxin-induced acute lung injury in Guinea pigs. Am Rev Respir Dis **145**：1030—1035, 1992

Therapeutic Role of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Treating E. Coli Peritonitis in Rats

Minoru Kuroiwa
First Department of Surgery, Gunma University School of Medicine
(Director: Prof. Yukio Nagamachi)

To investigate the therapeutic efficacy of G-CSF in treating peritonitis, we examined its effect on the mortality and function of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in a rat peritonitis model. E. coli was administered intraperitoneally. G-CSF and/or an antibiotic (LMOX) were given to rats after the onset of peritonitis. The mortality rate was decreased by simultaneous administration of G-CSF. Moreover, the administration of G-CSF in combination with LMOX induced a marked increase in the survival rate (100%), and resutlted in improvement of the peripheral leukocyte count. The ability of PMN to generate O_2^- in the LMOX + G-CSF treated group was significantly enhanced as compared with that of the other treated groups. The plasma endothelin-1 (ET-1) level was shown to be the lowest in the group treated with LMOX + G-CSF and to correlate with a decrease in the rat mortality in contrast with the endotoxin level. The combined use of G-CSF in treatment did not induce the findings of acute lung injury. These results suggest that G-CSF may have a protective effect on survival and also provide excellent support to antibiotics in the treatment of severe peritonitis. In addition, in this series of experiments,the plasma ET-1 level, regardless of endotoxin, was a useful indicator of the severity of peritonitis.

Reprint requests: Minoru Kuroiwa First Department of Surgery, Gunma University School of Medicine
3-39-15 Showamachi, Maebashi, 371 JAPAN