

学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第 号	氏 名	Phawut Nueangphuet
<p data-bbox="229 465 371 495">[論文題名]</p> <p data-bbox="229 515 1366 591">Neutrophil and M2-polarized Macrophage Infiltration, Expression of IL-8 and Apoptosis in <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> pneumonia in Swine</p> <p data-bbox="229 611 1366 687">豚の <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 感染肺炎における好中球および M2 マクロファージの浸潤と、IL-8 の発現およびアポトーシスについて</p> <p data-bbox="229 757 1283 833">Journal of Comparative Pathology Volume 189, November 2021, Pages 31-44, DOI: 10.1016/j.jcpa.2021.09.004</p> <p data-bbox="229 898 355 927">[要 旨]</p> <p data-bbox="229 947 1366 1883"><i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (<i>Mhp</i>) is the primary cause of swine enzootic pneumonia (SEP) and one of the pathogens in the porcine respiratory disease complex. <i>Mhp</i> causes chronic respiratory disease and poor health, reducing average daily weight gain and creating severe economic losses in the pig industry worldwide. The typical lung macroscopic lesion is pale to dark red consolidation of the cranioventral lung lobes. The histological changes in SEP are bronchus associated lymphoid tissue (BALT) hyperplasia. However, the pathogenicity of <i>Mhp</i> remains to be fully elucidated and the effect of <i>Mhp</i> cytotoxicity on apoptosis, requires further investigation. The interaction between <i>Mhp</i> and airway epithelial cells can result in epithelial damage and ciliostasis, which orchestrates numerous cytokines, leading to pneumonic lesions. Many cytokines have been reported to play a crucial role in the inflammatory process and the immunoregulatory system, including interleukin (IL)-1α, IL-1β, tumour necrosis factor-α (TNF-α), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and interferon-γ (IFN-γ). However, reports of natural disease remain limited, and the pathogenesis has not been fully elucidated. Other changes, such as the presence of an M2-polarized macrophage subpopulation and the expression of anti-inflammatory cytokines in the later stages of infection, require further investigation as they might influence the progression of disease. The aim of this study was to relate the histological and IHC features of lung lesions in pigs with naturally acquired SEP to apoptosis expression of IL-8, IL-10, IL-12 and IFN-γ and <i>Mhp</i> load.</p> <p data-bbox="229 1904 1366 1980">Fifteen consolidated lungs, typical of SEP, were collected from crossbred gilts (F1) at a slaughterhouse in southern Kyushu, Japan. Pink to dark red consolidated</p>			

lung tissue representing >10% of the total lung area were collected. The proportion of the affected area of lung (%) was measured and scored using the online software ImageJ. Fresh lung samples were homogenized and performed DNA and RNA extraction. The DNA and RNA extracted from the fresh lung tissue samples were used to check for the presence of other swine pneumonia pathogens (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida*) by PCR. The nested PCR was used to detect porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) virus. Multiplex PCR was used to detect *Mhp* and *Mycoplasma hyorhinis*. Real-time PCR was used to quantify *Mhp* in the lung samples. The formalin fixed samples were processed and stained with haematoxylin and eosin (HE) and Alcian blue for microscopic examination.

Microscopic lesions were semi-quantitatively scored from + to +++, and three important lesions were also evaluated distribution and scored: peribronchiolar lymphoid hyperplasia, accumulation of cellular exudate in the airways, including bronchial and bronchiolar lumina and alveolar spaces, and interstitial pneumonia. IHC was performed to detect *Mhp* antigen, cellular infiltration, including CD163/CD204-labelled M2-polarized macrophages, CD3-labelled T lymphocytes and CD20-labelled B lymphocytes, apoptosis and cytokines, including IL-8, IL-10, IL-12 and IFN- γ . All markers were analyzed for statistically correlation.

Results, fifteen lung samples were positive for *Mhp*. Histopathological examination of the lung tissues revealed moderate to severe suppurative bronchopneumonia with prominent BALT hyperplasia, and perivascular and peribronchiolar lymphocytic infiltration. Airway and alveoli were filled with neutrophils and pulmonary alveolar macrophages. IHC results, *Mhp* antigen was consistently detected on the surface of bronchial and bronchiolar epithelium and also seen within phagocytic inflammatory cells, including neutrophils and a few macrophages. B lymphocytes were more intense than T lymphocytes. Almost all Iba-1-labelled pulmonary alveolar macrophages were also strongly immunopositive for CD163 and CD204 that represented M2-polarized macrophages. Neutrophils were the most frequently immunolabelled by caspase 3 within the lesions. Lymphocytes in the lymphoid follicle and alveolar macrophages were detected in a few areas. Interestingly, the bronchial-bronchiolar epithelial cells, which were associated with the *Mhp* antigen on the luminal surface, were labelled by caspase3 in multiple areas. The intensity of *Mhp* immunolabelling and number of CD163/CD204-positive macrophages were correlated with the *Mhp* load in lung tissue ($r = 0.87, 0.56, P < 0.05$). IL-8 immunolabelling correlated with *Mhp* load, *Mhp* immunolabelling and histological lesion score ($r = 0.70, 0.66, 0.64, P < 0.05$), respectively. Apoptosis was seen

in neutrophils and macrophages in alveolar spaces and was correlated with *Mhp* load ($r = 0.62$, $P < 0.05$). Alveolar macrophages were labelled most intensely by IL-10, with mild to moderate cytoplasmic labelling and strong labelling at the cell membrane.

Discussion and conclusions, BALT and peribronchiolar lymphoid hyperplasia are characteristic lesions of *Mhp* infection. In addition, numerous accumulations of inflammatory cells, including neutrophils and macrophages, were observed in alveoli. Infiltration with these cells was consistent with increasing histological scores. Our observations emphasize that neutrophils and some bronchial and bronchiolar epithelial cells can express IL-8, which is related to the *Mhp* load in lung tissue. CD163 and CD204 have been used as markers for M2-polarized macrophages. The expression of both markers in uniform macrophage populations in our study reflected M2-polarized macrophages. It is presumed that the marked upregulation of CD163- and CD204- labelled M2-polarized macrophages relates to IL-10 expression in such circumstances. In this study, apoptosis was demonstrated by in various cell types, including neutrophils, pulmonary alveolar macrophages, and lymphoid cells. Apoptosis was strongly correlated with the *Mhp* load in lung tissue. Interestingly, there was also evidence of apoptosis bronchial and in bronchiolar epithelial cells in some regions that colocalized with the presence of *Mhp* organisms. Our results show that *Mhp* interaction with host cells might induce apoptosis and take part in the pathogenesis.

豚流行性肺炎 (SEP) の主要な病原体である *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhp*) は、慢性呼吸器疾患や健康状態の悪化、増体低下を引き起こし、世界中の養豚業界に深刻な経済的損失をもたらす。典型的な肺の肉眼病変は、頭腹側部肺葉の淡赤色から暗赤色の硬化巣である。SEP の組織学的特徴として、気管支関連リンパ組織 (BALT) の過形成があげられる。しかし、*Mhp* の病原性は完全に解明されておらず、*Mhp* によるアポトーシスについては、さらなる検索が必要である。*Mhp* は気道上皮細胞との相互作用により、上皮傷害と線毛運動障害を引き起こし、多数のサイトカインが関与して肺病変を引き起こす。インターロイキン (IL) -1α 、IL- 1β 、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 およびインターフェロンガンマ (IFN- γ) など、多くのサイトカインが炎症過程と免疫調節システムにおいて重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、自然発生例における報告は限られており、病理発生機序は完全に解明されていない。M2 マクロファージの存在や感染後期の抗炎症性サイトカインの発現などの変化は、病変の進行に影響を与える可能性があるため、さらなる研究が必要である。本研究の目的は、SEP 自然発症豚における肺病変の組織学的および免疫組織化学的特徴と、IL-8、IL-10、IL-12 および IFN- γ のアポトーシス発現および *Mhp* 量との関連性を明らかにすることである。

本研究を行うにあたり、九州南部の屠畜場から、交雑種雌豚 (F1) から SEP に典型的な全肺面積の 10%以上に相当する暗桃色から暗赤色の肝変色巣を有する肺 15 検体を採材した。肺病変部の割合 (%) は、ImageJ を使用し測定した。肺の生材料から乳剤を作成し、DNA および RNA 抽出を行い、PCR により豚呼吸器病の他病原体 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*) を調べた。豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ウイルスの検出には nested PCR を実施した。*Mhp* と *Mycoplasma hyorhinis* の検出には Multiplex PCR、肺病変中の *Mhp* 定量には Real-time PCR を用いた。さらに、ホルマリン固定材料を用いて、ヘマトキシリン・エオジンおよびアルシアンブルー染色を行った。組織学的病変は 1+ から 4+ まで半定量的にスコア化した。また、重要な病変である BALT の過形成、気管支腔、細気管支腔および肺胞腔の浸潤細胞、間質性肺炎についてスコア化した。*Mhp* 抗原、CD163/CD204 陽性 M2 マクロファージ、CD3 陽性 T リンパ球、CD20 陽性 B リンパ球を含む細胞浸潤、アポトーシス、IL-8、IL-10、IL-12、IFN-164 を含むサイトカインの検出のために IHC を実施し、統計的に解析した。

Multiplex PCR では、15 検体の肺サンプルにおいて *Mhp* が検出された。肺組織の病理組織学的検査では、顕著な BALT の過形成、血管周囲および細気管支周囲のリンパ球浸潤を伴う中等度から重度の化膿性気管支肺炎が認められた。気道と肺胞は、好中球と肺胞マクロファージで充満していた。IHC の結果、*Mhp* 抗原は気管支および細気管支上皮の表面に一貫して検出され、好中球と少数のマクロファージの細胞内にもみられた。B リンパ球は T リンパ球より多数出現していた。ほぼすべての Iba-1 陽性肺胞マクロファージは、M2 マクロファージマーカーである CD163 と CD204 にも強い陽性反応を示した。病変部では好中球が最も多く caspase3 陽性を示した。リンパ濾胞内リンパ球および肺胞マクロファージは、一部で caspase3 陽性を示した。興味深いことに、気管支-細気管支上皮細胞では、管腔表面の *Mhp* 抗原とほぼ一致して、複数の領域で caspase3 陽性を示した。*Mhp* 抗原陽性の強度および CD163/CD204 陽性マクロファージの数は、肺組織中の *Mhp* 量と相関関係が示された ($r = 0.87, 0.56, P < 0.05$)。IL-8 免疫標識は、*Mhp* 量、*Mhp* の抗原量および組織学的病変スコアとそれぞれ相関していた ($r = 0.70, 0.66, 0.64, P < 0.05$)。アポトーシスは肺胞内の好中球およびマクロファージで認められ、*Mhp* 量と相関が示された ($r = 0.62, P < 0.05$)。肺胞マクロファージは IL-10 によって最も強く標識され、細胞質は軽度から中等度、細胞膜は強陽性であった。

【考察とまとめ】

BALT および細気管支周囲リンパ組織の過形成は、*Mhp* 感染に特徴的な病変である。また、肺胞腔には好中球やマクロファージなどの炎症性細胞が多数集積していることが示された。これらの細胞浸潤は、組織学的スコアと一致していた。好中球と一部の気管支および細気管支上皮細胞は IL-8 を発現しており、肺組織内の *Mhp* 量との関連性が示された。本研究で、CD163 と CD204 を M2 マクロファージのマーカーとして用いており、均一なマクロファージ集塊において両マーカーに対する陽性所見が得られた。CD163/CD204 陽性 M2 マクロ

ファージの顕著な発現増加は、このような状況での IL-10 の発現に関連していると推定される。本研究では、好中球、肺胞マクロファージ、リンパ球など様々な細胞でアポトーシスが認められた。また、アポトーシスは、肺組織における *Mhp* 量と強い相関関係を示した。興味深いことに、気管支および細気管支上皮細胞のアポトーシスは、*Mhp* と共局在する領域もあった。この結果は、*Mhp* と宿主細胞との相互作用がアポトーシスを誘導し、病態形成に関与している可能性を示している。

備考 論文要旨は、和文にあつては2,000字程度、英文にあつては1,200語程度