

グラム染色の手技

A microscopic image showing Gram-stained bacteria. The background is a light pinkish-red color. In the center, there is a cluster of purple-stained bacteria, likely cocci, arranged in a somewhat circular pattern. To the right, there are larger, more irregularly shaped structures, possibly yeast or other microorganisms, stained in a darker red or purple hue.

小栗 豊子

亀田総合病院 臨床検査部技術顧問

はじめに

患者検体のグラム染色

- 細菌・真菌感染症の迅速検査として高い評価
- 治療効果の判定
- 3種の染色法が普及
- 概略・塗抹標本の作製法・固定法の解説
- ハッカーの変法の染色手技解説

目次

1. グラム染色の特徴

2. グラム染色の種類

- ハッカーの変法

- フェイバー法

- バーミー法

3. グラム染色の手順（ハッカーの変法）

- 喀痰の塗抹標本作製，固定，染色，
鏡検に至る一連の操作を紹介

1. グラム染色の特徴(1)

利 点

1. 起炎菌の推定ができる
 2. 炎症像の有無が推定できる
 3. 検査所用時間（30分以内）
 4. 安価である
-

1. グラム染色の特徴(2)

欠点

1. **菌数**が少ないと検出できない
検出限界： $\geq 10^5/\text{mL}$
 2. 鏡検の解釈に**熟練**を要する
 3. **難染性**の細菌がある
-

2. グラム染色の種類

● グラム染色法（3種類）

① ハッカーの変法

② フェイバー法（西岡の方法）

③ バーミー法（Bartholomew & Mittwerの変法）

● 数分で染色できる簡単な方法

● 脱色試薬による分別操作が染色の良否を左右

● 染色は化学反応：染色試薬は有効期限を厳守

● 極端な長・短時間は不可

ハッカー (Hucker) の変法



■ハッカーの変法の試薬

左から**グラムハッカー染色 I** (クリスタル紫液)

グラムハッカー染色 II (ルゴール液)

グラムハッカー染色 III (サフラニン液)

分別：エタノール (又はアセトン・アルコール)

- グラム染色の標準的な方法
- ハッカーの液：媒染剤として
 礮酸アンモニウムを添加
- ルゴール液：処方はメーカーにより
 異なる
- 分別：エタノール または
 アセトン・アルコール (短時間)
- 後染色：サフラニン液 または
 パイフェル (Pfeiffer) 液

分別：アセトン・アルコール

後染色：パイフェル液を推奨

フェイバー法*



■フェイバー法の試薬

左から**染色液A**（ビクトリアブルー液）

脱色液（ピクリン酸・エタノール液）

染色液B（サフラニン液またはパイフェル液）

- 通常のグラム染色法と異なる
- グラム陽性菌の染色：ビクトリアブルー液を使用
- ピクリン酸・エタノール液：ピクリン酸はグラム陽性菌の媒染，エタノールは分別用
- 後染色は他の方法と同じ染色
- 他の方法に比べ操作が1ステップ少なくて済み，媒染・分別の時間も短縮

* 西岡光夫：新しいグラム染色法. 衛生検査 31:p.943-948, 1982

バーミー法（山中法）*



■バーミー法の試薬

左からバーミー-M1（クリスタル紫水溶液）

バーミー-M2（ヨウ素・水酸化Na水溶液）

バーミー-M3（アセトン・エチルアルコール）

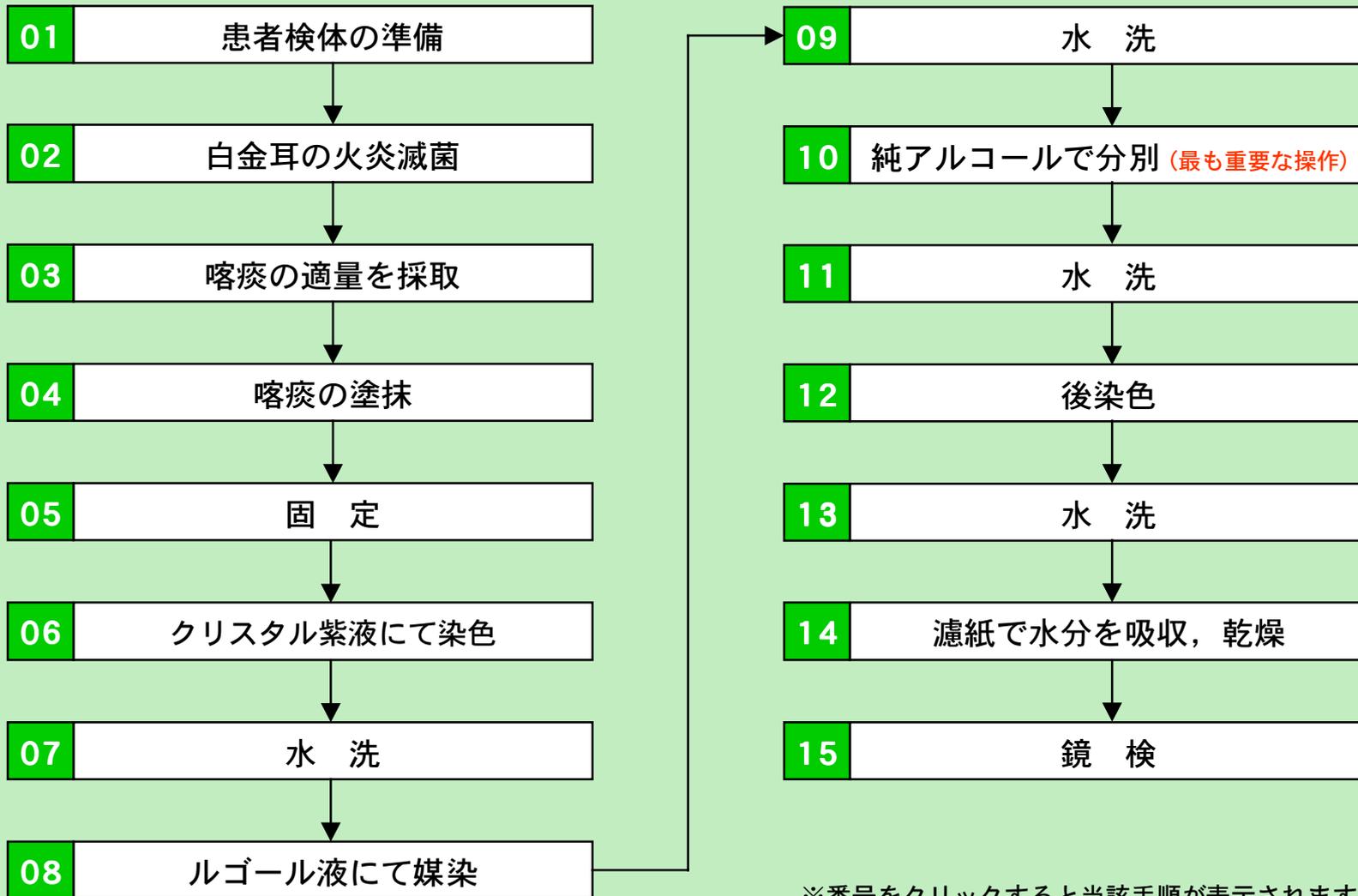
バーミー-M4（フクシン水溶液）

* 山中喜代治：グラム染色. 臨床微生物迅速診断研究会誌1:p.81-90, 2002

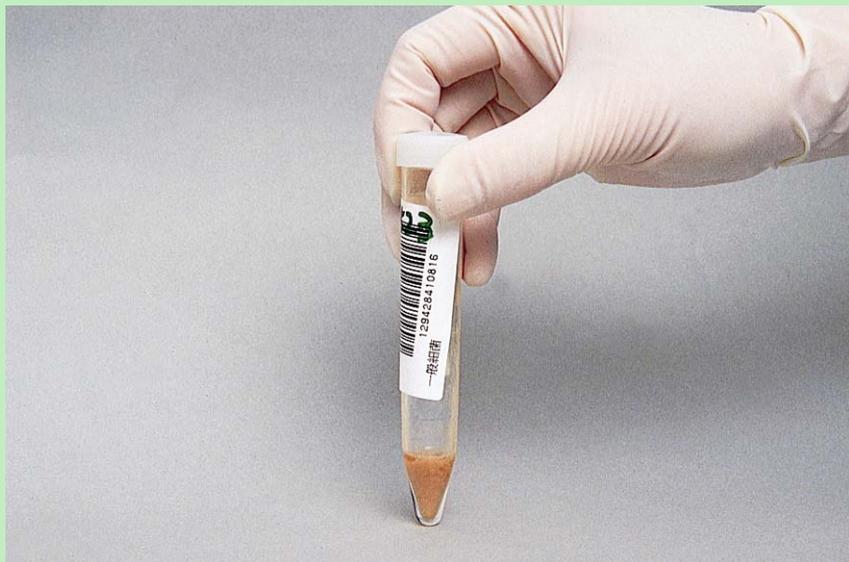
- Kopeloff法や Bartholomew & Mittwerの変法として知られる
- ハッカーの変法に類似
- クリスタル紫液に重炭酸Naを添加（媒染剤）
- 分別：アセトン・アルコール
- 後染色：他の染色法に同じ

3. グラム染色の注意点 (ハッカーの変法)

- ハッカーの変法：塗抹から鏡検までの操作を解説
- スライドグラス：一昼夜、エタノールに浸漬後、ピンセットで取り出し、ガスバーナーの火炎で軽く焼き、冷ましたもの
- 初心者：スライドグラスの一端にグラム陽性菌（黄色ブドウ球菌）とグラム陰性桿菌（大腸菌）を塗抹し、分別の参考に
- 精度管理：最低、週1回。染色液や試薬のロットを変更した場合はその都度実地
 - グラム陽性菌，グラム陰性桿菌を塗抹した標本を染色し，正しく染色できるかどうかをチェック
- グラム染色法の染色性の確認：歯間部から歯垢を採取し，これを塗抹して染色，グラム陽性菌と陰性菌が混在，染色が難しい嫌気性菌が存在するので練習材料に最適



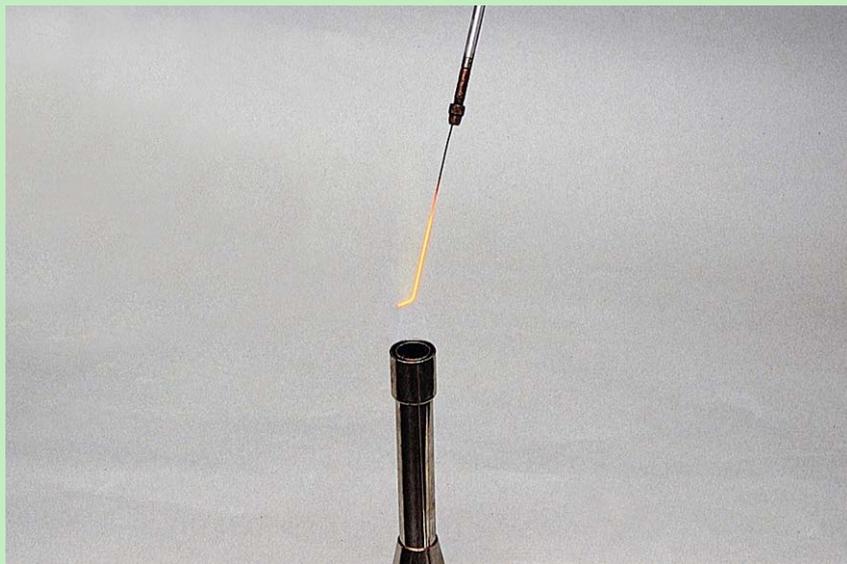
※番号をクリックすると当該手順が表示されます



- ・ 検体の外観：肉眼的観察。色調，性状，臭気など
- ・ 喀痰では **Miller & Jones の分類**
(M1, M2, P1, P2, P3に分類)

- 材料：髄，胸水，血液培養陽性時の培養液，中等症ないし重症肺炎患者の喀痰，穿刺液，尿，膿・分泌物など
- 材料は採取後2時間以内の新鮮なもの
- 冷蔵保存では24時間以内のもの

白金耳の火炎滅菌



+ ポイント

- ・ガスバーナーの炎：内炎（内側の青い炎）と外炎（外側の炎）
- ・外炎の方が温度が高い
- ・白金耳はまず内炎に入れ、次いで外炎で**赤くなるまで**焼く

- ガスバーナー：完全燃焼状態にする
- ガス量と空気量を調節
- バーナーの下のネジはガス調整用
- 上のネジは空気調整用
- 赤いゆらゆらした炎は不完全燃焼
- ビリビリ音が出るのは空気が過剰
- 白金耳を炎に添えるように保ち、
- ニクロム線の部分が赤くなるまで火炎滅菌

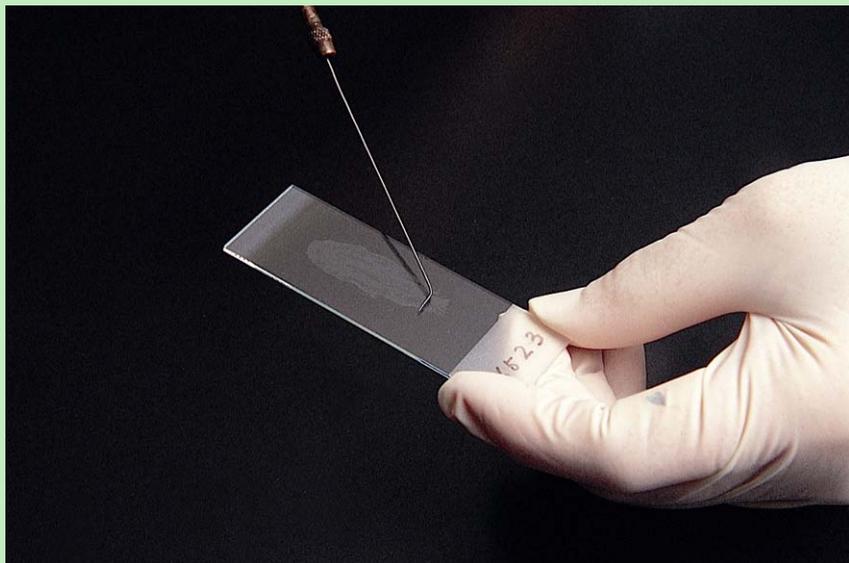
喀痰の適量を採取

**+** ポイント（洗浄喀痰を用いる場合）

喀痰の洗浄：滅菌生理食塩液10mLを入れた滅菌スピッツに大豆粒程度の膿性部分の痰を採り，密閉して激しく振盪して洗浄．喀痰成分をカギ型白金線ですくい取り塗抹．

- 喀痰の量はコメ粒の1/3程度をとる
- 漿液性の喀痰は白金耳で塗抹
- 粘稠性の喀痰はカギ型白金線
- 先端に喀痰の膿性部分を引っ掛け，容器の壁で適量を切り取る
- 爪楊枝を用いて塗抹してもよい

喀痰の塗抹

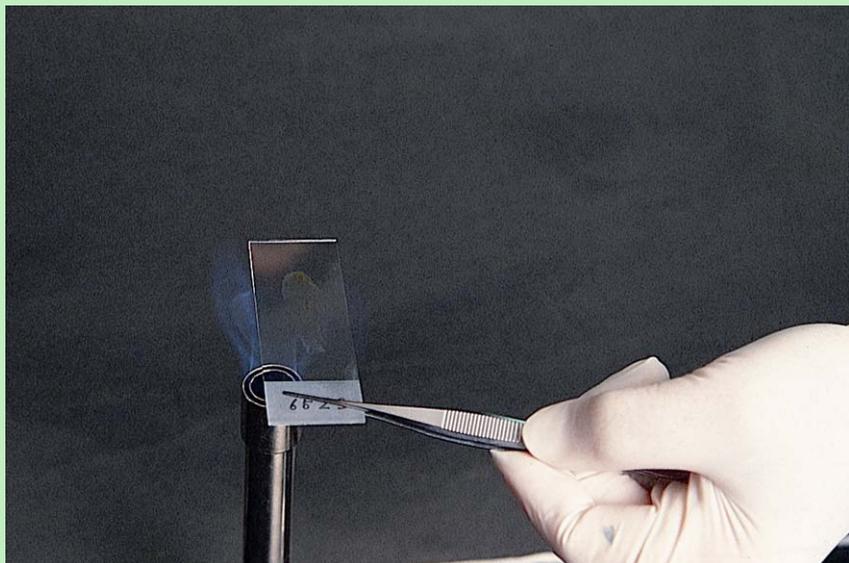


+ ポイント

- ・塗抹：喀痰は薄く引き伸ばして塗抹
- ・液体の検体は毛細管ピペットで1滴とり、10円硬貨の大きさに広げる
但し、膿性の材料は薄く引き伸ばして塗抹

●脱脂された清潔なスライドガラスに薄く引き伸ばして塗抹

●別法：喀痰をスライドガラスに置き、ニクロム線の真っ直ぐな部分を喀痰に付着させ、そのままガラス上をスライドさせて塗抹。ただし、濃い部分は薄く広げること

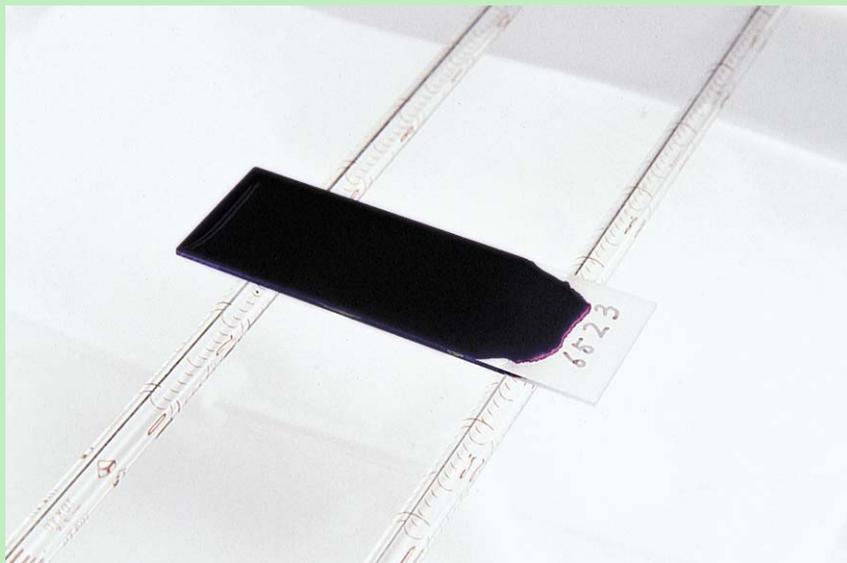


⊕ ポイント

- ・別法としてアルコール固定：乾燥させた標本をメタノールに1～2分程度浸す
- ・患者検体の染色には火炎固定よりもアルコール固定の方がよい

- 塗抹後は、自然乾燥させる
- 火炎固定：塗抹面を上にして火炎の中をゆっくり3回
- 極端な加熱をしてはならない
- 火炎固定後の標本は素手で持てない

クリスタル紫液にて染色

**+** ポイント

- ・塗抹部分が十分覆われる程度の染色液をかける
- ・泡ができたならピペットで吸い取る
- ・グラム陽性菌，陰性菌，生体細胞などすべて紫色に染色

- 火炎固定後の標本は冷ます
- アルコール固定標本は乾燥させる
- クリスタル紫液を塗抹面に注ぐ
- 1枚の標本は1 mLの染色液で可能
- 染色時間20秒
(10秒～1分)

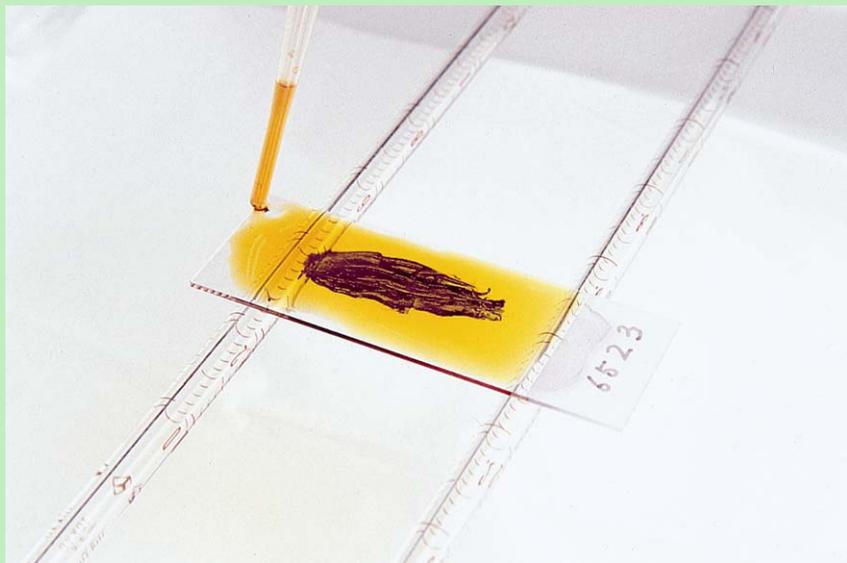


⊕ ポイント

- ・ 噴水ビンの先をスライドグラスにやや平行にして水洗すると、床や術者の衣類に染色液が飛び散ることがあるので注意
- ・ 軽い水洗（染色液が薄く付着）でよい

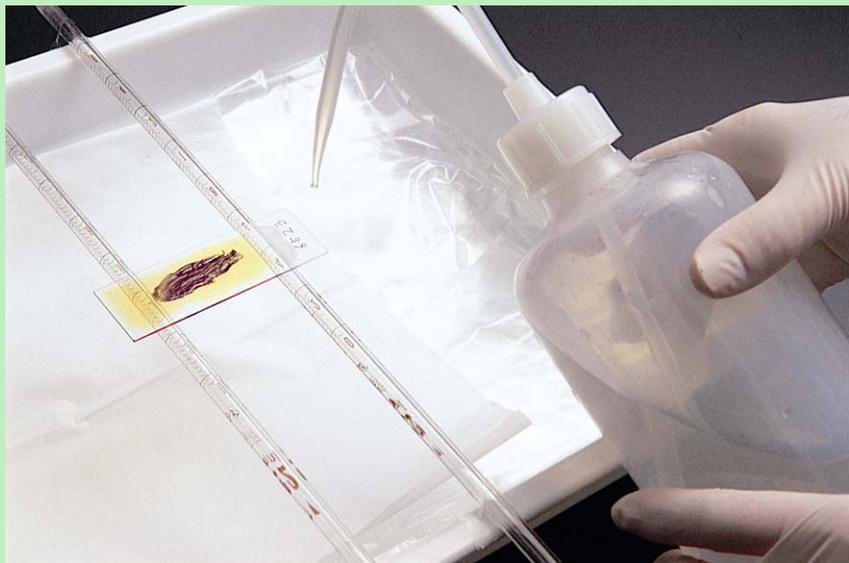
- 噴水ビンを用いる場合：スライドグラスの一端から噴水部分を下に向けて静かに水洗
- 水道水を用いる場合：静かな流水で標本の表と裏の両面を軽く洗い流す
- 水洗は標本の端から行い、塗抹面には直接、流水をかけない

ルゴール液にて媒染

**+** ポイント

- ・グラム陽性菌：ルゴール液の作用によりアルコールに不溶性の結合物を形成，グラム陰性菌ではできない
- ・グラム陽性菌はアルコールで脱色されにくい，グラム陰性菌は容易に脱色

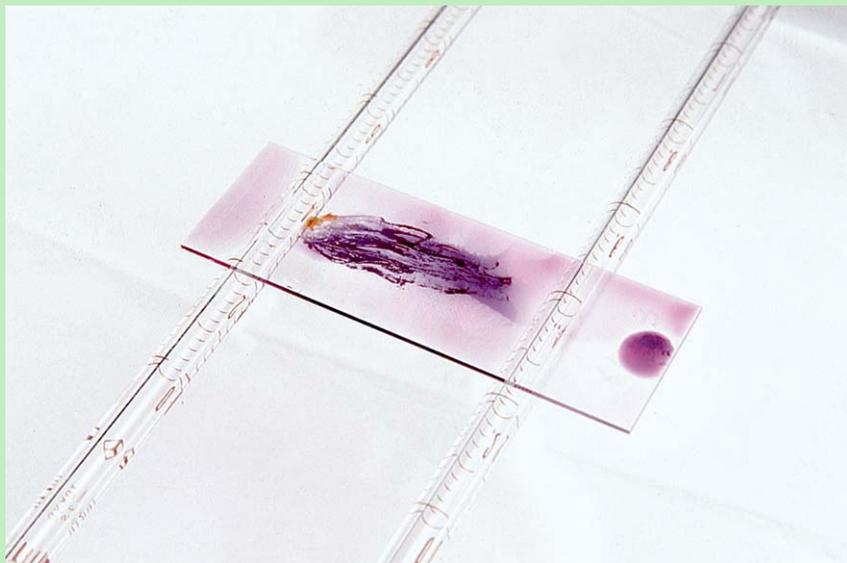
- 塗抹面にルゴール液を作用
- 標本を傾けて液を捨て、再度、ルゴール液を作用
- 染色時間20秒
(20秒～1分)



⊕ ポイント

- ・ 標本の端から水洗し、ルゴール液を浮き上がらせるように
- ・ 標本を手で持ち、裏面も水洗
- ・ 水分をできるだけ除く

- 水洗：ステップ7の要領で行う
- ルゴール液作用後の**水洗は丁寧に**
- 水洗後は標本を振ってよく水を切り、塗抹面の水分を少なくする
- (次の分別[ステップ10]による**脱色操作を促進**させるため)



⊕ ポイント

- ・ 喀痰や膿汁など塗抹が濃い標本：時間を要す
- ・ 分別の操作は長くとも1分以内
- ・ 塗抹の濃い部分は紫色が残る
- ・ 終末点と感じたら**直ちに水洗**
- ・ **アルコールが付着していると脱色が促進**

- アセトン・エタノールを満載
染色液が溶け出し，塗抹部分が脱色
- 標本を揺り動かし，2～3回，分別液をかけ**塗抹面が無色になるまで**行う
- 作用時間は**20秒～1分以内**
(標本の厚さにより異なる)
- 純アルコールを用いた場合は脱色がより緩やかとなる

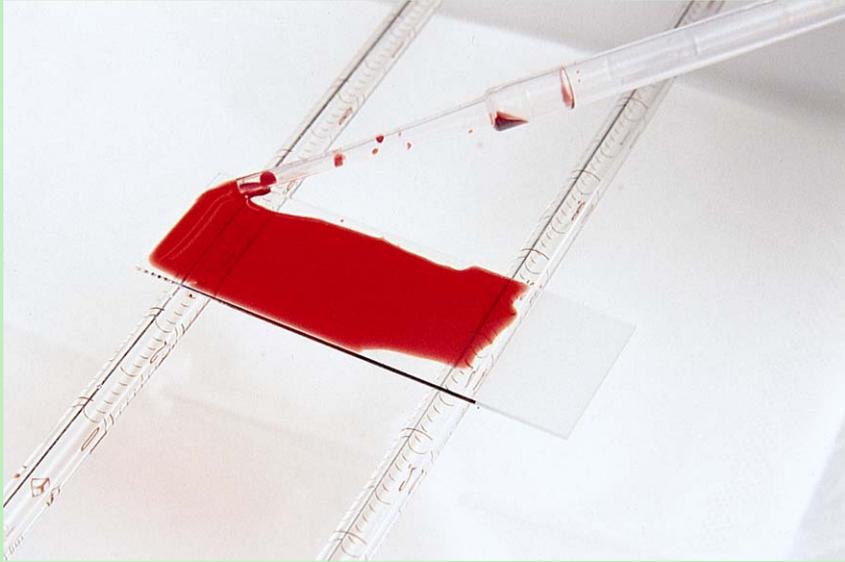
水洗 (分別の終末点を確認したら直ちに行う)



⊕ ポイント

標本にアルコールが付着したままだと脱色が進み、
グラム陽性菌も脱色されてしまうので注意

- 直ちに水洗：ステップ7の要領で
- 塗抹面にアルコールが残らないよう
丁寧に
- 標本の裏面も水洗する



⊕ ポイント

- ・ 分別により脱色されたグラム陰性菌の染色
- ・ パイフェル液は塩基性フクシンを用いており、染色力が強く、染色性の弱い菌種の染色に適す

- サフラニン液またはパイフェル液にて染色
- サフラニン液は30秒～1分
- パイフェル液は10～20秒
- サフラニン液の方が美しく染色



⊕ ポイント

標本の表と裏の両面を丁寧に洗う

- ステップ7の要領で行う
- 丁寧に標本全体を洗い、振って水を切る

濾紙で水分を吸収、乾燥



⊕ ポイント

- ・染色が成功した標本は全体が赤色を呈する
- ・喀痰や膿汁の濃い部分は紫色の部分が残っていてもよい

- 標本を濾紙の間にはさみ、
上から手のひらで軽く押さえる
- 標本に水分が残っているので、
標本を振って完全に乾燥させる

**+** ポイント

1000倍：コンデンサーを上げ、絞りを開いて十分な光量で観察

油浸装置：顕微鏡の横からみて、粗動装置でステージを上げ、油浸レンズを標本に最も近づけた状態にする。その後、接眼レンズで覗きながら粗動装置でステージを少しずつ下げてゆき、視野に像が見えたら微動装置でピントを合わせる

- 喀痰では生体細胞を観察するため、油浸用オイルをつけず、100倍で鏡検（Gecklerの分類）。その後、塗抹部分に油浸用オイルを滴下し、1,000倍で鏡検する
- 100倍の鏡検は顕微鏡のコンデンサーを下げ、絞りで光量を調整して観察



感染症治療の基礎 初期治療に役立つ検査



No.1 特集：喀痰

- ・呼吸器検体から検出される微生物の迅速診断の現状
- ・喀痰から検出される耐性菌の現状について
- ・グラム染色の手技（ハッカー法）



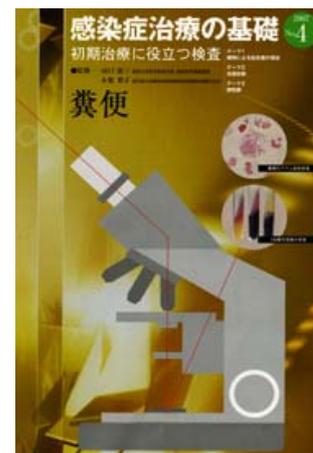
No.2 特集：血液・髄液

- ・髄液検体から検出される微生物の迅速診断検査法
- ・血液・髄液から検出される耐性菌



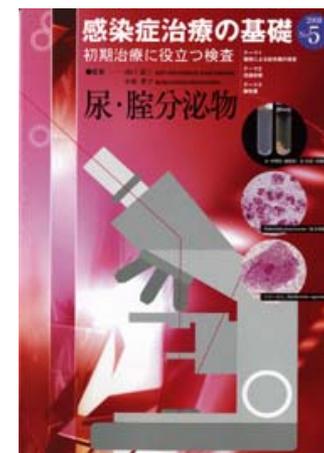
No.3 特集：分泌液・穿刺液

- ・膿・分泌液から検出される微生物の迅速診断
- ・膿・分泌液から検出される耐性菌の現状について
- ・グラム染色の手技（フェイバー法）



No.4 特集：糞便

- ・糞便材料から検出される微生物の迅速診断
- ・糞便から検出される耐性菌の現状について



No.5 特集：尿・腔分泌物

- ・尿中抗原検出による急性呼吸器感染症迅速診断への応用
- ・尿・腔分泌物から検出される耐性菌の現状について

●監修：山口恵三 東邦大学医学部微生物・感染症学講座教授
小栗豊子 亀田総合病院 臨床検査部技術顧問

本書に関するお問い合わせは国際医学出版（株）までご連絡ください

URL: <http://www.imp-kokusaiigaku.com/index.html>

E-mail: IMP@imp-kokusaiigaku.com