

【総説】

臨床微生物学トランスレーショナル・リサーチの推進と確立に向けた基盤研究

—21年間の研究生活の軌跡—

山口 恵三

東邦大学名誉教授*

(平成24年8月21日受付・平成24年8月30日受理)

21年間にわたる東邦大学医学部微生物・感染症学講座での研究生活のなかで、トランスレーショナル・リサーチの視点からいくつかの知見を報告することができた。経腸管的緑膿菌性敗血症モデルを用いた解析がそのスタートであり、この実験から好中球減少患者に発症する敗血症の発症病態や新しい治療法に関する知見が得られた。また、緑膿菌の病原因子に及ぼすマクロライド剤の効果を検討するなかで、本剤が緑膿菌のクオラムセンシング機構を抑制する事実を見出した。この成績は、マクロライド剤の慢性気道感染症に対する有効性メカニズムの一つと考えられており、その応用による新しい感染症治療薬の開発が期待される。レジオネラの臨床疫学および動物実験の成績から本症の発症病態、重症化のメカニズムに関するいくつかの知見を報告した。耐性菌および抗菌薬耐性メカニズムの研究のなかで最も重要な報告は、本邦で初めての基質拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)の検出であり、酵素学的な特徴の解析を加え“Toho型ESBL”として報告することができた。東邦大学在任中にさまざまな幸運に遭遇したが、その幸運をしっかりと研究に発展させ論文として仕上げてくれた教室員に心よりお礼を申し上げたい。

Key words: translational research, quorum-sensing, extended spectrum β -lactamase, *Legionella*, endogenous sepsis

1990年から約21年間にわたり東邦大学医学部微生物・感染症学講座の教授を務めさせていただいた。本講座は桑原章吾先生、五島瑳智子先生が基礎を築かれた教室であり、その研究の一貫した方向性は基礎と臨床の融合であり、“臨床に真実がある”という視点に基づく研究ではないかと思う。日頃経験する症例のなかに真実があり、そのなかから問題点・疑問点をいかに正しく見いだすか、そしてその疑問を基礎的な考え方や手法を用いて解析することから研究がスタートする。いわゆるトランスレーショナル・リサーチ的発想であるが、本概念が出てくるだいぶ前から当教室ではこれが実践されてきたように思う。この視点から、私の在任中にいくつかの知見を報告することができたことを大変嬉しく思う。その一つが経腸管的緑膿菌性内因性敗血症モデルを用いた発症病態の解析であり、私の緑膿菌研究はこのモデルからスタートしている。また、緑膿菌の病原因子に関してある種のマクロライド剤が本菌のクオラムセンシング機構を抑制する事実を確認し、本作用が慢性緑膿菌気道感染症に対する有効性メカニズムの一つになっている可能性を報告した。臨床疫学的な研究として、1991年よりレジオネラ肺炎の診断に関する研究を開始し、そのなかで本症の臨床的特徴、また動物モデルを用いた発症病態の解析に関する研究を展開した。本邦の耐性菌の疫学

に関しては、各種薬剤の市販後調査のなかでいくつかの興味深い知見を見出すことができた。そのなかで最も重要な報告は、日本で初めての基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ“Toho-1”の報告であり、私どもにもたらされた偶然とそれを見逃さなかった教室員に感謝したい。本稿では志賀潔・秦佐八郎賞の受賞講演で話した内容を中心に、21年間の東邦大学医学部微生物・感染症学講座の研究の一端を紹介してみたい。

I. 緑膿菌内因性敗血症モデルの確立とこれを用いた研究の展開

今日においても好中球減少患者にみられる緑膿菌性敗血症は重要であり、その死亡率は依然として高い。緑膿菌の侵入門戸としては腸管が重要であり、腸管粘膜からのバクテリアル・トランスロケーションを介した菌の門脈への侵入、肝臓における微小膿瘍形成、全身への菌散布により敗血症が発症することが明らかとなっている。この知見のもとになった基礎データはFig. 1に示す感染動物実験モデルから得られた¹⁾。SPFマウス(腸管に緑膿菌を保菌していないマウス)では好中球減少が進行しても敗血症にはいたらないのに対し、経口的に緑膿菌を接種し腸管内に定着させているマウスでは高い頻度で緑膿菌性敗血症が発症することが確認されている。このマウ

*東京都大田区大森西 5-21-16

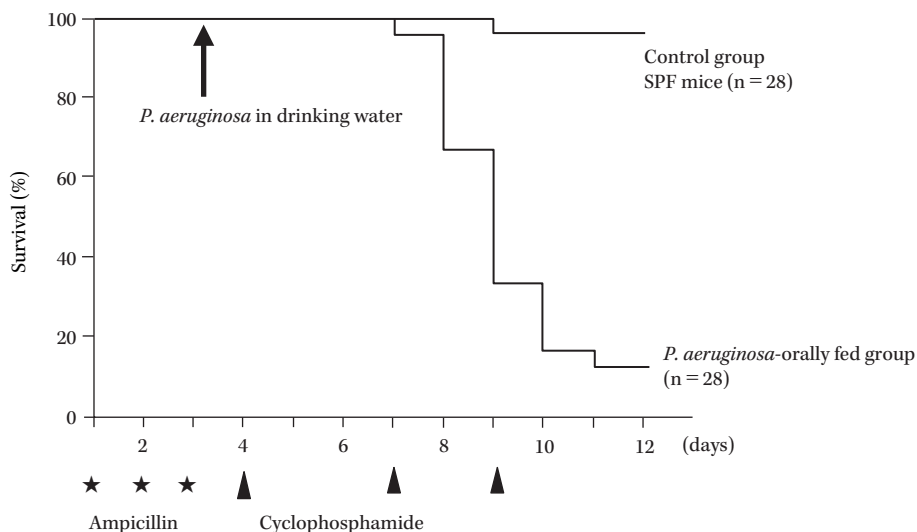


Fig. 1. Induction of gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice¹⁾.

モデルは、好中球減少患者にみられる緑膿菌性敗血症の発症病態を反映したモデルであり、本実験系を用いることによりいくつかの新しい知見を報告することができた。敗血症発症における肝臓クッパー細胞の役割²⁾、エクソトキシンをはじめとする菌側病原因子の関与³⁾、生体防御因子としてのTNF・IL-1などの生体側ファクター^{4,5)}、さらにはビフィドバクテリウムを用いたプロバイオティクスの可能性⁶⁾などが代表的なものである。一方で、この実験系において不明なことも多く残されている。緑膿菌の腸管からの侵入の分子メカニズムは最も重要な問題であり⁷⁾、またその予防戦略・治療戦略に関してもまだまだ多くの課題が残されている。緑膿菌でみられたこの経腸管的敗血症の現象を応用して、カンジダ、MRSA、さらには非結核性抗酸菌症などの病原体における経腸管的敗血症の発症病態に関しても検討していくことが必要であろう。

II. マクロライド剤による緑膿菌クオラムセンシング抑制効果

1998年にKudohらがびまん性汎細気管支炎患者に対してエリスロマイシンの少量長期投与が有効であるという画期的な成績を報告した⁸⁾。興味深いことに、このマクロライド剤の有効性は緑膿菌が気道に定着した宿主、すなわち慢性緑膿菌気道感染症患者においてもみられることが特徴であった。このマクロライド剤の有効性メカニズムに関して、われわれの教室では本剤の緑膿菌病原因子発現に及ぼす影響について種々の検討を行ってきた。その結果、ある種のマクロライド剤が緑膿菌の菌体表層構造を変化させること^{9,10)}、細菌の病原因子産生の抑制¹¹⁾、長時間暴露による殺菌作用¹²⁾などを報告してきた¹³⁾(Fig. 2)。そしてさらに、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、ロキシスロマイシン、アジスロマイシンなどのマクロライド剤が緑膿菌のクオラムセンシング機構を抑制

するという事実を報告した^{13,14)}。クオラムセンシング機構は、autoinducer分子を介した細菌の遺伝子発現・病原因子調節機構の一つで、本機構により色素産生やプロテアーゼなど緑膿菌のさまざまな病原因子発現が制御されている。特に緑膿菌ではLas系とRhl系のクオラムセンシング機構が重要であり、その発現を促進するautoinducerとしてホモセリンラクトン分子(3-oxo-C₁₂-HSL, C₁₂-HSL)が利用されている。アジスロマイシンは2μg/mLという低濃度でこれらautoinducerの産生を強く抑制することが明らかとなり、この作用がマクロライド剤の慢性緑膿菌気道感染症に対する有効性メカニズムの一つになっていることが想定されている¹⁴⁾(Fig. 3)。さらに緑膿菌による人工呼吸器関連肺炎を想定した実験系のなかで、アジスロマイシンの予防投与が生存率を有意に高めることを確認しており、その作用メカニズムとしても本剤の有するクオラムセンシング抑制効果が関与している可能性が高い¹⁵⁾。マクロライド剤のクオラムセンシング抑制効果の分子メカニズムの詳細は不明であるが、DNAマイクロアレイを用いた検討により、本剤によりautoinducer合成にかかわる多数の酵素遺伝子の発現が抑制されていることを確認している¹⁶⁾。

また近年、緑膿菌のautoinducerは自身の病原性発現を制御するばかりでなく(intra-species)、他の細菌に対する作用(inter-species)、あるいは生体細胞に対する作用(inter-kingdom)も有していることが報告されている。この点に関してわれわれの研究室では、緑膿菌の3-oxo-C₁₂-HSLが白血球にアポトーシスを誘導すること¹⁷⁾、レジオネラの増殖を抑制すること¹⁸⁾、またその分解産物が*Clostridium difficile*に対して殺菌作用があることを報告した¹⁹⁾。前者の知見に関して、アポトーシス誘導作用は好中球やマクロファージなどの貪食細胞に対してみられるものの、上皮細胞に対してはみられなかった。Auto-

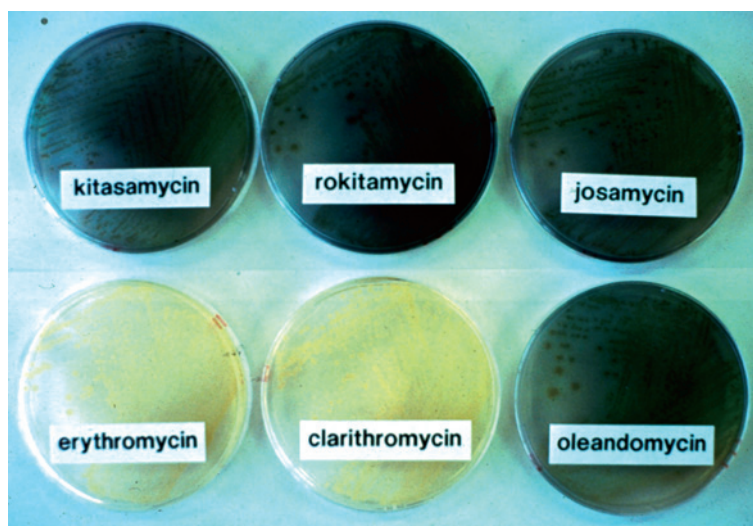


Fig. 2. Effects of macrolides on pigment production of *Pseudomonas aeruginosa*¹³⁾.

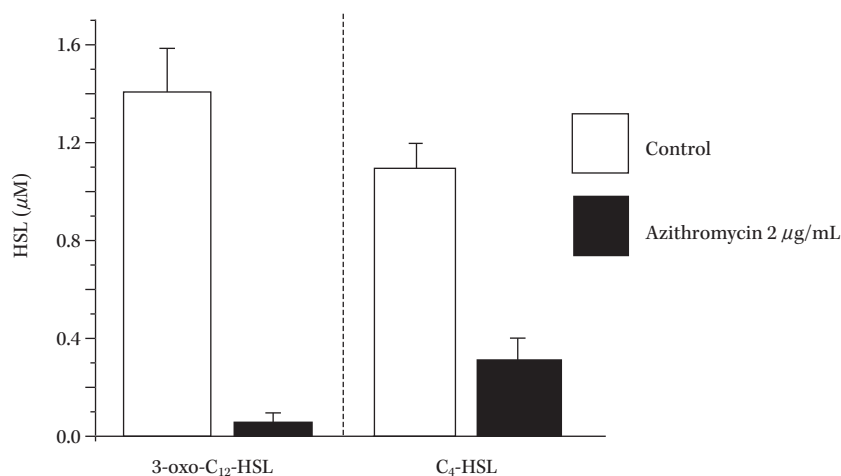


Fig. 3. Effect of sub-MIC of azithromycin on autoinducer production¹⁴⁾. *P. aeruginosa* was grown in a liquid medium with 2 μg/mL of azithromycin for 10 hours, and then autoinducer concentrations in the medium were determined by bioassay.

inducer 分子のアポトーシス誘導作用のメカニズム，特に宿主側受容体の存在などに関して今後の検討が待たれる。またレジオネラに対する増殖抑制効果においては autoinducer の鉄キレート作用が，*C. difficile* に対する殺菌作用に関しては本物質の膜障害作用が関与しているものと思われる^{18,19)} (Fig. 4)。マクロライド剤のクオラムセンシング抑制効果の分子メカニズムをはじめ，autoinducer の intra-species, inter-species, そして inter-kingdom communication としての役割などまだまだ解明しなければいけない疑問が山積している状況であり，今後の展開が期待される。

III. レジオネラ肺炎の疫学および発症病態

レジオネラ属細菌はクーリングタワーの水，土壌など自然界に広く存在するグラム陰性ブドウ糖非発酵菌で，

汚染したエアロゾルの吸入により肺炎を引き起こす。本菌はヒトのマクロファージ/単核球内での増殖を特徴とし，β-ラクタム剤やアミノグリコシド剤が無効であり，今日においても死亡率の高い感染症の一つとして知られている。本菌は1976年のフィラデルフィアにおける集団発生を契機に見つかったが，本邦では斉藤らが1981年にレジオネラ肺炎の第1例目を報告している²⁰⁾。私どもの施設は1991年より厚生労働省の研究班の1施設としてレジオネラ肺炎の診断に関して検討を行い，Fig. 5に示すように2006年までに1,100を超える症例を検討し226例の陽性例を確認している。その経過中に1996年の新生児病棟における集団感染，1998年頃に話題となった循環式浴槽を原因とする感染例を経験し，2003年に尿中抗原検査が認可されることにより依頼検査数の減少がみられ

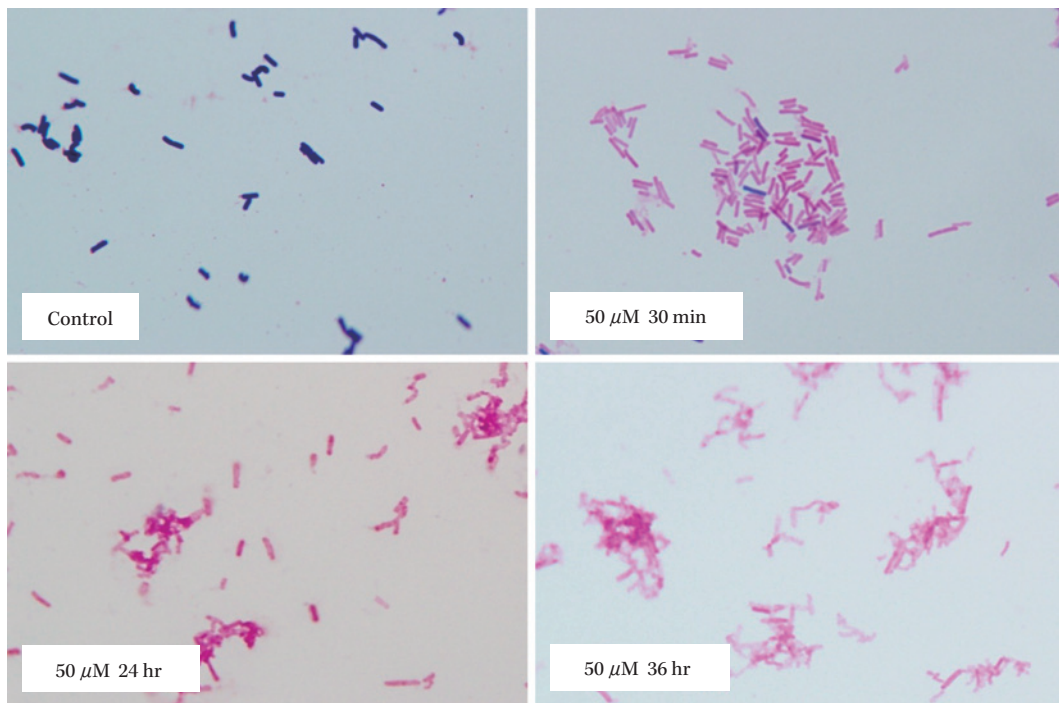


Fig. 4. Effects of degradation products of autoinducer of *Pseudomonas aeruginosa* on *Clostridium difficile*¹⁸⁾.

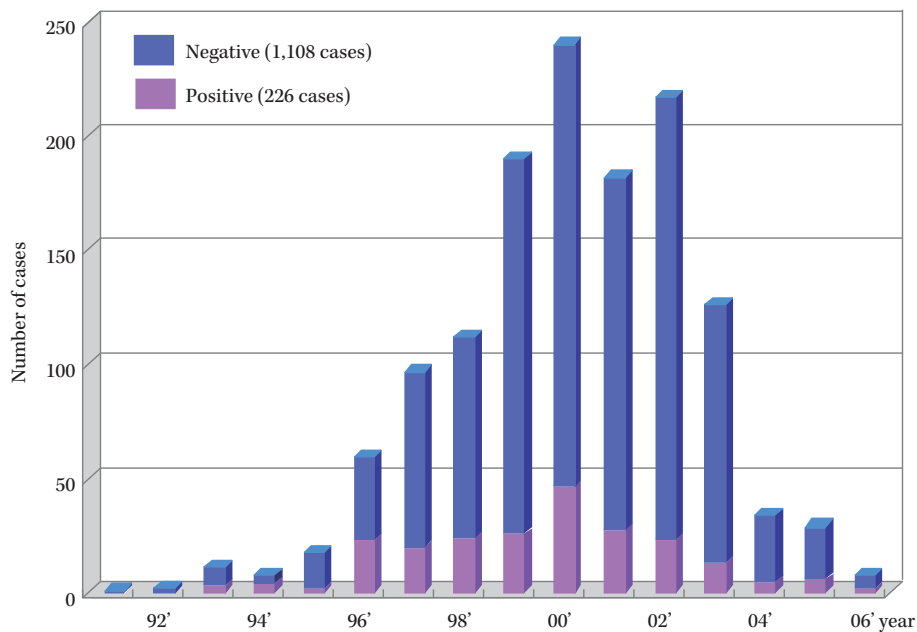


Fig. 5. Annual changes in the number of cases examined for *Legionella* infections in Toho University.

(Data from department of microbiology and infectious diseases in Toho University)

ている。今日、欧米の報告では市中肺炎の3~15%、日本の報告でも3%前後でレジオネラの関与が推定されているが、本症の診断の特殊性と難しさを考えると、実際の症例数はもう少し多いと考えておく必要があるであろう。当教室では、環境中のレジオネラの分布に関して特に温泉水を中心とした疫学調査を実施してきたが、興味

深いことに、路上にたまった雨水のなかからもレジオネラが陽性となることを確認している²¹⁾。また、自然界においてはレジオネラとアメーバの共生の関係が示唆されており、この点に関して、環境温度が両者の関係を規定する重要な因子であることを見出し²²⁾、その知見は American Society for Microbiology (ASM) の機関誌である Mi-

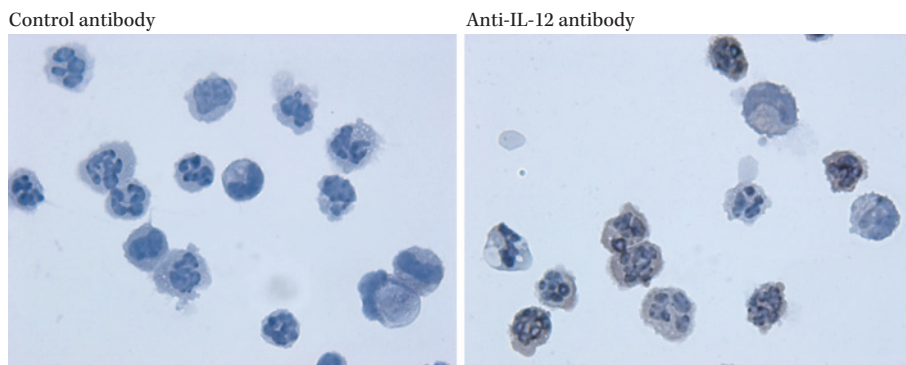


Fig. 6. Role of neutrophil-IL-12 in the pathogenesis of *Legionella pneumoniae*²⁷⁾. A/J mice were intratracheally challenged with an *L. pneumophila* suzuki strain, and then bronchoalveolar lavage was performed at 48 hours. The cells were stained with an anti-IL-12 antibody.

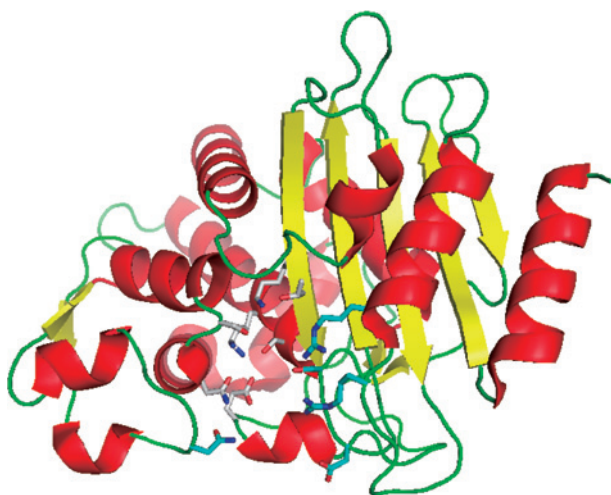


Fig. 7. Three dimensional structure of "Toho-1"^{33,34)}.

crobe の 2008 年 Journal Highlight で取り上げられている (Microbe Vol 3, No 9, P425, 2008)。

われわれの教室では、レジオネラ肺炎の疫学的解析とともに、動物実験モデルを用いた発症病態の解明に関する研究も行ってきた。本症に対する感染防御機構としては IFN- γ や IL-12 を介した Th1 型の生体反応が重要であり、この点に関していくつかの知見を報告してきた^{23~26)}。レジオネラ肺炎マウスの肺に集積した好中球内に多量の IL-12 が確認されており、これが感染局所の Th1 反応の亢進に関与している可能性が示唆されている²⁷⁾ (Fig. 6)。また、レジオネラ肺炎の重症化のメカニズムとして、高酸素条件が本症の死亡率を有意に高めること、そのメカニズムとして高酸素とレジオネラ感染による肺細胞アポトーシスの亢進が関与している事実を報告した^{28,29)}。レジオネラ肺炎症例では強い低酸素血症を呈する症例も多く、しばしば人工呼吸器による酸素投与が行われる。実際に臨床で使用される濃度の酸素がどれほど本症の感染病態に影響を与えているのかは不明である。今後、レジオネラ肺炎の発症病態におけるアポトーシス

の関与、レジオネラ・高酸素と急性肺障害との関連、あるいはその予防法・治療法についてさらに検討していく必要があるであろう。

IV. 耐性菌の疫学研究と“Toho 型 ESBL”の発見

当講座では、東邦大学大森病院医療センターで分離された臨床由来株に加えて、抗菌薬の市販後感受性調査の目的で全国から収集された菌株を対象に抗菌薬感受性試験を行ってきた。これまでにレボフロキサシン、セフェピム、シプロフロキサシン、ピペラシリン・ピペラシリン/タゾバクタム、メロペネム、パズフロキサシンなどの薬剤に関する市販後調査を行い、13万株以上の分離菌を対象に抗菌薬感受性検査を実施している。その調査のなかで多数の興味深い耐性菌が見出されてきた。その一つが本邦からの初めての報告となった基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (extended spectrum β -lactamase : ESBL) に関する成績である³⁰⁾。これは東邦大学医療センター大森病院に入院した1歳女児の尿から分離された大腸菌から見つかった。この年、1993年には971株の大腸菌が分離されていたが、そのなかにセフゾナムの MIC が $512 \mu\text{g/mL}$ を示すものが2株存在しており、この株をさらに詳細に検討することにより日本で初めての ESBL 産生菌として報告することができた³⁰⁾。この知見は、大森医療センターの微生物検査室の協力があって初めて得られた研究成果であり、改めて微生物検査室との連携の重要性を痛感する事例であった。その後、この酵素は“Toho-1 型”として報告され (現在は国際命名法に基づき CTX-M44)、本邦ではこの CTX-M 型の ESBL 産生菌が多いことが確認されている^{31,32)}。Toho-1 は、ESBL のなかで初めて3次元構造が解かれた酵素としても有名であり^{33,34)}、現在でも広く引用されている (Fig. 7)。最近の話題は、なぜ ESBL が世界中で増加するのか、特に市中感染菌としての ESBL 産生菌が増加する理由について多くの検討が行われている。この点に関してわれわれは、食肉と ESBL 産生菌との関連、特に輸入鶏肉との関連に焦点をあてた研究を実施している。腸内細菌に

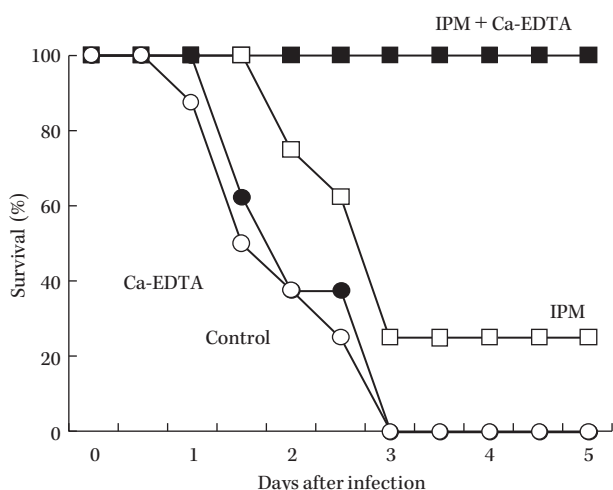


Fig. 8. Effects of calcium-EDTA on the survival of mice challenged with metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*³⁶⁾.

における ESBL 産生菌の増加は世界的な問題であり、今後の動向には十分注意して対応する必要がある。

V. 多剤耐性菌に対する新しい治療戦略

近年、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) をはじめとして、多剤耐性アシネトバクター (MDRA) あるいはニューデリーメタロ β -ラクタマーゼ (NDM) 産生菌など、抗菌薬の選択および抗菌薬療法に苦慮する多剤耐性菌の出現が次々と報告されている。この点に関して当教室は、緑膿菌感染症研究会の事務局であることもあり、2000 年代の初期から MDRP に対する抗菌薬療法、特に併用療法に関して相談を受ける機会が多くなっていった。一般に併用療法に関しては、 β -ラクタム剤 + アミノグリコシド剤などの組合せによる治療が経験的に行われることが多い。しかし MDRP においては、その耐性メカニズムが多岐にわたり、表現系は MDRP であっても耐性メカニズムの組合せは多様であり、個々の原因菌を対象とした併用療法感受性検査を実施する必要性を感じていた。これまで、抗菌薬の併用効果に関してはチェッカーボード法による検討が一般的であったが、これをルチンの検査のなかで実施することは難しい状況にあった。このような背景のもとに、抗菌薬の併用効果を迅速かつ一度に検討する方法としてブレイクポイント・チェッカーボード法が考案された³⁵⁾。この方法は、抗菌薬のブレイクポイント濃度 (R, I の 2 濃度) の単独および 2 剤併用 (I-I, I-R, R-I, R-R の 4 穴) の組合せで相乗効果を検討するものである。本プレートは、栄研化学からすでに MDRP 用 BC-プレートとして販売されており、分離菌に対する 20 の抗菌薬組合せの効果を 1 晩で検討することができる方法として利用されている。また多剤耐性菌でしばしば問題となるメタロ β -ラクタマーゼに対する阻害薬としてカルシウム-EDTA の有用性に関して報告した³⁶⁾。メタロ β -ラクタ

マーゼはその活性中心に亜鉛を有する酵素であり、その作用によりカルバペネム剤を含むほとんどすべての β -ラクタム剤が不活化される。逆に、この酵素を阻害する薬剤があれば、 β -ラクタム剤は不活化されずに、抗菌活性が回復する可能性が考えられた。この発想のもとに、メタロ β -ラクタマーゼの亜鉛をキレートする化合物をスクリーニングした結果、鉛中毒患者に注射用治療薬として利用されているカルシウム-EDTA 製剤の新しい応用の可能性を見出すことができた。実際にマウスの MDRP (メタロ β -ラクタマーゼ陽性) 肺炎モデルにおいて本剤を併用することにより、イミペネムの有効性を回復させることができることを確認している³⁶⁾ (Fig. 8)。本知見は多剤耐性菌に対する新しい治療戦略の一つとして 2010 年の *Microbe* の Journal Highlight で取り上げられた。本剤をすぐに多剤耐性菌感染症に対する併用治療薬として応用することは難しいが、その誘導体を含め新しいメタロ β -ラクタマーゼ阻害薬の候補としてさらに検討していくことは重要と思われる。

VI. 終わりに

われわれの考えるトランスレーショナル・リサーチは、臨床医にとって面白い学問である。日常遭遇する症例のなかにヒントが隠されており、それを的確に見出し、そして自分なりの正解を導き出す研究と考える。抗菌薬の効果一つとってみても、なぜ効かないのか (あるいは効くのか)、抗菌薬の直接効果・生体側防御能との相乗効果、PK-PD 理論で説明できない現象、これまでにない新しい治療法の可能性など、症例ごとにたくさんの疑問が湧いてくる。特に若い先生方に伝えたいのは、感染症学・化学療法学を含め今の医療において“いかにわかっていないことが多いか”を認識することの重要性であり、ちょっとした現象のなかにさえ大きな研究テーマが隠されているという視点である。症例のなかの真実を見つけた時の驚き、研究として発展させる喜び、自分なりに結論が得られた時の達成感と将来の医療に与えるインパクトがトランスレーショナル・リサーチの醍醐味である。次の世代、あるいは次の次の世代のなかから世界で活躍するトランスレーショナル・リサーチャーが一人でも多く育ってくれることを楽しみにしている。

謝 辞

本論文は平成 23 年度志賀潔・秦佐八郎記念賞を教室を代表して受賞した研究内容を総説にまとめたものである。東邦大学医学部微生物・感染症学講座での研究の機会を与えていただいた桑原章吾先生 (故人)、五島瑳智子先生に改めて感謝したい。また、私と夢を共有し、日夜研究に没頭してくれたスタッフ・研究生・大学院生の皆さんに心よりお礼を申し上げる。

利益相反自己申告：塩野義製薬株式会社、アステラス製薬株式会社、第一三共株式会社、MSD 株式会社、Meiji Seika ファルマ株式会社、大日本住友製薬株式会社、大正

富山医薬品株式会社, ファイザー株式会社, バイエル薬品株式会社から資金援助を受けている。

文 献

- 1) 山口恵三, 館田一博, 朝野和典, 平潟洋一, 下口和矩, 佐々木豊裕, 他: 白血球減少マウスをモデルとした敗血症の誘引と発症機序についての検討 1. 敗血症の成立に及ぼす抗生剤の影響。感染症誌 1989; 63: 195-202
- 2) Hirakata Y, Tomono K, Tateda K, Matsumoto T, Furuya N, Shimoguchi K, et al: Role of bacterial association with Kupffer cells in occurrence of endogenous systemic bacteremia. Infect Immun 1991; 59: 289-94
- 3) Hirakata Y, Furuya N, Tateda K, Kaku M, Yamaguchi K: In vivo production of exotoxin A and its role in endogenous *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. Infect Immun 1993; 61: 2468-73
- 4) Matsumoto T, Tateda K, Miyazaki S, Furuya N, Ohno A, Ishii Y, et al: Paradoxical synergistic effects of tumour necrosis factor and interleukin 1 in murine gut-derived sepsis with *Pseudomonas aeruginosa*. Cytokine 1999; 11: 366-72
- 5) Horino T, Matsumoto T, Uramatsu M, Tanabe M, Tateda K, Miyazaki S, et al: Interleukin-1-deficient mice exhibit high sensitivity to gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Cytokine 2005; 30: 339-46
- 6) Matsumoto T, Ishikawa H, Tateda K, Yaeshima T, Ishibashi N, Yamaguchi K: Oral administration of *Bifidobacterium longum* prevents gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. J Appl Microbiol 2008; 104: 672-80
- 7) Okuda J, Hayashi N, Okamoto M, Sawada S, Minagawa S, Yano Y, et al: Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the intestinal tract is mediated by the binding of ExoS to an Na, K-ATPase regulator, FXYD3. Infect Immun 2010; 78: 4511-22
- 8) Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, Izumi T, Ando M: Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. Am J Respir Crit Care Med 1998; 157: 1829-32
- 9) Tateda K, Hirakata Y, Furuya N, Ohno A, Yamaguchi K: Effects of sub-MICs of erythromycin and other macrolide antibiotics on serum sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 675-80
- 10) Tateda K, Ishii Y, Hirakata Y, Matsumoto T, Ohno A, Yamaguchi K: Profiles of outer membrane proteins and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* grown in the presence of sub-MICs of macrolide antibiotics and their relation to enhanced serum sensitivity. J Antimicrob Chemother 1994; 34: 931-42
- 11) Hirakata Y, Kaku M, Mizukane R, Ishida K, Furuya N, Matsumoto T, et al: Potential effects of erythromycin on host defense systems and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1922-7
- 12) Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, Furuya N, Nagashima M, Matsunaga T, et al: Direct evidence for antipseudomonal activity of macrolides: exposure-dependent bactericidal activity and inhibition of protein synthesis by erythromycin, clarithromycin, and azithromycin. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2271-5
- 13) Tateda K, Standiford T J, Pechere J C, Yamaguchi K: Regulatory effects of macrolides on bacterial virulence: potential role as quorum-sensing inhibitors. Curr Pharm Des 2004; 10: 3055-65
- 14) Tateda K, Comte R, Pechere J C, Köhler T, Yamaguchi K, Van Delden C: Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1930-3
- 15) Kikuchi Y, Tateda K, Fuse ET, Matsumoto T, Gotoh N, Fukushima J, et al: Hyperoxia exaggerates bacterial dissemination and lethality in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Pulm Pharmacol Ther 2009; 22: 333-9
- 16) Kai T, Tateda K, Kimura S, Ishii Y, Ito H, Yoshida H, et al: A low concentration of azithromycin inhibits the mRNA expression of N-acyl homoserine lactone synthesis enzymes, upstream of lasI or rhlI, in *Pseudomonas aeruginosa*. Pulm Pharmacol Ther 2009; 22: 483-6
- 17) Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere J C, et al: The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. Infect Immun 2003; 71: 5785-93
- 18) Kimura S, Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Miyairi S, Gotoh N, et al: *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in Legionella species. Microbiology 2009; 155: 1934-9
- 19) Ueda C, Tateda K, Horikawa M, Kimura S, Ishii Y, Nomura K, et al: Anti-*Clostridium difficile* potential of tetramic acid derivatives from *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing autoinducers. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 683-8
- 20) 齊藤 厚, 下田照文, 長沢正夫, 田中 光, 伊藤直美, 重野芳輝, 他: 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 1981; 55: 124-8
- 21) Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, et al: *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. Emerg Infect Dis 2009; 15: 1295-7
- 22) Ohno A, Kato N, Sakamoto R, Kimura S, Yamaguchi K: Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). Appl Environ Microbiol 2008; 74: 4585-8
- 23) Tateda K, Moore T A, Newstead M W, Tsai W C, Zeng X, Deng J C, et al: Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of *Legionella* pneumonia: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. Infect Immun 2001; 69: 2017-24
- 24) Yoshizawa S, Tateda K, Matsumoto T, Gondaira F, Miyazaki S, Standiford T J, et al: *Legionella pneumophila* evades gamma interferon-mediated growth suppression through interleukin-10 induction in bone marrow-derived macrophages. Infect Immun

- 2005; 73: 2709-17
- 25) Fuse E T, Tateda K, Kikuchi Y, Matsumoto T, Gondaira F, Azuma A, et al: Role of Toll-like receptor 2 in recognition of *Legionella pneumophila* in a murine pneumonia model. *J Med Microbiol* 2007; 56: 305-12
- 26) Hayakawa K, Tateda K, Fuse E T, Matsumoto T, Akasaka Y, Ishii T, et al: Paradoxically high resistance of natural killer T (NKT) cell-deficient mice to *Legionella pneumophila*: another aspect of NKT cells for modulation of host responses. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1340-8
- 27) Tateda K, Moore T A, Deng J C, Newstead M W, Zeng X, Matsukawa A, et al: Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of *Legionella pneumophila* pneumonia. *J Immunol* 2001; 166: 3355-61
- 28) Tateda K, Deng J C, Moore T A, Newstead M W, Paine R 3rd, Kobayashi N, et al: Hyperoxia mediates acute lung injury and increased lethality in murine *Legionella pneumonia*: the role of apoptosis. *J Immunol* 2003; 170: 4209-16
- 29) Nara C, Tateda K, Matsumoto T, Ohara A, Miyazaki S, Standiford T J, et al: *Legionella*-induced acute lung injury in the setting of hyperoxia: protective role of tumour necrosis factor- α . *J Med Microbiol* 2004; 53: 727-33
- 30) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2269-75
- 31) Ishii Y, Ueda C, Kouyama Y, Tateda K, Yamaguchi K: Evaluation of antimicrobial susceptibility for β -lactams against clinical isolates from 51 medical centers in Japan (2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69: 443-8
- 32) Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, Yamaguchi K: Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1181-6
- 33) Ibuka A, Taguchi A, Ishiguro M, Fushinobu S, Ishii Y, Kamitori S, et al: Crystal structure of the E166A mutant of extended-spectrum β -lactamase Toho-1 at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1999; 285: 2079-87
- 34) Ibuka A S, Ishii Y, Galleni M, Ishiguro M, Yamaguchi K, Frère J M, et al: Crystal structure of extended-spectrum β -lactamase Toho-1: insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion. *Biochemistry* 2003; 42: 10634-43
- 35) Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, Yamaguchi K: 'Break-point Checkerboard Plate' for screening of appropriate antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scand J Infect Dis* 2006; 38: 268-72
- 36) Aoki N, Ishii Y, Tateda K, Saga T, Kimura S, Kikuchi Y, et al: Efficacy of calcium-EDTA as an inhibitor for metallo- β -lactamase in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4582-8

Fundamental approach to translational research in the clinical microbiology field

—Experience of 21 years as a researcher—

Keizo Yamaguchi

Toho University School of Medicine, 5-21-16 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo, Japan

It was a great honor for me that we have reported several novel pieces of evidence and facts from the standpoint of translational research. First, we have reported new insights in pathogenesis and therapeutic strategies in gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in neutropenic mice. During those experiments, quorum-sensing suppressing activity of macrolide at sub-MICs was demonstrated in *P. aeruginosa*, which was speculated to be one of mechanisms of this antibiotic against chronic pulmonary infections. Clinical and epidemiological surveys and a mouse model of experiments have shed light on the pathogenesis of *Legionella pneumonia* and gave new insight into this disease. One of the most impressive and important reports on antibiotic resistance and its mechanism is the discovery and characterization of the first extended spectrum β -lactamase (ESBL), which was later named "Toho-type ESBL". Thinking back, I was so lucky to be in Toho University, and I would like to express my deepest appreciation to all the people who were concerned with those data and studies, and in particular I would like to give special thanks to our laboratory members for their sincere efforts and contribution.