ブリの腸球菌症実験感染における *Enterococcus seriolicida* 水平感染に及ぼす溶存酸素の影響

福田 穰^{*1}・舞田正志^{*2}・佐藤公一^{*1}・山本 浩^{*3}
岡本信明^{*2}・池田彌生^{*2}

(1996年9月6日 受付)

Effects of Dissolved Oxygen Concentration on Experimental Horizontal Transmission of Induced by Artificial Infection with *Enterococcus seriolicida* in Yellowtail

Yutaka Fukuda^{*1}, Masashi Maita^{*2}, Koh-ichi Satoh^{*1}, Hiroshi Yamamoto^{*3},
Nobuaki Okamoto^{*2} and Yayoi Ikeda^{*2}

^{*1}Oita Institute of Marine and Fisheries Science, Kamiura, Oita 879-26, Japan

^{*2}Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Minato, Tokyo 108, Japan

^{*3}Yanmar Marine Farm, Musashi, Oita 873-04, Japan

(Received September 6, 1996)

Yellowtail *Seriola quinqueradiata* were experimentally infected with *Enterococcus seriolicida* in order to investigate the effect of dissolved oxygen (DO) on horizontal transmission. Forty-five fish orally inoculated with *E. seriolicida* (2.9×10^9 CFU/fish) (donor fish) and an equal number of non-inoculated fish (recipient fish) were reared in separated net cages kept in a tank with high oxygen concentration (HDO, 112~161% oxygen saturation) for 20 days. The same set of fish was kept in another tank with low oxygen concentration (LDO, 59~82% oxygen saturation).

Average mortality of the donor fish in LDO group was higher than that of HDO group. Although there was no mortality among recipient fish in HDO tank, 5 recipient fish died in LDO tank. *E. seriolicida* was isolated from the recipient fish in LDO tank, but not from those in HDO tank. The venous blood oxygen tensions of the recipient fish in LDO tank were significantly lower than a control value measured prior to the experiment.

These results indicated that horizontal transmission occurs more easily among yellowtail kept in hypoxic than in hyperoxic conditions.

Key words: yellowtail, *Enterococcus seriolicida*, dissolved oxygen, horizontal transmission

ブリ *Seriola quinqueradiata* の腸球菌症 (楠田ら, 1976; Kusuda *et al.*, 1991) は, ブリ養殖業に大きな経済的被害を与えている重要疾病である。本症に対して養殖現場では死亡率を低減させるため, 主としてマクロライド系抗生物質やリンコマイシンなどの薬剤を用いた化学療法が行われているが, 近年, 原因細菌 *Enterococcus seriolicida* (最近 *E. seriolicida* は *Lactococcus garvieae* のジュニア・

シノニムであるとの報告 (Eldar *et al.*, 1996) があるが, ここでは従来にならい *E. seriolicida* なる種名を用いる) の多剤耐性化により (Aoki *et al.*, 1990), 化学療法による対処が困難になってきている。一方, 腸球菌症は環境や飼育管理の不適が流行の引き金になるといわれており (金井, 1996), 餌料や漁場環境の改善により被害を軽減するための施策が提唱されてきた (谷口, 1982; 1983a; 1983b)。腸球菌症による被害を軽減するためには, 発病に関与する様々な要因の制御と適切な化学療法の組み合わせが不可欠であると考ええる。

^{*1} 大分県海洋水産研究センター

^{*2} 東京水産大学資源育成学科

^{*3} ヤンマーリンファーム

養魚用餌料については、配合飼料や飼料添加物を利用した給餌技術の改良と普及により、その問題点は解消されつつある。しかしながら、腸球菌症の感染・発病と流行の引き金となる環境要因との関係については、まだ検討する余地が残されている。魚類の感染症の発生に影響を及ぼす環境要因としては、水温、溶存ガス、栄養塩類、代謝産物、さらには産業汚染物質などがあげられる(Snieszko, 1974)。なかでも溶存酸素量の低下は、養殖魚の飼育密度との関連性が高く、技術的に改善が可能であることから、検討すべき項目の一つであると考えられる。溶存酸素量の低下が感染症による死亡率を高めることは古くから知られており、細菌感染症と溶存酸素量との関係については、アメリカナマズ *Ictalurus punctatus* (Walters and Plumb, 1980; Mqolomba and Plumb, 1992) や、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* (Caldwell and Hinshaw, 1995) での報告がある。ブリの腸球菌症の発病と溶存酸素量との関係についても検討はされているが、* 明確な結果は得られていない。そこで、本研究では溶存酸素量が腸球菌症の実験感染における感染・発病に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

飼育装置

実験には屋内の2 m³ FRP 水槽 2 基を用いた。1 基の水槽は、濾過海水の注水部に高濃度酸素発生装置 SA002 (ヤンマーディーゼル株式会社) を接続し、高濃度の溶存酸素量 (HDO 区, 5.6~8.2 mg/l, 酸素飽和度 112~161%) を維持した。もう1基の水槽は濾過海水を無処理で注水し、溶存酸素量を低く (LDO 区, 3.0~4.2 mg/l, 酸素飽和度 59~82%) 保った。注水は定流量弁を用いて、両水槽の注水量が等量となるように設定した。なお、死亡および試料魚採取に伴う、収容密度の減少による溶存酸素量の上昇を防ぐため、注水量は 1.0~1.5 m³/h の範囲で適宜調整した。

E. seriolicida 添加飼料

感染実験には 1992 年 9 月に大分県蒲江町で養殖中のブリ病魚 (魚体重 2,250 g) の脳から分離された *E. seriolicida* OT-23984 株をトッドヒューイトプロス (Difco) で、25°C, 48 時間培養したのち、4°C, 3,000 rpm, 15 分間の遠心分離で菌体を約 10 倍に濃縮したものを接種菌液とし

て用いた。市販のブリ用粉末配合飼料に最終水分含量が約 70% となるよう滅菌蒸留水を加え、ペースト状にしたものに、接種菌液を添加して均一に混合した。接種菌液の添加量は、供試魚体重の約 0.5% 量の餌を経口的に強制投与したときの投与菌量が 2.9×10^9 CFU/尾となるように設定した。

供試魚および感染実験

大分県上蒲町地先の海面で飼育した平均体重 95.4 g のブリ 0 歳魚を実験に供した。供試魚 200 尾を感染実験の1週間前に陸上の水槽に収容し予備飼育した。予備飼育中の海水の水温は 23.7~23.8°C, 溶存酸素量は 3.7 ~ 4.4 mg/l (酸素飽和度 76~91%) であった。

供試魚 90 尾に魚体重の 0.5% 量の菌添加飼料をチューブを用いて、強制的に胃内に投与して菌接種魚とした。菌非接種魚 90 尾には、接種菌液を含まない飼料を同様に投与した。各水槽を網で等分に仕切り、一方の区画に菌接種魚を、他方に菌非接種魚をそれぞれ 45 尾ずつ収容した。供試魚には市販固形飼料を日間給餌率 3% の割合で給餌しながら 20 日間の飼育を行った。飼育期間中の水温は 21.7~23.8°C であった。死亡魚は速やかに取り上げ、腎臓および脳からブレインハートインフュージョン (BHI) 寒天培地 (日水) を用いて細菌分離を行った。

血液ガス、凝集抗体価、代替経路補体価および細菌数の測定

感染実験の直前に 5 尾を、感染実験開始後 2, 5, 10, 15 および 20 日に各群から外見的に正常な供試魚を 5 尾ずつ取り上げ、ヘパリン処理したプラスチックシリンジ (テルモ, 20G 注射針) で心臓穿刺により採血した。菌非接種魚群の血液は空気を遮断して氷冷しておき、20 分以内に pH/Blood gas Analyzer Model 170 (CIBA・CORNING) で静脈血酸素分圧を測定した。各区の実験開始前と比較および HDO 区と LDO 区との比較は Mann-Whitney の U 検定により行った。

各群から採取した血液を 4°C, 1,500×g で 10 分間遠心分離して血漿を採取し、抗体価および補体価の測定に供した。凝集抗体価は *E. seriolicida* OT-23984 株ホルマリン不活菌体を反応抗原として、マイクロタイター法により測定した。反応は 25°C で 2 時間行い、4°C に 1 晩静置して判定した。また、代替経路補体価 (ACH₅₀) は矢野ら (1988) の方法に従い、反応条件を 20°C, 2 時間に一部改変して測定した。

採血後、菌接種前の供試魚および菌接種魚については

* 昭和 61 年度魚病対策技術開発成果報告書, 日本水産資源保護協会, 1987.

脳、腎臓、肝臓および腸管(内容物を含む)を摘出し、重量を測定したあと、4倍量の滅菌生理食塩水を加えてホモジナイズし、10倍希釈系列を作製した。脳、腎臓および肝臓の希釈試料中の *E. seriolicida* 菌数は普通寒天培地(日水)を、腸管の希釈試料中のそれは北尾(1982)の方法に従って2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC)濃度を0.0075%に調整したEF寒天培地(日水)を、それぞれ用いて表面塗抹平板法(25°C, 48時間培養)により測定した。そして、臓器1g当たりの *E. seriolicida* 生菌数を求めた。菌非接種魚については、生菌数の測定は行わなかったが、脳および腎臓からBHI寒天培地を用いて細菌分離を行った。

結 果

HDO区の *E. seriolicida* 接種魚(Donor)群では菌接種4日後に、LDO区の菌接種魚群は接種3日後に最初の死亡がみられた。菌接種6~10日後および11~15日後の各期間の死亡率は、LDO区の方がHDO区に比べて高い傾向がみられた。菌接種群と同じ水槽に同居させた菌非接種魚(同居魚, Recipient)群については、HDO区では飼育期間中の死亡がまったくなかった。これに対し、LDO区では菌接種7日後に最初の死亡がみられ、菌接種6~10日後の期間に8.5%、11~15日後の期間に6.7%の死亡が認められた。いずれの区も実験開始15日後以降の死亡はみられなかった(Table 1)。なお、すべての死亡魚から *E. seriolicida* が再分離され、腸球菌症による死亡であることが確認された。

菌接種前の供試魚から *E. seriolicida* は分離されなかった。HDO区の菌接種群では、菌接種5および10日後の生菌数はいずれの臓器においてもLDO区と比べて高かった。また、両区とも腎臓では菌接種15日後まで検出されたが、他の臓器では10日後までしか菌が検出されなかった(Table 2)。HDO区の同居魚群からは、すべてのサンプリング時において菌が分離されなかったが、LDO区の同居魚群では菌接種5日後に2尾、10日後に1尾から菌が分離された。

供試魚の血漿中の *E. seriolicida* ホルマリン不活化菌体に対する凝集抗体価は、全ての群について顕著な上昇は認められなかった(Table 3)。また、菌接種魚群および同居魚群のうち *E. seriolicida* が分離されなかった魚(非感染魚)のACH₅₀は、菌接種20日後にLDO区の両群でやや上昇したほかには、差が認められなかった(Table 4)。

同居魚群のうち非感染魚の静脈血酸素分圧は、実験開始10日後まではHDO区およびLDO区の間に有意な差は認められなかったが、10日後以降、LDO区では低下する傾向が、HDO区では上昇する傾向が認められた。実験開始15日後および20日後は、LDO区がHDO区に比べて有意に低かった($p<0.01$)。LDO区では、実験開始5日後を除き、いずれの時点においても実験開始前と比べて有意に($p<0.01$)低かった(Fig. 1)。

考 察

高酸素環境下では *E. seriolicida* 接種ブリ(Donor)と同居させた魚(Recipient)の死亡はみられなかったが、低酸

Table 1. Mortality of yellowtail in a cohabitation experiment under different dissolved oxygen concentrations

Days after infection	High dissolved oxygen (5.6~8.2 mg/l)		Low dissolved oxygen (3.0~4.2 mg/l)	
	Donor* ¹	Recipient* ¹	Donor	Recipient
1-2	0	0	0	0
3-5	2.5* ²	0	2.5	0
6-10	0	0	8.5	8.5
11-15	3.3	0	6.7	6.7
16-20	0	0	0	0

*¹ Fish grouped into "donor" and "recipient" were kept in separated net cages in a tank. Donor fish were orally inoculated with *Enterococcus seriolicida* and recipient fish were not.

*² Mortality (%) was calculated from a formula;

$$\frac{\text{Number of dead fish in each period}}{\text{Total number of fish at the initial day of each period}} \times 100.$$

Table 2. Log number of *Enterococcus seriolocida* cells in the tissues of yellowtail (donor fish) orally infected with *E. seriolocida**¹

Days after infection	N* ²	High dissolved oxygen (5.6~8.2 mg/l)				N	Low dissolved oxygen (3.0~4.2 mg/l)			
		Kidney	Brain	Liver	Intestine		Kidney	Brain	Liver	Intestine
Pre-infection	0	ND* ³	ND	ND	ND	0				
2	2	2.6 (4.6-8.5)	<2.3 (4.0-7.0)	2.7 (4.8-8.8)	2.6 (2.3-8.4)	2	<2.3 (2.5-4.9)	<2.3 (7.4)	<2.3 (3.7)	<2.3 (2.3-3.2)
5	3	3.6 (5.7-6.3)	4.7 (7.6-8.1)	3.2 (5.3-5.5)	4.7 (2.8-8.0)	2	<2.3 (2.1-2.8)	<2.3 (2.4)	<2.3 (2.3-2.4)	2.6 (2.3-3.0)
10	4	3.2 (2.6-6.3)	5.6 (9.1-9.6)	2.4 (2.3-5.3)	4.7 (3.1-10.2)	2	<2.3 (4.1)	<2.3 (6.3)	<2.3 (3.5)	<2.3 (2.4-4.0)
15	1	<2.3 (2.4)	ND	ND	ND	1	<2.3 (3.9)	ND	ND	ND
20	0	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND

*¹ Geometric mean of samples from five fish (log CFU/g). Figures in parenthesis present the range in positive samples.*² Nuber of fish from which the bacteria were isolated.*³ Not detected.**Table 3.** Agglutinating antibody titers against formalin-killed *Enterococcus seriolocida* in the plasma of yellowtail examined

Days after infection	High dissolved oxygen (5.6~8.2 mg/l)		Low dissolved oxygen (3.0~4.2 mg/l)	
	Donor* ¹	Recipient* ¹	Donor	Recipient
Pre-infection	<4* ² (<4-<4)			
2	<4 (<4-≤4)	<4 (<4-≤8)	<4 (<4-≤4)	<4 (<4-≤4)
10	<4 (<4-≤4)	<4 (<4-≤4)	<4 (<4-≤4)	<4 (<4-≤8)
15	<4 (<4-≤16)	<4 (<4-≤4)	8.6 (<4-≤16)	<4 (<4-≤32)
20	8.0 (<4-≤32)	<4 (<4-≤32)	<4 (<4-≤32)	<4 (<4-<4)

*¹ See in Table 1.*² Geometric mean from five fish sample. Parenthesis presents the range.

素環境下では本症による同居魚の死亡が認められ、低酸素環境下では高酸素環境下に比べて *E. seriolocida* の水平感染が起こりやすいことが示された。

本症に感染したブリからは大量の *E. seriolocida* が排出されることが知られている (松岡, 1992)。本実験に供したブリには本症の病歴はなく、菌接種前の供試魚から *E. seriolocida* は分離されなかったため、菌接種魚から排出さ

れた *E. seriolocida* が低酸素環境下の同居魚群に感染・発病をもたらした感染源になったものと考えられる。低酸素環境下と高酸素環境下で菌の排出量に差があったかどうかは明らかでないが、高酸素環境下では、菌接種魚の各臓器の生菌数が低酸素環境下における魚のそれに比べて高かったことから、菌の排出量が低酸素環境下より少なかったとは考えにくく、低酸素環境下で飼育された魚

Table 4. Alternative complement pathway activity*¹ in the plasma of yellowtail examined

Days after infection	High dissolved oxygen (5.6~8.2 mg/l)		Low dissolved oxygen (3.0~4.2 mg/l)	
	Donor* ²	Recipient* ²	Donor	Recipient
Pre-inoculation	415.6±222.6* ³ (n=5)* ⁴			
2	493.7±215.2 (n=3)	275.8±142.2 (n=5)	294.3±187.6 (n=3)	362.8±210.0 (n=4)
10	297.0 (n=1)	329.4±109.6 (n=5)	305.3± 54.0 (n=3)	353.0±134.0 (n=4)
15	382.0±126.3 (n=4)	454.0±286.3 (n=5)	312.8±114.6 (n=4)	392.4±171.6 (n=5)
20	343.0±105.5 (n=5)	306.4±84.6 (n=5)	559.6± 37.8 (n=5)	565.8± 77.1 (n=5)

*¹ ACH₅₀ (U/ml).*² See in Table 1.*³ Data are shown as mean±standard deviation from uninfected fish.*⁴ Parenthesis presents the number of samples for examination. **Fig. 1.** Changes of venous oxygen tension (mean±SD) in “recipient” yellowtail which were not infected with *Enterococcus seriolocida*. Fish were maintained in the tanks of high (●; 5.6–8.2 mg/l) and low (■; 3.0–4.2 mg/l) dissolved oxygen concentration. Differences between the both groups (**; $p<0.01$) and compared to a control value measured prior to the experiment (a; $p<0.01$) were tested by Mann-Whitney’s U-test.

が感染・発病しやすくなっていたものと解釈するのが妥当と考える。水平感染が高酸素環境下で起こりにくいということは、本症による死亡率を軽減することにつながる重要な所見であると思われる。

本症流行後のブリ血清中には *E. seriolocida* に対する凝集抗体価の上昇が認められ、実験的な再感染が成立しにくいことが報告されている(飯田ら, 1982)。本研究で供試したブリには本症の病歴がなく、死亡がほぼ終息した15日以降にわずかながら凝集抗体価の上昇が認められただけであったので、本実験では、両区における水平感染の起こりやすさの違いには関係していなかったと考えられる。また、特異抗体および補体量の増加に伴い、ブリのマクロファージの *E. seriolocida* に対する貪食活性が高くなることが知られている(楠田・田中, 1988)。非感染魚の代替経路補体活性を経日的に追跡した結果では、その値には飼育水の溶存酸素量の違いによる差はみられず、本実験下では本因子も両区における水平感染の起こりやすさの差には関与していなかったと判断した。溶存酸素量と本症発病との関連については、魚の疾病に対する抵抗力に及ぼす溶存酸素量の影響という観点から、他の生体防御因子の検討が必要であると考えられた。

実験開始10日後から、低酸素環境下では非感染魚の静脈血酸素分圧は低下する傾向が、高酸素環境下では上昇する傾向が見られた。また、低酸素環境下においた魚で

は実験開始5日後を除き、実験開始前と比べて静脈血酸素分圧は有意に低かった。魚の動脈血酸素分圧は飼育水の溶存酸素量の影響を受けて変動することが知られており (Holeton and Randall, 1967; Hughes and Johnston, 1978), 静脈血酸素分圧の変動は飼育水の溶存酸素量の影響を受けて静脈血酸素分圧が変動した状態で、各組織で必要な酸素が消費されることによって起こる必然的な変動と考えられる。好中球による殺菌には、貪食の過程で生成される活性酸素による酸素依存性の機構があり (飯田, 1996), ある種の細菌に対するヒト好中球の殺菌活性は嫌気的条件下で低下することが知られている (Mandell, 1974)。また、静脈血酸素分圧と本症実験感染における死亡率との関係について、給餌を続けたブリに比べて無給餌のブリでは静脈血酸素分圧が高く、死亡率は低くなることが報告されている (福田・池田, 1993)。ところが、本実験では高酸素環境下の魚の方が低酸素環境下におかれた魚よりも、菌の増殖が顕著であったことから、血中酸素分圧と好中球の貪食・殺菌能、本症における水平感染の成立および死亡率との関係は今後さらに検討すべき課題であると考えられる。

本研究においては、低酸素条件と比較するために高酸素条件として設定した HDO 区の酸素飽和度は平均で 139% と過飽和であった。ニジマスの *Yersinia ruckeri* 実験感染における死亡率は、正常な酸素飽和度の時に比べて、酸素飽和度が低いときだけでなく、過飽和のときにも高くなることが報告されている (Caldwell and Hinshaw, 1995)。本研究結果からは、ブリの腸球菌実験感染による死亡率は溶存酸素が過飽和の状態でも必ずしも高くなるとは考えにくい、過飽和の溶存酸素量がブリの腸球菌症による死亡率に及ぼす影響については、酸素飽和度 100% 前後の溶存酸素量における死亡率と比較する必要がある。

本実験結果は、高酸素環境下では低酸素環境下に比べて、*E. seriolicida* に感染しても死ににくく、また、水平感染も起こりにくいことを示したが、何故、そのような結果になるかについては本研究における解析範囲では明らかにすることができなかった。

謝 辞

本研究を行うに当たり、大分県海洋水産研究センター職員各位のご協力をいただきましたことを深く感謝致します。

文 献

- Aoki, T., K. Takami and T. Kitao (1990): Drug resistance in a non-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis. Aquat. Org.*, **8**, 171–177.
- Caldwell, C. A. and J. M. Hinshaw (1995): Tolerance of rainbow trout to dissolved oxygen supplementation and a *Yersinia ruckeri* challenge. *J. Aquat. Anim. Health*, **7**, 168–171.
- Eldar, A., C. Ghittino, L. Asanta, E. Bozzetta, M. Gorla, M. Prearo and H. Bercovier (1996): *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.*, **32**, 85–88.
- 福田 穰, 池田彌生 (1993): ブリ連鎖球菌症実験感染魚の発病に及ぼす給餌の影響. 大分水試調研報, **15**, 46–56.
- Holeton, G. F. and D. J. Randall (1967): The effect of hypoxia upon the partial pressure of gases in the blood and water afferent and efferent to the gills of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, **46**, 317–327.
- Hughes, G. M. and I. A. Johnston (1978): Some responses of the electric ray (*Torpedo marmorata*) to low ambient oxygen tensions. *J. Exp. Biol.*, **73**, 107–117.
- 飯田貴次 (1996): 魚類の生体防御, 「魚病学概論, 室賀清邦・江草周三編」, 恒星社厚生閣, 東京, 9–20.
- 飯田貴次・若林久嗣・江草周三 (1982): ハマチの連鎖球菌症ワクチンについて. 魚病研究, **16**, 201–206.
- 金井欣也 (1996): 海産魚の細菌病, 「魚病学概論, 室賀清邦・江草周三編」, 恒星社厚生閣, 東京, 58–63.
- 北尾忠利 (1982): 連鎖球菌の検査法—培養学的, 生化学的および血清学的性状を中心として—. 魚病研究, **17**, 17–26.
- 楠田理一・川合研児・豊嶋俊夫・小松 功 (1976): 養殖ハマチから分離された *Streptococcus* 属の新魚病細菌について. 日水誌, **42**, 1345–1352.
- 楠田理一・田中卓史 (1988): *Streptococcus* sp. に対するブリマクロファージの食菌作用に及ぼす抗体および補体のオプソニン効果. 日水誌, **54**, 2065–2069.
- Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C. R. Banner and J. L. Fryer (1991): *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **41**, 406–409.
- 松岡 学 (1992): ブリ連鎖球菌症実験感染魚からの排菌量. 愛媛水試研報, **(5)**, 39–41.
- Mandell, G. L. (1974): Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.*, **9**, 337–341.
- Mqolomba, T. N. and J. A. Plumb (1992): Effect of temperature and dissolved oxygen concentration on *Edwardsiella ictaluri* in experimentally infected channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, **4**, 215–217.

- Snieszko, S. F. (1974): The effect of environmental stress on outbreak of infectious disease of fishes. *J. Fish Biol.*, **6**, 197–208.
- 谷口道子 (1982): 高知県下における養殖ブリの連鎖球菌症の発病要因とその予防対策. 魚病研究, **17**, 55–59.
- 谷口道子 (1983a): ハマチの連鎖球菌症発病に及ぼす飼育餌料の影響. 日水誌, **49**, 363–366.
- 谷口道子 (1983b): 人為経口感染におけるハマチの連鎖球菌症の経過. 日水誌, **49**, 1171–1174.
- 矢野友紀・畑山幸宏・松山博子・中尾美樹 (1988): 主要養殖魚の補体代替経路活性の測定法について. 日水誌, **54**, 1049–1054.
- Walters, G. R. and J. A. Plumb (1980): Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Biol.*, **17**, 177–185.