

流行性造血器壊死症

EHN : Epizootic haematopoietic necrosis

1. 疫学

(1) 病名と病原体

① 病名：流行性造血器壊死症

英名：Epizootic haematopoietic necrosis (EHN)

② 病原体：イリドウイルス科、ラナウイルス属に属する EHNV。遺伝学的、血清学的に EHNV と類似するラナウイルス属のウイルスは世界各地の魚類・両生類・爬虫類に多数存在する。

(2) 発生地域

現在のところ、オーストラリア本土に限定されている。

(3) 宿主域

自然発病魚：レッドフィンパーチ (*Perca fluviatilis*)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)

実験感染魚：

浸漬感染により発病するもの：レッドフィンパーチ、ニジマスのほか、マコウリーパーチ (*Macquaria australasia*)、シルバーパーチ (*Bidyanus bidyanus*)、カダヤシ (*Gambusia affinis*)、マウンテンギャラキシアス (*Galaxias olidus*)

腹腔内注射により発病するもの：実験が行われていないカダヤシを除く上記の魚種のほか、ミューレーコッド (*Maccullochella peeli*)、ゴールデンパーチ (*Macquaria ambigua*)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*)

(4) 発生の特徴

レッドフィンパーチでは成魚稚魚ともに重篤に感染し、しばしば致命的であるが、幼魚の方がより重篤である。ニジマス (写真1) では、症状はレッドフィンパーチに比べ軽症であり、集団の一部しか感染しない。自然発病は 11~17℃ であるが、レッドフィンパーチでは 12℃ 以下での発病はみられない。

EHN はオーストラリア本土に限定されているので、発病した場合その種苗の生産施設がオーストラリア本土

であるか、またはそこを経由して入った可能性が高い。オーストラリア経由ではない輸入種苗の場合であっても、過去にオーストラリア経由の別の種苗との接触があった可能性も考えられる。



写真1 EHNに感染したニジマス稚魚。

(5) 外観症状

本疾病に特徴的な外観症状は乏しく、死亡して初めて発見される。瀕死魚は平衡感覚を失い、鰓蓋を開けて体色は黒化することが多い。過密や水質悪化など悪い養殖環境で飼育されたと見られる形跡が、体表、鰭、鰓などに認められることが多い。

レッドフィンパーチ

運動失調は成魚・稚魚ともに認められる。病魚は呼吸が緩慢となり、しばしば水面で無気力に浮遊し、時には旋回上昇や稚魚では頭を底につけて倒立遊泳を行うこともある。成魚では脳および外鼻孔周囲の発赤が顕著であるが、稚魚では必ずしもその症状は認められない。稚魚ではしばしば尾柄部筋肉に点状もしくは尾柄部全体にわたる白化が認められる。鰭、特に臀鰭基底部の点状出血や鰓の鬱血も認められる。成魚では肛門の発赤やカビの感染による皮膚の潰瘍が認められ

ることもある。

ニジマス

0⁺ 魚、1⁺ 魚ともに運動失調、体色の黒化、食欲低下が認められ、躯幹後半部の皮膚に、境界の明瞭な深い潰瘍が認められることもある。0⁺ 魚では軽度の腹部膨満や肛門突出がみられる。

(6) 剖検所見

レッドフィンパーチ

成魚では肝臓に直径 1~3mm の白点または黄点が多くみられる（写真 2）が、稚魚の白化した肝臓では認めにくい。脾臓は明赤色化して腫大し、稚魚ではゼラチン状化している。腎臓および鰓周囲の腹膜下の充血が顕著である。腹水の貯留もみられる。

ニジマス

腎臓の腫大と臓器表面の隆起性病変、脾臓の腫大と褪色が認められる。

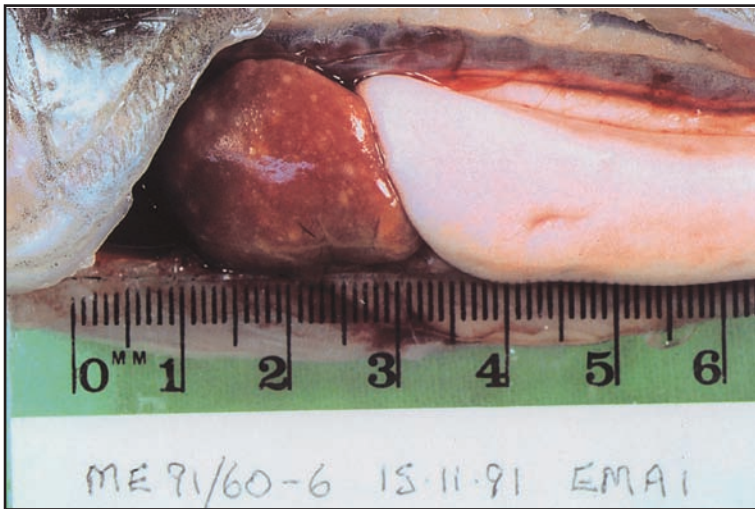


写真 2 感染実験により EHN に罹患したレッドフィンパーチ。肝臓に 1~3mm の白点が多数見られる。

(7) 病理組織学的所見

レッドフィンパーチ

腎臓全体の造血組織に壊死がみられ、特に前腎の壊死病巣が顕著である。肝臓の血管に多数の壊死病巣が認められる。病状の進行した部位では血管壁の損傷が認められる。重篤な場合には、広範な壊死巣が肝臓全体にみられる。脾臓は本症に特異的な壊死病巣を示すものから、赤髄、白髄部の消失といった広範な壊死を示すものまでである。脳および外鼻孔周囲の発赤がみられる病魚では、髄膜血管の鬱血が顕著であり、髄膜上の出血にいたる場合もある。

ニジマス

腎臓造血組織に壊死が認められる（写真 3）。肝臓の血管系を中心にあるいはそれに沿って肝細胞の壊死病巣が認められる。一部の肝細胞には、好塩基性の封入体が認められる（写真 4）。脾臓の赤髄、白髄部、胃腸上皮にも多数の壊死病巣が認められる。

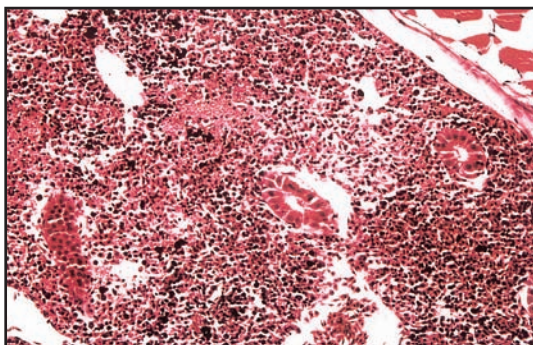


写真 3 ニジマス自然発病魚の腎臓病理組織像。腎臓造血組織の広範囲の壊死が観察される。

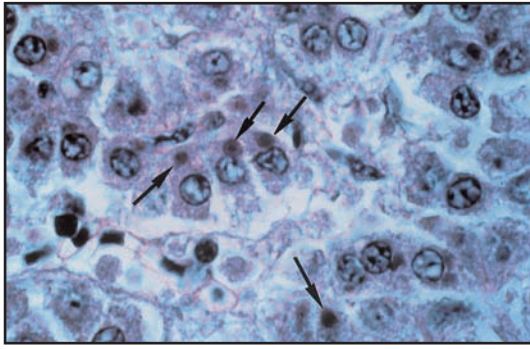


写真4 ニジマス自然発病魚の肝臓病理組織像。肝細胞の壊死および細胞質内封入体(矢印)が観察される。

(8) 消毒

オートクレーブによる滅菌、塩素消毒等、一般的なウイルスの消毒法に準ずる。

(9) 防除法

一般的なウイルスの防除法に準ずる。

2. 試料採取法

(1) 被検魚の収集

- ① 少なくとも10尾の瀕死魚または当該疾病の外観症状を示す生魚を採取する。被検魚の収集から採材まではできるだけ速やかに行うことが望ましいので、現場で臓器試料を採取する。
- ② 被検魚を検査機関に搬入する場合は、生きたままビニール袋などに入れて酸素パッキングし、水温変動に注意して搬送するか、被検魚を発生現場で即殺後、個体ごとに無菌の密閉可能な容器に包装し、氷冷または冷蔵状態で48時間以内に搬送する。搬送の際に、被験魚が凍結することのないように注意する。
- ③ 被検魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮なものを採取し、個体ごとにビニール袋などで密閉包装し、氷冷または冷蔵状態で搬送する。臓器試料または被検魚には採取場所および日時を明記したラベルを添付する。

(2) 外観症状および剖検所見の記載

- ① 0.5% MS222 (Tricaine; 3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate) などの麻酔剤で麻酔、または大型魚では撲殺する。
- ② 外観症状を記載する(1-(5) 外観症状の項参照)。
- ③ 魚体表面を70%アルコール綿またはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミ、ピンセットなどで解剖する。
- ④ 内臓の異常を調べ、剖検所見を記載の上、検査に必要な部位を採取する(1-(6) 剖検所見の項参照)。

(3) ウイルス検査のための臓器試料の採材

- ① 明らかに病徴を呈している魚
 - (a) 全長4cm以下の仔魚
魚全体を試料とする。体表を消毒後、卵黄嚢がある場合は除去する。
 - (b) 全長4cm~6cmの魚
腎臓を含む内臓全体を試料とする。
 - (c) 全長6cm以上の魚
腎臓、脾臓および脳を試料とする。
- ② 病徴の見られない魚(不顕性感染が疑われる魚)

(a) 未成熟魚
腎臓、脾臓および脳を試料とする。

(b) 成熟親魚
上記臓器の他に卵巣腔液*¹を試料とする。

* 1 卵巣腔液は、必ず開腹前に滅菌したピペットなどで泌尿生殖孔より採取し、他の組織試料とは別の容器に入れる。サンプル量は5尾を1検体とし、合計で約1mL以内とする。

③ 試料の採取

(a) 検査魚から滅菌したハサミ、ピンセットなどを用いて臓器試料を採取する（卵巣腔液は2-(3)の* 1参照）。

(b) 腎臓、脾臓および肝臓は混合して各最大5尾分を1検体としてプールする。採材量は1検体分で約1g以下とする。

(c) 試料は計量の後、予め輸送液*²（試料の5~10倍量）を入れた滅菌チューブに入れる。

* 2 輸送液：抗生物質添加イーグル最少必須培地（MEM）。抗生物質はゲンタマイシン 1000 μg/mLまたはペニシリン800IU/mLとジヒドロストレプトマイシン800μg/mLの併用が適当。合成抗真菌剤のマイコスタチンまたはファンギゾン 400IU/mLを加えてもよい。輸送時間が12時間を越えるようなら、ウイルスを安定化するために血清か卵白を5~10%加えてもよい。

④ 試料の輸送

(a) 臓器試料の入った容器は互いに接触しないように個々にビニール袋で包装し、検査機関まで0~4℃に保ちながら搬送する。その際に試料が凍結しないよう注意する。

(b) 臓器試料のウイルス検査は、採取後できるだけ速やかに行う。やむを得ず遅くなる場合でも48時間以内に行う。

(c) 魚体ごと検査機関まで搬送された場合は、到着後直ちに③からの作業を行う。

⑤ 試料等の処理

検査試料および解剖器具などは病原体による汚染・伝播を防ぐために以下の処置を施す必要がある。被検魚、臓器試料の残りは焼却処分、輸送用コンテナおよび水は次亜塩素酸ソーダなどで消毒する。解剖器具、微生物培養器具（以下同様）は再使用、廃棄の前にオートクレーブによる滅菌を行う。

3. 診断手順

(1) ウイルス検査のためのサンプル調製

① 臓器試料のホモジナイズ

(a) 操作は氷冷下（0~4℃）で行うことが望ましい。

(b) 臓器試料が予め抗生物質処理されていない場合は、試料を抗生物質を添加した培地に再懸濁し、15℃、2~4時間、または4℃で一晩放置する。

(c) 試料容器を傾けて抗生物質添加培地を捨てる。

(d) プールされた臓器を乳鉢または電気ミキサーでホモジナイズして、ペースト状にし、これを輸送液に再懸濁して最終的には1：10のホモジネート液とする。

② 接種試料の調製

(a) 希釈ホモジネート液を冷却遠心機で4℃、2,000g、15分間遠心分離し、上清を回収する。

(b) 抗生物質処理されていない臓器試料は、上清を15℃で2~4時間、または4℃で1晩放置して、抗生物質を作用させる。

- (c) 試料の採取から 48 時間以内に細胞に接種できない場合は、臓器試料はそのまま -80℃に凍結保存し、後日ウイルス検査を行う。

(2) ウイルス検査

① 培養細胞への接種

- (a) 予め BF-2 細胞^{*3}を細胞培養液^{*4}で 20℃で 24 ウェル細胞培養プレート（ファルコン、メンク、コースター社製のいずれでも可）に培養しておく（希釈ホモジネート液を接種する細胞は、分散後 24 時間程度経過したものをを用いる）。

* 3 BF-2 細胞：ブルーギル稚魚尾柄由来繊維芽細胞

* 4 細胞培養液：10%の牛胎児血清（FCS）を添加したイーグル最少必須培地（MEM）に抗生物質（ペニシリン 100IU/mL、ジヒドロストレプトマイシン 100 μg/mL）を添加したもの。真菌の汚染を防ぐため抗真菌剤（マイコスタチン 50IU/mL）を加えてもよい。培養液は重炭酸ナトリウムや 0.16M tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) HCl で緩衝する。0.2M N-2-hydroxyethylpiperazine N-2-ethanesulfonic acid (HEPES) はさらによい。密閉した培養フラスコで培養する場合は重炭酸ナトリウムを単独で用いてもよいが、細胞培養用プレートにはトリスまたはヘベス緩衝液を用いる。pH は細胞培養用には 7.3~7.4、ウイルス検査用には 7.6 に合わせる。

- (b) ホモジネート上清（1:10）の 10 倍希釈系列を 3 列作り、上清（1:10）、各段階希釈液（1:100、1:1000、1:10000）および陰性対照培養液の適当量を予め培養液を除去した細胞単層に接種する。少なくとも 2cm² の細胞単層に 100 μL 接種する（図 1）。

- (c) 10~15℃で 0.5~1 時間吸着させた後、接種液はそのままにして FCS を 2% 添加したウイルス検査用の細胞培養液（pH7.6）を 24 ウェル細胞培養プレートに 1mL/ウェルずつ加える。

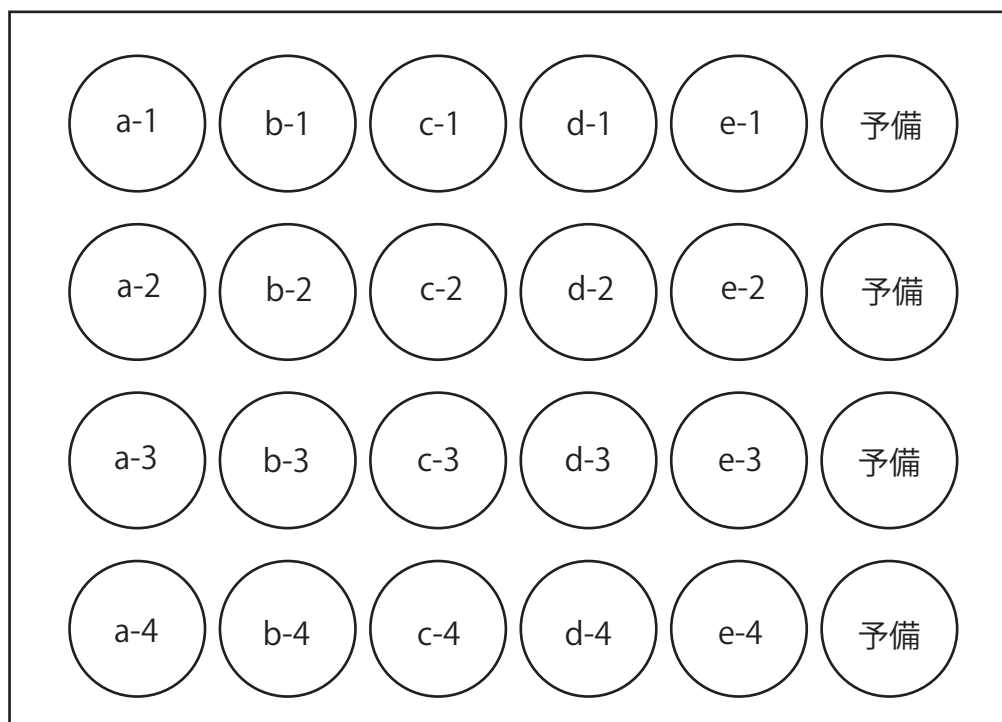


図 1 ウイルス検査試料の細胞培養プレートへの接種

20 尾のサンプルの場合 (1 ウェル当たり 5 尾分)

a-1~a-4: 陰性対象 (接種陰性対象 100 μL+ 細胞培養液 1mL)

b-1~b-4: 10 倍希釈液 (接種試料 100 μL+ 細胞培養液 1mL)

c-1~c-4: 100 倍希釈液 (接種試料 100 μL+ 細胞培養液 1mL)

d-1~d-4: 1000 倍希釈液 (接種試料 100 μL+ 細胞培養液 1mL)

e-1~e-4: 10000 倍希釈液 (接種試料 100 μL+ 細胞培養液 1mL)

② 培養および観察

- (a) ウイルス検査試料を接種した培養細胞は、22℃のインキュベーターで14日間培養し、毎日顕微鏡観察する。顕微鏡は位相差顕微鏡を推奨する。
- (b) 培養期間中は培養液のpHを7.3~7.6に維持する。
- (c) 接種した培養細胞に細胞変性効果(CPE) (写真6) が現れたら、直ちに下記の手順に従ってウイルスの同定に着手する。

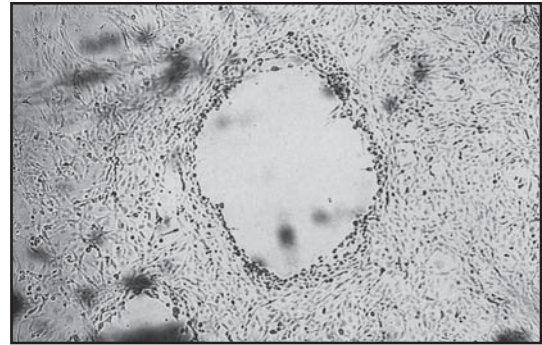


写真6 EHNV感染BF-2細胞。細胞の崩壊によるCPEが見られる。

- (d) 14日後においてもCPEが発現しなければ、以下のようにさらに新たな培養細胞に試料を継代して培養を行う。

③ 継代培養

- (a) ホモジネート上清希釈液を接種したすべてのウェルから細胞培養液を集める。
- (b) 4℃で15分間、2000gで遠心分離後、上清を回収する。
- (c) 前述したようにBF-2細胞単層に接種して培養し、7日間観察する。
- (d) CPEが現れなければ、ウイルス検査は陰性とする。

(3) ウイルスの同定

① PCRとPCR産物の制限酵素断片長解析(REA)を組合わせた方法(一次診断用)

- (a) 分離ウイルスの培養上清をテンプレートする方法が望ましいが、分離に時間がかかることから、病魚臓器から抽出したDNAをテンプレートとして直接PCRを行ってもよい。ただし、この結果が陰性の場合には必ずウイルス分離を行わなくてはならないので、ウイルス分離の際に同時に臓器からのPCR用のDNA調製を行うことを推奨する。
- (b) 培養上清から行う場合は、ウイルス分離に用いたプレートからCPEが発現しているウェルを選び、培養液を集め、低速遠心分離を行って上清を回収する。
- (c) PCR試料とするウイルス培養上清は、50倍の水に希釈して5分間煮沸し、よく攪拌した後、氷水中に保存してテンプレートとする(市販のDNA抽出キットを用いるとなおよい)。
- (d) 陰性対照として、健康魚の臓器DNA(臓器から直接行う場合)またはウイルス接種していないBF-2細胞培養上清からのテンプレートを調製する。陽性対照には、不活化ウイルスもしくは断片の挿入されたプラスミドやこれら陽性対照から一度増幅したDNAを用いる。比較対象としてESV、FV3等のラナウイルスのテンプレートがあるとなおよいが、なくても使用する制限酵素断片の認識サイトを含むDNA断片があればよい(制限酵素が失活していないことの確認のため)。
- (e) フォワードプライマーとしてM151: 5'-AAC CCG GCT TTC GGG CAG CA- 3'、リバープライマーとしてM152: 5'-CGG GGC GGG GTT GAT GAG AT- 3'を用いる(これらは業者から購入する)。
- (f) 調製したテンプレート試料およびその10-100倍希釈系列5μLを、PCR用チューブ中で、0.1μM各プライマー、2units Taqポリメラーゼ、2.5mM MgCl₂を含むTaqポリメラーゼバッファーに溶かす。反応系は50μLとする(OIEでは終濃度でBSA fraction V 1.65mg/mL, 硫酸アンモニウム 16.6mg/mL, Tris 66.6mM, β-メルカプトエタノール 10mMを含むバッファー組成を推奨しているが、この過程はポリメラーゼの試薬メーカーの指示に従えばよい)。
- (g) チューブは最初94℃・30秒間、続いて94℃・30秒間、50℃・30秒間、72℃・60秒間

を 35 サイクル、最後に 72℃・15 分間 (+ 4℃保存) をプログラムしたサーマルサイクラーにかけ、PCR 反応を行う。

- (h) 反応を終了したチューブから試料を数 μ L とり、1/5 量のゲルローディングバッファー (50% グリセロール、0.25% ブロモフェノールブルー、0.25% キシレンシア ノール、1mM EDTA、pH8.0) と混合した後、100bp ラダーなど適当な分子量マーカールとともに、1.5~2% のアガロースゲル (泳動バッファーで溶かす) にアプライし、TAE バッファー (0.4M Tris、0.4M 氷酢酸、0.01M EDTA、pH8.0)、または TBE バッファー (0.89M Tris、0.89M ホウ酸、0.01M EDTA、pH8.0) を用いて 50~100 V 程度の電圧で電気泳動する。TBE バッファーの場合 2 倍に希釈したものをを用いてもよい。
 - (i) 色素が十分泳動されたら、ゲルをエチジウムブロマイド染色 (バッファー 1mL あたり 10mg/mL のエチジウムブロマイド溶液を 100 μ L 加える) し、トランスイルミネーターの紫外線下で観察する。ゲル作製時に予め同濃度のエチジウムブロマイドを加えておくと染色の手間が省ける。エチジウムブロマイドは発ガン性物質であるため、染色したゲルの取り扱いには手袋を着用する。また紫外線は目を痛めるので観察には保護眼鏡を着用する。
 - (j) 陰性対照にはバンドが認められず、陽性対照および比較対照には 321bp の増幅された MCP-1 領域の DNA のバンドが認められることを確認し、試料にこれらの対照と同様のバンドが認められれば、次の制限酵素消化のステップに移る。
 - (k) PCR 産物を制限酵素 *Pvu*I (NEB 社など) で消化する。方法は制限酵素のメーカーの指示に従う。1~4 μ L の PCR 産物に、2U の酵素、1.6 μ L のバッファー、1.6 μ L の濃度 100 μ g/mL のウシ血清アルブミン、最終容量 16 μ L になるように滅菌精製水を加えて、推奨温度で 2~4 時間反応させる。
 - (l) 制限酵素消化した PCR 産物を 3%ゲルで泳動し、比較対照が切断され、陽性対照および試料が切断されないことを確認し、一次診断陽性とする。なお、EHNV のほかに同じオーストラリアのラナウイルス BIV もこの酵素では切断されないため、EHNV であるか否かは確定診断の結果を待つことになる。制限酵素切断断片長については表 1 を参照。
- ② PCR と PCR 産物の制限酵素断片長解析 (REA) を組合わせた方法 (確定診断用)
- (a) フォワードプライマーとして M153: 5'-ATG ACC GTC GCC CTC ATC AC- 3'、リバープライマーとして M154: 5'-CCA TCG AGC CGT TCA TGA TG- 3'を用いる他は一次診断用と同じである。
 - (b) 陰性対照にはバンドが認められず、陽性対照および比較対照には 625bp の増幅された MCP-2 領域の DNA のバンドが認められることを確認し、試料にこれらの対照と同様のバンドが認められれば、次の制限酵素消化のステップに移る。
 - (c) PCR 産物を制限酵素 *Hinc* II, *Acc* I, *Fnu*4H I (NEB 社など) でそれぞれ消化する。方法は制限酵素のメーカーの指示に従う。
 - (d) 制限酵素消化した PCR 産物を 3%ゲルで泳動し、比較対照、陽性対照の切断パターンを表 1 と比較し、試料の切断パターンが陽性対照と一致することを確認する。制限酵素切断断片長については表 1 を参照。
- ③ PCR と PCR 産物の塩基配列の決定による方法 (確定診断用)
- (a) フォワードプライマーとして、Forward 5'-CGC AGT CAA GGC CTT GAT GT- 3'、リバープライマーとして、Reverse 5'-AAA GAC CCG TTT GCA GCA GCA AAC- 3'を用いる。
 - (b) 調製したテンプレート試料 1 μ L を、PCR 用チューブ中で、0.1 μ M 各プライマー、2.5 units Taq ポリメラーゼ、2.5mM MgCl₂ を含む Taq ポリメラーゼバッファーに溶かす (この過

程はポリメラーゼの試薬メーカーの指示に従う)。

- (c) チューブは (最初 94℃・30 秒間、続いて) 95℃・60 秒間、55℃・60 秒間、72℃・60 秒間を 35 サイクル、最後に 72℃・15 分間 (+ 4℃保存) をプログラムしたサーマルサイクラーにかけ、PCR 反応を行う。
- (d) 同様に 1~1.5%ゲルで PCR 産物を泳動し、陰性対照にはバンドが認められず、陽性対照には 580bp の増幅された DNA のバンドが認められることを確認し、試料に陽性対照と同様のバンドが認められれば、次の塩基配列の決定・比較のステップに移る。
- (e) 塩基配列の決定は、PCR 産物のダイレクトシーケンスまたは複数クローン (最低 3) 以上の PCR 産物をクローニングした大腸菌プラスミドのシーケンスにより得られたコンセンサス配列を得ることによる。この配列をジーンバンクに登録されている EHNV MCP 遺伝子 (Accession No. AY187045) と比較し、該当領域の配列が EHNV と一致していることを確認する (インターネットのホモロジー解析サイトを用いて、得られた配列を BLASTN 解析にかければ比較してくれる)。

表 1 各種ラナウイルスの PCR 産物の制限酵素切断断片パターン

PCR 産物	制限酵素	予想断片長 (bp)	切断パターンの一致するウイルス
MCP-1(321bp)	<i>Pf</i> M I	321,	EHNV, BIV
		131, 190	FV3, ESV, ECV, WV, GV
MCP-2(625bp)	<i>Hinc</i> II	100, 138, 387	EHNV
		100, 525	BIV, FV3, ESV, ECV, GV
		100, 240, 285	WV
	<i>Acc</i> I	238, 387	EHNV
		625, 164, 461	BIV, ESV, ECV, WV, FV3, GV
	<i>Fnu</i> 4H I	33, 38, 44, 239, 271	EHNV
		3, 33, 38, 44, 108, 399	BIV
		3, 38, 44, 108, 432	FV3, GV
3, 9, 44, 108, 151, 272		ESV, ECV	
		3, 44, 71, 108, 399	WV

BIV: Bole iridovirus, ESV: European sheatfish iridovirus, ECV: European catfish iridovirus, FV3: Frog virus, WV: Wamena virus, GV: Gutapo virus

4. 参考文献

- Ahne, W., H. J. Schlotfeldt and I. Thomsen (1989) : Fish viruses : Isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). J. Vet. Med. [B] , 36, 333-336.
- Ahne, W., M. Bearzotti, M. Bremont and S. Essbauer (1998) : Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. J. Vet. Med. [B], 45, 373-383.
- Ahne, W., M. Ogawa and H. J. Schlotfeldt (1990) : Fish viruses : transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish *Silurus glanis*. J. Vet. Med. [B],

- Ariel, E., H. Tapiovaara and N.J.Olesen (1999) : Comparison of pikeperch (*Stizostedion lucioperca*), cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) iridovirus isolates with reference to other piscine and amphibian iridovirus isolates. European Association of Fish Pathologists, VIII. International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Rhodes, Greece, 20-24, September.
- Aubertin, A. M. (1991) : Family Iridoviridae. In : Classification and Nomenclature of Viruses, Francki R.J., C. M. Fauque, D. L. Knudson and F. Brown, eds. Arch. Virol. (Suppl. 2), pp.132-136. Springer, NewYork, USA, and Vienna, Austria.
- Bloch, B. and J. L. Larsen (1993) : An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. Dis. Aquat. Org., 15, 235-240.
- Cannon, R. M. and R. T. Roe (1982) : Livestock Disease Surveys : A Field Manual for Veterinarians. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Chinchar, G., S. Essbauer, J. G. He, A. Hyatt, T. Miyazaki, V. Seligy and T. Williams (2005) : Family Iridoviridae. In : Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U. and Ball L. A., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145-161.
- Chinchar, V. G. (2002) : Ranaviruses (family Iridoviridae) : emerging cold-blooded killers-brief review. Arch. Virol., 147, 447-470.
- Crane, M. S. J., J. Young and L. Williams (2005) : Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) : growth in fish cell lines at different temperatures. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 25, 228-231.
- Drury, S. E. N., R. E. Gough and A. A. Cunningham (1995) : Isolation of an iridovirus-like agent from common frogs (*Rana temporaria*). Vet. Rec., 137, 72-73.
- Eaton, B. T., A. D. Hyatt and S. Hengstberger (1991) : Epizootic haematopoietic necrosis virus : purification and classification. J. Fish Dis., 14, 157-169.
- Fijan, N., Z. Matasin, Z. Petrinc, I. Valpotic and L. O. Zwillenberg (1991) : Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). Veterinarski Arhiv, 61, 151-158.
- Fijan, N., D. Sulimanovic, M. Bearzotti, D. Muzinic, L. Zwillenberg, S. Chilmonczyk, J. Vautherot and P. De Kinkelin (1983) : Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). Ann. Virol. Institut Pasteur, 134E.
- Gould, A. R., A. D. Hyatt, S. H. Hengstberger, R. J. Whittington and B. E. H. Coupar (1995) : A polymerase chain reaction (PCR) to detect epizootic haematopoietic necrosis virus and Bohle iridovirus. Dis. Aquat. Org., 22, 211-215.
- Hedrick, R. P., T. S. McDowell, W. Ahne, C. Torhy and P. De Kinkelin (1992) : Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. Dis. Aquat. Org., 13, 203-209.
- Hengstberger, S. G., A. D. Hyatt, R. S. Speare and B. E. H. Coupar (1993) : Comparison of epizootic haematopoietic necrosis virus and Bohle iridovirus, recently isolated Australian iridoviruses. Dis. Aquat. Org., 15, 93-107.
- Hyatt, A. D. (1991) : Immunogold labelling techniques, In : Electron Microscopy in Biology : a Practical Approach, Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59-81.
- Hyatt, A. D., B. T. Eaton, S. Hengstberger and G. Russel (1991) : Epizootic haematopoietic necrosis virus : detection by ELISA, immunohistochemistry and electron microscopy. J. Fish Dis., 14,

605-618.

- Hyatt, A. D., A. R. Gould, Z. Zupanovic, A. A. Cunningham, S. Hengstberger, R. J. Whittington, J. Kattenbelt and B. E. H. Coupar (2000) : Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.*, 145, 301-331.
- Hyatt, A. D., M. Williamson, B. E. H. Coupar, D. Middleton, S. G. Hengstberger, A. R. Gould, P. Selleck, T. G. Wise, J. Kattenbelt, A. A. Cunningham and J. Lee (2002) : First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *J. Wildl. Dis.*, 38, 239-252.
- Langdon, J. S., J. D. Humphrey, L. M. Williams, A. D. Hyatt and H. A. Westbury (1986) : First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, 9, 263-268.
- Langdon, J. S. and J. D. Humphrey (1987) : Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia. *J. Fish Dis.*, 10, 289-297.
- Langdon, J. S., J. D. Humphrey and L. M. Williams (1988) : Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *J. Fish Dis.*, 11, 93-96.
- Langdon, J. S. (1989) : Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, 12, 295-310.
- Mao, J., T. N. Tham, G. A. Gentry, A. Aubertin and V. G. Chinchar (1996) : Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology*, 216, 431-436.
- Mao, J., R. P. Hedrick and V. G. Chinchar (1997) : Molecular characterization, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, 229, 212-220.
- Marsh, I. B., R. J. Whittington, B. O'Rourke, A. D. Hyatt and O. Chisholm (2002) : Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molec. Cell. Probes*, 16, 137-151.
- Pozet, F., M. Morand, A. Moussa, C. Torhy and P. De Kinkelin (1992) : Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.*, 14, 35-42.
- Reddacliff, L. A. and R. J. Whittington (1996) : Pathology of epizootic haematopoeitic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Pathol.*, 115, 103-115.
- Simon, R. C. and W. B. Schill (1984) : Tables of sample size requirements for detection of fish infected by pathogens : three confidence levels for different infection prevalence and various population sizes. *J. Fish Dis.*, 7, 515-520.
- Speare, R. and J. R. Smith (1992) : An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, 14, 51-57.
- Steiner, K. A., R. J. Whittington, R. K. Petersen, C. Hornitzky and H. Garnett (1991) : Purification of epizootic haematopoietic necrosis virus and its detection using ELISA. *J. Virol. Methods*, 33, 199-209.
- Tapiovaara, H., N. J. Olesen, J. Linden, C.-H. Rimala-Parnanen Von Bonsdorff (1998) : Isolation of an iridovirus from pike-perch (*Stizostedion lucioperca*). *Dis. Aquat. Org.*, 32, 185-193.
- Whittington, R. J. (1992) : Evaluation of a simple method for improving the precision of an ELISA

- detecting antibody in serum. *J. Immunol. Methods*, 148, 57-64.
- Whittington, R. J. and K. A. Steiner (1993) : Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) : improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *J. Virol. Methods*, 43, 205-220.
- Whittington, R. J., A. Philby, G. L. Reddacliff and A. R. MacGown (1994) : Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) : findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *J. Fish Dis.*, 17, 205-218.
- Whittington, R. J. and G. F. Reddacliff (1995) : Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Aust. Vet. J.*, 72, 421-424.
- Whittington, R. J., C. Kearns, A. D. Hyatt, S. Hengstberger and T. Rutzou (1995) : Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, 73, 112-114.
- Whittington, R. J. and A. D. Hyatt (1998) : Contingency planning for control of epizootic haematopoietic necrosis disease. *Sing. Vet. J.*, 20, 78-87.
- Whittington, R. J., L. A. Reddacliff, I. Marsh, C. Kearns, Z. Zupanovic and R. B. Callinan (1999) : Further observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Dis. Aquat. Org.*, 35, 125-130.
- Wolf, K., G. L. Bullock, C. E. Dunbar and M. C. Quimby (1968) : Tadpole edema virus : a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.*, 118, 253-262.
- Wolf, K. (1988) : *Fish Viruses and Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, pp.476.
- Zupanovic, Z., C. Musso, G. Lopez, C. L. Louriero, A. D. Hyatt, S. Hengstberger and A. J. Robinson (1998) : Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org.*, 33, 1-9.

注意：EHNに関する写真はすべて元 Elizabeth MacArthur Agricultural Institute, NSW Agriculture, NSW, Australia 所属の R. Whittington 博士（現所属：Faculty of Veterinary Science University of Sydney, Sydney, NSW, Australia）、および Division of Animal Health, Australian Animal Health Laboratory (AAHL), C.S.I.R.O, Geelong, Vic. Australia の A. Hyatt 博士のご厚意により、本マニュアルに限るとの条件のもとに提供されたものです。これら写真の著作権は NSW Agriculture ならびに C.S.I.R.O. にありますので、無断複写、他人への譲渡等は一切できません。

