

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3版)

令和6年3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 <i>mecA</i> 、または、 <i>mecC</i> の検出.....	8
4. 分子疫学解析	10
【参考文献】	10
主な改訂履歴	13

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、かつオキサシリンの MIC 値が 4 µg/mL 以上、又はオキサシリンの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が 10 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、かつオキサシリンの MIC 値が 4 µg/mL 以上、又はオキサシリンの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が 10 mm 以下、かつ分離菌が感染症の起因菌と判定された場合	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)、市中あるい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* 遺伝子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⁾。ただし、SCC*mec* XI 型は *mecA* ではなく *mecC* 遺伝子を保有している。細菌学的には、SCC*mec* I 型、II 型、III 型が HA-MRSA、IV 型と V 型は CA-MRSA として分類されている。日本国内における HA-MRSA は SCC*mec* II 型が多く、CA-MRSA では IV 型が V 型より多い⁵⁾。以前は、医療施設内においては細菌学的分類上の HA-MRSA の検出がほとんどであっ

たが、近年では医療施設内でも CA-MRSA が増加傾向であり、従来の定義が曖昧になってきている。^{6),7)}。一方、*mecC*を保有する SCC*mecXI* 型は LA-MRSA として初めて報告された⁸⁾。加えて、LA-MRSA では SCC*mecV* 型が多く検出されている⁹⁾。

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。CA-MRSA の中にはオキサシリン (MIPIC) に感性の株が多く、MIPIC 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、MIPIC 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い。CFX を選択薬に用いた選択培地としては 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) などがある。また、クロモアガーMRSA (関東化学) もセファマイシン系の選択薬が用いられている。

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。これらの MRSA 鑑別法に使用する薬剤として、日本国内では双方の検査に MIPIC および CFX が採用されているが、近年の CLSI ドキュメント¹⁰⁾では、ディスク拡散法においては CFX のみが推奨され、微量液体希釈法では MIPIC と CFX のどちらも推奨されている。

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^{11),12)}。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'の検出あるいは PCR 法による *mecA* の検出が有用であり、被検菌を血液添加 MHA または血液寒天培地に塗布して培地上に CFX30 µg 含有ディスクを置き、5% CO₂ 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¹⁰⁾。

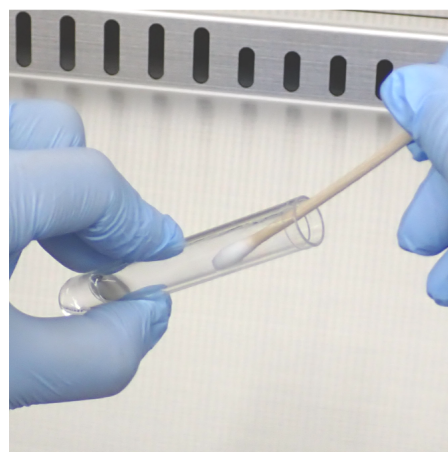
3.2.1. ディスク拡散法による MRSA の鑑別^{10), 13)}

ディスク拡散法の接種菌液は、18～24 時間¹³⁾培養した寒天培地上の被検菌を滅菌綿棒等をかきとり、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 μ g 含有ディスクを培地上に配置し、好氣的条件下で $35 \pm 2^\circ\text{C}$ で 16～18 時間培養した後、阻止円の直径を測定して、 $\leq 21\text{mm}$ を耐性（MRSA）と判定する。ただし、 35°C 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。

CLSI では、以前にはディスク拡散法での MRSA の鑑別に MPIPIC も推奨していたが、MPIPIC は偽陰性を示す場合がある事から、近年では CFX を MRSA の鑑別に用いることを推奨している¹⁰⁾。MPIPIC ディスクで偽陰性を示すものとして、MPIPIC 感性 MRSA（OS-MRSA, oxacillin-susceptible MRSA）があり、典型的な特徴として *mecA* 遺伝子を保有しているにも関わらず、MPIPIC の MIC が低い（通常 $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ ）ことが挙げられる。（図 3 参照）また、CA-MRSA の中にも MPIPIC 感性株がある。



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

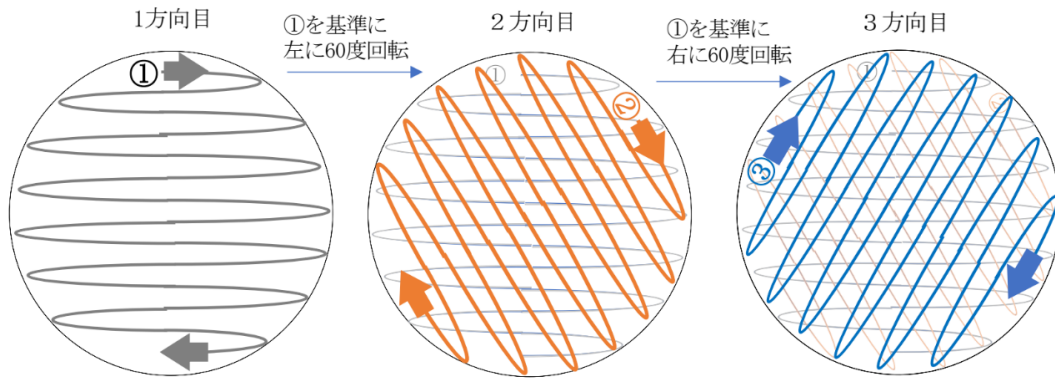


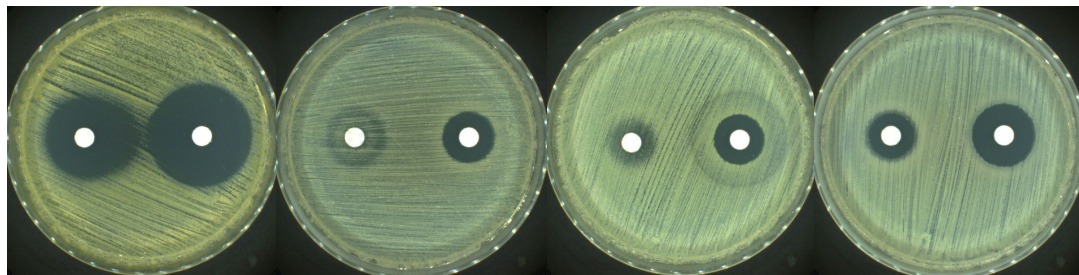
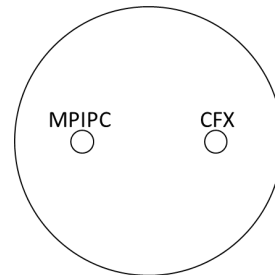
図 2. ディスク拡散法における菌液の塗布方法 ¹⁴⁾図改変

MRSAの判定基準

MPIPC ≤ 10 mm* CFX ≤ 21 mm**

*感染症法に基づく届出基準に準拠¹⁾

**MICの判定は CLSI2023 (M100-Ed33) に準拠¹⁰⁾



MSSA
(MPIPC:S, CFX:S)

HA-MRSA
(MPIPC:R, CFX:R)

CA-MRSA
(MPIPC:R, CFX:R)

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

S(感性), R(耐性)

図 3. ディスク拡散法による薬剤感受性試験の結果

3.2.2. 微量液体希釈法による MRSA の鑑別^{10), 15)}

微量液体希釈法で MIPIC 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、18～24 時間¹⁵⁾培養した寒天培地上の被検菌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/ウェルまたは 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 μ L 分注した各ウェルに 5 μ L ずつ分注する。調製した接種菌液は 15 分以内に使用する。好氣的条件下で $35 \pm 2^\circ\text{C}$ で CFX は 16～20 時間、MIPIC は 24 時間培養後に判定する。ただし、 35°C 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。MIPIC の MIC が $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ または CFX の MIC が $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ の場合を耐性（MRSA）と判定する¹⁰⁾。

薬剤感受性を自動測定機器で測定する場合は、WalkAway（ベックマン・コールター）や VITEK 2（バイオメリュー）、Phoenix（ベクトン・デッキンソン）等で測定が可能であるが、用手の微量液体希釈法と自動測定では結果の MIC が異なる場合がある点に留意する¹⁶⁾。

3.3. PCR 法による *mecA*、または、*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°C で 10 分間加熱処理後、13,000rpm 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 μ L にリゾスタフィンを最終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ ¹⁷⁾ 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°C で 30 分から 1 時間インキュベートし、 100°C 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 $5 \sim 50 \mu\text{g/mL}$ で適宜調整する。PCR 法による *mecC* の検出は *mecA* 用のプライマーを用いても検出されないため、*mecC* 用のプライマーを用いる¹⁸⁾。

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*、または、*nuc*を検出するためのプライマーの例を以下に示す。

Gene	Oligonucleotides sequence (5'-3')	PCR 産物サイズ
<i>mecA</i>	TGCTATCCACCCTCAAACAGG AACGTTGTAACCACCCAAGA	286 bp ²⁰⁾
<i>mecC</i>	GATAACTCTCGCAAAACATAACG CGTCATTGGCGGATCAAAC	224 bp ¹⁸⁾
<i>nuc</i> ^{**}	CTAAGTAGCTCAGCAAATGCATC AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	405 bp ^{21)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

PCR 条件

94°C 3 min

94°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C* 30 sec

} 30 cycles

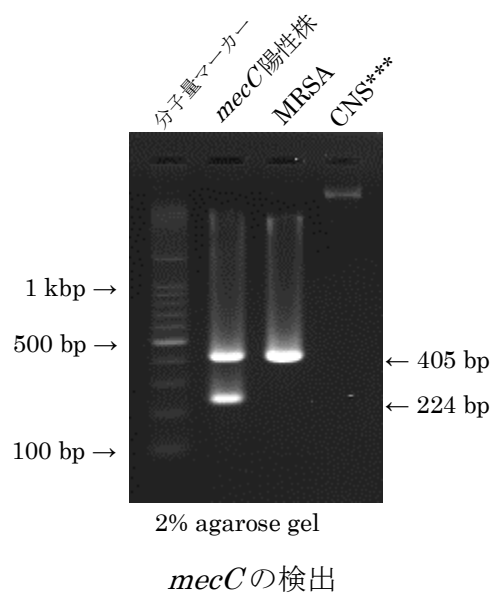
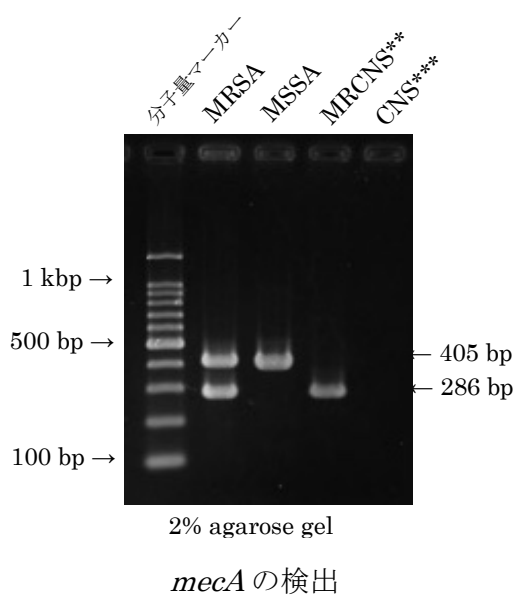
72°C* 3 min

*使用する taq によっては 68°C

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*)



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。MRSA 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°C、4 時間インキュベートした後、proteinase K 処理する。制限酵素は SmaI 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²²⁾。

【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. 48 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 2024-02-22)
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://www.sccmec.org/index.php/en> (参照 2024-02-22)
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 42:7. 2014.
9. Bal AM, Coombs GW, Holden MTG, et al. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *J Glob Antimicrob Resist.* 6:95-101. 2016.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2023. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-Ed33.
11. 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.
12. 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.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; M02, 13th Edition. 2015.
14. 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://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Invasive_Haemophilus_influenzae_disease20211228.pdf (参照 2024-02-22)
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; M07, 11th Edition. 2018.

16. 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.
17. 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.
18. 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.
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. 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.
22. 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.

【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