

## Cadmium이 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 면역 반응에 미치는 영향

변주영 · 유민호 · 전려진 · 이형호\* · 정현도†  
부경대학교 수산생명의학과, \*부경대학교 생물공학과

## Influence of cadmium exposure on the immune response of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Ju Young Byun, Min Ho Yoo, Lyu Jin Jun, Hyung-Ho Lee\*  
and Hyun Do Jeong†

Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Sciences,  
Pukyong National University, Pusan 608-737

\*Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University

Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* known as an one of the major aquacultured species in Korea were exposed to cadmium (Cd) with different protocols and analyzed the effects of exposure on the immune response. Antibody levels in sera of the group exposed to Cd (20 ppb) by immersion method from 2 weeks before immunization with formalinised *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) KFE antigen to the end of experiment reached to peak level faster than that of the non-exposed group. After this peaking time the levels decreased much at a faster rate compared to the non-exposed group. This tendency was also appeared in the numbers of specific antibody secreting cells (SASC) analyzed with the enzyme-linked immunospot (ELISPOT)-assay technique in the splenocytes of the experimental groups exposed to Cd with different ways. Interestingly, the group exposed to Cd for 2 weeks before immunization also showed increased numbers of SASC unlikely the antibody production and suggested a more critical influence of cadmium exposure in early stage of immune reaction. Artificial infection with live *E. tarda* KFE induced 100% mortality in the flounder exposed to cadmium throughout the experimental period from two weeks before the immunization. It may imply that some other factors related to specific immunity are involving in the defence system of flounder exposed to Cd. Taken together, Cd exposure may induce temporarily stimulatory or inhibitory effects on the immune reaction, but suppress the physiological systems for the resistant against the infective agents with other toxic effects.

**Key words** : *Edwardsiella tarda*, Cd, *Paralichthys olivaceus*, ELISPOT-assay, Specific antibody secreting cell, Agglutination test

1980년대 이후 빠르게 진행된 우리 나라의 급속한 도시화와 산업화는 자연 환경에 도시폐수, 농장 유체수 등의 생활폐수 및 자연적으로 기원된 여러 복합적인 산업폐수를 유출시키게 되어 자연의 자정능력을 상실하게 하고 있다. 그 결과 매년 심각해지고 있는 수질오염은 수중 생태계내의 어류를 비롯한 거의 모든 수산생물의 생리적 기능에 영향을 미치고 있다 (Cross *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1989). 오염물질등에 의한 환경적인 스트레스는 Snieszko (1974)가 지적한 것과 같이 어류의 자체

방어 기작 등의 생리적 변화를 유도하여 전염성 질병등에 보다 높은 감수성을 나타내도록 변화시키고 있다. 이러한 것은 Rodsaether *et al.* (1977)이 뱀장어의 *Vibrio anguillarum*에 의한 질병 발생과 폐사율이 구리의 노출 여부에 크게 영향을 받는다는 보고에서도 쉽게 확인할 수 있다. 그러므로 현재 특정 공업 지역에서 해수중으로 배출되고 있는 중금속, 화학물질, 온배수, 담수 등과 같은 주요 오염원이 어패류의 여러 방어기작에 어떠한 영향을 미치며 그것은 추후에 발생할 수 있는 질병이나 증식속도

† Corresponding Author

**Table 1.** Protocols for Cd exposure by immersion against olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Experimental groups	Cd pre-immersion for 2 weeks	Immunization with <i>E. tarda</i> FKFC	Cd post-immersion for 7 weeks	Remark
A	+	+	-	
B	+	+	+	
C	-	+	+	
D	-	+	-	(+) control
E	-	-	-	(-) control

n, number of strain; A, *Streptococcus*; B, *Enterococcus*; C, *Lactococcus*; V, variable reaction.

와 어떠한 연관관계에 있는지를 밝히는 것은 매우 중요하다 할 수 있다.

구리, 수은, 납 등의 중금속과 함께 수질오염의 원인중 하나인 Cd은 인간을 비롯한 거의 모든 생물에 치명적인 영향을 미치는 요인이 되는 것으로 알려져 있다. 이것은 수중 생태계 내에서도 산소 또는 식물성 플랑크톤을 소멸시킬 뿐만 아니라 어류 등의 생리기능에도 직접적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Cross *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1989). 특히 어류의 방어기작에 중요한 면역계는 비록 적은 농도로의 노출일지라도 Cd을 포함한 많은 환경 오염 물질들에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다 (Exon and Koller, 1986). 그리고 Cd이 어류의 면역계에 미치는 영향에 대하여 발표된 연구에 의하면, Cd은 저농도의 노출에서는 체액성 면역 반응을 향상시키는 반면 고농도의 노출에서는 면역억제 영향을 가질 수 있다는 흥미로운 결과도 많이 나와 있다 (Jones *et al.*, 1971; Koller *et al.*, 1976; Shenker *et al.*, 1977; Fujimaki, 1985; Krzystyniak *et al.*, 1987). 그러나 이러한 Cd의 면역반응에 미치는 영향에 대한 연구는 포유류에서는 많은 보고가 되어 있으나 어류에 있어서는 혈청내 항체생성에만 국한되어져 이루어지고 있다. 그러므로 본 연구에서는 현재 우리나라의 연안과 육상 양식장에서 활발히 양식되고 있는 넙치를 Cd에 노출시킨 후 그 면역 반응에 미치는 영향을 특정 항원에 대한 혈청내 특이 항체량 변화와 특이 항체 생성 세포 (SASC) 수의 변화를 분석하고자 한다. 이는 단일 세포 수준에서까지 특이적 면역 반응을 분석함으로써 어류가 오염된 환경의 변화에 어떻게 반응하고 있는지를 조사하여 어류질병예방을 위한 기초

자료로서 활용 할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 실험어

평균체중 40 g의 병력이 없고 건강한 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 남해안의 한 양식장에서 분양 받아 실험실 수조에서 수온 22°C로 유지하여 실험 전 2주간 순치시킨 후 실험에 사용하였다.

### 면역처리

완전하게 진행된 상법 (Itami *et al.*, 1989)에 따라 0.5% formalin을 처리하여 불활화시킨 *E. tarda* KFE formalin killed cell (FKC)을 pH 7.2의 phosphate buffered saline (PBS) 완충용액에 습증량농도로 100 mg/ml로 현탁시킨 다음 Freund's complete adjuvant (FCA)와 1:1로 혼합하여 어체 당 10 mg/kg의 농도로 복강 주사하였다. 면역 후 1, 2, 3, 5, 7 주째에 각 그룹의 어류 미부 혈관으로 채혈을 실시하여 특이 항체 생성을 분석하였으며 항체 생성 세포 분석에는 신속하게 적출된 비장 조직을 단일 세포화하여 사용하였다.

### Cd 처리

CdCl<sub>2</sub> · 5/2 H<sub>2</sub>O (Sigma Chem. Co.)를 증류수로 1 g Cd/l 가 되게 stock solution을 만들어 사용하였다. 본 실험에서 사용한 농도는 Cd<sup>++</sup>의 농도를 의미하고 있다. 각각의 그룹 당 30마리씩 실험어를 150 l 수조에 수용한 다음 사육수의 Cd 농도가 20 ppb가 되도록 stock solution을 가하였고 매일 수조의 1/2 을 새로운 정상 또는 Cd 첨가 해수로 환수 시키면

서 7주간 실험하였다. 이때 각각의 시기별 분석에 사용한 어류의 개체수는 5마리씩으로 하였다. Cd의 노출과 *E. tarda* KFE FKC (*E. tarda* bacterin)의 immunization schedule에 대한 것은 Table 1에 표시하였다.

### Agglutination test

미부 정맥을 통하여 채혈된 혈액을 4°C에서 12시간 이상 정지시킨 후 원심 분리 (8,000 rpm, 10 min)하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 형성된 항 *E. tarda* KFE 항체의 측정은 U형 96 well polystyrene microtiter plate를 이용하여 연속적으로 희석하는 microtiter법을 이용하였다. 연속적으로 생리 식염수로 2배씩 희석된 항혈청을 각 well에 50  $\mu$ l씩 가하고 *E. tarda* KFE FKC 항원 (4 mg/ml)을 50  $\mu$ l씩 첨가하여 실온의 습윤기에서 overnight동안 반응시킨 후 응집괴가 형성되는 최대 희석 배수를 응집항체가로 결정하였다.

### ELISPOT-assay

Nitrocellulose membranes을 직경 6 mm의 원형으로 자른 후 96 well polystyrene microtiter plate의 각 well 바닥에 부착시켜 ELISPOT을 위한 plate로 준비하였다. SASC의 검출을 위하여 먼저 ethylenediamine tetra-acetic acid (20 mM, pH 7.2)로 추출한 *E. tarda* KFE 항원을 Ha *et al.* (1999)의 방법에 따라 50  $\mu$ g/ml의 농도가 되게 조제 하고 이를 nitrocellulose membranes가 들어 있는 96 well polystyrene microtiter plate의 각 well에 100  $\mu$ l씩 가하여 4°C에서 overnight 동안 바닥에 있는 membranes에 항원을 부착시켰다. Tween20이 첨가된 PBS (T-PBS)를 washing buffer로 각 well을 3회씩 세척하였으며 이후로 모든 단계의 반응이 끝날 때마다 이와 동일하게 세척하였다. 2% BSA를 200  $\mu$ l 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 결합을 억제하였다. 적출된 비장조직을 단일세포로 L-15 세포 배양 배지에 현탁하여 각 well에  $1 \times 10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  cells의 농도로 duplicate로 넣고 항체 생성을 유도하기 위해 CO<sub>2</sub> incubator (CO<sub>2</sub> 5%)에서 22°C, 6시간동안 배양하였다. 세척 후 biotinylated rabbit anti-flounder Ig를 25  $\mu$ g/ml의 농도로 반응시키고 alkaline phosphate peroxidase (Sigma Chem. Co.)를 1:1000으로 희석하

여 75  $\mu$ l씩 첨가하여 반응시켰다. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT, Sigma Chem. Co.)을 기질로 사용하여 200  $\mu$ l씩 well에 첨가하였다. 10분 후에 증류수를 첨가하여 반응을 정지시키고 형성된 SASC는 해부 현미경으로 그 수를 직접 계수 하였다.

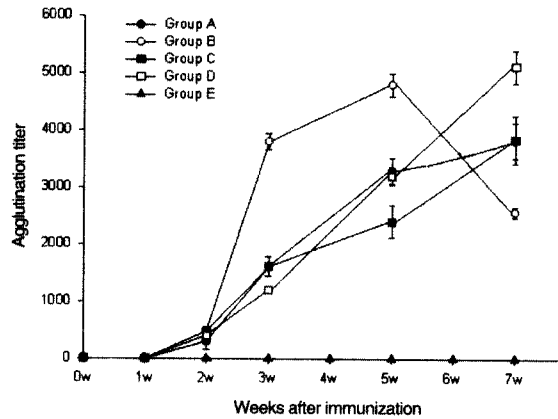


Fig. 1. Effect of cadmium exposure on specific antibody levels measured with agglutination test in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, immunized with *E. tarda* KFE bacterin. Each value is the mean of 5 fish.

### 공격실험

TSB (tryptic soy broth)에서 18시간동안 25°C에서 배양한 *E. tarda* KFE (LD<sub>50</sub>:  $1.4 \times 10^5$  cfu/Kg 어체중)를 0.85% 멸균 생리식염수에 현탁시켜  $5.6 \times 10^4$  cfu/ml로 한 후 이를 공격 실험용 세균액으로 사용하였다. 공격 실험은 면역 전 2주와 면역 후 7주간 계속 Cd에 노출된 시험구와 면역 후 7주간 정상해수에 두었던 양성 대조구 그리고 immunization을 하지 않은 음성 대조구, 즉 그룹 B, D, E 각 20마리씩에 준비한 *E. tarda* KFE 균액을 개체당 0.1 ml씩 복강주사하여 9일 동안 관찰하였고 결과는 누적 폐사율로 나타내었다.

### 결 과

#### Cd에 노출된 넙치의 혈청 내 특이 항체량의 변화

Cd이 넙치의 면역 반응에 미치는 영향을 보기 위하여 *E. tarda* KFE FKC를 복강 주사한 넙치에 Cd을 침지법으로 각기 다른 노출시기와 노출시간으로 하여 처리하였다. 면역 반응의 분석은 *E. tarda*

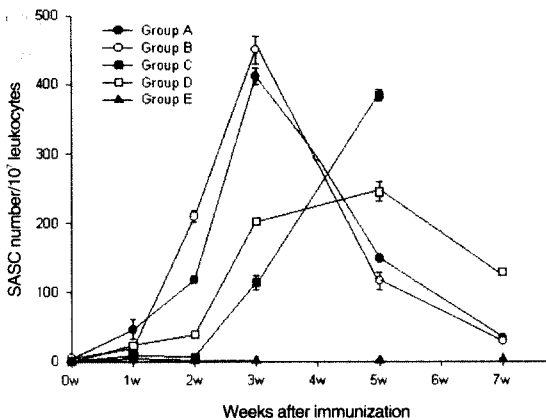


Fig. 2. Effect of cadmium exposure on the numbers of specific antibody secreting cell (SASC) in the splenocytes of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Each value is the mean of 5 fish.

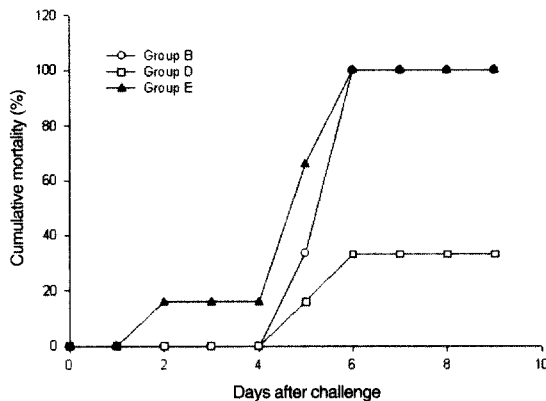


Fig. 3. Effect of cadmium exposure on the mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, challenged with *E. tarda* KFE ( $5.6 \times 10^3$  cfu/fish).

KFE FKC에 대한 응집 항체가를 측정하였다 (Fig. 1). 그 결과 Cd에 노출된 모든 시험구에서 혈청 내 특이 항체가 2주째부터 증가하기 시작하였다. 그러나 면역 전후로 계속해서 Cd에 노출된 시험구 B의 혈청내 항 *E. tarda* KFE 항체는 면역 전후 정상해수에 있던 양성 대조구 D와 비교하여 볼 때 면역 후 2주째부터 빠른 혈청 내 항체의 증가를 보여 주었다. 그러나 양적인 최고 수치의 차이는 나타나지 않았으며 5주째 이후로는 혈청내의 항체가 감소하기 시작하여 면역 7주 후에는 다른 시험구에 비해 오히려 낮은 항체를 나타내

었다. 시험구 A는 시험구 C와 함께 양성 대조구 D와 비교해 볼 때 유의성 있는 차이를 보이지는 않았다.

### Cd에 노출된 넙치의 SASC 수의 변화

Cd이 넙치의 면역 반응에 미치는 영향을 단일 세포 수준에서 분석하기 위하여 특이 항체를 생산해내는 SASC 수의 변화를 추적하였다. SASC의 검출은 면역 2주전부터 계속해서 Cd에 노출되었던 시험구 B가 양성 대조구 D와 비교해 볼 때 2주째에 빠른 속도의 항체 생성 세포증가를 보였으며 최대치 ( $450 \text{ spots}/10^7 \text{ splenocytes}$ ) 또한 현저하게 높은 수치를 보여 주었다. 이와 같은 반응은 면역 전 2주간 Cd에 노출되었던 시험구 A에서도 같은 경향으로 나타났다. 그러나 이 두 시험구는 양성 대조구에 비하여 약 2주정도 빠르게 최대치의 spot수를 나타낸 이후 빠른 속도로 감소하기 시작하여 면역 5주 후에는 오히려 낮은 수치를 나타내었다. 시험구 C는 3주까지는 가장 낮은 항체 생성 세포가 검출되었으나 5주째에는 많은 수의 항체 생성 세포가 생성되어 검출되었고, 양성 대조구 D는 5주째까지 점차적으로 증가하다가 이후로 검출되는 spot의 수가 서서히 감소하였다 (Fig. 2).

### 공격실험을 통한 Cd에 노출된 넙치의 질병 저항성 분석

동해연안양식장의 병어로부터 분리한 *E. tarda* KFE 균주를  $5.6 \times 10^3$  cfu/fish로 복강 주사하여 전 실험기간동안 Cd에 노출된 B 시험구를 대상으로 하여 누적 폐사율을 분석하였다. 그 결과 면역 전후에 지속적인 침지로 Cd에 노출된 시험구 B와 음성 대조구 E는 6일 후 100%의 누적 폐사율을 나타내었다 (Fig. 3). 그러나 *E. tarda* KFE FKC로 면역시킨 양성 대조구 D에서도 약 30%의 폐사율을 나타내어 본 균주는 병원성이 상당히 강한 것으로 나타났다.

### 고 찰

각기 다른 조건으로 Cd에 노출시킨 넙치의 *E. tarda* KFE FKC에 대한 응집 항체를 1, 2, 3, 5, 7주째에 측정한 결과 모든 시험구의 혈청 내 특이 항체가 2주째부터 증가하기 시작하였으며 특히 시험

구 B에서 가장 빠르게 증가하는 경향을 보여 주었다. 이러한 결과는 메기를 사용한 Albergoni and Viola(1995)의 보고와 유사 하였지만 5주째 이후로는 특이 항체가 다른 시험구에 비해 빠르게 감소하는 차이점을 나타내어 사용한 항원과 어종간의 특성 때문에 다르게 나타날 수 있음을 보여 주었다 (Fig. 1). 그리고 Cd이 미치는 체액성 특이 면역 반응의 변화를 단일세포수준에서 분석하기 위하여 SASC의 변화를 알아 본 결과 면역 전 2주간 Cd에 노출되었던 시험구 A와 면역 전후로 계속해서 Cd에 노출되었던 시험구 B가 양성 대조구인 D에 비하여 2주째 부터 항체 생성 세포의 빠른증가를 보였고 최대치 또한 높게 나타났다 (Fig. 2). 그러나 A, B 두 시험구는 최대치의 SASC수를 나타낸 이후에는 다른 시험구에 비하여 빠른 SASC수의 감소를 보여 주어 시험구 B의 혈청 내 항체량 변화 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 이러한 결과는, 외부 항원이 어체 내로 유입되게 되면 lymphoid organ 내의 lymphocyte가 자극되어져 분화와 증식의 과정을 거치게 되는데, 면역 전후로 계속 Cd에 노출된 시험구 B의 경우 lymphoid organ 내의 lymphocyte는 differentiation과 secretion 모두가 빠르게 유도되도록 하는 영향을 받는 것으로 추정된다.

그런데 Cd에 노출된 어류의 생리적 상태는 노출을 중지한 후 약 7일 전후부터는 회복(recovery)이 일어난다는 것이 확인되어져 있고 (Harley *et al.*, 1989), 면역 반응에서 외부의 온도 변화 등과 같은 stress가 중요하게 작용하는 시기는 항원 주사 후 약 5일 이내에 일어나는 B 세포의 differentiation을 위한 early stage라고 보고되어 있다 (Yang and Zuo, 1991). 그러므로 면역 실시 전 2주 동안만 Cd에 노출된 시험구 A의 경우, Cd에의 노출효과가 면역 반응에서 B 세포의 differentiation에 중요한 early stage에 영향을 미치기도 하지만 노출 중지 후에 이어지는 생리적 회복도 함께 진행되어 SASC의 증가는 나타나지만 완전한 항체 유출을 위한 late stage의 Cd 자극은 없었기 때문에 또는 생리적인 회복(recovery)에 의하여 혈청 내 항체량 증가는 볼 수 없었던 것으로 추정된다.

한편, 면역과 동시에 Cd에 노출 시킨 시험구 C는 2주까지는 낮은 항체 생성 세포가 검출되었으나 이후 5주째에 증가된 항체 생성 세포 수를 보여 주었

는데 (Fig. 2), 이것은 Cd이 면역반응에 영향을 주기 위하여서는 생체 내 축적 기간이 필요하기 때문인 것으로 생각되어 진다. 그러나 특이 항체량의 분석에서는 이러한 현상이 뚜렷하게 나타나지 않았는데 (Fig. 1) 이에 대하여서는 Cd의 축적속도, 면역 반응의 단계, 그리고 다른 면역 반응 관련세포(T세포, Macrophage) 등의 변화가 보다 구체적으로 분석되어져야 할 것이다. 그리고 어종간, 수온 등의 영향이 Cd의 노출농도 변화에 따라 어떠한 영향을 나타내는지에 대한 분석은 항 후 다시 이루어져야 할 과제로 남아있다.

생리적 독성물질임에도 불구하고 일시적 어류의 면역반응 증가효과를 유도하는 것과 같이 보이는 Cd에의 노출이 실질적인 어류의 방어체계에서 어떠한 효과를 나타내는지를 직접 분석하기 위하여 항원 (FKC 형태)으로 사용한 *E. tarda* KFE 생균으로 공격실험을 실시하였다 (Fig. 3). 본 실험에서는 자연계의 어류가 Cd에 노출 되는 것은 환경의 변화속에서 상당기간 지속적일 것이므로 면역 전과 면역 후 계속 Cd에 노출 시킨 시험구 B와 대조구들을 비교대상으로 하였는데, 시험구 B 와 면역을 실시하지 않은 정상해수의 시험구 E는 모두 100%의 폐사율을 나타내었다. 이러한 결과는 Cd 노출 후 특이 항체가 빠르게 생성된다는 것이 방어체계의 빠른 소진(exhaust)을 의미한 것이거나 또는 노출 7주후 빠르게 감소된 특이 항체량 때문 일 것이다. 더불어서 Cd의 여러 다른 생리적 요소들에 의한 직접적인 작용, 즉 어류의 여러 생리적 효소 활성의 감쇠에 의한 interferon 분자와 complement의 생성부족 (O'Neill, 1981), 그리고 생성된 항체의 직접적인 살균 역가 감소 (Jones *et al.*, 1971) 등과 같은 Cd의 독성작용도 함께 작용하였을 것으로 추정된다.

결론적으로 Cd에 지속적으로 노출된 어류는 특이 면역 반응에서 peaking time은 빠르나 SASC의 수 또는 항체량이 빨리 감소하는 반응을 보여 주었으며 전체적인 방어 체계에서는 면역반응에 대한 것뿐만 아니라 독성효과도 함께 고려되어야 하는 복합적인 것임을 확인 할 수 있었다.

## 요 약

어류의 면역 반응에 대한 cadmium (Cd)의 영향을 분석하기 위하여 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 각기 다른 방법으로 Cd에 노출시킨후 특이적 면역 반응의 변화와 *Edwardsiella tarda* KFE (*E. tarda* KFE)의 인위감염에 대한 저항성을 분석하였다. *E. tarda* KFE 의 formalin killed cell (FKC)로 면역시키기 2주전부터 계속하여 실험 기간동안 침지법으로 Cd (20 ppb)에 노출된 시험구는 노출되지 않은 시험구와 양성 대조구보다 혈청 내 특이 항체가가 빠르게 최고치에 이르렀으나, 감소속도는 노출시키지 않은 양성 대조구에 비하여 빠른 것으로 나타났다. 이러한 경향은 splenocytes를 ELISPOT-assay (enzyme-linked immunospot assay)를 이용하여 특이 항체 생성 세포 (specific antibody secreting cell, SASC) 수를 분석해 보았을 때에도 동일하게 나타났다. 그러나 면역 전 2주 동안만 Cd에 노출시킨 시험구에서는 혈청내 항체생성 결과와는 달리 증가된 SASC의 수를 보여 주었다. 그리고 면역 2주전부터 실험 전기간동안 계속해서 Cd에 노출시킨 넙치를 대상으로 하여 *E. tarda* KFE 생균으로 인위 감염 시켰을 때 100% 폐사율을 보여 주었다. 이것은 Cd에 지속적으로 노출된 어류에서의 방어 체계는 면역반응뿐만 아니라 독성효과도 함께 고려되어야 하는 복합적인 것임을 확인 할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 부경대학교 해양식량자원개발 특성화 사업단의 5차년도 (2001년) 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

## 참고 문헌

- Albergoni, V. and Viola, A. : Effects of cadmium on catfish, *Ictalurus melas*, humoral immune response. *Fish & Shellfish Immunol.*, 5: 89-95, 1995.
- Anderson, D. P., Dixoc, O. W. and Lizzio, E. F. : Suppression of antibody-producing cells in rainbow trout spleen sections exposed to copper *in vitro*. *J. Aquat. Animal Health*, 1: 57-61, 1989.
- Cross, F. A., Peters, D. S. and Schaaf, W. E. : Implications of waste disposal on costal waters on fish populations. In American Society for Testing and Materials Special Technical Publication, 854: 383-399, 1985.
- Exon, J. H. and Koller, L. D. : Immunotoxicity of cadmium; In handbook of experimental pharmacology. Cadmium (E. C. Foulkes, ed.), 339-350, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 1986.
- Fujimaki, H. : Suppression of primary antibody response by a single exposure to cadmium in mice. *Toxicol. Lett.*, 25: 69-74, 1985.
- Ha, J. Y., Park, J. H., Kim, M. S., Chung, J. K. and Jeong, H. D. : Study on the production and management of aquatic animals: Application of ELISPOT-assay for the detection of antibody-secreting cells in flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Korean Fish. Soc.*, 32: 420-426, 1999.
- Harley, C. B., Menon, C. R., Rach ubinski, R. A. and Nieboer, E. : Metallothionin mRNA and protein induction by cadmium in peripheral-blood leucocytes. *Biochem. J.*, 262: 873-879, 1989.
- Itami, T., Takahashi, Y. and Nakamura, Y. : Efficiency of vaccination against vibriosis in cultured kimura prawms, *Penaeus japonicus*. *J. Aquat. Ani. Health.*, 1: 238-242, 1989.
- Jones, R. H., Williams, R. L. and Jones, A. M. : Effects of heavy metal on the immune response. Preliminary findings for cadmium in rats. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137: 1231-1236, 1971.
- Koller, L. D., Exon, J. H. and Roan, J. G. : Humoral antibody response in mice after single dose exposure to lead and cadmium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 151: 339-342, 1976.
- Krzystyniak, K., Fournier, M., Trottier, B., Nadeau, D. and Chevalier, G. : Immunosuppression in mice after inhalation of cadmium aerosol. *Toxicol. Lett.*, 38: 1-12, 1987.
- O'Neill, J. G. : Effects of intraperitoneal lead and cadmium on the humoral immune response of *Salmo trutta*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 27: 42-48, 1981.
- Rodsather, M. C., Olafsen, J. and Raa, J. : Copper can trigger outbreaks of vibriosis in eels. *Nord. Vet. Med.*, 29(12, Suppl. 1): 3, 1997.
- Shenker, B. J., Matarazzo, W. J., Hirsch, R. L. and Gray, I. : Trace metal modification of immunocompetence. I. Effect of trace metals in the cultures on *in vitro* transformation of B lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 34: 19-24, 1977.
- Snieszko, S. F. : The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish. Biol.*, 6: 2, 197-208, 1974.
- Yang, X. and Zuo, W. : Mechanism of water temperature-dependent immune response in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *J. Chin. Acad. Fish. Sci.*, 4: 1, 27-33, 1991.