

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658053

研究課題名（和文） 昆虫の記憶を伴う獲得性免疫機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of acquired immunity system in insects

研究代表者

田中博光（TANAKA HIROMITSU）

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫機能研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：30391577

研究成果の概要（和文）：

昆虫の免疫機構は脊椎動物とは異なり、迅速で非特異的に行われる自然免疫機構のみを有し、一度侵入・感染した病原体に対する免疫記憶はないとされるが、十分な検証はされていない。そこで、カイコを用い、免疫記憶の有無についての検証を行った。その結果、あらかじめ大腸菌を接種しておくことで、大腸菌を再接種させた場合の体内での生菌のクリアランスがよりすみやかに行われることが示された。また、このクリアランスの増大は体液性免疫能が向上することによってではなく、細胞性免疫能が向上することによって示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Insects possess an innate immunity system that is characterized as immune reactions with non-specific factors. Although insects are known to lack an acquired immunity with immunological memory, it is still controversy whether insects have an immunological memory or not. In this study, we found that priming silkworm with *E. coli* increased clearance of living *E. coli* cells in the *E. coli*-reinoculated body. Furthermore, we indicated that the elevation of this clearance was not caused by activation of the humoral immune reactions, but probably by activation of the cellular reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学 応用昆虫学

キーワード：昆虫病理

1. 研究開始当初の背景

昆虫は全動物種の約70%を占め、地球上で最も繁栄した生物種の一つであるといえる。その繁栄した理由として卓越した生体防御機構を発達させたことが挙げられる。一般に昆虫を始めとする無脊椎動物の生体防御機構には、ほ乳類にみられるような記憶を伴う

獲得性免疫機構は存在せず、異物の侵入に対し、非特異的かつ迅速に行われる自然免疫機構のみを有しているとするのが常識的な概念となっている。しかし、昆虫や他の無脊椎動物も免疫記憶を有するという報告が最近なされ始め、昆虫の記憶を伴う獲得性免疫機構の有無については大きな論争の的となっている。

2. 研究の目的

昆虫の免疫機構は脊椎動物とは異なり、獲得性免疫機構を持たず、迅速で非特異的に行われる自然免疫機構のみを有し、一度侵入・感染した病原体に対する免疫記憶はないとされる。しかし、一度侵入・感染を受けた特定の病原体が再度侵入・感染を受けた場合、昆虫はそれを記憶し、より抵抗性を増し、排除する効率が上昇するののかについては十分に解析されていない。本研究では昆虫の免疫記憶の有無を明確にするため、同じ微生物に再感染した場合、それら微生物に対し、特異的に抵抗性が増すのか、異物の排除が促進されるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) カイコ

カイコ（東海×朝日）は、25℃（11時間明、13時間暗）で、人工飼料（日本農産工業）を与えて飼育した。

(2) 細菌接種

グラム陰性細菌として大腸菌、グラム陽性細菌として黄色ブドウ球菌、枯草菌を用いた。これらは37℃で培養し、対数増殖期のものを6,000×gで集菌後、生理食塩水に希釈した。カイコへの一次経皮接種は3齢1日目幼虫に行い、1頭あたり、 1×10^3 個の大腸菌あるいは、 1×10^2 個の黄色ブドウ球菌を接種した。二次経皮接種は5齢3日目幼虫に行い、1頭あたり、 1×10^7 個の大腸菌あるいは黄色ブドウ球菌、枯草菌を接種した。

(3) カイコ幼虫の体腔内細菌数の測定

カイコ幼虫に二次接種の一定時間後にカイコ腹脚から体液を回収後、遠心（18×g、10分）、により血球を除去した。この体液を適宜希釈後、寒天培地上で培養し、培地上で生育された細菌のコロニー数をコロニーカウンター（Gel count, OPTRONIX）で計測した。

(4) 体液中の抗菌活性測定

血球を除去した体液をさらに遠心（6,000×g、10分）し、体液中の細菌を除去した。寒天培地 12.5 mL に 1×10^7 個の細菌（二次接種に用いた細菌）を加えてプレートを作製し、ゲルパンチャーで 2 mm 孔をあけ、2.5 μL の体液を添加して、37℃で一晩培養し、ハローの大きさを測定した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌の一次接種の有無によるカイコの体腔内での大腸菌のクリアランスの影響

本研究では、カイコ幼虫を研究材料に用い、同じ微生物に再感染した場合、カイコ体腔内においてそれら微生物の排除が促進されるかを検証した。まず、カイコの3齢1日目に、 1×10^3 個の大腸菌を経皮接種した、あるいはしなかった幼虫をそれぞれ5齢3日目まで飼育後、5齢3日目に、 1×10^7 個の大腸菌を経皮接種し、接種1時間あるいは2時間後の体液中の生菌数を測定した。その結果、大腸菌を一次接種したカイコに大腸菌を再接種した場合は、1時間後および2時間後の体内の生菌数はいずれも、一次経皮接種しなかった場合と比較し、大きく減少することが明らかとなった（図1）。このことから、一次経皮接種が、体内に接種させた大腸菌のより迅速な排除を促すことが示された。

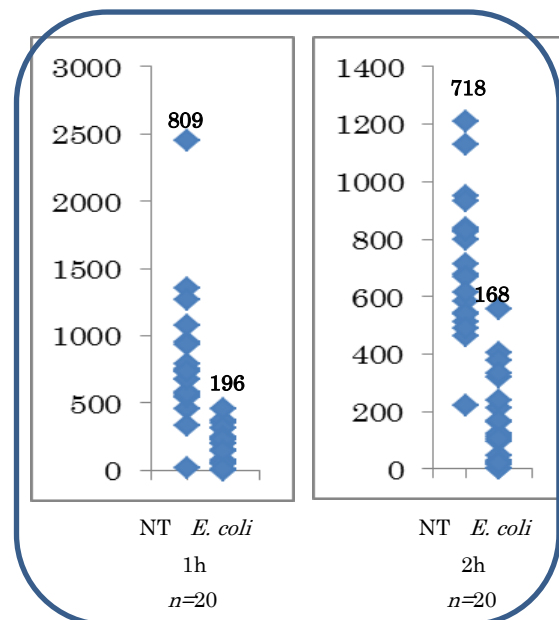


図1 一次接種した場合 (*E. coli*) としなかった場合 (NT) の体液中の生菌数の比較。
左：二次接種1時間後の大腸菌の生菌数
右：二次接種2時間後の大腸菌の生菌数

(2) 大腸菌のクリアランスと体液性免疫との関係

大腸菌の一次接種による体腔内の大腸菌のクリアランスの増大が、体腔中に分泌される抗菌性ペプチドの活性増大等によるものか（つまり体液性免疫能の向上によるものか）を検証するために、一次接種及び二次接種した幼虫及び、一次接種をしなかった幼虫それぞれの体液の抗菌活性をハローアッセイで測定し両者の比較を行った。その結果、両者において、体液中の抗菌活性にはほとんど

ど差がみられなかったことから、一次接種した場合の体内の細菌数の減少は、体液性免疫機構によってなされるわけではなく、血球の貪食等の細胞性免疫機構が関与することが示唆された。

(3) 黄色ブドウ球菌の一次接種

次に、一次接種する際の細菌が異なる場合においても、一次経皮接種が、体内に侵入した大腸菌のより迅速な排除を促すのかについて調査するため、一次接種細菌として、黄色ブドウ球菌を用いて、接種実験を行った。しかし、3齢1日目幼虫に 1×10^2 の黄色ブドウ球菌を接種し、その後、5齢まで飼育させたところ、生育にばらつきが生じたため、二次接種実験を行うことができなかった。今後は、用いる一次接種菌として、より弱毒性の黄色ブドウ球菌を使う必要があると思われる。また、毒性の弱い別の細菌を用いた実験を行う必要があると思われる。

(4) 一次接種細菌と二次接種細菌が異なる場合の二次接種後のカイコ体内での生菌数のクリアランス

一次接種菌と二次接種菌が同じ場合と異なる場合で、体腔内の細菌のクリアランスに違いがあるかを調査するため、3齢1日目に 1×10^3 個の大腸菌を接種したカイコに、二次接種菌として、大腸菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌をそれぞれ5齢3日目に接種し、接種後の体液中の生菌数を測定した。また、コントロールとして、3齢1日目には接種せず、5齢3日目のみに大腸菌を接種したカイコを用い、このカイコの接種後の体液中の生菌数を測定した。その結果、大腸菌を一次接種後に、枯草菌を二次接種させた場合は、大腸菌を二次接種させた場合と同様に、コントロールと比較し、カイコ幼虫体内のクリアランス能が大きく向上することが示されたが、一方、黄色ブドウ球菌を二次接種させた場合のクリアランス能は、コントロールとほとんど変わらないことが分かった(図2)。枯草菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン、大腸菌と同様DAP型であることから、ペプチドグリカンの構造が、記憶に関与していることが、考えられた。

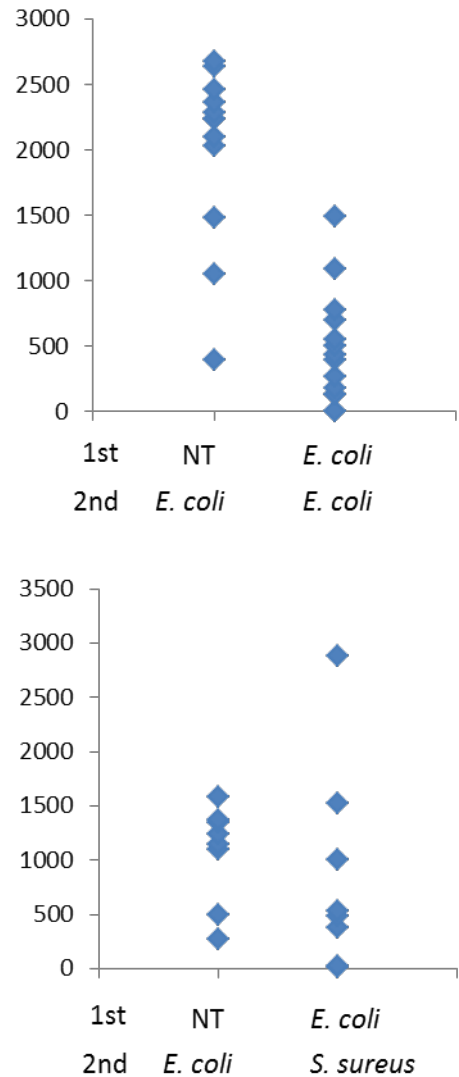


図2 大腸菌(*E. coli*)を一次接種した後、大腸菌(上)あるいは、黄色ブドウ球菌(下)を二次接種した場合の生菌数の比較。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 博光 (TANAKA Hiromitsu)
独立行政法人 農業生物資源研究所 昆虫
機能研究開発ユニット
主任研究員
研究者番号 : 30391577