

日本鰻魚 (*Anguilla japonica*) 對 *Edwardsiella anguillimortiferum* & *Aeromonas hydrophila* 抗原之免疫反應

宋延齡·郭光雄*

The Immuno-responses of Eel (*Anguilla japonica*) Inoculated with *Edwardsiella anguillimortiferum* & *Aeromonas hydrophila* Antigens

Yen-Ling SONG and Guang-Hsiung Kou*

(Received Nov. 30, 1977)

Active immunization of the cultured eel was studied with *Edwardsiella anguillimortiferum* and *Aeromonas hydrophila*. They are pathogens of edwardsiellosis and red fin disease, respectively. The results were as following:

1. The immune response of eel was induced by intraperitoneal injection of heat or formalin-killed *E. anguillimortiferum*. The agglutinating titers reached their maxima (4096) two to six weeks after immunization. It seems that the immunized eels showed a higher resistant than the controlled ones.

2. The antibodies induced by the formalin-killed *E. anguillimortiferum* lasted longer than those induced by the heat-killed one.

3. Same antigenic determinants were common in both *E. anguillimortiferum* and *A. hydrophila*. Mixed injection of *E. anguillimortiferum* and *A. hydrophila* could enhance the agglutinating titer.

4. The antigenicity of *E. anguillimortiferum* was stronger than that of *A. hydrophila*.

緒 言

養殖鰻常發生一種肝臟、腎臟及體表潰瘍的疾病，少數病鰻在鰓與腸亦有上述症狀。每年春季水溫發生劇烈變化時或夏季水溫高時，此病常造成重大的損失。鰻魚每年因病害所受之損失約為一萬噸，其中三分之一之損失為本病造成，此種病症吾人稱為「潰瘍病」(Edwardsiellosis)，為一種革蘭氏陰性，具運動性，cytochrome oxidase 陰性，有發酵性，可產生 indol 及 lysine decarboxylase 之周鞭毛桿菌⁽¹⁵⁾引起之疾病；其病原菌為 *Edwardsiella anguillimortiferum*，常侵襲造血組織 (Hematopoietic tissue)，造成體表特別是腹部之充血。本病之外觀症狀與 *Aeromonas hydrophila* 所造成之赤鰓病類似，且二者常共同感染^(12,13)，但致病機構却迥異，後者可產生出血性毒素 (hemorrhagic toxin) 及壞死性毒素 (necrotic toxin)⁽¹⁷⁾，但 *E. anguillimortiferum* 却不具有此二種毒素，其造成出血係因組織被分解所產生之毒素引起⁽⁵⁾。一般情形病鰻常不攝餌，於是利用 sulfonamides & oxytetracycline⁽¹⁸⁾ 等化學藥劑療法就發生困難，因此不得不在疾病預防方面想辦法，「免疫」是最佳的預防方法。

魚類方面的免疫最初是由 Babes & Riegler 於 1903 年發現。此後細菌與病毒的口服疫苗應用於

* 國立臺灣大學理學院動物學研究所 (Institute of Zoology, College of Science, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Republic of China.)

鮭魚與鯉魚類疾病之預防有很大的進展^(1-3,7,8)。另外病原菌粹取物做為抗原注射入魚體也可獲得對疾病之抵抗力^(6,12,20)。目前 *Vibrio anguillarum* 及 IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus) 已達可實用之階段⁽⁹⁾。本實驗為探討疫苗之可行性擬以 *E. anguillimortiferum* 經由不同方式處理做為抗原，比較何者可使鰻魚得到最佳保護性抗體。同時試探此種疫苗對赤鱗病是否亦有保護效果，亦即比較 *E. anguillimortiferum* 與 *A. hydrophila* 之抗原成份，期能一舉而控制此二種最困擾養鰻事業之疾病。

材料與方法

一、細菌培養：

將 *E. anguillimortiferum* (株號 760603-2 skin)，於 28°C 培養於普通寒天平板培養基，48 小時後，以 0.85% 滅菌食鹽水沖洗下來，於 0°C 400 rpm 離心，取沉澱，再以滅菌食鹽水清洗離心三次，取沉澱，溶於 0.85% 滅菌食鹽水做成菌懸浮液。*A. hydrophila* 亦以同法做成菌懸浮液。

二、疫苗製造：

(1) 加熱死菌：*E. anguillimortiferum* 菌懸浮液在 56°C 加熱 30 分，做為抗原。

(2) 福馬林死菌：將 *E. anguillimortiferum* 培養 48 小時後，以 0.85% 滅菌食鹽水沖洗下來，清洗離心三次，取沉澱，溶於 0.5% 之福馬林生理食鹽水，於室溫下放置數天，做為抗原。*A. hydrophila* 亦以同法處理得到福馬林死菌抗原。

以上抗原各取 0.4 ml 分別接種於 10 ml 之 Fluid thioglycolate medium，於 37°C 培養 48 小時，檢驗是否有未殺死之活菌。若全為死菌，再以 0.85% 滅菌食鹽水稀釋，至其混濁度等於 McFarland scale 中第 4 試管，濃度為 1.2×10^8 cell/ml。

(3) 福馬林混合死菌：將 *E. anguillimortiferum* 福馬林死菌與 *A. hydrophila* 福馬林死菌等量混合。

三、免疫過程：

1. 鰻魚之蕃養：33×36×76 cm 之玻璃水槽清洗乾淨，加入 20 升之自來水，投入數粒 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ，打氣，24 小時後備用。自桃園漁殖管理處採購每尾約 160 g 之健康鰻，以 Nitrofurantoin P-7138 10 ppm⁽⁴⁾ 藥浴 15 分，再以 1 ppm 上野甲基藍⁽²⁶⁾ 浸浴 24 小時後移至玻璃水槽中，每水槽放 4~6 尾，靜置 2 天後，進行實驗。實驗期間不投餌，水溫在 20~30°C 之間。

等量之抗原與佐劑 (Freund's complete adjuvant Difco) 混合均勻成白色乳狀。用 1.5% Urethane (Ethyl carbamate) 麻醉鰻魚，從腹腔注射，劑量為 0.2 ml/100 g B. W.，7 天後第二次注射，劑量為 0.3 ml/100 g B. W.，再隔 7 天最後一次注射，劑量為 0.4 ml/100 g B. W.。第二與第三次注射佐劑則以 Freund's incomplete adjuvant Difco 代替。第 3 次注射後每隔一星期殺 6 尾，從動脈球 (bulbus arteriosus) 採血，於 0°C 4000 rpm 20 分鐘離心後取得血清，測血清中凝集抗體力價 (agglutination antibody titer)，至第 6 星期為止。自然對照組 (natural control) 不經任何處理以同法採血，測血清中凝集抗體力價。

2. 凝集抗體力價之測定：血清分為兩組，以 0.85% 滅菌食鹽水 2 倍連續稀釋 ($2 \times -8192 \times$)，分別加入等量之 *E. anguillimortiferum* 及 *A. hydrophila* 活菌懸浮液，其混濁度等於 McFarland scale 中第 2 試管，濃度為 6.0×10^8 cells/ml，振盪使充份混合，於 28°C 作用 24 小時，記錄凝集抗體之力價。

3. 吸收實驗 (Absorption test)：*E. anguillimortiferum* 活菌懸浮液等量加入鰻血清，振盪使充份混合，28°C 作用 24 小時，離心去其沉澱。同法重覆數此至無沉澱為止。取其上層液，加入等量之 *A. hydrophila* 活菌懸浮液，測其抗體力價。活菌懸浮液之濃度均為 6.0×10^8 cells/ml。

4. 再攻擊實驗 (Challenge test):

(1) 菌浴法 (Contact method)⁽⁴³⁾: 將 *E. anguillimortiferum* 接種於 5 ml 之 Nutrient broth, 28°C 培養 48 小時, 將此 5 ml 菌液全部接種於 100 ml Nutrient broth, 於 28°C 振盪培養 48 小時, 再以滅菌之蒸餾水稀釋 10 倍, 此時菌濃度為 1.5×10^8 cells/ml。經福馬林混合死菌免疫 3 星期後之魚浸入此稀釋菌液中 20 分鐘後撈出, 放入水槽內蓄養。觀察期為 2 星期, 每天檢查發病狀況與死亡情形, 死亡魚做菌種鑑定, 以確證其死亡原因。對照組則以未經處理過之鰻同法感染。

(2) 腹腔注射感染法: *E. anguillimortiferum* 於 28°C 培養於普通寒天平板培養基, 48 小時後, 刮取濕菌溶解於滅菌之 0.85% 食鹽水, 濃度為 20 mg/ml, 從腹腔注射免疫 3 星期之魚, 劑量為 0.1 ml/100 g B. W.⁽⁴⁴⁾。其餘與菌浴法相同。

結 果

以 *E. anguillimortiferum* 加熱死菌免疫鰻魚, 每隔一星期殺 6 尾, 測血清中抗 *E. anguillimortiferum* 抗體 (Anti-E) 之力價, 其結果見表 1 及圖 1。抗體力價平均以第三星期達最高, 可達 4096, 以後則逐漸降低。但第六星期後又略有上升。

Table 1. The agglutination antibody titers of eels inoculated with the heat-killed *E. anguillimortiferum* (Strain No. 760603-2 skin)

Duration (wk)	B. W. (g)	B. L. (cm)	Antibody titers against <i>E. anguillimortiferum</i>	Mean \pm S. E.
1	160	47.0	512	469.3 \pm 104.5
	130	46.0	512	
	130	46.0	256	
	160	48.5	512	
	90	42.1	512	
	210	55.0	512	
2	70	39.2	512	1280.0 \pm 841.3
	200	54.5	512	
	150	51.5	2048	
	140	51.5	2048	
	160	53.0	512	
	170	52.0	2048	
3	150	50.5	2048	2389.3 \pm 1399.1
	180	48.5	4096	
	180	51.5	2048	
	180	48.0	1024	
	160	48.5	4096	
	120	48.0	1024	
4	300	59.0	1024	1365.3 \pm 528.8
	260	60.0	2048	
	120	57.0	2048	
	150	48.0	1024	
	150	52.5	1024	
	160	50.0	1024	
5	120	46.8	512	358.4 \pm 140.2
	110	46.7	256	
	140	47.3	256	
	110	45.3	512	
	110	47.2	256	
6	130	46.4	256	512.0 \pm 280.4
	150	48.2	512	
	100	44.8	256	
	90	44.4	512	
	120	49.5	1024	
	80	43.7	512	

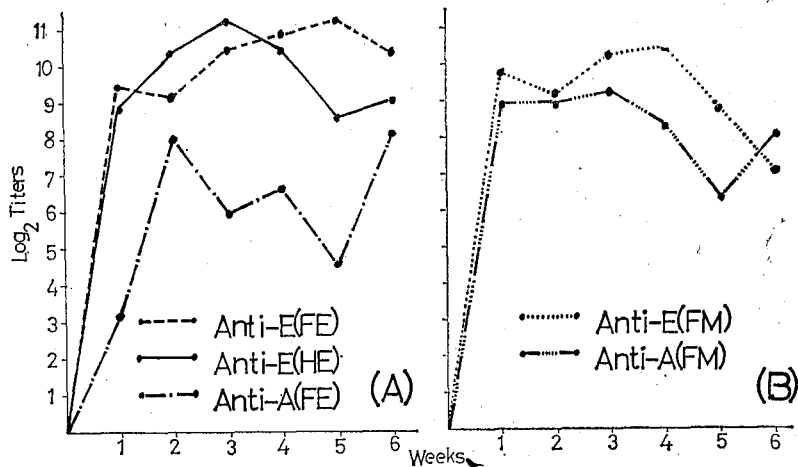


Fig. 1. The agglutination antibody titers of eels inoculated with the heat-killed (H) or formalin-killed (F) *E. anguillimortiferum* (Part A) and the mixture (M) (Part B) vaccines respectively.

以 *E. anguillimortiferum* 福馬林死菌免疫鰻魚，每隔一星期殺 6 尾，分別測血清中 Anti-E 之力價，其抗體力價平均以第 5 星期達最高，可達 4096。此外同尾鰻魚所取得之血清對 *A. hydrophila* 亦有凝集作用，唯此種抗體 (Anti-A) 力價低，最高僅達 512，見表 2 及圖 1。比較 *E. anguillimortiferum* 之加熱死菌與福馬林死菌，二者皆可誘使鰻魚產生特異性抗體，但疫苗注射後一個月內以加熱死菌所誘使之 Anti-E 力價略高，而一個月後則以福馬林死菌所誘使之 Anti-E 力價較高。

若 *E. anguillimortiferum* 福馬林死菌免疫鰻魚後所得之血清先被 *E. anguillimortiferum* 活菌懸浮液吸收後，則血清中 Anti-A 之效價則降為 0，見表 3。

E. anguillimortiferum 福馬林死菌與 *A. hydrophila* 之福馬林死菌混合疫苗免疫鰻魚，每隔一星期殺 6 尾，分別測血清中抗體力價，其結果 Anti-E 力價以第 4 星期為最高，可達 2048。同尾鰻魚之血清中 Anti-A 之力價以第 2 星期為最高，可達 4096。產生之二種抗體力價接近且曲線形狀亦近似，但 Anti-E 之力價比 Anti-A 之力價略高，見表 4 及圖 1。

又比較混合疫苗及純疫苗免疫鰻魚後抗體產生之情形。雖然混合疫苗中 *E. anguillimortiferum* 菌濃度僅相當 *E. anguillimortiferum* 福馬林死菌疫苗中菌濃度的一半，但二者所誘使 Anti-E 之力價及消長情形在一個月內類似，一個月以後則混合疫苗所誘使之 Anti-E 力價迅速下降，見圖 1。

再攻擊實驗之結果見表 5。二種感染方法中免疫組之死亡率均較對照組為低。以菌浴法感染時，免疫組在第 11 天有一尾死亡，死亡率為 6.6%；而對照組在第一天及第八天分別有一尾死亡，死亡率為 14.3%。而以腹腔注射感染時，免疫組在前 4 天死亡分別為 1 尾、2 尾、2 尾、1 尾，死亡率為 50.0%；而對照組在前 4 天死亡分別為 2 尾、3 尾、3 尾、2 尾，死亡率為 83.3%。其中因菌浴法死亡之魚，出現症狀較緩慢，但有明顯之病徵，即肛門、生殖孔紅腫，肝腎外側之皮膚出血，嚴重者潰爛。從腹腔注射感染後第 1 至第 4 天內雖有大量死亡，但一般外觀病徵不明顯，從第 3 天後死亡之魚才有肛門、腹部紅腫現象。剛死亡之魚從患部做菌種之鑑定，則確定為 *E. anguillimortiferum*。

討 論

利用 *E. anguillimortiferum* 死菌經由腹腔注射免疫鰻魚，可誘使鰻魚產生凝集抗體，在免疫後第 2 至第 6 星期產生抗體力價最高，可達 4096。Takahashi & Riichi (1971)⁽²⁴⁾ 利用 *A. hydrophila* 免疫鯉魚，以對抗立鱗病 (Scale protrusion) 之感染，在第 5 星期抗體力價達到最高，本實驗之結果

Table 2. The agglutination antibody titers of eels inoculated with the formalin-killed *E. anguillimortiferum* (Strain No. 760603-2 skin)

Duration (wk)	B. W. (g)	B. L. (cm)	Antibody titers against <i>E. anguillimortiferum</i>	Mean±S. E.	Antibody titers against <i>A. hydrophila</i>	Mean±S. E.
1	140	47.0	512	682.7± 264.4	8	8.5± 5.7
	100	41.2	512		2	
	90	41.8	1024		—	
	120	44.7	1024		16	
	120	44.6	512		8	
	120	46.8	512		—	
2	110	45.0	1024	565.3± 393.3	256	260.0±202.5
	130	46.6	256		—	
	120	43.3	64		—	
	130	46.6	512		256	
	130	48.0	512		16	
	150	51.4	1024		512	
3	100	—	1024	1365.3± 528.8	16	61.3± 38.4
	160	50.7	1024		128	
	120	47.0	1024		32	
	170	49.5	1024		64	
	130	47.8	2048		64	
	150	51.8	2048		64	
4	120	44.6	256	1740.8±1592.6	128	96 ± 45.3
	150	48.6	256		128	
	130	49.5	4096		32	
	130	45.0	2048		128	
	190	49.5	2048		64	
5	150	50.0	2048	2389.3±1399.1	32	22.7± 10.6
	150	47.5	4096		32	
	150	47.0	4096		32	
	160	49.0	1024		16	
	130	48.5	2048		16	
	130	47.0	1024		8	
6	130	47.0	1024	1280.0± 512.0	32	280.0±268.2
	160	49.0	2048		64	
	100	46.0	1024		512	
	70	43.0	1024		512	

Table 3. The changes of the antibody titers against *A. hydrophila* after absorption with *E. anguillimortiferum*

No. of eel serums	Duration after immunization (wk)	Antibody titers against <i>E. anguillimortiferum</i>	Antibody titers against <i>A. hydrophila</i>	Antibody titers against <i>A. hydrophila</i> after absorption with <i>E. anguillimortiferum</i>
1	3	1024	128	0
2	3	1024	32	0
3	3	1024	64	0
4	3	2048	64	0
5	3	2048	64	0
6	4	2048	128	0
7	4	2048	64	0
8	5	2048	32	0
9	5	4096	32	0
10	5	4096	32	0
11	5	1024	16	0
12	5	2048	16	0
13	5	1024	8	0
Natural control	—	0	0	0

Table 4. The agglutination antibody titers of eels inoculated with the mixture of the formalin-killed *E. anguillimortiferum* & *A. hydrophila*

Duration (wk)	B. W. (g)	B. L. (cm)	Antibody titers against <i>E. anguillimortiferum</i>	Mean \pm S. E.	Antibody titers against <i>A. hydrophila</i>	Mean \pm S. E.
1	90	43.0	1024	853.3 \pm 264.4	512	469.3 \pm 330.5
	110	47.0	512		1024	
	160	52.0	1024		128	
	100	46.5	512		512	
	140	50.0	1024		128	
	100	45.0	1024		512	
2	90	45.7	256	563.2 \pm 280.4	512	460.8 \pm 368.8
	110	45.2	512		512	
	90	41.5	512		128	
	170	51.7	1024		1024	
	140	51.2	512		128	
3	130	48.7	2048	1194.7 \pm 699.5	512	597.3 \pm 209.0
	110	45.8	2048		512	
	90	42.8	512		512	
	110	47.8	1024		512	
	150	50.2	512		1024	
	150	50.3	1024		512	
4	130	50.5	2048	1365.3 \pm 770.8	256	320.0 \pm 156.8
	140	48.7	1024		512	
	130	48.2	2048		256	
	150	49.0	2048		256	
	120	48.5	512		512	
	140	49.2	512		128	
5	100	46.8	256	409.6 \pm 140.2	32	80 \pm 55.4
	100	47.6	512		128	
	130	46.7	512		—	
	120	46.5	512		128	
	120	45.3	256		32	
6	140	47.2	128	128.0	256	256.0

Table 5. Comparison of challenges with contact method & intraperitoneal injection against *E. anguillimortiferum* between vaccinated & control eels

Infectious route	No. of fish	No. of deaths after challenge														Accumulative mortality (%)			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
Contact method	Vaccinated	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.6
	Control	14	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	14.3
Intraperitoneal injection	Vaccinated	12	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50.0
	Control	12	2	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83.3

Water temperature: 20-30°C.

與其類似。K. D. Spence⁽²³⁾ 等 (1965) 認為抗體力價超過 300，對再次感染即具抵抗力，而本實驗抗體力價高達 4096；雖然再攻學實驗獲知免疫組之死亡率均較對照組為低，而 Chi-square 分析結果並不顯著。

比較 *E. anguillimortiferum* 之加熱死菌與福馬林死菌抗原性 (Antigenicity) 得知：加熱死菌在免疫後一個月內產生抗體較高，但一個月後抗體產生則福馬林死菌超過加熱死菌，此可能因 *E. anguillimortiferum* 為周鞭毛桿菌，且蛋白質比多醣脂 (lipopolysaccharide) 之抗原性強⁽²⁸⁾。因此

免疫性之長久維持以福馬林死菌較佳，唯其詳細機構需待更進一步之研究。

另外由吸收實驗之結果，*E. anguillimortiferum* 與 *A. hydrophila* 有部份抗原決定基團 (antigenic determinant groups) 相同。此二種菌之福馬林死菌等量混合免疫鰻魚，結果抗 *E. anguillimortiferum* 之抗體力價比抗 *A. hydrophila* 之抗體力價略高；Song (1976)⁽²²⁾ 以 *A. hydrophila* 免疫鰻魚，抗體效價最高僅為 512；又 *E. anguillimortiferum* 為周鞭毛，而 *A. hydrophila* 為單鞭毛，周鞭毛菌之病原性比單鞭毛強，又一般病原性之強弱與抗原性成比例，可見 *E. anguillimortiferum* 之抗原性比 *A. hydrophila* 強。

混合疫苗中 *E. anguillimortiferum* 之濃度雖然僅為純疫苗時濃度之半，但凝集抗體產生量二者却相近，因而推知 *A. hydrophila* 之部份相同的抗原決定基團對 *E. anguillimortiferum* 之抗體產生有加強作用。此結果與 DPT (diphtheria-pertussis-tetanus)⁽²⁰⁾ 疫苗中，百日咳對於白喉毒素與破傷風毒素顯示出佐劑效果，而加強抗體產生為同樣之道理。至於此種混合疫苗對赤鯮病抗體之產生是否亦有同樣加強效果，則需更進一步之研究。

又由再攻擊實驗中菌浴法與腹腔注射法之結果顯示出：前者感染過程緩慢，可清晰觀察到病變特徵，進而確定病因，但感染至發病所需時間長，體弱之鰻易遭其他水生病原菌之侵害，而混淆實驗結果。至於腹腔注射雖然結果迅速，但病變外觀往往不及表現，鰻魚即死亡。所以隨著感染途徑與菌種病原性 (pathogenicity) 之改變而適時調整 MLD (minimal lethal dose) 實為一重要問題。

至於免疫效果之評估，除了將實驗魚暴露於病原菌使其受感染而後測定死亡率之外，更精確之方法亦有建立之必要。

本實驗中免疫鰻魚需人工注射三次，此舉對大規模養殖魚類很不實際，且處理過程中，驚擾 (stress) 會增加魚類疾病之發生，已有報告指出⁽²⁰⁾。從較高等脊椎動物之研究顯示：驚擾促進下視丘-腦下腺-腎上腺連鎖 (hypothalamic-pituitary-adrenal system) 之分泌，增加血液中腎上腺皮素 (corticosteroids) 的濃度，進而抑制細胞性或體液性之免疫反應 (cellular or humoral immunity)^(11, 21, 25)。雖然目前環境因素是否會抑制魚類之免疫反應還不清楚，然而對科賀鮭 (Coho salmon) 和鱒 (Trout) 之研究明白顯示：驚擾有促進下視丘-腦下腺-腎上腺連鎖之分泌，而使血液中 cortisol 之濃度升高⁽²⁷⁾。

因此如何尋求一種恰當的免疫方法，既可處理大量魚羣，又不致影響到魚的生理狀況，在節省人力的情況下達到最佳先疫效果，實為當前魚類免疫之最大課題。

摘 要

養殖鰻於每年春季水溫劇變或夏季高水溫時，易感染潰瘍病 (Edwardsiellosis)，造成重大損失。病原菌為 *Edwardsiella anguillimortiferum*，此病之外觀症狀與 *Aeromonas hydrophila* 造成之赤鯮病類似，常共同感染。本實驗以主動免疫嘗試預防此二種疫病，結果如下：

1. *E. anguillimortiferum* 之加熱死菌與福馬林死菌抗原由腹腔注射免疫鰻魚後第 2 至第 6 星期抗體產生效價最高，達 4096。利用菌浴法與腹腔注射再攻擊，免疫組之死亡率均較對照組低。
2. *E. anguillimortiferum* 之加熱死菌與福馬林死菌皆誘使鰻產生抗體，但免疫性之長久維持以福馬林死菌較佳。
3. *A. hydrophila* 與 *E. anguillimortiferum* 有部份抗原決定基團 (antigenic determinants) 相同。此相同部份對 *E. anguillimortiferum* 之抗體產生量有加強作用。
4. *E. anguillimortiferum* 對鰻之抗原性 (antigenicity) 比 *A. hydrophila* 強。

謝 辭

本研究報告承蒙行政院國家科學委員會之補助得以完成。並承水產試驗所東港分所廖所長一久博

士，臺灣大學動物學系黃主任仲嘉博士，臺灣大學動物學系客座副教授楊光雄博士等詳閱原稿及悉心指正，謹此一併誌謝。

參 考 文 獻

1. AMLACHER, E. (1970). Prophylaxis, hygiene and therapy. In Textbook of Fish Disease (Eds Conroy, D. A. & Herman, R. L.), pp. 66-80. London: T. F. H. Publications.
2. ANDERSON, D. P. and NELSON, J. R. (1974). Comparison of protection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) inoculated with and fed Hagerman redmouth bacterins. J. Fish. Res. Bd. Can., **31**, 214-216.
3. BULLOCK, G. L., CONROY, D. A. and SNIESZKO, S. F. (1971). Disease of fish. Book 2A. Bacterial diseases of fish. In Diseases of Fish (Eds Snieszko, S. F. & Axelrod, H. R.), pp. 1-151. London: T. F. H. Publications.
4. DONALD F. A. and A. J. ROSS (1970). Experimental control of Columnaris disease with a new Nitrofurantoin drug P-7138. Pro. Fish-Culturist, **32**(1), 19-25.
5. EGUSA, S. (1976). Some bacterial diseases of freshwater fishes in Japan. Fish Pathology, **10**(2), 103-114.
6. FINN, J. P. (1970). The protective mechanisms in disease of fish. Vet. Bull., Weybridge, **40**, 873-886.
7. FLETCHER, T. C. and WHITE, A. (1973). Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after oral and parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. Aquaculture, **1**, 417-428.
8. FRYER, J. L., NELSON, J. S. and GARRISON, R. L. (1972). Vibriosis in fish. Prog. fish food Sci. **5**, 129-133.
9. FRYER, J. L., J. S. ROHOVEC, G. L. TEBBIT, J. S. McMICHAEL and K. S. PILCHER (1976). Vaccination for control of infectious diseases in Pacific salmon. Fish Pathology, **10**(2), 155-164.
10. FUJIHARA, M. P. and NAKATANI, R. E. (1971). Antibody production and immune response of rainbow trout and coho salmon to *Chondrococcus columnaris*. J. Fish. Res. Bd. Can., **28**, 1253-1258.
11. GROSS, W. B. and SIGEL, P. B. (1973). Effect of social stress and steroids on antibody production. Avian Dis, **17**, 807-815.
12. HOSHINA, T. (1962). On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, **28**(2), 162-164.
13. _____ (1962). ウナギの鰭赤病に関する研究。東水大特別研究報告, **6**(1), 1-104.
14. KOU, G. H. (1973). Studies on the pathogenicity of the fish pathogen, *Aeromonas liquefaciens*-III. Variation of pathogenicity caused by inoculation into fish. J. Fish. Soc. Taiwan, **2**(2), 16-19.
15. MEYER, F. P. and G. L. BULLOCK (1973). *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Appl. Microbiol., **25**, 155-156.
16. PACHA, R. E. and E. J. ORDAL (1963). Epidermiology of Columnaris disease in salmon. Bacteriol. Proc., **63**, 3.
17. SHIMIZU T. (1969). Studies on pathogenic properties of *Aeromonas liquefaciens*-III. Some chemical and antigenic properties of toxic factors. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **35**(5), 423-429.
18. SHOTTS, E. B. and S. F. SNIESZKO (1976). Selected Fish Diseases. In Wildlife Diseases (Ed L. A. Page), pp. 143-151. New York: Penum Publishing Co.
19. SNIESZKO, S. F. (1970). Immunization of fishes: a review. Dis. **6**, 24-30.
20. _____ (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases. J. Fish Biol., **6**, 197-208.
21. SOLOMON, G. F. (1969). Stress and antibody response in rats. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **35**, 97-104.
22. SONG, Y. L., S. N. CHEN and G. H. KOU (1976). Agglutinating antibodies production and protection in eel (*Anguilla japonica*) inoculated with *Aeromonas hydrophila* (*A. liquefaciens*) antigens J. Fish Soc. Taiwan, **4**(2), 25-29.
23. SPENCE, K. D., J. L. FRYER and K. S. PILCHER (1965). Can. J. Microbiol., **11**, 397-406.
24. TAKAHASHI, Y. and K. RIICHI (1971). Studies on the scale protrusion disease of carp fishes-II. Immune response of carp to *Aeromonas liquefaciens*. Fish Pathology, **6**(1), 24-29.
25. THAXTON, P. and H. S. SIEGEL (1972). Depression of secondary immunity by high environmental temperature. Poult. Sci., **51**, 1519-1526.
26. VAN DUIN JNR. C. (1967). Fungus infection. In Diseases of Fishes. p. 81, London: Iliffe Books.
27. WEDEMEYER, G. (1970). The role of stress in disease resistance of fishes. In symposium on diseases of fishes and shellfishes. S. F. Snieszko (ed). Special publication No. 5, American Fisheries Soc. Washington, DC, 30-35.
28. WEISER, MYRVIK and PEARSALL. (1969). Fundamentals of Immunology, p. 9.
29. _____ (1969). Fundamentals of Immunology, p. 40.