

病原体検出マニュアル
「バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌」

(初版)

令和6年3月

目次

1. 感染症法上の定義.....	3
2. VRSA の概要とバンコマイシン耐性機構.....	4
3. 検査法.....	5
【参考文献】.....	10
主な改訂履歴.....	12

1. 感染症法上の定義

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」において、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（VRSA, vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*）感染症は、獲得型バンコマイシン耐性遺伝子を保有し、バンコマイシン耐性を示す黄色ブドウ球菌による感染症と定義される。VRSA 感染症は五類感染症に属し、全数把握疾患に位置付けられている。感染症法に基づく、VRSA 感染症の臨床的特徴、届出基準及び検査所見は以下のように定められている¹⁾。

【臨床的特徴】

バンコマイシンの長期間投与を受けた患者の検体などから検出される可能性がある。

【届出基準】

ア. 患者（確定例）

医師は、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 VRSA 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、VRSA 感染症患者と診断した場合には、法第 12 条第 1 項の規定による届出を 7 日以内に行わなければならない。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

医師は、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、VRSA 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、VRSA 感染症により死亡したと判断した場合には、法第 12 条第 1 項の規定による届出を 7 日以内に行わなければならない。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、分離菌に対するバンコマイシンの MIC 値が 16 µg/mL 以上	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、分離菌に対するバンコマイシンの MIC 値が 16 µg/mL 以上、かつ、分離菌が感染症の起因菌であるとの判定。	喀痰、膿、尿、その他の通常無菌的ではない検体

2. VRSA の概要とバンコマイシン耐性機構

VRSA は、バンコマイシンの MIC 値が 16 µg/mL 以上を示し、バンコマイシン耐性遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌である。VRSA は 2002 年に米国で最初に検出され、2021 年までに米国内で 16 例が報告された²⁾。米国以外では、インド、イラン、パキスタン、ポルトガル、ブラジルといった世界各国での分離が報告されている³⁾。日本国内ではこれまでに VRSA が分離された報告はない。

黄色ブドウ球菌がバンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin-resistant enterococci ; VRE)由来の *vanA* プラスミドを獲得することで、VRSA が出現したと考えられている⁴⁾。バンコマイシン耐性遺伝子はほとんどがプラスミド性であるが、*vanA* 遺伝子を含む遺伝子群が染色体上に取り込まれた VRSA も報告されている⁵⁾。

バンコマイシンは、ペプチドグリカン/ムレイン・モノマーの末端にある D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) 部分に結合して細胞壁合成を阻害する。VRSA は、*vanA* 遺伝子を含む遺伝子群を獲得することにより、バンコマイシンに耐性化する。バンコマイシン耐性機構は、その遺伝子群内の遺伝子によってコードされる VanX が D-Ala-D-Ala を加水分解し、VanA 及び VanH によって D-Ala-D-Lac が合成され、細胞壁に D-Ala-D-Lac が取り込まれる。その結果、バンコマイシンの標的部位である D-Ala-D-Ala が D-Ala-D-Lac に置換され、バンコマイシンが標的部位に結合できなくなる⁴⁾。

バンコマイシン中間耐性黄色ブドウ球菌 (vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, VISA) はバンコマイシンの MIC 値が 4~8 µg/mL を示し、国内外でも分離されている。VISA は *vanA* 遺伝子を有しておらず、耐性機序が異なる。VISA による中間耐性の耐性機序は、黄色ブドウ球菌の細胞壁合成・調節関連遺伝子の変異及びバンコマイシ

ン長期暴露により細胞壁の肥厚が生じることで、バンコマイシンに対して中間耐性を示すと考えられている⁶⁾。

バンコマイシン感受性黄色ブドウ球菌 (vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus*, VSSA) はバンコマイシンの MIC 値が $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ を示す。VSSA 感染症例で、バンコマイシンが効かない症例が稀に報告される⁷⁾。これは、VSSA 株集団の中に 10^{-6} の頻度で VISA が存在し、バンコマイシンを投与することによって VISA が表面化すると考えられている。このような VISA は heterogeneous VISA (hVISA と略す) と呼ばれ、臨床上注意が必要である⁷⁾。

2010 年以降、VRSA、VISA 及び hVISA の分離報告件数は世界的に増加傾向である⁸⁾。2019 年までの研究において、VISA の分離報告件数は欧米よりもアジア地域の方が多く、hVISA の分離報告件数は欧米とアジア共に同程度であることが報告された⁸⁾。

また、バンコマイシンの薬剤感受性試験においては、グラム陰性菌などのコンタミネーションによって、バンコマイシン耐性と誤判定される場合がある。臨床分離株で VRSA が疑われた場合には、被検株を純培養した後に薬剤感受性試験を再検、または後述 (3.2.の項目) の PCR 検査を実施する。

3. 検査法

3.1. 薬剤感受性測定

バンコマイシンに対する薬剤感受性試験として、寒天平板希釈法、微量液体希釈法及び Etest が用いられている。ディスク拡散法は、VSSA と VISA における阻止円径の区別が困難なため、CLSI 及び米国 CDC では推奨されていない^{9), 10)}。CLSI の判定基準は下表の通りである⁹⁾。なお、自動測定機器を使用した薬剤感受性測定では、バンコマイシンの MIC 値が変動することがあるので、注意が必要である¹⁰⁾。VRSA と疑われる菌株については、後述 (3.2.の項目) の PCR 検査を実施し、バンコマイシン耐性遺伝子の有無を判定する必要がある。バンコマイシンの MIC 値が $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ の株は、国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター等に送り、詳細な解析を依頼する。

バンコマイシン感受性試験結果の判定基準 ⁹⁾		
感性 (VSSA)	中間耐性 (VISA)	耐性 (VRSA)
$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	4~8 $\mu\text{g/mL}$	$\geq 16 \mu\text{g/mL}$

3. 1. 1. 寒天平板希釈法^{9), 11), 12)}

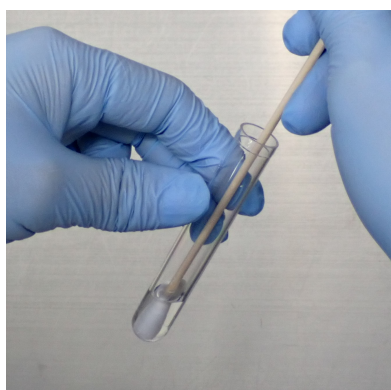
薬剤感受性試験の判定基準値が含まれる濃度（1, 2, 4, 8, 16, 32 µg/mL など）を含有するミュラーヒントン寒天培地（MHA）を作製する。菌液は、18～24 時間¹²⁾培養した寒天培地上の被検菌を滅菌生理食塩水または滅菌液体培地で McFarland 0.5 の濁度（約 1×10^8 CFU/mL）になるように懸濁する。白金耳、ピペットまたは菌液接種機器を用いて、1 スポット（直径 5 mm から 8 mm）あたり 10^4 CFU になるように調製した菌液を寒天表面に接種する。菌液接種機器を使用する場合、メーカーに使用する金属製ピンの直径と接種量を確認することが必要である。金属製ピンの直径 3 mm を使用する場合には、調製した菌液を滅菌生理食塩水または滅菌液体培地で 1:10 に希釈し、希釈した菌液 2 µL を寒天平板の表面に接種する。金属製ピンの直径 1 mm を使用する場合には、調製した菌液（濁度: McFarland 0.5）を希釈せずに使用し、菌液 0.1～0.2 µL を寒天平板の表面に接種する。最初に発育コントロールとして、抗菌薬無添加の MHA に菌液を接種し、次に低濃度の平板から順に菌を接種する。最後に、コンタミネーション及び菌液接種中における抗菌薬のキャリーオーバーがないか確認するために、2 枚目の発育コントロールとして、抗菌薬無添加の MHA に菌液を接種する。寒天培地に接種した菌液が乾くまで室温で静置する。好氣的条件下で $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した後に判定する。

3. 1. 2. 微量液体希釈法^{9), 12)}

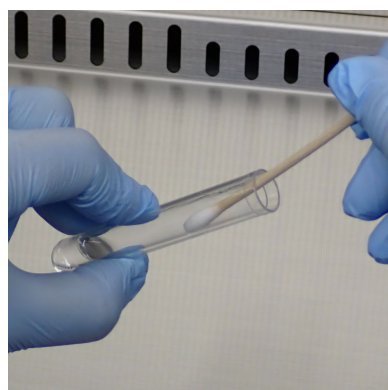
微量液体希釈法で MIC を測定する場合、陽イオン調整ミュラーヒントン液体培地（CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth）が使用される。バンコマイシンの濃度は 2 倍連続希釈系列で調整する。菌液は、18～24 時間¹²⁾培養した寒天培地上の被検菌を滅菌生理食塩水で McFarland 0.5 の濁度（約 1×10^8 CFU/mL）になるように懸濁する。調製した菌液（濁度: McFarland 0.5）を滅菌生理食塩水や液体培地でさらに希釈し、菌液の最終濃度が 5×10^5 CFU/mL、または 5×10^4 CFU/well（単位に注意）になるように接種用菌液を調製する。例えば、1 ウェルに液体培地 100 µL と接種用菌液 10 µL を加える場合、接種用菌液は予め調製した菌液（濁度: McFarland 0.5）を滅菌生理食塩水や液体培地で 1:20 に希釈する。接種用菌液は 15 分以内に使用する。好氣的条件下で $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した後に判定する。

3. 1. 3. Etest

Etest は、Etest ストリップの製造元の手順書に準じて薬剤感受性測定を行い、CLSI の判定基準に従って判定を行う。菌液は、18~24 時間¹²⁾培養した寒天培地上の被検菌を滅菌生理食塩水または滅菌液体培地で McFarland 0.5 の濁度になるように懸濁する。調製した菌液に滅菌綿棒を浸し（図 1 A 参照）、試験管の内壁に押し付けて余分な菌液を除く（図 1 B 参照）。ミュラーヒントン寒天培地（MHA）表面全体にシャーレを 60 度ずつ回転させて、3 方向から隙間を開けずに塗布する（図 2 参照^{13)図改変}）。Etest ストリップを MHA 上に配置し、好氣的条件下で $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した後、阻止帯がストリップと交差する位置を判読する（図 3 参照）。



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. Etest 余分な菌液の除き方

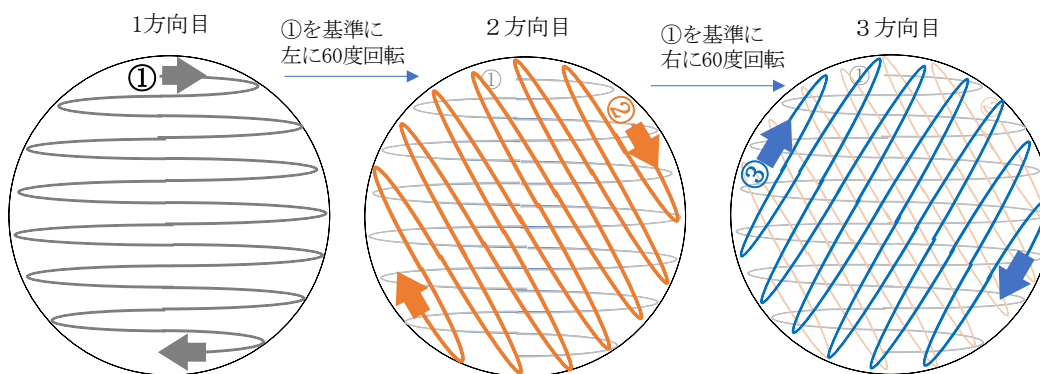


図 2. Etest 菌液の塗布方法^{13)図改変}

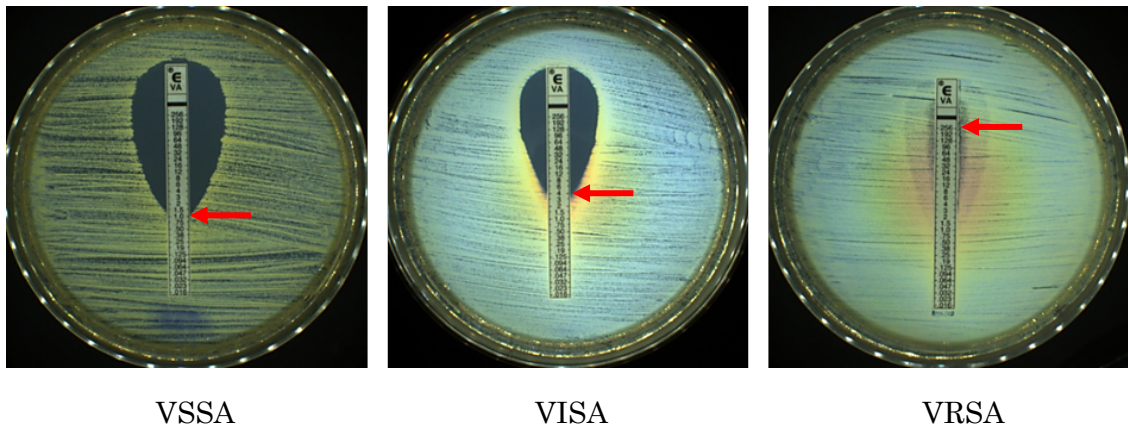


図 3. Etest の結果

Etest の結果は、矢印(赤色)の位置でストリップの数値を判読する。図 3 で使用した VSSA 株の MIC 値は $1 \mu\text{g/mL}$ 、VISA 株の MIC 値は $4 \mu\text{g/mL}$ 、VRSA 株の MIC 値は $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ 。

3. 1. 4. 寒天平板法による VRSA スクリーニング検査^{9), 12)}

バンコマイシン $6 \mu\text{g/mL}$ 含有のブレインハートインフュージョン (BHI) 寒天培地を作製する。菌液は、18~24 時間¹²⁾培養した寒天培地上の被検菌を滅菌生理食塩水または滅菌液体培地で McFarland 0.5 の濁度になるように懸濁し、BHI 寒天平板に $10 \mu\text{L}$ をスポットする。好氣的条件下で $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した後、透過光で判定する。1 個以上のコロニーまたは薄い膜状の発育がある場合、バンコマイシン低感受性菌株が疑われるため、PCR 法にて *vanA* 遺伝子の有無を判定する。

3. 2. バンコマイシン耐性遺伝子の検出

Multiplex PCR 法にてバンコマイシン耐性遺伝子の保有の有無を検査することができる。PCR 法に用いる DNA テンプレートの調製方法は、滅菌蒸留水に McFarland 0.5 の濁度になるよう被検菌を懸濁し、 100°C で 10 分間加熱処理することにより DNA を溶出する。DNA の溶出量が少ない場合、リゾスタフィン (最終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$)¹⁴⁾ を含む滅菌蒸留水 $100 \mu\text{L}$ に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し、 37°C で 30 分から 1 時間インキュベートした後、 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については、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。バンコマイシン耐性遺伝子を検出するためのプライマー配列と

PCR 条件を下記に示す¹⁵⁾。*vanA* 遺伝子以外のバンコマイシン耐性遺伝子を検出する場合には、参考文献 15 を参照する。

Gene	Primer	Oligonucleotides sequence (5'-3')	Product (bp)
<i>vanA</i>	vanA_F1	GCAAGTCAGGTGAAGATGGA	721 ¹⁵⁾
	vanA_R1	GCTAATACGATCAAGCGGTC	
<i>nuc</i> ^{**}	nuc_F	CTAAGTAGCTCAGCAAATGCATC	405 ^{16)改変}
	nuc_R	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	

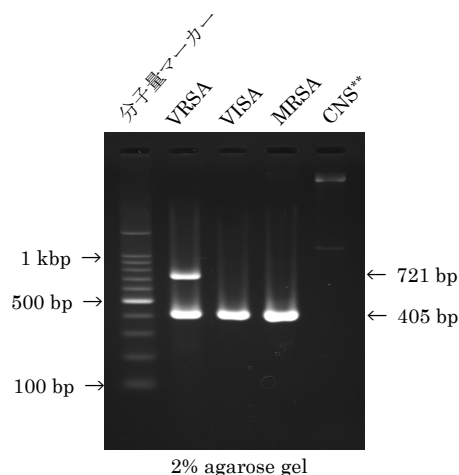
* *nuc* (nuclease) 遺伝子は黄色ブドウ球菌の陽性コントロールとして使用

PCR 条件

94 °C for 2 min	} 30 cycles
94 °C for 1 min	
64 °C for 1 min	
72°C* for 1 min	
72°C* for 7 min	

*使用する taq によっては 68°C

**CNS (Coagulase-negative *Staphylococcus*)



【参考】hVISA の検出法^{6), 7)}

ポピュレーション解析を用いた hVISA の検出法について紹介する。hVISA は PCR 検査では鑑別できないので、ポピュレーション解析を行う。菌液は、18~24 時間¹²⁾培養した BHI 寒天培地上の被検菌を滅菌生理食塩水または滅菌液体培地で McFarland 0.5 の濁度 (約 1×10^8 CFU/mL) になるように懸濁する。さらに、液体培地または生理食塩液で 10 倍希釈系列の菌液を調製する。バンコマイシン含有 BHI 寒天培地にそれぞれ 100 μ L 塗布し、好氣的条件下で 37°C、48 時間培養した後、コロニー数を記録する。バンコマイシンの薬剤濃度は 0 から 10 μ g/mL で 1 μ g/mL 毎に測定する。陽性対照株には Mu3 株⁷⁾を使用する。x 軸に薬剤濃度、y 軸に CFU/mL として、グラフに各濃度の CFU をスポットする。GraphPad Prism 等のソフトウェアを使用し、グラフの an area under the curve (AUC) を算出する。被検菌の AUC を Mu3 株の AUC で割った比率が ≥ 0.9 であれば、hVISA と判定する。Mu3 株は、国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 薬剤耐性菌バンクで分与可能である¹⁷⁾。

【参考文献】

1. 厚生労働省ホームページ。感染症法に基づく医師の届出のお願い。19 バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症。 <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekakukansenshou11/01-05-13-01.html>
2. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC)ホームページ。CDC Reminds Clinical Laboratories and Healthcare Infection Preventionists of their Role in the Search and Containment of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA). 2022. https://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/vrsa_lab_search_containment.html
3. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res.* 21:169-176. 2019.
4. Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:4580-4587. 2009.
5. Haas W, Singh N, Lainhart W, Mingle L, Nazarian E, Mitchell K, Nattanmai G, Kohlerschmidt D, Dickinson MC, Kacica M, Dumas N, Musser KA. Genomic Analysis of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the 3rd Case Identified in the United States Reveals Chromosomal Integration of the *vanA* Locus. *Microbiol Spectr.* 11:e0431722. 2023.
6. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 23:99-139. 2010.
7. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* 350:1670-1673. 1997.
8. Shariati A, Dadashi M, Moghadam MT, van Belkum A, Yaslianifard S, Darban-Sarokhalil D. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 10:12689. 2020.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 33rd. CLSI supplement M100. 2023.
10. Walters M, Lonsway D, Rasheed K, Albrecht, V, McAllister, S, Limbago B, Kallen A. Investigation and Control of Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: A

Guide for Health Departments and Infection Control Personnel. Atlanta, GA. 2015. Available at: https://www.cdc.gov/hai/pdfs/vrsa-investigation-guide-05_12_2015.pdf

11. 永山在明、山口恵三、渡邊邦友、田中正利、小林寅喆、永沢善三. 抗菌薬感受性測定法検討委員会最終報告（2007年）. 日本化学療法学会雑誌. 56:49-57. 2008.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; M07, 11th Edition. 2018.
13. 国立感染症研究所ホームページ。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
14. 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.
15. Nomura T, Hashimoto Y, Kurushima J, et al. New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. J Microbiol Methods. 145:69-72. 2018.
16. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, 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.
17. 薬剤耐性菌バンクホームページ。 <https://jarbb.jp/>

【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 岩尾泰久、沓野祥子、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
初版 (R6年3月)	マニュアル作成	新規作成