

## ふれあい動物園のモルモットが受けるストレスを 糞中コルチコステロンによって推定する試み

佐藤 恵 若林 修一 酒井 秀嗣

### Noninvasive monitoring of stress via fecal corticosterone levels in guinea pigs on public display

Megumi Sato, Shuichi Wakabayashi and Hidetsugu Sakai

#### Abstract

In the present study, the authors evaluated stress in a group of guinea pigs at a petting zoo. Guinea pigs were divided into five groups based on the daily rotation. Fecal corticosterone levels were measured on the day of display (Disp 0) and at 1 (Disp 1) and 3 (Disp 3) days after display, at three time points during each day; before the zoo opened (“morning”), during the lunch break (“noon”) and after closing (“evening”). Corticosterone levels in the “morning” of Disp 1 and Disp 3 were significantly elevated in a day respectively. On the other hand, corticosterone values observed in the “evening” of Disp 0 were significantly higher than at any other time, thus suggesting that public display and the constant touching by visitors was responsible for the elevated corticosterone levels observed in the guinea pigs that were on display. It is well known that peak corticosterone levels are seen early in the morning in rodents as a result of the circadian rhythm, but the corticosterone values of Disp 1 and Disp 3 were higher than expected. Thus, the influence of exhibition apparently continues for at least three days. However, no significant differences in hormonal levels were seen between guinea pigs with and without the experience of being displayed to the public. This may be partly ascribed to the advanced management strategies of the keepers, who aim to decrease the stress placed on animals, as well as the fact that, as a domesticated species, the guinea pig is less receptive to stressors.

**Key words:** corticosterone, fecal hormone, guinea pig, petting zoo, stress

#### 緒 言

生物に外界から加えられた侵襲的な刺激に対して、非特異的に生体調節が調和を崩した状態がストレスと言われる<sup>1)</sup>。ストレスを引き起こす刺激はストレスと呼ばれ、温度や光条件の変化などの物理的ストレス、薬物などの化学的ストレス、寄生虫や細菌などの生物

学的ストレス、個体群内あるいは生態系における社会的ストレスに大別される。さらにヒトも含めて高度な知能を持つ生物の場合は心理的ストレスも挙げられる。これらのストレスが個体に働くと生体調節機構に歪みを生じるために、生体はその修復を計ろうと反応する。それにはいくつかの生理活性物質が関与するが、主な機構は視床下部-下垂体-副腎皮

日本大学歯学部生物学教室  
日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門  
〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13  
(受理: 2009年9月30日)

Department of Biology, Nihon University School of Dentistry  
Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry  
1-8-13 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan

質系のホルモンと交感神経の刺激によって副腎髄質から分泌されるカテコールアミンである<sup>2)</sup>。したがって、これらの生理活性物質、とりわけ副腎皮質から分泌される糖質コルチコイドの動態がストレスの指標とされている。

かつては動物園の展示動物には野生個体では見られない様々な常動行動が観察され、飼育展示のストレスが問題になった。その後、動物の福祉に関する認識が高まり、飼育環境の整備や飼育技術の向上によってストレスの軽減が図られている<sup>3)</sup>。しかし、それらの改善策がどれだけストレスの軽減につながったかを、個々の措置ごとに評価することは難しい。展示動物のストレスの有無は常動行動の観察や血中糖質コルチコイドの濃度から推測されるが、わずかな変動は行動では評価できないし、血中ホルモン濃度の測定のために採血すること自体がストレスを生むためである。そこで、本研究においては、非侵襲的手法として糞を利用した。

一方、動物の福祉の推進とは別に、各地の動物園には「子ども動物園」あるいは「ふれあい広場」と呼ばれる、小型の哺乳類や鳥類を入園者が直接に触れることができるコーナーが設けられている。多くの子どものためには、普段は動物に触れる機会が少ないためだけでなく、教育的な意味においてもこのコーナーの人気は非常に高い。このため、日本動物園水族館協会に加盟している動物園や水族館だけでなく、公立の公園や民間のアミューズメントパークにも多数併設されている。これらの施設の動物は不特定の入園者に触れられるため、過度のストレス状態に陥っていると推測される。そこで、これらの動物を対象にして、糞中糖質コルチコイドによるストレスの評価を試みた。

## 材料と方法

### 1. 動物

江戸川区自然動物園(東京都江戸川区西葛西)

の「ふれあいコーナー」で展示飼育されている雌雄のモルモット (*Cavia porcellus*) を用いた。本動物園は江戸川区立行船公園内の一角を占める広さ約 1 ha の都市型動物園である。ふれあいコーナーは長径 12 m, 短径 10 m のやや歪んだ円形で、上部は日差しを遮るために藤棚になっている。ここに、モルモットのほか、イエウサギ (*Oryctolagus cuniculus domesticus*)、ヒツジ (*Ovis aries*)、ヤギ (*Capra aegagrus hircus*)、コールドック (*Anas platyrhynchos*)、ウコッケイ (*Gallus gallus domesticus*)、トウキョウシャモ (*Gallus gallus domesticus*)、チャボ (*Gallus gallus domesticus*) が展示されている。

モルモットはおよそ 15 個体ずつ 5 群に分けられ、各々長さ 180 cm, 幅 60 cm, 深さ 50 cm の干し草を入れた木箱で飼育され、順に 5 日に 1 回ずつ展示された。バックヤードでは午前 8 時過ぎから給餌や清掃が行われ、ふれあいコーナーに展示される動物の準備も順次行われる。ふれあいコーナーは、夏期には午前 10 時から 11 時 45 分の間および 14 時 30 分から 15 時 45 分の 2 回公開され、昼の休憩時間には干し草を敷いて冷却剤を置いた 2 つのコンテナに入れて冷房が効いた部屋に移された。展示には 2 歳令から 4 歳令の個体が供され、2 歳未満の個体はバックヤードで同様の条件下で飼育されている。

### 2. 糞の採取

試料採取は 8 月上旬の土曜日に、試料採取日に展示された個体群 (Disp 0 群)、展示の翌日に当たる個体群 (Disp 1 群) および展示から 3 日目の個体群 (Disp 3 群) の各展示個体群と、展示された経験のない 2 歳令未満の個体群 (UD 群) から行った。いずれの個体群の場合も、1 回について 10 個の糞を特定の場所に偏らないように飼育箱全体から採取した。

3 つの展示個体群については、展示前の午前 9 時半から 10 時の間に 1 回目の採取を行った

(「朝」)。Disp 0 群は展示のために搬出された後であり、他の2群も新しい干し草を入れたコンテナに移された後で、いずれも飼育箱の中には前日の夕方からの糞が残されていた。これらの中で、指で摘んで比較的柔らかく新しいと思われる糞を選んだ。2回目の採取は、Disp 1 群と Disp 3 群は 12 時に、Disp 0 群は 13 時 30 分に行った。前2群は「朝」の採取以降の糞、Disp 0 群は午前の展示終了後の糞になる(「昼」)。3回目は、Disp 1 群と Disp 3 群は 16 時に、Disp 0 群は 16 時 45 分にそれぞれ採取した(「夕」)。また、UD 群は 16 時に、朝からの糞のうち比較的柔らかい物を選んで採取した。

採取した糞はチャック付きのビニール袋に入れて直ぐに冷蔵し、研究室に持ち帰って $-20^{\circ}\text{C}$ で抽出まで冷凍保存した。

### 3. コルチコステロンの測定

採取した糞は $60^{\circ}\text{C}$ で48時間乾燥して秤量の後、ホルモン分画の抽出を行った。糞を入れた $16\times 100\text{ mm}$ のガラス試験管に3mlの蒸留水を加え、ウルトラホモゲナイザーを用いてホモゲナイズした。この懸濁液を約 $1500\times\text{g}$ で30分間遠心して上清を得た。沈殿には新たに蒸留水2mlを加えて震盪し、遠心分離を行って上清を合一した。続いて、この上清に2mlのジエチルエーテルを加え、攪拌後に $1500\times\text{g}$ 、20分間の遠心を行ってエーテル層を $10\times 70\text{ mm}$ のガラス試験管に分取した。この試験管は、窒素ガスを吹き付けながら $55^{\circ}\text{C}$ に加熱したアルミブロックヒーターに入れ、エーテルを蒸発させた。一方の水層には再度2mlのジエチルエーテルを加えて攪拌と遠心分離を行い、エーテル層を先の試験管に移して同様にエーテルを完全に蒸発乾固させた。この試験管に測定キットに添付されている緩衝液0.5mlを加えて乾固物を再溶解させ、測定試料とした<sup>4)</sup>。

コルチコステロンの測定にはCorticosterone EIA Kit (Cayman Chemical Co., Ann

Arbor, MI, USA)を採用し、吸光度はBIO-RAD Laboratories (Hercules, CA, USA)のモデル680マイクロプレートリーダーに405nmのフィルターを用いて測定した。添付の説明書によると、EIAキットの交差率は11-デオキシコルチコステロンが19.6%、プロゲステロンが1.01%で、その他の調べられた9種類のステロイドは0.25%以下である。測定には二重測定を採用し、測定値が試料全体の中で大きく外れていた試料、あるいは二重測定による2つの測定値が大きく離れている試料については再測定を行った。

測定試料のホルモン濃度の算出には、若林が作成したN88-BASIC用のプログラムを角川がMS-DOS用書き換えて日本繁殖生物学会のホームページから供給していたNewcra for Windowsを用いた<sup>5,6)</sup>。この際、コルチコステロン量は糞の単位乾燥重量あたりの含有量で表記した。

### 4. 統 計

実験結果の検定には一元配置分散分析およびKruskal-Wallisの検定を用い、多重比較はDunnettの検定、Scheffeの検定およびSteel-Dwassの検定によった。さらに、2群間の比較にはMann-WhitneyのU-検定を行った。また、各群の外れ値は、Smirnov-Grubbsの方法によって求めた。一方、測定における標準品と試料間の用量-反応直線の平行性の検定には共分散分析を用いた。これらの検定はいずれも統計パッケージ、エクセル統計2004およびエクセル統計2008(社会情報サービス、東京)によって行った。

## 結 果

### 1. 動 物

試料採取日は曇りが多かったが晴れており、ふれあい動物園の開園時刻にはすでに気温が $29.9^{\circ}\text{C}$ になっていた。利用者は就学前から小学

校低学年の子どもが主体で、ほとんどが家族連れで訪れ、常に 30 名以上がエリア内にいた。人気があったのはモルモットとウサギで、それらを手でできないとチャボなどのニワトリやヒツジ、ヤギに向かった。モルモットは、干し草が入ったコンテナから抱きかかえてベンチまで運び、膝に乗せて頭をなでる程度で、乱暴に扱う光景は見られなかった。他の動物も同様で、手荒に扱われることはなかった。また、展示中には常に飼育者が立ち会って動物の独占や扱いについて注意を払っており、昼の休憩に入る前とふれあい動物園終了後には 1 個体ずつ異常の有無を確認した。

2. ホルモン量の検定

各個体群とも予定した採取時刻に各々 10 ずつの糞を採取し、すべてについてコルチコステロンの含有量を測定することができた。しかし、測定値の分散が試料群間で異なるために二元配置分散分析を適用することができなかった。また、多重比較の方法が無いために Friedmann の検定法も採用しなかった。そのため、個体群毎に 1 日のうちでの変動を解析すると共に、同一時刻に採取した試料について 3 つの個体群の比較を行った。一元配置分散分析を試みたところ、すべての検定において Bartlett 検定あるいは Levene 検定の両者あるいはいずれか一方によって分散の均一性が否定されたため、F 値を用いない多重検定およびノンパラメトリック検定を採用した。

検定はすべての測定値を対象に行ったが、それぞれの群内に極端に異なる値がみられたため、Smirnov-Grubbs の方法によって外れ値を除外して同様の検定を行った (表 1)。

3. 各個体群の日内変動

Disp 0 群では「夕」の試料の平均値が「朝」および「昼」に比べて高い傾向が認められたが、Kruskal-Wallis の検定では変動は認められなかった。また、多重比較でも試料間の差は認め

表 1 Smirnov-Grubbs の方法によって除外された外れ値の数

個体群	朝	昼	夕
Disp 0	1	2	1
Disp 1	1	0	2
Disp 3	0	0	1
UD	—	—	1

採取試料数はいずれも 10

—: 試料無し

られなかったが、外れ値を除外した場合には「昼」と「夕」の間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。

Disp 1 群は Kruskal-Wallis の検定で試料間に高度な有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。さらに、「朝」の値は「昼」に対して ( $p < 0.001$ ) も「夕」に対して ( $p < 0.05$ ) も有意に高いことが判明した。また、Disp 3 群も Kruskal-Wallis の検定で有意差が検出され ( $p < 0.05$ )、「朝」の値は「昼」に対して ( $p < 0.001$ ) も「夕」に対して ( $p < 0.05$ ) も有意に高いことが判明した。外

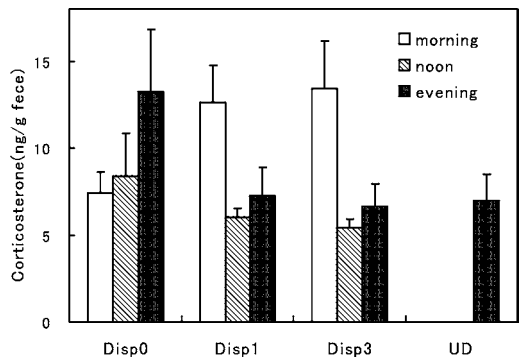


図 1 当日展示群 (Disp 0), 展示後 1 日群 (Disp 1), 展示後 3 日目群 (Disp 3) および未展示群 (UD) の「朝」(morning), 「昼」(noon), 「夕」(evening) に採取糞に含まれるコルチコステロン量。ホルモン量は乾燥した糞 1 g 当たりの含量に換算し、平均値および標準誤差で表記した。

れ値を除外した場合も、これらとほぼ同様の結果になった(表2, 図1)。

4. 各採取時間帯における3個体群の比較

「朝」, 「昼」, 「夕」の各々について3群間での比較を行った。どの時間帯も Kruskal-Wallis の検定では群間における有意差が認められなかった。また, 多重比較でも有意差は検出されなかった。しかし, 外れ値を除外した場合には, 「朝」は Kruskal-Wallis の検定で群間の差が有意になり ( $p < 0.05$ ), Disp 3 群の値が Disp 0 群に比べて高いことが判明した ( $p < 0.05$ )。さら

に, 「夕」の糞は Kruskal-Wallis の検定では有意ではなかったが, Dunnett の検定および Scheffe の検定の両方で Disp 0 の値が Disp 1 群および Disp 3 群に比べて有意に高いことが判明した ( $p < 0.05$ ) (表3, 図1)。

5. 展示群の未展示群との比較

3つの展示個体群から各々3回に渡って採取した計9つの試料の値を UD 群の値と比較した。Kruskal-Wallis の検定では群間に高度な有意差が認められたが ( $p < 0.001$ ), Dunnett の検定でも Steel-Dwass でも差のある試料は認め

表2 各展示個体群の1日のコルチコステロン量の比較

1) Disp 0 群 : Kruskal-Wallis : —(—)			
Steel-Dwass	試料	昼	夕
	朝	—(—)	—(—)
Dunnett	試料	昼	夕
	朝	—(—)	—(—)
	昼		—(*)
2) Disp 1 群 : Kruskal-Wallis : ** (***)			
Steel-Dwass	試料	昼	夕
	朝	** (***)	* (**)
Dunnett	試料	昼	夕
	朝	** (***)	* (***)
	昼		—(—)
3) Disp 3 群 : Kruskal-Wallis : * (**)			
Steel-Dwass	試料	昼	夕
	朝	** (***)	—(*)
Dunnett	試料	昼	夕
	朝	** (***)	* (**)
	昼		—(*)

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ , — :  $p > 0.05$

( ) は外れ値を除いた検定結果

表3 各時刻における展示個体群のコルチコステロン量の比較

1) 朝 : Kruskal-Wallis : -(*)			
Steel-Dwass	試料	Disp 1	Disp 3
	Disp 0	-(*)	-(-)
	Disp 1		-(-)
Dunnett	試料	Disp 1	Disp 3
	Disp 0	-(-)	-(*)
	Disp 1		-(-)
2) 昼 : Kruskal-Wallis : -(-)			
Steel-Dwass	試料	Disp 1	Disp 3
	Disp 0	-(-)	-(-)
	Disp 1		-(-)
Dunnett	試料	Disp 1	Disp 3
	Disp 0	-(-)	-(-)
	Disp 1		-(-)
3) 夕 : Kruskal-Wallis : -(-)			
Steel-Dwass	試料	Disp 1	Disp 3
	Disp 0	-(-)	-(-)
	Disp 1		-(-)
Dunnett	試料	Disp 1	Disp 3
	Disp 0	-(*)	-(*)
	Disp 1		-(-)

\* :  $p < 0.05$ , - :  $p \geq 0.05$

( ) は外れ値を除いた検定結果

られなかった。また、多重比較ではなく、Mann-Whitney の U-検定によって個別に 2 試料間の比較を行ったところ、Disp 3 群の「朝」と Disp 1 群の「朝」が UD 群の値に比べて有意に高いことが判明した ( $p < 0.05$ )。一方、外れ値を除外した場合には、これらに加えて多重比較によっても Disp 3 群の「朝」の試料 ( $p < 0.001$ ) と Disp 1 群の「朝」の試料 ( $p < 0.05$ ) が有意に高いことが判明した (表 4, 図 1)。

## 考 察

ストレスの指標としたコルチコステロンは血流を介して運搬されるため、血中濃度による評価が高感度であるが、試料を得るための採血自体がストレッサーとして結果に影響する恐れがある。そのため、本研究では非侵襲的手法として、糞中に含まれるホルモンによってストレスの評価を試みた。ステロイドホルモン分画を抽出して測定を行うものの、糞には元々多くの夾雑物が含まれることから測定の妨害が懸念され

表4 UD群と展示個体群のコルチコステロン量の比較

1) Kruskal-Wallis: ** (***)			
2) Steel-Dwass	試料	UD	
3) Dunnett	Disp 0	朝	—(—)
		昼	—(—)
		夕	—(—)
	Diso 1	朝	—(—)
		昼	—(—)
		夕	—(—)
	Disp 3	朝	—(—)
		昼	—(—)
		夕	—(—)
4) Mann-Whitney's U	Disp 0	朝	—(—)
		昼	—(—)
		夕	—(—)
	Disp 1	朝	—(*)
		昼	—(—)
		夕	—(—)
	Disp 3	朝	—(***)
		昼	—(—)
		夕	—(—)
試料	Disp 0	朝	—(—)
		夕	—(—)
	Disp 1	朝	—(***)
		朝	—(*)

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001, — : p>=0.05  
( )は外れ値を除いた検定結果

た。そこで、3つの測定試料を用いて用量—反応直線を求め、キットの標準品との平行性を検定した。この結果、傾きに有意な差は認められず、糞を用いてもコルチコステロンを特異的に測定していることが示唆された。

モルモットは体を寄せ合って生息する習性があるため、個別飼育はかえってストレスになっ

てしまう。よって、複数個体が一緒に飼育されており、糞の個体識別は不可能であった。そこで、飼育箱全体から採取する事によって、その飼育個体群の値として扱った。また、展示に用いられた3つの飼育群では、糞の採取時刻がやや異なった。「朝」の採取は同じ条件で、前日の夕方からの糞を採取した事になる。しかし、「昼」の採取では、Disp 0群は午前の展示終了後からの糞に限られるが、他の2群は「朝」の採取以降の時間帯の糞になる。「夕」の採取も同様で、Disp 0群はふれあい動物園終了後の糞であるが、他の2群は「昼」の採取以降の時間帯の糞である。このように、厳密には同じ条件ではないが、便宜的に同時刻の試料として扱う事にした。また、UD群は「朝」の採取時刻から閉園後の採取時刻までに排泄された試料で、日中の平均値を表すものといえる。

いずれの個体群の測定値もばらつきが大きく、Disp 0群は「朝」以降、「昼」、「夕」の順に平均値は次第に高くなっていく傾向が見られたが、検定の結果では「夕」にのみ有意な上昇が認められた。ストレスサーがある糖質コルチコイドの血中濃度は急速に上昇して15分程度で有意差が検出されるが<sup>7)</sup>、糞中の値の上昇が認められるまでには数時間から10時間程度を要するという報告がある<sup>8)</sup>。このため、午前中からストレスサーの刺激を受けていたものの顕著な影響は「夕」になって糞に現れたものと理解される。また、Disp 1群では「朝」に高い値が観察された。これは、展示によるストレスの影響が、前日から引き続いていたと考えるのが合理的である。実際、このDisp 1群では、「昼」以降になると値が低下してストレスの解消を示唆していた。一方、Disp 3群も「朝」の値が1日の中で有意に高い事が判明した。これは、Disp 1群で翌日にはストレスの影響が解消したと推測される上記の結果と相反する。Disp 3群の「朝」の値は、Disp 0群の同時刻の値とも有意差

があった。糖質コルチコイドの分泌には日内変動があり、日没後に分泌が高まることが知られている<sup>9)</sup>。Disp 0 群で「朝」の値が決して高くないことから、日内変動は糞中ホルモン量に顕著に反映するほど大きくないのではないかと考えられる。このため、Disp 3 群の「朝」の値は、日内変動に加えて何らかの要因が働いた可能性がある。展示のストレスが潜在的に残っていて、日内変動の亢進時に増幅を促したのかも知れないと推察している。

UD 群の値を含めて全試料について検定すると、Kruskal-Wallis の検定では有意差が認められたが、多重比較ではいずれも UD 群との違いは認められなかった。そこで、Mann-Whitney の U-検定によって個別に検定すると、Disp 1 群と Disp 3 群の「朝」の値が有意に高いという結果を得た。多試料の多重比較を行う場合、このように独立二試料検定法を用いる事は不適であるが<sup>10,11)</sup>、多重検定法では群の数が多いことによる感度の低下を補うために試行してみた。これらの結果から、展示個体群の値は、全体としては UD 群に比べても極端に高いわけではないことが判明した。

以上に述べたことをまとめると、ふれあい動物園によるストレスが当日と翌日に現れ、3 日後までも影響している可能性が示唆された。しかし、糞中に現れるコルチコステロン量は、UD 群の値と比べても著しい変化ではなかった。つまり、ふれあい動物園はモルモットに対してストレスを起こさせ、その影響はある程度持続するものの、ストレスの大きさは極端に大きなものではないと言える。これには、モルモットが長い年月にわたって愛玩動物として飼育されてきた過程で、ストレスに対する感受性の低い個体が選択的に残されてきた可能性が挙げられる。これを支持する報告がリチャードソンジリスについて成されている<sup>12,13)</sup>。また、入園者の扱いが非常に適切で、モルモットに対して大き

な負荷を与えていないことが考えられる。さらに、展示時間を短くし、かつ休憩時間には冷却材を入れて安静にするなど、飼育者も動物の健康に配慮していた。また、展示個体群を 5 つに分けて順番に展示に使用し、ストレスを蓄積しないような経験が生かされていたものと思われる。

展示による影響の持続を解明するためには、同一個体の連続した変動を追うという方法が考えられた。しかし、天候などの環境要因もストレスサーになり得るため、展示個体全体を同一母集団と考えて、同一日に展示日の異なる個体から試料採取を行った。また、非侵襲的手法として糞を利用したが、血中濃度は採血直前の瞬間的なストレスを反映するのに対して糞は体内に滞留していた時間のストレスを積算していると考えられるならば<sup>14)</sup>、本研究のように連続したストレスを評価する上でも有為な手法と言える。展示から 3 日後も果たして影響が残るのか、また、多く検出された外れ値がどのような意味を持っているのかなど、本研究で顕在化した疑問点について更に研究を進めたい。

## 謝 辞

東京都江戸川区立自然動物園の協力を感謝する。本研究は、平成 20 年度日本大学歯学部佐藤奨学金研究費の支援をうけた。

## 文 献

- 1) Selye H (1952) The Story of the Adaptation Syndrome. Acta Inc., Montreal
- 2) Weigent DA, Blalock JE (1987) Interaction between the neuroendocrine and the immune systems: common hormones and receptors. *Immunol Rev* 100, 79-108
- 3) Shepherdson DJ, Mellen JD, Hutchins M (1998) Second Nature: Environmental Enrichment for Captive Animals, Smithsonian Institution Press, Washington



- 4) 佐藤恵, 柳沼千春, 塩谷正勝, 若林修一, 酒井秀嗣 (2007) 糞中ステロイドホルモン抽出方法の比較. 日大歯紀 35, 49-56
- 5) 若林克己 (1984) ライフサイエンス・パソコン・シリーズ 5 実験データの整理, 培風館, 東京
- 6) コンペティティブアッセイ用プログラム「Newcra for Windows」配布ページ (1999) 日本繁殖生物学会 <http://reproduction.jp/member/newcra.html>
- 7) Wingfield JC, Romero LM (2000) Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. In Mc Ewen B ed, Oxford Univ Press, New York
- 8) Touma C, Sachser N, Möstl, Palme R (2003) Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol*, 130, 267-278
- 9) Touma C, Palme R, Sachser N (2003) Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav*, 45, 10-22
- 10) 足立堅一 (1998) 多重性に関する問題点—その徹底的理解と対処法. らくらく生物統計学, 足立堅一著, 中山書店, 東京, 115-137
- 11) Tukey JW (1977) Some thought on clinical trails, especially problems of multiplicity. *Science*, 198, 679-684
- 12) Delehanty B, Boonstra R (2009) Impact of live trapping on stress profiles of Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*) *Gen Com Endocrinol* 160, 176-182
- 13) Künzl C, Kaiser S, Meier E, Sachser N (2003) Is a wild mammal kept and reared in captivity still a wild animal? *Horm Behav* 43, 187-196
- 14) Bauer B, Palme R, Machatschke IH, Dittami J, Huber S (2008) Non-invasive measurement of adrenocortical and gonadal activity in male and female guinea pigs (*Cavia aperea* f. *porcellus*) *Gen Com Endocrinol* 156, 482-489