

## 総説

# 簡易迅速染色液ディフ・クイックの微生物分野への応用

中村 彰宏

天理よろづ相談所病院 臨床病理部：奈良県天理市三島町 200 (〒 632-8552)

Key Words 塗抹検査, グラム染色, ディフ・クイック染色

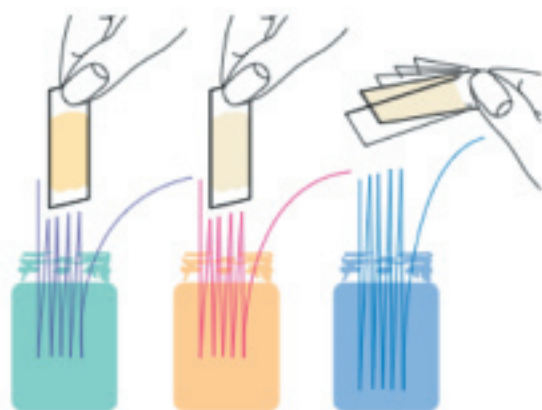
## はじめに

微生物検査領域における迅速化が求められる今日、塗抹検査は最も安価で迅速に実施可能な検査であり重要な診断ツールである。塗抹検査は細菌の有無のみを観察するのではなく、細菌以外の要素すなわち炎症のステージやウイルス感染およびアレルギーなどの非細菌性炎症などを観察することで、幅広い情報が得られ治療方針の決定に大いに貢献することが可能である。日常検査における染色法にはグラム染色が汎用されているが、本染色法は細菌観察のための染色法であり、細胞分類などには不適である。そこで、当検査室では塗抹検査においてより多くの情報を得るため、ディフ・クイック染色(シスメックス社)を

併用している。ディフ・クイック染色の操作法を図1に示す。ディフ・クイック染色は、固定から染色まで15秒でライト・ギムザ染色と同様な染色形態が得られる簡易迅速染色液セットであり、ベッドサイドでの穿刺吸引細胞診や血液形態などで頻繁に用いられる。本染色法は微生物分野においてもグラム染色との併用によって非常に有用な染色法であると考える。本稿では、ディフ・クイック染色の当院における利用方法をいくつか実例をふまえ紹介する。

## 血流感染症例における活用

血中に生きた微生物が存在する血流感染は重篤な感染症の一つであり、それを早期に診断することは、患者の予後に大きく関与する。当院における血液培養検査はバクテアラート 3D シリーズ(シスメックス・バイオメリュー社)を用いて行っている。本装置付属の FA/FN 培養ボトルは、ボトル中に活性炭粒子を含有しており、活性炭粒子を含まないボトルに比べ抗菌薬投与中患者において菌検出感度が高い<sup>1-3)</sup>。しかし、血液培養陽性時にグラム染色を行い細菌を確認する際に、活性炭はグラム陽性に染まるためグラム陽性菌を見落としやすくなる<sup>4)</sup>。図2-aにカテーテル感染における MRSA 敗血症例の血液培養グラム染色像を示したが、ボトル中に存在する活性炭粒子とグラム陽性球菌との鑑別ができない。特に、ブドウ球菌系は塊状に増殖するため、グラム染色のみで活性炭と鑑別することは困難である。そこで、当院



①固定液：5回 ②染色液Ⅰ：5回 ③染色液Ⅱ：5回

図1. ディフ・クイック染色の操作法

では血液培養陽性時にディフ・クイック染色を併用している。図2-bにディフ・クイック染色像を示したが、菌体は鮮青色に染色され、活性炭との鑑別は容易となる。また、グラム陰性桿菌とグラム陽性球菌の複数菌血流感染症の場合においても、グラム陽性球菌を見落とすことなく報告することが可能となる(図3-a, b)。

また、血流感染起炎菌のなかには、グラム染色で染色されにくい稀な病原体も存在する。図4-aに*Campylobacter fetus*による敗血症例のグラム染色像を示したが、本菌はらせん形態を示し、グラム染色のサフラニンに染色されにくく、グラム染色の背景が不良であれば検出が困難となる場合がある。図4-bにディフ・クイック染色像を示したが、菌体が明瞭に観察できる。

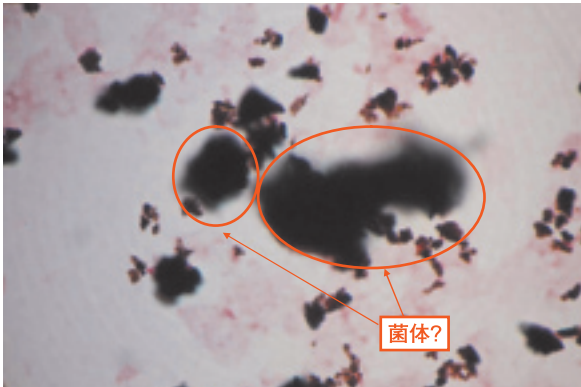


図2-a. MRSA 敗血症における血液培養液のグラム染色像 (×1000)

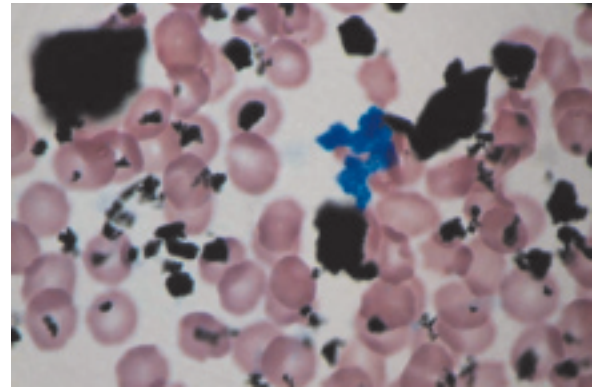


図2-b. MRSA 敗血症における血液培養液のディフ・クイック染色像 (×1000)

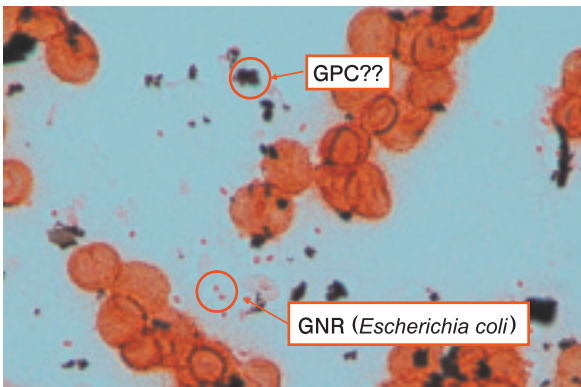


図3-a. 複数菌敗血症における血液培養液のグラム染色像 (×1000)

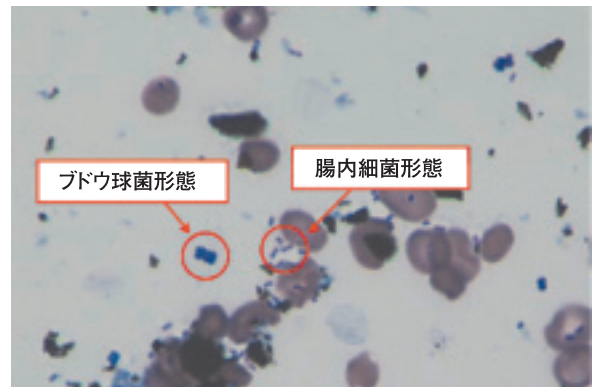


図3-b. 複数菌敗血症における血液培養液のディフ・クイック染色像 (×1000)

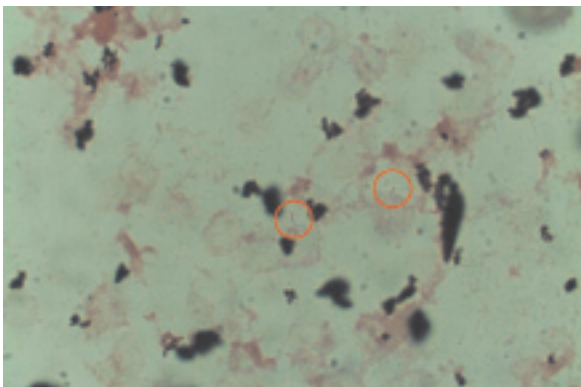


図4-a. *Campylobacter fetus* による敗血症例のグラム染色像 (×1000)

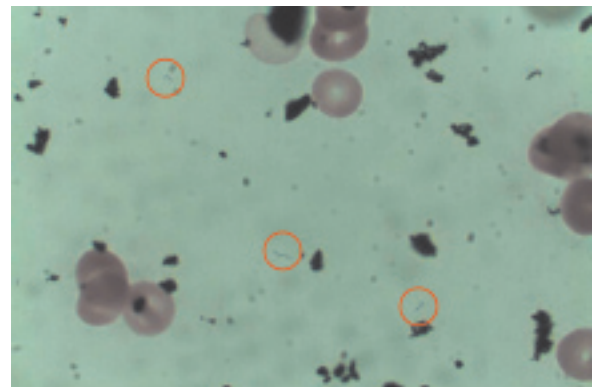


図4-b. *Campylobacter fetus* による敗血症例のディフ・クイック染色像 (×1000)

次に、**図5-a**に *Mycobacterium fortuitum* による敗血症例のグラム染色像を示した。抗酸菌は、通常グラム染色ではグラム不定な染色形態を示す場合が多く、見落とされてしまうことが多いが、**図5-b**に示したディフ・クイック染色像では抗酸菌も明瞭に染色されている。本症例では、ディフ・クイック染色の併用により抗酸菌血流感染を疑い、チールネルゼン

染色を実施することができた。チールネルゼン染色像を**図5-c**に示す。

血流感染治療において、血液培養陽性時の塗抹検査結果は重要な意味をもつ。細菌の見落としは命取りになりかねない。ディフ・クイック染色を併用することで、より正確な検査結果を迅速に報告することが可能となる。

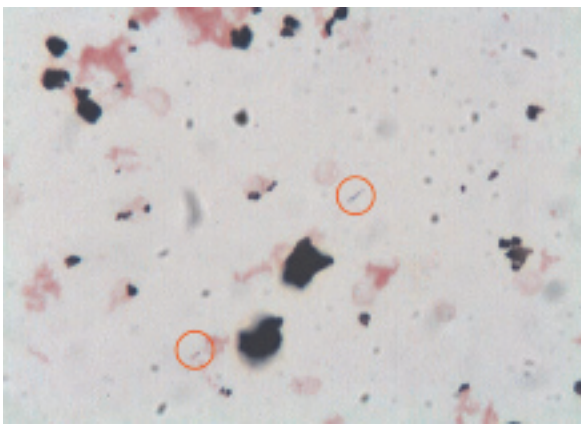


図5-a. *Mycobacterium fortuitum* による敗血症例のグラム染色像 (×1000)

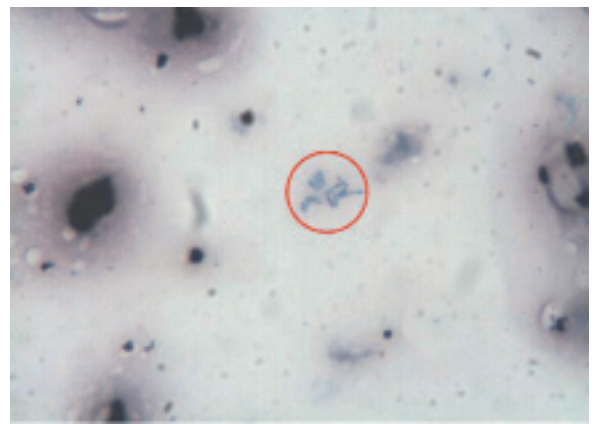


図5-b. *Mycobacterium fortuitum* による敗血症例のディフ・クイック染色像 (×1000)



図5-c. *Mycobacterium fortuitum* による敗血症例のチールネルゼン染色像 (×1000)

## 原虫類による感染症例における活用

本邦における原虫感染症は近年増加傾向にある<sup>5)</sup>。特に我々が日常検査において頻繁に遭遇するアメーバ類である *Entamoeba histolytica* による赤痢アメーバ症は、世界で年間 5000 万人の感染者が存在し、死亡者数は毎年 4～7 万人になると推定されている<sup>6)</sup>。また、近年では汚染コンタクトレンズの装用が原因の *Acanthamoeba* spp. によるアカンソアメーバ角膜炎が注目されている<sup>7-9)</sup>。本疾患は難治性で強い眼痛を主訴とするが、診断が遅れ適切な治療が行われなければ失明に至ることもあり、早期診断が求められる疾患であ

る。これらアメーバ類の検査診断法は、近年では Real-Time PCR 法の進歩により病原体遺伝子の検出が可能となってきたが<sup>10-12)</sup>、PCR 法を実施するには特殊な機器を必要とするために日常検査として浸透していないのが現状である。しかし、現在の微生物検査室におけるグラム染色では、原虫を明確に染め分けて検出することは難しい。図 6-a に角膜擦過物から検出したアカンソアメーバ栄養型のグラム染色像を示したが、菌体の輪郭および菌体内構造が不明瞭で観察が困難である。しかし、図 6-b に示したディフ・クイック染色像では菌体内の核も明瞭に観察することができる。また、図 6-c の嚢子も明瞭に観察可能である。

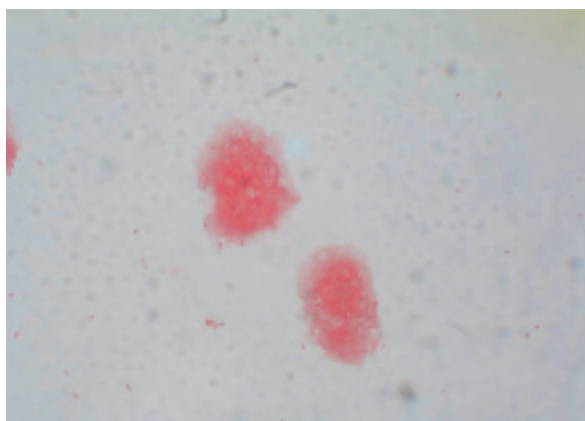


図 6-a. *Acanthamoeba* spp. 栄養型のグラム染色像 (×1000)

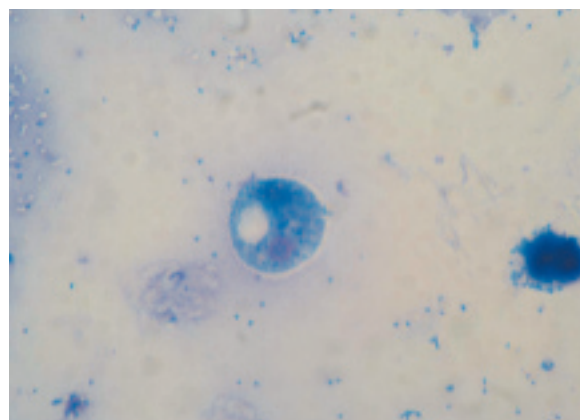


図 6-b. *Acanthamoeba* spp. 栄養型のディフ・クイック染色像 (×1000)

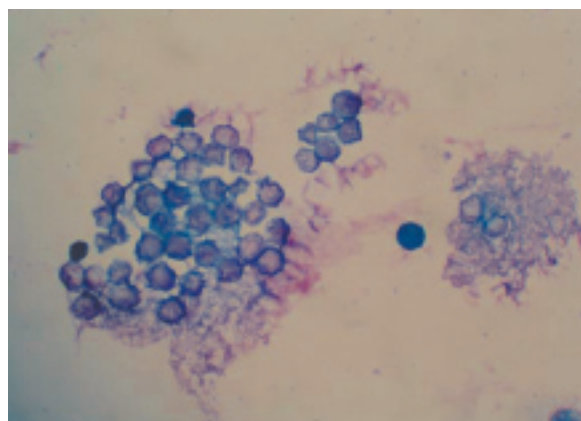


図 6-c. *Acanthamoeba* spp. 嚢子のディフ・クイック染色像 (×100)

また、*Giardia lamblia* によるジアルジア症も 1999 年 4 月～2006 年 3 月の 7 年間に、本邦では 683 例が報告されており、そのうち国内感染例は 298 例と従来からの海外旅行での輸入感染のみならず国内感染例が多く存在している<sup>5)</sup>。ジアルジア症の診断は、栄養型あるいは嚢子を顕微鏡下にて検出することで確定するが、**図 7-a** に示したグラム染色では、核やカリオソームが不明瞭で検出することは困難である。しかし、**図 7-b** のディフ・クイック染色では、核やカリオソームなどを明瞭に染色することが可能である。

## 呼吸器感染症例における活用

ここまでは病原体そのものを染める染色法として紹介したが、ディフ・クイック染色は本来細胞観察用の染色法であり、多種の細胞（単核球、多核球、好酸球など）を鑑別することが可能である。微生物分野における顕微鏡検査は、ただ単に細菌を見るのみでなく細菌以外の要素を観察することも重要である。例えば、**図 8-a** に示した喀痰グラム染色像では、一見多核好中球が多数浸潤しており、細菌性肺炎の所見に思われるが、**図 8-b** のディフ・クイック染色では、好酸性顆粒が染色され、大部分の細胞が好酸球であることがわかる。このような好酸球性肺炎の症例では抗菌薬の投与は行われず、ステロイド治療などが施されるため、細菌性肺炎との鑑別は重要である。

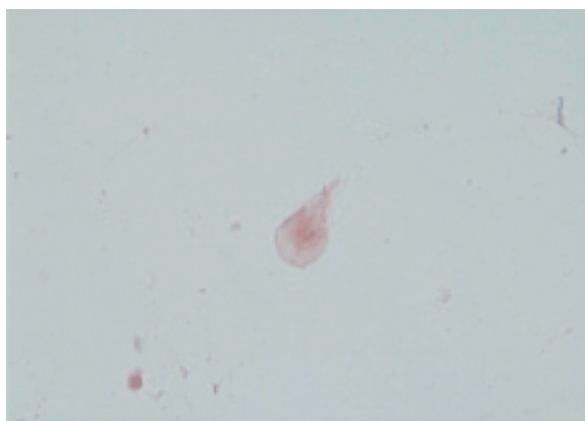


図 7-a. *Giardia lamblia* 栄養型のグラム染色像 (×1000)

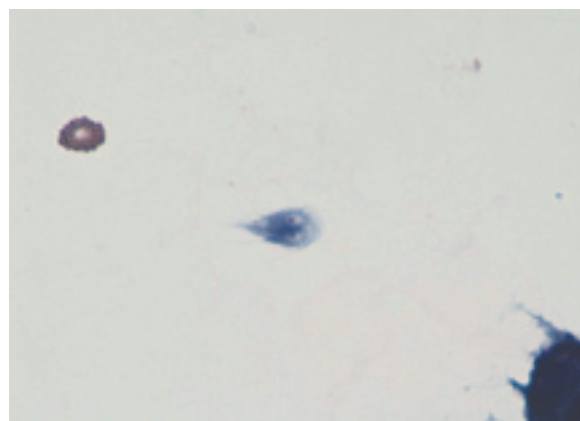


図 7-b. *Giardia lamblia* 栄養型のディフ・クイック染色像 (×1000)

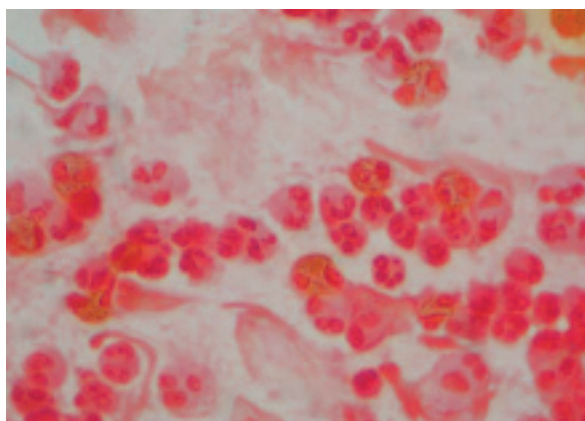


図 8-a. 好酸球性肺炎のグラム染色像 (×500)

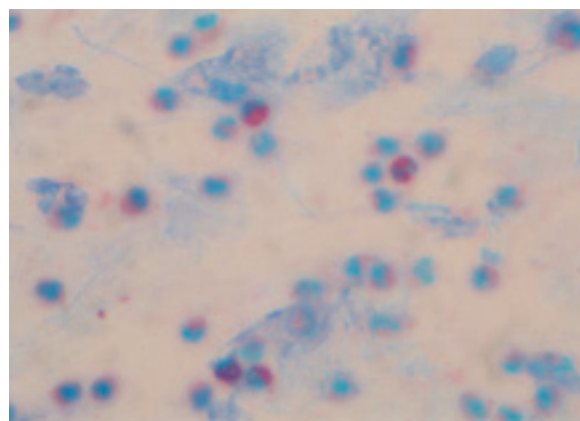


図 8-b. 好酸球性肺炎のディフ・クイック染色像 (×500)

本邦における市中肺炎病原体の頻度を図9<sup>13)</sup>に示したが、グラム染色において検出可能な病原体は、市中肺炎病原体のうち約20%にすぎない。特に非定型肺炎の代表格であるマイコプラズマや肺炎クラミジアは、市中肺炎病原体のうち約40%と高頻度に認めるが、グラム染色では菌体を染色することは不可能である。ディフ・クイック染色でも、菌体そのものを染色することは不可能であるが、細胞成分を観察することで非定型肺炎を疑うことは可能である。図10-aに示したのは喀痰グラム染色像であるが、一

見多数の好中球浸潤を認めるように思われる。しかし図10-bのディフ・クイック染色では、細胞の大部分が単核球であることがわかる。そこで主治医に非定型肺炎病原体が疑われる旨を伝え、その後咽頭ぬぐい液によるマイコプラズマをターゲットとしたReal-Time PCR検査で陽性となり、マイコプラズマ肺炎と診断された。このように、塗抹検査はディフ・クイック染色を併用することで細胞分類が容易になり、病因を推定できる有用なツールとなる。

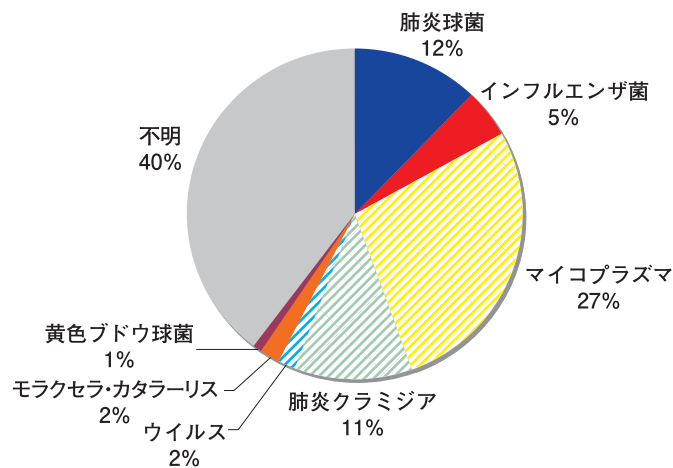


図9. 本邦における市中肺炎病原体の分離頻度<sup>13)</sup>  
 ※斜線グラフはグラム染色では検出できない病原体

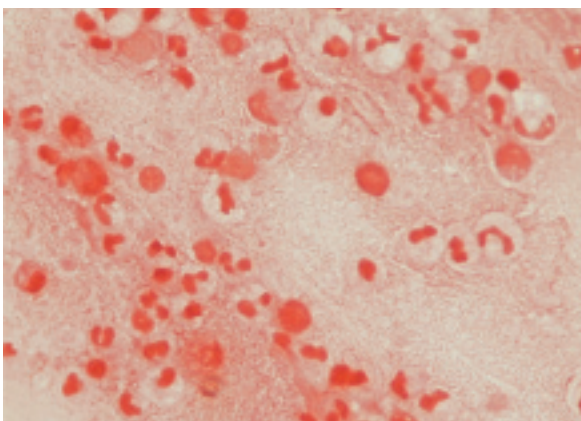


図10-a. *Mycoplasma pneumoniae* 肺炎症例におけるグラム染色像 (×500)

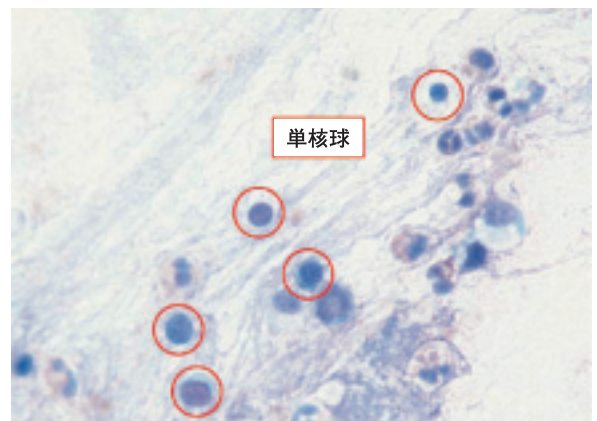


図10-b. *Mycoplasma pneumoniae* 肺炎症例におけるディフ・クイック染色像 (×500)

## おわりに

診断群分類 (Diagnosis Procedure Combination) 時代が到来し、安価で正確な検査が求められる近年では、グラム染色の有用性が再認識され重要視されている。しかし、グラム染色は検査結果が実施者の経験に左右されやすい検査であり、誰でもいきなり実施できるものではない。ディフ・クイックは染色技術を必要とせず、誰でも短時間で実施することができるうえ、グラム染色では染色されにくい病原体や細胞成分を検出することを可能とする。今後、塗抹検査から得ることができる情報をいかに最大限に引き出し、付加価値を提供するかが重要であろう。

## 参考文献

- 1) Weinstein MP et al. Controlled evaluation of BacT/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture bottles for detection of bacteremia and fungemia. *J Clin Microbiol.* 1995; **33** (4): 978-981.
- 2) Wilson ML et al. Controlled evaluation of BacT/Alert standard anaerobic and FAN anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia and fungemia. *J Clin Microbiol.* 1995; **33** (9): 2265-2270.
- 3) McDonald LC et al. Clinical importance of increased sensitivity of BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 1996; **34** (9): 2180-2184.
- 4) Sumerkan B, Gökahmetoglu S, Eşel D. Brucella detection in blood : comparison of the BacT/Alert standard aerobic bottle, BacT/Alert FAN aerobic bottle and BacT/Alert enhanced FAN aerobic bottle in simulated blood culture. *Clin Microbiol Infect.* 2001; **7** (7): 369-372.
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター : <http://idsc.nih.go.jp/index-j.html>
- 6) WHO. WHO Amoebiasis. *Weekly Epidemiological Record.* 1997. **72** : 97-99.
- 7) Thebpatiphat N et al. Acanthamoeba keratitis : a parasite on the rise. *Cornea.* 2007; **26** (6) : 701-706.
- 8) 石橋康久 他 . Acanthamoeba keratitis の 1 例 : 臨床像 , 病原体検査法および治療についての検討 . *日本眼科学会誌* . 1988 ; **92** (6) : 963-972.
- 9) Stehr-Green JK et al. The epidemiology of Acanthamoeba keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol.* 1989 ; **107** (4) : 331-336.
- 10) Roy S et al. Real-Time PCR Assay for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection. *J Clin Microbiol.* 2005 ; **43** (5) : 2168-2172.
- 11) Qvarnstrom Y et al. Comparison of Real-Time PCR Protocols for Differential Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *J Clin Microbiol.* 2005 ; **43** (11) : 5491-5497.
- 12) Qvarnstrom Y et al. Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba* spp. , *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol.* 2006 ; **44** (10) : 3589-3595.
- 13) Miyashita N et al. Community-acquired pneumonia in Japan : a prospective ambulatory and hospitalized patient study. *J Med Microbiol.* 2005 ; **54** (4) : 395-400.

# Application of Diff-Quick, a Simple and Rapid Staining Method to Clinical Microbiology

Akihiro NAKAMURA

Department of Clinical Pathology, Tenri Hospital, 200 Mishima-cho, Tenri-shi 632-8552

### Key Words

Microscopic Examination, Gram Staining, Diff-Quick