

假性狂犬病豬中樞神經系統 之超顯微組織病理變化

楊喜吟¹ 黎南榮¹ 鍾明華¹ 賴秀穗¹ 楊揚輝¹
傅祖慧² 朱瑞民³

自本省假性狂犬病患者豬分離之 PrV-TNL 株病毒，以 $10^{6.6}$ TCID₅₀ 病毒量行鼻腔接種於 3 至 4 週齡之健康小豬，並觀察其中樞神經系統之超顯微組織病理變化。接種病毒 1 天後，只見神經細胞的粒線體呈輕度腫脹；2 天後則可在嗅球、肝臟體、四疊體、延腦及腦橋見到神經細胞軸突的軸膜內有多數無外膜病毒粒子 (Unenveloped virus particles)。病毒粒子直徑為 90 至 110 nm，蛋白衣呈卵圓形或六角形，厚度約為 5 nm，內為直徑 70 至 80 nm 之圓形或卵圓形核心 (core)。有些神經細胞的胞質內有類似神經微絲 (neurofilaments) 的多聚合現象 (polymerization)。浸潤的淋巴球則有胞器的顯著減少，粗面內質網腫脹及含大小不一的空泡。有些神經膠細胞的核膜及其膜孔有顯著的擴張。於頸椎可見軸突的退行性變化及脫髓鞘作用 (demyelination)。

接種病毒 3 至 5 天後，可見腦各部位明顯的小神經膠細胞增殖、血管外圍之淋巴球浸潤及更廣泛之細胞病變，同時極易發現無外膜病毒粒子及胞質內各型的溶酶體 (lysosomes)。6 至 7 天後，腦脊髓各部位均呈重度之細胞壞死病變，胞質內之神經小管 (neurotubules) 及神經微絲等的多聚合現象，以及無外膜病毒粒子之存在。至接種 14 及 49 天後，則腦脊髓各部位大多無或僅呈輕微之細胞病變，亦不復見有病毒粒子。

本研究顯示 Pr 病毒沒有引起腦脊髓的血管內皮細胞病變，因之推測該病毒在侵入腦脊髓後，不經由血管途徑傳播，而可能經由神經細胞間之直接傳播。

豬假性狂犬病 (Pseudorabies; Pr) 於 1971 年 6 月在屏東某養豬場爆發以來，至今已蔓延並流行全省。因其引起仔豬嚴重之中樞神經系統障礙和高死亡率，以及母豬之流死產，而造成經濟上重大之損失。(20, 27, 28) 本病在中樞神經系統主要為引起非化膿性腦膜腦炎，Baskerville A. 等及其他數位學者以電子顯微鏡研究感染豬之神經系統超顯微組織病理變化，結果除了觀察到某些病變部的細胞病理變化外，尚可見感染細胞內存在該病毒粒子。(1, 2, 3, 4, 7, 12, 13, 15) 但自感染之初至 7 天後，該病毒在中樞神經系統之傳播情形則未甚明瞭。Narita 等發現本病能引起頸下淋巴結及扁桃腺的壞死性血管炎，並在血管內皮細胞內找到病毒，(19) 但在中樞神經系統是否會引起血管炎病變亦仍未明瞭。

本研究即以 Pr 病毒感染小豬後，在電子顯微鏡下觀察病毒在中樞神經系統之傳播及引起之病變演化情形，藉以探究假性狂犬病對豬的致病原理。

材料與方法

病毒株：為台灣省家畜衛生試驗所分離之 PrV-TNL 病毒株，經繼代於 MBPK 株化細胞 1 代，SK 細胞 1 代，以及 CPK 株化細胞 2 代後，經測定病毒力價為 $10^{8.6}$ TCID₅₀/ml 後供接種小豬用。

試驗豬隻：自台糖大林畜殖場購入 3 至 4 週齡無假性狂犬病抗體之健康小豬 10 頭，經餵飼 2 天後接受病毒接種用。

病毒接種：供試小豬於接種 Pr 病毒前，先由頸靜脈採血及分離血清，經 56°C、30 分鐘處理

後，再以免疫擴散試驗 (Immunodiffusion test) 測定確無 Pr 抗體。10 頭供試小豬中，9 頭小豬行鼻腔接種 PrV-TNL 株病毒，每頭 1ml ($10^{6.0}$ TCID₅₀/ml)，鼻腔兩邊各為 0.5 ml；另一頭不接種病毒而隔離飼養，做為對照組。

電子顯微鏡標本製作及觀察：小豬於接種 Pr 病毒後，自接種後第 1 至 7 天逐日剖檢 1 頭，另 2 頭則於接種後第 14 天及 49 天再各剖檢 1 頭。對照組小豬亦於 49 天後剖檢。剖檢後，採取腦及脊髓，腦細分嗅球、大腦前葉、大腦運動區、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。取材、修整及固定均在 4°C 之冰冷狀態下操作，以 2.5% 戊二醛做為前固定，以 1% 四氧化鐵做為後固定，而以環氧樹脂混合物包埋，經過 60°C、20 in. Hg 之 Oven 中 48 小時以上之聚合作用，再以超薄切片機先切 700 nm 之厚切片，以 1% 甲苯藍在 60°C 下染 2 分鐘，然後在光學顯微鏡下選定薄切部位，然後再切成 80 nm 之超薄切片，置於銅網片上，行醋酸鈉及檸檬酸鉛之雙重染色法後，在電子顯微鏡 (H-600) 下觀察及照相。

結 果

接種 Pr 病毒 1 天後之小豬，其腦脊髓各部位之超薄切片，在電子顯微鏡下觀察，除神經細胞有輕度之粒線體腫脹外，並無其他細胞病變，亦不見細胞內含病毒粒子。

接種 Pr 病毒 2 天後，則可在嗅球、胼胝體、四疊體、延腦及腦橋之超薄切片見有許多無外膜病毒粒子 (Unenveloped virus particles) (圖 1 至 3)。病毒粒子主要出現於神經細胞軸突末端的軸漿 (axoplasm) 及空泡內，外層為卵圓形或六角形的蛋白衣外殼 (capsid)，中心為卵圓形或圓形的密電子核心，二者之間為一空環 (hallow)；有些病毒粒子只有外層之蛋白衣，成為空心之病毒粒子 (empty particles)；有些病毒粒子的蛋白衣部份或完全消失，僅餘密電子核心部份。無外膜病毒粒子的直徑在 90 至 110 nm 之間，核心的直徑則在 70 至 80 nm 之間，蛋白衣外殼的厚度約為 5 nm。少數有外膜病毒粒子則蛋白衣層另有一外膜構造，此種完整的病毒粒子直徑約為 150 nm。有些神經細胞的胞質內可見束狀之纖維樣物，可能為神經微絲 (neurofilaments) 的多聚合現象 (圖 3)。另外尚可見一些退行性變化之細胞 (圖 4)，可能是浸潤的淋巴球。這些細胞的胞器顯著減少，粗面內質網腫脹，並含數個大小不一的空泡。有些神經膠細胞的核膜及其膜孔有顯著的擴張 (圖 5)。在頸椎可見軸突發生退行性變化。軸突周圍的髓鞘塌陷 (collapse) 及崩解 (disruption)，髓鞘板層 (myelin lamella) 扭曲成不規則狀，其間的空腔擴張形成所謂的消化空腔 (digestion chambers)，並有脫髓鞘作用 (demyelination) (圖 6)。

接種 Pr 病毒 3 至 5 天後，在腦各部位有明顯的神經膠細胞增殖 (圖 7) 及血管外圍之淋巴球浸潤；神經細胞的病變更廣泛，在胞質或軸突內常見有粒線體的腫脹及包括初級及次級的溶酶體 (lysosomes) 及一些大小不一的空泡 (圖 8)，且極易在軸漿內見到無外膜病毒粒子或偶在核內見到無外膜病毒粒子存在 (圖 9)。

接種 Pr 病毒 6 至 7 天後，腦脊髓呈極重度的細胞病變，神經膠細胞的胞質內尚可見明顯的神經小管 (neurotubules) 成束狀排列 (圖 10)，血管周圍的淋巴球浸潤 (圖 11)，以及處處可見核濃縮、破碎或消失而僅餘殘碎的染色質塊，及含各種吞噬小泡 (phagocytic vesicles) 的壞死細胞，這些壞死細胞均被增殖的小神經膠細胞或侵入的巨噬細胞 (macrophages) 所包圍 (圖 12) 或吞噬 (圖 13)。

接種 Pr 病毒 14 及 49 天後，腦脊髓絕大部份均與對照之小豬腦脊髓一樣無細胞病變，或僅呈輕度的細胞病變，亦不復見到病毒粒子的存在。

所有腦脊髓之超薄切片中，均未能找到核內包涵體構造及血管內皮細胞的病變。

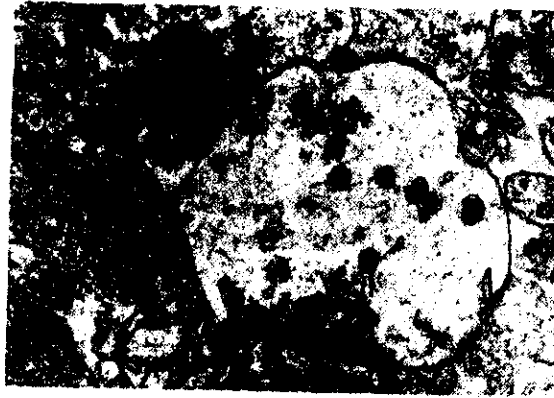


圖 1 接種 PrV-TNL 株病毒 2 天後，在腦橋神經軸突的軸漿 (axoplasm) 內可見多個卵圓形 (↑) 或六角形 (↗) 的無外膜病毒粒子 (unenveloped virus particles)，直徑在 90 至 110 nm 之間，病毒粒子中心為卵圓形的密電子核心，外圍是蛋白衣 (capsid)，核心與蛋白衣之間有一中空環 (hallow)，有些病毒粒子的蛋白衣部份消失。U & L stain，× 37,500。



圖 2 接種 PrV-TNL 株病毒 2 天後，在腦橋另一神經軸突的軸漿內所見的無外膜病毒粒子，其核心之核酸物質電子密度不一。U & L stain，× 90,000。

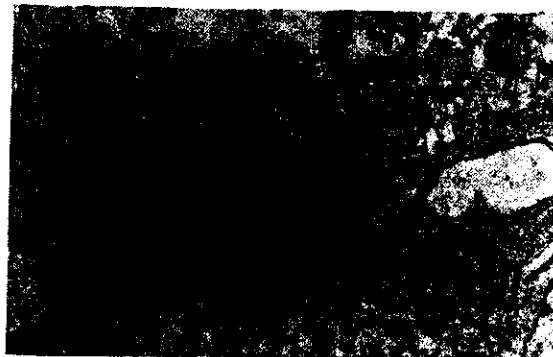


圖 3 接種 PrV-TNL 株病毒 2 天後，在嗅球神經軸突的軸漿內可見無外膜病毒粒子 (↑)，左上角成束狀之纖維樣物 (↗) 可能為神經微絲 (neurofilaments) 的多聚合現象 (polymerization) 所致。U & L stain，× 30,000。



圖4 接種 PrV-TNL 株病毒 2 天後，在嗅球見到退行性變化之細胞，依其所含少量之胞器推測可能為浸潤之淋巴球；粗面內質網有顯著的腫脹現象，並有數個大小不一的空泡。U&L stain, $\times 90,000$ 。

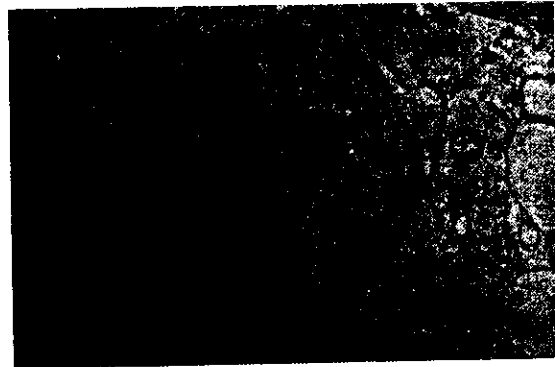


圖5 接種 PrV-TNL 株病毒 2 天後，在嗅球所見神經膠細胞核膜的擴張 (\uparrow) 及其膜孔的擴張 (\leftarrow)，胞質內有數個大小不一的空泡。U & L stain, $\times 12,000$ 。



圖6 接種 PrV-TNL 株病毒 3 天後，在頸椎的神經軸突發生變性，周圍的髓鞘塌陷 (collapse) 及崩解 (disruption)，髓鞘板層 (myelin lamella) 扭曲成不規則狀，其間的空腔擴張成所謂的消化空腔 (digestion chambers) (\uparrow)，並有脫髓鞘作用 (demyelination) U & L stain, $\times 15,000$ 。

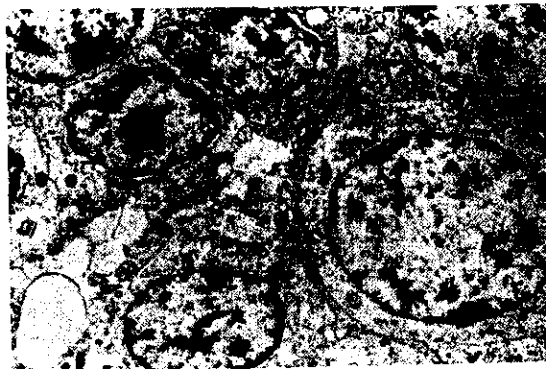


圖7 接種 PrV-TNL 株病毒 3 天後，在小腦所見神經膠細胞 (Glia cells) 的增殖。U & L stain, $\times 6,000$ 。

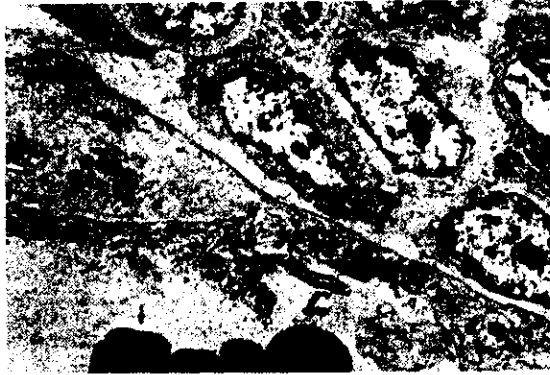


圖 8 接種 PrV-TNL 株病毒 3 天後，在胼胝體所見無髓鞘軸突內粒線體的腫脹 (↑) 和初級溶酶體 (primary lysosomes) (↑↑)，次級溶酶體 (secondary lysosomes) (→) 及一些空泡的存在。U & L stain, × 30,000。

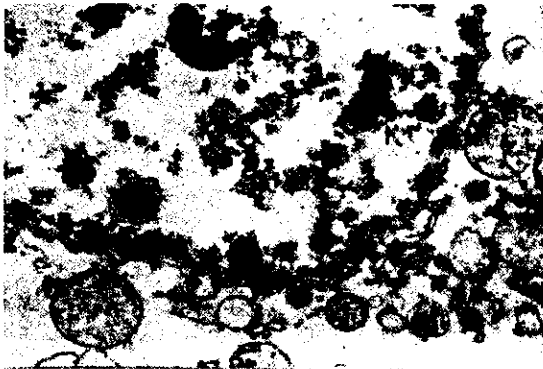


圖 9 接種 PrV-TNL 株病毒 4 天後，在腦橋神經細胞核內可見少數無外膜短毒粒子 (↑) 存在。U & L stain, × 15,000。



圖 10 接種 PrV-TNL 株病毒 6 天後，在嗅球所見神經膠細胞胞質內明顯的神經小管 (neurotubules) 束狀排列 (↑)。U & L stain, × 12,000。

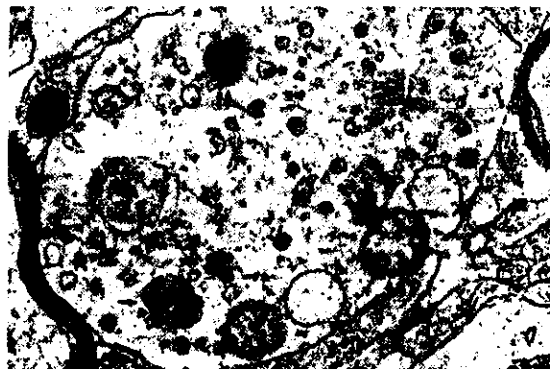


圖 11 接種 PrV-TNL 株病毒 6 天後，在嗅球所見血管周圍的淋巴球浸潤情形，下方箭頭所指為紅血球 (↓)。U & L stain, × 3,750。



圖 12 接種 PrV-TNL 株病毒 6 天後，在嗅球所見神經細胞的壞死情形。中央的壞死細胞（↑），可見核破碎及胞器構造的消失；右下角的壞死細胞（→），胞核與胞質的界限已不甚清楚。壞死細胞被多量的小神經膠細胞所包圍。U&L stain，× 6,000。

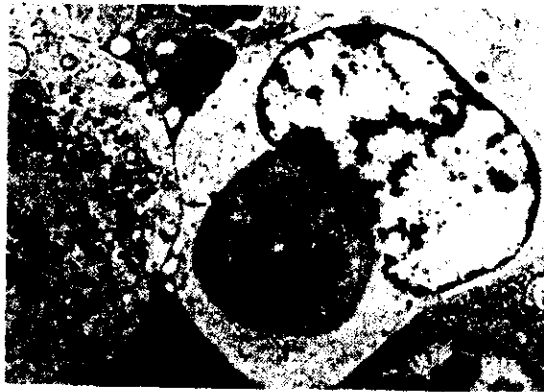


圖 13 接種 PrV-TNL 株病毒 6 天後，在嗅球所見神經細胞的壞死情形。中央為一壞死細胞（↑）被小神經膠細胞所吞噬；左邊為另一壞死細胞（←），核已消失，僅存一些殘餘小體（residual bodies）及吞噬小泡（phagocytic vesicles），胞器構造已不復存在。U&L stain，× 7,500。

討 論

由試驗結果顯示，小豬鼻腔接種 $10^{6.6}$ TCID₅₀ 病毒量之 PrV-TNL 株病毒後，其腦脊髓超薄切片在電子顯微鏡下所見的細胞病變，包括神經細胞核內染色質的凝聚團塊及著邊現象、質內粒線體的腫脹、脫髓鞘作用及神經細胞的壞死等，與前昔學者^(7, 11, 12)所報告者大致雷同，但本試驗中尚發現有些神經細胞核膜及其小孔的擴張，以及胞質內神經小管及神經微絲的多聚合現象等。

另外，本試驗亦觀察到壞死的神經細胞被小神經膠細胞或單核吞噬細胞所包圍及吞噬的情形，同時看到壞死細胞內核的濃縮、破碎或消失，以及各型的吞噬小泡、溶酶體的出現情形。Percy 等在犬感染 Canine herpesvirus 的電子顯微鏡觀察中，亦發現腦有單核細胞或類似單核球的吞噬細胞進行吞噬神經細胞碎片及髓鞘的情形。⁽¹⁴⁾ 而 Narita 等在存有病毒粒子的神經細胞核內染色質中發現有細條狀纏繞的物質及一些密電子物質構成的管狀構造，⁽¹²⁾ 但於本試驗中均未發現有類似的構造。

Stewart 等應用免疫螢光染色法檢查豬假性狂犬病患豬的腦，結果發現在大腦皮質部的神經

細胞質中最容易發現到病毒粒子，⁽¹⁶⁾ McCracker and Dow以組織培養的細胞感染Pr病毒後，發現病毒係以無外膜的病毒粒子存在，因而認為該無外膜病毒粒子係由局部破壞的核膜逸出，以致於未能覆上核膜所致。^(1,2,3) 但Itakura等在Pr的野外病例發現無外膜病毒粒子存在於神經細胞及星狀細胞的核內，偶亦見於質內，而另有一些有外膜病毒粒子見於質內。⁽⁹⁾ Narita等在感染Pr病毒的小豬太陽神經節(Solar ganglia)神經細胞核內近核膜處見有多數的無外膜病毒粒子，而在胞質內、細胞間隙及軸突內見有外膜病毒粒子。⁽¹²⁾ 在本研究中，雖偶亦在神經細胞核內發現無外膜病毒粒子，但最常見無外膜病毒粒子存在於神經細胞軸突的軸漿內，此可能是神經細胞極易受到Pr病毒的攻擊，所以在病毒侵入神經細胞後，很快即使其破壞崩解並釋出病毒，而不易像某些感染細胞培養的病毒，能夠在核膜上以芽生(budding)的方式被上一層外膜成有外膜病毒粒子。

本研究中所有之無外膜病毒粒子直徑為90至110 nm，有外膜病毒粒子的直徑為150 nm左右。Kaplan and Vatter以超薄切片在電子顯微鏡下觀察Pr之有外膜病毒粒子直徑為186 nm，而以負染色法測出其蛋白衣直徑為110 nm。⁽⁹⁾ Hashimoto等以電子顯微鏡觀察自然感染痘疹病毒的大肝細胞，在其核內見到直徑80至90 nm的無外膜病毒粒子，胞質空胞內見到直徑150 nm的有外膜病毒粒子，而以培養細胞感染本病毒時所見之蛋白衣直徑為110 nm。⁽⁶⁾ 另外Hauser等在研究蟒蛇感染類似痘疹病毒的肝細胞內所見無外膜病毒粒子直徑為80至90 nm，有外膜病毒粒子直徑為115至125 nm，少數達200 nm。⁽⁶⁾ 由以上各學者之觀察結果，均與本研究所見之病毒粒子大小相當一致。

Backer在電子顯微鏡下觀察Pr人工感染豬之血管內皮細胞，發現有細胞質及內質網之腫脹，以及各種程度的退行性變化；⁽⁴⁾ Narita等則在經口感染之仔豬頸下淋巴結及扁桃腺見有壞死性血管炎及血管內皮細胞核內包涵體，以及其所含之無外膜病毒粒子，但在腦脊髓亦不見有該等病變及血管內皮細胞內之病毒粒子；⁽¹³⁾ 其他學者亦未見有腦脊髓之血管炎病變。本研究結果，亦同樣未能在腦脊髓中發現有血管內皮細胞的任何病變，顯示該病毒在侵入中樞神經系統後，即完全經由神經細胞來傳播；與在其他臟器如肺、淋巴結或扁桃腺可以進入血管內皮細胞增殖而傳播的途徑似有不同。

又由本研究結果顯示，Pr病毒在鼻腔接種小豬2天後，即可出現於嗅球、腦橋、延腦、四疊體及胼胝體；在接種3天後，病毒在視丘、小腦及頸椎亦相繼出現；至4天後，病毒已到達大腦皮質部，亦即感染4天後，病毒即遍及全腦；至感染6至7天後，病毒相繼抵達胸椎及腰椎，亦即此時病毒遍佈中樞神經系統，組織或細胞病變均在病毒抵達之部位當天或翌日即產生，巨噬細胞及淋巴球的浸潤及吞噬作用在感染5天後，即相當顯著。而感染14至49天後，其中樞神經系統已不見有病毒粒子之存在，細胞病變極輕微，顯示感染小豬在中樞神經系統之病變及病毒存在之時間，概在2週以內，經該病毒是否在引起中樞神經系統相當程度之破壞後，即隱逸於其他臟器，則有待進一步的探討。

誌 謝

本研究承蒙行政院國家科學委員會提供經費，始克完成。電子顯微鏡標本之製作承呂蓮葉小姐之熱心協助，在此一併致誠摯之謝意。

參 考 文 獻

1. Baskerville, A. 1972. Ultrastructural changes in the pulmonary airways of pigs infected with a strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 13: 127-132.
2. Baskerville, A. 1973. Ultrastructural changes in the lungs of pigs infected with Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 14: 229-233.

3. Baskerville, A. 1973. The histopathology of experimental pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 14 : 223-228.
4. Becker, C. H. and A. Gatzke. 1973. Ultrastructure of endothelial cells and small vessels of rabbits and pigs after infection with herpesvirus suis. *Vet. Bull.* 1537.
5. Hashimoto, A., K. Hirai, A. Miyoshi, S. Shimakura, K. Yagami, N. Kato, K. Kunihiro, A. Fujiura, K. Kitazawa, K. Okada and Y. Fujimoto. 1978. Naturally occurring canine herpesvirus infection in Japan. *Jap. J. Vet. Sci.* 40 : 157-169.
6. Hauser, B., F. Mettler and A. Rubel. 1983. Herpesvirus-like infection in two young boas. *J. Comp. Path.* 93. 515-519.
7. Ionova, O. P., V. A. Shoshokin, R. Kh. Yusupov and E. A. Sapaev. 1979. Distribution of Aujeszky's virus the tissues of experimentally infected swine. *Vet. Bull.* 3150.
8. Itakura, C., J. Nakatsuka and M. Goto. 1981. An incidence of pseudorabies (Aujeszky's disease) in piglets in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 43 : 923-927.
9. Kaplan, A. S. and A. E. Vatter. 1959. A comparison of herpes simplex and pseudorabies viruses. *Virology.* 7 : 23-42.
10. Lin, S. C., M. C. Tung, C. I. Liu, C. F. Chang, W. C. Huang and C. M. Chang. 1972. An outbreak of pseudorabies in swine in Pingtung. *Chinese J. of Microbiol.* 5 : 56-68.
11. McCracken, R. M. and C. Dow. 1973. An electron microscopic study of Aujeszky's disease. *Vet. Bull.* 4897.
12. Narita, M., M. Osada and A. Fukusho. 1983. An electron microscopic study of solar ganglia in piglets infected with Aujeszky's disease viruses. *Natl. Inst. Anim. Heal. Quat.* 23 : 61-66.
13. Narita, M., M. Haritani and M. Moriwaki. 1984. Necrotizing vasculitis in piglets infected orally with the virus of Aujeszky's disease. *Jap. J. Vet. Sci.* 46(1) : 119-122.
14. Percy, D. H., J. F. Munnell, H. J. Olander and L. E. Carmichael. 1970. Pathogenesis of canine herpesvirus encephalitis. *Am. J. Vet. Res.* 31 : 145-156.
15. Pirtle, E. C. and D. E. Gutekunst. 1978. Virus isolation and immune responses in susceptible swine exposed with pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 39 : 1367-1368.
16. Shell, L. G., R. W. Ely and R. A. Crandell. 1981. Pseudorabies in a dog. *J.A.V. M.A.* 178 : 1159-1161.
17. Tung, M.C., S. C. Lin, S. S. Tsai, H. S. Kwang and G. N. Chang. 1980. Outbreaks of abortions and stillbirths of pregnant sows with pseudorabies virus infection. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 6 : 123-132.
18. Yang, S. Y., C. H. Wang and Y. S. Wu. 1981. Pathologic changes of piglets inoculated with various titers of pseudorabies virus intravenously. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 7 : 115-119.

**ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE CENTRAL
NERVOUS SYSTEM OF PIGS AFTER INFECTION
WITH PSEUDORABIES VIRUS**

S. Y. Yang¹, N. J. Li¹, M. H. Jong¹, S. S. Lai¹, Y. H. Yang¹,
T. H. Fuh² and Redman M. Chu³

The ultrastructural changes in the central nervous system of pigs were studied after intranasal infection with $10^{8.6}$ TCID₅₀ TNL strain of pseudorabies virus. Only mild swelling of mitochondria was found at 1 day postinoculation (DPI). Many unenveloped virus particles with oval or icosahedral capsids were found in the axoplasm from 2 to 7 DPI. The diameters of unenveloped virus particles and core were 90-110 and 70-80 nm, respectively. The cytopathologic changes found in affected neurons were described as decrease or disappearance of endoplasmic reticulum, formation of various sized vacuoles and polymerization of neurofilaments in the cytoplasm, and dilatation of nuclear envelope and its pores. Degeneration of axon and demyelination were also found at the same time. From 3 to 5 DPI, proliferation of microglia, phagocytosis by the macrophages, lymphocytic perivascular cuffing and other cytopathologic changes of neurons were more prominent. These lesions became most severe at 6 and 7 DPI, but could not be found after 14 DPI. No vasculitis was seen in the central nervous system. It was strongly suggested that the spread of pseudorabies virus in the central nervous system might not through hematogenous route.

Received for publication: Sept. 25, 1984.

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Tamsui, Taiwan, R.O.C.
2. Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, National Taiwan University.
3. Pig Research Institute of Taiwan, Miaoli, Taiwan, R.O.C.

