

## 魚類のストレスを低減する能登海洋深層水に関する研究

鈴木 信雄<sup>1</sup>, 関口 俊男<sup>1</sup>, 木谷 洋一郎<sup>1</sup>, 小木曾 正造<sup>1</sup>, 福士 圭介<sup>1</sup>,  
田淵 圭章<sup>2</sup>, 服部 淳彦<sup>3</sup>

<sup>1</sup>金沢大学環日本海域環境研究センター, <sup>2</sup>富山大学生命科学先端研究センター, <sup>3</sup>東京医科歯科大学教養部

**概要** 海洋深層水は表層水とは異なり、幾つかの特徴がある。即ち、1)河川水の影響を受けないため、化学物質による汚染を受けにくい点、2)有害な雑菌が少ないという点。3)無機塩(硝酸態窒素、リン酸、ケイ素等)が豊富であるという点。これらの特徴を生かして様々な商品が開発されている。また水産業にも生かされており、魚の養殖にも応用され、生育がよいという報告もある。しかしながら、深層水の魚類生理に対する詳細な機構を調べた研究は非常に少ないという現状である。そこで我々は、魚の内分泌学的な側面から研究を行った。

能登半島の九十九湾(石川県)で漁獲されたメジナ(*Girella punctate*)と石川県水産総合センターから譲渡していたヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)を実験に用いた。これらの魚は、約2週間馴化させた後、実験に用いた。まず、イニシャルのコルチゾル濃度を測定するために、魚を0.04% 2-フェノキシエタノール溶液で麻酔し、ヘパリン処理した注射器を用いて、血液サンプルを採取した。採取した血液を1.5 mlのチューブに入れて、15,000 rpmで3分間遠心分離した。分離した血漿を直ちに凍結し、使用するまで-80°Cで保管した。表面の海水および深層水で魚を飼育した後、5日および10日目に血液試料を再度採取し、上述のように遠心分離により血漿を分離した。その後、ELISAキットを用いて血漿コルチゾルレベルを測定した。

メジナを飼育して5日後、深層水で飼育したメジナよりもコルチゾル濃度は高かったが、表面水で飼育した魚の血漿コルチゾルレベルとの間には有意差がなかった。10日後、深層水で飼育したメジナの血漿コルチゾルレベルはイニシャルから変化しなかったが、表面水で飼育したメジナでは、血漿コルチゾル濃度が著しく上昇して、10日後の表面水と深層水で飼育したメジナの血漿コルチゾルレベルに有意差が得られた。ヒラメにおいても同様な結果が得られた。即ち、深層水で飼育するとイニシャルと比較してコルチゾル濃度は10日間飼育しても変化しなかった。一方、ヒラメを表層水で飼育すると5日及び10日目にしても上昇して、深層水で飼育したヒラメのコルチゾル濃度との間に有意差が認められた。魚介類を深層水に入れて飼育するとストレスがなくなるので、長期間蓄養できるということが経験的に知られており、この経験的な現象と本研究の結果は一致する。

### 1. 研究目的

海洋深層水(Deep Ocean Water: DOW)とは水深200 m以深に存在する深海の海水のことであり、①常に低温に保たれ、②豊富なミネラルや無機栄養分を含み、③細菌数が少ないという特徴を持つ。このような特徴をいかして、冷媒やミネラル源といった工業的な利用や、ミネラル豊富で清浄であると言った健康的なイメージを利用した健康グ

ッズが商品化されている(図1参照)。さらに、DOWで海産物を飼育することで生育が良くなるという経験的なことから水産増養殖にも利用されている<sup>(1)</sup>。しかしながら、科学的な根拠については、非常に少ないという現状である。また、深層水という概念は、日本にしかなく、海外(例えば、ノルウエー)では、水温の調節のために、DOWを利用しているに過ぎない。一方、金沢市の市場(近江町市場)

では、DOW に入れて魚を飼育すると、通常の海水と比較して数日間魚を生かすことができるという経験的なことも知られている。そこで申請者は、魚のストレスを軽減させることにより、市場で通常の海水よりも長く生かすことができているという仮説を立てて、実験を行った。

実験 1 では、表層海水 (Surface Sea Water: SSW) と DOW でメジナを 5 日間飼育し、飼育 5 日目の血中コルチゾル濃度を比較した。実験 2 及び 3 では、SSW と DOW でメジナまたはヒラメを 10 日間飼育し、飼育 5、10 日目の血中コルチゾル濃度の 0 日目 (イニシャル) に対する変化率を算出し比較した。さらに実験 4 では、ヒラメの血液を外注して分析した。

## 2. 研究方法

### 2.1 試験魚

実験には、メジナ (*Girella punctata*) およびヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) を用いた。

メジナを採用した理由は、釣りによる採集が容易で、飼育のノウハウもあり、過去の知見<sup>(2)</sup>によりウロコを用いた実験に発展させられる可能性もあったためである。金沢大学環日本海域環境研究センター 臨海実験施設が面する九十九湾で釣りによる採集を行い、実験の直前まで野外のかけ流し水槽で 3 日間以上の馴致処理をした。

ヒラメを採用した理由は、商業的価値が高く、生態や遺

伝子に関する知見の蓄積が進んでおり、また種苗生産事業者などから容易に入手できることなどである。実験 3 で用いたヒラメは、石川県水産総合研究センターより種苗生産用のものを譲り受けることで入手した。実験の直前まで野外のかけ流し水槽で 3 日間以上の馴致処理をした。

### 2.2 魚の実験飼育のための水槽飼育系の構築と制御

本研究では実験飼育のため、下記のような水槽飼育系を新たに構築した。

#### 飼育系 I:

この飼育系は、一般に広く販売されている水槽 (容積: 120 x 45 x 45 cm<sup>3</sup>) を使用して構築した。この規格の水槽を 2 個用意し、それぞれ SSW 飼育群用、DOW 飼育群用とした。飼育水として、下記の 2 種類の新鮮な海水を使用した。

- SSW: 臨海実験施設がポンプで水深 2 m よりくみ上げている九十九湾の海水。
- DOW: 能登海洋深層水施設がポンプで水深 332 m よりくみ上げている日本海固有水。ポリタンクによる汲み置きした海水を一度に十分量譲り受け、日の当たらない涼しい場所で保管した。

飼育水は水槽に 200 L 入れ、一日 20 L の水替えを行った。アンモニア除去のための生物濾過装置として、EHEIM FILTER 2260 を用い、濾材として珊瑚砂を封入した。この装置にはクーラータワー (ゼンスイ ZC-200α) およ

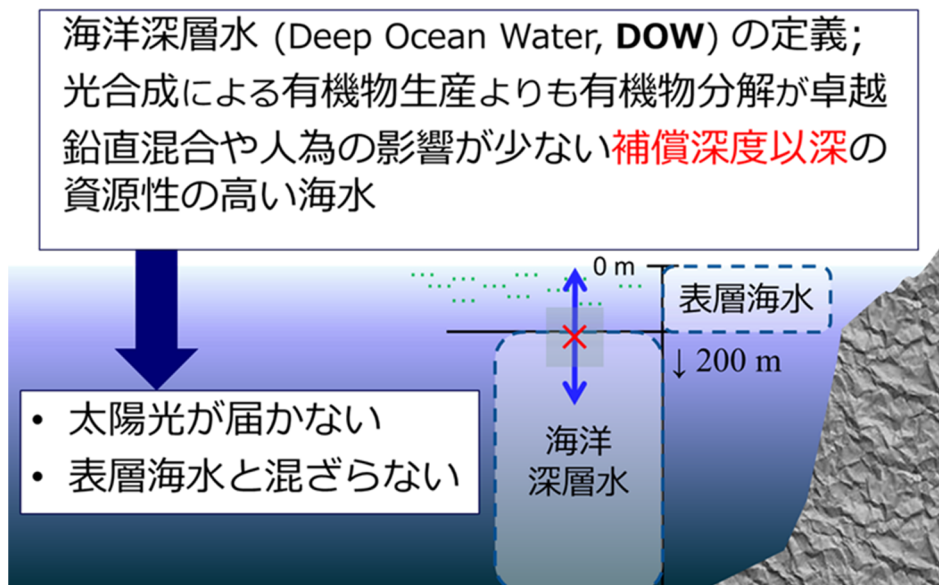


図 1: 海洋深層水の概念のまとめ

びヒーター(ニッソー プロテクト PRO 500 W)を連結して、サーモスタット制御によって水温を一定にした。また、エアポンプを用いた過剰のバブリングにより、飼育水中に酸素を供給した。光源として LED (Kotobuki フラット LED 1200)を用いし、6:00 から 18:00 を明期としてタイマーで制御し調光した。エサは一日一回、タイ養殖用の人工飼料を食べ残しのない量を与えた。

#### 飼育系 II:

この飼育系は、4 個の 60 cm 水槽(容積:60 x 25 x 30 cm<sup>3</sup>)に対し、ひとつの濾過装置を連結した水槽を使用して構築した。この水槽を4系統用意し、2系統をSSW 飼育群用、他の2系統をDOW 飼育群用とした。SSW 飼育群用の水槽は能登臨海実験施設の実習室に、DOW 飼育群用の水槽は能登海洋深層水施設に設置した。飼育水として、下記の二種類の新鮮な海水を使用した(図 2 参照)。

- ・ SSW: 臨海実験施設がポンプで水深 2 m よりくみ上げている九十九湾の海水。
- ・ DOW: 能登海洋深層水施設がポンプで水深 332 m よりくみ上げている日本海固有水。くみ上げられた DOW を直接水槽に注ぎ使用した。



図 2: 実験2及び3で用いた飼育系 II

飼育水は水槽に200 L 入れ、一日 20 L の水替えを行った。アンモニア除去のための生物濾過装置として、備え付けの濾過槽に珊瑚砂を封入したものをを用いた。この装置にはクーラータワーおよびヒーターを連結し、サーモスタット制御によって水温を一定にした。また、エアポンプを用いた過剰のバブリングにより、飼育水中に酸素を供給した。さらに光源として LED を用意し、6:00 から 18:00 を明期としてタイマーで制御し調光した。エサは一日一回、タイ養殖用の人工飼料を、食べ残しのない量を与えた。

### 2. 3 魚類の飼育

本研究では、下記のような 4 回の実験を行った。なお、実験は金沢大学の実験動物の規定に準じて実施した。

#### 実験 1:

魚種としてメジナ(100 ± 25 g)を用いて、飼育系 I の水槽に入れて実験を行った。馴致処理を終えたメジナを 14 匹用意し、SSW 飼育群と DOW 飼育群に 7 匹ずつ分け、それぞれ水槽にいれた。水温を 20°C として、5 日間飼育した。その後、麻酔下で採血をした。

#### 実験 2:

魚種としてメジナ(100 ± 25 g)を用いて、飼育系 II の水槽に入れて実験を行った。馴致処理を終えたメジナを 16 匹用意し、SSW 飼育群と DOW 飼育群に 8 匹ずつに分けて、水温を 20°C として、10 日間飼育した。飼育 0 日目、5 日目、10 日目に、同じ個体から麻酔下で連続採血を行った。

#### 実験 3:

魚種としてヒラメ(350 ± 100 g)を用いて、飼育系 II の水槽に入れて実験を行った。馴致処理を終えたヒラメを 16 匹用意し、SSW 飼育群と DOW 飼育群に 8 匹ずつに分けて、水温を 20°C として、10 日間飼育した。飼育 0 日目、5 日目、10 日目に、同じ個体から麻酔下で連続採血を行った。

#### 実験 4:

実験 3 で用いたヒラメの 10 日目の血漿サンプルを用いて、オリエンタル酵母株式会社バイオ事業本部 (<http://www.oyc-bio.jp/>) の創薬研修支援受託サービスに委託することにし、生化学検査(血液・尿)のスクリーニングセットにて検査を依頼した。

## 2.4 血液の採取

血中コルチゾル濃度測定のためのサンプルとして、実験 1, 2 及び 3 では血漿を用いた。魚を麻酔液(0.02% Phenoxyethanol, Wako)で麻酔し、背大動脈からヘパリン処理したシリンジで採血した。なお、麻酔薬の濃度は、麻酔効果の見られる下限の濃度<sup>(3)</sup>を採用した。採取した血液はただちに卓上遠心機を用いた 1 分間の遠心分離にかけ、上澄みを分離し血漿サンプルとして-80°Cで保管した。

血清を用いる場合は、魚を麻酔液で麻酔し、背大動脈からヘパリン処理をしていないシリンジで採血した。採取した血液は室温で 2 時間、4°Cで 24 時間おいて凝血させた。その後 5,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上澄みを分離し血清サンプルとして-80°Cで保管した。

分離した血漿サンプルまたは血清サンプルは、5 倍量のジエチルエーテル(Diethyl ether, Wako)に通し、エーテル層を窒素乾固することで除タンパク処理を行った。乾固したサンプルは、分離したサンプルの 3 倍量の ELISA 用のアッセイバッファー(50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Wako; 0.2% BSA for ELISA, Wako; 0.01% Thimerosal, Wako) (pH 7.8)で溶解し、実験の直前まで-80°Cで保管した。

## 2.5 コルチゾル濃度の測定

コルチゾル濃度の測定には、コスモバイオの試薬を用いた競合 ELISA 法(Cosmo Bio Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用いた。競合 ELISA 法の原理は、サンプル溶液中のコルチゾルと、酵素標識した標識コルチゾルとを、抗コルチゾル抗体に対して競合的に抗原抗体反応させ、その後の酵素反応による基質溶液の呈色をスタンダード曲線に対応させて比色定量するというものである。以下に操作方法を示す。

### 操作 1: 二次抗体固相化プレートの調整

まず、抗ウサギ抗体ヤギ抗体をプレートに固相化した。市販の抗ウサギ抗体ヤギ抗体(CPL 55641, Cosmo Bio Co.)を、炭酸バッファー(15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Wako; 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, Wako; 3 mM NaN<sub>3</sub>, Wako) (pH 9.6)に 15 µg/mL となるように希釈し、二次抗体溶液を調製した。この溶液を 96 穴プレート(C8 MAXISORP, Nunc-Immomodule)に 100 µL ずつ注ぎ、セロハンテープで封をし、室温で 48 時間インキュベートし固相化した。

次に、プレートを糖でブロッキングした。二次抗体溶液を捨て、生理食塩水 250 µL で 4 回洗浄した。その後ブロッキングバッファー(50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1% BSA, 3% Sucrose, Wako) (pH 7.8)を 200 µL ずつ注ぎ、セロハンテープで封をし、室温で 48 時間インキュベートしブロッキングした。その後ブロッキングバッファーを捨て、セロハンテープで封をして 4°Cで保管した。

### 操作 2: 既知濃度のコルチゾル溶液(標準液)の希釈系列の調整

未標識のコルチゾルを 1 mg/mL となるようエタノールに溶解した溶液を用意した。毎回、100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12.5 ng/mL, 6.25 ng/mL, 3.23 ng/mL, 1.56 ng/mL, 0.78 ng/mL となるようにアッセイバッファーで段階希釈し、標準液としてそれぞれサンプルと同時に抗原抗体反応を行った。

### 操作 3: 西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase: HRP)標識コルチゾルの調整

市販の HRP 標識コルチゾル(FKA 403, Cosmo Bio Co.)を購入し、4°Cで保管した。実験のつど、アッセイバッファーで 1/50 倍に希釈して使用した。この保管法と希釈倍率は製品のデータシートの記述に従った。

### 操作 4: 一次抗体溶液の調整

市販の抗コルチゾルウサギ抗体(FKA 404-E, Cosmo Bio Co)を購入し、内溶液 20 µL をアッセイバッファー 9.98 mL に溶かして 1/500 倍に希釈し、440 µL ずつエッペンドルフチューブに分注し、-80°Cで保管した。実験のつど、アッセイバッファーで 1/10 倍に希釈して使用した。この保管法と希釈倍率は製品のデータシートの記述に従った。

### 操作 5: 抗原抗体反応

二次抗体固相化プレートの所定の位置に、前述までの要領で調整した溶液を下記の順で溶液を 50 µL ずつ加えた。

- ① サンプルまたは標準液
- ② HRP 標識コルチゾル溶液
- ③ 一次抗体溶液

その後、セロハンテープでシールし、軽く振盪し、室温で 24 時間インキュベートした。

### 操作 6: HRP の基質溶液の調製と呈色反応

HRP による酵素反応の基質として、o-フェニレンジアミ

ンニ塩酸塩 (o-Phenylenediamine: OPD, Wako) を採用した。OPD は HRP が触媒する反応により酸化的に切断され 492 nm の吸光波長を呈する。呈色反応の直前に OPD 及び過酸化水素 (Hydrogen peroxide: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Wako), クエン酸バッファー (0.2 M Citric acid, Wako) (pH 4.5) を用いて、基質溶液 (0.08% OPD, 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Citric acid buffer) を調製した。

抗原抗体反応の手順の終了後、プレートに 250  $\mu$ L のプレート洗浄液 (131 mM NaCl, Wako; 9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Wako; 1.1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Wako; 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Wako; 0.05% Tween20, Wako) (pH 7.4) で 4 回洗浄した。その後、基質溶液を 100  $\mu$ L ずつ注ぎ、遮光し、軽く振盪しながら 20 分程度インキュベートした。基質溶液が十分に呈色したことを確認し、規定度 3 の硫酸を 50  $\mu$ L 追加して酵素反応を停止した。

このプレートを、吸光波長を 492 nm に設定したプレートリーダーで吸光度を測定することでデータ化し、その吸光度をコルチゾルの標準液と比較して、サンプル溶液中のコルチゾル濃度を求めた。

## 2.6 統計学的処理

実験 1 のデータを統計学的に処理する場合、まず SSW 飼育群および DOW 飼育群それぞれについて外れ値検定 (Grubbs' outlier t-test) を施し、 $p < 0.05$  となる要素を外れ値として見出し、平均値の計算から除外した。次に等分散を仮定した 2 標本による片側 t-検定 (student's t-test) を

行った。その結果である p 値について、 $p < 0.05$  を統計学的有意水準、 $p < 0.10$  を統計学的有意傾向とした。外れ値とした要素はグラフ中に  $\times$  印で挿入した。

実験 2 及び 3 のデータを統計学的に処理する場合は、まず 5 日間および 10 日間飼育した各個体の血中コルチゾルの濃度の値を、0 日目の血中コルチゾルの値で除し、変化率を算出した。その値を用いて、5 日目、10 日目それぞれのタイムポイントごとに Sidak の多重比較検定を行った。それらの結果である p 値について、 $p < 0.05$  を統計学的有意水準、 $p < 0.10$  を統計学的有意傾向とした。

## 3. 研究結果

### 3.1 実験 1 の結果

20°C で 5 日間飼育した SSW 飼育群と DOW 飼育群のメジナ 7 匹ずつの血漿中コルチゾル濃度を測定した。その平均値を比較した結果、DOW 飼育群の血漿中コルチゾル濃度が SSW 飼育群よりも有意に低かった (図 3)。

### 3.2 実験 2 の結果

20°C で 5 及び 10 日間飼育した SSW 飼育群と DOW 飼育群のメジナの血漿中コルチゾル濃度を測定した。各個体の 0 日目 (イニシャル) に対する 5 及び 10 日目の血漿中コルチゾルの変化率を算出した。SSW 飼育群では飼育期間が増えると、血漿中コルチゾル濃度が増加していくのに対し、DOW 飼育群では飼育期間が増えても血漿中コルチゾル濃度はほとんど変化しなかった (図 4)。

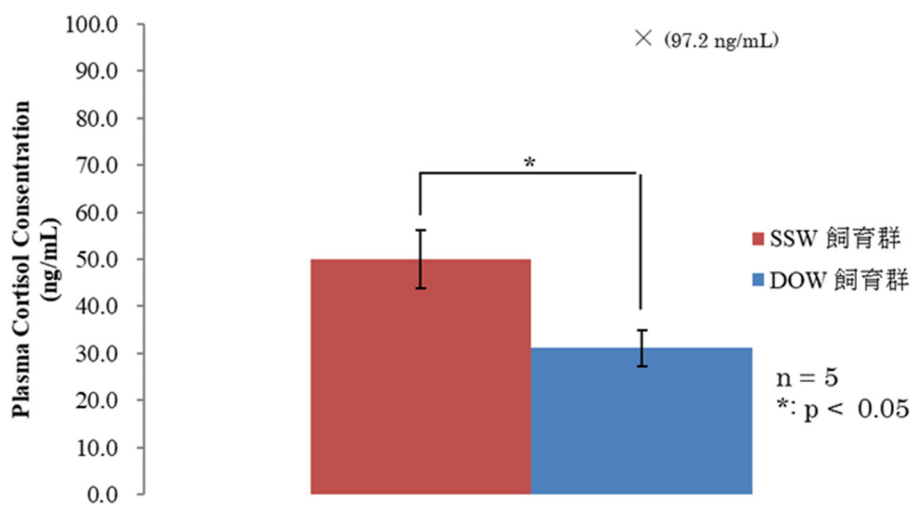


図 3: SSW 及び DOW で 5 日間、20°C で飼育したメジナの血漿中のコルチゾル濃度

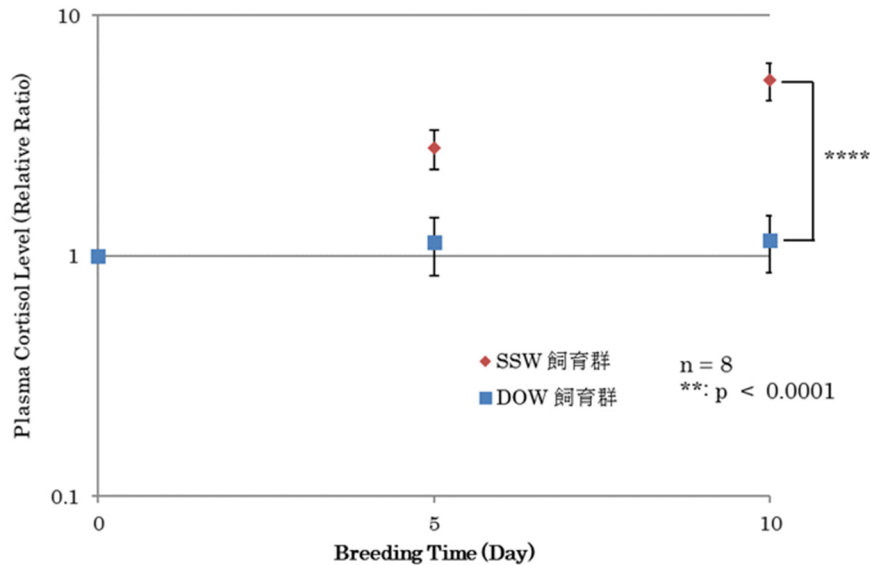


図 4: SSW 及び DOW で 10 日間, 20°C で飼育したメジナの血漿中のコルチゾル濃度の比較

### 3.3 実験 3 の結果

20°C で 5, 10 日間飼育した SSW 飼育群と DOW 飼育群のヒラメの血漿中コルチゾル濃度を測定した。各個体の 0 日目 (イニシャル) に対する 5 及び 10 日目の血漿中コルチゾルの変化率を算出した。SSW 飼育群では飼育期間が増えると血漿中コルチゾル濃度が増加していくのに対し, DOW 飼育群では飼育期間が増えても血漿中コルチゾル濃度はほとんど変化しなかった (図 5)。

### 3.4 実験 4 の結果

SSW 飼育群と DOW 飼育群のヒラメそれぞれ 8 匹ずつの血中成分のスクリーニングの結果の, 各検査項目の平均値を求め, 各検査項目について統計的な検定を行った。その結果, 血液中の総タンパク質 (TP), アルブミン (ALB) 及び尿素窒素 (BUN) においては, SSW 飼育群と DOW 飼育群とではほぼ同じ値を示した (図 6)。

総コレステロール (T-CHO), 中性脂肪 (TG), HDL-コレステロール (HDL-C), 総ビリルビン (T-BIL), グルコース (GLU) 濃度の結果を図 7 に示す。DOW 飼育により, T-CHO や TG は低下傾向がみられたが有意差は認められなかった。また GLU 濃度も低下傾向を示し, HDL-C はほとんど変化しなかった。一方, T-BIL は検出されず, 酵素類も検出できなかったものが多かった。

血液中のミネラル濃度の変化を図 8 及び 9 に示す。Na, K 及び Cl 濃度にはほとんど変化は認められなかった。一方, 血漿中の Ca 濃度は, DOW 飼育により有意に低下す

ることが判明した。したがって, DOW 飼育によりカルシウム代謝に影響を及ぼしていることがわかった。

## 4. 考察

実験 1 の結果より, 海洋深層水 (DOW) で魚を飼育することで, 表層海水 (SSW) で飼育した魚と比べて血中コルチゾル濃度が低下することがわかった。コルチゾルはストレスホルモンのひとつとして知られ, 生体がストレスを受けたときに副腎皮質 (魚類では間腎腺) から分泌され血液中の濃度が増加するため, 慢性ストレスの指標とされている<sup>(4)</sup>。このことから, DOW が魚にかかるストレスを軽減したことが示唆される。これは, 社会的な通説である, 「DOW 飼育により魚の健康に良い影響がある」とよく一致する。また, コルチゾルは筋肉の分解を亢進するなどの成長を阻害するような作用を引き起こすことが知られており, これが低下することで成長阻害から解放され, 生育が良くなることが予想される。

実験 2 においても, 実験 1 の結果が再現され, DOW 飼育により血液中のコルチゾル濃度が上昇しないことが判明した。さらにメジナと同様にして, ヒラメにおいても DOW 飼育の効果が認められ, 水槽による飼育でかかる慢性ストレスが軽減されることがわかった。魚にとって, 狭い水槽に押し込められて飼育されることはストレスとなり, それを DOW が軽減したものと考えらえる。

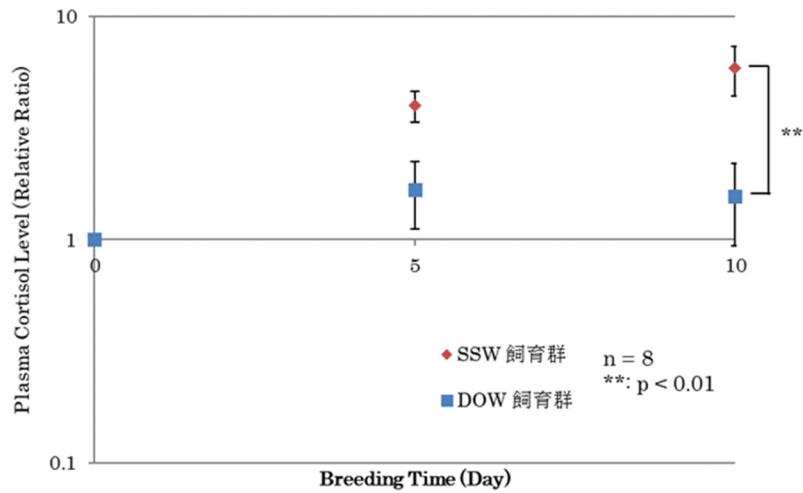


図 5: SSW 及び DOW で 10 日間、20℃で飼育したヒラメの血漿中のコルチゾル濃度の比較

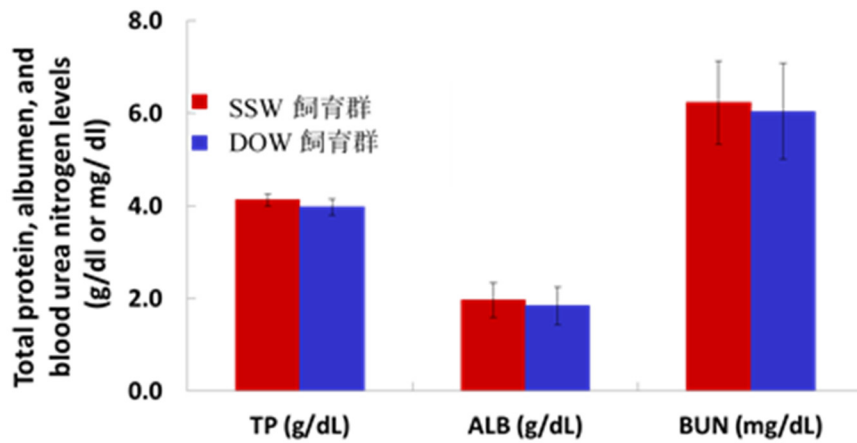


図 6: SSW 及び DOW で 10 日間、20℃で飼育したヒラメの血漿中の総タンパク質(TP), アルブミン(ALB)及び尿素窒素(BUN)

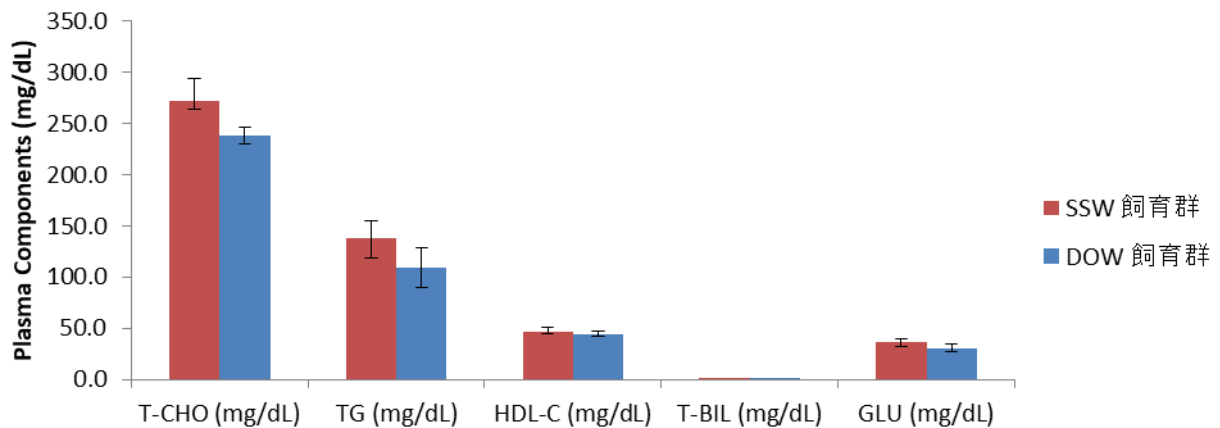


図 7: SSW 及び DOW で 10 日間、20℃で飼育したヒラメの血漿中の総コレステロール(T-CHO), 中性脂肪(TG), HDL-コレステロール(HDL-C), 総ビリルビン(T-BIL), グルコース(GLU)濃度

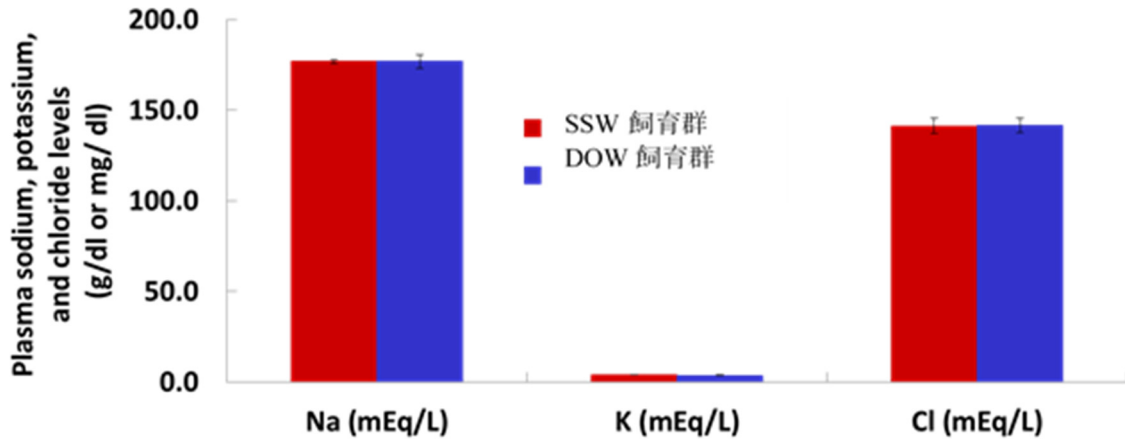


図 8: SSW 及び DOW で 10 日間、20°C で飼育したヒラメの血漿中の Na, K 及び Cl 濃度

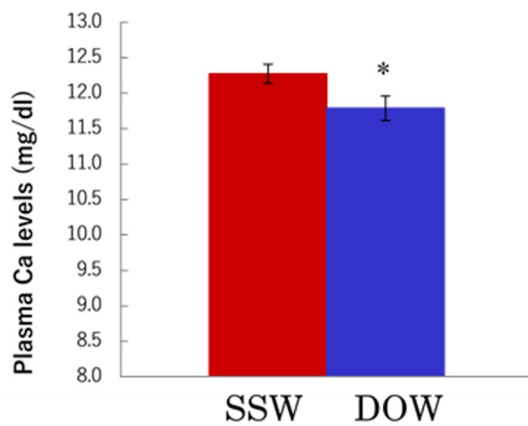


図 9: SSW 及び DOW で 10 日間、20°C で飼育したヒラメの血漿中の Ca 濃度 \*P < 0.05

一方、実験 4 において、血液中の成分分析を行った結果、血液中の総タンパク質、アルブミン及び尿素窒素には影響はなく、Na, K 及び Cl には影響は認められなかったが、血液中のカルシウム濃度が低下することが判明した。コルチゾルなどのステロイドホルモンは、骨吸収の促進作用があり<sup>(5)</sup>、魚類においてもコルチゾルには血液中のカルシウム濃度を上昇させる作用がある<sup>(6)</sup>。コルチゾル濃度が低下したことにより、血液中のカルシウム濃度が低下した可能性が高い。

## 5. 今後の課題

本研究により、DOW 飼育により、メジナ及びヒラメの血液中のコルチゾル濃度が低下することが判明した。そこで、

DOW 飼育によるコルチゾル低下のメカニズムを調べるために、現在、ヒラメの脳の次世代シーケンス解析を行っている。7 月の助成研究発表会においては、次世代シーケンス解析の結果も含めて発表する予定である。

## 6. 文献

- (1) 野田浩之, 岡本利一, 岡田祐史, 高木 毅: 海洋深層水と表層海水で飼育されたニジマス *Onchirhynchus mykiss* の生残と成長及び成熟. *Deep Ocean Water Research*, 11: 1-11 (2011)
- (2) Yachiguchi, K., Sekiguchi, T., Nakano, M., Hattori, A., Yamamoto, M., Kitamura, K., Maeda, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kamauchi, H., Nakabayashi, H., Srivastav, A.K., Hayakawa, K., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Effect of inorganic mercury and methylmercury on osteoclasts and osteoblasts in the scales of the marine teleost as a model system of bone. *Zoological Science*, 31: 330-337 (2014)
- (3) Watanabe, K., Takahashi, M., Nakagawa, M., Ohta, K., Satoh, J. and Hotta, T.: Effectiveness of 2-phenoxyethanol Anesthesia of Fish Cultured in Japan. *Aquaculture Science*, 54: 255-263 (2006)
- (4) Ellis, T.: Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 163-188 (2012)
- (5) Ventura, A., Brunetti, G., Colucci, S., Oranger, A., Ladisa, F., Cavallo, L., Grano, M. and Faienza, M.F.:



Glucocorticoid-induced osteoporosis in children with 21-hydroxylase deficiency. *BioMed Research International*, 2013:250462 (2013)

(6) Flik, G. and Perry, S.F.: Cortisol stimulates whole body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. *Journal of Endocrinology* 120:75-82 (1989)

## Study on Noto Deep Ocean Water with Fish Stress Reduction Effect

Nobuo Suzuki<sup>1</sup>, Toshio Sekiguchi<sup>1</sup>, Yoichiro Kitani<sup>1</sup>, Shouzo Ogiso<sup>1</sup>, Keisuke Fukushi<sup>1</sup>,  
Yoshiaki Tabuchi<sup>2</sup>, Atsuhiko Hattori<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University; <sup>2</sup>Life Science Research Center, University of Toyama; <sup>3</sup>College of Liberal Arts and Sciences, Tokyo Medical and Dental University

### Summary

Deep ocean water (DOW) is found 200 m below the surface of Earth's oceans. DOW has a very uniform low temperature (0–3°C), a salinity of about 3.5‰, rich nutrients, and is clean. These characteristics may be useful for aquaculture. In fact, it has been reported that the growth of seaweeds and shrimp was promoted by breeding in DOW. Also, fish culture has been attempted using a closed recirculating aquaculture system with DOW. However, until now, there has been little scientific evidence regarding the mechanism of effectiveness for aquaculture. In the present study, therefore, we noticed the stress response of fish and measured plasma cortisol levels in fish bred in DOW.

Nibbler fish (*Girella punctata*) were caught by fishing in Tsukumo Bay of the Noto Peninsula (Ishikawa Prefecture). In addition, flounder (*Paralichthys olivaceus*) were purchased from a commercial source (Marinetech Co. Ltd., Aichi, Japan). These fish were used in the present experiments after acclimation for approximately two weeks. Nibbler fish and flounders were anesthetized with a 0.04% 2-phenoxyethanol (Wako Co. Ltd., Osaka, Japan) solution. To determine initial cortisol levels, blood sampling was performed. A heparinized syringe was used to collect blood samples from the caudal vessels of individual, anesthetized nibbler fish and flounders. The collected blood was put into 1.5 ml tubes. The tubes were then centrifuged at 15,000 rpm for 3 min. The separated plasma was immediately frozen and kept at –80°C until use. Every 5 and 10 days after both fish were bred in surface seawater and DOW, blood samples were taken again, and the plasma was separated by centrifugation as described above. Thereafter, the plasma cortisol level was determined using an ELISA kit (Cosmo Bio Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Five days after breeding nibbler fish, the plasma cortisol levels of nibbler fish kept in the surface seawater were higher than those of nibbler fish kept in DOW, although there were no significant differences between plasma cortisol levels of fish kept in surface seawater and those kept in DOW. At 10 days, the plasma cortisol concentrations had increased remarkably in nibbler fish kept in surface seawater, although the plasma cortisol level in nibbler fish kept in DOW did not change from the initial level. A significant difference between the plasma cortisol levels of nibbler fish kept in the surface seawater and those kept in DOW was obtained 10 days after breeding. In the case of the flounder, similar results were obtained. At 10 days after breeding, the plasma cortisol levels of flounders kept in surface seawater were significantly higher than those kept in DOW, just as with the nibbler fish. Experience has caused us to believe that long-term breeding without stressing fish is possible when we breed fish in DOW. We are the first to demonstrate that DOW influences stress responses in marine teleosts and may contribute to aquaculture.