

簡易グラム染色性判定法の臨床分離菌への応用

岡山大学医学部細菌学教室

友近健一・船橋達天
丸山隆司・寺坂薫
金政泰弘

(昭和59年5月28日受稿)

Key words : Gram-stain,
Clinical isolates,
KOH method

緒言

一世紀も前に Gram により開発されたグラム染色法は、全細菌を陽性菌と陰性菌に2分する方法でしかもその性質が菌のもつ生物性状に大きく関与することで高く評価されている。しかも近年の進歩の著しい微細構造の研究により、グラム染色性の機序が細菌のもつ表層構造の差によることが明らかにされてからますます Gram 染色法の評価が高まったことは周知の事である¹⁾。したがってグラム染色は、細菌同定作業の第一段階に使用される手技として重要であるが、本染色法の手技が煩雑で多くの検体を取り扱う場合にはかなりの時間を必要とする難点がある。

グラム染色性をグラム染色法以外の手技で判定するためには、等電点測定、蛋白分解酵素による消化性、自己融解性、アルカリ抵抗性等が知られている²⁾。Fluharty と Packard は、染色によらない方法によるグラム染色性の分類を試み、KOH 処理による菌液の粘稠化がグラム陰性菌にだけ認められる事を明らかにした³⁾。その後、Kuhn は臨床分離菌同定時における経費および時間削減のため本 KOH 法を導入すべきだと述べている⁴⁾更に最近、Buck はグラム染色性の一定しない細菌が多い海洋細菌の同定にも KOH 法が有用であると報告している⁵⁾。

我々は、教室保存株および臨床分離株における KOH 法とグラム染色法とを比較し、KOH 法

採用上の問題点および有用性に関して検討を加え、KOH 法が通常の細菌検査において充分グラム染色法の代用に耐えることを明らかにした。

材料と方法

供試菌株は、Table 1 に示した教室保存株40株と尿路感染症患者分離株253株である。教室保存株は、Mycobacterium および Streptococcus を除いて普通寒天培地または CLED 培地にて培養し、Mycobacterium はソートン培

Table 1. 供試教室保存株のリスト

Gram-positive		Gram-negative	
<i>B. megaterium</i>	899	<i>Ent. aerogenes</i>	NCTC 10006
<i>B. subtilis</i>	RIMD 0225013	<i>Ent. cloacae</i>	NCTC 9394
<i>L. casei</i>	ATCC 7469	<i>E. coli</i>	IID 561
<i>L. helveticus</i>	ATCC 15009	<i>E. coli</i>	IID 954
<i>L. plantarum</i>	ATCC 8014	<i>E. coli</i> B	IID 562
<i>L. salivarius</i>	ATCC 11742	<i>E. coli</i>	NIHJ JC-2
<i>L. monocytogenes</i>	EGD	<i>K. pneumoniae</i>	NCTC 9632
<i>M. luteus</i>	ATCC 4698	<i>P. inconstans</i>	IFCO 3736
<i>Mycob. tuberculosis</i>	IID 591	<i>P. mirabilis</i>	TH-4
<i>S. aureus</i>	209P FDA	<i>P. morgani</i>	NCTC 10041
<i>S. aureus</i>	Cowan I	<i>P. rettgeri</i>	NIH 96
<i>S. epidermidis</i>	2623	<i>Ps. aeruginosa</i>	NCTC 10490
<i>S. epidermidis</i>	S 64-1	<i>S. typhi</i>	IID 611
<i>S. saprophyticus</i>	H 131	<i>S. typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>St. faecalis</i>	ATCC 10741	<i>Sh. sonnei</i>	IID 969
<i>St. faecalis</i>	H 138	<i>Ser. marcescens</i>	IFCO 3736
<i>St. faecium</i>	H-24A	<i>Ser. marcescens</i>	IID 620
<i>St. mitis</i>	ATCC 9811		
<i>St. pneumoniae</i>	IID 552		
<i>St. pneumoniae</i>	IID 554		
<i>St. pneumoniae</i>	IID 555		
<i>St. pyogenes</i>	IID 693		
<i>C. albicans</i>	IID 867		

地, Streptococcus は血液寒天培地で培養した。臨床分離株は, 全て CLED 培地で分離培養を行った後, グラム陽性菌は血液寒天培地で, グラム陰性菌は CLED 培地で, 真菌はサブロー寒天培地で培養した。液体培養はトリプティケースソイ液体培地でを行った。

グラム染色は Hucker 液を用いる常法に従って行った⁶⁾。この場合, 菌の塗抹から鏡検までの行程には約10分を要する。KOH 法によるグラム染色性の判定は, スライドグラス上に KOH 液を滴下し, それに供試菌を白金耳を用いて懸濁し粘稠化をもってグラム陰性菌と判定する。粘稠化の判定は, 菌懸濁液を白金耳で釣り上げた場合に糸を引く様に成る事でを行った。なお KOH 液は作成後, 密栓して室温保存したが, 少なくとも2ヶ月は充分使用することができ, 陰陽の判定には全く支障はなかった。

結 果

1. KOH 濃度のグラム染色性判定時間に及ぼす影響。

実験に使用する KOH 濃度を設定するため, グラム陰性菌7株の各種 KOH 濃度による粘稠化までの時間を測定した。結果は Table 2 に示した。0.5%でも多くのグラム陰性菌が1分以内に粘稠化したが, 2・3の菌株では菌量の影響もあって成績が一定しない場合があった。3% KOH 濃度では, 極めて短時間の粘稠化が認められ結果も安定し再現性に富んでいた。しかし3%以上を使用してもこれ以上の処理時間の短縮は認められなかった。しかもこの3% KOH では供試した全てのグラム陽性菌は, 1分以内では全く粘稠化しなかった。従って以下の実験においては, 3% KOH 液を使用した。

2. KOH 法によるグラム染色性判定に及ぼす菌量の影響。

菌量の影響を調べるために, 100 μ l の3% KOH 液に1/4白金耳から5白金耳までの量を懸濁したが, 成績には全く影響を与えなかった。100 μ l の KOH 液に対して1/2白金耳未満の菌量では, グラム染色性の判定が困難であった場合が数菌種であった。通常の判定には, 20~30 μ l の KOH 液を使用するので, 1/5白金耳程度の菌

Table 2. KOH 濃度のグラム染色性判定時間に及ぼす影響

Strain	Conc.	KOH concentration (%)				
		0.5	1.0	2.0	3.0	5.0
<i>E. coli</i> IID 561		30	20	20	20	20
<i>E. coli</i> IID 562		>60	40	30	20	20
<i>E. coli</i> ATCC 27166		>60	40	30	30	30
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9632		40	20	20	10	10
<i>Proteus mirabilis</i> TH-4		40	30	20	20	20
<i>Ps. aeruginosa</i>		60	50	30	30	30
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311		50	40	40	40	40

判定は, 100 μ l KOH 液に1白金耳の固型培地発育菌を使用して行った。単位は粘稠化までの時間を秒数で示してある。

Table 3. KOH 法によるグラム染色性判定に及ぼすグラム陽性菌培養時間の影響

Strain	Culture time	KOH method	Gram stain method
<i>S. aureus</i> 209P	18 (hr)	+*	100 (%)**
	36	+	100
	45	±	90
	60	-	85
	90	-	80
<i>St. faecalis</i> H-21A	18	+	100
	36	+	100
	45	+	95
	60	+	80
	90	±	70

* KOH 法による判定は, 菌懸濁液が粘稠化したものを(-)と表示してある。

** グラム染色でグラム陽性に染った菌の百分率で示してある。

量を使用すれば, グラム染色性の判定に最適であることが判った。

液体培養後, 遠心分離で集菌した菌の KOH 法によるグラム染色性の判定においても良好な成績が得られたが, 判定までの時間は約2倍程度となった。なお, *Listeria monocytogenes* では, 菌が寒天面に食い込んで発育するため, KOH 法による判定に必要な菌量を釣菌するには困難で行い得なかった。

3. KOH 法によるグラム染色性判定に及ぼす

Table 4. 臨床分離株の KOH 法による Gram 陰陽判定結果の検討

Gram stain	KOH method*	
	Positive result	Negative result
Positive bacteria (86 strains)	86 strains (100%)	0
Negative bacteria (143 strains)	0	143 strains** (100%)
Positive Fungi (24 strains)	24 strains (100%)	0

* KOH 法による判定は、菌懸濁液が60秒以内に粘稠化したものを Negative と判定した。

** 143株のうち140株は40秒以内にすべて粘稠化した。3株のみは60秒かかって粘稠化した。

すグラム陽性菌培養時間の影響。

KOH 法は、溶菌に伴った DNA の漏出に基づく粘稠化によりグラム染色性を判定するものである。培養時間の延長に伴うグラム陽性菌の陰性化も十分考慮さねばならない。Table 3 は、グラム陽性菌である *S. aureus* と *St. faecalis* の培養時間延長が、KOH 法に如何なる結果をもたらすかを従来のグラム染色法結果と比較しつつ検討した。結果は KOH 法は +、- で、グラム染色法は陽性を示す菌の百分率で示した。KOH 法によるグラム染色性の陰性化とグラム染色の陰性率には平行関係はあるものの、完全な相関性は認められなかった。したがって Table に明らかな様に、KOH 法を使用する場合には供試菌の培養時間に充分注意する必要がある。

4. 臨床分離株の KOH 法によるグラム染色性判定。

供試した臨床分離株は、グラム陽性球菌86株、グラム陰性杆菌143株、真菌24株であった。新鮮培養菌を使用した場合には、グラム染色結果と100%相関していた (Table 4)。しかしながら、3株のグラム陰性菌では、KOH による粘稠化の度合いが弱く、処理時間を延長する必要があった。粘稠化までの時間は最長のもので60秒で、大多数のグラム陰性菌は30秒以内に粘稠化した (Table 4)。グラム陽性菌および真菌は1株も粘稠化せずグラム染色結果と良く一致して

いた。分離培養などに使用した培地成分によるグラム染色性判定の妨害は全く観察されなかった。

考 察

近年細菌表層構造の研究は飛躍的發展を示し、グラム染色性の違いは表層構造の差を反映していることで高い評価がなされている¹⁾。その結果、約40年前に日本人研究者により明らかにされたグラム陰性菌のアルカリによる粘稠化法は、アルカリ処理による表層構造の破壊に基づく DNA 漏出が機序であることが明らかとなった。このような背景もあり、最近グラム染色性の判定に KOH 法をグラム染色法の代りに使用する事が再検討されつつある³⁻⁵⁾。我々は、臨床分離細菌の同定作業時に煩雑なグラム染色法に代って、KOH 処理によるグラム染色性の判定方法を導入することを試みた。その結果、新鮮培養菌を使用し、3% KOH 液20~40 μ l 当り1/5白金耳量以上の菌体を使用すればグラム染色結果と100%一致することを見出した。また、グラム染色性の判定に要する時間も1分以内であり多くの検体を迅速に処理するには非常に有用な方法であると思われる。しかし KOH 法にもいくつかの難点はある。KOH 法は、グラム染色法に比べて多量の菌体を必要とするため釣菌が容易なようにコロニーの独立発育が必要である。しかも菌の分離純粋性が完全であることを要求する。それはグラム陰性菌の中に少量のグラム陽性菌が混入していてもそれが検出され得ないためである。また、本法では菌の形態観察を行わないので、菌の形状に関する情報が必要な場合には、他の方法により得る必要がある。

前述のような KOH 法の短所も、本法が安価に行ない得て、しかも迅速な方法であり手技の熟練も必要としない点を考慮すればルチンに行なう菌同定の第一段階作業に極めて有用な方法として汎く採用されてよいと考える。

要 約

臨床分離細菌の検査同定作業の能率化をはかる目的で、グラム染色法によらないグラム染色性判定法の導入を試みた。KOH 液を用いた簡易染色法を試験するため、教室保存株における

グラム染色性の判定に必要な KOH 液濃度およびその他の判定条件に検討を加えた。その結果、3% KOH 液を使用し、充分量の新鮮培養菌を使用するならば供試した全ての菌株でグラム染色結果と一致した。この結果に基づき、尿路感染症患者由来株253株の染色性を判定した。3株のグラム陰性株で若干反応性が弱かったものの全ての菌でグラム染色結果と一致した。

KOH 液は、グラム染色性の判定が迅速、安

価、かつその判定には熟練を必要としない点から今後大いに使用されるべき方法と考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み本実験に多大な協力を頂きました教室の森徳子嬢、池田多美恵嬢の両名に深く感謝いたします。

文 献

1. Rogers, H.J., Perkins, H.R., and Ward, J.B.: *Microbiol Cell Wall and Membranes*. Chapman and Hall Publication, London, 1980.
2. 橋本雅一：細菌染色法。「臨床検査講座」16, 11—16, 1977.
3. Fluharty, D.M., and Packard, W.L.: Differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria without staining. *Am. J. Vet. Clin. Pathol.* 1, 31—35, 1967.
4. Kuhn, P.J.: Practical ideas for cost containment in microbiology. *Med. Lab. Observ.* 13, 73—86, 1981.
5. Buck, J.D.: Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 992—993, 1982.
6. 医科学研究所学友会編：細菌学実習提要, p. 123, 丸善株式会社, 1976.

**Application of KOH method for determination of
Gram reaction of clinical isolates.**

**Ken-ichi TOMOCHIKA, Michitaka FUNABASHI, Takashi MARUYAMA,
Kaoru TERASAKA and Yasuhiro KANEMASA**

Department of Microbiology, Okayama University Medical School,

A rapid nonstaining method for the determination of the Gram reaction was applied to clinical isolates. In this study, 253 clinical isolates were tested by both the KOH method and Gram staining method. Both methods discriminated 110 of Gram-positive bacteria and Yeast-form fungus, and 143 of Gram-negative bacteria. These results confirmed the application of KOH method to clinical isolates.