

学位論文審査の結果の要旨

氏名	大 福 美 帆
審査委員	主査 菅原 卓也 副査 木村 義雄 副査 山内 聡 副査 小川 雅廣 副査 島村 智子

論文名

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

審査結果の要旨

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。本研究は、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ている。

まず、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効果を示すことが確認された。イオン交換クロマトグラフィーにより、精製および活性物質の同定を試みたところ、活性物質は、トロポミオシン 4 である可能性を見出した。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と推察された。

次に、マグロ動脈球抽出液の免疫促進活性評価に取り組んだ。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結果、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に含まれる活性物質の特定を試みた。その結果、陰イオン交換クロマトグラフィーの非吸着画分に活性物質が含まれ、SDS-PAGE で解析した結果、主要な数本のバンドを確認した。それぞれのタンパク質をトリプシンによるゲル内消化後、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した。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、いずれのタンパク質にも抗体産生促進活性があることを見出した。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、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すことが明らかになった。

そこで、LDHの免疫促進効果に着目し、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。その結果、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産生を促進することが明らかになった。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2週間経口投与し、その影響について検討した。その結果、血清中のIgA量が増加することを見出した。また、リンパ球の活性を *ex vivo* 法で評価したところ、パイエル板リンパ球のIgA、IgM産生および脾臓リンパ球のIgA、IL-4、IL-5、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 産生が、有意に促進された。以上の結果から、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になった。

LDHの免疫促進作用についてさらに詳細に検討するため、マクロファージに対する免疫促進効果の評価した。その結果、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- α 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になった。作用機構を検討した結果、LDHはMAPキナーゼの一つであるJNKのリン酸化と転写因子であるNF- κ Bの核内移行を亢進することで、J774.1細胞のサイトカイン遺伝子の発現を亢進し、産生を増加させていることが明らかになった。

本研究により、ハマチ心臓やマグロ動脈球など、魚類の内臓抽出液に免疫促進効果が有ることを見出した。本研究で得られた成果を応用することによって、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することが期待できる。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に重要な課題であり、本研究の結果は、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。

本論文の公開審査会は、平成30年2月3日に愛媛大学農学部において開催され、申請者による口頭発表と質疑応答が行われた。引き続き、学位審査委員会を開催して論文の内容について慎重に審査した結果、審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。