

昆虫の血球と生体防御

—エノシトイドの防御機能を中心に—

クミアイ化学工業株式会社生物科学研究所

くり
栗

はら
原

ゆたか
浩

はじめに

昆虫は脊椎動物で見られるような免疫記憶や反応特異性を特徴とする獲得抵抗性の免疫を持たず、侵入する寄生者をそのつどシャットアウトする手段で繁栄を築いてきた。多くの総説に述べられているように、昆虫の皮膚や前腸、後腸のクチクラ層は寄生者に対する物理的バリアーであると同時に、そこに含まれるキノンや遊離脂肪酸は抗菌作用を示す。また、消化液にも抗菌作用がある。

さらに寄生者がこれらのバリアーを突破して血液中に入ってからシャットアウトする仕組みを持っている。血液中の生体防御因子としては、顆粒細胞やプラズマ細胞等の細胞性防御因子と、抗菌物質、レクチン、メラニン色素産生系、補体等の液性防御因子がある(和合, 1986)。広義の獲得抵抗性も認められており、体内に細菌が侵入すると血球や脂肪体から抗菌蛋白質が誘導される。昆虫では15種類以上の抗菌蛋白質が知られているが(和合, 1995)、これらは免疫グロブリンと違い、その反応特異性は低く免疫記憶は認められない。

本稿では、昆虫の生体防御の最後の砦ともいえる血液において、異物処理を行う生体防御担当細胞の働きとこれを助けるフェノールオキシダーゼがエノシトイドの崩壊性と関連していかにコントロールされているかについて、ハスモンヨトウの例を中心に論じたい。

I 血球による生体防御

昆虫の血液をスライドグラスに採り顕微鏡で観察すると、顆粒細胞(図-1-F, 2-F)とプラズマ細胞(図-1-D, 2-B)はガラス面に付着伸展し、それぞれ特有の形態をとることがわかる。こうした採血後の形態変化は血球の異物への反応性の違いを示す。

カイコやハスモンヨトウの場合、異物に対する食作用は顆粒細胞が担当する。顆粒細胞が異物に接触すると表面にある糸状突起を伸ばし、異物の大きさの情報をキャ

ッチする。自身より小さい場合はベール状に膜突起を伸ばし異物を細胞質内に取り込む(Wago, 1980 b)。一方、顆粒細胞よりも大きい異物に対しては細胞質内の顆粒物質を放出することによりプラズマ細胞を活性化させ、プラズマ細胞と共に異物を包囲する(SCHMIT and RATCLIFFE, 1977)。

II 昆虫の血球の多様性

昆虫では、原白血球、顆粒細胞、プラズマ細胞、小球細胞、エノシトイドなどの血球がよく知られている。ところが、カイコ以外の昆虫種ではさらに多くの血球が報告されており、また発育ステージが異なると血球の種類

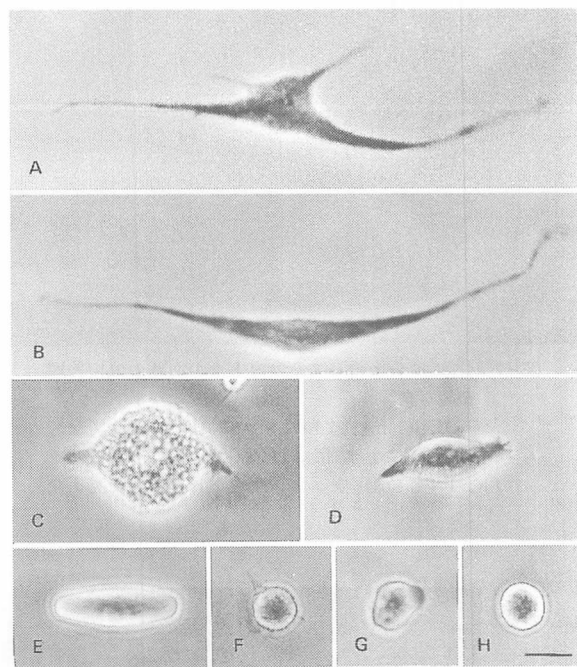


図-1 ハスモンヨトウの血球の位相差顕微鏡写真(2.5% グルタルアルデヒド固定)

バーは10 μm 。A:ポドサイト(podocytes), B:ポドサイト(バーミフォーム細胞タイプ)(vermiform-cells), 細胞の長さは75~150 μm , 厚さ約2 μm 。C:顆粒プラズマ細胞(granular plasmatocytes), D:プラズマ細胞(plasmatocytes), 採血直後は紡錘形をしている。E:エノシトイド(oenocytoids), F:顆粒細胞(granulocytes), G:小球細胞(spherulocytes), H:原白血球(prohemocytes)。

Insect Hemocytes and Host Defense. —Possible Defensive Function of Oenocytoids— By Yutaka KURIHARA

(キーワード:血球, 血液, フェノールオキシダーゼ, エノシトイド)

も違ってくる。

図-1 は採血直後のハスモンヨトウ幼虫の血球であるが、基本的な5種類の血球に当てはまらない血球も存在する。図-1-Cは大型の顆粒を含んだ血球であるが、培養するとスライドガラス上でアメーバ状に伸展し(図-2-A)、異物として体内に注入した大型ラテックス粒子への包囲化参画は認められたが墨粒子への食作用が認められず、明らかにプラズマ細胞の特徴を備えている(顆

粒プラズマ細胞)(KURIHARA et al., 1992 b)。また, Vermiform cells (図-1-B) および Podocytes (図-1-A) はプラズマ細胞の一種と見られていたが, 両者とも採血後時間を経ても浮遊したままであり, 多数の細胞質突起を有する付着性のない細胞に形態変化したことから(図-2-E), これらはプラズマ細胞とは性質が異なるとされ, ポドサイトと総称されている(KURIHARA et al., 1992 a)。ポドサイトは他の鱗翅目でも認められ, 例えばニカメイガではクラゲのように突起の間に膜を有した細胞が浮遊しているのが観察される。これらの細胞の機能については不明であり, 昆虫の血球に未知の機能が隠されている可能性がある。

ところで, ハスモンヨトウのエノシトイドはラグビーボールをさらに細長くしたような形をしているが, 採血するとただちに崩壊してしまう。図-3はエノシトイドの崩壊の様子を低温下で撮影したものである(KURIHARA et al., 1992 b)。その細胞質には長軸に沿って繊維束を有し, 崩壊時これが折れ曲がり細胞質の内容物を放出する。このことから, この細胞は崩壊する機能を有していると考えられる。

III 生体防御担当細胞とフェノール オキシダーゼ

液性の防御因子の中で, メラニン色素産生系はフェノールオキシダーゼ(PO)を中心に特に重要である。メラニン色素形成の過程で生じるキノンは侵入微生物の増殖を抑制する。また, POは血球の異物処理を促進する働きがあり, 異物に付着した顆粒細胞はPOによって脱顆粒化が促進され包囲化が進行するが, POの生成を抑制すると顆粒細胞は異物に付着できない(WAGO and ICHIKAWA, 1988)。

体外に出た血液が黒くなるのはこのPOのためであるが, 体内でPOが働かないのはPOが前駆体(proPO)

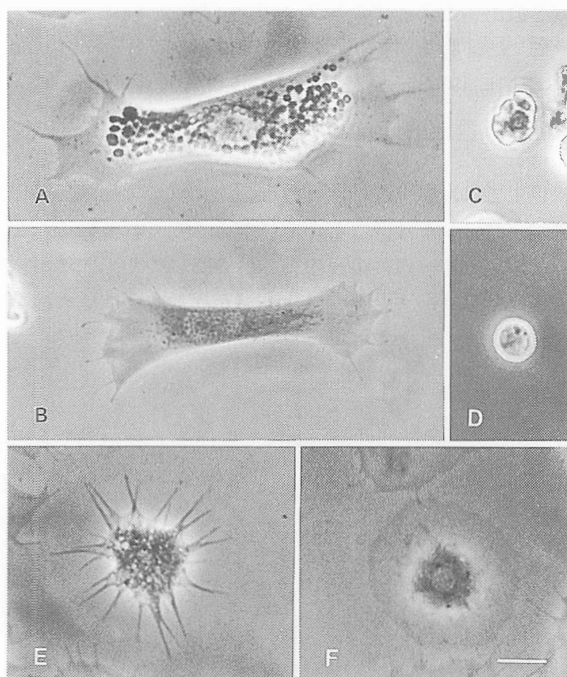


図-2 採血40分後のハスモンヨトウの血球の位相差顕微鏡写真

バーは10 μ m。A: 顆粒プラズマ細胞, B: プラズマ細胞, C: 小球細胞, D: 原白血球, E: ポドサイト, F: 顆粒細胞。エノシトイドは崩壊して見えない。

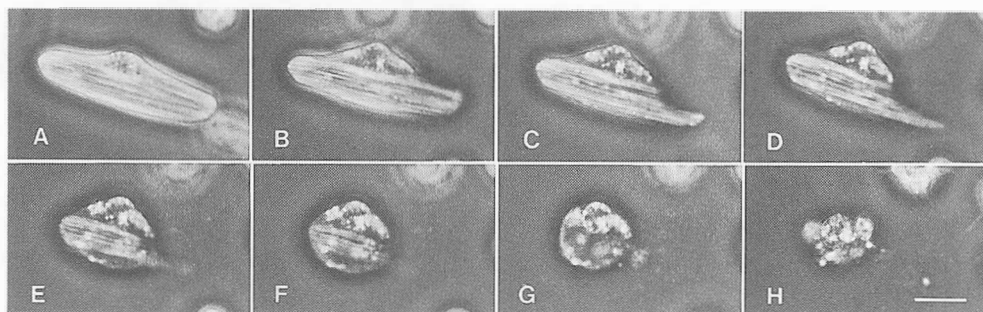


図-3 ハスモンヨトウのエノシトイドの崩壊過程 (10°C)

A~H: 採血後時間 (20, 23, 26, 29, 32, 35, 60, 120 秒)。バーは10 μ m。

として存在しているからである。proPO の活性化は、 β -1,3-グルカン（ザイモサン A）やペプチドグリカン等（エリシター）が引き金になっている（YOSHIDA and ASHIDA, 1986）。また、障害を受けた自己変性成分も引き金になる。これらはエリシターを認識するタンパク質と結合し、セリンプロテアーゼを活性化させ、これが proPO を活性化させる。このカスケード反応は、フェノールオキシダーゼ前駆体活性化系（Prophenol-oxidase activating system; proPO-AS）と呼ばれている。

IV エノシトイドとフェノールオキシダーゼ

カイコでは proPO がエノシトイドから供給されていることが知られている（IWAMA and ASHIDA, 1986）。カイコのエノシトイドは表面が滑らかな球形の大型の細胞である。しかし、前述したとおりハスモンヨトウのエノシトイドは形態、安定性ともカイコのそれとは大きく違っている。そこで、ハスモンヨトウとカイコのエノシトイドが機能的に同じであるかどうかを検証してみた。

エノシトイドの崩壊を防ぐため、グルタルアルデヒドを体腔内に注入して血球を固定し、PO の基質である DOPA 溶液中に採血したところ、エノシトイドのみがメラニン化し褐色を呈した（図-4）。メラニン化はエノシトイドの表面ではなく細胞質で起こり、セリンタイプのプロテアーゼ阻害剤である pNIPGB（p-nitrophenyl-4-guanidinobenzoate hydrochloride）で抑制された。これは、ハスモンヨトウのエノシトイドも proPO-AS を持っていることを強く示している。

V ハスモンヨトウのエノシトイド崩壊の意味

エノシトイドが崩壊するのは、異物反応によって proPO を放出するためとも考えられた。この仮説を証明するためには、エノシトイドを崩壊させない実験系が

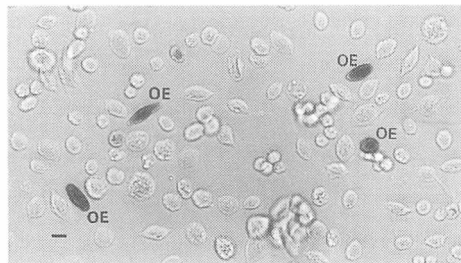


図-4 グルタルアルデヒドで固定したハスモンヨトウ血球の DOPA 反応
エノシトイドのみがメラニン化している。バーは 10 μ m.

必要となったが、炭酸ガスを満たしたチャンバーの中で採血すると崩壊しないことをつきとめた。そこで、炭酸ガス中で採血した血漿と血球の PO 活性を、空気中で採血したものと比較した。その結果、血漿中ではエノシトイドの崩壊によって PO 活性が高まり（図-5）、血球中ではその逆であることが明らかになった。すなわち、proPO はエノシトイドの内容物が存在する画分に含まれており、エノシトイドの崩壊によって血液中に放出されるものと考えられる。

VI proPO 放出戦略の昆虫種による違い

エノシトイドが採血後崩壊しやすいと報告されているのは、ハスモンヨトウの他にヤガ科の *Heliothis virescens* 等がある。そこで、5 種鱗翅目幼虫（ハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウ、スジキリヨトウ、カイコ、ニカメイガ）についてエノシトイド崩壊までの時間を調べてみた。

崩壊までの時間はハスモンヨトウが 45 秒と最も短かった。続いて同属のシロイチモジヨトウとスジキリヨトウの 1.5 分であった。これに対し、カイコではエノシトイドが崩壊するまでに約 4 分を、ニカメイガでは約 40 分を要した。

次にエノシトイドが崩壊しないよう炭酸ガス中で採血し、血球中の PO 活性と血漿中 PO 活性を比較した（図-6）。その結果、ハスモンヨトウ、シロイチモジヨトウ、スジキリヨトウでは PO 活性が血球で高く血漿で低かった。これに対し、カイコでは血漿と血球の両方で高い PO 活性が認められ、ニカメイガでは逆に血球に比べ

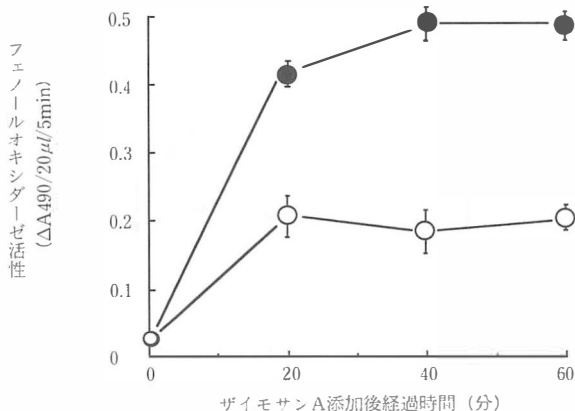


図-5 エノシトイドの崩壊が血漿中フェノールオキシダーゼ活性に及ぼす影響

●：エノシトイド崩壊物を含む血漿（空気中採血）、
○：エノシトイド崩壊物を含まない血漿（炭酸ガス中採血）。

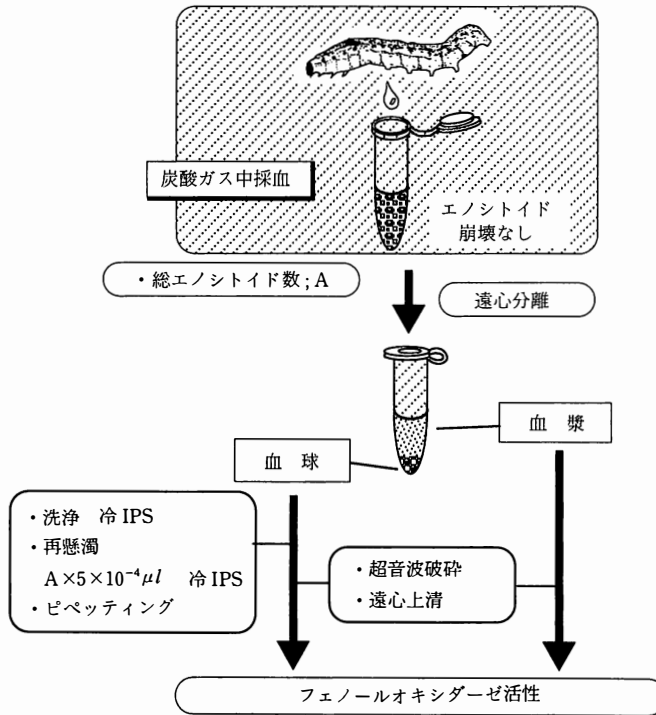


図-6 フェノールオキシダーゼ活性分布測定のための試料調製

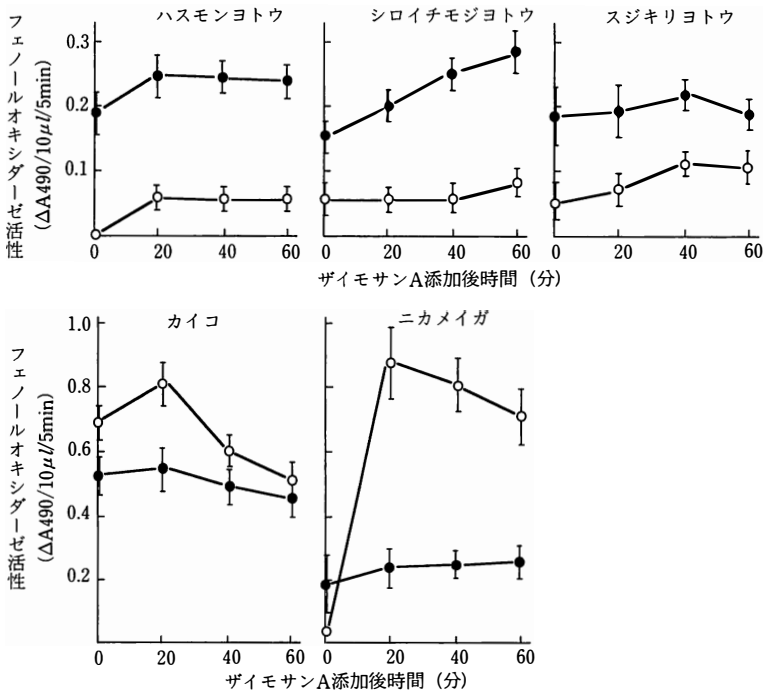


図-7 血球破碎液上清および血漿のフェノールオキシダーゼ活性
血液は炭酸ガス中で採血し、エノシトイドの崩壊を防いだ。

●—●: 血球破碎液上清, ○—○: 血漿, (栗原, 1997)。

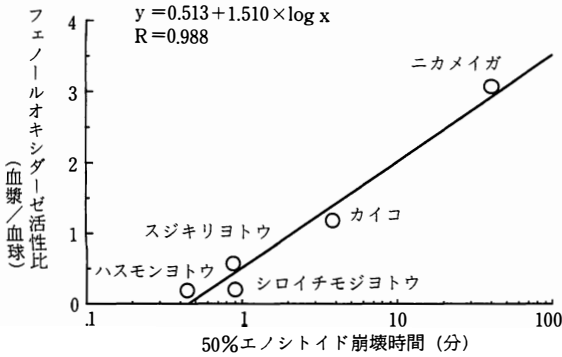


図-8 5種昆虫におけるエノシトイド崩壊時間とフェノールオキシダーゼ活性の関係

で著しく高い活性が血漿で認められた (図-7)。

図-8はザイモサンA添加40分後のOD値を指標にしてPO活性の血漿/血球比を求め、これと各昆虫のエノシトイド50%崩壊時間の関係をまとめたもので、崩壊時間の対数と血漿/血球のPO活性比には明確な直線関係が認められる。すなわち、ProPOはニカメイガのように崩壊時間が遅い昆虫では常時血液中に分泌されており、ハスモンヨトウのように崩壊しやすいエノシトイドを持っている昆虫ではエノシトイドに局在し異物の侵入に応じて血漿中に放出されていると考えられる。

おわりに

獲得抵抗性免疫に頼らずに数億年をも生き継いできた昆虫は、それに代わる免疫システムを備えている。自らが崩壊して異物処理の一翼を担うエノシトイドもその一つだ。昆虫の血球には多様性があり、まだたくさんの未知の機能が隠されているに違いない。

本稿をまとめるにあたり、埼玉医科大学短期大学和合治久教授に貴重なご指導をいただいた。

引用文献

- 1) IWAMA R. and M. ASHIDA (1986): Insect Biochem. 16: 547~555.
- 2) KURIHARA Y. et al. (1992 a): Appl. Entomol. Zool. 27: 225~235.
- 3) ——— (1992 b): Appl. Entomol. Zool. 27: 237~242.
- 4) 栗原 浩 (1997): 動物の血液細胞と生体防御, 葉根出版, 東京, pp. 89~116.
- 5) SCHMIT A. R. and N. A. RATCLIFFE (1977): J. Insect Physiol. 23: 175~184.
- 6) WAGO H. (1980 b): Appl. Entomol. Zool. 15: 489~491.
- 7) 和合治久 (1986): 蛋白質 核酸 酵素 31: 886~903.
- 8) WAGO H. and Y. ICHIKAWA (1988): Invertebrate and fish tissue culture, Scientific Societies Press, Japan, pp. 185~188.
- 9) 和合治久 (1995): 応動昆 39: 1~13.
- 10) YOSHIDA H. and M. ASHIDA (1986): Insect Biochem. 16: 539~545.

学 界 だ よ り

○第18回農薬生物活性研究会シンポジウム「農薬開発の新しい流れII」

■日時: 平成13年4月20日(金)10:00~17:00

■場所: 東京農業大学校友会館 (グリーンアカデミー)
世田谷区桜丘 3-9-31, TEL 03-3429-1983, 小田急線 経堂駅または千歳船橋駅から徒歩で約15分, 千歳船橋駅からバス (渋谷駅行: 渋23, 等々力行: 等11, 用賀駅行: 用01) で約5分桜丘中学校前下車。東急新玉川線 (地下鉄半蔵門線) 用賀駅からバス (祖師谷大蔵駅行: 用01) で約15分農大成人学校前下車。

■プログラム (一部変更する可能性があります。)

1. 殺ダニ剤ピフェナゼートの作用性について
春山 裕史氏 (日産化学)
2. トルフェンピラドの開発
野仲 信行氏 (三菱化学)
村井敬三郎氏 (大塚化学)

3. バチルス・チューリンゲンシスの多様性と利用
宮本 和久氏 (蚕昆研: 4月改称予定)
4. フェントラザミドの開発
五島 敏雄氏 (日本バイエルアグロ)
5. 新規水稲除草剤オキサジクロメホンの作用特性 (仮題)
鈴木 久人氏 (アベンティスグループ)
6. 新規イミダゾール系SBI剤オーシャインの開発と生物活性
森田 孝延氏 (大塚化学)
西村 孝氏 (宇都興産)
7. 新規殺菌剤NF-149の生物活性と特性
佐野 慎亮氏 (日本曹達)
8. バイオキパーの開発 (仮題)
高原 吉幸氏 (セントラル硝子)

■参加費: 参加費 5,000円 (講演要旨代を含む) 当日会場にて受付 (事前申込み不要)。

■連絡先: 〒243-0034 厚木市船子1737 東京大学農学部 農学科植物保護研究室: 根岸 寛光氏
TEL: 046-270-6498, FAX: 046-270-6226
E-mail: negishi@nodai.ac.jp