

연두금파리(*Lucilia illustris*) 혈구에 대한 결절형성인자와 결절형성과정

정민원 · 김지현 · 김우갑

고려대학교 이과대학 생물학과

연두금파리에서 혈구 세포가 면역반응의 일환으로 일으키는 결절형성(nodule formation) 현상을 형태학적으로 관찰하고자 본 실험이 수행되었다. 연두금파리 종령 유충 체내에 정상 효모, 고정된 효모, 세포벽이 제거된 원형질체의 효모를 각각 주입하여 면역반응 과정을 전자현미경으로 관찰하였다. 먼저 정상 효모를 주입하였을 경우, 효모와 접촉한 혈구의 과립방출과 곧 이은 혈구의 파괴 그리고 효모 주위에 혈림프와 함께 점액성 응혈(clot)의 형성을 관찰 할 수 있었다. 점액성 응혈에는 여러 유형의 파괴된 혈구가 포함되어 있었다. 이같은 면역반응에는 체내 혈구 중 과립혈구(granulocyte)가 가장 활발히 반응하였고 응혈의 대부분을 형성하였다. 결절의 중심부인 응혈은 효모와 파괴되지 않은 혈구 및 파괴된 혈구 그리고 방출된 과립들로 차 있었고, 효모 주입 3시간까지는 이같은 응혈은 계속 확대되었다. 그러나 10시간 이후에는 응혈이 관찰되지 않았으며 이때 체강내에서 효모가 관찰되곤 하였다. 고정된 효모를 주입하였을 경우에는 혈구파괴나 과립방출 등이 관찰되지 않았으며, 고정된 효모에 대한 혈구의 식세포작용만이 관찰되었다. 이 식세포작용은 주입후 10시간 까지 계속되었다. 원형질체의 효모를 주입하였을 경우에는 혈구에 의한 면역반응이 관찰되지 않았다.

KEY WORDS: Nodule Formation, Granulocytes, Yeast, *Lucilia illustris*

곤충의 세포성 면역작용은 식세포작용, 피낭형성, 결절형성으로 이루어지며 이 면역작용은 혈구에 의해 수행된다(Ratner and Vinson, 1983). 미생물에 대한 면역작용은 식세포작용과 결절형성이며, 식세포작용하기에 너무 큰 이물질에 대한 면역작용은 피낭형성이다. 결절형성 기작에 대한 설명은 두가지 방향으로 나타났다. 첫번째는 혈구가 이물질을 다량 식세포작용하여 포화 상태에 이르고 이 혈구 주위에 다른 혈구들이 점착되어 피낭(capsule)을 이루면서 중심부의 식세포작용한 혈구들은 파괴되어 응혈을 이룬다는 것이며(Hoffman *et al.*, 1974) 두번째는 이물질에 접촉한 혈구들이 식세포작용과 관계없이 과립을 방출하며 파괴되어 이물질 주위에 점액성의 응혈을 형성한다는 것이다(Gagen and Ratcliffe, 1976; Ratcliffe and Gagen, 1976). 그러나 최근의 계속적인 연구에 의하여

후자의 견해가 옳음이 입증되었다.

Schmit and Ratcliffe(1977)은 결절형성과 피낭형성과정인 이물질 인식 시기(recognition phage)와 피낭형성시기(capsule formation phage)의 특징적인 두 과정으로 구분되는 매우 비슷한 반응이라 하였다(Schmit and Ratcliffe, 1977). 첫번째 과정은 매우 빠르게 나타나는 인식시기이며 이 과정에서는 혈구의 이물질접촉, 과립방출, 혈구파괴가 나타나며 이물질의 주위에 혈구, 파괴된 혈구의 부스러기, 방출된 과립과 혈림프 그리고 파괴되지 않은 혈구 등으로 이루어진 응혈이 형성된다. 두번째 과정은 형성된 응혈 주위에 무정형혈구(plasmacyte)(Schmit and Ratcliffe, 1977; Eggenberger *et al.*, 1990)가 달라 붙거나 과립혈구(Brehelin *et al.*, 1975; Enneser and Nappi, 1984)가 달라 붙어 다세포층의 피낭이

형성되는 느리게 진행되는 시기이다. 또한 다양한 미생물의 세포벽 성분을 곤충의 체강에 주입하여 결절형성을 일으키는 인자를 알아본 결과 β -1,3-glucan, laminarin, zymosan, lysozyme soluble peptidoglycan, peptidoglycan, capsular material 등이 결절형성을 유발하는 인자이며(Gunnarsson and Lackie, 1985; Brookman *et al.*, 1989a). 이들 인자들은 과립혈구의 prophenoloxidase (proPO) cascade반응과 연관이 있음이 암시되었다(Brookman *et al.*, 1989b). 결절 중심에 놓여 있는 세균들은 독성 quinone이나 조밀한 혈구들의 피낭에 의해 질식사 하는 것으로 알려지고 있으나 이 세균들의 운명은 숙주에 대한 독성에 따라 다르게 나타난다. 숙주에 대해 독성이 강한 세균은 초기 세포성 면역작용을 탈출하여 활발한 세포분열을 한다(Vey and Farques, 1977; Walters and Ratchliffe, 1983; Horohov and Dunn, 1983).

본 실험은 결절형성 유발인자로서 미생물의 세포벽 성분과 결절형성에 관여하는 주요 혈구를 알아보기 위해 실행되었다. β -1,3-glucan과 mannoprotein을 세포벽 성분으로 가지는 효모를 3가지 종류로 만들고(정상적인 효모, 고정된 효모, 세포벽을 제거한 원형질체) 이들을 각각 연두금파리 종령 유충에 주입하여 세포성 면역반응을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

부화된 연두금파리(*Lucilia illustris* Meigen)를 실내에서($25 \pm 3^\circ\text{C}$) 사육하여 종령유충을 선별, 실험재료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 효모

본 실험에 사용된 효모는 *Saccharomyces cerevisiae*이며 효모 배지에서 37°C , 18시간 배양되었다. 고정된 효모는 18시간 배양된 상태에서 2.5% glutaraldehyde로 2시간 고정하여 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)로 여러번 세척한 후 곤충 생리식염수로 치환되었다. 원형질체(protooplast)는 배양된 효모를 Tris-HCl buffer, protoplasting buffer, 2-mercaptoethanol, 0.1M EDTA, lyticase로 처리한 후 형성된 원형질체를 사용하였다.

2) 결절형성과정 관찰

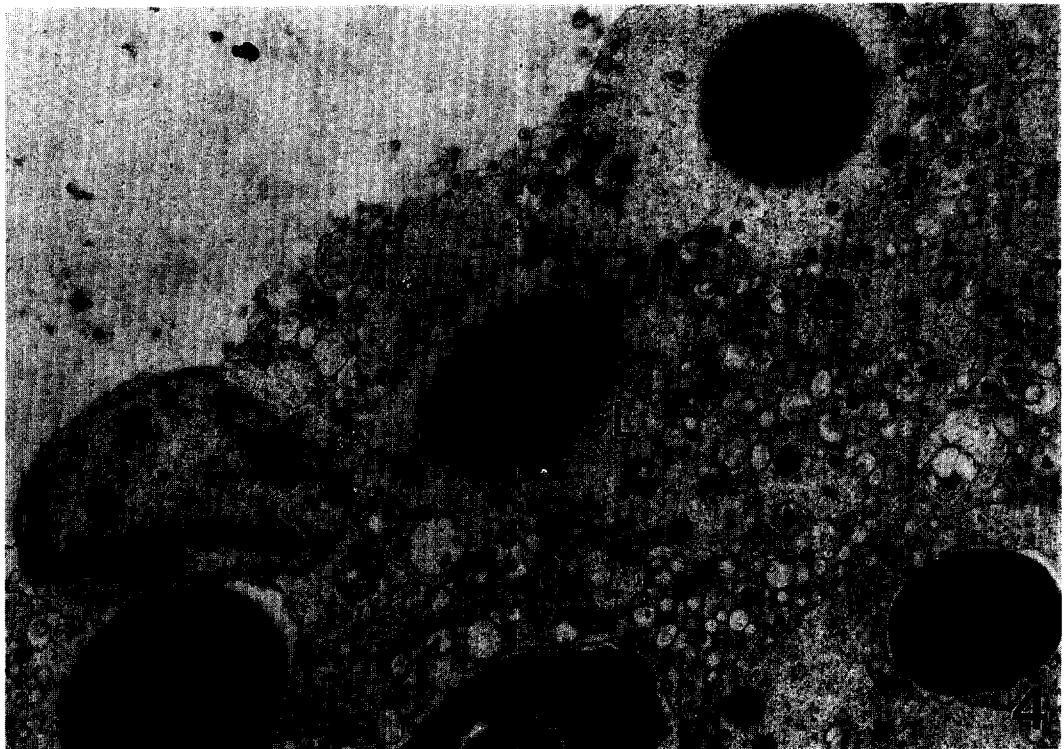
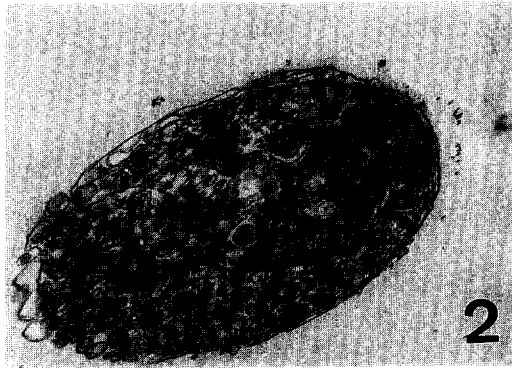
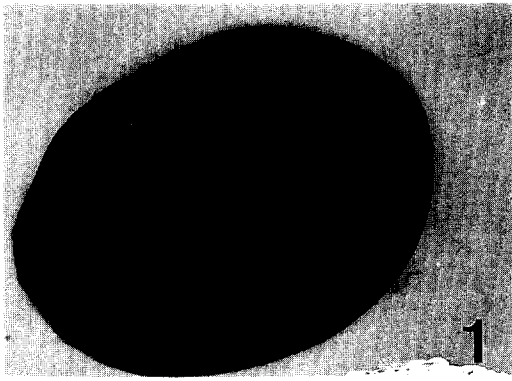
연두금파리 종령유충 복강내에 3가지 종류의 효모 각각을 개체당 $5\mu\text{l}$ 씩 microsyringe로 주입한 후 10분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간 간격으로 혈림프를 채취하였다. 채취한 혈림프는 2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde(phosphate buffer, pH7.4, 4°C 유지)가 들어 있는 eppendorf tube에서 20분간 고정시킨 후 3000 r.p.m으로 원심분리시켜 상층액은 버리고 혈구만을 응축시킨 후 1시간 30분간 전고정을 계속하였다. 고정된 혈구는 0.1M phosphate buffer(pH 7.4, 4°C 유지)로 15분씩 3번 세척한 후, 1% OsO_4 (0.1M phosphate buffer)로 1시간 30분 후 고정하였다. 동일한 완충액으로 같은 시간 세척한 후 acetone농도 상승 순으로 탈수하여 Epon-Araldite혼합액에 포매한 다음 60°C 항온기에서 36시간 중합반응 시켰다. 포매된 혈구를 LKB ultramicrotome 으로 먼저 semithin section하고 methylene blue-basic fuchsin으로 이중염색한 다음 광학현미경으로 관찰, 확인하고 초박 절편을 제작하여 copper gride에

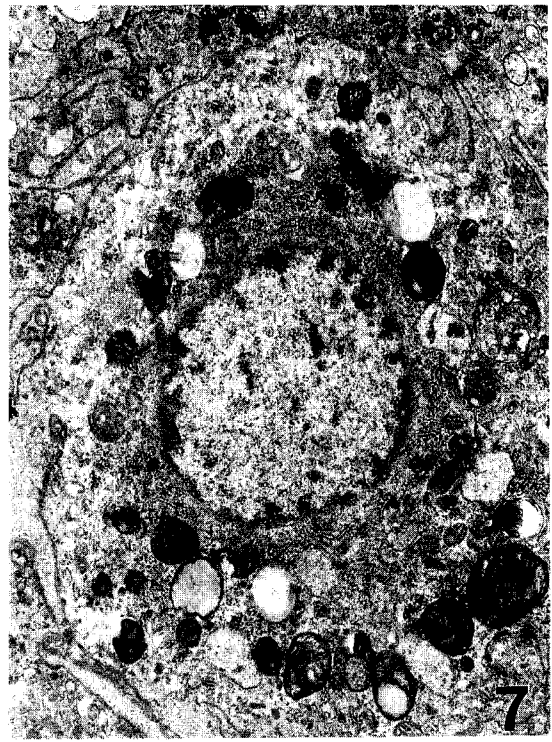
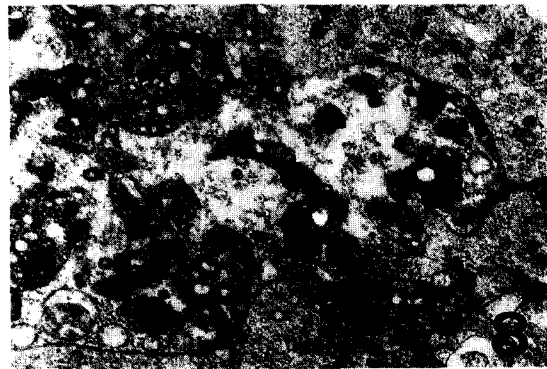
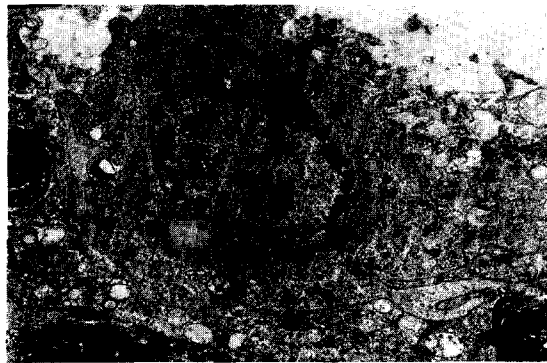
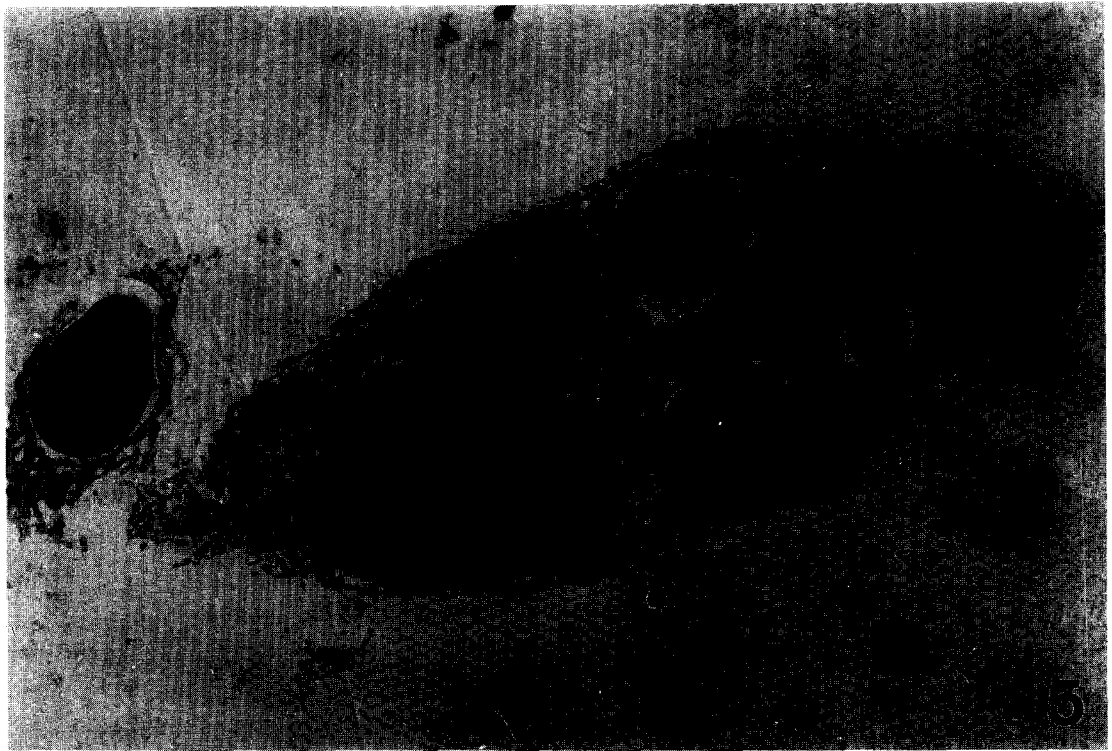
Fig. 1. Normal yeast ($\times 28,000$)

Fig. 2. Yeast proplast ($\times 20,000$)

Fig. 3. 10min after injection of normal yeast. Hemocyte is disrupted when contact on yeast. Vesicles of disrupted hemocyte and coagulum arrested yeast ($\times 12,000$).

Fig. 4. 10min after injection of normal yeast. Clot (CL) is formed. Nucleus, vesicles, granules and yeasts are seen in clot ($\times 12,000$).





부착시킨 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100 CX-II 형 투과전자현미경으로 80 KV에서 관찰하였다.

결과

1. 연두곰파리의 효모에 대한 면역반응

본 실험에서 혈구의 유형은 Roe 등(1993)에 의한 연구 결과에 따라 나누었다. 그러나 효모에 대해 세포성 면역작용을 수행하는 혈구들은 표준 혈구를 구분할때 사용되었던 형태학적 기준들이 많이 사라져 구분하기 매우 어려웠다. 대체로 이들 혈구들은 과립의 양이 적고 크기도 작으며, 길이가 다양한 세포막돌기를 가지고 있었다.

1) 세포벽을 가진 정상적인 효모에 대한 면역반응

효모에 대한 연두곰파리 종령유충의 최초의 면역반응은 효모 주입 10분안에 일어났다. 세포성 면역반응의 최초의 반응은 효모에 접촉한 혈구들이 접촉함과 동시에 파괴되는 반응이며 매우 빠르게 진행된 관계로 혈구의 유형을 판별하기 어려웠다(그림 3). 그러나 대체적인 형태가 과립혈구의 특징을 보여주고 있었다. 접촉 후 파괴된 혈구들의 세포 파편들이 혈림프와 효모 주위에 응집하여 점액성의 응혈을 형성하였다. 응혈의 크기는 효모의 숫자에 의해 결정되어 효모가 많이 존재하는 곳에서는 커다란 응혈이 형성되었으며 효모는 응혈내에 질서없이 존재하였다(그림 4).

이 응혈에 다른 혈구들과 효모들이 첨가되어 응혈의 크기는 점차로 증가하였다. 첨가되는 혈구들의 과립의 양은 매우 적었으며 많은 수의 세포막돌기를 가지고 있었다(그림 5). 초기에 파괴되는 혈구들이 효모와 접촉과 동시에 파괴되었는데 비하여 첨가된 혈구들은 여러가지 방식으로

파괴 또는 분해되었다. 대부분의 경우 응혈에 정착과 동시에 세포내의 과립을 방출하며 파괴되었으나(그림 6) 일부의 혈구들은 정착 후 일정시간 동안 응혈내에서 세포 형태를 유지하다가 과립을 방출하면서 파괴되었고(그림 7), 일부의 혈구들은 응혈내에서 자가분해(autophagic) 반응을 보이며 분해되었다(그림 8). 응혈의 형성은 3시간까지 계속되었다. 3시간이 지난 응혈 내부의 효모 표면에는 매우 전자밀도가 높은 물질이 조금 축적되어 있었다(그림 9).

3시간이 지난 후에는 응혈이 발견되지 않았으며 이 응혈을 중심으로 파괴되지 않은 다세포층의 피낭 또한 형성되지 않았다. 대신 10시간이 지난 후 혈림프내에서 효모가 출아하는 모습이 관찰되곤 하였다(그림 10).

2) 고정된 효모에 대한 면역반응

고정된 효모에 대한 면역반응은 정상적인 효모에 대한 반응과는 달리 효모의 주변에 점액성의 응혈이 형성되지 않았으며 혈구의 과립방출과정도 관찰되지 않았다. 반응하는 혈구는 대부분 과립혈구이며 오로지 식세포 작용만이 관찰되었다. 식세포작용은 10시간이 지나서도 매우 활발히 일어났다(그림 11).

3) 원형질체에 대한 면역반응

혈림프에서 원형질체는 관찰되지 않았다. 전체적으로 혈구들은 적은 수의 과립을 가지고 있었으며 작은 액포들을 활발히 식세포작용하는 모습이 다수 관찰되었다(그림 12).

고찰

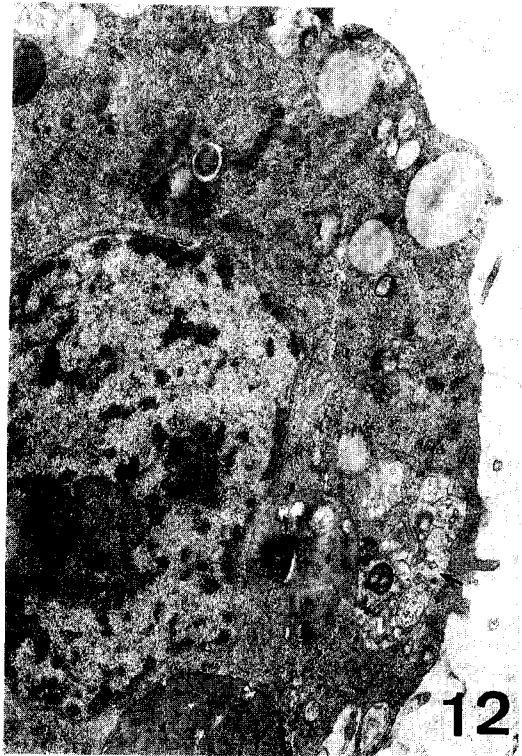
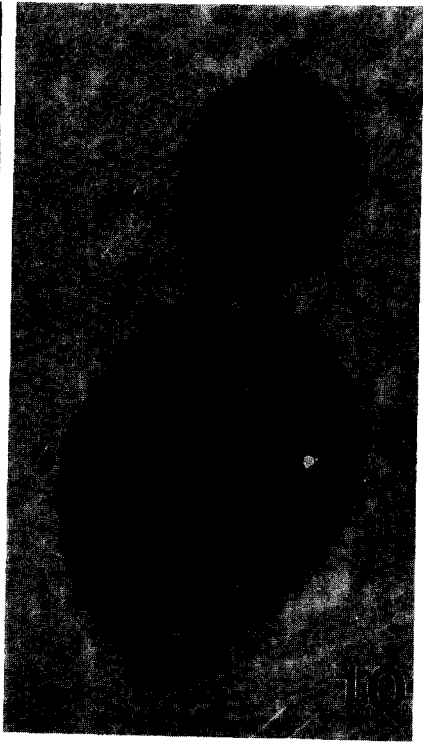
결절형성과 피낭형성은 매우 유사한 반응으로서 최종적으로 다세포층의 피낭을 형성하는데 인

Fig. 5. 10min after injection of normal yeast. Granulocyte is contact on clot. Many cell membrane process of granulocyte are seen. Yeasts surrounded by piece of clot are observed ($\times 5,800$).

Fig. 6. 1hr after injection of normal yeast. When granulocyte is contact on clot, this hemocyte was degranulated and disrupted ($\times 9,300$).

Fig. 7. 30min after injection of normal yeast. Granulocyte has been disrupted after interval in clot ($\times 20,000$).

Fig. 8. 1hr after injection of normal yeast. Autophagic granulocyte is seen ($\times 18,000$).



식시기와 피낭형성 시기의 두 과정으로 구분된다 (Schmit and Ratcliffe, 1977; Eggenberger et al., 1990). 인식시기는 혈구의 과립방출과 파괴, 혈림프의 응집이 특징적이며 이들이 이물질 주위에 한 층의 응집물을 형성한다. 초기에 이물질과 접촉하여 비자기임을 인식하는 일은 모든 종류의 혈구에 의하여 이루어지며, 이물질 주위에 형성된 응집물에 접촉하여 과립 방출을 하며 파괴되는 혈구는 과립혈구임을 암시하였다 (Takahashi and Enomoto, 1987). 그리고 이물질 주위에 형성된 응집물의 주요 구성분은 과립혈구와 소구혈구(spherulocyte)의 과립 또는 소구로 생각되며 이들은 PAS 반응에 양성임이 실험적으로 밝혀졌다(Horohov and Dunn, 1982).

결절형성과 피낭형성에서 초기 응혈을 형성하게 하는 이물질의 유발 인자로 결절 형성의 경우에는 주로 미생물의 수와 세포벽 성분, 피낭형성의 경우에는 이물질의 크기로 생각되고 있다. 최근에는 결절형성 유발인자로서 미생물의 세포벽에 주안점을 두고 계속적인 연구가 진행중이다.

결절형성의 초기 응혈의 유발인자로서 세포벽 성분을 알아보기 위해 *Pseudomonas aeruginosa*를 *Manduca sexta*에 주입한 실험에서 결절형성은 매우 빠른 반응으로서 30분 이내에 90%이상의 박테리아를 제거하며 이 반응은 2시간까지 지속된다. 그 이후 10시간까지는 혈구에 의한 식세포작용으로 박테리아를 제거하였다 (Horohov and Dunn, 1983). Gunnarsson and Lakie(1985)는 미생물로부터 얻어낸 다양한 세포벽 성분을 *Periplaneta americana*에 주입하여 결절형성인자를 알아본 결과 β -1,3-glucan, laminarin, zymosan, lipopolysaccharide(LPS)는 결절형성의 주요한 인자이며 α -1,6-linked glucan, dextran은 결절형성을 유발하지 않았다고 하였다. 또 Brookman 등 (1989a)은 *Locusta migratoria*와 *Schistocerca*

*gregaria*에 미생물의 다양한 세포벽 성분을 주입한 결과 lysozyme soluble peptidoglycan, peptidoglycan, teichoic acid가 제거된 세포벽, capsular material 등은 결절형성을 유발하며 teichoic acid, 제품화 된 lipopolysaccharide는 결절형성을 유발하지 않는다고 하였다.

3종류의 효모-정상 효모, 고정된 효모, 세포벽을 제거한 원형질체-를 연두금파리 종령 유충에 주입한 본 실험의 결과 결절형성의 초기 반응은 매우 빠른 반응이며 식세포작용과 별개의 반응으로 나타났다. 살아있는 완전한 효모는 결절형성을 유발하며 고정된 효모의 경우에는 식세포작용이 일어났다. 원형질체는 고유의 모습이 관찰되지 않았으며 혈구들은 작은 액포들을 활발히 식세포 작용하고 있었다. 이로 미루어 이 원형질체는 혈림프내에서 삼투압이나 다른 요인에 의해 파괴되는 것 같았다.

효모의 세포벽은 견고한 β -1,3-glucan층위에 mannoprotein층이 존재하는데 mannoprotein 단량체들은 비공유결합으로 결합해 층을 이루며 일부의 mannoprotein은 β -1,3-glucan와 공유결합을 하고 있다. 그러나 mannoprotein층은 어느정도 유연성을 가지는 것으로 알려지고 있다 (Zlotnick et al., 1984). 본 실험에서 살아있는 완전한 효모의 경우 결절형성을 일으키는데 반하여 고정된 효모의 경우에는 식세포작용이 관찰되었다. 이는 고정액이 효모의 mannoprotein층을 견고하게 만들어 결절형성의 인자인 β -1,3-glucan층을 차단하기 때문에 결절형성을 유발하지 않는 것으로 사료된다.

효모와 접촉하여 비자기를 인식하고 파괴되는 혈구는 10분 이내에 접촉과 동시에 파괴가 이루어져 정확한 혈구의 유형을 구분하기 어려웠다. 초기에 파괴된 혈구와 혈림프가 효모 주변에 점액성의 응혈을 형성하고 이 주위에 파괴되지 않은 다른 혈구, 효모가 접촉되었다. 응혈 주위에

Fig. 9. 3hr after injection of normal yeast. Something of high electron density is accumulated on yeast cell wall ($\times 32,000$).

Fig. 10. 12hr after injection of normal yeast. Yeast budding in hemocoel of larva ($\times 18,000$).

Fig. 11. 3hr after injection of fixed yeast. Granulocyte phagocytes yeasts. Granules in hemocyte are not degranulated ($\times 7,600$).

Fig. 12. 30min after injection of protoplast. Active phagocytosis is observed (arrow) ($\times 15,000$).

점착되는 혈구는 점착 전에 과립이 많이 사라진 관계로 유형 판별이 어려웠으나 연두금파리의 혈구 유형은 92%가 과립혈구이라는 점(Yang, 1977)으로 미루어 과립혈구로 생각된다. 점착 후 파괴되는 양상은 여러가지 양상-점착되면서 과립방출을 하며 파괴되는 혈구. 점착후 일정 시간이 지난 후에 과립방출하면서 파괴되는 혈구. 점착후 일정시간이 지난후 자가 분해되는 혈구 등-으로 나타나는데 아마도 이 차이점은 혈구들의 subtype과 관계되지 않는가 생각된다.

본 실험에서 결절형성은 특이하게 인식시기만이 관찰되었다. 즉 응혈은 형성되었으나 최종적으로 다세포층의 피낭은 형성되지 않았다. Schmit와 Ratcliffe(1977), Davies와 Preston(1987), Gotz(1986) 등은 피낭형성시 다세포층의 피낭을 형성하는 주요 혈구는 무정형 혈구라는 암시를 하고 있다. 연두금파리의 경우에는 92%가 과립혈구라는 점에서 초기인식시기는 존재하지만 지속적인 다세포층의 피낭은 무정형혈구의 작은 숫자로 말미암아 형성되지 않은 것으로 생각된다.

감사

본 연구는 1992년도 교육부 기초과학 연구비 지원에 의해 이루어 졌음.

인용문헌

- Brehelin M., J.A. Hoffman, G. Matz and A. Porte, 1975. Inverted gap and other cell junctions in cockroach hemocyte capsule: a thin section and freeze fracture study. *Tissue cell.*, **7**: 575-585.
- Brookman, J.L., A.F. Rowley and N.A. Ratcliffe, 1989a. Studies on formation in Locusts following injection of microbial products. *J. Invertebr. Pathol.*, **53**: 315-323.
- Brookman, J.L., N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley, 1989b. Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect. Biochem.*, **19**: 47-57.
- Davies, D.H. and T.M. Preston, 1987. Effect of disruption of plasmatocyte microfilaments on encapsulation in vitro. *Devel. Comp. Immunol.*, **11**: 353-362.
- Eggenberger, L.R., W.J. Lamoreaux, and L.B. Coons, 1990. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp. Appl. Acarol.*, **9**: 279-287.
- Ennesser, C.A. and A.J. Nappi, 1984. Ultrastructural study of the encapsulation response of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Ultra. research.*, **87**: 31-45.
- Gagen, S.J., and N.A. Ratcliffe, 1976. Studies on the in vivo cellular reactions and fate of injected bacteria in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, **28**: 17-24.
- Gotz, P., 1986. Encapsulation in arthropods. In: Immunity in Invertebrates. (BREHELIN, M, Ed.): Springer-Verlag, pp. 153.
- Gunnarsson, S.G. and A.M. Lackie, 1985. Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. *J. Invertebr. Pathol.*, **46**: 312-319.
- Hoffman, D., M. Brehelin and J.A. Hoffman, 1974. Modifications of the hemogram and hemocytopoietic tissue of male adults of *Locusta migratoria* (Orthoptera) after injection of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **24**: 238-247.
- Horohov, D.W. and P.W. Dunn, 1982. Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. *J. Invertebr. Pathol.*, **40**: 327-339.
- Horohov, D.W. and P.W. Dunn, 1983. Phagocytosis and Nodule formation by hemocytes of *Manduca sexta* Larvae following injection of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.*, **41**: 203-213.
- 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. Invertebr. Pathol.*, **28**: 373-382.
- Ratner, S., and B.S. Vinson, 1983. Phagocytocytosis and encapsulation: Cellular immune responses in arthropoda. *Amer. Zool.*, **23**: 185-194.
- Roe, M.J., J.H. Kim, S.C. Yu, K.S. Kim and W.K. Kim, 1993. Hemocyte types and granular composition of *Lucilia illustris*. *Korean J. Entomol.*, **23**: 31-39.
- Schmit, A.R. and N.A. Ratcliffe, 1977. The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae. *J. insect Physiol.*, **23**: 175-184.
- Takahashi, S. and G. Enomoto, 1987. Scanning electron microscopic study of the initial phase of encapsulation in *Samia cynthia ricini*. *Develop. Growth and Differ.*, **29**: 249-256.
- Vey A. and J. Farques, 1977. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. *J. Invertebr. Pathol.*,

30: 207-215.

Walters, J.B. and N.A. Ratcliffe, 1983. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: Fate of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules. *J. Insect. Physiol.*, **29**: 417-424.

Zlotnick, H., M.P. Fernandez, B. Bowers and E. Cabib, 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an

external cell wall layer that determines wall porosity. *J. Bacteriol.*, 159: 1018-1026.

양희영, 1977. 곤충의 혈구에 관한 연구. 고대박사학위논문.

(Accepted October 20, 1994)

**Studies on the Nodule Formation Factor and Mechanism of the Hemocyte
in *Lucilia illustris***

Min-Won Jeong, Ji-Hyun Kim, Woo-Kap Kim (Department of biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

This investigation has been carried out to examine nodule formation of hemocytes against the foreign cells in the last larval *Lucilia illustris*. The morphological processes of immune reaction following injections of normal yeast, fixed yeasts and cell wall- removed yeasts (protoplasts) into the hemocoel were examined by the electron microscope. The injection of normal yeast has led to discharge of granules from the granulocytes, destruction of the granulocytes, and formation of sticky clot around the yeasts. The sticky clot contains various types of hemocytes, especially granulocytes which were most active in this immune reaction. The clot, or core of nodule, is filled with yeast, intact or destructed hemocytes, and discharged granules from granulocytes. The increase of clot in size continued until 3 hours after injection of normal yeast into the hemocoel. The clots could not be found with the hemocoel 10 hours after injection of normal yeast, but a few normal yeasts were found. The injection of fixed yeasts caused the hemocytes to phagocyte them until 10 hours after the injections. However, destruction of hemocytes and discharge of granules from granulocytes were not found. In case of injection of cell wall removed yeasts, the immune reactions of hemocytes could not be examined.