

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

移植 (1988.12) 23巻6号:555～563.

9C4抗原 α 鎖の多型性
—二次元電気泳動による解析—

村上雅則, 三代川齊之, 片桐 一

9C4 抗原 α 鎖の多型性

——二次元電気泳動による解析——

村上 雅 則・三代川 齊 之・片 桐 一

Polymorphism in α Chain of the 9C4 Antigen Defined by Two-dimensional Gel Electrophoresis Analysis

Masanori Murakami, Naoyuki Miyokawa and Makoto Katagiri

Department of Pathology, Asahikawa Medical College

[Summary]

Monoclonal antibody 9C4 precipitated HLA class II antigen molecules that were identical to those precipitated by monoclonal antibody B7/21, an anti-DP framework antibody. Examination of α chain of the 9C4/DP molecule in 11 different HLA-DR homozygous B-lymphoblastoid cells by two-dimensional (2-D) NEPHGE/SDS-PAGE analysis revealed that there are two distinct patterns in the α chain spots. One was seen in DPw5-positive cells, and the other was seen in cells typed as DPw2 or DPw4. Moreover, DPw2/w5 heterozygous cells expressed both of these α spots. To further analyze the relationship between the polymorphism of 9C4/DP α chain and DP alloantigenic specificity, the reactivity with these B-lymphoblastoid cells of the M 2016 alloantiserum that has been shown to react with 9C4 molecule was compared to the polymorphism of 9C4 α chain observed in 2-D gels. The results showed that the M 2016 molecule is expressed on DPw5-positive cells but not DPw2- or DPw4-positive cells, strongly suggesting a concordance between DP specificity and DP α chain polymorphism. It is therefore likely that some of the DP specificities, cellularly defined or serologically defined, are determined by the polymorphism of DP α chain.

Key words: HLA-DP,
Class II antigen,
Molecular heterogeneity,
9C4 antibody

I. はじめに

HLA-class II 抗原は、ヒトの免疫応答を制御する細胞膜蛋白として、主にBリンパ球、マクロファージなどの細胞に発現されている。HLA-class II 抗原としては、DR, DQ 及び DP 抗原の少なくとも、3種類の抗原系

が明らかにされている¹⁾。DR 及び DQ 抗原系が抗血清を用いた血清反応により決められるのに対して、DP 抗原は一度アロ抗原刺激を受けたリンパ球を用いた第二次リンパ球混合培養反応 (Primed Lymphocyte Typing, PLT) によって決定される^{2,3)}。最近、DP 抗原分子を解析するために、単クローン抗体の作成がすすめられている⁴⁻⁶⁾。これらの中で、B7/21 抗体は、等電点電気泳動のパターンが DP 抗原特異性と相関するような多型性を有し^{7,8)}、DP 抗原遺伝子を transfect したマウスの

細胞と反応することなどから^{9,10)}, DP 抗原を検出する抗体として知られている。

われわれの教室で作成した単クローン抗体 9C4 は, B7/21 抗体と同一の抗原分子を検出する可能性を報告してきた^{11,12)}。また, 9C4 抗体が検出する分子 (9C4 抗原分子) を部分精製した抗原材料とアロ抗血清を用いることにより, 9C4 抗原分子にアロ抗原性が存在することを指摘してきた¹³⁾。

今回, 9C4 抗原分子の構成鎖とアロ抗原性との関係, 並びに DP 抗原特異性との関係を検討する目的で, 二次元電気泳動法による検討を行った。その結果, 9C4 抗原 α 鎖に荷電上の多型性が存在することが明らかとなった。また, この多型性と DP 抗原特異性, 並びに 9C4 抗原構成鎖上のアロ抗原性との関係について解析した。

II. 方法

1. 細胞

HLA-DR 座に関してホモ接合体である 11 種類の培養 B リンパ芽球様細胞を用いた (表 1)。

2. 単クローン抵抗及び抗血清

HLA-class II 抗原に対する 4 種類の単クローン抗体を用いた。8B3 抗体は DR 抗原の monomorphic determinant を検出し^{11,13)}, Sh-2 抗体は主に DQw3 抗原を検出する抗体である¹¹⁾。B7/21 抗体は DP 抗原を検出する抗体で, ミネソタ大学 F.H. Bach 教授より分与された。9C4 抗体は, DR, DQ 抗原以外の HLA-class II 抗原を検出する抗体である。また, ヒトアロ抗血清 M 2016 は妊婦血清である。

3. ³⁵S-methionine 標識可溶性抗原材料

培養 B リンパ芽球様細胞を 10⁷ 個につき 2 ml の割合で, methionine free の RPMI-1640 培養液 (1% ウシ胎児血清加) により 45 分間培養した。その後, 細胞を上記の培養液中に, 10⁷ 個/ml の割合で再浮遊させた。更に, 培養液 1 ml について ³⁵S-methionine を 0.25mCi の割合で加え, 37°C, 5% CO₂ 下で 4 時間培養した。標識された細胞を RPMI-1640 培養液 (methionine を含む) で洗浄した後, 0.5% NP-40 を含む Tris-HCl buffer により可溶化し, ³⁵S-標識可溶性抗原材料として用いた。

4. 免疫反応沈降物の作成

標識可溶性抗原材料に単クローン抗体 (腹水) を加えて 2 時間反応させ, 免疫反応物を Staphylococcus aureus Cowan I を用いた吸着法により沈降させた。この沈降物から, 試料用緩衝液 (9.2 M Urea, 2% NP-40, 5% 2-mercaptoethanol, 5% Ampholine) により, HLA-class II 抗原を分離した。

5. 二次元電気泳動法

二次元電気泳動は O'Farrell らの方法¹⁴⁾に準じた。一次元目は, Non-equilibrium pH Gradient Electrophoresis (NEPHGE) を行った。Ampholine の pH range は, pH 3.5-10, もしくは pH 3.5-10 と pH 3.5-5 の Ampholine を 2:1 に混合して用いた。二次元目は, 10% Polyacrylamide gel による SDS-PAGE で展開した。電気泳動後, fluorography¹⁵⁾ により構成鎖のスポットを検出した。

表 1 実験に用いた培養 B リンパ芽球様細胞 (HLA-D/DR homozygous)

Cell	HLA type					
	-A	-B	-C	-DR	-DQw	-DPw
EBV-Sa	24/24	7/7	w7/w7	1/1	1/1	4/-
KJ-2	1/24	7/8		2/2	1/1	4/-
WT-49	2/2	17/17		3/3	2/2	4/-
ER	2/2	44/44		4/4	3/3	4/-
EBV-Wa	24/24	w54/w54	w1/w1	4/4	Wa/Wa	
L-KT 2	2/2	51/51		4/4	3/3	5/-
JHA	31/31	51/51		4/4	3/3	1/3
L-KT 9	24/11	60/59	1/3.2	4/4	3/3	2/-
L-KT 13	24/31	7/51	w7/-	4/4	3/3	2/5
WT-46	32/32	13/13		w6/w6	1/1	2/-
DKy	26/11	w61/w48		9/9	3/3	

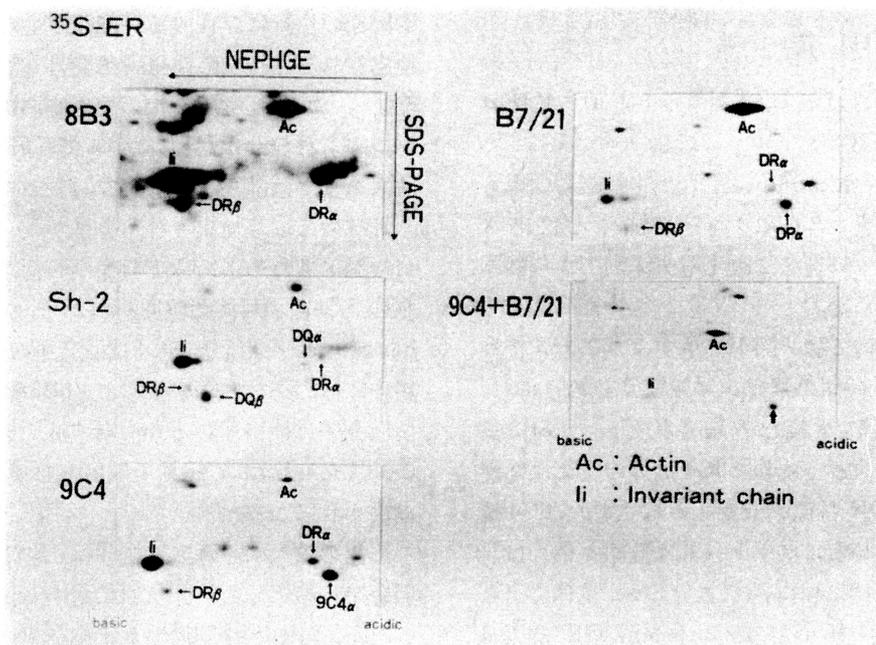


図 1 9C4 抗体が検出する抗原分子と他の HLA-class II 抗原分子の二次元電気泳動法による比較 ER 細胞より得た ³⁵S-標識可溶性抗原材料と各種単クローン抗体との免疫反応沈降物を、二次元電気泳動に展開した。

8B3: anti-DR, Sh-2: anti-DQw3, B7/21: anti-DP

6. ¹²⁵I-標識 9C4 抗原材料

9C4 抗体が検出する抗原を分離精製した。既に報告した方法により¹⁶⁾, EBV-Wa 細胞から HLA-class II 抗原を部分精製し、クロラミンT法により ¹²⁵I を標識した。この材料から、9C4 抗体結合 Sepharose gel を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより 9C4 抗体と反応する分画を分離し¹³⁾, ¹²⁵I-標識 9C4 抗原材料とした。

7. Inhibition assay 法

¹²⁵I-標識 9C4 抗原材料とヒトアロ抗血清との反応を、被検材料が阻止するか否かについて検討した。¹²⁵I-標識 9C4 抗原材料とヒトアロ抗血清との反応は、二重抗体法を用いて検出した。被検材料は、培養 B リンパ芽球様細胞を NP-40 により可溶化し作成した。反応阻止率は下記により算出し、50% 以上を陽性と判定した。

阻止率 (%)

$$= 100 \times (1 - (\text{Sample-N}) / (\text{Ab-N}))$$

Ab: ¹²⁵I-標識 9C4 抗原材料とアロ抗血清との反応値

Sample: アロ抗血清に被検材料を反応させた後の、

¹²⁵I-標識 9C4 抗原材料との反応値

N: 正常ヒト血清と ¹²⁵I-標識 9C4 抗原材料との反応値

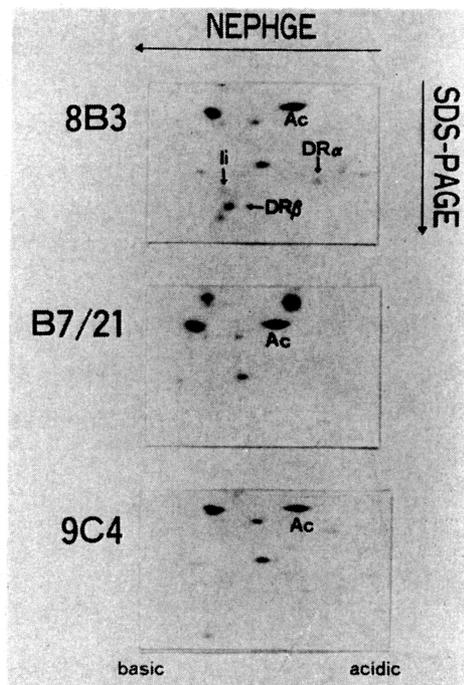


図 2 9C4 抗体が検出する抗原分子を除去した抗原材料における二次元電気泳動 EBV-Wa 細胞より得た ³⁵S-標識可溶性抗原材料から、9C4 抗体結合 Sepharose gel を用いて、9C4 抗体が検出する抗原を除去した。この材料中には、DR 抗原は検出されるが、B7/21 抗体と反応する DP 抗原は検出されない。

III. 結 果

1. 9C4 抗体で検出される α 鎖スポットと DP 抗原 α 鎖スポットの一致

ER 細胞を ^{35}S -methionine により代謝標識して得られた可溶性抗原材料を、各種単クローン抗体と反応させ、その特異的免疫沈降物を二次元電気泳動により展開した。

9C4 抗体との反応物では、図 1 に示すように、2 種類の α 鎖スポットと 1 種類の β 鎖スポットが認められた。これらのうち 1 種類の α 鎖と β 鎖スポットは、8B3 抗体が検出するスポットと一致し、9C4 抗体の交叉反応性により検出される DR 抗原構成鎖とみなされた。9C4 抗体が検出する他方の α 鎖スポット (9C4 抗原 α 鎖) は、DR 抗原 α 鎖の酸性側に検出された。Sh-2 抗体により検出される DQw3 抗原 α 鎖のスポットが DR 抗原 α 鎖のアルカリ側に見られることから、9C4 抗原 α 鎖は、DR、DQ 抗原 α 鎖とは異なるものとみなされた。B7/21 抗体により検出される DP 抗原 α 鎖スポットは、DR 抗原 α 鎖スポットの酸性側に位置し、9C4 抗原 α 鎖スポット

と同様の位置に存在する可能性が考えられた。両抗体で検出された免疫反応沈降物を混合し二次元電気泳動に展開すると、DR 抗原 α 鎖の酸性側には 1 個のスポットしか認められなかった。したがって、両抗体により検出されるスポットは、同様の位置に泳動されることが示された。

両抗体により検出される分子が同一であるか否かを更に検討するために、以下の操作を行った。EBV-Wa 細胞の ^{35}S -標識可溶性抗原材料から、9C4 抗体結合 Sepharose gel を用いて 9C4 抗原分子を除去した。この材料中には、図 2 に示すように、8B3 抗体と反応する DR 抗原分子は検出されるが、9C4 抗原構成鎖は検出されない。また、B7/21 抗体で検出される DP 抗原構成鎖も検出されなかった。

以上の結果より、9C4 抗体は、B7/21 抗体と同一の抗原分子を検出し、DP 抗原に対する抗体であることが示された。なお、今回用いた細胞標識の方法では、DP 抗原 β 鎖は検出されなかった。

2. 9C4 抗原 α 鎖の二次元電気泳動上の多型性

次に 9C4 抗原分子の多型性の有無について、8 種類の

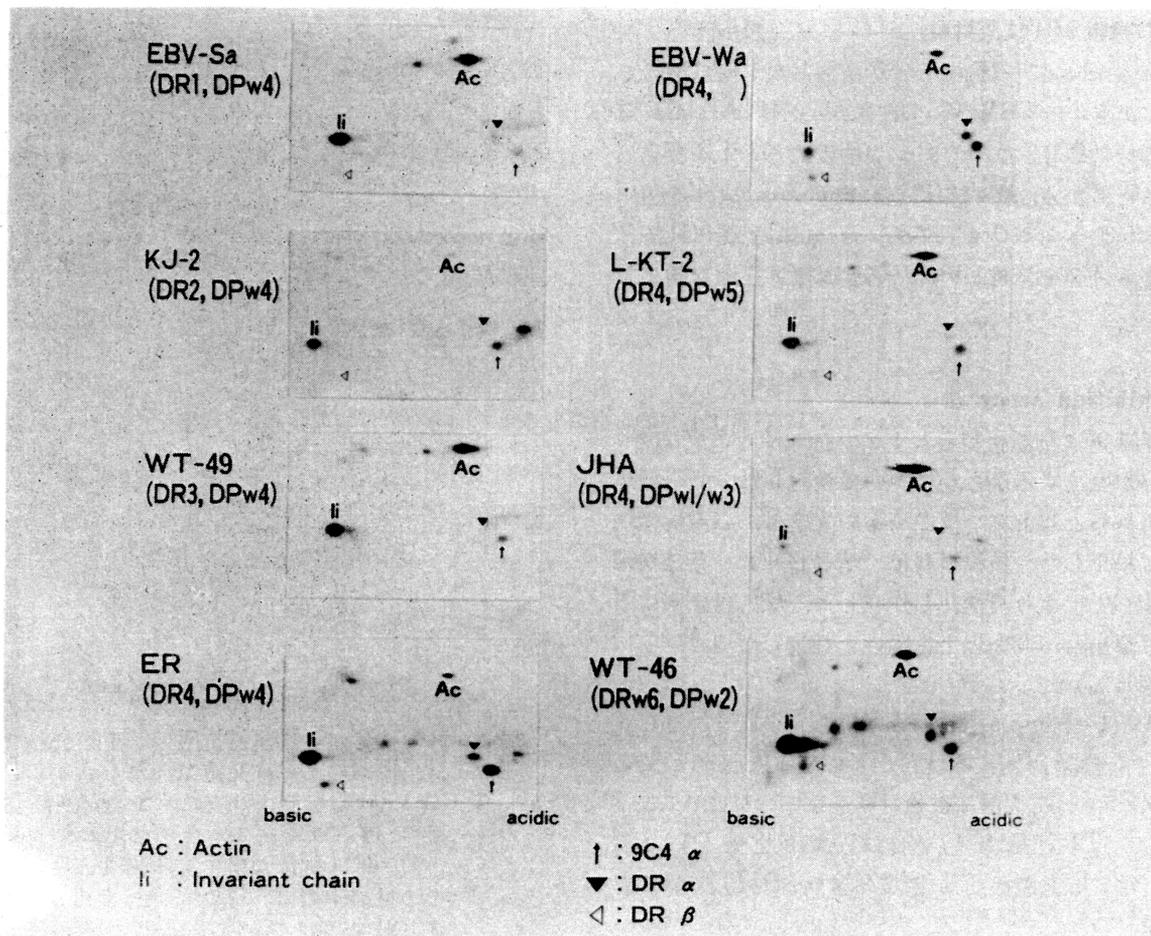


図 3 8 種類の培養 B リンパ芽球様細胞における 9C4 抗原構成鎖の比較

培養Bリンパ芽球様細胞を用いて検討した(図3). いずれの細胞においても, ER 細胞の場合と同様に, 9C4 抗体は, DR 抗原 α 鎖と β 鎖, 及び DR 抗原 α 鎖の酸性側に泳動される 9C4 抗原 α 鎖を検出した. DR 抗原 α 鎖は荷電上の多型性を示さなかったが, DR 抗原 β 鎖は DR 特異性あるいは D 特異性の違いにより多型性を示した. 8 種類の細胞の中で L-KT2 細胞と EBV-Wa 細胞の 2 種類の細胞の 9C4 抗原 α 鎖は, 他の細胞と比べてわずかにアルカリ側にスポットを検出し, 9C4 抗原 α 鎖の荷電上の多型性の存在が示唆された.

3. 免疫反応沈降物の混合による 9C4 抗原 α 鎖の多型性の検討

電気泳動条件のわずかな違いや, 泳動後の fluorography による gel の伸縮によってもスポットの位置の変化がみられることがある. これらの影響を除くため, 異なる 2 種類の細胞より得られた 9C4 抗体免疫沈降物を混合し, 二次元電気泳動による解析を行った. また, 一次元目の NEPHGE において pH の低い部分の解像度を増加させるために, pH 3.5-10 と pH 3.5-5 の 2 種の Ampholine を混合し使用した. 図4に示すように, ER 細胞の 9C4 抗原 α 鎖は EBV-Wa 細胞のものに比

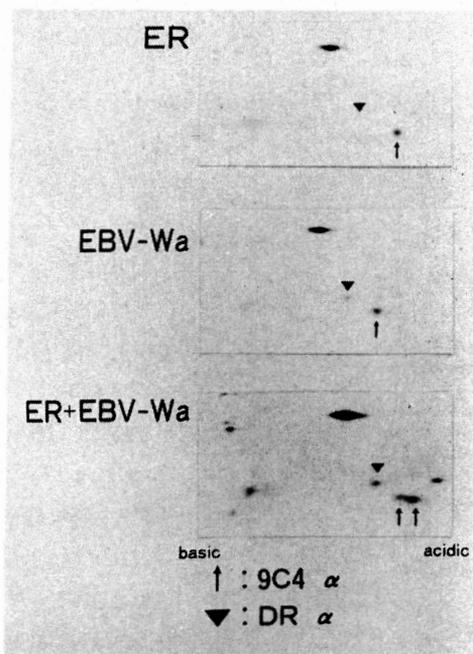


図4 ER 細胞と EBV-Wa 細胞の 9C4 抗原 α 鎖の比較

ER 細胞と EBV-Wa 細胞より得た ^{35}S -標識可溶性抗原材料と 9C4 抗体との免疫反応沈降物をそれぞれ二次元電気泳動に展開した(上, 中段). 両者を混合し一枚の gel に泳動した(下段).

べ, わずかに酸性側に位置するように見える. これら両者を混合して泳動すると, DR α 鎖の酸性側に 2 個のスポットが認められた. したがって 9C4 抗原 α 鎖の泳動パターンは, ER 細胞と EBV-Wa 細胞の間では異なることが確認された.

更に同様の方法による検討を, DP 特異性が異なる 8 種類の細胞を用いて行った(図4). ER 細胞と EBV-Wa 細胞を基準として, 9C4 抗原 α 鎖のスポットの位置を比較した. ER 細胞の 9C4 抗原 α 鎖と同様のスポットは, DPw 2 特異性を示す WT-46 細胞と L-KT 9 細胞, 及び DPw 1/w 3 特異性を示す JHA 細胞に見られた. 一方, EBV-Wa 細胞の 9C4 抗原 α 鎖と同様のスポットは, DPw 5 特異性を示す L-KT 2 細胞で検出され, WT-46 細胞, L-KT 9 細胞及び JHA 細胞の 9C4 抗原 α 鎖とは異なっていた. また, EBV-Wa 細胞と L-KT 2 細胞の組合せにおいても, 9C4 抗原 α 鎖スポットは 2 個検出された. DPw 2/w 5 特異性を示す L-KT13 細胞の免疫反応沈降物単独の場合には, 9C4 抗原 α 鎖スポットが 2 個認められた. 以上の結果より, 9C4 抗原 α 鎖には少なくとも 2 種類の荷電上の多型性が存在することが示された.

4. 9C4 抗原 α 鎖スポットの多型性とアロ抗原性の関係についての検討

二次元電気泳動で見られる 9C4 抗原 α 鎖スポットについて, ER 細胞と同じパターンを示す群(A群)と, EBV-Wa 細胞と同じパターンを示す群(B群)に分類し, 表2にまとめた.

ヒトアロ抗血清 M 2016 は, DR, DQ 抗原とは異なるヒト class II 抗原を検出する抗体を含んでおり, また, 9C4 抗原材料は M 2016 血清と反応し, この反応により検出される抗原はアロ抗原性を示すことがこれまでに明らかにされている. 既に報告したものであるが¹³⁾, EBV-Wa 細胞より部分精製された 9C4 抗原材料とヒトアロ抗血清 M 2016 の反応を, 各種培養Bリンパ芽球様細胞が阻止するか否かについて検討した成績を表2に示した. Inhibition assay 法で陽性と判定された細胞は, M 2016 血清が検出する抗原決定基を発現している細胞と考えられる. このような細胞は, EBV-Wa 細胞を含めて 5 種類認められ, DR 特異性または DQ 特異性とは異なるアロ抗原特異性を示した.

スポットパターンとアロ抗原性について比較すると, B群のスポットを持つ細胞は, すべて M 2016 血清で検出される抗原決定基を発現していた. また, DP 抗原特異性が決定されている細胞について比較すると, DPw 5

表 2 M 2016 血清に対する反応性と 9C4 抗原 α 鎖のスポットパターンの比較

Cell	HLA			M 2016 Determinant	9C4 α Spot		
	DR	DQ _w	DP _w		A		B
EBV-Sa	1	1	4/-	-	+		-
LG-2	1	1		-		ND	
KJ-2	2	1	4/-	ND	+		-
EB-CMG	2	1		-		ND	
WT-49	3	2	4/-	ND	+		-
ER	4	3	4/-	-	+		-
EBV-Wa	4	Wa		+	-		+
L-KT 2	4	3	5/-	+	-		+
JHA	4	3	1/3	ND	+		-
L-KT 9	4	3	2/-	-	+		-
L-KT 13	4	3	2/5	+	+		+
WT-46	w6	1	2/-	-	+		-
EBV-Sh	w6	3		+		ND	
LG 10	7	2		-		ND	
DKy	9	3		-	+		-
ISK	9	3		+		ND	

M 2016 determinant (+): Inhibition assay法で阻止率 50% 以上

(-): 同法により阻止率 50% 以下

9C4 α Spot (A): ER 細胞の 9C4 抗原 α 鎖と同様のパターンのスポット

(B): EBV-Wa 細胞の 9C4 抗原 α 鎖と同様のパターンのスポット

ND: Not Determined

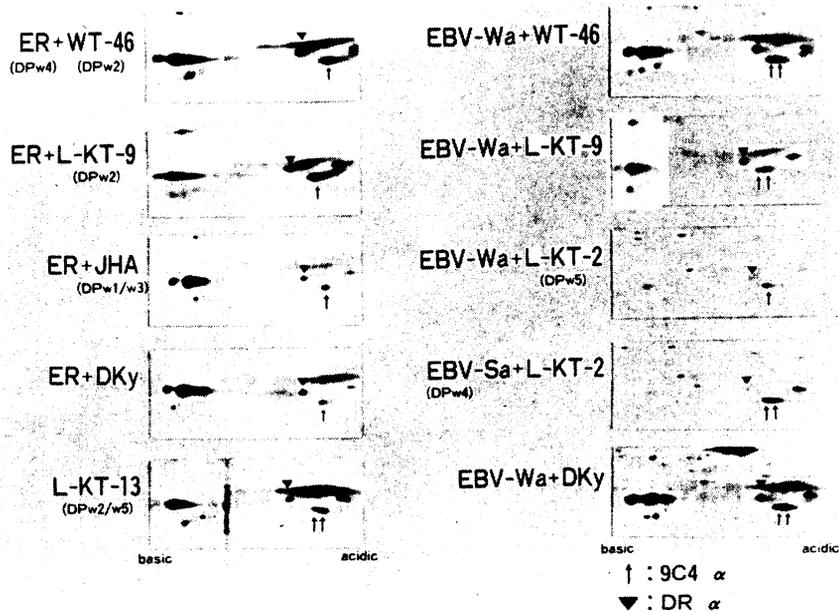


図 5 9C4 抗原 α 鎖の二次元電気泳動における多型性

各種培養 B リンパ芽球様細胞より得た ³⁵S-標識可溶化抗原材料と 9C4 抗体との免疫反応沈降物を混合し、二次元電気泳動に展開した。DR 抗原 α 鎖のスポットを指標に、9C4 抗原 α 鎖スポットの位置と個数を比較した。

ハプロタイプを持つ細胞が B 群のスポットパターンを示し、M 2016 血清で検出される抗原決定基を有していた。

IV. 考 案

単クローン抗体 9C4 は、DR 抗原及び DQ 抗原とは異なる class II 抗原を検出し、 ^{125}I -標識抗原材料を用いた Sequential coprecipitation 法により DP 抗原を検出する可能性が示されていた^{11,12)}。 ^{35}S -標識可溶性抗原材料を用いた二次元電気泳動法による検討においても、9C4 抗体は DP 抗原を検出する抗体であることが確認された。

DP 抗原は PLT により検出され、7 種類の特異性が報告されている^{1,17)}。しかし、細胞性免疫反応を利用した検出法であるため、DP 抗原分子の免疫化学的性状とアロ抗原性の関係について解析することは困難であった。

DP 抗原遺伝子の解析では、 α 鎖及び β 鎖の双方の遺伝子に多型性が見られ、これらの多型性の一部が DP 特異性と相関することが報告されている^{18,19)}。とくに、各種の B lymphoblastoid cell の DNA を制限酵素 Taq I で切断し、DP α cDNA をプローブとして Southern blotting 法を行ったところ、7.6 kb のバンドが DPw 5 type と相関することを、Bodmer J らは報告している。また、Hyldig-Nielsen J らは、Taq I を制限酵素として用いたとき、6.5 kb のバンドが DPw 5 type と相関し、13.5 kb のバンドが DPw 2 と相関することを報告している。

一方、単クローン抗体による解析では、DP 抗原 β 鎖の多型性と DP 特異性との関係が報告されていたが^{7,8)}、 α 鎖については明らかではなかった。最近、家系調査と二次元電気泳動法の組合せにより、DP 抗原 α 鎖にも多型性が存在し、それが DP 特異性と関連している可能性が報告されてきた²⁰⁾。

今回の検討では、9C4 抗原 α 鎖に 2 種類の多型性が見られた。一方のスポットパターンは、DPw 4 特異性を示す 4 種類の細胞と DPw 2 特異性を示す 2 種類の細胞、及び DPw 1/w 3 特異性を持つ細胞に認められ、他方は、EBV-Wa 細胞と DPw 5 特異性を示す L-KT 2 細胞に見られた。また、DPw 2/w 5 特異性を示す L-KT 13 細胞では、2 種類の 9C4 抗原 α 鎖スポットが認められた。したがって、2 種類の 9C4 抗原 α 鎖スポットの中で、一方は DPw 1, w 2, w 4 特異性と関連し、他方は DPw 5 特異性と関連している可能性が考えられた。

これらの細胞の DP 抗原 α 鎖遺伝子の多型性を、Southern blotting 法により検討したところ、制限酵素と

して Taq I を用いた場合、2 種類の polymorphic なバンドが認められている。一方のバンドは EBV-Wa 細胞と L-KT 2 細胞で見られ、L-KT-13 細胞では双方のバンドが見られている（未公表データ）。Bodmer J¹⁹⁾ や Hyldig-Nielsen J¹⁸⁾ らの報告を合わせると、DP 抗原 α 鎖遺伝子の多型性の一部が、9C4 抗原 α 鎖スポットの多型性として表現されていると推定される。

血清学的に DP 抗原を検出する試みがいくつかの施設で行われている²¹⁻²³⁾。われわれの用いたアロ抗血清 M 2016 は、多種類の抗体を含む抗血清であるため、従来の細胞傷害性試験では特定の DP 抗原特異性を検出し得ない。しかし、この抗血清は、9C4 抗体結合 Sepharose gel を用いて分離した ^{125}I -標識 9C4 抗原材料と反応することから、DP 抗原を検出する抗体を含んでいると考えられる。この反応系の阻止反応によってアロ抗原性を検出し得たが、検討した細胞のうち DP 抗原特異性が決定されている細胞が少ないため、このアロ抗原性と DP 抗原特異性との相関は十分解析し得ていない。M 2016 血清との免疫反応沈降物を SDS-PAGE で解析すると、1 本の構成鎖バンドのみであったことから¹³⁾、M 2016 血清の抗原決定基は、DP 抗原構成鎖のいずれか一方に存在すると推定されていた。今回、この抗血清に対する抗原決定基を発現している細胞の分布と 9C4 抗原 α 鎖スポットの多型性を比較すると、検討した範囲では一致していた。したがって、M 2016 血清で検出されるアロ抗原決定基は DP 抗原 α 鎖に存在している可能性が考えられる。

^{35}S -methionine による細胞標識の方法では、DP 抗原 β 鎖スポットは検出されていない。9C4 抗体、B7/21 抗体のいずれを用いても同様の結果であった。この理由は不明である。

今後、更に多くの細胞を用いた検討を進めることと、DP 抗原 β 鎖の多型性について解析を進めることにより、これまで未知であった DP 抗原系の血清学が明らかにされるとと思われる。

V. ま と め

単クローン抗体 9C4 は、 ^{35}S -標識可溶性抗原材料を用いた二次元電気泳動法により、HLA-DP 抗原を検出することが明らかとなった。9C4 抗原 α 鎖には、少なくとも 2 種類の多型性が存在し、抗血清により検出されるアロ抗原性と関連している可能性が推定された。

文 献

- 1) Bodmer W, Albert E, Bodmer J, Dausset J, Kis-

- smeyer-Nielsen F, Mayr M, Payne R, vonRood JJ, Trnka Z, Waiford RL: Nomenclature for Factors of the HLA system. *Immunogenetics* 20: 593, 1984
- 2) Kavathas P, Demars R, Bach FH, Shaw S: SB: a new HLA-linked human histocompatibility gene defined using HLA-mutant cell line. *Nature* 293: 747, 1981
 - 3) Shaw S, Kavathas P, Pollack MS, Charmot D, Mawas C: Family studies define a new histocompatibility locus, SB, between HLA-DR and GLO. *Nature* 293: 745, 1981
 - 4) Nadler LM, Stashenko P, Hardy R, Tomaselli KJ, Yunis EJ, Schlossman SF, Pesando JM: Monoclonal antibody identifies a new Ia-like (p 29,34) polymorphic system linked to the HLA-D/DR region. *Nature* 290: 591, 1981
 - 5) Pawelec GP, Shaw S, Ziegler A, Muler C, Wernet P: Differential inhibition of HLA-D-or SB-directed secondary lymphoproliferative responses with monoclonal antibodies detecting human Ia-like determinants. *J Immunol* 129: 1070, 1982
 - 6) Makgoba NW, Hildreth JEK, McMichael AJ: Identification of a human Ia antigen that is different from HLA-DR and DC antigens. *Immunogenetics* 17: 623, 1983
 - 7) Watson AJ, Demars R, Trowbridge IS, Bach FH: Detection of a novel human class II HLA antigen. *Nature* 304: 358, 1983
 - 8) Linner KM, Bach FH: HLA-FA: A Non-DR, Non-DQ HLA class II product. In: *Histocompatibility Testing 1984*, p. 538-539. Springer-Verlag, 1984
 - 9) Austin P, Trowsdale J, Rudd C, Bodmer W, Feldman M, Lamb J: Functional expression of HLA-DP genes transfected into mouse fibroblasts. *Nature* 313: 61, 1985
 - 10) Heyes J, Austin P, Bodmer J, Bodmer W, Madrigal A, Mazzilli MC, Trowsdale J: Monoclonal antibodies to HLA-DP-transfected mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3417, 1986
 - 11) 三代川齊之・池田久寛・片桐 一: 9C4抗体により検出されるヒトクラスII抗原の免疫化学的解析—FA抗原との免疫化学的比較—. *移植* 20: 144, 1985
 - 12) Murakami M, Miyokawa N, Yakura H, Ikeda H, Katagiri M: A non-DR and -DQ class II molecule detected by monoclonal antibody AS-9C4. In: *HLA in Asia-Oceania 1986*, p. 439-443, Hokkaido Univ Press, Sapporo Japan, 1986
 - 13) 丹野正隆・池田久実・片桐 一: HLA-DR抗原及びそれらの超特異性抗原とは異なるヒトIa様抗原の免疫化学的解析. *移植* 19: 51, 1984
 - 14) O'Farrel PZ, Goodman HM, O'Farrel PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133, 1977
 - 15) Lasky RA, Mills AD: Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur J Biochem* 56: 335, 1975
 - 16) Katagiri M, Ikeda H, Maruyama N, Moriuchi J, Wakisaka A, Aizawa M, Itakura K: Evidence for two B-cell alloantigen loci in the HLA-D region. *Immunogenetics* 9: 335, 1979
 - 17) Nose Y, Nakatsuji T, Tsuji K, Reinsmoen NL: A new HLA-DP (SB) specificity (Cp 63) defined in Japanese and Caucasian cell populations by cloned PLT cells. *Hum Immunol* 13: 145, 1985
 - 18) Hyldig-Nielsen JJ, Morling N, O'Dum N, Ryder LP, Platz P, Jakobson B, Svejgaard A: Restriction fragment length polymorphism of the HLA-DP phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1644~1648, 1987
 - 19) Bodmer J, Bodmer W, Heyes J, So A, Tonks S, Trowsdale J, Young J: Identification of HLA-DP polymorphism with DP α and DP β probes and monoclonal antibodies: Correlation with primed lymphocyte typing. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4596~4600, 1987
 - 20) Lotteau V, Teyton L, Tongio M, Soulier A, Thomsen M, Sasportes M, Charron D: Biochemical polymorphism of the HLA-DP heavy chain. *Immunogenetics* 25: 403~407, 1987
 - 21) Park M, Tonai R, Ferrara GB, Kaszubowska K, Terasaki P: Serological typing of DP-like antigen. In: *HLA in Asia-Oceania 1986*, p. 608~611, Hokkaido Univ Press, Sapporo Japan, 1986

- 22) Johnson AH, Tang TF, Numez G, Stastny P, Thorsby E, Ferrara GB, Hartzman RJ: Identification and Molecular characterization of HLA-DP Alloantisera. In: HLA in Asia-Oceania 1986, p. 612~615, Hokkaido Univ Press, Sapporo Japan, 1986
- 23) Tanigaki N, Tosi R, Parodi B, Sorrentino R, Ferrara GB, Strominger JL: Detection of HLA-DP serological allodeterminants by use of radioiodinated DP molecules. Eur J Immunol 17: 743~750, 1987
-