

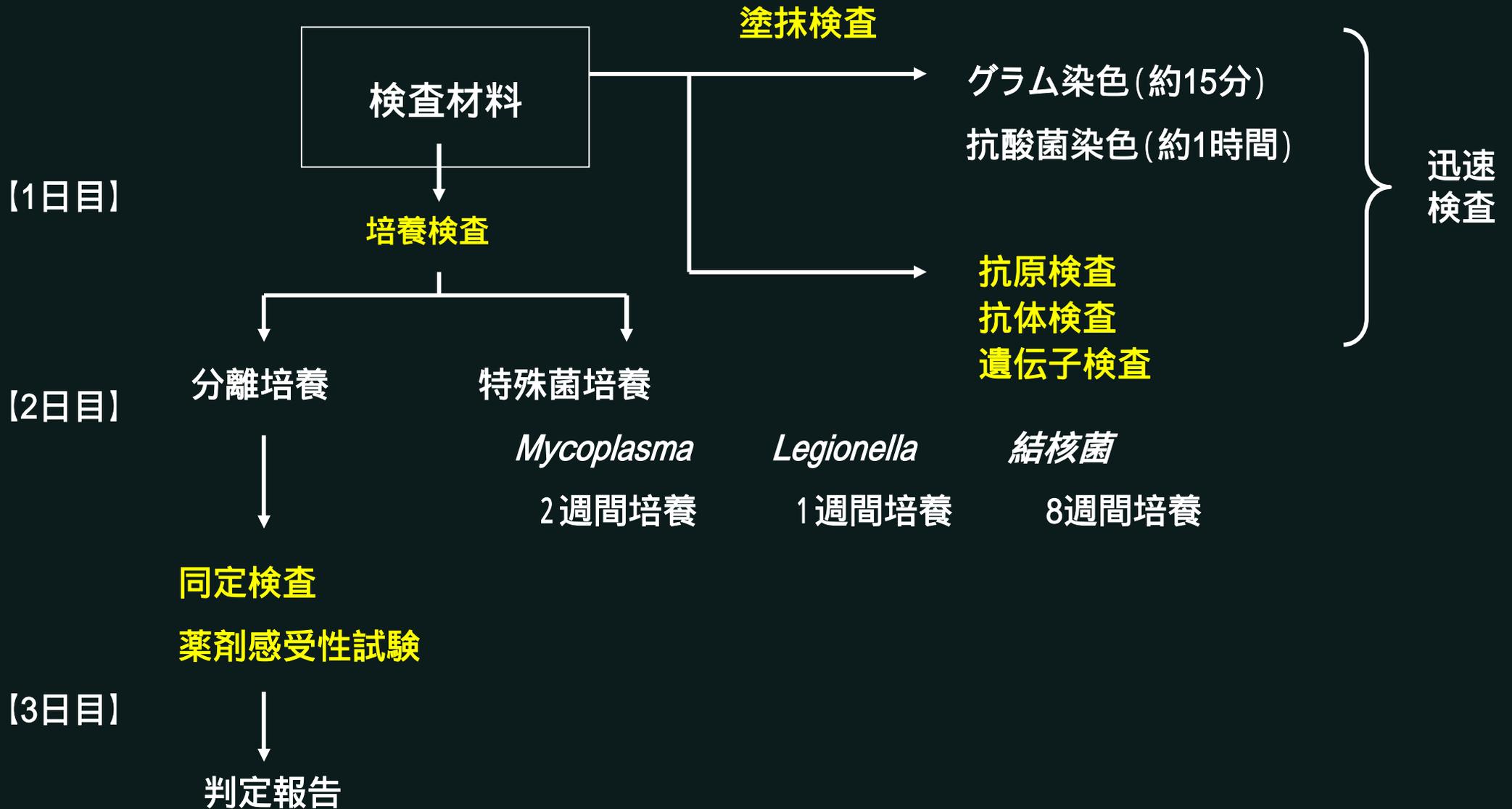
グラム染色の見方と考え方

2011年9月4日

本日の内容

1. グラム染色の原理
2. 染色の注意点
3. グラム染色の問題と解答

細菌検査のフローチャート



塗抹検査の有用性

利点

- ・培養検査に比較して短時間で結果が得られる。
- ・起因菌のおおまかな推測ができる。 抗菌薬の選択可能
- ・特別な機器を必要としない。(試薬と顕微鏡)
- ・同定検査に比較して低コスト。

欠点

- ・菌数が少ないと検出できない(10^5 以上必要)。
- ・難染色性の菌種がある。
- ・成績にばらつきがある

グラム染色とは

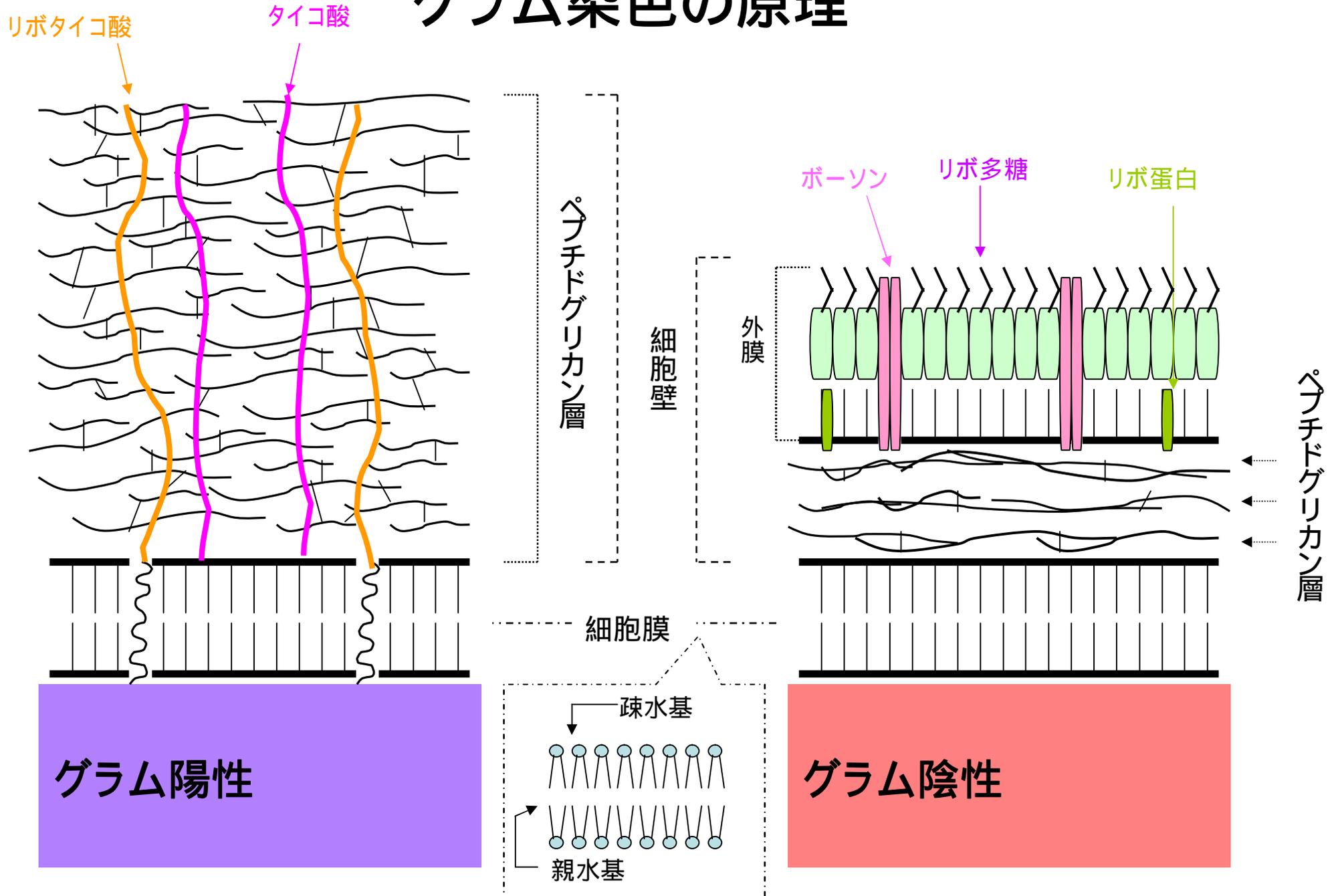
主として細菌類を色素によって染色する方法の一つで、細菌を分類する基準の一つ。

1884年にデンマークの細菌学者

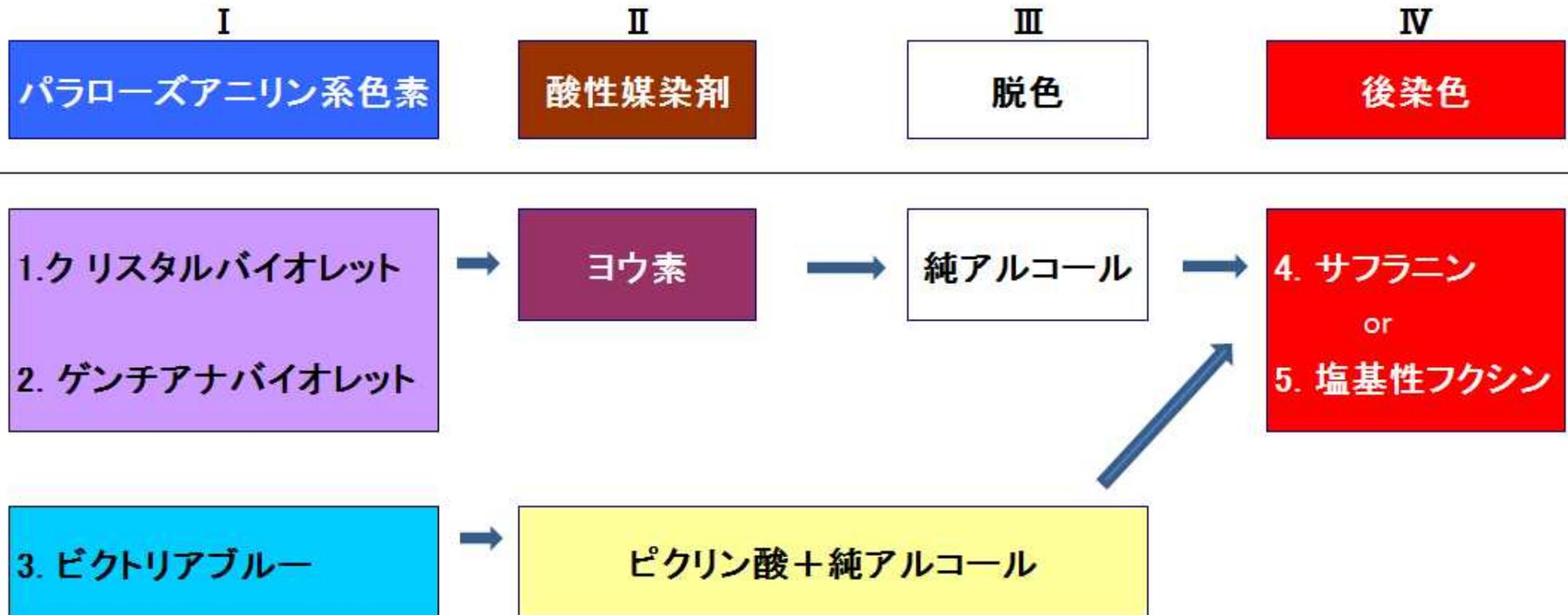
Hans Christian Joachim Gram (1853 -1938)によって

考案された。以来多くの研究者により改良法が報告されている。

グラム染色の原理

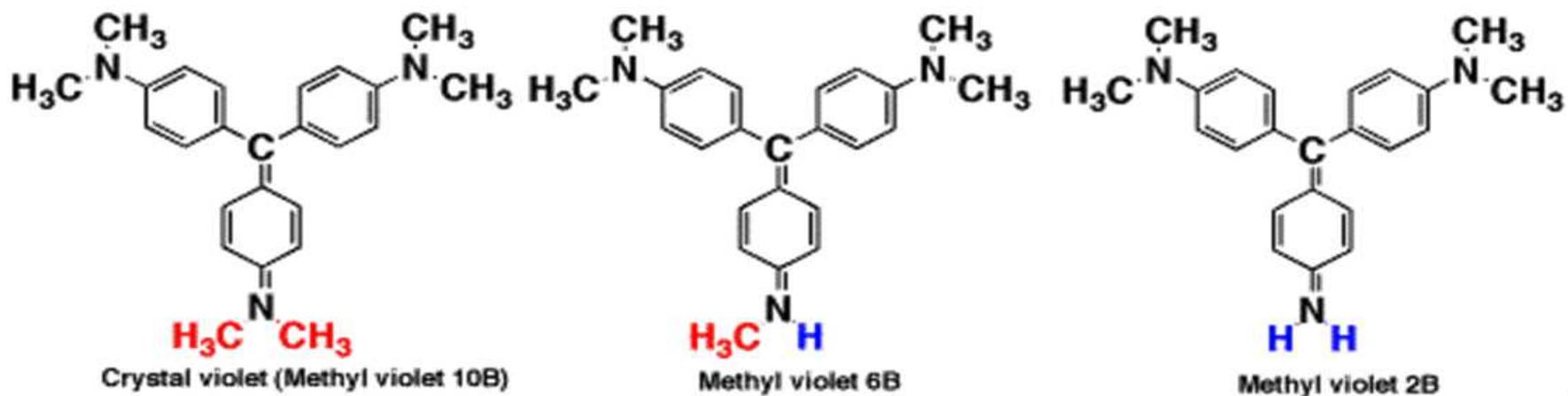


グラム染色の流れ



ビクトリアブルー法は、
媒染と脱色を同時に行っている

ゲンチアナ紫 (Gentian Violet)



3つある窒素にメチル基が合計6個

5個

4個

試薬調整

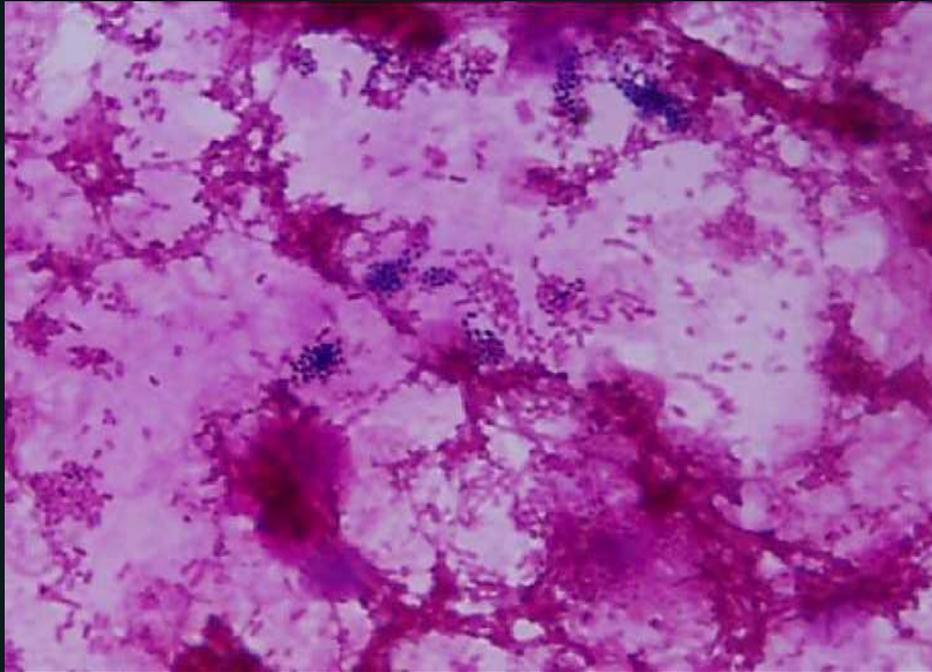
	Hucker変法	Bartholomew & Mittwer変法	西岡法
前染色液	クリスタルバイオレット・シュウ酸アンモニウム液 A液40ml+B液160ml (ろ過して使用する。混和後すぐは染色性が悪いため24時間置いて使用する。)	1%クリスタルバイオレット溶液をスライドガラスに満載したのち5%炭酸水素ナトリウムを数滴滴下(染色時に炭酸水素ナトリウムを添加する)	ピクトリアブル-B使用液: A液とB液を混合
	・A液: クリスタルバイオレット保存液 クリスタルバイオレット40g +95%エチルアルコール400ml (室温で1年間有効)	A液: 1%クリスタルバイオレット溶液 クリスタルバイオレット10g +蒸留水1000ml (ガラス瓶に入れ、室温で1年間有効)	A液: ピクトリアブル - B ピクトリアブル - B 0.2g 純エチルアルコール20ml
	・B液: 1%シュウ酸アンモニウム液 シュウ酸アンモニウム16g 蒸留水1600ml (褐色瓶に入れ、室温で1年間有効)	B液: 5%炭酸水素ナトリウム	B液: 1%シュウ酸アンモニウム液 シュウ酸アンモニウム0.8g 蒸留水80ml
媒染剤	C液60ml+D液60ml+蒸留水220ml (褐色瓶に入れ保存、室温で6ヶ月有効)	・ヨウ素2g 1N-NaOH10ml 蒸留水100ml (褐色瓶に入れ、室温で6ヶ月有効)。	・媒染・脱色液 ピクリン酸2g 純エタノール100ml
	・C液: ヨウ素1g ヨウ化カリウム2g 蒸留水300mL (褐色瓶に入れ、室温で6ヶ月有効)		
	・D液: 5%炭酸水素ナトリウム 炭酸水素ナトリウム50g 蒸留水1000ml		
脱色液	95%エタノールまたは 95%エタノールとアセトン混合液(1:1)	95%エタノールとアセトン混合液(1:1) 95%エタノールでもよい	
後染色	サフラニン使用液: E液20ml+蒸留水180ml サフラニンが推奨、bやcを使い分けしてもよい	左記参照	左記参照
	・E液: サフラニン保存液 サフラニン O 5.0g 95%エチルアルコール200ml (ガラス瓶に入れ、室温で1年間有効)		
	b. 塩基性フクシンの0.1~0.2%水溶液 c. パイフェル液 石炭酸フクシン液を5~10倍希釈		
市販キット	・グラム染色キット(BBL) ・カラーグラム2キット(シスメックス・ピオメリー)	・バーミM(武藤化学) ・neo-B&Mワコー(和光純薬)	・フェイバーGセット(日水製薬) ・グラムカラー(武藤化学)

各種グラム染色の方法

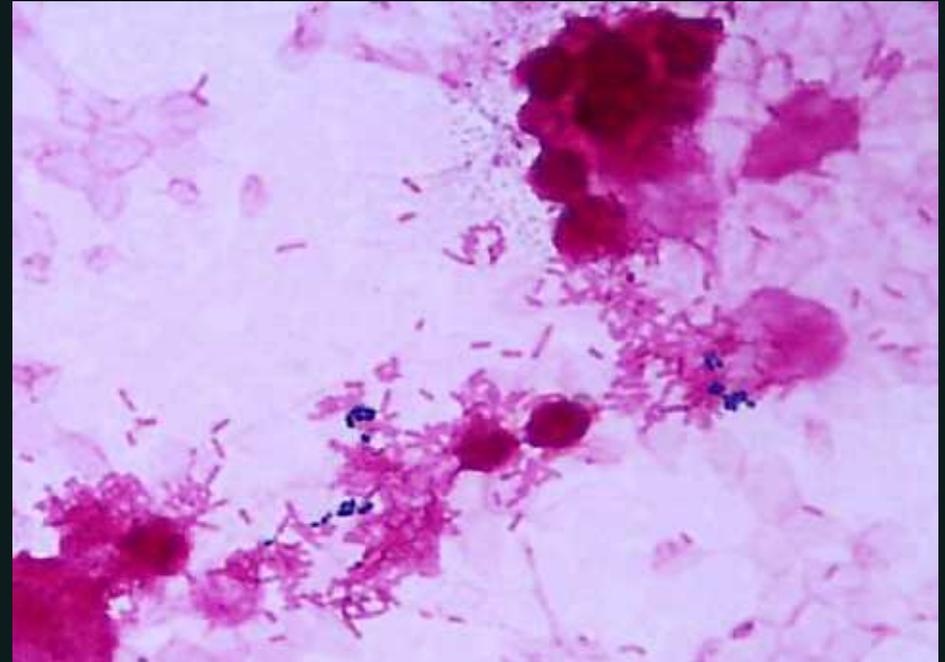
	Hucker変法	Bartholomew & Mittwer変法	neo Bartholomew & Mittwer変法	西岡法 (フェイバーGセット)
前染色	クリスタルバイオレット・シュウ酸アンモニウム液をスライドガラスに満載する	クリスタルバイオレットをスライドガラスに満載し炭酸水素ナトリウムを数滴滴下する	クリスタルバイオレットをスライドガラスに満載	ピクトリアブルーB液をスライドガラスに満載する
	(1分)	(30秒)	(30秒)	(1分)
媒染	水洗	水洗	水洗	水洗
	ヨウ素・ヨウ化カリウム スライドガラスに満載して(1分)	ヨウ素・水酸化ナトリウム スライドガラスに満載して(30秒)	ヨウ素・水酸化ナトリウム スライドガラスに満載して(30秒)	20%ピクリン酸エタノール 青が流れなくなるまで
	水洗	水洗	水洗	水洗
脱色	95%エタノール 青が流れなくなるまで	アセトン・エタノール 青が流れなくなるまで、数秒 (アセトンが入ると脱色時間が速くなる)	アセトン・エタノール 青が流れなくなるまで、数秒 (アセトンが入ると脱色時間が速くなる)	標本の塗抹部分にピクリン酸の黄色味が残らないよう水洗する。 ↓
	水洗	水洗	水洗	
	サフラニン使用液 または0.1~0.2%塩基性フクシン水溶液 またはパيفェル液 スライドガラスに満載して(30秒~1分)	サフラニン使用液 または0.1~0.2%塩基性フクシン水溶液 またはパيفェル液 スライドガラスに満載して(30秒~1分)	サフラニン使用液 または0.1~0.2%塩基性フクシン水溶液 またはパيفェル液 スライドガラスに満載して(30秒~1分)	
後染色	少し長めに染色するのがコツ。 グラム陰性菌の染まりが悪いため。	少し長めに染色するのがコツ。 グラム陰性菌の染まりが悪いため。	少し長めに染色するのがコツ。 グラム陰性菌の染まりが悪いため。	少し長めに染色するのがコツ。 グラム陰性菌の染まりが悪いため。
	水洗	水洗	水洗	水洗
	乾燥・鏡検	乾燥・鏡検	乾燥・鏡検	乾燥・鏡検
特徴	現在のグラム染色の標準的 方法 染色手技が難しい	Hucker変法に比較し染色性が良好 前染色時に炭酸水素ナトリウム の添加が必要。neo-B&Mワコー では改善され省略された	脱色が強力で早い。脱色過多にならないよう注意。 グラム陽性球菌と見間違える顆粒が乗ることがある。	媒染と分別が同時にされるためステップ数 が他より少ない 厚めの標本や蛋白濃度が高いと顆粒が析出 しやすくなる

標本の作製の注意

標本の厚い部分



標本の薄い部分



の厚い標本では、透過性が悪く菌が不鮮明で識別しづらいため
薄い標本を作製するか、薄い部分で判定したほうがよい。

膿尿 : *Enterococcus faecalis* と *Escherichia coli*

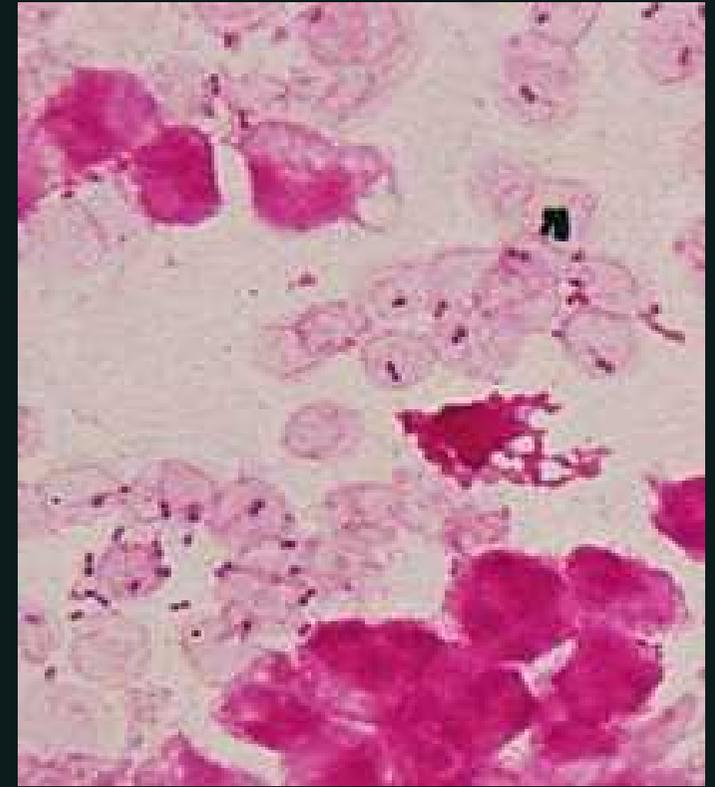
標本の退色と菌体の破壊



血液
Bacillus cereus



血液
A群溶連菌



喀痰
Streptococcus pneumoniae
(PSSP)

固定

固定方法によって、菌体の変形、破壊、収縮、膨張、などが起こる。

火炎固定

最も一般的なグラム染色の固定。

塗抹面を上にして、ガスバーナーの炎の中をゆっくり3回通過させる。

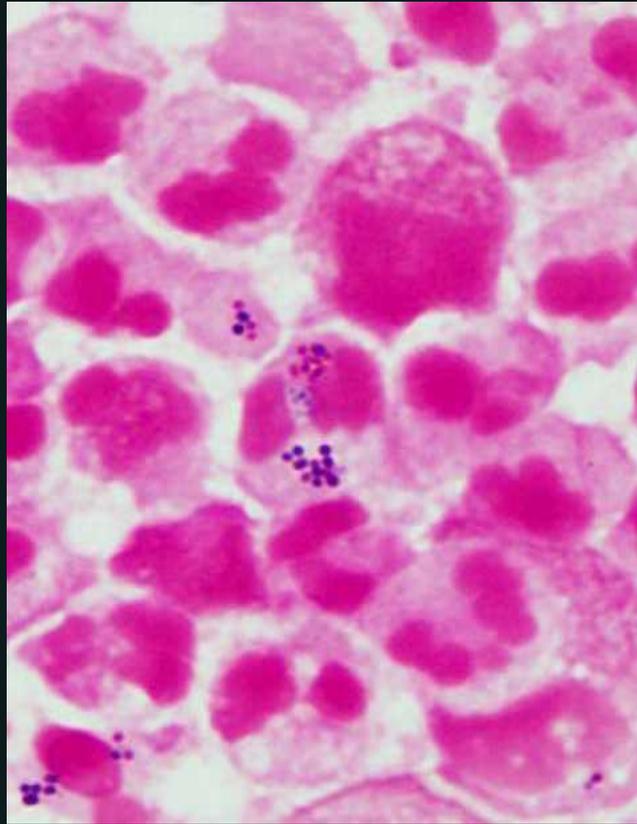
固定中に湯気や煙が標本より発生した場合は染色に使用してはならない。

メタノール固定

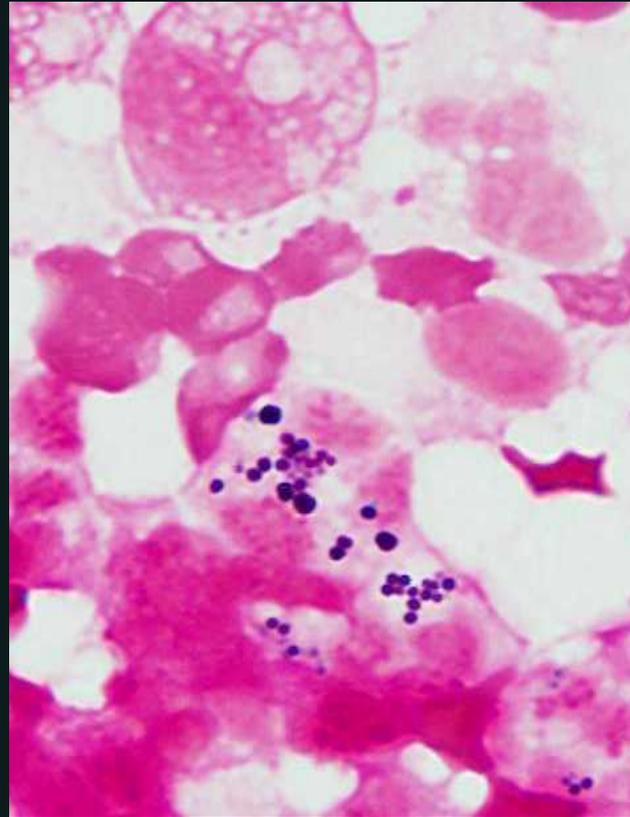
グラム染色の化学的固定として最も推奨

メタノール中に1～2分浸し、完全に乾燥させてから染色する。好中球の核など、細胞の内部構造が観察しやすい。

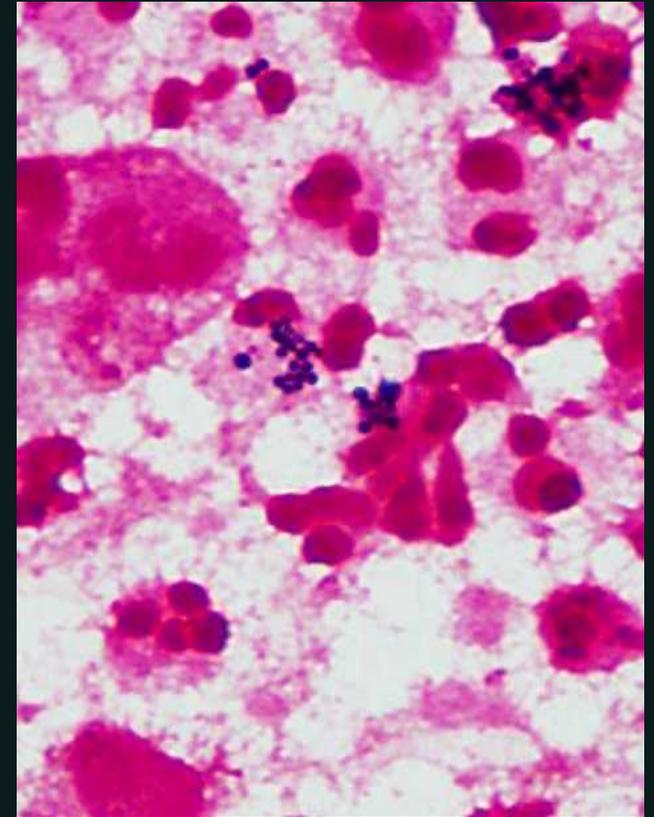
固定による影響



火炎固定



メタノール固定
1分



ホルマリン固定
1分

関節液 : Staphylococcus aureus(MSSA)

固定による影響

		火炎固定	ホルマリン	メタノール
背景	フェイバー	バーミに比較して厚い標本で顆粒が析出し易い。	厚い標本でも顆粒が析出しにくい(染色時脱色が火炎固定に比較して容易)。背景がきれいで見やすい。	火炎固定より、顆粒が析出しやすい。背景も検体によって汚い。
	バーミ	厚い標本で顆粒が析出。	厚い標本でも顆粒が析出しにくい(染色時脱色が火炎固定に比較して容易)。背景がきれいで見やすい。	火炎固定より、顆粒が析出しやすい。背景も検体によって汚い。
好中球	フェイバー	細胞質辺縁明瞭、核は赤でコントラストは固定標本に比較しやや不良、核が青く染まる傾向有り。	細胞質辺縁の破壊、核が濃縮し濃染。バーミより強い傾向。	細胞質辺縁明瞭、核は赤でコントラストも良好。
	バーミ	細胞質辺縁明瞭、核は赤でコントラストは固定標本に比較しやや不良	細胞質辺縁の破壊、核は濃染傾向。	細胞質辺縁明瞭、核は赤でコントラストも良好。

脱色の注意

- 95%エタノール

(原法)

- n-プロピルアルコールの使用を推奨している

(Bartholomewらは)

- アセトン:アルコールの 3:7 比率を推薦

(ASM: American Society for Microbiology)

脱色剤の違いは、脱色速度が異なり、エタノールとn-プロピルアルコールは比較的ゆっくり脱色され、アセトン・アルコールが速く脱色される。

ここが
ポイント

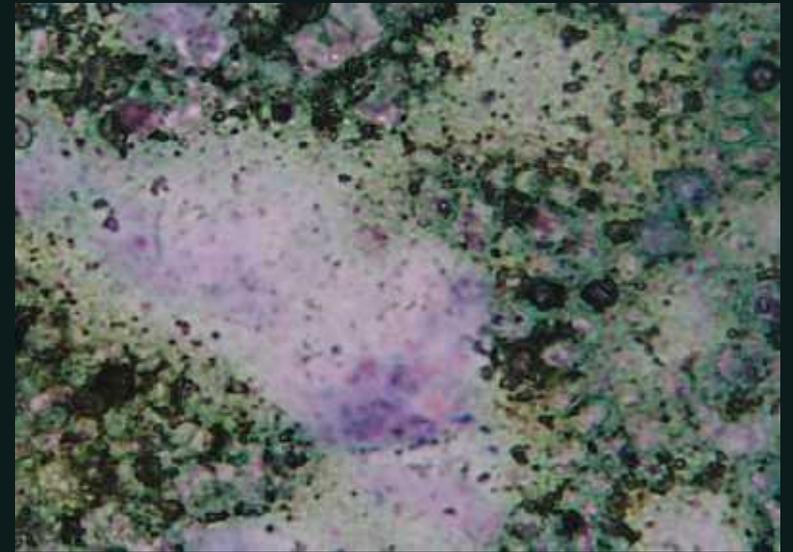
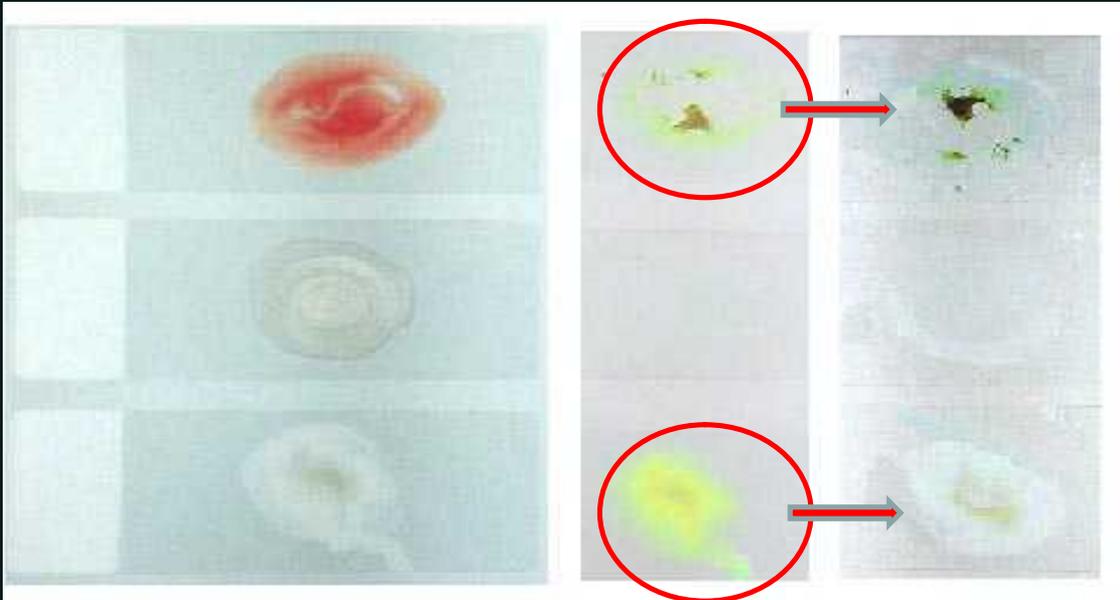
脱色後の水洗時の注意点

元の標本

ピクリン酸アルコール
による脱色水洗後

確実に
黄色味を落とす

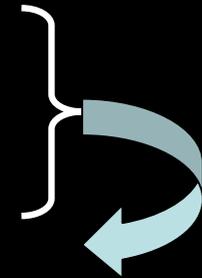
ピクリン酸が標本に残った状態で
後染色した標本の観察



西岡法では、血液成分や蛋白成分が多い検体を厚く塗抹するとピクリン酸アルコールで脱色した後の水洗でピクリン酸が残りやすくなり、顆粒析出の原因となる。ピクリン酸が標本に残ると のように顆粒が析出し、判定が困難になることがある。黄色を完全に洗い落とすことがポイントである。

後染色の注意

- ビスマルクブラウン(原法)
- サフラニン(グラム陰性桿菌や嫌気性菌の染色不良)
- 0.1%-0.2%フクシンの溶液
- 塩基性フクシン(0.8%)と石炭酸フクシン



より強烈に着色するが、背景も同様に濃く着色する傾向がある

その他注意事項

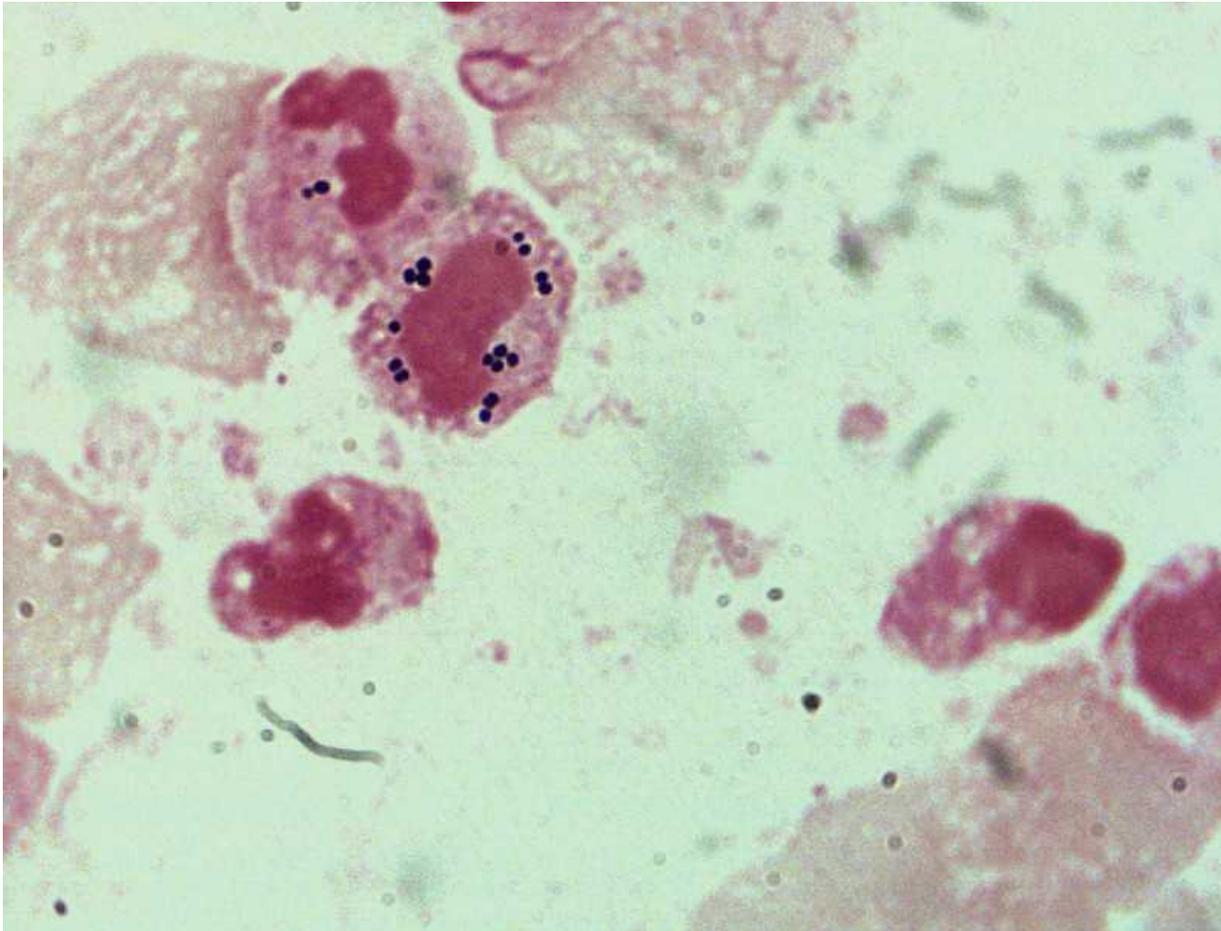
- *Mycoplasma spp.*、*Chlamydia spp.*、*Rickettsia spp.*などいくつかの微生物は、グラム染色では提示できない。
- 一般的に十分に染色されない微生物として *Campylobacter spp.*、*Legionella spp.*、*Bacteroides spp.*、*Fusobacterium spp.*、*Brucella spp.*などがある。
- 抗酸菌は一般的には染色されない。
- 48時間以上古い培養からとられる微生物や保管されていた検体では、細胞壁損害などにより、グラム不定に染色される場合がある(特に肺炎球菌)。
- 検体採取前の患者に抗生剤投与歴があると、細菌の細胞壁に損害を与えグラム不定に染色される。

テスト

- * 制限時間は1スライド、1分です。
普段、臨床医に報告している内容で推定菌種や推定感染症を記入してください。

問題1) 67歳 男性 関節腔内ドレナージのグラム染色

2型糖尿病、アレルギー性肺アスペルギルス症の診断で加療中、3日前より38.5 の発熱と右肩痛出現し、解熱剤内服し様子を見ていたが疼痛継続し挙上できず。関節腔内ドレナージを施行。



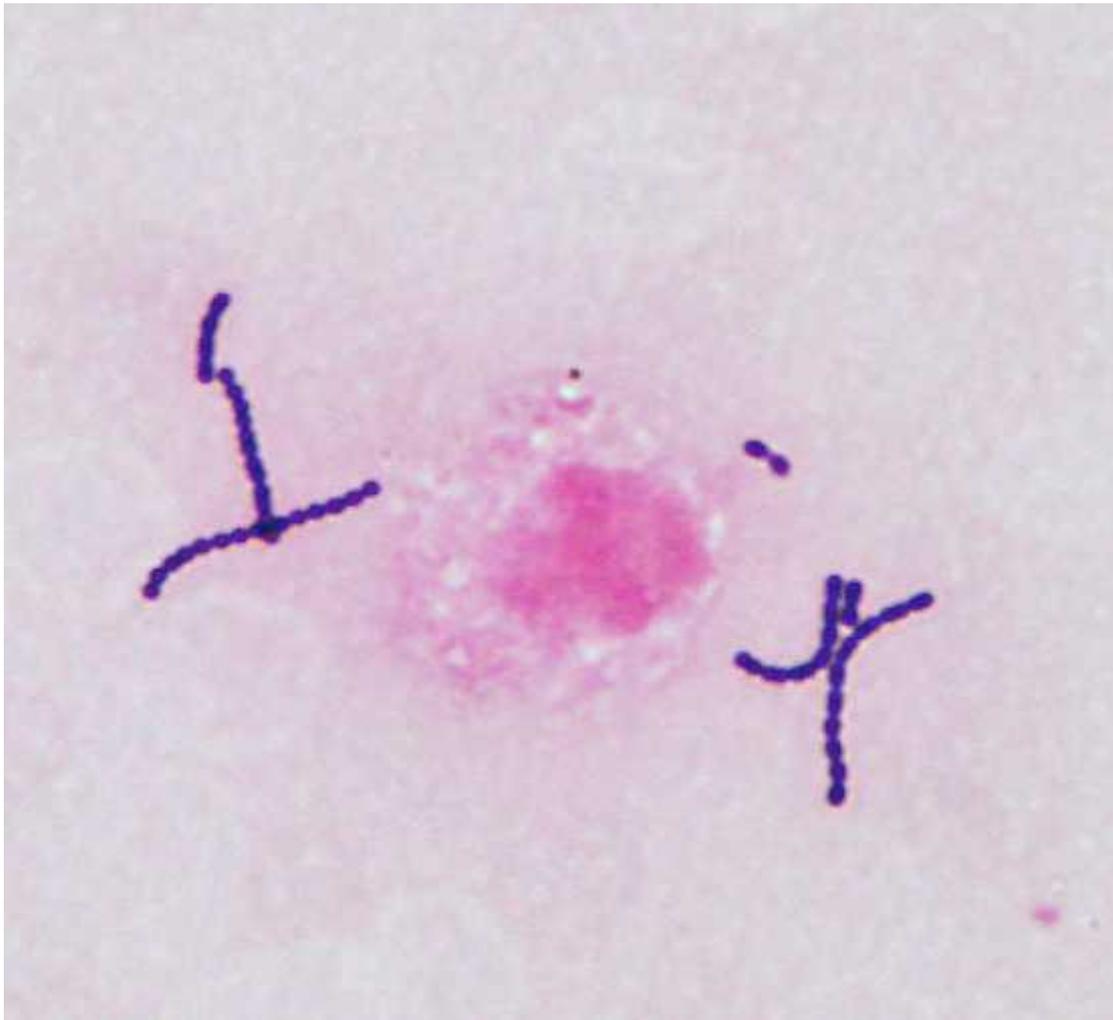
推定菌種は？

WBC 1500 / μ l

CRP 28.3 mg/dl

問題2) 64歳 男性 血液のグラム染色

4/15会社寮で倒れているのを同僚が見つけて緊急搬送。ショックバイタルで肺炎像が見られ呼吸苦も強く挿管管理となる。入院時採血で嫌気ボトル2セット陽性のグラム染色。ボトルは溶血していた。



推定菌種は？

問題3) 70歳 女性 血液培養のグラム染色

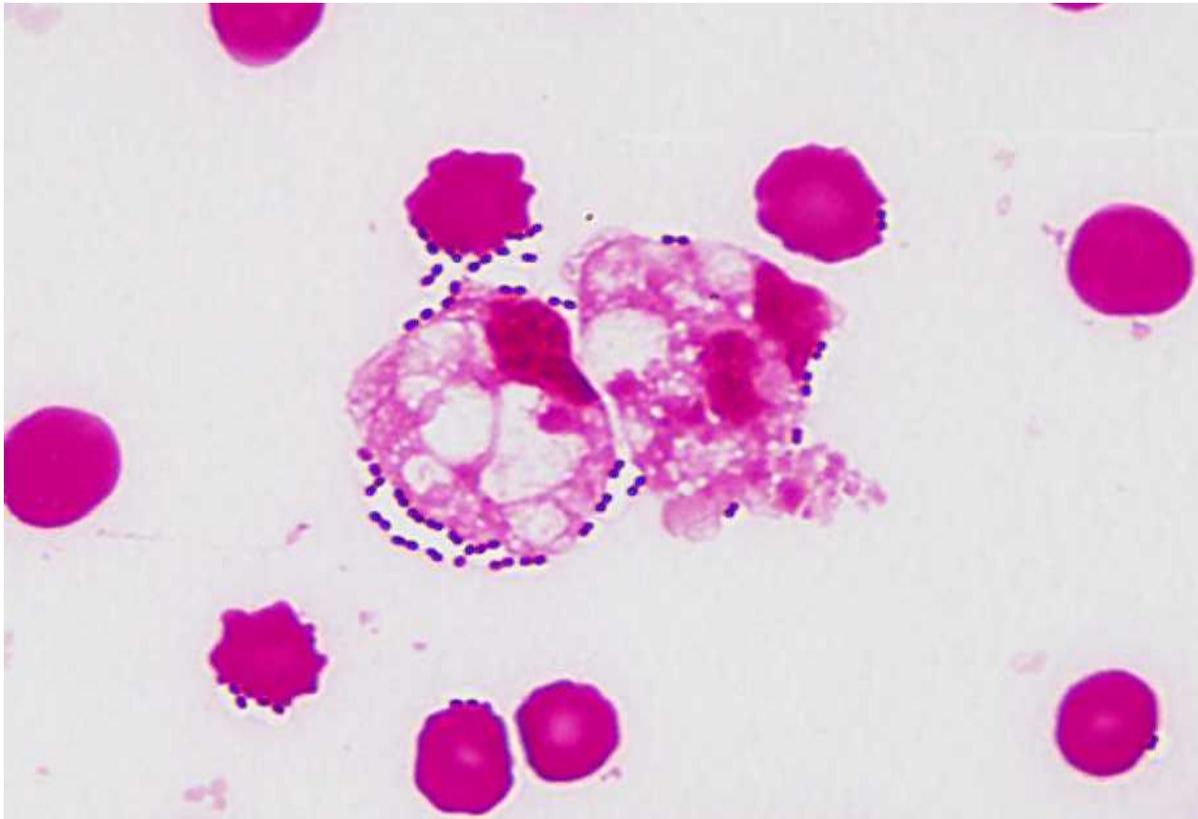
腸球菌による細菌性心内膜炎が示唆され、ビクシリンによる治療を開始し6/15に終了。6/20に38.5度の発熱が見られ、IEの再発を考え血液培養施行。陽性時の好気ボトルのグラム染色。



臨床医に何と報告しますか？

問題4) 38歳男性の血液培養

5/16より熱発、尿路感染疑いで5/17他院より転送。血小板著明な低下と両下肢に紫斑認め
る。5/18強直性痙攣あり、髄液所見より細菌性髄膜炎を疑うが、髄液のグラム染色は陰性で
あった。5/18入院時採血の血液培養が陽性となった。



髄液の所見

細胞数 576 / mm³

糖 27mg / ml

蛋白 379mg / ml

グラム染色及び培養は陰性

WBC 30500/ μ l

CRP 26.5mg/dl

PLT 3.9×10^4 / μ L

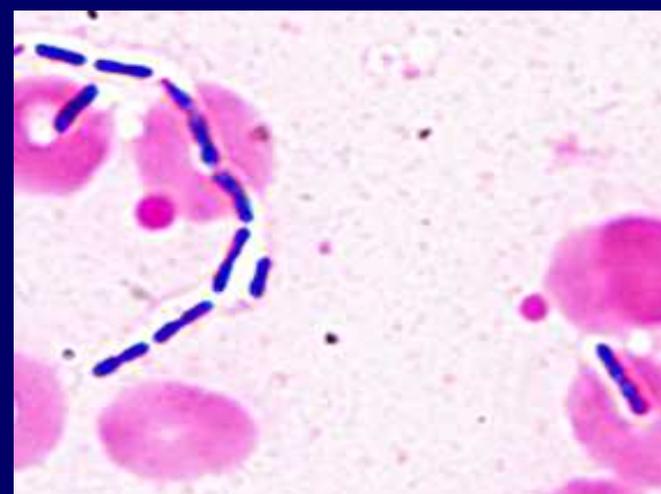
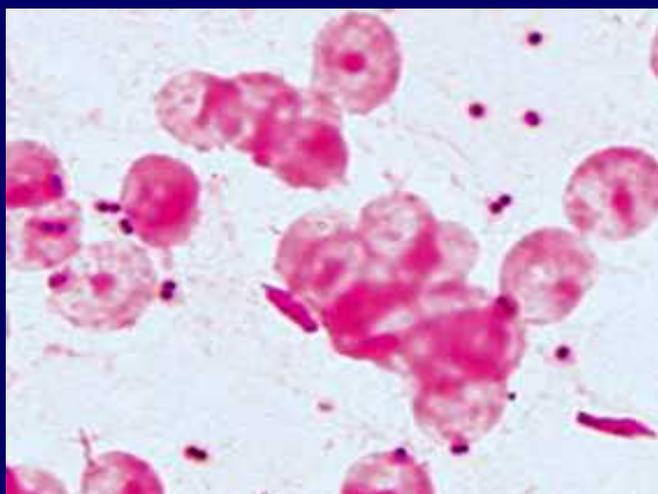
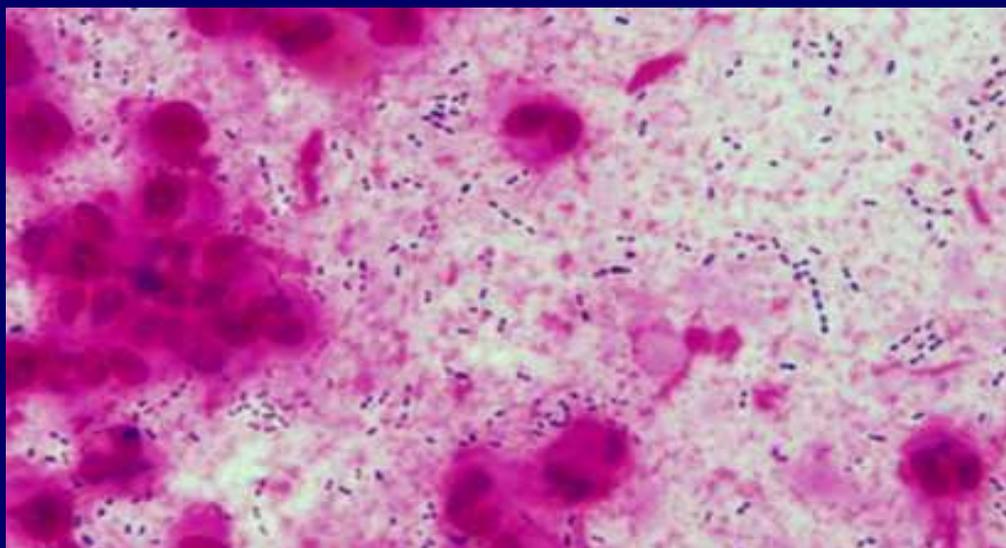
DD 28.0

AST 230IU/ml

ALP 320IU/ml

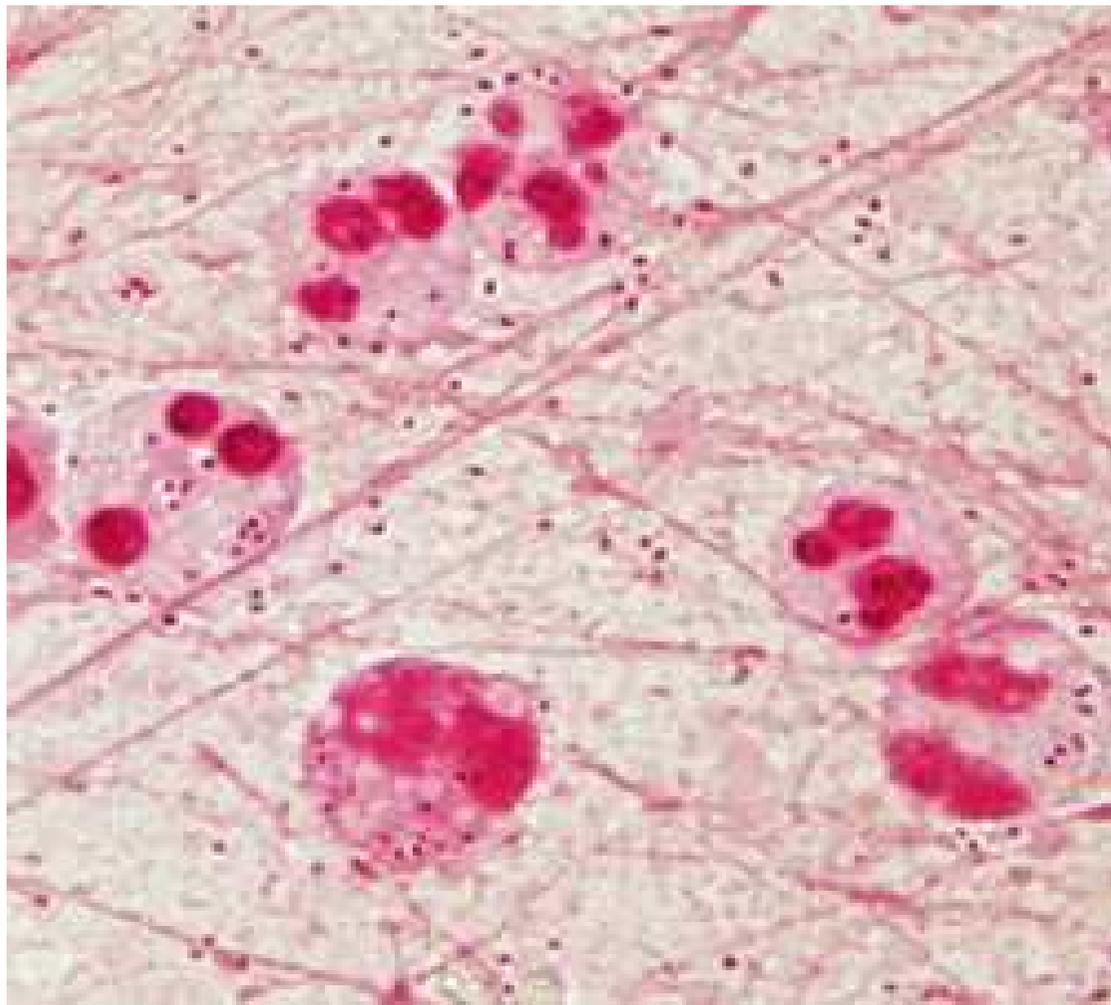
**推定菌種と考えられる病態
は？**

色々な肺炎球菌



問題5) 66歳 男性 喀痰のグラム染色

5/1外傷で搬送され脳挫傷、くも膜下出血、脳出血、顔面挫創などあり、自発呼吸困難で気切し人工呼吸管理中。5/7に39度の発熱があり喀痰からMSSA 検出。MEPMを使用、その後改善傾向にある5/10の喀痰のグラム染色。



5/7

WBC $239 \times 10^2 / \mu\text{L}$

CRP 30.7mg/dl

5/11

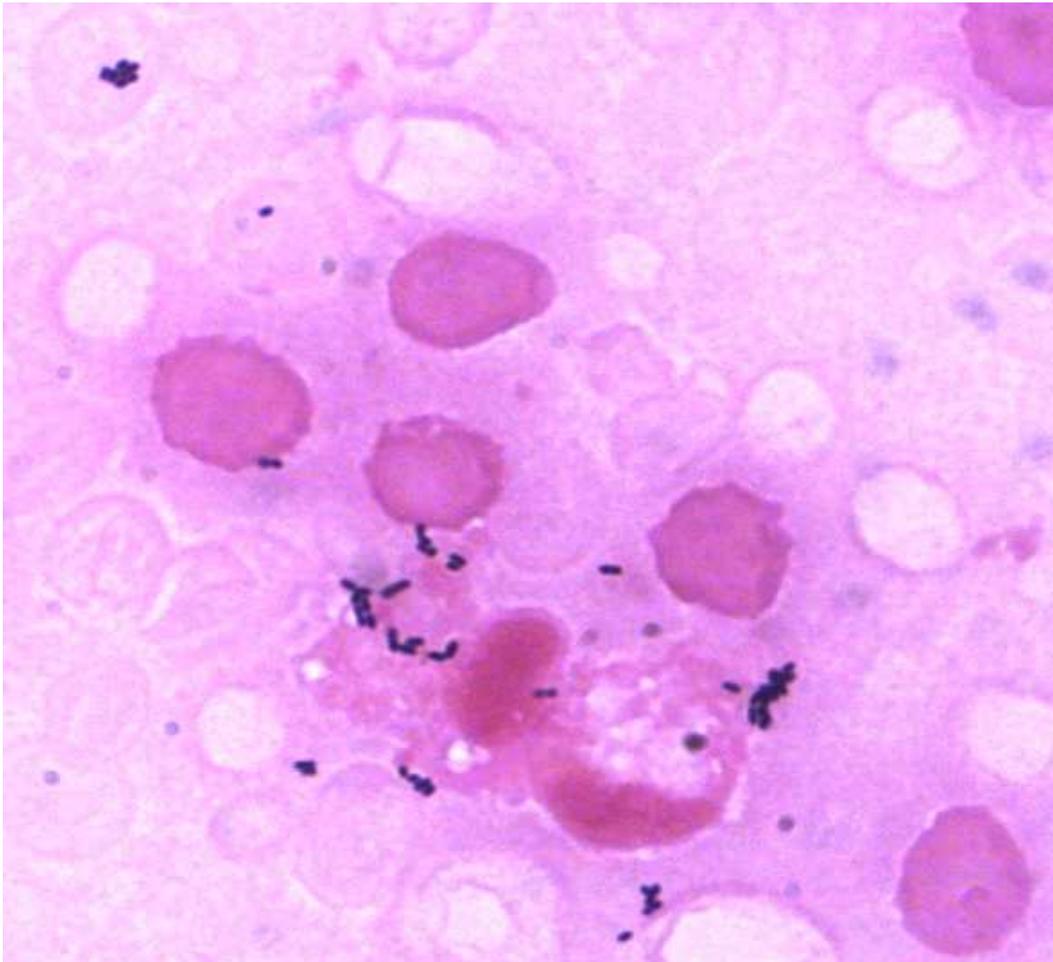
WBC $158 \times 10^2 / \mu\text{L}$

CRP 9.4mg/dl

推定菌種は？

問題6) 64歳 女性 血液のグラム染色

慢性関節リュウマチで抗TNF- α モノクローナル抗体製剤使用中。6月4日ころから39度の発熱、関節痛、呼吸苦あり。症状の改善がないため、6日精査目的で入院。血液培養施行。



Laboratory Data

WBC 13200/ μ l

CRP 15.5 mg/dl

推定菌種は？

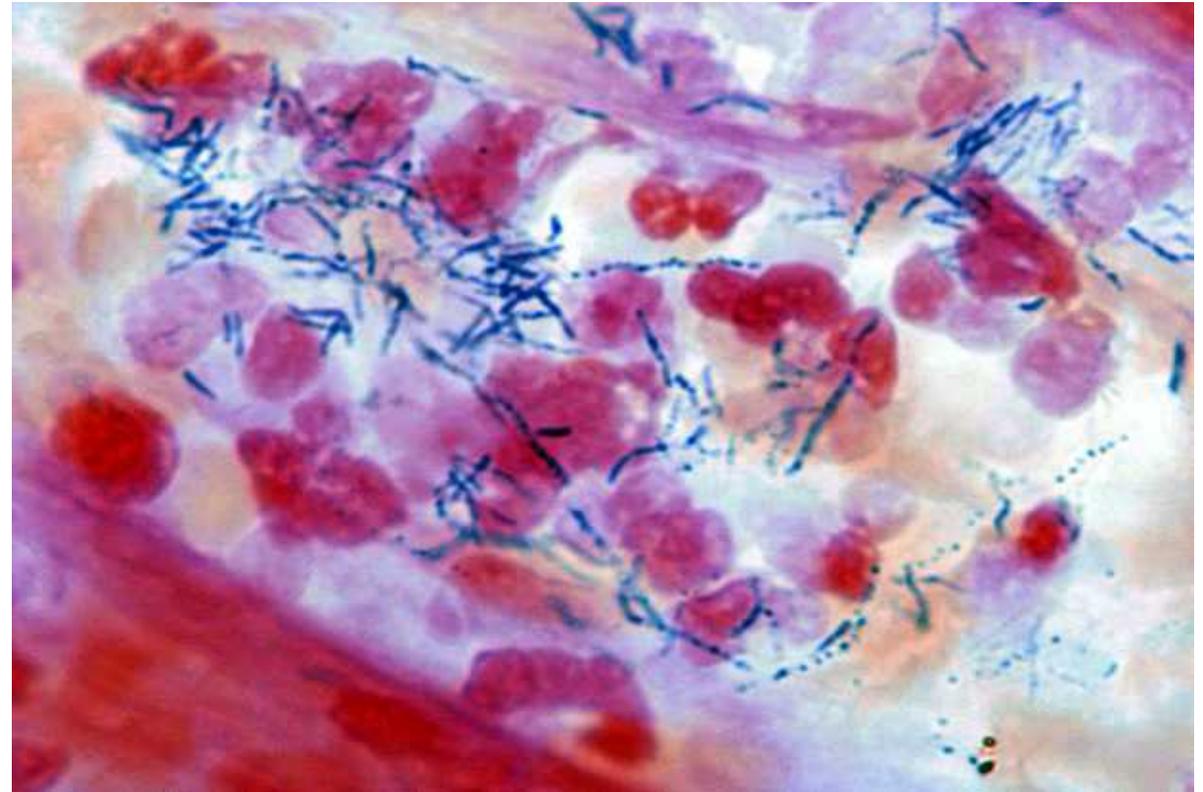
問題7) 72歳女性の涙小管内容物

流涙, 眼脂, 充血(特に鼻側), 患側の軽度の圧痛あり、涙小管部を強く圧迫すると、黄白色の小さな塊が出てきた。それを押し潰したものをグラム染色



黄白色の塊

菌塊、涙石、肉芽組織 ?

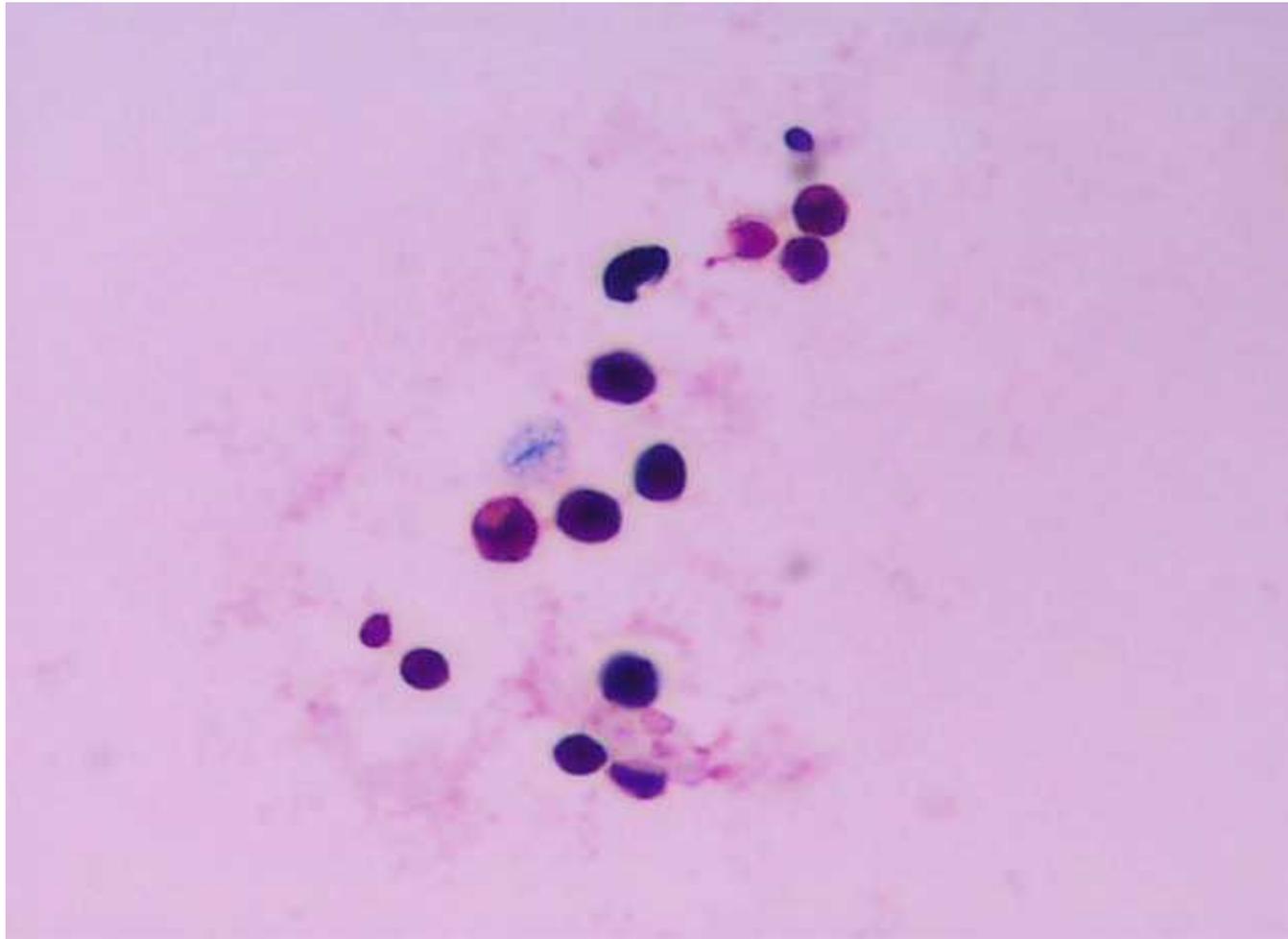


グラム染色 (×1000)

推定菌種は?

問題8) 68歳男性の髄液

前医にてカンジダ肺炎。頭痛と極度の体調不良で入院、細菌性髄膜炎を疑いルンバル施行、白濁した髄液採取。



髄液の所見

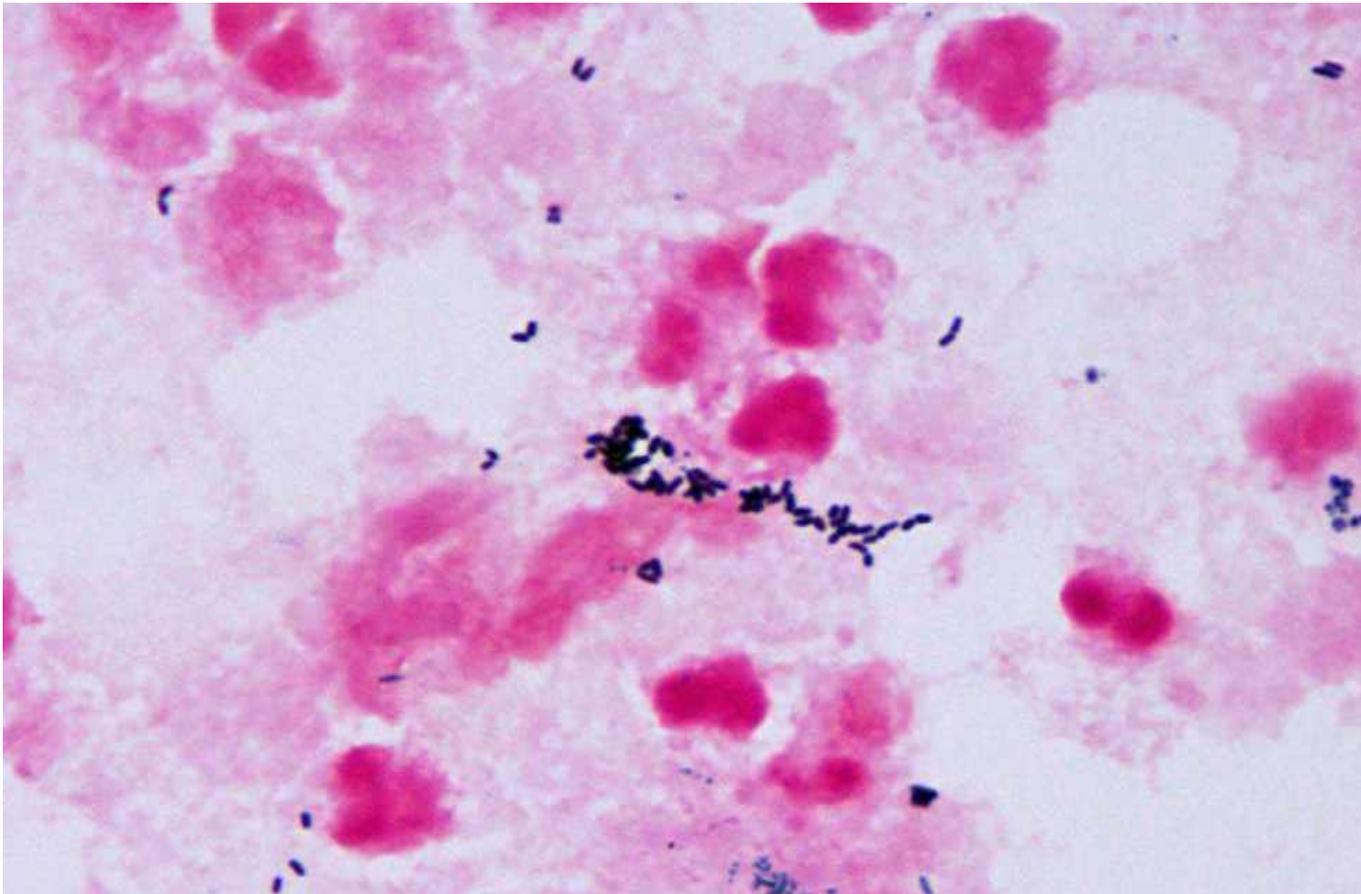
細胞数	2 / mm ³
糖	65mg / ml
蛋白	44mg / ml

推定菌種は？

問題9) 34歳 女性 乳房膿瘍のグラム染色

右乳房痛を自覚し、スルタミシリン内服で様子を見ていたが改善せず、7/11切開排膿し緑黄色の粘調度の高い膿を多量に排出したグラム染色標本。

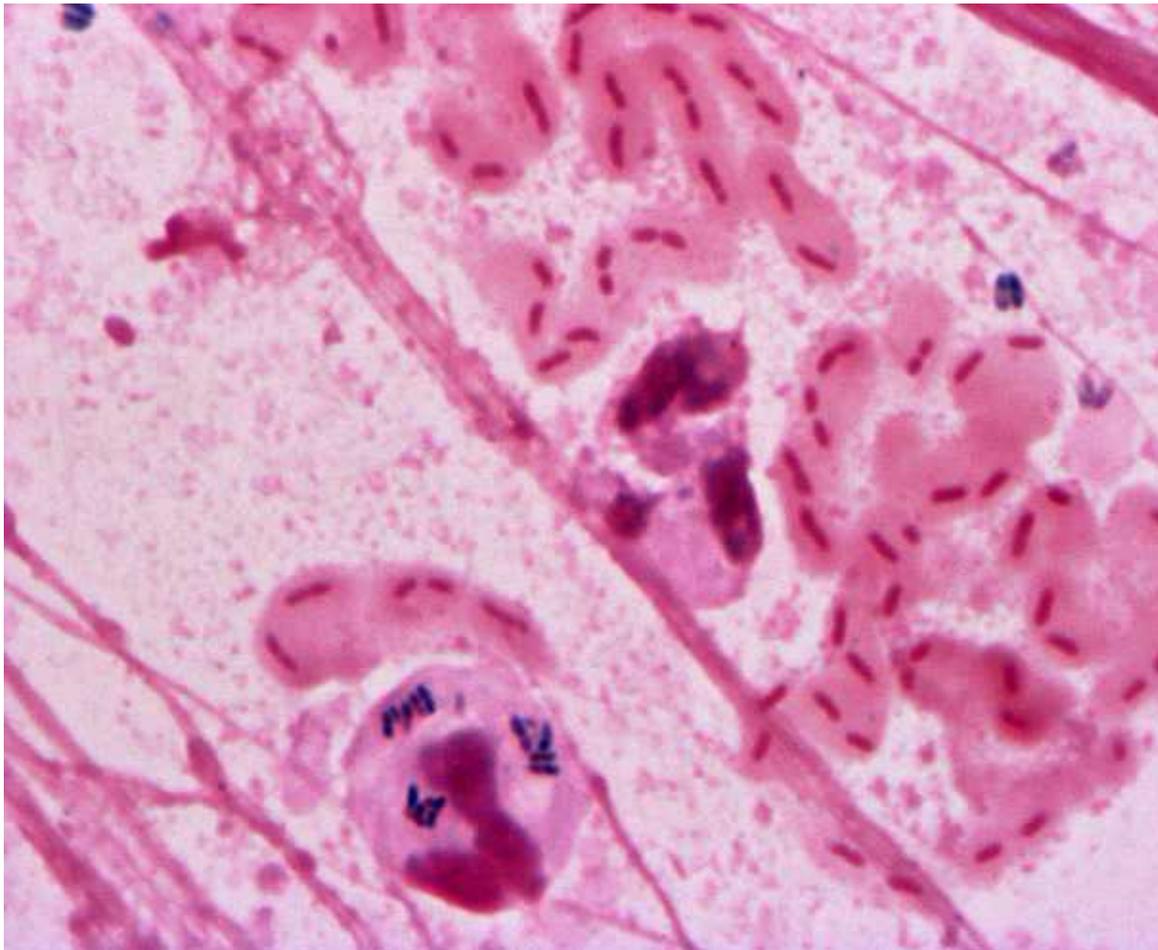
好気培養での発育は不良、カタラーゼ陽性であった。



推定菌種は？

問題10) 78歳 女性 喀痰のグラム染色

慢性気管支炎、在宅酸素療法中。9月上旬発熱と痰が持続するため、ガチフロキサシンを処方し、一時改善が見られたが24日38.5 の発熱が見られ喀痰培養施行。



Laboratory Data

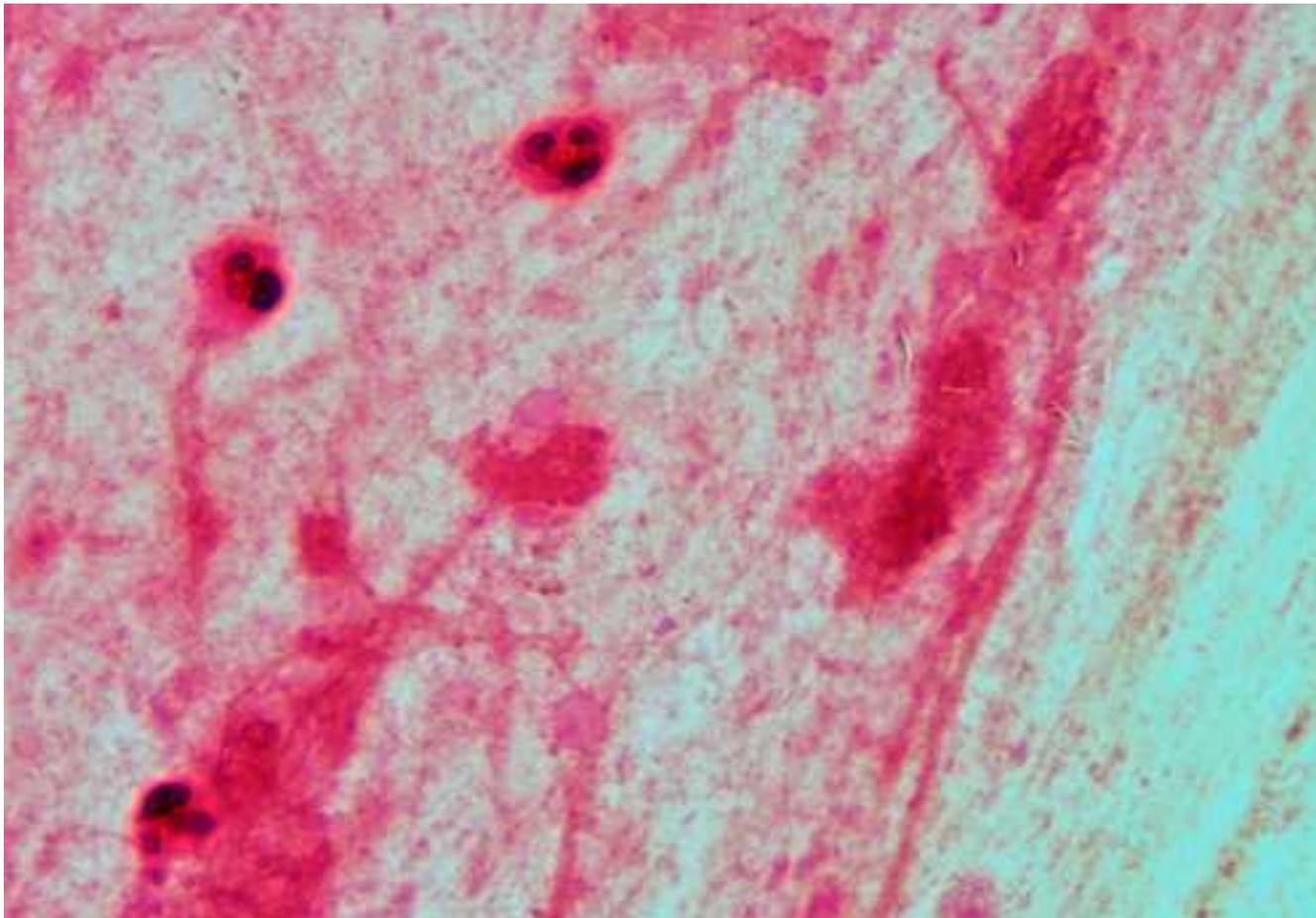
WBC 11000/ μ l

CRP 5.5 mg/dl

推定菌種は？

問題11) 64歳 男性 喀痰のグラム染色

器質化性肺炎と糖尿でステロイド投与で当院通院中。9月の上旬ころから発熱と咳があり、LVFXで症状の改善が見られたが、右上葉浸潤影の残存あり、喀痰培養の依頼。



考えられる感染症は？

問題12) 59歳男性の胸水

2009年に右下葉切除、その後9/17膿胸の診断で入院。開窓術施行し外来で包交していた。2011年5/11膿胸腔有茎筋肉弁充填術施行し、この時に採取した胸水。

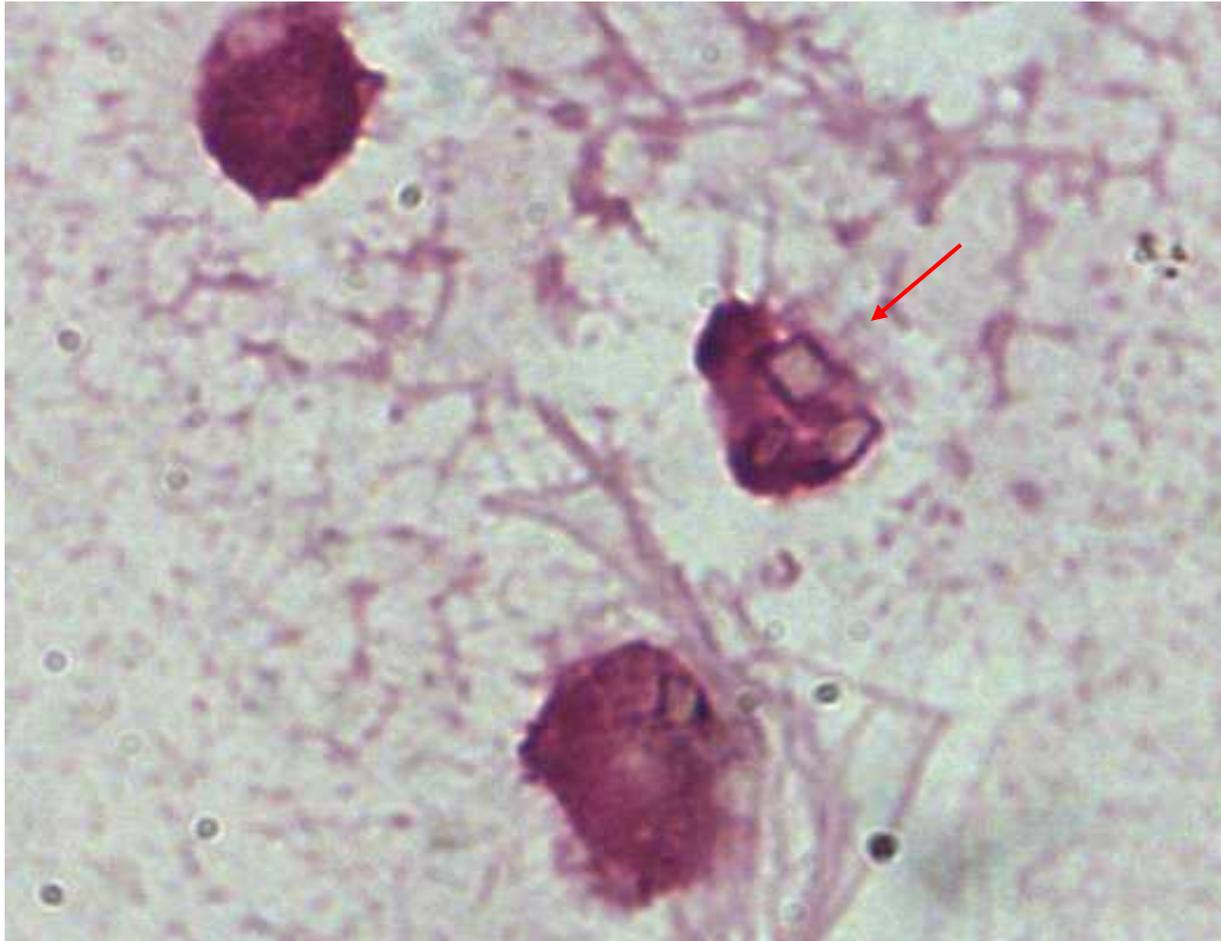


WBC $89 \times 10^2 / \mu\text{L}$
CRP 0.8mg/dl
Asp Ag 0.1(-)
-D-グルカン 16.3pg/ml

推定菌種は？

問題13) 74歳女性の関節液

発熱と呼吸苦を主訴に来院。尿路感染と慢性心不全の増悪疑いで入院加療。入院10日後より右膝の疼痛があり、体動困難にて整形consult。関節腔内吸引時のグラム染色。



WBC $95 \times 10^2 / \mu\text{L}$
CRP 18.3mg/dl

推定疾患は？

問題14) 28歳女性の大腸生検

H23年1月11日インド旅行から帰国後下痢を起し、発熱はなく以後1日2～3回の水様性下痢が続いた。6/9当院外来を受診し、6/11CF施行時の生検を生標本で観察したところ長径10 μ m程度の活発に運動する細胞が散見された。



考えられる原虫名は？

まとめ

・抗菌薬の適正使用と耐性菌対策の重要性により、グラム染色の利用価値が高まりつつある。臨床医への報告は治療上有益と思われる事象に対して、迅速・簡便に伝達すべきである。

・複数のメーカーから染色キットが販売されている。どのような検査法においても利点と欠点はつきものである。塗抹検査は治療に直結する緊急検査であるため、まずは使用する試薬の欠点を十分理解し、正しい染色法を身につけるべきである。