

MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)をめぐる混乱と新しいMRSAの概念“BIVR”

The confusion for MRSA (methicillin resistant Staphylococcus aureus) and unprecedented type of MRSA "BIVR" (β -lactam antibiotic induced-vancomycin resistant MRSA)

北里研究所抗感染症薬研究センター センター長/医学博士 花木 秀明
Hideaki Hanaki Ph.D.
Kitasato Research Center for Anti-infection Drugs

関東化学株式会社 ライフサイエンス部 久保 亮一
Ryoichi Kubo
Life Science Dept. Kanto Chemical Co., Inc

1. はじめに

MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)は、耐性を獲得しやすい多様性を有す病原菌であり、その耐性度も様々である。また、従来は院内感染型であったが、最近では市中感染型MRSAも散見されるようになっている。この院内感染型のMRSAと市中感染型のMRSAは*mec*の遺伝型も耐性度も異なっているため、耐性度を表すMRSA、感染場所を表すMRSA、疫学的を表すMRSA等に関する言葉が散乱しはじめており、医療専門家の間でも混乱が起きている。

そこで本稿では、こうした薬剤耐性の黄色ブドウ球菌をめぐる問題を整理するとともに、どのような耐性黄色ブドウ球菌が新たな脅威に成り得るかを概説してみた。

2. 黄色ブドウ球菌の進化

1930年代の黄色ブドウ球菌に耐性遺伝子はない。必要な抗菌薬のプレッシャーがないため、耐性を獲得する必要がなかったためである。1940年にペニシリンが実用化されるが、その翌年1941年にはペニシリンを分解するペニシリナーゼ産生菌が出現している。抗菌薬プレッシャーによる耐性遺伝子の獲得である。さらに、1960年にペニシリナーゼに安定なメチシリンが市販されるが、これもその翌年には耐性菌が検出されている。世界で初めての*mecA*遺伝子を保有したMRSAの出現である。この*mecA*を獲得したMRSAは、現在のように全ての β -ラクタム薬に耐性を示すわけではなく、グラム陽性菌に活性の強い抗菌薬には感受性を示していた。現在のMRSA

は、長年の β -ラクタム薬による抗菌薬プレッシャーで高度耐性化が進行した結果であり、さらにVCM (バンコマイシン)に偏った治療によって、VCMに抵抗性を有すMRSAまで出現してきている。

3. MRSAの多様性

MRSAは時代の流れ、抗菌薬使用状況と共に進化し続けている。この進化はMRSAの多様性を如実に表しているものであり、その多様性から様々な名称がつけられている。

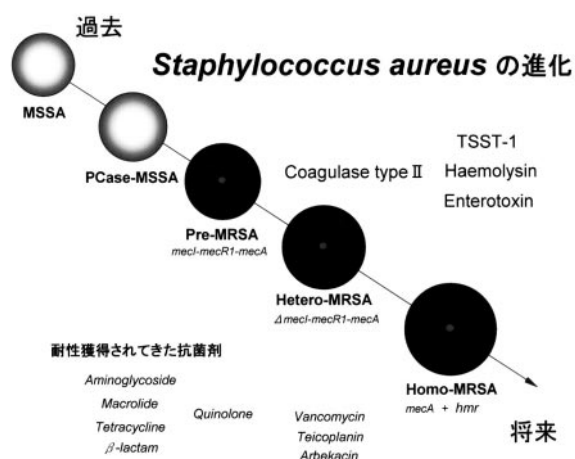


図1 MRSAの変遷

3-1 Pre-MRSA : *mecI* 正常

Pre-MRSAは、*mec*領域を獲得したMRSAであり、耐性遺伝子 (*mecA*:PBP2' (penicillin-binding protein 2') の構造遺伝子)を調節する制御遺伝子 (*mecI*:抑制遺伝子と*mecR*:誘導遺伝子)を完全な形で保有している。*mecI*は*mecA*の読み取りを強力に抑制しており、この遺伝子が

存在すると*mecA*は読み取られず、その産物である耐性を発揮するPBP2'の産生ができない(図1)。PBP2'が産生されなければ、もしくはその産生に長い時間を必要とするなら、グラム陽性菌に活性の強い抗菌薬は感受性を示すことになる¹⁾。

3-2 Hetero-MRSA : *mecI* 機能不全

Hetero-MRSAは、Pre-MRSAから10⁶個に1個以上の頻度で出現する*mecI*が機能不全(変異や脱落)に陥ったMRSAである。*mecI*が機能しないため、*mecA*は構成的に読み取られ、PBP2'は常時産生されている状態になる(図1)。Pre-MRSAの感受性は、ほとんどのβ-ラクタム薬に中程度耐性(臨床では無効)を示す¹⁾。

3-3 Homo-MRSA : *hmr* 遺伝子

Homo-MRSAは、*mec*以外の耐性遺伝子が発現したhetero-MRSAである。その遺伝子の一つとして*hmr* 遺伝子が検出されている(図1)。また、何らかの理由によってPBP2'を過剰に産生するMRSAも高度耐性を示す¹⁾。

3-4 VRSA : バンコマイシンMIC値 $\geq 16 \mu\text{g/mL}$

VRSAは、VCM耐性の黄色ブドウ球菌(Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*:VRSA)を意味している。今まで検出されている耐性菌は5株(2002年MichiganとPennsylvaniaで各1株²⁾³⁾、2003年New Yorkで1株⁴⁾、2005年に2株)は全て*mecA*を保有し、アメリカでのみ検出されている。このMRSAは、VCM耐性腸球菌(VRE)のVCM耐性遺伝子(*van*遺伝子)を獲得し、VCMに高度耐性化している(図2)。

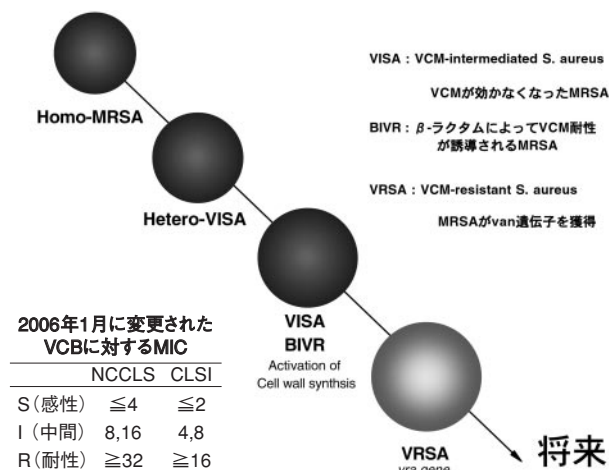


図2 MRSAのさらなる進化

3-5 VISA (GISA) : バンコマイシンMIC値 4~8 $\mu\text{g/mL}$ のMRSA

VISA (GISA)は、VCM中程度耐性の黄色ブドウ球菌(Vancomycin-intermediated-resistant *Staphylococcus aureus*:VISA)を意味する(図2)。全世界から20株程度が報告されており、これらの株も全て*mecA*を保有するMRSAである。この20株というのは、VCMに対するMIC (minimum inhibitory concentration, 最小増殖阻止濃度)値が8 $\mu\text{g/mL}$ の株であり、旧NCCLSに準じたVISA株である⁵⁾。この基準は2006年初頭にCLSI(旧NCCLS)によって改められ、VCMのMIC値が $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ は感性、4および8 $\mu\text{g/mL}$ は中間(中程度耐性)、 $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ は耐性⁶⁾になった。このため、VISAに分類される株は飛躍的に増加していると考えられる。このVCMの基準が改訂になった最大の理由は、Fridkinら⁷⁾の発表したVCMのMIC値と臨床効果の調査に関する論文であると考えられる。この論文では、VCMのMIC値が4および8 $\mu\text{g/mL}$ (厳密には4 $\mu\text{g/mL}$ が15株、8 $\mu\text{g/mL}$ が4株)のMRSAと、2 $\mu\text{g/mL}$ 以下のMRSAに分けて調査し、2 $\mu\text{g/mL}$ 以下のMRSAでは5%、4および8 $\mu\text{g/mL}$ のMRSAでは63%の確率で致死感染を起こす結果を得ている(図3)。

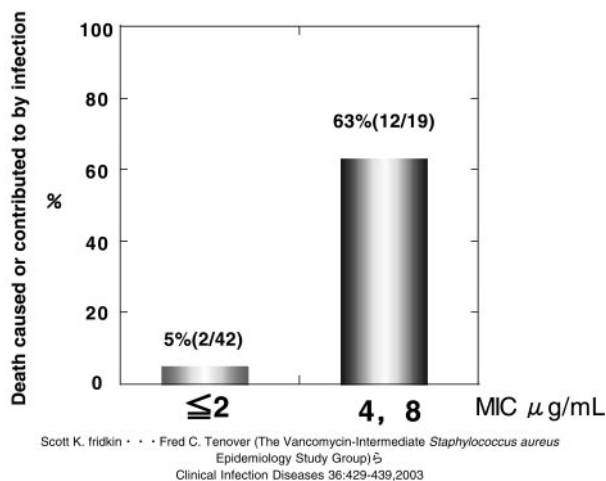


図3 VCMのMIC値が4と8 $\mu\text{g/mL}$ のMRSA

この結果を受けて、CLSIはVCMの耐性基準を下げたと考えられる。驚くことに、VCMの抗菌力と臨床効果のデータがない状態で、我々は闇雲にNCCLSの基準を信奉していたことになる。臨床データが存在しない状態で、8 $\mu\text{g/mL}$ でも十分な効果が期待できる。ましてや4 $\mu\text{g/mL}$ なら尚更だという考えがまかり通っていた時期があったことは真摯に反省すべきであろう。

VISAと同様の言葉として、GISA (glycopeptide intermediated *Staphylococcus aureus*)があるが、厳密にはVCMとテイコプラニン(ともにグリコペプチド系抗生物質)の耐性は若干異なっており、グリコペプチド系抗生物質を一纏めにした耐性の表現には無理がある。

3-6 Hetero-VISA : VISA細胞含有MRSA

Hetero-VISAは、VISAの性質(VCMのMIC値が4もしくは8 μ g/mL)の細胞を含むMRSAを意味する(図2)⁸⁾⁹⁾。Hetero-VISAに関しては色々な意見があるが、少なくとも検出に値しない耐性菌とは考えられない。VISAの性質を有す細胞を含む細胞集団であれば、VCMの暴露(抗菌薬プレッシャー)によって耐性細胞のみが選択され、最終的にVISAとなることは明白である。このようなMRSAにVCM以外の抗菌薬を使用すればVISAは出現しない。そのために、CLSIもHetero-VISAの検出を推奨している⁶⁾。しかも、Hetero-VISA検出の必要性がない、もしくはHetero-VISA自体が存在しない¹⁰⁾¹¹⁾、という意見の根本的原因であったBrain Heart Infusion (BHI)寒天培地を用いての検出が推奨されている⁶⁾。この誤った意見は、耐性菌の検出培地とMIC測定培地を混同していることと、ヘテロ耐性菌(どの耐性菌にもヘテロ耐性は存在するという言葉の理解不足に起因すると考えられる⁹⁾。何れにしても、ヘテロ耐性菌を無視することは臨床的に危険である。

3-7 Borderline MRSA¹²⁾

Borderline MRSAは、オキサシリン低感受性MRSAを意味するが定義はない。単にオキサシリンに低感受性を示すMRSAの増加(主にCA-MRSA, Community-acquired MRSA)に伴い、この言葉が出てきたと思われる(図4)。オキサシリンのMIC値が8~16 μ g/mL以下のMRSAを呼称することが多い。

3-8 Low-level resistant MRSA¹³⁾

Low-Level resistant MRSAは、Borderline MRSAと同じ意味を有すオキサシリン低感受性MRSAである(図4)。

3-9 OS-MRSA (Oxacillin-susceptibility MRSA)

OS-MRSAは、オキサシリン感性であるが*mecA*を保有する黄色ブドウ球菌を意味する(図4)。オキサシリンのMIC

値が4 μ g/mL以上であればMRSAと判断するが、2 μ g/mL以下であればMSSA (Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*)と判断される。しかし、2 μ g/mL以下であっても*mecA*を保有するMRSAが存在する。このMRSAをOS-MRSAと呼んでいる。OS-MRSAをMSSAと判断して、経口のペニシリンやセフェム薬を投与しても、完治させることは困難である。むしろ抗菌薬プレッシャーによって高度耐性MRSAに変わる恐れがある。*In vitro*の研究では、低濃度、中濃度、高濃度の β -ラクタム薬に1回接触させるだけで、低度耐性、中程度耐性、高度耐性菌になることが確認されている。前述したPre-MRSAと同じ挙動を示す。

3-10 BIVR(β -lactam antibiotic induced-vancomycin-resistant MRSA)

BIVRは、 β -ラクタム薬によってVCM耐性が誘導されるMRSAを意味する(図2)。このMRSAは、 β -ラクタム薬が存在することによってVCM耐性が発現するため、通常の検査では検出できない¹⁴⁾¹⁵⁾。

3-11 HA-MRSA(Hospital-acquired MRSA) : 院内もしくは病院獲得型MRSA

HA-MRSAは、耐性度を示す言葉ではなく、院内で免疫不全患者に感染する現在のMRSAを意味する(図4)。ほとんどが高度耐性であり、かつ*mec*領域(SCC*mec*)はII型(まれにI, III)である¹⁶⁾。

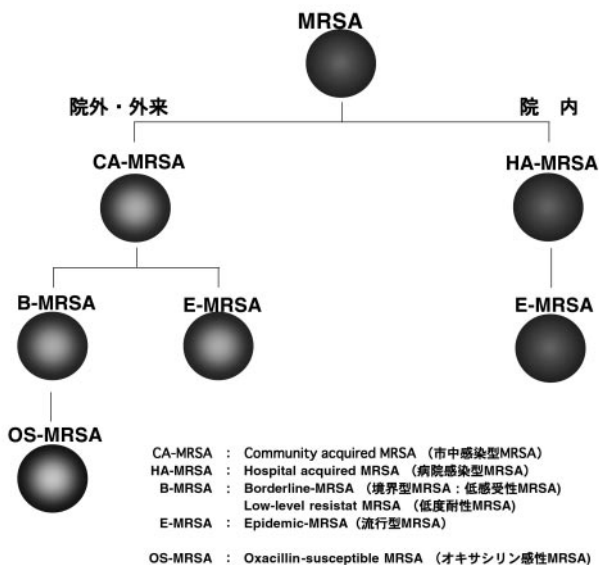


図4 MRSAの現状

3-12 CA-MRSA (Community-acquired MRSA)

CA-MRSAは、市中で感染するMRSAであり、最近増加傾向にある(図4)。オキシサリン以外の β -ラクタム薬に対する耐性は低い。*mec*領域(SCC*mec*)はIV型(時にV型)主に若年者の皮膚や軟部組織に感染し、表皮剥離毒素(SEB、SEC、SHE)やパントンバレンタインロイコジン(PVL)を産生する。ただし、日本でのPVL産生CA-MRSAは極めて少ない。CA-MRSAからは、borderline MRSA (low-level resistant MRSA) やOS-MRSAの検出率が高い^{17)~19)}。

3-13 E-MRSA (epidemic MRSA)

E-MRSAは、HA-MRSAでもCA-MRSAでも、流行型のMRSAが存在する。この流行型のMRSAを意味する(図4)。特にHA-MRSAは個々の病院特有のMRSAが院内感染をおこすため、その特定のMRSA(E-MRSA)を検出することは、院内感染対策上必須である²⁰⁾。

4. BIVRについて

BIVRとは、 β -lactam antibiotic-induced-vancomycin-resistant MRSAの略であり、 β -ラクタム系抗菌薬によってVCM耐性が誘導されるMRSAを意味する。このVCM耐性には β -ラクタム薬の存在が不可欠であり、 β -ラクタム薬がない場合、VCM耐性は発現しない。ここに、BIVRが検出できない最大の問題点がある。通常の検査では、特定の1抗菌薬に対する感受性検査は実施されるが、2薬剤が存在した場合の感受性測定は行なわれない。つまり、VCM単剤の抗菌力は測定されるが、 β -ラクタム薬共存下での抗菌力は測定されない。その結果、BIVRであってもVCM耐性が誘導されないため、VCMは感性(S)と表示されてしまう。

4-1 BIVRの検出方法

基本的な原理は、VCMと β -ラクタム薬との拮抗(β -ラクタム薬によるVCM耐性の誘導現象)を利用した検出方法(図5)である。当初は、Mu3培地を用いて検出していたが、Mu3培地はhetero-VISAの検出培地²¹⁾として販売されているため、誤解を招きやすい危険性を含んでいる。その危険性を避けるため、新たにBIVRの検出培地を作成した。この新たなBIVR検出培地は、BHI寒天培地を

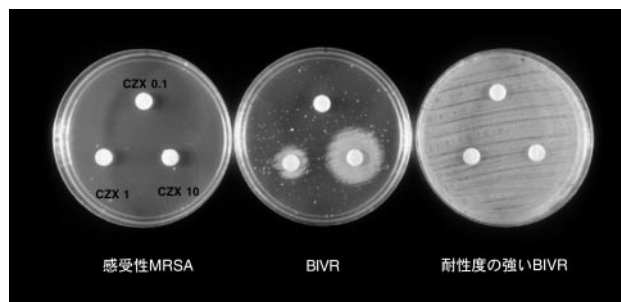


図5 Mu3培地(4 μ g/mlのVCM含有培地)でのBIVR株の検出

基礎培地とし、MRSAに対する β -ラクタム薬感受性測定の際に添加する塩化ナトリウム、緩衝作用を強めるリン酸(第一と第二)カリウムを添加している。VCM濃度は4 μ g/mLであり、4 μ g/mLで生育可能なMRSAが検出できる。仮に基礎培地にMueller Hinton (MH) 寒天培地を用いた場合は、2 μ g/mLのVCM添加で同じ結果になるが、MH寒天培地に血液やresting medium(細胞壁構成成分)を添加した場合は、4 μ g/mLのVCM添加でBHI寒天培地を基礎培地とした結果と同じになる。

2 μ g/mLのVCM添加MH寒天培地で生育するMRSAはVCMの中程度耐性MRSA(VISA)の可能性を秘めている。また、より生体に近づけた血液添加MH寒天培地での検出はBHI寒天培地と同等の検出率となるため、わざわざ血液を添加した培地を使用する必要はなく、血液添加と同等の検出率が得られるBHI寒天培地をBIVR検出の基礎培地として用いることとした。10⁸CFU/mLに調整した菌液を滅菌綿棒で培地全面に塗布し、その上に β -ラクタム薬含有ペーパーディスクを置いて培養する。ペーパーディスク周辺に生育円、もしくは全面に生育が認められればBIVRと判定する。接種菌量が多いという意見もあるが、見た目(10⁸CFU/mL)にごまかされているに過ぎない。10⁸CFU/mLの菌液の80 μ Lが綿棒にて培地全面に塗布されることになるが、培地全面の面積は少なくとも40mm \times 40mm \times 3.14=5024mm²であり、この上に10⁸CFU/mL \times 0.08mL=8 \times 10⁶CFUが塗布されるため、1mm²中には8 \times 10⁶CFU/5024mm²=1.6 \times 10³CFU/mm²の菌数が存在することになる。一方、CLSIの準じたMIC測定時の菌量は、10⁷CFU/mLの5 μ Lが1mm \times 1mm \times 3.14=3.14mm²に接種される。この1mm²当たりの菌数は、10⁷CFU/mL \times 0.005mL/3.14mm²=1.6 \times 10⁴CFU/mm²となり、単位面積あたりの菌量は、MIC測定時の方が10倍も多いことが分かる。むしろ、塗布する菌量は少なすぎるのかもしれない。

4-2 BIVRのマウス全身感染: β -ラクタム薬併用による死亡率の増加

BIVRをマウス腹腔内に感染させて、VCM単剤と β -ラクタム薬併用による感染治療効果を検討した(図6(a)(b))。

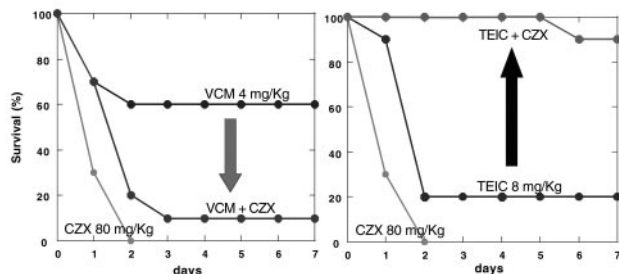


図6(a) Vancomycin (VCM)とTeicoplanin (TEIC)を単剤で用いた場合とCeftizoxime (CZX)を併用した場合のBIVRに対する治療効果(マウス感染実験)

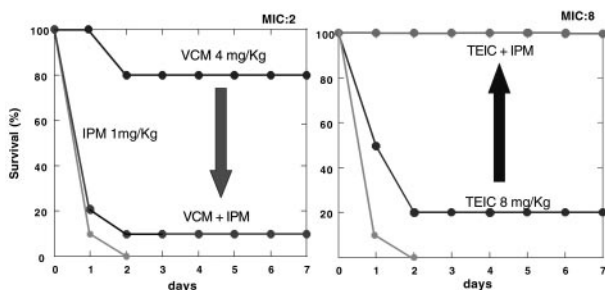


図6(b) Vancomycin (VCM)とTeicoplanin (TEIC)を単剤で用いた場合とImipenem (IPM)を併用した場合のBIVRに対する治療効果(マウス感染実験)

VCM単剤の生存率は70~90%であったが、 β -ラクタム薬としてflomoxef (FMOX)、aminobenzylpenicillin (ABPC)、imipenem (IPM)のそれぞれを併用した場合、生存率は10~20%しかなかった。つまり、 β -ラクタム薬との併用によって死亡率が極端に上がった結果となった。これは、*in vitro*で確認されたバンコマイシンと β -ラクタム薬との拮抗作用、言い換えれば β -ラクタム薬によってVCM耐性が誘導されるためVCMの効果がなくなる現象と一致している²²⁾。

4-3 BIVRの臨床例

BIVRの臨床例は、福岡大学医学部、北里大学医学部、社会保険中央病院から発表されている。福岡大学の症例は、熱傷患者にMRSAが感染した患者であり、VCMとIPMの併用でBIVRが出現したこと、2週間程度の併用期間で耐性度の強いBIVRに変わったことが報告されている(図7)²³⁾。また、北里大学の症例は、MRSAの感染性心内膜炎にVCMとIPMを併用した時点から、同じ遺伝型を有すMRSA(同一株)がBIVRの性質(β -ラク

タム薬によってVCM耐性が誘導)を発揮した症例であり、治療に失敗している(図8)²⁴⁾。また、社会保険中央病院の症例は大塚らによって感染症学会で発表されたものである。これは、MRSA肺炎治療にVCMとpanipenem (PAPM)を投与した後にBIVRへと変わり、胃瘻造設とともにBIVRの菌血症がおき、VCMとPAPMの21日間の投与でも血液中から消失しなかった症例である。VCMはTDMによって十分な血中濃度が確認されているにも拘らず、奏功していない。

実在するこれらの臨床例を、たまたま起きたこととして切り捨てるわけには行かない。当事者である患者にとって、たまたま済まされることではないからである。

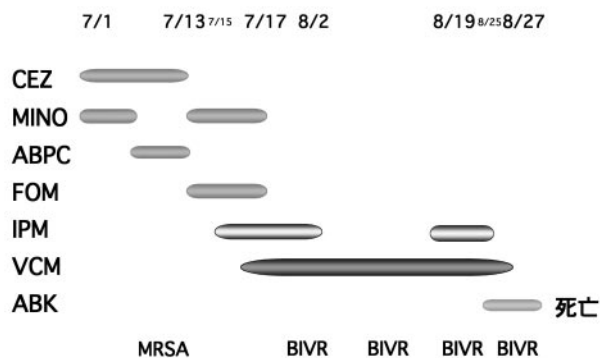


図7 BIVRの出現により、化学療法が失敗した事例
62歳男性患者。腎移植、糖尿病、感染性心内膜炎あり(PFGEで同一の菌である事が確認された。)感染症学雑誌.V75. p473-479.による

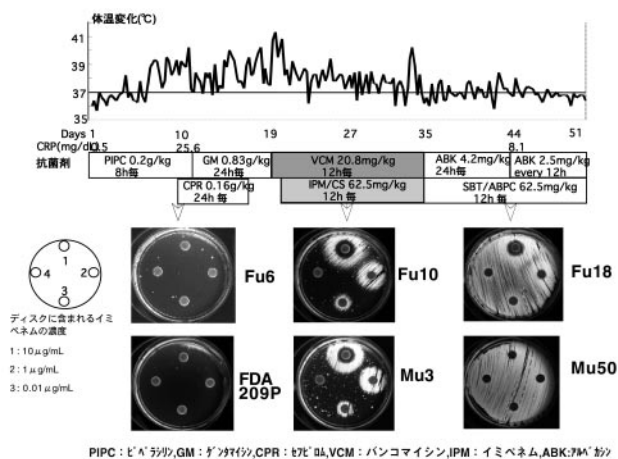


図8 MRSAがBIVRの出現により難治化した臨床事例

5. まとめ

BIVRについては、検出法や耐性機序などを含めた多くの問題点が残されている。併し、*in vitro*での効果、マウス感染実験結果、臨床例を考えると、BIVRに対してバンコマイシンと β -ラクタム薬の併用が有効な効果をもた

らすとは考えにくい。BIVRに対して、バンコマイシンを用いる必要があるなら、単剤で用いた方が治療効果は得られやすいと考える。また、 β -ラクタム薬との併用が必須であるなら、抗MRSA薬のテイコプラニン(強力な相乗効果を発揮する)やアルベカシン(相加・相乗)、リネゾリド(相加)との併用が可能である。 β -ラクタム薬について上記のような否定的なデータがあるなかで、また他の抗菌薬が使用できる条件下で、無理してバンコマイシンと β -ラクタム薬との併用を行なう必要性はないと考える。

参考文献

- Asada K, Inaba Y, Tateda-Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Ito T, Hiramatsu K. Evolution and resistance expression of MRSA. Evaluation of beta-lactam antibiotics against a set of isogenic strains with different types of phenotypic expression. *Acta Biochemica Polonica*, **42** (4), 517-24 (1995).
- CDC. Staphylococcus aureus resistant to vancomycin --- United States, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **51**, 565-567 (2002).
- CDC. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus --- Pennsylvania, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **51**, 902 (2002).
- CDC. Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus --- New York, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **53**, 565-567 (2002).
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed Approved standard NCCLS publication no. M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. (2003).
- Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed. Approved standard. CLSI publication no. M7- A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa (2006)
- Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, Tenover FC: Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Epidemiology Study Group. Epidemiological and Microbiological Characterization of Infections Caused by Staphylococcus aureus with Reduced Susceptibility to Vancomycin, United States, 1997-2001. *Clin Infect Dis.*, **15**, 36:429-39 (2003).
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, and Kobayashi I, Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus of heterogeneously resistant to vancomycin, *Lancet*, **350**, 1668-71 (1997).
- Howe RA, Walsh TR. hGISA: seek and ye shall find. *Lancet*, **364**, 500-501 (2004).
- 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.*, **39**:4445-51 (2001).
- Arakawa Y, Ike Y, Nagasawa M, Where has vancomycin-heterogeneously resistant *Staphylococcus aureus* gone? *Lancet*. **363**:1401 (2004).
- Liu H, Buescher G, Lewis N, Snyder S, Jungkind D, Detection of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* and differentiation from methicillin-resistant strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **9** (10), 717-24 (1990).
- Sa-Leao R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros RM, de Lencastre H. Detection of an archaic clone of Staphylococcus aureus with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol.*, **37** (6), 1913-1920 (1999).
- Hanaki H, Yamaguchi Y, Yanagisawa C, Uehara K, Matsui H, Yamaguchi Y, Hososaka Y, Barada K, Sakai F, Itabashi Y, Ikeda S, Atsuda K, Tanaka H, Inamatsu T, Nagayama A, Sunakawa K. Investigation of beta-lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR). *J Infect Chemother.*, **11** (2), 104-106 (2005).
- Hanaki H, Yamaguchi Y, Nomura S, Haraga I, Nagayama A, Sunakawa K. Method of detecting beta-lactam antibiotic induced vancomycin resistant MRSA (BIVR). *Int J Antimicrob Agents.*, **23** (1), 1-5 (2004).
- Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, Hinrichs SH, Boxrud DJ, Davis CC, Kreiswirth BN, Schlievert PM. Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother.*, **47** (1), 196-203 (2003).
- Storch GA, Rajagopalan L. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia in children, *Pediatr Infect Dis.*, **5** (1), 59-67 (1986).
- Jansen WT, Beitsma MM, Koeman CJ, van Wamel WJ, Verhoef J, Fluit AC. Novel mobile variants of staphylococcal cassette chromosome mec in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.*, **50** (6), 2072-2078 (2006).
- Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, Oishi T, Nitahara Y, Iwakura N, Ozaki K, Takano M, Nakayama T, Yamamoto T. A Pantone-Valentine leucocidin (PVL) -positive community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan. *J Clin. Microbiol.* **43** (7), 3356-3363 (2005).
- Peacock JE Jr, Moorman DR, Wenzel RP, Mandell GL. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: microbiologic characteristics, antimicrobial susceptibilities, and assessment of virulence of an epidemic strain, *J Infect Dis.*, **144** (6), 575-82 (1981).
- Hanaki H, Inaba Y, Sasaki K, Hiramatsu K. A novel method of detecting *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin (hetero-VRSA). *Jpn J Antibiot.*, **51** (8), 521-530 (1998).
- Hatano K, Yokota Y, Hanaki H, Sunakawa K. Combined effect of vancomycin or teicoplanin plus a beta-lactam antibiotic in mouse infection models caused by beta-lactam antibiotic-induced vancomycin resistant MRSA (BIVR) *Kansenshogaku Zasshi.*, **80** (3), 243-50 (2006).
- Haraga I, Nomura S, Fukamachi S, Ohjimi H, Hanaki H, Hiramatsu K, Nagayama A. Emergence of vancomycin resistance during therapy against methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a burn patient--importance of low-level resistance to vancomycin. *Int J Infect Dis.*, **6** (4), 302-308 (2002).
- Takayama Y, Hanaki H, Irinoda K, Kokubun H, Yoshida K, Sunakawa K, Investigation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus showing reduced vancomycin susceptibility isolated from a patient with infective endocarditis. *Int J Antimicrob Agents.*, **22** (6), 567-73 (2003).