

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580273

研究課題名(和文) エビ類におけるワクチン効果判定ツールの探索 哺乳類の抗体に代わる指標はあるのか？

研究課題名(英文) Exploring the bio-indicators to evaluate the vaccination efficacy for shrimp "quasi-immunity".

研究代表者

伊丹 利明 (Itami, Toshiaki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00363573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：クルマエビ類のDNAワクチンとリコンビナントワクチンにおける有効性を示す因子として、クラスチン、リゾチームおよびペネイジン等の抗菌ペプチドが有効であることが示された。ワクチンの機能を知る上で重要な多数のサイトカイン様遺伝子を20種類以上も検出・同定した。IL-17遺伝子はクルマエビの幼生の後期に著しく高い発現が認められた。マルチプレックスRT-PCRによる網羅的遺伝子検出では、ウイルス感染において、JAK/STAT経路のSOCS遺伝子の発現が高まる点は重要な発見であり、本遺伝子をノックダウンすることによって新たな感染防御法が示唆された。

研究成果の概要(英文)：After vaccination with DNA vaccine and recombinant vaccine against VP-28 protein of white spot syndrome virus, we found that the anti-bacterial peptide genes, eg. crustine, lysozyme and penaeidine genes, can be used for bio-indicators for "quasi-immunity" in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). Cytokines are known to play important roles in the mechanism for vaccine efficiency in mammals. However, little is known about them in shrimp. We found over 20 cytokine genes in kuruma shrimp. The group IL-17 and related receptor genes were found. During WSSV infection, Dicer 2 and Argonaute 2 genes showed high expression in the early stage of the infection (from 12 hours post infection). This indicates the degradation of the foreign genes by these factors is a defense system in shrimp against virus. However, during the later stage, the SOCS gene was activated and suppressed the JAK/STAT pathway, another anti-virus defense system, resulting in massive growth of virus.

研究分野：魚病

キーワード：クルマエビ ワクチン 生体防御因子 サイトカイン WSSV PRDV ビブリオ

1. 研究開始当初の背景

本課題の対象生物であるクルマエビは自然免疫しか持っていない。しかし、現象としては以下に述べるように、ワクチン投与によって、感染に対して抵抗性を示すことが報告されている。いわゆる『特異免疫様』現象がみられる。

申請者は1989年にクルマエビのピプリオ病に対するワクチンの有効性について初めて明らかにし、さらに、病原ウイルスであるクルマエビ急性ウイルス血症原因ウイルス (penaeid rod-shaped DNA virus: PRDV, 世界的には white spot syndrome virus: WSSV) に対しても DNA ワクチン (特願2007-25589) とリコンビナントワクチン (特許第5649188「クルマエビ科生物の急性ウイルス血症に対するワクチン」) の有効性を明らかにした。これらのいずれのワクチンの有効性評価法も、人為感染試験に依存している。人為感染試験とは、クルマエビにワクチン投与後、当該の病原生物 (*Vibrio penaeicida* あるいは PRDV) を人為的に感染させることである。これによって、ワクチン無投与区との生残率の差異を比較して、有効性を判断している。しかし、人為感染試験では

- 供試クルマエビに近交系がないこと
- ウイルスの病原性が安定しないこと (保存状態による病原遺伝子の部分的脱落)
- 培養細胞がないために正確な感染ウイルス量の決定が困難であること
- 判定に2週間以上を要すること

によって、試験結果が不安定になり、また時間がかかる。

ワクチン投与によって抗体を産生する脊椎動物とは異なり、抗体を産生しないエビでは、指標となる物質が明らかにされていない。

2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえて、ワクチン投与によって抗体等のワクチン効果指標が未解明なクルマエビについて、ワクチン効果の判定を人為感染試験以外の方法、例えば指標となる発現遺伝子の特定や抗体産生等に関連するサイトカイン様物質の検索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試エビ: 平均体重 10~25 g のクルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) を用いた。

(2) DNA ワクチンの作製: 上記 PRDV のエンペロータンパクを構成する VP28 遺伝子を増幅して、ヒト CMV プロモーター (pTARGET Mammalian Expression Vector, Promega) を含む発現ベクターとライゲーションして、常法により pCMV-vp28 を増幅・作製した。

(3) リコンビナントワクチンの作製: 大腸菌と小麦胚芽系の2つを用いた。大腸菌のシステムでは、pQE30 を用いて形質転換、発現誘導を行って、VP28 リコンビナントタンパクを作製し、ワクチンとして用いた。小麦胚芽系では、ENDEXT Wheat Germ Expression H Kit (CellFree Science) を用いて、

wheat-GST-rVP28 タンパクを作製し、ワクチンとして用いた。

(4) サイトカイン系遺伝子の検出: 得られた遺伝子情報から縮重プライマーを作製して、常法により TA クローニングを行い、配列の全長を決定した。

(5) 病原体による攻撃試験: 病原ウイルスとしては、前述の PRDV を用いた。病原細菌としては *Vibrio penaeicida* を用いた。

(6) サイトカイン系遺伝子群のリコンビナントタンパク質の作製: 大腸菌用発現ベクター (pCold 等) のマルチクローニングサイトにサイトカイン遺伝子群の ORF を挿入して発現用プラスミドを作製した。このプラスミドを用いて宿主大腸菌を形質転換した。37 で振とう培養後、培養液を 15 に冷却し、IPTG を添加後、15 で 24 時間振とう培養し、培養終了後、SDS-PAGE で目的産物の有無と発現量を確認した。

(7) マルチプレックス RT-PCR: 網羅的遺伝子検出には、各遺伝子特異プライマーにユニバーサル配列を接続したキメラプライマーを作製し、これを用いて、逆転写反応と目的遺伝子の増幅を行い、CEQ8000 Automated Sequencer (Beckman Coulter) の専用ソフトを用いて、発現量の定量を行った。

4. 研究成果

(1) DNA ワクチン接種後の腸管とリンパ様器官における抗菌ペプチド (クラスチン、リゾチームおよびペネイディン) 遺伝子の動態を図1に示した。図から明らかなように、DNA ワクチン接種後7日目には、腸管とリンパ様器官のいずれにおいてもワクチン投与エビ

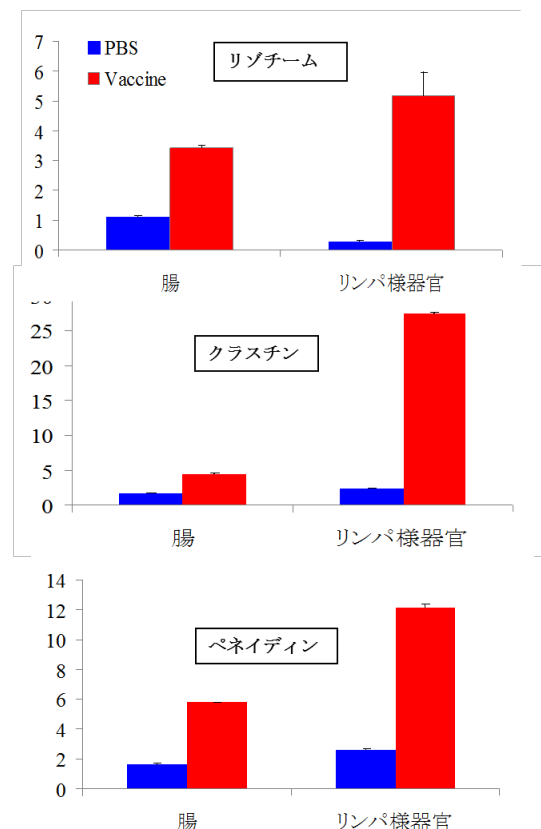


図1. DNA ワクチン接種7日後の腸管とリンパ様器官における各種抗菌ペプチドの発現動態。

の各抗菌ペプチドの発現は上昇した。とくに、リンパ様器官における遺伝子の発現率は腸管に比較すると明らかに高く、本器官がワクチン投与後の免疫様反応に大きく関与していることが明らかとなった。

(2) リコンビナントワクチンを接種後の遺伝子の動態を調べた。その結果、同ワクチン接種したエビの心臓とリンパ様器官において、上記抗菌ペプチドはいずれも発現量が増加した。とくに、リンパ様器官におけるリゾチームの発現量は高く、接種後1日~7日において7~12倍に顕著に増加した。この結果は、DNA ワクチンを接種した時と同様の傾向を示した。以上のことから、DNA ワクチン及びリコンビナントワクチンのいずれにおいても抗菌ペプチド関連遺伝子の発現が上昇することから、これらの遺伝子がワクチン効果判定の候補遺伝子として重要であると考えられた。

(3) サイトカイン遺伝子を検出し、全長解析を行った。表1に示すように、本研究において、クルマエビから23種類のサイトカイン様遺伝子が同定され、ほとんどが甲殻類で

表1.クルマエビから明らかとなったサイトカイン様遺伝子

JAK/STAT経路	Domeless
	Hopscotch
	STAT
	SOCS2A
IL17/IL17Rファミリー	IL17
	IL17B
	IL17R1
	IL17R2
VEGF/VEGFRファミリー (血管内皮細胞増殖因子)	VEGF1, 2, 3, 4
	VEGFR/PDGFR 5種類
MIFファミリー (マクロファージ遊走阻止因子)	MIF
	DDT
TGF-スーパーファミリー (トランスフォーミング増殖因子)	Dpp
	Gbb-60A
	myostatin
アスタカイン	Astakine

初めての検出となった。

表1の VEGF、MIF および DDT については、立体構造解析を行い、前者は2量体、後二者は3量体を形成することが示された。

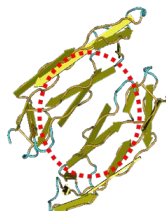


図2.クルマエビVEGF1 2量体の予測立体構造

(4) 病原体感染時におけるサイトカイン様遺伝子群の発現解析を行った。ウイルス感染後のサイトカイン遺伝子群の発現動態について、PRDV 注射後の血リンパおよびリンパ様器

官において、VEGF1 の遺伝子発現が顕著に増加した。Astakine 遺伝子は PRDV 注射後、リンパ様器官においては平常時と比較して顕著に遺伝子の発現が増加したが、血リンパでは顕著な発現の差は認められなかった。

細菌感染後のサイトカイン遺伝子群の発現動態について、*V. penaeicida* 注射後の VEGF1 は、リンパ様器官においては平常時と比較して顕著に遺伝子の発現が増加したが、血リンパでは顕著な発現の差は認められなかった。一方、MIF ファミリーに属する DDT(MIF2) 遺伝子は血リンパにおいては平常時と比較して顕著に発現が増加したが、リンパ様器官では顕著な発現の差は認められなかった。このような結果からクルマエビのサイトカイン遺伝子群がエビ類の生体防衛機構に関与している可能性が示唆された。

(5) クルマエビの幼生期における IL17 受容体の発現解析を行った。クルマエビの幼生期の各ステージ(卵、ノープリウス、ゾエア1令、2令、ミス1令、3令、ポストラバ)における2種類の IL17 受容体(IL17R1、IL17R2)の遺伝子発現を解析した結果、IL-17R1 遺伝子のみがミス3令以降に顕著に増加することが明らかとなった。サイトカインとクルマエビの変態との関連性は極めて興味深く、また、ウイルス病はエビの幼生期には感染しないことから、このような観点からも今後サイトカインの研究を進める必要がある。これは、甲殻類の変態に伴うレセプター発現の変遷とウイルス感染という新たな研究局面を生み出すものと期待される。

(6) 遺伝子ノックダウン時の機能解析を行った。Astakine 遺伝子ノックダウン後72時間と75時間において同一個体から計2回採血を行った結果、血球数の著しい減少が認められた。すなわち、ノックダウンを行っていない対照区のエビの血球は、採血後に造血活動が活性化され、血球数は2.2~3.8倍になったのに対して、ノックダウン区は0.35~0.96倍にしかならなかった。このことから、Astakine 遺伝子はクルマエビの造血機能亢進に重要な因子として関与していることが明らかとなった。

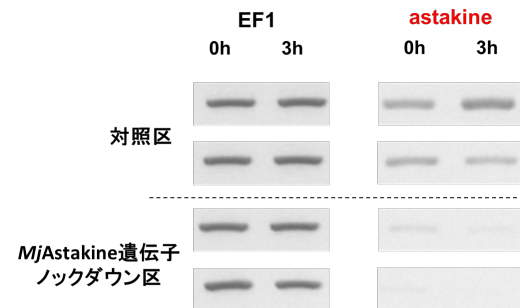


図3.クルマエビAstakine遺伝子ノックダウン

(7) リコンビナントタンパク質の作製と機能解析: MIF ファミリーに属する MIF、DDT を

大腸菌の系を用いて作製した結果、SDS-PAGEによって、可溶性画分において目的とする約14 kDaのバンドが確認された。得られたMIFおよびDDTのリコンビナントタンパク質を精製し、器官培養したリンパ様器官の細胞に添加したが、細胞死や細胞増殖等の変化は認められなかった。

(8) *V. penaeicida* 注射後の各種遺伝子の経時的動態を調査するために、マルチプレックス RT-PCR を用いた網羅的遺伝子検出を行った結果を表2に示した。*V. penaeicida* 注射によって、Toll 遺伝子系、Croquemort や ASK1 などのアポトーシス系およびリゾチームなどの抗菌ペプチド系の遺伝子の発現が増加した(表中の赤色は発現の増加を、青色は発現の低下を表す。色の濃淡は発現の程度を示す。)

表2. マルチプレックス RT-PCR による *V. penaeicida* 接種クルマエビにおける各種遺伝子の経時的変化

<i>Vibrio penaeicida</i> 感染試験	0	6	12	24	48	72	120	144
Toll経路								
Toll	1	0.691	1.668	4.492	4.264	2.790	1.117	0.552
Toll2	1	0.905	0.383	1.160	5.513	5.776	2.781	4.686
Tollip	1	0.112	1.082	1.347	1.305	2.181	2.215	2.386
IMD経路								
IMD	1	0.649	1.189	0.657	0.791	1.089	0.699	1.139
Relish	1	1.438	3.218	1.461	1.865	2.212	3.248	3.221
JAK/STAT経路								
JAK/STAT	1	1.694	2.581	1.691	2.488	3.346	3.517	3.958
経路								
SOCS	1	1.694	1.164	2.563	2.748	1.868	2.540	1.956
Croquemort	1	0.707	0.591	0.645	4.705	5.765	2.435	1.111
アポトーシス系関連								
ASK1	1	0.535	2.486	5.871	4.324	4.377	3.301	0.899
JNK	1	0.621	0.349	0.768	0.666	1.323	0.501	0.406
p38	1	0.746	0.392	1.888	0.729	2.211	0.745	1.390
JAP	1	0.978	0.485	1.324	2.891	3.431	0.563	0.866
Caspase3	1	0.582	1.484	1.421	2.838	2.578	1.542	1.345
Wengen	1	0.610	0.834	0.713	4.275	2.660	1.123	0.539
Dicer1	1	0.115	2.305	2.182	2.189	2.125	2.223	1.171
Dicer2	1	0.351	0.906	0.683	0.467	1.117	1.523	1.649
RNA干渉								
Argo1	1	0.605	1.605	2.355	2.229	1.337	1.060	2.137
Dicer2	1	0.291	0.488	1.406	0.724	0.688	2.036	0.983
Argo2	1	0.398	0.989	1.224	0.633	1.469	0.569	1.191
NOS	1	1.224	1.070	3.004	4.108	2.320	4.458	2.617
フリーラジカル関連								
Nox	1	0.778	0.869	2.565	2.523	1.808	1.152	1.774
Duox	1	2.332	1.281	4.002	3.081	2.073	2.947	0.777
AOX	1	0.898	1.968	2.037	2.007	1.269	1.759	1.544
ALP2	1	1.330	2.772	4.808	3.696	4.218	2.443	3.366
抗菌ペプチド								
Crustin	1	0.617	1.620	1.505	3.551	3.735	4.218	2.784
Lysozyme	1	1.551	1.116	3.983	4.885	5.240	4.540	5.936

次に、PRDV 感染時における各種遺伝子の経時的動態を表3に示す。ウイルス感染においては、ウイルス接種後12時間からDicer2とArgonaute2の遺伝子発現が増加していることが明らかとなった。これは、外来の遺伝子を切断・分解するためと考えられ、ショウジョウバエ等の無脊椎動物さらには哺乳類等の脊椎動物でも共通したウイルス感染に対する防御機能として機能しているものと考えられる。感染後6時間ではJAK/STAT経路の活性化が認められる。しかし、48時間経過すると、本経路に抑制的に作用するSOCS遺伝子の発現が高まり、本経路によるウイルス感染防御を低下させる方向、すなわちウイルス感染が重篤化する方向に進むことが解る。これは、ウイルスの何らかの作用により、SOCS遺伝子の発現が高まり、ウイルスの増殖を促進するためのウイルスの感染戦略と考えられる。したがって、本ウイルスの感染を防止するためには、SOCS遺伝子の発現を抑制するために遺伝子ノックダウン法などが考えられ、今後の新たなウイルス感染防御方法およびワクチンの新たなアジュバントとしても適応可能と思われる。

表3. マルチプレックス RT-PCR による PRDV 接種クルマエビにおける各種遺伝子の経時的変化

PRDV感染試験	0	6	12	24	48	72	120	144
Toll経路								
Toll	1	0.597	1.140	1.615	0.746	1.192	0.971	0.952
Toll2	1	0.948	1.215	1.984	2.694	2.806	1.454	1.664
Tollip	1	1.833	1.315	1.801	1.834	3.339	3.056	1.664
IMD経路								
IMD	1	0.974	0.840	1.199	2.048	2.065	0.955	0.751
Relish	1	1.275	0.761	1.300	1.225	1.790	1.454	0.977
JAK/STAT経路								
STAT	1	3.188	1.627	0.888	0.609	0.515	0.595	0.595
SOCS	1	1.000	2.060	0.988	1.352	3.399	4.512	4.237
Croquemort	1	0.603	0.707	1.753	2.488	1.240	0.619	0.468
アポトーシス系関連								
ASK1	1	0.713	0.458	1.817	1.503	0.524	0.524	0.524
JNK	1	0.959	1.118	0.680	0.959	1.418	1.265	1.174
p38	1	0.973	0.519	1.737	3.405	5.840	5.788	2.862
JAP	1	0.345	0.171	0.546	0.469	0.469	0.469	0.469
Caspase3	1	0.740	0.201	1.138	0.530	0.441	0.441	0.441
Wengen	1	1.619	0.722	0.722	0.404	0.759	1.372	1.372
Argonaute1	1	2.124	1.861	1.813	1.151	0.884	1.452	1.242
Argonaute2	1	1.533	2.682	3.767	4.719	7.400	4.010	6.698
Dicer1	1	1.327	2.774	0.598	1.435	1.558	1.557	1.831
Dicer2	1	2.395	6.592	6.271	6.271	6.271	3.969	0.983
NOS	1	0.918	1.644	2.727	0.367	0.367	0.367	0.528
フリーラジカル関連								
Nox	1	2.256	1.760	5.820	7.488	2.155	1.489	1.125
Duox	1	1.661	1.671	1.190	0.713	0.501	0.477	0.481
AOX	1	1.500	1.634	3.408	1.124	1.333	0.662	0.670
ALP2	1	1.451	1.098	1.247	1.309	1.123	0.948	1.010
抗菌ペプチド								
Crustin	1	2.947	1.285	3.284	2.691	1.788	1.671	1.341
Lysozyme	1	1.458	0.406	0.934	1.097	0.347	0.449	0.456

(9) 総括

本事業において、クルマエビ類のDNAワクチンとリコンビナントワクチンにおける有効性を示す因子として、クラスチン、リゾチームおよびペネイジン等の抗菌ペプチドの遺伝子が有効であることが示された。また、ワクチンの機能を知る上で重要な多数のサイトカイン様遺伝子を20種類以上も検出・同定し、一部の遺伝子の立体構造を明らかにした。IL-17は多機能のサイトカインとして知られているが、今回クルマエビの幼生の後期に同遺伝子の高い発現が認められた。これは今までにはない知見で、クルマエビ類の変態とウイルスに対する易感染性との関連について興味深い知見が得られた。MIFとDDPについては、リコンビナントタンパクを作製したが、その機能は明確ではなかった。これらのタンパクはシステインリッチであることから、リフォールディングが適正になされなかったものと考えられる。リコンビナントサイトカインの評価にはリンパ様器官の器官培養を用いたが、今後は造血器などの幼弱な細胞や血球を用いる必要がある。マルチプレックス RT-PCR による網羅的遺伝子検出では、細菌感染とウイルス感染における各種遺伝子の動態が明らかとなった。とくに、ウイルス感染において、JAK/STAT経路のSOCS遺伝子の発現が高まる点は重要な発見であり、本遺伝子をノックダウンすることによって新たな感染防御法が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)【すべて査読有】

Kono, T., Biswas, G., Fall, J., Mekata, T., Hikima, J., Itami, T., Sakai, M. Adjuvant effects of poly I:C and imiquimod on the immunization of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) with a recombinant protein, VP28 against white spot virus. *Aquaculture*, 446, 236-241, 2015. Doi:10.1016/j.aquaculture.2015.04.033

Mekata, T., Satoh, J., Inada, M., Dinesh S., Harsha P., Itami, T. Sudhakaran, R. Development of simple, rapid and sensitive detection assay for grouper nervous necrosis

virus using real-time loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Fish Diseases* DOI: 10.1111/jfd.12297

Maeda, M., Shibata, A., Biswas, G., Korenaga H., Kono, T., Itami, T., Sakai, M. Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. *Marine Biotechnology*, 16, 181-192, 2014. DOI: 10.1007/s10126-013-9532-1

Inada, M. Kihara, K. Kono, T. Sudhakaran, R. Mekata, T. Sakai, M. Yoshida, T. Itami, T. Deciphering of the Dual oxidase (Nox family) gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*: full-length cDNA cloning and characterization. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 471-485, 2013. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.11.026

Okugawa, S. Mekata, T. Inada, M. Kihara, K. Shiki, A. Kannabiran, K. Kono, T. Sakai, M. Yoshida, T. Itami, T. Sudhakaran, R. The SOCS and STAT from JAK/STAT signaling pathway of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Molecular cloning, characterization and expression analysis. *Molecular and Cellular Probes*, 27, 6-14, 2013. DOI: 10.1016/j.mcp.2012.08.003

Nishiki, I., Minami, T., Chen, S.-C., Itami, T., Yoshida, T. Expression of the serum opacity factor gene and the variation in its upstream region in *Streptococcus dysgalactiae* isolates from fish. *Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 457-463, 2013. DOI: 10.2323/jgam.58.457

Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kono, T., Shimokawa, H., Itami, T., Sakai, M. Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 366-367, 40-45, 2012. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.09.001

Inada M., Sudhakaran R., Kihara K., Nishi J., Yoshimine M., Mekata T., Kono T., Sakai M., Yoshida T., Itami T. Molecular cloning and characterization of the NADPH oxidase from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Early gene up-regulation after *Vibrio penaeicida* and poly(I:C) stimulations in vitro. *Molecular and Cellular Probes*, 26, 29-41, 2012. DOI: 10.1016/j.mcp.2011.11.002

〔学会発表〕(計 38 件)

伊丹 利明 「エビ類の感染症と生体防御に関する研究」 『平成 26 年度日本魚病学会春季大会学会賞受賞記念講演 (招待講演)』平成 27 年 3 月 8 日 東京

酒井正博、堀内美咲、児玉ひろの、引間順一、河野智哉、稲田真理、伊丹利明 「クルマエビにおける低溶存酸素刺激に対するストレス応答遺伝子の発現動態」, 『平成 27 年

度 日本魚病学会春季大会』、東京都、(平成 27 年 3 月 7 ~ 8 日)

Inada, M. Yui, T. Sakai, M. Itami, T. 「MIF family, Cytokine Homologue Genes, in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*」 『The 13th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology』 Murcia, Spain, (平成 27 年 6 月 28 日 ~ 7 月 3 日)

Inada, M. Yui, T. Sakai, M. Itami, T. 「Cytokine Homologue Genes, VEGF, MIF and Astakine, in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Simulation of 3D structure, Gene Expression Analysis during WSSV Infection and Gene Knockdown」 『9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture』 Ho Chi Minh City, Vietnam, (平成 26 年 11 月 23~28 日)

Inada, M. Yui, T. Sakai, M. Itami, T. 「Characterization of Cytokine Homologue Genes, VEGF, MIF and Astakine, in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*」 『7th International Symposium on Aquatic Animal Health』 Oregon, USA, (平成 26 年 8 月 30 日 ~ 9 月 4 日)

Inada, M. Shigeyoshi, D. Sakai, M. Itami, T. 「Xanthine Dehydrogenase from ROS Generation Enzyme Genes in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Gene Expression Analysis during Infection with *Vibrio penaeicida* or WSSV」 『10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference』 Taipei, Taiwan, (平成 26 年 5 月 1 日 ~ 6 日)

Inada, M. Yui, T. Sakai, M. Itami, T. 「Novel cytokine genes from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: MIF and VEGF are important in the innate immunity」 『First International Conference of Fish and Shellfish Immunology』 Vigo, Spain, (平成 25 年 6 月 24~30 日)

Inada, M. Shigeyoshi, D. Kono, T., Sakai, M. Itami, T. 「Identification, gene expression during infection of pathogen and knockdown of free radical generation enzymes in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*」 『17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International』 Kyoto, (平成 26 年 3 月 27~28 日)

Inada, M. Shigeyoshi, D. Kono, T., Sakai, M. Itami, T. 「Molecular cloning, expression analyses and knockdown of NADPH oxidase, MjNOX, in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*」 『AQUA2012 Global Aquaculture: Securing and Future』 Praha, Czech, (平成 24 年 9 月 15 ~ 22 日)

Inada, M. Shigeyoshi, D. Mekata, T., Kono, T., Sudhakaran, R., Sakai, M. Itami, T. 「Molecular cloning and expression analyses and knockdown of free radical generation enzymes in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*」 『12th Congress of the International Society of Development and Comparative Immunology』

Fukuoka, Japan (平成 24 年 7 月 10 日 ~ 13 日)

〔図書〕(計 1 件)

伊丹 利明 「甲殻類のウイルス病と診断法」『魚介類の微生物感染症の治療と予防(青木 宙編)』恒星社厚生閣、137-166、481pp、2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：マルチプレックス遺伝子解析によるエビ類の健康診断

発明者：伊丹利明、木原啓輔、稲田真理、酒井正博、河野智哉

権利者：宮崎大学

種類：特許

番号：特願 2013-014265

出願年月日：2013 年 1 月 29 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

受賞：

伊丹利明 平成 25 年度宮崎銀行ふるさと振興助成事業 学術研究部門 「クルマエビ類生産チャレンジプログラム-宮崎発！健康・優良エビ種苗の生産-」平成 26 年 1 月 27 日 みやぎん経済研究所

伊丹利明 平成 26 年度魚病学会賞「エビ類の感染症と生体防御に関する研究」平成 27 年 3 月 8 日 日本魚病学会
<http://www.miyazaki-u.ac.jp/topics/20150307-4>

Toshiaki ITAMI プリンソオブソククラ大学(タイ王国)名誉博士号 2014 年 7 月 5 日
<http://www.miyazaki-u.ac.jp/topics/20140904-2>

ホームページ：

<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~fishery/staff/staff07/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊丹 利明 (ITAMI, Toshiaki)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00363573

(2)研究分担者

酒井 正博 (SAKAI, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20178536