豚サーコウイルス2型感染を伴い多核巨細胞浸潤 を特徴とする子豚のび慢性肝臓壊死

奥田宏健^{1)†} 白石 誠²⁾ 吉村範男³⁾ 多田幸四郎¹⁾ 福富豊子¹⁾

萱原佳美¹⁾ 播谷 亮⁴⁾ 川島健司⁵⁾ 村上洋介⁴⁾

- 1) 岡山県家畜病性鑑定所 (〒709-2123 岡山県御津郡御津町河内2770-1)
- 2) 岡山県高梁家畜保健衛生所 (〒719-2122 高梁市高倉町田井860)
- 3) 岡山県岡山家畜保健衛生所 (〒709-2123 岡山県御津郡御津町河内2770-1)
- 4) 農林水産省家畜衛生試験場 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-1)
- 5) 農林水産省家畜衛生試験場七戸研究施設 (〒039-2586 青森県上北郡七戸町字海内31)

(2000年3月31日受付・2000年9月4日受理)

要 約

発育不良の若齢子豚1頭を病理組織学的に検索したところ、肝臓にび慢性の壊死、偽胆管形成、多核巨細胞、マクロファージおよびリンパ球浸潤が観察された。多核巨細胞、マクロファージおよびクッパー細胞の細胞質内に、免疫組織化学的には豚サーコウイルスに対する陽性抗原が存在し、in situ hybridization 検査では離乳後多臓器性発育不良症候群 (postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) の病原体として疑われている豚サーコウイルス2型 (pmws-PCV) 核酸が検出された。透過型電子顕微鏡検査では、サーコウイルス様粒子がマクロファージや多核巨細胞の細胞質内に観察された。また、PCR法でも、この豚の肝臓および回腸においてpmws-PCV核酸が検出された。pmws-PCV感染と関連していると考えられているPMWSでは肝臓の壊死や線維化が時に観察されるが、本症例の肝臓病変はそれらと比較し重度であり、多数の巨細胞の出現がきわめて特徴的であった。

——キーワード：肝臓壊死、豚サーコウイルス、離乳後多臓器性発育不良症候群。

----- 日獣会誌 54, 181～184 (2001)

近年、離乳後多臓器性発育不良症候群 (postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) と称される若齢子豚の消耗性疾患の発生が欧米および日本において報告されている [2, 5, 8, 10, 12, 14, 15]。原因として従来から知られていたPK-15細胞由来豚サーコウイルス (np-PCV) とは異なる新型の豚サーコウイルス (pmws-PCV) 感染が疑われ [2, 8, 14]、分離されたpmws-PCVを豚に実験的に感染させたところ同様の病変が再現された [1, 3, 6]。PMWSに特徴的な病変はリンパ系組織の単核食細胞系細胞における好塩基性細胞質内封入体の形成であるが、肺、肝臓、腎臓、心臓および中枢神経系にも炎症性病変が観察される [2, 8, 14]。PMWSに罹患した豚の肝臓では壊死、炎症、線維化などが認められるが [1, 3, 6, 7, 11, 13]、わが国ではpmws-PCVに関連した肝臓病変の報告はない。今回、発育不良の若齢子豚を病理組織学的に検索したところ肝臓で重篤な病変が観察され、この病変にpmws-PCVが関与していることが確認された。

材 料 お よ び 方 法

肥育豚300頭を飼養する繁殖肥育一貫経営農場で、1999年2月頃より2～3カ月齢の若齢子豚に下痢が散発した。子豚の死亡率は低く (1～2%)、多くは回復したが、少数例は発育不良に陥った。検査症例は雄の子豚で、生後40日齢頃から水様性下痢を発症した。マクロライド系抗生物質の投与で下痢は治癒したが食欲不振は継続し、発育不良および消瘦を呈し、2カ月齢時に死亡した。病原検索では、下痢便からラテックス凝集反応によりロタウイルス抗原が検出された。これ以外には、下痢便からコロナウイルス、伝染性胃腸炎ウイルスあるいは豚流行性下痢ウイルスの抗原は検出されず、有意な細菌も分離されなかった。また、血清を使用した豚繁殖・呼吸障害症候群間接抗体は陰性であった。

検査症例を剖検し、中枢神経系を含む主要臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定後、定法によりHE染色、PAS反応およびマッソン・トリクローム染色を施し鏡検し

† 連絡責任者：奥田宏健 (岡山県家畜病性鑑定所)

〒709-2123 岡山県御津郡御津町河内2770-1 ☎0867-24-3855 FAX 0867-24-3856

た。肝臓および回腸については、鍍銀染色（ワーチン・スターリー染色）と抗酸菌染色を実施したほか、PMWS 野外症例由来のビオチン化豚抗PCV抗体を使用してストレプトアビジン・ビオチン化抗体（SAB）法^{a)}により免疫組織化学的検査を行った [10]。また、肝臓については、兎抗牛ケラチン血清^{b)}（牛脾臓パウダーで吸収）を使用したSAB法により、免疫組織化学的検査を実施した。さらに、肝臓のパラフィン包埋切片について、pmws-PCV固有遺伝子に対するDNAプローブを使用してin situ hybridization法によりpmws-PCV核酸の検出を試みた。使用したプローブは、日本で検出されたPCV2株 [10] ORF2の一部（nt 1273-1602, 329 bp）を増幅するプライマーを設計し、PCRキット^{c)}を用いて作製した。電子顕微鏡検査のために肝臓のホルマリン固定材料を常法に従いエボン包埋し、超薄切および電子染色後、標本を透過型電子顕微鏡で観察した。pmws-PCV核酸の検出のために肝臓と回腸のパラフィン包埋切片からDNAを抽出した^{d)}。その後、Hamelら [4] のプライマーを使用してPCR法を行い、生成産物を制限酵素Hinf Iで切断し、PCV DNAの確認を試みた [10]。

成 績

剖検所見：検査症例の体長は正常同腹豚の約80%で、かつ削瘦しており、皮膚と可視粘膜に黄疸がみられた。肝臓の大きさは正常であったが軟弱であり、表面および断面は暗緑褐色を呈し、小葉構造は明瞭であった。肺の左右前葉および中葉辺縁部は肝変化し、気管支内には黄白色の泡沫が貯留していた。腸管粘膜はうっ血し、腸間膜リンパ節は軽度に腫脹していた。中枢神経系を含む他

の臓器に病変は認められなかった。

病理組織学的検査：主要病変は肝臓に存在していた。肝臓では、び慢性あるいは小葉中心性の肝細胞の変性・壊死および脱落が認められた（図1）。類洞はうっ血し、出血巣も散見された。小葉辺縁部では、偽胆管の形成、リンパ球、マクロファージおよび多核巨細胞の浸潤（図2）が観察され、その間に、少数の肝細胞索が残存していた。胆管およびマクロファージには胆汁色素が沈着していた。最も特徴的であったのは多数の多核巨細胞の浸潤であった。多核巨細胞にはランゲハンス型および異物型の両方が認められ、大きさや核の数はさまざまであり、数個の核を有する小さなものから十数個の核を有する巨大なものまで存在した。少数の多核巨細胞は赤血球や壊死細胞を貪食していた。抗酸菌染色標本で、多核巨細胞の細胞質内には抗酸菌は観察されなかった。グリソン鞘および中心静脈周囲に軽度の結合組織の増生が観察される部位があった。グリソン鞘では軽度のリンパ球浸潤がみられた。なお、肝臓では封入体は観察されなかった。ケラチンを免疫染色したところ、胆管、偽胆管およ

図1 び慢性の肝細胞の壊死および脱落と、小葉周辺性の偽胆管の増生、多核巨細胞、マクロファージおよびリンパ球の浸潤（HE染色 ×100）。

図2 小葉辺縁部における多核巨細胞の浸潤（HE染色 ×400）。

図3 豚サーコウイルスの免疫染色。多核巨細胞、マクロファージおよびクッパー細胞の細胞質における陽性反応（×400）。

a) ヒストファインSABキット、ニチレイ、東京。
b) ダコ・ジャパン、京都。
c) DIG Probe Synthesis kit, Boehringer Mannheim, Germany。
d) QIAmp DNA Mini Kit, キアゲン、東京

図4 in situ hybridization法により豚サーコウイルス2型遺伝子を検出。多核巨細胞、マクロファージおよびクッパー細胞の細胞質における陽性シグナル (×400)

び肝細胞の細胞質内に明瞭な陽性反応が観察され、変性した肝細胞も弱陽性反応を呈したが、多核巨細胞はまったく陽性反応を示さなかった。PCVを免疫染色したところ、主として多核巨細胞、マクロファージおよびクッパー細胞の細胞質に陽性反応が観察された(図3)。変性した肝細胞にもまれに弱陽性反応が観察された。In situ hybridization法により pmws-PCV 遺伝子の検出を試みたところ、PCV抗原陽性部位に一致して陽性シグナルが検出された(図4)。透過型電子顕微鏡検査の結果、マクロファージおよび多核巨細胞の細胞質内に、直径16nm前後のサーコウイルス様粒子が縄状に配列した構造が観察された(図5)。

肝臓以外の臓器における病変としては、回腸のパイエル板と腸間膜リンパ節でリンパ球の著明な減数と単核食細胞系細胞の増数がみられ、好塩基性滴状細胞質内封入体を充満する単核細胞が散見された。腸間膜リンパ節では少数の多核巨細胞の浸潤もみられた。抗PCV抗体を用いた免疫染色では、好塩基性滴状細胞質内封入体が明瞭な陽性反応を示した。肺では化膿性カタル性気管支肺炎が観察された。肝臓と回腸のパラフィン包埋切片についてPCRを実施した結果、どちらの組織からも約550 bpのPCR産物が検出され、これらのPCR産物は *Hinf* I で切断された。

考 察

今回の発育不良を呈して死亡した子豚の肝臓には、びまん性あるいは小葉中心性の肝細胞の壊死および消失と、小葉周辺性の偽胆管の増生、多核巨細胞、マクロファージおよびリンパ球の浸潤がみられた。これらの病変は、免疫組織化学的検査および透過型電子顕微鏡検査によりPCVに関連しており、さらにin situ hybridization法により pmws-PCV の感染が証明された。また、*Hinf* I で

図5 マクロファージの細胞質内に認められた豚サーコウイルス様粒子 (×45,000)

切断されたPCR産物は pmws-PCV のそれと同一であった [4, 10]。PMWSに関連した肝臓病変としては、Kiupelら [7] が野外のPMWS症例でリンパ球およびマクロファージの浸潤を伴った肝細胞の孤在性壊死の出現を、またEllisら [3] がPMWS罹患豚の組織乳剤等を実験的に感染させた無菌豚症例で同様の病変を報告している。今回報告した子豚の肝臓病変は、これらと比較しきわめて重度なものであった。一方、Spillaneら [13] は、野外のPMWS症例1頭の肝臓において重度な肝細胞の壊死と組織球系細胞の浸潤が観察されたとのみ記述した。Rosellら [11] は黄疸を呈して死亡した1頭の子豚の肝臓病変についてやや詳しく記述し、肝臓病変は小葉全体の大多数の肝細胞の消失と単核球の浸潤からなっていた。さらに、Kennedyら [6] およびAllanら [1] は、PCV2型と豚パルボウイルス (PPV) を混合感染させた初乳未摂取の子豚の肝臓で巣状ないしびまん性の壊死を観察した。壊死が非常に重度な症例では肝細胞の消失が顕著であり、類洞は著しく拡張・充血していた。すなわち、今回報告した子豚の肝臓病変はこれらの報告と類似していた。このような重篤な肝細胞の壊死の原因については、変性した肝細胞にウイルス抗原と核酸が存在したことから、ウイルスの直接細胞障害作用が考えられる。また、ナチュラルキラー細胞や細胞障害性T細胞の作用により、感染細胞が破壊された可能性もある [6, 9]。さらに、PCV感染の重篤化に豚パルボウイルスを含む感染あるいは豚の免疫に影響を与える環境因子の関与が示唆されている [1]。本症例ではこれらの関与については検討されなかったが、類似症例を今後検査する際は、これらの要因を考慮する必要がある。

一方、多核巨細胞浸潤および偽胆管の形成は、本症例の肝臓病変のうちでも特記すべきものと考えられた。特に多核巨細胞については、PMWS症例のリンパ節、脾臓および肺に出現することは知られていたが [2, 11, 14]、同様の巨細胞が肝臓にも特徴的に出現することが今回の

検索により初めて明らかにされた。さらに、多核巨細胞は免疫組織化学的にケラチン陰性であり、単核食細胞系由来であることが示された。多核巨細胞の出現の理由としては、壊死細胞排除のために単核食細胞系細胞が活性化したほかに、ウイルス感染のために核分裂に細胞分裂が伴わずに、あるいは細胞が融合して形成された可能性がある。一方、偽胆管形成については、PCV感染とは直接関係のない非特異的な再生像と考えられた。

PMWS症例における肝臓病変の重要性について言及した論文は少ないが、今回の報告症例を含めて死亡豚ではしばしば重度な肝臓病変が観察されている[11]。肝臓病変が病勢の増悪に関与している可能性が高い。最近、PMWSは本邦においても相次いで報告がされており[8, 9, 12, 14, 15]、豚の生産病の中でも特に重要な消耗性疾患となる可能性がある。

引用文献

- [1] Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM : J Comp Pathol, 121, 1-11 (1999)
- [2] Allan GM, Ellis JA : J Vet Diagn Invest, 12, 3-14 (2000)
- [3] Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Haines D, Bratanich A, Clark E, Allan G, Konoby C, Hassard L, Meehan

- B, Martin K, Harding J, Kennedy S, McNeilly F : J Vet Diagn Invest, 11, 3-14 (1999)
- [4] Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS : J Virol, 72, 5262-5267 (1998)
- [5] 今田忠夫 : 豚病学, 第4版, 281-282, 近代出版, 東京 (1999)
- [6] Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM : J Comp Pathol, 122, 9-24 (2000)
- [7] Kiupel G, Stevenson GW, Mittal SK, Clark KG, Hanes DM : Vet Pathol, 35, 303-307 (1998)
- [8] 久保正法 : 豚病学, 第4版, 282, 近代出版, 東京 (1999)
- [9] 中村恭一, 若狭治毅, 桜井 勇編 : 医系病理学, 275-283, 中外医学社, 東京 (1997)
- [10] Onuki A, Abe K, Togashi K, Kawashima K, Taneichi A, Tsunemitsu H : J Vet Med Sci, 61, 1119-1123 (1999)
- [11] Rosell C, Segales J, Plana-Duran J, Balasch M, Rodriguez-Arrioja GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M : J Comp Pathol, 120, 59-78 (1999)
- [12] 佐藤勝哉, 赤地重広 : 家畜衛生週報, 2542, 67 (1999)
- [13] Spillane P, Kennedy S, Meehan B, Allan G : Vet Rec, 143, 511 (1998)
- [14] 田島正典 : 日獣会誌, 53, 53-58 (2000)
- [15] 坪川 正, 本多秀次 : 日獣会誌, 53, 114-147 (2000)

Diffuse Hepatic Necrosis Characterized by Infiltration of Multinucleated Giant Cells Associated with Porcine Circovirus Type 2 in a Piglet

Koken OKUDA^{*†}, Makoto SHIRAISHI, Norio YOSHIMURA, Koshiro TADA,
Toyoko FUKUTOMI, Yoshimi KAYAHARA, Makoto HARITANI,
Kenji KAWASHIMA and Yosuke MURAKAMI

** Okayama Prefectural Veterinary Diagnostic Laboratory, 2770-1 Kawachi, Mitsu, Okayama Prefecture 709-2123, Japan*

SUMMARY

Histopathological examination of a stunted piglet revealed diffuse hepatocytic necrosis and pseudo bile ducts formation together with infiltrations of multinuclear giant cell, macrophage, and lymphocyte in the liver. The immuno-histological method demonstrated the porcine circovirus antigen in the cytoplasm of giant cells, macrophages, and Kupffer cells. In situ hybridization revealed the presence of genetic signals specific to the porcine circovirus type 2 (pmws-PCV), which has been suspected of being the pathogen in the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Electron microscopy revealed circovirus-like particles in macrophage and multinuclear giant-cell cytoplasm. Moreover, the PCR method detected the nucleotide specific for pmws-PCV in the animal's liver and ileum. Although hepatic necrosis and fibrosis have occasionally been observed in animals with PMWS associated with pmws-PCV infection, in this case, the extent of hepatic lesions was more prominent than in previously reported cases. Furthermore, the appearance of many giant cells and pseudo bile ducts was especially remarkable in this piglet.

— Key words : liver necrosis, porcine circovirus, postweaning multisystemic wasting syndrome.

† Correspondence to : Koken OKUDA (Okayama Prefectural Veterinary Diagnostic Laboratory)

2770-1 Kawachi, Mitsu, Okayama Prefecture 709-2123, Japan

TEL 0867-24-3855 FAX 0867-24-3856

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 54, 181 ~ 184 (2001)