

[原 著]

新規に開発された小型自動染色装置 GS-20A におけるグラム染色性の評価

厚川喜子¹⁾・川上小夜子¹⁾・石垣しのぶ¹⁾・田中孝志¹⁾浅原美和¹⁾・斧 康雄²⁾・宮澤幸久¹⁾¹⁾ 帝京大学医学部附属病院中央検査部²⁾ 帝京大学医学部微生物学講座

(平成 21 年 3 月 13 日受付, 平成 21 年 5 月 7 日受理)

新規に開発された小型自動染色装置 GS-20A によるグラム染色性能を評価した。GS-20A によるグラム染色性は、96.61% (2,652/2,745 件) が良好な染色状態であったが、好中球など生体細胞の核の染色不良が 0.84% (23/2,745 件), 細菌の染色不良が 2.26% (62/2,745 件), 色素顆粒の沈着が 0.29% (8/2,745 件) にみられた。細菌の染色不良の内訳は、グラム陽性球菌の陰性化が 1.71% (47/2,745 件), グラム陽性桿菌の陰性化が 0.62% (17/2,745 件) で、本来グラム陽性に染まるべき菌の陰性化がわずかに認められた。適正なグラム染色を実施するための注意点として、喀痰、膿汁、血液成分の多い検体などでは、標本作製時に検体を薄く塗抹すること、染色液交換時には脱色時間を短く調整することがあげられる。本染色装置は目的や用途に応じた時間設定が可能で、多量の標本作製にも適しており、感染部位の塗抹鏡検を迅速で効率的に行うための染色装置として極めて有用である。

Key words: 自動染色装置, GS-20A, グラム染色, 効率化

序 文

感染症の診断と治療において感染部位の塗抹鏡検は、起因菌の推定と適正な抗菌薬を選択するうえで重要な検査法である。特にグラム染色法は、検体をスライドガラスに塗抹後 15 分程度で結果の判定が可能となる迅速性と簡便で安価な点において、有用性が見直されている。

グラム染色は、デンマークの Hans Christian Joachim Gram が 1884 年に発明した染色法で、形態や大きさから細菌を分類することにより菌種の推定が可能となり、現在では世界中で細菌の形態分類の表現に使用されている。さらに、細菌だけでなく背景に存在する白血球や上皮細胞などの生体細胞を観察することにより、さらに的確な感染症診断を行うことが可能である¹⁾。しかし、良質な標本作製し、感染症所見を判読するためには経験と熟練が必要で、現在のところ

一部の微生物検査担当者や感染症専門医にしか実施できない施設が多いのが現状である。

小型自動染色装置 GS-20A (GS-20A; スギヤマゲン) は、グラム染色を自動的に行う目的で開発された機器であり、一度に 20 枚の標本の染色が可能で、染色から乾燥までを自動的に行う。今回、各種臨床検体を用いて塗抹標本作製し、自動染色装置によるグラム染色の有用性を検討した。

方 法

1) 対象

2008 年 7 月～8 月に細菌検査を目的に当検査室に提出された 2,745 件の臨床検体について、GS-20A を使用してグラム染色を実施し、染色結果の評価を行った。グラム染色の評価を実施した検体の内訳は、髄液 39 件、脳室ドレーン 2 件、喀痰 593 件、気管支肺洗浄液 44 件、胸水 55 件、胸腔ドレーン 12 件、心嚢液 1 件、胃液 21 件、腹水 55 件、腹腔ドレーン 11 件、胆汁 40 件、関節液 5 件、膿汁 83 件、創部ドレーン 131 件、組織 28 件、人工異物 32 件、中心静脈カテーテル先端 189 件、骨髓血 1 件、尿 1,155 件、便 9 件、血液培養陽性ボトル 239 件である。咽頭や創部などのスワ

著者連絡先: (〒173-8606) 東京都板橋区加賀 2-11-1
帝京大学医学部附属病院中央検査部
厚川喜子
TEL: 03-3964-9327
FAX: 03-3964-9327
E-mail: yoshiko.atsu@tbh.t-com.ne.jp

ブ検体については対象から除外した。

2) 機器・試薬

GS-20A は、幅 480×奥行 430×高さ 450 mm、重量 26 kg で、AC100 V、11 A、50/60 Hz 対応の機種で、染色は 4 個の染色槽に染色籠が水平移動する方法で行う (図 1)。標本の洗浄 (水洗) には近くの水道よりビニールホースで自動的に取り込まれた水道水を使用し、オーバーフロー方式の流水洗浄後に、水はビニールホースで排水される。各染色時間、水洗時間、乾燥時間の設定はダイヤル方式で 1 秒単位の設定が可能で、染色後には自動温風乾燥を行い、乾燥後はブザーおよびランプ表示を行う。処理能力は一度にスライドガラス 20 枚の染色が可能で、専用の染色籠に入れて染色する。

グラム染色液はグラム染色液 I (クリスタル紫、武藤化学)、グラム染色液 II (ルゴール液、武藤化学)、グラム染色液 III (サフラニン、武藤化学)、25%アセトンアルコール (99.0%アセトンと 99.5%エタノールを使用して自家調整、いずれも関東化学) によりグラム Hucker 変法を実施した。各染色液は透明な染色槽 (TPX 染色バット、スギヤマゲン) に 220 ml 分注し



図 1. 小型自動染色装置 GS-20A

①～④の染色槽には各々クリスタル紫、ルゴール、アセトンアルコール、サフラニンを 220 ml 分注。
⑤では水洗、⑥では乾燥を行う。⑦の染色籠が設定された時間によって移動し、染色が行われる。

で使用し、1 週間ごとに新しい染色液に交換した。アセトンアルコールは月曜と水曜の 2 回交換した。また、週内に蒸発などにより減量した染色液は、そのつど追加補充し常に 220 ml を維持した。アセトンアルコールの濃度は、当院でのグラム染色標本の厚さから脱色に最適な混合割合を検討して設定した。

3) 染色方法

各種臨床検体をスライドガラスに塗抹して標本を作製し、99.5%メタノール (関東化学) で約 1 分間固定後乾燥し、GS-20A によるグラム染色を実施した。喀痰は口腔内常在菌の汚染を軽減する目的で洗浄し、膿性部分を塗抹した。GS-20A の染色時間は、クリスタル紫 1 分、流水水洗 1 分、ルゴール 1 分、流水水洗 1 分、25%アセトンアルコールによる脱色 7 秒、流水水洗 1 分、サフラニン 30 秒、流水水洗 1 分、温風乾燥 1.5 分に設定した。標本を入れた染色籠の移動時間を含めると約 10 分の染色時間となる。

4) 評価方法

グラム染色の評価は、臨床検体標本を 100 倍および 1,000 倍で鏡検し、生体細胞と細菌の染色が正しく実施されているか否か、および色素顆粒の沈着の有無を判定した。また、不適または不明と判断された標本に関しては従来の用手法 (グラム Hucker 変法) を実施して双方の染色性を比較検討した。

結 果

GS-20A によるグラム染色性の評価は、全体では 96.61% (2,652/2,745 件) が良好な染色状態であったが (図 2)、好中球など生体細胞の核の染色不良が 0.84% (23/2,745 件)、細菌の染色不良が 2.26% (62/2,745 件)、色素顆粒の沈着が 0.29% (8/2,745 件) にみられた (表 1, 図 3)。また、グラム染色が難しいとされている *Helicobacter cinaedi* の血液培養陽性ボトルを GS-20A でグラム染色したところ、用手法と同等の染色性が得られた。

細菌の染色不良の内訳は、グラム陽性球菌の陰性化が 1.71% (47/2,745 件)、グラム陽性桿菌の陰性化が 0.62% (17/2,745 件) と、本来グラム陽性に染まるべき菌の陰性化がわずかに認められた (表 2)。しかし、グラム陰性菌や酵母様真菌では良好な染色結果が得られた。

検体別にみると、本来グラム陽性に染まるべき菌の陰性化は尿で 4.59% (53/1,155 件) と最も多く、膿汁 3.61% (3/83 件)、人工異物 3.13% (1/32 件)、胆汁 2.50% (1/40 件)、喀痰 0.67% (4/593 件) にみられた。好中球などの生体細胞の核の染色不良は胸水

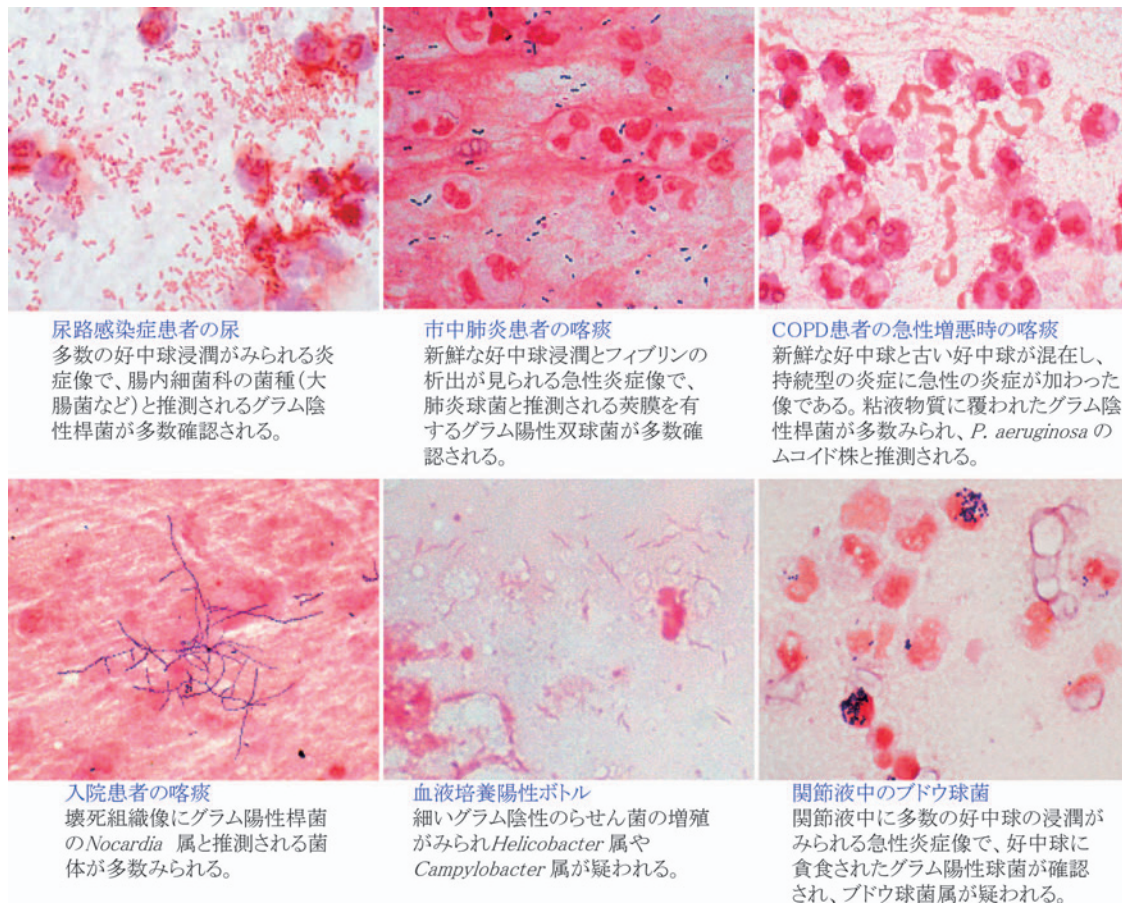


図2. GS-20A で正しく染色された標本と所見

9.09% (5 / 55 件), 腹水 9.09% (5 / 55 件), 膿汁 6.02% (5/83 件), 喀痰 0.51% (3/593 件), 尿 0.40% (5/1,155 件) に, 色素顆粒の沈着は胸水 1.82% (1/55 件), 膿汁 1.20% (1/83 件), 喀痰 0.67% (4/593 件), 尿 0.17% (2/1,155 件) にみられた。

考 察

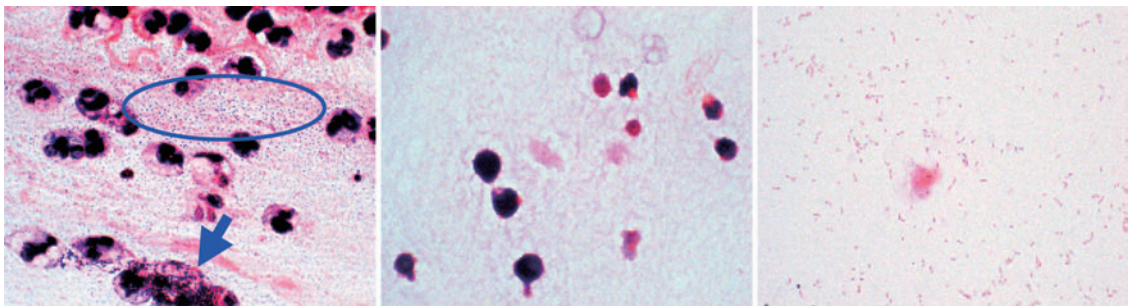
グラム陽性と陰性の染色性の違いは細胞壁の構造の違いによる。グラム陽性菌の細胞壁は厚いペプチドグリカン層から構成されているが, グラム陰性菌では, 薄いペプチドグリカン層の外側を, 外膜と呼ばれる脂質二重膜が覆っている。エタノールで処理すると, グラム陰性菌の外膜は容易に壊れ, また内部のペプチドグリカン層が薄いために色素が脱色されて赤く染まり, グラム陽性菌では脱色されないまま色素が残り紫色に染まる^{2,3)}。臨床検体 2,745 件について GS-20A を使用して実施したグラム染色法の検討では,

96.61% が良好と評価され日常業務で十分に使用可能な成績であった。3.39% 存在した染色不良の原因を解析すると, グラム陽性菌の陰性化は染色液交換直後の月曜日と水曜日に多くみられていることが判明した。このグラム陽性菌の陰性化の原因として, 脱色時間の短縮を目的に使用している 25% アセトンアルコールによって, この脱色反応が亢進したことが推測された。

これらは, 染色液交換直後の染色ではアセトンアルコールでの脱色時間を 7 秒から 5 秒へ短縮することによって改善された。また, 色素顆粒の沈着・好中球の核の染色不良は, 膿性検体や血液成分の多い検体など, 塗抹が厚すぎる標本で確認された。これらは塗抹標本を薄く作製することによって良好な染色性が得られた。同様の現象は, 病棟の検査室に設置されていて希にしか使用されない古いグラム染色液でもみられ, 染色液劣化時にも発生することがある。このことか

表 1. GS-20A で不適と評価された項目

	検査件数	生体細胞の 染色不良 件数	%	細菌の染色 不良件数	%	顆粒の沈着 件数	%
髄液	39						
脳室ドレーン	2						
喀痰	593	3	0.51	4	0.67	4	0.67
気管内洗浄液	44						
胸水	55	5	9.09			1	1.82
胸腔ドレーン	12						
心嚢液	1						
胃液	21						
腹水	55	5	9.09				
腹腔ドレーン	11						
胆汁	40			1	2.50		
関節液	5						
膿汁	83	5	6.02	3	3.61	1	1.20
創部ドレーン	131						
組織	28						
人工異物	32			1	3.13		
中心静脈カテーテル先端	189						
骨髓血	1						
尿	1,155	5	0.40	53	4.59	2	0.17
便	9						
血液培養陽性ボトル	239						
合計 (%)	2,745	23	(0.84)	62	(2.26)	8	(0.29)



市中肺炎患者の喀痰
好中球の核が紫色のままで脱色されておらず、クリスタルバイオレットの色素顆粒もみられる。好中球に貪食された細菌の色調や形態も識別不能。

入院患者の腹水
白血球の細胞質も紫色に染色されたままのため、単核球か分葉核球かの識別が不可能。

入院患者のカテーテル尿
Enterococcus 属と推測されるグラム陽性球菌の陰性化がみられる(用手法ではグラム陽性に染色され、培養では *E. faecalis* と同定された)。

図 3. GS-20A によるグラム染色標本と所見

ら、脱色時間の設定や染色液の交換は適宜行う必要がある。

一方、本法は染色槽に複数の標本を入れて染色することから、固定が不十分な場合には、標本がはがれて他の標本を汚染する可能性を有している。そのため、検体塗抹後に乾燥した標本をメタノールで固定することが必須となる。火炎固定では生体細胞の萎縮と

染色不良を招くだけでなく、標本のはく離が起りやすく、検体標本から有用な感染情報の判読が不能になる恐れがある。

GS-20A 使用の利点は、一度に 20 枚の標本の自動染色が可能になるため、検査技師は染色時間を他の作業に当てる事が可能な効率化にある。当院では現在 1 日 50~100 検体をグラム染色しており、GS-20A を

表 2. GS-20A による細菌の染色性の評価

	適		不適	
	件数	%	件数	%
グラム陽性球菌の陰性化	2,698	98.29	47	1.71
グラム陽性桿菌の陰性化	2,728	99.38	17	0.62
グラム陰性球菌の陽性化	2,745	100	0	0
グラム陰性桿菌の陽性化	2,745	100	0	0
酵母様真菌の陰性化	2,745	100	0	0

4 回以上使用している。これを用手法で実施した場合には 1.5 時間以上を要する計算になり、この時間が省力化されたことになる。また、用手法では熟練した技術が必要であるが、GS-20A では一定の染色性が得られる。そのためグラム染色に不慣れた技師や臨床医にも容易に使用可能で、夜間当直帯や休日にも対応できると考えられる。さらに、GS-20A の使用により、手や流しが汚れないという利点もある。

GS-20A による染色での重要な注意点は、上述したように塗抹の厚さを均一に薄くすることにある。染色時間が一定で検体ごとに染色時間を変更できないため、喀痰、膿汁、血液成分の多い検体など、厚く塗抹されやすい検体では注意が必要になる。塗抹標本作製の優劣は担当者によって差が生じやすいことから、これらを回避するには、一定期間のトレーニングやマニュアルを作成することも有用であろう。

GS20-A での染色工程の設定は施設ごとに変更可能であり、脱色時間の短縮やアセトンアルコールの混合割合を変更することにより対応が可能となる。当院での染色時間は教科書どおりに設定したが、各工程を 1 秒単位で設定変更することも可能で、バーミー染色液やフェイバー染色液、ギムザ染色液などの使用も可能である。本法は目的や用途に応じた時間設定が可能で、多量の標本作製にも適している。しかし、大木らはフェイバー染色も粘張性の強い検体や膿性検体、血液成分が多い検体では染色性が悪く判定不能となる場合があることを報告しており、注意が必要となる⁴⁾。それらを回避し、適正なグラム染色による検査を維持するためには、*S. aureus* (ATCC25923) と *E. coli* (ATCC25922) を使用した精度管理が必要で、米国の Clinical Microbiology Procedures Handbook では毎日実施することを推奨している⁵⁾。

染色液のコストは、用手法で 1 枚ずつ染色した場合と GS-20A で毎週染色液を交換し減量分を常に補充した場合とを比較すると、GS-20A 使用のコストが約 10% 軽減する結果であった。また、標本 1 枚当たり

21.3 円でグラム染色が実施可能と計算された。

自動染色装置はこれまでも幾つかの機種が発売されており、日常業務の効率化において高く評価されているが^{4,6)}、GS-20A も優れた性能を有しており他の機種より安価であることから、検査室への導入が容易になると考えられる。

2008 年 4 月に診療報酬の改定が行われ、臨床検査項目の保険点数が切り下げられた中で、グラム染色項目に該当する「細菌顕微鏡検査 3. その他のもの」は、以前の 17 点から 25 点に増額された⁷⁾。また、グラム染色法が研修医教育の項目として盛り込まれなどの見直しもなされており、感染症の迅速検査として感染病巣の塗抹鏡検の有用性が再評価された結果であると推測される。さらに、検体検査管理加算として、指定された血液・生化学項目、輸血および微生物の顕微鏡検査が院内で 24 時間対応可能な場合には、施設基準に応じて 1 患者に対し月 1 回 40 点、100 点、300 点が請求できる項目が追加された。これにより夜間・休日におけるグラム染色の必要性が再認識されており、今後グラム染色法を新たに 24 時間対応項目として導入される施設が増加することが予想される。GS-20A はこれらの施設においても有用なグラム染色装置であると考えられ、今後の普及が期待される。

文 献

- 1) 菅野治重, 川上小夜子監修. 2003. 感染症診断に必要な微生物検査. ライフサイエンス社, 東京
- 2) Beveridge, J. T. 1990. Mechanism of Gram variability in select bacteria. J. Bacteriol. 172: 1609-1620.
- 3) Beveridge, T. J., J. A. Davies. 1983. Cellular Responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the Gram stain. J. Bacteriol. 156: 846-858.
- 4) 大木まゆみ, 小栗豊子. 2006. 塗抹検査 ミラストイナーの運用. 臨床と微生物 33: 80-83.
- 5) York, M. K., Staining Procedures. 2003. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd

- ed. p. 3.2.1.1-23. ASM Press, New York.
- 6) 湖城明子, 村田葉子, 池田明人, 他. 2002. 改良
グラム染色液 neo-B&M ワコーと自動染色装置
PORY STAINER を用いたグラム染色検査の実用
性について. 医療と検査機器・試薬 25: 455-465.
- 7) 社会保険研究所. 2008. 医科点数表の解釈. p.
312, 318-319.

Evaluation of the Gram Stainability Newly Developed in Small Automatic Staining Machine, GS-20A

Yoshiko Atsukawa,¹⁾ Sayoko Kawakami,¹⁾ Shinobu Ishigaki,¹⁾ Takashi Tanaka,¹⁾
Miwa Asahara,¹⁾ Yasuo Ono,²⁾ Yukihiisa Miyazawa¹⁾

¹⁾ Department of Central Laboratory, Teikyo University Hospital

²⁾ Department of Microbiology and Immunology, Teikyo University School of
Medicine

The stainability for Gram staining by a newly developed small automatic staining machine (GS-20A) was evaluated. Though, the stainability for Gram stain by GS-20A was excellent (96.61%; 2,652/2,745), defective staining rate of the nuclei of the cells, such as white blood cell or epithelial cells, defective staining rate of the bacteria were 0.84% (23/2,745), and 2.26% (62/2,745), respectively, and pigment granule deposition was seen in 0.29% (8/2,745). The defective staining rate of the Gram positive bacteria which should have been dyed by Gram positive were 1.71% (47/2,745) for cocci and 0.62% (17/2,745) for bacilli, respectively. To conduct appropriate Gram staining, samples with high contents of sputum, pus, or blood constituents should be smeared evenly and thinly onto slides in sample preparation, and the length of time for bleaching should be kept short just after reagent replacement. This staining machine allows different time settings for various purposes, and is also suitable for staining a large number of prepared samples. This machine is very effective for rapid microscopic examination of smear samples from sites of infection.