

「グラム染色」いかに実施し、いかに伝えるか！ 情報発信のコツ

◎永田 邦昭¹⁾

地方独立行政法人くまもと県北病院機構公立玉名中央病院 診療技術部¹⁾

患者検体の直接塗抹標本観察は、病巣を顕微鏡でのぞくと言える作業であり、グラム染色標本にはその時点での患者の病態を反映する様々な情報が含まれる。最も“臨床に即した検査”であり、医師との情報のやり取りには欠くことのできないツールである。グラム染色標本から多くの情報を掘り起し情報発信して行くためには、観察に適する検体の選び方、塗抹方法、染色のコツを理解し、再現性のある染色技術を習得する必要がある。本セミナーでは基本的な標本の作製法から染色像の見方、考え方、患者病態も踏まえた結果解釈法について紹介する。

【検体の肉眼的観察と材料の質に応じた塗抹法】

液状検体や膿汁であれば検体中の菌分布はほぼ均一と考えられるが、喀痰の場合、下気道で生成された痰が常在菌の棲息する上気道を経由して喀出されるため、採取された痰の塊が病巣由来のものばかりとは限らない。このように菌分布の不均一な検査材料では、材料の肉眼的な観察が検査結果を大きく左右することになる。また塗抹操作は検体の性状により加減が必要であり、一般的には膿性度や粘稠度が高いほど少量の検体を広範囲に(薄く)塗り広げる必要があるが、塗抹する際に濃淡(濃度勾配)をつけておくことにより、顕微鏡で観察する際に最も見やすい部分を選択して検鏡することができ失敗を少なくすることができる。

【染色(脱色)のコツ】

グラム染色で最もミスが起きやすい操作は脱色である。標本面に残った水分で脱色液が薄められると脱色力は弱くなるどころか逆に増強され、グラム陽性菌が陰性化する。これが脱色ミスの主要な原因である。対処法は①脱色前に標本上に残った水滴を良く切る。②最初の脱色液の注ぎ方が重要で、塗抹部分のみではなく、一気に注いで一旦スライドグラス全面を脱色液で満たす。一気に十分量の脱色液を注ぐことで残った水分による希釈の影響を最低限に抑えることができる。一旦全面を満たした後には脱色液を追加しながら前染色液を洗い流す。ここを守れば初心者でも再現性のある染色結果を得ることができる。

【顕微鏡的に検体の品質評価をした上での結果解釈と情報発信】

検査情報を発信するにあたって、患者さんに“悪さ“をしている菌(抗菌薬を使用すべき菌)を絞り込んで報告

することが大切である。近年声高に叫ばれている AMR 対策や AST 活動において検査技師が担う重要な役割である。喀痰などの常在菌混入頻度の高い材料では、感染に伴う炎症の指標となる白血球数と常在菌混入の指標となる扁平上皮細胞数を基準に、喀痰の品質を評価(Geckler 分類)し、白血球に富む膿性部分に選択的に存在する菌を推定起炎菌として検索する。ただし、喀痰に限らず免疫不全の患者あるいは劇症型感染症などでは感染局所に白血球が認められにくいことも念頭に置く必要がある。また誤嚥による炎症の特徴を理解すること、誤嚥の初期に認められる炎症は、誤って下気道に落ち込んだ多種類の常在菌や扁平上皮を白血球が取り囲み排除しようとする異物排除の段階であり、種々雑多な菌の貪食像が観察され、膿性痰であるにも関わらず培養では常在菌しか検出されない。この時点ではこの常在菌すべてが炎症の原因と考えられ、ある特定の細菌が増殖(感染)した状態ではない。多くの場合自然免疫や初期治療(狭域抗菌薬)で排除され、一時期炎症細胞(白血球)のみが観察されて菌が存在しない時期も存在するが、誤嚥を起こす基礎疾患が改善されない限り新たな誤嚥を繰り返す。また注意すべきことは、常在菌と共に一過性に口腔内に存在していた少数の緑膿菌や MRSA などが培養で検出された場合、必要のない抗菌薬が投与されかねないということである。耐性菌による院内感染防止対策の意味では報告せざるを得ないが、あくまで起炎菌(抗菌薬治療対象菌)検索とは区別しなければならない。“誤嚥による炎症が疑われます”とコメントはつけて対処はするものの難しい問題である。以上結果解釈の難しい喀痰を中心に記述したが、その他の検査材料の事例はセミナー当日紹介する予定である。

【抗菌薬使用後の形態・染色性変化の解釈と活用】

最後に抗菌薬の影響によってグラム陰性桿菌はフィラメント化、球状化、バルジ化など多彩な形態変化を起こし、グラム陽性球菌はグラム陰性化や染まりが薄くなる傾向が認められ、起炎菌の推定を難しくするが、これらの変化は抗菌薬が効いている証しであり、効果判定の迅速な情報源となる。グラム染色により抗菌薬を使用すべきか否か? 抗菌薬は効いているのか? を迅速に発信できれば、日常診療のみならず抗菌薬適正使用支援(AS)活動における意義は大きい。

検査結果の解釈・臨床への報告

◎宮本 仁志¹⁾

愛媛大学医学部附属病院 検査部¹⁾

微生物検査は、感染症の診断・治療に必要な検査である。従来の培養・同定検査の重要性は変わらないが、分子生物学的手法に基づく遺伝子検査が現在普及してきている。

微生物検査には塗抹検査、同定検査、薬剤感受性検査、遺伝子検査、抗原検査があり、臨床への報告時には塗抹検査では付加価値のある報告、同定検査では起因菌および病原菌の判定、薬剤感受性検査では有効薬剤はもとより耐性菌においては耐性機序などが求められる。また検査結果を解釈する上で、各検査におけるピットフォールの存在を知ることが重要であり、ピットフォールを理解していることで、臨床への報告がより確実なものになると考える。今回はピットフォールを中心に考えてみたい。

1. 塗抹検査におけるピットフォール

検体の品質（適正さ）の判定、細菌や炎症の有無と起因菌の推定する検査であるが、以下の項目が考えられる。

- ① グラム染色で推定可能な菌種と類似菌種（類似物）がある
- ② グラム染色で染まらない細菌がある
- ③ グラム染色で見えるのに発育しない細菌がある
- ④ 細菌以外で見落としとしてはいけない所見がある

このような点が、塗抹検査においては重要であり、培養の方向づけ（培地の追加、培養条件の変更）が必要になる。

2. 同定検査・薬剤感受性検査におけるピットフォール

- ① 菌種名から自然耐性の薬剤がわかるが、菌名が間違っていると無効な薬剤を投与される場合がある
- ② 感性菌（多数）の中に耐性菌（少な目）が混在していると、スクリーニング培地を使用しなければ耐性菌を見落とす可能性がある

3. 抗原検査におけるピットフォール

イムノクロマト法を利用した、尿中抗原検査（肺炎球菌、レジオネラ）、便中抗原検査（*Clostridioides difficile*

の菌体抗原・トキシン、ノロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス）、A群溶血性レンサ球菌、*Mycoplasma pneumoniae*、インフルエンザウイルスなどの検査キットが市販されている。

- ① 各種検査キットにより、感度・特異度が異なる
- ② 検査方法により、結果が異なる（イムノクロマト法、遺伝子検査法）

4. 免疫不全患者におけるピットフォール

近年、臓器移植や自己免疫疾患に対し免疫抑制剤、抗リウマチ薬、生物学的製剤などの使用により、免疫応答低下をきたした患者による日和見感染症が増加している。日和見感染症は、宿主の免疫機能低下によって生体内や環境に常在し本来病原性を有さない弱毒菌によって引き起こされることを考慮して検査を行う必要がある。

5. 臨床からの要望

- ① 起因菌か常在菌かの情報
- ② グラム陰性桿菌の場合、腸内細菌か緑膿菌かの情報
- ③ 耐性菌およびその耐性機序等の情報
- ④ まれな菌が検出された場合の菌情報などが、臨床側から要望されている。

以上述べてきた点を考慮して検査結果の解釈・臨床への報告を行う必要がある。

嫌気性菌検査法のステップアップに向けて

◎国広 誠子¹⁾

元 山口県立総合医療センター 中央検査部¹⁾

嫌気性菌検査は、検査結果が判明するまでに時間を要し、分離される細菌も嫌気性菌のみによる場合よりも、通性菌などと数種類の嫌気性菌が分離される混合感染が多いため、検査の経費もかかる。臨床材料から分離した嫌気性菌は同定困難な菌種も多く、継代培養時に死滅し易い菌種や栄養要求の厳しい菌種も存在し、初心者が扱う検査としては、煩雑である。また、検査技師も世代交代し、前任者からの引き継ぎもされておらず、どのように検査を扱うのか、悩んでいる技師も少なくない。

今回は、各検査室で実施している嫌気性菌検査をいかにステップアップするかについて解説する。

<検体採取>

嫌気性菌感染症の多くは、化膿性感染症で、常在細菌が多数存在する粘膜面直下に膿瘍や壊死を起こす事が多いため、極力常在細菌の混入を防ぎ検査材料を採取する。検査室側では、採取部位の詳細な情報を得ることが、嫌気性菌検査の第一歩であり、嫌気性菌検査ガイドライン 2012 の検体カテゴリー別に分け、検査の方針を立てる。

<検体の輸送、保存>

嫌気性菌検査を目的とする検査材料は、ただちに嫌気培養するのが理想的である。やむなく保存する場合は、市販の嫌気性輸送容器や嫌気性輸送培地を使用し、冷蔵庫に保管する。また、滅菌試験管に吸引材料を採取する場合は、なるべく採取量を多くし、空気と遮断される部分を多くする。冷所に保存しても時間経過とともに菌量が減少するため、なるべく早く検査に着手する。

<検体のグラム染色>

嫌気性菌が存在する検査材料は、グラム染色で多数の好中球と多種類の小さな菌が認められることが多い。大腸菌のグラム染色に比較して、小さな菌が多数認められれば、嫌気性菌関与の推定報告をしても良い。

<増菌培地>

増菌培地は、嫌気性菌ガイドライン 2012 のカテゴリーA1 の検体には必要であるが、複数菌が分離される検体は、増菌培地を先行させてはならない。(検体を

増菌培地に直接入れ、発育した菌を平板培地に塗布し、嫌気培養)

<平板培地>

培地は、嫌気性に還元したものを使用するが、一旦大気中に開封すると、平板培地に侵入する空気の色度は驚くほど速いので、直ちに使用する。使用しなかった培地をそのまま冷所に保存してはならない。

<非選択培地>

非選択培地はすべての検体に使用する。非選択培地を使用せず、選択培地のみを使用すると、発育しない嫌気性菌も多数存在するので、必ず使用する。また、栄養要求の厳しい菌も多数存在するので、血液添加培地を使用し、羊血液のみを添加した培地は、発育しない嫌気性菌もあるので、注意する。

<選択培地>

複数菌が分離される検体は、材料別に選択培地を使用する。特に、口腔内常在菌に抑制を受け、発育しない嫌気性菌もあるので、必ず選択培地を使用する。

<発育した菌の嫌気性菌確認>

嫌気培養で発育した嫌気性菌の確認は、嫌気性非選択培地を使用し、それぞれ嫌気、炭酸ガス、好気培養し、確認を行う。今回のガイドラインでは、血液寒天、チョコレート寒天培地は、嫌気性菌確認のためには使用しない。

<同定検査>

同定検査では、同定困難な菌種も多く存在し、グラム染色性のみでの報告しかできない菌種も多い。ガイドラインカテゴリー別に検査を行い、数種類の嫌気性菌や通性菌による感染症と報告する。特に、嫌気性グラム陰性桿菌が多数存在する場合やガス壊疽などでクロストリディウムが存在する場合は、早急に臨床医に中間報告する。

<薬剤感受性検査>

ガイドラインの薬剤感受性検査を参考に薬剤感受性試験を実施する。