

抗 Myelin-associated glycoprotein (MAG) モノ
クローナル抗体と結合するヒトの
リンパ球表面抗原の解析

新潟大学脳研究所神経内科 (主任: 宮武 正教授)

荒井元美

Characterization of the surface antigens on human mononuclear
cells to which anti-myelin associated glycoprotein
(MAG) monoclonal antibodies bind

Motomi ARAI

*Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Tadashi MIYATAKE)*

Three (GC-J4, MC-P2 and MC-P4) out of five murine monoclonal antibodies (mAbs) to myelin-associated glycoprotein (MAG) bound to human mononuclear cells (MNC). The results of the competitive inhibition assay suggested that MC-P2 and MC-P4 bind directly to or close to the Leu 7 epitope, and that GC-J4 binds to the epitope which is distinct from the Leu 7 epitope. The electrophoretic patterns of immunoprecipitates with GC-J4, MC-P2 and anti-Leu 7 from detergent lysates of surface labeled human MNC were very similar. The target molecules of anti-Leu 7, MC-P2 and GC-J4 have apparent molecular weights of 205, 170, 150, 135, 110, 85, 65 and 55 kDa, and they are monomeric or noncovalently associated proteins. The patterns of immunoprecipitates with MC-P4 were slightly different from those with anti-Leu 7 and MC-P2. The implications of these results are as follows: 1) The mAb with specificity to the carbohydrate part of MAG reacts with the Leu 7-reactive molecule on human MNC. 2) At least two epitopes detected by anti-MAG mAbs coexist on the surface molecules with various apparent molecular weights. 3) The fine antigenic specificity of MC-P4 is different from those of anti-Leu 7 or MC-P2.

Key words: monoclonal antibody, myelin-associated glycoprotein, mononuclear cells, surface marker.

モノクローナル抗体, ミエリン糖蛋白, リンパ球, 表面抗原

Reprint requests to: Motomi Arai,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University, Niigata, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1
新潟大学脳研究所神経内科学教室
荒井元美

Myelin-associated glycoprotein (MAG) はミエリンに微量に存在する分子量 100kDa の糖蛋白である¹⁾。脱髄性末梢神経障害を合併する IgM M 蛋白血症の患者の M 蛋白のなかには MAG と結合するものがあることが知られている²⁾³⁾。抗 Leu 7 抗体はヒトの T 細胞性白血病細胞である HSB-2 を抗原として作成された IgM モノクローナル抗体で、ヒトのリンパ球、特に natural killer (NK) 細胞の表面抗原を認識すると言われている⁴⁾が、イムプロット法により MAG と反応し⁵⁾⁶⁾⁷⁾、特に MAG の糖鎖部分を認識することが見いだされた⁸⁾。患者血清中の抗 MAG 活性をもった IgM M 蛋白と抗 Leu 7 抗体はともに、ヒト末梢神経に存在する分子量 20~26kDa の糖蛋白⁸⁾、ヒト末梢神経から抽出された同一の酸性糖脂質と反応する⁹⁾¹⁰⁾など抗原特異性が類似している。両者と反応するヒト末梢神経の糖脂質は硫酸基とグルクロン酸基をもったスフィンゴ糖脂質であるが、両者に対する抗原決定基の化学的構造は異なっていると言われている¹¹⁾。

ヒトのリンパ球の約10%は家兎抗ヒト MAG 抗血清によって染色される¹²⁾。また、抗 MAG モノクローナル抗体と反応するヒトのリンパ球は large granular lymphocyte の形態を持ち¹³⁾、NK 細胞活性を示す¹⁴⁾ことが知られている。しかし、NK 細胞活性を示すヒトのリンパ球は均一ではない¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ので、抗 Leu 7 抗体と抗 MAG モノクローナル抗体の微細抗原特異性が異なるものであればヒトのリンパ球の表面抗原を検索する際に有用なマーカーとなりうる。

ヒトのリンパ球表面抗原分子には、ヒト MAG の糖鎖部分に特異性を持つ抗 MAG モノクローナル抗体と反応する抗原決定基には少なくとも2種類有ることが分かった。すなわち、1つは抗 Leu 7 抗体が結合する抗原決定基 (Leu 7 epitope) と区別できないもの、もう1種類はそれと異なるものである。

イムプロット法により HSB-2 のホモジェネートの家兎抗ヒト MAG 抗体と抗 Leu 7 抗体で染色すると2本のバンドが検出された¹⁸⁾。しかし、抗 MAG 抗体によって検出されるヒトのリンパ球上の表面抗原の性質については明らかにされていない。抗 MAG モノクローナル抗体と抗 Leu 7 抗体の微細抗原特異性が異なるならば、抗 MAG モノクローナル抗体は Leu 7 抗原と異なる表面抗原とも反応する可能性がある。この点について検討するため、¹²⁵I で表面標識したヒトのリンパ球を可溶化したのち、免疫沈降し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法によってこれらの抗体と反応する表

面抗原分子を解析した。

方 法

MAG の精製: ヒト大脳白質から Norton と Poduslo¹⁹⁾ の方法によりミエリンを精製した。ミエリンから lithium 3,5-diiodosalicylate (LIS)-フェノール法²⁰⁾によって MAG を抽出し、ゲルろ過法により精製した。

モノクローナル抗体の作成: 西沢らが報告したように、LIS-フェノールで抽出された MAG で免疫した BALB/c マウスの脾細胞と P3-X63-Ag8-6,5,3 ミエローム細胞を融合させた。ハイブリドーマの培養上清中の抗 MAG 抗体活性を酵素抗体法 (ELISA) によって測定し、抗体産生細胞を限界希釈法によりクローン化した²¹⁾。

ハイブリドーマ細胞を、プリスタン処理した BALB/c マウスの腹腔に接種して腹水を得た。アイソタイプ特異的抗体を二次抗体として、ELISA により各モノクローナル抗体のアイソタイプを決定した²¹⁾。腹水を硫酸塩析して免疫グロブリン分画を集め、MC-P2, MC-P4 は Sepharose 4B を用いたゲルろ過法により、また、GP-D3, GC-J4, GC-P1 はアガロースに結合させた抗マウス IgG 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。既知の免疫グロブリン濃度を持つマウス基準血清 (Miles Scientific) を標準として、ELISA により免疫グロブリン濃度を測定した¹⁴⁾。各モノクローナル抗体の名称とアイソタイプ²¹⁾を表1に記載した。

表 1 ¹²⁵I 標識抗 Leu 7 抗体とヒトのリンパ球との結合に対するモノクローナル抗体の抑制効果

名 称	モノクローナル抗体		50%抑制値 ($\mu\text{g/ml}$)
	isotype	特異性	
抗 Leu 7	IgM	糖鎖	0.86
MC-P2	IgM	糖鎖	0.04
MC-P4	IgM	糖鎖	0.46
GC-J4	IgG 1	糖鎖	N.I. (30)
GC-P1	IgG 1	糖鎖	N.I. (30)
GC-P1	IgG 1	ペプチド	N.I. (600)

モノクローナル抗体の特異性は、MAG のどの部分と結合するかによって示した。N.I. は抑制しないことを、また () の値は検査した最高濃度を示す。

ヒトのリンパ球の調製：静脈血から Lymphoprep (Nyegaard) を用いた密度勾配遠心法によってヒトの末梢血リンパ球を分離し、ナイロン・ウールによりB細胞とマクロファージを除去した²²⁾。

モノクローナル抗体の¹²⁵I 標識：モノクローナル抗体 10~40 μ g を 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3 α , 5 α -di-phenyl-glycoluril (Iodogen; Pierce Chemical)²³⁾ 24) の存在下で 200 μ Ci の Na ¹²⁵I (New England Nuclear) と反応させ ¹²⁵I 標識した。1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む pH7.4 のリン酸緩衝液 (PBS) で平衡化した Sephadex G-100 でゲルろ過して未反応の Na ¹²⁵I を除去した。抗 Leu 7 抗体は Becton Dickinson 社から購入した。

ラジオイムノアッセイ (RIA)：¹²⁵I 標識モノクローナル抗体の二倍希釈系列をつくり、 5×10^5 個のヒトリンパ球と30分間反応させた。反応は 1% BSA, 0.1%アジ化ナトリウムを加えた PBS (RIA buffer) 中で行った。リンパ球に結合した放射能活性を Aloka Auto Well Gamma System (Aloka) で測定した。

適度に希釈した ¹²⁵I 標識モノクローナル抗体 50 μ l と他のモノクローナル抗体の二倍希釈系列 50 μ l を予め混合し、50 μ l の RIA buffer に浮遊させた 5×10^5 個のヒトのリンパ球に加えて 4°C で1時間反応させ、RIA buffer で十分に洗浄した後、リンパ球の表面に結合した放射能活性を測定した。抑制試験の結果は% inhibition によって表した。

$\% \text{inhibition} = (\text{noninhibited-experimental}) / (\text{noninhibited-background}) \times 100$ ここで、noninhibited は inhibitor のモノクローナル抗体の代わりに RIA buffer 50 μ l を加えたときの放射能活性、experimental はinhibitor を加えたときの放射能活性を示す。

96穴マイクロタイター・プレートに 100 μ g/ml の抗 MAG モノクローナル抗体 (MC-P2, MC-P4, GC-J4) 40 μ l を加えて2時間放置してモノクローナル抗体を吸着させ、RIA buffer で十分に洗浄した後 ¹²⁵I 標識抗 Leu 7 抗体 20 μ l と室温で1時間反応させた。プレートを洗浄後、放射能活性を測定した。

表面標識及び免疫沈降法：ナイロン・ウール非付着細胞約 5×10^7 個を PBS で十分に洗浄し、10 μ l の Iodogen を触媒として 500 μ Ci の Na ¹²⁵I と反応させた^{23) 24)}。標識されたリンパ球を洗浄し、0.5% (w/v) Nonidet P40 (NP40; Shell Chemical) を含む NaCl-EDTA-Tris (NET) buffer (150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris, 0.02% アジ化ナトリウム) 700 μ l

に浮遊させ10分間振盪した。27,000 \times g, 30分間遠心して得た上清をホルマリン固定した黄色ブドウ球菌 Cowan I 株 (SaC) 100mg で吸収する操作を2回行った。上清 100 μ l に各種抗 MAG モノクローナル抗体あるいは対照として BALB/c マウス血清 15 μ l を加え1時間反応させた。用いたモノクローナル抗体はいずれも SaC の protein A と強く結合しないので、抗マウス免疫グロブリン抗体を加えて免疫複合体を形成させた。すなわち、BALB/c マウス血清, 抗 Leu 7 抗体, MC-P2, MC-P4 に対してヤギ抗マウス IgM 抗血清を、一方、GC-J4, GC-P1, GP-D3 に対してはヤギ抗マウス IgG 抗血清を用いた。免疫複合体は Kessler の方法²⁵⁾に従って SaC に吸着させた。SaC を十分に洗浄した後 SDS sample buffer 50 μ l を加えて免疫複合体を可溶化した。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 及びオートラジオグラフィー：Laemmli と Favre の方法²⁶⁾に従い、7.5%ポリアクリルアミド・ゲル上で SDS-PAGE を行った。二次元電気泳動 (diagonal SDS-PAGE) では、先ず非還元条件で SDS-PAGE を行い、レーンを切り出して5% 2-メルカプトエタノールを含む SDS-sample buffer に浸したのち第二のゲルに載せ、還元条件で SDS-PAGE を行った。ゲルをクマシー・ブルーで染色し、乾燥後 -70°C で Kodak XAR-5 フィルムに密着させ感光させた。

結 果

¹²⁵I 標識 MC-P2, MC-P4, GC-J4 はヒトのリンパ球表面に結合した。これらの抗 MAG モノクローナル抗体が結合する抗原決定基が Leu 7 epitope と異なるかどうか検討するため、¹²⁵I 標識抗 Leu 7 抗体とヒトのリンパ球との結合をこれらのモノクローナル抗体が濃度依存性に抑制するかどうかを調べ、結果を図1に示した。MC-P2, MC-P4 は濃度依存性に抑制しており、30 μ g/ml の濃度では抗 Leu 7 抗体と同程度に抑制した。一方、GP-D3, GC-J4, GC-P1 は抑制しなかった。¹²⁵I 標識抗 Leu 7 抗体とヒトのリンパ球との結合を50%抑制するのに要するモノクローナル抗体の濃度を計算し50%抑制値として表1に示した。モノクローナル抗体溶液の中に、抗 Leu 7 抗体の paratope と結合する抗体が混入している場合にも同様の結果が得られる可能性がある。しかし、固相法 RIA では、¹²⁵I 標識抗 Leu 7 抗体と MC-P2, MC-P4 とは結合せずこの可能性は否定された。逆に、抗 Leu 7 抗体は ¹²⁵I 標識

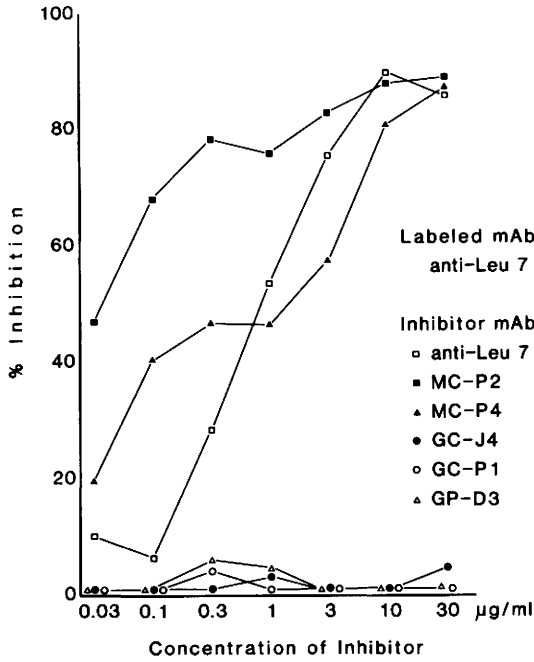


図 1 ^{125}I 標識した抗 Leu 7 抗体とヒトのリンパ球との結合に対する抗 MAG モノクローナル抗体による抑制効果

モノクローナル抗体の種類は次の通りである。
抗 Leu 7 抗体 (□), MC-P2 (■), MC-P4 (▲), GC-J4 (●), GC-P1 (○), GP-D3 (△)。

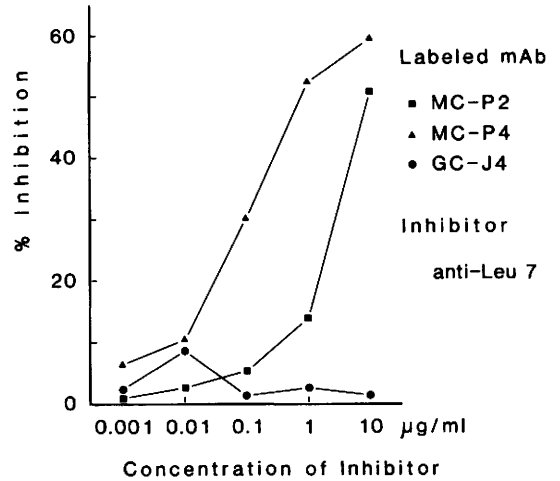
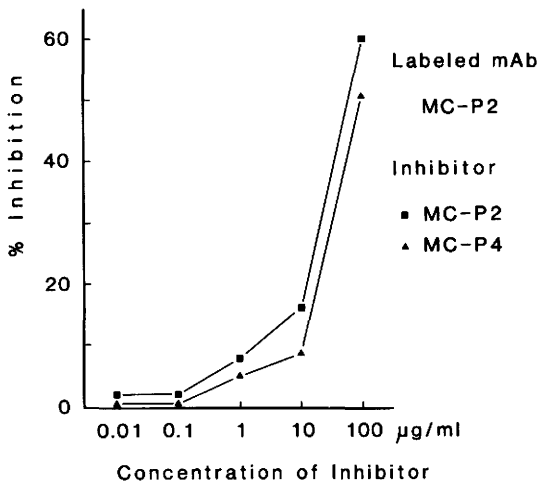
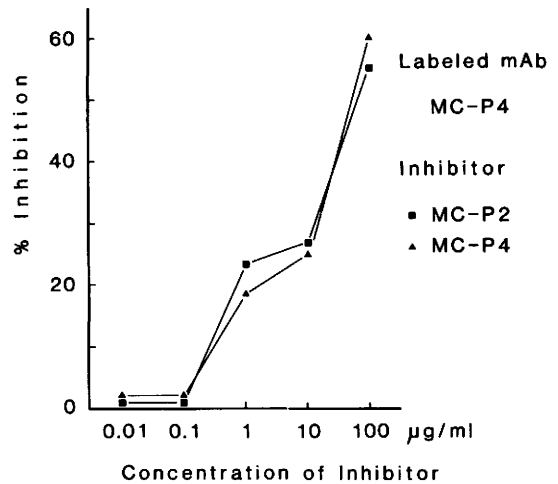


図 2 ^{125}I 標識した抗 MAG モノクローナル抗体とヒトのリンパ球との結合に対する抗 Leu 7 抗体による抑制効果

^{125}I 標識した抗 MAG モノクローナル抗体の種類は次の通りである。
MC-P2 (■), MC-P4 (▲), GC-J4 (●)。



A



B

図 3 ^{125}I 標識した MC-P2 (A) あるいは MC-P4 (B) とヒトのリンパ球との結合に対する MC-P2 (■) と MC-P4 (▲) による抑制効果

した MC-P2, MC-P4 とヒトのリンパ球との結合を抑制したが, GC-J4 との結合を抑制しなかった (図 2)。

^{125}I 標識した MC-P2 あるいは MC-P4 とヒトのリンパ球との結合を MC-P2 と MC-P4 はほぼ同様に抑制し (図 3A, 3B), リンパ球上の MC-P2 epitope と MC-P4 epitope が異なるとは言えなかった。

抗 MAG モノクローナル抗体および抗 Leu 7 抗体と結合する, ヒトのリンパ球表面抗原の生化学的解析. ヒト B細胞表面のさまざまなアイソタイプの免疫グロブリン分子は SaC と結合し易い²⁵⁾ので, このような非特異的な結合による影響を抑えるため, ナイロン・ウールにより B細胞を除去し, さらに ^{125}I 標識した表面抗原の抽出液を SaC で 2 回回収してから免疫沈降法を行った. SDS-PAGE を行ったゲルのオートラジオグラムを図 4 に示した. IgM 抗体の対照としての BALB/c マウス血清, および IgG 抗体の対照としての GP-D3, GC-P1 による沈降物の SDS-PAGE では, おおの 80, 60, 55, 50, 45kDa のバンドがみられ, 非特異的に免疫複合体に取り込まれたかあるいは SaC と結

合した物質と考えられる. 抗 Leu 7 抗体, MC-P2, GC-J4 による沈降物の SDS-PAGE のパターンは非常に類似しており, 205, 170, 150, 135, 110, 85, 65, 65, 55kDa の 8 本のバンドはこれらのモノクローナル抗体と特異的に結合した物質を示している. MC-P4 による沈降物の SDS-PAGE のパターンにもこれらのバンドがみられるが, 2つの特徴を持っている. つまり, 65 kDa のバンドが他のモノクローナル抗体の沈降物で見られたものよりも明らかに濃いこと, また, 58kDa のバンドがみられたことである. このことから, MC-P4 は 65kDa の分子に対する親和性が抗 Leu 7 抗体, MC-P2, GC-J4 よりも高く, またこれらの抗体とは微細抗原特異性が異なることを示している. diagonal SDS-PAGE のパターンでは, 全てのスポットが対角線上に見られ, 抗 Leu 7 抗体, MC-P2, MC-P4, GC-J4 と結合する表面抗原分子はモノマーと考えられる.

考 察

ヒトのリンパ球の約10%は家兎抗ヒト MAG 抗血清によって染色される¹²⁾. 二重染色により, 家兎抗ヒト MAG 抗血清で染色されるヒトのリンパ球の 95% 以上は抗 Leu 7 抗体によっても染色され, 逆に抗ヒト MAG 抗血清で染色されるリンパ球の 50~90% が抗 Leu 7 抗体により染色された²⁷⁾. Dobersen ら¹³⁾は, ヒト MAG の糖鎖部分に特異性をもつモノクローナル抗体を用いた実験で同様の結果を得て, 抗 MAG モノクローナル抗体は抗 Leu 7 抗体は同一あるいは近接した抗原決定基と結合するが, 親和性がより低い可能性を示唆した. Tanaka らは家兎抗ヒト MAG 抗血清と結合する抗原決定基は Leu 7 epitope を含むかあるいはこれに近接している可能性があること¹⁴⁾, ニューラミニダーゼ処理したヒトのリンパ球は抗ヒト MAG 抗血清で染色される割合が増加するのに対し, 抗 Leu 7 抗体で染色される割合は変わらないことから, これらの抗体と結合する抗原決定基の構造が異なる可能性を示した²⁸⁾.

抗 MAG 抗体と反応するヒトのリンパ球は NK 細胞活性を示す¹³⁾¹⁴⁾ことが知られている. しかし, 表面抗原の点からは, NK 細胞活性を示すヒトのリンパ球は均一ではないので, 抗 MAG モノクローナル抗体が結合する抗原決定基と Leu 7 epitope の関係を明らかにすることは, ヒトのリンパ球の表面抗原の分析に有用である.

Kubagawa ら²⁹⁾は, 抗 Leu 7 抗体と反応するヒト

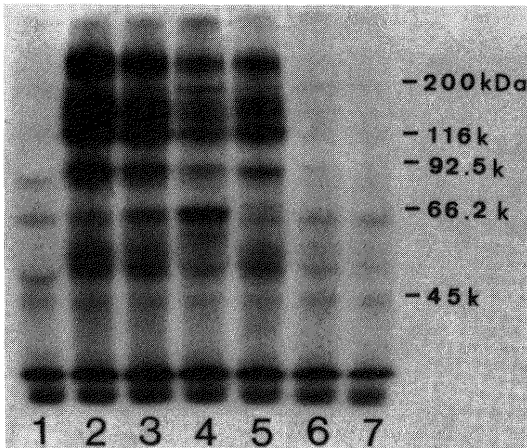


図 4 モノクローナル抗体と結合するヒトのリンパ球表面抗原の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動パターン

免疫沈降法で用いた抗体は次の通りである. BALB/c マウス血清 (レーン 1), 抗 Leu 7 抗体 (レーン 2), MC-P2 (レーン 3), MC-P4 (レーン 4), GC-J4 (レーン 5), GP-D3 (レーン 6), GC-P1 (レーン 7).

分子量の標準物質は次の通りである. ミオシン (200kDa), β -ガラクトシダーゼ (116kDa), フォスフォリラーゼ B (92.5kDa), ウシ血清アルブミン (66.2kDa), 卵白アルブミン (45kDa).

のリンパ球表面抗原を SDS-PAGE で95および 110 kDa のバンドとして検出したと報告した。HSB-2 のホモジェネートのイムノブロット法による分析では、抗 Leu 7 抗体、家兎抗ヒト MAG 抗血清、末梢神経障害を伴う IgM M 蛋白血症患者の血清と反応する 2 本のバンドが検出され¹⁸⁾、またヒト MAG の糖鎖部分に特異性を持つ抗 MAG モノクローナル抗体では 80~150 kDa の間に数本のバンドが検出された³⁰⁾。我々は表面標識したヒトのリンパ球表面抗原の SDS-PAGE で抗 Leu 7 抗体と結合する 205, 170, 150, 135, 110, 85, 65, 55 kDa のバンドを検出した。MC-P2, GC-J4 と結合する表面抗原も SDS-PAGE では同様のパターンを示した。MC-P4 ではこれらの他、58 kDa のバンドも検出された。数本のバンドが検出されたが、Iodogen による ¹²⁵I 標識では生細胞を殆ど障害しない²³⁾ので、細胞質内の表面抗原前駆物質を検出している可能性はないと考えられる。しかし、表面抗原が実験中に分解した可能性は完全には否定できない。

抗 Leu 7 抗体と反応する表面抗原分子は単一でないにもかかわらず、MC-P2 と MC-P4 が抗 Leu 7 抗体とヒトのリンパ球との結合をほぼ完全に抑制したことから、抗 Leu 7 抗体と反応する表面抗原分子のほとんどすべてにおいて、MC-P2, MC-P4 は Leu 7 epitope 自体あるいはそのごく近傍に結合すると考えられる。この場合、抗体の50%抑制値が小さいほど親和性は高いので、Leu 7 抗原分子に対する親和性は、MC-P2, MC-P4, 抗 Leu 7 抗体の順に低くなっていると考えられる。ヒトのリンパ球との結合を、抗 Leu 7 抗体と GC-J4 は互いに抑制しないので、GC-J4 に対する抗原決定基は Leu 7 epitope と明らかに異なる。しかし、免疫沈降法による分析では GC-J4 が反応する分子は抗 Leu 7 抗体が反応する分子と区別できないので、GC-J4 epitope は Leu 7 抗原分子の上に存在すると考えられる。以上から、抗 Leu 7 抗体、MC-P2, MC-P4, GC-J4 が結合する表面抗原分子は、分子量の異なる糖蛋白でありながら、非常に類似した構造の糖鎖部分を持っていると考えられる。

抑制試験の結果からは、MC-P2 epitope はMC-P2 epitope あるいは Leu 7 epitope と区別できなかった。しかし、イムノブロット法によるミエリンの染色パターンが MC-P4 と MC-P2 では異なる²¹⁾こと、免疫沈降法によるヒトのリンパ球表面抗原の SDS-PAGE パターンが MC-P4 と MC-P2 あるいは抗 Leu 7 抗体とで異なることから MC-P4 の微細抗原特異性は、

MC-P2 あるいは抗 Leu 7 抗体と異なると考えられる。以上から、MC-P4, GC-J4, 抗 Leu 7 抗体はいずれも Leu 7 抗原分子と結合するが、それぞれに対応する抗原決定基は基なっている。したがって、細胞の分化の過程あるいは腫瘍化による変化、または allotypic な構造の変化が Leu 7 epitope の近傍に起こっている場合にはこれらの抗体の反応性に解離がみられる可能性があり、有用なマーカーとなることが期待される。

本研究をご指導下さいました新潟大学脳研究所神経内科宮武正教授に深謝いたします。またご協力下さいました新潟大学脳研究所神経内科佐藤修三講師、田中正美、西沢正豊、犬塚貴、馬場広子先生に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Quarles, R.H., J.L. Everly and R.O. Brady: Evidence for the close association of a glycoprotein with myelin in rat brain. *J. Neurochem.*, **21**: 1177, 1973.
- 2) Braun, P.E., D.E. Frail and N. Latov: Myelin-associated glycoprotein is the antigen for a monoclonal IgM polyneuropathy. *J. Neurochem.*, **39**: 1261, 1982.
- 3) Steck, A.J., N. Murray, C. Meier, N. Page, and G. Perruisseau: Demyelinating neuropathy and monoclonal IgM antibody to myelin-associated glycoprotein. *Neurology*, **33**: 19, 1982.
- 4) Abo, T. and C.M. Balch: A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J. Immunol.*, **127**: 1024, 1981.
- 5) McGarry, R.C., S.L. Helfand, R.H. Quarles and J.C. Roder: Recognition of myelin-associated glycoprotein by the monoclonal antibody HNK-1. *Nature*, **306**: 376, 1983.
- 6) Sato, S., H. Baba, M. Tanaka, K. Yanagisawa and T. Miyatake: Antigenic determinant shared between myelin-associated glycoprotein from human brain and natural killer cells. *Biomed. Res.*, **4**: 489, 1983.
- 7) Murray N. and A.J. Steck: Indication of a possible role in a demyelinating neuropathy

- thy for an antigen shared between myelin and NK cells. *Lancet*, 1: 711, 1984.
- 8) Inuzuka, T., R.H. Quarles, A.B. Noronha, M.J. Dobersen and R.O. Brady: A human lymphocyte antigen is shared with a group of glycoproteins in peripheral nerve. *Neurosci. Lett.*, 51: 105, 1984.
 - 9) Ilyas, A.A., R.H. Quarles and R.O. Brady: The monoclonal antibody HNK-1 reacts with a human peripheral nerve ganglioside. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 122: 1206, 1984.
 - 10) Freddo, L., T. Ariga, M. Saito, L.C. Malcala, R.K. Yu and N. Latov: The neuropathy of plasma cell dyscrasia: Binding of IgM M-proteins to peripheral nerve glycolipids. *Neurology*, 35: 1420, 1985.
 - 11) Chou, K.H., A.A. Ilyas, J.E. Evans, R.H. Quarles and F.B. Jungalwala: Structure of a glycolipid reacting with monoclonal IgM in neuropathy and with HNK-1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 128: 383, 1985.
 - 12) Tanaka, M., S. Sato and T. Miyatake: Identification of myelin-associated glycoprotein (MAG) on the cell surface of mononuclear cells in human peripheral blood by a heterologous antiserum. *Jap. J. Exp. Med.*, 54: 9, 1984.
 - 13) Dobersen, M.J., P. Gascon, S. Trost, J.A. Hammer, S. Goodman, A.B. Noronha, D.J. O'Shannessy, R.O. Brady and R.H. Quarles: Murine monoclonal antibodies to the myelin associated glycoprotein react with large granular lymphocytes of human blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 552, 1985.
 - 14) Tanaka, M., M. Nishizawa, T. Inuzuka, H. Baba, S. Sato and T. Miyatake: Human natural killer cell activity is reduced by treatment of anti-myelin-associated glycoprotein (MAG) monoclonal mouse IgM antibody and complement. *J. Neuroimmunol.*, 10: 115, 1985.
 - 15) Hercend, T., E.L. Reinherz, S. Meuer, S.F. Schlossman and J. Ritz: Phenotypic and functional heterogeneity of human cloned NK cell lines. *Nature*, 301: 158, 1983.
 - 16) Griffin, J.D., T. Hercend, R. Beveridge and S.F. Schlossman: Characterization of an antigen expression by human natural killer cells. *J. Immunol.*, 130: 2947, 1983.
 - 17) Lanier, L.L., A.M. Le, J.H. Phillips, N.L. Warner and G.F. Babcock: Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J. Immunol.*, 131: 1789, 1983.
 - 18) Sato, S., M. Tanaka, N. Miyatani, H. Baba and T. Miyatake: Shared antigen between the myelin-associated glycoprotein (MAG) and a cell line from human T cell leukemia (HSB-2). *J. Neuroimmunol.*, 7: 287, 1985.
 - 19) Norton, W.T. and S.E. Poduslo: Myelination in rat brain-Method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 21: 749, 1973.
 - 20) Quarles, R.H. and C.F. Pasnak: A rapid procedure for selectively isolating the major glycoprotein from purified rat brain myelin. *Biochem. J.*, 163: 635, 1977.
 - 21) Nishizawa, M., M. Tanaka, T. Inuzuka, K. Tanaka, H. Baba, N. Miyatani, S. Sato and T. Miyatake: Production and characterization of monoclonal antibodies against myelin-associated glycoprotein. *J. Neurochem.*, 47: 1893~1900, 1986.
 - 22) Julius, M.H., E. Simpson and L.A. Herzenberg: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 3: 645, 1973.
 - 23) Fraker, P.J. and J.C. Speck: Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 80: 849, 1978.
 - 24) Markwell, M.A.K. and C.F. Fox: Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril. *Biochemistry*, 17: 4807, 1978.

- 25) Kessler, S.W.: Cell membrane antigen isolation with the staphylococcal protein A-antibody adsorbent. *J. Immunol.*, **117**: 1482, 1976.
- 26) Laemmli, U.K. and M. Favre: Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.*, **80**: 575, 1973.
- 27) Tanaka, M., S. Sato, K. Yanagisawa and T. Miyatake: Myelin-associated glycoprotein (MAG): Expression on the surface of human natural killer cells. *Biomed. Res.*, **5**: 71, 1984.
- 28) Tanaka, M., S. Sato, H. Baba and T. Miyatake: Effect of neuraminidase on reactivity of anti-myelin-associated glycoprotein (MAG) antiserum with human natural killer cells. *Biomed. Res.*, **5**: 283, 1984.
- 29) Kubagawa, H., T. Abo, M.C. Balch and M.D. Cooper: Biochemical analysis of antigenic determinants recognized on human natural killer cells by HNK-1 (Leu-7) antibody. *Fed. Proc.*, **42**: 1219, 1983.
- 30) Baba, H., S. Sato, T. Inuzuka, M. Nishizawa, M. Tanaka and T. Miyatake: Characterization of the antigenic determinant on HSB-2 cells shared with myelin-associated glycoprotein (MAG) using monoclonal antibodies. *J. Neuroimmunol.*, **13**: 89, 1986.

(昭和62年2月18日受付)