

つ貝の場合には、赤血球と非赤血球を分けるが、非赤血球の分類については未だ統一見解は無い。しかし、形態学的分類においては、胞体内に顆粒を持つ細胞（顆粒球、granular cell）と顆粒を持たない細胞（無顆粒球、agranular cell または hyaline cell）に大別することが一般的である。染色性により好塩基性、好酸性細胞に分ける研究者もある。さらには、組織学的な分類だけでなく、血リンパ球の生存下での顕微鏡学的観察、比重分離法による細胞分取後の機能的検索、細胞成分の生化学的検索など、細胞の機能をも考慮した分類も報告されている。

分担者は、アコヤ貝において心臓採血あるいは閉殻筋採血後に得た血リンパ液をスライドグラスに塗抹し、ホルマリン固定乾燥後にメイギムザ染色を施し、顕微鏡下に顆粒球と無顆粒球に分類し細胞比率を測定している。

一方、貝類の循環血リンパ球は高等動物のそれに比して数が少ない。その分、組織に留まる血リンパ球が免疫機構に占める働きの部分が大きいと考えられる。消化吸收にかかわる消化盲囊細管上皮細胞のうちヘマトキシリン染色性の低い細胞（light cell）、アコヤ貝での心房上皮組織を募集して形成するポア細胞（pore cell）、組織中に広く分布する細網細胞（reticulum cell）などは、異種あるいは変性自己蛋白の貪食・消化を行い細胞性免疫において重要な役割を担っていると考えられる。しかし、循環血リンパ球に比べて研究が進んでいない。

3) 血リンパ球遊走能

原始的な免疫機構をもつ生物にあっても、細胞性免疫が非特異的攻撃を行う場合に標的となる異物に対して接近することは初期の防御機能として大きな役割を持つ。貝類の血リンパ球においても遊走能をしめす細胞が存在する。遊走能はアメーバ状の運動を行い方向性を持たない不規則な随意運動能力と誘引物質（走化性因子）の濃度勾配の高いほうへ向かって移動する走化性の両方の総和として評価される。貝類の血リンパ球の走化性評価の

際には微生物由来の菌体成分や産生物質が用いられ、大腸菌培養濾液などが一般的である。測定条件によっては随意運動能と走化性を区別して測定ができる。アコヤ貝において、走化性は顆粒球、無顆粒球の双方に認め、随意運動能は顆粒球の方が上回るとの報告がある。

分担者はアコヤ貝において 10% 大腸菌培養濾液を走化性因子として総合的に遊走能を測定している。

4) 血リンパ球食作用

原始的な非特異的細胞性免疫では、異物への接着、貪食作用とそれに引き続き行われる細胞内消化が主な機能であり、この一連の機能を食作用という。細胞表面に接着した異物を細胞膜が取り囲み、やがてファゴソーム（食胞）という小胞体を形成する。このファゴソームは分解酵素を中に含むリソソームと融合し、その中で酵素群は異物と遭遇し分解を行う。これを細胞内消化という。異物の消化の段階で、異物が外来微生物である場合には殺菌が行われる。この殺菌過程においては、次項で述べる H_2O_2 が重要な働きをもつ。また、消化の結果として、栄養素であるグリコーゲンあるいは不要物質が形成され、グリコーゲンがエネルギー源として一部細胞内で利用されるほか不要物は細胞外に排出される。生殖活動後に不要となった生殖組織は、生体不要物質として血リンパ球の食作用によって食作用を受けグリコーゲン貯蔵組織に置き換えられていく。血リンパ球は異物である細菌など病原体をも貪食するが、その全てを処理し消化できるとは限らない。処理、消化されなかった病原体は血リンパ球を破壊し貝個体にも死をもたらすこととなる。従って、貝類において生体防御機構と栄養素の取り込み貯蔵機能に関与する食作用は、個体の健康度と密接な関係にあると考えられる。

食作用の測定法は、一般的には採取した血リンパ球を用いての *in vitro* での異物粒子の貪食を評価することが行われている。粒子としてサイモザン、墨汁滴などが用いられる。また、食作用の初期の段階と考えられる走化

性因子やレクチンなどとの接触能を評価する試みもなされている。さらに食作用の一環として細胞性免疫機構の一翼を担っている消化酵素活性の測定を行う方法もある。消化酵素としてペルオキシダーゼ、N-アセチル- β -D-グルコシダーゼ、キモトリプシン様酵素、酸性フォスファターゼ、 β -グルクロニダーゼなどが測定される。分担者はアコヤ貝において血リンパ球の食作用評価として、血リンパ球の 20℃、*in vitro* 培養系でリチウムカルミン粒子を接触させ、その取り込みを見ることにより貪食能を測定している。

5) 血リンパ球活性酸素産生量

血リンパ球は、食作用の一環として細胞内に取り込んだ外来微生物などを殺菌する。哺乳動物同様に、貝類においても細胞内殺菌においては活性酸素 (O_2^- や H_2O_2) が重要な役割を持っている。血リンパ球の活性酸素の産生能は生体防御ことに外来病原微生物に対する抵抗性と密接に関連すると考えられる。 H_2O_2 産生量の評価は、ホモバニリン酸蛍光測定法ないしニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 反応などによって測定されて行われる。

分担者はアコヤ貝において血リンパ球の 20℃、*in vitro* 培養系で NBT 試薬を作用させ、生成される不溶性青色物ホルマザンにより青色を呈する細胞を顕微鏡にて観察して評価している。

6) 血リンパ球の安定性 (被細胞毒性)・細胞活性血リンパ球の細胞膜傷害をニュートラルレッドの細胞質内貯留で見る方法がある。傷害された細胞の膜透過性が高まることによって色素の細胞内流入が増すことを指標として観察する。この方法は純粋な免疫学的方法というよりは毒性学的検索法である。また、R1 標識核酸の細胞内取り込みを測定することによって細胞の活性を評価することも試みられている。

(C) 総合的免疫能

病原性微生物あるいは常在 (共生) 微生物による感染実験がおこなわれている。用いられている微生物は、海棲細菌であるビブリオ、原虫であるパーキンサスに主に用いられている。

異物排除能力も免疫能が本来持つ重要な働きであり、閉殻筋に異物微粒子を注射しその血リンパ液からの排除を観察する検索法も工夫されている。この作用は主に血リンパ球の貪食作用によるところが大きい。サイモザンや色素であるニュートラル・レッドなどが用いられている。

移植片拒絶反応も生態防御機能の重要な働きである。この作用には、移植された外来物の異物としての認識力と排除のための細胞性免疫能が関わっている。アコヤ貝は真珠養殖に使われ、その際に核を挿入する作業が必須であるために異物排除機構に関しての研究が行われている (青木, 1965; 和田, 1987)。

参考文献

- 1) 青木駿, (1965), 挿核, 真珠養殖全書, 真珠養殖全書編集委員会, Pp. 166-204, 全国真珠養殖漁業協同組合連合会.
- 2) 森勝義, (1995), 貝類の生体防御機構, カキ・ホタテガイ・アワビ生産技術と関連研究領域- (野村正監修), Pp. 181-206, 恒星社厚生閣.
- 3) 和田浩爾, (1987), 真珠貝の体力と生体防御能力, 全貝連技術研究会報, 3, 5-13.

1.2.2. 昆虫類

(和合治久)

体表面での生体防御 (サーフェスバリアー)

昆虫は左右対称のキチン質から構成される外骨格をもち、寒さや乾燥に強く繁殖力が大きいという特徴をもっている。体表面の表皮細胞はクチクラ層を形成しているリピドや β -ポリ-アセチルグルコサミンから成るキチンと種々の蛋白質を分泌している。クチクラ層が硬化したものが外骨格であり、真皮細胞と基底膜と一緒に昆虫の皮膚を形づくっているが、この皮膚の最外層を外表皮、その内側を

原表皮と呼んでいる。一般的に、外表皮にはセメント層、ロウ層、ポリフェノール層、クチクリン層が存在し、この部位に特に生体外の異物（病原体）侵入を阻止する物理的及び化学的な生体防御のバリアーが構築されている(和合、1995、1999)。

皮膚の真皮細胞は飽和脂肪酸、カプリン酸、カプリル酸、フェノール、3、4-ジオキシ安息香酸などを含み、こうした物質によって特にカビなどの真菌類の発芽や発育を阻害することができる。さらに、真皮細胞はグラム陰性細菌やその細胞壁成分のリポ多糖体の侵入あるいは刺激によって細菌を殺す抗菌蛋白質の1種であるセクロピンを合成する能力があり、積極的に皮膚を介した細菌類の昆虫体内への侵入を食い止めている(Ashida と Brey, 1995; Brey ら 1993)。

一方、表皮や脱皮の際に分泌される脱皮液には、フェノール酸化酵素前駆体(proPO)が存在し、黒色のメラニン色素形成に関与している。特に、皮膚からカビ類や細菌類が侵入すると、これらの細胞壁の構成成分である β -1, 3-グルカンやペプチドグリカンなどによって、proPO が活性化して PO が生じ、これが真皮細胞に存在するフェノール物質を基質にして最終的にメラニンを形成させる。このプロセスは、体表の損傷によっても生じ、メラニン形成によって出血も止まるため、昆虫の重要な生体防御反応の1つである(和合、1995)。

サーフェスバリアーとして機能する体壁

皮膚—表皮(クチクラ)—外表皮—セメント層
ワックス層
蛋白性外表皮—多価フェノール
クチクリン
原表皮—外原表皮
内原表皮
真皮(飽和脂肪酸、カプリン酸、カプリル酸、
フェノールなど)
(セクロピン合成)
基底膜
*脱皮液--フェノール酸化酵素前駆体が存在

消化管での生体防御

昆虫の口から肛門に至る上皮組織の管は消化管として機能し、食物からの栄養を吸収している。この消化管は機能的に前腸、中腸、後腸の3つの部分からできているが、前腸と後腸には外胚葉由来のクチクラ層が存在するので、それは皮膚のものと同様に異物侵入を阻止する物理的バリアーとして機能している。内胚葉由来の中腸は一方で摂取した食物の消化と吸収を行っており、その内側にはキチン、ムコ多糖、蛋白質から構成される薄い開食膜が存在するため、食物と中腸上皮細胞の直接的接触が阻害されており、中腸における生体防御に役割を果たしている。

消化管に分泌される消化液の中には、細菌に対する抗菌物質や核多角体病ウイルスに対する抗ウイルス性蛍光蛋白質が存在し、微生物に抵抗している。さらに、昆虫の消化液はアルカリ性であり、pH10位の種類も知られ、強アルカリ条件で生育できない細菌などに対抗することができる(和合、1995)。

血体腔での生体防御

(A) 細胞性の防御反応

A-1) 昆虫の血球

昆虫の血体腔には背脈管の力で体液が循環している。この中に、血球が存在し、皮膚や消化管を突破して侵入する異物を攻撃する昆虫の免疫担当細胞が観察される。血球の種類や構成比は昆虫の種類によって異なっているが、どの種類にも共通して存在するのは、顆粒細胞(granular cell)とアメーバ状のプラズマ細胞(plasmatocyte)である。これらの血球は食食という小型異物を捕食して処理する機能(食作用)と大型の異物を包囲して生体内隔離する機能(包囲化作用)をもち、細胞性防御反応に重要な役割を演じている。

チョウやガの場合、顆粒細胞とプラズマ細胞のほかに、原白血球、小球細胞、エノシトイドの3種類が存在している。細胞学的には、細胞質に小型の顆粒を数多くもち、異物に付着すると糸状突起を放射状に伸展させるのが顆粒細胞で、アメーバのように膜状突起(偽

足)と糸状突起を伸展させて付着し、運動能を示すのがプラズマ細胞であり、昆虫マクロファージとも呼ばれている。形態学的に細胞表面が滑らかで球状の血球が原白血球、細胞質に小球という大型の顆粒をもつので表面がゴツゴツしているのが小球細胞、血球の中でもっとも大型で細胞質に三日月型の構造をもっているのがエノシトイドである。これらの血球の割合と形態は個体発生の中で大きく変動し、特に脱皮や変態時には著しく変動する(和合、1995)。

さらに、特殊な血球として、シストサイト、アディポヘモサイト、ポドサイトなどの血球がある種の昆虫に観察されている。

A-2) 血球の由来

昆虫の血球は基本的には造血器官で成熟分化し、血体腔中に放出されることが知られている。鱗翅目昆虫の場合、幼虫期の前胸部にある翅芽に隣接した部位に造血器官があり、ここで顆粒細胞、プラズマ細胞、原白血球、小球細胞、エノシトイドなどの血球種が作られ、体液中に放出されることが判明している。放出された血球種の中で、顆粒細胞と原白血球は有糸分裂する能力があり、その数を調節している。

A-3) 細胞性防御反応と昆虫の免疫担当細胞

昆虫の細胞性防御反応には、前述の食食作用及び包囲化作用のほかに、細菌感染の時に見られるノジュール形成という反応も存在する。この反応は、細菌を食食した顆粒細胞がお互いに集合してノジュール(小節)を作るタイプであり、この反応によって食食された細菌は周囲に拡散することができなくなるため、昆虫の生体防御にとって重要である。これらの3つの防御反応には、顆粒細胞とプラズマ細胞が関与するので、この2種類の血球は昆虫の重要な免疫担当細胞として位置づけられるが、この他にもこうした細胞性防御反応を支援する形で間接的に防御に関与する血球も存在している。特に顆粒細胞の異物応答の中で付着反応を促進するフェノール酸化酵素前駆体活性化系を構成している因子を産

生する小球細胞とエノシトイドは新たな昆虫の免疫担当細胞である。すなわち、小球細胞は血漿中にペプチドグリカンや β -1, 3-グルカン認識する認識蛋白質を合成し、メラニン色素形成過程の上位の生化学的反応であるセリンプロテアーゼの活性化に関与する一方、エノシトイドはフェノール酸化酵素前駆体を生合成している(和合、1995)。

昆虫の血球と生体防御への関与

顆粒細胞、プラズマ細胞 — 食作用、包囲化作用、
ノジュール形成、
防御物質の産生

小球細胞 — ペプチドグリカン認識蛋白質の合成
B-1、3-グルカン認識蛋白質の合成
エノシトイド — フェノール酸化酵素前駆体の合成

A-4) 顆粒細胞の防御機能発現

顆粒細胞は糸状突起を細胞表面にもち、これを付着異物に伸展させて異物を捕まえ、最終的に細胞質内に取り込んで消化する。この食食過程は、異物への付着、糸状突起の伸展、膜状突起の伸長、取り込み、ファゴゾーム形成、消化というプロセスから成立しているが、この中で糸状突起の伸展は異物を捕まえ異物情報をキャッチする上できわめて重要である。この突起にはマイクロフィラメントが機能し、この機能発現で生じる突起伸展が次の細胞行動を進行させる上で鍵を担っている。

昆虫は生体内に侵入する物体(病原体)を非自己と認識することができるが故に、一連の細胞性防御反応を発動させることができる。一般的に、昆虫類では、非自己になるものは異種移植片であり、それが血体腔に移植された場合には血球反応を被り拒絶される。この拒絶には顆粒細胞が関与していて、特に基底膜のムコ多糖類の分子構造上変化のある部位には特に強く反応していくことが知られている。

昆虫の食食細胞は侵入異物ばかりでなく、自己体内で生じた非自己的変性細胞なども異物と認識して排除することができる。よく観察される現象は幼虫期の組織崩壊が生じ蛹の

組織が新たに再構築される変態期で、この時期の血液細胞（食食細胞）は幼虫期には存在しなかった細胞膜蛋白質を発現し、この分子によって幼虫期の組織（例えば、脂肪体の基底膜）に結合し、それを非自己と認識して、キモトリプシン様プロテアーゼを放出し、幼虫期の組織を分解することが判明している（名取、1991）。

（B）液性の防御反応

B-1）感染防御因子としての抗菌蛋白質

微生物の中でも特に昆虫に細菌感染を引き起こす細菌類に対抗する手段として、昆虫は抗菌性の蛋白質を発現して、感染から免れている。現在までに約 100 種類もの物質が分離、精製され、アミノ酸配列まで決定されている。これらの抗菌蛋白質は大きく 5 つに分類することができる。これらは、セクロピン、アタシン、ディフェンシン、高グリシン含有抗菌性蛋白質、高プロリン含有抗菌性蛋白質であり、その他に属すタイプも知られており、多くは細菌感染に関連して脂肪体あるいは血球において合成され、体液中に分泌され、細菌に対して抗菌的に作用している（Hultmark、1993；谷合と山川、1999）。

a）セクロピン類

セクロピア蚕で最初に発見された分子量約 4 kD の抗菌蛋白質で、A、B、C、D の 4 つの型が存在している。2 個のアルファヘリックス構造があり、両親媒性で短い強塩残基の N 末端と長い疎水性の C 末端が見られる。細菌のグラム陽性、陰性を問わず殺菌作用を示すが、陰性菌の方が感受性が高い。このタイプの物質は、細菌の細胞膜リン脂質に作用し表面に穴を開け、細胞膜の電気化学的ポテンシャルを破壊することにより能動輸送を停止させて障害を与えることが知られている（Ando ら、1987；Kato ら 1993；山川、1997）。

b）アタシン類

グリシンに富むドメインをもち、分子量約 20kD の物質で、主として対数増殖期にあるグラム陰性細菌に抗菌的に作用する。抗菌活

性は比較的弱く静菌的で、一般的に細菌の外膜の浸透性機能に影響し、細胞分裂の不規則性を誘導したり、細胞壁ペプチドグリカンの合成を阻害する作用が観察されている（Ando and Natori, 1988）。

c）ディフェンシン類

この抗菌物質は分子量約 4kD で構造上、システインをもち、3 個のジスルフィド結合で折り畳まれているのが特徴である。昆虫類に存在するディフェンシンは哺乳類のマクロファージが合成するディフェンシンと相同性が高く、昆虫ディフェンシンと呼ばれている。どちらも血液細胞に由来することを特徴とし、細菌の細胞質膜をターゲットに、イオンチャンネルを形成し、細菌内膜の部分的減極、ATP 減少、細胞質カリウム流出などを引き起こし、細菌を攻撃することが判明している（山川、1997）。

d）高グリシン含有抗菌性蛋白質類

分子量が 10kD 前後でアタシン類とは異なるグリシン残基を多く含有する抗菌蛋白質であり、主としてグラム陰性細菌に作用する。ディプテリシンやヒメノプタエシンが分離同定されている。

e）高プロリン含有抗菌性蛋白質類

分子量が 2-4kD のペプチドで、プロリン残基に富んでいる。主としてグラム陰性細菌に作用するが、抗菌活性の発現には糖鎖が重要である。ドロソシン、フィロホコリシン、レボシンなどが分離同定されている。

f）その他の抗菌蛋白質類

カイコのモリシン、ハマダラバエのセラトトキシンは昆虫特有の抗菌性蛋白質であり、構造上、アルファヘリックスをもっている。

B-2）感染防御因子としての抗真菌性蛋白質

昆虫類はカビなど真菌類に対抗する手段の 1 つとして、抗真菌性の蛋白質を発現している。センチニクバエには AFP という分子量約 7kD で耐熱性の物質が存在し、例えばカンジダ菌の細胞膜を標的に細胞障害することが報告されている。また、ドロソミシンという抗真菌物質がショウジョウバエから分離精製されて

いる。脂肪体で合成され体液へと分泌されるこの物質は、植物由来の 5kd 抗真菌蛋白質と相同である。さらに、ホトリシンがチョウセンクロコガネから、メチニコウインがショウジョウバエから見出されている (Fehlbaum and Bulet, 1994; Iijima ら 1993)。

B-3) リゾチーム

動植物に広く分布している生体防御蛋白質で、昆虫においてもハチミツガ、カイコ、セクロピア蚕から分離されている。リゾチームの cDNA 解析から、昆虫リゾチームがニワトリ型に相同であることが判明している。一般的に、この防御蛋白質は、ミクロコッカス・ルテウスやバチルス・メガテリウムなど一部の細菌にだけ作用し、細胞壁ペプチドグリカンのグリカン鎖を切断して抗菌性を発揮する。

昆虫類の代表的な抗菌蛋白質

主として脂肪体由来 —— セクロピン類

(細菌細胞膜チャネル形成)

アタシン類

(グラム陰性菌の外膜蛋白質合成阻害)

(ペプチドグリカン合成阻害)

主として血球由来 —— ディフェンシン類

(グラム陽性菌細胞膜)

B-4) レクチン

レクチンは動植物に広く存在する細胞凝集性の糖蛋白質である。昆虫には数多くの種類のレクチンが見出されており、異物侵入や個体発生的に脱皮や変態時、あるいは損傷時に産生されることが特徴である。昆虫レクチンの生体防御機能として、レクチンが認識する糖鎖をもつ異物細胞を凝集し、その生体内拡散を防止すると同時に、血球によって処理されやすくすること、食細胞と異物とを橋渡し、オプソニンとして機能すること、そして食細胞機能を活性化して異物殺菌能を高めること、などが考えられ、これらは実験的に証明されている。一方、昆虫レクチンは生体防御機能をもつばかりでなく、個体発生あるいは再生においても重要であり、形態形成蛋白質とし

ても機能している (和合, 1995)。

昆虫類のレクチンとしてよく研究されているものは、センチニクバエのザルコファーガレクチン、ワモンゴキブリの LPS 結合蛋白質やリジェネクチン、カイコのヘモサイチンなどである。また、血球の中で、顆粒細胞には D-ガラクトース、プラズマ細胞にはマンノースや N-アセチル-D-グルコサミンなどの糖類が存在し、自己レクチン分子が結合することも報告されており、レクチン依存性の細胞性防御反応が促進すると考えられる (Kotani ら, 1995)。

B-5) フェノール酸化酵素前駆体活性化系

昆虫のフェノール酸化酵素前駆体 (proPO) は活性化するとフェノール酸化酵素 (PO) になり、この酵素によってチロシンやドーパのようなフェノール性物質が酸化され、最終的にメラニンの黒色色素が形成される。この一連の酵素反応は異物認識と関係し、特に真菌類や細菌類の侵入で引き金が引かれる。特にチロシナーゼ型の PO の前駆体は、体液のみならずクチクラ、表皮に存在し、生体防御に役割を果たしている。

proPO は血球の 1 種であるエノシトイドによって体液中に供給されており、通常はこの不活性な状態で存在するが、ペプチドグリカンをもつ細菌や β -1, 3-グルカンをもつカビなどが侵入すると、これらの成分を認識できる認識蛋白質が反応する。この結合の後にセリン型のプロテアーゼが活性化すると、proPO が PO へと部分的に活性化していく。生じた PO はフェノール性物質を酸化して、ドーパキノンやドーパクロームという中間代謝物を経て最後にメラニン色素を形成する。この活性化系によって侵入異物はメラニン色素で覆われたり、顆粒細胞による細胞性防御反応も促進する結果、より早く排除されることが判明している。

昆虫の proPO は節足動物のヘモシアニンと相同な蛋白質であることが血球由来の cDNA から推測される proPO ポリペプチド I、II の一次構造の解析から明らかにされている