特集2 魚類のウイルス

3. 魚類におけるイリドウイルス病

中島 員洋

(水産庁養殖研究所病理部)

はじめに

近年、我が国において、ウイルスに起因する海産養殖魚の病気が産業的に大きな問題となっている。なかでも、イリドウイルス病が海産養殖魚に及ぼす被害は甚大であり、その防除対策の確立は急務となっている。

今回、魚類のイリドウイルスについて概要を説明するとともに、日本で大きな問題となっているマダイイリドウイルス病および原因ウイルスについて、私達の現在までの研究内容について述べてみたい。

魚類のイリドウイルス

イリドウイルス科は、2本鎖DNAをもつ大型ウイルスの科で正20面体構造を有し、細胞質で増殖する。魚類、両生類などの脊椎動物から、また無脊椎動物では、昆虫を主とする節足動物から多くが分離されている。また、カキ、タコなどからもこの科に属するウイルスが見いだされている。International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)²⁾によるとイリドウイルス科は、Iridovirus属、Chloriridovirus属、Ranavirus属、Lymphocystivirus属およびGoldfish virus 1-like virus属の5属に分類されている。Iridovirus属、chloriridovirus属には、昆虫を主とする節足動物のウイルスが知られており、Ranavirus属には、両生類(カエル、イモリ等)のウイルスが含まれる。かつてアフ

リカ豚コレラの原因ウイルスが、ホ乳類のイリドウイルスとしてイリドウイルス科に含まれていたが現在は除かれている。魚類を宿主とするウイルスは2属に含まれている。Lymphocystivirus属には、flounder virus (LCDV-1)と lymphocystis disease virus (dab isolates, LCDV-2)が入る。Goldfish virus 1-like virus属にはキンギョ由来の goldfish virus-1 (GFV-1) および goldfish virus 2 (GFV-2)が含まれている。

Ahne³⁾は魚類のイリドウイルスを生物学的特性に基づいて4グループに分類している。グループ1には、皮膚に向性のあるイリドウイルスが含まれる。硬骨魚11目45科に属する140種類以上の魚が、このグループに属するウイルスに感染する。先の分類の lymphocystivirus 属ウイルスがこのグループに入る。このグループに属するウイルス粒子の大きさは130~380nmと様々であり、皮膚の結合組織細胞がウイルスの感染を受けて巨大化する。この巨大化した細胞はリンホシスチス細胞、このような細胞が形成されるとリンホシスチス病と呼ばれている。日本の養殖魚では現在までのところ、ブリ、マダイ、スズキ、ヒラメなどのリンホシスチス病が知られている。ウイルスの分離培養はできていない。グループ2には、病状を呈していないキンギョから分離されたイリドウイルスが入る。このウイルスの粒子の直径は180nmで、キンギョには病徴を起こさない。先の分類では Goldfish virus 1-like virus 属の GFV-1, GFV-2がこのグループに含まれる。グループ3には、ウイルス性赤血球壊死症の原因となるウイルスが含まれる。カナダ大西洋岸のタラなど数種の海産魚において赤血球の細胞質内に1μm程度のエオシン好性封入体がみられ、核が融解する疾病が報告されて以来、サケ科魚類、ニシンなど数多くの魚種で本ウイルスの感染が報告されている。感染赤血球の電子顕微鏡観察に

Iridovirus infection in fish

Kazuhiro Nakajima

Fish Pathology Division, National
Research Institute of Aquaculture,
Fisheries Agency

Nansei, Watarai, Mie 516-01

〒516-01 三重県度会郡南勢町中津浜浦422-1

表1 魚類のイリドウイルス

ウイルス名	宿主	*病名	ウイルス分離の可否	著 者
Lymphocystis disease virus(LCDV)	140種類以上の淡水魚, 海産魚	リンホシスチス病	電顕観察のみ	Wolf, 1962 ²⁶⁾
Viral erythrocytic necrosis virus(VENV)	20種類以上の淡水魚, 海産魚	ウイルス性赤血球壊死症	電顕観察のみ	Appy <i>et al.</i> , 1976 ⁵⁾
Cod iridovirus	大西洋タラ		ウイルス分離可	Jensen <i>et al.</i> , 1979 ¹²⁾
Cichlid iridovirus	Ramirez dwarf cichlid		電顕観察のみ	Leibovitz & Riis, 1980 ¹⁷⁾
Carp iridovirus (CCIV)	コイ		電顕観察のみ	Shchelkunov & Shchelkunova, 1981 ²⁵⁾
Japanese eel iridovirus	ニホンウナギ		ウイルス分離可	Sorimachi & Egusa, 1982 ²⁴⁾
Goldfish iridovirus (GFV)	キンギョ		ウイルス分離可	Berry <i>et al.</i> , 1983 ⁵⁾
Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)	レッドフィンパーチ	流行性造血器壊死症	ウイルス分離可	Langdon <i>et al.</i> , 1986 ¹⁶⁾
White sturgeon iridovirus(WSIV)	シロチョウザメ		ウイルス分離可	Hedrick <i>et al.</i> , 1990 ⁹⁾
Sheatfish iridovirus	シートフィッシュ		ウイルス分離可	Ahne <i>et al.</i> , 1989 ¹⁾
Chromid cichlid iridovirus	Chromide cichlid		電顕観察のみ	Armstrong & Ferguson, 1989 ⁴⁾
Catfish iridovirus	キャットフィッシュ		ウイルス分離可	Pozet <i>et al.</i> , 1992 ²³⁾
Red sea bream iridovirus (RSIV)	マダイ他海産魚	マダイイリドウイルス病	ウイルス分離可	Inouye <i>et al.</i> , 1992 ¹¹⁾
Turbot iridovirus	ターボット		電顕観察のみ	Bloch & Larsen, 1993 ⁶⁾

*日本魚病学会で選定されている魚病名のみ示した。

より細胞質中に病原ウイルスが見いだされる。粒子の大きさは魚種により異なり、150～360nm と大きな幅がある。病原ウイルスの分離培養はいまだできていない。グループ4には、オーストラリアでレッドフィンパーチから分離されたイリドウイルス (epizootic haematopoietic necrosis virus) が入る。流行性造血器壊死症の原因ウイルスであり、粒子の大きさは130～170 nm である。

現在までに報告されている魚類のイリドウイルスの主なものを表1に示した。

ただし、表1に示したイリドウイルスがすべて、上記の4グループに入るわけではない。これらの内、比較的良く研究されているものとして、古くから研究されている lymphocystis disease virus, viral erythrocytic necrosis virus の他、近年報告が増えつつある epizootic haematopoietic necrosis virus^{8), 10), 16)} および後述するマダイから分離した red sea bream iridovirus (RSIV, マダイイリドウイルス)¹¹⁾がある。また我が国では、lymphocystis disease virus, Japanese eel iridovirus, マダイイリドウイルスの存在が知られている。

マダイイリドウイルス病

タイ類の養殖は、生産量73,000トン、生産額659億円(1993)で、ブリ類につぎ、海面養殖業の主要魚種と

なっている。マダイの疾病には、細菌性疾病、寄生虫症等が知られているが、近年、イリドウイルス病による被害が大きな問題となっている。

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、マダイの大量斃死を引き起こした。病気は水温が20℃程度まで低下した11月になると自然に終息したが、1991年以後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。病魚の病理組織学的検討ならびに電子顕微鏡による観察の結果、ウイルス粒子が確認され、病魚磨砕ろ液による接種実験によって自然発病と同様の病変が認められたことから、ウイルス感染が原因であることが明らかになり、主にその形態学的特徴からイリドウイルス科に分類されている。

また、近年ではマダイ以外にもブリ等の各種の養殖魚種にマダイイリドウイルス病と類似する病気が多発し、産業的に大きな問題となっている。

病魚の外観および解剖所見

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。

図1 マダイイリドウイルス感染GF細胞内のイリドウイルス(スケール:250nm)(吉田茂氏提供)

病理組織学的所見

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(異形肥大細胞)の出現が特徴である¹¹⁾。異形肥大細胞は、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異形肥大細胞が観察される。

電子顕微鏡による観察所見

電子顕微鏡による観察では、前述の異形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もつ等、イリドウイルスに特徴的な形態を有する。赤血球細胞にはウイルス粒子は全く観察されなかった。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。

原因ウイルスの培養細胞による分離

病魚の脾臓磨砕液をBF-2, FHM, RTG-2, CHSE-214, KRE-3などの魚由来の株化細胞に接種し20~25℃で培養すると、数日後にはいずれの細胞においても肥大球形化を特徴とするCPEが発現するが、他の魚類ウイルスにみられるような急激な細胞の崩壊は示さない。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、イサキの鰭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¹³⁾。マダイイリドウイルス感染GF細胞中のマダイイリドウイルスの電顕写真を図1に示した。

物理化学的性状

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。フィルター法では220nmでわずかに通過する。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¹⁸⁾。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ものと考えられた。

魚類におけるイリドウイルス病としては、リンホシス病やウイルス性赤血球壊死症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り、マダイのイリドウイルスは既報の魚類イリドウイルスとは異なる新しい種と考えられる。

海産養殖魚に対する病原性

マダイ病魚の脾臓磨砕液あるいはウイルス培養液をマダイ稚魚の腹腔内に接種すると、接種4, 5日後から徐々に摂餌不良、体色の黒化や褪色、スレ等が認められ、次第に動作も緩慢となって死亡する。マダイでは稚魚も小さいほど感受性が高い傾向がある。斃死魚は自然発病魚と同様に鰓や肝臓の貧血、脾臓の腫大を特徴とする。マダイの実験感染魚で肥大細胞の出現を経時的にみると、脾臓で最も早く、3, 4日後には観察されはじめ、時間経過とともに肥大細胞の増加と大型化が認められ、斃死のピークの7~10日が最大となる。18~30℃の範囲で飼育水温と発病との関連を調べると、水温が高いほど致死日数は短く斃死率が高い。20℃前後では発病は著しく低下し、18℃での発病は認められない。これらの結果は、自然における発病とはほぼ一致するものである。

ブリ稚魚についても同様の感染実験を試みたところ、病原性が確認された。

マダイイリドウイルス誘導抗原に対する単クローン抗体の作製

単クローン抗体の作製は、マダイイリドウイルス感染 BF-2 細胞を超音波処理により可溶化後、フロインド完全アジュバントと混合して免疫原とし、マウスの腹腔内に接種した。約 1 ヶ月後にマウスから脾臓を摘出し、免疫マウス脾細胞とマウスミエローマ細胞との融合を行い、単クローン抗体を産生するクローンを選択して培養した。これらのハイブリドーマから得られる単クローン抗体のスクリーニングは間接蛍光抗体法により行った。すなわち、単クローン抗体をマダイイリドウイルス感染 BF-2 細胞とウイルス非感染細胞とに反応させ、次にマウスの抗体に対して蛍光標識した抗体（二次抗体）を反応させて蛍光を観察した。その結果、マダイイリドウイルス感染細胞と特異的に反応し、非感染細胞とは反応しない抗体を産生する 20 クローンのハイブリドーマクローンを得ることができた¹⁹⁾。

得られた単クローン抗体の認識抗原を、免疫沈澱法、SDS-PAGE を用いて解析した結果、19 クローンが 230/180kDa の蛋白を認識し、1 クローンは 20/16kDa の蛋白を認識することが明らかになった¹⁹⁾。また、金コロイド法による免疫電子顕微鏡による観察を行った結果、230/180kDa に対する抗体は、ウイルス粒子とは反応せず、ウイルス感染細胞表面に存在するウイルス誘導抗原と反応することが明らかになった²²⁾。

単クローン抗体の各種イリドウイルス分離株に対する反応性

マダイ由来イリドウイルスとして単クローン抗体の作製に用いた愛媛県株および鹿児島県と三重県のマダイ病魚から分離した 3 株を、またスズキおよびイシダイ由来イリドウイルスとして愛媛県のそれぞれの病魚から分離したウイルス 1 株ずつを BF-2 細胞で培養し、得られた単クローン抗体の反応性を検討した。その結果、マダイ由来のイリドウイルス 3 株とスズキ由来のイリドウイルスはいずれも得られた 20 の単クローン抗体と同様の反応性を示した。イシダイ由来のイリドウイルスはマダイおよびスズキ由来株と多少異なる反応性を示したが、共通の抗原決定基も存在した。一方、ウナギ由来のイリドウイルス (Japanese eel iridovirus)、カエル由来のイリドウイルス (Frog virus 3) とは全く反応せず、今回作製した単クローン抗体はマダイをはじめとする海産魚のイリドウイルスとのみ特異的に反応することが明らかになった。

図 2 マダイイリドウイルス病罹病マダイ脾臓スタンプ標本（蛍光抗体法）中の異形肥大細胞（スケール：50 μ m）

単クローン抗体を用いた間接蛍光抗体法によるマダイイリドウイルス病の診断方法

前述のごとく、マダイイリドウイルス病は産業的被害が大きいことから、迅速で正確な診断法の確立が強く望まれていた。そこで、得られた単クローン抗体を用いて間接蛍光抗体法を用いた簡易診断法を確立した。

まず、作製した 230/180kDa 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、マダイイリドウイルスを実験感染させたマダイ稚魚からウイ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、ウイルス抗原が検出された。また、一部生残魚においてもウイ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。

そこで、この方法を用い県水産試験場の協力のもとに、1994年に西日本の養殖場で発生したイリドウイルス感染の疑われた病魚 738 検体についてイリドウイルスの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、トラフグおよびキジハタのスズキ亜目 5 科 7 属 10 種、フグ亜目 1 科 1 属 1 種の計 11 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マダイイリドウイルスと共通の反応性を示すウイルス抗原が検出された。これらの事実はこの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の海産養殖魚のイリドウイルス病の迅速診断に有効であることを示している²⁰⁾。

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はなく、大型魚の感染も認められた。マダイの脾臓スタンプ標本から検出された蛍光陽性細胞像を図2に示した。本蛍光抗体法では異形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。

不活化ワクチンによる防御能の誘導

本病に対するワクチン利用の可能性を検討するためホルマリン不活化マダイイリドウイルス感染GF細胞またはホルマリン不活化培養上清のワクチンを腹腔内に接種して免疫したところ、いずれのワクチン接種魚も対照魚に比べ攻撃後の死亡率が低く、ワクチンによる防御能の誘導が確認された²¹⁾。現在、実用化を目指して、ワクチンの大量生産方法の確立、ワクチンの投与方法の検討（浸漬ワクチン、投与スケジュール等の検討）を行っている。

ウイルス遺伝子の解析

マダイイリドウイルス遺伝子の解析は、緒についたばかりである。マダイイリドウイルス感染GF細胞培養上清から塩化セシウム密度勾配による超速心法により、ウイルス粒子を精製し、ウイルスゲノムDNAを抽出した。さらに、ゲノムライブラリーを作製し、塩基配列を決定した。これらは、その遺伝子配列からマダイイリドウイルスのATPase遺伝子、DNA Polymerase遺伝子、RNA polymerase遺伝子の一部と考えられた¹⁴⁾。また、これらを基に、PCRプライマーを作製し、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により目的断片が増幅され、PCR法による診断の可能性が示唆された¹⁵⁾。今後は、野外より広範にマダイイリドウイルス感染の疑われるサンプルを収集、解析し、PCR法による診断法の確立を図る予定である。

おわりに

魚類のイリドウイルスにおいては、lymphocystis disease virusは古くから広範な研究が行われているが、他のウイルスに関しては、一部の解析が行われているのみである。特に、現在問題となっているマダイイリドウイルス病の原因ウイルスに関しても株間の違い、他の海産魚から分離されたイリドウイルスとの違い、既報のイリドウイルスとの比較等研究すべき点は多く残されている。

また、本文中で魚のイリドウイルスとして述べたものの多くは、本来イリドウイルス様ウイルスと記述す

べきで、これらについては詳細な解析を行い分類学的な位置付けを明らかにする必要がある。

マダイイリドウイルス病は、1990年に発生したが、この原因ウイルスがどこから来たのか、輸入種苗とともに海外から侵入してきたウイルスであるのか、もともと日本の沿岸域あるいは養殖場のどこかに存在していたウイルスか、本来の宿主動物は何か、また、他の動物のイリドウイルスとの遺伝子、あるいは進化上の関連はどうなっているか等興味深い点が多くある。魚のウイルス研究は、主に水産分野の魚病研究者を中心に魚病問題解決を主眼に研究に取り組んでいる。他の研究分野の方に、特にウイルス学的見地から、多くの方に興味をもっていただき御助言いただければ幸いです。

文 献

- 1) Ahne, W., Schlotfeldt, H.J. and Thomsen, I. (1989) Fish viruses: Isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). J. Vet. Med. B **36**, 333-336.
- 2) Ahne, W. (1992) Classification and nomenclature of fish viruses In: Proceedings of the OJI international symposium on salmonid diseases (Kimura, T. ed.)
- 3) Appy, R.G., Burt, M.D.B. and Morris, T.J. (1976) Viral nature of piscine erythrocytic necrosis (PEN) in the blood of Atlantic cod (*Gadus morhua*). J. Fish. Res. Board Can. **33**, 1380-1385.
- 4) Armstrong, R.D. and Ferguson, H.W. (1989) Systemic viral disease of the chromide cichlid *Etroplus maculatus*. Dis. aquat. Org. **7**, 155-157.
- 5) Berry, E. S., Shea, T. B. and Gabliks, J. (1983) Two iridovirus isolates from *Carassius auratus* (L.). J. Fish Dis. **6**, 501-510.
- 6) Bloch, B. and Larsen, J.L. (1993) An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. Dis. aquat. Org. **15**, 235-240.
- 7) Goorha, R. (1995) Family Iridoviridae In: Virus taxonomy (Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D. H.L., Ghabrial, S.A., Tarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. eds.), 95-99. Wien, Springer-Verlag
- 8) Gould, A.R., Hyatt, A.D., Hengstberger, S.H., Whittington, R.J. and Coupar, B.E.H. (1995) A polymerase chain reaction (PCR) to detect epizootic haematopoietic necrosis virus and Bohle iridovirus. Dis. aquat. Org. **22**, 211-215.
- 9) Hedrick, R.P., Groff, J.M., McDowell, T. and Wingfield, W.H. (1990) An iridovirus infection of the integument of the white sturgeon *Acipenser transmontanus*. Dis. aquat. Org. **8**, 39-44.

- 10) Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Ahne, W., Torhy, C. and de Kinkelin, P. (1992) Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. aquat. Org.* **13**. 203-209.
- 11) 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 (1992) 養殖マダイのイリドウイルス感染症. *魚病研究*, **27**, 19-27
- 12) Jensen, N.J. Bloch, B. and Larsen, J. L. (1979) The ulcus-syndrome in cod (*Gadus morhua*). III. A preliminary virological report. *Nord. Vet. Med.* **31**. 436-442.
- 13) 栗田潤, 中島員洋, 反町稔 (1994) G F細胞によるマダイイリドウイルスの培養. 平成6年度日本魚病学会秋季大会講演要旨集 P17
- 14) 栗田潤, 中島員洋, 広野育生, 青木宙 (1996) マダイイリドウイルスのゲノムより得られた遺伝子について. 平成8年度日本魚病学会春季大会講演要旨集 P7
- 15) 栗田潤, 中島員洋, 前野幸男, 広野育生, 青木宙 (1996) “マダイイリドウイルス病”のPCR診断. 平成8年度日本魚病学会春季大会講演要旨集 P14
- 16) Langdon, J.S., Humphrey, J.D. and Williams, L. M. (1986) First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from red-fin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.* **9**. 263-268.
- 17) Leibovitz, L. and Riis, R. C. (1980) A viral disease of aquarium fish. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **177**. 414-416.
- 18) Nakajima, K. and Sorimachi, M. (1994) Biological and physico-chemical properties of iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Path.* **24**. 29-33.
- 19) Nakajima, K. and Sorimachi, M. (1995) Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus. *Fish Path.* **30**. 47-52.
- 20) Nakajima, K., Maeno, Y., Fukudome, M., Fukuda, Y., Tanaka, S., Matsuoka, S. and Sorimachi, M. (1995) Immunofluorescence test for the rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using monoclonal antibody. *Fish Path.* **30**. 115-119.
- 21) 中島員洋, 前野幸男, 栗田潤, 乾靖夫 (1995) 不活化ワクチンによるマダイイリドウイルス感染症に対する防御能の誘導. 平成7年度日本魚病学会秋季大会講演要旨集 P17
- 22) 中島員洋, 真鍋貞夫, 小野耕一, 今川忠, 乾靖夫 (1996) マダイイリドウイルスに対する単クローン抗体の認識抗原の解析. 平成8年度日本魚病学会春季大会講演要旨集 P9
- 23) Pozet, F., Morand, M., Moussa, A., Torhy, C. and de Kinkelin, P. (1992) Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish *Ictalurus melas*. *Dis. aquat. Org.* **14**. 35-42.
- 24) 反町稔, 江草周三 (1982) 養殖ウナギから分離されたウイルスの性状と分布. *魚病研究* **3**. 97-105.
- 25) Shchelkunov, I. S. & Shchelkunova, T. I. (1981) Results of virological investigations of carp diseased with gill necrosis. In: *Fish, Pathogens and Environment in European Poly-culture* (ed. by Olah, J., Molnar K. & Jeney, Zs), pp.466-482. Szarvas, Hungary.
- 26) Wolf, K. (1962) Experimental propagation of lymphocystis disease of fishes. *Virology* **18**. 249-256.