

昆蟲 血球의 異物質에 대한 免疫反應의 電子顯微鏡的 研究

I. Gold Particle에 대한 血球의 免疫反應

張炳秀 · 余聖文 · *金宇甲 · 文明珍

檀國大學校 自然科學大學 生物學科, *高麗大學校 理科學大學 生物學科

곤충 혈구의 異物質에 대해 免疫反應을 확인하기 위하여 평균지름 10 nm의 gold 입자를 함유한 colloidal gold solution을 등검은메뚜기(*Euprepocnemis shirakii* Bolivar) 성충의 복강에 주입한 후, 혈구의 반응양상을 전자현미경으로 관찰하였다.

Gold 입자에 대한 혈구의 면역반응은 전체 혈구의 약 28%를 차지하고 있는 plasmatocytes에서 食細胞作用(phagocytosis)의 형태로 확인되었고, 다른 종류의 혈구는 반응하지 않았다. Plasmatocytes에 의해 식세포작용의 초기반응은 많은 원형질 돌기를 형성하여 이물질들을 포획하는 表面反應과 원형질막의 함입에 의한 食胞의 形成課程으로서, 이 과정은 이물질 주입후 10분 이내에 완료되는 것으로 관찰되었다.

혈구내에 형성된 식포는 초기에 전자밀도가 낮은, 膜狀 또는 纖維狀의 내부구조를 가지고 있었으나, 일차 lysosome의 융합에 의해 전자밀도가 높은 顆粒狀으로 된 후, 結晶狀의 내부구조로 변형되었으며, 그 이후의 단계에서 multivesicular body 형태의 이차 lysosome을 형성하였다.

KEY WORDS: Hemocytes, Phagocytosis, Gold particles, EM, *Euprepocnemis shirakii*

異物質에 대한 昆蟲의 체내 방어기작은 일차적으로 견고한 外骨格(exoskeleton)이나, 중장 상피조직을 보호하고 음식물을 둘러싸고 있는 營養圍膜(peritrophic membrane) 등에 의해서 이루어지지만(Dunn, 1986), 이차적인 방어는 혈림프에서 일어나는 細胞性 免疫反應(cellular immunity)과 體液性 免疫反應(humoral immunity)에 의해서 이루어 진다(Gupta, 1986).

혈구들에 의한 반응인 세포성 면역반응은 食細胞作用(phagocytosis), 結節形成(nodule formation), 被囊形成(encapsulation), 凝固(coagulation) 등과 같은 다양한 형태로 곤충 체내로 침입한 세균, 곰팡이, 선충류 등의 異物質을 효과적으로 제거하게 되는데(Ennesser and Nappi, 1984; Guzo and Stoltz, 1987; Han, 1989), 이물질에 대

한 반응양상은 체내에 들어온 이물질의 크기나 수에 의해서 결정되는 것으로 추측되고 있다(Ratcliffe and Gagen, 1976; Lackie, 1981).

食細胞作用은 異種의 미생물이나 이물질을 섭취하는 일종의 endocytotic process로서, 전체 과정은 이물질의 인식(recognition)과 세포내 소화(intracellular digestion), 그리고 노폐물의 처리 및 제거(disposal or clearance)와 같은 세단계의 반응에 의해 진행되는 것으로 밝혀져 있다(Gupta, 1985).

또한 곤충의 식세포작용 과정은 주로 plasmatocytes, granulocytes, coagulocytes 등의 혈구에 의해 주도되는 것으로 알려져 있으나(Bang, 1975; Chain and Anderson, 1982; Geng and Dunn, 1989). 혈구외에도 造血器官(hemopoietic organ)에 존재하고 있는 網狀細胞(reticular cell)나 圍心細胞(pericardial cell) 등도 일부 관여하는 것으로 보고되고 있다(Hoffmann *et al.*, 1974;

이 논문은 1990년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

Brehelin and Hoffmann, 1980; Nappi et al., 1984).

본 연구에서는 실험실에서 크기를 조절할 수 있는 gold 입자를 약 10 nm의 크기로 제조하여 등점은메뚜기(*Euprepocnemis shirakii* Bolivar) 성충 복부에 주입한 후, 주입된 이물질에 대한 혈구의 반응양상과 이러한 면역반응에 관여하는 혈구의 종류를 규명하고, 혈구의 세포성 면역반응에 의한 이물질의 처리과정을 고배율의 透過電子顯微鏡으로 관찰하였다.

材料 및 方法

야외에서 채집한 등점은메뚜기(*Euprepocnemis shirakii* Bolivar)를 실험실(25-27°C)에서 사육하여 마지막 脫皮가 끝난 건강한 成蟲을 實驗材料로 사용하였다.

Colloidal gold solution의 제조는 Slot와 Geuze(1985)의 방법을 이용하여 증류수에 혼합한 1% HAuCl₄ 용액과, 1% C₆H₅Na₃O₇·H₂O, 1% tannic acid, 25 mM K₂CO₃의 혼합액을 섞어서 가열한 후, 용액내에 분산되어 있는 gold 입자의 크기를 평균지름 10 nm로 조정하였다.

제조된 gold solution을 Hamilton's syringe를 사용해서 메뚜기 성충 복부 3번째 마디와 4번째 마디 사이로 10 μl 씩 주입한 다음, 10분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 9시간 간격으로 혈림프를 채취하였다. 채취한 혈림프는 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde(4°C, phosphate buffer, pH 7.4)가 들어있는 Eppendorf tube에서 2000 r.p.m.으로 10분간 원심분리시켜 혈구만을 응축시킨 후, 1시간 동안 前固定(prefixation)하였다. 고정된 혈구덩어리는 緩衝溶液(4°C, phosphate buffer, pH 7.4)으로 10분간 3회 세척하였으며,

이어서 1% OsO₄(4°C, phosphate buffer, pH 7.4)로 1시간 동안 後固定(postfixation)하였다.

고정이 끝난 재료는 동일 완충용액으로 수회 세척한 후, ethanol 농도 상승순으로 脫水하였으며, propylene oxide로 置換하여 Epone-Araldite 混合液에 包埋한 다음, 60°C vacuum drying oven에서 36시간 중합반응시켰다. 포매된 혈구덩어리는 ultramicrotome(LKB-2088)으로 初薄切片을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 二重染色하여 JEOL 100CX-II형 透過電子顯微鏡으로 80 kV에서 관찰하였다.

結果

異物質로 사용하기 위해서 평균지름 10 nm의 gold 입자를 함유한 colloidal gold solution을 등점은메뚜기의 체내에 주입하였을 때, gold 입자에 대한 혈구의 면역반응은 食細胞作用의 형태로만 관찰되었고, 다른 종류의 세포성 면역반응은 나타나지 않았다. 또한 gold 입자에 대한 식세포작용은 오직 plasmatocytes에 의해서만 이루어졌으며, 다른 종류의 혈구에서는 전혀 관찰되지 않았다.

한편, 이물질을 주입한 후 한시간 이상 경과되지 않은 비교적 초기단계의 조직표본을 대상으로 grid의 mesh내에 분포되어 있는 혈구 수를 조사한 결과, plasmatocytes는 전체 혈구의 약 28%를 차지하고 있었으며, 이중 13.9% 정도는 gold 입자를 함유한 食胞(phagocytic vesicle)가 형성되어 있었는데, 전체 혈구중 plasmatocytes가 차지하는 비율이나 식세포작용에 관여한 plasmatocytes의 비율은 시간 경과에 따라 거의 일정한 수준을

Table 1. Constitutive ratio of the major types of hemocytes in *Euprepocnemis shirakii*.

Time	Prohemocytes	Plasmatocytes	Granulocytes	Others
10 min	19.0 (-)	28.3 (13.5)	37.7 (-)	15.0 (-)
30 min	19.6 (-)	27.5 (14.0)	37.2 (-)	16.0 (-)
60 min	18.4 (-)	28.5 (14.2)	38.8 (-)	14.3 (-)
average	19.0 (-)	28.1 (13.9)	37.9 (-)	15.1 (-)

Phagocytic ratio of each hemocyte after injection of gold particles is represented in parentheses.

유지하였다(Table 1).

주입 후 10분이 경과된 조직의 표본에서는 plasmotocytes의 표면에 많은 細胞質 突起(cytoplasmic process)가 길게 형성되어 있었으며, gold 입자들은 이들 돌기의 표면에 吸着되어 있거나, 주변부에 散在되어 관찰되었다(Fig. 1). Plasmotocytes의 세포질에는 粗面小胞體(rough endoplasmic reticulum)가 잘 발달되어 있었고, 세포질 돌기에 둘러싸인 gold 입자는 세포질 속으로 깊숙히 陷入되기 시작했으며(Fig. 2), 세포질 돌기에 둘러싸여 세포질로 함입된 gold 입자들은 원형질막으로 둘러싸여 형성된 초기단계의 식포 속에서 관찰되었다(Fig. 3).

Colloid solution 상태로 주입된 gold 입자는 모두 plasmotocytes에 의해 포식되었는데, 이 혈구의 전형적인 모양은 紡錘形이며, 장축의 평균 직경은 약 $9 \mu\text{m}$ 인 것으로 측정되었다(Fig. 4). 세포질 속으로 떨어져 들어온 초기 식포의 평균 직경은 약 $0.4 \mu\text{m}$ 정도이었고, 異物質에 대한 초기 식세포작용이 진행된 상태에서는 세포질 돌기의 숫자가 현저히 감소되었으며, 세포질에 형성된 식포의 내부에는 顆粒狀의 물질이 축적되기 시작하였고, gold 입자는 식포의 限界膜(limiting membrane) 주변에 부착되어 있었다(Fig. 5).

原形質膜의 표면반응에 의해 plasmotocytes의 세포질 속으로 완전히 함입되어 핵주변부로 이동된 식포들은 인접한 식포들과 상호 융합됨으로써 보다 대형의 과립을 형성하였으며, 과립의 주변부에서는 일차 lysosome이 발달되어 있었고, 일부는 식포와 융합되어 있는 점으로 미루어 이 시기에 식포가 이차 lysosome으로 變形됨이 확인되었다. 그러나, 식포의 電子密度는 비교적 낮은 상태이며, gold 입자들도 과립의 가장자리에 集積되어 있었다(Fig. 6).

주입 후 30분이 경과된 표본에서 plasmotocytes는 전형적인 방추형의 형태로 관찰되었고, 핵은 세포질의 한쪽으로 치우쳐서 존재하고 있었으며, gold 입자를 함유한 식포가 세포질의 여러 곳에서 형성되어 있었는데, 1차 lysosome과 융합된 시기의 차이에 따라 식포의 전자밀도가 서로 다르게 관찰되었다(Fig. 7). 그리고, plasmotocytes 표면의 세포질 돌기는 이물질 주입 후 10분이 경과

된 표본에서만 식세포작용이 확인되었고, 그 이후의 표본에서는 전혀 관찰되지 않았다. 이 시기의 식포는 핵과 인접한 부위에 분포하였고, 원형질막과 동일한 二重膜으로 둘러싸여 있었으며, 내부에는 과립상의 물질이 채워져 있었다. 식포의 한계막 주변에 분산되어 있던 gold 입자들은 집적되어 과립의 중심부로 이동하기 시작하였다(Fig. 8).

주입 후 1시간이 경과된 표본에서 plasmotocytes 내부에 형성된 식포는 前時期에 비해 좀더 조밀한 과립상의 물질로 채워져 있었고, 과립 내부의 gold 입자는 서로 凝縮되어 덩어리를 형성한 상태로 관찰되었다(Fig. 9).

주입 후 3시간이 경과된 표본에서 관찰된 plasmotocytes의 식포는 전자밀도가 높고 균질한 膜狀의 물질로 채워져 있었으며, 과립 내부의 gold 입자는 식포의 중심부로 이동하였고, 이 시기 이후의 표본에서 식포의 한계막에 부착된 gold 입자는 전혀 관찰되지 않았다. 특히, 이 시기의 식포 주변부에는 골지복합체가 매우 발달되어 있었고, 식포와 마주한 골지체의 成熟面(maturing surface)에서는 물질의 分泌가 활발하였으며, 이들 分泌小胞(secretory vesicles)가 식포와 융합되는 형태도 관찰되었다(Fig. 10). 그리고, 식포들 간의 상호 융합에 의한 이물질의 농축작용은 이 시기에도 계속되었는데, 전자밀도가 낮은 초기 상태의 식포가 전자밀도가 높은 막상의 식포로 융합됨으로써 gold 입자가 농축되는 현상도 관찰되었다(Fig. 11).

주입 후 6시간이 경과된 표본에서 식포는 격자상의 결정구조로 변형되어 있었는데, 식포의 한계막 주변부에서는 부분적으로 동심원상의 라멜라 구조도 관찰되었다. 식포의 전자밀도는 前時期와 마찬가지로 높은 상태였고, gold 입자는 주로 식포의 중앙부 근처에 집적되어 있었다(Fig. 12).

주입 후 9시간이 경과된 표본에서 관찰된 식포는 주변의 작은 식포들이 서로 융합되어 multivesicular body를 형성한 평균직경 $1.5 \mu\text{m}$ 에 달하는 대형의 식포를 형성하였고, 식포내에는 응축된 다량의 gold 입자들이 散在되어 있었다. Multivesicular body를 이룬 대형의 식포 내부에

함유된 작은 식포들은 혈구에 의해 식세포작용된 시기에 따라, 식포의 크기와 전자밀도 그리고 내부구조등이 각각 다르게 관찰되었다(Fig. 13). 그리고, 이 시기를 전후하여 multivesicular body를 이룬 대형의 식포들은 다시 혈구의 원형질막 주변부로 이동하였으며, 식포를 둘러싼 한계막의 일부가 解體되면서 식포와 세포질간의 境界가 불분명해지는 것으로 관찰되었다(Fig. 14).

考 察

곤충은 체내에 침입한 이물질에 대해 신속하고 특이적인 반응을 나타냄으로써 이물질의 공격에 대한 자기방어 기능을 수행하게 되는데(Anderson et al., 1973; Chain and Anderson, 1982), 혈장에 의해 이루어지는 체액성 면역반응과 혈구들에 의한 세포성 면역반응이 중요한 부분을 차지하고 있다(Dunn, 1986; Gupta, 1986).

혈구에 의한 면역작용은 食細胞作用, 結節形成, 被囊形成, 凝固 등의 반응이 알려져 있으나(Ennesser and Nappi, 1984; Guzo and Stoltz, 1987; Han, 1989), 본 실험에서 등검은메뚜기 체내에 주입된 평균직경 10 nm의 gold 입자에 대한 혈구의 반응은 식세포작용의 형태로만 관찰되었고, 다른 종류의 세포성 면역반응은 나타나지 않았는데, 이는 주입된 이물질인 gold 입자의 크기가 개개의 혈구들에 의해 충분히 처리될 수 있을 만큼 소형이었기 때문으로 추측되며, 이러한 현상에 대해 Ratcliffe와 Gagen(1976), Lackie(1981) 등도 異物質에 대한 반응양상은 체내에 들어온 이물질의 크기나 수에 의해 결정됨을 밝힌 바 있다.

곤충 혈구에 의한 식세포작용에는 plasmatocytes, granulocytes, coagulocytes 등의 혈구 종류가 관여하는 것으로 알려져 있으나(Ratcliffe and Rowley, 1975, 1979; Han, 1989), 실험에 사용한 곤충이나 주입한 이물질의 종류에 따라 다양한 결과가 보고되고 있는 실정이다. Wittig(1965), Rizki와 Rizki(1984) 등은 각각 나비목의 *Pseudaletia unipuncta*와 파리목의 초파리(*Drosophila melanogaster*) 유충을 재료로 하여 세균을 이물질로 주입한 연구에서 plasmatocytes가 식세포작용

에 관여하는 중요한 혈구임을 보고한 반면, 누에나방(Akai and Sato, 1973)과 *Manduca sexta* 유충(Horohov and Dunn, 1982)을 대상으로 한 실험에서는 granulocytes가 식세포작용에 관여한다고 하였으며, 풀무치를 실험 재료로 하여 iron saccharide를 이물질로 주입한 실험에서는 plasmatocytes와 coagulocytes가 가장 활발하게 식세포작용을 하는 것으로 보고된 바 있다(Brehelin and Hoffmann, 1980).

본 실험에서 이물질로 사용된 gold 입자에 대한 식세포작용은 prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes(I), granulocytes(II), spherulocytes, oenocytoides 등 다양한 종류로 이루어진 등검은메뚜기의 血球(Chang et al., 2990) 중에서 조직 plasmatocytes에 의해서만 이루어졌고, 다른 종류의 혈구에서는 전혀 관찰되지 않았는데, gold 입자와 비슷한 不活性 物質인 iron saccharide를 이물질로 사용한 Brehelin과 Hoffmann(1980)의 실험결과와 비교해 볼 때, 불활성 상태의 무기물질에 대해 가장 민감하게 반응하는 혈구 종류는 plasmatocytes임을 확인할 수 있었으며, 식세포작용에 관하여는 혈구의 종류는 면역원의 특성(Gupta, 1985), 즉 주입된 이물질의 종류나 크기, 또는 양에 따라 다를 것으로 사료된다.

또한 plasmatocytes에 의한 식세포작용의 初期 반응은 세포질에 많은 原形質 突起를 형성하였으며, 이들 돌기 사이에 gold 입자들이 흡착된 후, 원형질막의 陷入에 의해서 식포가 형성됨을 확인할 수 있었는데, Kislev 등(1969), Ratcliffe와 Rowley(1979) 등도 식세포작용의 초기반응이 혈구 세포질의 형태적 변화에 의해 뻗어 나온 세포질 돌기에 이물질이 부착되어 식포가 형성된다고 하였으며, Wago(1984) 등도 식세포작용시 이물질의 포획과정에는 세포질 돌기가 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고하고 있다. 그러나 주입된 이물질이 virus이거나 水溶性, 또는 단백질성 물질인 경우에는 coated vesicle이나 pinocytotic vesicle을 형성하여 혈구내로 흡수된다는 점(Leutenegger, 1967; Crossley, 1975; Ratcliffe and Rowley, 1979)으로 미루어 주입된 이물질의 종류에 따라 식세포작용되는 방식이 다를 것으로 생각된다.

그리고 혈구에 의한 이물질의 認識은 혈구 표면의 막 수용체에 의해 유도되거나(Scott, 1971), 化學走性(chemotaxis) 및 혈구와 이물질 표면의 電荷差에 의해서 유도되는 것으로(Lackie, 1981) 보고되고 있는 바, 본 실험에서는 주입된 이물질이 불활성 금속물질임에도 불구하고 혈구에 의한 능동적인 식세포작용이 이루어졌다는 점으로 미루어 혈구에 의한 인식과정은 주로 이물질 표면의 전하차에 의해서 이루어 졌을 가능성이 큰 것으로 사료된다.

한편 Brehelin과 Hoffmann(1980)은 iron saccharide를 주입한 실험에서 이물질은 endocytosis에 의해 형성된 식포의 peripheral membrane에 부착되어 rosette를 형성한다고 하였는데, 등검은메뚜기에서 plasmotocytes의 세포질 돌기에 부착된 gold 입자들은 원형질막의 함입에 의해 식포를 형성한 직후에는 주로 식포의 限界膜 주변부에 集積되어 있었으나, 식포가 성숙됨에 따라 점차 중심부쪽으로 이동함을 관찰할 수 있었다.

또한 식세포작용에 의해 혈구의 세포질속으로 유입된 식포는, 효소를 함유한 一次 lysosome과 융합되어 二次 lysosome을 형성함으로써 섭취된 이물질의 分解가 이루어지는 것으로 알려져 왔으나(Gupta, 1985), 식포의 형태적 변형과정에 대해서는 미비한 점이 많아, 본 실험에서 관찰한 결과 gold 입자를 포식한 식포는 일차 lysosome과 융합한 후, 시간이 경과함에 따라 顆粒狀의 물질이 전자밀도가 강한 結晶狀의 내부구조로 변형되었으며, 이들 주위의 작은 식포들이 서로 융합되면서 multivesicular body 형태의 이차 lysosome을 형성하는 것으로 확인되었다.

Chain과 Anderson(1982), Mohrig 등(1986) 등에 의하면 이물질에 대한 혈구의 면역반응이 이루어지는데 소요되는 시간은 이물질의 종류나 크기, 그리고 주입된 양에 따라서 다르다고 하였는데, 누에나방(*Bombyx mori*)의 경우 거위의 적혈구를 주입한 후 3시간이 지나서 식세포작용의 초기단계인 혈구와의 반응이 관찰되었고(Wago and Ichikawa, 1979), 풀무치(*Locusta migratoria*)의 경우 iron saccharide를 주입한 후, 5분 이내에 식포가 형성되는 것으로 보고되었으며(Brehelin and Hoffmann, 1980), Horohov와 Dunn(1983)은 담

배나방(*Manduca sexta*)에서 세균을 주입한 실험에서 초기 30분 이내에 혈구들에 의한 結節(nodule)이 생성되었고, 결절이 형성되지 않은 세균은 2-8 시간 사이에 모두 飽食되었다고 보고한 바 있다.

등검은메뚜기를 대상으로 관찰한 본 실험에서는 혈구의 원형질막 함입에 의해 식포가 형성되기 까지 소요되는 시간은 gold 입자를 주입한 후 10분 이내인 것으로 확인되었는데, Wago와 Ichikawa(1979)에 의해 측정된 3시간이라는 수치가 식세포작용의 초기 반응을 확인할 수 없는 광학현미경상에서 관찰되었다는 점을 감안한다면, 다른 연구자들에 의해 발표된 결과와 거의 동일하며, 이러한 결과로 미루어 이물질에 대한 혈구의 식세포작용은 다른 종류의 세포성 면역반응들에 비해 비교적 신속하게 일어나고, 이러한 신속한 반응이 이물질에 대한 효과적인 방어수단이 되는 것으로 사료된다.

引用文獻

- Akai, H. and S. Sato, 1973. Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Int. J. Insect Morphol. Entomol.* **2**: 207-231.
- Anderson, R. S., B. Holmes, and R. A. Good, 1973. *In vitro* bactericidal capacity of *Blaberus craniifer* hemocytes. *J. Invert. Pathol.* **22**: 127-135.
- Bang, F. B., 1975. Phagocytosis in Invertebrates, *In*: Invertebrate Immunity (Maramorosch, K and R. E. Shore, eds.). Academic press, New York, pp. 137-151.
- Brehelin, M. and J. A. Hoffmann, 1980. Phagocytosis of inert particles in *Locusta migratoria* and *Galleria mellonella*: study of ultrastructure and clearance. *J. Insect Physiol.* **26**: 103-111.
- Chain, B. M. and R. S. Anderson, 1982. Selective depletion of the plasmotocytes in *Galleria mellonella* following injection of bacteria. *J. Insect Physiol.* **28**: 377-384.
- Chang, B. S., M. J. Moon, S. S. Han, and S. M. Yoe, 1990. Ultrastructure of the hemopoietic organ in *Euprepocnemis shirakii* Bolivar (Orthoptera: Locustidae). *Korean J. Electron Microscopy* **20**: 46-56.
- Crossley, A. C. S., 1975. The cytophysiology of insect blood. *Adv. Insect Physiol.* **11**: 117-222.
- Dunn, P. E., 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol.* **31**: 321-339.

- Ennesser, C. A. and A. J. Nappi, 1984. Ultrastructural study of the encapsulation response of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Ultrastruct. Res.* **87**: 31-45.
- Geng, C. and P. E. Dunn, 1989. Plasmacyte depletion in larvae of *Manduca sexta* following injection of bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **13**: 17-23.
- Gupta, A. P., 1985. Cellular Elements in the hemolymph, *In*; Comprehensive Insect Phylogeny Biochemistry and Pharmacology (Kerkut, G. A. and L. I. Gilbert, eds.). Pergamon Press, New York, pp. 401-451.
- Gupta, A. P., 1986. Arthropod Immunocytes, *In*; Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods (Gupta, A. P., ed.). John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 3-61.
- Guzo, D. and D. B. Stoltz, 1987. Observations on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. *J. Insect Physiol.* **33**: 19-31.
- Han, S. S., 1989. Insect immunity. *Korean J. Appl. Entomol.* **28**: 175-191.
- Hoffmann, D., M. Brehelin, and J. A. Hoffmann, 1974. Modifications of the hemogram and of the hemocytopenic tissue of male adults of *Locusta migratoria* (Orthoptera) after injection of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* **24**: 238-247.
- Horohov, D. W. and P. E. Dunn, 1982. Changes in the hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. *J. Invert. Pathol.* **40**: 327-339.
- Horohov, D. W. and P. E. Dunn, 1983. Phagocytosis and nodule formation by hemocytes of *Manduca sexta* larva following injection of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invert. Pathol.* **41**: 203-213.
- Kislev, N., F. Harpaz, and A. Zelcer, 1969. Electron-microscopic studies on hemocytes of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) infected with a nuclear-polyhedrosis virus, as compared to non-infected hemocytes. II. Non-infected hemocytes. *J. Invert. Pathol.* **14**: 245-257.
- Lackie, A. M., 1981. Immune recognition in insects. *Dev. Comp. Immunol.* **5**: 191-204.
- Leutenegger, R., 1967. Early events of *Sericesthis* indescendent virus infection in hemocytes of *Galleria mellonella* (L.). *Virology* **32**: 109-116.
- Mohrig, W., D. Schitteck, and D. Ehlers, 1986. Mediators in Insect Immunity, *In*: Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods (Gupta, A. P., ed.). John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 431-447.
- Nappi, A. J., J. Kmiecik, and M. Sivers, 1984. Cellular immune competence of a *Drosophila* mutant with neoplastic hematopoietic organs. *J. Invert. Pathol.* **44**: 220-227.
- Ratcliffe, N. A. and S. J. Gagen, 1976. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vivo*: Nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J. Invert. Pathol.* **28**: 373-382.
- Ratcliffe, N. A. and A. F. Rowley, 1975. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vitro*: Phagocytosis in a new suspension culture system. *J. Invert. Pathol.* **26**: 225-233.
- Ratcliffe, N. A. and A. F. Rowley, 1979. Role of Hemocytes in Defense against Biological Agents, *In*: Insect Hemocytes (Gupta, A. P., ed.). Cambridge Univ. Press, London, pp. 85-127.
- Rizki, T. M. and R. M. Rizki, 1984. The Cellular Defense System of *Drosophila melanogaster*, *In*: Insect Ultrastructure (King, R. C. and H. Akai, eds.). Plenum Press, New York, pp. 579-604.
- Scott, M. T., 1971. A naturally occurring hemagglutinin in the hemolymph of the American cockroach. *Arch. Zool. Exp. Gen.* **112**: 73-80.
- Slot, J. A. and H. J. Geuze, 1985. A new method of preparing gold probes for multiple labeling cytochemistry. *European J. Cell Biol.* **38**: 87-93.
- Wago, H. and Y. Ichikawa, 1979. Hemocytic reactions to foreign cells in the silkworm, *Bombyx mori*, during post-embryonic development. *Appl. Ent. Zool.* **14**: 36-43.
- Wago, H., 1984. *In vitro* evidence for the requirement of filopodial elongation for the progress of phagocytosis by phagocytic granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* **8**: 7-14.
- Wittig, G., 1965. Phagocytosis by blood cells in healthy and diseased caterpillars. I. Phagocytosis of *Bacillus thuringiensis* (berliner) in *Pseudaletia unipuncta* (Haworth). *J. Invert. Pathol.* **7**: 474-488.

(Accepted November 30, 1991)

**Electron Microscopic Study on the Hemocytic Immune Responses to the Foreign Substances
in Insects I. Response to Gold Particles**

Byung Soo Chang, Sung Moon Yoe, *Woo Kap Kim, and Myung Jin Moon (Department of Biology, Dankook University, Cheonam 330-714, Korea and *Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Hemocytic immune responses to the injection of foreign materials such as colloidal gold solution containing gold particles with average diameter of 10 nm into the hemocoel of grasshopper, *Euprepocnemis shirakii* Bolivar were examined using electron microscope.

Only the plasmatocytes which consist of about 28% of total hemocytes participated in this response by the form of phagocytosis, but the other kinds of hemocytes were not reacted. The initial phagocytic response of plasmatocyte was composed of the first projection of cytoplasmic processes and the second formation of phagocytic vesicles by the surface reaction of the plasma membrane. And this procedure was finished within 10 minutes after injection.

The phagocytic vesicles with the plasmatocytes were comprised electron lucent fibrous or membranous inner structure initially, changed to electron dense granular form after fusion of the primary lysosome, and then developed to secondary lysosome composed of multivesicular body in the next stage.

Explanation of Figures

Fig. 1. Electron micrograph of the plasmatocyte at 10 minutes after injection of colloidal gold solution. At this stage the gold particles (arrowheads) are closely applied to the cytoplasmic processes (CP) of this hemocyte. M: mitochondria, RER: rough endoplasmic reticulum. ($\times 5,600$).

Fig. 2. After elongation of the cytoplasmic processes (CP) on the plasmatocyte, injected gold particles (arrowhead) are surrounded and entrapped by this process. M: mitochondria. ($\times 12,000$).

Fig. 3. Next step of this immune response, the gold particles (arrowheads) are endocytosed by phagocytic reaction. Formation of phagocytic vesicles (PV) containing gold particles are formed by invagination of the cytoplasmic processes of plasmatocytes. RER: rough endoplasmic reticulum. ($\times 80,000$).

Fig. 4. Electron micrograph of the plasmatocyte containing phagocytic vesicle (arrow) at 10 minutes after injection of colloidal gold solution. Nu: nucleus. ($\times 12,200$).

Fig. 5. High magnification electron micrograph of the phagocytic vesicles containing gold particles (arrowheads). The gold particles are localized close to the limiting membrane of the phagocytic vesicle (PV). Nu: nucleus. ($\times 47,700$).

Fig. 6. A number of phagocytic vesicles (PV) are fused each other and located near the nucleus (Nu) of plasmatocyte by intracellular movement. Note the well developed rough endoplasmic reticulum (RER) and mitochondria (M) of the plasmatocytes. Arrowheads indicate injected gold particles within the phagocytic vesicles. ($\times 28,600$).

Fig. 7. Electron micrograph of the plasmatocyte 30 minutes after injection of gold particles containing a number of phagocytic vesicles (arrows). ($\times 14,400$).

Fig. 8. High magnification electron micrograph of the arrow region in Fig. 7. The phagocytic vesicle (PV) is filled with fine granular material, and the gold particles (arrowheads) are moved to central region of the phagocytic vesicle at this stage. Note the double membranes of the phagocytic vesicle. ($\times 100,000$).

Fig. 9. Electron micrograph of the phagocytic vesicle (PV) 1 hour after injection of gold particles (arrowheads). This vesicle contains compactly aggregated granular material signaling formation of secondary lysosome. ($\times 70,000$).

Fig. 10. Electron micrograph of the plasmatocyte after 3 hours postinjection of gold particles (arrowhead). Phagocytic vesicles are changed to secondary lysosome state by the fusion of primary lysosomes. Characteristically, phagocytic vesicle of this stage contains electron dense material and faced to maturing surface of Golgi complex (G). Nu: nucleus. ($\times 40,000$).

Fig. 11. Electron micrograph of the plasmatocyte 6 hours after injection. The gold particles (arrowheads) are more compactly aggregated than prior stages, and electron density of this vesicle is also discontinuous. Nu: nucleus. ($\times 40,000$).

Fig. 12. High magnification electron micrograph of the plasmatocytes 6 hours after injection of gold particles (arrowheads). parts of phagocytic vesicles (PV) of this stage showing crystalline or lamellar structure. M: mitochondrion, Nu: nucleus. ($\times 80,000$).

Fig. 13. Electron micrograph of the plasmatocyte 9 hours after injection of gold particles (arrowheads). At this stage small phagocytic vesicles are fused each other and made to large multivesicular body (MB) sized $1.5 \mu\text{m}$ in diameter. ($\times 42,000$).

Fig. 14. At 9 hours after injection, limiting membranes of the phagocytic vesicles are obscured and conformed to hexagonal morphology, and gold particles (arrowheads) within the multivesicular bodies (MB) are more densely aggregated. ($\times 36,000$).







