

噴霧ワクチンを投与したアユの血清と体表粘液中の抗体の ELISA 法による検出*¹

伊丹利明*²・高橋幸則*²・安岡真司*²・満谷 淳*³・武居 薫*³

Detection of Antibody by ELISA
(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
from Serum and Cutaneous Mucus of Spray-Vaccinated
Ayu Plecoglossus altivelis

Toshiaki Itami*², Yukinori Takahashi*², Shinji Yasuoka*², Atsushi Mitsutani*³
and Kaoru Takesue*³

In the previous paper, the authors purified the immunoglobulin (Ig) from the serum and the cutaneous mucus of ayu (*Plecoglossus altivelis*) immunized by intraperitoneal injection of *Vibrio anguillarum* emulsified with Freund's complete adjuvant (FCA). We demonstrated that both Igs in the serum and the mucus had the same molecular weight of 900,000 and the same Rf value of 0.01 in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). In this paper, Igs of ayu were detected from the serum and the mucus of ayu by the ELISA after vaccination against vibriosis by spray method.

Igs were purified from the hyper-immunized serum of ayu after intraperitoneal injection of *V. anguillarum* with FCA by fractionation by ammonium sulfate and the column chromatographies of DEAE- and SP-Toyopearl 650M, Mono Q 5/5 and Superose 6. The purity of the Ig was determined by the PAGE and immunoelectrophoresis. Purified ayu Ig was injected into the rabbit with FCA to produce the anti-ayu Ig rabbit IgG that was used for the ELISA. To monitor the antibody of the serum and the mucus of spray-vaccinated ayu against lipopolysaccharide extracted from *V. anguillarum*, indirect ELISA was carried out using horse-radish peroxidase labelled anti-rabbit IgG goat IgG.

Igs of serum and body mucus of spray-vaccinated fish were purified through the same pro-

水産大学校研究業績 第1396号, 1992年2月10日受付.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No.1396. Received Feb. 10, 1992.

* 1 平成元年度日本魚病学会春季大会(東京)にて発表.

* 2 水産大学校増殖学科水族防疫学講座(Laboratory of Fish Diseases, Department of Aquaculture and Biology, Shimonoseki University of Fisheries).

* 3 水産大学校増殖学科水産環境学講座(Laboratory of Fishery Environmental Science, Department of Aquaculture and Biology, Shimonoseki University of Fisheries).

cedure mentioned above. Main fractions of both Igs were fractionated almost the same NaCl concentration in ion exchange chromatography and found in the same elution volume in gel chromatography. But in DEAE-Toyopearl 650M ion exchange chromatography, we found the positive reaction of ELISA in 0.3M NaCl eluate that was different fraction from the main fraction of Ig.

We concluded that Ig of spray-vaccinated ayu was able to be detected in both in serum and body mucus by ELISA, and that the characteristics of ELISA antibody was the same as the agglutinating antibody in hyper-immunized serum, but there was some possibility that the different type(s) of Ig may exist in the serum and mucus, because we found another ELISA antibody fraction apart from the main Ig fraction.

1. 緒言

先に著者らは、*Vibrio anguillarum* ワクチンを腹腔内に投与したアユ (*Plecoglossus altivelis*) の体表粘液中には血清中と同じ抗体が存在することを示し、これらの抗体の分子量はいずれも約90万で2-メルカプトエタノールに感受性を持つ凝集抗体であることを明らかにした¹⁾。一方、アユのピブリオ病に対する噴霧法ワクチンは、感染防御効果は明らかとなっているが²⁻⁴⁾、血清や体表粘液中の抗体は検出されていない。

そこで、本報では精製したアユの血中抗体を免疫原としてウサギに投与して、抗アユ抗体ウサギ抗体 (IgG) を作製し、これを用いて噴霧法ワクチン投与魚の血清と体表粘液中から酵素抗体法 (ELISA) を用いて抗体を検出するとともに、両抗体の精製を試みた。

2. 材料および方法

2.1 供試魚 平均体重62gのアユ180尾を用いた。

2.2 ワクチンの調製と投与 抗原としては *Vibrio anguillarum* (J-0-1) を用いた。注射法ワクチンおよび噴霧法ワクチンの調製と投与は前報^{1,3,4)}と同様の方法を用いた。対照区としてはワクチン無投与魚を用いた。

2.3 アユ抗体精製用試料の調製 注射法によって免疫したアユを用いて、前報¹⁾と同様にして抗体精製用アユ血清を調製した。

2.4 凝集抗体価の測定 前報¹⁾と同様にして測定した。

2.5 抗体の精製 50% 硫酸塩析法、DEAE-Toyopearl 650M (東ソー)、SP-Toyopearl 650M (東ソー)、Mono Q 5/5 (Pharmacia) および Superose 6 (Pharmacia) を用いて精製を行った。硫酸塩析法および DEAE-Toyopearl 650M

によるイオン交換クロマトグラフィーならびにタンパク質の検出は前報¹⁾と同様の方法で行った。

2.5.1 イオン交換クロマトグラフィー 0.01M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した SP-Toyopearl 650M イオン交換体に同緩衝液で透析した試料を吸着させたのち、NaCl による濃度勾配を用いて溶出を行った。Mono Q 5/5 には5%グリセリンと0.15M NaCl を含む0.02M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を用い、溶出には NaCl による濃度勾配を用いた。

2.5.2 ゲルろ過 ゲルろ過剤として Superose 6 を用いた。緩衝液には0.1M NaCl を含む0.02M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を用いた。

2.6 アユ抗体に対するウサギ IgG の調製 精製アユ抗体をフロイントの完全アジュヴァントと等量混合して、白色ウサギの皮下に7日~10日間隔で4回接種した後、最終接種後7日後に耳翼静脈から採血して抗血清を作製した。ウサギ抗血清を50%硫酸塩析し、沈澱画分を0.028M NaCl を含む0.02M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、Sephadex G-25 で脱塩した。脱塩した試料を DEAE Affi-Gel Blue (BioRad 社) に添加し、同緩衝液で溶出して未吸着画分を精製ウサギ IgG とした。

2.7 純度の検定 精製アユ抗体の純度をポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE) と免疫電気泳動法を用いて検定した。

2.7.1 PAGE 前報¹⁾と同様にして検定した。

2.7.2 免疫電気泳動法 電気泳動用担体にはペロナル緩衝液 (pH 8.5) に溶解した1.2%寒天を用いた。スライドガラスに展開した寒天上で精製アユ抗体とアユ血清をそれぞれの試料添加孔に添加して、7mA で泳動したのち、湿潤箱中で抗アユ抗体ウサギ抗血清と反応させて沈降線を

観察した。

2. 8 噴霧ワクチン投与魚の血清および体表粘液の調整 噴霧ワクチン投与魚および無投与魚の血清および体表粘液を前報¹⁾と同様にして調整した。

2. 9 酵素抗体法 (ELISA) による抗体の検出 1次抗体として抗アユ抗体ウサギ IgG を、2次抗体としてペロオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヒツジ IgG を用いて、間接法を用いて抗体を検出した。反応用抗原には *V. anguillarum* の粗リポポリサッカライド (LPS) を固相化して用い、アユの血清および体表粘液中の *V. anguillarum* LPS に対する特異抗体を検出した。

2. 9. 1 抗原の調整 供試菌体からフェノール水抽出した LPS 画分をセタポロンで処理し⁵⁾、粗 LPS を調整して抗原とした。

2. 9. 2 抗体検出用の試料の調整 噴霧ワクチン投与区および対照区の血清はリン酸緩衝液 (PBS) で100倍に希釈し、体表粘液はそのまま ELISA 用試料とした。また、噴霧ワクチン投与魚の血清ならびに体表粘液の各精製途中の試料については、溶出液をそのまま用いた。

2. 9. 3 ELISA ELISA にはアミノプレート (住友ベークライト社) を用いた。本プレートの活性化のために、各穴に2%グルタルアルデヒドを100 μ l 添加して、2時間静置したのち、蒸留水で洗浄した。炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解した粗 LPS を各穴に200 μ l ずつ分注し、4 $^{\circ}$ C で一晩静置して固相化した。粗 LPS 溶液を捨てたのち、PBS で調整した1.5%ウシ血清アルブミン溶液200 μ l を分注後、2時間室温で反応させてブロッキングした。この後、0.05% の Tween 20 を含む PBS (PBS-Tween) で各穴を3回振盪洗浄後、抗体測定用の試料100 μ l を添加した。室温で3時間反応後、PBS-Tween で3回振盪洗浄し、一次抗体としての抗アユ抗体ウサギ IgG を200 μ l ずつ各穴に分注して振盪後、室温で2時間反応させた。反応終了後、PBS-Tween で3回振盪洗浄したのちに、2次抗体としてのペロオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヒツジ IgG (和光) を200 μ l ずつ各穴に分注して振盪し、室温で2時間反応させた。反応終了後、PBS-Tween で3回振盪洗浄したのち、基質として σ -フェニレンジアミン溶液を200 μ l ずつ分注し、30分反応後、6N 硫酸で反応を停止し、マイクロプレートリーダー MRP 4A (東ソー) を用いて492nm における吸光度を測定した。

2. 10 噴霧ワクチン投与魚の血清および体表粘液からの抗体の精製 噴霧法ワクチンを投与したアユの血清と体表粘液を硫酸塩析法、DEAE-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl 650M, Mono Q 5/5 および Superose 6 を用いて注射ワク

チン血清と同じ条件で精製を行った。ただし、硫酸塩析法に用いた飽和硫酸の添加濃度は血清の場合は50%、体表粘液の場合は75%をそれぞれ用いた。また、体表粘液試料の SP-Toyopearl 650M による分画では、初期緩衝液で洗浄後、0.5M NaCl を含む緩衝液で溶出した。供試試料および各精製段階の試料の抗体活性の検出には ELISA 法を用いた。

3. 結果

3. 1 アユ抗体の精製 血清試料を50%硫酸で塩析したところ、沈澱画分に *V. anguillarum* に対する凝集活性がみられた。活性画分を DEAE-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl 650M, Mono Q 5/5 および Superose 6 のタンパク質の溶出プロフィールおよび *V. anguillarum* に対する凝集活性を図1に示した。まず、DEAE-Toyopearl 650M によるイオン交換クロマトグラフィーでは、凝集活性が NaCl 濃度0.07~0.16M で、SP-Toyopearl 650M では NaCl 濃度0.1~0.23M で、また Mono Q 5/5 では NaCl 濃度0.17~0.2M で溶出した。Superose 6 によるゲルろ過では、ボイドボリューム (Vo) よりやや遅れて活性画分が溶出した。

3. 2 純度の検定 PAGE と免疫電気泳動法における泳動パターンを図2に示した。PAGE では、Rf 値が0.01付近に1本のバンドが認められた。免疫電気泳動法では、精製アユ抗体試料およびアユ血清試料のいずれに対しても、試料添加孔よりやや陰極側にそれぞれ1本の沈降線を形成した。

3. 3 噴霧ワクチン投与魚の血清および体表粘液から抗体の検出と精製 噴霧ワクチン投与魚の血清および体表粘液いずれも凝集活性は見られなかった。しかし、ELISA による検出では、492nm における吸光度がそれぞれ0.18および0.125であったが、対照区の血清および体表粘液のそれは0.021および0.015であった。噴霧ワクチン投与魚の血清の DEAE-Toyopearl 650M, SP-Toyopearl 650M, Mono Q 5/5 および Superose 6 からのタンパク質の溶出プロフィールおよび ELISA によって検出された *V. anguillarum* 粗 LPS 画分に対する抗体活性を図3に示した。血清試料では、50%の硫酸塩析で得られた沈澱画分を緩衝液に溶解して、DEAE-Toyopearl 650M によるイオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、NaCl 濃度0.1~0.2M で抗体が検出された。しかし、この抗体陽性画分を SP-Toyopearl 650M で溶出したところ、抗体はほぼ全域にわたって検出された。この抗体画分を Mono Q 5/5 で分画したところ、0.18~0.2M 付近に抗体が検出された。Superose 6 によるゲルろ過では、Vo よりやや遅れて抗体が溶出した。

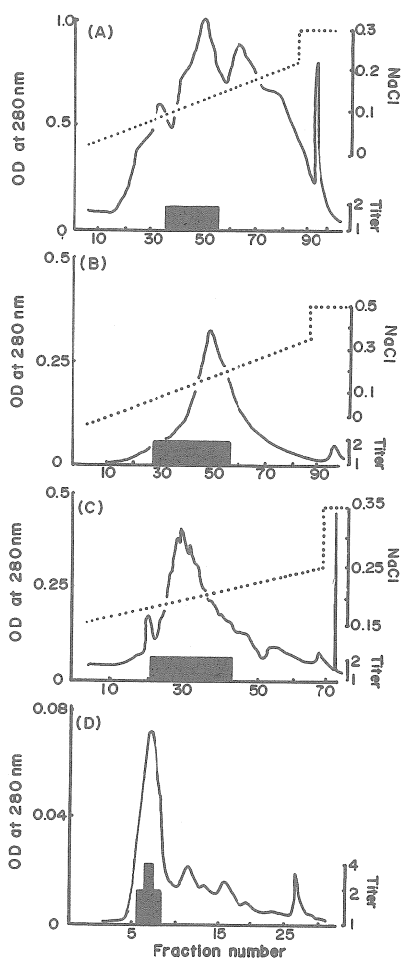


Fig. 1. Liquid chromatography of the hyper-immunized ayu serum.

(A) The crude extract was applied on the DEAE-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5). After washing with the starting buffer containing 0.05M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.05-0.2M NaCl in the buffer.

(B) Antibody fraction was applied on the SP-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 6.0). After washing with the starting buffer, the column was eluted by a linear gradient of 0-0.3M NaCl in the buffer.

(C) Antibody fraction was applied on the Mono Q 5/5 column Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC, Pharmacia) system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol. After washing with the starting buffer

containing 5% glycerol and 0.15M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.15-0.25M NaCl in the buffer.

(D) Antibody fraction was applied on Superose 6 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol and 0.1M NaCl.

—; the optical density at 280nm,; concentration of NaCl, ■■; shaded area shows the agglutinating antibody titers against *V. anguillarum*

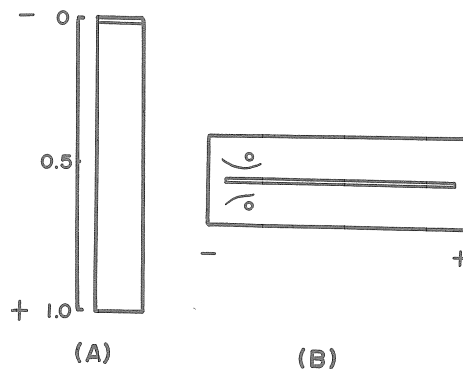
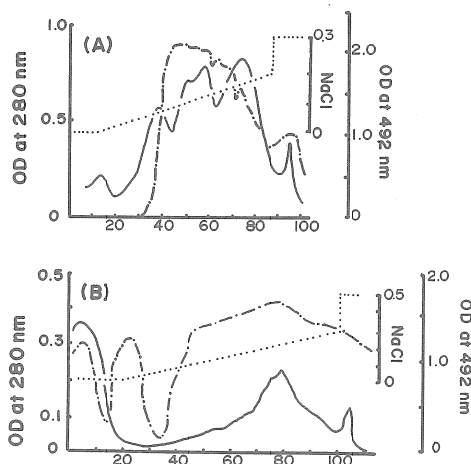


Fig. 2. Schematic drawing of polyacrylamide gel electrophoretic pattern (PAGE) (A) and immunoelectrophoretic pattern (B) of purified ayu antibody in the upper well and whole ayu serum in the lower well.



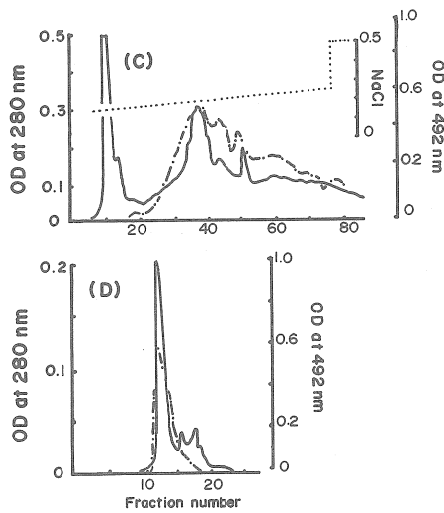


Fig. 3. Liquid chromatography of the serum of spray-vaccinated ayu.
 (A) The crude extract was applied on the DEAE-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5). After washing with the starting buffer containing 0.05M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.05-0.2M NaCl in the buffer.
 (B) Antibody fraction was applied on the SP-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 6.0). After washing with the starting buffer, the column was eluted by a linear gradient of 0-0.3M NaCl in the buffer.
 (C) Antibody fraction was applied on the Mono Q 5/5 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol. After washing with the starting buffer containing 5% glycerol and 0.15M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.15-0.25M NaCl in the buffer.
 (D) Antibody fraction was applied on Superose 6 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol and 0.1M NaCl.
 —; the optical density at 280nm,; concentration of NaCl, - - - -; the optical density at 492nm by ELISA.

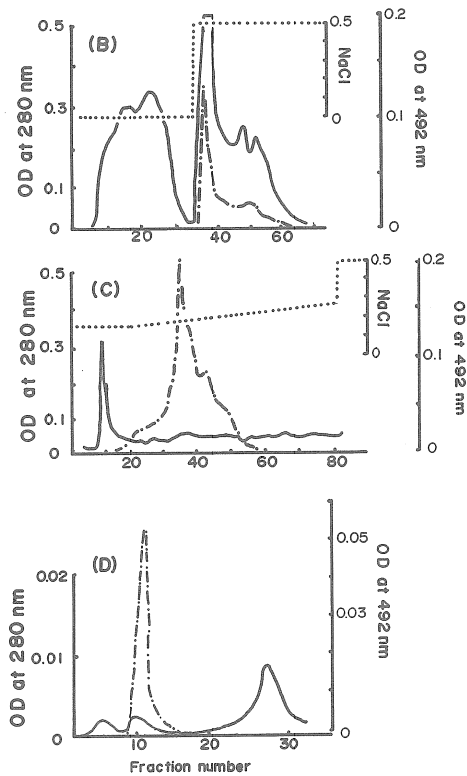
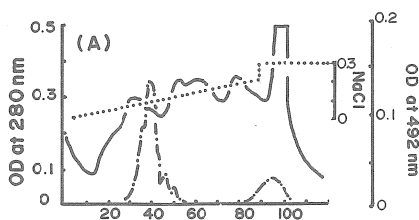


Fig. 4. Liquid chromatography of the cutaneous mucus of spray-vaccinated ayu.
 (A) The crude extract was applied on the DEAE-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5). After washing with the starting buffer containing 0.05M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.05-0.2M NaCl in the buffer.
 (B) Antibody fraction was applied on the SP-Toyopearl 650M column equilibrated with 0.01M phosphate buffer (pH 6.0). After washing with the starting buffer, the column was eluted by 0.5M NaCl in the buffer.
 (C) Antibody fraction was applied on the Mono Q 5/5 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol. After washing with the starting buffer containing 5% glycerol and 0.15M NaCl, the column was eluted by a linear gradient of 0.15-0.25M NaCl in the buffer.
 (D) Antibody fraction was applied on Superose 6 column in FPLC system equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% glycerol and 0.1M NaCl.
 —; the optical density at 280nm,; concentration of NaCl, - - - -; the optical density at 492nm by ELISA.



噴霧ワクチン投与魚の体表粘液試料の各精製段階におけるタンパク質の溶出プロフィールおよびELISAによって検出された *V. anguillarum* の粗 LPS 画分に対する抗体活性を図4に示した。75%硫酸塩析で得られた沈澱画分を緩衝液に溶解して、DEAE-Toyopearl 650M によるイオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、NaCl 濃度0.12~0.15付近に抗体が検出された。この抗体陽性画分を SP-Toyopearl 650M を用いて分画したところ、0.5M NaCl で溶出した直後に抗体活性が検出された。Mono Q 5/5 で抗体画分を分画したところ、0.15~0.2M 付近に抗体が検出された。Superose 6 によるゲルろ過では、 V_0 よりやや遅れて抗体が溶出した。

4. 考 察

今回用いた精製抗体は注射ワクチン投与魚の血清から精製したが、より精製度を高めるために前報¹⁾の方法を改良した。すなわち、前法¹⁾では50%の硫酸塩析、Sephacryl S-300 によるゲルろ過と DEAE-Toyopearl 650M によるイオン交換クロマトグラフィーを用いたが、今回は硫酸塩析と DEAE-Toyopearl 650M による分離に加えて、SP-Toyopearl 650M および Mono Q 5/5 によるイオン交換クロマトグラフィー、ならびに Superose 6 によるゲルろ過を行った。その結果、最終の精製段階である Superose 6 によるゲルろ過において、凝集活性を持つタンパク質のピークが見られ、分子量は約90万であることが明らかとなった。このピークを PAGE で分析したところ、Rf 値0.01の位置にバンドが1本みられた。このことから、今回精製した凝集抗体の純粋性が確認されたとともに、ゲルろ過の溶出パターンと PAGE での易動度から、先に報告した¹⁾抗体と生化学的に同一の物質であることが確認された。この活性画分をウサギに接種して抗体を作製し免疫電気泳動法を行ったところ、アユ血清および精製抗体のいずれに対しても1本の沈降線が認められた。このことから、精製抗体は免疫学的にも純粋であることが確認された。

次に、噴霧ワクチン投与魚の血清および体表粘液を ELISA で検出したところ、対照区に比較して明らかに高い値が得られた。また、前述の抗体精製法と同様にこれら試料の精製を試みた。まず、血清の ELISA 抗体は DEAE-Toyopearl 650M によるイオン交換クロマトグラフィーにおいて主に NaCl 濃度0.1~0.2M に検出されたが、0.3M NaCl においても抗体が若干検出された。体表粘液試料でも、ELISA 抗体は主として0.12~0.15M に溶出したが、0.3M においても抗体が検出された。0.1~0.2M あるいは

0.12~0.15M に溶出する抗体の大きなピークは、注射ワクチンを投与したアユの血清中の凝集抗体が検出された NaCl 濃度とほぼ同じであった。しかし、噴霧ワクチン血清や体表粘液で検出された0.3M NaCl で溶出する ELISA 抗体は、注射ワクチン血清から検出された凝集抗体と部分的に共通抗原をもつものの種類の異なる抗体である可能性が考えられる。しかし、今回の実験においては収量が少なく、これ以上の検討を行わなかったことから、その性状は明らかではない。SP-Toyopearl 650M による分画では、噴霧ワクチン血清の ELISA 抗体が未吸着画分から NaCl による溶出画分の全域にわたって検出された。体表粘液試料では、NaCl による濃度勾配溶出法を行わなかったために、血清試料との直接の比較はできないが、0.5M の溶出画分の比較的狭い範囲にのみ抗体が検出された。注射ワクチン血清では NaCl 0.1~0.23M に溶出し、他の画分には凝集活性はみられなかった。このように、SP-Toyopearl 650M に対する噴霧ワクチン血清の試料が、他の試料とは異なった溶出パターンを示した原因は明らかではない。Mono Q 5/5 によるイオン交換クロマトグラフィーでは、いずれの試料の ELISA 抗体および凝集抗体も NaCl 濃度0.15~0.2M 付近に検出された。Superose 6 によるゲルろ過では、いずれの試料からも抗体は V_0 より少し遅れて検出された。以上の結果から、噴霧ワクチンで誘導される血清あるいは体表粘液中の *V. anguillarum* に対する主な ELISA 抗体は、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過によって、凝集抗体とほぼ同じ位置に検出されたことから、静電的性状や分子量は凝集抗体と同じものであると考えられる。しかし、噴霧ワクチン投与魚の血清と体表粘液からは、DEAE-イオン交換体における溶出パターンが凝集抗体とは異なる抗体が若干検出され、これが異種の抗体であるかどうかは今後さらに詳細な検討が必要である。

ELISA による抗体の検出については、rainbow trout (*Salmo gairdneri*) の *Yersinia ruckeri* と VHS に対する抗体⁶⁾、channel catfish (*Ictalurus punctatus*) の *Edwardsiella ictaluri* に対する抗体⁷⁾、rainbow trout の *V. anguillarum* に対する抗体⁸⁾、およびニホンウナギの *E. tarda* に対する抗体⁹⁾ がそれぞれ報告されている。前二者は注射法ワクチン投与魚の、また後二者は浸漬法ワクチン投与魚について、いずれも血清中の抗体価がワクチン無投与区より有意に高いことを明らかにしている。しかし、いずれの報告においても体表粘液中の抗体を ELISA で検出したものはない。噴霧ワクチン投与魚の体表粘液中に抗体が産生されて、これが凝集抗体と類似のものであることを ELISA を用いて明ら

かにしたのは著者らがはじめてである。

著者らはすでにアユのピブリオ病に対する経口ワクチン投与魚の体表粘液中に抗体が産生されることを明らかにしたが¹⁰⁾、その物理化学的性状は明らかではない。注射法ワクチン投与魚における体表粘液への抗体の産生については、先に著者らが報告したように¹⁾、血清中の抗体と同様のIgM様の抗体が検出された。浸漬法ワクチンについては、Lobb¹¹⁾がcatfish (*Ictalurus punctatus*) にジニトロフェニール化ウマ血清アルブミンを浸漬法によって投与したところ、5尾中4尾の体表粘液中の抗体が無処理の対照区より高かったとしている。このことから、浸漬法によって投与された同アルブミンは血清中の抗体と同じ抗体の産生を体表粘液中に誘導することを示したが、浸漬法処理魚の皮膚を組織化学的に検討した結果、局所免疫の可能性あることを示唆した。

体表粘液中の抗体については、全身性の免疫かあるいは局所性の免疫によるものかは研究者によって見解が異なる。全身性の免疫であるとする研究者は、その根拠として、体表粘液中の抗体が血清中のそれと免疫学的に同一であることを挙げている¹²⁻¹⁴⁾。一方、Lobb and Clem¹⁵⁾は標識抗体で受動免疫した魚体内における分布の調査結果から、また Lous-Cormiers ら¹⁶⁾は上皮中に膜結合性のIgMを有するリンパ球が存在した結果から、局所性の免疫の可能性を示唆している。今回の著者らの実験では、これらの問題を解明する結果が得られていないが、少なくとも噴霧ワクチン投与魚の体表粘液中に産生される主な抗体は、血清中のIgM様凝集抗体と生化学的にほぼ同一の高分子抗体で、免疫学的にも共通の抗原を持つ抗体であることを明らかにした。しかし、DEAEイオン交換体に対する挙動が異なるELISA抗体も検出されているので、今後これがIgM様抗体以外の抗体であるかどうかについて、詳細な検討が必要である。また、噴霧ワクチン投与魚の皮膚の組織切片を作製して、免疫組織学的手法によって抗体あるいは抗体産生細胞の分布を解析し、抗体の局在性について検討する必要がある。

文 献

- 1) 伊丹利明・高橋幸則・岡本隆義・久保埜和成：日水誌，54，1611-1617 (1988).
- 2) T. Itami and R. Kusuda: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 44, 1413 (1978).
- 3) 伊丹利明・楠田理一：日水誌，46，533-536 (1980).
- 4) 伊丹利明・楠田理一：日水誌，46，699-703 (1980).
- 5) O. Westphal and K. Jann: Bacterial lipopolysaccharides, in "Method in Carbohydrate Chemistry vol. V" (ed. by R. L. Whistler, J. N. Bemiller and M. L. Wolfrom), Academic Press, New York, 1965, 83-91.
- 6) C. Muriel: *Aquaculture*, 49, 197-208 (1985).
- 7) P. Waterstrat, J. Ainsworth and G. Capley: *J. Fish Dis.*, 12, 87-94 (1989).
- 8) A. Thuvander, T. Hongslo, E. Jansson and B. Sundquist: *J. Fish Dis.*, 10, 479-486 (1987).
- 9) T. Iida, H. Yonekura, M. Izumiyama and H. Wakabayashi: *Fish Pathol.*, 26, 201-205 (1991).
- 10) K. Kawai, R. Kusuda and T. Itami: *Fish Pathol.*, 15, 257-262 (1981).
- 11) C. J. Lobb: *Dev. Comp. Immunol.*, 11, 727-738 (1987).
- 12) T. C. Fletcher and P. T. Grant: *Biochem. J.*, 115, 65 (1969).
- 13) T. C. Fletcher and A. White: *Aquaculture*, 1, 417-428 (1973).
- 14) C. M. Bradshaw, A. S. Richard and M. M. Sigel: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 136, 1122-1124 (1971).
- 15) C. J. Lobb and L. W. Clem: *J. Immunol.*, 127, 1525-1529 (1981).
- 16) E. A. St. Louis-Cormier, C. K. Osterland and P. D. Anderson: *Dev. Comp. Immunol.*, 8, 71-80 (1984).