

[原 著]

薬剤感受性試験で Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* と判定された *mec* 遺伝子陰性株の解析および判定不一致の早期発見に向けた判定方法の評価

村 竜輝<sup>1)</sup>・麻生 都<sup>1)</sup>・金谷和美<sup>1)</sup>・河村佳江<sup>1)</sup>・多賀允俊<sup>2)</sup>・飯沼由嗣<sup>1)3)</sup>

<sup>1)</sup> 金沢医科大学病院中央臨床検査部

<sup>2)</sup> 金沢医科大学病院薬剤部

<sup>3)</sup> 金沢医科大学臨床感染症学

(令和7年7月5日受付, 令和7年10月15日受理)

当院で Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) と判定された保存菌株のうち cefoxitin (CFX) または oxacillin (MPIPC) の片方が感性であった株の *mec* 遺伝子の保有状況を調査した。2019年3月-2024年12月で40株が対象となり10株が *mec* 遺伝子陰性であった。10株中3株は感受性パネルによる薬剤感受性再検査においても MRSA と判定され, borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA) と推測された。7株は再検査で Methicillin-susceptible *S. aureus* と判定され結果の乖離を認めた。MPIPC または CFX が片方感性の MRSA において, *mec* 遺伝子の有無をパネルによる薬剤感受性試験結果で推測するのは困難であった。一方で, MRSA スクリーニング培地にコロニーを直接接種すると, *mec* 遺伝子の有無による発育に差異を認め識別が可能であった。PBP2' ラテックス凝集法についても同様に識別可能であった。*mec* 遺伝子の有無と薬剤感受性試験結果の乖離事例は稀に報告されているが, 疫学情報やその機序など十分な解析はなされていない。各検査室においては薬剤感受性試験に加えて, MRSA スクリーニング培地や PBP2' 検出ラテックス凝集法, 遺伝子検査などの併用や適用条件を検討する必要がある。

**Key words:** MRSA, *mecA*, *mecC*, BORSA

序 文

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は, *mecA* 遺伝子保有による penicillin-binding protein 2a (PBP2a または PBP2') の産生が主要な耐性メカニズムである。近年では, *mecA* のホモログ遺伝子である *mecC* やその他のメチシリン耐性機序も報告されているが<sup>1)</sup>, MRSA の判定基準は *mecA* 遺伝子および PBP2a の証明であり, 日常業務においては薬剤感受性試験によって判定される。

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) は, 薬剤感受性試験による MRSA の判定において, ディスク拡散法では cefoxitin (CFX) を, 薬剤感受性パネルによる MIC 測定では CFX または oxacillin (MPIPC) を採用することを推奨している<sup>2)</sup>。CFX と MPIPC のいずれか一方または両方が耐性と判定された場合に MRSA とみなし, 他の  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬も MIC 値に関わらず耐性と報告される。

当院では 2024 年に, 新生児集中治療室 (NICU) 入室中の患児から分離された *S. aureus* が, パネルによる薬剤感受性試験では CFX が耐性 (> 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) であったため MRSA と判定された。一方で, MPIPC の MIC は 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と低

値であったため, *mec* 遺伝子を確認したところ, 陰性の結果となり, Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) と判定されるという乖離事例を経験した。当院では以前より, CFX と MPIPC の感受性結果に乖離を認める MRSA が検出されていたものの, メチシリン耐性の判定について詳細な検討は行われていなかった。今回, 同様の事例が潜在的に存在していた可能性を考慮し, メチシリン耐性判定の正確性を検討することとした。加えて, 薬剤感受性試験と *mec* 遺伝子保有の有無が乖離する菌株を日常業務で早期に発見するための手段についても検討した。

材料と方法

1. 対象

2019年3月-2024年12月に分離された MRSA の保存菌株の内 (i) または (ii) の条件を満たす株を対象とした。

(i) CFX 耐性 (> 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で MPIPC 感性 ( $\leq$  2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の株。

(ii) CFX 感性 ( $\leq$  4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で MPIPC 耐性 ( $\geq$  4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の株。

当院では MRSA 菌株は無菌検体からの検出時は全て保存し, 加えて無菌検体以外からの検出は入院及び外来の初回分離時に保存している。研究開始時に条件 (i) または (ii) に合致する保存菌株を検索する際は, 同一患者からの重複株を含めた全株から検索した。条件に合致する株の中で同一患者の重複分は検出材料を問わず採取日が古い分離株を選択した。菌株は MALDI biotyper (ブルカー・ジャパン) にて同定し

著者連絡先: (〒920-0293) 石川県河北郡内灘町大学 1-1  
金沢医科大学臨床感染症学  
飯沼由嗣  
TEL: 076-218-8452  
FAX: 076-218-8453  
E-mail: yiinuma@kanazawa-med.ac.jp

た。薬剤感受性試験は Pos MIC 2J パネル(ベックマン・コーンター)を使用し, Walkaway 96 plus, LabPro ver. 4.45 にて測定した。判定は CLSI M100 ED35<sup>2)</sup>に基づいて行った。Pos MIC 2J 測定時の菌液調整は基準濁度法にて行い, McFarland 0.5 の菌液調整は濁度計 VITEK DENSICHEK (ビオメリュー)を用いた。濁度計は測定日毎にキャリブレーションチェックによる確認を実施していた。

## 2. *mecA*, *mecC* 遺伝子の検出

対象菌株の *mecA* 遺伝子の有無を PCR にて確認し, *mecA* 陰性株は追加で *mecC* 遺伝子の検索を行った。*mecA* 及び *mecC* PCR の増幅コントロールとして *S. aureus* の陽性コントロールである *nuc* 遺伝子を用いた。保存菌株を 5% 羊血液寒天培地 M58 (栄研化学) で 5% CO<sub>2</sub>, 35°C で 18 時間培養し用いた。DNA 抽出はシカジーニクス DNA 抽出試薬 ST (関東化学) を用いた。プライマーは *mecA*-forward (5' - TGCTATCCACCCTCAAACAGG-3'), *mecA*-reverse (5' - AACGTTGTAACCACCCAAGA-3'), *mecC*-forward (5' - GATAACTCTCGCAAAACATAACG-3'), *mecC*-reverse (5' - CGTCATTGGCGGATCAAAC-3'), *nuc*-forward (5' - CTAAGTAGCTCAGCAAATGCATC-3'), *nuc*-reverse (5' - AGCCAAGCCTTGACGAACATAAGC-3') を使用した<sup>3)</sup>。PCR は 94°C-3 min を 1 cycle, 94°C-30 sec, 55°C-30 sec, 72°C-30 sec を 30 cycles, 72°C-3 min を 1 cycle で増幅した<sup>3)</sup>。*mecA*, *nuc* 遺伝子陽性コントロールとして *S. aureus* ATCC43300 を *mecC*, *nuc* 遺伝子陽性コントロールは *S. aureus* NCTC13552 を用いた。

## 3. CFX, MIPIC ディスクを用いたディスク拡散法

CFX 及び MIPIC ディスクを用いたディスク拡散法を *mecA*, *mecC* 遺伝子陰性株を対象に実施した。保存菌株を 5% 羊血液寒天培地 M58 (栄研化学) で 5% CO<sub>2</sub>, 35°C で 18 時間培養後に用いた。ディスクは BD センシ・ディスク セフォキシチン 30 及びオキサシリン 1 (日本 BD), 培地は BD BBL Mueller Hinton II 寒天培地 (BD) を用いた。培養は 35°C で行い, 阻止円は透過光で読み取り計測した。CFX の判定は CLSI M100 ED35 に基づき感性;  $\geq 22$  mm, 耐性;  $\leq 21$  mm とし<sup>2)</sup>, MIPIC の判定は CLSI M100 S16 に基づき, 感性;  $\geq 13$  mm, 中間; 11-12 mm, 耐性;  $\leq 10$  mm) とした<sup>4)</sup>。

## 4. パネルによる薬剤感受性試験の再検査

*mecA*, *mecC* 遺伝子陰性株を対象に実施した。保存菌株を 5% 羊血液寒天培地 M58 (栄研化学) で 5% CO<sub>2</sub>, 35°C で 18 時間培養し用いた。パネルは Pos MIC 2J を使用し, 菌液は基準濁度法にて測定した。Walkaway 96 plus で最終判定直後のパネルを取り出し CFX 4  $\mu$ g/mL のウェルを, 条件(ii) に合致する菌株は MIPIC のウェルについても目視で確認した。

## 5. MRSA スクリーニング培地による判定

日常業務におけるメチシリン耐性判定の補助手段として MRSA スクリーニング培地の発育性を検討した。対象菌株の保存菌株を 5% 羊血液寒天培地 M58 (栄研化学) で 5% CO<sub>2</sub>, 35°C で 18 時間培養し用いた。培地はクロモアガー MRSA (関東化学) を 8 分画で使用し 35°C, 18 時間培養した。培地への塗抹方法は日常業務を考慮し, (a) 発育したコロニーを滅

菌綿棒でかきとり, クロモアガー MRSA へ接種, (b) McFarland 0.5 に調整した菌液を滅菌綿棒でクロモアガー MRSA へ接種の 2 条件とした。

## 6. ラテックス凝集法による PBP2' 検出

日常業務におけるメチシリン耐性判定の補助手段として PBP2' ラテックス凝集法を検討した。対象菌株の保存菌株を 5% 羊血液寒天培地 M58 (栄研化学) で好気条件下, 35°C で 18 時間培養し用いた。PBP2' ラテックス凝集法は MRSA-LA 「生研」(デンカ生研) を用い, 試薬添付文書<sup>5)</sup>に従い実施した。

本研究は金沢医科大学 病院研究倫理審査委員会の承認 (H412) を得て実施した。

## 結 果

### 1. 対象菌株の内訳と *mec* 遺伝子の保有状況

2019 年 3 月-2024 年 12 月に分離された 1,042 株の MRSA (重複を除く) の内, 本研究の対象となった菌株は計 40 株 (3.8%) であり, そのうち条件 (i) に該当するものが 34 株, 条件 (ii) に該当するものが 6 株であった。*mecA* 遺伝子陽性株は 30 株, *mecA* および *mecC* 遺伝子陰性株は 10 株 (0.96%) であった。*mec* 遺伝子陰性 10 株の内訳は, 条件 (i) から 8 株, 条件 (ii) から 2 株であった。対象となった 40 株の  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に対する MIC 分布を確認したところ, MIPIC, ペニシリン G, アンピシリンは *mec* 遺伝子の有無と MIC 値の高低に関連性は認められなかった。セファゾリンに対する MIC 分布では, *mec* 遺伝子陰性株は全て 1  $\mu$ g/mL 以下に分布していたが, *mec* 遺伝子陽性 30 株中 22 株も同様に 1  $\mu$ g/mL 以下に分布していた (Figure 1)。*mecA* および *mecC* 遺伝子陰性 10 株が検出された患者のうち, 4 名は検出前 30 日以内に当院での抗菌薬投与歴が認められたが, 残りの 6 名には抗菌薬投与歴は認められなかった。

### 2. CFX および MIPIC ディスク拡散法による結果

*mec* 遺伝子陰性 10 株のうち, 2 株は CFX ディスク拡散法において阻止円径 21 mm を示し, MRSA と判定された。残りの 8 株は阻止円径 22-30 mm を示し, MSSA と判定された。MIPIC ディスク拡散法においては, 3 株が中間と判定され, 7 株が感性と判定された (Table 1)。

### 3. *mec* 遺伝子陰性株のパネルによる薬剤感受性試験再検査結果

保存菌株を用いたパネルによる薬剤感受性試験の再検査では, *mec* 遺伝子陰性 10 株中 3 株が CFX により MRSA と判定され, 7 株は MSSA と判定された (Table 1)。特に, MRSA と判定された 3 株の CFX 4  $\mu$ g/mL のウェルを目視で確認したところ, 弱い発育が認められた (Figure 2)。MIPIC では全て MSSA 判定となった。

### 4. MRSA 選択培地における発育性

MRSA スクリーニング培地における発育性について, 以下の結果が得られた。

・コロニーを直接塗抹する条件 (a) の場合: *mecA* 遺伝子陽性株は全て良好な発育を示した。一方, *mec* 遺伝子陰性株では 7 株 (Figure 3 No. 4-10) が非発育であった。残りの 3 株 (Figure 3 No.1-3) は薄い発育を認めたものの, *mecA* 遺伝子陽性株とは明確に識別可能であった。

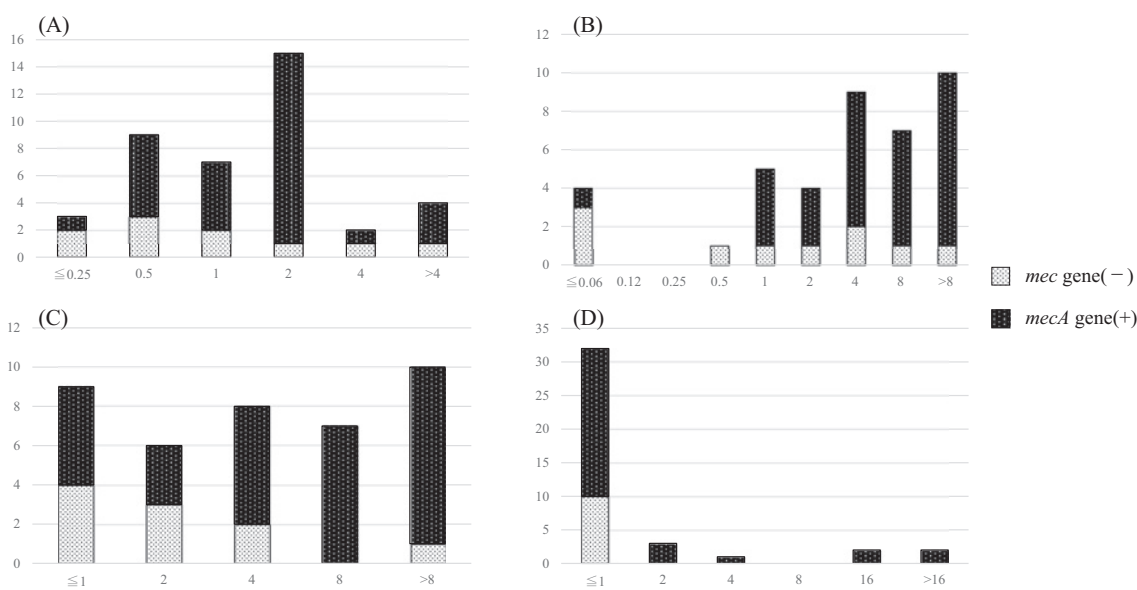


Figure 1. MIC distribution of *mecA* gene-positive and *mec* gene-negative *S. aureus* in  $\beta$ -lactam antimicrobials (A) oxacillin, (B) penicillin G, (C) ampicillin, (D) cefazolin

・McFarland 0.5 に調整した菌液を塗抹する条件 (b) の場合：*mec* 遺伝子陰性株は 8 株 (Figure 3 No. 3-10) が非発育、2 株 (Figure 3 No. 1, 2) が薄い発育を示した。*mecA* 遺伝子陽性株においては、4 株 (Figure 3 No. 11-14) で大小不同のコロニーや薄い発育が観察され、直接接種した場合と比較して十分な発育が認められなかった。

#### 5. ラテックス凝集法による PBP2' 検出

*mec* 遺伝子陰性 10 株は全て PBP2' 陰性であり、*mec* 遺伝子陽性 30 株は全て PBP2' 陽性であった。ただし、*mec* 遺伝子陽性 1 株は初検時 PBP2' 陰性であった。試薬添付文書を参考に MIPIC ディスクを用いて誘導培養を行い<sup>5)</sup>、ディスク周囲のコロニーを用いて再度ラテックス凝集法を行ったところ陽性の結果が得られた。

#### 考 察

本検討では、MIPIC または CFX のいずれか一方に耐性を示し MRSA と判定された 40 株中 10 株において、*mec* 遺伝子が陰性であることが確認された。

*mec* 遺伝子陰性の 10 株中 2 株は CFX ディスクを用いたディスク拡散法で MRSA と判定され、3 株は PosMIC 2J パネルを用いた再検査で MRSA と判定された。*mec* 遺伝子陰性でありながらメチシリン耐性を示す機序として、borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA) が挙げられる<sup>1)</sup>。BORSA には、 $\beta$ -ラクタマーゼの過剰産生、PBP1-4 における複数の無関係な点突然変異 (modified *S. aureus* : MODSA と呼ばれる)、あるいは GGDEF domain protein containing phosphodiesterase (GdpP) が関与する機序が報告されている<sup>1)6)~10)</sup>。Sawhney らは、*mec* 遺伝子陰性で MIPIC が耐性または中間の菌株を BORSA と規定している<sup>1)</sup>。一方で Argudín らはメチシリン耐性 *mec* 欠損株として *mec* 遺伝子陰性 CFX and/or MIPIC 耐性株の解析を報告しており<sup>6)</sup>、現状では BORSA の定義について用語を含めてコンセンサスが

得られた明確な定義は存在していない。*mec* 遺伝子陰性は共通しているが、判定に用いる薬剤や MIC 値は報告によって異なる定義の「BORSA」が用いられているのが現状である<sup>1)6)~10)</sup>。本研究においてはパネルによる薬剤感受性再検査で MRSA と判定され、かつ MIPIC のディスク拡散法で中間と判定された 3 株は BORSA である可能性が高いと考えられた。なお、本稿で言及する BORSA という用語は、各報告によってその定義が異なることに留意されたい。

臨床的に BORSA は MRSA に類似していると報告があるほか<sup>11)</sup>、MSSA 感染症より重症であったり<sup>11)12)</sup>、治療薬選択に難渋した症例<sup>13)</sup>が報告されている。これらのことは MRSA、MSSA、BORSA は正確に区別する必要があることを示唆している。本研究では *S. aureus* における BORSA の割合は 0.29% であったが、既報においては 1% 未満から 12.5% と報告によって大きく異なる<sup>1)</sup>。これは、BORSA の検出についてコンセンサスが得られた定義が存在しておらず、CLSI<sup>2)</sup>において MRSA の検出に主眼が置かれ標準的な検出法が存在しないこと、及び BORSA の疫学情報が少ないことに起因すると考えられる<sup>11)</sup>。BORSA が発生する要因としては、抗菌薬投与が関与している可能性が指摘されている<sup>14)</sup>。本研究で BORSA と考えられた 3 株の内 2 株は検出 30 日以内の抗菌薬投与を認めたが 1 株は投与歴を認めなかった。BORSA の出現は抗菌薬投与以外の発生リスクが存在する可能性が考えられる。以上のことから BORSA の疫学や臨床的特徴について、その実態を正確に把握できていない可能性がある。加えて、BORSA の原因とされる遺伝子変異が複数報告されており<sup>1)6)~10)</sup>、今後 BORSA について症例の蓄積と菌株の全ゲノムシークエンスなどの詳細な遺伝子解析が求められる。

パネルによる薬剤感受性試験の再検査で MRSA と判定された 3 株は CLSI の基準においては MRSA と判定される一方、残りの 7 株は初検時と再検査で結果の乖離を認めた。薬剤感受性試験で結果が変動しうる要因として接種菌量が考え

Table 1. Characteristics of *mec* gene-negative *S. aureus*

Sequence No.	Starin No.	sample	History of antimicrobial administration	DD (mm)	CHORMagar MRSA	Di-rect	Mc Farland 0.5	CFX screen	MPIPC	PCG	ABPC	ABPC/SBT	IPM/CS	CEZ	GM	ABK	EM	CLDM	MINO	VCM	TEIC	DAP	LVFX	FOM	MUP	LZD	ST	RFP	MIC by PosMIC 2J (μg/mL) (initial value / retest value)	
																													CFX MPIPC	ABPC
1	B20210207	postnasal swab	no	21	11	weak	pinpoint	>4	1 / 0.5	≤0.06 / ≤0.06	≤1 / ≤1	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.25 / ≤0.25	≤1 / 0.5	≤1 / 0.5	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.5 / ≤0.5	≤4 / ≤4	≤256 / ≤256	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	
2	B20220576	postnasal swab	yes	23	12	weak	pinpoint	>4	2 / 0.5	≤0.06 / ≤0.06	≤1 / ≤1	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	2 / 2	2 / 2	>4 / >4	≤0.25 / ≤0.25	≤1 / 1	≤1 / 1	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.5 / ≤0.5	≤4 / ≤4	≤256 / ≤256	1 / 1	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	
3	B20240795	sputum	yes	21	12	weak	-	>4	0.5 / 0.5	4 / 2	4 / 2	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	>4 / >4	>4 / >4	≤0.25 / ≤0.25	≤1 / 0.5	≤1 / 0.5	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.5 / ≤0.5	≤4 / ≤4	≤256 / ≤256	2 / 2	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	
4	C20207871	blood culture	no	24	20	-	-	>4	1 / ≤0.25	1 / ≤0.06	2 / ≤0.06	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	>8 / >8	≤1 / ≤1	>4 / >4	≤0.25 / ≤0.25	≤1 / 1	≤1 / 1	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	>4 / >4	≤4 / ≤4	≤256 / ≤256	2 / 2	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	
5	C20218673	otorrhea	yes	25	16	-	-	>4	0.5 / 0.5	>8 / >8	>8 / >8	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	>4 / >4	>4 / >4	≤0.25 / ≤0.25	≤1 / 0.5	≤1 / 0.5	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.5 / ≤0.5	≤4 / ≤4	≤256 / ≤256	2 / 2	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	
6	B20230293	conjunctival swab	no	23	16	-	-	>4	≤0.25 / ≤0.25	≤0.06 / ≤0.06	≤1 / ≤1	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	8 / 8	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.25 / ≤0.25	≤1 / 1	≤1 / 1	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.5 / ≤0.5	≤4 / ≤4	≤256 / ≤256	2 / 2	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	
7	B20240311	throat swab	yes	22	15	-	-	>4	0.5 / ≤0.25	8 / 2	4 / 2	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	2 / 2	≤0.25 / ≤0.25	≤0.25 / ≤0.25	≤0.25 / ≤0.25	≤1 / 0.5	≤1 / 0.5	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.5 / ≤0.5	≤4 / ≤4	≤256 / ≤256	2 / 2	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	
8	B20240631	sputum	no	23	19	-	-	>4	≤0.25 / ≤0.25	2 / 0.5	2 / 0.5	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.25 / ≤0.25	≤0.25 / ≤0.25	≤1 / 0.5	≤1 / 0.5	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	≤0.5 / ≤0.5	≤4 / ≤4	≤256 / ≤256	1 / 1	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	
9	C20197389	urological specimen	no	25	21	-	-	≤4	>4 / ≤0.25	0.5 / ≤0.06	≤1 / ≤1	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	>8 / >8	>4 / >4	>4 / >4	≤0.25 / ≤0.25	≤1 / 1	≤1 / 1	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	>4 / >4	≤4 / ≤4	≤256 / ≤256	2 / 2	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	
10	B20210370	closed wound	no	30	19	-	-	≤4	4 / ≤0.25	4 / 2	2 / 2	≤2 / ≤2	≤1 / ≤1	≤1 / ≤1	2 / 2	≤0.25 / ≤0.25	≤0.25 / ≤0.25	1 / 1	2 / 2	1 / 0.5	≤1 / ≤1	≤0.25 / ≤0.25	4 / 1	>16 / 16	>256 / ≤256	2 / 2	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	≤0.5 / ≤0.5	

DD, disk diffusion; CFX, cefoxitin; MPIPC, oxacillin; ABPC/SBT, ampicillin/sulbactam; IPM/CS, imipenem/cilastatin; CEZ, ceftazolin; GM, gentamicin; ABK, arbekacin; EM, erythromycin; CLDM, clindamycin; MINO, minocycline; VCM, vancomycin; TEIC, teicoplanin; DAP, daptomycin; MUP, mupirocin; LZD, linezolid; ST, sulfamethoxazole-trimethoprim; RFP, rifampicin; -, no growth on agar.

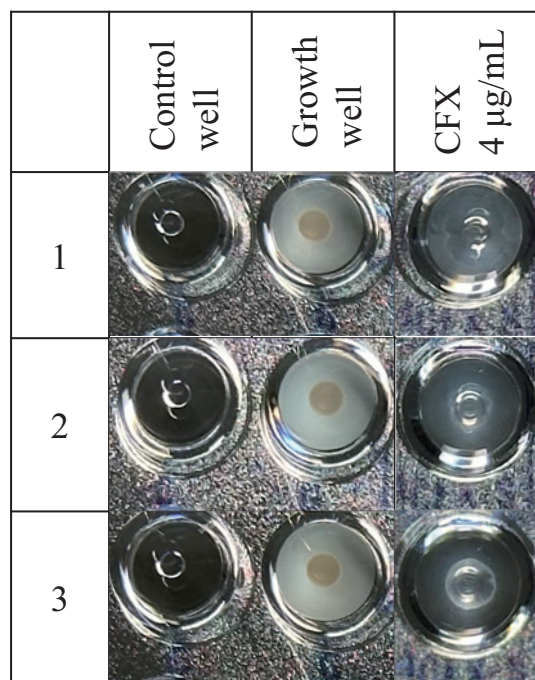


Figure 2. Presence of growth in a PosMIC 2J panel of *mec* gene-negative *S. aureus*

られるが、Microscan パネルには菌液調整の方法として、プロンプト法と McFarland 0.5 に調整した菌液を用いる基準濁度法の 2 種類が存在する。プロンプト法は菌液調整が容易である反面、バンコマイシンの MIC が高値となる傾向が報告されている<sup>15)16)</sup>。そのため、当院では *S. aureus* の薬剤感受性試験は全て基準濁度法にて菌液調整を実施し、加えて菌液を調整する濁度計についても測定日ごとにキャリブレーションチェックによる確認を実施していた。また、調査期間中に関連する検査機器、試薬、消耗品に変更がなかった。これらのことから、菌液調整などの測定方法や手技に由来した結果の乖離は考えにくい。

7 株の結果が乖離したその他の要因として、以下の 2 点が考えられる。1 つ目は、菌株の凍結保存による MIC の変化が挙げられる。2000 年代から 2010 年代にかけて、MRSA におけるバンコマイシンの MIC が経年的に徐々に上昇する現象、いわゆる MIC creep が報告された<sup>17)</sup>。一方で、長期(6 ヶ月以上)の -80℃ 凍結保存後の菌株はバンコマイシンやダプトマイシンの MIC が初検時より低下したことから、MIC creep は存在しないとの報告もされている<sup>18)</sup>。当時の検討においては抗 MRSA 薬の MIC 変化のみが検討されており、β-ラクタム系抗菌薬の MIC 変化については検討されていなかった<sup>19)</sup>。凍結保存による MIC 変化の発生機序は解明されていないものの、本検討においても凍結保存検体を用いてパ

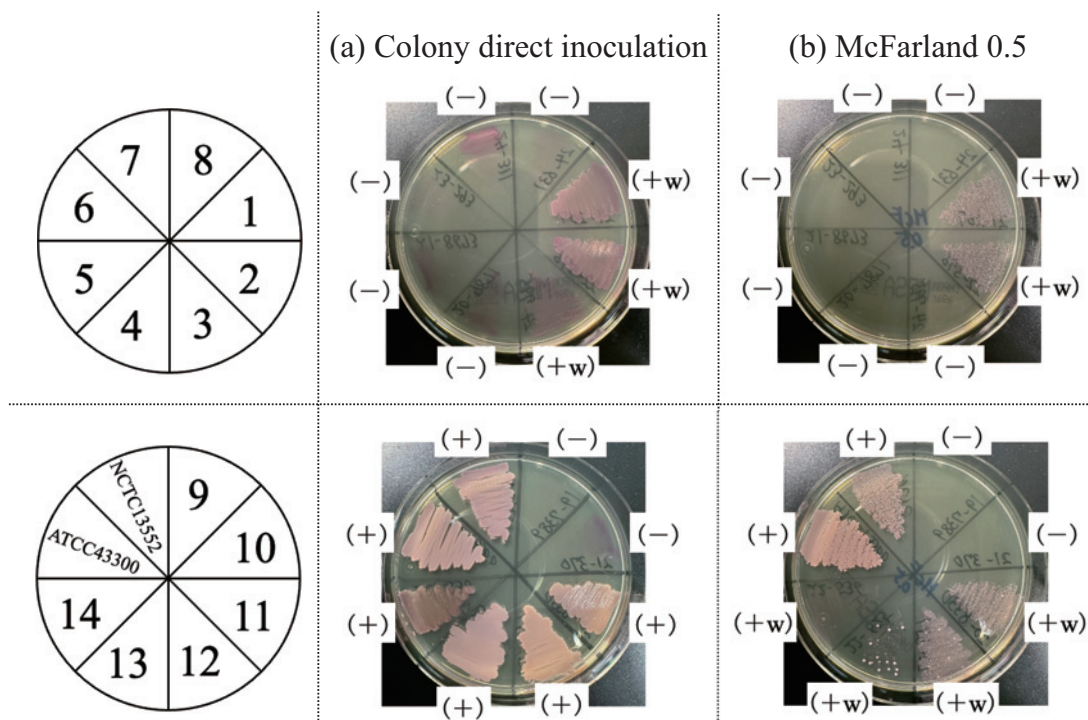


Figure 3. Comparison of MRSA screening agar growth depending on colony inoculation method  
 ATCC4330, *S. aureus* ATCC43300; NCTC13552, *S. aureus* NCTC13552.  
 Numbers 1 to 10 were *mec* gene-negative strains listed in Table 1, and 11 to 13 were MRSA strains that were *mecA* gene-positive, CFX-resistant, and MIPIC-susceptible. All colonies of different sizes were confirmed to be MRSA. 14 was MRSA strain that was *mecA* gene-positive, CFX-susceptible, and MIPIC-resistant. (-), no growth on agar; (+), purple colony growth was confirmed; (+w), purple colony growth was observed, but it was clearly weaker than that observed in (+). Of the bacteria displayed with (+w), conditions (a) 1 to 3 and (b) 14 showed thin bacterial growth overall. Conditions (b) 1, 2, 11 and 12 showed pinpoint colony formation, and condition 13 showed colonies of varying sizes.

ネルによる感受性試験の再検を行ったため、初検時より MIC が低下し、再現性が得られなかった可能性が考えられる。2 つ目に、CFX ウェルの発育判定が正しく行われていなかった可能性が考えられる。パネルによる感受性再検査の際に MRSA と判定された 3 株は CFX ウェルで弱い発育を認めたが、7 株は発育を認めなかった。当院で使用している PosMIC 2J パネルは CFX の判定に用いるウェルが 1 つ (4 µg/mL) であり、発育を認めれば MRSA と判定される。そのため、CFX ウェルがスキップ現象などのように偶発的に発育陽性と判定された可能性や、CFX の MIC が 4 µg/mL 付近の境界域であったためにウェルが 1 つでは正確に判定できなかった可能性が考えられる。感受性パネルによっては、CFX のウェルがブレイクポイントである 4 µg/mL 付近で複数存在するパネルが上市されているが、本パネルは 1 つのウェルであったため、それに気づくことは困難であった。これら 7 株の MSSA が初検時に MRSA と判定された原因は推測の域を出ず、特定には至らなかったが、今後このような BORSA や結果が乖離しうる *S. aureus* を初検時にどのようにして検出するかを検討した。

まず、パネルによる感受性試験結果に着目し、今回の検討の発端となった MIPIC の MIC 低値 (≤ 2 µg/mL) が指標となりうると考えられたが、MIPIC の MIC 分布から *mec* 遺伝子の有無を明確に区別するカットオフ値は設定できなかった。同様に、ペニシリン G、アンピシリン、セファゾリンにおいても MIC 分布から *mec* 遺伝子の有無を推測することは困難であると考えられた。

次に、当院で使用している MRSA スクリーニング培地が MRSA 判定の補助として利用可能か検討した。当院では *S. aureus* の感受性試験において必ず基準濁度法にて測定を行うため、感受性試験実施時に選択培地に McFarland 0.5 の菌液を接種するか、コロニーより直接接種する 2 条件が測定フローにおいて適していると考えられた。*mec* 遺伝子陰性 10 株中 7 株は両条件とも発育を認めなかったが、パネルによる感受性試験で MRSA と判定され、BORSA と考えられた 3 株はコロニーより直接接種する条件で弱いながらも発育を認めた。一方で、MRSA の標準菌株と比較して明確に発育性が異なっており、識別は可能であると考えられた。*mec* 遺伝子陽性であった 30 株においては、コロニーからの直接接種では十分な発育を認めたが、McFarland 0.5 の菌液では 4 株の発育が弱い結果となった。以上のことから、MRSA の判定補助には選択培地にコロニーを直接接種することが最適と考えられた。加えて、BORSA と考えられた 3 株はコロニーより直接接種する条件で弱い発育を認めたことから、BORSA の推測が可能であることが示唆された。

当院では使用していないものの、MRSA の検出方法としてラテックス凝集法による PBP2' 検出法も用いられる。研究対象となった 40 株に対してラテックス凝集法を実施したところ、*mec* 遺伝子の有無を正確に判定可能であった。一方で *mec* 遺伝子陽性の 1 株は MIPIC ディスクを用いた誘導培養を行い、再検査が必要であった。これは PBP2' 産生量が低下していたことに起因すると考えられ、薬剤感受性試験結果とラテックス凝集法の結果が乖離した際は解釈に注意を要する。*S. aureus* における薬剤感受性結果と遺伝子結果

の判定不一致例はしばしば報告されており、*mec* 遺伝子陽性の MSSA も報告されている<sup>20)21)</sup>。これらの症例においては、MRSA スクリーニング培地、PBP2' 検出ラテックス凝集法、遺伝子検査の併用が有用であると報告されている<sup>20)21)</sup>。本研究においてはメチシリン耐性の判定補助として MRSA スクリーニング培地にコロニーを直接接種する方法か、ラテックス凝集法による PBP2' 検出が有用であると考えられた。各検査室においては、薬剤感受性試験以外にメチシリン耐性の判定方法を用意し、使用している薬剤感受性パネルに応じて追加検査を行う条件を検討する必要があると考えられた。

以上のことから、MRSA と判定された株の中で MIPIC または CFX のいずれか一方のみが耐性の株の中に、*mec* 遺伝子陰性株が存在することが明らかになった。これらの株は BORSA であるか、CFX のウェルが 1 つでは判定が難しい株であった可能性が考えられた。感受性測定における初検時と再検時の結果乖離の原因は特定には至らず推測の域を出なかったが、MIPIC または CFX が片方のみ耐性の株については、コロニーから直接接種した選択培地の発育性を同時に確認する、あるいは PBP2' ラテックス凝集法を行うことで、その異常に気づくことが可能であると考えられた。BORSA については、詳細な遺伝子解析の途上にあり、今後さらなる菌株と遺伝子解析の蓄積が求められる。

**利益相反：**飯沼由嗣は、株式会社 MSD から講演料を受けている。

## 文 献

- 1) Sawhney, S.S., E.M. Ransom, M.A. Wallace, et al. 2022. Comparative genomics of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* detected during a pseudo-outbreak of methicillin-resistant *S. aureus* in a neonatal intensive care unit. *mBio* 13: e03196-21.
- 2) CLSI. 2025. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 35th edition. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 3) 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. 国立健康危機管理研究機構.  
<https://id-info.jihs.go.jp/relevant/manual/010/MRSA20240318.pdf> 2025 年 4 月 29 日現在.
- 4) CLSI. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. sixteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 5) ブドウ球菌キット MRSA-LA 「生研」. PMDA 独立行政法人医薬品医療機器総合機構.  
[https://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/470154\\_21200AMZ00443000\\_A\\_02\\_02.pdf](https://www.info.pmda.go.jp/downfiles/ivd/PDF/470154_21200AMZ00443000_A_02_02.pdf) 2025 年 8 月 10 日現在.
- 6) Argudín, M.A., S. Roisin, L. Nienhaus, et al. 2018. Genetic diversity among *Staphylococcus aureus* isolates showing oxacillin and/or cefoxitin resistance not linked to the presence of *mec* genes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 62: e00091-18.
- 7) Ba, X., E.M. Harrison, G.F. Edwards, et al. 2014. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on

- susceptibility testing, but lack the *mec* gene. J. Antimicrob. Chemother. 69: 594-597.
- 8) Nadarajah, J., M.J.S. Lee, L. Louie, et al. 2006. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. J. Med. Microbiol. 55: 1675-1683.
  - 9) Banerjee, R., M. Gretes, C. Harlem, et al. 2010. A *mecA*-negative strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high-level  $\beta$ -lactam resistance contains mutations in three genes. Antimicrob. Agents. Chemother. 54: 4900-4902.
  - 10) Ba, X., L. Kalmar, N.F. Hadjirin, et al. 2019. Truncation of GdpP mediates  $\beta$ -lactam resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 74: 1182-1191.
  - 11) Hryniewicz, M.M., K. Garbacz. 2017. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA)- a more common problem than expected?. J. Med. Microbiol. 66: 1367-1373.
  - 12) Balslev, U., A. Bremmelgaard, E. Svejgaard, et al. 2005. An outbreak of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) in a dermatological unit. Microb. Drug Resist. 11: 78-81.
  - 13) Buffart, B., P. Clevenbergh, A. Stiuliuc, et al. 2025. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) bacteremia-Case report. Antibiotics 14: 809.
  - 14) Sasaki, H., H. Ishikawa, T. Itoh, et al. 2021. Penicillin-binding proteins and associated protein mutations confer oxacillin/cefoxitin tolerance in borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microb. Drug Resist. 27: 590-595.
  - 15) Rybak, M.J., C. Vidailac, H.S. Sader, et al. 2013. Evaluation of vancomycin susceptibility testing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of Etest and three automated testing methods. J. Clin. Microbiol. 51: 2077-2081.
  - 16) 宮原悠太, 敷地恭子, 古谷裕美, 他. 2014. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の VCM MIC 測定における細菌懸濁液調整手法の重要性. 医学検査 63: 59-64.
  - 17) Wang, G., J.F. Hindler, K.W. Ward, et al. 2006. Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. J. Clin. Microbiol. 44: 3883-3886.
  - 18) Edwards, B., K. Milne, T. Lawes, et al. 2012. Is vancomycin MIC "creep" method dependent? analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility trends in blood isolates from North East Scotland from 2006 to 2010. J. Clin. Microbiol. 50: 318-325.
  - 19) Ludwig, F., B. Edwards, T. Lawes, et al. 2012. Effects of storage on vancomycin and daptomycin MIC in susceptible blood isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 50: 3383-3387.
  - 20) Gargis, A.S., B.B. Yoo, D.R. Lonsway, et al. 2020. Difficult-to-detect *Staphylococcus aureus*: *mecA*-positive isolates associated with oxacillin and cefoxitin false-susceptible results. J. Clin. Microbiol. 58: e02038-19.
  - 21) 鈴木 裕, 茜谷大輔, 山口優花, 他. 2023. オキサシリン感性 *mecA* 陽性黄色ブドウ球菌による菌血症の 1 例. 日臨微誌 33: 64-68.

## Discrepancies between *mec* gene presence and antimicrobial susceptibility testing in MRSA: insights from direct inoculation on screening media

Tatsuki Mura<sup>1)</sup>, Miyako Aso<sup>1)</sup>, Kazumi Kanaya<sup>1)</sup>, Kae Kawamura<sup>1)</sup>, Masatoshi Taga<sup>2)</sup>, Yoshitsugu Inuma<sup>1) 3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, Kanazawa Medical University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Pharmacy, Kanazawa Medical University Hospital

<sup>3)</sup>Department of Infectious Diseases, Kanazawa Medical University

This study investigated the presence of the *mec* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, initially identified as MRSA, that exhibited susceptibility to either cefoxitin (CFX) or oxacillin (MIPIC). From March 2019 to December 2024, 40 isolates that showed the above sensitivity results were analyzed, with 10 found to be negative for the *mec* gene. Upon re-testing antimicrobial susceptibility, three of these 10 *mec*-negative isolates were re-confirmed as MRSA and were presumed to be borderline oxacillin-resistant *S. aureus* (BORSA). Conversely, the remaining seven isolates were re-identified as methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA), revealing a discrepancy in the results. Our findings suggest that inferring the presence or absence of the *mec* gene solely from antimicrobial susceptibility test (AST) results is challenging for MRSA strains displaying susceptibility to either MIPIC or CFX. However, direct inoculation of colonies onto MRSA screening agar effectively differentiated between *mec*-positive and *mec*-negative strains. Using the PBP2' latex test also yielded correct identification. While rare discrepancies between *mec* gene status and AST results have been reported, their epidemiology and underlying mechanisms remain unclear. Microbiology laboratories should consider integrating MRSA screening media, PBP2a detection latex agglutination tests, and genetic testing, in addition to conventional ASTs, and define appropriate conditions for their application.