

# 香川県立保健医療大学リポジトリ

## 機能性食品を用いた新たな免疫賦活法によるモノクローナル抗体の作製

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大星, 航, 天川, 雅夫, 近藤, 明宏, 加藤, 亮二, 徳永, 賢治 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://kagawa-puhs.repo.nii.ac.jp/records/283">https://kagawa-puhs.repo.nii.ac.jp/records/283</a>

## 機能性食品を用いた新たな免疫賦活法による モノクローナル抗体の作製

大星 航<sup>1)\*</sup>, 天川 雅夫<sup>2)</sup>, 近藤 明宏<sup>3)</sup>, 加藤 亮二<sup>4)</sup>, 徳永 賢治<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 香川県立保健医療大学大学院保健医療学研究科保健医療学専攻, <sup>2)</sup> 香川県立保健医療大学大学院

<sup>3)</sup> 香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科, <sup>4)</sup> 純真学園大学保健医療学部検査科学科

## Production of Monoclonal Antibodies by a New Immunostimulatory Method Using Functional Foods

Wataru Oboshi<sup>1)\*</sup>, Masao Amakawa<sup>2)</sup>, Akihiro Kondou<sup>3)</sup>  
Ryoji Kato<sup>4)</sup>, Kenji Tokunaga<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> *The Graduate school of Kagawa Prefectural University of Health Sciences  
Graduate school of health sciences <master's Degrees> Course of health Sciences*

<sup>2)</sup> *The Graduate school of Kagawa Prefectural University of Health Sciences*

<sup>3)</sup> *Department of Medical Technology, Kagawa Prefectural University of Health Sciences*

<sup>4)</sup> *Department of Medical Laboratory Sciences, Junshin Gakuen University*

### 要旨

一般的に臨床検査薬として使用するモノクローナル抗体の作製には、動物免疫によるB細胞を用いた細胞融合法を用いることが多いが、このモノクローナル抗体を得るためには①高力価の抗体を産生するマウスを使用すること、②簡便で確実なクローニング法を確立することにある。これまで抗体価を上昇させるための免疫方法の工夫として、抗原の種類、免疫部位、動物種などが検討されてきたが、最適な方法はいまだ確立されていない。

そこで、従来の免疫法（以下従来法）に加えて、免疫賦活作用を持つとされる機能性食品（βグルカンおよび乳酸菌含有）の経口投与の併用法を検討した。さらに、操作が容易で、原則的にクローニングの必要がなく、単一クローンを得やすい利点を有するメチルセルロース法を用いてモノクローナル抗体作製を実施した。

その結果、抗原をマウス腹腔に免疫した方法に乳酸菌含有βグルカンの経口投与を併用することで有意な抗体価の上昇（ $p < 0.05$ ）を認め、さらに、メチルセルロース法によるクローニングを行うことで、効率的にモノクローナル抗体を作製することができた。

**Key Words:** 機能性食品 (functional foods), βグルカン (beta-glucan), モノクローナル抗体 (monoclonal antibody), クローニング (cloning), メチルセルロース法 (methylcellulose method)

\* 連絡先：〒761-0123 香川県高松市牟礼町原 281-1 香川県立保健医療大学大学院保健医療学研究科保健医療学専攻 大星 航

\* Correspondence to: Wataru Oboshi, The Graduate school of Kagawa Prefectural University of Health Sciences Graduate school of health sciences <master's Degrees> Course of health Sciences, 281-1 Murecho-hara, Takamatsu, Kagawa 761-0123 Japan

## はじめに

1975年にミルスタインとケラーによって作製されたモノクローナル抗体<sup>1)</sup>は、特定のエピトープに高い親和性を持つ抗体で、微量な生体物質の診断薬としての利用をはじめ、様々な物質の分離・精製、医薬分野での利用など、多岐にわたり使用されている。

現状におけるモノクローナル抗体の作製法と応用には、大きく分けて2つあり、1つは動物に免疫感作したリンパ球とミエロマ細胞を用いた細胞融合法による従来型の動物を使用した方法、他方はファージディスプレイ法やマウスモノクローナル抗体の抗原結合部位をヒト免疫グロブリンの定常部に移植したキメラ抗体や、マウス抗体の相補性決定領域をヒト可変領域に移植するヒト型化モノクローナル抗体などの遺伝子工学を利用した作製方法<sup>2)</sup>が用いられている。これらのうち、遺伝子工学を利用した方法は動物由来の抗体ではないため、医薬分野の利用として非常に大きな利点がある。

一般的な臨床検査診断薬に使用するモノクローナル抗体作製には動物免疫法による細胞融合法が多いが、動物免疫の際に、より高力価の抗体を得るための工夫として、これまでに抗原の種類、免疫部位、用いる動物種などの検討がなされてきた。しかしながら、最も効率よく抗体価を上昇させる方法はいまだ確立されていない。

そこで、高力価の抗体産生を誘導する方法として、従来法に黒酵母アウレオパナジウムβグルカン（株式会社アウレオ）を併用した新たな免疫賦活方法を考案した。このβグルカンは、アウレオパナジウム菌株が菌体外に産生する多糖類であり、高分岐なβ-1,3-1,6-D-グルカンの構造をとる。これは、種々の免疫賦活作用を示すと言われており、マクロファージ細胞の表面に存在するDectin-1<sup>3,4)</sup>と呼ばれるβグルカンを特異的に認識する受容体にβグルカンが結合することで、マクロファージが種々の活性を示し、マクロファージの貪食作用を増強することが報告されている<sup>5)</sup>。また、これまでに腸管免疫に対する免疫賦活作用<sup>6)</sup>、抗腫瘍活性<sup>7)</sup>、腸管粘膜の保護作用<sup>8)</sup>などの効果も報告されている。

今回実験に使用したβグルカンには、βグルカン540mgに対して乳酸菌が1,000mg含有されており、βグルカンと乳酸菌の両者の混合物（以下乳酸菌含有βグルカン）として検討を行った。

一方、モノクローナル抗体の取率を上げる方法として、クローニング法の選択が重要である。そのクローニング法には、従来から行われている限界希釈法<sup>9)</sup>をはじめ、寒天<sup>10)</sup>やアガロース<sup>11)</sup>、またはメチルセルロース<sup>12)</sup>などの半固形培地を用いた方法が知られている。今回使用したメチルセルロース法は細胞の成育が最適なメチルセルロース培地にHAT (hypoxanthine aminopterin thymidine) を添加したもので、この培地に融合細胞をまくことによりコロニーを直接肉眼で見ることができ、

容易に単一コロニーとして採取することができる。原則的にクローニングが不要となり、限界希釈法と比べ、個々の融合細胞による希釈操作や培地交換の必要もなく、操作が容易である<sup>13)</sup>が、コストがかかる欠点を有している。

そこで、我々がこれまで日常的に作製しているサイログロブリン（以下Tg）のモノクローナル抗体を例に、従来法と乳酸菌含有βグルカンの経口投与を併用した免疫法の比較検討を行い、モノクローナル抗体を作製した。

## 方法

### 1. モノクローナル抗体作製の概要

モノクローナル抗体作製において、動物免疫からクローニングまでの期間と工程を図1に示した。

### 2. 免疫原の作成

免疫原は分子量66万の糖タンパクであるTgを用いた。使用したTgはバセドウ病患者から得た甲状腺組織をホモジナイズ後、遠心分離した上清（粗Tg）をACA34カラム（IBF Biotechnics社）によるゲル濾過法で精製した。初回免疫にはこのTgにFreundの完全アジュバント（Freund's complete adjuvant; FCA,和光純薬工業株式会社）を1：9の比率で混和後、エマルジョンを作製し、追加免疫にはFreundの不完全アジュバント（Freund's incomplete adjuvant; FIA,和光純薬工業株式会社）を1：9の比率で混和後エマルジョンを作製した。

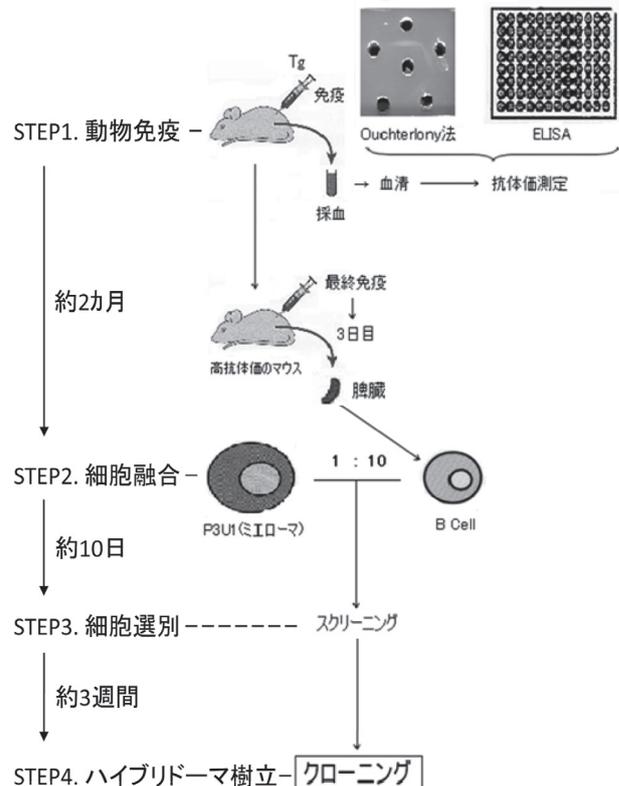


図1 モノクローナル抗体作製の期間と工程

### 3. 動物免疫および抗体価の測定

動物免疫はすべて6週齢、メスのBALB/cマウス（日本チャールズ・リバー株式会社）に免疫原であるTgを1匹あたり80 $\mu$ g投与し、追加免疫は2週間隔で行った。

採血は追加免疫後7日目ごとに行い、10,000rpm、5分間の遠心条件で血清分離後、 $-30^{\circ}\text{C}$ で測定まで保存した。抗体価測定は、ある期間の一定数をまとめてOuchterlony法<sup>14)</sup>およびELISA法で実施した。

#### 1) 免疫部位による抗体価の推移

まず、従来法を用いて免疫部位による抗体価の比較検討を行った。

免疫部位は腹腔、皮下、尾根部<sup>15)</sup>の3群とした。尾根部免疫は筋注の方法の一つで、マウス腸骨リンパ節での抗体産生を促進させ、一般的な腹腔免疫と同等の抗体価を得ることができる。今回、1群あたり前述した方法でマウス6匹、3群の計18匹を用いて、それぞれ腹腔、皮下、尾根部に抗原を投与した。追加免疫は2週間隔で3か月間、計7回行った。追加免疫後7日目に採血を計7回行い、ELISA法で免疫部位の違いによる抗体価の推移の比較を行った。

#### 2) 免疫法の比較検討

免疫部位ごとに、従来法と、従来法と乳酸菌含有 $\beta$ グルカンの経口投与を併用する方法による抗体価の比較検討を行った。

従来法を用いて免疫のみ行うコントロール群として、腹腔、皮下、尾根部の3群、従来法に乳酸菌含有 $\beta$ グルカンの経口投与を併用する乳酸菌含有 $\beta$ グルカン群として、腹腔、皮下、尾根部の3群、計6群とした。検討は1群あたり12匹、計72匹用いて、それぞれ腹腔、皮下、尾根部に抗原投与し、同時に乳酸菌含有 $\beta$ グルカンを1匹あたり毎日200 $\mu$ lずつ経口投与を行った。追加免疫は2週間隔で2か月間、計5回行い、追加免疫後7日目に採血をそれぞれ行った。抗体価の測定はOuchterlony法とELISA法で実施した。

#### 3) 抗体価測定法

ELISA法は、96穴マイクロプレート（Thermo Fisher Scientific社）に免疫原として用いたTg（100 $\mu$ g/ml）を各穴に100 $\mu$ lずつ分注し1夜 $4^{\circ}\text{C}$ で固相化させ、自家製の抗原結合プレートを作製した。これに、採血したマウス血清を100倍、1,000倍、10,000倍希釈後100 $\mu$ lずつ分注し、30分間一次反応を行った。これを0.05%Tween20添加生理食塩水で3回洗浄を行い、2次抗体である抗マウスIgG・HRP抗体を100 $\mu$ lずつ分注して30分間反応させた。その後、同様に3回洗浄を行い、基質であるテトラメチルベンチジン（TMB；Kirkegaard & Perry Laboratories社）を100 $\mu$ lずつ加えて30分間反応させた。最後に、反応停止液（1Mリン酸緩衝液）を50 $\mu$ lずつ加えて反応停止後、マイクロプレートリーダー（Bio-Rad Laboratories社）で450nmにて比色定量した。

Ouchterlony法は、溶解した1%アガロースをスライドガラスに5ml流し込み寒天を作製後、正五角形になるように穴をあけ、連続2倍希釈したマウス血清をそれぞれ20 $\mu$ lずつ注入した。また、正五角形の中心には免疫原として用いたTgを20 $\mu$ l注入した。湿潤箱に入れて $37^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させ、翌日イムノビュアーで沈降線の有無を確認した。

### 4. 細胞融合

抗体価の上昇が確認されたマウスに最終免疫を行い3日後、脾臓を摘出した。その脾臓をハサミで細かく切った後、75 $\mu$ mの篩（東京スクリーン株式会社）に通して濾過後、リンパ球を採取した。次に、このリンパ球とミエローマ細胞（対数増殖期：40~60万個/ml）を10:1の割合で混和し、ポリエチレングリコール法<sup>16)</sup>で細胞融合を実施した。細胞融合後、メチルセルロース法によってクローニングを行った。

### 5. クローニング

メチルセルロース法では、メチルセルロースHAT培地（stem cell technologies社）に1シャーレあたり融合細胞が約200万個になるように蒔き、コロニーが生育するまでの約10日間培養した。そして、生育したコロニーを1つずつマイクロピペットで採取し、それを10% Fetal calf serum (FCS；ウシ胎児血清) 添加RPMI-1640培地（日本製薬株式会社）の入った96穴プレートに移して増殖後、その上清を用いて抗体価を測定し抗体産生クローンを検出した（図2）。

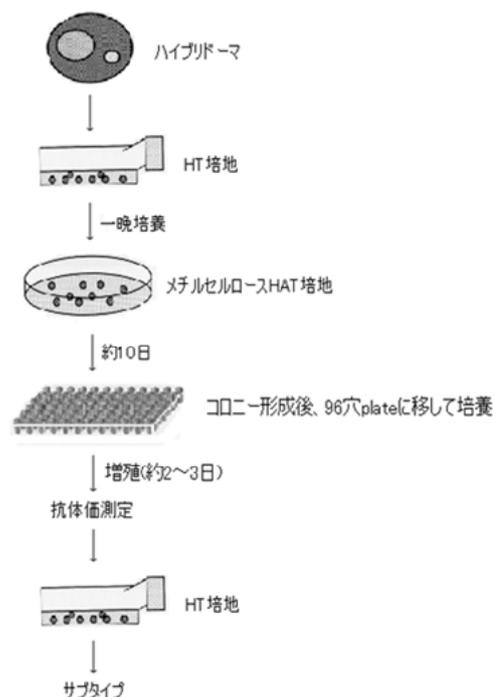


図2 メチルセルロース法によるクローニング

## 6. 腹水の採取とモノクローナル抗体の性状の確認

メス7週齢のC3Hマウス（日本チャールズ・リバー株式会社）にプリンスタン（和光純薬工業株式会社）を0.5ml/匹ずつ腹腔投与し、5日後にモノクローナル抗体産生細胞（対数増殖期：50~80万個/ml）を1,000万個/匹ずつ腹腔投与した。細胞投与後、腹水の貯留を確認し、シリンジを用いて腹水を採取した。この採取した腹水をイムノグロブリンタイピングキット（和光純薬工業株式会社）を用いて抗体のサブタイプを判定した。さらに、この腹水からprotein A（Sigma-Aldrich社）を用いて抗体精製を行った。

## 倫理的配慮

この研究を実施するに当たって、香川県立保健医療大学の動物実験専門委員会に審査請求し承認を得た上で、本学動物実験に関する指針に従い行った。

## 結果

### 1. 免疫部位による抗体価の推移

免疫は13週目まで追跡した。図3は1群あたり6匹、計3群の血清1万倍希釈の抗体価推移の平均値を示した。腹腔免疫では免疫後9週目（O.D. = 1.073 ± 0.219）でピークに達し、13週目（O.D. = 1.038 ± 0.244）まで抗体価は持続した。また、尾根部免疫では免疫後13週目まで上昇（O.D. = 1.059 ± 0.216）する傾向であったが、腹腔免疫と同等の抗体価を示した。一方、皮下免疫では9週目（O.D. = 0.556 ± 0.144）でピークとなり、13週目（O.D. = 0.460 ± 0.128）で抗体価は横ばいとなった。13週目における抗体価について、有意水準を5%としてt検定を行ったところ、腹腔免疫および尾根部免疫は、皮下免疫と比較して有意に抗体価が高い結果となった（ $p < 0.05$ ）。

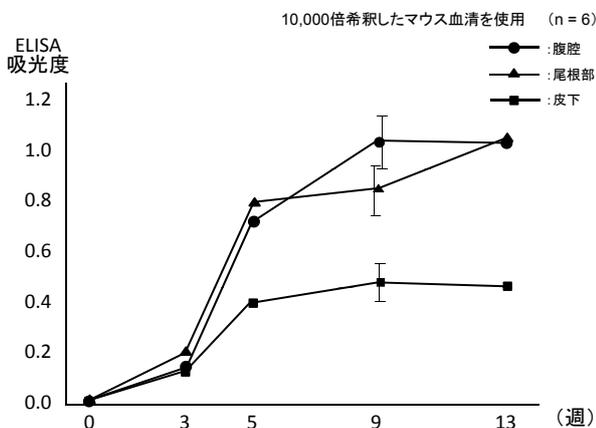


図3 従来の免疫法による免疫部位別（腹腔、皮下、尾根部）の抗体価の推移

### 2. 免疫法の比較

免疫法2群における免疫7週目の抗体価（12匹/群、計6群）の比較を図4に示した。従来法であるコントロールの腹腔群では抗体価は0.442 ± 0.209に対し、乳酸菌含有βグルカン腹腔群では1.088 ± 0.243まで上昇した。また、尾根部群ではコントロールの抗体価は0.721 ± 0.273であったのに対し、乳酸菌含有βグルカン尾根部群では0.804 ± 0.319となった。一方、皮下群のコントロールの抗体価は0.299 ± 0.123であったのに対し乳酸菌含有βグルカン皮下群では0.398 ± 0.175であった。有意水準を5%として、t検定をそれぞれのコントロール群と乳酸菌含有βグルカン群の間で行ったところ、腹腔免疫群で有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）。しかし、皮下（ $p = 0.124$ ）および尾根部（ $p = 0.287$ ）では、それぞれのコントロール群と乳酸菌含有βグルカン群の間で有意差を認めなかった。

### 4. 得られたモノクローナル抗体の性状

得られた抗体産生クローンの性状は、すべてIgG1、κ型であった。

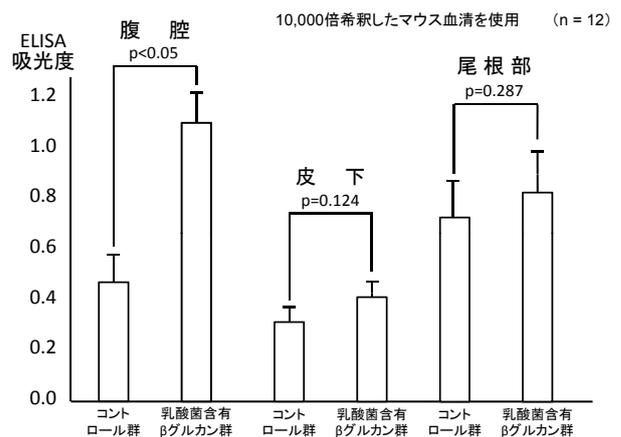


図4 免疫7週目におけるコントロール群、乳酸菌含有βグルカン群の免疫部位別（腹腔、皮下、尾根部）の抗体価の比較

## 考察

臨床検査に使用するモノクローナル抗体は、測定上、高い特異性と親和性を有することが重要である。これらの性質を有する抗体を細胞融合から得るには、まず抗体価の高い免疫動物を得ることが必要であり、中でも一定した免疫法の確立が必須とされる。

これまでに報告された免疫部位としては、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉、尾根部などがあるが、この免疫部位をいくつかあるいは複数部位に免疫するマルチプル法<sup>17, 18)</sup>等も使用されている。さらに、免疫抗原の工夫として、可溶性抗原を担体に結合させることでマクロファージに貪食されやすくしたり、抗原タンパク質を熱変性に

よって免疫原性を高める方法などが知られている<sup>19)</sup>。

使用する動物種にはウサギ, マウス, ラット, ヒツジ, ニワトリなどが使用され, 投与する抗原量や免疫部位, 回数など, 動物種によって異なる。その中で, 免疫期間は効率よく抗体価を上げるための重要な1つであり, 追加免疫は通常2~3週間の間隔を置くことが多い。それは血清中の抗体価が免疫後10~14日後位にピークに達するため, それに合わせて追加免疫を行うことにより抗体価は指数的に増加する<sup>20)</sup>。

しかし, それぞれの用途にあった抗体を得るには免疫部位, 抗原, 動物種, 免疫期間などの組み合わせが多数あり, それぞれの最適な方法を確立することは難しい状況にある。

そこで, これらの問題を解決するために, 抗原投与時に動物の生体内免疫細胞機能を機能性食品で賦活化して抗体産生の向上をみる新たな免疫法の工夫を試みた。

最近, 予防医学的な観点や生体活動を調節する目的で, 機能性食品などの健康食品の利用が普及している。その中で,  $\beta$ グルカンの高い免疫賦活活性が注目され, 医療分野でも応用<sup>21, 22)</sup>されつつある。

そこで, 我々はこの $\beta$ グルカンの免疫賦活作用に注目し, 機能性食品の中の乳酸菌含有 $\beta$ グルカンを用いて, 従来法と併用した。

その結果, 腹腔免疫と乳酸菌含有 $\beta$ グルカンの経口投与の併用は, 従来法や他の免疫部位法に比較し, 免疫7週目から有意に抗体価の上昇を認めた。この理由については,  $\beta$ グルカンが持つ免疫賦活作用としてマクロファージやNK細胞などの自然免疫に関与する細胞の活性化<sup>8)</sup>が考えられている。また,  $\beta$ グルカンは多糖体であり, もともとリンパ球のB細胞の活性化についても報告されている。

さらに, 今回の実験においては, 他の免疫部位に比べて腹腔免疫法が抗体価の早期上昇や高い抗体価を得る結果を示していることから, 経口投与した乳酸菌の関与も大きく影響していることが推測される。今回の実験には記載していないが, 市販のヤクルト(株式会社ヤクルト)を同様に200 $\mu$ lを7週間経口投与した場合で, 今回の結果に比べて及ばないもののコントロール群に比較して上昇する傾向を示したことから乳酸菌の存在はマウスの腸管免疫の活性化に関与していることが推測できる。

以上のことから, モノクローナル抗体作製時に従来法に加えて機能性食品の経口投与を併用することで有用な結果が得られた。このことは, 将来, ワクチンなどの投与時にこの方法を用いることで, 抗体価の早期上昇と抗体価そのものの上昇に寄与できることが示唆された。

## 結 論

従来の免疫法に乳酸菌含有 $\beta$ グルカンの経口投与を併用することで抗体価を有意に上昇させ, クローニングに

メチルセルロース法を用いることで効率的にモノクローナル抗体を得ることができた。

## 文 献

- 1) Köhler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975.
- 2) Yazaki PJ, Sherman MA, Shively JE, Ikle D, et al. Humanization of the anti-CEA T84.66 antibody based on crystal structure data. *Protein Eng Des Sel.* 17(5): 481-489, 2004
- 3) Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43(8): 597-606, 2007
- 4) Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, et al. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol.* 184(11): 6335-6642, 2010
- 5) Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol:* 25-36, 2009
- 6) 大野尚仁. “ $\beta$ グルカンの基礎と応用—感染, 抗がん, ならびに機能性食品への $\beta$ グルカンの関与—”, 株式会社シーエムシー出版, 東京, 154-155, 2010.
- 7) Kimura Y, Sumiyoshi M, Suzuki T, Sakanaka M. Antitumor and antimetastatic activity of a novel water-soluble low molecular weight beta-1, 3-D-glucan (branch beta-1, 6) isolated from *Aureobasidium pullulans* 1A1 strain black yeast. *Anticancer Res* 26(6B): 4131-4141, 2006
- 8) Sumiyoshi M, Suzuki T, Kimura Y. Protective effects of water-soluble low-molecular-weight beta- (1, 3 - 1, 6) d-glucan purified from *Aureobasidium pullulans* GM-NH-1A1 against UFT toxicity in mice. *J Pharm Pharmacol* 61(6): 795-800, 2009
- 9) Oguma K, Agui T, Syuto B, Kimura K, Iida H, et al. Four different monoclonal antibodies against type C1 toxin of *Clostridium botulinum*. *Infect Immun.* 38(1): 14-20, 1982
- 10) Goding JW. Antibody production by hybridomas. *J Immunol Methods* 39:285-308, 1980
- 11) Sharon J, Morrison SL, Kabat EA. Detection of specific hybridoma clones by replica immunoadsorption of their secreted antibodies. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 76: 1420-1424, 1979.
- 12) Teh CZ, Wong E, Lee CY. Generation of monoclonal

- antibodies to human chorionic gonadotropin by a facile cloning procedure. *J Appl Biochem.* 6(1-2): 48-55, 1984
- 13) Davis JM, Pennington JE, Kubler A-M, Conscience JF. A simple, single-step technique for selecting and cloning hybridomas for the production of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 50: 161-171, 1982.
  - 14) Goudie RB, Anderson JR, Gray KG. Non-precipitating antithyroglobulin studied by the Ouchterlony technique. *Immunology*: 309-321, 1959
  - 15) Sado Y, Inoue S, Tomono Y, Omori H. Lymphocytes from enlarged iliac lymph nodes as fusion partners for the production of monoclonal antibodies after a single tail base immunization attempt. *Acta Histochem Cytochem* 39(3): 89-94, 2006
  - 16) Lane RD, Crissman RS, Lachman MF. Comparison of polyethylene glycols as fusogens for producing lymphocyte-myeloma hybrids. *J Immunol Methods.* 72(1):71-76, 1984
  - 17) Kilpatrick KE, Wring SA, Walker DH, Macklin MD, et al. Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS. *Hybridoma.* 16(4): 381-389, 1997
  - 18) Bynum J, Andrews JL, Ellis B, Kull FC Jr, Austin EA, Kilpatrick KE. Development of class-switched, affinity-matured monoclonal antibodies following a 7-day immunization schedule. *Hybridoma.* 18 (5): 407-411, 1999
  - 19) 金光修. “抗体工学入門”地人書館, 東京, 60-62, 1994
  - 20) 金光修. “抗体工学入門”地人書館, 東京, 63-64, 1994
  - 21) Hong F, Hansen RD, Yan J, Allendorf DJ, et al. Beta-glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res* 63(24): 9023-9031, 2003
  - 22) Vetvicka V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World J Clin Oncol.* 2(2):115-119, 2011
- 

## Abstract

Currently, to obtain pure monoclonal antibodies for clinical diagnosis, attempts are being made to study immunization methods using various animals. It is consequently important to obtain highly immunized B cells to create high-titer antibodies. Therefore, we attempted to obtain high-titer antibody by combining foods which have an immunostimulatory function with conventional immunization methods. Such methods combine oral administration of a functional food, known for its immunomodulatory activity, with a conventional immunization method and compare antibody titer in several immunization sites. The methylcellulose method used for cloning is simple to perform and has the advantage of a high-probability of monoclonality. Therefore, we performed cloning with the methylcellulose method using B cells to produce high-titer antibodies. The results revealed a significantly increased antibody titer when combining oral administration of  $\beta$ -glucan and lactic acid bacteria with the conventional immunization method ( $p < 0.05$ ). Taken together, we were able to produce a high-titer monoclonal antibody by combining  $\beta$ -glucan and lactic acid bacteria with the conventional immunization method and subsequently using the methylcellulose method for cloning.

---

受付日 2011年10月14日  
受理日 2012年 1月 6日