

豚サーコウイルス関連疾病の豚にみられた多核巨細胞を伴う非化膿性髄膜脳炎の3例

村山丹穂^{1)†} 楠原 徹¹⁾ 井野壽磨¹⁾ 谷村信彦²⁾
 播谷 亮²⁾ 山田 学²⁾

1) 茨城県県北家畜保健衛生所 (〒310-0002 水戸市中河内町966-1)

2) 独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2013年9月2日受付・2014年2月7日受理)

要 約

2010年6月, 2011年3月実施の発育不良豚の病性鑑定で豚サーコウイルス関連疾病(PCVAD)と診断した症例に, 多核巨細胞を伴う非化膿性髄膜脳炎を3例認めた. 全例で神経症状はなく, 脳, 肺, 扁桃及び血清から豚サーコウイルス2型(PCV2)の特異遺伝子を検出した. 病理組織学的には大脳及び脳幹部にマクロファージ浸潤と多核巨細胞形成を伴う非化膿性髄膜脳炎を認めた. 脳における多核巨細胞の細胞質には透過型電子顕微鏡下でライソゾームを認め, マクロファージ由来と考えられた. *In situ* hybridization 及び免疫組織化学的染色では中枢神経にPCV2遺伝子及び抗原を認めなかった. 多核巨細胞を伴う肉芽腫性炎は脳以外にリンパ組織でも認められ, 今回の脳炎はPCVADの肉芽腫性病変に関連し形成された全身的病変の一つと推察された.

——キーワード: 多核巨細胞, 非化膿性髄膜脳炎, 豚サーコウイルス2型.

----- 日獣会誌 67, 413~418 (2014)

豚サーコウイルス関連疾病 (Porcine Circovirus Associated Disease: PCVAD) は豚サーコウイルス2型 (PCV2) 感染による疾病の総称であり, その病態はPCV2感染と, 他の感染性もしくは非感染性の因子により起こされるとされるが, それらの因子や発病機序には不明な点が多い [1]. PCVADの診断は病理組織学的検査で確定され, その病変はリンパ組織に主座し, 扁桃や脾臓を含む全身のリンパ組織にリンパ球減数ないし枯渇化がみられ, しばしば細網細胞に好塩基性細胞質内封入体及び多核巨細胞の形成が認められる. 病変はまれに肝臓, 肺, 気管支の粘液腺あるいは十二指腸腺等のさまざまな組織に形成される [2]. 近年, 豚の中枢神経組織病変へのPCV2の関与も報告されているが, その症例数は少なく, また, その病変形成機序はほとんど明らかにされていない [3]. PCVADの病変がみられた症例で多核巨細胞形成を特徴とした豚の非化膿性脳炎の発生はカナダで1例報告されているが [4], 脳病変でみられる特徴

的な多核巨細胞の由来や診断的意義は明らかにされていない.

今回, PCVADと診断された3例の発育不良豚において, 多核巨細胞を伴う非化膿性髄膜脳炎が3例全例に認められたので, その発生の概要と病理組織学的特徴について報告する.

材料及び方法

発生農場の概要: 母豚約150頭を飼養する一貫経営農場において, 100~120日齢の豚に発育不良と下痢が散見されたため, 2010年6月1日に生体2例, 死体1例について病性鑑定を実施した. 症例1はこの生体の1例である. また, 母豚約500頭を飼養する試験研究機関において, 8週齢の同腹豚に発育不良が散見され死亡豚1例に黄疸を認められたため, 同腹の生体2例について2010年6月11日に病性鑑定を実施した. 症例2はこの生体の1例である. さらに, 母豚約150頭を飼養する一貫経営

† 連絡責任者(現所属): 村山丹穂 (茨城県県南家畜保健衛生所)

〒300-0051 土浦市真鍋5-17-26

☎029-822-8518 FAX 029-822-7375

E-mail: n.murayama@pref.ibaraki.lg.jp

農場において、30～40日齢の豚が発育不良を呈し死亡したため、2011年3月29日に生体3例について病性鑑定を実施した。症例3はこの生体の1例である。いずれの農場においても平時の離乳後の事故率は5%以下であった。症例1及び3では3週齢でPCV2ワクチンを接種していた。

材料：中枢神経系に多核巨細胞が認められた3症例を材料とした。

病理学的検査：剖検時に臓器を採材後、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。また、リンパ節及び大脳についてはチールネルゼン染色を実施した。免疫組織化学的検索として、抗PCV2家兎血清及び抗PRRSV家兎血清 (動物衛生研究所、茨城) を用いた免疫染色を実施した。また、多核巨細胞の由来を検索するために、抗リゾチーム兎抗体 (ダコ・ジャパン株、東京)、抗牛GFAP兎抗体 (BTI, U.S.A.)、抗ヒト Myeloid/Histiocyte Antigen Mac387モノクローナル抗体 (Clone:MAC387(1), ダコ・ジャパン株、東京)、抗ビメンチンモノクローナル抗体 (Clone:VIM3B4, PROGEN, Germany) を用いた染色を実施した。いずれの免疫組織化学的染色においてもストレプトアビジン-ビオチンシステムキット (ヒストファインSAB-POキット、ニチレイ株、東京) を使用した。

大脳についてはSeeligerら [3] によるビオチン標識プローブ及びGenPoint, Catalyzed Signal Amplification System (ダコ・ジャパン株、東京) を用いた *in situ* hybridization (ISH) を行い、PCV2遺伝子の検出を試みた。

症例1の大脳については、多核巨細胞の超微形態学的特徴の確認のため、透過型電子顕微鏡による検索を実施した。検体はパラフィンブロックを材料とし、HE染色標本で確認した病変部位を切出した後、キシレンに浸漬しパラフィンを溶出した。その後常法に従いオスミウム酸固定、エポキシ樹脂包埋及び超薄切により切片を作製し、酢酸ウラニル・鉛二重染色を施した。

細菌学的検査：主要臓器及び腸内容物について5%めん羊血液加寒天培地、DHL寒天培地を用いて37℃48時間好気培養及び嫌気培養を実施した。

ウイルス学的検査：主要臓器の10%乳剤を用いて、CPK細胞を使用したウイルス分離を実施した。PCRによる特異遺伝子の検出は、血清、脳、扁桃及び肺の各臓器を材料とし、ホモジネート検体からDNA抽出キット及びウイルスRNA検出キット (QIAamp DNA Mini Kit及びQIAamp Viral RNA Mini Kit, キアゲン株、東京) によりDNA及びRNAを抽出した。

PCV2については血清、扁桃及び肺についてKawashimaら [5] の方法によるPCRを行った。また、

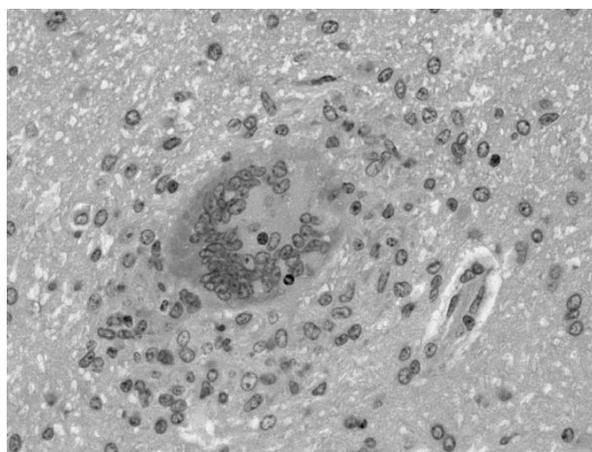


図1 大脳における病理組織像 (HE 染色)
大脳実質に多核巨細胞浸潤を伴うグリア結節形成がみられる (症例1)

PCV2の遺伝子型を明らかにするため、血清、脳、扁桃及び肺について鈴木ら (鈴木孝子、川島健司、勝田 賢、高萩陽一、村上 博、吉井雅晃、宮崎綾子、沖永龍之、恒光 裕：農場における子豚の事故率と分離される豚サーコウイルス2型の遺伝子型との比較、第144回日本獣医学会学術集会講演要旨集、83 (2007)) の方法によるPCRを実施した。PRRSVについては肺及び血清についてKonoら [6] の方法によるRT-PCRを実施した。

成 績

症例：3例はいずれも病性鑑定に供された発育不良豚で、神経症状は認められなかった。

症例1では体表及び臓器付属リンパ節が著明に腫大していた。症例2では胃食道部に小豆大潰瘍がみられ、腸間膜リンパ節が腫大していた。症例1及び2で結腸内容は泥状を呈した。症例3では肺の退縮不良と左右前葉から後葉にかけての肝変化が認められ、右肺後葉は横隔膜と線維性癒着を示した。心嚢内には黄色透明の心嚢水が高度に貯留して心嚢水腫を呈し、胸膜、心膜及び心外膜の表面は絨毛状を呈していた。腹腔内には中等量の線維素塊がみられた。

病理組織学的所見：3例とも、大脳皮質及び髄質に広範囲にわたって多核巨細胞が散見され、周囲にグリア細胞の増数も確認された (図1)。一部の多核巨細胞では複数の核が細胞質辺縁に配列する特徴的なラングハンス型多核巨細胞であった。多核巨細胞の多くは実質血管周囲に認められたが、血管から離れた実質にも確認され、同病変の近傍では中等度のリンパ球及びマクロファージの浸潤による囲管性細胞浸潤がみられた。軟膜の血管周囲にも同様の細胞浸潤がみられ、まれに脳実質で認められたと同様な多核巨細胞の形成を伴っていた (図2)。中脳白質にも同様の多核巨細胞を伴うグリア結節形成が散見

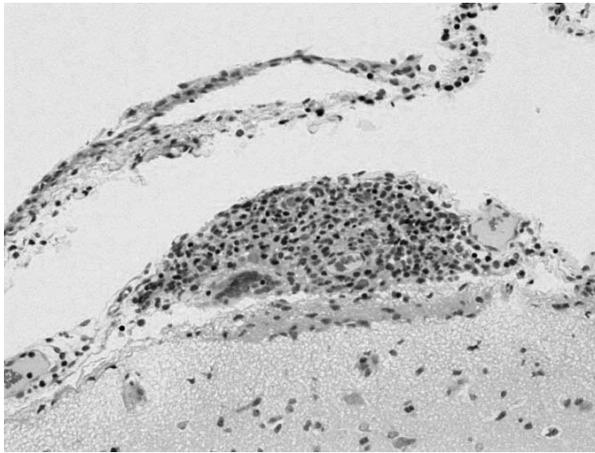


図2 大脳における病理組織像 (HE 染色)
軟膜の血管周囲に単核細胞浸潤がみられ、一部で多核巨細胞形成を伴っている (症例1)

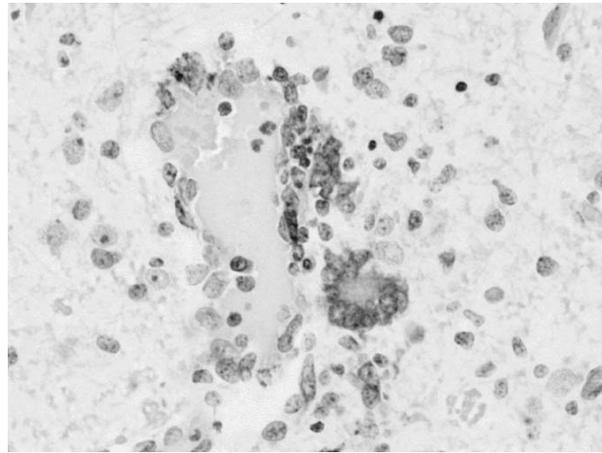


図3 中脳における抗リゾチーム抗体による免疫組織化学染色像 (症例1)
血管周囲に浸潤する単核細胞及び多核巨細胞に陽性反応がみられる

表1 多核巨細胞形成を伴うマクロファージ浸潤病変の分布

症例	大脳	脳幹部	小脳	脊髄	リンパ節*	肝臓	肺
1	+	+	-	-	+	-	-
2	+	+	-	-	+	+	-
3	+	-	-	-	+	-	-

* 肝門リンパ節, 腎門リンパ節, 肺門リンパ節, 空腸腸間膜リンパ節, 回盲リンパ節, 耳下腺リンパ節, 下顎リンパ節及び扁桃を含む

され、小脳、橋及び門部では大脳と同様の囲管性細胞浸潤がみられた。症例3の脳病変は症例1, 2に比べ病変はやや軽度であった。また、脊髄の白質では軽度なマクロファージ浸潤巣が全症例にみられた。リンパ組織では全症例にリンパ球減少がみられた。症例1及び2ではリンパ球が消失したリンパ節において、高度の多核巨細胞形成を伴ったマクロファージの増殖病変が認められた。症例3のリンパ組織においても中等度から高度のリンパ球減少と、軽度ないし中等度のマクロファージの増殖病変及び軽度の多核巨細胞形成がみられた。また、症例1では腸間膜リンパ節及び下顎リンパ節の細網細胞にPCV2に特徴的な好塩基性細胞質内封入体がみられた。症例1の肝臓では類洞内及びグリソン鞘周囲にマクロファージの浸潤が散見された。症例2の肝臓ではマクロファージの巣状浸潤が散見され、まれに多核巨細胞の出現を伴っていた (表1)。その他の臓器の所見として、症例1では空腸中部から回腸の固有層にマクロファージ浸潤を伴う絨毛の短縮・融合が認められた。症例2では肺の細気管支周囲にマクロファージ浸潤が散見され、腎臓における軽度の間質性腎炎及び胃食道部の軽度な潰瘍がみられた。症例3では間質性肺炎、慢性線維索性心外膜炎、

表2 大脳にみられた多核巨細胞に対する免疫組織化学的染色結果

一次抗体	対象細胞	染色態度
抗リゾチーム	マクロファージ	多核巨細胞に陽性反応
抗 MAC 387	単球・組織球 (多核巨細胞は陰性)	ほとんどの多核巨細胞が陰性 一部の多核巨細胞に弱陽性反応
抗ビメンチン	血管内皮・結合組織細胞・マクロファージなど	多核巨細胞に陽性反応
抗 GFAP	アストロサイト	すべての多核巨細胞が陰性

胸膜炎及び腹膜炎がみられた。

免疫組織化学的には、いずれの症例でも中枢神経にPCV2抗原はみられなかった。症例1については染色を実施した回盲部リンパ節で、症例2では肝臓、脾臓、肺リンパ節、空腸及び回腸に浸潤するマクロファージ及び多核巨細胞の細胞質にPCV2抗原がみられた。症例3では空腸腸間膜リンパ節、回盲部リンパ節、下顎リンパ節、耳下リンパ節、肺リンパ節及び鼠径リンパ節の髓洞に浸潤するマクロファージに軽度ないし中等度のPCV2抗原がみられた。また、症例1及び3についてはいずれの症例でも中枢神経組織にPRRSV抗原はみられなかった。抗リゾチーム抗体 (図3)、抗ビメンチンモノクローナル抗体による染色では、多核巨細胞に陽性反応がみられた。抗ヒト Myeloid/Histiocyte Antigen Mac387モノクローナル抗体による染色では一部の多核巨細胞で弱陽性反応がみられ、抗牛 GFAP 抗体による染色で

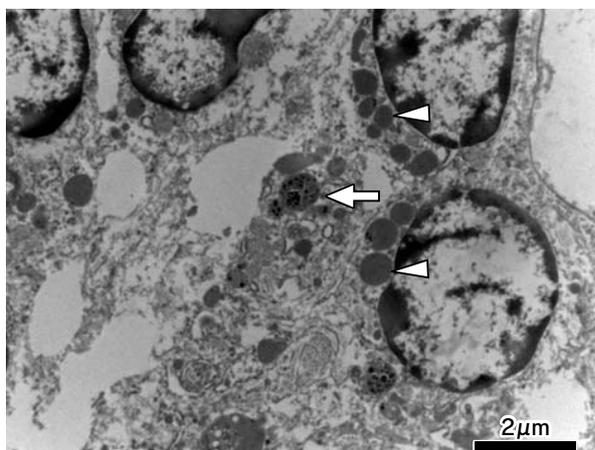


図4 大脳血管周囲の透過型電子顕微鏡像
血管周囲に浸潤する細胞は矢頭で示す一次ライソゾーム、矢印で示す二次ライソゾームを細胞質に有するマクロファージから構成されている (症例1)

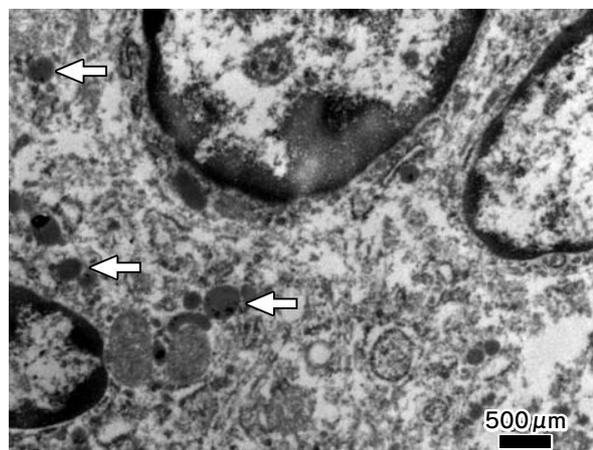


図5 大脳血管周囲の多核巨細胞の拡大
2つの核の間に細胞膜の構造はなく、矢印で示すライソゾームを細胞質内に認める

は、すべての多核巨細胞で陰性であった (表2)。また、大脳について実施したISHでは、PCV2の陽性シグナルは認められなかった。リンパ節及び大脳について実施したチールネルゼン染色はいずれも陰性であった。

透過型電子顕微鏡による検索では、大脳実質血管周囲にみられた単核細胞及び多核巨細胞は細胞質内に豊富なライソゾームを有したことから、マクロファージ由来であることが示唆された (図4, 5)。血管から脳実質内へと浸潤している細胞はマクロファージ及び形質細胞であった。また、血管内や脳実質に多くのマクロファージがみられた。実質には壊死細胞がみられ、その近傍にマクロファージが認められた。壊死細胞に病原微生物は確認できなかった。

細菌学的検査: 全症例で病原性を示す特異的な菌は分離されなかった。

ウイルス学的検査: 全症例でウイルスは分離されなかった。PCR検索で全症例のすべての材料からPCV2及びPCV2group1の特異遺伝子を検出した。PRRSVについては症例1の肺及び症例3のすべての材料から北米型の特異遺伝子を検出した。

考 察

豚の非化膿性脳炎は豚の健康を脅かす重要疾病の一つで、主要原因としてウイルス感染があげられる。近年、豚の原因不明の非化膿性脳炎事例が増え病性鑑定上の問題となっている。この脳炎へのPCV2の関与が疑われているが、実態は明らかではない [7]。今回、PCVADの3例で多核巨細胞形成を特徴とする非化膿性脳炎がみられた。多核巨細胞形成を伴う非化膿性脳炎は、家畜では馬伝染性貧血の脳炎での報告がある [8]。人ではHIV-1による脳炎が知られ、脳の萎縮、単核細胞の血管周囲及

び脳実質への浸潤、血管周囲の多核巨細胞形成が認められている。多核巨細胞はHIV感染マクロファージの融合により生じることが知られる [9]。豚では、PCVADの病変がみられた症例で多核巨細胞形成を特徴とした豚の非化膿性脳炎の発生はカナダで1例報告されているが [4]、脳病変でみられる特徴的な多核巨細胞の由来や診断的意義は明らかにされていない。今回大脳にみられた多核巨細胞は、抗リゾチーム抗体による染色で陽性を示し、透過型電子顕微鏡による検索では多核巨細胞内に豊富なライソゾームが認められたことから、マクロファージ由来であると考えられた。今回の多核巨細胞は人のHIV感染で形成される多核巨細胞と同様に、PCV2感染マクロファージの融合によって形成されたと考えたが、多核巨細胞へのPCV2感染とその後の細胞融合の明確な証拠を得ることはできなかった。

今回検索した3例ではすべてにPCV2によると考えられる多核巨細胞の出現を伴う肉芽腫性リンパ節炎や肉芽腫性肝炎が認められ、リンパ節の肉芽腫性病変と脳病変における多核巨細胞やマクロファージの出現頻度に相関がみられた。前述したカナダにおける豚の脳に多核巨細胞形成を伴う非化膿性脳炎の発生事例では、起立困難等の神経症状を呈し、病理組織学的に多核巨細胞形成を伴う重度の非化膿性脳炎・脊髄炎がみられ、本症例と同様に肉芽腫性リンパ節炎や肝炎が認められている [4]。この報告と今回検索した3例の検査結果から、諸臓器で多数の多核巨細胞が形成されるPCVADの病態と関連して、中枢神経組織にも多核巨細胞形成を特徴とした病変が引き起こされたと考えられた。

PCVADの中脳神経病変として、小脳血管壊死及び周囲炎を伴う出血性・梗塞性病変形成が近年報告され [3]、茨城県を含めた国内でも発生がみられている。この病態

ではPCV2抗原が血管内皮細胞や周囲の浸潤細胞にみられるが、今回検索した3例では中枢神経系においてPCV2抗原はみられず、PCV2のISHも陰性であった。電子顕微鏡による検索では病変部に壊死細胞を認めたが、ウイルス粒子などの病原体は確認できなかった。

なお、症例1及び3の農場では、同時に病性鑑定を実施した他の2頭にもリンパ球減少及び好塩基性封入体を伴う肉芽腫性リンパ節炎がみられ、PCVADの病態を示していた。このことから、症例3の農場にはワクチンの接種時期を早めるよう指導したところ、指導後に離乳後の事故は減少した。

今回の検索で脳の多核巨細胞はマクロファージ由来であることが明らかとなり、PCVADの肉芽腫性病変に関連して形成されたことが示唆された。しかし、PCV2の直接的な関与については明らかにすることはできなかった。従来の肉芽腫性リンパ節炎を伴うPCVAD発症豚では中枢神経系に多核巨細胞はみられていない。PCVADはPCV2感染と他の感染性、もしくは非感染性の因子により起こるとされるがその因子はいまだ不明であり、本3例の多核巨細胞を伴う脳病変は、いまだ特定されていない因子により引き起こされた可能性も否定できない。豚の非化膿性脳炎やPCVADについては未解明の部分が多く、さらに症例検討を重ねる必要があると思われる。

引用文献

- [1] Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ : Diseases of swine, 9th ed, 299-304, Wiley-Blackwell Publishers, Ames, IA (2006)
- [2] 久保正法, 日本獣医病理学会編: 動物病理カラーアトラス, 117, 文永堂出版, 東京 (2007)
- [3] Seeliger FA, Brüggemann ML, Krüger L, Greiser-Wilke I, Verspohl J, Segalés J, Baumgärtner W : Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs, *Vet Pathol*, 44, 621-634 (2007)
- [4] Drolet R, Cardinal F, Houde A, Gagnon CA : Unusual central nervous system lesions in slaughter-weight pigs with porcine circovirus type 2 systemic infection, *Can Vet J*, 52, 394-397 (2011)
- [5] Kawashima K, Tsunemitsu H, Horino R, Katsuda K, Onodera T, Shoji T, Kubo M, Haritani M, Murakami Y : Effects of dexamethasone on the pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection in piglets, *J Comp Pathol*, 129, 294-302 (2003)
- [6] Kono Y, Kanno T, Shimizu M, Yamada S, Ohashi S, Nakamine M, Shirai J : Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs, *J Vet Med Sci*, 58, 941-946 (1996)
- [7] Bukovsky C, Schmoll F, Revilla-Fernández S, Weisenböck H : Studies on the aetiology of non-suppurative encephalitis in pigs, *Vet Rec*, 161, 552-558 (2007)
- [8] Oaks JL, Long MT, Baszler TV : Leukoencephalitis associated with selective viral replication in the brain of a pony with experimental chronic equine infectious anemia virus infection, *Vet Pathol*, 41, 527-532 (2004)
- [9] Atwood WJ, Berger JR, Kaderman R, Tornatore CS, Major EO : Human immunodeficiency virus type 1 infection of the brain, *Clin Microbiol Rev*, 6, 339-366 (1993)

Three Cases of Nonsuppurative Meningoencephalitis with Multinucleated Giant Cells in Porcine Circovirus Associated Disease (PCVAD)-Affected Pigs

Niho MURAYAMA^{1)†}, Toru KUSUHARA¹⁾, Kazumaro INO¹⁾, Nobuhiko TANIMURA²⁾,
Makoto HARITANI²⁾ and Manabu YAMADA²⁾

1) *Kenhoku Livestock Hygiene Service Center of Ibaraki Prefecture, 966-1 Nakagachi-cho, Mito-shi, 310-0002, Japan*

2) *National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

Nonsuppurative meningoencephalitis characterized by multinucleated giant cell formation was observed in three pigs diagnosed with Porcine Circovirus Associated Disease (PCVAD). The animals were emaciated and underdeveloped, and necropsied between July 2010 and March 2011, with no neurological signs noted. On the polymerase chain reaction, porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA was detected in the brain, lungs, tonsils and serum of all pigs. Histopathological examination revealed perivascular to parenchymal histiocytic infiltration with sparse multinucleated giant cell formation in the cerebrum and brainstem. Central nervous system lesions were found to be negative for the PCV2 antigen and DNA using immunohistochemistry and *in situ* hybridization, respectively. Electron microscopic findings showed the multinucleated giant cells in the cerebrum to have a large number of lysosomes, indicating their derivation from macrophages. Granulomatous lymphadenitis with multinucleated giant cells was seen in all three animals, suggesting that central nervous system lesions developed in response to the systemic granulomatous lesion associated with PCVAD.

— Key words : multinucleated giant cell, nonsuppurative meningoencephalitis, porcine circovirus 2.

† *Correspondence to (Present address) : Niho MURAYAMA (Kenan Livestock Hygiene Service Center of Ibaraki Prefecture)
5-17-26 Manabe, Tsuchiura, 300-0051, Japan
TEL 029-822-8518 FAX 029-822-7375
E-mail : n.murayama@pref.ibaraki.lg.jp*

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 67, 413 ~ 418 (2014)