

グラム染色の意義

千葉大学

神経内科

金井哲也

序論

- なぜ、今グラム染色なのか？
 - 実際アメリカにおいてもグラム染色の意義について議論されていた問題
 - Empiricに治療しても、変わらないのでは？
 - 感度・特異度が決して高くない検査では？
 - 今後のグラム染色のあり方について考える必要

そこで、もう一度グラム染色の長所・短所について最近の話題を含めて検討する。

今日のテーマ

A. グラム染色の利点

- a. 迅速診断
- b. 治療効果判定について
- c. 細菌感染以外の使い方(喀痰について)

B. グラム染色の欠点について

- a. 感度・特異度について
- b. 培養結果と異なることについて

C. Take home message

グラム染色の利点

- 簡易
- 迅速診断
 - 細菌感染症かどうかもわかる
 - 菌名もわかり、頻度の低い病原菌もカバー出来る
- 安価
- 治療効果の判定が出来る
 - 治療が開始されている場合でもより早く適切な治療への変更が可能
- 細菌感染以外にも利用できる

<これらを利用して初期治療に活かしたい>

今日のテーマ

A. グラム染色の利点

a. 迅速診断

b. 治療効果判定について

c. 細菌感染以外の使い方(喀痰について)

B. グラム染色の欠点

a. 感度・特異度について

b. 培養結果と異なる点について

C. Take home message

初期治療を活かすために

医師として期待することとして

- 早くないといけない
- できれば菌種まで知りたい
- Antibiogramまで知りたい

迅速診断について

- Rosonらの報告*ではGeckler分類5の喀痰を使用時
肺炎球菌の感度68% 特異度93%
インフルエンザ桿菌の感度76% 特異度100%
と有意であった
- Corderoらの報告**では、HIV患者の喀痰培養が細菌性肺炎の診断に優れていた

などの報告がある。

*Roson B, et.al. *Clin Infect Dis*. 2000;31:347-382.

**Cordero E, et.al. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:362-367.

迅速診断について

一方で、異論も多い

- 非定型肺炎を見逃す可能性がある
- 3割の肺炎患者では痰が出ない
- また出たとしても、3割は培養陰性である
- 喀痰誘発して提出したとしても、2割程度しか診断率はない*

まとめると**感度も特異度も低い検査では意味がない**

*Ewingらの研究でも喀痰でのCAPの診断率は9%

そこで疑問

そもそもEmpiricに治療すればいいのではないか？

過去にEerdenらによる報告*では、市中肺炎に対して標準治療群とエンピリック治療群で比較検討した無作為対照試験では、死亡率および入院期間に差がない結果となった。

この試験は抗菌薬への耐性率が低い国で行われたため、**耐性率の高い我が国にそのまま適応となるわけではない。**

またATS/IDSAのコンセンサスガイドラインでも**検査結果(グラム染色・培養)で抗菌薬を変更するように推奨している。**

*van der Eerden M.M., *et al.*: Thorax 60 : 672-678, 2005.

初期投与の抗菌薬を決めるには？

グラム染色を活かす

- 抗菌薬が選択できる情報が必要
- GPC,GNRでは抗菌薬は選択できない。
- できるだけ具体的な菌名がわかればBest
- 菌名がわからなくてもそれにつながる情報を

グラム染色を活かすために

- GPCなら少なくともClusterかChainか？
- GNRなら腸内細菌群か非発酵菌か？
- 嫌気性菌は疑われるか？
- その他形態でわかる菌は積極的に菌名を！

– *H. influenzae*



– *Pseudomonas aeruginosa*



– *Enterobacter sp.*



具体例

	グラム 陽性 Gram positive	グラム 陰性 Gram negative
球 菌 cocci	<p>GPC</p>  <p>diplococcus 肺炎球菌</p>	<p>GNC</p>  <p>モラクセラ 髄膜炎菌 淋菌 (アシネトバクター)</p>
	<p>chain</p>  <p>連鎖球菌 腸球菌</p>	
	<p>cluster</p>  <p>ブドウ球菌</p>	<p>GNR</p>  <p>coccobacillus インフルエンザ桿菌 アシネトバクター 百日咳菌</p>
桿 菌 rod (bacilli)	<p>GPR</p>  <p>クロストリジウム コリネバクテリウム リステリア バシラス</p>	<p>small size</p>  <p>緑膿菌</p>
	<p>filament</p>  <p>ノカルジア アクチノマイセス</p>	<p>middle size</p>  <p>大腸菌 サルモネラ</p>
	<p>giant/budding</p>  <p>カンジダ (真菌)</p>	<p>large size</p>  <p>クレブシエラ</p>
		<p>gull wing</p>  <p>キャンピロバクター ヘリコバクター</p>
		<p>filament</p>  <p>フソバクテリウム カブノサイトファーガ</p>

抗菌薬が選択できる情報

- GPC cluster
- GPC chain
- GNR enterobacteriaceae (腸内細菌様)
- GNR Pseudomonas aeruginosa (非発酵菌)
- Anaerobe (嫌気性菌は混合感染なので、GP+GNが混在している。)

グラム染色で抗生剤を変えるセッティング

- 尿路感染症の場合、抗菌薬のFirst choiceはSanfordの「熱病」によるとシプロフロキサシンやセフトリアキソンである。
- しかし、尿中にchain GPCが確認できた場合、腸球菌を疑う所見だが、この2つの抗生剤は効くのであろうか？

	M	Fluoroquinolone					1st	2nd Gen		3rd Generation		4th	5th	1st Gen		2nd Gen						
		Aztreonam	Ciprofloxacin	Ofloxacin	Levofloxacin	Moxifloxacin	Gemifloxacin	Gatifloxacin	Cefazolin	Ceftetan	Cefoxitin	Cefuroxime	Cefotaxime	Ceftizoxime	Ceftriaxone	Ceftazidime	Cefepime	Ceftaroline	Cefadroxil	Cephalexin	Cefaclor	Loracarbef
Gram-Positive																						
<i>S. pneumoniae</i>														?								
Viridans Strep														?								
<i>S. Anginosus grp (milleri)</i>																						
<i>E. faecalis</i>		?	?																			
<i>E. faecium</i>																						
<i>S. aureus (MSSA)</i>																						
<i>S. aureus (MRSA)</i>																						
<i>S. aureus (CA-MRSA)</i>																						
<i>S. epidermidis</i>																						
<i>C. jeikeium</i>																						
<i>L. monocytogenes</i>																						
Gram-Negative																						
<i>N. gonorrhoea</i>		?	?	?	?																	
<i>N. meningitidis</i>																						
<i>M. catarrhalis</i>																						
<i>H. influenza</i>																						

上記の通り、腸球菌に対しては、効果がないと言える。

そのため尿でGPCが見えた場合にはABPC + GMの治療を行うようにしている。

グラム染色を更に活かす

- 平板培地のコロニーでわかることも多いので追加情報で
- 検査室に問い合わせる
- 医師と技師とのコミュニケーション

今日のテーマ

A. グラム染色の利点

- a. 迅速診断
- b. 治療効果判定について
- c. 細菌感染以外の使い方(喀痰について)

B. グラム染色の欠点

- a. 感度・特異度について
- b. 培養結果と異なる点について

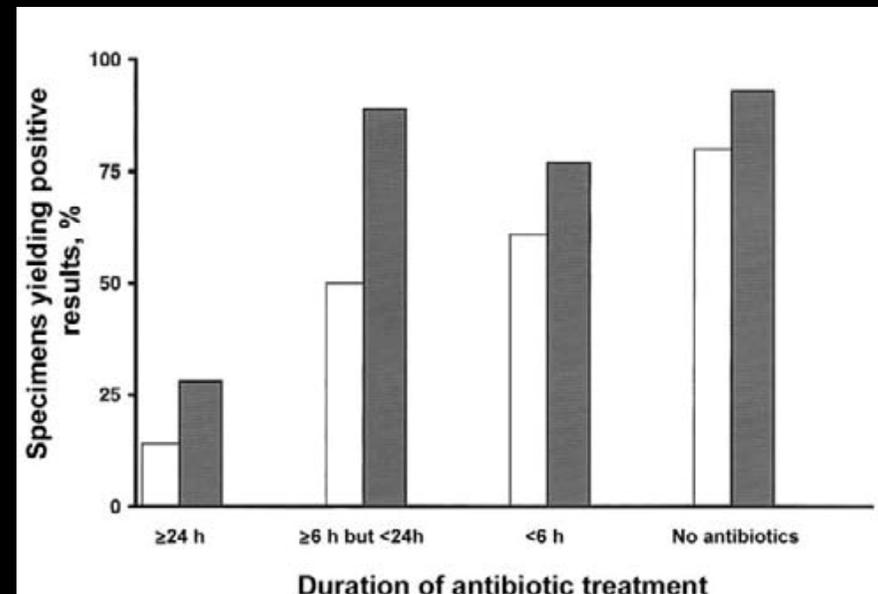
C. Take home message

治療効果について

- 起炎菌の減少、バイタルサイン、白血球数、CRPの順で改善する。
- 痰のグラム染色は、早期に抗菌薬の治療効果の判定が出来る。

治療効果について

- Musherらによる報告*では抗菌薬投与6時間以上経過すると半分以上でグラム染色で観察できなくなるとの報告がある。



治療効果について

- 一方Miyashitaらによる日本の報告例*においても、同様の結果を得ている。

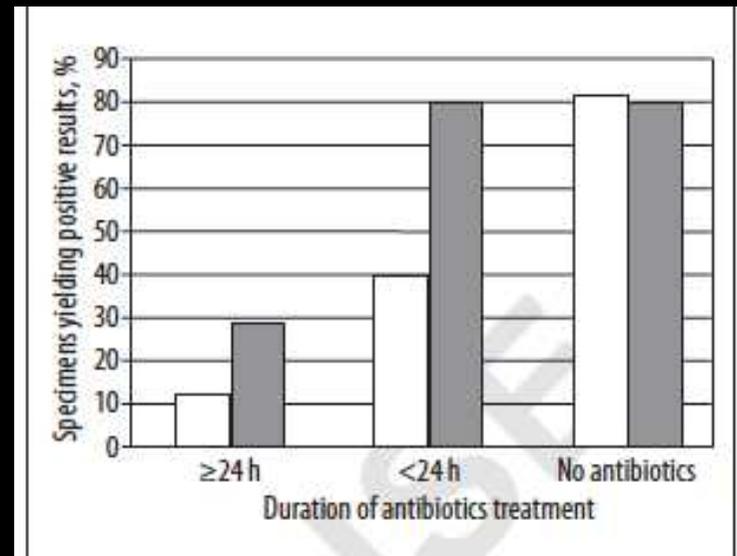


Figure 2. Relationship between the duration of antibiotic treatment and results of Gram stain (open bar) and culture (shaded bar).

抗菌薬の効果判定について

- 6時間でも半数は観察できるとのことである。
- しかし、自験例では静注抗菌薬投与終了後3時間後にはGMR菌の消失減少が認められることを経験している。
- なお、抗菌薬著効の場合には2時間程度で感染病巣の細菌数の減少を確認している報告もあり。
- 一方GPCに関しては24時間経過しても、残存していることが多い印象を受ける。
- 文献検索を行ったが、現時点ではそういった記載は認めない。

抗菌薬有効症例とは？

- GPC
 - グラム陽性の染色性が低下して、陰性化しやすい
- GNR
 - *Vibrio vulnificans*では弯曲が認められない
 - フィラメント化、球状化、バルジ形成多彩な形態変化を起こすが、形態変化が起きた菌体の中に基と成る正常な菌体が混在していることも多い。
 - そのため形態変化を示している菌においては治療効果があるものの完全に有効とは言えない。
 - 少なくとも6時間以上経過した時点で菌が消失しているかどうか確認は必要と考える。

今日のテーマ

A. グラム染色の利点

- a. 迅速診断
- b. 治療効果判定について
- c. 細菌感染以外の使い方(喀痰について)

B. グラム染色の欠点

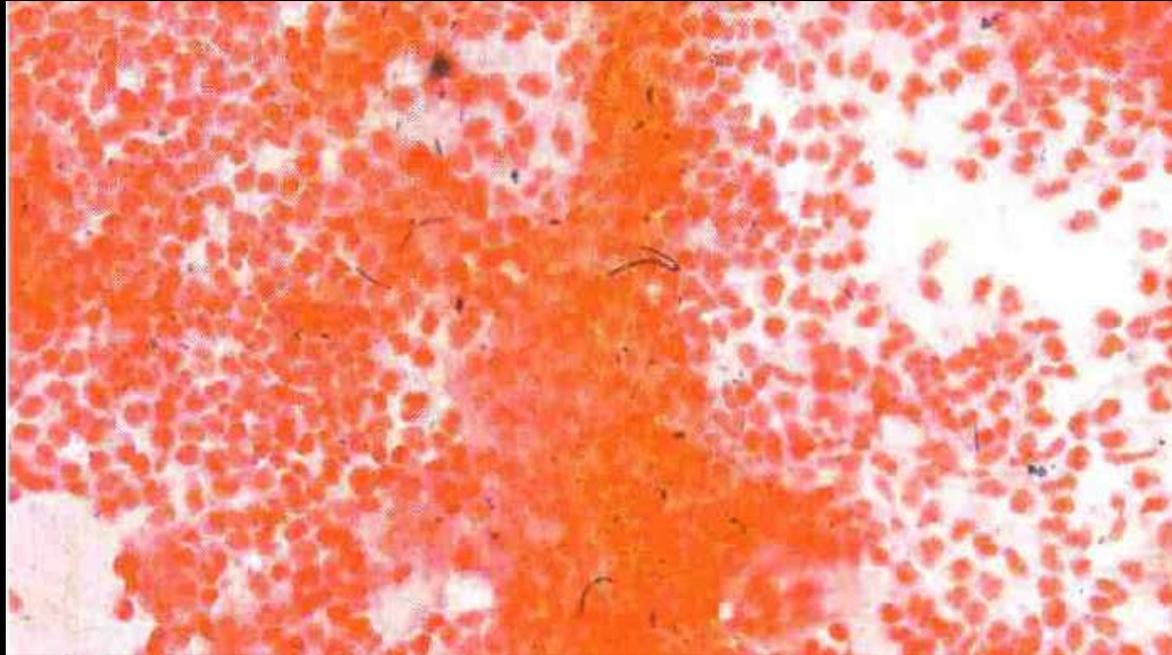
- a. 感度・特異度について
- b. 培養結果と異なる点について

C. Take home message

細菌感染以外の使い方 (喀痰)

- . また, 炎症細胞の出現状況や種類から感染・炎症の状況を推測することも可能
 - ウイルス所見
 - アレルギー所見について、後記する。

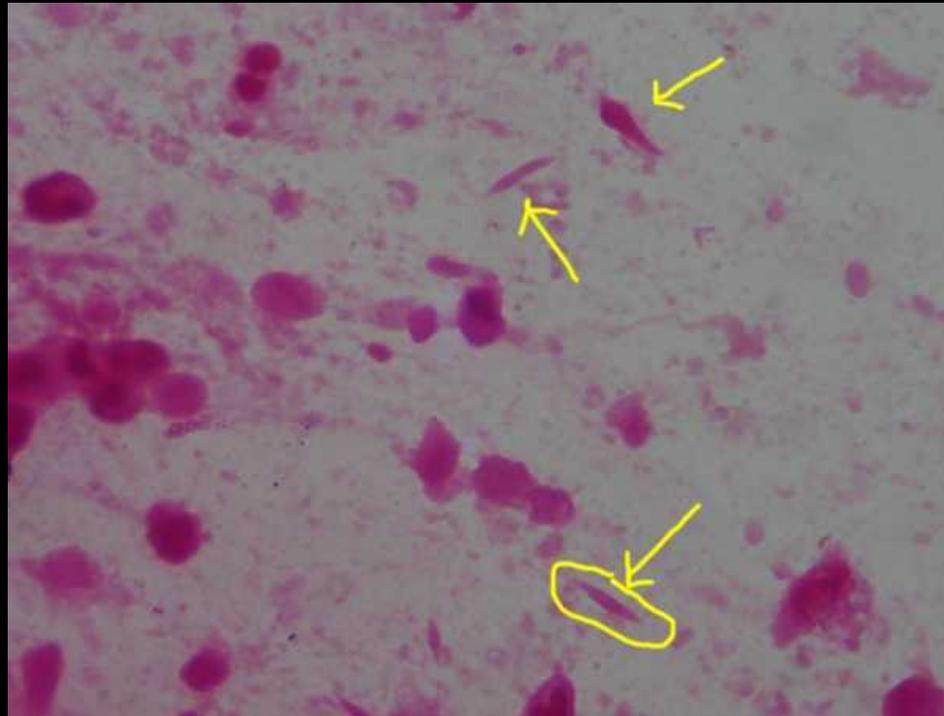
ウイルス所見



気道上皮あるいは肺胞上皮と推測される単核細胞の大量剥離所見

アレルギー性疾患

- 喘息では好酸球優位の喀痰



- またシャルコー・ライデン結晶が観察出来る。

今日のテーマ

A. グラム染色の利点

- a. 迅速診断
- b. 治療効果判定について
- c. 細菌感染以外の使い方(喀痰について)

B. グラム染色の欠点

- a. 感度・特異度について
- b. 培養結果と異なることについて

C. Take home message

グラム染色の欠点

- 感受性がわからない。
- 慣れた人が見ないと判定できない。
- 培養結果と異なることがある。
- はっきり結論が出せないことがある。

これらを織り込み済みで判断する必要があり、
検査の特性を理解する必要がある。

今日のテーマ

A. グラム染色の利点

- a. 迅速診断
- b. 治療効果判定について
- c. 細菌感染以外の使い方(喀痰について)

B. グラム染色の欠点

- a. 感度・特異度について
- b. 培養結果と異なる点について

C. Take home message

なぜ感度・特異度が低いのか？

1.喀痰採取が抽出ではない。

- * *Elisa Garcia-Vazquez*らの報告では46%も上気道からの吸引により出された*normal flora*であった。

2.同じ検体でも取る部位によって感染像が異なる。

3.標本作成の問題

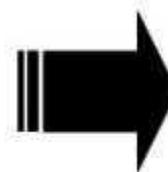
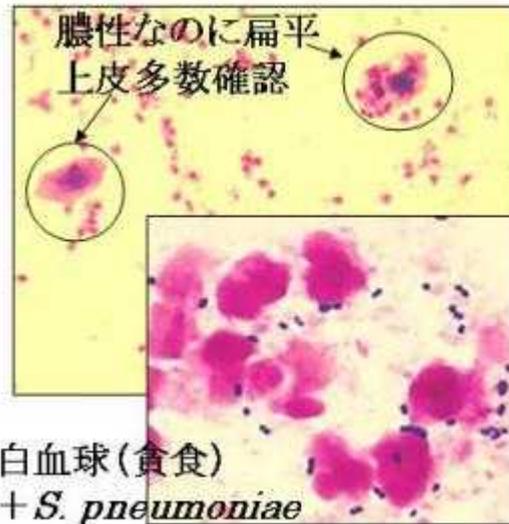
4.処理の時間

5.結果の解釈

1. 喀痰採取が適当ではない

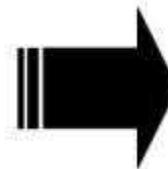
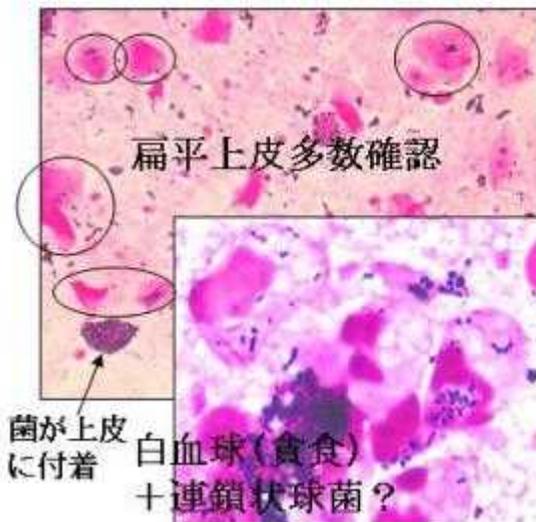


+



誤嚥性肺炎に
合併した肺炎
球菌性肺炎の
可能性 **大**

グラム染色道場



誤嚥性肺炎に合
併した肺炎球菌性
肺炎の可能性?

⇒材料が良くない
ので判断が難しい
ことも...

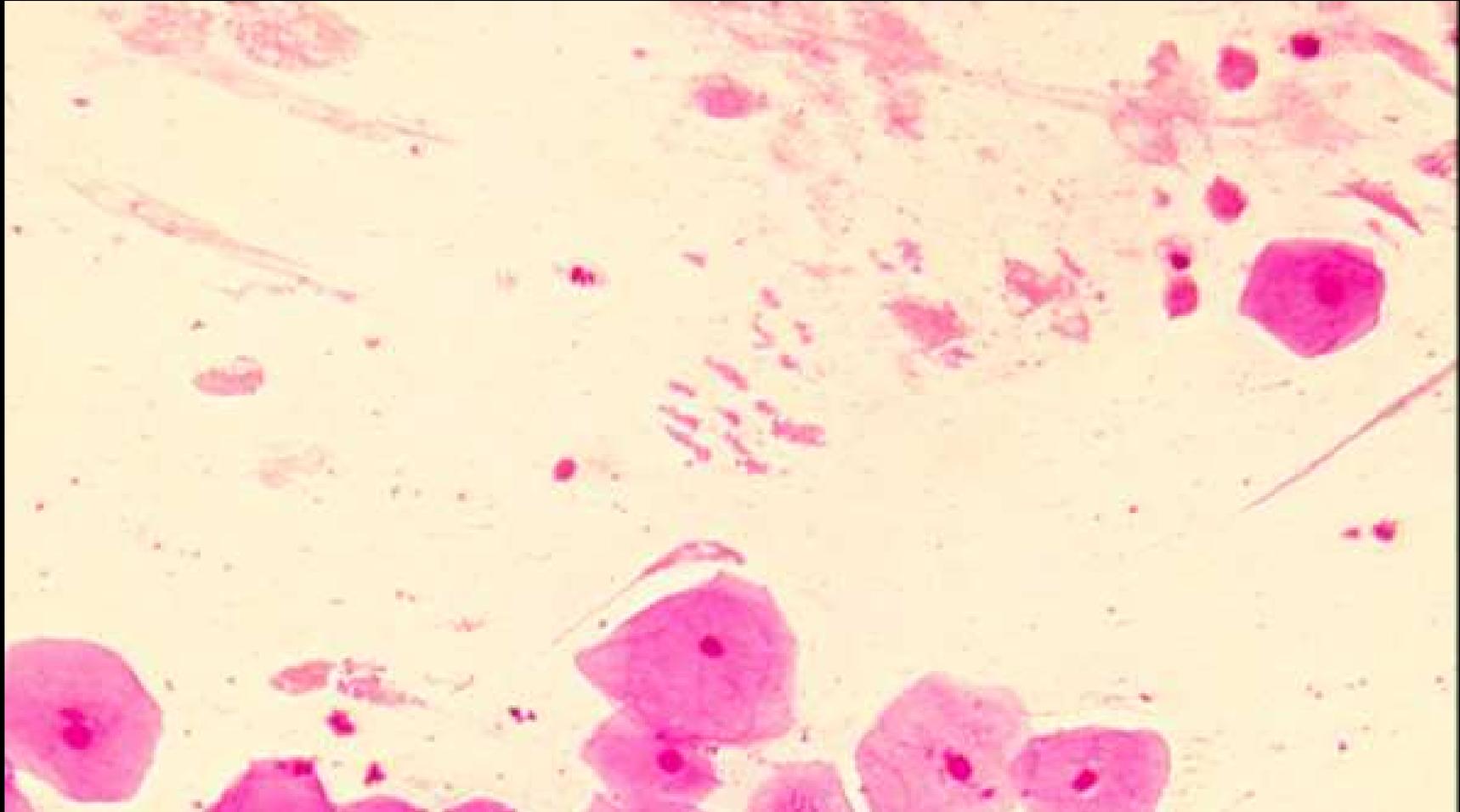
無駄な時間を過ごさないため

- **喀痰標本の評価が必須！**
 - * 染める前に肉眼的評価が一番大事
= **唾痰染めても意味なし。**
- 喀痰の肉眼的品質評価(Miller & Jones)
 - M1 唾液, 完全な粘性痰
 - M2 粘性痰の中に膿性痰が少量含まれる
 - P1 膿性痰で膿性部分が 1/3 以下
 - P2 膿性痰で膿性部分が 1/3?2/3
 - P3 膿性痰で膿性部分が 2/3 以上

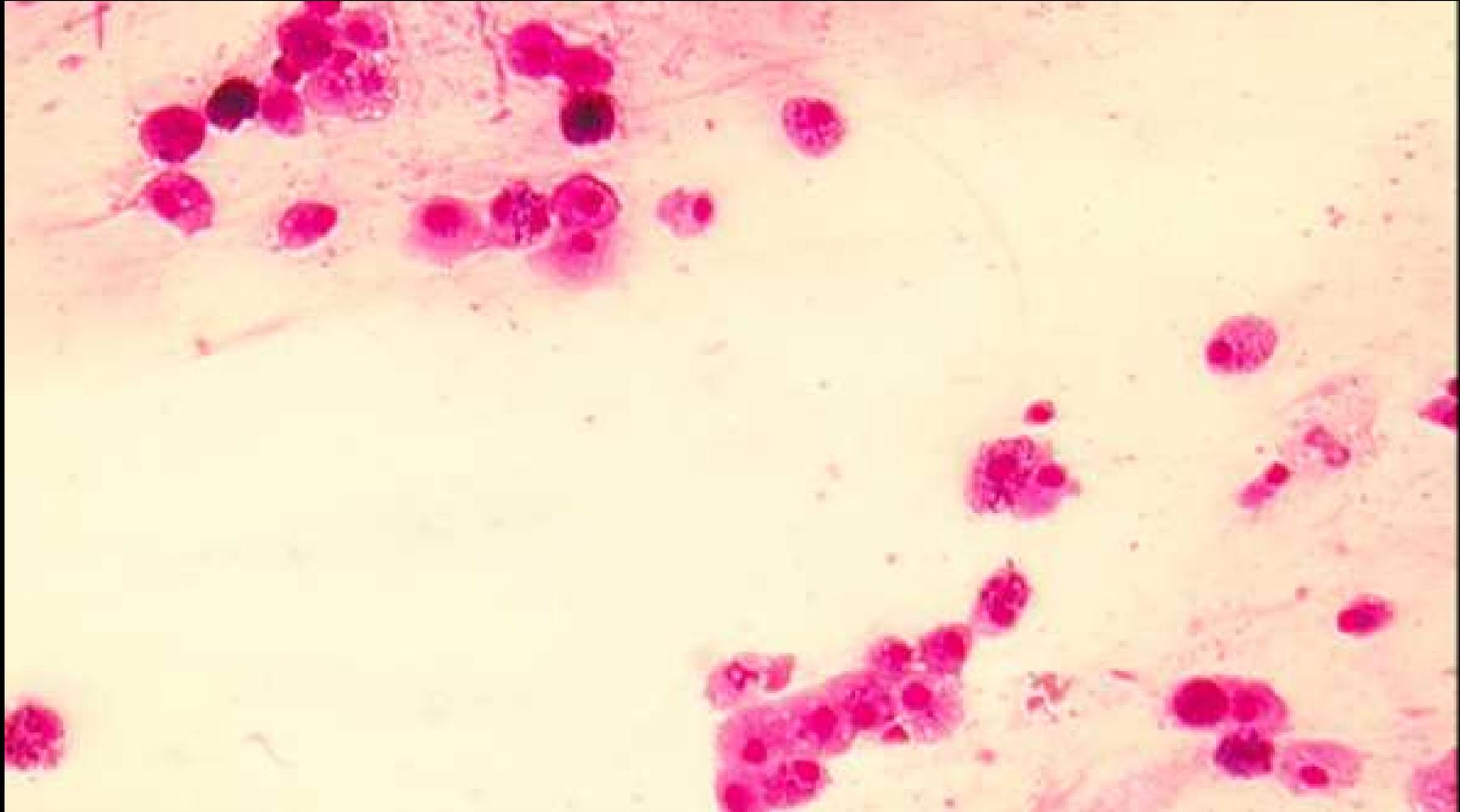
2.同じ検体でも取る部位によって感染像が異なる。

- 吸引痰(嚥下性肺炎の患者)を良く見ると、スピッツの中で2層に分離している。
- 上層には泡にまみれた痰のような唾液、下層にはどろっとした痰。
- 上層は扁平上皮の塊が多く見られますが、下層はバラけて見えます。つまり、喀出時(吸引時)に吸ってしまったものです。しっかりと膿の部分採取しないとダメだと思ふ一瞬です。

上層



下層



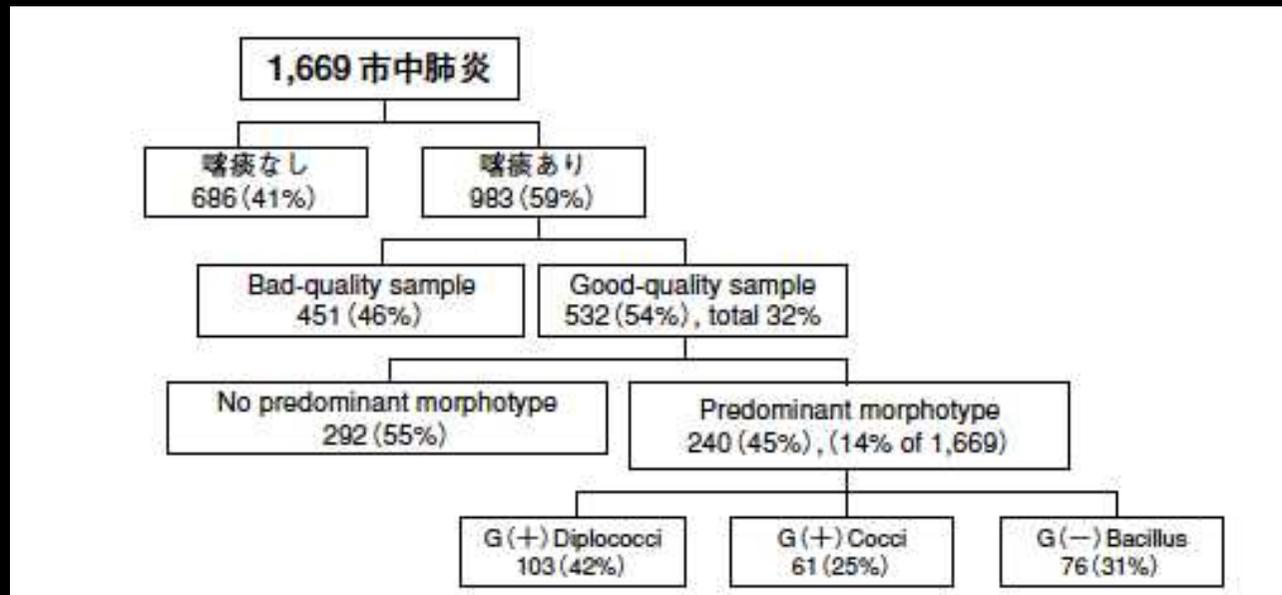
結局は、

- 鏡検での喀痰の評価が必要で、なるべく良い痰を使用するのが望ましい。

	白血球 (好中球)	扁平上皮細胞
1	< 10	> 25
2	10 ~ 25	> 25
3	> 25	> 25
4	> 25	10 ~ 25
5	> 25	< 10
6	< 25	< 25

Geckler分類(細胞数/1視野 100倍)

しかし、良い痰が取れても・・・



45%しか有意菌が検出されず、肺炎の重症度を定めるPORTスコアとの相関が認められるわけではなかった。

綿貫らによる研究も同様で、重症例であると喀痰が取りにくく、軽症～中等症においてグラム染色が有効で、重症例には尿中肺炎球菌抗原が好ましいとの報告があり。

とは言えど・・・

- Musherの試験*では24時間以内に抗菌薬を投与されていない群では**80%でG染色陽性、93%で喀痰培養陽性**となっている。

*Musher et al; [Clin Infect Dis 2004; 39:165-9]

ここまでは市中肺炎の症例のみ

- 実際、HAP(Hospital-acquired pneumonia)でのグラム染色の意義はどのようなのだろうか？
- 岩田らの報告*によると良好な喀痰が取れた場合のグラム染色での起炎菌推定率の感度は89.4%で、陰性的中率も85.7%と高値であった。
- また院内感染ではMRSA,*P. aeruginosa*,の順に多かった。

迅速診断の面では少なくとも、有効と言える。

*K.Iwata et al. J Infect Chemother 2012

3 . 標本作成の問題

- さきほど提示した通り、検体の適正な利用が好ましい。
- 染色技術の問題
 - 一般的にはBartholomew&Mittwer法(バーミー法)が検者の経験や技術の影響を受けにくい
- 各検体ごとに作成上の注意点を述べる！

3 - 1 喀痰

- 喀痰洗淨法を施行してからが望ましい。
 - 検体と滅菌生理食塩水を、滅菌チューブにいれ激しく振ることで検体を分離させる。
 - また膿性が強い検体の場合には希釈作用もあるため薄くのばすことができる。
- 薄く一定の方向に引き延ばすこと
 - ランダムに延ばさないのがコツ

3 - 2 尿、髄液、胸水などの液状検体

- 検体を濃く塗る。
- 遠心はしないで作成する
 - 一部の教科書では遠心分離し、沈殿物を採取し評価を行うとの記載がある。
 - これに関しては、私的な意見を述べるが菌を発見するだけがグラム染色ではなく、未処理検体を鏡検することで細胞数・細菌数の概算ができるため可能な限り未処理の検体での評価が望ましい。
 - なお、抗酸菌・淋菌の検索を目的とする場合この限りではない。

4.処理の時間

- 肺炎球菌は時間が経つと自己融解するという特徴があり、その過程でグラム陰性球菌に見えることがある。
- また検体を冷蔵保存しても6時間を超えると白血球の崩壊や細菌数の増減、形態変化が起こるため検体採取直後に塗抹するのが大事

5. 結果の解釈

- 微生物の所見
 - 上皮近くに分布する細菌：常在菌
 - 好中球とともに分布する細菌：起炎菌
- 生体側の所見 (アクティブ・フレッシュ所見)
 - 核分葉し細胞質明瞭
 - 貪食像
 - フィブリン析出
- アーチファクト

5-1.アーチファクト

- アーチファクトは一部分に限局して出現するものなので、大きく違う部分で再度スミアを見直すのが大切です。
- 少しでも疑わしければ、再検が好ましい。

具体例

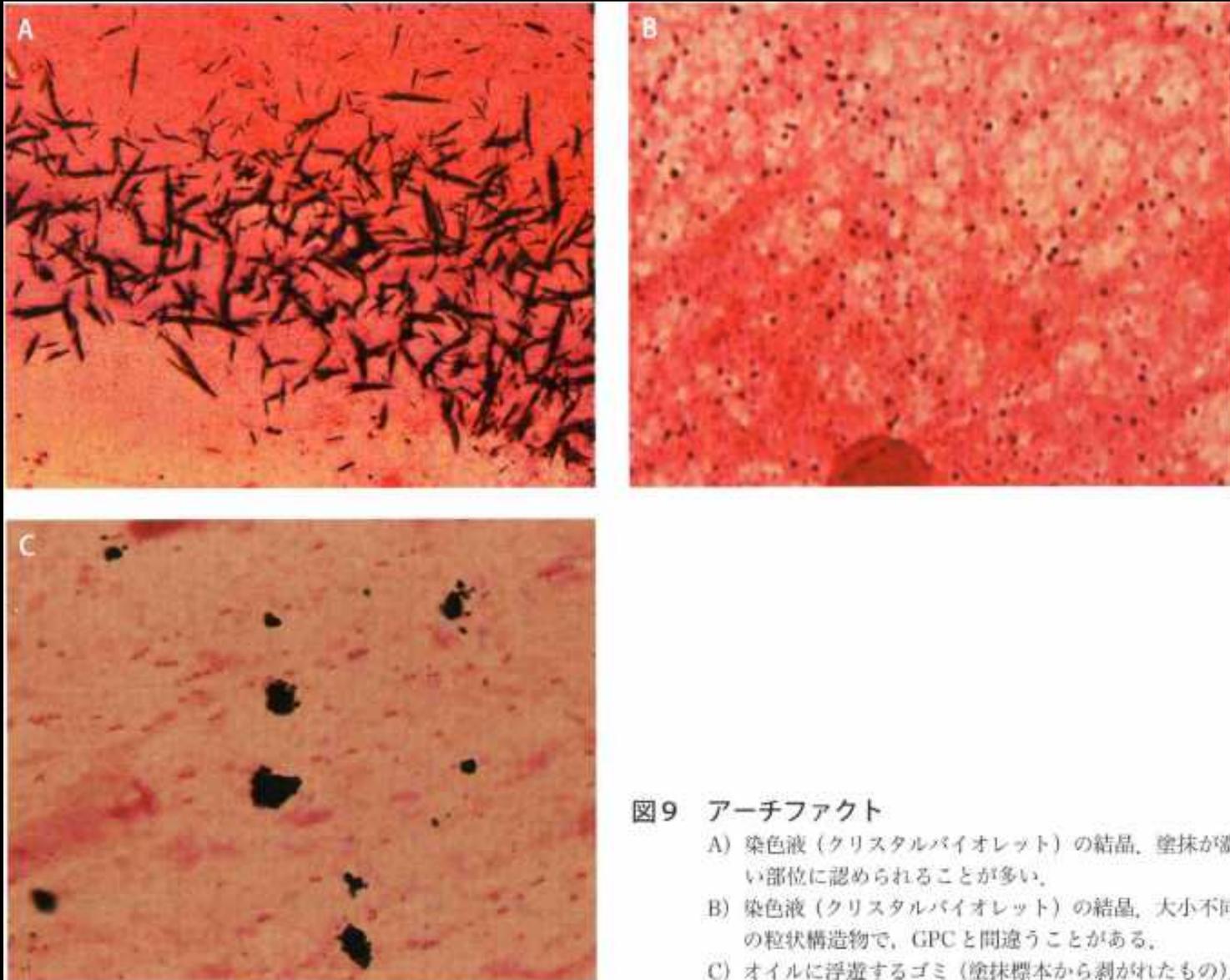


図9 アーチファクト

- A) 染色液（クリスタルバイオレット）の結晶、塗抹が濃い部位に認められることが多い。
- B) 染色液（クリスタルバイオレット）の結晶、大小不同の粒状構造物で、GPCと間違ふことがある。
- C) オイルに浮遊するゴミ（塗抹標本から剥がれたもの）。

5-2.好中球の貪食像について

- 1) 血管外に遊走してきた好中球は常在菌かどうか見境無く貪食をするため、常在しているものかどうかの判断は付かない。
- 2) 宿主側に貪食作用を悪くする要素のある疾患、薬の投与がある場合は貪食能が落ちる可能性があるため、貪食像が原因菌の指標にはならない。
- 3) 臓器によっては貪食を起こしにくい環境がある。
 - 胸水はオプソニン活性が悪いので貪食能が落ちたり (Infectious disease in 30 days)
 - 尿はpHと浸透圧によって回避される (INFECTION AND IMMUNITY, Jan. 1993, p. 8-12)

5-2.好中球の貪食像について

- 4) そもそも好中球減少時には末梢にも好中球が無いので貪食像を原因菌の指標にするのは困難。
- 5) 宿主側に何も問題が無い場合は感染を起こすと好中球が集積して患部で貪食は行われる。このため貪食像が原因菌かもしれないという推測は付くが確定は付かない。
- 6) 菌側に貪食を回避させる機構がある場合は多く貪食が見られない場合がある。莢膜などあると見ない場合もある。
- 7) 細胞内寄生菌の場合、好中球の中に多く菌が観察されるので原因菌かどうかは臨床症状任せである。
B. catarrhalisは典型例。(JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 1990, p. 2559-2560)

5-2.好中球の貪食像について

実際は、多くの文献では好中球が多いのかが論点になっており、採取された材料が的確に感染部位の像を反映しているかどうか判断するものとしてグラム染色は理解されている。
(JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2011, p. S30–S33)

一部の文献では

- 否定的な文献も多い中、VAPに関しては判断が難しいので好中球の数と貪食の割合から原因菌かどうか考えるという文献*もある。

Chest 1989;95:190-192.

尿路感染症の貧食像について

1. 尿中では浸透圧の関係で貧食能が落ちることが報告*されている。
 2. 上行尿路感染で、侵襲性のある病気の場合は貧食像が見られることが多い。
 - 菌が器質に直接障害を起こしたり粘膜下組織の感染を起こしやすい環境のため？
- < 下記に貧食像と尿路感染症の報告例を列記 >
- 尿検体全体の貧食率22%でした。
 - Primaryな外来で単純性尿路感染症の場合は 44%
 - バルン留置者で新たな感染をうたがった場合 77%
 - 腎盂腎炎疑い腎盂カテーテル尿を採取した場合 88%

急性腎盂腎炎など上部尿路感染を強く疑う場合には貧食率は上がる。

今日のテーマ

A. グラム染色の利点

- a. 迅速診断
- b. 治療効果判定について
- c. 細菌感染以外の使い方(喀痰について)

B. グラム染色の欠点

- a. 感度・特異度について
- b. 培養結果と異なる点について

C. Take home message

培養結果とグラム染色

グラム染色では見えたのに、培養では生えないことがあるのでしょうか？

この2つは覚えておく

- すでに治療で死滅した菌
- 培養しにくい菌種
 - 肺炎球菌、インフルエンザ桿菌、嫌気性菌

こういった菌の場合、コンタミネーションの増幅があり、培養結果を持って治療方針が大きく異なってしまうことがある。

グラム染色で見えなくて培養が生える
こともある。

市中感染症でグラム染色が診断的でないもの

- 異型肺炎(レジオネラ、オウム病、マイコプラズマなど)
- 結核
- ニューモシスチス肺炎
- 種々のウイルス感染(SARS, インフルエンザ)
- 真菌感染(例外的にCandidaはよく染まる。)

これらは喀痰に白血球が多数認められるのにも関わらず、原因と思われる菌がないこと、通常のラクタム剤が無効な場合に疑う。

今日のテーマ

A. グラム染色の利点

- a. 迅速診断
- b. 治療効果判定について
- c. 細菌感染以外の使い方(喀痰について)

B. グラム染色の欠点

- a. 感度・特異度について
- b. 培養結果と異なる点について

C. Take home message

Take home message

- グラム染色は迅速診断には優れるが、感度・特異度は必ずしも高いわけではなく、検体の質が良ければある程度信頼しえる検査となる。
- 逆に言えば、検体が良質でなければ意味のない検査である。
- 培養が生えにくい菌の場合や、治療効果を早期に評価するためには非常に有用な検査である。
- グラム染色だけを信じると非定型肺炎を見逃す可能性がある。