

し、昆虫の proPO の cDNA クローニングもカイコ、ショウジョウバエ、タバコスズメガなどで成功し、その塩基配列から推定された全アミノ酸配列もわかっている (Kawabata ら 1995; Fujimoto ら、1995; Hall ら 1995)。

フェノール酸化酵素前駆体活性化系
微生物侵入ー (エリシター) ーセリンプロテアーゼ
ーproPO 活性化ーメラニン

B-6) 補体因子

補体は脊椎動物の血清中に存在する生体防御蛋白質で、通常 9 つの成分 (C1-C9) が知られている。この防御蛋白質の活性化 (C1, 42356789) は、抗原抗体複合体によって生じ、最終的に抗原を溶解する。この経路が古典的経路であり、その他、C142 とは無関係に微生物成分によって C3 より C9 まで活性化される副経路あるいはレクチンが関与するレクチン経路などが存在し、細菌やカビなどの微生物の溶解に関与している。

昆虫類にも補体成分の検索が行われ、今日、C3 成分活性化因子、C3 類似成分、副経路インヒビター、C3、C4 の制御系インヒビターなどの存在が報告されている (Anderson ら、1972; Aston ら 1976)。

参考文献

- 1) Anderson, R. S., Day, N. K. B. and Good, R. A. (1972) Specific hemagglutinin and a modulator of complement in cockroach hemolymph. *Inf. Immun.*, 5, 55-59.
- 2) Ando, K. and Natori, S. (1988). Inhibitory effects of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 103, 735-739.
- 3) Ando, K., Okada, M. and Natori (1987). Purification of sarcotoxin II, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* larvae. *Biochemistry* 26, 226-230.
- 4) Ashida, M. and Brey, P. (1995). Role of the integument in insect defense : Prophenol oxidase in the cuticular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 10698-10702.
- 5) Aspan, A. et al. (1995). cDNA cloning of prophenoloxidase from the fresh water crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 939-943.
- 6) Aston, W. P., Chadwick, J. S. and Henderson, M. J. (1976). Effects of cobra venom factor on the in vivo immune response in *Galleria mellonella* to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Insect Physiol.*, 27, 171-178.
- 7) Brey, P. T., et al. (1993). Role of the integument in insect immunity: Epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 6275-6279.
- 8) Fehlbaum, P., Bulet, P. (1994) Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.* 69, 33159-33163.
- 9) Fujimoto, K. et al. (1995) Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 7769-7773.
- 10) Hall, M. et al. (1995) Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: Purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 7764-7768.
- 11) Hultmark, D. (1993) Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a mode for innate immunity. *Trends Genet.*, 9, 178-183.
- 12) Iijima, R. et al. (1993) Purification, characterization, and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *J. Biol. Chem.*, 268, 12055-12061.
- 13) Kato, Y. et al. (1993) Expression and characterization of cDNAs for cecropin B, an antibacterial protein of the silkworm,

- Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23, 285-290.
- 14) Kawabata, T. et al. (1995) Molecular cloning of insect prophenol oxidase: A copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 7774-7778.
 - 15) Kotani, E. et al. (1995) Cloning and expression of the gene of hemocyanin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor. *Biochem. Biophys. Acta*, 1260, 245-258.
 - 16) 名取俊二(1991) 変態と異物認識, 生体防御 8, 125-130.
 - 17) 谷合幹代子, 山川稔 (1999) 環境昆虫学 (日高敏隆, 松本義明編), 234-249.
 - 18) 山川稔 (1997) 昆虫機能利用学, pp101-129, 朝倉書店.
 - 19) 和合治久 (1995) 昆虫の生体防御反応. 日本応用動物昆虫学会誌, 39, 1-13.
 - 20) 和合治久 (1999) 環境昆虫学 (日高敏隆, 松本義明編), 220-233.

1.2.3. 環形動物 (小宮山一雄)

ミミズの免疫機能の概略

ミミズは陸生の無脊椎動物で、その生態は土壌とかかわりが深く、みみずが土を耕すことにより土壌環境が保たれているといっても過言ではない。事実、この機能を積極的に利用して、耕地の土壌改良や、コンポストにおける廃棄物処理に利用がなされてきた歴史がある。

野生種は日本では約 300 種いるといわれているが、分類についても今だ十分にミミズ解明されているとはいえない。一方で、市街化が進み、地表がアスファルトやコンクリートで覆われてしまい、彼らの生活の場は極端に減少しつつある。ミミズの減少は単に彼らの種の保存といった問題だけではなく、ミミズは野生生物の食物連鎖の原点でもあり、他の生物の生存にも少なからず影響があると考えられる。

ミミズは雌雄同体で、であるが一般に他家

受精で繁殖する。ミミズの生活環境は様々であるが、周囲には生存を脅かす多くの病原微生物がいる環境のなかで生活している。

ミミズの体表は粘液で覆われており、クチクラを有する固い上皮細胞で保護されている。粘液や上皮細胞は病原微生物の侵入を妨げている。このような物理的防御にくわえて、ミミズの生体が刺激を受けると、体の表面に開口している体孔から、強力な hemolysin、aggritinin をなどを含む coelomic fluid や多くの抗菌蛋白を持つ coelomocyte が排出され病原微生物の侵入を防いでいる。ミミズの免疫防御は脊椎動物のような、侵入する抗原に対する特異的な抗体産生が起こる液性免疫機構は存在しないが、細胞傷害活性を持った液性因子によるものと、マクロファージ、顆粒球、chorolagon cell といった細胞性免疫機構の 2 つの機構に大別される。

1) ミミズの免疫担当細胞

ミミズの閉鎖血管系であるが、血管内と体腔内ではほぼ同様の細胞が認められ、血液細胞は体腔へ出入りしているため、血球細胞と体腔細胞の両者は、ほぼ同義と考えられる。Coelomocyte の起源は、coelomic cavity を覆う上皮、もしくはその近傍にある lymphatic gland に由来すると考えられている。

ミミズは血球細胞 (coelomocytes) は、Cooper & Stein (1981)、Dales & Dixon (1981) らにより、義足をもち異物を貪食する能力有する Phagocytes (Amebocytes) と大型で球形の脂肪滴を胞体内に有する, chloragogen cell (eleocytes) の 2 種に分類されるが両者の区別が難しいことがあり、同じ細胞の分化度の違いあるいは、成熟過程の差であるとする考えもある。

Amebocytes についても、細胞の大きさ (10-30 μm) や顆粒の有無で、パリエーションが見られる。顆粒は好酸性のものと、好塩基性のものがある。Chloragogen cell は大きさが 17-70 μm で、細胞内に lipid や carotenoid pigment や glycogen を含んでおり (Dales 1961, Eckelbarger 1976)、時として顆粒を細胞質内

に認めるが、granular mebocyte とは明らかに形態がことなる。

Cooper and Stein (1981)、Stein (1977)、Stein and Cooper(1978)は、ミミズの血球細胞を、さらに顆粒や細胞質の性状により、basophils, neutrophils, acidophils, granulocytes and chloragogen cell の5つのサブタイプに分類している。

しかし、Dales and Dixon(1981)は、eleocytes はいくつかの種において、phagocytic amebocyte から分化する可能性を指摘している。さらに amebocyte のいくつかは、一つの cell lineage の細胞が分化の段階で様々な大きさや性状を示していると考えられる (Dales and Dixon, 1981)。

組織化学的な方法により、細胞内に酸性ホスファターゼ、(グルクロニダーゼがすべての coelomocytes に認められるが、特に basophils and neutrophils に強く発現している。Peroxidase は、eleocyte にのみ弱く発現している。好中球では中性ムコ多糖を認める。

ミミズの免疫防御システム

1) 生体防御因子 (液性免疫因子)

溶血反応

ミミズにおいて見られる、無生物 (abiotic materials)、非自己の細胞や微生物に対する液性因子の多様性は無脊椎動物における液性因子のレパトアの一部として認められる。これらの液性因子の多くは、生理的に存在する非特異的な防御システムとして存在している。しかしながら、新しいタイプの分子が外来の異物に対しての反応として誘導されることが明らかとなり、無脊椎動物にも獲得性免疫機構の存在が示唆されている。(Boman&Hulmark1987)。例として、無脊椎動物で、リソゾームとは異なった抗菌活性が体液中に見られる。In insects, Phylumにおいては、多くの抗菌活性を示す物質が知られている。Defensins, ceropinsなどは昆虫において良く知られるが、ヒトでも認められる抗菌物質である (Eisenhauer, 1989, Lee1989)。

ほとんど、すべての無脊椎動物 (phyla) は脊椎動物の赤血球を溶血することが知られ、この物質を hemolysins と呼ぶ。Acelomates においては、組織の抽出液に溶血活性が報告されている (Kamiya1989)。同様な活性は celomate においても認められる。

[Du Pasquier&Duprat (1986), Weinheimer (1969, Day (1972), Bretting&Renwarantz (1973), Parrinello (1979), Roch (1979), Anderson (1980), Cenini (1983), Tuckova (1986), Canicatti (1987))。

ミミズは体腔液中に、脊椎動物の赤血球やある種の腫瘍細胞に障害活性を示す物質が認められており、赤血球を溶解する因子を hemolysins と呼び、無脊椎動物では組織の抽出液や体液中にこの物質が存在することが一般に知られている。この物質は無脊椎動物における補体活性に類似していると考えられている。また hemolysis は脊椎動物の pore-forming protein に類似している Canicatti (1990)、Canicatti and Roch (1993)。しかし、分子レベルでの証明はなく、明らかではない。

1968 年、ミミズにおいて初めて脊椎動物の赤血球に対する溶血活性が、Du Pasquier and Duprat により報告されて以来多くの報告がある。ミミズの溶血活性は、coelomocyte, Chloragocyte から放出されるばかりでなく、および体表を覆っている粘液中にも存在する Valembois et al (1984)。

無脊椎動物の溶血活性

1968 年に環形動物のミミズ (アイゼニア) に溶血活性があることが初めて報告された (DuPasquier & Duprat 1986)。この溶血活性は数種類のミミズにみられる。またこの活性は、体腔液、体腔細胞、chloragocyte 体表の粘液中に存在する。(Valembois1988)。Cocoon albumin のアルブミンにも溶血活性があるが、celomic fluid とは異なっている epithelial glands に含まれている。(Valembois1984)。Polychaetes, Naineteis laevigata and petalo-proctus terricola のヘモリシンは single protein からなる (Roch, 1990)。280kDa からなる

蛋白は 4 つの 70 kDa のサブユニットに別れる。

また *Spirographis spallanzani* の精液からは 16、22、40kDa の 3 種の主要タンパクと 29、34kDa のマイナーなタンパクが認められる。(Canicatti1992)。 *Eisenia fetida andrei*、では 40、45kDa の 2 つのタンパクが赤血球の溶血に関与している (Roch1992)。

これら hemolysin には溶血活性以外にも多機能性が報告されている。多くの hemolysin は、食能を活性化させる (Stein & Cooper 1981)。また、hemolysin は、ロゼット形成の際の最初の細胞認識に関与していると考えられる (Toupin 1976)。これらの結果から、環形動物においては、hemolysin、anti-bacterial activity、agglutinating activity は同じ分子によって行われるが、アッセイ方法により異なってみえるのかもしれない。(Roch 1987)。

Anthropods においては、上記の機能は、刺激を加えない限り、認められない。

hemolysin の活性は、coelomic fluids、coelomocyte lysate、external secretions などがあるが、どの細胞が産生しているのかは明らかではない。

無脊椎動物においては、非タンパク性の溶血が存在することが報告されている。それは、サポニンによるもので、熱に安定なグリコシド、燐酸グリセロールなど知られている。(Roch, 1990)

Proteolytic Enzymes in Annelides

ミミズ(*Sabellaria alveolata*)の消化液から、塩基性の pH で活性を示す serine proteinase が数種類見つかった。これらの酵素の origin は明らかでないが、broAd specificities がみられる (Peucellier, 1983) ミミズ (*E. foetida*) の coelomocytes 培養液から、異種蛋白を消化できる proteinase が確認される (Valembois et al, 1973)。また、脊椎動物の血清タンパク (pig IgG, Hu serum albumin-HAS) を分解するが自身の、体腔液や同種の他個体のタンパクは分解しない。(Tuckova et al) これらのタンパク分解酵素の分子量いずれも約 40kda

で、inhibitor による検索で、hemolytic activity とは異なる酵素である (Roch 1979)。Hemolysis は simple sugar で阻害されるが、proteolysis は阻害されない。Proteolysis は、1 mM PMSF で阻害されるが、hemolysis は阻害しない (Tuckova, 1986a)

Proteolysis は pH-dependent で、pH7 and pH10 にピークがあり、dose-dependent、Ionic strength や熱に対して耐性があり、100℃で 15 分加熱しても、完全に失活することはない。この酵素は、serine proteinase で分子量 45kDa で、trypsin-like and chymotrypsin-like な酵素である (Roch, 1991b)。

最近の研究では、異なったいくつかのタンパク分解能をもつ酵素が分離されている。(Bilej 1993, 1992b)

Antigen binding protein

ミミズには、抗原刺激に対して脊椎動物にみられるような抗体の産生はないが、体内に注入された抗原物質に対して抗体の様に特異的に結合する蛋白があることが報告された。この物質の機能は、まだ十分に解明されていないが、抗体と同じように、抗原物質の排除に働くとしたら、液性免疫機構は無脊椎動物でその原形がすでに認められることとなり、大変注目されている。(Tuckova,1988) (Tuckova, 1991)

細胞性免疫

Phagocytosis

ミミズにおける phagocytosis を始めに観察したのは Metchnikoff(1981)である。ミミズの coelomocytes は、進入してくる異物や細菌などに対しての、本質的な防御因子として働く、なぜなら体腔は外界と、体孔を通じて直接に接しているからである。Phagocytosis は、非特異的かつ生理的な作用であるとも考えられる。しかし、最近のデータでは、ヒツジ赤血球を、脊椎動物の IgG、IgM、C3b、C3bi、C3d など前処理を行うと phagocytosis が増強された。これらの結果は、脊椎動物に見られると同様なレセプターの存在を示唆する。部

分的に共通である可能性がある。

我々は、蛍光ビーズの貪食能および貪食後蛍光を発する色素を用いて、FACS で解析している。環境化学汚染物質を作用させたミミズでは貪食能の低下を、汚染度の指標あるいは、免疫能への影響として観察できる可能性がある。

Chemotaxis

他の生物の組織抗原やバクテリアなどに対して、走化性を示すことが観察され、この機能を有するのは、好中球 (type I granulocyte) が 92-94% を占めていた。

Cell chamber を使って可能かどうか？、Amebocytes が多いので、自走するものが多いと考えられる。環境化学汚染物質の投与方法が問題となる。

Encapsulation

体内に進入してきた異物を Coelomocytes が貪食できないときには、異物を包囲化して、固定する反応が脊椎動物と同様に認められる。Metchnikoff の観察では、結節は 2 層からなり、外側はキチン質からなり、多分パラサイトが分泌したと考えた。内側は coelomocytes の層状の集団からなる。E. foetida においては、最初に出来た結節は速やかに、coelomocytes の集簇により大きさを増す。その大きさは直 1-2mm で、brown body と呼ばれる。この結節は最後には、糞と一緒に排泄される。この結節には、水解酵素や酸化酵素が認められるが、後期に至るまでは酵素活性は見られない。免疫学的防御の一環と考えられる。

Natural Cytotoxicity (cell mediated)

細胞障害活性は無脊椎動物においても、脊椎動物に見られるのと同様な種のバリエーションがみられる。この二つの種において、生存のための戦略は似ているが、外来の遺物やタンパクに対する中和の過程や異物の除去の過程は異なっている。

Natural Cytotoxicity は今日免疫防御システム

としては古典的であり、抗体産生による液性免疫システムや、T細胞の分化より早い時期に確立した免疫システムであると考えられている。しかし、その起源は今だ明らかではない。近年、脊椎動物における Natural Cytotoxicity の測定と同様な方法で、細胞障害活性を測定し、coelomocytes による Natural Cytotoxicity が報告されてきている。無脊椎動物による赤血球やある種の腫瘍細胞を障害する能力はさまざまであり、種によって異なっている。環形動物はこれらのなかで最も強い傷害活性を持つと考えらる (Roch1981a) 4000units。

もちろん無脊椎動物にとって、脊椎動物の赤血球は本質的な標的ではないが、溶血現象の際の、膜に起こる現象の解析モデルとして有意である。また、病原微生物に対する傷害活性も同様に観察できる (bacteria, protozoa, parasites etc.) Insect は natural lytic component は補体様活性を示すことから、celomate のそれとは異なっていると考えられる。

この複雑なシステムは進化のなかでは、fish, amphibians からみとめられる。

無脊椎動物における hemolysis と脊椎動物における pore forming proteins に類似性がみられる。(Canicatti1990)。しかし系統発生学的には異なったシステムであり更なる遺伝子レベルでの検討が必要である。(Canicatti & Roch1, 1993)

最近、我々はミミズの coelomocytes の顆粒中に、perforin 様蛋白を見だし、ヒトマウスの perforin 抗体と反応する、約 70Kda の蛋白を確認した。遺伝子解析の結果、ヒト、マウスの遺伝子とは、相同性が低い、シスチンの配列が一部類似しており、更なる解析を続けている。(Komiyama, Moro, Cooper, 1998)。

Mitogen 刺激による coelomocytes の反応脊椎動物で、リンパ球の mitogen 反応の測定に利用されている、Concanavalin A (Con A)、phytohemagglutinin (PHA)、Lipopolysaccharides (LPS) を用いて検索されている。

ConA

ConA は刺激後 4 日に thymidine の取り込みがピークとなる。ConA に反応する細胞は、coelomocytes の約 10% 程度でさほど多くはない。細胞の種類は、non-adherent cell である。しかし、蛍光色素を用いて検索すると、ConA は adherent cell にも結合していることが解る。結合後、30 分で細胞に adherent cell では capping を認めた。2 時間後には capping は消失し、細胞質全体に蛍光が拡がった。

Small cell では、capping は 1 時間後に約 20%、90 分後には 30% 認められた。その後、細胞質に取り込まれ、細胞質全体が均一に蛍光を発した。

ConA の coelomocytes への結合は Methyl- α -D-mannose が最も強く抑制した。

PHA

L. Terrestris の coelomocytes が PHA 刺激で non adherent cell にのみ DNA 合成が認められた。Thymidine の取り込みは 4 日めにピークとなった。

LPS

LPS は、少数の non adherent cell にのみ DNA 合成が認められた。

Chemotaxis

他の生物の組織抗原やバクテリアなどに対して、走化性を示すことが観察され、この機能を有するのは、好中球 (type I granulocyte) が 92-94% を占めていた。

Allogenic in vitro stimulation (MLR)

ミミズにおける MLR は、脊椎動物におけるそれとは異なっている。通常 MLR は認められないが、同種動物の細胞で、数ヶ月の間を明けて行くと反応が認められる。

F1 における反応様式は、genetic control を受けているのか、あるいは生理学的反応の結果かは明らかでないが、少なくとも、無脊椎動物のリンパ球に似た反応が見られる。

移植片拒絶反応 (graft rejection)

移植組織片に対する coelomocytes の反応は、他家移植片では、同種移植片より速やかに、かつ強い移植片の拒絶がおこるが、自己の組織に対しては拒絶がおこらず生着する。移植片の拒絶や、heal の程度および速度は、移植片と宿主の遺伝的距離による。Allografts や xenografts の拒絶反応を利用して、免疫学的な memory の検索がおこなわれている。始めの grafts が拒絶されてから、短期間の内に、2 回目の移植を行うと、前より速やかに拒絶が起こる。しかし、治癒後時間を置いて移植を行うとこの反応本能は見られない。これにより短期間の memory が存在している。これらの研究の結果から、ミミズのメモリーは約 10 日以内で、20-90 日後に再移植すると、拒絶は起こらなくなってしまう。

参考文献

- 1) Bang, F. B.. (1973) A survey of phagocytosis as a protective mechanism against disease among invertebrates. In: Braum W, Unger J (eds) Non-specific factors influencing host resistance. Katger, baselm, 2-10.
- 2) Bilej, M., Tuckova, L., Rejnek, J., ervicka, V. (1990) In vitor antigen-binding propaties of coelomocytes of Eisenia foetida (annelida). Immunol. lett.. 26, 183-188.
- 3) Bilej, M., Tuckova, L., Rossmann, P. (1994) A new approch to in vitro studies of antigenic response in earthworms.. Dev. Comp. Immunol.. 18, 363-367.
- 4) Boman, H. G., Hultmark, D. (1987) Cell-free immunity in insects. Annu Rev. Microbiol. 41, 103-126.
- 5) Burch, S. W., Fitzpatrick, L. C., Goven, A. J., Venables, B. J., Giggelman, M. A. (1999) In vitro earthworm Lumbricus terrestris coelomocyte assay for use in terrestrial toxicity identification evaluation.. Bull Environ Contam Toxicol. 62(5), 547-54#
- 6) Canicatti, C. (1987) Evolution of the lytic system inechinoderms. 1. Naturally occuring

- hemolytic activity in *Paracentrotus lividus* (Echinoidea) coelomic fluid.. *Boll Zool.* 54, 325-329.
- 7) Canicatti, C. (1990) Hemolysin: pore-forming proteins in invertebrates. *Experientia.* 46, 239-244.
 - 8) Canicatti, C., Roch, P. (1993) Erythrocyte membrane structural features that are critical for the lytic reaction of coelomic fluid hemolysis.. *Comp. Biochem. Physiol.* 105, 401-407.
 - 9) Canicatti C. (1990) Hemolysins: pore-forming proteins in invertebrates.. *Experientia.* 46(3), 239-44.
 - 10) Canicatti C, Roch P. (1993) Erythrocyte membrane structural features that are critical for the lytic reaction of *Spirograhis spallanzani* coelomic fluid hemolysin.. *Comp Biochem Physiol C.* 105(3), 401-7.
 - 11) Cooper EL. (1986) Leukocyte activity during earthworm inflammatory reactions.. *Int J Tissue React.* 8(3), 175-84.
 - 12) Cooper EL, Cossarizza A, Kauschke E, Franceschi C. (1999) Cell adhesion and the immune system: a case study using earthworms.. *Microsc Res Tech.* 44 (4), 237-53.
 - 13) Cooper EL, Cossarizza A, Suzuki MM, Salvioli S, Capri M, Quaglino D, Franceschi C. (1995) Autogeneic but not allogeneic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor cell target K562. *Cell Immunol.* 166 (1), 113-122.
 - 14) Cooper EL, Cossarizza A, Suzuki MM, Salvioli S, Capri M, Quaglino D, Franceschi C. (1995) Autogeneic but not allogeneic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor cell target K562. *Cell Immunol.* 166(1), 113-22
 - 15) Cooper EL Stein EA Oligochetes.. (1981) In: Ratcliffe NA Rpwley AF(eds) *Invertebrate blood cells.* vol 1. Academic Press London. 75-140.
 - 16) Cossarizza A, Cooper EL, Suzuki MM, Salvioli S, Capri M, Gri G, Quaglino D, Franceschi C (1996) Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines.. *Exp Cell Res.* 224(1), 174-82.
 - 17) Dales RP. (1961) The coelomic and peritoneal cells systems of some sabellid polychaetes. *Q. J. Microsc. Sci.* 102, 327-346.
 - 18) Dales RP, Dixon LRJ. (1981) Polychaetes. In: Ratcliffe NA Rpwley AF(eds) *Invertebrate blood cells.* vol. 2 Academic Press London. 35-74.
 - 19) Day, N. , Geiger, H., Finstad, J., Good, R. A. (1972) A starfish hemolymph factor which activates vertebrate complement in the presence of cobra venom factor.. *J. Immunol.* 109, 164-167.
 - 20) Du pasquier L, Dupart P. (1986) Aspects humoraux et cellulaires d'une immunité naturelle non spécifique chez l'oligochète *Eisenia foetida* (Lumbricidae). *CR Acad Sci Paris.* 266, 638-546.
 - 21) Eckelbarger KJ. (1976) Origin and development of the amoebocytes of *Nicolaia zoostericola* (Polychaeta Terebellidae) with a discussion of their possible role in oogenesis.. *Mar Biol.* 136, 169-182.
 - 22) Eisenhauer P. B, Harwig S. S. L, Szklarczyk D, Ganz T, Selsted M. E, Lehrer I. (1989) Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. *Infect. Immun.* 57, 2021-2027.
 - 23) Folia Biol (Krakow). () Earthworm immune responses. *Folia Biol.* 45(1-2), 1-9
 - 24) Hanusova, R., Bilej, M., Brys, L., De-Baetselier, P., Beschin, A. (1999) Identification of a coelomic mitogenic factor in *Eisenia foetida* earthworm.. *Immunol Lett.* 65(3), 203-11.
 - 25) Herberman, R. B. (1982) Natural killer cells and their possible relevance to transplantation biology. *Transplantation.*