

[原 著]

グラム染色の水洗における水質の影響

和田京平¹⁾・久保勢津子¹⁾・露木勇三²⁾・柴田祥子¹⁾

¹⁾ 株式会社サンリツ臨床検査技術部

²⁾ サンリツサービス株式会社

(令和5年5月24日受付, 令和5年12月4日受理)

細菌感染症において病原菌を迅速に特定することは重要である。一般細菌検査は塗抹、培養および薬剤感受性試験が行われる。培養や感受性試験は結果を得るまでに2~3日を要する一方で、塗抹検査は簡便かつ迅速な報告に優れている。なかでも日常多用されるグラム染色は染色性と形態観察によって菌種の推定ができることに加えて、組織細胞や炎症細胞の確認が可能であり、初期抗菌薬の選択に有用な情報となり得る¹⁾²⁾。

夏季に、当施設でグラム染色の染色性が低下する事象が発生した。今回、この原因を追究するため染色性に影響する染色液を含めすべての工程を検討したところ、水洗の水道水と判明し水洗水としてイオン交換水を使用したことにより良好な染色結果が得られた。したがって、染色性低下の原因は水質であると判断された。

そこで染色性の低下する夏季の外気温度・水温と染色に影響する水の硬度の影響について検討した。日常検査を想定し、水温は5℃~30℃、水質は硬度0 mg/L~304 mg/Lの範囲で調べた。その結果、染色性は水温5℃・硬度0 mg/Lの水洗水を用いた場合に最も良好であり、水温30℃・硬度304 mg/Lの水洗水が最も不良であった。

グラム染色において、用いた水洗水は水温・硬度ともに低いほど良好な染色性を示した。他の因子の影響も否定できないが、グラム染色における水洗水の標準化は必要と考えられた。

Key words: グラム染色, 硬度, 水温, 迅速

序 文

病原菌の特定は初期抗菌薬の選択を行う際、有益な情報の迅速性が重視されるが、この点でグラム染色による塗抹検査は優れている。

Gram博士の報告から138年が経過したが、現在でも有用性、簡便性、迅速性から多くの施設で実施されている³⁾。グラム染色は特別な装置を必要とせず、染色試薬と水洗環境を整えれば可能である。検査結果は高品質かつ高精度でなければならず、自家調製の時代から現在は数社より試薬調整した市販品が販売されている。

一方、グラム染色は検体中の菌量による影響を受けること、また難染色性の菌種が存在することが知られている⁴⁾⁵⁾。さらに塗抹標本作成等の手技面でばらつきがあり、判定に苦慮することもある⁵⁾。

当施設で夏季にグラム染色の染色性が低下する事象が持続発生した。工程を検討した結果、染色低下の原因は水洗に使用する水道水と判明した。イオン交換水使用で解決されたことより一番目の原因として気温と水温に注目した。当施設が使用している浄水場データによると毎年6~9月で35℃以上

の猛暑日と言われる日があり、それに伴い検査室の水道水温も上昇し水温27℃が観察された。2番目の原因として、当施設のある千葉県は古代の海底が陸地になり地中のミネラルが高いのと利根川の下流部であることが原因で国内でも水の硬度が高いことが分かった。調査の結果、浄水場の年間最高硬度は80 mg/L前後と高いことが分かり、それに加えて浄水場での水温は気温より1~2℃低い状態であることが分かった⁶⁾。

今回我々は、この原因を追究するべく水洗に使用する水の品質の面からその影響について検討した。

材料と方法

材料

1. グラム染色液

使用染色試薬はバーミー M (武藤化学) を使用した。

2. 試料

グラム染色の染色性確認のためコントロールは精度管理株 *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) *Escherichia coli* (ATCC25922) *Candida albicans* (臨床分離株) を均一になる様に混和し、100枚の塗抹標本を作成した。臨床検体材料として当施設に提出された喀痰検体の残余を使用した。喀痰検体を均一になる様に白金耳で軽く混ぜ、スライドガラスに塗布し火災固定を行った。各染色工程の変化を見るために、1つの喀痰検体から100枚の塗抹標本を作成した。

3. 水洗の水

水洗用の水の硬度調整には市販飲料水 (evian: 硬度 304

著者連絡先: (〒276-0022) 千葉県八千代市上高野 1353-25
株式会社サンリツ臨床検査技術部
和田京平
TEL: 047-487-2631
FAX: 047-487-2861
E-mail: k-wada@san-g.com

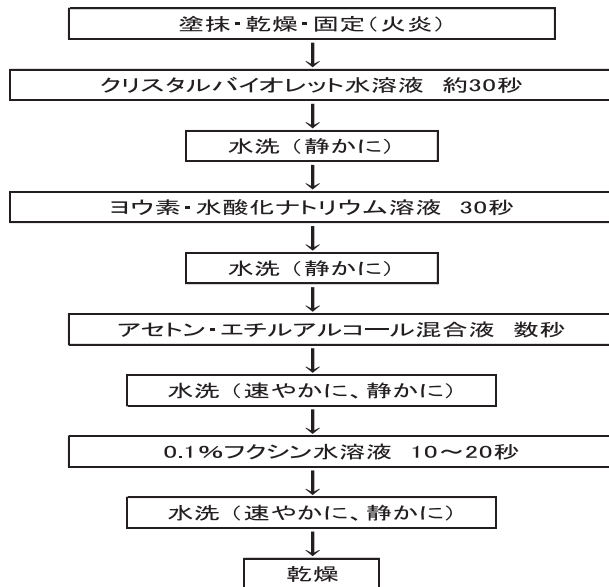


図1. グラム染色プロトコール (添付文書)

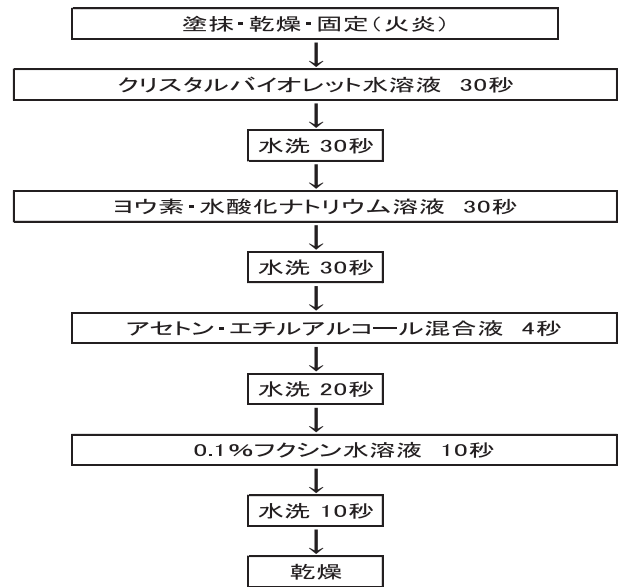


図2. グラム染色プロトコール (方法1 方法2 方法3)

mg/L) を使用した。evian の 100 ml 当たりの成分は、ナトリウム 0.7 mg, カルシウム 8.0 mg, マグネシウム 2.6 mg である。また、当施設水道水の硬度は、県平均硬度である硬度 80 mg/L とした⁶⁾。硬度 0 mg/L の水は当施設のイオン交換水を使用した。

水洗水の温度調整は、冷蔵庫と室温と恒温槽を用いた。

検討方法

方法1 温度と硬度の影響について

バーミー M 添付文書 (図1) に従い、各染色時間を固定、また各箇所の水洗時間も統一した (図2)。水洗水の温度調整は冷蔵庫 (5℃)、室温 (22℃)、恒温槽 (30℃) で行い、各々の温度環境に決めた硬度の水をペットボトルに入れ温度を調整した。水温の測定はペットボトル内に温度計を入れ、クリスタルバイオレット染色中に1回と乾燥中に再度測定し、温度変動がないことを確認した。使用した塗抹標本は、グラム染色性確認用のコントロール検体と喀痰検体である。

方法2 硬水から軟水と水道水による水洗各所の染色像

水洗水の硬度を変え、図2の各所水洗後の染色性の比較確認を行った。

バーミー M 添付文書に従い、各染色時間と水洗時間を固定し、水洗時の水の温度も 22℃ で固定した。市販飲料水 (evian) をイオン交換水で希釈し、硬度 304・200・100・50・0 mg/L になるように調整した水を用いた。例として、硬度 200 mg/L の水洗水の調整は、evian 1333 mL にイオン交換水 666 mL を加えるという方法で、2 L の水洗水を作成した。作成した調整水のマグネシウム (以下 Mg) とカルシウム (以下 Ca) の値も分析を行った。各々の調整水について、硬度 200 mg/L 中には Mg 16 mg/L と Ca 55 mg/L、硬度 100 mg/L 中には Mg 8 mg/L と Ca 26 mg/L、硬度 50 mg/L 中には Mg 4 mg/L と Ca 13 mg/L であり、硬度は測定値であることを確認した。使用した塗抹標本は、染色性確認用のコントロール検体である。

方法3 3都県の水道水による染色

方法1の追加検討として千葉県 (睦浄水場) 以外の水道水の染色性を比較した。対象は東京都 (金町浄水場) と埼玉県 (新三郷浄水場) と栃木県 (鳥野目浄水場) の水道水を用いて、図2の染色性の比較確認を行った。使用した塗抹標本は、喀痰検体である。

結果

1. 温度と硬度の影響【方法1】

水洗時の水の温度と硬度の変化がグラム染色像にどのような影響を与えるかについて検討した結果を図に示す。まず、硬度 0 mg/L の水を用いて染色を行った際の染色性は (図3)、次に水道水 (硬度 80 mg/L) の水を用いた際の染色性を (図4) に、最後に硬度 304 mg/L の水を用いた染色性を (図5) に示す。

図4の硬度は水道水を用いているため、千葉県における水道水の平均硬度の値とした。

硬度 0 mg/L 水温 5℃ における染色結果が最も良好であり、喀痰検体では白血球の核と細胞質を明瞭に染め分ける事ができ、最適硬度・水温と確認出来た (図3)。水道水 (硬度 80 mg/L) 水温 22℃ における染色結果は、陽性菌の一部が陰性へと染まり、陰性菌の識別はやや困難という結果であった (図4)。水道水の硬度が高めであり、全体的な染色評価に注意が必要であった。硬度 304 mg/L 水温 30℃ における染色結果が一番悪く、酵母様真菌が完全に陰性化した (図5)。

硬度・水温ともに上昇するにつれ染色不良が顕著に確認出来た。

以上の各染色像を評価した結果を図6) に示す。

2. 硬水から軟水と水道水による水洗各所の染色像【方法2】

I 媒染・II 分別・III 対比の各箇所でのグラム染色結果への影響を検討した。

水洗水の硬度が 304 mg/L, 200 mg/L, 100 mg/L である

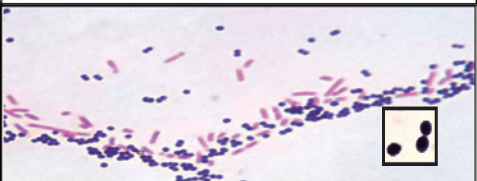
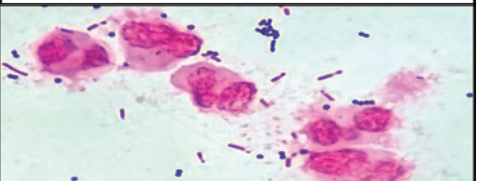
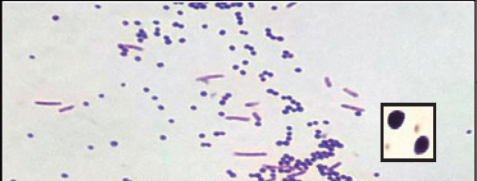
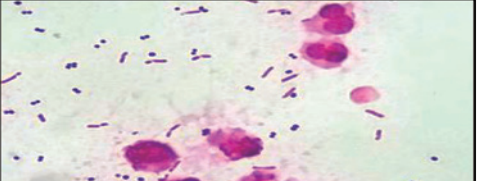
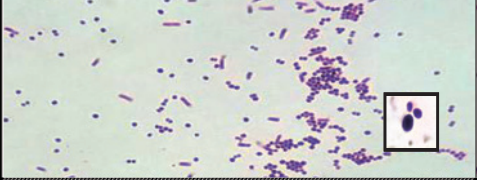
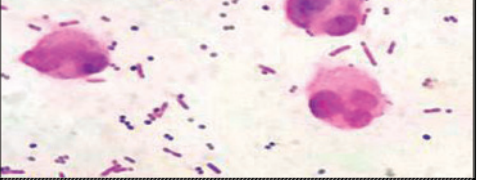
試料 水温	コントロール(GPC+GNR+Y)	喀痰
5℃		
結果	グラム陽性菌と陰性菌が明瞭に観察できる	細胞の核と細胞質が識別でき、菌体も明瞭に観察できる
22℃		
結果	グラム陽性球菌の極一部が陰性に染色される	細胞の核と細胞質が識別でき、菌体も観察できる
30℃		
結果	グラム陽性菌の一部が陰性に染色される	細胞の核と細胞質が識別できるが、グラム陽性菌の一部が陰性に染色される

図3. 水洗水と水温による染色への影響 ～イオン交換水（硬度0 mg/L）を使用～

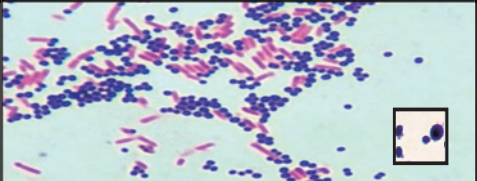
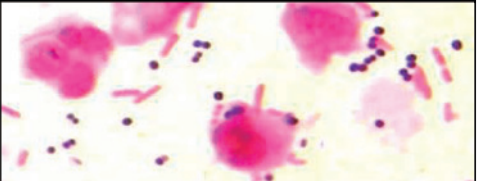
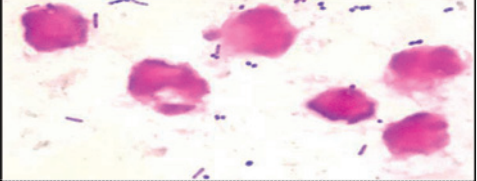
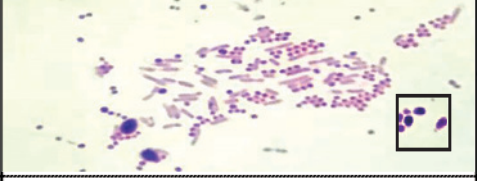
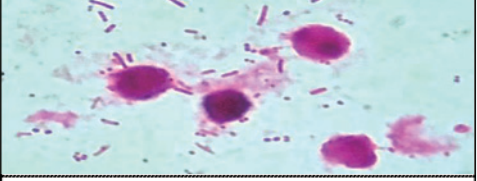
試料 水温	コントロール(GPC+GNR+Y)	喀痰
5℃		
結果	グラム陽性菌と陰性菌が明瞭に観察できる	細胞の核と細胞質が識別でき、菌体も明瞭に観察できる
22℃		
結果	グラム陽性菌の一部が陰性に染色され、陰性菌の識別がやや困難	細胞質がやや不明瞭で、グラム陽性菌の一部が陰性に染色される
30℃		
結果	グラム陽性菌の多くが陰性に染色され、陰性菌の観察が困難	細胞質が不明瞭。グラム陽性菌の多くが陰性に染色され、陰性菌の観察が困難

図4. 水洗水と水温による染色への影響 ～水道水（硬度80 mg/L）を使用～

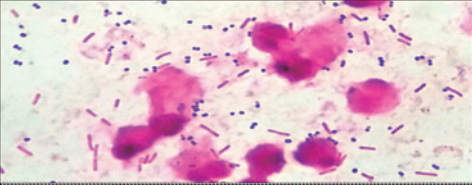
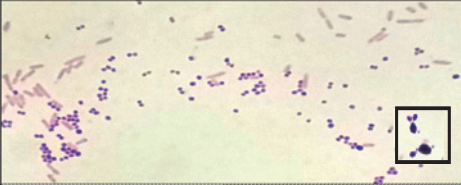
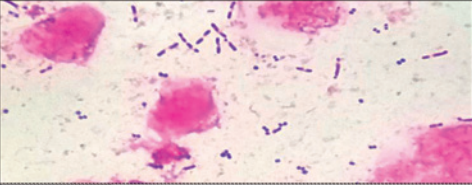
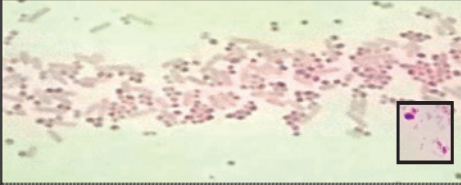
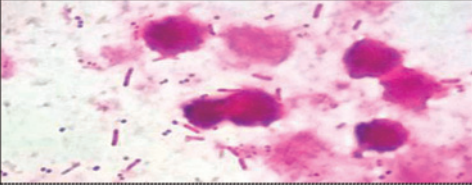
試料 水温	コントロール(GPC+GNR+Y)		喀痰	
5℃				
結果	グラム陽性菌の一部が陰性に染色され、陰性菌の識別がやや困難		細胞質がやや不明瞭で、グラム陽性菌の一部が陰性に染色される	
22℃				
結果	グラム陽性菌の多くが陰性に染色され、陰性菌の観察が困難		菌体と細胞が不明瞭で、グラム陽性菌がやや陰性に染色される	
30℃				
結果	グラム陽性菌が陰性に染色され、陰性菌の観察が不可能		菌体と細胞が不明瞭で、グラム陽性菌が陰性に染色される	

図5. 水洗水と水温による染色への影響 ～硬水（硬度 304 mg/L）を使用～

		<図3> イオン交換水【硬度0mg/L】				<図4> 水道水【硬度80mg/L】				<図5> 硬水【硬度304mg/L】			
		観察顕鏡			評価	観察顕鏡			評価	観察顕鏡			評価
		GPC(青)	GNR(赤)	Y(青)		GPC(青)	GNR(赤)	Y(青)		GPC(青)	GNR(赤)	Y(青)	
染色性確認用菌株（コントロール）	5℃	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	△	○	○	△
	22℃	○	○	◎	○	○	△	○	△	△	△	△	×
	30℃	△	○	△	×	×	△	△	×	×	×	×	×
検体（喀痰）	5℃	細胞も明瞭で、グラム陽性菌と陰性菌が明瞭に識別できる			◎	細胞も明瞭で、グラム陽性菌と陰性菌が明瞭に識別できる			◎	細胞は不明瞭で、菌体の識別がやや困難である			×
	22℃	細胞も明瞭で、菌体の識別もできるが、グラム陽性菌の極一部が陰性に染色される			○	細胞がやや不明瞭で、グラム陽性菌の一部が陰性に染色される			△	細胞は不明瞭で、多くの陽性菌が陰性に染色される			×
	30℃	細胞は明瞭であるが、グラム陽性菌の一部が陰性に染色される			×	細胞は不明瞭で、グラム陽性菌の多くが陰性に染色される。			×	細胞は不明瞭で、グラム陽性菌が陰性に染色される。			×

コントロール: GPC+GNR+真菌酵母の混合液

検体: 喀痰を使用

赤字…正しい染色性

◎…菌体が明瞭に識別できる

○…極一部不良

△…菌体がやや不明瞭かつ一部不良が確認できる

×

…全体的に不良

GPC…グラム陽性球菌(青)

GNR…グラム陰性桿菌(赤)

Y…酵母様真菌(グラム陽性: 青)

図6. グラム染色の水洗時に使用する「水3種と水温」の検討結果と評価

水洗箇所 \ 水の硬度	304mg/L	200mg/L	100mg/L
I 媒染後			
結果	多くが不染である	多くが不染である	染色性のムラがあるが、正しく染色されている
II 分別後			
結果	陽性菌も含め、多くが脱色される	陽性菌も含め、多くが脱色される	陽性菌の多くがやや脱色される
III 後染色後			
結果	陽性菌の多くが陰性に染まり 菌体も不明瞭	陽性菌の多くが陰性に染まり 菌体も不明瞭	陽性菌の多くが陰性に染まり 菌体も不明瞭

図 7. 染色時の各水洗箇所での比較（水温 22℃）～水質硬度 304・200・100 mg/L～

水洗箇所 \ 水の硬度	80mg/L	50mg/L	0mg/L
I 媒染後			
結果	染色性のムラがあるが、正しく染色されている	正しく染色されている	正しく染色されている
II 分別後			
結果	陽性菌の一部が脱色されている	グラム陰性菌のみ脱色されている	グラム陰性菌のみ脱色されている
III 後染色後			
結果	陽性菌の一部陰性化、菌体の識別は可能	グラム陽性菌と陰性菌が明瞭に識別できる	グラム陽性菌と陰性菌が明瞭に識別できる

図 8. 染色時の各水洗箇所での比較（水温 22℃）～水質硬度 80・50・0 mg/L～

		<図7> 硬水【硬度304mg/L】				<図7> 硬水【硬度200mg/L】				<図7> 硬水【硬度100mg/L】			
		観察顕鏡			評価	観察顕鏡			評価	観察顕鏡			評価
		GPC	GNR	Y		GPC	GNR	Y		GPC	GNR	Y	
(コ ン ト ロ ー ル 用 菌 株)	媒染後 <3菌種全て青に染色>	×	×	×	×	×	×	△	×	○	○	○	○
	分別後 <GNRのみ脱色>	×	○	×	×	×	○	△	×	△	○	△	△
	後染色後 <GPC+Yが青 GNRが赤>	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
各 所 評 価 の 内 容	媒染後	3菌種で不染が確認できる				3菌種で不染が確認できる				3菌種とも正しく染色されている			
	分別後	上記より不染であり、3菌種とも脱色				上記より不染であり、3菌種とも脱色				多くのグラム陽性菌の脱色が確認できる			
	後染色後	菌体の観察が不可能				菌体の観察が不可能				グラム陽性菌の陰性化が確認できる			
		<図8> 水道水【硬度80mg/L】				<図8> 軟水【硬度50mg/L】				<図8> イオン交換水【硬度0mg/L】			
		観察顕鏡			評価	観察顕鏡			評価	観察顕鏡			評価
		GPC	GNR	Y		GPC	GNR	Y		GPC	GNR	Y	
(コ ン ト ロ ー ル 用 菌 株)	媒染後 <3菌種全て青に染色>	○	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	分別後 <GNRのみ脱色>	△	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	後染色後 <GPC+Yが青 GNRが赤>	△	○	○	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
各 所 評 価 の 内 容	媒染後	3菌種とも正しく染色されている				3菌種とも正しく染色されている				3菌種とも正しく染色されている			
	分別後	グラム陽性菌の一部で脱色が確認できる				正しく脱色されている				正しく脱色されている			
	後染色後	陽性菌の一部陰性化、菌体の識別は可能				グラム陽性菌と陰性菌が明瞭に識別できる				グラム陽性菌と陰性菌が明瞭に識別できる			

コントロール：GPC+GNR+真菌酵母の混合液

赤字…正しい染色性
◎…菌体が明瞭に識別できる
○…種一部不良
△…菌体がやや不明瞭かつ一部不良が確認できる
×…全体的に不良

GPC…グラム陽性球菌(青)
GNR…グラム陰性桿菌(赤)
Y…酵母様真菌(グラム陽性：青)

図 9. グラム染色の媒染・分別・対比の各染色後の結果と評価

都県名	千葉県 (83mg/L)	埼玉県 (60mg/L)	東京都 (41mg/L)	栃木県 (38mg/L)
水温				
5℃				
結果	4都県とも、細胞の核と細胞質が明瞭であり、グラム陽性菌とグラム陰性菌も明瞭に観察できる			
22℃				
結果	細胞質がやや不明瞭で、グラム陽性菌の極一部が陰性に染色される		細胞質がやや不明瞭であるが、菌体の識別は可能である	
30℃				
結果	細胞質が不明瞭。グラム陽性菌が陰性に染色され、陰性菌の観察が困難		細胞質が不明瞭。グラム陽性菌の多くが陰性に染色され、陰性菌の観察が困難	

図 10. 4 都県の水道水での染色比較 ～水道水（採水近日硬度）を使用～

硬水の染色性比較を（図7）に示す。次に水道水（硬度 80 mg/L）、硬度 50 mg/L、硬度 0 mg/L の染色性比較を（図8）に示す。

硬度 304 mg/L から 100 mg/L において水洗での青色色素の脱色が確認出来た。硬度 50 mg/L から 0 mg/L では青色色素が脱色されず、定着が確認出来た。硬度が高いほど、水洗における色素の脱色が顕著であることが確認出来た。

以上の染色像を評価した結果を（図9）に示す。

3. 3 都県の水道水による染色【方法3】

方法1の千葉県である当施設水道水の染色結果と同じ結果が得られた。3都県全てにおいて水温5℃では良好な染色結果が得られ、水温30℃では染色不良が顕著であった。水温22℃においては極一部陰性化が見られたが、全体的に確認を行えば問題ない染色結果であった。更に追加検討時の硬度、千葉県と栃木県で染色像を比較すると硬度が高いほど陰性化が多く確認できた。

以上の染色像を評価した結果を（図10）に示す。

図10の各都道府県の硬度は、採水時から一番近い水質検査結果の値とした^{6)~9)}。

考 察

グラム染色法の原理は様々な説があるが、一般的には Davies らが提唱している細胞表面構造（ペプチドグリカン層の厚さ）の違いにより染色態度が異なると考えられている¹⁰⁾。

中西らの検討によるクリスタルバイオレットの染着形式について、鉛液を用いて染色性を確認した実験がある¹¹⁾。この実験より、菌体内の酸基とクリスタルバイオレット内の色素カチオンが結合しグラム陽性に染まり、この時の細胞一色素相互間に働いている力はクーロンの法則と Van der Waals の分子間力である。今回の検討と照らし合わせると、菌体と結合しているクリスタルバイオレットは菌体側より水洗時の金属イオン側へと強く結合をしたと考えられる。その金属イオンが多い（硬水）ほど脱色が著しい結果も得られたので、硬水で長く水洗を行うほど脱色が顕著になると考えられる。

また、温度に関して加温を行うと脱色の程度はさらに著しい結果が得られている¹¹⁾。この点に関しては、温度上昇に従い分子の熱運動が激しくなることからだと考えられる。

染物分野でも同じ現象がおきていて、塩基性カチオン染料は繊維分子と色素分子が静電氣的引力と分子間力で結合し、物が染まる。塩基性カチオン染料は繊維中の酸性基に静電氣的引力で染着するが、用水中の金属イオン Ca^{2+} や Mg^{2+} 等が多く含まれると染着が悪くなる¹²⁾。

今回の検討で、水洗水は水温硬度ともに低い程良好なグラム染色結果が得られた。逆に高い程染色性は悪くなり、菌体や白血球が不鮮明になった。

上記のことから、水洗水が高硬度かつ高温度であるほど、カルシウムイオン等が菌体や白血球内の染色液と結合性が増し、共に洗い出されているのではないかと考えられる。

日本における水道水の硬度は低値 0.101 mg/L～高値 200 mg/L で平均は 48.9 mg/L となっており、水道水水洗によるグラム染色性への影響は少ないと思われる¹³⁾。しかし、3都県の水道水を用いた結果から、グラム染色で水道水を使用す

る際、水温 22℃ を超える場合は染色不良が発生すると考えられる。また、水道水の硬度も高いほど染色不良の割合が増加する。このことから、水道水の水洗水使用と夏場の水温上昇には注意が必要と考えられる。

今回用いた菌体は易染色性の菌株が多く、難染色性の菌株の同一条件での検討を行ったときにはどのように染まるのかという調査が必要と考える。

本研究では水洗水の水温と硬度の面でのみグラム染色結果を比較検討した。他の因子の影響も否定できないが、グラム染色における水洗水の標準化が必要と考えられる。

なお、本論文の要旨は第31回日本臨床微生物学会総会にて発表した。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 山本 剛. 2015. グラム染色を用いた感染症診療支援について. 日本微生物学会誌 265-276.
- 2) 丸岡博信, 他. 2013. グラム染色評価を導入した感染症患者における薬剤管理指導. 日赤医学 64 (2): 420-425.
- 3) Gram, C. 1884. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyces in Schnitt- und Trockenpräparaten (ドイツ語). Fortschritte der Medicin 2: 185-189.
- 4) 連沼裕也. 2013. 臨床微生物検査における色素および呈色反応. J. Jpn. Soc. Colour Mater. 86 (6): 217-224.
- 5) 小栗豊子. グラム染色の利点・欠点・注意点. p. 30. 臨床微生物検査ハンドブック (第5版), 三輪書店.
- 6) 千葉県庁水道部浄水課水質管理班. 千葉県営水道「給水栓水質検査結果」.
<https://www.pref.chiba.lg.jp/suidou/jousui/suishitsu/kensa/index.html> 2023年9月18日現在.
- 7) 水道局. 東京都「水質検査結果」.
<https://www.waterworks.metro.tokyo.lg.jp/suigen/data/r05.html> 2023年9月18日現在.
- 8) 企業局水質管理センター. 埼玉県「水質検査結果」.
<https://www.pref.saitama.lg.jp/d1307/suisitsukanri-kensa/kensakekka.html#R05> 2023年9月18日現在.
- 9) 鬼怒水道事務所. 栃木県「鬼怒水道水の水質情報」.
<https://www.pref.tochigi.lg.jp/j54/n05iji/suishitsu.html> 2023年9月18日現在.
- 10) 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.
- 11) 中西俊雄. 1956. Crystalviolet の染着形式と Gram 染色のメカニズム. 日本細菌学雑誌 11 (12).
- 12) 今田邦彦. 2003. 染色技術者のための染料化学 (その9) 塩基性染料 (カチオン染料) について. 繊維工学 56 (8).
- 13) 堀まゆみ. あなたの水道水, 「硬さ」調べました～日本全国水道水の硬度分布～. 東京大学大学院総合文化研究科・教養学部.
https://www.c.u-tokyo.ac.jp/info/news/topics/files/20210629watanabe_horisoubun01.pdf 2023年5月24日現在.

Effect on Gram staining at water temperature or water quality

Kyohei Wada¹⁾, Setsuko Kubo¹⁾, Yuzo Tsuyuki²⁾, Sachiko Shibata¹⁾¹⁾Inspection Engineering Department, Sanritsu Co., Ltd.²⁾Sanritsu Service Co., Ltd.

Rapid confirmation of pathogenic bacteria is important in bacterial infections. Clinical microbiological examinations generally consist of smear staining, culture and susceptibility testing. Of these, culture and susceptibility testing usually take 2-3 days and have disadvantage in term of rapid diagnosis. On the other hand, the smear staining test is simple in procedure and excellent in quick reporting. The Gram stain method is the most common procedure of the smear staining tests for pathogens. It allows rough estimation of bacterial species and tissue damage by stainability and morphological observations. The findings obtained can provide useful information for initial treatment of infectious diseases.

We experienced the decrease of stainability in our laboratory this summer. Good staining results were obtained by using ion exchanged water containing no impurities as washing water. Therefore, it was suggested that the cause of the staining decline was water quality.

To find out the cause, we investigated on the effects of the water quality used for rinsing. Assuming routine examinations, water temperature ranging from 5 to 30°C and water quality ranging from 0 to 304 mg/L in hardness were used in this study. As a result, the stainability was the best when rinse water at a water temperature of 5°C and a hardness of 0 mg/L was used, and the rinse water with a water temperature of 30°C and a hardness of 304 mg/L was the worst. It showed good stainability as the water temperature and hardness decreased.

In this study, the Gram stainability was examined in terms of the temperature and hardness of rinse water. Although the effects of other factors cannot be ruled out, standardization of rinse water in Gram stain was considered necessary.