

## 2 群編成ストレスが移動及びワクチン接種後の肥育豚の生産性に与える影響

県央家畜保健衛生所

藤田慶一郎、赤間俊輔

農研機構・動物衛生研究所

菊佳男、矢ヶ部陽子、宗田吉広

### はじめに

肥育豚において、群編成は腹違いの豚同士の闘争を誘発し<sup>1,2)</sup>、各種免疫機能の低下を招くとされているが<sup>3,4,5)</sup>、このことが肥育豚の生産にどのような悪影響を及ぼすかについての報告は少ない。今回、肥育豚において群編成ストレスを負荷した後、さらに豚舎の移動とワクチン接種を実施し、各種ストレス指標や抗体応答及び増体に与える影響について調査した。

### 材料と方法

**試験豚と試験区：**3腹の交雑種（LWD）16頭を試験に供し、群編成ストレス負荷当日（0日とする）の試験豚の日齢は56～59日齢、平均体重は26.5kgとした。群編成をストレスとして、3腹8頭の複数腹で編成する区をストレス区、同腹のみの8頭で編成する区を対照区とした。試験豚は、試験区を編成する3週間前に、豚胸膜肺炎（App）と豚マイコプラズマ肺炎の混合不活化ワクチン（以下KV）を接種した。

**試験方法と採材：**ストレス区で群編成を実施した後、両試験区を7日間飼育し、8日に各試験区の豚を別豚舎に移動後、2回目のKVを接種し、さらに6日間飼育した（図1）。-7日、0日（群編成45分後）、7日、8日（移動45分後：唾液のみ）、14日で血液及び唾液を採取し、併せて体重を測定した（図1）。唾液

は、サリベットコットンスワブ（Sarstedt AG & Co, Germany）を用いて採取し、検査当日まで-30℃で保存しコルチゾール濃度測定に用いた。血液は、採取後速やかにヘパリンにより抗凝血処理し、比重遠心法<sup>6)</sup>により処理血液から分離した末梢血単核球（PBMC）をリンパ球幼若化能及びPBMCポピュレーションの解析に用いた。PBMC分離用の遠沈管（リユーコセップ、グライナージャパン、東京）に、Ficoll-conray液（Histopaque 1.077, SIGMA, UK）を3mL分注し、その上に、PBSで2.5倍に希釈した血液6mLを静かに重層した。さらに、遠沈管を800xgで15分遠心し、遠沈管の中層に現れるPBMC層を採取後、PBSにて3回洗浄し、5mLのL-グルタミン加RPMI-1640（ナカライテスク、京都）にて懸濁した液を細胞浮遊液とした。

**唾液中コルチゾール濃度：**ストレスに対する急性応答を評価するため、唾液中のコルチゾールの濃度を、Munetaらの方法に準じて測定した<sup>7,8)</sup>。

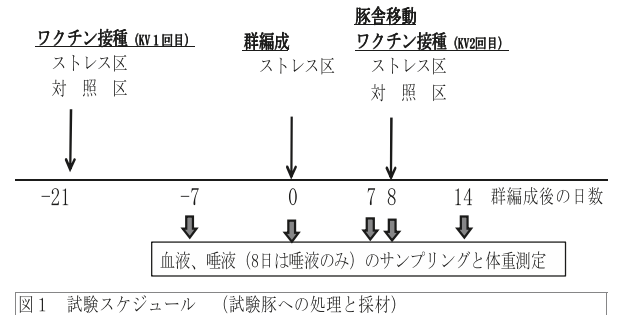
**リンパ球幼若能及びPBMCポピュレーション：**ストレス負荷後の免疫能の変動を評価するため、リンパ球幼若化能の測定及びPBMCポピュレーションをfujitaらの方法<sup>9)</sup>に準じて実施した。リンパ球幼若化能は、刺激剤（マイトジェン）としてフィトヘマグルチニン（PHA, Jオイルミルズ、東京）を用い、Stimulation Index（SI値＝マイトジェンの刺激細胞の測定

値 / マイトジェン非刺激細胞の測定値) を算出し、リンパ球の増殖度を数値化した。また、分離した PBMC の表面抗原の解析は、PE 標識マウス抗ブタ CD4 抗体 (Clone : 74-12-4, Beckman Coulter Inc, USA)、FITC 標識マウス抗ブタ CD8 抗体 (Clone : 76-2-11, Beckman Coulter Inc)、FITC 標識マウス抗ブタ CD21 抗体 (Clone : BB6-11C9.6, Beckman Coulter Inc) 及び FITC 標識マウス抗ヒト CD14 抗体 (Clone : TUK4, AbD serotec, UK) を用いた。細胞浮遊液を遠心後、PBS にて再度浮遊させた細胞について表面抗原の免疫染色を行い、フローサイトメーター (EPICS XL ADC flow cytometer, Beckman Coulter Inc) を用いて各種表面抗原の PBMC 中の陽性細胞率 (%) 及び CD4/CD8 比を解析した。

**1 日平均増体量：**体重測定の結果から、ストレス負荷 0 日から 7 日後、7 日後から 14 日後の一日平均増体量 (ADG) を算出した。

**App 抗体価の測定：**App に対する抗体の測定は ELISA 法により実施し、App 血清型 1、2、5 に対する各抗体価を E 値として  $\{($ 披験血清の OD 値 - 陰性血清の OD 値) / (指示陽性血清の OD 値 - 指示陰性血清の OD 値) $\}$  算出した (日生研に依頼)。

**統計処理：**すべての測定値は、平均値 ± 標準誤差で表記した。各試験区の測定値は、F 検定後、分散に差が認められない場合はスチューデントの t 検定、分散に差が認められる場合はウィルコクソンの順位和検定で比較し、 $p < 0.05$  を統計学的な有意差とした。



## 成績

**唾液中コルチゾール：**ストレス区は、対照区と比較して 0 日並びに 7 日が有意 ( $p < 0.05$ ) に高かった (表 1)。

**リンパ球幼若能及び PBMC ポピュレーション：**リンパ球幼若化能では、7 日のストレス区が有意 ( $p < 0.05$ ) に低かった (表 1)。また、PBMC ポピュレーションにおいてストレス区は、0 日の CD4 / 8 比が有意に低く ( $p < 0.05$ )、14 日の CD14 陽性細胞比が有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (表 1)。

**一日平均増体量：**ストレス区は、一日平均増体量が、8 日 - 14 日で有意 ( $p < 0.05$ ) に低かった (表 2)。

**App 抗体価の測定：**ストレス区は、App 血清型 5 に対する抗体価が 14 日で有意 ( $p < 0.05$ ) に低かった (表 3)。

## 考察

表1 唾液中コルチゾール濃度、リンパ球幼若化能及びPBMCポピュレーション

検査項目	試験日	ストレス区		対照区	
唾液中コルチゾール濃度 (mg/ml)	-7日	2.48 ± 0.31	3.03 ± 0.31	4.04 ± 0.62 *	0.62 *
	0日	8.02 ± 1.18	4.04 ± 0.62 *	1.42 ± 0.22	0.95
	7日	2.76 ± 0.39	1.42 ± 0.22	7.61 ± 0.95	5.37 ± 0.91
	8日	7.58 ± 1.25	7.61 ± 0.95	5.37 ± 0.91	
	14日	4.54 ± 1.02	5.37 ± 0.91		
リンパ球幼若能 (PHA,SI値)	-7日	5.87 ± 0.96	5.91 ± 0.96	6.04 ± 1.68	6.04 ± 1.68
	0日	4.71 ± 1.21	6.04 ± 1.68	6.28 ± 1.02 *	6.28 ± 1.02 *
	7日	4.61 ± 1.25	6.28 ± 1.02 *	7.68 ± 1.82	7.68 ± 1.82
	14日	6.30 ± 1.81	7.68 ± 1.82		
PBMCポピュレーション (CD4陽性細胞率,%)	-7日	19.27 ± 0.98	17.76 ± 0.66	22.75 ± 2.99	22.75 ± 2.99
	0日	18.21 ± 1.03	22.75 ± 2.99	17.85 ± 1.18	17.85 ± 1.18
	7日	17.21 ± 0.45	17.85 ± 1.18	17.28 ± 1.66	17.28 ± 1.66
	14日	18.06 ± 1.75	17.28 ± 1.66		
PBMCポピュレーション (CD8陽性細胞率,%)	-7日	35.56 ± 2.82	28.86 ± 2.62	27.51 ± 1.41	27.51 ± 1.41
	0日	34.41 ± 3.24	27.51 ± 1.41	23.00 ± 1.59	23.00 ± 1.59
	7日	26.29 ± 1.52	23.00 ± 1.59	23.05 ± 0.74	23.05 ± 0.74
	14日	27.07 ± 1.48	23.05 ± 0.74		
PBMCポピュレーション (CD21陽性細胞率,%)	-7日	11.90 ± 2.75	11.93 ± 1.89	14.15 ± 3.50	14.15 ± 3.50
	0日	10.36 ± 4.09	14.15 ± 3.50	13.81 ± 3.20	13.81 ± 3.20
	7日	12.42 ± 3.74	13.81 ± 3.20	11.18 ± 2.23	11.18 ± 2.23
	14日	9.82 ± 3.07	11.18 ± 2.23		
PBMCポピュレーション (CD14陽性細胞率,%)	-7日	13.22 ± 3.93	18.83 ± 4.77	20.12 ± 6.94	20.12 ± 6.94
	0日	18.83 ± 5.27	20.12 ± 6.94	15.24 ± 2.00	15.24 ± 2.00
	7日	14.51 ± 4.34	15.24 ± 2.00	20.78 ± 5.30 *	20.78 ± 5.30 *
	14日	13.67 ± 5.13	20.78 ± 5.30 *		
PBMCポピュレーション (CD4/8比,%)	-7日	0.58 ± 0.19	0.65 ± 0.18	0.83 ± 0.26 *	0.83 ± 0.26 *
	0日	0.57 ± 0.19	0.83 ± 0.26 *	0.79 ± 0.15	0.79 ± 0.15
	7日	0.67 ± 0.13	0.79 ± 0.15	0.76 ± 0.23	0.76 ± 0.23
	14日	0.67 ± 0.19	0.76 ± 0.23		

\* : ストレス区と対照区との有意差P<0.05

表2 一日平均増体量 (kg/day)

試験日	ストレス区		対照区	
0日-7日	0.7689 ± 0.01	0.743 ± 0.04	0.743 ± 0.04	0.04
8日-14日	0.625 ± 0.09	0.769 ± 0.01 *	0.769 ± 0.01 *	0.01 *

表3 App血清型1、2、5に対する血清中EILSA抗体価

検査項目	試験日	ストレス区		対照区	
App 血清型1	-7日	0.15 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.03
	0日	0.11 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.02
	7日	0.17 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.88 ± 0.08	0.88 ± 0.08
	14日	0.93 ± 0.10	0.88 ± 0.08		
App 血清型2	-7日	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01
	0日	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
	7日	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	14日	0.31 ± 0.03	0.38 ± 0.04		
App 血清型5	-7日	0.18 ± 0.01	0.24 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01
	0日	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02
	7日	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.60 ± 0.04 *	0.60 ± 0.04 *
	14日	0.47 ± 0.04	0.60 ± 0.04 *		

\* : ストレス区と対照区との有意差P<0.05

豚は、その飼養環境により様々なストレスに暴露されている。過度なストレスは、豚の免疫機能を低下させ、日和見的な慢性疾病を誘発することにより生産性の低下をもたらすと考えられており<sup>10)</sup>、豚に負荷されたストレスが養豚経営に与える悪影響について、科学的根拠の提示が求められている。

腹違いの豚同士を飼育する群編成は、編成直後に激しい闘争行為が始まり、リンパ球幼若化能低下<sup>3)</sup>や好中球や単球の貪食能低下<sup>4)</sup>及びオーエスキーワクチン接種後の野外株に対する各種免疫応答低下<sup>5)</sup>をもたらすなど豚の免疫能に悪影響を及ぼすストレスとして問題視されている。しかし、一方で農場の生産性に直接的に関わる項目である一日平均増体量では相反する報告がされていることや<sup>11)</sup>、疾病感受性については報告自体<sup>5)</sup>が少なく、群編成ストレスが養豚経営に与える悪影響について、さらなる調査が必要と考えられた。

さらに、本稿にデータとして示さないが県内の養豚農場に対して我々が行った聞き取り調査では、群編成は、多くの農場で発育ステージに応じた豚房の移動時に実施されており、作業効率上、ワクチン接種を同時に行っている農場も認められた。このことから、野外の養豚農場においては、移動やワクチン接種などストレスの複合によって群編成ストレスの影響が顕在化している可能性が疑われ、これらの飼養条件を反映した影響の評価が必要と考えた。

そこで、今回我々は、群編成ストレス負荷後、豚舎移動とワクチン接種を実施し豚への影響を評価するため、各種ストレス応答及び生産性について調査した。

ストレス指標において、ストレス区は、群編

成後の唾液中のコルチゾール濃度が高く、獲得免疫の応答性を評価する CD4/8 比やリンパ球の一般機能を評価するリンパ球幼若化能の低下が認められた。以上から、ストレス区には、群編成により強いストレスが負荷されたことを確認した。

農場の生産性に関わる項目として一日平均増体量や App 抗体価を測定したところ、ストレス区は、移動後で一日平均増体量や、APP 血清型 5 に対する抗体価が低く、群編成ストレスは、移動など他のストレスとの重複により、増体や抗体産生応答を低下させ農場の生産性に悪影響を及ぼすことが示唆された。

以上から、肥育期の生産性を向上させるためには、群編成を最小限に留めることが必要と考えられた。また、生産現場で、移動時に群編成を実施する際は、一時的に豚群の免疫能が低下することを考慮したワクチンプログラムの検討や移動先豚舎の衛生管理の徹底及び飼養環境の適正化に努めることが必要と考えられた。

#### 参考文献

- 1 Jensen P. Fighting between unacquainted pigs: effects of age and of individual reaction pattern. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1994;41:37-52
- 2 Meese GB. et al. The establishment and nature of the dominance hierarchy in the domesticated pig. *Anim. Behav.* 1973;21: 326-34
- 3 Deguchi E. et al. Effects of Fighting after Grouping on Plasma Cortisol Concentration and Lymphocyte Blastogenesis of Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by mitogen in Piglets. *J. vet. Med. Sci.* 1998;60(2): 149-153
- 4 Deguchi E. et al. Changes of Plasma Cortisol Concentration, Total and Differential Leukocyte Counts and Phagocytic Function of Monocytes and Neutrophils in Peripheral Blood after Grouping Unfamiliar Piglets. *Anim. Sci. techino.(Jpn).* 1997;68(8):767-773.
- 5 Groot J DE. et al. Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. *Physiology & Behavior.* 2001;73: 145-158.
- 6 笠原和恵: 日常検査としての T リンパ球・B リンパ球測定法, 改訂版, 59-66, 近代出版, 東京 (1985) .
- 7 Muneta Y. et al. Interleukin-18 expression in pig salivary glands and salivary content changes during acute immobilization stress. *Stress.* 2011; 14:549-556
- 8 Muneta Y. et al. Salivary IgA as a useful non-invasive marker for restraint stress in pigs. *J. Med. Sci.* 2010;72:1295-1300.
- 9 Fujita K. et al. Effects of Crowding on Weight gain, immune preformance and the concentration of salivary stress markers in growing-finishing pigs. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 2015;68:43-47.
- 10 Kelley KW. Stress and immune function; A bibliographic review. *Ann. Rech. Vet.* 1980;11:445-478.
- 11 Friend TH. et al. Behavior and performance of pigs grouped by three different methods at weaning. *J. Anim. Sci.* 1983;57:1406-

1411.

- 12 Stookey JM. The effects of regrouping on behavioral and production parameters in finishing swine. *J. Anim. Sci.* 1994;72: 2804-2811.