

血清中 Interleukin-18 (IL-18) の定期的なモニタリングは 養豚農場の衛生状態を評価するための有用な 1 指標となりうる — 2 養豚農場の比較による実証試験の一例 —

矢ヶ部陽子¹⁾, 高萩陽一²⁾, 宗田吉広¹⁾ *

(平成 29 年 9 月 27 日 受付)

Serum interleukin-18 is a potential marker for evaluating hygiene status on pig farms: comparison of two pig farms

Yoko YAKABE¹⁾, Yoichi TAKAHAGI²⁾ & Yoshihiro MUNETA¹⁾ *

衛生状態が異なる 2 つの養豚農場において肥育された豚の血清および口腔液を材料とし、各種病原体の浸潤状況を PCR および ELISA により、また、ストレスマーカーとして IL-18, Cortisol および IgA を ELISA により調査した。血清中に Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) および *Salmonella* typhimurium (ST) O4 抗体が検出され、かつ口腔液中に PRRSV および Swine influenza virus (SIV) 遺伝子が検出された H 農場の豚群では、いずれも陰性であった X 農場の豚群に比べて血清中 IL-18 が有意に高かった。慢性ストレス条件下で低下するとされる血清中 IgA は H 農場の豚群では低値のまま抑えられる傾向にあった。実際に、試験期間中の H 農場の事故率は X 農場に比べ約 1.4 倍高く、X 農場に比べて H 農場では、一日あたりの増体成績も低く、出荷日齢も遅れたことは、H 農場の衛生状態の悪さが反映されていたと考えられた。以上の結果より、血清中 IL-18 の定期的なモニタリングは養豚農場の衛生状態を評価するための有用な指標の一つとなりうると思われた。

- 1) 農研機構 動物衛生研究部門 病態研究領域
〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
- 2) 日本ハム㈱中央研究所
〒 300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3-3

- 1) Pathology and Pathophysiology Research Division, National Institute of Animal Health, NARO, 3-1-5, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0905, Japan.
- 2) Research and Development Center, NH Foods Ltd., 3-3, Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki, 300-2646, Japan.

* Corresponding author: Yoshihiro MUNETA

Pathology and Pathophysiology Research Division, National Institute of Animal Health, NARO, 3-1-5, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0905, Japan.
TEL: 029-838-7786 FAX: 029-838-7880
E-mail: ymuneta@affrc.go.jp

Abbreviations: PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus), SIV (Swine influenza virus), PCV2 (porcine circovirus type 2), ST (*Salmonella* typhimurium), SC (*Salmonella* Choleraesuis), Mhp (*Mycoplasma hyopneumoniae*), HACCP (hazard analysis and critical control point), JGAP (Japan good agricultural practice)

緒言

近年、養豚現場では経営の大規模化や効率化、畜産物の安定供給のために過度な密飼いや過剰な薬剤投与が行われてきた。集約的飼養環境下で育成・肥育されることで豚は様々なストレスにさらされ、下痢や肺炎などの日和見感染症が増加している²⁴⁾。一方で我が国でも、欧米諸国と同様に産業動物も含めた動物福祉の意識の高まりと消費者の安全志向の高まりを背景に、2009 年より「アニマルウェルフェアの考え方に対応した家畜の飼養管理指針」のもと家畜の快適性に配慮した飼養管理が必要とされている^{2), 21), 25)}。従来、畜産食品の品質は栄養価、嗜好性（おいしさ）、機能性（抗酸化能の付加など）が認知されてきたが、近年これらに加えて、アニマルウェルフェアに配慮して生産した畜産物に対し家畜福祉品質 welfare quality (WQ) があるとする考え方が提唱されている^{10), 23)}。これは動物を飼養中の苦痛や疾病から解

放（5つの自由）し、かつ動物本来の生理と行動スタイルを尊重して一定以上のアニマルウェルフェアを満たした条件で飼養された健康な家畜からは、より安全性に優れた畜産食品が得られるというものである。今後はこれらの付加価値を可視化し、快適性に配慮した家畜の飼養管理を評価するための WQ 基準となる指標の確立が望まれる。

一方、動物のストレスの指標となるマーカーとしては、Cortisol が一般的に広く知られるストレスホルモンであり、急性ストレス刺激により活性化される視床下部・下垂体・副腎皮質系（hypothalamo-pituitary-adrenal axis）を介し血中あるいは唾液中に放出されることが知られている¹¹⁾。また、炎症性サイトカインの1つである IL-18 は病原体感染に対して液性免疫あるいは細胞性免疫応答を誘導し、ストレスとも関連の深いサイトカインとして総説も書かれている²⁰⁾。さらに、IL-18 は、様々な Danger Signals（危険信号）を感知する細胞内センサーであるインフラマソームの構成成分で、微生物由来成分に加え、様々な要因により傷害を受けた細胞から放出される成分 DAMPs（Danger Associated Molecular Patterns：傷害関連分子パターン）によっても活性化されることが知られており⁹⁾、このことから、ワクチンアジュバント等の化学物質や環境因子等を含む外的ストレスの評価マーカーとなる可能性もある。加えて、血清中 IgA 動態に関しては、ラット慢性拘束ストレスモデルにおいて、慢性ストレスを与えた群は非拘束群に対して血清中 IgA が有意に低下¹²⁾し、またラット社会的ストレスモデルでは口腔液中 IgA が減少した⁴⁾と報告されていることから、慢性ストレス条件下において血清中 IgA は低く抑えられるものと考えられる。

これまでの研究で、我々は豚の急性拘束ストレスに対する口腔液中ストレスマーカーとして IgA¹⁵⁾ および IL-18¹⁶⁾ が有用であることを報告した。そこで、本研究では、これらのストレスマーカーが養豚農場の衛生状態の評価や、そこで飼養される豚のストレス状態の評価の指標となるかどうかを検討することを目的とし、衛生状態の異なる2つの養豚農場において育成・肥育されている豚から得られた血清または口腔液を用いて病原体浸潤状況およびストレスマーカー動態を調査した。

材料と方法

材料：調査対象農場の概要を Table 1 に示した。2013 年 10 月下旬～11 月上旬、北海道の2養豚農場（H および X 農場）で育成・肥育されていたハイポー豚（1, 1.5, 2,

Table 1. Summary of research objective farms.

	H 農場		X 農場	
地域	北海道	道東地区	北海道	道東地区
飼養形態	一貫経営 ハネアゲ豚舎, ウインドレス		一貫経営 ハネアゲ豚舎, ウインドレス	
飼養頭数	16,000 頭		3,800 頭	
飼養品種	ハイブリッド種		ハイブリッド種	
採材時期	2013 年 10 月下旬		2013 年 11 月上旬	

3, 4, 5, 6 ヶ月齢, H 農場:各群 5 頭, X 農場各群 3 頭) 計 56 頭を対象とした。血清は個体毎に、口腔液は群ごとに採取した。豚は一つの豚房内で育成または肥育されていた同一月齢の豚を一群として扱った。

血清および口腔液の採取：血液は、H および X 農場で育成・肥育されていた豚から個体ごとに、獣医師の指導の下に熟練した作業員が、豚にかかる採血ストレスが最小限になるように配慮して採取した。採取した血液は 3000 rpm, 4 °C, 10 min 遠心後血清を分離し、測定を行うまで -20°C に保存した。口腔液は、H および X 農場の育成・肥育用の豚房内に、直径 6 mm の綿ロープ (Fig. 1) の先端が豚の口付近に位置するように豚房柵等に固定した。豚房内の豚が自由に咬めるようにし、15 分～1 時間程度経過後に綿ロープを回収した。回収した綿ロー



Fig. 1. Rope pack for collecting oral fluids.

ブは 3000 rpm, 4 °C, 10 min 遠心して浸み込んだ口腔液を分取し、測定を行うまで -80°C に保存した。

ウイルス遺伝子検出 PCR: 各豚房から回収した口腔液を用いて Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Swine influenza virus (SIV), Porcine circovirus type 2 (PCV2) 各遺伝子検出のための PCR を実施した^{7), 8), 22)}。簡単には、ウイルス RNA およびウイルス DNA は市販のキットを用いて抽出した [Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, Promega Corp., 米国ウイスコンシン州]。ウイルス RNA は逆転写反応を実施し cDNA とした。PRRSV は 2 種類のプライマー PR7c-f (5'-GTACATTCTGGCCCCCTGCC C-3') と PR7c-r (5'-GCCCTAATTGAATAGGTGAC-3') を用いて ORF7 を含むフラグメントを PCR で増幅した。PCR 反応は 95 °C 30 秒, 53 °C 1 分, 72 °C 1 分を 45 サイクル実施した。PCV2 は 2 種類のプライマー PCV2-f1 (5'-CCATGCCCTGAATTTCCATA-3') と PCV2-r1 (5'-ACAGCGCACTTCTTTTCGTTT-3') を用いて ORF2 を含むフラグメントを PCR で増幅した。PCR 反応は 94 °C 30 秒, 60 °C 30 秒, 72 °C 1 分を 40 サイクル実施した。SIV は 2 種類のプライマー NP-F (5'-CAGRTACTGGG CHATAAGRAC-3') と NP-R (5'-GCATTGTCTCCGA AGAAATAAG-3') を用いて nucleoprotein 遺伝子を含むフラグメントを PCR で増幅した。PCR 反応は 94 °C 30 秒, 55 °C 1 分 30 秒, 72 °C 30 秒を 40 サイクル実施した。

抗体検査:

(1) PRRSV 抗体検出方法

各血清の PRRSV の抗体価は市販のキット [PRRS X3 エリーザキット, IDEXX Laboratories, Inc., 米国メイン州] を用いて記載されているプロトコルに従って測定した。

(2) *Salmonella typhimurium* (ST) O4 および *Salmonella* Choleraesuis (SC) O7 抗体検出 ELISA は、小林ら⁶⁾の方法に従って実施した。血清は希釈液で 100 倍希釈し、以下の通りに判定した。すなわち、陽・陰性コントロール (PC・NC) の吸光度 (OD₄₅₀ 値) からブランクの OD₄₅₀ 値を引いたそれぞれの値を比較し、PC の値が NC のその 8 倍以上あれば試験は成立とした。被検血清の OD₄₅₀ 値から NC の OD₄₅₀ 値を差し引いた値が、PC の OD₄₅₀ 値から NC の OD₄₅₀ 値を差し引いた値の 20% を越えた場合、被検血清は「陽性」と判定した。

(3) *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) p46 抗体検出

ELISA は、Okada ら¹⁹⁾の方法に従った。ただし血清は希釈液で 100 倍希釈し、反応温度は室温で実施した。被検血清、PC、NC すべての検体において、リコンビナント (r) p46 抗原陽性 (+) の OD₄₅₀ 値から r p46 抗原陰性 (-) の OD₄₅₀ 値を差し引いた値を測定値とした。PC の測定値が 1.2 以上のとき試験は成立とし。被検血清の測定値が 0.2 以上のとき「陽性」と判定した。

ストレスマーカー測定:

すべて血清を用いて測定を実施した。

- (1) 血清中 IL-18 ELISA は、Muneta ら^{13), 16)}の方法に従って実施した。検体は希釈液で 4 倍希釈し測定に用いた。
- (2) 血清中 Cortisol EIA は、Muneta ら¹⁶⁾の方法に従って実施した。検体は希釈液で 4 倍希釈し測定に用いた。
- (3) 血清中 IgA ELISA は、Muneta ら¹⁵⁾の方法に従って実施した。血清は希釈液で 10,000 倍、口腔液は 1,000 倍希釈し測定に用いた。

吸光度の測定は、多機能マイクロプレートリーダー (Infinite M200, TECAN Japan, 神奈川) により実施し、ストレスマーカー濃度は、PLATE manager V4 (和光純薬工業株式会社, 東京) によって算出した。

統計学的解析: 統計学的解析は表計算ソフト Excel (Microsoft) ベースの統計解析プログラム (ystat 2000) を用いて、Mann-Whitney U-test により 2 群間の比較を行い、p<0.05 を統計学的な有意差とした。

結果

各農場のウイルスおよび細菌病原体浸潤状況について血清および口腔液を用いて調べた。口腔液中ウイルス遺

Table 2. Results of viral gene detection in oral fluid samples by PCR.

PCR 検査	農場	月 齢						
		1	1.5	2	3	4	5	6
PRRSV	H	+	-	-	+	+	-	-
	X	-	-	-	-	-	-	-
SIV	H	+	-	+	-	-	-	-
	X	-	-	-	-	-	-	-
PCV2	H	-	-	-	-	-	-	-
	X	-	-	-	-	-	-	-

+ : PCR positive, - : PCR negative

伝子検出 PCR 結果を Table 2 に示す。X 農場では 1 ～ 6 ヶ月齢までの豚で PRRSV, SIV および PCV2 すべて陰性であったのに対し, H 農場では 1 ヶ月齢の豚から PRRSV および SIV 遺伝子が認められた。また, 血清中 PRRSV 抗体検査では, 遺伝子検出と同様に H 農場の豚群でのみ PRRSV 抗体の上昇が認められ, 3 ヶ月齢以降はすべての個体において陽性に転じ, 抗体陽性率 100 % であった (Fig. 2)。

細菌病原体に対する抗体検査の結果, 血清中 ST O4 抗体は H 農場の豚で月齢と共に上昇したが, X 農場に比べ有意差は認められなかった (Fig. 3)。SC O7 および Mhp p46 抗体は両農場の豚で同様の推移を示した。口腔液中の ST O4, SC O7, Mhp p46 に対する抗体は, いずれの農場の豚においても検出されなかった。

血清中ストレスマーカー IL-18, Cortisol および IgA

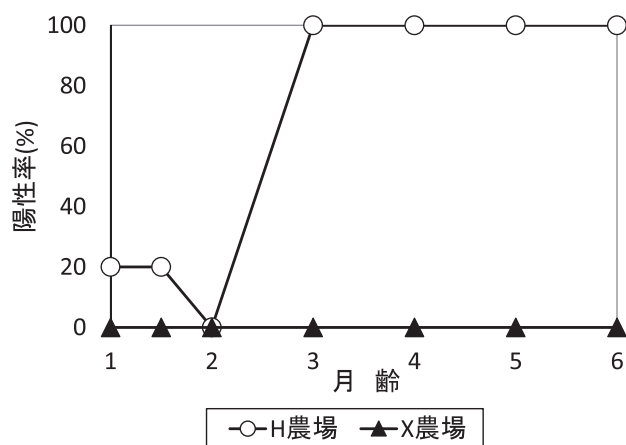


Fig. 2. Transition of seropositive rate of PRRSV antibody in H and X farms.

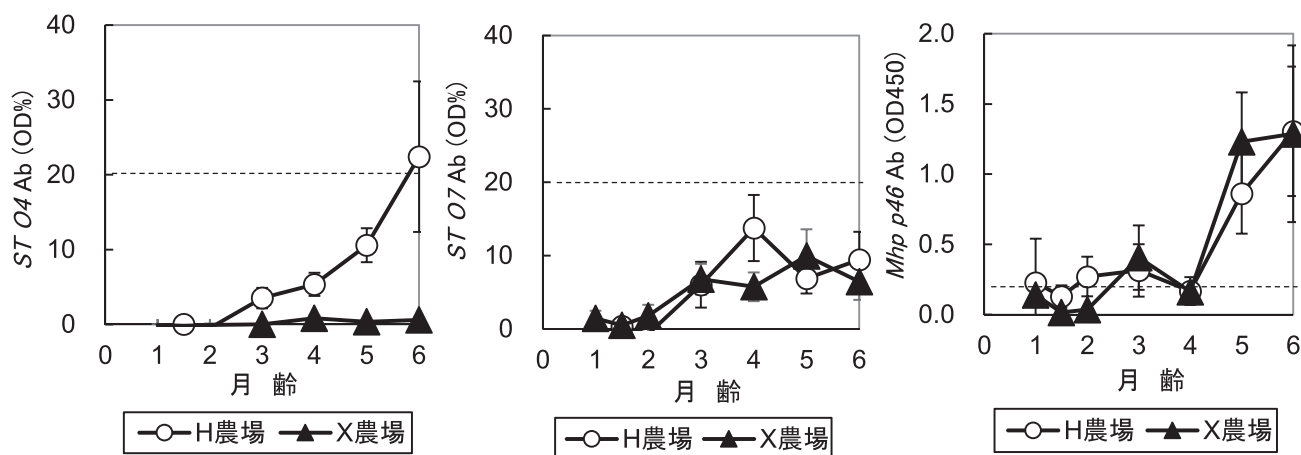


Fig. 3. Transition of ST O4, SC O7 and Mhp p46 antibody in serum.

N=5 (H farm) and N=3 (X farm) in each group. ST O4 antibody and SC O7 antibody were positive when OD₄₅₀ was greater than 20 % compared with positive control. Mhp p46 antibody was positive when OD₄₅₀ was greater than 0.2. Data shows mean ± S.E.

の推移を Fig. 4, 5 および 6 に示した。IL-18 は, H 農場の 1, 1.5, 2, 4, 5 および 6 ヶ月齢の豚で X 農場に比較して有意に上昇した ($p < 0.01$ あるいは $p < 0.05$)。Cortisol は期間中 2 農場間の豚に 5 ヶ月齢を除いて有意差は認められなかったが, H 農場の豚で高い値で推移した。IgA は X 農場の豚では月齢に伴って上昇したが, H 農場の豚では低値のまま抑えられる傾向にあった。しかし 2 農場間で有意な差ではなかった。

試験期間中における調査対象農場の生産指標を Table 3 に示した。農場間の事故 (死亡) 率を比較すると, X 農場の事故率に対し, H 農場の事故率は約 1.4 倍高い結果であった (具体的な事故率の数値は農場の都合で非公表)。また 1 日あたりの増体成績は, H 農場の豚は 586.0 g/日, X 農場の豚は 678.6 g/日の約 1.16 倍低く, 出荷日数も H 農場の豚で約 2 週間長くなった。

考察

近年, 養豚農場においてアニマルウェルフェアに配慮した飼養管理が必要とされており, WQ 基準となる指標の確立が望まれている。今回, 豚のストレスマーカーが農場の衛生状態とそこで飼養される豚のストレス状態を評価する指標となりうるか実証するため, 衛生状態の異なる 2 養豚農場において病原体浸潤状況とストレスマーカー動態について比較検討した。

同地域に立地し, ほぼ同じ規模・一貫経営の形態をとる 2 養豚農場である H および X 農場の病原体浸潤状況を比較したところ, H 農場の豚群では PRRSV・SIV 抗原陽性, PRRSV 抗体陽性, ST O4・Mhp p46 抗体陽性, 一方の X 農場の豚群では Mhp p46 抗体のみ陽性と

いう結果であり、H 農場でより多くの病原体の浸潤が確認された。実際に生産指標をみると、H 農場の事故（死亡）率は X 農場の約 1.4 倍、増体成績は X 農場より低く、出荷日数は約 2 週間長いという状況であった。このことから調査対象期間において、H 農場は X 農場に比べ衛生状態が悪化していたといえる。

我々はこれまでに、急性拘束ストレスにより豚の口腔液中 IL-18 がストレスマーカーとして有用であると報告した¹⁶⁾。また、異なる衛生条件の 2 農場における口腔液中 IL-18 濃度は、衛生意識が低くかつ過去の疾病履歴や事故率が高い農場において有意に高かったと報告した¹⁷⁾が、用いた口腔液材料は個体毎に採取しているという点が本研究とは異なっている。一方で、藤田ら³⁾は養豚場での密飼いストレスの影響について調査した結果、口腔液中ストレスマーカー（Cortisol, IgA および IL-18）に有意な差はなかったと報告している。密飼いによって豚が受けるストレスは慢性的なストレスであり、急性スト

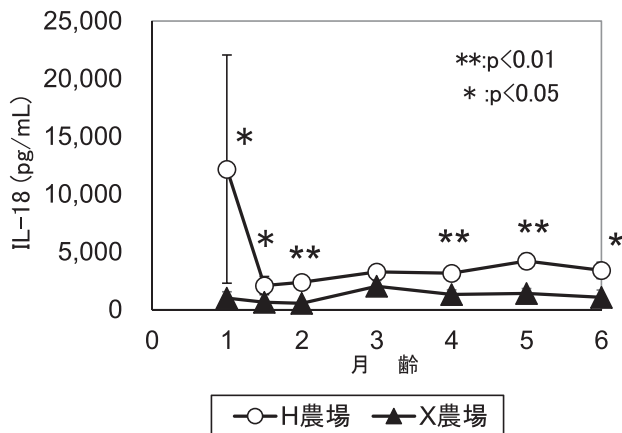


Fig. 4. Transition of serum IL-18 concentration in H and X farms.

N=5 (H farm) and N=3 (X farm) in each group. Data shows mean \pm S.E.

Statistical differences between H and X farm were analysed by Mann-Whitney U-test.

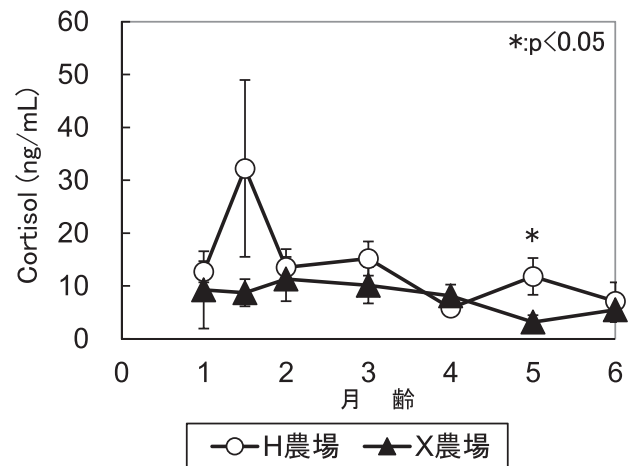


Fig. 5. Transition of serum cortisol concentration in H and X farms.

N=5 (H farm) and N=3 (X farm) in each group. Data shows mean \pm S.E.

Statistical differences between H and X farm were analysed by Mann-Whitney U-test.

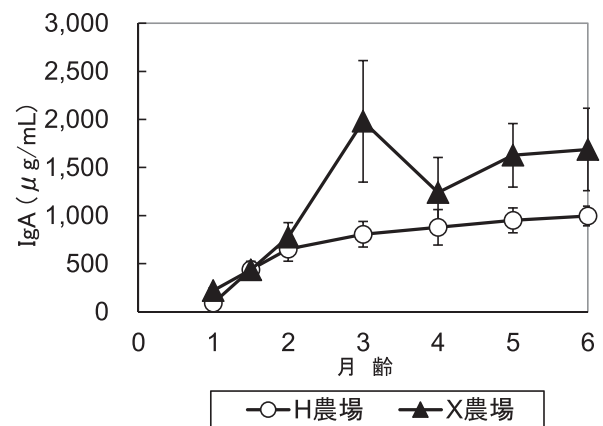


Fig. 6. Transition of serum IgA concentration in H and X farms.

N=5 (H farm) and N=3 (X farm) in each group. Data shows mean \pm S.E.

Statistical differences between H and X farm were analysed by Mann-Whitney U-test.

Table 3. Production index of H and X farms.

	H 農場 (2013 年 10 月生産指標)	X 農場 (2013 年 11 月生産指標)
事故率（死亡率）	X 農場に比べ約 1.4 倍	H 農場に比べて 0.74 倍
増体成績	586.0 g/ 日	678.6 g/ 日
出荷日齢	185 日	168 日

Vaccination programs were same in both farms.

Accident rate (Mortality rate) of H and X farms are confidential.

レスとはストレス強度が異なるため、口腔液中ストレスマーカーは慢性ストレスの評価には適していない可能性があると考えている。これらの理由から、本研究では養豚場でのストレスをより確実に評価できると考えられる血清を用いることとした。

まず、本研究において血清中 Cortisol 濃度は2農場間で5ヶ月齢を除くすべての月齢で有意な差は認められなかった。このことから、藤田ら³⁾の報告と同じく、農場内の飼養環境から生じるストレスはCortisol上昇を伴う急性ストレスに対し、比較的マイルドなストレスであり、いずれの農場または5ヶ月齢を除くいずれの月齢においても血清中 Cortisol 上昇は認められなかったものと考えられた。

これに対し血清中 IL-18 濃度は、H農場において有意な上昇が認められた。IL-18は炎症性サイトカインであり、病原体感染に対して液性免疫あるいは細胞性免疫応答を誘導する。これまでの報告で、豚の感染症に対するIL-18応答について、*Mhp* 実験感染 SPF 豚で感染後1週目から肺胞洗浄液中に IL-18 が上昇する¹⁴⁾、あるいは *in vitro* で SIV 感染豚骨髄樹状細胞 (BMDCs) では培養上清中に IL-18 産生が認められる¹⁸⁾ などの報告があり、H農場の血清中 IL-18 の有意な上昇は、病原体検査で検出された PRRSV, SIV または *Mhp* 感染に対する宿主の免疫応答を反映したものと考えられた。結果としてH農場では複数の病原体浸潤により生産指標の悪化が認められたことから、血清中 IL-18 は農場内の衛生状態を反映することが示唆された。

血清中 IgA 動態に関しては、Klobasa F et al. は母豚の血清中 IgA 濃度について 1500-2000 µg/ml 程度だと報告している⁵⁾。本研究においても、血清中 IgA 濃度はH農場(1000 µg/ml 以下で頭打ち)でX農場(1500-2000 µg/ml 程度に上昇)に比較して1, 3, 5および6ヶ月齢で低い傾向があり、病原体感染など衛生状況の悪化からもたらされたストレスが慢性的に継続したことで、血清中 IgA 濃度が低く抑えられたものと推察された。このことから血清中 IgA 濃度のモニタリングは、豚の慢性ストレスの評価の可能性を示唆していると考えられ、本研究では例数が少なく有意差が得られていないことから今後同様の調査を例数を増やして継続していきたいと考えている。

さらに、本研究で実施した病原体検査について、ロープ法により群毎に採取した口腔液からPCRによりRPPSVおよびSIV等ウイルス病原体遺伝子検出が可能であったことは、農場の衛生管理を行う上で大変有用で

あると考えられる。これまでに高萩らは口腔液からPCRにより呼吸器病関連病原体 (PRRSV, SIV, *Mhp*, *Mhr*) 遺伝子検出が可能であったと報告し(第156回日本獣医学会学術集会講演要旨集DV-85), また会田ら¹⁾は口腔液からPRRSV抗体および遺伝子検出が可能であったと報告しているが、いずれも個体別に採取した検体を用いている。さらに、本研究において検出された口腔液中PRRSV遺伝子出現は、血清中抗体出現より早い時期に確認されており、ウイルス感染をより早期に検出することが可能であった。本研究で実施したロープ法による群毎口腔液採取方法は、個体毎に採取するのに比べて大変簡便であり、今後農場内で健康管理を実施する際に、より早期に疾病診断および疾病対策を行うためのウイルス検査の材料として活用できる可能性が示唆された。なお、本研究では口腔液を用いた細菌病原体PCR検査は実施していないが、高萩らの報告(第156回日本獣医学会学術集会講演要旨集DV-85)からも十分検出が可能であると推察され、今後さらに継続して検討したい。

最後に、今後は調査対象養豚農場の数を増やして結果の再現性や衛生対策実施前後での比較について検討するとともに、危害分析重要管理点(HACCP)や適正農業規範(JGAP)といった農場認証制度を導入した農場等における衛生条件の改善の評価指標等として活用できないか検討して行きたいと考えている。また、養豚農場における衛生管理の簡便性とアニマルウェルフェアの観点からも、採血を伴う血清材料ではなく、ロープ法等により採取した口腔液を用いた病原体検出およびストレスマーカーのモニタリングが可能となる条件についても、さらなる検討が必要であると考えている。

謝辞

本研究を実施するに当たりご協力いただいた、動物衛生研究部門ウイルス疫学研究領域 井関博博士および動物衛生研究部門 生物学的製剤製造グループ長 小林秀樹博士に御礼申し上げます。本研究は、農研機構の平成26年度広報連携基礎的促進費「ストレスマーカーの測定による養豚農場の衛生条件評価技術の現地実証試験」により実施されました。

引用文献

- 1) 会田恒彦, 馬上 斉, 村山和範, et al.: 口腔液を用いた豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス抗体及び遺伝子の検出. 日獣会誌. 67, 323-327 (2014).
- 2) Dwinger, R., Lambooi, B.: A brief summary of

- European legislation regarding animal welfare. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 125, 297-304 (2012).
- 3) 藤田慶一郎, 菊 佳男, 高橋孝志, et al.: 密飼いが肥育豚の増体や免疫能及び唾液中ストレスマーカーに与える影響. 日獣会誌. 68, 43-47 (2015).
- 4) Guhad, F.A., Hau, J.: Salivary IgA as a marker of social stress in rats. Neurosci. Lett. 216, 137-140 (1996).
- 5) Klobasa, F., Habe, F., WerHahn, E., et al.: Changes in the concentration of serum IgG, IgA and IgM of sows throughout the reproductive cycle. Vet. Immunol. Immunopathol. 10, 341-353 (1985).
- 6) 小林秀樹: 簡易 LPS 抽出キットを用いた豚サルモネラの ELISA 抗原調整と診断. All About Swine. 30, 25-28 (2007).
- 7) Kono, Y., Kanno, T., Shimizu, M., et al.: Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. J. Vet. Med. Sci. 58, 941-946 (1996).
- 8) Lee, MS., Chang, PC., Shien, JH., et al.: Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. J. Virol. Methods. 97, 13-22 (2001).
- 9) Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J.: The Inflammasomes: Guardians of the Body. Annu Rev Immunol. 27, 229-265 (2009).
- 10) 松木洋一: アニマルウェルフェアの現状と課題 (II)—アニマルウェルフェア畜産に取り組む世界の動向〜健康な家畜の飼育と食品安全〜. 日獣会誌. 64, 359-365 (2011).
- 11) Minton, J.E.: Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. J. Anim. Sci. 72, 1891-1898 (1994).
- 12) Moazzam, S., Hussain, M.M., Ahmad, T.A.: Effect of chronic restraint stress on immune status of male Sprague Dawley rats. J. Coll. Physicians Surg. Pak. 23, 487-490 (2013).
- 13) Muneta, Y., Mikami, O., Shimoji, Y., et al.: Detection of porcine interleukin-18 by sandwich ELISA and immunohistochemical staining using its monoclonal antibodies. J. Interferon Cytokine Res. 20, 331-336 (2000).
- 14) Muneta, Y., Minagawa, Y., Shimoji, Y., et al.: IL-18 expression in pigs following infection with Mycoplasma hyopneumoniae. J. Interferon Cytokine Res. 26, 637-644 (2006).
- 15) Muneta, Y., Yoshikawa, T., Minagawa, Y., et al.: Salivary IgA as a useful non-invasive marker for restraint stress in pigs. J. Vet. Med. Sci. 72, 1295-1300 (2010).
- 16) Muneta, Y., Minagawa, Y., Nakane, T., et al.: Interleukin-18 expression in pig salivary glands and salivary content changes during acute immobilization stress. Stress. 14, 549-556 (2011).
- 17) 宗田吉広: 豚の非侵襲的ストレスマーカーとしての IL-18 および IgA の可能性. 畜産技術. 676, 2-6 (2011).
- 18) Mussá, T., Ballester, M., Silva-Campa, E., et al.: Swine, human or avian influenza viruses differentially activates porcine dendritic cells cytokine profile. Vet. Immunol. Immunopathol. 154, 25-35 (2013).
- 19) Okada, M., Asai, T., Futo, S., et al.: Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of Mycoplasma hyopneumoniae. Vet. Microbiol. 105, 251-259 (2005).
- 20) Sugama, S., Conti, B.: Interleukin-18 and stress. Brain Res. Rev. 58, 85-95. (2008).
- 21) 菅谷公平: アニマルウェルフェアの考え方に対応した家畜の飼養管理指針について. All about swine. 3-8 (2009).
- 22) Takahagi, Y., Toki, S., Nishiyama, Y., et al.: Differential effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2 genotypes at Japanese pig farms. J. Vet. Med. Sci. 72, 35-41 (2010).
- 23) 武村勇司: 家畜の生産と福祉をめぐる最近の展開. 日生氣誌. 48, 57-68 (2011).
- 24) 山本孝史: 日和見感染の多発とその対策. 日本養豚学会誌. 36, 173-175 (1999).
- 25) アニマルウェルフェアの考え方に対応した豚の飼養管理指針. 畜産技術協会 http://jlta.lin.gr.jp/report/animalwelfare/shishin/pig_28.9.pdf (2016)

Summary

Serum interleukin-18 is a potential marker for evaluating hygiene status on pig farms: comparison of two pig farmsYoko YAKABE¹⁾, Yoichi TAKAHAGI²⁾ & Yoshihiro MUNETA¹⁾

To evaluate the hygiene status of two different pig production farms, their pathogen invasion status was determined by PCR (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Porcine circovirus type 2 (PCV2), Swine influenza virus (SIV)) and ELISA (PRRSV, *Salmonella* Choleraesuis (SC), *Salmonella* typhimurium (ST), *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhp*)) of serum or of oral fluids collected from each group in a pen by using a cotton rope. Stress markers in the serum and oral fluids were measured by ELISA (IL-18, cortisol, IgA). Analyses for major pig viral and bacterial pathogens revealed anti-PRRSV and anti-ST O4 antibodies in the serum and positivity for PRRSV and SIV antigens in the oral fluids on farm H, but testing for serum antibodies and antigens in oral fluids on farm X was negative. Stress marker analysis showed that serum IL-18 concentrations were significantly higher in the pigs on farm H than in those on farm X. Serum IgA levels on farm H remained low, whereas those on farm X increased with age. The mortality rate on farm H was 1.4 times that on farm X. Daily gain was lower on farm H, and the date of shipping to market was extended on this farm. These results suggested that periodic monitoring of serum IL-18 can be a useful stress indicator for evaluating the hygiene status of pig production farms.

Key words: hygiene conditions, IL-18, pathogen invasion, serum, stress