

In vitro 免疫反応におけるマクロファージ機能に関する研究

第 1 編

Polyclonal B cell activator によるリンパ球活性化反応におけるマクロファージ機能に関する研究

岡山大学医学部第三内科学教室 (主任: 太田善介教授)

篠原佳年

(昭和58年3月30日受稿)

Key words: polyclonal B cell activator,
macrophage,
PWM-induced Ig synthesis,
³H-thymidine incorporation,
nonspecific esterase staining

緒言

ヒトにおける免疫応答の調節機構を研究するために、*in vitro* において、phytohemagglutinin (PHA), pokeweed mitogen (PWM) を利用した DNA 合成反応、多クローン性抗体産生反応などが、広く用いられている。その結果、ヒトリンパ球の、マイトゲン、同種細胞、種々の抗原などに対する DNA 合成反応には、マクロファージ (M ϕ) が重要な役割を果たしていることが、知られている^{1,2)}。さらに、T細胞依存性抗原に対する抗体産生反応においても、M ϕ の必要性が指摘されている³⁾。ところが、T細胞依存性抗体産生反応のモデルとして知られている PWM による多クローン性の抗体産生反応については、ヘルパーT細胞の必要性は明らかにされている⁴⁻¹⁰⁾が、M ϕ の必要性については、現在なお明らかにされていない。

in vitro の抗体産生反応モデルである PWM 誘導多クローン性抗体産生反応や polyclonal B cell activator (PBA) 刺激による DNA 合成反応における M ϕ の必要性の有無を研究することは、*in vitro* におけるヒトリンパ球の免疫応答調節反応の研究をすすめる上で、重要なことと思わ

れる。そこで、従来よりこの研究を困難とし、まちまちの結果が報告される原因となっている含有 M ϕ の不均一性を無くするために、M ϕ 除去法を改良して組み合わせることにより、M ϕ をほぼ完全に除去し、PBA 誘導抗体産生反応ならびに DNA 合成反応における M ϕ の役割を検討した。

対象ならびに方法

1. 末梢血単核球 (mononuclear cells: MNC) の分離

a) 未分画 MNC の分離

健常者のヘパリン加末梢血を、培養液 RPMI-1640 にて 2 倍に希釈して、Ficoll-Conray 液に静かに重層し、1,500 r.p.m. (400G) にて 30 分間遠沈後、境界面に浮遊する MNC 層を採取した。RPMI-1640 にて 2 回洗浄後、10% fetal calf serum (FCS) 加 RPMI-1640 にて、 1×10^6 /ml に調整浮遊させたものを、未分画 MNC とした。

b) M ϕ 除去 MNC 分画の分離

健常者のヘパリン加末梢血を、培養試験管 (Falcon 社製 #3033) 内に入れ、1/10 量のシリカ浮遊液 (日本抗体研究所, KAC-2) を加え、

10分毎によく転倒混和しつつ、37°Cの恒温槽内に1時間静置した。さらに、このシリカ処理血液より、Ficoll-Conray 比重遠沈法にて食食細胞除去 MNC 分画を得、2回 RPMI-1640 にて洗浄後、10% FCS 加 RPMI-1640 で浮遊させ、特殊コーティングプレート（日本抗体研究所、MSP-P）内に入れ、5% CO₂ incubator 内に、37°C 1時間静置した。次いで、非付着細胞を静かに吸引し RPMI-1640 にて洗浄後、10% FCS 加 RPMI-1640 にて浮遊させ、Mφ 除去 MNC 分画とした。このとき、各プレートには、最高 1×10^7 個の細胞を、3~4 ml の10% FCS 加 RPMI-1640 に浮遊させたものを入れた。

c) T細胞, B細胞分画の分離

Mφ 除去 MNC 分画より、Yano 等の方法¹¹⁾ に準じ、羊赤血球(SRBC) ロゼット法にて、E-Rosette forming cells(E-RFC) とロゼットを形成しない分画(non-E-RFC)を得た。E-RFC は、Tris NH₄Cl にて、Ficoll-Conray 比重遠沈時の沈渣の SRBC を溶解し、RPMI-1640 にて2回洗浄(1,500 r.p.m. 6分)後、10% FCS 加 RPMI-1640 に浮遊させて採取し、T細胞分画とした。また、non-E-RFC は、RPMI-1640 で希釈し、よく混和して、まず2,000r.p.m.10分間、次いで1,500r.p.m. 6分間遠沈洗浄後、10% FCS 加 RPMI-1640 にて浮遊させ、B細胞分画とした。

d) Mφ 分画の分離

未分画 MNC を、MSP-P 内に上記のように入れ、37°C 1時間5% CO₂ incubator 内に静置し、非付着細胞を除去したのち、さらに約37°C に温めた RPMI-1640 にて数回洗浄を繰り返して、出来るだけ非付着細胞を取り除いた。次に4°C に冷却させておいた EDTA-FCS 加 PBS (0.54 mM) を約3~4 ml プレート内に加え、4°C にて20分間静置した。その後、遊離細胞を採取し、3回洗浄したのち、10% FCS 加 RPMI-1640 にて浮遊させ、Mφ 分画とした。

2. 免疫グロブリン (Ig) 産生用 MNC 培養

Asano 等の方法¹²⁾ に準じて行った。すなわち、培養液は、あらかじめ *in vitro* IgG 産生に対して刺激作用の少ないことを確かめ、56°C 30分間に非働化した FCS と、penicillin G.(PC-G)100 U/ml, streptomycin(SM) 100μg/ml を含む

RPMI-1640 を用いた。末梢血 MNC は血清中の Ig の混入を避けるため、RPMI-1640 にて計5回洗浄した。生細胞を10% FCS 加 RPMI-1640 にて 1×10^6 /ml に調整し、おのおの1 ml を上記の培養試験管に分注し、PWM (GIBCO 社) 10μl/ml を添加後、5% CO₂ incubator 内で37°C 9日間培養した。培養終了後、2,000r.p.m. で10分間遠沈し、培養上清を村田式ピペットにて採取し、-20°C で保存した。

3. 単球の同定

各細胞分画の浮遊液を、サクラオートスメア (サクラ精機) にて、750r.p.m. 60秒間の cyto-centrifugation を行って塗抹標本を作製し、十分乾燥させた。その後、エステラーゼ染色キット (武藤化学) にて、非特異的エステラーゼ染色¹³⁾ (nonspecific esterase-staining) を行い、単球を同定した。即ち、ホルマリンアセテート緩衝液にて固定し、M/15 リン酸バッファー pH 6.3 にて溶解させた Fast Garnet GBC と、2% α-Naphthyl Butyrate EGME 液との混合液にて30分間染色し、核染色には Mayer's Hematoxylin 染色を行った。各分画中の Mφ の混入率は、1000個の細胞中のエステラーゼ陽性細胞を算定することにより、求めた。(Table I)

Table I. Percentage of Mφ in fractionated cell populations

	non-specific esterase positive cells (%)
unfractionated	10-50%
Mφ depleted fraction	< 0.1 %
Mφ fraction	> 90 %
T cell fraction	< 0.1 %
B cell fraction	< 0.1 %

4. 培養上清中の Ig 量の測定

Asano 等¹²⁾ の報告の如く、二抗体法 radio-immunoassay(RIA) にて培養上清中の IgG, IgA および IgM を測定した。すなわち、各種骨髄腫およびマクログロブリン血症患者の血清から各種 Ig を精製し、Chloramine T 法にて¹²⁵I 標識 Ig を作製した。標準曲線用の精製 Ig または各培養上清0.1ml と1/1,000~1/2,500の正常家兔血清を含む1% BSA-PBS にて、1/2,000

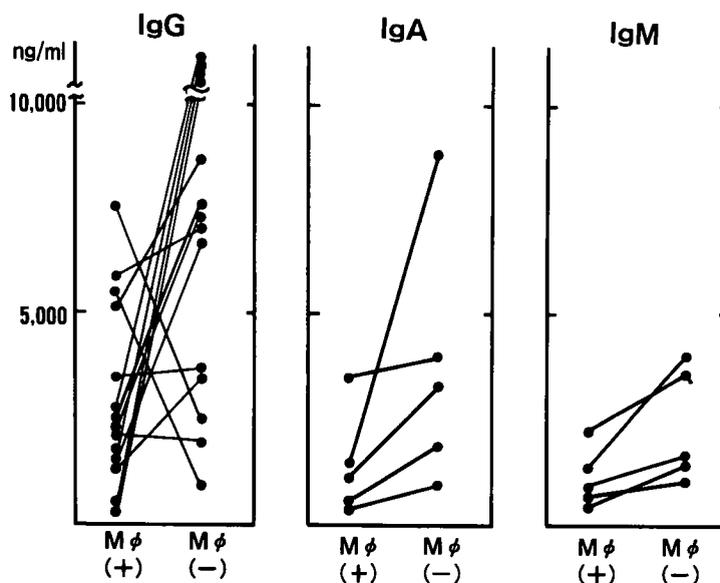


Fig. 1. Effect of M ϕ depletion on PWM-induced Ig(s) synthesis. M ϕ (+), unfractionated MNC; M ϕ (-), M ϕ depleted MNC.

に希釈した抗各種H鎖家兔血清0.1mlとを室温にて90分間反応させ、次に約20,000 cpm/0.1ml (Ig量として1 ng以下)となる様に希釈した各種標識Ig液0.1mlを加え、さらに90分間反応させた。次いで1% BSA-PBSにて1/100~1/200に希釈した抗家兔 γ -globulin山羊血清0.1mlを添加し、一晚4°Cにて反応させた。反応後3,000 r.p.m.にて30分間遠沈し、上清を除去し、沈渣中の放射能活性を測定して標準曲線から上清1 ml中に含まれるIg量を求めた。

5. ³H-thymidine (TdR) 摂取率¹⁴⁾

T細胞分画を、10% FCS加RPMI-1640にて5×10⁵/mlに調整し、その0.2mlをmicrotest plate(Falcon社, #3042)の各穴に入れ、5日間培養し、培養終了4時間前に5 μ Ci/mlの³H-TdRを加え、4時間pulseを行った。培養終了後に、Mini MASH(ラボサイエンス社)にて細胞をグラスファイバー紙上に洗浄採取して、液体シンチレーション・カウンターにて、³H-TdR摂取率を測定した。なお、培養時添加するマイトゲンは、PBAとして知られているStaphylococcal phage lysate¹¹⁾: SPL(Delmont社)、PWMを用い、濃度は、それぞれの至適濃度である25 μ l/ml、2.5 μ l/mlにした。

結 果

1. PWM誘導Ig産生における単球の影響

正常人14人の未分画MNC、M ϕ 除去MNC分画をそれぞれ1×10⁶/mlに調整し、PWM 10 μ l/mlを添加後9日間培養し、その上清中のIgを、二抗体法RIAにて測定した。PWM刺激によるIg産生を、未分画MNCとM ϕ 除去MNC分画とで比較すると、Fig. 1に示すように、IgGは有意(p<0.01)にM ϕ 除去MNC分画の方が高値であり、IgA、IgMでは共に軽度の上昇傾向が認められた。以上よりin vitroにおけるPWM誘導Ig産生には、M ϕ の非存在下にも十分反応出来、IgG産生反応においては、M ϕ 除去により、上昇していることが判明した。

2. T細胞、B細胞による再構成成分画のPWM誘導Ig産生

正常人6人のM ϕ 除去MNC分画より、T細胞、B細胞を分離し、4:1にて再構成した時のPWM誘導Ig産生量を測定した。Fig. 2に示すように、M ϕ を含まない再構成成分画のIgG産生は、M ϕ を含んでいる未分画MNCと比較して、有意(p<0.01)に上昇していた。

3. T細胞、B細胞による再構成成分画のPWM

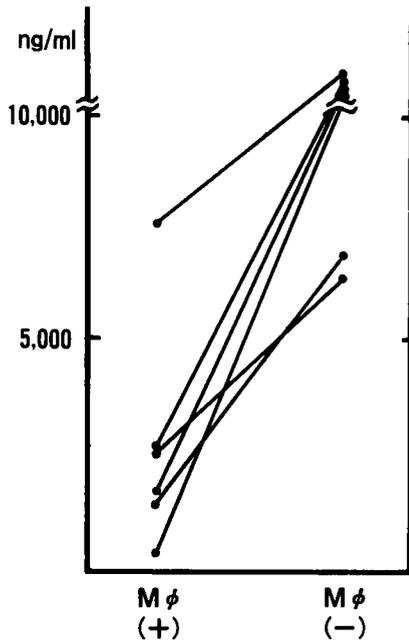


Fig. 2. PWM-induced IgG synthesis by reconstituted fraction with T and B cells. Mφ(+), unfractionated MNC; Mφ(-), reconstituted fraction with T and B cells from Mφ depleted MNC.

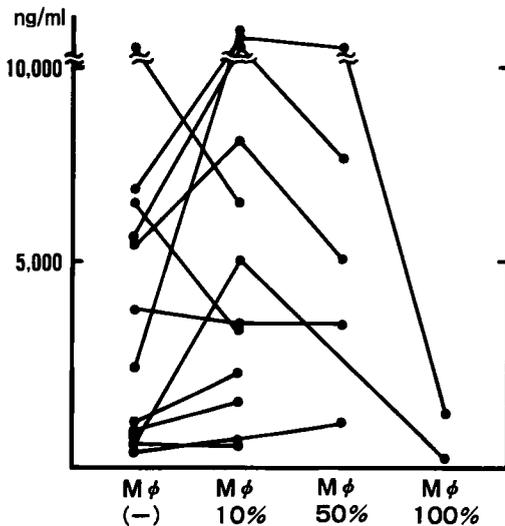


Fig. 3. Effect of various numbers of Mφ on PWM-induced IgG synthesis by reconstituted fraction with T and B cells.

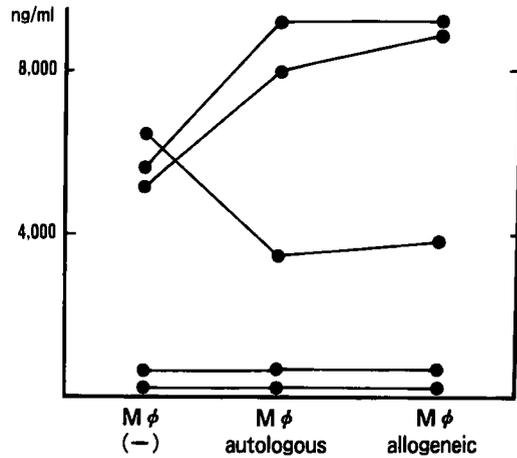


Fig. 4. Effect of autologous or allogeneic Mφ addition on PWM-induced IgG synthesis by reconstituted fraction with T and B cells.

Table II. Effect of Mφ addition on PWM-induced DNA synthesis by T cell fraction

Addition to T cell Culture		³ H-Thymidine Incorporation (dcpm)						
PWM	Mφ	EXPT. 1	EXPT. 2	EXPT. 3	EXPT. 4	EXPT. 5	EXPT. 6	Mean±SE
0	0	48	519	137	350	400	1,185	440±165
+	0	423	5,700	2,257	5,000	5,000	6,371	4,125±935
+	+	11,085	8,790	4,237	N.D.	N.D.	10,556	8,667±1,556

N.D.=Not Done

誘導 IgG 産生に対する Mφ の影響

Fig. 3 は、正常人12人の再構成成分画に、自己 Mφ を10%、50%、100%添加したときの、PWM 誘導 IgG 産生を比較したものである。再構成成分画に、10%の Mφ を加えると、産生 IgG 量は、9例で上昇し、3例で減少した。これらの減少例のうち2例は、どちらも再構成成分画のみでも産生 IgG 量は高値であった。50% Mφ 添加では、5例中3例が、減少し、2例は、変化が認められなかった。100% Mφ の添加では、2例とも IgG 産生は激減した。以上の成績は、PWM 誘導 IgG 産生において、Mφ は不可欠なものではなく、至適数の Mφ が存在すれば、最大の IgG 産生反応をおこし、過剰の Mφ が存在すれば、IgG 産生を抑制することを、示唆していた。

4. 同種 Mφ の PWM 誘導 IgG 産生への影響
次に、正常人5人の再構成成分画に、同種 Mφ

Table III. Effect of Mφ addition on SPL-induced DNA synthesis by T cell fraction

Addition to T cell Culture		³ H-Thymidine Incorporation (4cpm)										Mean±SE
SPL	Mφ	EXPT. 1	EXPT. 2	EXPT. 3	EXPT. 4	EXPT. 5	EXPT. 6	EXPT. 7	EXPT. 8	EXPT. 9	EXPT. 10	
0	0	48	202	400	420	N.D.	N.D.	N.D.	304	519	313	315±59
+	0	1,177	3,372	24,000	5,320	41,000	45,000	12,500	2,213	10,500	26,763	17,185±5,118
+	+	12,644	5,218	40,000	13,968	41,300	37,000	25,000	22,528	23,104	54,108	28,743±4,763

N.D.=Not Done

を10%添加時の PWM 誘導 IgG 産生を、自己 Mφ を10%加えた群と比較した。Fig. 4 のように、自己 Mφ と同種 Mφ における PWM 刺激による IgG 産生において、差は認められなかった。

5. T細胞分画の PWM 誘導 DNA 合成反応におよぼす Mφ の影響

正常人6人のT細胞分画の PWM 誘導 ³H-TdR の摂取率と、10%自己 Mφ 添加時の同反応を比較すると、Table II に示すように、T細胞分画のみでも、PWM の刺激にて DNA 合成反応は、非刺激時と比較し、有意 (p < 0.01) に上昇し、10%自己 Mφ を添加すると、³H-TdR 摂取率はさらに増加した。

6. T細胞分画の SPL 誘導 DNA 合成反応におよぼす Mφ の影響

PWM と同様で T細胞依存性の PBA である SPL を用いて、正常人10人のT細胞分画にて、上記と同様の実験を施行した。Table III に示すように、SPL で刺激しても、T細胞分画は、非刺激時と比較し、有意 (p < 0.05) に上昇し、10%自己 Mφ を添加すると、³H-TdR 摂取率はさらに増加した。成績は示していないが、PWM 又は SPL のどちらを用いた場合にも、10%同種 Mφ の添加は、10%自己 Mφ の添加と同様の ³H-TdR の摂取率増加効果をあらわし、又、自己 Mφ の50%、100%添加の場合は、³H-TdR の摂取率を減少させる傾向を示した。従って、T細胞依存性 PBA である PWM あるいは SPL による T細胞分画の DNA 合成反応において、Mφ の存在は不可欠なものではなく、至適数の Mφ が混在すれば、最大の反応が得られるということが推測された。

考 接

本研究は、*in vitro* における免疫反応での Mφ の役割を、PBA である PWM あるいは SPL 刺激時の抗体産生反応、DNA 合成反応を通して、検討したものである。まず、PWM による *in vitro* の抗体産生反応についてみると、数多くの研究により、この反応はヘルパー T細胞を必要とし⁴⁻¹⁰⁾、ヘルパー T細胞とサブレッサー T細胞のバランスによって、反応性が調節されていることが、一般的に認められている¹⁵⁾。しかし、本反応における Mφ の必要性については、賛否両論があり、Saxon 等⁵⁾、Fauci 等¹⁶⁾、Meyling 等¹⁷⁾ は、Mφ の不必要性を主張し、又 Rosenberg 等¹⁸⁾、Knapp 等¹⁹⁾、Keightley 等⁴⁾ は、その必要性を主張している。この全く正反対の成績が得られた原因は、Mφ の除去の困難さと、用いた抗体産生測定の方法の違いに由来するものと思われる。実際、上記のほとんどの研究者たちも、Mφ 除去 MNC 分画中に、なお 1~数%の Mφ の混入を認めている。データには示していないが、筆者も Meyling 等¹⁷⁾ の報告と同じように、少数の Mφ の存在下でも、十分反応出来ることを認めており、この 1~数%の Mφ が混入している細胞分画を用いての実験では、Mφ の機能を解析することは、不適當であると思われる。本実験において、PWM による抗体産生反応には、Mφ は不可欠なものではなく、Mφ の除去によって、むしろ上昇の傾向が認められた。さらに、最大の反応を得るためには、至適数の Mφ の存在が必要であり、過剰の Mφ の存在は IgG 産生を抑制し、又これらの Mφ の

働きは、同種 $M\phi$ でも同様に認められた。これらの結果は、 $M\phi$ が PWM 誘導抗体産生反応に必要なだと主張する Rosenberg 等¹⁸⁾、Knapp 等¹⁹⁾ の結果と相反する。Knapp 等¹⁹⁾ は、 $M\phi$ を付着法により部分的に除去すると抗体産生反応が上昇し、 $M\phi$ を完全に除去すると、抗体産生反応が消失することから、本反応に $M\phi$ は必要だと主張している。 $M\phi$ の部分的除去による抗体産生の増加は、本研究結果と一致するところであるが、完全に $M\phi$ をとり除く (0.2%以下に) と抗体産生が見られなくなるという成績は、本研究の成績からは理解出来ない。これは、Meyling 等¹⁷⁾、Rosenberg 等¹⁸⁾ も指摘しているように、Knapp 等¹⁹⁾ の $M\phi$ 除去法、即ちナイロンウールカラム付着法が、高率に $M\phi$ を除去すると同時に、PWM 反応性 B 細胞の多くをも、除去するためではないかと考えられる。Rosenberg 等¹⁸⁾ は、従来より培養の際に用いられている丸底の培養管は、底に細胞が密集しやすく、たとえ少数の $M\phi$ の存在でも、十分反応し得ると考え、少数の MNC を平底プレートを用いて培養する、low cell density cultures 法を用いて検索し、PWM 誘導 IgG 産生反応には、 $M\phi$ が必要であると報告している。筆者も、正常人 9 人の再構成分画を、丸底チューブ、平底プレートで培養したところ、確かに平底プレートでは産生される IgG 量が減少する例が多く見られたが、不変、増加を示す例もみられ、一定の傾向は認められず、 $M\phi$ の添加によっても、ほとんど上昇はみられなかった。おそらく、混入 $M\phi$ だけの問題だけではなく、T 細胞と B 細胞の接触がより少なくなったことも、このような結果が得られた原因ではないかと考えられる。さらに、Rosenberg 等¹⁸⁾、Knapp 等¹⁹⁾ が用いた産生 Ig の測定方法が、筆者の用いた RIA 法とは異なっていることに基づいているのかも知れない。Saxon 等⁵⁾、Fauci 等¹⁶⁾ は、筆者と同じように、PWM 誘導抗体産生反応に $M\phi$ は必要でないと主張している。しかし、Saxon 等⁵⁾、Fauci 等¹⁶⁾ の報告は、 $M\phi$ 除去 MNC 分画に、なお残余 $M\phi$ が 1~数%存在しており、比較の対象とはなり得ない。Meyling 等¹⁷⁾ の結果は、筆者の実験結果と非常によく近似している。彼等は、G-10カ

ラムにより $M\phi$ を 0.3%以下に除去した分画を用い、 $M\phi$ の非存在下でも未分画細胞群より低い、十分な PWM 誘導抗体産生を認め、又少量の $M\phi$ の存在下で至適反応を示し、過剰 $M\phi$ の存在下で抗体産生の抑制を認めたと、述べている。しかしながら、 $M\phi$ 除去 MNC 分画、未分画 MNC、 $M\phi$ 添加細胞群それぞれの PWM 誘導 IgG 産生動態は、筆者の実験結果と異なり、 $M\phi$ の至適数等にも大きな差が認められる。これらの差は、用いた細胞分離法、培養チューブの底の形態、PWM の濃度等の違いによるものと考えられる。

次に、T 細胞特異マイトゲンである PHA、Concanavalin-A (Con-A) に対する T 細胞分画の DNA 合成反応における $M\phi$ の必要性については、多くの研究で、 $M\phi$ が必要であると認められている^{20,21)}。しかし、PWM や SPL のような PBA に対する T 細胞分画の DNA 合成反応における $M\phi$ の必要性については、ほとんど報告がなされていない。筆者は、本実験において、Table II、Table III で示したように、PBA 刺激による T 細胞分画の DNA 合成反応は、 $M\phi$ の存在を必要としないが、10% $M\phi$ の添加により、さらに ³H-TdR の摂取率は増加するという結果を得た。

それでは、PWM 誘導 IgG 産生反応においても、又 PWM、SPL 誘導 DNA 合成反応においても、 $M\phi$ を必要としないという研究結果を、どのように解釈すればいいのであろうか。 $M\phi$ は免疫応答においては、抗原提示細胞として、広く認識されているが、PBA は抗原物質ではなく、マイトゲンの一種であり、T 細胞、B 細胞上の同じマイトゲンレセプターに直接結合し、両細胞の活性化を惹起するものと理解されている。従って、免疫応答で重要な役割を担う主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) 産物の認識を必要とせず、PBA による反応は、MHC の制約をこえて反応し、MHC 産物を保持し、抗原提示機能を有する $M\phi$ を必要としないことが、理解出来る。次に最大反応に至適数の $M\phi$ の存在が必要なのは、なぜであろうか。おそらく、 $M\phi$ は前述のように抗原提示細胞として働いているのではなく、

さまざまな液性因子を産生し、免疫応答反応が最も円滑にすすめられる至適環境を形成しているためと理解される。過剰のM ϕ の存在が抗体産生を抑制することについては、サプレッサーM ϕ の概念が導入され、同時にM ϕ の産生する種々の抑制物質が、分子レベルで解明されつつある^{22,23)}。しかし、この抑制がサプレッサーM ϕ の活性化によるものか、サプレッサーT細胞を介して作用するのか、現在のところ不明であるが、X線照射にてもこの抑制が消失しない¹⁹⁾ことより、M ϕ 自体が、直接又は液性因子を介してB細胞を抑制している可能性が強い。しかし、M ϕ を採取する操作が、M ϕ を活性化し抑制的に作用している可能性があり、M ϕ による抑制は*in vitro*においてのみ見られる現象かもしれない。従って、今後は、比重の差²⁴⁾などを利用して、出来るだけ刺激をうけていないM ϕ を、採取する必要があると思われる。筆者は、本実験中に、PWMに無〜低反応性の正常人2例を経験したが、このときM ϕ を完全に除去すると反応性を回復し、M ϕ を順次加えてゆくとさらに反応は上昇したが、*in vivo*におけるM ϕ の数とほぼ一致する80〜100%のM ϕ (全細胞の40〜50%に相当)を加えると、全く無反応となった。このPWMに無〜低反応者は、PWM反応性ヘルパーT細胞の欠陥といわれていた⁴⁾が、これらの例のように、M ϕ 自体がPWM刺激反応に対して、非常に抑制的に作用している可能性が強いと思われる。今後は、*in vitro*における、マイトゲンを用いた実験の限界を認識し、その上でデータを解析し、より生体環境に近い実験システムを築いてゆく必要がある

と思われる。

結 語

PBAのリンパ球活性化反応におけるM ϕ の機能について検討し、以下のことが判明した。

1. 正常人MNCによるPWM誘導Ig産生は、M ϕ が存在しなくても可能であり、IgG産生反応においては、M ϕ 除去により、むしろ有意($p < 0.01$)な産生亢進が、認められた。
2. M ϕ 除去MNC分画のPWM誘導Ig産生反応は、10%の自己M ϕ 添加にて上昇傾向を、50%又は100%の自己M ϕ 添加にて著明な抑制を示した。又10%の同種M ϕ の添加は、10%の自己M ϕ の添加と同様の効果を示した。
3. T細胞依存性のPBAである、PWM、SPL刺激によるT細胞分画のDNA合成反応において、M ϕ は不可欠なものではなく、10%の自己M ϕ の添加は、³H-TdRの摂取率をさらに増加させることが、判明した。

以上、PBAによる*in vitro*のIgG産生反応、DNA合成反応などのリンパ球活性化反応においては、M ϕ は不可欠なものではなく、適当数のM ϕ が存在すれば、至適環境がえられ、リンパ球は最大反応をおこし、過剰のM ϕ の存在は抑制効果を示すことが、判明した。

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜った恩師太田善介教授に深甚の謝意を表します。また、終始多大の御指導と御援助をいただいた矢野啓介博士に感謝いたします。

なお、本論文の主旨の一部は、第32回日本アレルギー学会総会(1982年,10月,岡山)において発表した。

文 献

1. Schmidtke, J.R. and Hatfield, S.: Activation of purified human thymus-derived (T) cells by mitogens. II. Monocyte-macrophage potentiation of mitogen-induced DNA synthesis. *J. Immunol.* 116, 357-362, 1976.
2. Rosenberg, S.A. and Lipsky, P.E.: Monocyte dependence of pokeweed mitogen-induced differentiation of immunoglobulin-secreting cells from human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 122, 926-931, 1979.
3. Rosenthal, A.S.: Regulation of the immune response-Role of the macrophage. *N. Engl. J. Med.* 303, 1153-1156, 1980.

4. Keightley, R.G., Cooper, M.D. and Lawton, A.R.: The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. *J. Immunol.* **117**, 1538—1544, 1976.
5. Saxon, A., Stevens, R.H. and Ashman, R.F.: Regulation of immunoglobulin production in human peripheral blood leukocytes: Cellular interactions. *J. Immunol.* **118**, 1872—1879, 1977.
6. Lohrmann, H.P., Novikovs, L. and Graw, R.G.: Cellular interactions in the proliferative response of human T and B lymphocytes to phyto mitogens and allogeneic lymphocytes. *J. Exp. Med.* **139**, 1553—1567, 1974.
7. Greaves, M., Janossy, G. and Doenhoff, M.: Selective triggering of human T and B lymphocytes *in vitro* by polyclonal mitogens. *J. Exp. Med.* **140**, 1—18, 1974.
8. Clot, J., Massip, H. and Mathieu, O.: *In vitro* studies on human B and T cell purified populations. *Immunology* **29**, 445—453, 1975.
9. Insel, R.A. and Merler, E.: The necessity for T cell help for human tonsil B cell responses to pokeweed mitogen: Induction of DNA synthesis, immunoglobulin, and specific antibody production with a T cell helper factor produced with pokeweed mitogen. *J. Immunol.* **118**, 2009—2014, 1977.
10. Hirano, T., Kuritani, T., Kishimoto, T. and Yamamura, Y.: The mechanism (s) involved in T cell helper functions in the pokeweed mitogen-induced differentiation and proliferation of B cells. *J. Immunol.* **119**, 1235—1241, 1977.
11. Yano, K. and Lucas, Z.J.: Cytotoxic activity of lymphocytes. VII. Cellular origin of α -lymphotoxin. *J. Immunol.* **120**, 384—394, 1978.
12. Asano, T., Yano, K. and Ofuji, T.: A double antibody radioimmunoassay for measurement of IgG, IgA and IgM synthesized by human lymphocytes *in vitro*. *Acta Med. Okayama* **35**, 319—326, 1981.
13. Horwitz, D.A., Allison, A.C., Ward, P. and Kight, N.: Identification of human mononuclear leucocyte population by esterase staining. *Clin. Exp. Immunol.* **30**, 289—298, 1977.
14. 矢野啓介, 盛政公明: マイトゲンおよび特異抗原誘発リンパ球芽球化反応. *臨床免疫*, **13**, 333—338, 1981.
15. Lipsky, P.E., Ginsberg, W.W., Finkelman, F.D. and Ziff, M.: Control of human B lymphocyte responsiveness: Enhanced suppressor T cell activity after *in vitro* incubation. *J. Immunol.* **120**, 902—910, 1978.
16. Fauci, A.S., Steinberg, A.D., Haynes, B.F. and Whalen, G.: Immunoregulatory aberrations in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **121**, 1473—1478, 1978.
17. Gmelig-Meyling, F. and Waldmann, T.A.: Human B cell activation *in vitro*: Augmentation and suppression by monocytes of the immunoglobulin production induced by various B cell stimulants. *J. Immunol.* **126**, 529—537, 1981.
18. Rosenberg, S.A. and Lipsky, P.E.: The role of monocytes in pokeweed mitogen-stimulated human B cell activation: Separate requirements for intact monocytes and a soluble monocyte factor. *J. Immunol.* **126**, 1341—1345, 1981.
19. Knapp, W. and Baumgartner, G.: Monocyte-mediated suppression of human B lymphocyte differentiation *in vitro*. *J. Immunol.* **121**, 1177—1183, 1978.
20. Rosentreich, D.L., Farrar, J.J. and Dougherty, S.: Absolute macrophage dependency of T lymphocyte activation by mitogens. *J. Immunol.* **116**, 131—139, 1976.
21. Knop, J.: Influence of various macrophage populations on Con-A induced T-cell proliferation. *Immunology* **41**, 379—385, 1980.
22. Passwell, J.H., Levanon, M., Davidsohn, J., Kohen, F. and Ramot, B.: The effect of human mono-

- cytes and macrophage proliferation. *Immunology* **47**, 175–181, 1982.
23. Staite, N.D. and Panayi, G.S.: Regulation of human immunoglobulin production *in vitro* by prostaglandin E₂.: *Clin. Exp. Immunol.* **49**, 115–122, 1982.
24. Gutierrez, C., Bernabe, R.R., Vega, J. and Kreisler, M.: Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J. Immunol. Methods* **29**, 57–63, 1979.

Studies on macrophage function in *in vitro* immune response

Part 1. The role of macrophages in lymphocyte
reaction to polyclonal B cell activator

Yoshitoshi SHINOHARA

Third Department of Internal Medicine, Okayama

University Medical School.

(Director: Prof. Z. Ota)

To clarify the function of macrophages ($M\phi$) in lymphocyte reaction to polyclonal B cell activator (PBA), especially pokeweed mitogen (PWM) and Staphylococcal phage lysate (SPL), the pattern of PWM-induced IgG synthesis and the degree of PBA-induced DNA synthesis by unfractionated mononuclear cells (MNC) or $M\phi$ depleted MNC fraction were examined. The response of the $M\phi$ depleted MNC fraction to PBA was significantly higher than that of unfractionated MNC. The addition of 10% $M\phi$ to the depleted MNC fraction enhanced both responses, but too many $M\phi$ reduced PWM-induced IgG synthesis. These results suggest that the presence of $M\phi$ is not necessary in PBA-induced lymphocyte reaction and that the maximal response is obtained by the addition on optimal number of $M\phi$. Moreover, an excessive number of $M\phi$ suppresses the IgG synthetic response.