

20020616

平成 12.13.14 年度  
厚生科学研究費補助金  
(新興・再興感染症研究事業)

新型の薬剤耐性菌のレファレンス  
並びに耐性機構の解析及び  
迅速・簡便検出法に関する研究

研究報告書

平成 15 年 4 月

主任研究者 池 康 嘉

平成14年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析

及び迅速・簡便検出法に関する研究班 班員名簿

区分	氏名	所 属	職 名
主任研究者	池 康嘉	群馬大学医学部 微生物学教室 同 薬剤耐性菌実験施設	教授
分担研究者 (五十音順)	荒川 宜親 井上 松久 生方 公子  後藤 直正 中江 太治 堀田 國元 山口 惠三 山本 友子  和田 昭仁 渡邊 邦友	国立感染症研究所 細菌第二部 北里大学医学部 微生物学 北里大学 北里生命科学研究所 感染制御免疫部門 感染情報学研究室 京都薬科大学薬学部 微生物学 東海大学医学部 分子生命科学部門 国立感染症研究所 生物活性物質部第四室 東邦大学医学部 微生物学教室 千葉大学薬学部 薬効・安全性学講座 微生物薬品化学研究室 国立感染症研究所 細菌第一部第三室 岐阜大学 医学部附属嫌気性菌実験施設	部長 教授 教授  助教授 教授 室長 教授 教授  室長 教授
研究協力者 (順不同)	谷本 弘一 藤本 修平 富田 治芳 小澤 良之 野村 隆浩 林 淑璟 麻 興華 土井 洋平 山根 一和 柴田 尚宏 八木 哲也 柴山 恵吾 加藤はる 横山 佳子 岡本了一	群馬大学医学部 微生物学教室 群馬大学医学部 微生物学教室 群馬大学医学部 微生物学教室 群馬大学医学部 微生物学教室 群馬大学医学部 微生物学教室 (財)ヒューマンサイエンス振興財団 (財)ヒューマンサイエンス振興財団 国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部 (財)ヒューマンサイエンス振興財団 北里大学医学部微生物学	助教授 講師 助手 助手 技官 リサーチアシスタント リサーチアシスタント 研究員 研究員 研究員 主任研究官 研究員 主任研究官 リサーチアシスタント

千葉 菜穂子	北里大学北里生命科学研究所 感染情報学研究室
小林 玲子	北里大学北里生命科学研究所 感染情報学研究室
長谷川 恵子	北里大学北里生命科学研究所 感染情報学研究室
砂川慶介	北里大学医学部感染症学講座
西野 武志	京都薬科大学 微生物学教室
村田 健	京都薬科大学 微生物学教室
江田 志磨	東海大学医学部 分子生命科学部門
間世田 英明	東海大学医学部 分子生命科学部門
石野 敬子	国立感染症研究所生物活性物質部
石川 淳	国立感染症研究所生物活性物質部
土崎 尚史	国立感染症研究所生物活性物質部
石井 良和	東邦大学医学部
Alba Jimena	東邦大学医学部
木村 聡一郎	東邦大学医学部
山口 優子	千葉大学大学院薬学研究院
友安 俊文	千葉大学大学院薬学研究院
高屋 明子	千葉大学大学院薬学研究院
川村 千鶴子	岐阜大学 医学部附属嫌気性菌実験施設
中村 敏彦	岐阜大学 医学部附属嫌気性菌実験施設
貝森 光大	岐阜大学 医学部附属嫌気性菌実験施設

## 分担研究課題 及び 目次

総合研究報告書（平成 12～14 年度）		
池 康嘉	.....	1
総括報告書（平成 14 年度）		
池 康嘉	.....	19
分担研究報告書（平成 14 年度）		
荒川 宜親	アルベカシン高度耐性緑膿菌の耐性機構の解析 .....	27
池 康嘉	バンコマイシン耐性腸球菌（vancomycin resistant enterococci, VRE）の 新型の高頻度接合伝達性プラスミドと薬剤耐性の拡散 .....	33
井上 松久	$\beta$ -ラクタム薬加水分解酵素[ $\beta$ -ラクタマーゼ]産生菌の検出法の検討 .....	42
生方 公子	呼吸器感染症ならびに化膿性髄膜炎例から分離される肺炎球菌と インフルエンザ菌における耐性メカニズム解析と その迅速診断法に関する研究 .....	48
後藤 直正	臨床分離緑膿菌の多剤耐性化に機能する排出システムの性状解析 .....	69
中江 太治	緑膿菌の RND 型排出ポンプによる薬剤選別および多剤耐性の機序 .....	73
堀田 国元	アミノグリコシド耐性菌のレファレンス因子の特定と迅速簡便 検出法に関する研究 .....	82
山口 恵三	多剤耐性 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> の耐性機構に関する研究 .....	92
山本 友子	臨床分離フルオロキノロン高度耐性菌の耐性遺伝子の解析 およびキノロン感受性に影響を与える因子に関する研究 .....	97
和田 昭仁	グリコペプチド耐性黄色ブドウ球菌の検出法と耐性遺伝子検査技術の開発 —テイコプラニン感受性に影響を与える因子の解析— .....	103
渡邊 邦友	嫌気性菌に対する微量液体希釈法の問題点とその改良 .....	107
-----		
14 年度班会議抄録		112
主な論文別冊		131

## I. 総合研究報告書（平成12～14年度）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

12—14年度 総合研究報告書

新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法に関する研究

主任研究者 池 康嘉（群馬大学医学部微生物学教室）

**研究要旨** 平成12～14年度の3年間の重点研究として、臨床で問題となる薬剤耐性菌や新たに出現した新型の耐性菌の検出方法を目的に、基礎的研究及びそれらに基づく検出方法開発のための研究を行った。これらの研究で得られた新知見や成果を、以下に分担研究者ごとに列挙する。[荒川] 緑膿菌を含め、グラム陰性菌にカルバペネム耐性を賦与する各種のメタロ-β-ラクタマーゼの遺伝学的解析を行い、新型のメタロ-β-ラクタマーゼを発見した。メタロ-β-ラクタマーゼを迅速簡便に検出するためにメルカプト酢酸ナトリウムを利用したディスク拡散法を開発した。緑膿菌のアミノグリコシド耐性菌（アルベカシン耐性菌）から新型のアミノグリコシド不活化酵素を発見した。[井上] *Enterobacter cloacae*を含め、各種グラム陰性菌の染色体上に一般的に存在するβ-ラクタマーゼ遺伝子 *ampC* 遺伝子の調節機構の解析を行った。[生方] 肺炎球菌とインフルエンザ菌のβ-ラクタマーゼ生産、及びPBP変異によるβ-ラクタム剤耐性を検出するためPCR法を用いた検出方法を開発した。さらに、この方法はこれらの臨床分離菌の臨床分離β-ラクタム剤耐性を耐性機構別に検出可能であり、実用可能であることを証明した。[山口] 緑膿菌の *ampC* 型β-ラクタマーゼの生産量の増加により、カルバペネム耐性となることを発見した。[堀田] 黄色ブドウ球菌及びMRSAのアミノグリコシド不活化酵素による耐性検出方法の研究を行った。8種類のアミノグリコシド不活化酵素をコロニーから検出するためのPCR法を開発し、その実用性を証明した。[後藤・中江] *Pseudomonas aeruginosa*（緑膿菌）の多剤耐性に関与するマルチ・コンポーネントシステム（多蛋白構成システム）による、各種の薬剤排出ポンプの蛋白の遺伝子発現機構と、排出ポンプ構成蛋白と排出薬剤の特異性の研究を行った。[渡邊] 無芽胞生嫌気性菌 *Fusobacterium nucleatum* の培養方法の研究と、寒天平板希釈法を用いた各種抗菌剤に対する感受性の研究。[和田] 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性の耐性関連遺伝子の遺伝学的研究。[池] グリコペプチドアポバルシンの使用歴のある国からの輸入鶏肉から、VREが20%～50%の頻度で分離されるこ

と、中でも輸入量の多いタイ産鶏肉からの VRE は、すべてバンコマイシン耐性遺伝子の 3ヶ所に変異があり、それと同じ遺伝子を持つ VRE が日本人から分離されることが解った。タイとの共同研究で、養鶏場の VRE 分離を減少させる対策を行った。VRE から新たな高頻度接合伝達性プラスミドを分離した。[池・荒川] 日本の 278 病院からの臨床分離 MRSA6,625 株のバンコマイシン感受性の疫学調査を行い、MRSA の中でバンコマイシン耐性株は存在しないことを示した。

#### 分担研究者（五十音順）

荒川 宜親	国立感染症研究所	部長
井上 松久	北里大学医学部	教授
生方 公子	北里大学 北里生命科学研究所	教授
後藤 直正	京都薬科大学薬学部	助教授
中江 太治	東海大学医学部	教授
堀田 国元	国立感染症研究所	室長
山口 恵三	東邦大学医学部	教授
山本 友子	千葉大学薬学部	教授
和田 昭仁	国立感染症研究所	室長
渡邊 邦友	岐阜大学医学部	教授

は国家及び世界的規模で取り組まなければならないとされている。その対策は、1) 薬剤耐性菌感染症の調査、2) 薬剤耐性菌の研究、3) 新薬の開発、が不可欠な対策として含まれる。我が国において厚生労働省の事業として、薬剤耐性菌感染症の調査に対応するものとして「薬剤耐性菌感染症サーベイランス事業」が平成 12 年度から開始された。そして「薬剤耐性菌の研究」に対応するものとして本研究課題の研究が平成 12 年度より新規に開始された。本研究では、細菌が常に変異し出現してくる新型の薬剤耐性菌の耐性機構及びその拡散機構を研究し、それらの迅速検出方法を研究開発することを目的とした。

#### A. 研究目的

多剤薬剤耐性菌による病院内感染症は、先進国で最も多い細菌感染症で、共通の深刻な問題となっている。この背景には病院内における抗生物質の多用による治療薬が存在しないまでの多剤薬剤耐性菌の増加と蔓延、人口の高齢化と、高度先進医療の発達による、重度の免疫不全の易感染状態の入院患者の増加がある。多剤薬剤耐性菌による病院内感染症は、医療の安全を脅かし、高度先進医療の発展に大きな障害となり、医療経済的にも更なる負担を強いる。薬剤耐性菌の防御対策

病院内感染菌の多くは、各種の薬剤の耐性を獲得した多剤薬剤耐性菌である。細菌は突然変異や転移遺伝子、接合伝達性プラスミド等により常に変異し、あるいは新たな形質を獲得する。

また薬剤耐性菌の中で、一般の細菌検査室において判定が困難な耐性菌について、再試験を行うとともに、最新の解析技術を用いて分子・遺伝子レベルで、耐性菌の識別や同定を行うことにより、薬剤耐性菌の防御対策

及びサーベイランス事業の制度を保証することを目的とする。

## B. 研究方法

1. 薬剤耐性検査、NCCLS 法に基づく寒天平板希釈方法及び微量液体希釈方法を用いた。
2. PCR 法を用いた各種薬剤耐性遺伝子の解析と、新たな薬剤体制遺伝子の検出。
3. 遺伝子塩基配列の決定。
4. 薬剤耐性遺伝子のクローニングと遺伝子構造解析。
5. 遺伝学的変異株の分離と遺伝子発現機構の解析。
6. 免疫化学的方法を用いて、耐性発現蛋白の機能を解析。

## C. 総合結果

### 荒川 宜親

- ・カルバペネム系抗生物質は、グラム陰性菌、特に緑膿菌感染症に切り札的抗生物質である。カルバペネム分解酵素(メタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼ)による耐性菌が特に問題となる。日本ではこれまでIMP-1型メタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌が分離されていたが、2001年に日本の69医療施設より分離された505株のグラム陰性菌の調査で、ヨーロッパ等で分離されているIMP-2型、VIM-2型等のメタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌が18株分離された。これらのメタロ・ $\beta$ -ラクタマ

ーゼ生産菌は、新規に開発したメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)を利用したディスク拡散法によって検出可能で、検査における実用性を証明した。アミノ配糖体抗生物質アルベカシン高度耐性緑膿菌から、新型のアミノ配糖体不活化酵素を発見した。

### 井上 松久

- ・グラム陰性菌の基質拡張型 $\beta$ -lactamase (ESBL)及びメタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼの研究を行った。
- ・大腸菌、肺炎桿菌の中でセフム剤CPDX耐性を示す85株について、ESBL検出用プライマーを用いてその耐性遺伝子を調べた。ESBLの中でTEM型ESBLは5種類の異なるものが存在することが解った。
- ・グラム陰性桿菌は、染色体に誘導型のclassC $\beta$ -ラクタマーゼ(AmpC)遺伝子を保有する。*Enterobacter cloacae*のAmpC型耐性遺伝子保有株の*in vitro*高度 $\beta$ -lactam耐性変異株は、AmpC生産量が増加し、AmpC遺伝子の調節遺伝子に変異が存在した。メタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌はカルバペネム耐性となる。メタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼの中でIMP型はIMP-1~IMP-6が報告されている。*S. marcescens*由来IMP-6遺伝子にはIMP-1構造遺伝子の640番目の塩基に変異が存在した。

### 生方 公子

- ・肺炎球菌とインフルエンザ菌の $\beta$ -ラク



タム剤耐性菌の検出方法を開発する目的で、その耐性遺伝子研究と、疫学的研究を行った。

- ・ 全国の臨床分離肺炎球菌、インフルエンザ菌の $\beta$ -ラクタム耐性菌を調査し、 $\beta$ -ラクタム薬の標的である細菌の細胞壁合成酵素 PBP (Penicillin binding proteins; ペニシリン結合蛋白) の変異による耐性菌が肺炎球菌で約 45%、インフルエンザ菌で約 10%分離されることが解った。これらの PBP の遺伝子変異を解析し検査方法を研究開発した。
- ・ 肺炎球菌及びインフルエンザ菌の $\beta$ -ラクタム剤耐性 (感受性) を PCR 法で迅速に検出する方法を新たに開発した。これを用いて、呼吸器感染症又は化膿性髄膜炎由来肺炎球菌 200 株、インフルエンザ菌 203 株について、 $\beta$ -ラクタム剤耐性 (感受性) を調べた。肺炎球菌は、各種の PBP 変異と $\beta$ -lactam 剤耐性値の関係を PCR 法で検出可能とした。インフルエンザ菌は、PBP 変異、 $\beta$ -ラクタマーゼ生産、及び PBP 変異と $\beta$ -ラクタマーゼ生産の 3 種類の耐性機構による $\beta$ -ラクタム耐性を PCR 法で検出可能とした。

後藤 直正

- ・ 緑膿菌の新規薬剤耐性排出システムの機能解析を遺伝学的、免疫化学的手法を用いて研究した。
- ・ MexX-MexY の機能発現には外膜蛋白 OprM が必要であることが解った。MexX-MexY は野性株では発現せず、エ

リスロマイシン、テトラサイクリン、ゲンタマイシン等の存在により発現が一過性に誘導され、キノロン、 $\beta$ -ラクタム薬、テトラサイクリン。エリスロマイシン、アミノ糖等の薬剤の排出を行うことが解った。

- ・ *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) は、種々の抗菌剤や消毒剤に自然耐性を示す。これには細菌細胞膜蛋白により構成される多剤排出機構による。この機構の機能は、基質の能動的輸送、排出基質の特異性の認識等を行う。これまで 5 種類の主な機構が解っている。そのうち 2 種類 MexAB-OprM 機構、及び MexCD-OprJ 機構について、それぞれの基質を認識する蛋白と考えられている MexB、MexD 蛋白の遺伝子構造を、臨床分離緑膿菌 43 株について調べた。その結果、MexB 蛋白の遺伝子変異は検出できなかった。MexD 蛋白遺伝子は 5 種類の変異株が発見され、それぞれの変異株は元来 MexCD-OprJ 機構が認識する抗菌剤とは異なる抗菌剤を認識し、耐性となっていることが解った。これらの変異の遺伝子構造解析から、MexD 蛋白の基質を認識する蛋白の領域が解った。

中江 太治

- ・ 緑膿菌の多剤耐性を発現する、薬剤排出ポンプ遺伝子の発現調節機構の解析。
- ・ 緑膿菌の薬剤排出ポンプ (マルチコンポーネントシステム) には数種類存在する。それらの中で多剤耐性を発現する

MexEF·OprN 排出ポンプは突然変異によりキノロン耐性となる NfrC 耐性遺伝子と、それとは別の MexT 遺伝子の両者により陽性制御されている。それぞれの制御機構を解析した。

- ・ 緑膿菌の抗菌剤に対する自然耐性機構の一つ、MexAB·OprM 排出機構の発現調節機構を解析した。MexAB·OprM は調節蛋白 MexR repressor により調節されている。MexA 蛋白の遺伝子の、アミノ末端領域の変異株の解析から、この領域に MexR 蛋白が結合するオペレーター部位が存在することが解った。
- ・ 排出基質特異性に関与する膜貫通蛋白 MexB、MexY の基質特異性を証明した。

#### 堀田 国元

- ・ MRSA の各種アミノグリコシド耐性を迅速簡便検出するためのコロニーPCR法を確立するための研究を行った。
- ・ MRSA の各種アミノグリコシド系薬剤耐性の不活化酵素には、これまで8種類のアミノグリコシド修飾酵素が知られている。MRSA の *mecA* 遺伝子、コアクラーゼ遺伝子及びそれぞれのアミノグリコシド修飾酵素を同時にコロニーから検出できる PCR 法 (Multiples Colony Direct PCR 法) を開発した。80年代から90年代に臨床分離された MRSA 230 株について、新規に開発した PCR 法を用いて調べた結果、MRSA の各種アミノグリコシド修飾酵素 (アミノグリコシド耐性) を検出することができ、この方法が有用

であることが証明できた。

#### 山口 恵三

- ・ *Enterobacter cloacae*、*E. coli*、*P. aeruginosa*、*C. freundii*それぞれが生産する classC 型β-ラクタマーゼのセフェム系薬剤 cefcapene に対する基質特異性及び安定性を生化学的に解析した。その結果、cefcapene は、これらの菌の classC 型β-ラクタマーゼを特異的に不活化させることが解った。
- ・ Class C 型酵素によるカルバペネム耐性を発見した。

#### 山本 友子

- ・ 2000年4月から2001年3月の間に臨床分離されたグラム陰性菌430株、グラム陽性菌331株について、各種ニューキノロン耐性を調べた。緑膿菌の耐性菌分離率が最も高く32% (38株/118株)で、*E. coli* 6% (8株/133株)、*K. pneumoniae* 2% (2株/100株)であった。グラム陽性菌では、*S. aureus* 70% (64株/91株)、*S. epidermidis* 45% (23株/51株)、*E. faecalis* 31% (42株/51株)であった。高度耐性 *E. coli* 8株の耐性機構解析の目的で、キノロン剤標的酵素の DNA gyrase のサブユニット GyrA 遺伝子、及び topoisomerase IV のサブユニット ParC 遺伝子の変異をそれぞれ解析し、その変異部位を決定した。*P. mirabilis* のニューキノロン高度耐性には GyrB の変異が関連することを示した。

#### 和田 昭仁

- ・ 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性機構、及び検出方法の研究。
- ・ 黄色ブドウ球菌の実験株（テイコプラニン MIC ~3 mg/L）を用いて、テイコプラニン耐性（MIC 8~12 mg/L）の変異株を分離し、変異に関連する遺伝子 *tcaRAB* オペロンを同定した。
- ・ *tcaRAB* から、*tcaR*、*tcaRA*、*tcaRAB*、*tcaA*、*tcaB* それぞれの遺伝子を含む断片をクローニングし、*tcaRAB* 欠損株（テイコプラニン低感受性 12 µg/ml）との相補実験を行った。その結果、テイコプラニン感受性には *tcaA*、又は *tcaB* 遺伝子が必要であることが解った。

#### 渡邊 邦友

- ・ 無芽胞性嫌気性グラム陰性桿菌の *Fusobacterium* の抗菌薬耐性化と耐性機構の解析を行い、その検出方法の研究を行った。
- ・ 臨床分離 *Fusobacterium* が分離された 108 症例についてその臨床的背景及び感染部位、混合感染の有無について詳しく調べ、細菌学的な症態像を調べた。また 108 株の菌について、各種抗菌剤の MIC を調べた。この菌については、微量液体希釈方法で薬剤の MIC を測定できない株が存在することが解った。
- ・ 嫌気性菌 *Fusobacterium nucleatum* 110 株の各種薬剤感受性を、微量液体希釈法、寒天平板法、及び E テストで調べた。3 つの方法で同じ結果は得られなかった。寒天平板希釈法の結果から、ペニ

シリン・セフェム系薬 6 薬剤に高度耐性 3 株、中等度耐性 3 株、ofloxacin 中等度耐性 2 株が検出された。

#### 池 康嘉

- ・ 輸入食品を介しての人への VRE の伝播を制御する目的で、タイ国立食品衛生局との共同で、タイ国養鶏環境における VRE 実態調査と VRE 制御対策を行った。タイ養鶏会社 20 社に属する Breeder farm、Hatchery、Broiler farm、Chicken meat、Chicken cloacal swab それぞれのサンプルの VRE を調べた。サンプル当たり VRE の分離頻度は Breeder farm から 12%、Hatchery から 28%、Broiler farm から 14%、Chicken meat から 16%、Cloacal swab から 25%の頻度で VanA 型 VRE が分離された。その後、出荷後、床の敷葉交換の徹底、床の清掃及びグルテアルデヒド消毒薬で消毒を行った。その後、半年後の調査で、それぞれの sample からの VRE 分離率は 1%、4.6%、5%、1.3%、3%と減少していた。この研究で分離された VRE は全て VanA 型 VRE で、日本のタイからの輸入鶏肉の VanA 型 VRE で発見される、VanA 型耐性遺伝子中の *VanS* 遺伝子に 3 箇所の変異のある新型の VRE であった。
- ・ 日本での臨床分離 *E. faecium* 菌から世界で初めて分離された高頻度接合伝達性プラスミド pMG1 が、米国で分離された VRE の約 50%の株を保持していることが解った。

池 康嘉、荒川 宜親

- ・バンコマイシンは MRSA 感染症に対する特効薬である。1997 年に日本で最初にバンコマイシン低感受性（低度耐性）MRSA 及び低感受性株が生じやすいヘテロ耐性 MRSA が分離され、世界的に問題となった。1997 年に日本の 278 の医療施設から分離された 6,625 株の MRSA を異なる菌量（ $10^4$ /ml,  $10^6$ /ml,  $10^7$ /ml）、異なる培地（Mueller Hinton, BHI）、異なる方法を用いて、バンコマイシンの MIC を精細に解析した結果、これらの MRSA はすべてバンコマイシン MIC は  $2 \mu\text{g/ml}$  以下であり、問題となる株は存在しなかった。

#### D. 考察

本研究において対象とした細菌はグラム陽性菌では、黄色ブドウ球菌、腸球菌、肺炎レンサ球菌、グラム陰性菌では、大腸菌を含む各種グラム陰性腸内細菌、及び緑膿菌等の各種ブドウ糖非発酵グラム陰性菌等である。薬剤耐性機構としては(1)不活化機構として、 $\beta$ -ラクタム剤加水分解酵素（ $\beta$ -ラクタマーゼ）、アミノ糖系抗生物質修飾不活化酵素、(2)排出機構として、緑膿菌の薬剤排出機構、(3)薬剤作用点（作用物質）の変異または変換として、キノロン耐性、MRSA、 $\beta$ -ラクタム剤耐性肺炎レンサ球菌及びインフルエンザ菌、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）等で現在問題となっている菌種、耐性機構はすべてその研究対象とした。

それぞれの研究者の研究テーマにより達成された研究の成果はいくつかに分けられる。

#### (1) 薬剤耐性菌の耐性機構の研究から、迅速検出方法の開発と実用化された研究

すべての抗生物質に効かないカルバペネム耐性緑膿菌、中でもメタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌（多剤耐性緑膿菌）は緑膿菌において臨床上最も主要な耐性菌で、簡便な迅速検出方法の開発が早急に望まれていた。メタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼ検出のために、新規に開発されたメルカプト酢酸ナトリウム（キレート剤）を利用したディスク拡散法 [荒川] は、臨床検査室で簡便に迅速にメタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼを検出可能とした点で、非常に画期的で有用な方法である。

MRSA 感染症治療には他薬剤との併用薬剤として、アミノ糖系抗生物質が使用されることがある。MRSA のアミノ糖系抗生物質耐性菌検出のために開発された各種アミノ糖不活化酵素検出用 PCR 法 [堀田] は、黄色ブドウ球菌のコロニーからこれらの各種不活化酵素（耐性）8 種類と菌種を同時に検出することが可能であり、臨床分離 MRSA を用いた研究においてこの方法が有用であることが実証され、実用化に向けている。

$\beta$ -ラクタム剤耐性肺炎レンサ球菌及びインフルエンザ菌は重症髄膜炎や重症肺炎の原因となる。これらの菌の、 $\beta$ -ラクタム剤耐性機構の研究に基づき開発された PCR 法を用いた、これらの耐性菌の迅速検出方法は、コロニーから 24 時間以内に検出可能で、実

用可能であることが証明された。

## (2) 新たな耐性菌の発見と耐性機構の解析

緑膿菌におけるアミノグリコシド高度耐性機構の新たな発見(荒川)は、これまでに報告のない全く新しい機構によるもので、今後疫学調査等の研究が必要となる。

新型のメタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼの発見[荒川]、プロトタイプメタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼの変異による新型のメタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼの発見[井上]、新型の基質拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼの発見[荒川、井上、山口]、新型のVanA型VREの発見[池]等の研究は、今後これらの菌の、検出方法の研究に発展させていく。

## (3) 薬剤耐性機構の研究

緑膿菌の排出ポンプは、この菌の自然耐性に主要な働きをする。この菌の排出機構の解析は、排出ポンプの耐性発現の解明につながる[後藤、中江]。黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性機構の研究では、耐性に関連する遺伝子を検出した[和田]。高度キノロン耐性機構の解析により、高度耐性に関連する遺伝子を明らかにした[山本]。これらの研究は、今後の耐性菌の検出方法の開発に有意義用である[山本]。

## (4) 疫学的研究

疫学的調査研究として、臨床分離各種細菌のキノロン耐性の分離頻度[山本]、臨床分離 *Fusobacterium nucleatum* の各種抗菌剤に対する感受性[渡邊]の研究は、現在の耐性菌の疫学データとして有用である。

我が国は、先進国あるいは東アジア各国の

中で唯一 VRE が広がっていない国である。しかしながら、タイやフランス等の輸入鶏肉から高頻度に VRE が分離される。またタイ産鶏肉から分離される VRE のバンコマイシン耐性遺伝子は、新しい型の遺伝子である。輸入鶏肉を介しての VRE が人に伝播することが危惧される。日本への鶏肉の主要輸出国であるタイの養鶏環境における VRE 制御対策(共同研究)により、タイ養鶏環境及びタイの輸出用鶏肉の VRE 検出率を顕著に減少させることができた[池]。

臨床分離 MRSA のバンコマイシン低感受性に関する調査研究結果(池、荒川等)は 2000 年に既に厚生省には報告済みであるが、この問題が日本を含め世界的に臨床現場で現在でも混乱を生じている問題であり、厚生省に報告後、国際専門誌への投稿を目的として詳細な研究解析を行い、その結果が J. Clin. Microb (2001, 39(12), 4445-4451) に掲載された。

## E. 結論

過去 3 年間の研究において、臨床で現在問題となっている薬剤耐性菌の検出方法を開発した。また、新たな薬剤耐性菌や、薬剤耐性菌の拡散に関与する新たな接合伝達性プラスミド等も発見され、それらの検出方法の基礎的研究を行い、さらに薬剤耐性菌に関する全国的な調査を行い、結果を厚生労働行政に還元してきた。その主なものは次の通りである。

(1) 緑膿菌耐性で最も重要な、メタロ・ $\beta$ -ラ

- クタマーゼのディスク拡散法による迅速検出方法を開発した。メタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼの簡便・迅速検出方法を提供し、薬剤耐性菌調査事業に正確な情報提供。
- (2) 全国 287 の医療施設の、肺炎レンサ球菌 2,000 株、インフルエンザ菌 1,500 株の分子疫学調査を行い、 $\beta$ -ラクタム耐性の PCR 法による迅速検出方法 (2 時間) を確立した。
- (3) コロニーからアミノグリコシド耐性を迅速に検出する Multiplex colony direct-PCR 法を確立した。
- (4) 緑膿菌に各種アミノグリコシド (AG) 高度耐性 (MIC > 1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) を賦与し、伝達性プラスミド上に遺伝子が存在する新型の AG 不活化酵素 (16SrRNA メチル化酵素) を世界で初めて発見した。新型 AG 耐性菌を薬剤耐性菌調査事業に加え、早期防御策が可能になる。
- (5) バンコマイシン (VCM) 低感受性 MRSA 及び VCM ヘテロ耐性 MRSA 菌の日本の 278 病院から 6,625 株の MRSA の実態調査研究の結果、当該耐性菌は存在しないことを明らかにした。この問題で世界的に混乱した医療現場に、調査研究による明確な科学的実態と対処策を提示。
- (6) タイ産鶏肉由来 VanA 型 VRE は、高度 VCM・低度 TEIC 耐性で、VanA 型遺伝子の 3 ヶ所に同じ変異があった。人分離 VRE にタイ産鶏肉 VRE と同じ VRE が存在した。日本の VRE 防御対策の基礎データを提供。

- (7) 日米の VRE に、新型の高頻度接合伝達性ゲンタマイシン耐性プラスミドが広く分布し、VCM 耐性を急速に拡散する因子であることを発見し、プラスミド特異遺伝子を同定し、検出可能とした。日本の VRE 防御対策の基礎データを提供。

## F. 研究成果等 (順不同)

### I. 学会発表

1. 山根一和、土井洋平、八木哲也、柴田尚宏、加藤はる、荒川宜親：アルベカシン高度耐性緑膿菌から分離された 16S rRNA メチル化酵素遺伝子の周辺構造の解析、第 51 回日本感染症学会東日本地方会、宮城、10 月、2002 年
2. Y. Doi, K. Yokoyama, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, Y. Arakawa: Prevalence of putative 16S rRNA methylase gene conferring consistent resistance to all aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan. American Society for Microbiology 102nd General Meeting, Salt Lake City, USA, May, 2002
3. 横山佳子、土井洋平、柴田尚宏、黒川博史、山根一和、八木哲也、柴山恵吾、加藤はる、荒川宜親：アルベカシン高度耐性緑膿菌から新規に発見されたプラスミド性 16S rRNA メチル化酵素、第 75 回日本細菌学会総会、横浜、4 月、2002
4. Chiba N., K. Hasegawa, R. Kobayashi, K. Sunakawa, and K. Ubukata: PFGE typing analysis and antibiotic

resistance patterns of *Haemophilus influenzae* from Meningitis patients. 42th ICAAC, Poster #1483

5. 生方 公子他:化膿性髄膜炎例から分離されたインフルエンザ菌における急速な耐性化。日本小児感染症学会 (札幌) 2002年11月9日
6. 生方 公子他:化膿性髄膜炎例から分離された肺炎球菌の解析。日本小児感染症学会 (札幌) 2002年11月9日

## II. 速報

1. 生方公子, 砂川慶介:化膿性髄膜炎・全国サーベイランス速報4, 平成15年1月20日発行

## III. 誌上発表

- 1: Ozawa Y, Tanimoto K, Nomura T, Yoshinaga M, Arakawa Y, Ike Y. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(12):6457-61.
- 2: Tanimoto K, Ike Y. Analysis of the conjugal transfer system of the pheromone-independent highly transferable Enterococcus plasmid pMG1: identification of a *tra* gene (*traA*) up-regulated during conjugation. *J Bacteriol*. 2002;184(20):5800-4.
- 3: Tomita H, Pierson C, Lim SK, Clewell DB, Ike Y. Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3326-33.
- 4: Ike Y, Arakawa Y, Ma X, Tatewaki K, Nagasawa M, Tomita H, Tanimoto K, Fujimoto S. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. *J Clin Microbiol*. 2001;39(12):4445-51.
- 5: Matsuoka, M., K. Endo, Y. Nakajima, T. Watanabe and M. Inoue. A new macrolide resistant gene *ermF* that encoded by plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 154-159, 2002.
- 6: Lee, K., J. K. Lim, D. Yong, J. Yum, Y. Chong, R. Okamoto and Inoue, M.. Evaluation of efficacy of screening extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* where bacteria are increasingly prevalent. *J Clin Microbiol*. 39:3696-3699, 2001.
- 7: Xiong Z, Zhu D, Wang F, Zhan Y, Okamoto R and M. Inoue. Investigation of extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Diag Microbiol Infect Dis* 44:195-200, 2002
- 8: Ida, T., R. Okamoto, M. Nonoyama, K. Irinoda, M. Kurazono and M. Inoue. Antagonism between aminoglycosides and  $\beta$ -lactams in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate involves induction of an aminoglycoside-modifying

- enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1516-15222, 2002.
- 9: Ubukata, N., Chiba, K., Hasegawa, Y., Shibasaki, K., Sunakawa, M., Nonoyama, S., Iwata, and M. Konno. Differentiation of  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* from other *H. influenzae* strains by a disc method. *J. Infect. Chemother.* 8:65-74, 2002.
- 10: K. Hasegawa, K. Yamamoto, N. Chiba, S. Iwata, K. Nagai, M.R. Jacobs, PC Appelbaum, K. Sunakawa, and K. Ubukata. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbial Drug Resistance*, 9: 39-46, 2003.
- 11: 生方公子 他：本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学. *日治療誌*, 50:794-804, 2002.
- 12: 生方公子 他：本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学. *日治療誌*, 51:60-70, 2003.
- 13: Jalal, S., Ciofu, O., HØiby, H., Gotoh, N., and Wretlind, B. 2000. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 710-712.
- 14: Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. 2000. Contribution of the MexX-MexY-OprM Efflux System to Intrinsic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2242-2246.
- 15: Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. 2000. Substrate Specificity of the MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3322-3327.
- 16: Pai, H., Kim, J.-W., Kim, J., Lee, J.H., Choe, K.W., and Gotoh, N. 2001. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 480-484.
- 17: Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., and Nishino, T. 2001. Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* mutant to  $\beta$ -lactams due to reduced expression of AmpC  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1284-1286.
- 18: Okamoto, K., Gotoh, N., and Nishino, T. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: Penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1964-1971.
- 19: Okamoto, K., Gotoh, N., and Nishino, T. 2002. Extrusion of Penem Antibiotics by Multicomponent Efflux Systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY/OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:



- 2696-2699.
- 20: Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E.W., and Speert, D.P. 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* 196: 109-118.
- 21: Murata, T., Kuwagaki, M., Shin, T., Kawai, Y., Gotoh, N., and Nishino, T. 2002. The substrate specificity of tripartite efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* is determined by the RND component. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 247-251.
- 22: Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., Gotoh, N., and Lomovskaya, O. 2002. Analysis of mutations which modulate the substrate specificity of the multidrug efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa* implicates the large periplasmic loops in substrate binding. *Mol. Microbiol.* 46: 889-901.
- 23: Okamoto, K., Gotoh, N., and Nishino, T. 2002. Alterations of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by overproduction of multidrug efflux systems, MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY/OprM to carbapenems: substrate specificities of the efflux systems. *J. Infect. Chemother.* 8: 371-373.
- 24: Murata, T., Gotoh, N., and Nishino, T. 2002. Characterization of the deduced outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of the specific rabbit antisera to the gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* 217:57-63.
- 25: Gotoh, N., Murata, T., Kimura, T., Ozaki, T., Kondo, A., and Nishino, T. 2003. Intrinsic Resistance of *Escherichia coli* to mureidomycin A and C due to expression of the multidrug efflux system AcrAB-TolC: comparison with the efflux systems of mureidomycin-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.*, in press.
- 26: Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T., and Tuchiya, T. 2003. Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* 26: AO1. *J. Antimicrob. Chemother.*, in press.
- 27: Hacquet, D., Vogne, C., Garch, F.E., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskaya, O., and Plesiat, P. 2003. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, in press.
- 28: 後藤直正. 2000. 細菌の異物(薬剤)排出蛋白質と抗菌薬耐性. *日本化学療法学雑誌* 48: 509-515. 後藤直正. 2001. 特集 耐性菌感染症—基礎・臨床の進歩と展望. 膜透過および排出機構に伴う多剤耐性菌. *日本臨床* 59: 712-718.
- 29: 後藤直正. 2003. 新世紀の感染症学 下—ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート. 第1部 グローバル時代の感染症学IV 感染症

- 特論 5. 薬剤耐性菌 8) 薬剤耐性緑膿菌. *日本臨床* 61: 196-201.
- 30: 後藤直正. 2001. トピックス 薬剤耐性とエフラックスポンプ. *臨床検査* 45: 779-782.
- 31: 後藤直正. 2001. Seminar & カラー 耐性菌シリーズ⑥ MDR. *感染症* 31: 32, 35-44.
- 32: 館田一博, 後藤直正, 千田一嘉, 石黒正路, 石井良和. 2001. ICC in the BioScan 座談会「グラム陰性菌におけるβ-ラクタム薬耐性」*BioScan* 2001.8.
- 33: 後藤直正. 2002. ARCHIVES 2002. 基礎編 緑膿菌の薬剤排出ポンプ. *分子呼吸器病* 6: 472-475.
- 34: Eda, S., Maseda, H., and Nakae, T. 2003 An elegant means of self-protection in gram -negative bacteria by recognizing and extruding xenobiotics from the periplasmic space *J. Biol. Chem.* 278 2085-2088.
- 35: Maseda, H., Kitao, M., Eda, S., Yoshihara, E and Nakae, T. 2002A novel assembly process of the multicomponent xenobiotic efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* *Molec. Microbiol.* 46 677-686.
- 36: Yoneyama, H., Maseda, H., Yamabayashi, T., Izumi, S. and Nakae, T. 2002 Secondary-site mutation restores the transport defect caused by the transmembrane domain mutation of the xenobiotic transporter MexB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 513-518.
- 37: Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., and Nakae, T. 2002 high-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation *Microbiol. Immunol.* 46 391-395.
- 38: Nakae, T., Guan, L., Yoneyama, H., Germ, M., Nakajima, A. 2002 Topological localization of the subunit proteins of the three component RND-efflux pump MexAB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa*. *Progress in Biomedical Optics and Imaging* 3 106-117
- 39: Herskovits, A. A., Nakae, T., Ehrmann, M., and Bibi, E. 2001 Evidence for coupling of membrane targeting and function of the signal recognition particle (SRP) receptor FtsY *EMBO reports.* 2 1040-1046.
- 40: Guan, L., and Nakae, T. 2001 Identification of essential charged residues in Transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* 183 1734-1739.
- 41: Saito, K., Eda, S., Maseda, H., Nakae, T. 2001 Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux expression in *Pseudomonas aeruginosa* *FEMS Microbiology Letters* 195 23-28
- 42: Nakae, T., Saito, K., and Nakajima, A. 2000 Effect of sulbactam on anti-pseudomonal activity of beta-lactam antibiotics in cells producing various levels of the MexAB-OprM efflux pump

- and beta-lactamase. *Microbiol. Immunol.* 44 997-1001.
43. Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A., and Nakae, T. 2000 variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa* *FEMS Microbiol. Letts.* 192 107-112.
- 44: Nakajima, A., Sugimoto, Y.,k Yoneyama, H., and Nakae, T. 2000 Localizaiton of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* *J. Biol. Chem.* 275 30064-30068.
- 45: Maseda, H., Yoneyama, H., and Nakae, T. 2000 Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 658-664.
46. Yoneyama, H., Maseda, H., Kamiguchi, H., Nakae, T. 2000 Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA,B-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane. *J. Biol. Chem.* 275 4628-4634.
- 47: 土崎尚史, 石川淳、堀田国元: コロニーPCR法によるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出. *Japanese J. Antibiotics* 53: 422-429 (2000).
- 48: Ishikawa J, Tsuchizaki N, Yoshida M, Ishiyama D & Hotta K: Colony PCR for detection of specific DNA sequences in actinomycetes. *Actinomycetologica* 14: 1-5 (2000).
- 49: Hotta K, Sunada A, Ikeda Y & Kondo S: Double stage activity in aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiotics* 53: 1168-1174 (2000).
- 50: Sunada A, Ikeda Y, Kondo S & Hotta K: Acetylation of aminoglycoside antibiotics with 6'-methylamino group, istamycin B and micromomicin, by a novel aminoglycoside-6'-acetyltransferase of actinomycete origin. *J. Antibiotics* 53: 1416-1419 (2000).
- 51: 土崎尚史、石川淳、堀田国元: コロニーPCRによるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出. *Japanese J. Antibiotics* 53: 422-429 (2000).
- 52: Tsuchizaki N, Hamada M & Hotta K: Rapid characterization by colony direct PCR of distribution specificity in *Streptomyces* of kan gene encoding a specific aminoglycoside-3-N-acetyltransferase. *Actinomycetologica* 15: 23-29 (2001).
- 53: 土崎尚史、堀田国元: Colony direct-PCRによる黄色ブドウ球菌の遺伝子プロフィール解析. *TOYOBO UPLOAD* No.69, pp.9-10 (2002).
- 54: 堀田国元、土崎尚史、石野敬子: MRSAのアルベカシン耐性はなぜ新興しないのか. *月刊薬事* 44(7): 1263-1267(2002).
- 55: 土崎尚史、堀田国元: Colony direct-PCRによる各種微生物遺伝子の簡便・迅速検出. *TOYOBO UPLOAD* No.70, pp.15-16 (2003).
- 56: Ishii, Y., J. Alba, S. Kimura, K.

- Nakashima, Y. Abe, and K. Yamaguchi. 2002. Rapid pulsed-field gel electrophoresis technique for determination of genetic diversity of *Serratia marcescens*. *J Infect Chemother* 8:368-70.
- 57: Alba, J., Y. Ishii, M. Galleni, J.-M. Frere, M. Ito and K. Yamaguchi. 2002. Cefcapene inactivates chromosome-encoded class C  $\beta$ -lactamases. *J. Infect Chemother* 8: 207-210.
- 58: Ito, I., J. Naito, S. Kadowaki, M. Mishima, T. Ishida, T. Hongo, L. Ma, Y. Ishii, T. Matsumoto and K. Yamaguchi. 2002. Hot spring bath and *Legionella pneumoniae*: an association confirmed by genomic identification. *Internal Medicine* 41: 859-863.
- 59: Ma, L., H. Matsuo, Y. Ishii, and K. Yamaguchi. 2002. Characterization of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* isolates from a nosocomial outbreak at three geriatric hospitals. *J Infect Chemother* 8:155-62.
- 60: Masuda, T., Y. Ishikawa, Y. Akasaka, T. Ishii, K. Tateda, Y. Ishii, K. Yamaguchi, and H. Kiguchi. 2002. Follicular bronchiolitis (FBB) associated with *Legionella pneumophila* infection. *Pediatr Pathol Mol Med* 21:517-24.
- 61: Masuda, T., Y. Ishikawa, Y. Akasaka, T. Ishii, K. Tateda, Y. Ishii, K. Yamaguchi, and H. Kiguchi. 2002. Follicular bronchiolitis associated with *Legionella pneumophila* infection. *Pediatr Pathol Mol Med* 21:41-7.
- 62: Okamoto, H., K. Tateda, Y. Ishii, T. Matsumoto, T. Kobayashi, S. Miyazaki, and K. Yamaguchi. 2002. High frequency of erythromycin A resistance and distribution of *mefE* and *ermB* genes in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Japan. *J Infect Chemother* 8:28-32.
- 63: Takenouchi, T., Y. Ishii, and K. Yamaguchi. 2002. Properties of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases constructed by site-directed mutagenesis. *J Infect Chemother* 8:211-7.
- 64: Miyazaki, S., T. Hosoyama, N. Furuya, Y. Ishii, T. Matsumoto, A. Ohno, K. Tateda, and K. Yamaguchi. 2001. In vitro and in vivo antibacterial activities of L-084, a novel oral carbapenem, against causative organisms of respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 45:203-7.
- 65: Yoshizumi, S., Y. Takahashi, M. Murata, H. Domon, N. Furuya, Y. Ishii, T. Matsumoto, A. Ohno, K. Tateda, S. Miyazaki, and K. Yamaguchi. 2001. The in vivo activity of olamufloxacin (HSR-903) in systemic and urinary tract infections in mice. *J Antimicrob Chemother* 48:137-40.
- 66: Okamoto, H., S. Miyazaki, K. Tateda, Y. Ishii, and K. Yamaguchi. 2001. In vivo efficacy of telithromycin (HMR3647) against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3250-2.
- 67: Ohno, A., Y. Ishii, L. Ma, and K. Yamaguchi. 2000. Problems related to