

# 国内飼育下チーターの enteric helicobacter に関する 病理学的研究

*Pathological study on enteric Helicobacter infection in captive cheetahs (Acinonyx jubatus)  
in Japan*

野村靖夫, 宇根有美

麻布大学獣医学部病理学研究室

Yasuo Nomura, Yumi Une

Laboratory of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, AZABU University

**Abstract.** There has been no report on the prevalence and pathogenicity of enteric *Helicobacter* in large felid including cheetahs. The pathogenicity of most enteric *Helicobacters* remains still unknown. Pathological examination of 63 captive cheetahs revealed a high incidence of lymphocytic enteritis. However we could not found the relationship of enteritis and *Helicobacter* infection of intestine. We therefore studied the relationship of amyloid and *Helicobacter* infection of intestine and its pathogenicity in captive cheetahs, in an attempt to identify the cause of this disease.

Pathological studies were carried out on 43 from 63 cheetahs that died in captivity. Amyloid deposited in 36 cheetah (83.7%) and was frequently observed in small intestine. There is no relationship of amyloid and *Helicobacter* infection of intestine.

Molecular biological examination distinguished that the bacteria derive from 2 cheetahs were *H. bilis*, *Flexispira rappini* and *H. cinaedi*. But the relationship of enteritis and *Helicobacter* infection of intestine was unclear. Because there were too few cheetahs with which the *Helicobacter* was isolated.

## 1. 目的

申請者は、近年、飼育数が激減している絶滅危惧種であるチーターの死因を解明すべく研究を続けてきた。その結果、チーターでは *Helicobacter* 属細菌による慢性胃炎が続発性アミロイド症を誘発し、これが主たる死因であることを明らかにした（124回日本獣医学会以下日獣会、第7回日本ヘリコバクテリア学会）。また、モデル動物（チーター由来 *Helicobacter* 接種マウス）の作成（127回日獣会）、これを用いた除菌方法の検討（129回日獣会）、*Helicobacter* 感染の非侵襲的検査法の確率（130、132

回日獣会）、胃内 *Helicobacter* 菌の菌種同定（129回日獣会、獣畜新報）もおこなった。この過程で、チーターには腸炎も高率に観察され、enteric *Helicobacter* が感染していることに注目し、2003年度は、各部位ごとの感染率と病変との関連を検討した。その結果、腸管いずれかの部位に *Helicobacter* 感染がみられた割合は58%（小腸21%、大腸60%、盲腸53%）と高率であったが、リンパ球プラズマ細胞性腸炎との関連性は見出せなかった。しかしながら、チーターの腸には多種類の enteric *Helicobacter* が感染している可能性があるため、本研究では、enteric *Helicobacter* の種類と腸炎以外の病変との関係を明ら

かにすることを目的として研究を行った。

これらの研究の成果は、消化器疾患罹患率の低下、腎不全の進行を遅らせ、腎不全の発症を抑え、チーターの寿命を延ばすことになり、ひいては、繁殖期間の延長、繁殖可能な個体数の増加を促すことになる。このことは絶滅危惧種であるチーターの種の保存に貢献するものと考えられる。

## 2. 材料と方法

### 1) 腸病変、特にアミロイドに関する検討

1994年から2002年の間に病性鑑定を行った63頭のチーターのうち、病理学的検査に適し、さらに病変のスコア化可能な検体数の揃った43頭を選択し、これらのホルマリン固定材料を用いて、常法に従いパラフィン標本を作製し、H.E染色、Warthin-Starry染色、Congo赤染色、抗*H. pylori*抗体(DAKO社製)と抗AAアミロイド蛋白抗体(協和発酵)を用いた免疫染色を施して病理組織学的に検索した。アミロイド沈着と*Helicobacter*属細菌感染との関連性を検討した。

### 2) 感染モデル動物を用いた*Helicobacter*属菌の種の同定

病性鑑定を行ったチーター12頭の腸管をスナネズミに経口接種して、スナネズミの消化管で*Helicobacter*属細菌を増菌して、分子生物学的および微生物学的に同定を行った。

具体的には、

#### (1) チーターからの*Helicobacter*属細菌の回収

死亡時採取した新鮮盲腸を乳剤にし、ブレインハートインヒュージュン培地にて希釈してスナネズミ最低3匹に、1匹当たり0.1~0.5 mlを胃ゾンデを用いて接種した。接種後最低4週間飼育した後に、3匹中1匹を安楽殺し、病理組織学的に菌の定着の有無を検討した。

#### (2) *Helicobacter*属細菌の培養

菌の定着が確認されたスナネズミの糞を採材し、PBSを10倍量加え乳剤にしたもの、200  $\mu$ lをHP寒天培地(栄研化学、*H. pylori*分離培地)に塗抹し、微好気条件下(85%  $N_2$ , 10%  $CO_2$ , 5%  $O_2$ )で1週間培養。

#### (3) 菌種の同定

培養によって得られたコロニーから常法に従い

DNAを抽出した。*Helicobacter*属菌共通プライマー(Forw.: 5'AGG GAA TAT TGC TCA ATG GG3'), (Rev.: 5'TCG CCT TCG CAA TGA GTA TT3')を用い、93°C 1分, 55°C 1分, 72°C 1分の条件下で、25サイクル増幅した。この操作で得られたPCR産物のクローニングを常法に従って行った。なお、ホモロジーリサーチは、<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>によった。

## 3. 結果と考察

### 1) アミロイド沈着

対象としたチーターの43頭中36頭、83.7%にアミロイドの沈着が認められた。その程度を0~3にスコア化したところ、+3: 2頭, +2: 8頭, +: 26頭, -: 7頭であった(表1)。沈着程度は、小腸で最も沈着率が高く、かつ重度であった。アミロイドは消化管では、胃から大腸まで認められたが、特に小腸で高度で、粘膜上皮直下の固有層に線状に沈着していた(写真1~3)。*Helicobacter*属細菌の感染とアミロイドの有無およびアミロイド沈着の程度と菌感染の関係を検討したが、グラフ1のように関連はみられなかった。

消化管へのアミロイドの沈着は、肝臓や腎臓と並んでかなり高度でかつ広範囲に及んでいた。アミロイドが消化管に沈着すると難治性の下痢(消化吸収障害)を引き起こすとされている。今回、対象とした多くのチーターには、生前下痢、消化不良の臨床症状が認められており、腸管へのアミロイドの沈着は、チーターの全身状態、栄養状態を悪化させる重要な病変と考えられる。

また、アミロイドは、腸陰窩や絨毛の基底膜に一致して沈着し、高度になると固有層を占拠するほどに塊状となっていた。また、軽度な例では絨毛先端部に、高度な例でも、絨毛部が冒されることが多かった。近年、アミロイド自体にアミロイド沈着促進効果があり、かつ伝達性が証明されていることから、チーターの腸管におけるアミロイドの沈着機序を考える上で非常に興味深い所見と考えられた。

### 2) 感染モデル動物を用いた*Helicobacter*属菌の種の同定

12頭のチーターの腸をスナネズミに接種したところ、3匹のスナネズミの盲腸・大腸に*Helicobacter*属

Table 1 Distribution and Score of Amyloid

	Sex	Age of death	Helicobacter	intestine	kidney	renal papilla	Liver
C-29	♂	5yrs	—	2	6	0	3
C-36	♀	4yrs	—	1	6	1	3
C-35	♀	3yrs	+	1	6	1	3
C-40	♀	8yrs	—	1	6	1	3
C-60	♀	4yrs	—	2	5	1	3
C-39	♀	4yrs	—	1	5	1	3
C-57	♂	9yrs	—	1	5	1	3
C-66	♀	8yrs	+	1	5	1	3
C-54	♂	5yrs	—	1	5	0	3
C-37	♀	10yrs	+	2	4	1	3
C-55	♀	3yrs	+	1	4	1	3
C-63	♀	10yrs	+	1	4	1	3
C-21	♀	4yrs	+	1	4	0	3
C-61	♀	7yrs	—	3	4	1	2
C-43	♀	8yrs	+	2	4	1	2
C-7	♀	15yrs	+	1	4	0	1
C-68	♂	10yrs	+	1	3	1	3
C-42	♀	5yrs	+	1	3	1	2
C-19	♂	7yrs	+	1	3	1	2
C-18	♂	4yrs	+	1	3	0	2
C-24	♀	3yrs	+	1	3	0	2
C-33	♂	4yrs	+	1	2	1	3
C-27	♀	12yrs	—	1	2	0	3
C-28	♂	3yrs	—	2	2	0	2
C-25	♂	3yrs	+	1	2	0	2
C-48	♂	8yrs	—	1	2	0	2
C-6	♂	13yrs	—	1	1	0	3
C-34	♀	4yrs	+	1	1	1	3
C-38	♂	6yrs	+	3	1	1	1
C-44	♀	6yrs	+	1	1	1	2
C-50	♀	9~10yrs	+	1	1	1	1
C-58	♂	9yrs	—	2	1	1	1
C-59	♂	4yrs	—	2	1	1	3
C-26	♀	11yrs	+	0	4	1	3
C-32	♀	9yrs	—	0	1	0	2
C-20	♂	12yrs	+	1	0	0	1
C-10	♂	12yrs	—	0	1	0	0
C-67	♀	10yrs	+	0	1	1	0
C-62	♂	15yrs	+	1	0	0	0
C-69	♀	>16yrs	+	0	0	0	1
C-70	♂	11yr	+	2	0	0	0
C-64	♂	14yrs	+	0	0	0	0
C-65	♂	14yrs	—	0	0	0	0
				36/43	37/43	24/43	37/43

菌が定着した。また、これらの動物の糞を培養したところ C-62 と C-50 チーター由来の 2 匹のスナネズミからそれぞれ 7 クローン、2 クローンのコロニーが得られた。C-62 由来 7 クローンはすべて同じ配列を示し、以下のように *H. bilis* と 93.5 % の相同性を持っていた。

AGGTTAGGTTGTAACCTTTTTTCNNTNCAGATT  
ATGGACGGNATCTTA  
CGAATAAGCACCGGGNTAACTCCGTGCCAGCAGC

CGCGGTAATACGGAGG  
GTGCAAGCGTTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAG  
AGCGCGTAGGTGGGAG  
AGTAAGTCAGATGTGAAATCCTTGTAGCTTAACT  
ACAGAACTGCATTTGA  
AACTACTTTTTCTAGAGTATGGGAGAGGTAGGTGG  
AATTCTTGGTGTAGGG  
GTAAAATCCGTAGAGATCAAGAGGAATACCTTTG  
GCGAAGGCGAAAA  
U18767!U18767.1 *Helicobacter bilis* Hb2 16S rRNA, parti

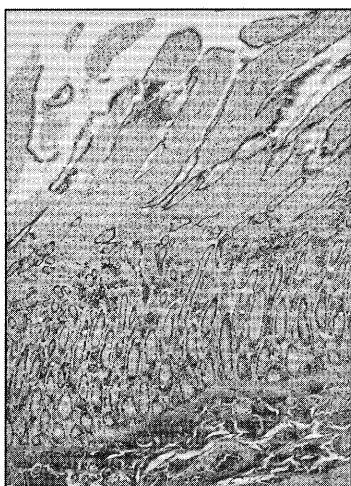


Fig.1 Amyloid deposition in the lamina propria mucosae of small Intestine of a cheetah with mild lymphocytic Infiltration (H.E stain)

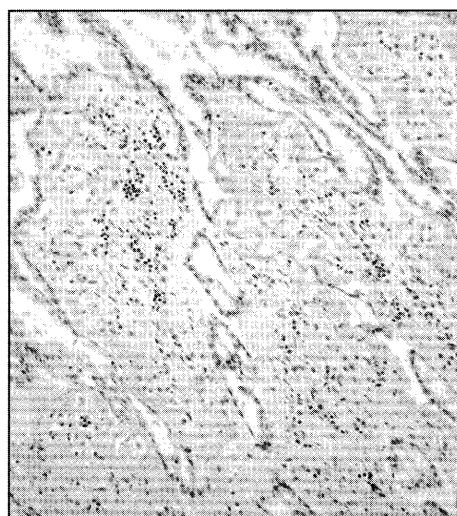


Fig.2 Amyloid deposition in the lamina propria mucosae of small Intestine (Congo Red stain)



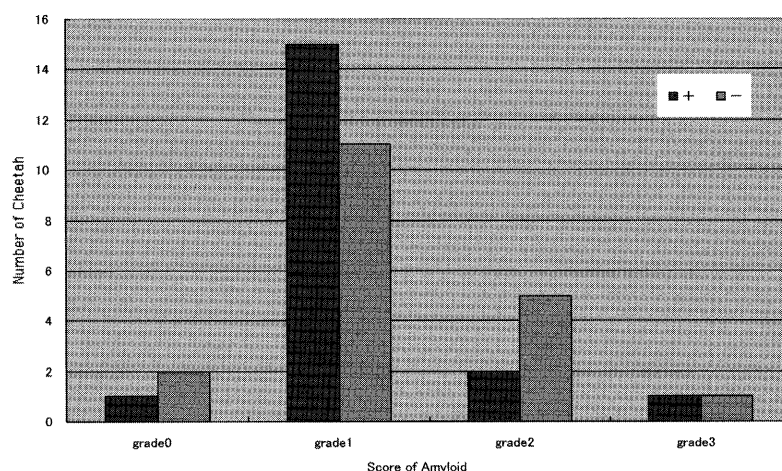
Fig.3 Amyloid deposition in the lamina propria mucosae (Immunostaining using AA protein Ab.)

(1617 nt)

また、C-50由来スナネズミ2クローンは、それぞれ *F. rappini*

GGTGAGGTTTAGGTTGTAACCTTTTTNTNNTTT  
 AGATTATGGACGGTA  
 TCTCACGAATAAGCACCGGGNTAACTCCGTGCCA  
 GCAGCCGCGGTAATAC  
 GGAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATCACTGGGCG  
 TAAAGAGCGCGTAGGC  
 GGGTGGTCAAGTCAGATGTGAAATCCTGTAGCTT  
 AACTACAGAACTGCAT  
 TTGAAACTGGCTATCTAGAGTATGGGAGAGGTAG  
 GTGGAATTCTTGGTGT

AGGGGTAAAATCCGTAGAGATCAAGAGGAATAT  
 CTTTTGCGAAGGCGAAA  
 AF118017:AF118017.1 *Flexispira rappini* 16S ribosomal  
 R (1451 nt) と 93.5% と  
*H. cinaedi*  
 CGAAANCNGGNNCGNCGGNNNATNCANCCAA  
 CCAAAAACCCCGNGGNN  
 AAAAAGGGTANGGATGTAACCTTTTTNTNNTCC  
 GATATGACNAAATNAC  
 GATAACACCGGCTACTCCGTGCCAGCAGCCGCGC  
 AATACGGAGGGGCAAG  
 CGNGGCTCGGNATCACTGGGCGTAAGAGCGCGT  
 ANGCGGGTGGTCAAGCA  
 GATGTGAAATCNGNANCTTACTACAGAACTGCAT



Graph 1 The relationship of amyloid and Helicobacter infection of intestine.

TTGAAATGGCTATCTA  
 AAGATGGGAGAGGANGGNGGAATTCTTGGGNGN  
 ANGGNAAAATCCGAAA  
 AAACANAAGGANACNCTTTTNGNNAANGCCAA  
 AAAATNCNCCNGGTCNC  
 NNANTTANACNGGTGTCC  
 AF207737:AF207737.1 *Helicobacter cinaedi* strain AND  
 04 (1402 nt)

と 81.5% の相同性を有する菌であった。

これらの形態は、昨年検討した透過および走査電子顕微鏡による菌の形態と一致した。しかしながら、菌の回収ができたチーターの頭数が少ないことから、アミロイド沈着やリンパプラズマ細胞性腸炎などの腸病変との関連を明らかにすることはできなかった。なお、今回、分離された菌のうち、*H. bilis* はマウスの腸炎を、*F. rappini* は犬の下痢、さらにヒツジの流死産に関わっているとされ、*H. cinaedi* はヒトの下痢便から高率に分離され、また、新生児に髄膜炎を起こしたとする報告があり、何らかの病原性を有していると推察され、今後、さらに研究を続ける必要がある。

#### 4. 要約

チーターを始めとする大型肉食ネコ科動物における腸型ヘリコバクターの感染率と病原性に関する報告は見当たらない。63頭のチーターを病性鑑定したところ、高率にリンパ球プラズマ細胞性腸炎が認められることが分かった。しかしながら、腸炎とヘリコバクター属細菌感染の間に関連を見出すことはで

きなかった。そこで、チーターにおける腸型ヘリコバクターの感染状況とその他の病変としてのアミロイドとの関連と飼育下チーターにおける病理発生を明らかにすることを目的として研究を行った。病性鑑定に供した63頭のうち今回の検索に適した43頭を病理学的に検索した。その結果、43頭中36頭、83.7%にアミロイドの沈着がみられた。しかしながら、腸へのアミロイド沈着とヘリコバクター属細菌の有無と関連がなかった。2頭のチーターから分離されたヘリコバクターは、分子生物学的研究により、それぞれに *H. bilis*, *Flexispira rappini* と *H. cinaedi* と同定された。しかし、ヘリコバクター属細菌が分離されたチーター数が絶対的に少なかったために、腸病変（アミロイドや腸炎）とヘリコバクター属細菌感染と病変との関連は明かではなかった。

#### 文 献

- 1) Eaton KA, Dewhirst FE, Radin MJ, Fox JG, Paster BJ, Krakowka S, Morgan DR. *Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis. *Int J Syst Bacteriol.* 1993. 43: 99-106.
- 2) Eaton KA, Radin MJ, Kramer L, Wack R, Sherding R, Krakowka S, Morgan DR. Gastric spiral bacilli in captive cheetahs. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1991. 181: 38-42.
- 3) Eaton KA, Radin MJ, Kramer L, Wack R, Sherding R, Krakowka S, Fox JG, Morgan DR. Epizootic gastritis associated with gastric spiral bacilli in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet Pathol.* 1993. 30: 55-63.
- 4) Fox JG. Human disease associated with the non-*H. pylori* helicobacters. *Helicobacter Res.* 2001. 5:124-133.

- 5) Lobetti R, Picard J, Kriek N, Rogers P. Prevalence of helicobacteriosis and gastritis in semicaptive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *J Zoo Wildl Med.* 1999. 30: 492-496.
- 6) 宇根有美 チーター由来 *Helicobacter* 属細菌の超微形態 2001, 獣畜新報 53: 933-938.
- 7) Ward JM, Fox JG, Anver MR, Haines DC, George CV, Collins MJ Jr, Gorelick PL, Nagashima K, Gonda MA, Gilden RV, et al. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J Natl Cancer Inst.* 1994. 86: 1222-1227.