

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：34101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00994

研究課題名(和文) 昆虫やヒトの自然免疫系の網羅的理解につながる簡易実験の開発

研究課題名(英文) Development of a simple experiment leading to comprehensive understanding of insect and human innate immune system

研究代表者

中松 豊 (Nakamatsu, Yutaka)

皇學館大学・教育学部・教授

研究者番号：00456617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高等学校の基礎生物の免疫分野において、食作用だけでなく免疫を網羅的に理解してもらうために、昆虫の血リンパを使って、液性免疫反応であるメラニン化や細胞性免疫反応である包圍化作用やノジュール形成の観察と液性免疫と細胞性免疫が協調して働くことを理解することのできる簡易実験の開発を行った。教材としての適性を高等学校や大学、科学館や博物館などでアンケートを用いて検証したところ、材料の扱い易さ、実験のし易さ、内容の理解という点で多くの人が良好と答えた。

研究成果の概要(英文)：In order to comprehensively understand immunity as well as phagocytosis in the basic biology of high school, We conducted simple experiments that can understand that humoral immunity and cellular immunity work in cooperation and also developed simple experiments that can observe melanization, encapsulation, nodule formation using insect hemolymph. When examining the suitability as a teaching material using questionnaires at high schools, university science museums and museums, many people answered that they were good in terms of ease of handling of materials, ease of experimentation and understanding of contents.

研究分野：理科教育学 昆虫生理学

キーワード：教材開発 免疫 昆虫 血球 食作用 包圍化作用 ノジュール形成 アワヨトウ

### 1. 研究開始当初の背景

2011年の高校の学習指導要領の改訂で基礎生物の「生物の体内環境の維持」という大項目の中に「免疫」という小項目が加わった。これに伴い高校の各社教科書には、昆虫を中心とした血球による食作用の実験が採用された(表1)。これまでの高校の教科書に記載されている食作用の実験は、供試動物体内で反応させる *in vivo* 実験が中心であったが、この研究に先立って昆虫による食作用の実験

表1 各出版社の教科書に採用されている血球の食作用の観察実験

出版社名	供試生物名
啓林館	ブタ
実教出版	コオロギ
数研出版	コオロギ
第一学習社	カイコガ
東京書籍	ショウリョウバッタ

をスライドガラス上で行う *in vitro* 実験の提案をおこなった(澤と中松, 2014)。 *in vitro* 実験は、異物や血球を動物体外で反応させるため、供試動物に異物を注入することや飼育することなどの手間がかからない点、反応時間以外ほとんど時間を要しないため、トータルな実験時間が短縮される点、免疫の反応過程も随時観察できる点など *in vivo* 実験に比べると、優れた点が多い画期的な方法である。これまで蓄積してきた昆虫免疫に関する知見と高校向けに開発された免疫教材を組み合わせれば、実感を伴った免疫系の網羅的理解が可能な新しい簡易実験を開発できると考えた。

### 2. 研究の目的

高校の生物基礎の教科書には、主に昆虫の血球を使った食作用の観察実験が採用されている。しかし昆虫の自然免疫は、体内に侵入してくる異物の種類によって様々な血漿成分や各種血球が連携して協調的に働くため、食作用の実験だけでは免疫系の網羅的理解につながらない。昆虫の免疫系は自然免疫中心であるが、血球が主に働く細胞性免疫に食作用、包囲化作用、ノジュール形成があり、血漿成分が主に働く液性免疫にメラニン形成、抗菌タンパク質、レクチンなど多くの種類がある。今回はこれらが単独に関わる免疫と血漿成分や血球が連携・協調して働く免疫およびヒトと共通性のある免疫についての簡易実験を構築し、高校生のための実感を伴った理解、および免疫系の網羅的理解がはかれるような教材開発を目指した。

### 3. 研究の方法

昆虫の体内に小さな異物が侵入した場合、血球による食作用のほかに、抗菌タンパク質による細菌や真菌類などの排除、レクチンによる特定の異物の認識と血球の凝集を引き起こす(和合治久, 1995, 応動昆)。また、小さい異物が多数侵入してきた場合は、食作用を起こした血球がレクチンを認識し、ヘモサイチンという粘性タンパク質を分泌して凝集反応を引き起こすノジュール形成が誘

導される(佐藤令一, 2013, 蚕糸・昆虫バイオテック)。侵入してきた異物が大きい場合はまずハイパースプレッドセル(HSC)という血球の一種が異物に付着してドーナツ状に細胞外物質を分泌する。ここにフェノールオキシダーゼとチロシンやドーパなどのフェノール性物質が付着しメラニン化が起こると、さらに顆粒細胞やプラズマ細胞が集まってきて異物を包囲化し消化して排除する(Katou ら 2014, Arch. Insect. Biochem. Physiol.)。

このように昆虫の免疫系は多様な異物に対して複数の血漿成分や血球が連携し協調的に働く。

今回は昆虫の血球による食作用だけではなく、液性免疫であるメラニン化や細胞性免疫である包囲化作用やノジュール形成に関して観察することのできる簡易実験やこれらの協調性について研究を進めた。

#### (1) メラニン化の誘導と観察法

液性免疫であるメラニン化は、アワヨトウの血リンパを体外に滴下すると、数十分で可視化できる。今回は血リンパのメラニン化ではなく、人工的にアワヨトウ体腔中に移植したカリヤコマユバチやセファデックススピーズなどの非自己成分に対するメラニン化の簡易実験の開発を行った。

#### (2) 包囲化作用の誘導と観察法

包囲化作用もメラニン化同様カリヤコマユバチ幼虫やセファデックススピーズをアワヨトウ体腔中に人工的に注入し、包囲化作用の観察を行った。

#### (3) ノジュール形成誘導と観察法

墨をPBSの入った硯で擦って墨汁をつくり、アワヨトウ幼虫の体腔中に注入しノジュール形成の数や移植する墨汁の濃度などを検討した。

#### (4) 簡易実験の実践と評価

開発した教材を名古屋市科学館や三重県立総合博物館にてアンケート調査をもとに評価した。

#### (5) メラニン化の起こる仕組みと細胞性免疫との関係。

包囲化作用はメラニン化反応の後に起こる(Katou ら 2014, Arch. Insect. Biochem. Physiol.)。そこで、これらの液性免疫と細胞性免疫がどのように協調して働くか探った。

### 4. 研究成果

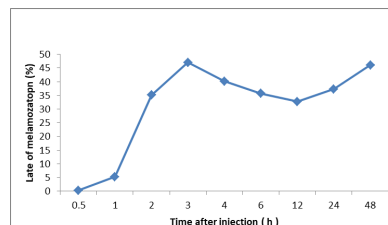


図1 移植幼虫に対するメラニン化の割合の経時的変化

(1)メラニン化の誘導と観察法  
液性免疫である異物のメラニン

化は移植後 30 分から始まり 3 時間でピークに達することがわかった(図 1) よってカリヤコマユバチをアワヨトウ体腔中に注入後 30 分から 1 時間で体外に摘出すればメラニン化が観察できることがわかった。

### (2) 包囲化作用の誘導と観察法

細胞性免疫である包囲化作用はカリヤコマユバチ移植後 2 時間から始まり 48 時間でピークに達する(図 2)。したがって、前日に移植し 24 時間後に取り出して観察するのが妥当だと考えられる。

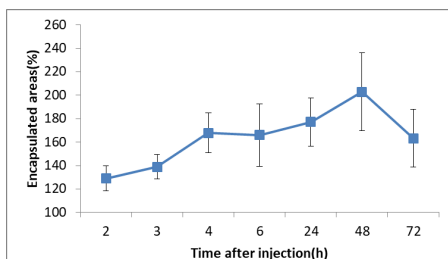


図 2 移植幼虫に対する包囲血球群の割合の経時的変化

### (3) ノジュール形成誘導と観察法

アワヨトウ体腔中に異なる濃度の墨汁を注入し、できたノジュール形成数をカウントしたところ、濃度の高い墨汁を注入したときが最も多くのノジュール形成数が観察された(図 3) よって約 500 回擦った墨汁の濃度が妥当であると考えられた。

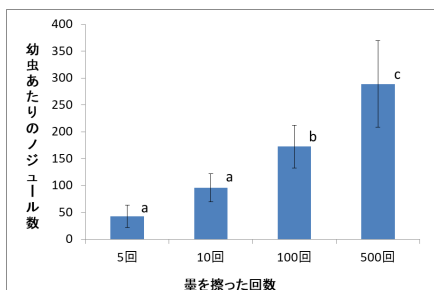


図 3 硯で墨を擦った回数とノジュール形成の個数の関係

### (4) 簡易実験の実践と評価

皇學館大学教育学部理科実験実習、三重県総合博物館での昆虫の免疫の実験や名古屋市科学館でのサイエンスラボでの体を守る血球の働きでは小学生の参加が多く見られたが、どちらの観察・実験においても実験のし易さ、材料の扱いやすさ、観察の状況、理解度などどれをとっても良好とのアンケート結果が得られた。

なお、高等学校における食作用の観察実験やそれ以外の免疫実験の評価については今年度引き続き行う予定である。

### (5) メラニン化の起こる仕組みと細胞性免疫との関係

昆虫の免疫系は多様な異物に対して複数の血漿成分や血球が連携して協調的に働く。まずは液性免疫である移植幼虫に対するメラニン化に着目した。幼虫表面のメラニン化はまずハイパースプレッドセル(HSC)(図 4)

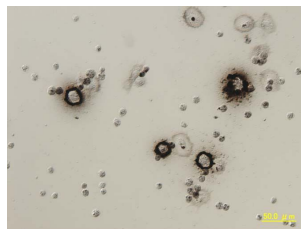


図 4 ハイパースプレッドセルとメラニン化

が付着するところから始まる。HSC が幼虫表面に付着すると、細胞が伸展しその先端から粘着性の物質を分泌し、その部分がメラニン化する。幼虫表面に HSC が多数付着する

ため幼虫全体がメラニン化する仕組みであることがわかった。さらにこのメラニン化が起こると、その後顆粒細胞やプラズマ細胞が集まってきて包囲化作用が起こることもわかった。したがって 15 分くらいで移植幼虫を摘出すると HSC を観察することができ、30 分から 1 時間だとメラニン化、24 時間後だと包囲化作用を観察できることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

(1) 中松豊、松谷広志、澤友美、大学生による昆虫を使った環境教育-2013 年伊勢市環境フェアを通して-、皇學館大学教育学部研究報告集、査読なし、10 巻、2018 年、95-112

(2) 澤友美、松谷広志、中松豊、大学生による昆虫を使った生きもの教室-「いせトピア子どもわくわく体験フェスティバル」を通じて、皇學館大学教育学部研究報告集、査読なし、9 巻、2017 年、81-101.

〔学会発表〕(計 23 件)

(1) 松谷広志、奥村雄暉、秦美咲、澤友美、中松豊、昆虫の血球を用いた昆虫免疫についての実験ラボ-名古屋市科学館の生命ラボの実施-. 日本生物教育学会第 102 回全国大会、2018 年

(2) 松谷広志、加藤良晃、田中利治、中松豊、アワヨトウ幼虫の血球の 1 種である Hyperspreadcell の免疫機構における働き. 日本応用動物昆虫学会、2016 年

(3) 中松豊、中村生希、武川栞緒里、西村真耶、澤友美、昆虫の自然免疫の観察-食作用・ノジュール形成・包囲化作用-. 日本生物教育学会、2016 年

〔図書〕(計 1 件)

(1) 中村哲夫、吉田直樹、深草正博、小孫康平、加藤茂外次、中松豊 他、教育の探求と実践-皇學館大学教育学部創設 10 周年記念論集-. 皇學館大学出版部、2018 年、昆虫を使った教材開発と持続可能な理科教育支援 (ISBN : 978-4-87644-205-8)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中松 豊 (NAKAMATSU, YUTAKA)

皇學館大学・教育学部・教授

研究者番号：00456617

(2) 連携研究者

田中 利治 (TANAKA, TOSHIHARU)

名古屋大学・アジアサテライトキャンパス

学院(農)・特任教授

研究者番号：30227152

(3) 研究協力者

澤 友美 (SAWA, TOMOMI)

松谷 広志 (MATSUTANI, HIROSHI)