

# カイコの自然免疫力を向上させる

岡部紗佳 岸本愛 金詩穂 篠原聡汰 田澤京子  
兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

現在、ヒトの感染症予防において、ワクチンをはじめとした獲得免疫を利用した予防法が進歩している。しかし、自然免疫を利用した予防法については、いまだ画期的な予防法が見つかっていない。そこで、多くの病原体に反応する自然免疫を向上させる研究を行うことが、ヒトの感染症予防につながると考えた。本研究では、実験動物として自然免疫のみを有するカイコを用い、カイコにとっての異物をカイコに投入することで、体液中の免疫に関する血球の数が増え、それによって自然免疫力が向上するかどうかを調べた。結果、体内に異物、特に乳酸菌を投入したときに生存日数が伸び、自然免疫力が向上したことを確認した。

## 1. 研究の背景

### 1.1. 動機と目的

現在、インフルエンザやCOVID-19(通称: 新型コロナウイルス感染症)の予防接種にワクチンが利用されている。これは、ヒトの免疫機構における獲得免疫を利用したものである。感染症の予防にはその感染症の病原体、または病原体の遺伝子を体内に投与する。よってこの予防方法では、ワクチン開発が完了するまでヒトは病原体に感染する以外に獲得免疫を獲得する手段がなく、またその免疫は特定の病原体にしか効果を発揮できない。私達は、この現状を改善する為に、自然免疫を用いた予防方法を考えた。自然免疫での予防であれば、多くの病原体に対して対抗でき、初めて病原体に感染した際にも重症化を防ぐことができる。感染症予防の手段として自然免疫の強化が有用になると考え、それが可能かどうかを調べることにした。この研究では、実験対象としてカイコ(*Bombyx mori*)を、病原体としては広く殺虫剤として使われている *Bacillus thuringiensis* (以下BTと表記)を用いた。カイコは昆虫であるため自然免疫のみを有し<sup>[1][2]</sup>、本校研究倫理規定に照らし実験対象として利用できると考えた。また、BTはカイコ体内において有害であることが分かっている<sup>[3]</sup>ため、これを病原体として利用することとした。病原体以外の異物としては、乳酸菌 (*Lacto Bacillus*) と墨汁を用いた。

### 1.2. 先行研究と本研究の特徴

本校の先行研究として、カイコ体内では「複数の病原体が同時に感染した時、それらの病原体が生物体内で互いの繁殖を抑制し合うなどして、結果的に病原体に感染した生物に対して生存期間を延ばすなどの、生存に有益な効果を表す可能性がある」ことが示されている。<sup>[4]</sup>

本研究では、病原体、または異物が連続してカイコ体内に侵入した場合に自然免疫力が強化されるかを調べた。

### 1.3. カイコの免疫機構について

カイコは体液中に5種類の血球あるいは血球細胞を持っている。原白血球(表面が滑らかで球状)、小球細胞(細胞質内に小球顆粒を多く持ち、表面に凹凸がある)、エノシノイド(細胞質内に三日月型の構造物を持つ)、プラズマ細胞(唯一運動能を示す)、顆粒細胞(細胞質に顆粒を持ち、付着すると糸状突起を伸長させる)を持つ。

昆虫の血球による細胞性防御反応は、貪食作用、大型の異物を複数の血球が包囲して生体内隔離をする包囲化作用(被包化)等がある。

## 2. 実験内容・方法

3齢幼虫のカイコに対して20分間の低温麻酔を施し、その後以下に示す物質の内1つをカイコ1個体当たり50 $\mu$ L 注射投与する。実験3-6では、24時間後に

同じカイコに20分間低温麻酔を施した後カイコにBTを1個体当たり50 $\mu$ L注射投与し、カイコの死亡個体数と死亡までの日数を調べる。注射投与の間隔を24時間としているのは、血球・血球細胞が1回目の刺激による血球量の増加、血球の活動量の増加が起こるまでの期間が24時間であると考えたからである。

墨汁はカイコ体内に投与されると免疫反応を示すことが分かっている<sup>[5]</sup>。

また、乳酸菌はカイコ体内に投与されると免疫反応を示すことが分かっている<sup>[7]</sup>。

## 2.1. 投与するもの

- 生理食塩水  
脱塩水に質量パーセント濃度が0.8%になるよう調製。  
(これはカイコの体液の塩類濃度に等しく実験で用いられている。<sup>[5]</sup>)  
カイコの生存・健康状態に影響なし。
- 墨汁  
生理食塩水に硯で磨った墨汁を混合させる。  
分光光度計で  $A_{600}=0.2-1.0$  の範囲で調製。  
(この濃度でカイコに投与したところ、墨炭素粒子が取り込まれ、免疫反応が起きていることが分かっている。<sup>[5]</sup>)  
カイコの生存・健康状態に影響なし。
- 乳酸菌  
生理食塩水に混合、菌体が $2.0 \times 10^3$ 個体/mL 含まれるよう調製。  
血球が非自己と認識する為免疫反応あり。  
カイコの生存・健康状態に影響なし。
- BT  
生理食塩水に混合、菌体が $2.0 \times 10^3$ 個体/mL 含まれるよう調製。  
体内への侵入は経口感染のみ。  
体内に副芽胞封入体と呼ばれるタンパク質の結晶を持っており、カイコ幼虫がこの結晶を体内に取り込むと、菌体がアルカリ性の消化液によって分解される。それに続いて内包する副芽胞封入体が消化され、毒素タンパク質が体内に溶け出し、体内に吸収され血液に移行、中枢神経に届くことで発病する。痙攣、麻痺症状を起こし、通常1,2日程度で致死する。

血球が非自己と認識する為免疫反応あり。

乳酸菌・BTの菌体を生理食塩水に混合する割合が $2.0 \times 10^3$ 個体/mLであるのは、注射時に投与するときの液量(50 $\mu$ L)での菌数がカイコ1個体当たり100個体にする為である。また、カイコ1個体に投与する菌数が100個体であるのは、BTの菌数が多い場合、カイコの死亡率・生存日数の変化が小さくなり、菌数が100個体であった時、その変化が顕著に表れると考えたからである。

## 2.2. 注射・低温麻酔の手法

### 低温麻酔について

低温麻酔は、カイコを発泡スチロール箱に保冷剤、その上にガラス製ビーカーを置き、箱内を低温に維持する。各ビーカー内にカイコを1匹入れ、20分間保管した。参考文献[5]での低温麻酔の方法を利用し、文献内では保冷剤を薄手のキルティング布で覆っていたが、カイコの体温を速やかに下げる為に、表面温度が変化しやすいガラス製のビーカーを用いて麻酔を施した。20分間の低温麻酔はカイコの健康状態に悪影響を及ぼさないことが分かっている<sup>[5]</sup>。

### 注射方法について

幼虫の腹部が外側に配置されるように、頭部と尾部を指で挟み、頭部から5番目の体節を注射部位として、注射器を用いて物質を投与した。注射投与の際は、体液、投与物の漏出を防ぐために、体表にワセリンを塗布した。これは、参考文献[5]での注射方法を利用した。注射器にはテルモシリンジ1mLを使用した。注射針には34Gを使用した。

## 2.3. 実験内容

本研究の各実験で投与する物質とその順番は以下の通りである。

(一回目の注射投与を第一投与、二回目の注射投与を第二投与と表記している)

### • 実験1

第一投与...無し

第二投与...無し

### • 実験2

第一投与...生理食塩水

第二投与...無し

・実験 3

第一投与...無し  
第二投与...BT

・実験 4

第一投与...生理食塩水  
第二投与...BT

・実験 5

第一投与...墨汁  
第二投与...BT

・実験 6

第一投与...乳酸菌  
第二投与...BT

カイコの飼育環境は、気温 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度80%以上とする。

カイコ間での病原体の伝染を防ぐ為に、1 個体ずつプラスチック製カップに入れて、飼育する。

カイコの餌には桑の葉と寒天を混合させた人工飼料を用いる。各個体の餌はカイコの成長度合いに合わせて毎日適量与える。

(人工飼料はカイコの健康状態に影響を及ぼさないことが分かっている[6])

本実験での経過観察はカイコが繭を作るまで行うこととし、繭を作った個体を生存個体と定義する。

### 3. 実験結果

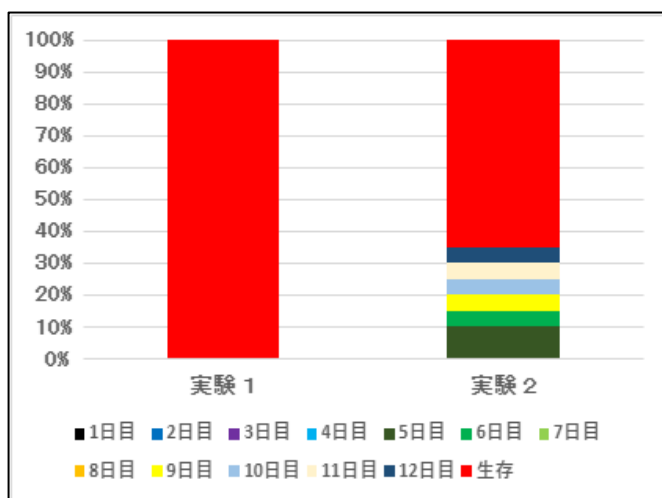


図1 実験 1, 2におけるカイコの生存日数の比較

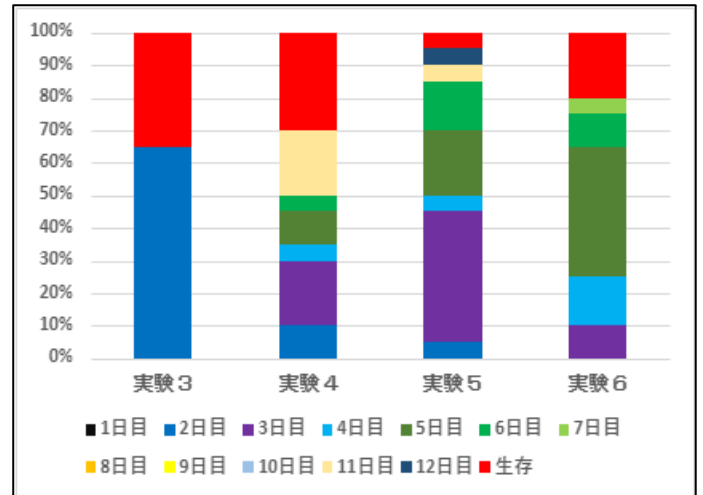


図2 実験 3-6におけるカイコの生存日数の比較

表1 各実験群におけるカイコの生存日数,生存個体

実験群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	生存
実験1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
実験2	0	0	0	0	2	1	0	0	1	1	1	1	13
実験3	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
実験4	0	2	4	1	2	1	0	0	0	0	4	0	6
実験5	0	1	8	1	4	3	0	0	0	0	1	1	1
実験6	0	0	2	3	8	2	1	0	0	0	0	0	4

実験 1 より、カイコは通常の生育環境では死亡することはないことが分かる。

実験 2 で生理食塩水投与後に死亡した個体が見られたのは、投与時に注射部から体液が漏出した様子が観察された為、それによる健康状態の変化が原因であると考えられる。図 2 より、実験 3 から BT を投与した場合、投与から 2 日後に 13 個体が死亡し、13 日後までに 7 個体が繭を形成した。参考文献[7]に記載されている通り、2 日目にカイコが死亡していることから、毒素タンパク質が体内で吸収され、毒素タンパク質量が致死量に達した場合、死亡率は 100%であることが分かる。生存した個体は、副芽胞封入体が血球によって排除されたことで毒素タンパク質が体内に放出されなかった為だと考える。また表 1 から、実験 5, 6 のカイコの生存個体数が実験 4 の生存個体数よりも少ない。また、実験 5 と実験 6 から、生存した個体数は乳酸菌の方が多くなっている。しかしこれは、実験 2 から、注射の操作によって死亡する個体が存在することを考えると、墨汁や乳酸菌を投与したことによるカイコの死亡ではないと考えられる。

他にも図 2 より、実験 4, 5, 6 でのカイコの死亡個体数が多かった期間を比較すると、実験 4 では 2-6 日目、実験 5 では 2-6 日目、実験 6 では 3-7 日目であった。また、死亡個体数が最も多かった日を

比較すると、実験4では3日目、実験5では3日目、実験6では5日目であった。よって、墨汁・乳酸菌を投与した場合は死亡率は変化していないが、墨汁を投与した場合は生存日数が長くなり、乳酸菌を投与した場合は生存日数が長くなり、免疫力が向上されたことが分かる。

#### 4. 考察

生理食塩水を投与した場合と比較すると、墨汁を投与した場合は死亡率が減少せず、生存期間も長くならなかったことから、墨汁は免疫力を向上させる物質として適さないといえる。また、乳酸菌を投与した場合は死亡率が減少しないが、生存期間が長くなったことから、乳酸菌は免疫力を向上させる物質であることがいえる。このことから、非タンパク質である物質よりもタンパク質で構成された物質の方が免疫力を向上させる度合いは大きくなる。よって、カイコの免疫機構は異物がタンパク質か非タンパク質かを判別している可能性が高い。そして、異物がタンパク質で構成されると認識した場合、血球数が増加量を大きく、又は血球の活動を更に盛んにすることが予想される。

以上のことから、自然免疫力を向上させる物質は、タンパク質で構成されたものであることが望ましいと結論付けられる。

#### 5. 今後の展望

実験1,2において、注射投与時にカイコの体液が漏出してしまったことがあった為、今後の実験ではその様な事態を防ぐ必要がある。また、本研究では第一・第二投与の間隔を24時間としたが、その時間が長くなった場合、また乳酸菌や墨汁の濃度を上昇させた場合で免疫力が向上される度合いが変化するかを調べる必要もある為、今後も追加実験を行おうと考えている。

#### 6. 謝辞

本研究を行うに当たり多くの助言や指摘をくださった兵庫県立神戸高等学校の繁戸克彦先生、サイエンスアドバイザーの方々、また、本研究の一部実験に関して協力してくださった兵庫県立神戸高等学校75,76回生の一部生徒の方々に、この場を借りて御礼を申し上げます。

#### 【参考文献】

- [1] 和合治久, 昆虫はどのように身を守るのか, pp.782-783, 学会出版センター, 1994
- [2] 田中博光, 昆虫の微生物感染に対する生体防御機構, pp.159-161, 蚕糸・昆虫バイオテック = Sanshi-konchu biotec, 2015
- [3] 秋葉芳男, 自然環境における *Bacillus thuringiensis* の生態, pp.35-36, 埼玉県蚕業試験場, 1988
- [4] 大崎麻里菜, 熊野柚瑞華, 佐々木優, 下赤陸斗, 西原潔, 病原体の相互作用について, pp.1-4, 2021
- [5] 杉村順夫, 森本弘一, 尾山廣, カイコの自然免疫, pp.11-15, 生物教育 第59巻 第1号, 2017
- [6] 松原藤好, 加藤勝, 林屋慶三, 児玉礼次郎, 浜村保次, 人工飼料による家蚕の無菌飼育, pp.230, 日本蚕糸学誌 第36巻 第1号, 1967
- [7] Satoshi Nishi, Yasuo Ono, Kazuhisa Sekimizu, Lactic acid bacteria activating innate immunity improve survival in bacterial infection model of silkworm, pp4-5, Drug Discoveries & Therapeutics., 2016