

特集：昆虫バイオ〔3〕

# 昆虫の食細胞と生体防御

埼玉医科大学短期大学臨床検査学科免疫学 **和 合 治 久**

## はじめに

食細胞 (phagocyte) は、動物すべてに基本的に備わった生体防御担当細胞であり、非自己 (nonself) の物体が粒子状の場合に文字どおりそれを貪食して細胞質内で消化・殺菌する細胞である。この意味で食細胞は系統発生的に最も古い起源を持ち、アメーバのような原生動物から人間のマクロファージに至るまで、非特異的な細胞性防御反応 (cellular defense reaction) に関与している (和合, 1986)。人間のような哺乳動物の場合、マクロファージは異物の貪食ばかりではなく、Tリンパ球への抗原提示能、インターロイキン・Iや腫瘍壊死因子などモノカイン分泌能、ガン細胞を攻撃する抗腫瘍活性など、数多くの防御機能を持ち、生命維持に不可欠な細胞として位置づけられている。昆虫類も例外ではなく、体腔中を流れる体液に食細胞が含まれ、侵入する外来性異物を貪食 (phagocytosis) によって処理している。

昆虫類の中には、ハエの幼虫のように微生物が増殖して食物が腐敗している環境下で立派に発育できる種類が数多く存在している。なぜハエ幼虫は微生物感染を免れることができるのだろうか。この問いに対する答えは生体防御の観点で重要であり、新たな知見は医学分野でのエイズを起こす HIV や MRSA (抗生物質耐性の黄色ブドウ球菌) などによる治りにくい感染症の克服、農学分野での植物病原体の駆除などにも応用できる可能性がある。その理由は、今日のバイオテクノロジーの技術を駆使すれば、ある昆虫由来の防御物質の遺伝子を組み込んだ形質転換動物や、形質転換植物を作出することができるし、細菌によって有用な防御物質を医薬品として得られるからである。

本稿では、昆虫の食細胞が関与する生体防御反応を、フェノール酸化酵素前駆体活性化系、レクチンの産生、抗菌物質の産生など、液性の防御反応 (humoral defense reaction) と関連づけながら、その重要性に論点を当てると同時に、今後必ず注目を集めるであろう昆虫の生体防御による害虫防除についても考察してみたい。

## I 昆虫の食細胞とは何か

昆虫の体液 (hemolymph) は、背脈管のポンプの力で

頭部側の出口より全身に分配され、再び後部の入口より背脈管に入ってくる。カイコ幼虫を材料にどんな血液細胞 (blood cell) あるいは血球 (hemocyte) が存在するかを調べると、5種類の血球種が存在していることがわかる。それらは原白血球 (prohemocyte) という球状で表面が滑らかな血球、小球 (spherule) という大型顆粒を数多く持つため表面がゴツゴツした小球細胞 (spherulocyte)、アメーバのように伸展して唯一運動能を示すプラズマ細胞 (plasmacyte)、細胞質に大小の顆粒を持ち付着すると糸状突起 (filopodia) を伸長させる顆粒細胞 (granulocyte)、そして一番大きく細胞質内に三ヶ月型構造を持つエノシトイド (oenocytoid) である (AKAI and SATO, 1971)。これらの血球種の割合と形態は、個体発生の中で、特に変態と関連して変化し、顆粒細胞とプラズマ細胞の変動は著しい (和合, 1985)。これらの血球に加え、シストサイト (cystocyte) と呼ばれる哺乳動物の肥満細胞 (mast cell) に類似する血球を持つ昆虫も知られている (PRICE and RATCLIFFE, 1974)。

カイコの場合、これらの血球は胸部の翅芽 (wing disc) に近接する部位にある造血器官 (hematopoietic organ) で作られ、成熟分化後に体液中に放出されていることが、オートラジオグラフィによる研究で判明している (AKAI and SATO, 1971)。また、体液中の原白血球や顆粒細胞は細胞分裂する能力があり、分裂中の血球をしばしば観察することができる。

一般的に、昆虫の血球による細胞性防御反応は、①小型の侵入異物を貪食によって処理する食作用、②細菌感染の際に細菌を貪食した食細胞同士が集合してノジュール (小節) を形成するノジュール形成 (nodule formation)、③貪食できない大型の異物を複数の血球が反応し、包囲して生体内隔離する包囲化 (被包化) 作用 (encapsulation)、の三つのタイプがある (SALT, 1970)。

カイコ体腔内に動物の赤血球や大小のラテックス粒子を注入して、経時的に血球を採取した後、細胞性防御反応を観察すると、顆粒細胞が貪食能や包囲化初期反応を示し、プラズマ細胞は包囲化過程に関与するにすぎなかった (WAGO, 1980 a, b)。多くの昆虫種で同様の実験を行ってみた結果、顆粒細胞が異物を食作用により積極的に排除する食細胞であることが判明した。この食作用は異物への付着、糸状突起の伸長およびベール状膜突起の伸展による細胞質内への取り込みという三つの過程から成

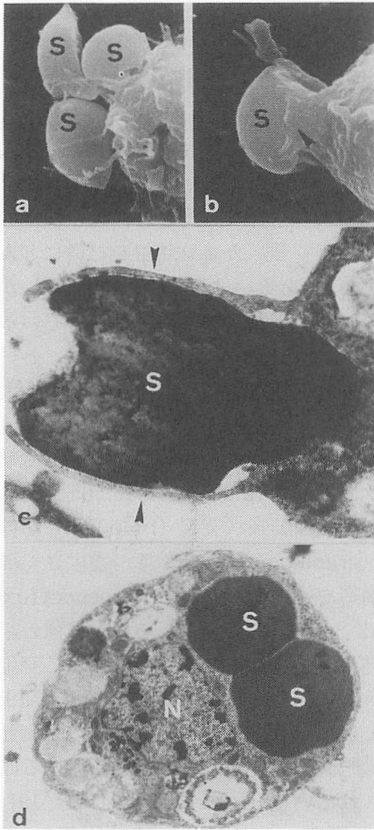


図-1 カイコ幼虫の顆粒細胞による食作用を示す電子顕微鏡写真

食作用は付着したヒツジ赤血球(s)に対する糸状突起の伸長(a)、ベール状膜突起(矢印)の伸展(b, c)そして細胞質内への完全な取り込み(d)から成り立っている。

り立っていた。一方、包圍化の初期反応にも顆粒細胞は関与し、臍顆粒化によりプラズマ細胞に反応する走化性因子が放出され、この2種の血球が連携プレーをとって大型異物に反応することも示された(WAGO, 1992 a)。

## II 昆虫の食細胞機能をどのように発現させるか

カイコの血球を生体外で培養すると、顆粒細胞は糸状突起を放射状に伸長させて付着する。一方、プラズマ細胞も膜状突起(lamellipodia)と糸状突起を組み合わせながら伸展させてアメーバ状に付着する性質を持っている。生体内でみられた顆粒細胞の食作用が生体外でも発現できれば、生体防御機能をより深く研究することができるだろう。そこで温度と細胞質突起の機能阻害剤を組み合わせ、機能発現法を検討した。

その結果、顆粒細胞とプラズマ細胞の糸状突起機能は低温とサイトカラシンBという微小線維阻害剤で抑制

されること(WAGO, 1982)、プラズマ細胞の膜突起機能は低温と微小管阻害剤のビンプラスチンとかコルヒチンで抑制されることが判明した(WAGO, 1990)。この知見を基礎に、顆粒細胞を低温下で付着のみ引き起こしておき、そこに異物を加えてから適温下に温度をシフトさせると、付着した異物に糸状突起が伸長して生体内と同様の食作用が発現した(WAGO, 1984)。したがって、顆粒細胞の突起が異物に対して連続的に伸長し、その過程で何らかの異物シグナルを量的に獲得することが、食作用という細胞行動を引き起こす上で重要であると思われる。この局面は哺乳類や鳥類の腹腔マクロファージの非特異的食作用の発現様式と類似していた。

## III フェノール酸化酵素前駆体活性化系は食細胞機能に影響するか

昆虫類や甲殻類には、黒色のメラニン色素が生体外の体液や傷口にすぐに形成される現象が観察される。この色素はドーパとかチロシンのようなフェノール性物質がフェノール酸化酵素(PO)によって酸化され、ドーパキノンやドーパクロムを経て形成される。この系は細菌細胞壁のペプチドグリカンや酵母、真菌の細胞壁に存在する $\beta$ -1,3-グルカンなどによって活性化されるので、生体防御と深く関係していると考えられていた。

ペプチドグリカンや $\beta$ -1,3-グルカンを持つ微生物が昆虫の体内に侵入すると、これらの成分(エリシター)を特異的に認識するタンパク質が結合する。その結果、セリン型プロテアーゼが活性化され、次に、POの前駆体(proPO)が活性化されてPOが生じ、前述の反応が進行してメラニン色素ができることと解釈されている(芦田, 1988)。

この生化学的反応(POの存否)が顆粒細胞の食作用に影響するか否かを、プロテアーゼ阻害剤と酸化酵素阻害剤を使うことによって調べた結果、顆粒細胞の付着反応はプロテアーゼ阻害剤の存在下で完全に抑制されることが判明した(WAGO and ICHIKAWA, 1988)。しかし、酸化酵素阻害剤は付着反応にほとんど影響しなかった。したがって、POが生成する系ほど、顆粒細胞の付着は促進することになる。このことは、 $\beta$ -1,3-グルカンを前処理しておくことと食作用が促進すること、キタラーゼ( $\beta$ -1,3-グルカンナーゼ)で $\beta$ -1,3-グルカンを除去した酵母プロトプラストに対する食作用は遅れることなどの実験からも裏づけられた(和合, 1994)。

なお、プラズマ細胞の付着反応はセリン型プロテアーゼの阻害剤に影響を受けることはなく、POの存在には左右されなかった。しかし、EDTAなど $\text{Ca}^{2+}$ キレート剤の存在下では付着反応は阻害されたので、プラズマ細胞の付着には $\text{Ca}^{2+}$ が不可欠である(WAGO, 1990)。

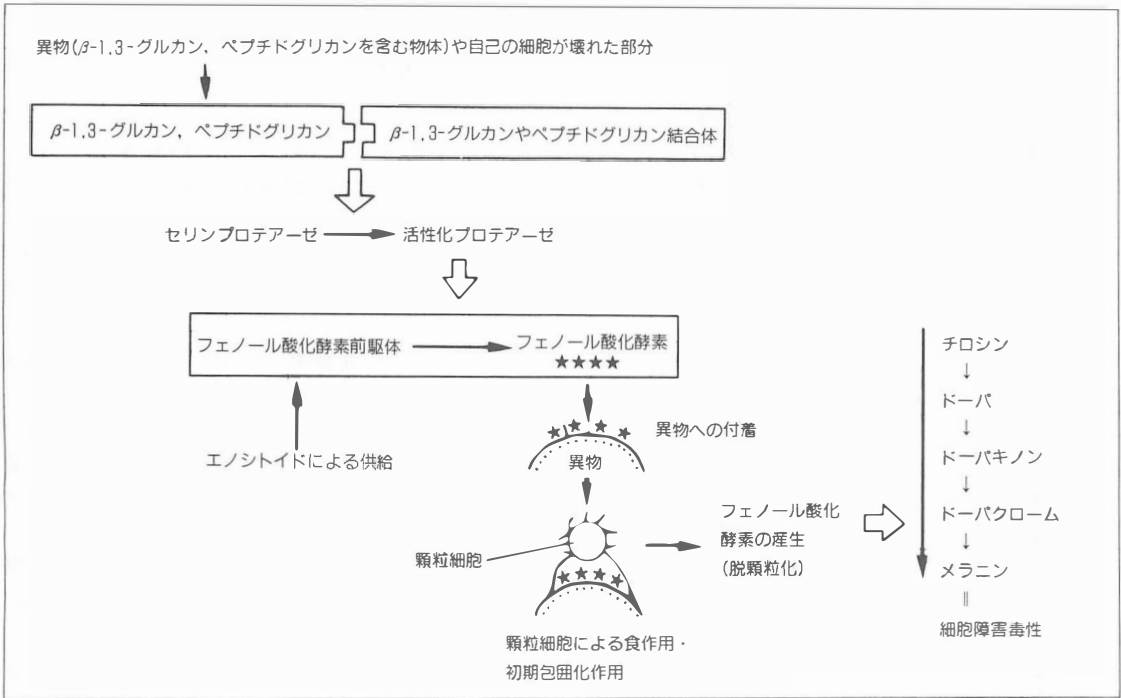


図-2 フェノール酸化酵素前駆体活性化系と顆粒細胞の初期付着反応の相互作用を示す重要な生体防御機構の模式図

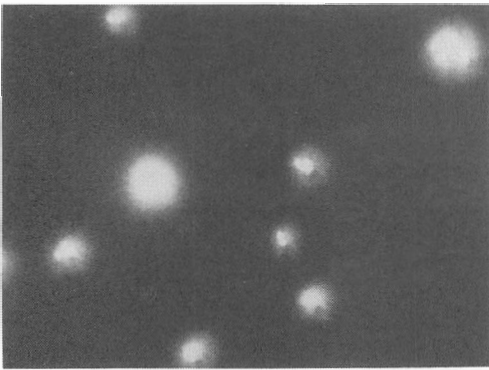


図-3 フェノール酸化酵素を含む体液で処理した蛍光色素 (FITC) 標識ラテックス粒子はカイコ顆粒細胞に早く捕食される (光っている部位は捕食された粒子)

最近, proPO 活性化系に存在する顆粒細胞の付着を促進する因子を検討した結果, 限外濾過と SDS-PAGE による解析から分子量が約 70K のタンパク質に付着活性のあることを見出した。カイコの proPO は分子量 80 K の約 0.15% の Cu を含むタンパク質で, セリンプロテアーゼによって分子量が 70 K の PO へと転換する (芦田, 1988)。この意味で, PO 自体が付着促進因子であると考えられる。

昆虫には脊椎動物の抗体や補体は存在しないので, 異物と食細胞を橋渡しする分子は存在しないと考えられていたが, proPO 系が異物への付着を促すと考えると, 昆虫の生体防御にとってその系は非常に重要な意義を持っていると思われる。

#### IV 食細胞機能はレクチン分子と関係があるか

レクチン (lectin) は動植物に広く存在する細胞凝集性の糖タンパク質で, 結合部位が多価であるためにレクチンを介して細胞同士が凝集する。このレクチンが昆虫においても生体防御系の物質として役割を果たしている。

カイコを材料にレクチンの存否を調べると, ヒツジ赤血球やヒト O 型赤血球を強く凝集する活性が脱皮や変態のステージに出現することがわかった (和合, 1993)。この個体発生での出現はエクジステロンなど変態ホルモンの制御下にあり, 興味深いことに食細胞である顆粒細胞によって作られている (和合, 1992)。この知見は結紮実験やホルモン注入実験, あるいは分画した顆粒細胞を用いた培養実験などから明らかになった。さらに, モンシロチョウやスジグロシロチョウの場合, 顆粒細胞自身にもレクチン活性の出現と平行してレクチン反応性のレセプターが強く誘導されることを見いだした (和合, 1982)。これらの事実から, レクチンが凝集した異種細胞は効率よく食細胞にトラップされ, 異物排除が

促進されている。

カイコのレクチンは分子量が約260 Kの糖タンパク質で、低濃度のヘパリンやグルクロン酸によって活性が阻害される (SUZUKI and NATORI, 1985)。一般に、昆虫レクチンは各種の糖類によって抑制される性質を持つので、糖存在下で異物の凝集は阻害される。例えばセンチニクバエのレクチンはガラクトースに親和性があり、体表に傷をつけてレクチンを誘導した後にこの糖を注入すると、異物排除が抑制される (KOMANO and NATORI, 1985)。この観察からもレクチンの防御機能を知ることができる。

さてカイコの場合、レクチン活性が見られないステージに異物を注入してレクチンが誘導されるか否かを調べると、食作用の生じやすい異物粒子ほど早くレクチン活性が一過性に誘導されることが判明した (和合, 1992)。したがって、食作用を引き起こした顆粒細胞は、レクチンを合成できると考えられる。しかし、誘導されたレクチン活性は72時間後には消失したので、活性が長く維持されるような性質はみられない。

以上より、レクチンは個体発生の中で組織構築が生じるときに出現するばかりではなく、異物の侵入によって顆粒細胞の食作用が発動するときにも生合成されると考えられる。なお鱗翅目昆虫の顆粒細胞は幼虫期の発育に伴い、その数が増加するが、蛹化すると数は著減する。しかし、そのとき大きさが増大してレクチンに反応するレセプターも獲得するので、この生物現象は生体防御反応のスイッチングと考えられる (WAGO, 1992 b)。

## V 食細胞機能は抗菌物質の誘導と関係があるか

細菌、ウイルス、カビなど、微生物の大部分を占める病原体をいかに攻撃できるかが、生命の維持に重要である。昆虫においても病原体の感染を阻止する作用をもつ防御因子が存在し、液性の防御反応に関与している。

一般的に、昆虫にみられる感染防御物質による液性反応は非特異的であり、その産生に二次の既往反応は観察されていない。しかし、昆虫に記憶を伴う特異的液性反応が存在することを証明する結果も、溶血性や呼吸酵素系に関与するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> をトキシイドとして注入したワモンゴキブリの実験から得られている (RHEIMS and KARP, 1984)。したがって、異物の質的相違が二次液性反応の特異性や効率性に影響しているように思われる。

さて、カイコの場合、抗菌性を示す3~4種類の物質が体液中に存在し、その中でも塩基性物質の活性が高く細菌の細胞膜に機能障害を与えることが知られていた (菊地, 1980)。最近、カイコにもセクロピア蚕で見いだされたと同じセクロピンやアタシンという抗菌タンパクが存在していることが判明している (谷合ら, 1993)。セクロピア蚕には分子量4 Kのセクロピンと分子量20~30 Kのアタシンという抗菌物質が単離されており (BOMAN et al., 1985)、この遺伝子はセンチニクバエの抗菌タンパク質であるザルコトキシンの遺伝子に類似している。一連の昆虫で発見された抗菌物質は共通する構造的特徴をも

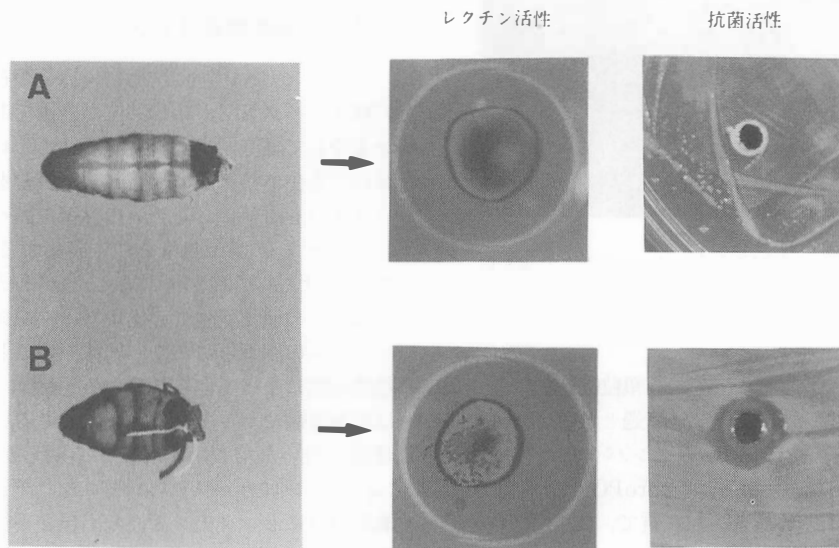


図-4 カイコの終齢幼虫を結紮後、永続幼虫 (A) と永続蛹 (B) を作り、ヒトO型赤血球に対するレクチン活性と抗菌活性を調べると、永続蛹において両活性が出現する。

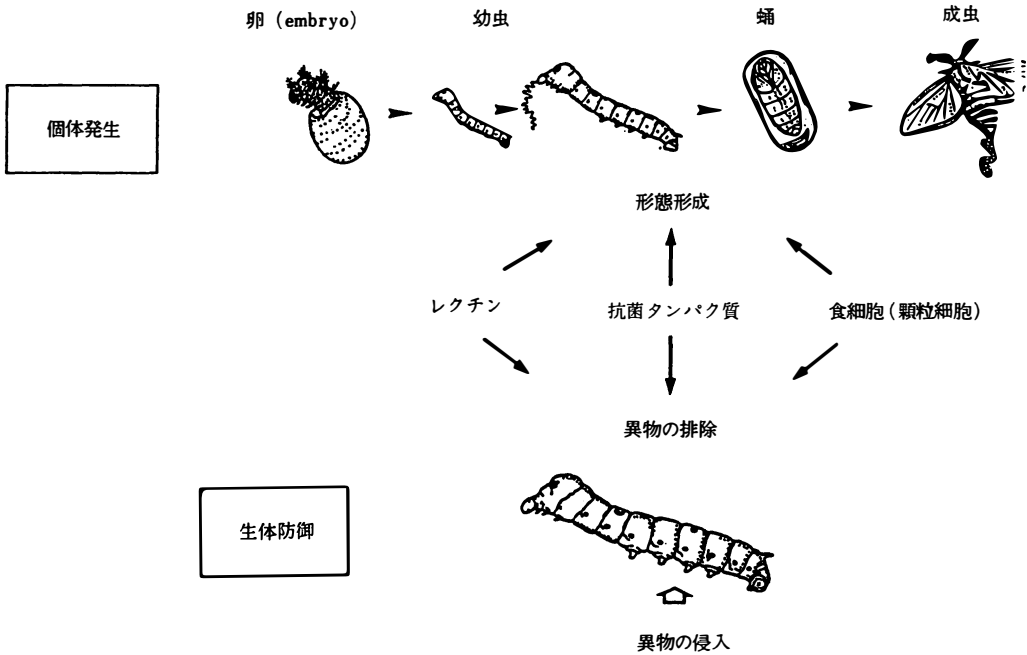


図-5 カイコのレクチンと抗菌タンパク質は個体発生の中で脱皮,変態と関連して出現するばかりでなく, 異物の侵入で食細胞による貪食作用が生じた後にも誘導されてくる。

つので, 普遍的に多くの昆虫に存在する可能性がある。

カイコで見いだされる抗菌物質は個体発生の中ではレクチンの出現と一致して脱皮や変態時に誘導されてくる(和合, 1993)。大腸菌に対する増殖阻止効果を指標に, カイコの抗菌物質が顆粒細胞による食作用と関連して誘導されるか否かを調べた結果, レクチンの誘導と同じように食作用を引き起こす異物粒子ほどより早く抗菌物質を誘導することがわかった。このことは生体防御の観点で細胞性防御反応と液性防御反応が連動していることを示していた。抗菌物質はレクチンの誘導に引き続いて産生され, レクチンよりも長く活性が維持されていた。

大腸菌などグラム陰性菌の細胞壁には内毒素としてリポ多糖体 (LPS) が存在している。この LPS を注入すると, 同時に抗菌物質が誘導される。もし LPS が顆粒細胞に貪食された大腸菌から遊離し, それがエクソサイトーシスで顆粒細胞から体液中に放出されるのであれば, 食作用による抗菌物質産生もうまく説明がつくと思われる。事実, その予想どおりに大腸菌を取り込んだカイコ顆粒細胞は LPS を放出し, この LPS で脂肪体から抗菌物質が産生されることが判明した (TANIAI et al., 1991)。なお, グラム陽性菌の細胞壁に多く存在するペプチドグリカンも同様の誘導効果を持っているので (山田ら, 1992), 顆粒細胞による細菌の貪食→消化→LPS やペプチドグリカンの放出→脂肪体→抗菌物質の遺伝子活性化

とその産生という生体防御の流れが, 昆虫の体内で生じていると考えられる。

## VI エノシトドや小球細胞も生体防御に関与するか

カイコのエノシトドや小球細胞は顆粒細胞やプラズマ細胞とは異なり付着能はなく (WAGO, 1981), これらの血球が生体防御機能を持っているなどは以前は考えられていなかった。

既述したように, proPO 活性化系は顆粒細胞の初期防御反応である付着反応を促進するが, この proPO そのものをエノシトドが主として生合成していることが金コロイド粒子を標識した抗 proPO 抗体を用いて証明された (IWAMA and ASHIDA, 1986)。カイコのエノシトドは細胞内で合成した proPO を血漿中に分泌しているので, 採血した体液はメラニン色素形成によってすぐに黒化するのである。一方, エノシトドが異物侵入ですぐに細胞崩壊して proPO を放出するような反応系を持つ昆虫も存在することが判明した (KURIHARA et al., 1992)。ハスモンヨトウのエノシトドがこのタイプで, 生体外に取り出しても同様の崩壊が1分間以内に生じる。この細胞崩壊反応はこの種にとって重要であり, 崩壊によって proPO 活性化系が作動し, 顆粒細胞の細胞性反応が発動するようになっている。

さらに、小球細胞は顆粒細胞と同じく、血漿中にペプチドグリカンや $\beta$ -1,3-グルカンを認識する認識タンパク質を合成している (ASHIDA et al., 1988)。これらの認識タンパク質が細菌のペプチドグリカンやカビの $\beta$ -1,3-グルカンと結合して proPO 活性化系が動くので、小球細胞も生体防御に深く関係していると考えられる。

## VII 昆虫の生体防御機構の制御は可能か

### —おわりに—

顆粒細胞による細胞性防御反応と proPO 活性化系、レクチンあるいは抗菌物質などによる液性防御反応は個々に独立して異物に対抗していくと考えられていたが、実は密接に両者が連動して、特に顆粒細胞の細胞行動が液性防御反応を効率的に誘導する上で重要であることが判明した。今後こうした知見を基礎に昆虫の生体防御機構を制御して、害虫の効率的防除や家畜化によって弱体化した有益昆虫の積極的保護を実行することが望まれる。

筆者は以前、害虫防除に当たり、①昆虫の皮膚に存在する低級脂肪酸を除いて糸状菌による感染を高めること、②正常な消化管内の微生物が作るマイクロフローラを変化させて感染性を高めること、③体液中のレクチンや感染防御物質の産生を抑制して防御能を低下させること、④proPO 活性化系を抑制して食細胞反応を低下させること、などがきわめて重要であることを指摘した (和合, 1984)。今後これらを考慮しつつ、さらに顆粒細胞機能を抑制する方法をみいだせば、自然界で害虫の生体防御機能を抑制することができ、農薬を使うことなく、単なる土壌微生物による日和見感染症で害虫を死に追いやることのできるであろう。この実現が筆者の夢であり、近い将来可能になるものと期待している。

この観点で今後検討すべき重要な昆虫の生体防御抑制因子として、寄生蜂の雌に由来する DNA を持つポリドナウイルスと毒液がある。さらにテラトサイト由来の proPO 活性化抑制因子も注目される一候補である。これらの因子の精製と遺伝子解析が進めば、今日あるバイオテクノロジーの技術で抑制因子の大量生産が可能になると思われる。ポリドナウイルスは最近、昆虫の顆粒細胞に侵入し、付着能を低下させて DNA 断片化を伴うアポトーシス (プログラム細胞死) を誘導することが報告されているので (PECH and STRAND, 1993)、益々注目に値する抑制因子になるだろう。また、昆虫に病原性を示す糸状菌に由来する生理活性物質の中にも、顆粒細胞の異物

認識や包囲化作用を阻害したり、proPO 活性化系を抑制する物質が存在するので (HUXHAM et al., 1989)、この方面の研究も重要になるだろう。

### 引用文献

- 1) AKAI, H. and S. SATO (1971) : J. Insect Physiol. 17 : 1665~1676.
- 2) 芦田正明 (1988) : 化学と生物 26 : 425~435.
- 3) ASHIDA, M. et al. (1988) : Tissue & Cell 20 : 599~610.
- 4) BOMAN, H. G. et al. (1985) : Dev. Comp. Immunol. 9 : 551~558.
- 5) HUXHAM, I. M. et al. (1989) : J. Insect Physiol. 35 : 97~101.
- 6) IWAMA, R. and M. ASHIDA (1986) : Insect Biochem. 16 : 547~555.
- 7) 菊地幹雄 (1980) : 生体防御の機構, 東京大学出版会, 東京, pp 19~39.
- 8) KOMANO, H. and S. NATORI (1985) : Dev. Comp. Immunol. 9 : 31~40.
- 9) KURIHARA, Y. et al. (1992) : Appl. Ent. Zool. 27 : 237~242.
- 10) PECH, L. L. and M. R. STRAND (1993) : Insect Science Symposium, Arizona, p.124.
- 11) PRICE, C. P. and N. A. RATCLIFFE (1974) : Z. Zellforsch. 147 : 537~549.
- 12) RHEINS, L. A. and R. D. KARP (1984) : ibid. 8 : 791~801.
- 13) SALT, G. (1970) : The Cellular Defence Reactions of Insects, Cambridge University Press.
- 14) SUZUKI, T. and S. NATORI (1983) : J. Biochem. 93 : 583~590.
- 15) 谷合幹代子ら (1993) : 第5回日本比較免疫学会大会講演要旨集, p.23.
- 16) TANIAI, K. et al. (1991) : 第3回日本比較免疫学会大会講演要旨集, p.19.
- 17) 和合治久 (1982) : 動物学雑 91 : 607.
- 18) ——— (1984) : 植物防疫 38 : 27~32.
- 19) ——— (1985) : 日経サイエンス 15 : 22~33.
- 20) ——— (1986) : 蛋白質・核酸・酵素 31 : 886~903.
- 21) ——— (1992) : 第4回日本比較免疫学会大会講演要旨集, p.27.
- 22) ——— (1993) : 生物情報の解明と制御による新農林水産技術の開発に関する総合研究 (報告書), p.80~81, 農林省.
- 23) ——— (1994) : 第38回日本応用動物昆虫学会大会抄録集, p.243.
- 24) WAGO, H. (1980 a) : Cell. Immunol. 54 : 155~169.
- 25) ——— (1980b) : Appl. Ent. Zool. 15 : 489~491.
- 26) ——— (1981) : Dev. Comp. Immunol. 5 : 217~227.
- 27) ——— (1982) : ibid. 6 : 655~664.
- 28) ——— (1984) : Dev. Comp. Immunol. 8 : 7~14.
- 29) ——— (1990) : Bull. Saitama Med. School Junior Coll. 1 : 3~13.
- 30) ——— (1992a) : Dev. Comp. Immunol. 16 : VI (abstract).
- 31) ——— (1992 b) : ibid. 16 : II (abstract).
- 32) ——— and Y. ICHIKAWA (1988) : Invertebrate and Fish Tissue Culture, 185~188, Springer.
- 33) 山田和寿ら (1992) : 第3回日本生体防御学会大会抄録集, p.72~73.