

マダイの胸腺リンパ球の活性に及ぼす各種ステロイドの影響

浜口 昌巳・薄 浩則・石岡 宏子

Effects of Steroids on Mitogenetic Response of Thymic Lymphocytes prepared from Red Sea Bream, *Pagrus major*

Masami HAMAGUCHI, Hironori USUKI, and Hiroko ISHIOKA

In order to clarify the relationship between steroids and immune response in red sea bream, *Pagrus major*, effect of three steroids on mitogenetic response of the thymic lymphocytes was determined *in vitro*. Red sea bream thymic lymphocytes without macrophages were cultured at 25 °C for 24 hr in the presence of phytohemagglutinin (PHA), pokeweed mitogen (PWM) and *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS). The mitogenicity of three mitogens to the thymic lymphocytes was determined by ³H-thymidine incorporation into the thymic lymphocytes. The effect of three steroids, 17 α -hydroxy-progesterone (17 α -prog), corticosterone (CCS) and cortisol (CRS), on mitogenetic response of the thymic lymphocytes stimulated by PHA was also determined by the same method mentioned above. The mitogenetic activity of PHA was the highest among three mitogens. The mitogenetic responsibility of the thymic lymphocytes stimulated by PHA was strongly inhibited by CRS and CCS, and the former was rather effective than the latter.

Key words : red sea bream, thymic lymphocytes, steroid, phytohemagglutinin.

哺乳類では、生体は各種のストレスを受けることによって、様々な生理学的反応を起こすことが知られている。このようなストレス反応のうち、最初に表れる第一次反応としては血中への各種ホルモンの放出があり、ついでこれらの働きによって第二次反応として様々な生理学的反応が認められる(石岡1982, 熊谷1983)。第一次反応で血中に放出されるホルモンのうち、副腎皮質系のコルチコステロイドはホルモンとしての本来の機能のほかに、胸腺に由来する細胞の分裂および活性を抑制する効果を持っており、生体の免疫系に様々な影響を及ぼすことが知られている(BAXTER 1976, MUNCK *et al* 1984, 広川 1993)。胸腺は脊椎動物の細胞性免疫機構の中心的役割を演じるTリンパ球の分化および成熟の場として、個体の生体防御系に重要な役割を担っている。したがって、ストレス反応の一環として放出されたコルチコステロイドは、胸腺由来リンパ球の分裂および活性を抑制する作用によって免疫系による感染防御系

に障害を与えることとなる。このように、内分泌系と免疫系は独立した系としてではなく、互いに影響し合いながら、それぞれが生体を維持するように作用している（広川 1993）。魚類においても各種ストレスにさらされた際には、血中のコルチコステロイドの一種であるコルチゾールの血中濃度が上昇することが知られている（石岡 1980, DONALDSON 1981, SCHRECK 1981）。また、魚類は独立した器官として胸腺を保有し、主要組織適合抗原に基づく移植片拒絶反応が認められていることから、哺乳類のTリンパ球機能領域を獲得した細胞が存在する可能性が大きいといえる。このことから、魚類においてもストレスにともなうコルチコステロイドの血中濃度の上昇は、この哺乳類のTリンパ球様細胞の活性を抑制し、感染防御系に影響を与えうるものと考えられる（MAULE et al 1989）。したがって、魚類リンパ球に対するコルチコステロイドの影響を調べることは、ハンドリングなどの各種ストレスが単独に、あるいは複合して負荷されることが多いと思われる養殖環境において、魚をいかに健康に育てていくかということを考えるうえで有用な知見が得られるものと思われる。

そこで、本研究では産業上重要種であるマダイを用いて3種のリンパ球分裂促進因子の効果を検討し、活性化に最も大きな効果が認められる因子を特定し、これによって刺激した胸腺リンパ球に及ぼすコルチコステロイド2種と、これらに類似した分子1種の計3種のステロイドの影響を試験管培養法によって検討した。

実 験 方 法

供試魚 1991年に広島県佐伯郡沖美町三高の養殖業者から購入した年齢2才、平均体重367gの養殖マダイ *Pagrus major* (TEMMINCK et SCHLEGEL) 30尾を用いた。

細胞培養用培地 ライボビッツL-15培地（FLOW LABORATORIES社製）に0.39%のNaCl, 5mMのHEPES（半井製薬社製）、100unit/mlのペニシリンGおよび0.05mgのストレプトマイシン（いずれも明治製薬社製）、5%のウシ胎児血清を添加したもの（以下L-15）を用いた。

胸腺細胞浮遊液の調製 心臓から採血したのち、脳穿刺によって即殺したマダイの体表及び鰓蓋内壁を78%アルコールでよく消毒してから胸腺を摘出した。これをL-15中にてハサミで細片化した後、白金メッシュでろ過して組織片を除去し、浮遊細胞液を作製した。この細胞浮遊液から付着法によってマクロファージ等を除去した細胞をL-15培地で3回洗浄したのち、0.3%トリパンブルーを用いて生細胞数を血球計算盤（ERMA社製）によって計数し、同培地中に 1.0×10^7 細胞/mlとなるように調製して胸腺細胞浮遊液とした。

リンパ球分裂促進因子およびステロイド リンパ球分裂促進因子としてフィトヘマグルチニン-P（PHA, SIGMA社製）、ポークウィードマイトジェン（PWM, SIGMA社製）、大腸菌 *Escherichia coli* リポポリサッカライド（LPS, DIFCO社製）を用いた。ステロイドにはFig.1に示す 17α -ヒドロキシprogテストロン（ 17α -prog, WAKO社製）、コルチコステロン（CCS, WAKO社製）、コルチゾール（CRS, WAKO社製）を用いた。

リンパ球刺激因子による胸腺リンパ球の活性化の測定 24穴のカルチャープレート（NUNC

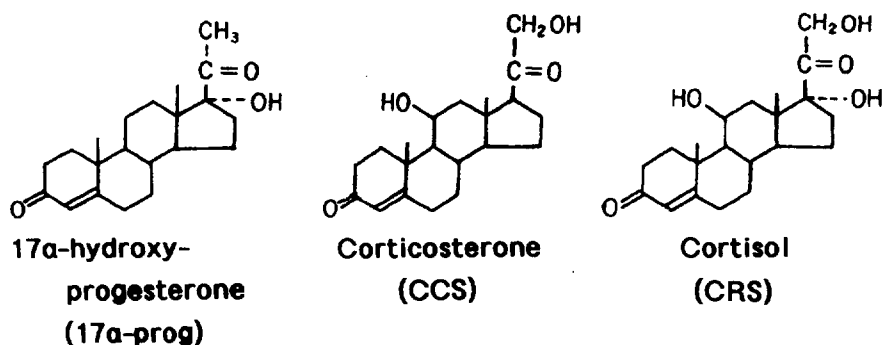


Fig. 1. Chemical structures of three steroids used in this study. Letters in parentheses are abbreviation of each steroid used in the present paper.

社製)の各ウェルに胸腺細胞浮遊液0.1ml, 50~0.001 μ g/mlの各段階濃度の3種類のリンパ球分裂促進因子を含むL-15を0.4ml添加し, 20 $^{\circ}$ Cで48時間培養した後, 各ウェルに最終濃度が7 \times 10⁴Bq/mlとなるように³H-サイミディンを添加し, さらに24時間培養した。培養後の細胞の処理は石岡・有馬(1989)の方法によって行った。放射活性は液体シンチレーションカウンター(Minaxi β -4000, PACKARD製)で測定し, 対照に分裂促進因子を含まないウェルの細胞を用いて下式によって刺激指数を算出した。

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{リンパ球分裂促進因子の刺激ウェルでの放射活性}}{\text{対照ウェルの放射活性}}$$

胸腺リンパ球の活性化に及ぼす各種ステロイドの影響 エタノールに17 α -progおよびCCSはそれぞれ400ng/ml, CRSは200ng/mlとなるように溶解してステロイド液とした。胸腺リンパ球を最終濃度が1 μ g/mlのPHAおよび20~0.01ng/mlのステロイドを含むL-15で前項と同じ方法で培養し, 放射活性を測定して刺激指数を算出した。対照にはPHAは含むが, ステロイドを含まないL-15, ブランクは両方とも含まないL-15で, それぞれ胸腺リンパ球を培養した後の放射活性とした。

結 果

マダイの胸腺リンパ球を各種分裂促進因子を添加して培養したときの放射活性の変化をFig. 2に示す。PHAを濃度1 μ g/mlとなるように添加した場合, 放射活性は7690 \pm 4220(平均値 \pm 標準偏差)dpmとなり, 無添加時および他の濃度と比較して有意に上昇した(P<0.01)。しかし, PWMおよびLPSでは最高濃度で放射活性が上昇する傾向を示したものの, 両者ともに有意な差は認められなかった(P>0.05)。それぞれの刺激指数ではPHA1 μ g/mlで5.96 \pm 3.64となったのが最大で, PWMおよびLPSでは2を越えなかった(Table 1)。

胸腺リンパ球を1 μ g/mlのPHAで刺激した時の放射活性に及ぼす各種ステロイドの影響をFig. 3に示す。PHAによって対照の放射活性はブランクより有意に上昇した(P<0.01)。ステ

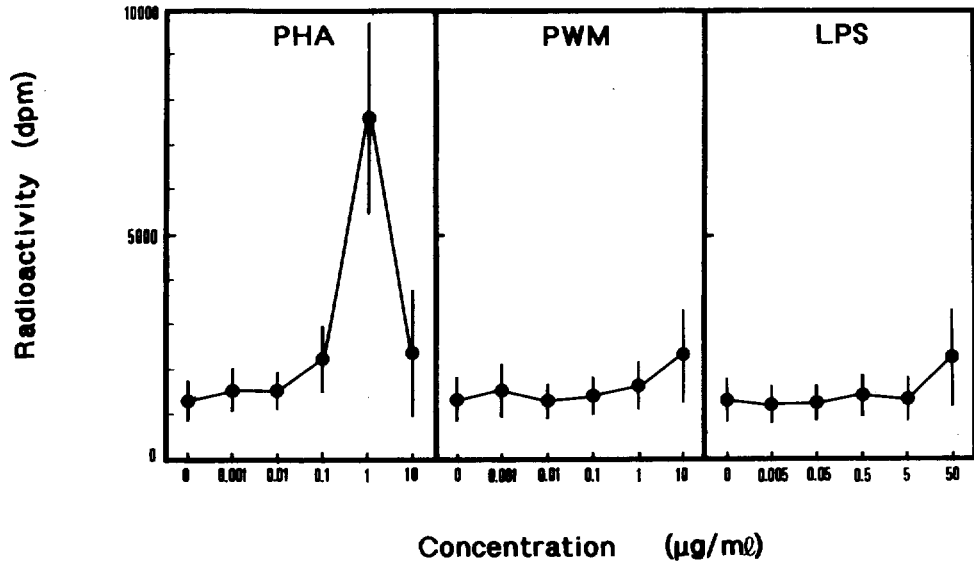


Fig. 2. Effects of mitogenetic substances on ^3H -thymidine incorporation in terms of radioactivity in the thymic lymphocytes of red sea bream, *Pagrus major*, *in vitro* (Mean \pm SD).

PHA : Phytohemagglutinin, PWM : Pokeweed mitogen,
LPS : *Escherichia coli* lipopolysaccharide,
dpm : Decay per minute.

Table 1. Effects of various mitogenic substances on stimulation index of thymic lymphocytes of red sea bream, *Pagrus major*.

Mitogens	Number of fishes	Concentration (ng/ml)	Stimulation Index (Mean \pm SD)
Phytohemagglutinin (PHA)	6	10	1.85 \pm 1.18
		1	5.96 \pm 3.64
		0.1	1.64 \pm 0.48
		0.01	1.10 \pm 0.12
		0.001	1.09 \pm 0.05
Pokeweed mitogen (PWM)	6	10	1.80 \pm 0.94
		1	1.17 \pm 0.19
		0.1	1.02 \pm 0.05
		0.01	0.90 \pm 0.05
Lipopolysaccharide (LPS)	6	0.001	1.05 \pm 0.13
		50	1.80 \pm 0.77
		5	0.97 \pm 0.21
		0.5	1.03 \pm 0.22
		0.05	0.94 \pm 0.15
		0.005	0.88 \pm 0.16

SD : Standard deviation

ロイド添加によって、 17α -prog では20ng/mlの濃度で対照に比べて放射活性が有意に低下し (P<0.01), リンパ球の活性化が阻害された。CCS では放射活性は0.2ng/mlから低下する傾向

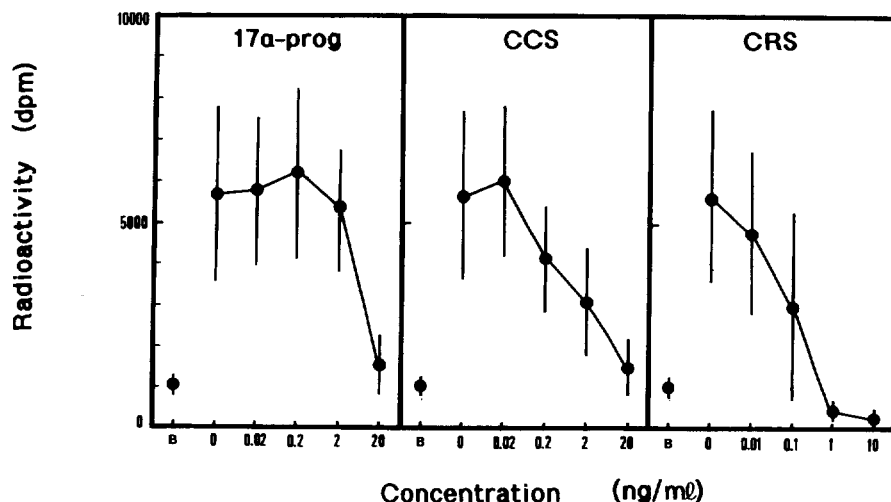


Fig. 3 Effects of mitogenetic substances on ^3H -thymidine incorporation in terms of radioactivity in the thymic lymphocytes of red sea bream, *Pagrus major*, *in vitro* (Mean \pm SD).
 PHA : Phytohemagglutinin, PWM : Pokeweed mitogen,
 LPS : *Escherichia coli* lipopolysaccharide,
 dpm : Decay per minute.

が認められ、20ng/mlでは対照との間に有意な差が認められた ($P < 0.01$)。CRS では0.01ng/mlの濃度からすでに放射活性が低下し、濃度が上昇するにつれてその度合は大きくなり、1 ng/ml以上では対照と比べて有意な差が認められた ($P < 0.01$)。それぞれの刺激指数は17 α -Progでは20ng/mlでリンパ球の活性化の抑制が認められたが、それ以下の濃度では影響はなかった。CCSでは0.20ng/ml以上、また、CRSでは0.01ng/ml以上で抑制が認められた (Table 2)。

Table 2. Effects of various steroids on activation of thymic lymphocytes of red sea bream, *Pagrus major*, stimulated by PHA.

Steroids	Number of fishes	Concentration (ng/ml)	Stimulation Index (Mean \pm SD)
17 α -hydroxy-progesterone (17 α -prog)	7	20	0.25 \pm 0.06
		2	1.00 \pm 0.16
		0.2	1.14 \pm 0.10
		0.02	1.06 \pm 0.13
Corticosterone (CCS)	7	20	0.14 \pm 0.08
		2	0.53 \pm 0.09
		0.2	0.80 \pm 0.17
		0.02	1.10 \pm 0.11
Cortisol (CRS)	7	10	0.04 \pm 0.02
		1	0.08 \pm 0.02
		0.1	0.49 \pm 0.29
		0.01	0.87 \pm 0.17

SD : Standard deviation.

考 察

マダイの胸腺リンパ球の活性化に及ぼすステロイドの影響を調べるにあたって、まず各種リンパ球分裂促進因子の効果を検討した。哺乳類ではリンパ球分裂促進因子のうち、PHA はTリンパ球、PWM はTおよびBリンパ球、LPS はBリンパ球に作用することから、それぞれの因子はリンパ球のサブポピュレーションの同定に用いられている。今回の結果から、マダイの胸腺リンパ球はPHA でよく活性化し、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で刺激指数が最大となったが、PWM およびLPS に対する反応はいずれも刺激指数が2以下となり、PHA と比較して活性化の程度が低かった。このことから、マダイの胸腺リンパ球は哺乳類のTリンパ球に近い反応性をもったリンパ球で構成されているものと考えられた。ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) およびchannel catfish (*Ictalurus punctatus*)、の胸腺細胞に対しては、Tリンパ球に指向性のあるリンパ球分裂促進因子のみが作用したとされている (ETLINGER *et al* 1976, ELLSAESSER 1988)。末梢血中のリンパ球であっても bluegil (*Lepomis macrochirus*) では胸腺由来抗原であるThy-1 様抗原を保有しているリンパ球群を除去した場合、PHA に対する反応性は低下した (CUCHENS and CLAM 1977)。また、ニジマスおよびchannel catfish では、哺乳類のBリンパ球の特徴となる細胞表面抗体 (sIg) を保有している細胞群はLPSに反応し、保有しない細胞群はPHA やコンカナバリン-A (Con-A) に反応したことが報告されている (DELUCA *et al* 1983, SIZEMORE *et al* 1984, 浜口 1991)。さらに、西村 (1993) はブリの胸腺特異抗原に対するモノクローナル抗体に反応する細胞群はCon-Aによく反応したとしている。このように、魚類では胸腺細胞およびそれに関連すると思われる細胞は、Tリンパ球に指向性のあるリンパ球分裂促進因子に対して反応性を有し、胸腺由来のTリンパ球様のサブポピュレーションの存在が確認されている。しかし、魚類リンパ球の試験管内培養法によるサブポピュレーションの同定の結果は、培地成分、添加する血清の種類や量などによって左右されるので、WARR and SARR それぞれの魚種にあった培地成分、血清の種類および添加量の検討など慎重を期す必要性はあるが、本研究結果はマダイにおいても、胸腺由来Tリンパ様細胞の存在を強く示唆するものである。

以上の結果を基にしてマダイの胸腺リンパ球を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のPHA で刺激したときの各種ステロイドの影響を検討したところ、個体差は大きいもののコルチコステロイドであるCCS やCRS によって胸腺リンパ球の活性化が強く抑制されたことが明らかであるのに対し、性ホルモンに属する $17\alpha\text{-prog}$ では抑制効果は小さかった。CCS とCRS ではCRSの方が低濃度で抑制効果が認められた。脊椎動物では、コルチコステロイドはタンパク質代謝、炭水化物代謝、電解質の代謝等にかかわる広範囲な生理活性を持つことが知られている。魚類に関してもそれらの機能が確認されているが、主としてCRSを研究対象としたものが多い。石岡 (1984) はマダイの血清中のコルチコステロイドはCRSが主体であることを確認している。したがって、試験管内で、マダイにおいてCCSよりCRSが胸腺リンパ球の機能抑制効果が高かったことは、マダイのコルチコステロイドはCRSが主体であるので、CRSに対する感受性が高いことを示

すのではないかと考えられる。一方、白血球の持つグルココルチコイド (=コルチコステロイド) のリセプターの数はストレスを受けた後の経過時間やストレスの種類によって変化することが知られており (MAULE and SCHRECK 1990, 1991), マダイにおいて各種ステロイドのTリンパ球の活性化抑制作用に個体差が大きかった理由としては各個体で供試前に受けたストレスの履歴の違いが影響している可能性がある。

石岡 (1984) はマダイの各種ストレスに対する反応性を検討し, 各種ストレスを与えたのちに血中の CRS 量が上昇することを確認した。このことにより, CRS はマダイの体内で生体の適応反応の促進や維持に関与していることが推察されるが, 本研究によって, マダイの胸腺リンパ球の活性を低下させて, 分裂促進因子に対する反応を抑制することが明らかとなった。

魚類におけるコルチコステロイドの白血球やリンパ球に対する作用としては, 数の減少 (MCLEAY 1973, JOHANSSON-SJOBECK *et al* 1978, MAULE and SCHRECK 1990), 機能の低下 (TRIPP *et al* 1987) およびそれらの結果として生じる免疫応答や感染症に対する抵抗性の低下 (MAULE *et al* 1987, KAATTARI and TRIPP 1987, THOMAS and LEWIS 1987, MAULE *et al* 1989) が上げられる。このようなことから, コルチコステロイドの長期の分泌が生体防御能を抑制し, 感染症が発生しやすい条件を作り出すことは明白である。上記のとおり, マダイにおいても CRS によって胸腺リンパ球の活性が抑制されることが明らかになったことから, ストレスがかかった場合には, それに適応するための生体反応の一環として CRS の血中濃度が上がるが, 同時に生体防御能の低下を誘導することになる。養殖現場においては, 随時行われる網POTTINGER 1987, WEDEMEYER 197)。このように, 養殖現場では魚体は自然環境下とは異なり, 人為的な様々のストレスにさらされる。本研究により, 養殖マダイに加わるこれらストレスの結果起こるとされる胸腺由来リンパ球の活性の低下の大きな原因が CRS の血中濃度の上昇であることが示された。

要 約

ストレスの免疫系に及ぼす影響を調べるために, マダイの胸腺リンパ球を試験管内で培養し, その活性に及ぼすストレスによって血中濃度が上昇するコルチコステロイドの影響を調べた。

マダイの胸腺リンパ球は各種リンパ球分裂促進因子のうちポークウィードマイトジェン (PWM) や大腸菌リポポリサッカライド (LPS) に対してはほとんど反応しなかったが, フィトヘマグルチニン (PHA) に対してよく反応し活性化が認められた。この PHA による胸腺リンパ球活性化は 3 種ステロイド, すなわち 17α -ヒドロキシプロジェステロン (17α -prog), コルチコステロン (CCS) およびコルチゾール (CRS) のうち副腎皮質ホルモン 1 種である CRS によって最もよく阻害された。このことから, ストレスにさらされたときのマダイにおける生体防御能低下の大きな要因が CRS であることが示された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、種々の御協力を戴いた曾我梶枝さんに感謝の意を表します。

文 献

- BAXTER, J. D., 1976 : Glucocorticoid hormone action. *Pharm. Ther.* **B2**, 605-659.
- DELUCA, D., M. WILSON, and G. W. WARR, 1983 : Lymphocytes heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur. J. Immunol.*, **13**, 546-550.
- CUHENS, A. M., and L. W. CLEM, 1977 : Phylogeny of lymphocyte heterogeneity II. differential effects of temperature on fish T like and B like cells. *Cell. Immunol.*, **34**, 219-228.
- DONALDSON, E. M., 1981 : The pituitary-interrenal axis as indicator of stress in fish. In "Stress and Fish" (A. D. Pickering, ed.), Academic Press, London, pp. 11-47.
- ELLSAESSER, C. F., J. E. BLY, and L. W. CLEM., 1988 : Phylogeny of lymphocyte heterogeneity : the thymus of the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, **12**, 787-792.
- ETLINGER, H. M., H. O. HODGINS, and J. M. CHILLER, 1976 : Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for lymphocytes heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. *J. Immunol.*, **8**, 67-73.
- FLETCHER, G. L. (1975) : The effects of capture, "stress", and storage of whole blood on the red blood cells, plasma proteins, glucose and electrolytes of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Zool.*, **53**, 197-206
- 浜口昌巳, 1991 : ブリの細胞性免疫機構に関する研究. 南西水研報, 24, 27-151.
- 広川勝是, 1993 : 神経内分泌系による免疫機能調節. 「神経・内分泌・免疫系のクロストーク」(広川勝是編), 学会出版センター, 東京, 3-12.
- 石岡宏子, 1982 : ストレス. 「活魚輸送」(日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 52-69.
- 石岡宏子, 1984 : マダイのストレス反応に関する生理生化学的研究. 南西水研報, 17, 1-133.
- 石岡宏子・有馬郷司 (1989) : 細胞・組織培養系による養殖魚のストレス判定に関する研究. 科学技術庁昭和63年度アイソトープ平和利用研究成績年報, 29, 55-1-55-5.
- JOHANSON-SJOBECK, M. L., G. DAVE, A. LARSSON, K. LEWANDR and U. LIDMAN, 1978 : Haematological effects of cortisol in European eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **60**, 165-168.
- KAATTARI, S. L. and R. A. TRIPP, 1987 : Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. *Fish Biol.*, **31**(supplement A), 129-132.
- 熊谷 朗, 1984 : ストレスと適応病. 医学のあゆみ, 125(5), 300-303.
- MAULE, A. G., R. A. TRIPP, S. L. KAATTARI and C. B. SCHRECK 1989 : Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **120**, 135-142.
- MAULE, A. G. and C. B. SCHRECK, 1990 : Changes in numbers of leucocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment. *J. Aquat. animal Health*, **2**, 298-304.
- MAULE, A. G. and C. B. SCHRECK, 1990 : Glucocorticoid receptors in leucocytes and gill of juveniles coho salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **77**, 448-455.
- MAULE, A. G. and C. B. SCHRECK, 1991 : Stress and cortisol treatment changed affinity and number of gluco-corticoid receptors in leucocytes and gill of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrin.*, **84**, 83-93.
- MCLEAY, D. J., 1973 : Effects of cortisol and dexamethasone on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juveniles coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*.

- Gen. Comp. Endocrinol.*, **21**, 441-450.
- MUNCK, A., P. M. GUYRE, and N. J. HOLBROOK, 1984 : Physiological functions of glucocorticoids in stress and their reactions to pharmacological actions. *Endocrinol. Rev.*, **5**, 25-44.
- NISHIMURA, H., 1993 : Studies on the lymphocyte subpopulations of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Kochi Univ. Master Thesis 1993, 1-106.
- PICKERING, A. D., T. G. POTTINGER, and P. CHRISTIE (1982) : Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress : a time-course study. *J. Fish Biol.*, **20**, 229-224.
- PICKERING, A. D. and T. G. POTTINGER (1987) : Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *J. Fish Biol.*, **30**, 701-712.
- SCHRECK, C. B., 1981 : Stress and compensation in the teleostean fishes : response to social and physical factors. In "Stress and Fish" (A. D. PICKERING, ed.), Academic Press, London, pp. 295-321.
- SIZEMORE, C. R., N. W. MILLER, M. A. CUCHENS, C. J. LOBB, and L. W. CIEM, 1984 : Phylogeny of lymphocyte heterogeneity : the cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leucocytes. *J. Immunol.*, **133**, 2920-2930.
- STRANGE, R. J., and C. B. SCHRECK (1978) : Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 345-349.
- 玉置文一, 稲野宏志, 鈴木桂子, 1988 : ステロイドホルモン. 「ホルモンハンドブック」(日本比較内分泌学会編), 南江堂, 東京, 305-336.
- THOMAS, P. and D. H. LEWIS, 1987 : Effects of cortisol on immunity in red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Fish Biol.*, **31** (supplement A), 123-127.
- TRIPP, R. A., A. G. MAULE, C. B. SCHRECK, and S. L. KAATTARI, 1987 : Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocytes responses *in vitro*. *Dev. Comp. Immunol.*, **11**, 565-576.
- WARING, C. P., R. M. STAGG, and M. G. POXTON (1992) : The effects of handling on flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic salmon (*Salmosalar* L.). *J. Fish Biol.*, **41**, 131-144.
- WEDEMEYER, G. A. and W. T. YASUTAKE (1976) : Physiological response of juvenile coho salmon (*Salmogairdneri*) to handling and crowding stress in intensive fish culture. *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 2699-2702.