

## 学位論文要旨 Dissertation Abstract

氏名： 大福 美帆  
Name

学位論文題目： 魚類内臓の有効活用を目指した機能性評価に関する研究  
Title of Dissertation

学位論文要旨：  
Dissertation Abstract

魚のフィレ加工において排出される内臓や中骨、頭部の多くは、利用されずアラとして廃棄されている。廃棄処分されている魚の内臓に含まれる成分の保健機能を明らかにし、機能性食品として有効活用することができれば、水産資源の有効利用と水産業の効率化に寄与すると期待できる。そこで本研究では、廃棄処分されているアラのうち、ハマチ心臓とマグロ動脈球に着目し、その免疫促進効果を明らかにすることを目的とした。

第2章では、ハマチ心臓の免疫促進活性について評価した。その結果、ハマチ心臓抽出液がヒト型ハイブリドーマ細胞株HB4C5細胞のIgM産生を促進することが明らかになった。続いて、ハマチ心臓加熱抽出液がマウス免疫系に与える影響について検討した。マウスに20日間ハマチ心臓加熱抽出液を経口投与した結果、ハマチ心臓加熱抽出液を投与した群では、血清中の抗体量の増加が認められ、培養細胞に対してだけでなく生体内においても免疫促進活性が確認された。陰イオン交換クロマトグラフィーによりサンプルを分画したところ、33 kDaの主要バンドが観察される画分に免疫促進活性がみられた。そこで、33 kDaのバンドをゲル内消化の後、LC-MS/MSによって解析したところ、ゼブラフィッシュ由来のトロポミオシン4と高い相同性があることが確認された。そこで市販のブタ筋肉由来のトロポミオシンの活性を評価したところ、HB4C5細胞の抗体産生を促進したことから、ハマチ心臓加熱抽出液に含まれる活性物質はトロポミオシンであることが示唆された。

第3章では、マグロ動脈球抽出液の免疫促進活性について評価した。動脈球は心臓とエラをつなぐ器官である。マグロ動脈球抽出液の免疫促進活性を評価したところ、HB4C5細胞のIgM産生を約6.6倍促進した。続いて、マグロ動脈球抽出液の活性物質を特定するため、陰イオン交換クロマトグラフィーで分画した。活性を示した非吸着画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで解析した結果、数本のバンドが確認された。それぞれのタンパク質をLC-MS/MS法で解析したところ、乳酸

脱水素酵素 (LDH)、トリオースリン酸イソメラーゼ、エノラーゼ、ヘモグロビンであると推定された。そこで、これらのタンパク質の HB4C5 細胞に対する活性を検討したところ、いずれにも抗体産生促進活性があることが確認され、LDH、トリオースリン酸イソメラーゼ、エノラーゼ、ヘモグロビンがマグロ動脈球抽出液に含まれる活性物質であることが明らかとなった。また、マウスの脾臓由来リンパ球に対する作用を *in vitro* で検討したところ、LDH は IgA、IgG、IgM 産生を、トリオースリン酸イソメラーゼは IgA、IgG 産生を促進した。特に、LDH は HB4C5 細胞と脾臓由来リンパ球に対して強い抗体産生促進活性を示した。

第4章では、LDH の免疫促進効果についてさらに詳細に検討することとした。LDH のマウス由来リンパ球に対する作用を *in vitro* で検討したところ、LDH は脾臓、腸間膜リンパ節およびパイエル板由来リンパ球の IgA、IgG および IgM 産生を促進した。そこで、生体内における LDH の免疫促進効果を検討するため、BALB/c マウスに LDH を 1.0 mg/kg/day もしくは 5.0 mg/kg/day の条件で2週間経口投与し、その影響について検討した。その結果、5.0 mg/kg/day 投与群において血清中の IgA 量が増加した。また、リンパ球の活性を *ex vivo* 法で評価したところ、1.0 mg/kg/day 投与群において、パイエル板由来リンパ球の IgA および IgM 産生が有意に促進された。また、脾臓由来リンパ球の IgA、IL-4、IL-5、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  産生の有意な促進が 5.0 mg/kg/day 投与群で認められた。LDH の経口投与が生体内でリンパ球の抗体産生およびサイトカイン産生を促進することが明らかとなった。

第5章では、LDH のマクロファージに対する免疫促進効果について検討した。LDH はマウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞の IL-6 および TNF- $\alpha$  産生を濃度依存的に促進し、J774.1 細胞を活性化することが明らかとなった。LDH がマクロファージを活性化する作用機構を明らかにするため、イムノブロット法で転写因子のリン酸化レベルへの影響を検討した。その結果、LDH は MAP キナーゼの一つである JNK のリン酸化を亢進することが確認された。続いて JNK の阻害剤を用いて検証した結果、LDH による IL-6 および TNF- $\alpha$  の産生促進活性が、JNK 阻害剤 SP600125 の作用によって濃度依存的に抑制されることが明らかになった。また、LDH は転写因子 NF- $\kappa$ B の核内移行を亢進することが示唆された。これらのことから、LDH は JNK のリン酸化と NF- $\kappa$ B の核内移行を亢進することにより、J774.1 細胞のサイトカイン産生を増加させていることが示唆された。

以上の研究結果から、ハマチ心臓やマグロ動脈球の魚類の内臓抽出液の免疫促進効果が確認された。これらの検証から、フィレ加工場で廃棄されるアラを免疫促進効果のある機能性素材として活用できることが期待される。未利用資源の有効利用や付加価値付与は地域産業の活性化のための重要な課題であり、今回の研究の結果は未利用資源の新たな活用法の創出につながると期待できる。