

1. マダイイリドウイルス病

中島 員洋¹⁾²⁾, 栗田 潤³⁾

1) 独立行政法人水産総合研究センター研究調査部

2) 現所属：富山県水産試験場

3) 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所玉城分室

マダイイリドウイルス病は、1990年に四国のマダイ養殖場で最初に報告された。1991年以降も西日本の養殖場でマダイのみならず多くの海産養殖魚に被害を及ぼしている。病魚は運動が不活発となり、極度の貧血症状、鰓の点状出血及び脾臓の肥大を呈する。原因ウイルスはイリドウイルス科に属し、red sea bream iridovirus (RSIV) と命名されている。RSIVのゲノムは、直鎖状2本鎖DNAであるが、他のイリドウイルスと同様、円環的置換が許され、末端が重複していると考えられる。円環状となる遺伝子地図の長さは112,415bpである。RSIV感染魚の迅速診断法として、単クローン抗体を用いた間接蛍光抗体法及びPCR法が広く使用されている。また、本病の防除法として、ホルマリン不活化ワクチンが開発され、実用化されるに至っている。

はじめに

近年、我が国において、海産魚を中心に養殖魚種の多様化が急激に進展するとともに、高密度飼育、種苗の広範な移動及び海外種苗の導入等が進んでいる。一方、魚類養殖業の急速な発展は疾病の発生数の増加をもたらし、新たな疾病も発生するようになった。特に、ウイルス病は、病気の伝播と進行が早く大量死を起こしやすいことに加え、抗生物質等の水産用医薬品による治療が困難なことから、養殖業に甚大な被害を及ぼし続け、その防除対策の確立は急務となっている。中でもマダイイリドウイルス病（本稿においては、マダイイリドウイルスがマダイ以外の魚種に感染し、病気が発生した場合もマダイイリドウイルス病と記している）は、1990年の初発以来、海産養殖魚に甚大な被害を及ぼしたことから社会問題となった。ここでは、マダイイリドウイルス病の原因、迅速診断技術並びに防除のためのワクチン開発等について紹介する。

病気の発生と疫学

本病は、1990年の夏から秋にかけて四国の養殖場で最初に発生し、マダイの大量死を引き起こした。本病は、病理組織学的検査、ウイルス検査及び分離ウイルスを用いた感染実験の結果から、イリドウイルス科に属するウイルスの感染が原因であることが明らかにされ、原因ウイルスはマダイイリドウイルス (RSIV) と命名された。病気は夏の高水温期を中心に発生し、水温が20℃程度まで低下した11月になると自然に終息したが、翌年以降も毎年夏の高水温期を中心に西日本各地の養殖場で流行を繰り返している。さらに、本病は稚魚のみならず成魚においても発生し、これまでに我が国で発生したウイルス病としては最大規模の被害を与えている。

県水産試験場の協力によって分布、罹病魚種等の発生状況を調査した結果、1991年以降急速に発生漁場が拡大し、これまでに本病の発生が18府県において確認されている(表1)¹⁶⁾²²⁾。また、現在までにスズキ目の魚類を中心に3目31魚種で本病の発生が確認されている。

本ウイルスがどこから侵入し、感染発病に至ったかは未だ明らかでない。海外からの輸入種苗の導入に伴い侵入した可能性も大きい結論を得るに至っていない。一方、感染経路については、養殖場での発生及び室内実験の結果から本ウイルスの水平感染が強く疑われる。養殖場において

連絡先

〒936-8536 富山県滑川市高塚 364

TEL : 076-475-0036

FAX : 076-475-8116

E-mail : kazuhiko.nakajima@pref.toyama.lg.jp

表1 マダイイリドウイルス感染魚種

スズキ目	スズキ亜目
アジ科	ヒラマサ, カンパチ, マアジ, プリ, シマアジ, マルコバン, プリヒラ
イサキ科	イサキ, コショウダイ
イシダイ科	イシダイ, イシガキダイ
サバ科	マサバ, クロマグロ, サワラ
スズキ科	スズキ
タイ科	マダイ, チダイ, クロダイ, フェフキ, ハマフェフキ
ハタ科	キジハタ, アオハタ, マハタ, クエ, チャイロマルハタ, ヤイトハタ
メジナ科	メジナ
スギ科	スギ
カレイ目	カレイ亜目
カレイ科	ホシガレイ
ヒラメ科	ヒラメ
フグ目	フグ亜目
フグ科	トラフグ

は次々と近隣の生簀で病気が発生すること、また、感染実験においては病魚と健康魚を同じ水槽で飼育することにより病気が伝播すること、さらに病魚の飼育排水を介し病気が伝播することなどがあげられる。一方、現在までに種苗生産場で本病の発生が無いことから、親魚から卵を介して仔魚への垂直感染による伝播の可能性は低いと考えられる。

マダイイリドウイルス病

(1) 病状

病魚は体色が黒化して海面を力無く遊泳する。軽度の眼球突出や出血、体表の出血性のスレが観察されることもある。剖検では鰓の褪色が特徴的で、著しい貧血を呈し、鰓弁の点状出血や鰓弁先端部より出血が認められることもある。また囲心腔内の出血、内臓諸器官の褪色、脾臓の腫大を特徴とする¹⁴⁾。

(2) 病変

病理組織学的には、細胞質が塩基性色素で均一に濃染あるいは顆粒状に染まる大型の類円形を呈する細胞（肥大細胞）の出現が特徴である。肥大細胞は、脾臓、心臓、腎臓、肝臓、鰓に多数観察される。病理組織学的に最も顕著な変化が認められるのは脾臓であり、広範な組織の空疎化が起こり、その組織中に多数の肥大細胞が観察される¹⁴⁾。

(3) 病因

1) 形態

電子顕微鏡による観察では、前述の肥大細胞の細胞質に結晶状に配列したウイルス粒子が観察される。ウイルス粒子は、平面的には六角形を呈する20面体であり、直径が200～240nmでエンベロープを持たず、中央部に直径120nmの電子密度の高いコアを持つ等、イリドウイルスに特徴的な形態を有する。ウイルス粒子形成前の感染細胞では細胞肥大と核の変性が特徴的である¹⁴⁾。

2) 理化学的性状

本ウイルスはIUDR処理によって増殖が抑制され、エーテル、クロロホルムに感受性、熱（55℃、30分）および酸（pH 3）に不安定な性質を示す。15～30℃で増殖可能であるが、適温は25℃前後であり、37℃での増殖は認められない²⁸⁾。これらの結果と、ウイルス粒子のサイズ、また20面体を呈し細胞質でのみ増殖することから、本ウイルスはイリドウイルス科に属する。

3) 培養と増殖

原因ウイルスの分離は、病魚の脾臓磨砕液をBF-2、FHM、RTG-2、CHSE-214、KRE-3などの魚類由来の株化細胞に接種し20～25℃で培養すると肥大球形化を特徴とするCPEが発現して原因ウイルスが分離される¹⁴⁾。ウイルス感染価は $10^3 \sim 10^5$ TCID₅₀/ml程度といずれの細胞も感受性が低く、継代とともに感染価は低下する傾向が認められる。そこで、さらに詳しく検討した結果、イサキの鱭由来の株化細胞であるGF細胞でウイルスの分離・培養ができ、継代も可能であることが明らかになった。

4) 血清学的性状

各種海産養殖魚種から分離したRSIVの抗原解析を行った結果、単クローン抗体の反応性に僅かに差が観察されるものの、同一あるいは非常に類似したウイルスと考えられた。魚類におけるイリドウイルス病としては、リンホシスチス病⁴²⁾やウイルス性赤血球壊死症²⁾などが多種類の海産魚で知られているが、症状、病理所見、ウイルス粒子の大きさ、性状などからいずれも本ウイルスと異なる。また、得られた単クローン抗体の反応性を検討した結果、ウナギ由来のイリドウイルス（Japanese eel iridovirus）³⁶⁾とは全く反応しなかった。また、海外で報告されているレッドフィンパーチの流行性造血器壊死症ウイルス（Epizootic haematopoietic necrosis virus）²⁰⁾、シートフィッシュイリドウイルス（iridovirus isolated from sheatfish）¹⁾、グルーパーイリドウイルス（iridovirus isolated from grouper）¹⁵⁾とは

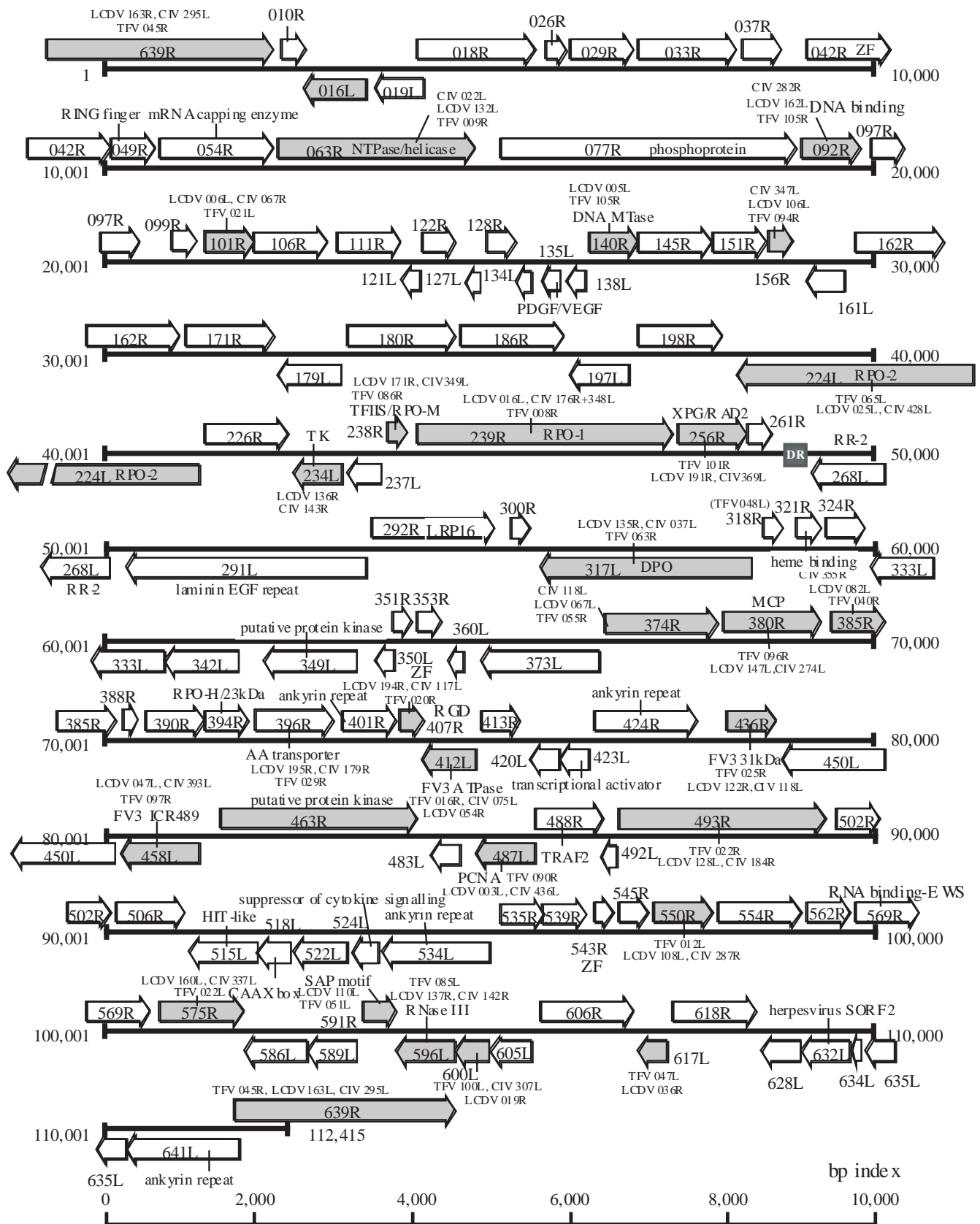


図1 マダイイリドウイルス Ehime 1 株 遺伝子地図
 ※ アミ矢印は他属にも見いだされる相同な遺伝子

反応せず既報の魚類イリドウイルスとは異なる新しいウイルスと考えられる²⁹⁾。

マダイイリドウイルス遺伝子の解析

(1) ゲノム構造

イリドウイルス科に属するウイルスのゲノムは約 100 ~ 300kbp 程度の直線状 2 本鎖 DNA である。しかし、円環的置換が許され、両端には重複した配列が付加されていることから、遺伝子地図としては円環状を示すが、重複末端が円環状のどの部分に来ているかは個々のウイルス粒子によって異なる⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾¹²⁾²¹⁾³⁴⁾⁴¹⁾。通常重複配列を除いた部分を全ゲノムとしている。末端になり得る位置は、ウイルス種によって異なり、全く自由なものもあればゲノムの 25% 程度に制限されるものもある⁵⁾⁸⁾²⁷⁾。また末端に重複される割合もウイルス種によって異なり、ゲノムの数% ~ 50% 以上と様々である⁵⁾⁸⁾。RSIV のゲノム構造も同様と考えられており、ゲノム解析により¹⁸⁾¹⁹⁾、円環状部分は 112,415 bp、GC コンテンツは 53.4% であることが明らかとなった。しかし、末端の重複部分が何%あるのか、また末端となり得る位置の許容範囲も分かっていない。ゲノムサイズと GC コンテンツを比較すると、RSIV は、節足動物を宿主とするイリドウイルス属、クロルイリドウイルス属、脊椎動物を宿主とするリンホシスティウイルス属、ラナウイルス属の既知の 4 属の中では、ラナウイルス属に最も近い。また DNA methyltransferase (MT) 遺伝子の存在や、メチル

化 DNA に寛容性のない大腸菌を用いてのゲノム断片のクローニングが困難であることなどの間接的証拠から、他の脊椎動物のイリドウイルスと同様⁵⁾¹⁰⁾¹¹⁾⁴⁰⁾⁴³⁾、RSIV のゲノム DNA も高度にメチル化されていることが示唆されている。

(2) 遺伝子組成とその特徴

円環状部分には、遺伝子と思われる読みとり枠が 116 個存在し (図 1)、幾つかを除いてその殆どはオーバーラップしておらず、また、イントロン構造をとる遺伝子も今のところ確認されていない。これらは、クロルイリドウイルス属を除く既知の 3 属のイリドウイルスにも見いだされる相同な遺伝子 (30 個) と、本ウイルスに特徴的な遺伝子 (86 個) とに分けられた。前者の中には、構造タンパク質である主要外被タンパク質 (MCP) 遺伝子の他、DNA polymerase, RNA polymerase の 2 つのサブユニット、XPG/RAD2 ファミリータンパク質や、前述した MT (脊椎動物のイリドウイルスのみに共通) などの酵素類の遺伝子が含まれるが、これら遺伝子の系統解析から、RSIV は既知の属とは異なる 5 番目の属に属することが明らかとなった (図 2)。ゲノム中での共通遺伝子の位置関係は、他の属と比較してもお互いに関連性は見出されず、属分化の過程においてゲノム内で激しく遺伝子の再配置が起こってきた歴史を示唆している。

主要な複製酵素、転写酵素の遺伝子は真核生物を起源とするものであるが、それらは全属にわたり共通であること

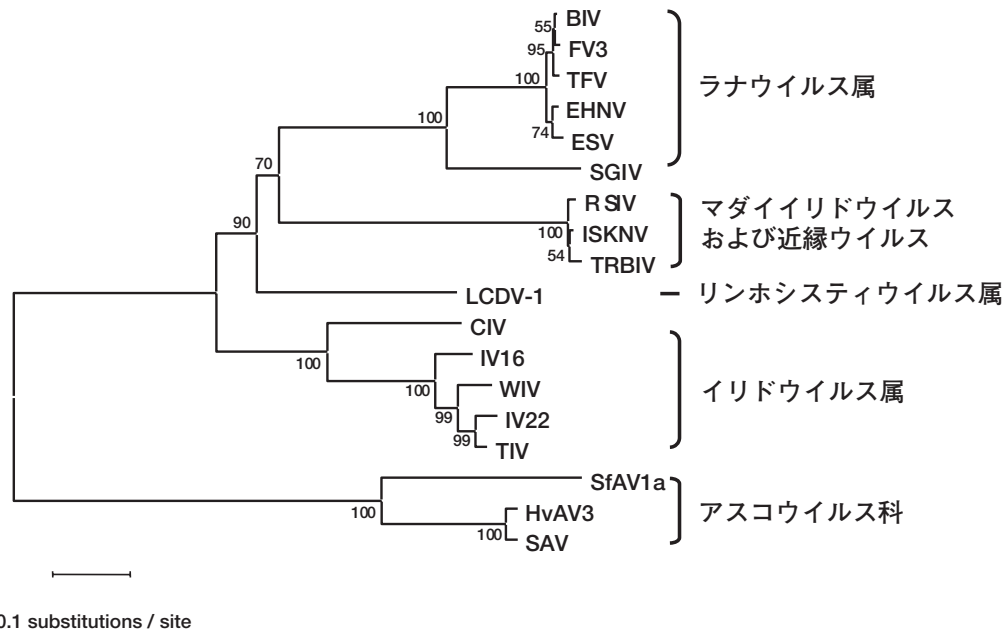


図 2 主要外被タンパク質アミノ酸配列に基づくイリドウイルス科ウイルスの分子系統樹 (NJ 法)

※クロルイリドウイルス属は含まれていない。アウトグループとしてイリドウイルス科に最も近縁なアスコウイルス科ウイルスの外被 (膜間) タンパク質を加えた。

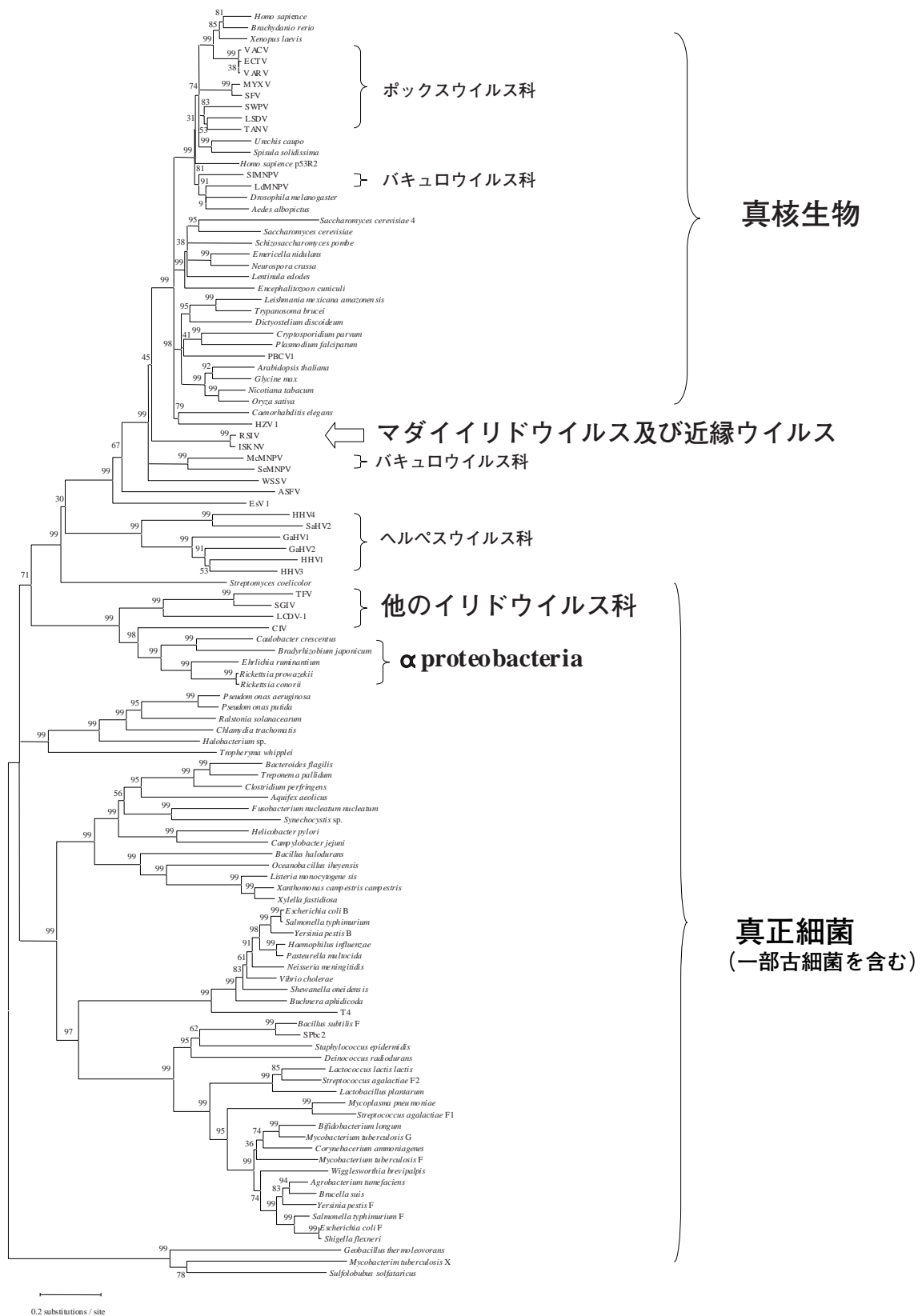


図3 クラスIリボヌクレオチドリダクターゼ小サブユニット遺伝子(RR-2)アミノ酸配列に基づく分子系統樹 (NJ法)
 ※アウトグループとして *Geobacillus thermoleovorans*, *Sulfolobus solfataricus* 及び結核菌のRR-2様遺伝子を加えた。

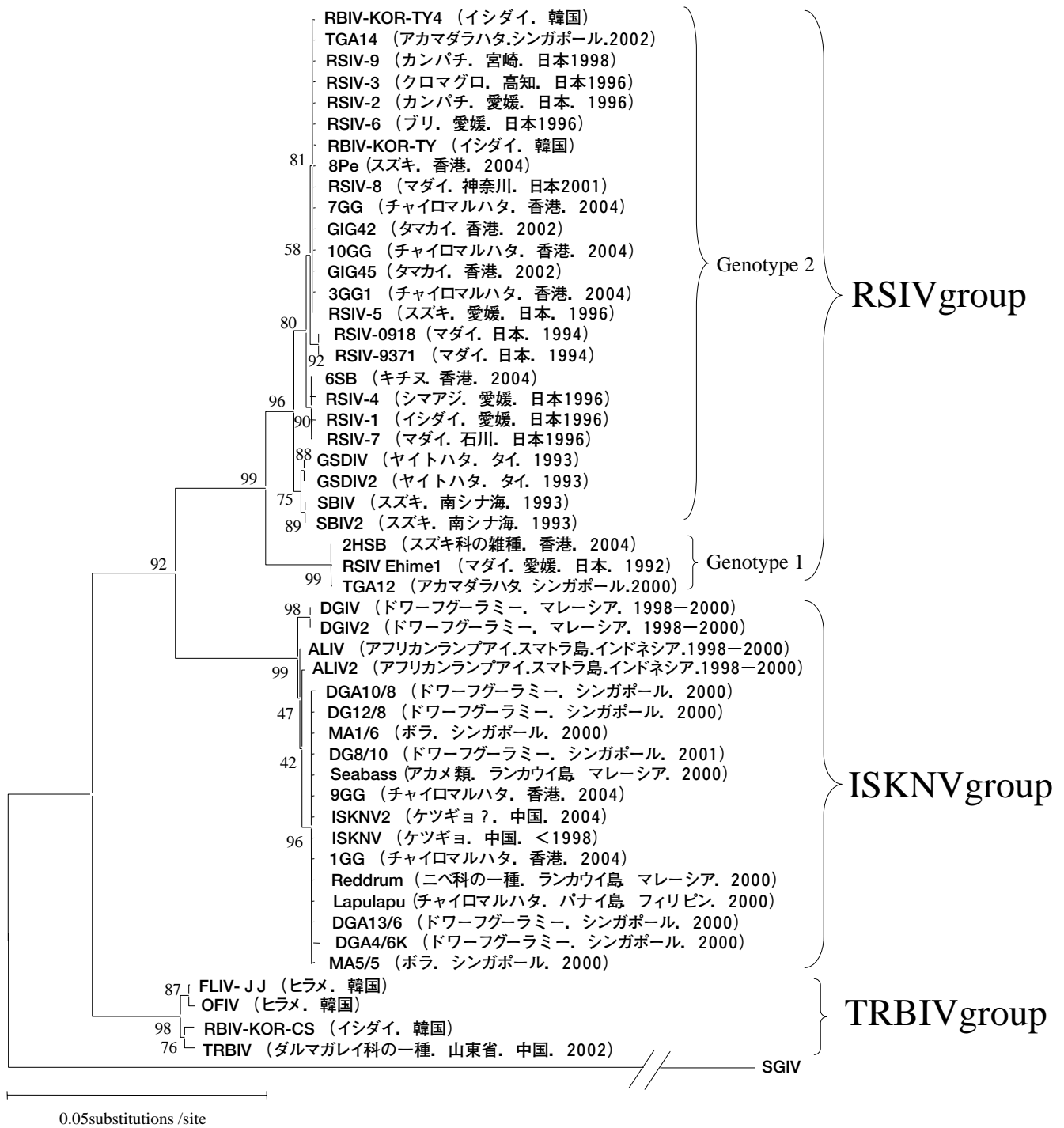


図4 主要外被タンパク質遺伝子塩基配列に基づくマダイイリドウイルス様ウイルスの分子系統樹 (NJ法)
 ※アウトグループとしてラナウイルス属であるシンガポールハタイリドウイルス(SGIV)の主要外被タンパク質遺伝子を加えた。

から、それらの起源は属分化の前、イリドウイルス科の誕生の頃に遡ると考えられる。このような古い時代に真核生物から獲得したと思われる遺伝子は他の大型 DNA ウィルスにも普通にみられるが、RSIV をはじめイリドウイルス科のこれらの遺伝子は、他とは比較にならないほどの真核生物との際だった相同性をとどめており、進化速度がきわめて遅いことが示唆された。このことは、他の科のウィルスが持っていない、DNA 修復機能を持つと予想される XPG/RAD2 ファミリーの遺伝子をイリドウイルスが早期に宿主から獲得していた事と関連があるかもしれない。

一方、他属には共通であるが、RSIV には当てはまらない特徴として DNA 合成に関わる ribonucleotide reductase (RR) の大小 2 つのサブユニット遺伝子 (RR-1, RR-2) が挙げられる。RSIV も RR-2 は持っているが、RR-1 が見あたらず、しかもこの RR-2 は他属の RR-2 との相同性が極めて低い。系統解析から RSIV の RR-2 は、真核生物 (おそらくは過去の宿主) を起源にもつ新しいものと入れ替わっていることが明らかになった (図 3)。失った結合相手である RR-1 は、おそらく宿主のものを使っているであろう。これに対して、他 3 属の RR-2 および RR-1 は細胞内寄生細菌であるリケッチアに近い細菌を起源とする古いものであることが明らかになり、イリドウイルス自体の起源とリケッチアが深く関わっていることを示唆する興味深い結果となった。他の大型 DNA ウィルスにおいても、細菌起源が示唆される遺伝子の存在は多く知られている。しかし、ウィルス遺伝子の進化速度が早く変異が大きいことから、系統解析によって起源となる細菌種までたどり着くことは殆どできないのが現状である。よってこれは極めて珍しい例といえよう。RR という保存性の高い遺伝子であったことに加え、おそらくイリドウイルスの遺伝子進化速度が遅く、古い遺伝子が原形をとどめていたことが幸いしたと考えられる。このように RSIV の遺伝子解析により、イリドウイルス科全体に関する思わぬ新しい知見が副次的に得られてきている。

その他 RSIV を特徴づける幾つかの興味深い遺伝子も見つかっている。サイトカインサプレッサー遺伝子やアンキリンリピートを持つ 3 つの遺伝子の存在は、宿主免疫系遺伝子発現のシャットダウン機能などを示唆するものである。またラミニン EGF リピートを持つ遺伝子、他属にも共通な遺伝子ではあるが、細胞接着アミノ酸配列 RGD を持つ遺伝子などは、細胞レセプターとの結合機能をもつ可能性も予想される。今後のこれらの遺伝子の機能解析が期待される。

(3) アジアにおけるマダイイリドウイルス様ウィルスの系統解析

近年、東南アジアや、中国、韓国から、ドワーフグーラーミーなどの熱帯魚、ケツギョなどの淡水魚、ハタ類、ヒラ

メなど異体類等の海産魚に由来する RSIV に抗原的、遺伝的に類似する幾つかのウィルスが報告され³⁾⁹⁾¹³⁾²³⁾³⁵⁾³⁷⁾³⁸⁾、その分類学的位置が論議されている。私達は、国内の RSIV および入手したこれらウィルスについて、分類のキーとなる MCP 遺伝子等を PCR 法により増幅して塩基配列を決定し、Genbank 上に公開されている配列と共に、塩基配列及びアミノ酸配列レベルで広範囲な系統解析を行った (図 4)。その結果、これらの類似ウィルスは RSIV、伝染性脾臓腎臓壊死症ウィルス (ISKNV)¹³⁾、ターボット赤体色イリドウィルス (TRBIV)³⁵⁾ をそれぞれ代表とする 3 つの分類群を形成し、現在のところこれらのウィルスを 3 種に分けるのが妥当と考えられた。RSIV の属する分類群は、細かく見るとさらに、Type strain である Ehime-1 株が属する Genotype 1 と、国内で優位を占める Genotype 2 の 2 つに分かれ、Sudthongkong ら³⁸⁾ により、ハタ眠り病イリドウィルス⁴⁾ であるとして報告されたタイのウィルス (GSDIV) と、韓国のイシダイイリドウィルス⁹⁾ は RSIV の Genotype 2 とほぼ同一であった。ISKNV 型は淡水魚・汽水魚を多く含み、TRBIV 型は殆どが異体類からで、東南アジアからは見つかっていない。

分類学的位置については、これら 3 つの分類群全てを同一種と考える研究者もいる一方で、同一の分類群内であっても生物学的特徴が著しく異なるものを含むこともまた事実であり、コンセンサスを得られる分類区分についてはさらなる研究が必要と考える。

マダイイリドウイルス病の診断法の開発

マダイイリドウイルス病の早期発見を目的に、当初、マダイ病魚脾臓スタンプ標本のギムザ染色観察による肥大細胞の確認が簡便な診断法として開発され普及したが、罹病魚種の拡大に伴って魚種によってはマダイほど顕著な病変を示さないものも出現し、現場からはより正確な診断法の開発が要望された。そこで、ウィルス感染により誘導される抗原を認識する単クローン抗体を作製し³⁰⁾、これを用いた間接蛍光抗体法による簡易診断法を確立した。まず、作製した抗体の内、ウィルス感染により誘導される抗原である 230/180kDa の抗原を認識する単クローン抗体を利用した蛍光抗体法を用いて、RSIV を実験感染させたマダイ稚魚からウィルス抗原の検出の可否を検討した。その結果、全ての実験感染死亡魚の脾臓スタンプにおいても、ウィルス抗原が検出された。また、一部の生残魚においてもウィルス抗原の検出されるものが認められ、単クローン抗体を用いた蛍光抗体法は本病の確定診断に利用できることが明らかになった³¹⁾。

そこで、この方法を用い、県水産試験場の協力のもとに、西日本の養殖場で発生した RSIV 感染の疑われた病魚 738 検体について感染の有無を調べた。これらの検体の中には、マダイ、チダイ、イシダイ、イシガキダイ、スズキ、ブリ、

ヒラマサ、カンパチ、シマアジ、トラフグ及びキジハタ等の魚種が含まれる。本診断法によりこれらの全ての魚類からRSIVと共通の反応性を示すウイルス抗原が検出された。これらの結果により、単クローン抗体を用いた蛍光抗体法による診断は、マダイのみならず各種海産養殖魚で発生している本病の迅速診断に有効であることが明らかとなった。なお、感染魚はマダイでは稚魚から親魚におよび、ブリ、カンパチ等においても稚魚ばかりでなく、大型魚の感染も認められた。本蛍光抗体法では肥大細胞のみならず、感染初期と思われる小型の細胞の識別も可能である。また、前述のごとくRSIV遺伝子の解析を広範に進めており、これらを基に、PCRプライマーを作製した。これらのプライマーを用い、実験感染および自然感染マダイの脾臓組織や分離ウイルスの培養上清の試料について検討した結果、PCR法により目的断片が増幅された¹⁷⁾。また、本法により実験感染および自然感染マダイの脾臓組織や分離ウイルスの培養上清の試料から目的断片が増幅され診断法としての有効性が確認された。現在では、ギムザ染色法、間接蛍光抗体法及びPCR法のいずれも養殖現場における迅速診断法として広く利用されている。

マダイイリドウイルス病に対するワクチンの開発

本病はウイルス病であり、薬剤等による化学療法は期待しにくいことから、ワクチンの開発が強く求められた。ワクチンは、RSIV感染GF細胞の培養液を低速遠心して得た上清に、ホルマリンを0.1%添加して不活化し作製した。室内試験においては、ワクチンの投与方法はマダイ1尾あたり0.1ml腹腔内、または筋肉内に接種して10日後、ウイルス液を腹腔内接種して攻撃し、その防御能を検討した。その結果、ワクチンを腹腔内及び筋肉内接種した群は、いずれも対照群に比べ極めて低い死亡率を示し、室内試験におけるワクチンの有効性が確認された³²⁾。さらに、自然環境下での有効性を確認するための野外試験を実施した。ワクチン投与群及び対照群（無処理群）にはそれぞれ1,000尾のマダイ稚魚を用いた。マダイ稚魚の腹腔内にワクチン液を0.1ml接種し、接種後から12週間海面生簀で飼育し観察を行った。また、対照群を隣接した生簀で同様に飼育した。対照群では投与4週間後から摂餌行動が鈍くなる魚が観察されるとともに、死亡魚が観察され始め、6～7週間目にピークに達した。ワクチン投与群では対照群の死亡魚のピークよりやや遅れ、投与後8週間後に小さなピークを示したが、累積死亡率は、対照群で68.5%、ワクチン投与群では19.2%であり、RPS（有効率）は72%であった。なお、累積死亡率では、ワクチン投与群と未投与群間で統計学的に有意な差（ $P < 0.01$ ）が認められた。平均魚体重についてもワクチン投与群が対照群に比べ有意に増加していた。また、ワクチン投与により免疫魚においてはウイルス抗原及びゲノムDNAの増幅が抑制されることが明らかになった³³⁾。

これらの結果を踏まえて、1999年にはマダイ稚魚を対象とした「イリドウイルス感染症不活化ワクチン」が市販された。本ワクチンは、魚類のウイルス病を対象として実用化された世界で最初のワクチンであり、現在ではブリ、カンパチ等のブリ属魚類やシマアジにおいてもその使用対象が拡大されている。

おわりに

近年、我が国の沿岸海域では、天然資源の回復・増大を目的とした増殖事業と、より高い生産性を追求した養殖事業が推し進められている。このような状況下で、「水産養殖」は一段と重要視されるようになり、漁業の中で養殖漁業は生産量では約20%、生産金額では約35%を占め、その地位を不動のものにしている。マダイについては、海面網生簀による本格的な養殖が行なわれるようになったのは昭和40年頃といわれており、その歴史は比較的新しい。マダイ養殖は、その後進展し、昭和60年代に入ってから、種苗の安定供給と質の向上、高度経済成長に伴うグルメ嗜好の増大、配合飼料の進歩、ブリ養殖の低迷などにより急速に進展した。また、マダイは、一般に他の海産養殖魚に比べ病気に強く養殖しやすいとされていた。しかしながら、昭和60年前後からマダイ養殖の隆盛に伴い、病気が頻発するようになり、現在までにマダイイリドウイルス病やリンホシスチス病といったウイルス病、ピブリオ病、滑走細菌症やエドワジエラ症といった細菌病、筋肉クドア症などの原虫病、ビバギナ症などの単生虫症、及び生殖腺線虫症などの寄生虫症が知られている²⁴⁾。

一方、我が国では、近年、海産養殖魚のウイルス病の発生が増加し、その対策が急務となっている。このような状況下で1990年の夏から秋にかけて、四国で、マダイ当歳魚を中心にマダイイリドウイルス病が最初に発生した。本病は、上述のごとく我が国で突然出現し急速に拡大したが、その発生源・感染源については明らかになっていない。推定される淵源として以下のことが挙げられる。一つは、外国由来、すなわち外国産種苗の導入とともに我が国に侵入した可能性が考えられ、もう一方では、国内由来の可能性が挙げられる。後者の場合、原因ウイルスは元々養殖場周辺に潜っており何らかの原因で魚に感染し、病気を起こしたものと考えられる。具体的には感受性の低い魚が本来の宿主で、現在でも依然として感染源となっている可能性が挙げられる。いずれにしても、本病は初発から10年以上経過しており、最早この病気について淵源をたどることは難しいとも考えるが、短期間のうちに多数の魚種に拡がったことからすれば外国産種苗の導入に伴い病原体が侵入した可能性は高いように思われる。このような状況下においては、輸入種苗とともに海外から病気が持ち込まれる危険性を低くするとともに、逃亡や産卵などによる生態等への影響も含め、外国種苗の安易な導入を止めることが肝要であ

ると考える。

感染症対策として、Muroga²⁵⁾により、7つの手段が示されている。また、これらは、魚類の細菌感染症の予防・治療対策並びに種苗生産における感染症の防除対策としても示されている²⁴⁾²⁶⁾。7つの手段には、感染源、感染経路対策として1) 感受性宿主と病原菌の接触を避ける(防疫)、2) 特定の病気が発生しにくい環境を維持する(環境制御)、宿主対策として、3) 特定の病気に対する抵抗性の高い品種を作出・育成する(耐病性育種)、4) 特定の病原菌に対する予防免疫を施す(予防免疫)、5) 免疫賦活剤あるいは栄養剤を投与することにより非特異的生体防御能を活性化(生体防御能の活性化)、6) 適正な飼育管理を行うことにより宿主の生体防御能を維持するとともに、病原体の増加を防ぐ(適正飼育管理)、及び治療対策として、7) その病原体に対する有効な薬剤を用いて治療する(化学療法)が挙げられる。

これらの内、本病に対する対策としては、適正飼育管理を基本とし生体防御能の活性化をはかるとともに、不活化ワクチンによる予防免疫に依ることが重要と考える。また長期的には、耐病性育種による耐病性系統の作出による対策が重要となろう。

さらに、ウイルス病の防除のためには、法律の整備等を含む養殖システムにおける基本的な改善も必要となる。我が国においては、前述のごとく、魚類の導入に際し特定疾病について健康証明書を必要とする検疫システムを平成8年に導入し、平成11年には、持続的養殖生産確保法が施行され、その中に、特定疾病の蔓延を防止する項目も含まれている³⁹⁾。このような対策を講じることにより、ウイルス病のみならず、魚病の発生の減少が期待されている。

謝 辞

本研究を行うにあたり、様々なご協力をいただきました水産総合研究センター、イリドウイルス感染症研究会及び財団法人阪大微生物病研究会の関係各位に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Ahne W, Schlotfeldt HJ, Thomsen I.: Fish viruses: Isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). J Vet Med B. 36: 333-336, 1989.
- 2) Appy RG, Burt MDB and Morris TJ.: Viral nature of piscine erythrocytic necrosis (PEN) in the blood of Atlantic cod (*Gadus morhua*). J Fish Res Board Can. 33: 1380-1385, 1976.
- 3) Chou HY, Hsu CC, Peng TY.: Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. Fish Pathol. 33: 201-206, 1998.
- 4) Chua FHC., Ng ML, Ng KL, Loo JJ, Lee JY.: Investigation of outbreaks of a novel disease, 'Sleepy Grouper Disease', affecting the brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* Forskal. J Fish Dis. 17: 417-427, 1994.
- 5) Darai G, Anders K, Koch HG, Delius H, Gelderblom H, Samalecos C, Flügel RM.: Analysis of the genome of fish lymphocystis disease virus isolated directly from epidermal tumours of *Pleuronectes*. Virology 126: 466-479, 1983.
- 6) Darai G, Delius H, Clarke J, Apfel H, Schnitzler P and Flügel RM.: Molecular cloning and physical mapping of the genome of fish lymphocystis disease virus. Virology 146: 292-301, 1985.
- 7) Davison S, Carne A, McMillan NA J, Kalmakoff J.: A comparison of the structural polypeptides of three iridescent viruses (type 6,9, and 16) and the mapping of the DNA region coding for their major capsid polypeptides. Arch Virol. 123: 229-237, 1992.
- 8) Delius J, Darai G, Flügel RM.: DNA analysis of insect iridescent virus 6: Evidence for circular permutation and terminal redundancy. J Virol. 49: 609-614, 1984.
- 9) Do JW, Moon CH, Kim HJ, Ko MS, Kim SB, Son JH, Kim JS, An EJ, Kim MK, Lee SK, Han MS, Cha SJ, Park MS, Park MA, Kim YC, Kim JW, Park JW.: Complete genomic sequence of rock bream iridovirus. Virology 325: 351-363, 2004.
- 10) Eaton BT, Hyatt AD, Hengstberger S.: Epizootic haematopoietic necrosis virus: Purification and classification. J. Fish Dis. 14: 157-169, 1991.
- 11) Essani K, Granoff A.: Amphibian and piscine iridoviruses: Proposal for nomenclature and taxonomy based on molecular and biological properties. Intervirology 30: 187-193, 1989.
- 12) Goorha R, KG Murti K G.: The genome of frog virus 3, an animal DNA virus, is circularly permuted and terminally redundant. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 79: 248-252, 1982.
- 13) He JG, Deng MS, Weng P, Lee Z, Zhou SY, Long QX, Wang XZ, Chang SM.: Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. Virology 291: 126-139, 2001.
- 14) 井上 潔, 山野恵祐, 前野幸男, 中島員洋, 松岡学, 和田有二, 反町 稔: 養殖マダいのイリドウイルス感染症. 魚病研究 27: 19-27, 1992.
- 15) Kasornchandra J, Khongpradit R.: Isolation and preliminary characterization of a pathogenic iridovirus in nursing grouper, *Epinephelus marabarcus*. In "Diseases in Asian Aquaculture III" (ed. by T. W. Flegel and I. H. MacRae), Manila, Philippine, 61-66, 1997.
- 16) 川上秀昌, 中島員洋: 1996年から2000年にマダイイリドウイルス病が確認された海産養殖魚種. 魚病研究 37: 45-47, 2002.
- 17) Kurita J, Nakajima K, Hirono I, Aoki T.: Polymerase chain reaction(PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). Fish Pathol, 33: 17-23, 1998.
- 18) 栗田潤: マダイイリドウイルスの遺伝子解析, 1999年度東京水産大学大学院資源育成学科学士学位論文, 2000.

- 19) Kurita J., Nakajima K, Hirono I, Aoki T.: Complete genome sequencing of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fisheries Science* 68 suppl. II: 1113-1115, 2002.
- 20) Langdon JS, Humphrey JD, Williams LM.: First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from red-fin perch, *Perca fluviatilis* L. *J Fish Dis.* 9: 263-268, 1986.
- 21) Lee MH, Willis DB.: Restriction endonuclease mapping of the frog virus 3 genome. *Virology* 126: 317-327, 1983.
- 22) 松岡 学, 井上 潔, 中島員洋: 1991年から1995年に“マダイイリドウイルス病”が確認された海産養殖魚種, *魚病研究*, 31: 233-234, 1996.
- 23) Miyata M, Matsuno K, Jung SJ, Danayadol Y, Miyazaki T.: Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand. *J Fish Dis.* 20: 127-134, 1997.
- 24) 室賀清邦, 江草周三: 魚病学概論, 厚星社厚生閣, 東京, 177p, 1996.
- 25) Muroga K.: Recent advances in infectious diseases of marine fish with particular reference to the cause in Japan In "Diseases in Asian Aquaculture III" Fish Health Section. Asian Fish Soc. Manila, pp.21-31, 1997.
- 26) 室賀清邦: 疾病防除の面からみた放流用種苗生産のあり方, *栽培技研*, 28: 39-45, 2000.
- 27) Murti KG, Goorha R, Granoff A.: Structure of frog virus 3: Genome size and arrangement of nucleotide sequences as determined by electron microscopy. *Virology* 116: 275-283, 1982.
- 28) Nakajima K, Sorimachi M.: Biological and physico-chemical properties of iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.* 24: 29-33, 1994.
- 29) Nakajima K, Maeno Y, Yokoyama K, Kaji C, Manabe S.: Antigen analysis of red sea bream iridovirus and comparison with other fish iridoviruses. *Fish Pathol.* 33: 73-78, 1988.
- 30) Nakajima K, Sorimachi M.: Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus. *Fish Pathol.* 30: 47-52, 1995.
- 31) Nakajima K, Maeno Y, Fukudome M, Fukuda Y, Tanaka S, Matsuoka S, Sorimachi M.: Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Pathol.* 30: 115-119, 1995.
- 32) Nakajima K, Maeno Y, Kurita J, Inui Y.: Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathol.* 32: 205-209, 1997.
- 33) Nakajima K, Maeno Y, Honda A, Yokoyama K, Tooriyama T, Manabe S.: Effectiveness of vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis. Aquat. Org.* 36: 73-75, 1999.
- 34) Schnitzler P, Soltau JB, Fischer M, Reisner H, Scholz J, Delius H, Darai G.: Molecular cloning and physical mapping of the genome of insect iridescent virus type 6; further evidence of for circular permutation of the viral genome. *Virology* 160: 66-74, 1987.
- 35) Shi CY, Wang YG, Yang SL, Huang J, Wang QY.: The first report of an iridovirus-like agant infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture* 236: 11-25, 2004.
- 36) 反町 稔, 江草周三: 養殖ウナギから分離されたウイルスの性状と分布. *養殖研報* 3: 97-105, 1982.
- 37) Sudthongkong C., Miyata M, Miyazaki T.: Iridoviral disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Dis. Aquat. Org.* 48: 163-173, 2002.
- 38) Sudthongkong C, Miyata M, Miyazaki T.: Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. *Arch. Virol.* 147: 2089-2109, 2002.
- 39) 水産庁 (監修): 持続的養殖生産確保法関係法令集, 成山堂, 119p, 2000.
- 40) Wagner HD, Werner SE, Gelderblom H, Darai G, Flugel R.: Methylation pattern of fish lymphocystis disease virus DNA. *J Virol.* 53: 1005-1007, 1985.
- 41) Ward VK, Kalmakoff J.: Physical mapping of the DNA genome of insect iridescent virus type 9 from *Wiseana* spp. larvae. *Virology* 160: 507-510, 1987.
- 42) Weissenberg R.: Fifty years of reasearch on the lymphocystis virus disease of fishes (1914-1964). *Ann NY Acad Sci* 126 (Part 1): 362-374, 1965.
- 43) Willis DB, Granoff A.: Frog virus 3 is heavily methylated at CpG sequences. *Virology* 107: 250-257, 1980

Red sea bream iridoviral disease

Kazuhiro Nakajima¹⁾²⁾, Jun Kurita³⁾

- 1) Research Promotion and Development Division, Fisheries Research Agency, Queen's Tower B 15F, 2-3-3 Minatomirai, Nishi-ku, Yokohama 220-6115, Japan
- 2) Present address :
Toyama Prefectural Fisheries Research Institute, 364 Takatuka, Namerikawa, Toyama 936-8536, Japan
E-mail: kazuhiro.nakajima@pref.toyama.lg.jp
- 3) Inland Station, National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 224-1 Hiruta, Tamaki, Mie 519-0423, Japan

The first outbreak of red sea bream iridoviral disease caused by red sea bream iridovirus (RSIV) was recorded in cultured red sea bream *Pagrus major* in Shikoku Island, Japan in 1990. Since 1991, the disease has caused mass mortalities of cultured marine fishes not only red sea bream but also many other species. The affected fish were lethargic and exhibited severe anemia, petechiae of the gills, and enlargement of the spleen. The causative agent was a large, icosahedral, cytoplasmic DNA virus classified as a member of the family Iridoviridae and was designated as red sea bream iridovirus (RSIV). The genome of RSIV is linear dsDNA and considered to be circularly permuted and terminally redundant like other iridoviruses. The length of physical map of RSIV genome is 112,415bp. An indirect immunofluorescence test with a monoclonal antibody and PCR are commonly used for the rapid diagnosis of RSIV infected fish in the field. For the control of this disease, a formalin-killed vaccine against red sea bream iridoviral disease was developed and now commercially available.

