胸腺抽出物がハイブリドーマの増殖および抗体産生 に及ぼす影響について

一宮まさみ*・府中英孝*・塚正泰之*・藤野正行**・杉山雅昭*
峯岸 裕*・赤羽義章***・安本教傳****

Augmentation of Hybridoma Growth and Its Monoclonal Antibody Production by Supplementation with Thymus Extracts

Masami ICHINOMIYA*, Hidetaka FUCHU*, Yasuyuki TSUKAMASA*,
Masayuki FUJINO**, Masaaki SUGIYAMA*, Yutaka MINEGISHI*,
Yoshiaki AKAHANE*** and Kyoden YASUMOTO****

* *Central Research Institute, Marudai Food Co., Ltd.,
21-3 Midori-machi, Takatsuki, Osaka 569*

** *Food Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.,
Nishioji-hachijo, Minami-ku, Kyoto 601*

*** *Department of Marine Bioscience, Faculty of Biotechnology
Fukui Prefectural University, 1-1 Gakuen-cho, Obama, Fukui 917*

**** *Research Institute for Food Science, Kyoto University,
Gokasho, Uji, Kyoto 611*

Effects of thymus extracts on growth of mouse hybridoma and its production of monoclonal antibody (Mab) against human serum albumin were investigated. Water extracts of calf thymus were fractionated into high- and low-molecular weight fractions (HM and LM, respectively) by ultrafiltration through a Millipore membrane filter with nominal molecular weight limit of 5000. The Mab production was increased about 10 times by supplementation of serum-free basal medium with HM at a concentration equivalent to 0.5% calf thymus. The increases of Mab titers paralleled with those of cell counts. Trypsin-digested HM showed least capacities in promoting the hybridoma growth and its Mab production. DEAE-HM, a fraction made free of basic proteins from HM by DEAE-cellulose chromatography, showed capacities similar to those observed with HM. Electrophoretic analysis revealed that DEAE-HM was composed of a number of proteinaceous components with molecular sizes of 25 to 30 kDa and pIs ranging from neutral to acid.

(Received Mar. 15, 1994)

モノクローナル抗体は、臨床検査や衛生検査における微量成分や微生物の迅速測定といった用途で実用化されているほかに、選択性の極めて高い物質精製用の素材としても近年注目を集めている¹⁾。モノクローナル抗体を

* 丸大食品(株)中央研究所 (〒569 大阪府高槻市緑町 21-3)

** 日本新薬(株)食品開発研究所 (〒601 京都市南区西大路通り八条下ル)

*** 福井県立大学生物資源学部海洋生物資源学科 (〒917 福井県小浜市学園町 1-1)

**** 京都大学食糧科学研究所 (〒611 京都府宇治市五ヶ川)

工業的規模で使用するためには、安価に、しかも大量に生産することが不可欠である。モノクローナル抗体は産生細胞（ハイブリドーマ）の培養上清を精製することにより得られ、その培養には高価なウシ胎児血清を添加した培地（以下、血清培地）が広く用いられている。血清培地中に含まれる血清由来の成分とモノクローナル抗体とを分離することが困難であるため、現状ではモノクローナル抗体は非常に高価なものとなっている。

一方、モノクローナル抗体の分離が容易な無血清培地中でハイブリドーマを培養した場合には、血清培地中に比べて細胞の増殖速度が遅く、抗体産生量が少ないという問題点がある。このため、ホルモンなどの添加による増殖能の改善法が研究されている^{2)~4)}。

畜産副生物である仔ウシ胸腺 (ris de veau) は、フランス料理の素材として利用されているが、本来胸腺はT細胞性免疫の中枢器官であり、T細胞の増殖・分化・成熟と免疫応答獲得の場である。また、GOLDSTEIN らによって胸腺抽出画分、thymosin fraction 5⁵⁾ に免疫応答を増強する液性因子の存在が報告されている。そこで、著者らは無血清培地系でハイブリドーマの抗体産生を増強する物質を仔ウシ胸腺より検索した。

実験方法

1. 胸腺抽出物の調製

(株)日本生物材料センター(大阪市)より入手した国産仔ウシ胸腺を3倍量の0.15 M 塩化ナトリウムとともに1分間ホモナイズした後、遠心分離(10 000×g, 30分間)して粗抽出液を調製した。これをさらに遠心分離(47 000×g, 2時間)して得られた上清画分をポアサイズ0.22 μm のメンブレンフィルター(MILLIPORE 社製)で過後、限外ろ過(MILLIPORE 社製、モルカットII, 分画分子量5 000)を行い、分子量5 000以上の高分子画分(HM)と分子量5 000以下の低分子画分(LM)とに分画した。胸腺1 kg 当りの乾物収量は、HM では1.72 g, LM では1.33 gであった。

2. マウスハイブリドーマ HSA-F 01 の作製

BALB/c マウスをヒト血清アルブミン(SIGMA 社製)で免疫化後、その脾臓細胞とマウスミエロマ細胞P 3U1を50% ポリエチレングリコール存在下で細胞融合し、HAT 培地による選択法と限界希釈法により抗ヒト血清アルブミンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(HSA-F 01)を得た。

3. HM のトリプシン処理

200% (生胸腺換算濃度、以下HMの濃度は生胸腺相

当量に換算して示す)のHM溶液に等量の0.5%のトリプシン溶液を混合してろ過滅菌し、37℃で24時間反応させた後、95℃で15分間加熱して反応を停止させた。

4. HM の DEAE セルロースによる分画

HMを限外ろ過(アミコン社製, Model 202 PM 10, 分画分子量10 000)により脱塩・濃縮後、50 mM リン酸緩衝液(pH 9.5)で平衡化させたDEAE-セルロース(Brown 社製)に吸着させ、1 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出する画分を再び限外ろ過により脱塩・濃縮した。

5. 細胞培養

無血清培地はSFM-101 Nissui(日水製薬(株)製)を、血清培地はダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬(株)製)とHAM F-12培地(日水製薬(株)製)を等量配合したものに、ウシ胎児血清(FCS)を10%添加したものを用いた。

この無血清培地および血清培地を対照区とし、これらの培地に乳タンパク質を有効成分とする免疫実験用ブロッキング剤ブロックエース(大日本製薬(株)製)⁶⁾、HM、LMをそれぞれ所定の濃度となるように加えた培地をテスト区として、HSA-F 01を4~9日間、5%二酸化炭素、95%大気の混合ガス気相中で37℃で培養した。なお、初発細胞数は10³ cells/mlもしくは10⁴ cells/mlとした。

6. 細胞数および抗体産生量の測定

細胞数は血球計算盤を用いた直接検鏡により、抗体産生量はヒト血清アルブミンを固相化した直接法酵素免疫法によって測定した。

7. 細胞内および細胞外抗体量の測定

細胞内および細胞外抗体量は、初発細胞数10⁴ cells/mlのHSA-F 01を7日間培養した後に測定した。無血清培地を対照区とし、これに50 μl/ml ブロックエース、0.1% HM、50 μl/ml ブロックエースと0.1% HMの併用、0.1%トリプシン処理HM、および1.0% DEAE-HMをそれぞれ添加した培地をテスト区とした。

細胞外抗体量は培養液8 mlを遠心分離(3 000×g, 5分間)した上清について、細胞内抗体量はその沈澱物を無血清培地4 mlで洗浄後、無血清培地4 mlに再び懸濁し、細胞数を測定した後に、超音波処理(200 W, 5分間)により細胞を破碎したものについて、それぞれ直接法酵素免疫法にて測定した。

8. 二次元電気泳動

DEAE-HMを8 M 尿素および5% 2-メルカプトエタノール溶液で溶解後、アンフォライン(pH 3~10, ファ

ルマシア-LKB 社製)を両性担体としてディスクゲル等電点電気泳動を行い、さらに 12% の SDS ポリアクリルアミドゲルで二次元目の電気泳動を行った⁷⁾⁸⁾。同時に泳動したマーカータンパク質の pI と分子量から DEAE-HM の主タンパク質の pI と分子量を推定した。

実験結果および考察

1. HM および LM が HSA-F 01 の抗体産生に及ぼす影響

Fig. 1 には血清 (A) および無血清培地 (B) それぞれにブロックエース, HM または LM のいずれかを加えた培地中で HSA-F 01 を 5 日間培養し、培養上清中の IgG 量を比較した結果を示す。

血清培地中では全テスト区の抗体産生量に有意差は認められなかった。無血清培地中では抗体産生増強活性があるとされているブロックエース⁶⁾ 50 μ l/ml 添加区で 4 倍、HM 0.01%~0.5% 添加区で 8~10 倍に抗体産生量が増加した。

2. HSA-F 01 に対する HM の細胞増殖および抗体産生増強活性

HM の HSA-F 01 に対する抗体産生増強効果が細胞増殖の促進によるものか、それとも細胞の抗体産生能自

体の増強によるものかを検討した。HSA-F 01 の初発細胞数を 10^3 cells/ml と 10^4 cells/ml の 2 段階に分け、それぞれ 9 日間と 4 日間、無血清培地にブロックエースおよび HM をそれぞれ単独または混合添加した培地中で培養し、対照区に対する細胞数比ならびに培養上清中の IgG 量比を調べた。得られた結果を Fig. 2 に示す。

初発細胞数が 10^4 cells/ml の場合には、1% の HM 単独添加および 0.01% から 0.1% までの HM とブロックエースの併用添加により生細胞数が対照に比べて有意に増加した。抗体産生量については HM 0.01% とブロックエースの併用添加区でのみ有意に増加することが認められ、高濃度 HM 併用添加区についても増加する傾向が認められた。

特に、初発細胞数が 10^3 cells/ml と少ない場合には、HSA-F 01 は無血清培地中で増殖することができないのに対し、HM 単独または HM とブロックエースの併用添加により増殖可能になることは注目に値する。

以上の結果は、HM に細胞増殖促進活性があることを示すものである。次に HM の抗体産生能増強活性について、検討を加えた。

3. HM の細胞内および細胞外抗体量に対する影響

ポリリジン等の塩基性タンパク質は、ハイブリドマ

Fig. 1 Effects of supplementation of thymus extracts on monoclonal antibody production by mouse hybridoma cultured in medium supplemented with (A) and without (B) fetal calf serum

The basal medium was 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F12 medium with the supplementation of 10% fetal calf serum (A), or SFM-101 (B). The hybridoma was cultured for 5 days with starting cell number of 10^4 cells/ml in those basal media supplemented with: a, none (control); b, Block Ace at 50 μ l/ml; c, Block Ace at 250 μ l/ml; d, low-molecular weight fraction of thymus extracts (LM) at 0.01% in thymus equivalence (TE%); e, LM at 0.05 TE%; f, LM at 0.1 TE%; g, LM at 0.5 TE%; h, LM at 1.0 TE%; i, high-molecular weight fraction of thymus extracts (HM) at 0.01 TE%; j, HM at 0.05 TE%; k, HM at 0.1 TE%; l, HM at 0.5 TE%; and m, HM at 1.0 TE%. The IgG production rates in the basal media A and B were 25.35 and 0.43 μ g IgG/ml, respectively.

Fig. 2 Promotion of growth (A and C) and antibody production (B and D) of mouse hybridoma cultured in serum-free medium by supplementation with HM

The hybridoma was cultured for 5 and 9 days with starting cell counts of 10^4 /ml (A and B) and 10^3 /ml (C and D), respectively, in the medium supplemented with: a, none (control); b, Block Ace at $50 \mu\text{l}/\text{ml}$; c, HM at 0.01 TE%; d, HM at 0.1 TE%; e, HM at 1.0 TE%; f, Block Ace at $50 \mu\text{l}/\text{ml}$ +HM at 0.01 TE%; g, Block Ace at $50 \mu\text{l}/\text{ml}$ +HM at 0.1 TE%; h, Block Ace at $50 \mu\text{l}/\text{ml}$ +HM at 1.0 TE%. One hundred percent in subsections A and C corresponded to cell counts of $(3.25 \pm 0.32) \times 10^4$ and $(0.83 \pm 0.53) \times 10^3$, and subsections B and D to IgG titers of 576 ± 65 and $7.00 \pm 0.71 \text{ ng}/\text{ml}$, respectively. Columns and bars represent means and SEM ($n=4$). The means with different letter within each subsections were significantly different at $p < 0.05$.

Abbreviations stand for as described in Fig. 1.

の細胞膜に作用して抗体の細胞膜透過性を高め、細胞外に放出される抗体量を増加させる働きのあること⁹⁾が知られている。この場合には、培地内の抗体量の増加をもって抗体産生能が増強されたとは必ずしもいえないことになる。

そこで、初発細胞数を $10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ として HSA-F 01 を、7 日間培養した後の培地内生細胞数、細胞内および細胞外抗体量ならびに細胞数 10^4 当りの細胞内および細胞外抗体量を調べた。得られた結果を Table 1 に示す。生細胞数は $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ブロックエース、0.1% HM、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ブロックエースと 0.1% HM の併用添加区で対照区に比べて有意な増加が認められた。これに伴い細胞内、細胞外抗体量も共に増加しているが、細胞数 10^4 当りでは細胞内抗体量に若干の増加傾向が認められるにすぎなかった。このことから、抗体量の増加は主として細

胞数の増加によるものであることが判明した。

Table 1 に示したトリプシンで処理した HM には、細胞数および抗体産生量の増加活性が認められなかった。このことは HM の持つ細胞増殖促進活性はタンパク質様の成分に由来するものであることを示唆している。

4. DEAE-HM の細胞増殖および抗体産生増強活性

胸腺に含まれる主要な塩基性タンパク質であるヒストンには細胞に対する分化誘導効果や、分化抑制効果のあることが既に報告¹⁰⁾されている。したがって HM で認められた効果がヒストンに由来している可能性も考えられる。

そこで、DEAE セルロースによりヒストンなどの塩基性タンパク質を除いた DEAE-HM を調製した。この DEAE-HM を無血清培地に添加して、初発細胞を $10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ とした HSA-F 01 について 7 日間培養後の生

Table 1 Intra- and extra-cellular IgG titers of mouse hybridoma cultured in serum-free medium with supplementation of high molecular weight fraction of thymus extracts¹

Supplementation	Cell counts		Intracellular IgG titers		Extracellular IgG titers	
	$\times 10^4/\text{ml}$		$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\text{ng}/10^4 \text{ cells}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\text{ng}/10^4 \text{ cells}$
None	15	$\pm 0.2^b$	0.14 ± 0.02^a	10 ± 1.2^a	1.8 ± 0.12^b	126 ± 6.5^{ab}
+50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Block Ace	33	$\pm 1.4^c$	0.36 ± 0.03^{ab}	11 ± 0.6^{ab}	3.1 ± 0.21^c	96 ± 5.6^a
+0.1 TE% HM	61	$\pm 1.5^e$	0.98 ± 0.09^b	16 ± 1.4^c	6.4 ± 0.43^e	105 ± 6.3^a
+50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Block Ace +0.1 TE% HM	54	$\pm 1.5^d$	0.88 ± 0.04^b	16 ± 0.9^c	5.1 ± 0.41^d	96 ± 8.4^a
0.1 TE% trypsin-digested HM	8.6	$\pm 0.49^a$	0.11 ± 0.02^a	14 ± 2.9^{bc}	1.2 ± 0.20^a	144 ± 28.5^b

¹The mouse hybridoma counting 10^4 cells/ml was cultured for 7 days in SFM-101 with indicated supplementation.

Values are means $\pm$ SEM (n=6). Means with different superscripts within the same column are significantly different at $p < 0.05$. Abbreviations stand for as described in Fig. 1.

Table 2 Effect of removal of basic proteins from high-molecular weight fraction of thymus extracts on intra- and extra-cellular IgG titers of mouse hybridoma¹

Supplementation	Cell counts		Intracellular IgG titers		Extracellular IgG titers	
	$\times 10^4/\text{ml}$		$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\text{ng}/10^4 \text{ cells}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\text{ng}/10^4 \text{ cells}$
None	10.7	$\pm 0.20^a$	0.11 ± 0.01^a	10 ± 1.2^a	0.96 ± 0.01^a	90 ± 2.4^b
+0.1 TE% HM	49.3	$\pm 1.09^b$	0.92 ± 0.01^b	19 ± 0.7^b	3.2 ± 0.17^b	65 ± 2.8^a
+1.0 TE% DEAE-HM	86.3	$\pm 1.01^c$	2.8 ± 0.02^c	33 ± 1.4^c	7.3 ± 0.09^c	85 ± 1.9^b

¹The mouse hybridoma counting 10^4 cells/ml was cultured for 5 days in SFM-101 with indicated supplementation.

Values are means $\pm$ SEM (n=3). Means with different superscripts within the same column are significantly different at $p < 0.05$. Abbreviations stand for as described in Fig. 1. DEAE-HM stands for the high-molecular weight fraction of thymus extracts removed of basic proteins by DEAE-cellulose chromatography as described in Materials and Methods.

細胞数, 細胞内, 細胞外抗体量ならびに細胞数 10^4 当りの細胞内, および細胞外抗体量を調べた。その結果を Table 2 に示す。HM および DEAE-HM の添加量については, それぞれの培養細胞増殖促進活性および抗体産生活性がもっとも高い濃度を選んだ (データは図示せず)。

1.0% DEAE-HM 添加区の生細胞数は対照区の約 8.0 倍, 0.1% HM 添加区の約 1.8 倍に増加し, 細胞外抗体量は対照区の約 7.6 倍, 0.1% HM 添加区の約 2.3 倍に増加した。しかし, 細胞数 10^4 当りの細胞外抗体量は他の試験区と変わらないことから, DEAE-HM 添加でみられる細胞外抗体量の増加も HM 添加の場合と同様に細胞数の増加に起因していることが確認された。

Fig. 1 に示すように HM を培地中に高濃度 (1.0%) に添加すると, 抗体産生量は対照区よりも減少する。一方,

初発細胞を 10^4 cells/ml とした HSA-F 01 について HM-DEAE を添加し, 5 日間培養した後の生細胞数および抗体産生量は, 対照区に比べ, それぞれ 0.1% 添加区で 3.6 倍と 3.5 倍, 1.0% 添加区で 13.3 倍と 13.9 倍, 10% 添加区で 8.2 倍と 6.3 倍といずれも大幅に増加している。このことから, DEAE セルロース処理により, 培養細胞の増殖を阻害する物質が除去されたものと推察される。

5. DEAE-HM 画分の二次元電気泳動パターン

DEAE-HM の二次元電気泳動パターンを Fig. 3 に示す。DEAE-HM は, 分子サイズが約 60 kDa で pI が約 6 の成分および分子サイズが約 25~30 kDa で pI が 3~4 の成分を主体とする数十種類の酸性~中性タンパク質を含んでいる。主要タンパク質のうち 60 kDa の成分は, 血清アルブミンであると推測された。血清アルブミン単独では細胞増殖促進活性が低い¹¹⁾ ことから, 後者に HM

Fig. 3 Two-dimensional electrophoresis pattern of high-molecular weight fraction of thymus extracts

DEAE-HM prepared as described in Materials and Methods was analyzed by one-dimensional electrofocusing over the range of pH 3 to 10 combined with two-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250.

の細胞増殖促進物質が含まれていると推定された。

以上のことより、胸腺中にはハイブリドーマの細胞増殖促進活性を有する酸性または中性のタンパク質が存在することが強く示唆された。この胸腺由来の細胞増殖促進因子は、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングの際のクローニングファクターであるマウス胸腺細胞の代替物としても利用可能ではないかと思われる。

動物細胞の培養には、ウシ胎児血清が長年用いられてきているが、モノクローナル抗体を工業的に生産する際には、高価で、しかも抗体精製の妨げとなる夾雑物質が多く含まれている血清培地よりも、抗体産生増強物質を添加した無血清培地を使用の方が望ましいと考えられ

る。

要 約

胸腺抽出物の高分子画分 (HM) および数十種類の酸性または中性のタンパク質で構成されている DEAE 吸着画分 (DEAE-HM) にはハイブリドーマに対する細胞増殖促進活性があり、抗体産生量も増加させることが明らかになった。

本研究の一部は、(財)小森記念財団の学術研究助成金の援助によって行われた。記して謝意を表す。

文 献

- 1) 杉野幸夫編：モノクローナル抗体，第2刷，(講談社，東京)，(1986)。
- 2) MURAKAMI, H., MASUI, H., SATO, G.H., SUEOKA, N., CHOW, T.P. and KANO-SUEOKA, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1158 (1982)。
- 3) HUTCHINGS, S.E. and SATO, G.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 901 (1978)。
- 4) HAYASHI, I. and SATO, G.H.: *Nature*, **259**, 132 (1976)。
- 5) GOLDSTEIN, A.L., GUHA, A., ZATS, M.M., HARDY, M.A. and WHITE, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1800 (1972)。
- 6) 村上浩紀・上野川修一：食品と生体防御，第1刷，(講談社，東京)，p. 115 (1992)。
- 7) O'FARRELL, P.H.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007 (1975)。
- 8) 寺田 弘：電気泳動法—基礎と実験—，第1版，(廣川書店，東京)，p. 188 (1989)。
- 9) 前田万里・森 隆・村上浩紀：日本農芸化学会大会講演要旨集，p. 481，東京 (1992)。
- 10) OKABE-KADO, J., HONMA, Y., HAYASHI, M. and HOZUMI, M.: *Cancer Research*, **41**, 1997 (1981)。
- 11) 村上浩紀・上野川修一：食品と生体防御，第1刷，(講談社，東京)，p. 114 (1992)。

(平成6年3月15日受理)