病原体検出マニュアル

「メチシリン耐性黄色ブドウ球菌: MRSA」

（第 4 版）

令和 8 年 10 月改訂

目次

1. 感染症法上の定義 3
2. MRSA の概要とメチシリン耐性機構 4
3. 検査法 5
3.1. 選択培地を用いた MRSA の分離 5
3.2. 薬剤感受性試験 5
3.2.1. ディスク拡散法による MRSA の鑑別 6
3.2.2. 微量液体希釈法による MRSA の鑑別 8
3.3. PCR 法による *mecA* 及び *mecC* の検出 8
3.4. 発育不良・栄養要求性変異株（small-colony variants）への対応 10
4. 分子疫学解析 10
【参考文献】 11
主な改訂履歴 15

1. 感染症法上の定義

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）感染症は、メチシリンなどのペニシリン系薬をはじめとして、β-ラクタム系薬、アミノグリコシド系薬、マクロライド系薬などの多くの薬剤に対し多剤耐性を示す黄色ブドウ球菌による感染症である[1)]と定義される。五類感染症のうち基幹定点把握疾患に分類され、指定届出機関の管理者は患者発生時に届け出る必要がある。本感染症の臨床的特徴、届出基準及び検査所見[1)]は以下のとおりである。

【臨床的特徴】

外科手術後の患者や免疫不全者、長期抗菌薬投与患者などに日和見感染し、腸炎、敗血症、肺炎などを来し、突然の高熱、血圧低下、腹部膨満、下痢、意識障害、白血球減少、血小板減少、腎機能障害、肝機能障害などの症状を示す[1)]。また、皮膚や粘膜バリアの破綻した患者などに、皮膚軟部組織感染症を起こし、二次的に敗血症・菌血症を起こすことがある[2)]。

【届出基準】

ア　患者（確定例）

指定届出機関の管理者は、当該指定届出機関の医師が、上記の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見から MRSA 感染症が疑われ、かつ、下表の左欄に掲げる検査方法により、MRSA 感染症患者と診断した場合には、法第１４条第２項の規定による届出を月単位で、翌月の初日に届け出なければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

イ　感染症死亡者の死体

指定届出機関の管理者は、当該指定届出機関の医師が、上記の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、MRSA 感染症が疑われ、かつ、下表の左欄に掲げる検査方法により、MRSA 感染症により死亡したと判断した場合には、法第１４条第２項の規定による届出を月単位で、翌月の初日に届け出なければならない。

この場合において、検査材料は同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

【届出のために必要な検査所見】

検査方法	検査材料
分離・同定による黄色ブドウ球菌の検出かつ次のいずれかを満たすことを確認 ア. オキサシリンの MIC が 4 μg/mL 以上 イ. セフォキシチンの MIC が 8 μg/mL 以上、又はセフォキシチンの感受性ディスク（ＫＢ）の阻止円の直径が 21 mm 以下	血液、腹水、胸水、髄液、その他の通常無菌的であるべき検体
分離・同定による黄色ブドウ球菌の検出かつ分離菌が感染症の起因菌と判定されることに加え、次のいずれかを満たすことを確認 ア. オキサシリンの MIC が 4 μg/mL 以上 イ. セフォキシチンの MIC が 8 μg/mL 以上、又はセフォキシチンの感受性ディスク（ＫＢ）の阻止円の直径が 21 mm 以下	喀痰、膿、尿、その他の通常無菌的ではない検体

2. MRSA の概要とメチシリン耐性機構

MRSA は、臨床上院内感染として知られている医療関連型 MRSA（HA-MRSA, healthcare-associated MRSA）、市中又は外来患者から検出される市中獲得型 MRSA（CA-MRSA, community-acquired MRSA）[3]、そして、主に養豚などで検出される家畜関連型 MRSA（LA-MRSA, livestock-associated MRSA）に大別される。 MRSA はメチシリン感性黄色ブドウ球菌（MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*）の染色体上に外来性に *mecA* 遺伝子を獲得することで、*mecA* 遺伝子産物である penicillin-binding protein 2'（PBP2'）を産生する。PBP2'はβ-ラクタム系薬との親和性が低いため、MRSA はほぼ全てのβ-ラクタム系薬に対する耐性を示す。*mecA* は発現調節遺伝子や組換えに関わる遺伝子を含む staphylococcal cassette chromosome *mec*（SCC*mec*）カセットに存在し、染色体上に組み込まれている。

SCC*mec* は現在 15 種類のタイプが存在することが報告されている [4]。そのうち、SCC*mec* XI 型は *mecC* を保有し、LA-MRSA として初めて報告された [5]。SCC*mec* I 型、II 型、III 型が HA-MRSA に多く、IV 型と V 型は CA-MRSA に多いとされてきた。日本

国内において、従来 SCC*mec* II 型は HA-MRSA、SCC*mec* IV 型は CA-MRSA に関連しているとされてきた[6]。しかし、近年は疫学的に HA-MRSA であっても、従来 CA-MRSA に多い SCC*mec* IV 型などの MRSA が院内で増加してきており、従来の傾向は変化してきている[7), 8)]。

3. 検査法

3.1. 選択培地を用いた MRSA の分離

MRSA の分離には MRSA 選択培地を使用する。SCC*mec* IV 型等の MRSA の中にはオキサシリン（MPIPC）に感性の株が多く、MPIPC を選択薬として用いた培地では発育しないことがある。このため、MPIPC 感性株の発育に配慮した培地としてセフォキシチン（CFX）を選択薬として用いられることが多く、CFX 又はセファマイシン系選択薬を含む選択培地・発色基質培地が広く用いられる。代表的なものとして、MS-CFX 寒天培地（島津ダイアグノスティクス）、ChromID MRSA（ビオメリュー）、CHROMagar MRSAII 寒天培地（ベクトン・ディッキンソン）、MDRS-K 寒天培地（極東製薬）、クロモアガー MRSA（関東化学）がある。

3.2. 薬剤感受性試験

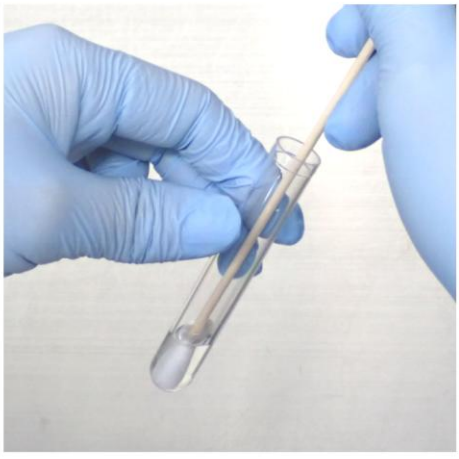
本マニュアルでは日常細菌検査において MRSA を鑑別する主な薬剤感受性試験として、ディスク拡散法と微量液体希釈法について記載する。MRSA 鑑別法に使用する薬剤は、CLSI[9)]に準拠し、ディスク拡散法では CFX、微量液体希釈法では MPIPC 及び CFX を用いる。

微量液体希釈法で使用する陽イオン調整ミュラーヒントン液体培地（CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth）やディスク拡散法で使用する無添加のミュラーヒントン寒天培地（MHA, Mueller-Hinton agar）に発育増殖しにくい黄色ブドウ球菌（small-colony variants 等）の場合、正確な薬剤試験結果が得られないことがある[10), 11)]。この場合には MRSA の鑑別法として、ラテックス凝集法による PBP2'の検出又は PCR 法による *mecA* の検出が有用である。ラテックス凝集法では被検菌を血液添加 MHA 又は血液寒天培地に塗布して培地上に CFX 30 μg 含有ディスクを置き、5% CO_2 環境下で 24 時間誘導培養を行った後、ディスク周囲阻止円の縁から採取した菌を使用する[9)]。

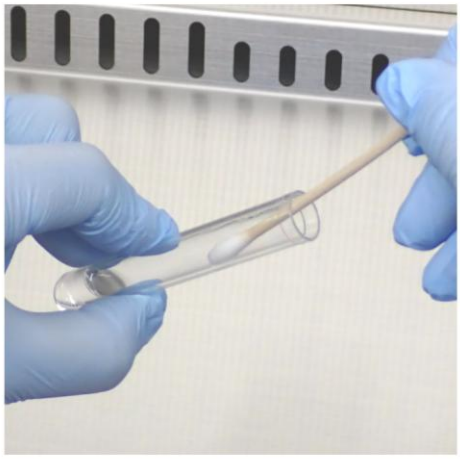
3.2.1. ディスク拡散法による MRSA の鑑別 [9), 12)]

ディスク拡散法の接種菌液は、新鮮なコロニー(18~24 時間培養)を滅菌綿棒等でかきとり、滅菌生理食塩水に懸濁して McFarland 0.5 の濁度（約 1 x10^8 CFU/mL）になるように、調製する（直接懸濁法）。菌液の塗布は、接種用菌液に浸した滅菌綿棒を試験管の管壁に圧して余分な菌液を取り除き（図 1）、図 2 のように MHA 表面全体に塗布出来るようシャーレを回転させて 3 方向から隙間を開けずに均一に塗布する。その後、CFX 30 µg 含有ディスクを培地上に配置し、33~35 ℃付近の好気的条件下で 16～18 時間培養した後、阻止円の直径を測定して、≦21mm を耐性（MRSA）と判定する（図 3）。35℃より高い温度で薬剤感受性試験を行うと、*mecA* の発現低下が原因と考えられる耐性減弱により MRSA が検出できない場合がある。

CLSI では、ディスク拡散法による MRSA の鑑別に CFX を用いることを推奨している[9),12)]。以前は MPIPC が用いられ、偽陰性を示すことがあった。典型的な特徴として、*mecA* 遺伝子は保有するが、MPIPC の MIC が低い値（通常、≦2 µg/mL）を示す「MPIPC 感性 MRSA (OS-MRSA, oxacillin-susceptible MRSA)」が挙げられる（図 4）。MPIPC のディスク拡散法は CFX に比べて検出能が低いため、CLSI M100-S22[13)]を最後に判定基準の記述が削除された [14)]。



a. 滅菌綿棒を菌液に浸す。



b. 試験管の内壁に綿棒を押し付け、余分な菌液を除く。

図 1. 余分な菌液の除き方

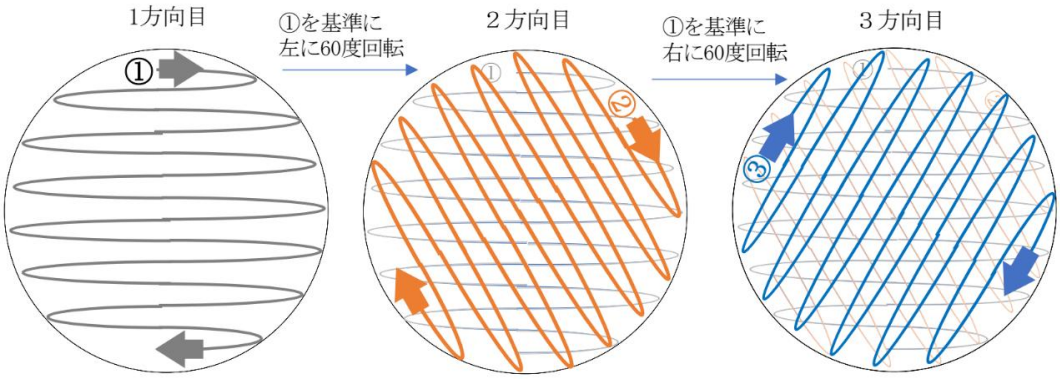
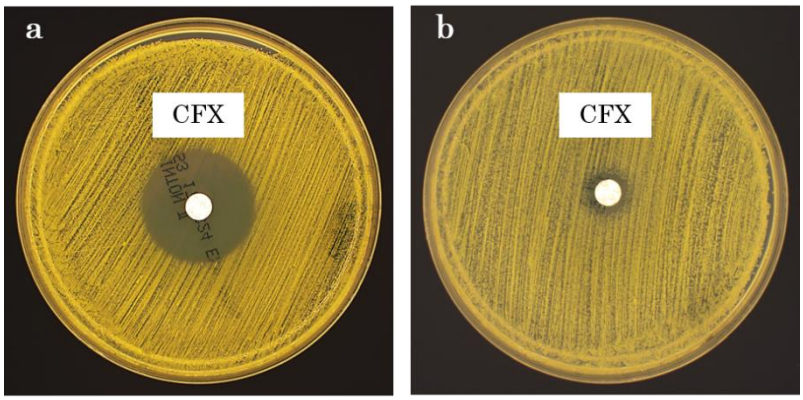


図 2.ディスク拡散法における菌液の塗布方法 [15)図改変]

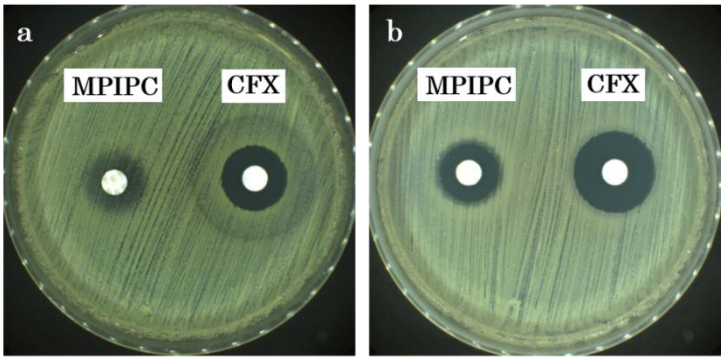


MSSA (CFX:S)　　MRSA (CFX:R)　　S:感性, R:耐性

図 3. ディスク拡散法による MRSA の判定例

a) 阻止円直径は 26 mm、22mm 以上のため MSSA と判定。

b) 阻止円直径は 10 mm、21mm 以下のため MRSA と判定。



MRSA (MPIPC:R, CFX:R)　　OS-MRSA (MPIPC:S, CFX:R)　　S:感性, R:耐性

図 4. ディスク拡散法による OS-MRSA の判定例

a) MRSA の阻止円直径は 7 mm（MPIPC）で耐性*、16 mm（CFX）で耐性であった。

b) OS-MRSA の阻止円直径は 15 mm（MPIPC）で感性*、20 mm（CFX）で耐性であった。

* CLSI M100-S22[13)]の MPIPC ディスク拡散法の判定基準を参照。

3.2.2. 微量液体希釈法による MRSA の鑑別 [9), 16)]

微量液体希釈法で MPIPC の MIC を測定する場合は、CAMHB に 2% NaCl を添加した感受性測定用培地を使用し、CFX の MIC を測定する場合は CAMHB を使用する。薬剤の濃度は 2 倍連続希釈系列で調整する。接種菌液は、新鮮なコロニーを滅菌生理食塩水に懸濁して McFarland 0.5 の濁度（約 1×10^8 CFU/mL）に調製し（直接懸濁法）、各ウェルの最終濃度が 5×10^4 CFU/ウェル又は 5×10^5 CFU/mL（単位に注意）になるように分注する。例えば調製した菌液（濁度: McFarland 0.5）を 10 倍希釈し、薬剤含有液体培地を 95 μL 分注した各ウェルに 5 μL ずつ分注する。調製した接種菌液は 15 分以内に使用する。33~35 ℃付近の好気的条件下で CFX は 16～20 時間、MPIPC は 24 時間培養後に判定する。35℃より高い温度で薬剤感受性試験を行うと、MRSA が検出できない場合がある。MPIPC の MIC が ≧ 4 μg/mL 又は CFX の MIC が ≧ 8 μg/mL の場合を耐性（MRSA）と判定する [9)]。

薬剤感受性を自動測定機器で測定する場合は、用手の微量液体希釈法で得られた結果と異なる場合がある点に留意する [17)]。

3.3. PCR 法による *mecA* 及び *mecC* の検出

PCR 法に使用する鋳型 DNA は、被検菌を滅菌蒸留水に懸濁して McFarland 0.5 の濁度になるように調製し、100℃で 10 分間加熱処理後、13,000 rpm で 5 分間遠心した上清から得る。DNA の溶出量が少ない場合、滅菌蒸留水 100 μL にリゾスタフィンを最終濃度 5 μg/mL [18)]になるように添加し、寒天培地で培養した被検菌を McFarland 0.5 の濁度になるように懸濁する。懸濁した溶液を 37℃で 30 分から 1 時間インキュベートし、100℃で 5 分間加熱すると十分量の DNA が溶出される。リゾスタフィンの最終濃度は、菌の溶菌度合いに応じて 5～50 μg/mL で適宜調整する。

各種遺伝子の陽性コントロール株は、薬剤耐性研究センター 薬剤耐性菌バンク（JARBB, Japan Antimicrobial Resistant Bacterial Bank）にて、MRSA SCC*mec* パネルから取得できる。詳細はホームページ [19)]を参照されたい。

mecA, *mecC*, *nuc* を検出するためのプライマーを以下に示す。黄色ブドウ球菌が共通して保有する *nuc* を検出するプライマーペアと、*mecA* 又は *mecC* を検出するプライマー

ペアを組み合わせた 2 種類のデュプレックス PCR（*nuc*+*mecA*, *nuc*+*mecC*）用にデザインされている。

Gene	Oligonucleotides sequence (5'-3')	PCR 産物サイズ
mecA	TGCTATCCACCCTCAAACAGG AACGTTGTAACCACCCCAAGA	286 bp [20]
mecC	GATAACTCTCGCAAAACATAACG CGTCATTGGCGGATCAAAC	224 bp [21]
nuc※	CTAAGTAGCTCAGCAAATGCATC AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	405 bp [22]改変

※*nuc*（nuclease）遺伝子は黄色ブドウ球菌の陽性コントロールとして使用．コアグラーゼ陰性ブドウ球菌（Coagulase negative *Staphylococcus*, CNS）では増幅が認められない。

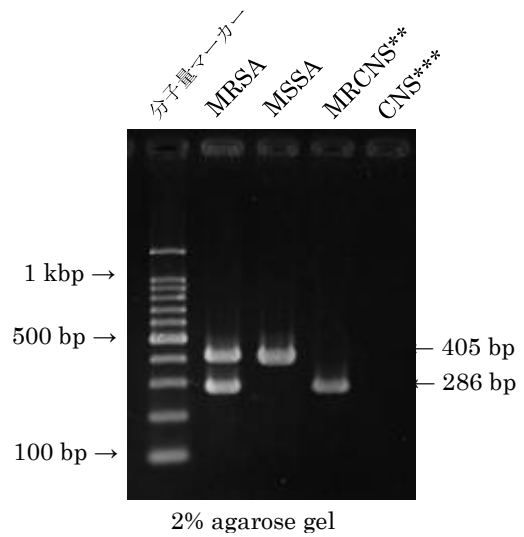
PCR 条件

94℃	3 min		
94℃	30 sec	}	30 cycles
55℃	30 sec		
72℃*	30 sec		
72℃*	3 min		

*使用する taq によっては 68℃

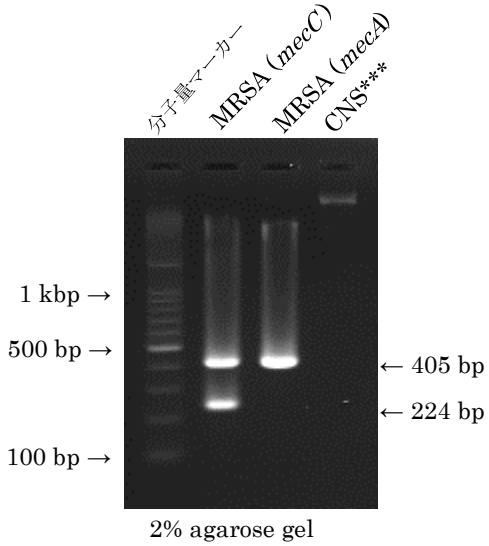
アガロース電気泳動の例を以下に示す。

** MRCNS（methicillin-resistant CNS） *** CNS（Coagulase negative *Staphylococcus*）



2% agarose gel

mecA の検出



2% agarose gel

mecC の検出

3.4. 発育不良・栄養要求性変異株（small-colony variants）への対応

Small-colony variants（SCVs）は、通常の株に比べて増殖速度が遅く、微小コロニーを形成する表現型変異株である。分離培養時の見落とし、誤同定又は薬剤感受性試験の不成立につながることがあり、持続感染や再発性感染に関与する場合もあるため留意する[10]。

黄色ブドウ球菌が血液寒天培地上で微小、非色素性又は非溶血性のコロニーを形成する場合、SCVs の可能性を考慮する。MHA 又は CAMHB で発育不良を示す場合にも同様に SCVs を考慮する。SCVs を確認する方法として、ヒツジ血液寒天培地等での継代培養、大小のコロニーの性状比較、チミジン、ヘミン若しくはメナジオン等の栄養要求性又は炭酸ガス依存性を確認する方法がある[10), 11)]。菌種の同定には MALDI-TOF MS 又は PCR 法を、メチシリン耐性の確認には 3.2 に記載した PBP2’ラテックス凝集法又は 3.3 に記載した *mecA* 若しくは *mecC* の PCR 法を、必要に応じて利用する。

SCVs では通常の薬剤感受性試験が成立しない場合がある。その場合、ヒツジ血液添加 MHA 又は 5% CO_2環境下での検査を検討する。ただし、標準法と異なる条件で得られた結果は参考値として取り扱う。施設内での対応が困難な場合には、国立健康危機管理研究機構 薬剤耐性研究センター等に詳細な解析を依頼する。

4. 分子疫学解析

MRSA の集団感染が疑われる場合は PFGE 解析を実施することがある。黄色ブドウ球菌の細胞壁はリゾチームではほとんど消化されないため、菌をアガロースに包埋する際にリゾスタフィンを 5 μg/100 μL 濃度で混合する。アガロースブロックはリゾスタフィンを 1 μg/100 μL 濃度に加えた 0.5 M EDTA pH8.0 中で 37℃、4 時間インキュベートした後、proteinase K 処理する。制限酵素は *Sma*I を用いる。約 500 kbp までのバンドおよそ 20 本程度からなる電気泳動パターンが得られる。電気泳動プログラムとしては、CHEF Mapper （BioRAD）の組み込みプログラムの場合は、6 V/cm、パルス角度 120 度、5.3～34.9 sec、20 h である。MRSA の PFGE パターンは比較的安定な傾向にあり、集団感染の場合バンドパターンはほぼ一致することが多い。

PFGE に代わる手法として、ゲノムデータを元に SCC*mec* 型の遺伝子配列も考慮して考案された PCR-based ORF Typing（POT）法が用いられている。Cica Geneus Staph

POT kit（黄色ブドウ球菌用）（関東化学）では PFGE とほぼ同等の結果が得られる[23]。近年は、PFGE や POT に加えて、全ゲノム解析（WGS）による高解像度な株間比較が集団感染調査に用いられることがある。WGS は PFGE よりも高い識別能を有し、従来法では区別困難な伝播イベントの推定に有用である。

WGS データを用いた SCC*mec* 型別には、SCCmecFinder[24]や sccmec[25]などの解析ツールが利用できる。新規型が疑われる場合には、International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements（IWG-SCC）の分類基準[4]に基づいて評価する。

【参考文献】

1. 厚生労働省. 感染症法に基づく医師の届出のお願い. 51 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症. https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-05-41-01.html （参照 2026-8-8）

2. Dryden MS. Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. Int J Antimicrob Agents. 34 Suppl 1:S2-7. 2009.

3. Buck JM, Como-Sabetti K, Harriman KH, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota, 2000-2003. Emerg Infect Dis. Oct;11(10):1532-8. 2005.

4. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements (IWG-SCC). https://jarbb.jp/joomla/index.php/en/（参照 2026-07-24）

5. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 42-7. 2014.

6. MRSA 感染症の治療ガイドライン作成委員会 編 (2019) MRSA 感染症の治療ガイドライン 2019 年改訂版.

7. Yamaguchi T, Nakamura I, Chiba K, et al. Epidemiological and microbiological analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a Japanese hospital. Jpn J Infect Dis. 65:175-178. 2012.

8. Inomata S, Yano H, Tokuda K, et al. Microbiological and molecular epidemiological analyses of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care hospital in Japan. J Infect Chemother. 21:729-736. 2015.

9. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 36th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2026.

10. 松本竹久. 臨床検査で問題になる Small-colony variants. 日本臨床微生物学会雑誌, 33(2), 101-108, 2023.

11. Kipp F, Becker K, Peters G, et al. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 42(3):1277-9. 2004.

12. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. 14th ed. CLSI standard M02. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024.

13. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

14. CLSI Archived Resource. A reference of breakpoints eliminated from CLSI document CLSI M100 Since 2010. https://clsi.org/media/bjhnlzhh/m100_archived_drugs_table_20251022.pdf

15. 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル. 侵襲性インフルエンザ菌感染症 （2021年 12 月版）. https://id-info.jihs.go.jp/manuals/pathogen-detection/Invasive_Haemophilus_influenzae_disease20211228.pdf （参照 2026-6-9）

16. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 12th ed. CLSI standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024.

17. 石井良和. 薬剤感受性試験とブレイクポイント，その問題点と今後の展望. 日本化学療法学会雑誌, 59, 454-459, 2011.

18. Kato F, Nakamura M, Sugai M. The development of fluorescent protein tracing vectors for multicolor imaging of clinically isolated *Staphylococcus aureus*. Sci Rep. 7:2865. 2017.

19. 薬剤耐性菌バンク. https://jarbb.jp （参照 2024-02-22）

20. Kondo Y, Ito T, Ma XX, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. Antimicrob Agents Chemother. 51:264-274. 2007.

21. Petersdorf S, Herma M, Rosenblatt M, et al. A Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type XI Primer for Detection of *mecC*-Harboring Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Screening Specimens. J Clin Microbiol. 53(12):3938-3941. 2015.

22. Zhang K, Sparling J, Chow BL, et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 42:4947–4955. 2004.

23. Kawamura H, Tokuda K, Imuta N, et al. Epidemiological Analysis of Nosocomial MRSA Outbreaks Using Phage Open-Reading Frame Typing in a Tertiary-Care Hospital. Jpn J Infect Dis. 69:523-524. 2016.

24. Kaya H, et al. SCCmecFinder, a Web-Based Tool for Typing of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in *Staphylococcus aureus* Using Whole-Genome Sequence Data. mSphere. 3:e00612-17. 2018.

25. Petit RA III. sccmec: A tool for typing SCCmec cassettes in assemblies. https://github.com/rpetit3/sccmec

【検査依頼先】

国立感染症研究所　薬剤耐性研究センター第五室

メールアドレス：　amr-staphy@nih.go.jp

【執筆者】

薬剤耐性研究センター第五室　沓野祥子、岩尾泰久、久恒順三

薬剤耐性研究センター第二室　川上小夜子

主な改訂履歴

改訂版	改訂項目	改訂内容
H24 年 12 月	薬剤耐性菌マニュアル全体	全面改訂
H28 年 12 月	メチシリン耐性機構と検査法	文章追加、参考文献追加
R6 年 3 月	マニュアル全体	文章全面改訂 病原体検出マニュアル薬剤耐性菌から分離
R8 年 8 月	マニュアル全体	文章全面改訂 届出のために必要な検査所見と検査法変更に伴う検査法の一部修正