

染色の基礎

「グラム染色液；フェイバーGについて」

島津ダイアグノスティクス株式会社

品質保証部 学術担当

岩脇 研次

グラム染色の種類

- 現在、主として用いられているグラム染色法は、ハッカーの変法、Bartholomew & Mittwer の変法（B&M法）、および西岡の方法（フェイバー法）である。
- かつてグラム染色といえば ハッカーの変法を指していたが、近年はB&M法とフェイバー法で大部分を占めている。

参考) 令和4年(2022年) 度 日本臨床検査技師会サーベイ報告書より

方 法	施設数 (%)
B&M法	1,089 (61.6)
西岡法	556 (31.4)
ハッカーの変法	56 (3.2)
自家製	40 (2.3)
その他	27 (1.5)
合計	1,769 (100.0)

検体（菌株）の塗抹

- **原則は薄い標本を作ることである。力を入れず、すばやく、薄く広げる。**
粘性部分が多く薄く広げにくい場合は、ムラになってもよい。
- ・ 喀痰は、カギ型白金線や滅菌済竹串（自施設で乾熱滅菌実施）を用いて膿性部分を引っ掛け、スライドガラスに塗抹する。また、滅菌生理食塩水で洗浄（必須ではないが洗浄した方がよい標本ができる）してから塗抹する場合もある。
- ・ 菌がないと推定される透明な尿と髄液は厚めに作ってもよいとされる。
- ・ 膿汁等で薄く広げることが難しいものは、スライドに少量の滅菌生理食塩水を置き、それを検体に加えるようにして広げる。
- ・ 血管内カテーテル先端は滅菌したハサミで5 mm程度の長さに切断し、少量の滅菌生理食塩水を加えてボルテックス後、塗抹する。

検体（菌株）の塗抹

- **血培陽性ボトルは、菌液をスライドの端に1滴落とし、その一部分を白金耳(先端だけでなく全体を使って)で薄く広げる。**
 - 鏡検に適したスライドの位置は、標本の外側の末端（波打ち際）である。
 - 波打ち際は厚みがないために背景の染まりが薄く、ヘリコバクターなどの染まりの悪い菌を見つけやすい。
 - 塗抹方法の悪い例として、ボトル菌液をスライド中心に落とし、白金耳で外側に向かってぐるぐると回すように広げると、外側に血球が集まって厚くなり、波打ち際ができなくなる。

塗抹標本の固定

- 塗抹後は、自然乾燥させる。
- 固定（目的：殺菌とスライドへの付着性および色素の浸透性を高める）

- メタノール固定の場合

ドーズに入れたメタノールにスライドを浸す、またはメタノールをスライドにかける。（1～2分間）乾燥後、染色

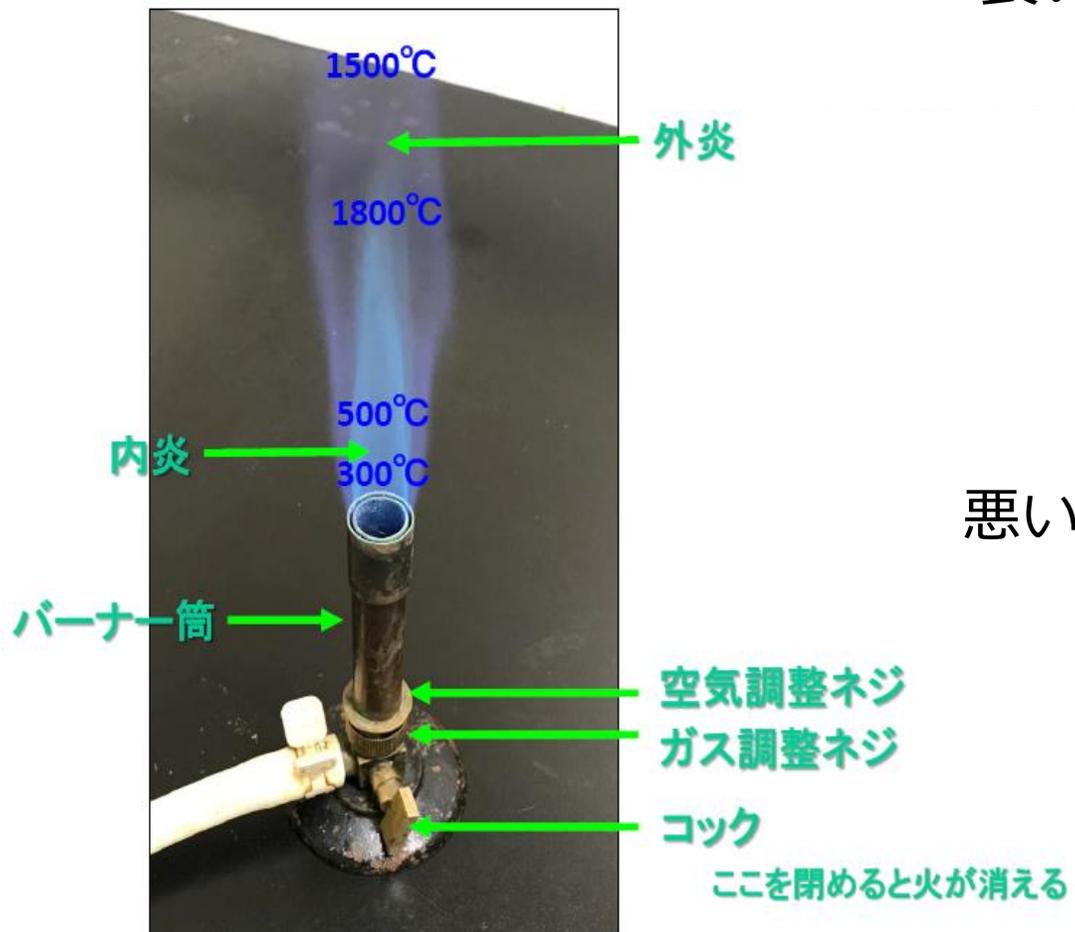
- 火炎固定の場合

バーナーは、青い弱い炎（還元炎の青く弱い）にする。

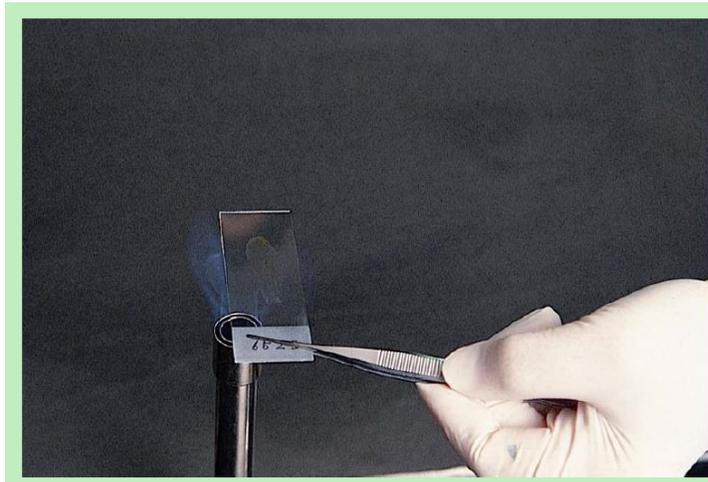
スライドガラスをピンセットで挟み、炎の中をゆっくり3回通過させる（ゆっくりとは、食パンを切るくらいの速度）。

（注）強い炎での固定は、細胞が破壊されて染色液がよく浸みこむため、脱色されにくくなる。

火炎固定



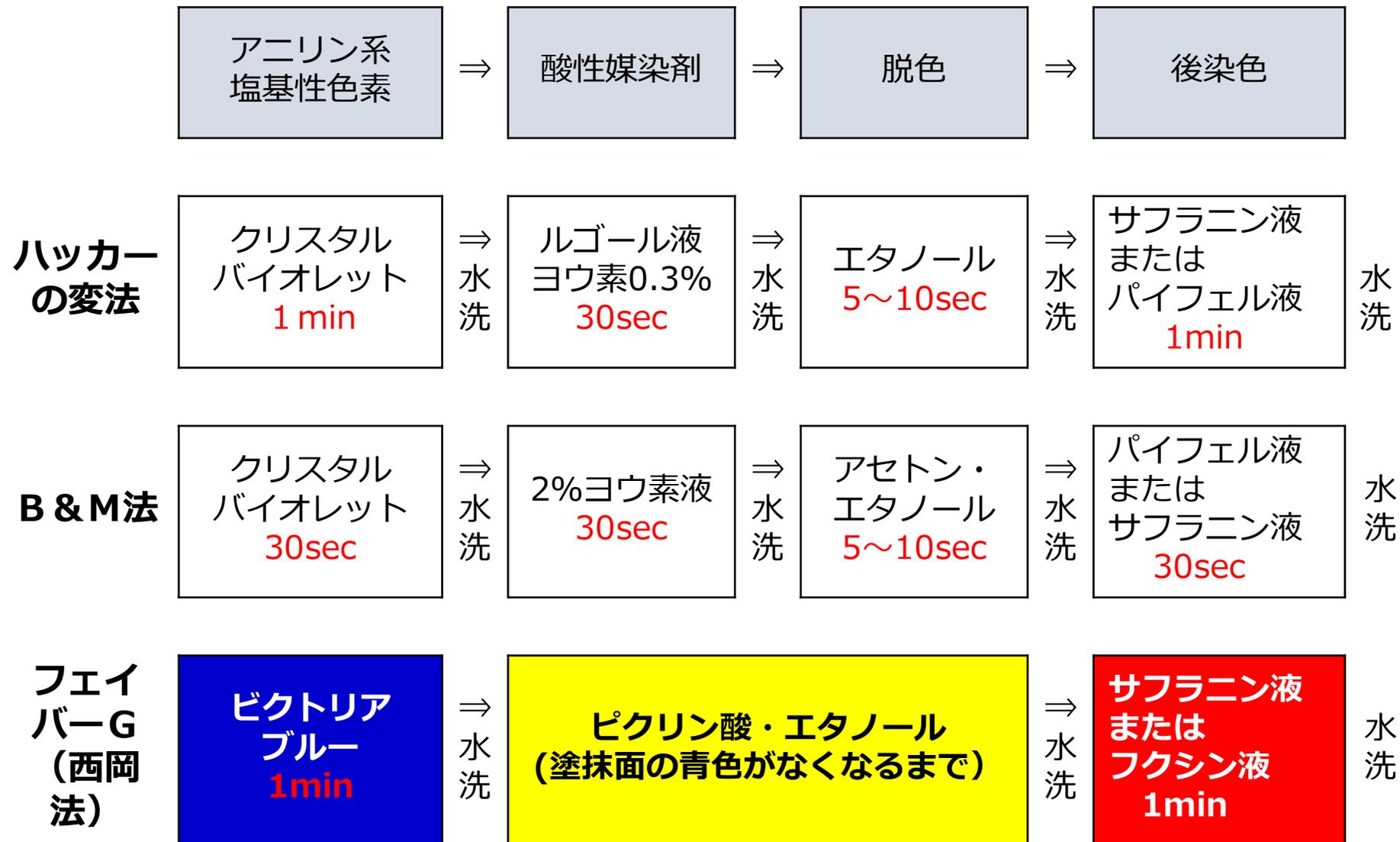
良い例



悪い例



各種グラム染色法の操作ステップ

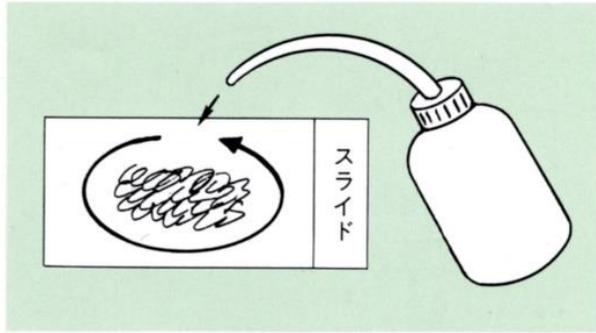


各グラム染色法の特徴

ハッカーの変法	<ul style="list-style-type: none">✓ グラム染色の基本である。染まりが繊細である。✓ 媒染剤のルゴール液に含まれる<u>ヨウ素量が0.3%と少ないため、通常の方法では媒染が不十分</u>となり、<u>染色性が安定しない</u>場合がある。それを補うためにはルゴール液の掛け方に工夫が必要である。✓ 脱色液が無水エタノールであるため<u>標本の厚いところは脱色に時間がかかる</u>。それに気をとられると<u>薄いところが脱色過多になる</u>。✓ 良好な染色標本を作製できるようになるには、<u>経験を要する</u>。
B&M法	<ul style="list-style-type: none">✓ 媒染剤の<u>ヨウ素含有量が2%であるため媒染が十分にできる</u>。✓ 媒染が十分であるため、脱色にアセトン・エタノールが使用できる。<u>脱色は5~10秒で完結できる</u>。✓ わずかなトレーニングで良好な標本を作製することができる。
フェイバー法 (西岡法)	<ul style="list-style-type: none">✓ <u>媒染と脱色をピクリン酸・エタノール混合液 1本で行うことができる</u>。✓ 濃汁など厚い標本の場合には脱色が困難になる。✓ <u>脱色後に水洗を十分に行う。ここがこの染色のポイントである</u>。 <u>水洗が不十分であると、ピクリン酸の色が取れず標本面が黄色味帯び</u> <u>グラム陽性菌が緑色になる</u>。

染色手技上のこつと注意点

染色試薬のかけ方



染色試薬が検体の塗抹部分に直接当たらないように**周囲から**かける。

後染色の場合は、染色液が水で薄まらないよう、水洗後の**水切りをよく行ってから**かける。

こつ

水洗の仕方

・水道水を使う場合には、水量を弱くし、スライド裏面にかき軽く洗い流す。

・フェイバー法の場合は、ピクリン酸・エタノールで脱色後、**黄色味をとる**ため水洗は十分に行う。

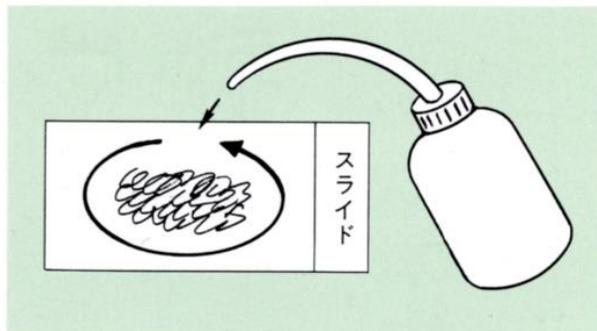
こつ

・水洗後、スライドに付着した**余分な水を振り切り**、次の試薬を作用させる。（次の試薬の浸透性を高めるために行う）

こつ

染色手技上の注意点

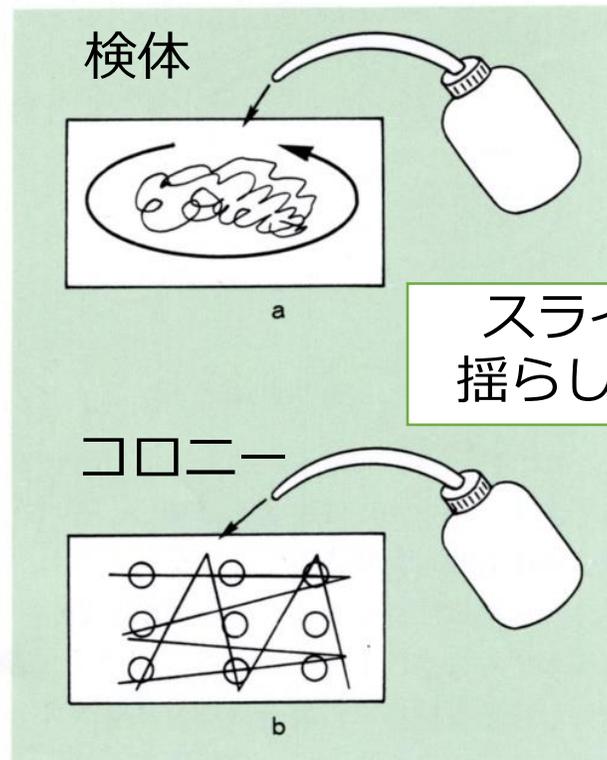
媒染剤のかけ方



- 媒染剤は検体の塗抹部分に**直接当たらないよう**に周囲からかける。

こつ

脱色液のかけ方



スライドは揺らしながら

- 脱色液が検体の塗抹部分に**直接当たらないよう**に周囲からかける。

失敗しないための脱色のコツ!

- ① 脱色前にスライド上に残った余分な水を取り除く（水をよく切っておく）
- ② 最初の脱色液の注ぎ方が大切で、一気にスライド全体を覆うように注いで脱色液をこぼれるくらい満載する

一気に十分量注ぐことで残った水分による脱色液の希釈を最低限に抑えることができる。

失敗しないための脱色のコツ!

- ③ 脱色液を満たした後に、脱色液を追加しながら余分な前染色液を洗い流す
(一旦浮き上がった前染色液の再付着防止ため)

注意!!!

水を切った後、標本を乾燥させてはならない。乾燥すると脱色抵抗性を示すようになるため、水を切ったのちは速やかに脱色液を注ぐ

標本の乾燥と鏡検

●乾燥

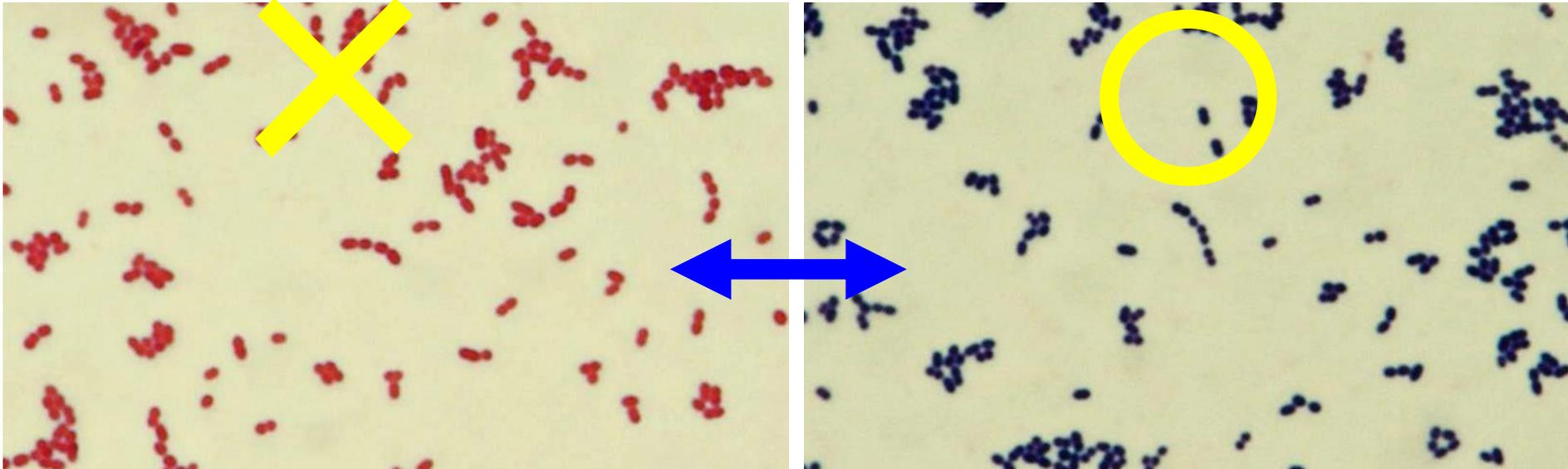
- 染め上がった標本をはしごに乗せ、ヘアードライヤーなどで乾かす。
はしごは斜めに置き、風を当てるとよい。風はホットでも大丈夫である。
- ろ紙を使う場合には、標本をろ紙に挟み、軽く押さえる。その後、標本を空中で振って完全に乾かす。

●鏡検

- 対物レンズを低倍率（10倍か20倍）にし、ピントが合ったら油浸レンズ（100倍）に切り替え、油浸用オイルを標本に滴下し観察をする。
- 検体の鏡検の場合には、白血球が存在している場所を中心に観察する。
- 白血球が多数存在しているにもかかわらず、菌が見えない場合には、さらに視野を増やして観察する。
- 鏡検終了後、油浸レンズに付いたオイルはキムワイプ等を使用しキシレンで拭き取る。
途中で拭く場合には、アルコール・エーテル液を使用する。常にキシレンを使用すると、キシレンで溶けたオイルが油浸レンズの先端の隙間からレンズ内部に入り込むため、最後のみとする。

失敗例①

Streptococcus pyogenes



水で80%に希釈した脱色液

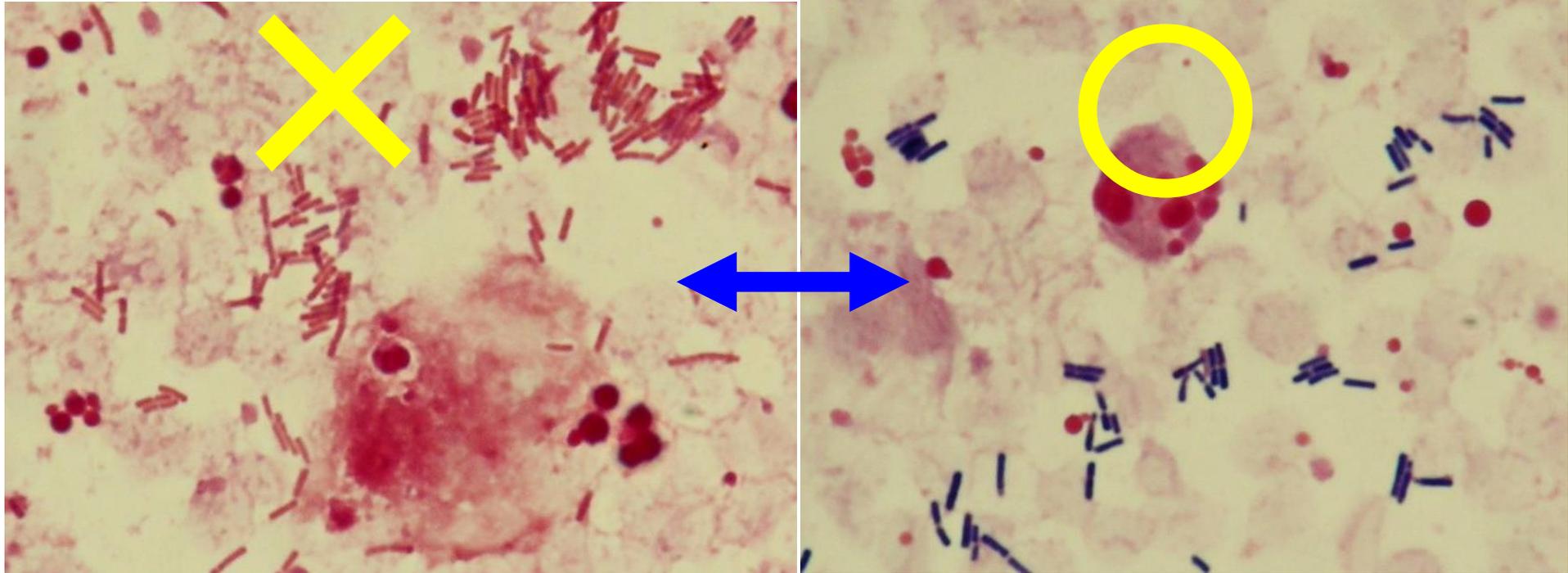
脱色液原液

脱色液を希釈すると、脱色が増強する。したがって、脱色液が希釈されないように、脱色液をストレートに使用すれば、正しく染めることができる。
(脱色液を80%に希釈した場合の染色例)

「感染症診断に役立つグラム染色」第2版より改変

失敗例②

Bacillus spp.



前述の脱色工程の他、培養条件によってグラム陽性になったり陰性になったりする菌もあり、これをグラム不定と言う。*Bacillus* 属細菌では古い培養菌や長時間培養が細胞壁の損傷などにより、グラム陰性になることがある。

「感染症診断に役立つグラム染色」第2版より改変

フクシンの改良

染色液Bフクシン（従前品）はグラム陰性菌の染色性が弱い傾向があり、特に*Campylobacter*属菌など一部の菌種では、ほとんど染まらずに、見落とす可能性も指摘されていました。
改良品では、染色性を改善し、グラム陰性菌をより検出しやすくしました。

<染色例 (*Helicobacter pylori*) > (自社データ)

<従前品染色液B>

<改良品染色液B>



“劉 (Ryu) の方法”

培養菌株のグラム染色性がどうしても判断できない場合、
“劉の方法”が参考になると考えられますので紹介します。

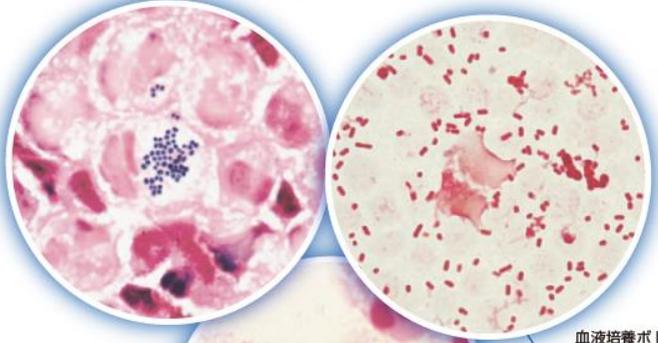
- ① スライドガラスの中央にガラス鉛筆などで2cm程度の円を描き、この中央に3% KOH水溶液1滴を滴下する。
- ② なるべく若い培養菌を白金線で釣菌し、その菌苔をKOHと混和する。
- ③ グラム陽性菌：変化なし
グラム陰性菌：菌苔が粘稠性となり、静かに引き上げると糸を引いたようになる。

SHIMADZU
Excellence in Science

グラム染色液 **フェイバー G**

ビクトリアブルー／脱色液／フクシン／サフラン
媒染・脱色が同時で、グラム染色が短時間に。

化膿性胸膜炎の胸水中に存在した
Staphylococcus aureus



血液培養ボトルに
発育した
Escherichia coli

多数の好中球が認められた、
グラム陰性双球菌
Neisseria gonorrhoeae



永田邦昭著
「感染症診断に役立つグラム染色」第1版より

品名	製品コード	希望納入価格(円)	備考
フェイバー G 染色液Aビクトリアブルー	05872	1,800	0.2% ビクトリアブルー溶液
フェイバー G 脱色液	05871	2,100	2%ピクリン酸 エタノール溶液
フェイバー G 染色液Bフクシン	05875	1,400	0.04% フクシン溶液
フェイバー G 染色液Bサフラン	05869	1,400	0.25% サフラン溶液

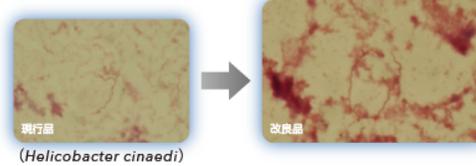


包装：500mL、貯法・使用期限：室温・12ヶ月

リニューアル

フェイバー G 染色液B フクシン

染色性を改善し、グラム陰性菌
をより検出しやすくしました。

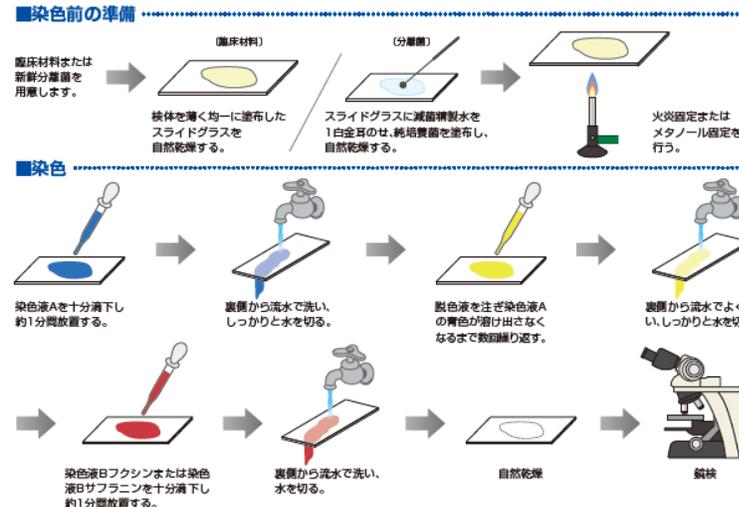


特長

- 媒染と脱色を同時に行うため操作が簡便です。
- ヨウ素液による媒染およびエタノールでの脱色法は高度な技術が必要ですが、西岡法(フェイバー G法)はピクリン酸エタノール溶液で媒染と脱色を同時に行うため、操作が簡便で、誰でも簡単に良好な染色結果が得られます。
- グラム陽性菌はビクトリアブルーにより鮮やかな青色に、グラム陰性菌は赤色に対比染色されます。

対比染色の赤色は2種類あり、好みによって選択できます。
○フクシン液……マゼンタともいう塩基性色素で、紫がかった赤色に染まります。
○サフラン液……鮮紅色の塩基性色素で、明るい紅色に染まります。

操作手順



注意事項

- ・染色液A後の水洗は水滴をよく切ってください。水滴が残ると脱色液のアルコール濃度が低くなり、染色液Aが抜け落ちて、グラム陽性が陰性化する場合があります。
- ・脱色液の水洗は十分に行ってください。水洗が不十分のまま後染色を行うと、色素の沈着物が出現し、用いにくい濃率となる場合があります。

製造販売元
島津ダイアグノスティクス 株式会社
お問い合わせ先：カスタマーサポート 課
TEL: 03 (5846) 5707
URL: <https://corp.cdcshimadzu.co.jp/>



島津製薬株式会社
島津製薬株式会社
島津製薬株式会社



島津製薬株式会社
島津製薬株式会社
島津製薬株式会社

操作例の動画

<https://vimeo.com/483366904>



よくあるご質問 (FAQ)

<https://clinical-diagnostics.biz.sdc.shimadzu.co.jp/faq/>

