

食水系感染症病原体の検査法 - 11

プロビデンシア・アルカリファシエンス

あさ くら ひろし
朝 倉 宏
Hiroshi ASAKURA

I. 病原体

1. 病原体

プロビデンシア・アルカリファシエンス (*Providencia alcalifaciens*: PA 菌) は、グラム陰性の腸内細菌科に属する *Providencia* 属の一菌種であり、0.6 ~ 0.8 × 1.5 ~ 2.5 μm の大きさを示す。同じ属には他に *P. stuartii*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii*, *P. heimbachae* が含まれる。本属菌の共通点としては、至適発育温

度が 37℃ であること、フェニルアラニンおよびトリプトファンを利用すること、マンノースを利用し、酸を産生すること等があげられる。

PA 菌の発見は 1962 年と比較的古く、アルカリファシエンスの語源は、「アルカリ産生 (Alkali-producing)」に起因する¹⁾。本菌は、鞭毛を有するが、軟寒天培地上での滑走は示さない。アドニトールより酸を産生するのが PA 菌の特徴の一つである (表 1)。主な生化学性状は表 1 に記したので参照されたい。分類学的には、*Morganella* や *Proteus* 属菌に近縁とされる。

表 1 *Providencia* 属菌の代表的生化学性状

性状	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>P. heimbachae</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. rustigianii</i>	<i>P. stuartii</i>
インドール産生	+	-	+	+	+
クエン酸	+	-	+	d*	+
尿素産生	-	-	+	-	d
オキシダーゼ産生	-	-	-	-	-
糖分解による酸産生:					
アドニトール	+	+	+	-	-
D-アラビトール	-	+	+	-	-
D-ガラクトース	-	+	+	+	+
i-イノシトール	-	d	+	-	+
D-マンニトール	-	-	+	-	-
L-ラムノース	-	+	d	-	-
D-グルコース (ガス産生は微弱)	+	+	+	+	+
トレハロース	-	-	-	-	+
L-アラビノース	-	-	-	-	-
エリスリトール	-	-	d	-	-
ラクトース	-	-	-	-	-
マルトース	-	+	-	-	-
D-マンノース	+	+	+	+	+
ラフィノース	-	-	-	-	-
D-ソルビトール	-	-	-	-	-
スクロース	d	-	d	+	d
D-キシロース	-	d	d	-	-
エスクリン加水分解	-	-	d	-	-
メチルレッド	+	d	+	d	+
VP 反応	-	-	-	-	-
硫化水素産生	-	-	-	-	-
フェニルアラニン脱アミナーゼ	+	+	+	+	+
ゲラチン (22℃)	-	-	-	-	-
ONPG 産生	-	-	-	-	-
DNase 25℃	-	-	-	-	-
KCN 中での発育	+	-	+	+	+

*dは反応が微弱であることを示す。

2. 疫学

海外における疫学調査の結果、PA菌は旅行者下痢症患者（特に幼児・児童）よりしばしば分離される。以前、ある検疫所のご協力を得て、われわれは海外渡航者の中で原因不明とされた下痢症患者の糞便より原因菌の特定を試み、その一部から本菌が分離されたため、これを下痢の原因菌と推定している²⁾。また、1996年には福井県で、本菌によるはじめての食中毒事例が報告され、世界的にも注目された³⁾。当該事例では、270名もの患者を数えた（多くが幼稚園児童）。当該事例の原因食品としてはパンが疑われたがその特定には至っていない。その後、1997年にはチェコの野戦病院においてポテトサラダを推定原因とする食中毒が発生⁴⁾、2002年には東京の中学・高校の寮生らよりPA菌が分離され、集団食中毒が疑われた⁵⁾。2006年6月には、鳥取県で本菌による食中毒事例と疑われる症例が報告されている（有症者44名）⁶⁾。当該事例では、糞便1gあたりに含まれるPA菌の菌数が平均約 10^6 個（ $10^3 \sim 10^8$ /g）であることが明らかとなっており、これは本菌感染による発症菌数を知る上での重要な知見といえよう。

このように、複数の食中毒事例（疑い例を含む）が報告されている現状を踏まえると、本菌は旅行者下痢症の原因菌であることに加えて、食品を介した感染を引き起こしている可能性も十分に考えられる。しかしながら、その食品汚染実態あるいは食中毒発生状況についての情報は、乏しいのが現状である。このほかの疫学的知見として、下痢を呈する犬や猫からもPA菌は分離されている⁷⁾。

3. 臨床症状

PA菌に感染した場合には、下痢・腹痛・発熱等を主徴とする、急性胃腸炎症状を呈する。福井県で発生した集団感染事例では、疫学解析を通じて、約69.2時間の潜伏期を経て発症したと推定されている³⁾。このほか、動物モデルを用いた検証結果として、PA菌はウサギ腸管ループ試験において、顕著な液体貯留を生じることが知られている⁸⁾。

4. 病原性等

PA菌による病原性発現機構については、現在迄に確たる結論は得られていない。本菌の多くは腸管上皮細胞への付着・侵入性を認めることが確認され、病態の一因と目されている^{9,10)}が、その主因となる分子は明らかにされていない。Maszewskaらは、赤痢菌と同様に何らかの分泌因子が関与すると推察している⁹⁾。PA菌の血清型としては、これまでに46種のO抗原が報告されているが、このうちO:3が最も下痢症患者から高頻度に分離されるとする報告もあり¹¹⁾、リポポリサッカライド(LPS)による下痢発現の可能性も十分に考えられる。PA菌のLPSについては、徐々にではあるがその構造が明らかにされてきている¹²⁻¹⁴⁾。今後は、こうした基礎研究の進展が、本菌により生じる下痢の発現メカニズムの解明へと寄与するものと期待される。

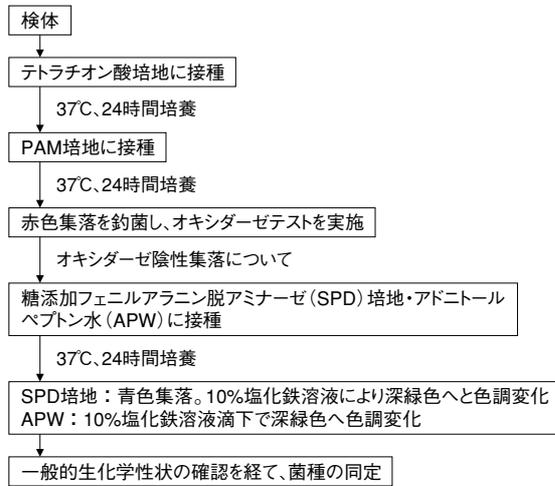
II. 検査法

1. 培養法

本菌の分離培養に際しては、一般的な腸内細菌分離法に頼るほかはない。しかしながら、マッコンキー寒天培地上でのラクトース非分解性のコロニーを釣菌し、生化学性状試験に供することがEwingにより提案されている¹⁵⁾。また、旅行者下痢症からのPA菌分離法については、Seniorが報告している¹⁶⁾ので、本稿ではその概略を紹介する（図1、写真1）。

この方法で使用しているPAM培地はPA菌の糖分解性状を利用して、類縁菌である*Proteus*や*Morganella*と識別ができる点で今後、食品からの検出用途にも有用と考えられる。本培養法の概略について以下に記す：まずテトラチオン酸に抵抗性を示す性状を利用し、テトラチオン酸塩培地で増菌培養を行い、これをPAM培地に塗布する。PAM培地は、フェノールレッドと3種の糖（キシロース、マンニトール、ガラクトース）を含んでおり、PA菌はこれらの糖分解性を有さないため、発育集落は赤色を呈する。一方、その他の菌種はこれらの少なくとも一部を利用するため、糖分解により酸が産生され、

【検査手順】



【各種培地の組成】

PAM培地		APW	
トリプトン	10g	ペプトン	1.5g
デオキシコール酸ナトリウム	5g	プロモクレゾールパープル (0.08%)	2.5ml
リン酸水素2ナトリウム	0.8g	アドニトール (10%)	5.0ml
フェノールレッド	80mg		/ 100ml
寒天	12g		
キシロース	1.5g		
マンニト	1.5g		
ガラクトース	1.5g		
	/ liter		
SPD培地			
トリプトン	1.5g		
L-フェニルアラニン	1.0g		
寒天	1.3g		
プロモクレゾールパープル (0.08%)	2.5ml		
トレハロース	5.0g		
マルトース	5.0g		
イノシトール	5.0g		
	/ liter		

図1 PA菌検出手順と培地組成

【PAM培地】

P. alcalifaciens

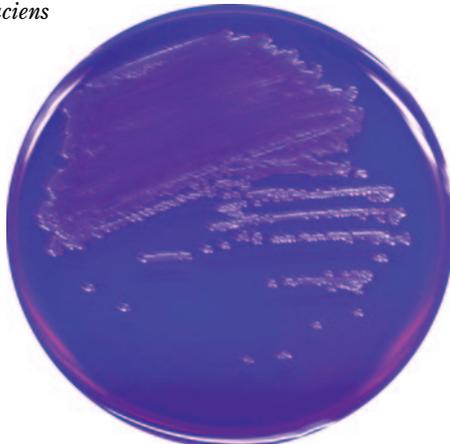


E. coli



【SPD培地】

P. alcalifaciens



E. coli

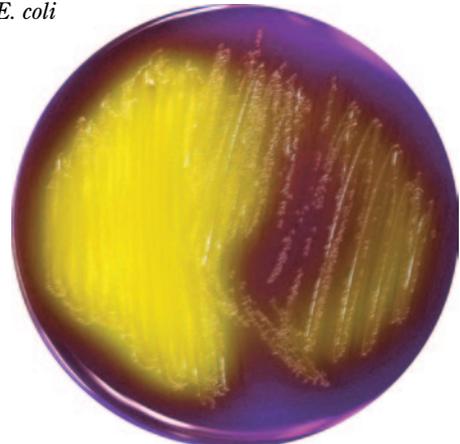


写真1 PA菌の選択培地上での比較 (37℃、24時間培養)

食水系感染症病原体の検査法 - 11

結果として黄色集落を形成する(写真1)。PAM培地上で赤色集落が観察された場合には、プロモクレゾール紫を含む、糖添加フェニルアラニン脱アミナーゼ (SPD) 培地およびアドニトールペプトン水 (APW) に接種し、二次増菌を行う。SPD培地上に青色集落が発育すれば、試験菌株は同培地に含まれるトレハロース・マルトース・イノシトールを分解せず、10%塩化鉄溶液の滴下後、速やかに深緑色へ色調が変化すれば、本菌の特徴である「フェニルアラニンを加水分解し、フェニルピルビン酸を産生した」と判定できる。また、同時に接種した、APWについても10%塩化鉄溶液を滴下し、同様に深緑色への色調変化が認められれば、アドニトールの利用能を確認できる。最終的には、表1に示されるような項目を含めた、生化学性状を確認することで菌種の同定が行われる。

2. 遺伝子検出法

1.の培養法によって、PA菌と疑われる菌株が分離された場合、生化学性状の検査と平行して、16s rRNA 遺伝子配列を決定し、データベース検索を通じて遺伝学的に同定することも可能である。われわれは、以下のプライマー配列を通常の菌種同定のためのシーケンス解析に使用している(5'-TGGA GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-TACCGCGGCT GCTGGCAC-3')¹⁷⁾。また、Fukushimaらは、リアルタイムPCR法を用いた食品からの直接的な遺伝子検出法を報告しており、臨床現場での迅速な同定、あるいは食品からのスクリーニングを目的とした検出に有用と考えられる¹⁸⁾。今後、PA菌に対して、あるいは特定の血清型に属するPA菌に対して、特異性の高い遺伝子検出法を開発していく上で、本菌の全ゲノム配列の解読が有用な情報源となるであろう。その解読は、PA菌の病原性に係る分子機構を明らかにする点においても、期待されることである。

3. 簡易・迅速診断法

現在、食品あるいは糞便中のPA菌を直接的に検出する簡易・迅速診断法はない。上述のような遺伝子検査法が唯一の迅速法ともいえるが、本菌の食品汚染実態と食中毒の発生状況を広く把握するために

も、より簡易な方法の開発が望まれる。

近年、PA菌(血清型O9)ではO-ポリサッカライド鎖に特有の構造を示すことが明らかにされる¹⁹⁾など、本菌に特異性を示す分子の探索も序々にではあるが進みつつある。このような新規ターゲット分子の探索・同定は、今後の簡易・迅速診断法の開発に有効と思われる。

Ⅲ. おわりに

細菌性食中毒のうち、原因が特定されない事例は全体の約3割にのぼっており、過去の食中毒事例の発生状況を鑑みると、PA菌による食中毒がその一部を占めている可能性は否定できない。その解明のためには、本菌の食品の汚染実態とこれに関連する食中毒の発生状況の把握が必要であり、いまだ発展途上にあるPA菌の迅速・簡便検出法の開発が望まれる。

文 献

- 1) Sheth NK and Kurup VP. Evaluation of tyrosine medium for the identification of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 1 (5): 483-485, 1975.
- 2) 朝倉宏, 五十君静信, 柳忠湖, 鈴木荘介, 春日文子, 山本茂貴, 熊谷進. *Providencia alcalifaciens* 由来 LPS の病原性に及ぼす影響についての検討. 第138回日本獣医学会学術集会講演要旨集. 124, 2004.
- 3) Murata T, Iida T, Shiomi Y, Tagomori K, Akeda Y, Yanagihara I, Mushiake S, Ishiguro F, Honda T. A large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens*. J Infect Dis. 184: 1050-1055, 2001.
- 4) Chilbek R, Jirous J, Beran J. Diarrhea outbreak among Czech Army field hospital personnel caused by *Providencia alcalifaciens*. J Travel Med. 9: 151-152, 2002.
- 5) 東京都健康安全研究センター(2003)東京都微生物検査情報(平成14年度の食中毒発生状況)第24巻5号. <http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/epid/2003/tbkj2405.html>
- 6) 田中真弓, 斎尾美春, 井田正巳. *Providencia alcalifaciens* が原因菌と示唆された食中毒事例について. 鳥取県衛生環境研究所報. 48: 21-22, 2007.
- 7) Tribe GW, Rood MJ. *Providencia alcalifaciens* in diarrhoeic dogs and cats. Vet Rec. 150 (12): 386-387, 2002.
- 8) Mathan MM, Mathan VI, Albert MJ. Electron microscopic study of the attachment and penetration of rabbit intestinal epithelium by *Providencia alcalifaciens*. J Pathol. 171 (1): 67-71, 1993.

- 9) Maszewska A, Torzewska A, Stączek P, Różalski A. Enterocyte-like Caco-2 cells as a model for *in vitro* studies of diarrhoeagenic *Providencia alcalifaciens* invasion. *Microb Pathog.* Epub Ahead of Print, 2010.
- 10) Khashe S, Scales DJ, Abbott SL, Janda JM. Non-invasive *Providencia alcalifaciens* strains fail to attach to HEp-2 cells. *Curr Microbiol.* **43** (6) : 414-417, 2001.
- 11) Penner JL, Fleming PC, Whiteley GR, Hennessy JN. O-serotyping *Providencia alcalifaciens*. *J Clin Microbiol.* **10** (6) : 761-765, 1979.
- 12) Parkhomchuk AA, Kocharova NA, Białczak-Kokot M, Shashkov AS, Chizhov AO, Knirel YA, Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O12. *Carbohydr Res.* **345** (9) : 1235-1239, 2010.
- 13) Ovchinnikova OG, Kocharova NA, Shashkov AS, Białczak-Kokot M, Knirel YA, Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O31 containing an ether of D-mannose with (2R,4R)-2,4-dihydroxypentanoic acid. *Carbohydr Res.* **344** (5) : 683-686, 2009.
- 14) Toukach FV, Kocharova NA, Maszewska A, Shashkov AS, Knirel YA, Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O8 containing (2S,4R)-2,4-dihydroxypentanoic acid, a new non-sugar component of bacterial glycans. *Carbohydr Res.* **343** (15) : 2706-2711, 2008.
- 15) Ewing WH. In : Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York : Elsevier Science, 1986 : 443-459.
- 16) Senior BW. Media for the detection and recognition of the enteropathogen *Providencia alcalifaciens* in faeces. *J Med Microbiol.* **46** (6) : 524-527, 1997.
- 17) Asakura H, Morita-Ishihara T, Yamamoto S, Igimi S. Genetic characterization of thermal tolerance in *Enterobacter sakazakii*. *Microbiol. Immunol.* **51** (7) : 671-677, 2007.
- 18) Fukushima H, Katsube K, Hata Y, Kishi R, Fujiwara S. Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* **73** (1) : 92-100, 2007.
- 19) Ovchinnikova OG, Kocharova NA, Shashkov AS, Arbatsky NP, Rozalski A, Knirel YA. Elucidation of the full O-polysaccharide structure and identification of the core type of the lipopolysaccharides of *Providencia alcalifaciens* O9. *Carbohydr Res.* **346** (5) : 644-650, 2011.