

「ふれあい動物園」のモルモットにおけるストレスの評価： 糞中コルチコステロンとコルチゾルの比較

佐藤 恵 若林 修一 酒井 秀嗣

Assessment of stress in guinea pigs at a petting zoo : analytical comparison of fecal corticosterone and cortisol

Megumi Sato, Shuichi Wakabayashi and Hidetsugu Sakai

Abstract

Many zoos include a petting zoo (or children's zoo), which have become very popular among visitors as they can touch or handle the animals. However, this considerably stresses the animals, and zoo keepers have considered various means of decreasing such stress. We devised a noninvasive method of analyzing stress levels in guinea pigs by measuring fecal cortisol concentrations. The findings were analytically compared with reported results of corticosterone. Guinea pigs were divided into five groups based on a daily rotation. Fecal cortisol levels were measured at three time points on the day of display (Disp0) and at 1 (Disp1) and 3 (Disp3) days thereafter. The correlation coefficient between the two hormones in the same sample was significant. However, the circannual variation in cortisol concentrations did not significantly differ. Even with such minor differences in hormonal changes, fecal hormone levels reflect cumulative accumulation in the blood, which indicates that this would be an effective and noninvasive method of measuring levels of stress in animals.

Key words : cortisol, corticosterone, guinea pig, petting zoo, stress

緒 言

動物園における動物展示において、動物福祉の立場から飼育環境や飼育方法を改善して飼育動物の幸福な生活を実現しようという、環境エンリッチメント (environmental enrichment) という概念が広く取り入れられるようになってきた^{1,2)}。この結果、各地の動物園では様々な展示方法が新たに考案され、さらに飼育施設の整備や飼育技術などの飼育方法の改善が急速に進展している。動物園の展示動物は、展示される

ことによってストレスを生じているが、以前にはストレスの反映として問題視された常動行動も見られなくなったことから、こうした飼育環境や飼育方法の改善によってストレスはかなり軽減されてきていると推測される。しかし、展示動物のストレスが大きい場合には様々な異常行動に反映されるが、ストレスが異常行動の閾値に達しない場合には外部観察からストレスを評価することが難しい。副腎皮質から分泌される糖質コルチコイドはストレスの指標とされているが、採血によるストレスを排除することは

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：2010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

難しく、ホルモンの血中濃度の変動をストレスの指標にすることは困難である。

そこで、我々は展示動物のストレスがどの程度糖質コルチコイドの値に反映されるのかを調べるため、展示動物の中でも特に強いストレスを感じていると推測される「ふれあい動物園」で展示されているモルモットの糞中コルチコステロン量を調べた³⁾。この結果、展示によるストレスの影響と思われるコルチコステロン値の変動は、展示から3日目でも認められたものの、その変動の幅は予想したほど大きくはなかった。当初この研究では、ふれあい動物園に展示されていた哺乳類と鳥類についてストレスを評価しようとしたため、鳥類で主に分泌されているコルチコステロン⁴⁾を指標に選択して測定した。しかし、哺乳類に限ると、コルチゾルの分泌量の方が数倍多いことが知られている^{5,6)}。このことから、コルチゾルを指標にした場合には、ストレスの変化が一層増幅して検出されるのではないかと考えた。本研究では、コルチゾルを測定した試料についてコルチゾルを測定し、両者の比較を試みた。

材料と方法

1. 測定試料

2009年8月に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*)から糞を採取し、含有コルチコステロンの測定を行った。本研究では、この測定に用いたホルモン抽出液を再び用いた。

これらの試料の調整は次のように行った。採取した糞は一旦冷凍保存した後、60°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。ホルモン分画の抽出は、まず蒸留水による抽出を2回繰り返す、次いでこの抽出液からジエチルエーテルによる抽出を2回行った。抽出液のジエチルエーテルは10×70 mmのガ

ラス試験管に入れ、窒素ガスを吹き付けながら55°Cに加熱したアルミブロックヒーターにて蒸発させた。エーテルが完全に蒸発した後、測定キットに添付されている100 mMリン酸緩衝液を0.5 ml加えて乾固物を再溶解させ、測定試料とした。

2. 動物

江戸川区自然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、「ふれあいコーナー」は長径12 m、短径10 mのやや歪んだ円型をしている。上部は藤棚になっていて日差しが遮られるよう配慮され、周囲に設けられた高さ約1 mの壁の内側に沿って設けられたベンチの下は小動物の逃げ場にもなっている。ここではモルモットのほか、数種の家畜家禽を展示している。

バックヤードでは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、5日に1回ずつ順に展示された。試料を採取した夏季では、ふれあい動物園の開園時間は午前10時から11時45分と14時30分から15時45分の2回であるが、バックヤードでは午前8時頃から清掃や給餌が行われる。また、展示された個体は、昼休みには干し草を敷いて冷却剤を置いた容器に入れられ、冷房された部屋に移される。これらの展示個体は2ないし4歳令で、ほかに展示には供されない2歳未満の個体がバックヤードで飼育されている。

3. 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)を対象に行った。

モルモットは集団生活する動物で個別飼育自体がストレスになる^{7,8)}恐れがあるため、展

示個体群ごとに大きな飼育箱で一緒に飼育されている。個体ごとに糞を識別して採取することは不可能であるが、特定の場所に偏らないように飼育箱全体から採取するように努めた。いずれの個体群の場合も、1回について10個の糞を採取した。

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°C で抽出まで冷凍保存した。

4. コルチゾルの測定

コルチゾルの測定にはCortisol Express EIA Kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)を使用した。研究開始時にはCatalog No. 1006791であったが、途中からNo. 500370に供給が切り替わった。前者は、第1抗体にウサギ抗コルチゾル、第2抗体にマウス抗ウサギIgGを、後者は第1抗体にマウスによる単クローン抗体、第2抗体にヤギ抗マウスIgGをそれぞれ採用したものである。キット添付の説明書によると、測定範囲は前者が7.8～1000 pg/mlであったのに対し、後者は39.1～5000 pg/mlと測定感度が低下した。しかし、他のステロイドとの交差率は、合成品であるプ

レドニゾロン (prednisolone) が22%から4.01%に、コルチコステロンが1.3%から0.14%というように、共通して調べられた5つのホルモンで交差率が低下して特異性が向上したことが認められ、 17α -ヒドロキシプロゲステロンのみ0.2%から0.23%に微増した。また、試料の段階希釈によって用量-反応直線が標準品と変わらないことを確認するとともに、同一試料を2種類のキットで測定して、測定値に違いがないことを確認した。

EIAによる吸光度の測定値からホルモン濃度を算出するために、若林が作成したN 88-BASIC用のプログラムを角川がMS-DOS用に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^{9,10)}。この際、コルチゾル量は糞の単位乾燥重量あたりの含有量で表記した。

5. 統 計

実験群間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Tukeyの検定、Steel-Dwassの検定およびSteelの検定によった。コルチコステロンの測定値との比較のために相関分析および回帰分析を行った。各群の外れ値は、Smirnov-Grubbsの方法によって求めた。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2008(社会情報サービス、東京)を用いた。

結 果

1. 動 物

試料採取日は晴天で朝から気温が高く、ふれあい動物園の開園時刻の午前9時半にはすでに 29.9°C であった。しかし、湿度がそれほど高くなく、周囲が平坦な公園であるために風が通ることから不快な暑さにはならなかった。利用者の主体は就学前から小学校低学年の子どもでほ

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。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。他の動物も同様に、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、午前の展示終了時と午後の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 ずつ計 100 個の糞を採取し、ステロイド分画の抽出後にコルチゾルの含有量を測定したところ、Disp 0 群の「昼」, 「夕」および Disp 3 群の「夕」の各 1 試料を除いた 97 試料について測定値を得た。しかし、測定値の分散が試料群間で異なつたため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、以下の検定を実施した。

1) 外れ値の検定

Smirnov-Grubbs 検定の結果、Disp 0 群の「昼」, 「夕」, Disp 1 群の「夕」, Disp 3 群の「夕」および UD 群の各 1 試料ずつが外れ値と判定された。これらの測定値は、いずれも各群の平均値から大きく離れてはいたが、Disp 0 群の「夕」を除く 4 試料はコルチコステロンの測定値においても外れ値として除外された試料である。また、コルチコステロンの測定で外れ値として除外され³⁾、コルチゾルの測定では除外されなかった試料のコルチゾル値も、値が得られなかった 1 試料を除いて非常に高値であることが判明した。このように、外れ値と判定された試料がコルチゾルとコルチコステロンの測定値でほぼ一致していたことから、測定試料全体と外れ値を除いた場合との両方で検定を実施した。

2) コルチゾルとコルチコステロンの相関

本研究に用いた試料全体を一群として、コルチゾルとコルチコステロンの測定値の相関分析と回帰分析を行った。この結果、すべての測定値を対象にした場合の相関係数は 0.735 (n=97), 外れ値を除外した場合は 0.641 (n=89) で、いずれも非常に高度な相関が認められた (p<0.001)。また、コルチコステロンを独立変数、コルチゾルを従属変数にとつた場合の回帰直線の傾きは、全測定値を用いた場合は 3.15 で標準誤差は 0.28, 外れ値を除外した場合は 1.46 で標準誤差は 0.19 であった。

3) 展示個体群から得られた試料全体の比較および UD 群の値との対比

Disp 0, Disp 1, Disp 3 の各群から、それぞれ「朝」, 「昼」, 「夕」に得られた全 9 種類の試料のコルチゾル濃度を比較した(図 1)。この検定では、試料間における分散の違いが有意に検出されたため、一元配置分散分析を用いずに Kruskal-Wallis の検定を実施した。しかし、全測定値をいた場合と外れ値を除外した場合のいずれでも全体での差が検出されなかった。

また、展示経験のない UD 群と全 9 種類の試

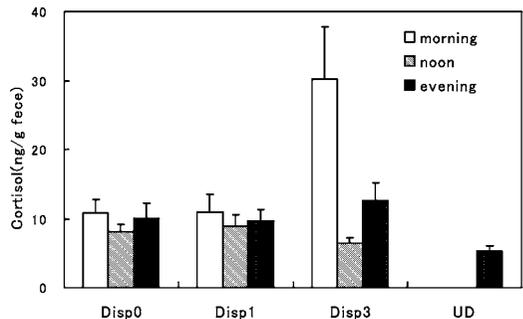


図 1 当日展示群 (Disp 0), 展示後 1 日目群 (Disp 1), 展示後 3 日目群 (Disp 3) および未展示群 (UD) の「朝」(morning), 「昼」(noon), 「夕」(evening) に採取糞に含まれるコルチゾル量。ホルモン量は乾燥した糞 1g 当たりの含量に換算し、平均値および標準誤差で表記した。

料の測定値との比較を行ったところ、外れ値を除外した測定値を用いた場合に Kruskal-Wallis の検定で有意差が認められ ($p < 0.05$)、Steel の検定によって UD 群と Disp 3 群の「朝」の試料との間にのみ差が認められた ($p < 0.05$)。一方、全測定値で検定を行った場合には、Kruskal-Wallis の検定では有意差が認められなかったが、Steel の検定によって UD 群と Disp 3 群の「朝」の試料との間にのみ差が検出された ($p < 0.05$)。

4) 同一個体群ごとの採取時間の違いによるコルチゾル濃度の比較

Disp 0, Disp 1, Disp 3 の各個体群について「朝」, 「昼」, 「夕」の糞中のコルチゾル濃度の違いを検定した。外れ値を除いた場合の Disp 0 と Disp 1 においてのみ、それぞれ 3 つの群の間で分散に有意差が認められなかった。そこで、一元配置分散分析を行ったものの、群間に測定値の違いは認められなかった。また、3 つの個体群すべてについて、すべての測定値を用いた場合と外れ値を除いた場合とで Kruskal-Wallis の検定を行った。この結果、Disp 3 群においてのみ外れ値を除外してもしなくても測定値に有意な違いが認められ ($p < 0.05$)、Steel-Dwass の検定によって共に「朝」と「昼」の間に有意差が有ることが判明した ($p < 0.05$)。

5) 同一時間帯に採取した 3 群の試料のコルチゾル濃度の比較

「朝」, 「昼」, 「夕」について、3 つの個体群間で糞中コルチゾル濃度に差が有るか否かを検定した。昼に採取した試料について外れ値を除外した場合のみ、一元配置分散分析を行うことができたが、有意差は認められなかった。また、3 つの時間帯の試料について、すべての測定値を用いた場合と外れ値を除外した場合とで Kruskal-Wallis の検定を行ったが、いずれにも有意差は検出されなかった。

考 察

動物園の展示動物のストレス状態は採餌行動の異常や常動行動、育児放棄などによって顕在化するが、これらの行動が観察されるのはストレスの強度がかなり高い状態と言える。現在では、展示動物のストレスを軽減するように飼育方法や展示方法の改善が様々になされているため、異常行動が現れる程のストレス状態は見られなくなった¹¹⁾。

ストレッサーによって生じた生体調節機構の歪みを是正するために、いろいろな生理活性物質が働く。それらの代表的なものが、視床下部一下垂体—副腎皮質系のホルモンと副腎髄質から分泌されるカテコールアミンである¹²⁾。これらの生理活性物質はストレッサーの刺激を受けると非常に敏感に血中濃度に反映するため、感度の良い指標と考えられる。しかし、血中濃度を測定するための採血自体がストレッサーになり、測定値に影響する可能性がある。また、ストレッサーの刺激によってこれらの物資の血中濃度は素早く上昇するが、刺激が一過性であった場合には分解されて短時間で減衰してしまう。このため、血中濃度の高い時期を逃すと、ストレスを正確に評価できない恐れがある。一方、血中の生理活性物質の濃度が高い場合には糞、尿、唾液などに現れることが知られている。特に糞に含まれる物質質量によって血中濃度を推定することは、個体に触れずに試料採取できることから非侵襲的な手法方法と行うことができる。糞中へは、糞が腸管を通過している間の過去数時間の血中濃度を積算した形で現れることから、過去の一定時間以内にストレスが生じたか否か、またその程度を検索することができる。

我々は、動物園の展示動物のストレスが、展示後までどのように影響するのかを調べるために、強いストレス反応が生じているであろうと推測される「ふれあい動物園」の展示動物を研

究対象に選んだ。江戸川区立自然動物園で飼育されているモルモットは1日展示に供されると、続く4日間はバックヤードで飼育される。このため、展示によるストレスの推移を追跡するには非常に適していると考えられた。

まず、糞中のコルチコステロン濃度の変化を調べたところ、展示日 (Disp 0) の「夕」方に採取した糞で有意な上昇が見られ、展示翌日 (Disp 1) と3日後 (Disp 3) も1日のうちでのホルモン濃度の違いがそれぞれ有意に認められ、「朝」に採取した試料の値が高いことが判明した³⁾。これらの結果から展示によるストレスは認められたものの、ホルモン濃度の上昇幅は予想程ではなかった。このため、Disp 3群の「朝」の試料の測定値が高いのも、展示によるストレスがそれまで残った可能性を考えたが、単に日内変動³⁾の可能性も棄却しきれない。

そこで、哺乳類では血中濃度がコルチコステロンの数倍高いとされるコルチゾル⁸⁾を指標にすると、変動幅が拡大されて差が明確になることを期待した。しかし、検定の結果では、1日の内における測定値の違いはDisp 3群でのみ検出されのみで、よりストレスが大きいと考えられるDisp 0群、Disp 1群では差が認められなかった。一方、コルチゾルとコルチコステロンの相関は、全測定値についても外れ値を除いた場合でも非常に高度に有意 ($p < 0.001$) に認められた。また、コルチコステロンを独立変数、コルチゾルを従属変数に取った場合の回帰直線を求めると、外れ値を除いた場合の傾きは1.46であった。これらの結果は、2つの糖質コルチコイドの測定値は非常に強く相関しているが、コルチゾルの測定値はコルチコステロンの測定値の平均で1.5倍に満たないことを示している。すべての測定値を用いた場合では回帰直線の傾きは3.15になるが、前者で除外された測定値が大きく外れていた結果であり、多くの試料では比率は小さいと言える。この研究では血中

のホルモン濃度を測定してはいないが、一般的に言われている血中での両者の比率が、糞では明らかに小さくなっている。これは、血流を介したコルチゾルが肝臓から胆汁によって腸管に運ばれ、排泄される過程で酵素や細菌によって分解された可能性がある。実際、放射性同位元素で標識されたコルチゾルがいくつかの分子に代謝されて回収されたことが報告されている¹³⁾。このように、糞中のコルチゾル濃度がコルチコステロンに比して大きくなかったことが、コルチコステロン以上に大きなホルモン濃度の変動が認められなかった理由と言える。

また、展示によるストレスは、糞のホルモン濃度の変化を見る限りそれほど明確には現れなかった。愛玩動物としてモルモットは代々飼育されてきた個体であり、本研究で対象にした個体は動物園で経代飼育される過程で、展示ストレスに強い個体だけが更に選択されてきていたと推測される。それは、展示個体の測定値をバックヤードで飼育されていて展示された経験のない個体と比較した場合、コルチゾルはDisp 3群の「朝」のみ、コルチコステロンもDisp 1群とDisp 3群の「朝」の試料に有意差が認められただけであり³⁾、他のすべての試料とは差がなかったからである。

一方、Smirnov-Grubbs 検定によって外れ値と判断された試料は、両方のホルモンで外れ値とされたか、あるいは片方だけの場合でも他方の測定値も非常に高い試料であった。つまり、両方のホルモンの測定値が共に高かったと言うことは、測定ミスなどの偶然のエラーではなく、明らかにホルモン濃度が極端に高い試料が含まれていたことになる。これは、飼育個体の中にストレスに強く反応する個体、あるいは一時的ではあるが強く反応した個体が含まれていた可能性を示唆している。家畜化された動物は野生個体に比べて血中コルチゾルの値が低いことが報告されており¹⁴⁾、飼育慣らされた動物

がストレスの影響を受けにくいことが知られている。モルモットも、家畜化された個体よりも野生個体の方がストレスに対して顕著に反応することが推測される。本来、モルモットという種にはストレスに対する様々な反応性を持つ個体が含まれていたが、家畜化される過程で反応性の低い個体を選択されて来たと考えられる。こうした中で、いったんは隠された性質が一時的に外れ値として現れたのではないかと思われる。

本研究では、展示動物のストレスを糖質コルチコイドによって評価するために、その実体を明らかにしようとして非侵襲的手法として糞中のコルチゾルを測定した。予想に反して、展示によるコルチゾルの反応は小さく、明確なストレスは検出されなかった。これは、研究対象のモルモットが愛玩動物化された過程でストレスに対する反応性が低い個体の選択が行われたことと、動物園が飼育や展示の方法に非常に配慮していた結果と考えられる。また、コルチゾルの測定値はコルチコステロンと非常に強く相関していたが、コルチコステロンとの比率は糞では血中濃度よりも低下している可能性が示唆された。ストレスの指標として糞中コルチゾルの値を用いるためには、血中濃度との相関を明確にしておく必要が生じた。

動物園動物のストレス管理を適正におこなうことは、エンリッチメントに寄与するだけでなく、動物園を訪れる来園者にとっても健康で安全な動物に触れる機会を作ることになる。今後、ホルモン測定の頻度、血中濃度との相関などを検討し、他の動物にも応用可能な定量的かつ簡便なモニタリング方法の開発に努めたい。

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 21 および 22 年度日本大学歯学部佐藤奨学金研究費の援助を受けた。

文 献

- 1) Loew F (1991) Animals in reasearch : Public policy determinants. American Psychological Association, Washington DC, 285.
- 2) 松沢哲郎 (2009) 心理学的幸福-動物福祉の新たな視点を考える-動物心理学研究 461, 31-33
- 3) 佐藤恵, 若林修一, 酒井秀嗣 (2009) 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. 日大歯紀 37, 21-29
- 4) Love OP, Bird DM, Shutt LJ (2003) Corticosterone levels during post-natal development in captive American kestrels (*Falco sparverius*). Gen Com Endocrinol 130, 135-141
- 5) Buscha DS, Hayward LS (2009) Stress in a conservation context: A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. Biol Conserv 142, 2844-2853
- 6) Romeo LM (2002) Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. Gen Com Endocrinol 128, 1-24
- 7) Hennessy MB, (1988) Both prevention of physical contact and removal of destal cues mediate cortisol and vocalization responses of guinea pig pups to Maternal separation in novel environment. Physiol Bwhavior 43, 729-733
- 8) Hennessy MB, Zate R, Maken DS (2008) Social buffering of the cortisol response of adult female guinea pigs. Physiol Behav 93, 883-888
- 9) 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
- 10) 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>
- 11) Morgana KN, Tromborgb CT (2007) Sources

- of stress in captivity. *Appl Anim Behav Sci* 102, 262-302
- 12) Weigent DA, Blalock JE (1987) Interaction between the neuroendocrine and the immune systems: common hormones and receptors. *Immunol Rev* 100, 79-108
- 13) Mostl E, Palme R (2002) Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol* 23, 67-74
- 14) Kunzl C, Sachser N (1999) The behavioral endocrinology of domestication: A comparison between the domestic guinea pig (*Cavia aperea f. porcellus*) and its wild ancestor, the cavy (*Cavia aperea*). *Hormon Behav* 35, 28-37