

埼玉医科大学病院 臨床検査医学

(中央検査部)

微生物検査 実習テキスト



第5版

(2026年1月13日改訂)

中央検査部で行う実習の目的

感染症の診療には病原体に関する正確な基礎的知識が必須である。正確な病原体の知識は幅広い臨床推論を可能にさせ、病原体学に根ざした臨床検査を深く学ぶことは、適切な診断と適切な患者指導に貢献できる。

本実習書は、微生物検査に関する教育効果を高め、知識の定着を図るために作成した。特に実習等の開始前には必ず本書を通読し、実習に備えるように心がけること。さらに、本書を知識の定着のための自己学習にも活用し、微生物検査のバイブルとして使用していただくことを期待している。

喀痰、便、尿などの臨床試料は自らで手に取り、五感を総動員して実検体を観察することは極めて重要である。適切な患者指導のもと良質な検体を採取し、その品質を自ら評価できなければ、正しい臨床推論は不可能である。中央検査部での実習では、短期間ではあるが可能な限り多くの実検体に触れ、多様な標本を観察できるよう努力すること。そのために時間が不足する場合、実習時間外・期間外を問わずいつでも観察できるよう準備している。より深く学ぶことを希望する場合には、担当教員まで遠慮なく申し出ること。

* QRコードとリンク画像について

QRコードの読み取り、もしくは、タップをすることで、臨床検査医学が管理するサーバに保存される画像データにリンクします。この画像データは、教育効果を高めるために公開しており、自由な活用を歓迎するが、外部への公表ならびにデータの配布は厳禁とする。必要な場合には中央検査部まで相談すること。

参考文献

- 1) 標準微生物学 第14版 (医学書院)
- 2) 戸田新細菌学 第34版 (南山堂)
- 3) グラム染色からの感染症診断 (羊土社)
- 4) 図解人体寄生虫学 改訂10版 (南山堂)
- 5) 寄生虫薬物治療の手引き 改訂 第10.2版 (無料ダウンロード可能)

http://jsp.tm.nagasaki-u.ac.jp/wp-content/uploads/2022/01/tebiki_2020ver10.2.pdf

テキスト作成担当者

埼玉医科大学病院 中央検査部 (細菌・遺伝子検査室)

連絡先 : t_maeda@saitama-med.ac.jp (前田)

目次

微生物検査室で行う実習の目的	p 2
(目次)	p 3
第1章 グラム染色と細菌培養検査	p 5
1. グラム染色の原理	p 6
2. 検体採取法	p 8
3. グラム染色像の形態分類	p 16
4. グラム染色像	p 20
第2章 抗酸菌感染症の検査	p 33
1. 抗酸菌塗沫検査 チール・ネルゼン染色	p 34
2. 抗酸菌培養検査	p 36
3. 抗酸菌 核酸増幅検査	p 37
第3章 抗菌薬の種類と選択	p 39
1. 抗菌薬の作用機序	p 40
2. 抗菌薬の選択	p 40
3. 臨床的に分離頻度の高い細菌	p 41
4. 抗菌薬のスペクトラム	p 42
第4章 上気道感染症の検査	p 45
1. 上気道検体採取	p 46
2. 尿を用いた呼吸器感染症検査	p 50
第5章 マラリア	p 53
1. マラリア原虫と臨床分類	p 54
2. イムノクロマト検査	p 54
3. 薄層塗抹検査	p 54
第6章 寄生虫感染症 検便検査	p 59
1. 直接塗沫法 生鮮観察	p 60
2. 直接塗沫法 ヨード染色	p 60
3. MGL 法	p 60
4. ショ糖浮遊法	p 61
5. 腸管原虫の観察	p 62
6. 虫卵の観察	p 64
7. 衛生害虫とその疾患	p 69

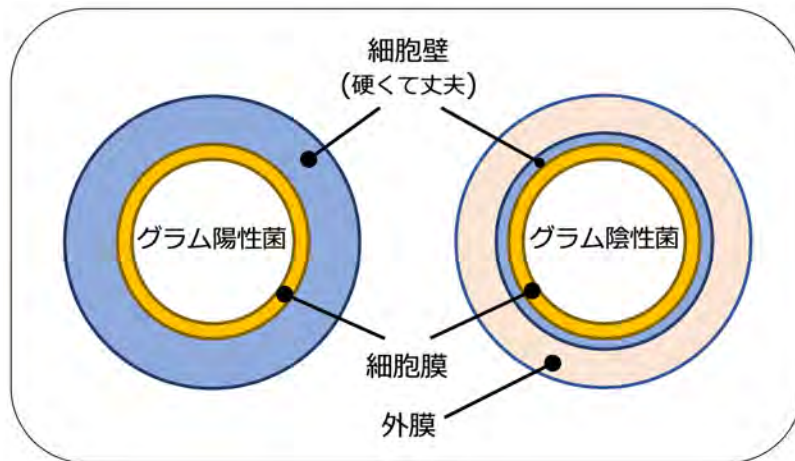
第1章

グラム染色と細菌培養検査

1. グラム染色の原理 (なぜ、染め分けができるのか?)

① 細胞構造が違う

- ▶ グラム陽性菌は厚い細胞壁(ペプチドグリカン層)をもつ(硬くて丈夫)。
- ▶ グラム陰性菌は細胞壁が薄い。外膜にある脂質成分(Lipid A)から長い糖鎖が伸長する構造をとる(=LPS; リポ多糖)。**[重要]**



② 染色の手順(フェイバー)法 フェイバー法はグラム染色法の一つの変法

	陽性菌	細胞壁	乾燥	水洗	水洗	水洗	水洗	乾燥
	陰性菌	外膜 細胞壁						
手順	塗抹	固定	前染色	媒染	脱色	後染色	観察	
試薬		火炎	ビクトリア青	脱色液 (ピクリン酸・エタノール)		フクシン液		
説明			陽陰性共に紫色に染まる	紫色色素が不溶化(媒染)、陰性菌はアルコールで破壊され脱色する		脱色した陰性菌のみ赤く染まる		

1. 前染色: クリスタル・バイオレットの色素(ビクトリア青)を細胞内に浸透させる。
2. 媒染: ヨウ素液を反応させ、クリスタル・バイオレットと複合体を形成させる。
3. 脱色: エタノールを作用させると細胞壁が障害され、複合体が細胞外へ溶出する。**(重要→)**このとき、細胞壁が厚いグラム陽性菌では複合体がそのまま残存するが(紫色)、壁が薄い陰性菌では細胞壁が破壊され、複合体が溶出する。
4. 後染色: フクシン液を作用させると、陰性菌は赤色に染色されるが、陽性菌は脱色できておらず、赤色には染色されない(グラム染色での染め分け)。

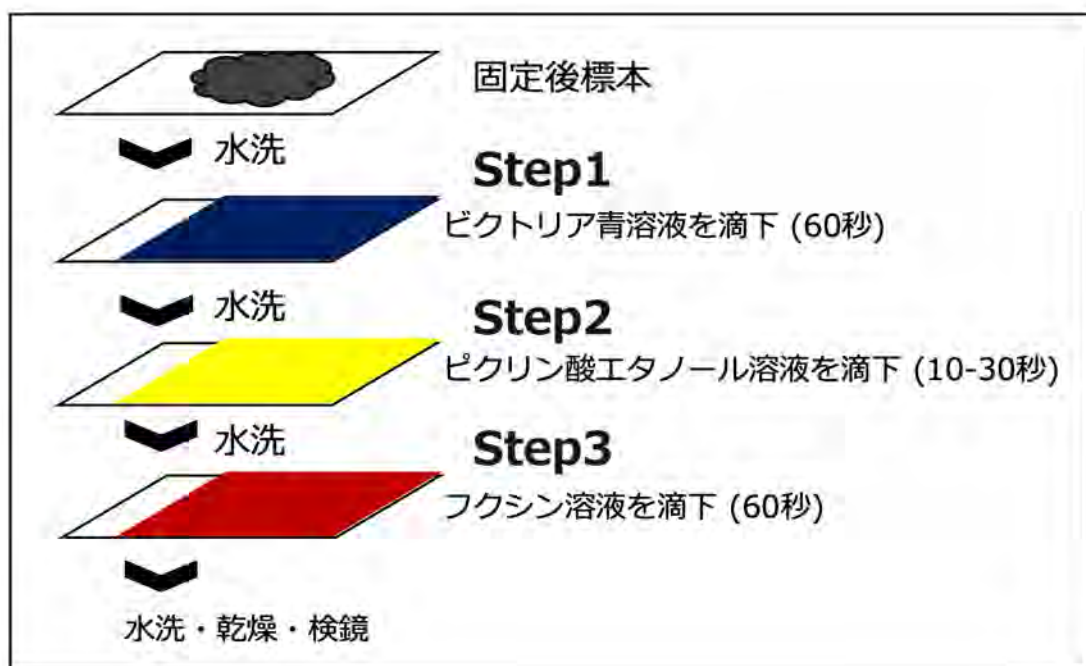
グラム染色の手順（フェイバー法）

① 試薬の準備（右図）

② 塗抹・自然乾燥・固定

検体は薄く塗抹する。すくい取る菌量はゴマ粒程度の量にとどめる(厚く塗りすぎない)。自然乾燥で乾燥した後に固定する。固定は火炎固定とメタノール固定がある。

③ 染色



- ✓ 染色の順番は信号と同じ『青・黄・赤』の順で。
- ✓ 染色液は十分な量を標本に滴下すること(ケチらない！)
- ✓ 脱色がもっとも重要。十分に、かつ脱色しすぎないように。
- ✓ 水洗の際には、スライドガラスの裏側から優しく水で流すこと。

④ 観察[重要]

1. 油浸 1,000 倍で鏡検し、厚塗でなく染色性のよい部分に視野を合わせる。
2. 好中球および扁平上皮細胞を観察することで「**検体の質**」を評価する (Geckler 分類に従う)。**質が低いと判断できる場合、検体の取り直しを検討する。**
3. 好中球が集簇し、貪食像が見られる領域を重点的に観察する。
4. 菌の推定が可能な鑑別点を探す (正円形、楕円形、連鎖、ブドウ状、大きさ、長さ、莢膜の有無、菌の変性など)。・・・**起因菌の推定**

2. 検体の採取法 (1)

① 喀痰検体

喀痰検査は気管支や肺(下気道)感染症の病原菌検査のために実施する。

- ✓ 口腔や咽頭には多くの菌が常在し、これらが喀痰に混入すると良い検査ができない。まず、水道水でよくうがいをして、口腔内を清潔にすること。必ず入れ歯は外して採取する(口腔内の常在菌の混入を可能な限り少なくする努力が重要!)。
- ✓ 強く咳をして気管支や肺から喀出される痰を提出する。この時、唾液や鼻汁は混じらないよう注意する。
- ✓ 喀痰が出せない場合は誘発喀痰を試みる。はじめに気道収縮軽減のため β_2 刺激剤を吸入する。次に、超音波ネブライザーを用いて 5%の高張食塩水を吸引させ、排痰を誘発する (誘発喀痰)。

* 喀痰は結核菌等が含まれる可能性があり、バイオハザードに十分注意し取り扱うこと。

<検体採取上の注意点>

- ✓ 検体の保存と運搬も重要。採取後は速やかに提出する。夜間・休日の場合、雑菌が増えないよう冷蔵庫で保管する。
- ✓ 嫌気性菌や肺炎球菌は特に死滅しやすく、放置すると検出できなくなる。
- ✓ 膿性成分を多く含む検体を目指すこと。

<検体の評価の基準>

(1) 肉眼的な評価 (Miller and Jones 分類) [重要]

膿性成分の割合をその場にいない医療者に正確に伝えるために用いる。できるだけ膿性成分の多い「P 痰」を検査に用いること。






(2) 顕微鏡的な評価 (Geckler 分類) [重要]

分葉核を有する好中球の存在は起炎菌が近くに存在するサイン (細菌の貪食像やフィブリンの析出も同様)。扁平上皮細胞は唾液の混入を示唆し、線毛上皮細胞はその検体が大気道由来であることを示唆する(必ず観察すること!)。

- 唾液の混入が少なく、好中球が多い検体が良好な検体である。
- Geckler 分類 4 群もしくは 5 群の喀痰を検査に使用することが望ましい。

Miller and Jones の分類

喀痰の肉眼的所見による評価方法。喀痰の膿性部分の割合に基づき分類しており、P2、P3 に分類された喀痰が質のよい検体とされる。

				
M1	M2	P1	P2	P3
唾液 (粘性成分のみ)	粘性痰の中に 少量の膿性成分	膿性成分が 全体の 1/3 以下	膿性成分が 全体の 1/3~2/3	膿性成分が 全体の 2/3 以上

M: Muroid (粘性), P; Purulent (膿性)

Geckler 分類

Geckler 分類は顕微鏡を用いた喀痰の評価方法。多核白血球と扁平上皮細胞の数に基づき分類し、Group 4 および 5 に分類された喀痰が質のよい検体と判断する。

分類 (群)	細胞数/1 視野 (100 倍鏡検)	
	好中球 (白血球)	扁平上皮細胞
1	< 10	> 25
2	10 ~ 25	> 25
3	> 25	> 25
4	> 25	10 ~ 25
5	> 25	< 10
6	< 25	< 25

* Group 1, 2 . . . 検査材料として不適切

* Group 3 . . . 注意深い判断が必要

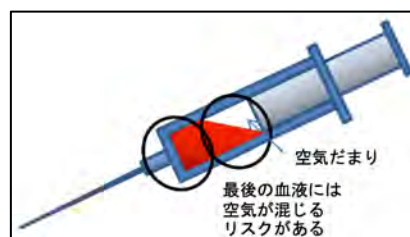
* Group 4, 5 . . . 良質な喀痰であり、検査に適すると判断する

* Group 6 . . . 気管吸引痰では検査に適すると判断する

2. 検体の採取法 (2)

② 血液検体(血液培養)

- ✓ 敗血症など重症感染症や血流感染の原因菌を調べるために実施する。
- ✓ 皮膚を十分に消毒した上で、1セット(好気性菌培養ボトル・嫌気性菌培養ボトル 各1本, 右頁図)を採取する。異なる採血場所から合計2セット(合計ボトル4本)を必ず採取すること (複数セットの採血により、皮膚常在菌の混入か原因菌かを推測できる)。**[重要]**
- ✓ 少量しか採血できなかったときは好気性菌培養ボトルへ接種する (好気ボトルのほうが検出可能な菌種が多いため)。
- ✓ 嫌気ボトルに空気が入らないよう注意する。
- ✓ 必要血液量が少ない小児用ボトル (1～3 mL, 好気性菌用) がある。



<検体採取上の注意点>

- ✓ 採血後のボトルを冷蔵保管してはいけない (低温に弱い髄膜炎菌の検出ができなくなる)。採血後は速やかに検査室に提出すること。
- ✓ 室温に長時間放置され、菌の増殖が進んだボトルは機械にセットしても陽性と認識しないことがある (ボトル内でのCO₂の発生によるpHの変化量をモニターするため)。
- ✓ 白血球数が異常に多いとき (30,000/mm³以上)、機械が偽陽性と認識することがある (白血球によるCO₂の発生を捉えてしまう)。
- ✓ 採血部位は動脈でも静脈でも問題はない。鼠径部からの採血は、皮膚常在菌の混入率が上がるので極力回避する。

(1) 採血のタイミング

悪寒や発熱を認めた時には速やかに採血を実施する。先に抗菌薬が投与されると、菌の検出率は低下する (抗菌薬投与の前に採血を実施する)。

(2) 適切な採血量

1セット (ボトル2本) の適切な採血量は16 mL～20 mL が推奨される。 血液中出现する菌数は多くの場合には1 mL中に1個以下とされる。したがって、培養する血液量を増量することは、検出率の向上につながる。

血液培養ボトルと血液培養自動分析装置

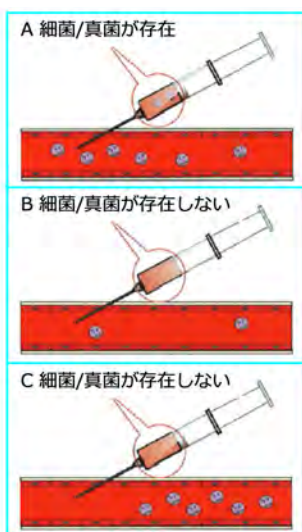


(左) 血液培養ボトル・・好気性菌培養ボトル内には小さな粒子(レズン)を含み、血液中に残存する多種の抗菌薬を吸着することで菌の検出率を向上させる。

(中) 血液培養自動分析装置(外観)

(右) 上記の内部。ボトルを装填し継続培養を行う。ボトル内の炭酸ガスの増加を検知し、培養陽性となったボトルを判別する。

血液採取のタイミング



	菌の状況	採血のポイント
A	感染性心内膜炎やカテーテル関連菌血症など。 ➤ 発熱に関係なく、常に血液に菌が存在	タイミングに関係なく検出可能
B	歯磨きや抜歯時など粘膜の破綻により一過性に少数の菌が血液に入り込む	採血量やボトル本数を多くすることで検出率が向上する
C	腎盂腎炎、胆嚢炎、膿瘍など、感染病巣から菌が断続的に血流中に入り込む	悪寒・発熱など採血するタイミングが重要

血液セット数と菌検出率

セット数	1 セット	2 セット	3 セット
検出率 (%)	73.2	93.9	96.9

* 皮膚には表皮ブドウ球菌やコリネバクテリウムなどが常在している。どれだけ丁寧に消毒しても、汗腺や皮脂腺のなかの常在菌は除去できず、少量の常在菌の混入は避けられない。

⇒ 場所を変えた2箇所では採血を行うと、同一細菌が同時に汚染を起こす可能性が低い。従い、1セットだけで検出された細菌は汚染菌と判定することができる(2セットから同一菌が検出された場合、それは感染症の起炎菌である可能性が高い)。

2. 検体の採取法 (3)

③ 尿・便・髄液検体

- ✓ 尿路感染症、感染性腸炎、髄膜炎などの原因菌を調べるために実施する。
- ✓ 尿道口の常在菌の混入を回避するため、女性は可能な限り陰部を洗浄・消毒し、男性は中間尿を滅菌カップに採取する (初尿で尿道を洗浄する)。
- ✓ 協力が得られない場合、消毒操作を行った上で膀胱内にカテーテルを挿入して尿を採取する (導尿)。
- ✓ 膀胱留置カテーテルが留置されている患者さんについては、ウロバック内に溜まった尿ではなく、カテーテルにあるゴム栓部分 (サンプルポート)から新鮮尿を無菌的に採取すること (右頁図)。
- ✓ 髄液の観察は 3,000 rpm, 15 分の遠心後、その沈渣をグラム染色して観察する。(起炎菌の検出感度を上げるため)。
- ✓ 肺炎球菌・レジオネラ菌による感染症の診断には、尿中抗原迅速検査が使用できる (イムノクロマトグラフィーを用いた迅速検査)。

<検体採取上の注意点> [重要]

- ✓ 尿は液体培地と同じと考える。(1時間以上室温放置した検体は菌が増殖し、菌量を多く判定することから、原因菌を誤判定する可能性がある)。
- ✓ 尿検体をすみやかに検査室に提出できない場合には冷蔵庫で保存する。ただし、淋菌感染症を疑う場合には常温で保存する(淋菌は低温で死滅するため)。
- ✓ 便検体を速やかに提出できない場合には冷蔵庫で保存する。ただし、赤痢アメーバ原虫の栄養体を観察する場合には室温で保存する。
- ✓ 髄液を速やかに提出できない場合には、髄膜炎菌のように低温で死滅する菌が存在することを考慮し、休日・夜間では小児用血液培養ボトルに検体を入れ、室温で保管するのもよい。

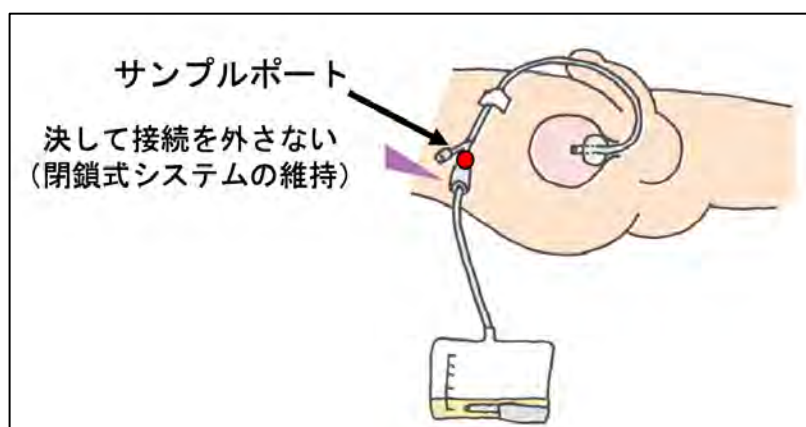
(1) グラム染色での尿路感染症の評価

尿路感染症を疑った場合には、「膿尿」と「細菌尿」を確認する(右頁表)。

(2) 尿検査による尿路感染症の評価

白血球エステラーゼ試験では膿尿を検出し、亜硝酸試験により細菌尿を検出する(右頁表)。

膀胱留置カテーテル尿の採取



膿尿と細菌尿の定義

膿尿	
定義	尿中に 10 個/ μL 以上の白血球が存在する状態 (尿沈渣で白血球 5 個/HPF 以上に相当する*)
グラム染色	1 視野あたり 1 個以上の白血球が認められること
細菌尿	
定義	尿中に 10^5 CFU/mL 以上の細菌が存在する状態 (10^5 CFU は 1mL の尿を $1/10^5$ まで希釈培養した際に 1 個のコロニーが形成される量のこと)
グラム染色	1 視野あたり 1 個以上の細菌が認められること

尿中エステラーゼ試験と亜硝酸試験

尿中エステラーゼ試験	
原理	好中球がもつエステラーゼを検出する
判定	尿中白血球が 10~20 個/mL 以上で陽性と判定
注意点	過度の尿糖・蛋白尿では偽陽性となる。セフェム系抗菌薬およびテトラサイクリン系抗菌薬でも偽陽性となることがある
尿中亜硝酸試験	
原理	硝酸塩が細菌により還元されるのを検出する
判定	尿中細菌数が 10^5 CFU/mL 以上で陽性となる
注意点	一定以上膀胱に貯留していない尿は偽陰性となる。グラム陽性球菌および緑膿菌は硝酸塩還元酵素を持たないので陰性となる。過度のビタミン C の摂取でも偽陰性となりうる。

2. 検体の採取法 (4)

④ 皮膚・軟部組織（膿汁など）・胸水・腹水など

- ✓ 膿瘍などの穿刺液・切除組織片は、嫌気性菌が関与することがある。「ケンキポータ」(右頁図)などを用い、嫌気状態を保ち検体を提出する。
 - ✓ 膿性検体や切除組織検体をすみやかに提出できない場合、雑菌の増殖を抑えるために、冷蔵庫で一時的に保存する。
 - ✓ 切除組織片については、乾燥を防ぐために嫌気ポータを使用することでもできる(検体が乾燥すると、多くの菌は死滅し、正しい培養検査が実施できない。微量(微小)検体は特に注意すること)。
- ・・・微小な検体はケンキポータを使用すること！
- ✓ 胸水・腹水は、消毒操作を行って穿刺し、滅菌スピッツに採取する。通常は無菌的なスペースなので、微生物が検出できれば起炎菌と考える。
 - ✓ 胸水・腹水では、嫌気性菌が起炎菌となりうる。可能な限り嫌気状態を保って提出することを考慮する。

・・・ケンキポータや嫌気性菌用の培養ボトルを使用する

<ケンキポータによる採取上の注意点>

- ✓ ケンキポータ内は炭酸ガスが充満している(酸素を含まない)。
- ✓ 注射器などで採取した膿性検体については、ケンキポータのゴムキャップを消毒した上で検体を注入する。
- ✓ 固形物をケンキポータに入れる場合には、酸素の混入を防ぐことを意識して取り扱うこと。

① 容器は立てた状態でゴムキャップを開封する。

⇒ 炭酸ガスは重いため開封してもポータ内に保持される。横にして開封すると炭酸ガスが流出し、空気(酸素)が容器内部に流入する。

・・・嫌気状態を常に維持するように扱うこと！

② 速やかに検体を入れる。

③ 直ちに栓をし、速やかに検査室に提出すること。

④ 底部にはインジケータがある。

・・・酸素が触れると白色透明のゲルがピンク色に変色する！

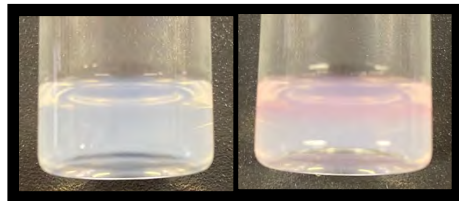
ケンキポータによる検体採取について

➤ ケンキポータ

容器の底面には白色透明のゲル(インジケータ)があり、炭酸ガスが封入されている(右図)。密栓できる構造で、微小検体の乾燥防止にも役立つ。



＜インジケータ＞ 酸素に触れるとピンクに色調変化する



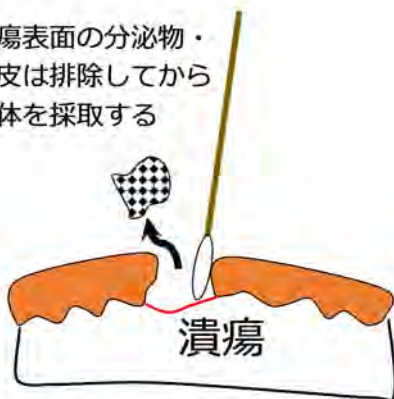
(左)白色透明・・・嫌気状態が維持できている

(右)ピンクに色調変化・・・酸素の混入が疑われる → 嫌気状態ではない

➤ 検体採取 (皮膚軟部組織; 潰瘍・膿瘍など)

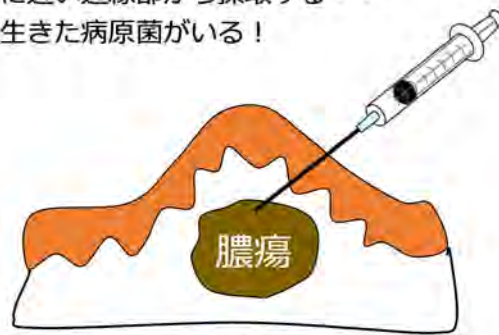
潰瘍は潰瘍底から、膿瘍は辺縁部から検体を採取すること。

潰瘍表面の分泌物・
痂皮は排除してから
検体を採取する



潰瘍からの検体は表面部から採取しない！

膿瘍では、中心部ではなく、壁
に近い辺縁部から採取する・・・
生きた病原菌がいる！



膿瘍の中心部から採取しない！

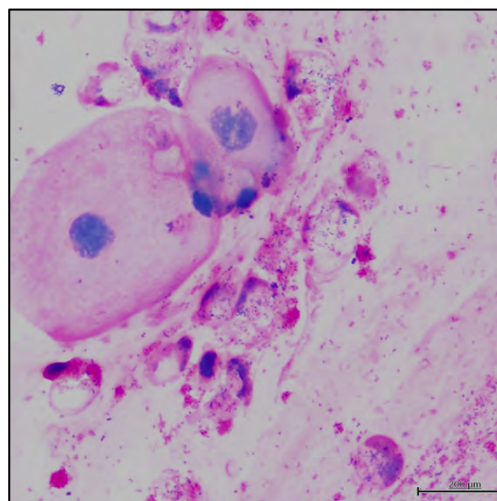
3. グラム染色像の形態分類

- ✓ 細菌をその染色性(陽性・陰性)と形態(球菌・桿菌)をもとに4分類する。
- ✓ 菌の大きさ、集簇するパターン(連鎖状・ブドウ房状など)を観察する。
- ✓ 周囲の透過性(=莢膜の有無)や粘液・フィブリン塊にも着目する。

微生物の観察所見	生体側の所見
➤ 染色性 (グラム陽性・グラム陰性)	➤ 炎症細胞(好中球)の有無とその形態
➤ 個々の菌体の形態 (球菌・桿菌)	➤ 貪食像の有無
➤ 集簇パターン (ブドウ房状・連鎖状・二連)	➤ 扁平上皮細胞・線毛上皮細胞の有無
	➤ フィブリン析出の有無

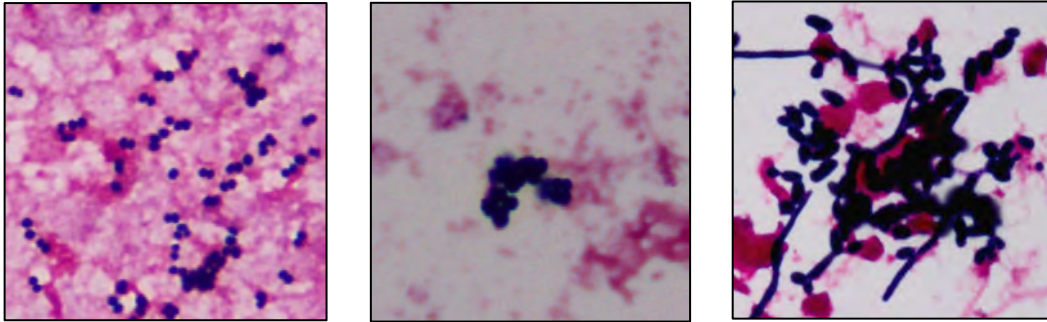
<観察上の注意点>

- ✓ 起因菌は1種類とは限らない。グラム陽性菌と混合感染したグラム陰性菌の存在には特に注意する(見落とすことがある)。
- ✓ 扁平上皮細胞に付着・周囲に存在するグラム陽性菌は口腔粘膜に定着する常在菌と推定できる(口腔内連鎖球菌)。 **[重要]・必ず観察しておくこと**
- ✓ 好中球に貪食もしくは好中球とともに分布する細菌は起因菌と推定できる。 **[重要]**
- ✓ 肺炎球菌は重要な肺炎の病原菌であるが、莢膜を持つため貪食されにくい。・・・**口腔内に常在するグラム陽性球菌との鑑別に注意する(形態的に類似するため)**
- ✓ 検体処理まで長時間放置された場合、肺炎球菌の染色性は変化する。・・・**自己融解によりグラム陰性菌に見える**
- ✓ 抗菌薬の投与により菌体の形状が変形する。・・・**フィラメント形成のほか、桿菌が球菌へと形状変化することがある**
- ✓ カンジダ(*Candida* spp.)は真菌だが、グラム陽性に染色される(誤判定に注意)。
- ✓ 非定型菌(クラミジア・リケッチア・マイコプラズマ)、抗酸菌(結核菌・非結核性抗酸菌)はグラム染色で染色されない。
* **常に起因菌の可能性として念頭に置くこと!**
- ✓ 多種・多様な細菌が検体に存在することを **Polymicrobial pattern** (右図)といい、誤嚥性肺炎、腸管穿孔による腹膜炎など、複数の常在菌が混入した状況を考える。・・・**病態から考えれば、嫌気性菌の関与も推定できる**



◆ グラム陽性菌

菌の集簇パターンで分類する。一部の真菌も形態が類似するので注意する。



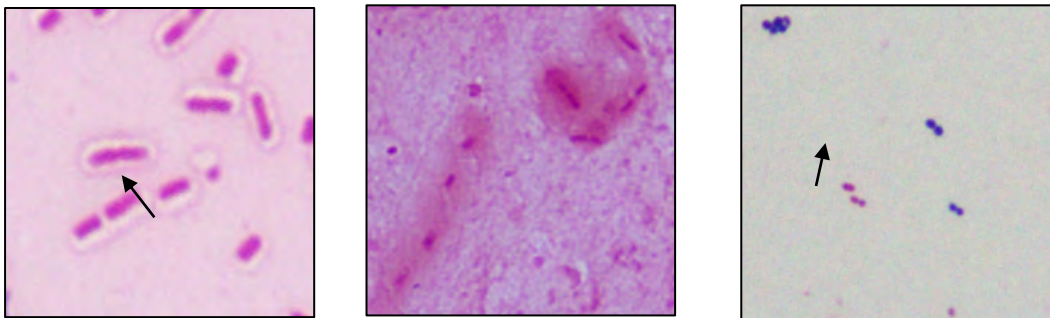
(中) ブドウ房様の集簇 (右) カンジダは真菌だがグラム陽性に染色される。



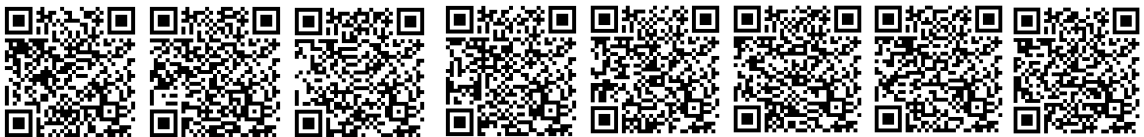
[QR] 左から, 1) 喀痰中の黄色ブドウ球菌, 2) 莢膜を持つ肺炎球菌, 3) 喀痰中の連鎖球菌, 4) 培養より得たカンジダ

◆ グラム陰性菌

菌の形態(球菌・短桿菌・桿菌)、集簇パターン(双球菌)で分類されるほか、莢膜・ムコイドの有無にも着目する。

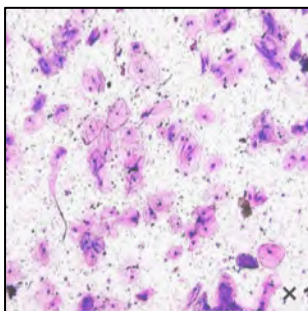


(左) 莢膜をもつクレブジエラ菌 (中) ムコイドをもつ緑膿菌 (右) グラム陰性にみえる肺炎球菌

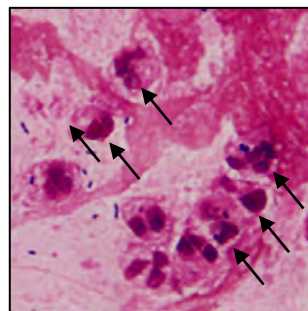


[QR] 左から, 1) 典型的グラム陰性桿菌, 2) グラム陰性双球菌(淋菌), 3) 喀痰中のグラム陰性双球菌, 4) グラム陰性短桿菌, 5) 莢膜をもつクレブジエラ, 6) ムコイドに囲まれる緑膿菌, 7) 喀痰中の緑膿菌, 8) グラム陰性に見える肺炎球菌.

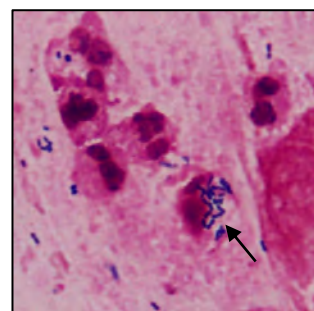
◆ 扁平上皮細胞



◆ 好中球



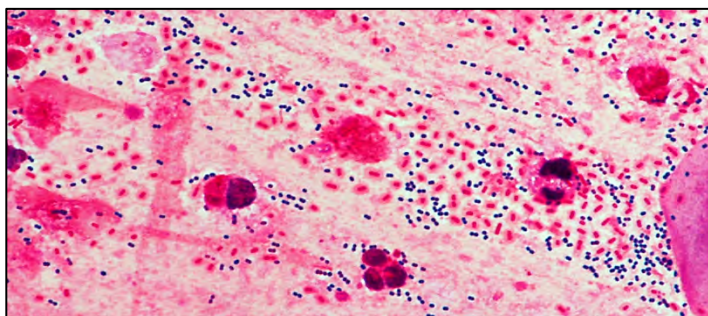
◆ 好中球 (貪食像)



左) 唾液成分混入を示唆, (中・右) 好中球に貪食される菌は起炎菌の可能性が高いと推定

◆ Polymicrobial pattern

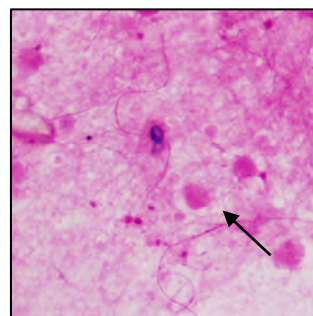
肺炎球菌とクレブジエラ菌の混合感染が疑われる



[QR] 左から, 1) 喀痰中の扁平上皮細胞, 2) 好中球による貪食像(1), 3) 好中球による貪食像(2)

◆ フィラメント形成

抗菌薬の効果による形態変化



◆ 喀痰品質評価

- 1) 各グレードの喀痰像を観察し、好中球・扁平上皮細胞の存在率を検証する。
- 2) 扁平上皮細胞の混入による判定上の問題点について検証する。

1) Geckler 1(喀痰) 起因菌不明



400 倍での観察画像。扁平上皮細胞がひろがり視野中に好中球が観察できない。ほぼ唾液と考えられ、起因菌の検査はできない。

2) Geckler 3(喀痰) インフルエンザ桿菌による肺炎



400 倍での観察画像。好中球とともに多くの扁平上皮細胞が同様に観察できる。扁平上皮には多くのレンサ球菌(口腔内常在菌)が付着し、観察の障害となりうることが理解できる。



1,000 倍での観察画像。扁平上皮に多くのレンサ球菌が付着し、検体観察に悪影響を及ぼす。よく見ると、グラム陰性の短く小さな桿菌がみえる(インフルエンザ桿菌である)。レンサ球菌の存在は肺炎球菌の区別を困難にしている。

3) Geckler 5(喀痰) モラクセラ・カタラーリスによる肺炎



400 倍での観察。扁平上皮細胞は観察できず、多くの好中球を認める。グラム陰性桿菌が均一に視野に広がり、容易に起因菌であると推定できる。



1,000 倍での観察。扁平上皮細胞は観察できず、多くの好中球を認める。グラム陰性桿菌が均一に視野に広がり、容易に起因菌であると推定できる。

Memo

4. グラム染色像 (1)

1. グラム陽性球菌 Gram positive cocci: GPC

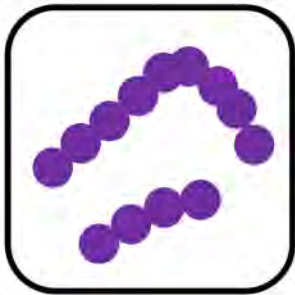
① 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*



ブドウ房状に増殖しクラスターを形成する。表皮ブドウ球菌などのコアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative *Staphylococci*; CNS) とは、形態的に区別はつかない。

➤ メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA)、メチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus*; MRCNS) の存在を念頭におく。

② レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes*



長い連鎖がみられることが特徴。形態的に、どの α および β 溶血性レンサ球菌なのかは鑑別できない。膿瘍や粘稠性の高い検体中では、長い連鎖の形態をとらず、小さく、少数の集塊となることがあるので注意(ブドウ球菌との鑑別が必要)。

➤ 基本的にはペニシリン系抗菌薬が有効である。

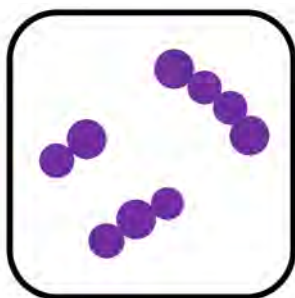
③ 肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae*



楕円形のグラム陽性双球菌。長軸方向の並びが特徴。長い連鎖を形成することもあるので注意が必要。莢膜を有するため周囲が透明に抜けて見えるが、ムコイド型肺炎球菌では周囲が赤く染まって見える。莢膜は白血球による貪食を回避し、自己融解によりグラム陰性的ようにみえる。

➤ ペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin-resistant *S. pneumoniae*; PRSP) の存在を念頭におく。

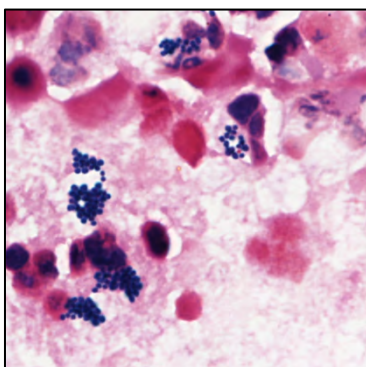
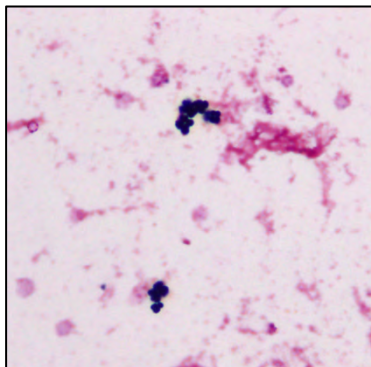
④ 腸球菌 *Enterococcus* spp.



レンサ球菌と比較して短い連鎖が特徴的なグラム陽性球菌。個々の球菌の大きさが不均一であるのも特徴。*E. faecalis* と *E. faecium* がよく知られるが、形態的にはそれぞれの鑑別はできない。

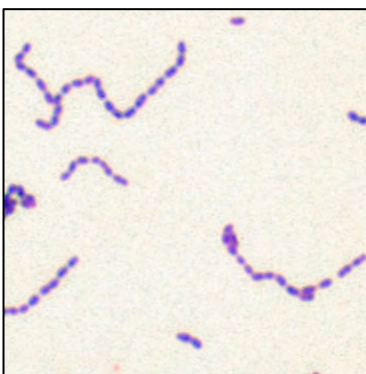
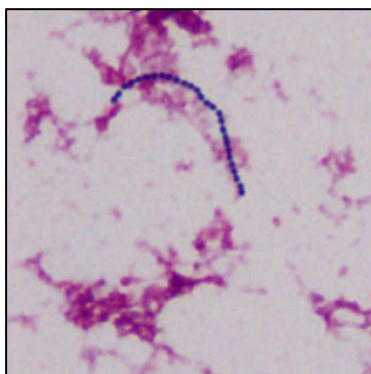
➤ 腸球菌はセフェム系抗菌薬に自然耐性であり、バンコマイシンが本来的に有効である。近年、バンコマイシン耐性腸球菌 vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) が問題である。

黄色ブドウ球菌



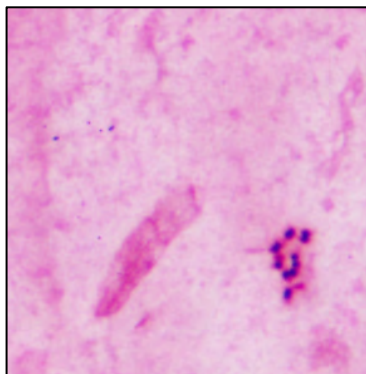
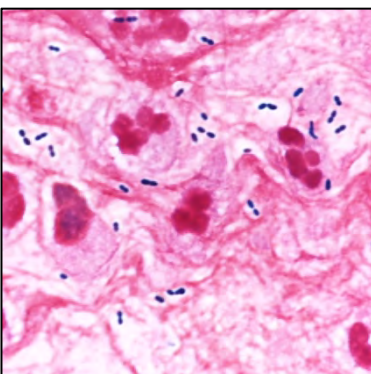
喀痰中に見られる黄色ブドウ球菌

レンサ球菌



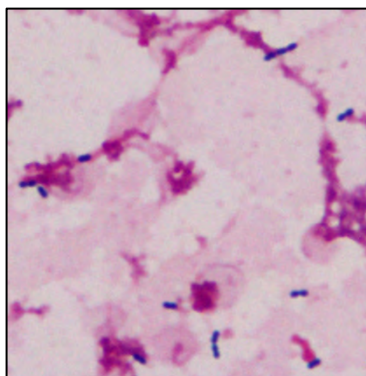
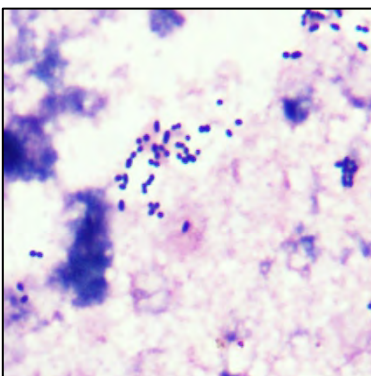
血液培養で検出されたレンサ球菌

肺炎球菌



喀痰中の肺炎球菌と莢膜所見

腸球菌



血液培養で見られる腸球菌

4. グラム染色像 (2)

2. グラム陽性桿菌 Gram positive rods: GPR

① コリネバクテリウム *Corynebacterium* spp.



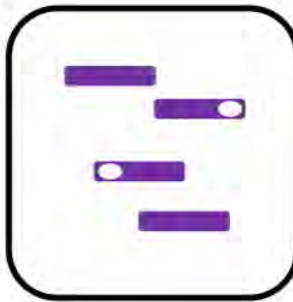
両端が丸くなったグラム陰性桿菌。柵状や「ハ」の文字様の形態をとることが特徴的。*C. diphtheriae*（ジフテリア菌）を除く *Corynebacterium* spp.は病原性が弱く、一般的には免疫機能が低下した患者に対して起炎菌となる (*C. jeikeium*)。口腔内のほか、皮膚、腸管の常在菌の一つである。

② クロストリディオイデス *Clostridioides* spp.



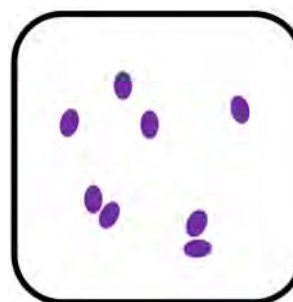
棍棒状のグラム陽性桿菌。一部で芽胞形成が始まると、淡く透明に抜ける部分が確認できる。*Clostridioides difficile*は抗菌薬の使用に伴い腸管内で異常に増殖することで発症する。形態的にはボツリヌス菌などの他の *Clostridioides* 属菌(*C. botulinum* など)とは区別ができないほか、バチルス属(*Bacillus* spp.)との鑑別も困難である。[芽胞形成菌]

③ バチルス *Bacillus* spp.



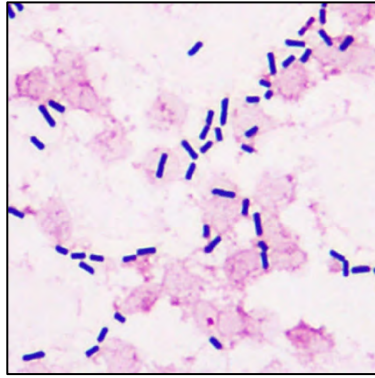
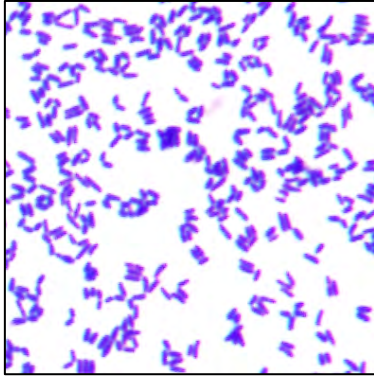
枯草菌（こそうきん）ともいう。形態的にはクロストリオイデス属と同様に野太い棍棒用のグラム陽性桿菌として観察される。クロストリオイデス属とは形態的には区別することは困難である。縦に繋がる形態を見かけることが多い。

④ リステリア *Listeria monocytogenes*

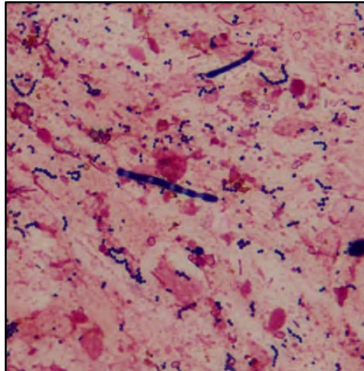
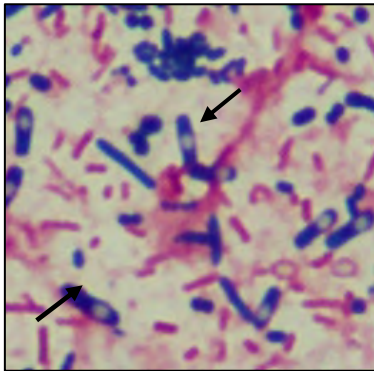


短めのグラム陽性桿菌であり、グラム染色での脱色が強くなると、グラム陰性桿菌と誤判定することがあるので注意する。肺炎球菌とよく見比べてみることに注意。

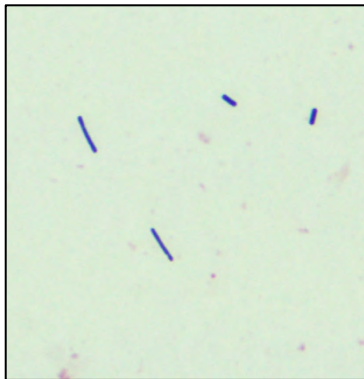
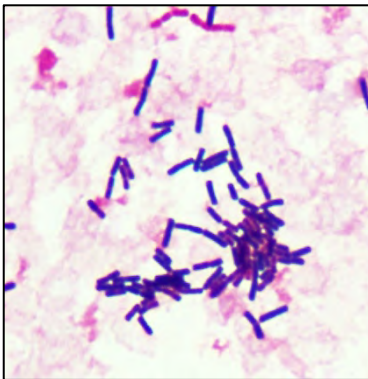
コリネバクテリウム



クロストリディオイデス



バチルス



4. グラム染色像 (2)

2. グラム陽性桿菌 Gram positive rods: GPR

⑤ ノカルジア *Nocardia* spp.



細長く分岐するグラム陽性桿菌であり、次のアクチノミセスとの形態的な鑑別はできない。ただし、ノカルジア菌は弱抗酸性であるため、抗酸菌染色（キニヨン染色；Kinyoun 染色）で赤色に染まることから、アクチノミセスとの鑑別が可能である。

⑥ アクチノミセス *Actinomyces* spp.



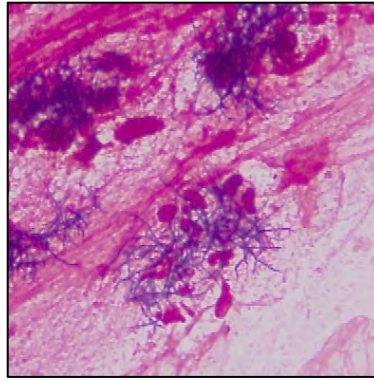
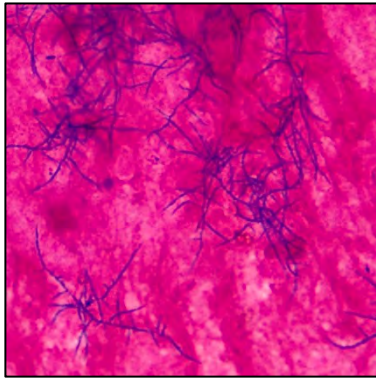
ノカルジアと同様、青色に細長く染まり、細長い形態をとる。糸状に発育し、V, Y, T 字状など、多彩に見える。口腔内の常在菌で、歯垢の 10～20%を占める。

⑦ カンジダ *Candida* spp. (グラム陽性菌ではないが、鑑別上重要である)



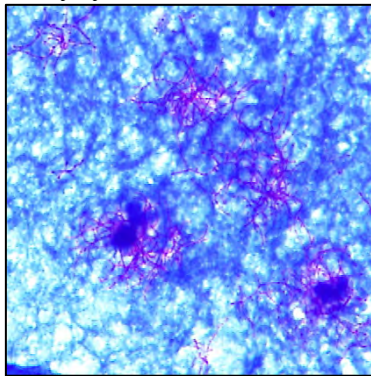
酵母用真菌で仮性菌糸を伸ばすのが観察できる。グラム陽性に染色され、見慣れないとグラム陽性球菌と見間違えることがあるので注意する。大きさが陽性球菌とは異なるので(カンジダのほうが巨大)、よく確認すること。

ノカルジア



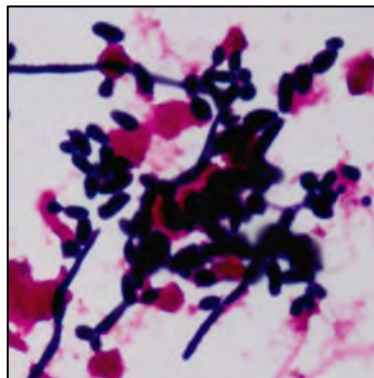
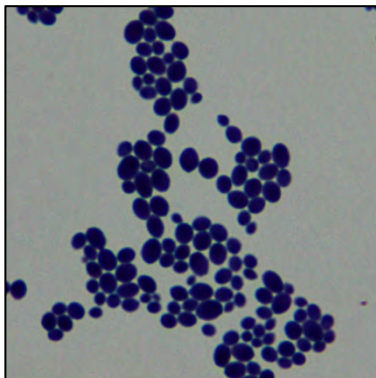
喀痰中に見られるノカルジア

*Kinyoun 染色像



喀痰の Kinyoun(キニヨン)染色像

カンジダ



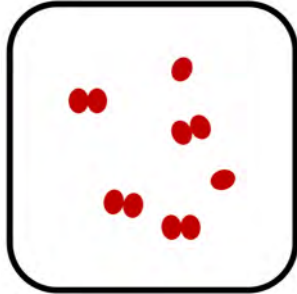
培養より得たカンジダの形態

仮性菌糸を伸ばすカンジダ

4. グラム染色像 (3)

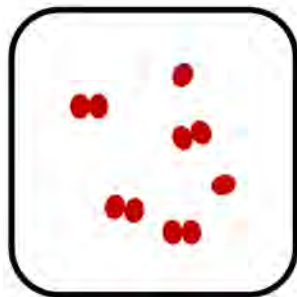
3. グラム陰性球菌 Gram negative cocci: GNC

① 淋菌 *Neisseria gonorrhoeae*



グラム陰性球菌(双球菌)から球桿菌に見える。形態的にはモラクセラや髄膜炎菌とは区別不可能である。菌体は粘膜から離れると数時間で感染性を失い、乾燥・温度変化・消毒剤で簡単に死滅する。従って、性交渉以外でのヒト-ヒト感染はまれである。冷蔵すると淋菌は死滅するので注意すること。

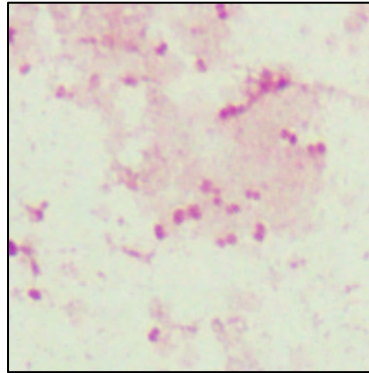
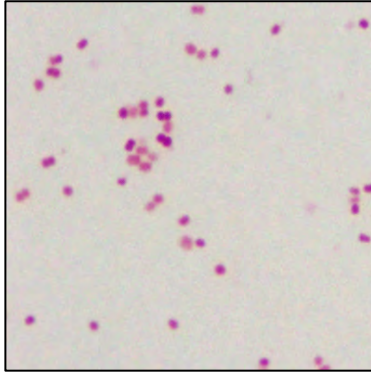
② モラクセラ カタラーリス *Moraxella catarrhalis*



短軸方向に連なるグラム陰性球菌(双球菌)。起因菌である場合には、貪食される像がよくみられる。口腔内には多くのナイセリア属細菌が常在しており、その区別は重要である。

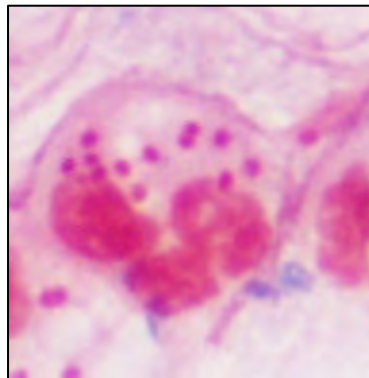
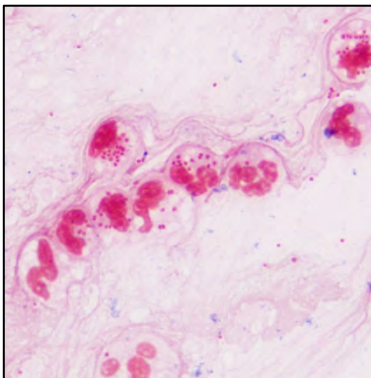
* インフルエンザ桿菌、アシネトバクター・バウマニと比較しておくこと [重要]

淋菌



尿道分泌物に見られる淋菌

モラクセラ



喀痰中のモラクセラ菌

* 特にインフルエンザ菌、アシネトバクター・バウマニとの類似性を理解し、それらの鑑別を念頭によく観察すること。[重要]



淋菌患者から得られた
尿道擦過物

4. グラム染色像 (4)

4. グラム陰性桿菌 Gram negative rods: GNR

① インフルエンザ菌 *Haemophilus influenzae*



グラム陰性桿菌だが、小型で球菌様に見えることもあるので注意(球桿菌; coccobacillus) **[重要]**。市中肺炎の代表的な病原菌だが、髄膜炎・中耳炎・関節炎の起因菌としても重要。視野全体に散りばめられた様に分布するので、背景にまぎれて見落とすことがあるので特に注意する。

② 大腸菌 *Escherichia coli*



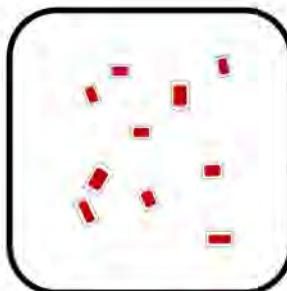
代表的な腸内細菌。中型のグラム陰性桿菌であり、他の腸内細菌とは形態的には区別はできない。両端が濃く丸く染まるのが腸内細菌の特徴である。

③ 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*



細身で小型のグラム陰性桿菌。なかには菌体周囲に「ムコイド」と呼ばれる粘液物質をもつことがある。その場合には、菌体周囲に赤くそまる粘液層が確認できる。

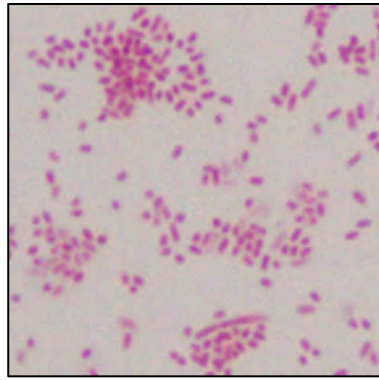
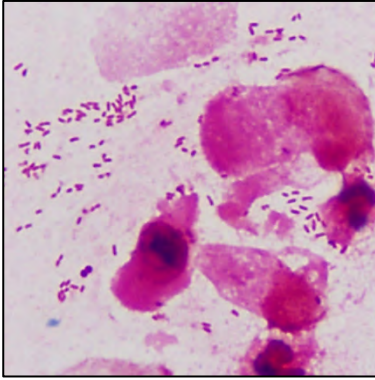
④ クレブジエラ *Klebsiella pneumoniae*



太くて大型のグラム陰性桿菌。莢膜を有するため、周囲が透明に抜けて見えることが特徴的である。腸内細菌科細菌との鑑別が重要。

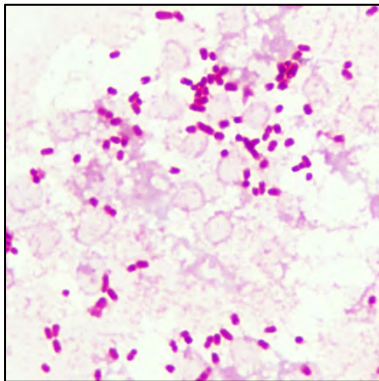
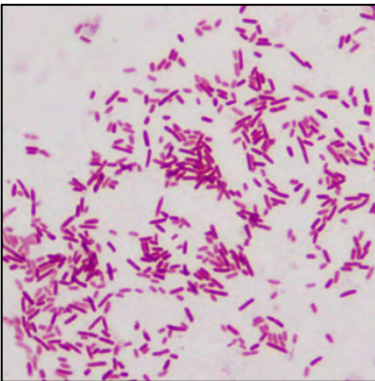
＊腸内細菌科細菌であり、本来は腸管などの正常細菌叢として常在している。アルコール依存、高齢者、糖尿病患者、免疫不全患者に対し肺炎を引き起こす **[重要]**。

インフルエンザ菌



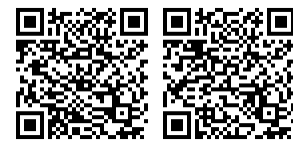
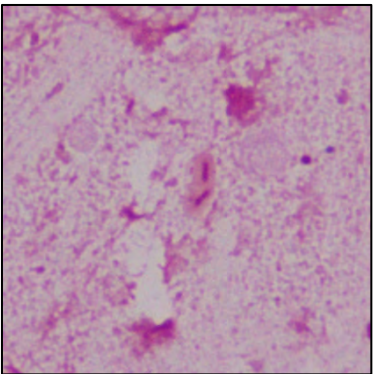
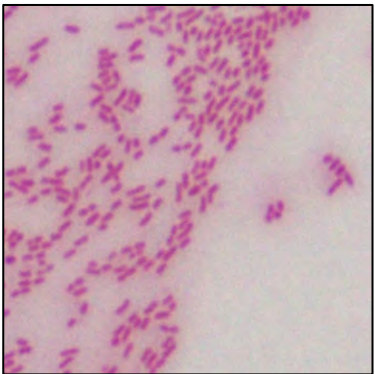
喀痰中のインフルエンザ桿菌

大腸菌



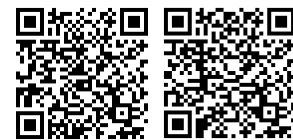
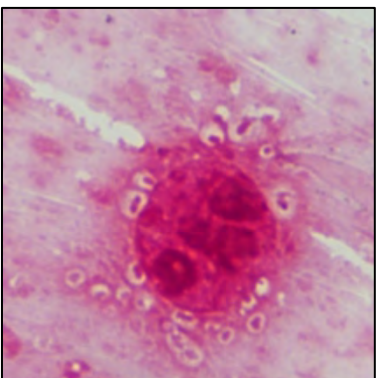
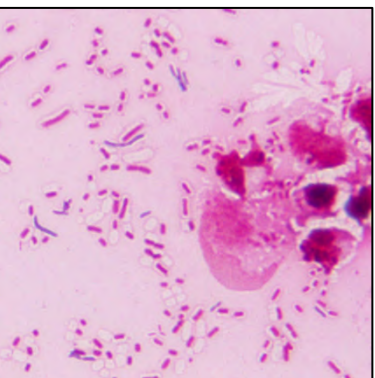
典型的なグラム陰性桿菌

緑膿菌



ムコイドに囲まれる緑膿菌

クレブジエラ



莢膜をもつクレブジエラ菌

4. グラム染色像 (4)

4. グラム陰性桿菌 Gram negative rods: GNR

⑤ アシネトバクター *Acinetobacter baumannii*



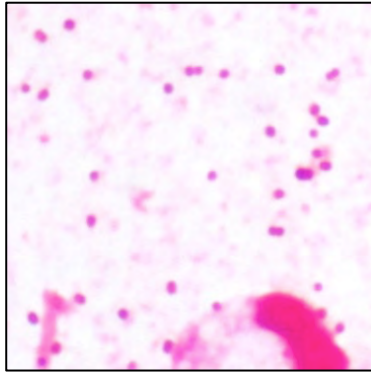
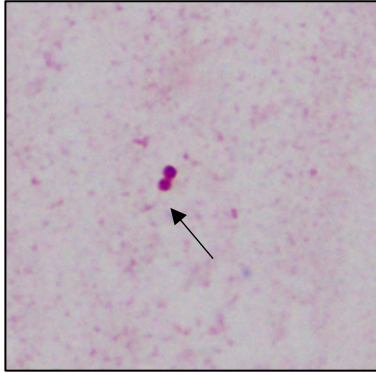
小型のグラム陰性桿菌。グラム陰性球菌のモラクセラ・タラーリスと非常に類似した双球菌(diplococcus)に見えることから、鑑別が難しい。その他、口腔内に常在するグラム陰性球菌であるナイセリア属菌との鑑別も重要である。

⑥ キャンピロバクター *Campylobacter jejuni*



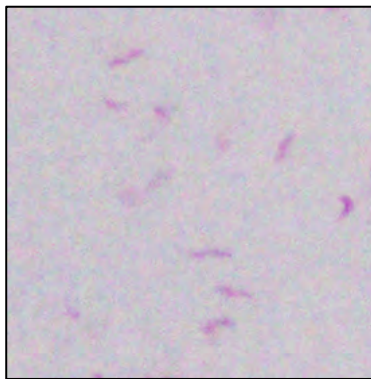
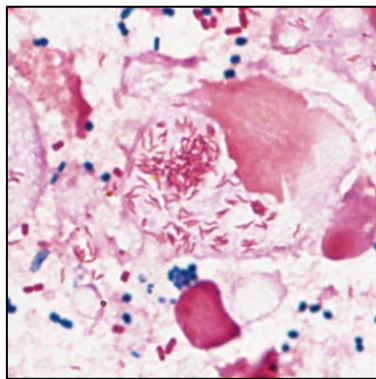
小型のグラム陰性桿菌で、「カモメの翼; gull wing」様にみえる。グラム染色で確定診断が可能な病原体は、このキャンピロバクターのみである。

アシネトバクター



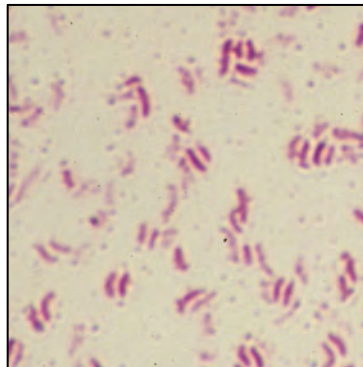
双球菌であるアシネトバクター

キャンピロバクター



Gull wing のキャンピロバクター

ビブリオ・コレラ

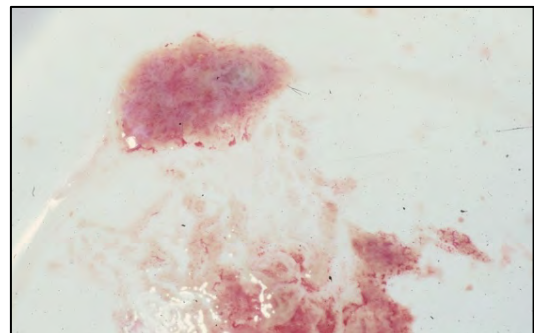


カンマ状のグラム陰性桿菌であるコレラ菌

***カンマ状のグラム陰性桿菌を確認する。**

= コレラ菌の形態特徴

参考



(左) キャンピロバクター腸炎の下痢便

(中) コレラ患者でみられた下痢便「米のとぎ汁様」

(右) サルモネラ症患者の粘血便

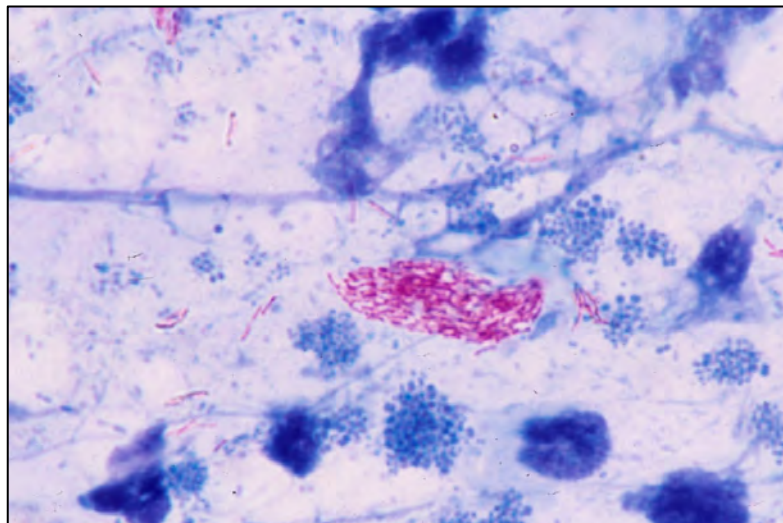
Memo

第2章

抗酸菌感染症の検査

1. 抗酸菌塗沫検査 チール・ネルゼン染色

図: チルネルゼン染色で見られる抗酸菌・・・「赤く」染まる



チール・ネルゼン染色と
抗酸菌

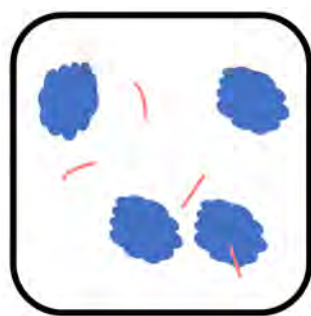
*「結核菌」と「非結核性抗酸菌」はいずれも赤く染色され区別はできない。

- ✓ 抗酸菌塗沫検査は感度が低い、いつでも迅速に実施できる基本の検査。
 - ・・・塗沫検査で検出するには、喀痰 1 mL 中におよそ $10^4 \sim 10^5$ CFU 以上の抗酸菌が存在する必要がある
 - ✓ 結核菌もしくは非結核性抗酸菌かどうかは判断できない。[重要]
 - ・・・PCR 法等の核酸増幅検査もしくは培養検査が菌種同定には必須
 - ✓ 塗沫陽性の場合、患者が感染源になり得ることを意味する。[重要]
 - ・・・観察できる抗酸菌量を半定量的に評価することで、感染源としての危険度を定量的に判断できる
- ⇒ ガフキー号数 [重要] (現在は新結核菌検査指針に従い報告する)

新結核菌検査指針	チール・ネルゼン法 (1,000 倍)	旧) ガフキー号数
-	0/300 視野	G0 (陰性)
±	1~2/300 視野	G1
1+	1~9/100 視野	G2
2+	≥ 10/100 視野	G5
3+	≥ 10/1 視野	G9

- ✓ 1 回の検査で抗酸菌感染症は否定できない。必ず、8~24 時間あけて喀痰を採取(そのうち 1 回は早朝喀痰を採取)し、検査を行うこと。・・・「3 連痰」[重要]
- ✓ 塗沫陰性であっても、抗酸菌感染症は否定できない。[重要]
 - ・・・培養検査および核酸増幅検査(PCR 等)も必ず併用すること

チール・ネルゼン染色像



抗酸菌

- 赤色の桿菌が抗酸菌
- 判定量的に菌量評価： **感染源としての危険度評価**
- 3 連痰で陰性を判断
- 喀痰のほか、胃液、気管支肺胞洗浄液、胸水、腹水などで観察可能

以下の喀痰像(チール・ネルゼン染色)を観察し、危険度評価を理解すること。



[QR] 左から 1)新結核菌検査指針 (2+)・旧ガフキー号数:G5,
2)新結核菌検査指針 (3+)・旧ガフキー号数:G9

***危険度(菌量)の異なる標本を観察し、本検査の意義と限界を理解すること。**

必ず理解しておくこと[重要]

1. IGRA(インターフェロン γ 遊離試験)は診断になぜ使用しないのか？
2. PCR 検査は高感度であり、菌種の迅速同定が可能である。なぜ、(検出感度の低い)チルネルゼン染色を行う必要があるのか？
3. チルネルゼン染色で抗酸菌が見えない場合、結核は否定してよいのか？
4. 培養検査では、どのくらいの期間で結果が判明できるのか？
5. なぜ、(判定までの期間が長い)培養検査を行う必要があるのか？
6. 多剤耐性結核菌とはなにか？

2. 抗酸菌培養検査

1. 抗酸菌は小川培地で培養する

- ✓ 抗酸菌は1回の分裂に10～15時間を要する。
- ✓ 抗酸菌の培養には4～8週間を要する[重要]。
 - ・・・それでも培養検査が重要である意味を考える！
- ✓ 抗酸菌検査のなかで培養検査は最も高感度[重要]。
- ✓ 非結核性抗酸菌は、その発育する速度により2つに分類される。
 - 1) 遅発育菌・・・結核菌と同様に4～8週間を要する
 - 2) 迅速発育菌・・・通常、7日以内にコロニーが発育する



遅発育菌	迅速発育菌	培養不能菌
結核菌群 <i>M. tuberculosis</i>	非結核性抗酸菌群 <i>M. abscessus</i>	<i>M. leprae</i> (らい菌)
非結核性抗酸菌群 <i>M. avium</i> complex <i>M. kansasii</i>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i>	

＊上記は一部の菌種のみ抜粋して記載

(小川培地を確認し、培養器の状況を観察すること)

2. MGIT 液体培養; 培養時間が短縮できる

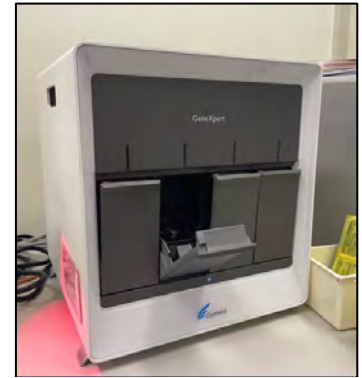
- ✓ 結核菌・非結核性抗酸菌ともに平均10日程培養期間が短縮できる。
 - ・・・エンリッチメントな液体培地から十分な栄養供給を受けることにより、菌の分裂速度が速くなる。



3. 抗酸菌 核酸増幅検査

PCR 法・LAMP 法が活用できる

- ✓ 前処理行程を含め、約 3 時間で結果が判明する
- ✓ 結核菌の同定が可能
 - ・・・チル・ネルゼン染色による検出よりも高感度

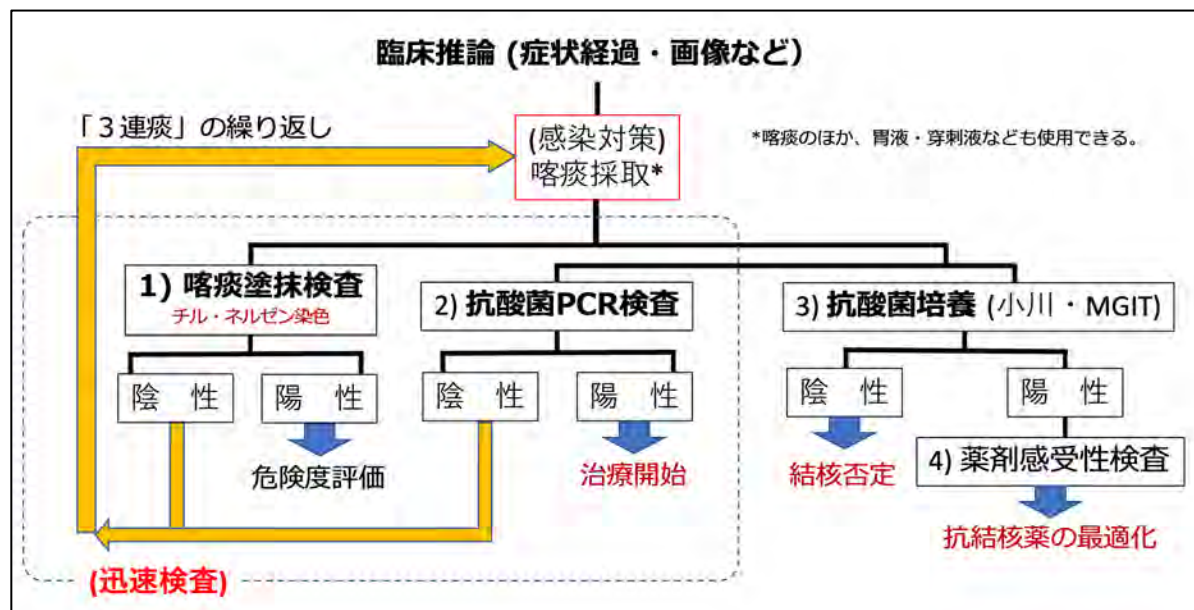


検出感度の考え方

チル・ネルゼン染色 < < < 核酸増幅検査 < 培養検査(小川培地)

注意：PCR 検査は死菌でも陽性となりうる。

肺結核診断へのアルゴリズム



Memo