

小猪人工感染猪瘟病毒ALD株之中樞 神經系統超顯微組織病理變化

楊喜吟 李淑慧 黎南榮 楊揚輝

台灣省家畜衛生試驗所

將人工感染猪瘟病毒ALD株的小猪腦脊髓在光學顯微鏡 (Light Microscope , LM) 及電子顯微鏡 (Electron microscope, EM) 下觀察其神經細胞及血管內皮細胞的病變。結果在感染 3、7 及 10 日後剖檢的所有小猪腦脊髓, 在LM下檢查除呈程度不一的非化膿性腦脊髓膜炎外, 其神經細胞均無可見之病變; 在EM下觀察時, 感染 3 日後剖檢之神經細胞多有染色質的異常分佈、粗面內質網及粒線體的腫脹, 以及髓鞘的擴張; 感染 7 及 10 日後剖檢之神經細胞除可見核膜明顯擴張、核內染色質的團塊形成及着邊現象 (Clumping and marginating of chromatin), 且於染色質團塊外出現特殊的管狀構造圍繞。聚集的小神經膠細胞中可見少數小淋巴球的浸潤, 並有各種程度的變性; 有些神經膠細胞的胞質內存有特殊小體, 可能是自噬體 (autophagosome) 或次級溶酶體 (secondary lysosome)。

血管內皮細胞在感染 3 日後尚無法以LM觀察到病變, 感染 7 及 10 日後則可見其腫脹及增殖; 以EM觀察時, 則在感染 3、7 及 10 日後均可見血管內皮細胞的病變, 除了細胞及核的腫脹外, 尚可見粒線體各種程度的腫脹或空泡樣變化, 部份內皮細胞的細胞膜有顯著的褶皺現象。所有超薄切片中均未能發現病毒粒子。

猪瘟是本省最古老且最重要的猪傳染病之一, 雖然經過多年的努力, 發生率已降低到 0.02 % 以下, 但仍常有散發性的野外病例發生, 且常與其他傳染病合併感染 (2, 10, 13)。非化膿性腦脊髓膜炎為猪瘟最具特徵性的病變, 主要為淋巴球圍管現象、小神經膠細胞增殖及血管內皮細胞的腫脹與增殖 (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13)。但是在光學顯微鏡 (LM) 下檢查, 神經細胞並無明顯之病變, 血管內皮細胞的病變出現率及程度, 亦常有很大的差異 (1, 4, 5, 9, 13)。本研究即在應用電子顯微鏡探討猪瘟病毒對於小猪中樞神經系統的神經細胞及血管內皮細胞的病變, 以明瞭猪瘟病毒之致病原理及供爾後診斷上之參考。

材料與方法

供試病毒:

台灣省家畜衛生試驗所繼代保存之猪瘟病毒ALD毒株。

供試小猪:

自台糖畜產研究所購入無猪瘟預防注射之健康小猪 9 頭, 體重約為 20 公斤。

病毒接種:

9 頭供試小猪中, 除留一頭另行隔離飼養做為對照組外, 其餘 8 頭均在耳根部後方肌肉接種猪瘟病毒, 每頭接種病毒量為 10^4 MLD。

症狀觀察、病理檢查及電子顯微鏡檢查:

小猪接種病毒後逐日觀察臨床症狀及量取體溫, 並於接種 3、7 及 10 日後分別剖檢 3、3 及 2 頭, 對照組小猪則與最後一組接種猪同時剖檢。剖檢後均採取腦及脊髓, 腦細分嗅球、大腦前葉、運動區、大腦後葉、胼胝體、視丘、四疊體、腦橋、延腦及小腦等 10 個部位, 脊髓則採自第 3 頸椎、第 3 胸椎及第 3 腰椎。所有病材皆分為二部份, 一部份固定於 10 % 中性福馬林溶液, 再以石臘包埋, 切成 6 μ 厚之切片, 行蘇木紫及伊紅染色後, 在光學顯微鏡下檢查; 另一部份則先後以 2.5 %

戊二醛與1%四氧化鐵固定，經適當修整後包埋於環氧樹脂混合物，再以超薄切片機先切700 nm之厚切片，經1%甲苯胺藍染色後，在光學顯微鏡下選定薄切部位，再切成80 nm之超薄切片，行醋酸鈉及檸檬酸鉛之雙重染色後，在電子顯微鏡（H-600）下觀察及照相。

結 果

一、臨床症狀：

小豬於接種病毒後第2日，體溫即迅速上升至41~42℃，且維持高溫至剖檢，但在接種10日後剖檢之小豬均為瀕死狀態，而有體溫下降至36~37℃之情形。感染之初，小豬在臨床上除稍顯沈鬱外，並無其他症狀；至接種3日後，小豬開始出現黃色乳酪樣的下痢，終而轉成水樣下痢，並有顯著的食慾不振及精神沈鬱，耳翼及腹部皮膚呈紅色至黑紫斑；至接種10日後，小豬即因站立困難而倒臥，全身震顫，眼神無力，處於瀕死狀態。對照小豬無任何異常症狀。

二、肉眼病變與組織病理變化：

剖檢小豬之腦與脊髓，除腦有輕度鬱血外，並無可見之內眼病變。在一般光學顯微鏡下檢查腦脊髓的組織病理變化，結果見表1。接種3日後剖檢的3頭小豬，有2頭呈極輕度（1號豬）或輕度（3號豬）的非化膿性腦炎，病變主要出現於腦幹部位，以淋巴球圍管、小神經膠細胞增殖為主，並有局部小出血。接種7及10日後剖檢的5頭小豬均呈嚴重的瀰漫性非化膿性腦脊髓炎，並有血管內皮細胞的腫脹及增殖，病變仍以腦幹部位為最顯著。

三、電子顯微鏡檢查：

腦脊髓的超薄切片在電子顯微鏡觀察，接種病毒3日後剖檢的小豬，可見腦大部份區域的神經細胞染色質不正常的分佈，粗面內質網及粒線體的腫脹（圖1），有些區域可見紅血球溢出血管外而進入實質細胞及神經纖維之間（圖2）；在脊髓可見髓鞘明顯不規則的擴張及消化空腔（Digestion chambers）的形成（圖3）；大部份血管內皮細胞及其細胞核均呈顯著的腫脹及增殖，其細胞質內之粒腺體亦有各種程度的腫脹或空泡樣變化，部份內皮細胞的細胞膜呈明顯的褶皺現象（圖4）。接種病毒7及10日後剖檢的小豬，腦部多數神經細胞的核膜明顯的擴張，核

表1 小豬接種豬瘟病毒後腦脊髓組織病理變化

接種病 毒日數	豬 號	嗅 球	大 腦			胛 胝 體	視 丘	四 疊 體	腦 橋	延 腦	小 腦	頸 椎	胸 椎	腰 椎
			前葉	運動區	後葉									
3	1	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
3	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	3	—	—	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—
7	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
7	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
10	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+
10	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
對照組	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

註：—：無可見之病變

＋：輕度病變

＋＋：中度病變

＋＋＋：重度病變

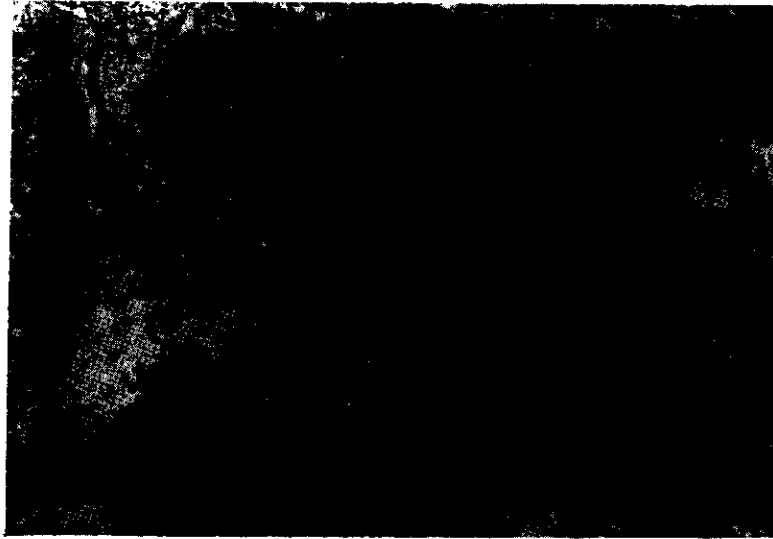


圖1 接種豬瘟病毒3日後，大腦的神經細胞染色質分佈不正常，粗面內質網(→)及粒線體(二)的腫脹。U & L stain, × 6000。

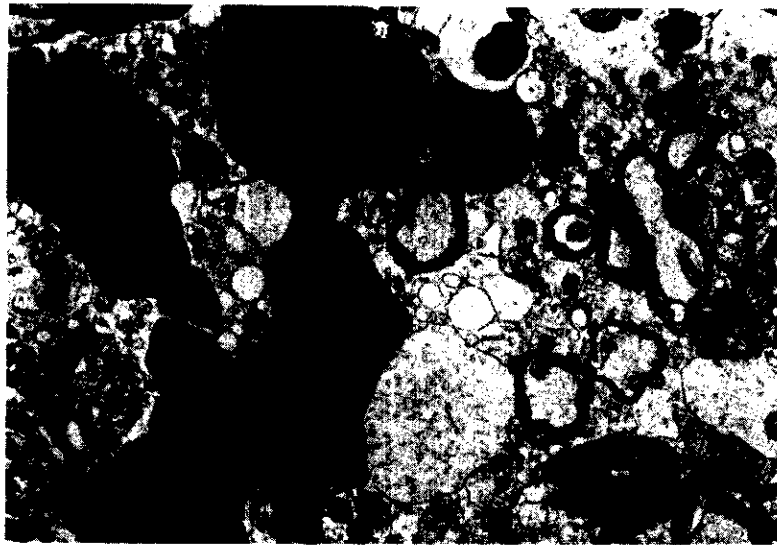


圖2 接種豬瘟病毒3日後，在延腦所見紅血球逸出血管外而進入實質細胞與神經纖維間。U & L stain, × 6000



圖3 接種豬瘟病毒3日後，在脊髓所見髓鞘不規則的擴張及形成消化空腔 (digestion chambers) (↑) 。U & L stain, × 6000 。

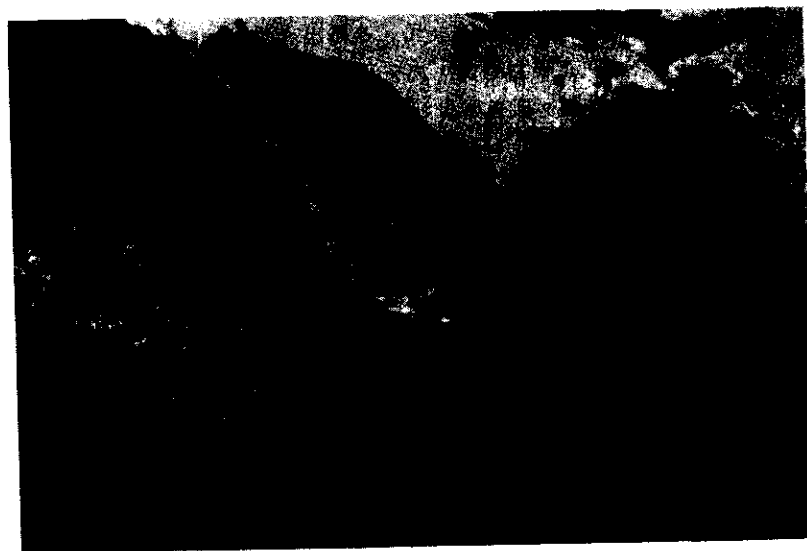


圖4 接種豬瘟病毒3日後，在大腦前葉的血管內皮細胞呈顯著的腫脹及增殖。U & L stain, × 7500



圖 5 接種豬瘟病毒 7 日後，在嗅球所見神經細胞的核膜呈輕度不規則的擴張。U & L stain, $\times 12000$



圖 6 接種豬瘟病毒 7 日後，在大腦後葉所見神經細胞核內染色質的團塊形成，外圍有層次分明的管狀結構圍繞 (↑)。U & L stain, $\times 18000$



圖7 接種豬瘟病毒7日後，在視丘所見聚集的神經膠細胞間，有變性的神經細胞(↑)。U & L stain, × 5250

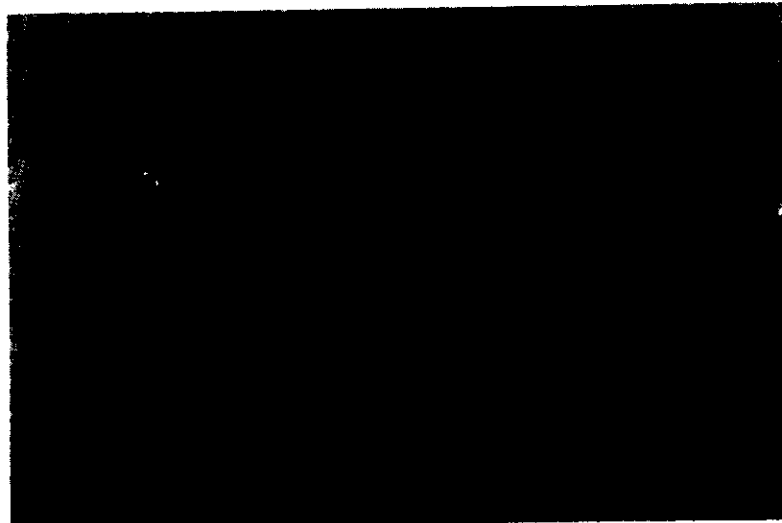


圖8 接種豬瘟病毒10日後，在嗅球所見神經細胞的變性，胞器顯著的減少(←)。U & L stain, × 7500

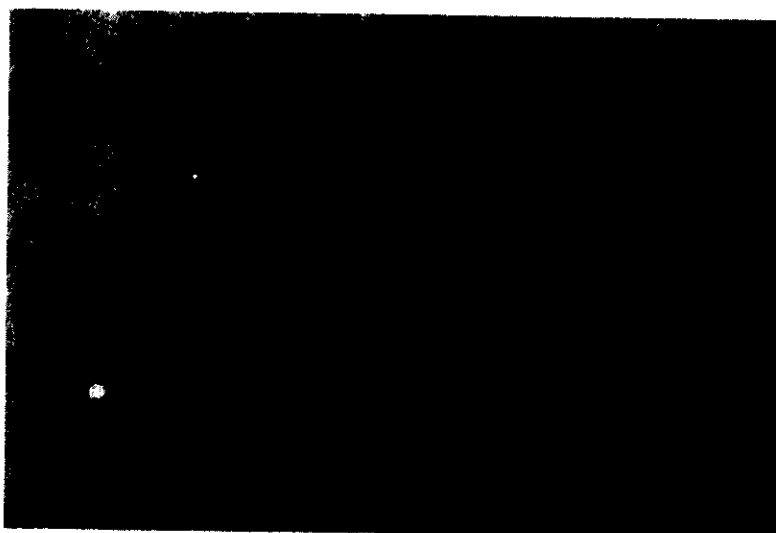


圖 9 接種豬瘟病毒 10 日後，在小腦所見聚集的神經膠細胞間存有變性而幾近壞死的神經細胞 (→)。U & L stain, × 4500

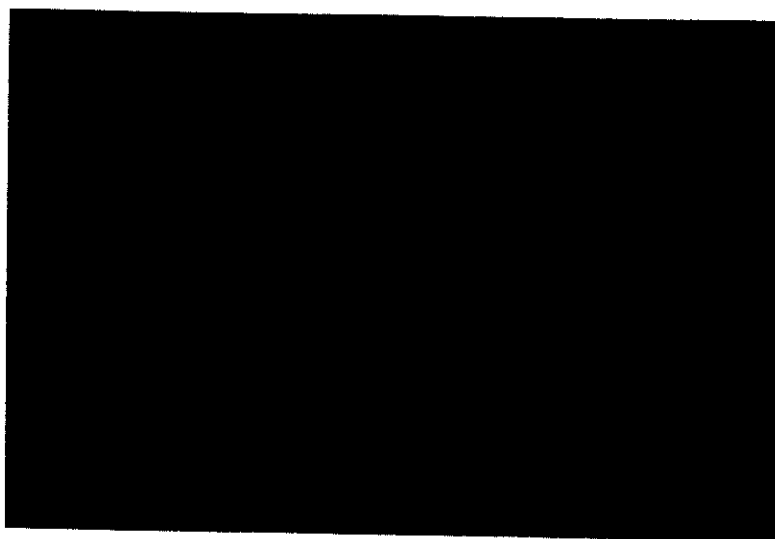


圖 10 接種豬瘟病毒 10 日後，在嗅球所見神經膠細胞的質內小體 (↑)，可能是自噬體 (autophagosome) 或次級溶酶體 (secondary lysosome)。U & L stain, × 9000

內染色質形成團塊 (Clumping) 及着邊現象 (marginating) (圖 5), 有些細胞核的染色質團塊外圍繞著層次分明的特殊管狀構造 (圖 6)。小神經膠細胞的聚集 (Microgliosis) 區域常有少數淋巴球的浸潤及變性的神經細胞 (圖 7、8、9); 有些神經膠細胞的細胞質內可見到特殊的小體, 推測可能是自噬體 (autophagosome) 或次級溶酶體 (secondary lysosome) (圖 10)。血管內皮細胞的病變與接種 3 日後剖檢之小豬相似, 但以細胞及其粒線體之腫脹為最明顯。在本試驗中, 所有超薄切片中均未能發現有豬瘟病毒粒子的存在。

討 論

由本研究結果顯示, 小豬在接種豬瘟病毒後, 體溫的變化及臨床症狀的出現情形均與前人所述大致相似^(1,4,5,6,7,8,9,13)。小豬中樞神經系統的病理變化, 程與李⁽²⁾以相同毒株接種於相同大小的小豬, 3 日後即見中樞神經系統輕度的病變, 5 日後則呈較嚴重的病變, 此與本研究結果相似。血管內皮細胞的病變以腫脹和增殖為主, Jones and Hunt⁽⁹⁾認為最常見於淋巴結、脾及腎, 中樞神經系統反而較不嚴重, 此與本研究所顯示的中樞神經系統在接種病毒 3 日後即現相當程度的血管內皮細胞病變頗不一致, 但雖有程度上的差異, 此病變的存在仍可與楊等⁽³⁾研究假性狂犬病在小豬中樞神經系統並不引起血管內皮細胞病變的結果, 做為診斷上重要的依據之一。

除了血管內皮細胞的病變之外, 在光學顯微鏡下尚能觀察到的主要病變是單核細胞的圍管現象及小神經膠細胞的聚集。神經細胞的病變雖無法以光學顯微鏡觀察, 但在電子顯微鏡下觀察, 卻有相當的病變。在接種病毒 3 日後, 即出現染色質不正常的分佈、粗面內質網及粒線體的腫脹、髓鞘不規則的擴張及形成消化空腔; 接種 7 及 10 日後, 多數神經細胞有核膜的擴張、核內染色質的團塊形成、着邊現象及一些特殊構造的出現。Jones and Hunt⁽⁹⁾認為神經細胞的病變較不具意義, 受病毒侵犯的神經細胞會有核腫脹、染色質呈斷片狀、缺核仁、細胞膜呈鋸齒狀及細胞質的空胞化等; Cherville⁽⁶⁾認為神經細胞粒線體的腫脹及嵴的消失普遍存於各超薄切片中, 但因粒線體對缺氧極敏感而易形成此種病變, 故應不具特異性。本研究中所見神經細胞核內染色質團塊周圍層次分明的特殊管狀構造, 有何意義, 並不瞭解; 而在有些神經膠細胞的胞質內見到的特殊小體, 推測可能是自噬體或次級溶酶體。

昔日各學者⁽¹³⁾以電子顯微鏡僅能在組織培養的細胞中觀察到 40 ~ 50 nm 的豬瘟病毒; 黃⁽²⁾在人工感染豬瘟病毒的小豬扁桃腺上皮細胞中觀察到為數甚少的豬瘟病毒粒子, 並在文獻檢討中提及 Ressang 以螢光標示抗體染色法發現在扁桃腺、咽頭黏膜、胃腸道、腎、膀胱、胆囊、胆管、胰臟、唾液腺、瞬膜、子宮、腎上腺及甲狀腺等上皮細胞內均有豬瘟病毒的特異螢光; Cherville and Mengeling 則發現急性豬瘟的病毒抗原呈瀰漫性分佈於網狀內皮細胞內。本研究中觀察所有中樞神經系統的超薄切片中, 均未能發現有病毒粒子的存在。以上均顯示豬瘟病毒並不直接侵犯中樞神經系統, 而可能是間接的傷害, 其真正的致病機序, 則仍有待進一步的探討。

誌 謝

本研究承許振祺先生及呂蓮葉小姐協助製作病理切片及超薄切片, 在此表示由衷謝忱。

參 考 文 獻

1. 程永昌、李全 (1968) 豬瘟中樞神經病理之研究。台灣省畜衛試研報。5: 35-43。
2. 黃天祥 (1985) 豬假性狂犬病與豬瘟之混合感染。國立台灣大學獸醫學研究所碩士論文。
3. 楊喜吟、黎南榮、鍾明華、楊揚輝、賴秀穗、傅祖慧、朱瑞民 (1985) 假性狂犬病豬中樞神經系統之超顯微組織病理變化。中華民國獸醫學會雜誌。11: 1-8。
4. 岡庭梓、石谷類造 (1960) 豚コレラの病理學的研究。II 強毒ALD株接種豚の病理組織學的研究: 特に中樞神經系の所見について。Bull. N.A.H. 40: 89-101。

- 5.岡庭梓、石谷類造 (1960) 豚コレラの病理學的研究。V. 自然發生豚コレラの病理組織學的所見。Bull. N.A.H. 40 : 127-140。
- 6.Cherville, N.F. 1983. Cell pathology. 2nd edi. Page 186-187, 248, 320-321, 468, 640-641。
- 7.Dunne, H.W., E.M. Smith, R.A. Runnells, H. J. Stafseth and F. Thorp. 1952. A study of an encephalitic strain of hog cholera virus. Am. J. Vet. Res. 48 : 277-289。
- 8.Helmboldt, C.F. and E.L. Jungherr. 1952. Further observations on the neuropathological diagnosis of hog cholera. Am. J. Vet. Res. 13 : 309-317。
9. Jones, T.C. and R.D. Hunt. 1983. Hog cholera. In Veterinary Pathology. 5th edi. Page 412-420。
- 10.Lai, S.S., W.C.Ho, S.H. Tsao, L.P.Lin and K.F. Lin. 1984. Concurrent infection of hog cholera with pseudorabies in swine. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 10 : 119-124。
- 11.Seifried, O. 1930. Histological studies on hog cholera. I. Lesions in the central nervous system. J. Exptl. Med. 53 : 277-293。
- 12.Seifried, O. and C.B.Cain. 1932. Histological studies on hog cholera. II. Lesions of the vascular system. J. Exptl. Med. 56 : 345-351。
- 13.Stewart, W.C. 1981. Hog cholera. In Diseases of Swine. 5th edi. Edited by Leman, A.D. etc. Page 224-236。

**ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF
PIGLETS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH HOG CHOLERA
VIRUS ALD STRAIN**

S.Y. Yang, S.W. Lee, N.J. Li and Y.H. Yang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

The central nervous systems of piglets experimentally infected with hog cholera virus strain were examined by light microscope (LM) and electron microscope (EM) at 3,7 and 10 days post infection (PI). Nonsuppurative encephalomyelitis was the principal lesion observed in this study under LM. And the changes of nerve cells could only be of chromatin, swelling of rough endoplasmic reticulum and mitochondria, and dilatation of myelin sheath were noticed at 3 days PI. At 7 and 10 days PI dilatation of nuclear membrane and clumping or marginating of Chromatin were found in most of nerve cells. Characteristic microtubular structure exhibiting irregular arrangement were seen in the nucleus of some nerve cells. Some degenerating small lymphocytes were seen in the areas of gliosis. Frequently, glia cells were found to contain special bodies that could be the autophagosomes or secondary lysosomes at 10 days PI. The changes of swelling and vacuolation were found in both cytoplasm and nucleus of endothelia and its mitochondria. Folding of endothelia membrane was seen in any stages. No virus particle could be found in any thin section in this study.