

## 亀田感染症ガイドライン

### グラム染色 (version 2)

2018年6月15日最終更新 作成：藤田浩二・黒田浩一 監修：鈴木大介・細川直登

グラム染色では、まず以下の様に2×2表で細菌を形態学的に整理することが大切である。好気性菌を『グラム陽性』と『グラム陰性』、『球菌』と『桿菌』で分ける。基本的に、感染臓器ごとに典型的な起炎菌は決まっている。原因微生物を予想しながら、Gram染色を行い、鏡検する。



#### 【染色方法（当院では neo-B&M ワコー [和光純薬工業株式会社] を使用）】

検体をスライドガラスに薄く塗抹して乾燥後（温風ドライヤー可）、100%エタノールで約1分間固定し、以下の順に染色し、鏡検する。

1. クリスタルバイオレット溶液で青紫色に染色する（約30秒）
2. ヨウ素溶液で、クリスタルバイオレットを押し流すように置換して、黒褐色に染める（約30秒）
3. 丁寧に水洗し、脱色液で（アセトン30%、エタノール70%）青色が溶け出さなくなる程度までしっかりと脱色する（約10-20秒）
4. 塗抹面にアルコールが残らないように丁寧に水洗し、パイフェル液（フクシン0.085w/v%）で赤色に染める（約10-20秒）
5. よく水洗し、水気を切ってから乾燥（温風ドライヤー可）させ鏡検する

#### ※注意点

火炎固定やアルコール固定していない場合、検体が剥がれ落ちることがあるので、水洗時にスライドガラスの塗抹面に直接水道水をかけてはいけない（スライドガラスを水平に保ち、裏面から流水をかけるとよい）。特に、尿や髄液のときに注意する。

#### 【グラム染色をする検体の質について】

グラム染色を行い、それを診断のための材料にするには質の良い検体採取が必須である。特に、喀痰の質（肉眼的および顕微鏡的）はとても重要で、肺炎を評価する場合には、Geckler-Gremillion分類の4および5のみが適切な喀痰の質であり、それ以外の質では肺炎の評価は不可能である（表1、2）。喀痰は他の検体と異なり、採痰方法次第で質が大きく変わる。良質の喀痰を得るための工夫は大きく2つある。1つ目は、唾液とその中の口腔内常在菌が混じらない様に口腔ケアを行ってから喀痰採取すること（事前の歯磨きや口腔内清拭、うがい、口腔内の唾液吸引）。2つ目は、3%高張食塩水（30ml以上）をウルトラネブライザーで吸入させて喀痰を誘発することである。

**表 1. 喀痰の肉眼的品質評価 (Miller & Jones 分類)**

M1	唾液、完全な粘性痰 (不良)
M2	粘性痰の中に膿性痰が少量含まれる (不良)
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 (良好)

※P1-P3 の膿性部分を含む喀痰が採取出来るように常に努力すること

**表 2. 喀痰の顕微鏡的品質評価 (Geckler-Gremillion 分類)**

分類	細胞数/1 視野 (100 倍鏡検)	
	白血球数 (好中球数)	扁平上皮細胞数
1	<10	>25
2	10~25	>25
3	>25	>25
4◎	>25	10~25
5◎	>25	<10
6	<10	<10

グループ 4、5 は顕微鏡評価に値する良質のサンプル  
 グループ 1、2、3 の場合喀痰から肺炎の評価を行うことは出来ない (検体を取り治す必要あり)  
 グループ 6 は、経気道的吸引痰や気管支洗浄液の場合は適している

**【グラム染色の顕鏡時の注意点】**

**(1) 色に注意：脱色し過ぎ、または、脱色不良による色の判断ミスに注意すること**

・検体の質や染色手技の関係で上手く Gram 陰性、陽性が染め分けられないことがある。脱色のしすぎ (グラム陽性菌がグラム陰性菌にみえる) と、脱色不良 (グラム陰性菌がグラム陽性菌にみえる) に、注意する。各菌の形を覚えることで脱色に関するエラーに気付くことが出来る。

**(2) 複数視野を見て判断すること (1 視野で判断しない)、一つの所見を盲信、過信しないこと**

・1 つの視野で判断できるとは限らないので必ず複数視野の情報を総合的に判断する。  
 ・白血球の細菌貪食像は起炎菌の確定材料にはならない。沢山の白血球が集まっている菌が起炎菌。  
 ・グラム染色所見は診断を進めていくために使う情報の 1 つであり、『見え方』を過信しないことも大切である。病歴、身体所見、その他の検査所見と合わせて判断することを心がけ、グラム染色はあくまでも診断のための補助的な手段であることを意識しておく。実際、グラム陰性桿菌の鑑別 (腸内細菌科細菌と緑膿菌) や、chain を形成するグラム陽性球菌の鑑別 (腸球菌と Viridans Group *Streptococcus*) は、難しいことがある。

**(3) 形に注意：似たような形態の菌の見分け方**

**1) グラム陽性球菌**

・まず、**ブドウ球菌 (cluster 形成、ブドウの房状) と連鎖球菌 (chain 形成) に分類する。**  
 ・分裂初期のものや、増殖後一塊になったものは見分けにくいことがある。  
 cluster 形成：黄色ブドウ球菌、コアグラセ陰性ブドウ球菌  
 chain 形成：β 溶血性レンサ球菌 (丸くて大きい)、肺炎球菌 (横長の双球菌、莢膜が周囲のハローとして見えることがある)、腸球菌 (肺炎球菌に類似する横長な形態、大きめ)、Viridans group *Streptococcus* (小さめの球菌で長めの chain を形成)。

**2) グラム陽性桿菌**

・*Corynebacterium* 属：『V』『W』の字型に並んで見えることが多い。  
 ・*Bacillus* 属と *Clostridium* 属：大きく角ばった長方形に見える桿菌。

・ *Propionibacterium* 属：小型で集簇傾向がある。多形性があり分岐していることがある。

### 3) グラム陰性桿菌

・ まず、太めの比較的大きな腸内細菌科細菌（大腸菌や肺炎桿菌など）か、細めで相対的に小さなブドウ糖非発酵菌（緑膿菌など）を区別。

・ 腸内細菌科細菌は菌体の中心部から端まで同じような太さであるが、緑膿菌は端が細くなる。

・ 肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) の場合は莢膜が見えることがある。

・ インフルエンザ桿菌 (*Haemophilus influenzae*) の場合は大小不同の極小さい球桿菌（球菌にも桿菌にも見える）で、背景に紛れ込んで見逃す事があるので注意する。

・ アシネトバクター属の場合には、双球菌にも桿菌にも見えることがある。

### 4) グラム陰性球菌

・ 喀痰から検出：*Moraxella catarrhalis* を考える。不良喀痰だと口腔内常在菌の *Neisseria* 属。

・ STI を想定した性器分泌物から検出：淋菌を考える

・ 髄液から検出：*Neisseria meningitidis* を考える

### 【参考】

