

[総 説]

グラム染色を用いた感染症診療支援について

山本 剛

西神戸医療センター臨床検査技術部

(平成 27 年 8 月 5 日受付)

グラム染色は感染症診療の初期診断において臨床的意義は高く、初期抗菌薬の選択や治療方針の決定、材料評価が一度に判読出来る検査である。中でも菌種推定は菌の形態的特徴を把握することで可能であり、菌種推定を行うことは第一選択薬の選択を十分に検討することができる。平成 20 年度の診療報酬改訂から 3 回連続して保険点数が高くなっており、日本においては感染症診療には欠かせない微生物検査の一つであると言える。今までは微生物検査の方向性を確認するのが中心であったグラム染色の所見確認を臨床現場に迅速にフィードバックを行うことで治療の適正化が図れる機会が増えている。グラム染色は初級者でも可能であるが、その解釈については卓越した高い技術が必要になり、フィードバックする際には医師とのコミュニケーションツールとして大きく役立ち、今後の感染症診療および微生物検査に必要な情報を提供できると考える。

Key words: グラム染色, 感染症診療支援, 保険点数, 感度

はじめに

グラム染色を初めとした塗抹検査は感染症の初期診療に必要な微生物迅速検査の一つである。特に高額な医療機器の導入は必要ではなく、染色するためのスペース確保と顕微鏡と染色液さえあれば、施設規模を問わず検査ができる。グラム染色所見は材料中に存在する微生物の鑑別や材料の品質管理を行うことができ、治療薬の選択にも大きく貢献することができ、単純に微生物の有無のみで無く、感染症診療において注目されている微生物検査である。今回は塗抹検査を用いた微生物検査の活かし方について解説していく。

1. なぜグラム染色が注目されてきたのか

(1) 塗抹検査と診療報酬

平成 26 年度の診療報酬改定は全体で +0.1% の改定率であったが、消費税率の引き上げに伴う実質の改定率は -1.26% となり平成 20 年度以来 6 年ぶりのマイ

ナス改定であった。臨床検査については増点されたものは 2 項目のみに留まり多くが引き下げられた¹⁾。増点になった 2 項目は本学会も大きく関係している微生物検査であり、一つが排泄物、滲出物又は分泌物の細菌顕微鏡検査その他のものが 50 点から 61 点 (1.22% 増点) となり、もう一方は抗酸菌分離培養 (液体培地法) で 230 点から 260 点 (13% 増点) でとなっている。特に前者の顕微鏡検査はグラム染色や抗酸菌染色を含み検査技術に対し高く評価された結果になった。通常、臨床検査に関わる保険点数の設定については検査にかかる実勢価格などを参考にして設定されるが、塗抹検査については平成 20 年度の診療報酬改定時には 20 点であったが、今回の改定時の点数と比較しても約 3 倍もの増点となり臨床的価値が高いものであることが証明され、微生物検査を実施している微生物検査技師にも大きく励みになる事である。また、検体検査管理加算の施設基準においても微生物検査が常時検査可能な状態であることが明記された。加算要件には排泄物、滲出物又は分泌物の細菌顕微鏡検査ができることが条件となり、グラム染色や抗酸菌染色が常時できることが求められているが、緊急検査の中ではグラム染色の方が幅の広い微生物を対象としているのでグラム染色の必要性が高くなっている。

著者連絡先：(〒651-2273) 神戸市西区梶台 5-7-1
西神戸医療センター臨床検査技術部
山本 剛
TEL: 078-997-2200
FAX: 078-993-3777

表1. 診療報酬改定とグラム染色の保険点数

診療報酬改定年度	保険点数
平成 20 年度	25 点
平成 22 年度	40 点
平成 24 年度	50 点
平成 26 年度	61 点

(2) 感染症診療におけるグラム染色の位置づけ

グラム染色が高い評価を得る理由として、初期診療の診断検査において、臨床へのインパクトが非常に大きいことである。グラム染色では一定の菌種推定が可能であることから適切な初期治療薬の選択が可能になる。原因微生物の検索は感染症の対象臓器や患者の臨床背景、および症状から経験的に得られることはあるが、より効率的に絞り込みを行い、広域な抗菌薬の断続的な使用機会を減らすことで耐性菌の発生を減らす機会も増える。そして、医師は抗菌薬を選択する際に妥当性のある検査結果に基づくものが必要な情報共有が可能になる²⁾。また、微生物検査室の中でも鏡検で確認された微生物情報によって培地を追加や微生物検査の方向性を確認するために大切である。更に材料の品質管理を行うことで、塗抹および培養で検出された菌の臨床的意義を高めることもできる。

(3) 塗抹検査の簡便性

グラム染色は安価で高額な機器の購入も必要無く、場所さえ確保できれば検査室だけで無く、外来や病棟でも実施可能で、臨床検査技師で無くとも実施可能なところにある。非常に臨床現場に近い微生物検査の一つであり迅速性のある検査である。もう一つは、医師や臨床検査技師のみならず医学生や医療従事者間の教育効果が高いことで、グラム染色から得られる情報を共有化することで感染症診断検査としての位置づけを高くすることができる³⁾。

このように、グラム染色は検査室の枠を超えて日本の感染症診療に根付きつつあり、診療報酬についても高い評価を受けているので全ての結果が簡略化したものでは無く、具体的な内容で報告し、臨床現場で役立つ内容として報告すべきと考える。

2. グラム染色の種類とその特徴

現在使用されているグラム染色液は Hucker 変法と Bartholomew & Mittwer (BM) 法、西岡 (フェイバー) 法の 3 種類である。特徴として前染色に使用する染色液は Hucker 変法と BM 法はクリスタル紫、西岡法はビクトリア青を使用している。そのため染色法により

グラム陽性菌の色が少し異なって見えるが、染色性が大きく変化することはない。平成 26 年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書によると日本における使用割合は Hucker 変法が 5.3%、BM 法が 51.7%、西岡法が 32.6% および自家製を含むその他の染色法が 5.0% で、約半数以上が BM 法で実施されている¹⁾。

(1) グラム染色法の原理

グラム染色の原理は色々な説があるが、Davies らが提唱している細胞表面構造の違いにより染色態度が異なることが一般的と考えられている⁵⁾。グラム陽性菌は細胞壁がクリスタル紫に染色され、さらにヨウ素還元され脱色を受けにくくなるために青く染まり、グラム陰性菌はグラム陽性菌に比べて細胞壁が薄く脱色を容易に受けるため後染色により外膜が赤く染まる。この細胞表面構造の違いが分かれば菌種推定のみならず、抗生剤選択に参考になる。

1) 本邦で使用されている各種グラム染色とその特徴 (表 1)

①Hucker 変法

グラム染色の現法を参考にして Hucker と Conn によって改良された方法。Hucker 変法は今でも広く使用されている方法で、前染色にクリスタル紫にシュウ酸アンモニウム塩を混合させて溶液で行い、ヨウ素溶液で媒染し 95% エタノールで脱色を行ったあと、後染色にサフラニン液を用いる方法である⁶⁾。

②Bartholomew & Mittwer (BM) 法

Bartholomew と Mittwer により改良された方法で Hucker 変法に比べて簡単な方法である。Hucker 変法と大きくことなるのは脱色液に n-プロピルアルコールまたはアセトン・アルコールを使用し、アセトン・アルコールは脱色時間が短いのが特徴である。アセトンは前染色の脱色作用が強く、アルコールとの配合比は 3 : 7 が良いとされている⁶⁾。

③西岡法

西岡法は Hucker 変法や BM 法と異なる点は 2 つあり、前染色にはビクトリア青、媒染にはピクリン酸を用いている。また媒染と脱色をピクリン酸で同時に行うことでステップ数を少なくしているのが特徴的である⁷⁾。

(2) 脱色液の種類とその注意点

1) 各種脱色液の種類

①脱色操作の重要性

脱色操作はグラム染色を行う上で最も重要な操作である。エタノール脱色を行う場合はエタノールの濃度が高い方が脱色時間は短くなり、Neido は 80% 濃度が最も良いとしているが⁸⁾、Hucker らは 95% 濃度が

表2. グラム染色で確認される微生物の形態的特徴と表現法 (文献13より抜粋し一部編集)

染色の様式を示す表現	
染色性	均一, 不均一, 両端, ビーズ状, 斑点, 縞状
形	丸い, 球菌状, 球桿菌, 桿菌, フィラメント, 酵母状
菌の辺縁	丸い, 尖っている, 先が細い, 平坦, 棍棒 (膨化), 凹む
菌の幅員	平行, 卵形 (膨化), 凹む, 不均一
菌の形	直線, 湾曲, らせん
多形性	適当な表現
大きさを示す表現	
菌全長	微少 (<0.3 μm), 小型 (0.3 ~ 0.5 μm), 中型, 大型
菌の長さ	短い (0.5 ~ 1 μm), 中型, 長い, フィラメント (10-30 μm)
幅員	細い, 中型, 厚い
多形性	適当な表現
所見上の特徴	1つの, ペア, 連鎖, 4つの, 集塊, 柵状, 漢字, 小塊, V字, L字, Y字
芽胞	丸い, 卵形, 端在, 亜端在

最も良かったと報告している⁹⁾。また, Conn はエタノールに近い脱色液としてイソプロピルアルコール・メタノールで脱色する方法を報告している¹⁰⁾。BM法のところで前述したように現在はアセトン・アルコールが短時間で脱色できるため推奨されている⁶⁾。Kisskalt はアルコールの種類を変更して脱色力の検討をしているが, エタノールが最も良く, 次いでメタノール, プロパノール, ブタノール, アミルアルコールの順に脱色力が弱くなると報告している¹¹⁾。このように脱色操作だけでも多くの研究があり脱色操作が非常に重要であることが伺える。

②脱色操作の注意点

脱色操作が上手くいかない場合には染色結果に不具合が生じることになる。そのため脱色時間は材料の種類や標本の厚さによって左右される。喀痰と髄液では材料中に存在する白血球を初めとした生体成分が大きくことなるので同じ脱色時間にすると液状検体である髄液の方がより脱色作用を強く受けることになるため脱色時間は短めに設定する方がよい。逆に, 粘性の高い喀痰を髄液の脱色時間と同じにすると脱色不十分となりグラム陰性菌が陽性菌として染まる可能性があるので注意したい。

3. グラム染色所見を用いた菌種推定

グラム染色を用いての菌種推定で重要なのは菌の特徴を系統立てて分類していくことである。最も分かりやすいのは *Staphylococcus* と *Streptococcus* の違いである。双方ともグラム陽性球菌であるが集塊状になる *Staphylococcus* と違い, *Streptococcus* は数珠状に連鎖形成を作ることが多く両者の鑑別材料に用いる

ことができる。いくつかその特徴について説明をしていく。

(1) グラム染色所見の表現方法

グラム染色は主観的要素が強い検査であるので, 特徴を染色性や1つ1つの形態や分裂様式も含めて所見確認を組み合わせることで, より客観的に捉えることが可能である。ASMの *Clinical Microbiology Procedure Handbook, 3rd. edition* には以下の点について所見を分別されて記載されている¹³⁾(表2)。

1) 染色性の表現

①染色態度: 均一, 不均一, 両端, ビーズ状, 斑点および縞状。

②菌の形状: 球状, 球菌状, 球桿菌, 桿菌, フィラメントおよび酵母様。

③菌辺縁の形状: 丸い, 尖っている, 先が細い, 平坦, 棍棒 (膨化) および陥没。

④菌の幅員: 平行, 卵形 (膨化), 凸凹, および不均一。

⑤菌のシルエット: 直線状, 湾曲状, 螺旋状, 多形性。

2) 菌の大きさについての表現

①菌1つ1つの長さ: 微少 (<0.3 μm), 小型 (0.3 ~ 0.5 μm), 中型および大型。

②菌または菌塊の長さ: 短い (0.5~1 μm), 中型, 長いおよびフィラメント状 (10~30 μm)。

③菌の幅員: 細い, 中型および厚い。

④特徴的な形状表現: 1つの, ペア, 連鎖, 4つの, 集塊, 柵状, 漢字, 小塊, V字, L字, Y字および多形性。

⑤芽胞の形状と位置: 球状または卵形。端在または



図1. 憩室炎患者の血液培養液から検出された *Clostridium ramosum* (BM法, 1000倍)

芽胞が先端で楕円形の芽胞が見られる。グラム染色をすると、菌の一端が赤くグラム陰性に確認されるものがある。

亜端在。

(2) グラム陽性球菌

1) *Staphylococcus* とその類似菌

Staphylococcus は集塊形成を起こし、多くが4~無数の菌塊として確認される。Williamらは155症例のうち74例で *Staphylococcus* は全て集塊状形成をしたと報告¹²⁾している。この研究では *Staphylococcus* 以外の6.7%に集塊状形成と確認されたものには Group D Streptococci や Group A および Group D 以外の Streptococci, Viridans group streptococci や *Peptococcus* も含まれている¹²⁾。

2) *Streptococcus* とその類似菌

Streptococcus の特徴は菌の形態とレンサの長さにある。血液培養ボトルを対象にした場合、Viridans group Streptococci や β -Streptococci の多くは長い連鎖を形成するが、*Enterococcus* の場合は短い連鎖を形成する。また、形態的特徴の一つ一つの菌は円形のものが多いが、Viridans Streptococci や *S. pneumoniae*, *Enterococcus* では卵形から楕円形を形成する。*Streptococcus anginosus* group や Nutritionally variant *Streptococcus* においては不染色のものがありグラム陰性菌として確認されるものも存在する。このような形態的特徴について細分化しているものは無い。

(3) グラム陽性桿菌

グラム陽性桿菌の菌種を区別する場合は、菌の大きさや幅に加えて、分裂の形態、芽胞があればその形と位置確認すると良い。

1) 大型の桿菌

Clostridium や *Bacillus* は芽胞形成する大型のグラム陽性桿菌で直列またはV字状で確認される。*Clostridium* や *Bacillus* は芽胞の位置や形が菌種によって特徴になるので、菌の大きさと芽胞の状態を確認すると良い。最終的に *Clostridium* は嫌気条件で、*Bacillus* は好気条件でのみ発育することで確認ができる。

①代表的な有芽胞菌

a) *Clostridium* 属

Clostridium perfringens では楕円形で端在、*Clostridium ramosum* では楕円形で亜端在に確認ができる。ただし、直接標本において *C. perfringens* の場合は芽胞が明瞭に確認できないものや、*C. ramosum* ではグラム陰性に染まるものもあり典型像として確認されないことがある(図1)¹⁴⁾。

b) *Bacillus* 属

Bacillus 属の多くは楕円形の芽胞を持ち、芽胞の位置は菌種によって異なる。*Bacillus cereus* では中央から亜端在で、*Bacillus subtilis* では端在である¹⁵⁾。

②主な無芽胞菌

Lactobacillus は大型のグラム陽性桿菌として、主に消化器材料や女性の生殖器材料で確認される。形態的に *Clostridium* や *Bacillus* と類似しており、両者で芽胞形成が明瞭で無い場合は鑑別が困難である。

2) 主な小型桿菌

グラム陽性の小桿菌は通常無芽胞菌が多く、遭遇する機会の多い *Corynebacterium* はその代表的な菌である。*Corynebacterium* は棍棒状でV字に分裂をした形で観察され鑑別しやすい菌であるが、短い *Propionibacterium* と区別は難しい¹⁶⁾。また、遭遇する機会は少ないが *Listeria* は臨床的意義の高い菌種である。*Listeria* は短桿菌で菌の幅は細いのが特徴である。特に細菌性髄膜炎時に髄液グラム染色で *Listeria* が疑われる場合は非常に有用性の高い結果になる。材料によっては *Bifidobacterium* との鑑別が困難な場合がある。

3) 分岐状桿菌

Nocardia や *Tsukamurella*, *Streptomyces*, *Actinomyces* は分岐状桿菌として確認される(図2)。*Nocardia* や *Tsukamurella*, *Streptomyces* は抗酸性を示すためクリスタル紫が縞状に確認されることがある。*Nocardia* と *Actinomyces* は *Nocardia* の抗酸性を利用して、通常 Kinyoun 染色を実施し、陽性であれば¹⁷⁾ *Nocardia* を疑う。

(4) グラム陰性球菌

Neisseria や *Moraxella catarrhalis* が遭遇する機会

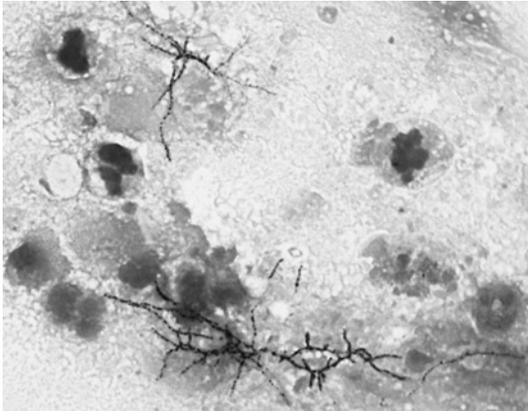


図2. 肺ノカルジア症患者の喀痰から検出された *Nocardia* の菌糸 (BM法, 1000倍)
抗酸性を有しているため、グラム陽性が縞状に染まっている。

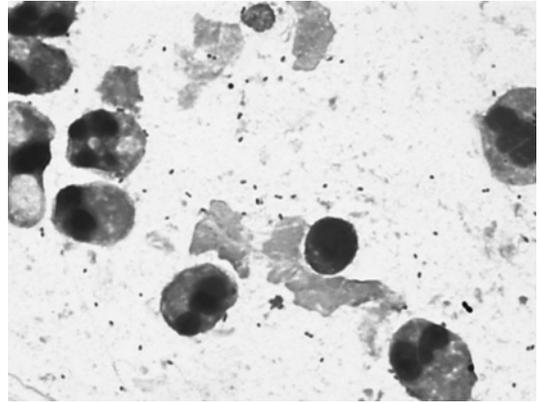


図4. 成人市中肺炎患者の喀痰で確認された *Haemophilus influenzae* (BM法, 1000倍)
短桿菌から球菌に確認される非常に小さいグラム陰性桿菌

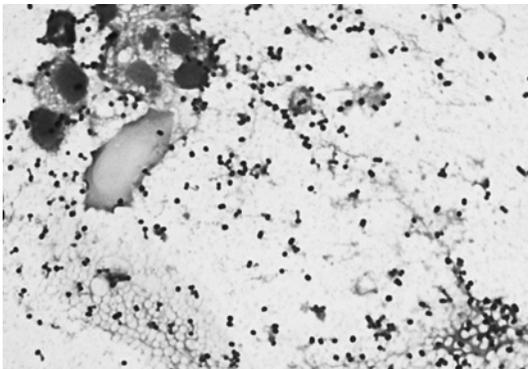


図3. 腹膜炎患者の腹水から検出された *Acinetobacter baumannii* (BM法, 1000倍)
グラム陽性球菌に確認される。報告によればグラム陽性球菌と間違っ報告されることがあり報告時に注意した菌である。

が多いが、両者の区別をする際には材料が必要な情報となる。尿道分泌物で確認された場合は *Neisseria gonorrhoeae* を強く疑い、膿性痰で確認された場合は *M. catarrhalis* を強く疑う¹⁸⁾。ただし、呼吸器材料の場合は *M. catarrhalis* と非病原性 *Neisseria* との区別が必要であるが、非病原性 *Neisseria* は集塊形成をしていることが多く確認される。髄液や血液培養からグラム陰性球菌が確認された場合は *Neisseria meningitidis* を疑う。*Acinetobacter* はブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に属するが、*Neisseria* に類似したグラム陰性球菌として確認されることがある (図3)¹⁹⁾。

(5) グラム陰性桿菌

グラム陰性桿菌は腸内細菌科細菌、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌、HACEK、*Campylobacter* や *Helicobacter* など菌種が多く形態的特徴を細かく観察することが重要である。特に形態的特徴を考慮した上で、疾患名や検出材料を加えて考えることが重要である。

例えば、*Campylobacter* のようならせん状桿菌は特徴的であり初級者でも確認がしやすい微生物の一つであり、下痢便から確認されたのであれば推定がしやすい。

Haemophilus は長さが3μm以下で腸内細菌科細菌と比べても小さい桿菌であるが、肺炎患者の喀痰および小児の髄液から確認された場合は推定がしやすい (図4)。*Pseudomonas aeruginosa* はグラム陰性桿菌の中でも多様な形態的特徴を持つ菌であるが、典型的なものになると腸内細菌科細菌と比べて、湾曲があり菌の両端が細く尖っているものも確認される¹³⁾ ことが多いため比較的推測しやすい菌種の一つであると考えられる (図5)。特に、慢性期気道感染症患者の喀痰では菌体周囲が赤色化しバイオフィーム形成が確認できる場合には *P. aeruginosa* と推測ができる。

図6および図7にグラム染色所見に基づいた菌種推定のためのフローチャートを作成したので参考されたい。

4. グラム染色で染まる微生物成分以外の染色像

グラム染色所見で最低限報告が必要な項目として、微生物および細胞の数量、細胞の種類、特徴のある菌

の形態表示である。加えて、細胞の以外の成分である滲出液の状態や結晶成分について確認されれば報告をしておきたい。

(1) 血球成分

後染色の単染色のため細胞成分はギムザに比べて明瞭には見えず、クロマチン構造もわかりにくくなっている。多核白血球の場合好中球と好塩基球、好酸球の区別は付かず、多核白血球が細菌性肺炎か好酸球性肺炎由来のものか判断は困難である。

単球や組織球は多核白血球より少し大きめに見え、

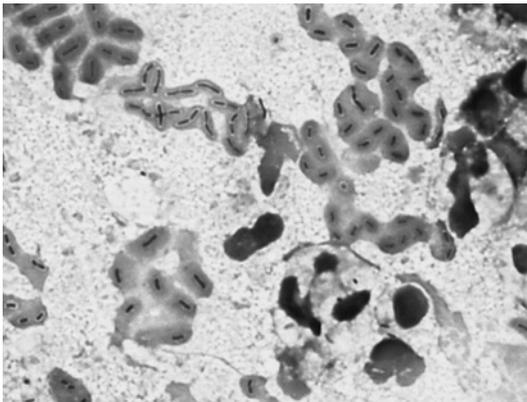


図5. 慢性気道感染症患者の喀痰から検出されたムコイド型の *Pseudomonas aeruginosa* (BM法, 1000倍) 菌の一部は湾曲をし、先端は細いものが多い。また菌周囲にはムコイド様のバイオフィルム形成が確認できる

リンパ球は単核で小細胞として確認される。赤血球の多くは染色液で溶血してしまうが確認されることもある(表3)。

(2) タンパク成分

炎症性に滲出したフィブリンや粘液は後染色液により染まって見える。中でもフィブリン成分は濃染したもので確認されることが多く、大葉性肺炎時には赤みが強いフィブリン成分が多く確認される。菌体から産生される毒素についても赤く染まって確認ができる。

(3) 結晶成分

結晶成分は、染色の過程で溶けるものは染まらないが、大きくはその形態を維持したまま確認される。例えば、ビリルビンや尿酸では黄色に、ピロリン酸カルシウム塩は無色透明に確認される(図8)。

(4) アーチファクト

クリスタル紫の結晶成分は針状や斑点状、放射状に確認されることがある(図9)。見間違えそうな事象としては、針状や放射状結晶は *Nocardia* や *Actinomyces* と斑点状は *Staphylococcus* などグラム陽性球菌がある。

5. グラム染色のもつ感度

(1) グラム染色の検出限界

材料中に菌が存在する場合は理論上グラム染色で微生物が確認できることになるが、菌数が一定以上増えた場合に確認しやすくなる。グラム染色の最小検出感度の報告は材料により差はあるが $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml である²⁰⁾²¹⁾。

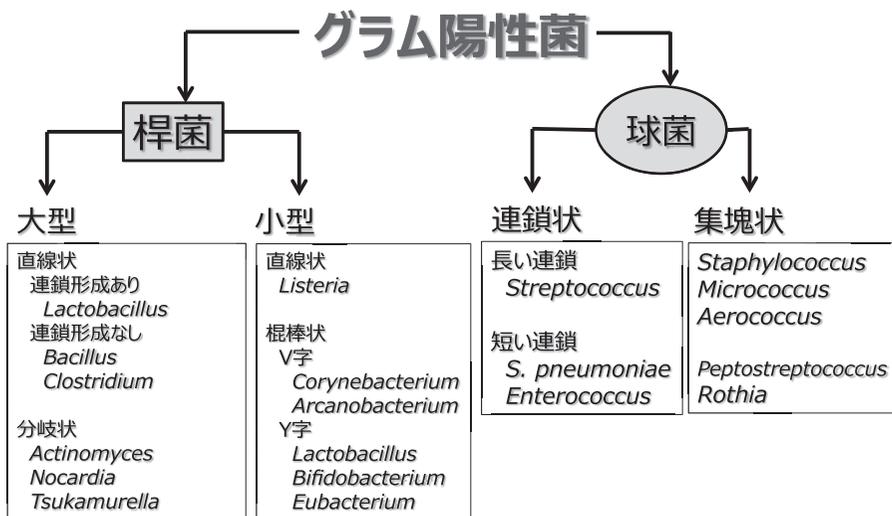


図6. 主なグラム陽性菌とその染色像の特徴

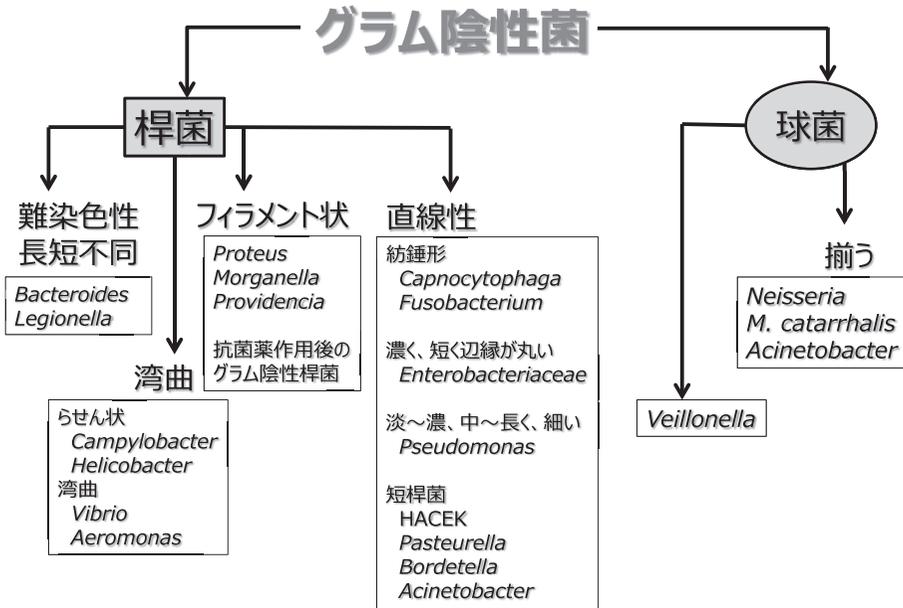


図7. 主なグラム陰性菌とその染色像の特徴

表3. グラム染色報告の様式と報告対象となる内容（文献13より抜粋し一部編集）

細胞数 (100倍)	報告する細胞種	菌数 (1000倍)	菌の形態
1+ (殆どない) : <1 個/視野	扁平上皮	細菌, 真菌などの微生物の種類	グラム陽性球菌
2+ (たまにある) : 1~9 個/視野	多核白血球		双球状, 連鎖, 集塊
3+ (中等度) : 10~25 個/視野	赤血球	1+ (殆どない) : <1 個/視野	グラム陽性桿菌
4+ (多数) : >25 個/視野	正常細胞 異形細胞	2+ (たまにある) : 1~5 個/視野	大型, 小型, 分岐, 放線状
		3+ (中等度) : 6~30 個/視野	グラム陰性球菌
		4+ (多数) : >30 個/視野	双球状
			グラム陰性桿菌
			桿菌, フィラメント, 多形性グラム不定, 多染色酵母, 発芽状, 仮性菌糸

この検出限界値より下回るものは、少量の菌数で感染が成立し発病を起こす微生物、抗菌剤投与後、材料採取が不適切で分量の菌量が確保できていない場合である。

(2) グラム染色性による感度の違い

通常、後染色が赤色であるので対比色としてのグラム陽性菌の方がグラム陰性菌に比べて微生物が確認しやすい²²⁾²³⁾。

(3) 感染臓器別の感度特性

グラム染色の感度は感染臓器別の感度特性を持ち、さらに起炎菌によっても検出感度に差がある。

例えば成人の細菌性髄膜炎の場合は *S. pneumoniae*

は90%, *H. influenzae* は86%と高い感出感度を示すが、*N. meningitidis* では75%, *Listeria monocytogenes* では30%と検出感度が低下する²⁴⁾。一方、*S. pneumoniae* については疾患別に感度が異なり、急性中耳炎の耳漏では89%である²⁵⁾が、肺炎の喀痰であれば62%と感度が下がることが知られている²⁶⁾。これは感染臓器内の菌量や菌濃度、有症状に至るまでの経過により左右されると思われる。また、抗菌剤の前投与があれば更に感度が下がるため抗菌剤の投与前に検体採取を実施することが望ましいと言える²⁷⁾。

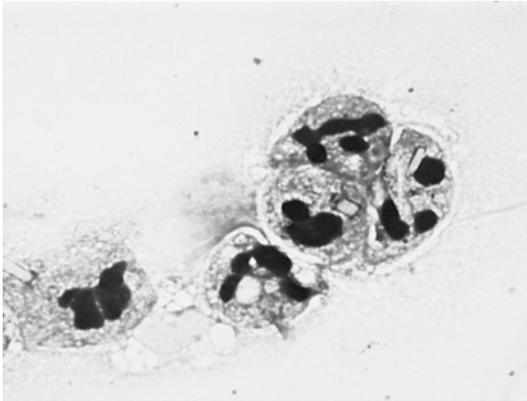


図8. 偽痛風患者の関節液で確認されたピロリン酸カルシウム塩の結晶成分 (BM法, 1000倍)
角形の無色透明の結晶成分が確認される

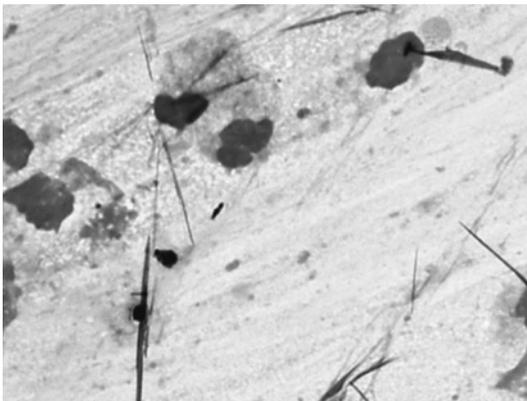


図9. 針状に確認されたアーチファクト (BM法, 1000倍)
クリスタル紫の結晶で針状に確認される。菌は大きく不整形であり結晶と確認ができる。他には斑点状や放射状のものも確認されることがある

(4) 材料の質による感度の特性 (特に喀痰について)

感染臓器と疾患名, 起炎菌の全てが同じ場合でも材料採取の条件が変われば検出感度も異なることがある。Rainらの報告では感度62%である²⁶⁾が, Ewigらの報告では感度50%とRainらの報告に比べて12%も検出感度が低いことが確認される²⁸⁾。Rainらの報告では全て良質な喀痰で感度を求めているが²⁶⁾, Ewigらは良質な喀痰は全体の20%しか無かったと報告²⁸⁾しており, 肺炎球菌性肺炎で喀痰の質が悪い場合には検出感度が下がることが予想される (表4)。

表4. 肺炎球菌性肺炎時の喀痰グラム染色の感度

報告者	症例数	良質な痰の提出率	感度
Reinら	42	100%	62%
Ewigら	116	20%	50%

6. 材料評価とスコアリングシステム

(1) 品質管理としてのグラム染色所見の活用

肺炎の診断を行う上で喀痰培養の有用性は高い。日本ではGeckler分類を用いる施設が多いが, Gecklerらはグラム染色を用いて喀痰の品質管理を多核白血球と扁平上皮の数量でGradingを行い, 成人市中肺炎では品質評価が良い喀痰では *S. pneumoniae* や *H. influenzae* が多く検出されたと報告している²⁹⁾。BartlettはGecklerらより以前にグラム染色を用いて喀痰の品質管理を行っている³⁰⁾が, 上気道に存在する常在菌が汚染する可能性があり多核白血球や扁平上皮により培養結果に適した喀痰かどうか評価することが不必要な培養や抗菌剤の過剰投与を防ぐことができる。その後, 色々な研究者により喀痰の品質管理が評価されている^{31)~33)}がcriteriaこそ異なるが, 喀痰の材料品質管理の重要性については同一意見を持っている (表5)。

(2) グラム染色によるスコアリング利用の感染症診断

グラム染色所見をスコアリングし感染症診療のために用いたものとして, 代表的なものはNugent Scoreがある。Nugentは妊婦の膈分泌物について *Lactobacillus* 様をした大型のグラム陽性桿菌と, *Gardnerella vaginalis* または *Bacteroides* 様の桿菌, *Mobiluncus* 様の三日月状グラム不定性桿菌の数量を合計してスコアリングし, スコア7以上の場合に細菌性膈症を強く疑う結果になった報告している³⁴⁾。スコアリング化は施設間差を無くす上では有用性の高い診断検査の手法の一つである (表6)。

7. 塗抹検査の付加価値を活かした微生物検査

グラム染色をはじめとして, 塗抹検査は微生物検査の中でも検査結果の迅速化に対応ができる。

問題点としては再現性が安定していないこと, 施設間差, 実施者間差が挙げられる。臨床検査は診療情報として再現性や精度が高いものに臨床的価値が高くなるため, 臨床検査として確立されているものかどうかを考えた場合に必ず貢献できているものか疑問視している有識者も多い。米国では塗抹検査は法律上で微生物検査技師しか行うことが出来ないため, 感染症ガイ

表5. Bertlett および Geckler らの提唱している顕微鏡下で行う喀痰の材料評価

Bertlett の品質評価			
スコア (粘液ありの場合)	1 視野 (100 倍) 当りの数		評価
	扁平上皮細胞	多核白血球	
-1 (0) 点	>25	10-25	悪い
0 (1) 点	10-25	10-25	
0 (1) 点	>25	>25	良い
1 (2) 点	10-25	>25	
Geckler の品質評価			
グループ	1 視野 (100 倍) 当りの数		評価
	扁平上皮細胞	多核白血球	
6	<25	<25	
5	<10	>25	良い
4	10-25	>25	
3	>25	>25	
2	>25	10-25	悪い
1	>25	<10	

表6. Nugent スコアによる細菌性膣症の評価

スコア	<i>Lactobacillus</i> 様の菌 *1	<i>Gardnerella</i> 様または <i>Bacteroides</i> 様の菌 *2	<i>Mobiluncus</i> 三日月様の グラム不定性桿菌 *3
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ または 2+
2	2+	2+	3+ または 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

*1+ *2+ *3 の合計でスコア化

ドラインやレビューにおいてもその重要性についても疾患による差があり、市中肺炎では、患者管理に伴う血液検査データや尿中抗原、患者背景による抗菌薬の選択を中心に記載があり、グラム染色については言及された記載はないのが現状である。

グラム染色は緊急性が高い感染症に適切に使うことが感染症に対する初期治療に必要である。

8. グラム染色の結果をどう判断するか？

(1) 目的菌に応じた菌を探す

グラム染色は微生物が確認された場合に有用であり、疾患別に検出頻度の高い微生物が確認された場合、または検出頻度が低く初期治療を行う上で想定されていない微生物が検出された場合である。ただし、検出頻度については患者背景によって変化が生じること

がある。例えば、髄膜炎について考えてみる。細菌性髄膜炎の場合には市中感染と院内感染、発症年齢により起炎菌の動向が変わる²⁴⁾³⁵⁾。市中感染例では、新生児で *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, 乳幼児で *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, 成人で *S. pneumoniae* が検出される機会が多くなり²⁴⁾、院内感染では *P. aeruginosa*, *S. aureus* や Coagulase negative *Staphylococcus*, *P. acnes* が検出される機会が多くなり³⁵⁾市中感染時とは異なる。鏡検を行う場合には依頼情報に基づいた見方も必要になってくる。

(2) グラム染色の結果を急ぐ症例とはどういったものか

グラム染色が有用な症例として以下の状況が考えられる。ア) 重症感染症患者で即座に治療方針の決定が必要な症例 (細菌性髄膜炎や壊死性筋膜炎など) であ

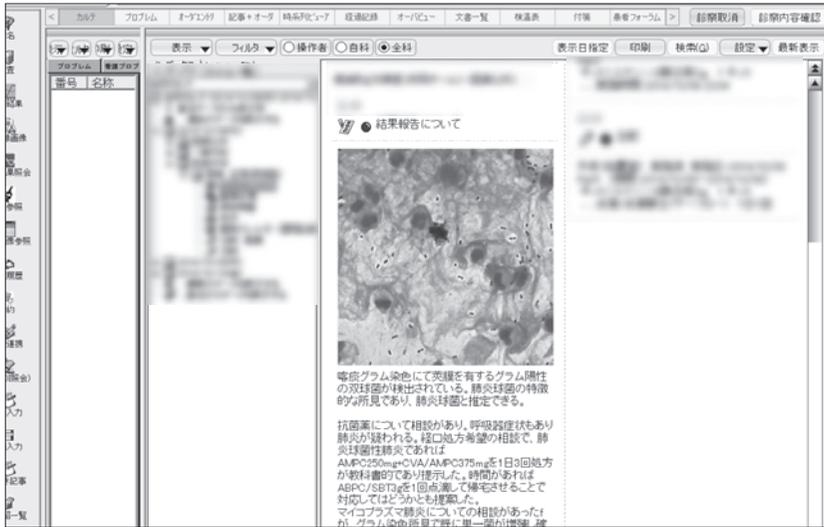


図 10. 電子カルテを利用したグラム染色所見の報告

ること、イ) 内科的治療を優先的に行う疾患(肺炎や単純性腎盂腎炎、排膿ができない膿瘍など)で抗菌薬の選択を絞る必要がある場合で、ウ) 菌血症時の血液培養陽性時に抗菌薬の投与が開始されていない場合、エ) 初期抗菌薬が明らかに効果の無いものと判断される場合(グラム陽性球菌による感染症を予想して初期治療でVCMを使用しているが、実際にはグラム陰性桿菌が無菌材料から確認された場合)。オ) 通常検出頻度が低く、起炎菌として想定されにくい菌が検出された場合(関節液からの酵母様真菌)といった日常的に微生物の検出が経験されるが、検出頻度の稀な微生物が見つかった場合については報告を急ぐ必要がある。また、グラム染色結果だけでは重症感染症かどうかの判断はできないので、検査結果は患者の状態を考慮した上で対応が必要である。

9. グラム染色結果が培養結果と不一致になった場合の原因

日常業務の中で、グラム染色の結果と培養結果が一致しない場合があるが、原因として①元々グラム染色性が不安定な菌(*G. vaginalis*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter* など)の場合¹³⁾¹⁴⁾³⁶⁾、②*S. pneumoniae* が自己融解を起こし検出されない³⁷⁾³⁸⁾、またはグラム陰性球菌として確認され気付かなかった場合、培地選択に問題があり培養で検出できなかった場合などがある。この場合の対処として、鏡検を再度行い確認する、染色を繰り返す、培養を継続し菌

量確保、培地の選択に問題が無かったのか検討してみると良い。いずれにしても一度確認した標本は直ぐに廃棄せずに培養が終了するまで残しておくことと良い。また、検査感度の問題もあり培養結果に塗抹検査結果を上塗りするような作業はあってはならないと思われる。

10. 電子カルテへの報告

電子カルテ化が進み、微生物検査の結果も数値や菌種名以外にも画像配信や添付を行うことでよりリアリティのある分かりやすい報告が可能になった。グラム染色所見の方向もその一つであり、カルテ記事に画像を取り込み、所見の詳細を記入することでグラム染色を普段行わない医師へ多くの情報を提供することができる。

当院も電子カルテ上に画像とコメントを記載するが、コメントについてはグラム染色結果の報告に加えて、推定菌の情報、採取した検体情報および推定菌に対する第一選択薬の情報、微生物検査のプロセスなど記載している。

主観的な検査結果であるグラム染色結果をしっかりコメントすることで意思伝達の不足や誤解が減ると思われる(図10)。

最後に、グラム染色は古典的な手法であるが、感染症診療や微生物検査には欠かすことのできない検査であり、今後もっと発展させ診療に役立つものにして、患者の予後改善に役立てていきたい。

文 献

- 1) 東篠尚子. 2014. 新しい検査法平成 26 年度診療報酬改定—検査にかかわる改定について. モダンメディア 62 (12): 369-373.
- 2) Dellit, TH., RC. Owens, JE. McGowan, et al. 2007. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. Clin. Infect. Dis. 44: 159-177.
- 3) 忽那賢志, 笠原 敬, 山本 剛. 2014. 臨床現場で有用な染色手技 (グラム染色, 他). 感染症診療 update. 日本医師会雑誌 143: S3-S16.
- 4) 一般社団法人日本臨床衛生検査技師会. 2015. 微生物検査報告書. 平成 26 年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書.
- 5) Davies, J.A., G.K. Anderson, T.J. Beveridge, et al. 1983. Chemical Mechanism of the Gram Stain and synthesis of a new electronopaque maker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain. J. Bacteriol. 156: 837-845.
- 6) B, JW., T M. 1952. THE GRAM STAIN. Bacteriol. Rev. 16: 1-29.
- 7) 山本 剛. 2009. 3. 試薬・方法による染色性の差異. Medical Technology 37 (9): 922-926.
- 8) NEIDE, E. 1904. Die Alkoholentfärbung der nach Gram gefärbten Bakterien als Speciesdiagnose, in Verbindung mit einer Untersuchung der für die Gramfärbung in Betracht kommenden Faktoren. Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. I. Orig. 35: 508-521.
- 9) HUCKER, G.J., H.J. CONN. 1927. Further studies on the methods of gram staining. N.Y. (Geneva) Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 128: 1-34.
- 10) CONN, H.J. 1928. A new substitute for ethyl alcohol in the gram stain. Stain Technol. 3: 71-72.
- 11) KISSKALT, C.. 1901. Eine Modifikation der Gramschen Färbung. Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. I 30: 281-284.
- 12) A, WA., DG. M. 1978. Efficacy of Direct Gram Stain in Differentiating Staphylococci from Streptococci in Blood Cultures Positive for Gram Positive Cocci. J. Clin. Microbiol. 7 (2): 111-113.
- 13) Gracia, LS. 2010. Staining Procedure, 3.2.1. Gram Stain. In: Clinical Microbiology Procedure Handbook. Vol. 1, 3rd ed. AMS Press, Washington DC.
- 14) S, DL., AE. B, et al. 2011. 50 *Clostridium*. p. 834-857, In: Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. AMS Press, Washington DC.
- 15) L, NA., AR. H, et al. 2011. 24 *Bacillus* and Other Aerobic Endospore-Forming Bacteria. p. 381-402, In: Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. AMS Press, Washington DC.
- 16) W, WG, E K. 2011. 49 *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and Other Non-Spore-Forming Anaerobic Gram Positive Rods. p. 817-833, In: Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. AMS Press, Washington DC.
- 17) B, BL., L B. 1994. *Nocardia* Species: Host-Parasite Relationships. Clin Microbiol Rev 7 (2): 213-246.
- 18) A, SM., SB. N, et al. 1990. Interpretation of Gram-Stained Sputa Containing *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. J Clin Microbiol 28 (11): 2559-2560.
- 19) C, MZ, PR H, et al. 2001. Severe Community-Acquired Pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. Chest. 120: 1072-1077.
- 20) D, SA., RA. E, et al. 1998. Microscopic Examination and Broth Culture of Cerebrospinal Fluid in Diagnosis of Meningitis. J Clinical Microbiol. 36 (6): 1617-1620.
- 21) W, ML., L G. 2004. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections in Adult Patients. Clin Infect Dis. 38: 1150-1158.
- 22) D, KA., MJ. E, et al. 2005. Ventilator-Associated Pneumonia in Injured Patients: Do You Trust Your Gram's Stain? J Trauma. 58: 462-467.
- 23) K, TR. 2006. Can empiric broad-spectrum antibiotics for ventilator-associated pneumonia be narrow based on Gram's stain result of bronchoalveolar lavage fluid. The American Journal of Surgery. 192: 812-816.
- 24) T, AR., BJ. H, et al. 2004. Practice Guidelines for the Management of Bacterial Meningitis. Clin Infect Dis 39: 1267-1284.
- 25) M, JS, PY Chen, et al. 2000. Invasive Streptococcus pneumoniae infection of children in central Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 33 (3): 169-175.
- 26) R, MF., JM. G, et al. 1978. Accuracy of Gram's Stain in identifying Pneumococci in Sputum. JAMA 239 (25): 2671-2673.
- 27) M, DM., R M. 2004. Diagnostic Value of Microscopic Examination of Gram-Stained Sputum and Sputum Cultures in Patients with Bacteremic Pneumococcal Pneumonia. Clin Infect Dis 39: 165-169.
- 28) E, S, M S, et al. 2002. Applying Sputum as a Diagnostic Tool Pneumonia; Limited Yield, Minimum Impact

- on Treatment Decision. *Chest* 121 (5): 1486-1492.
- 29) Geckler, R.W., D.H. G, et al. 1977. Microscopic and bacteriological comparison of paired sputa and transtracheal aspirates. *J Clin Microbiol.* 6: 396-399.
- 30) Bartlett, R.C.. 1974. *Medical microbiology: quality, cost and clinical relevance.* p. 24-31, John Wiley & Sons, New York.
- 31) Murray, P.R., J.A. Washington. 1975. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin. Proc.* 50: 339-344.
- 32) Van Scoy, R.E.. 1977. Bacterial sputum cultures, a clinician's viewpoint. *Mayo Clin. Proc.* 52: 39-41.
- 33) Heinenan, H.S., R.R. Radano. 1979. Acceptability and cost savings of selective sputum microbiology in a community teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* 10: 567-573.
- 34) N, RP., MA. K, et al. 1991. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. *J Clini Microbiol.* 29 (2): 297-301.
- 35) van de B., D, JM. D., et al. 2010. Nosocomial Bacterial Meningitis. *NEJM* 362: 146-154.
- 36) Esteban, J., G. García-Calvo, et al. 1996. Failure of Gram Stain To Detect Propionibacterium acnes in Specimens from Clinically Significant Infections. *J Clini Microbiol.* 34 (8): 2051.
- 37) Barrett-Connor, E. 1971. The Nonvalue of Sputum Culture in the Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 103: 845-848.
- 38) T, B, R M, et al. 1974. The Value of Respiratory Tract Bacteriology in Pneumococcal Pneumonia Among Navajo Indians. *Am. Rev. Respir. Dis.* 109: 577-578.