

総説

豚の唾液中ストレスマーカーとアニマルウェルフェアに関する最近の話題と研究

宗田 吉 広 (農研機構 動物衛生研究部門 病態研究領域 生化学ユニット)

Muneta, Y. (2019). Recent topics and studies on porcine salivary stress markers and the guideline for the animal welfare.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 74, 34-41.

キーワード：アニマルウェルフェア，豚，唾液，センサー，ストレスマーカー

はじめに

現在の養豚産業においては、大規模化および集約的な生産システムの普及や地球温暖化等の環境の変化、新興・再興感染症の出現に伴う飼養管理体制の強化等、家畜に対するストレスが負荷される機会は増大していると考えられる。一方で、アニマルウェルフェアに対する世界的な関心の高まりを受けて、家畜の取り扱い、飼養環境、疾病予防、日常の記録および給餌や給水等に関して、不要なストレスを低減し、快適性に配慮した飼育管理、輸送および畜管理を行うことで、生産性、肉質、繁殖成績および疾病の発生低減にも良い影響を与えることが提言されている^{14,17,18,52}。また、薬剤耐性対策アクションプラン³⁸の策定を受けて、健康やウェルフェアレベルを維持しながら、家畜における抗菌剤の使用量を低減することも求められている⁸。

豚におけるストレスの測定は、血液中のストレスマーカーの測定や尾かじりなどのストレスに起因する行動の観察の形で、従来から行われて来たが、これらは採血自体が動物にストレスを与えることや行動の観察に時間や人手を要する等の問題点があった。そこで、最近では、動物にストレスを与えずに非侵襲的に採取することの可能な、唾液を用いたストレスマーカーの検討が豚でも広く行われるようになり、後述するように、様々な研究報告がなされている³²。

さらに、日本版の適正農業規範 (Japan Good Agriculture Practice; JGAP) においても、2017年3月にJGAP家畜・畜産物が発表され²⁴、農場経営、食品安全、家畜衛生、環境保全、労働安全、人権・福祉に加えてアニマルウェルフェアに対しても審査認証制度が開始されており、東京オリンピックの調達食材の基準にもJGAPが導入される等、食肉業界における対応は喫緊

の課題である。また、最近では、各種の生体センシング技術や画像解析技術、これらのビッグデータを集約して解析する Internet of Things (IOT) や Artificial Intelligence (AI) 技術の進展は日進月歩であり、ストレスの検知やアニマルウェルフェアの向上に向けた技術開発も進展している²。

そこで本総説では、豚の唾液中ストレスマーカーに関する最近の研究について紹介するとともに、豚のアニマルウェルフェアの向上に向けて、国際獣疫事務局 (OIE) で策定されたアニマルウェルフェアの基準の概要および近年発展の著しい各種生体センシング技術やモニタリング技術のアニマルウェルフェアへの応用に向けて、どのような取り組みが行われているかについても概説する。

1 豚の唾液中各種ストレスマーカーに関する最近の研究

1) コルチゾール

豚の唾液中ストレスマーカーとして、古くから研究されてきたのは、副腎皮質ホルモンであるコルチゾールである。唾液中のコルチゾールは血液中のコルチゾールとよく相関するという報告⁵⁵がある一方で、唾液中のコルチゾールは血中コルチゾール濃度の約10%程度であり、副腎皮質刺激ホルモンに対する反応性も血液中コルチゾールに比べて低いという報告もある⁴⁷。測定法についても、改良が進んでおり、古くはラジオイムノアッセイで測定されていたが⁶、現在ではエンザイムイムノアッセイが主流となっていて、人用に開発されたキットが、豚の唾液中コルチゾールの測定に適用可能であるとする報告や⁶²、唾液自体のコルチゾールを測定する専用のキットも市販されている (<https://www.salimetrics.com/assay-kit/salivary-cortisol-elisa-kit/>)。また、最近の報告では、環境エンリッチメント (動物のウェルフェアと健康のため、飼養環境に

改善を加え、動物に刺激や選択の余地を与え、動物の正常な行動を引き出すこと）やハーブ製剤の添加による慢性ストレスの低減の評価に、被毛中のコルチゾールが有用であるとする報告があり³⁾、慢性ストレスの評価指標としても期待される。

2) 急性相タンパク質

急性相タンパク質は、炎症や感染、ストレスによって主に肝臓で合成されるハプトグロビン (Hp) 及び血清アミロイド A (SAA) に代表されるタンパク質群である。血清中の急性相タンパク質とストレスとの関連は数多く報告されており⁴⁸⁾、唾液中においても、Hp は、リポポリサッカライド (LPS) の連続投与¹¹⁾、急性拘束²³⁾、及び24時間の絶食⁴⁵⁾等によって上昇するが、孤立や再グループ化等の社会的ストレスでは変動しなかったとの報告がある¹⁰⁾。また、朝に高く夕方に低くなるという日内変動についての報告もある²⁰⁾。SAA については、孤立した豚でグループ飼育した豚に比べて、コルチゾールと同様に有意に高くなったことや、トラックによる輸送ストレスにおいて、コルチゾールよりも長期間にわたって上昇したことが報告されている⁵⁹⁾。また、フィールドにおいて、豚繁殖・呼吸障害症候群ウィルス (PRRSV) の感染豚の唾液中 SAA は血清中 SAA と同様に健康豚に比べて感染豚で有意に上昇することが報告されていることは興味深い⁵⁸⁾。

3) アミラーゼ

アミラーゼは唾液中の主要なタンパク分解酵素であり、人ではストレスの簡易指標として唾液アミラーゼ測定機器（唾液アミラーゼモニター）も市販されている (http://med.nipro.co.jp/med_eq_category_detail?id=a1U1000000b535GEAQ)。豚においても唾液中の α -アミラーゼを急性拘束ストレス下で測定した報告があるが、コルチゾールが全頭で上昇したのに対し、 α -アミラーゼは活性および濃度ともに有意な差は見られなかった⁵⁾。これは、我々が以前報告した成績と一致するものであり⁴¹⁾、豚における α -アミラーゼの唾液中ストレスマーカーとしての利用には今後さらなる検討が必要である。

4) クロモグラニン A

クロモグラニン A (CgA) は、副腎髄質や交感神経のクロム親和性細胞の顆粒からカテコールアミンとともに分泌されるタンパク質であり、ストレスによる交

感神経刺激に伴い副腎髄質から血中に分泌される。人において、CgA は交感神経・副腎髄質系 (SAM) の活性化の指標であり、カテコールアミンよりもより安定である。豚の唾液においても、急性拘束ストレス時に唾液中の CgA 濃度が有意に上昇し、日内変動は認められず、唾液中での安定性は 4℃ で 2 日以内、-20℃ や -80℃ であれば 1 年間安定であることが報告されている⁹⁾。また、豚の社会的なストレスである孤立においても唾液中の CgA 濃度が有意に上昇したという報告がある¹⁰⁾。さらに、離乳後の子豚の闘争によるストレスをモニターするために唾液中 CgA 濃度が有用であり、コルチゾールよりも闘争による皮膚の病変との相関が高かったとする報告がある¹³⁾。慢性ストレスの評価指標としても、唾液中の CgA 濃度が環境エンリッチメントやハーブ製剤の添加によるストレスの低減の評価に有用であり、被毛中のコルチゾール濃度と関連したとする報告があり、今後の展開が期待される³⁾。

5) イムノグロブリン類

イムノグロブリン類の中でも局所免疫に関与する IgA について、人で唾液中のストレスマーカーとなりうるとする報告がある⁶³⁾。我々も豚の急性拘束ストレス時に唾液中の IgA 濃度が有意に上昇することを報告している⁴¹⁾。また、豚において、社会的なストレスである孤立においても唾液中の IgA 濃度が CgA 濃度と共に上昇したとの報告もある¹⁰⁾。

6) サイトカイン類

我々は、ストレスと関連の深いサイトカインとして報告されているインターロイキン-18 (IL-18) について、豚の唾液中の IL-18 が急性拘束ストレス時に有意に上昇することを見出し、その産生部位として唾液腺の中でも混合腺や粘液腺である下顎腺や舌下腺で多いことを報告している⁴²⁾。また、最近の報告では、*Actinobacillus pleuropneumoniae* 実験感染豚の唾液腺において、感染初期に炎症性サイトカイン群や急性相タンパク質の遺伝子発現や唾液中濃度が上昇しており、感染初期の炎症性サイトカイン遺伝子発現の増加を肺胞洗浄液 (BALF) だけでなく唾液によっても捉えられる可能性が示されている⁵⁴⁾。

7) その他の新規マーカー

アデノシンデアミナーゼ (ADA) はリンパ球や単球・マクロファージ系を含む免疫細胞の分化や成熟に関連

する酵素であり、人では様々な炎症性疾患等（腫瘍、関節リウマチ、炎症性腸炎、肥満、結核等の感染症）と関連する。豚の唾液中の ADA 活性は健康豚の唾液に比べ、局所炎症、胃腸疾患、及び呼吸器疾患の豚の唾液で有意に上昇しており、これらは唾液中のハプトグロビン濃度と同じ傾向であったことが報告されている²¹⁾。また、呼吸器疾患を示していた個体を抗生物質で治療したところ、治療後2日後に唾液中の ADA 活性は有意に低下したことも示されている²¹⁾。

また、唾液中のコリンエステラーゼ活性や総エステラーゼ活性が、急性の拘束ストレスや輸送ストレスで有意に上昇し、総エステラーゼ活性については跛行を呈する豚で有意に上昇し、疾病との関連も示唆されることが報告されている^{60,61)}。

8) 唾液のプロテオーム解析

唾液中におけるストレスマーカーを見出すアプローチとして、プロテオーム解析を用いた網羅的なアプローチも多く報告されている^{19,29,30)}。Fuentes-Rubio らは、3種類の急性ストレス（鼻ねじによる5分間の保定と採血、短時間（40分間、35km）の輸送およびケージによる24時間の動きの制限）前と15分後に採取した唾液（コルチゾールが有意に上昇していることを確認）における2次元電気泳動によるプロテオーム解析を実施したところ、オドラント（匂い分子）結合タンパク（OBP）の発現低下およびアルブミンの発現増強を認めた¹⁶⁾。また、Gutierrez らは、健康豚と直腸脱を発症した豚において、唾液中の糖タンパク質のプロテオーム解析を実施したところ、唾液中には血液中に存在しない、特有のサイズの Hp が直腸脱豚にのみ認められ²²⁾、今後の解析の進展が期待される。

9) 唾液の採取方法や保存方法

唾液の採取方法についても、我々が当初報告した、たこ糸に脱脂綿やサリベットコットンを結んで、豚に自発的に咀嚼させる方法^{41,42)}に加えて、口腔内の唾液採取素材をロープで結び耳の後ろで固定して採取する方法や、ケーブルの先で固定した唾液採取素材を豚の口腔内に押し込んで採取する方法等が報告されている¹⁾。また、口腔液を採取する材料や採取後の処理が、測定値に影響することも報告されており注意が必要である⁴⁴⁾。さらに、ストレスマーカーの種類によって、採取後の保存温度や保存期間が異なることも報告されているため¹²⁾、この点にも注意を要する。

10) 唾液中ストレスマーカーの豚品種、性および生産ステージによる影響

最近の報告では、豚の唾液中のストレスマーカー（ADA、CRP、Hp）について、Large White x Duroc 種とイベリコ種で比較した場合、いずれのマーカーにも品種差が認められ、さらに性（雌雄）による差、あるいは生産ステージ（離乳、育成、肥育、仕上げ）による差も存在することが報告され⁵³⁾、唾液中ストレスマーカーの評価において考慮に入れなければならない問題である。

2 豚の生産システムにおけるアニマルウェルフェア

上述したように、多数の唾液中のストレスマーカーの研究開発により、非侵襲的に豚の多様なストレスを評価することは可能になりつつあるが、次の問題として、負荷されているストレスをどのように低減し、生産性や疾病対策レベルを維持しながら、豚の生産システムにおけるアニマルウェルフェアの向上につなげて行くかという課題がある。

我が国では、2011年に公益社団法人畜産技術協会に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が各畜種ごとに策定され、豚においても現在第4版が改定・公開されている²⁶⁾。この間、アニマルウェルフェアという用語や考え方は、かなり一般的に認知されるようになってきており、農林水産省のホームページでもアニマルウェルフェアに配慮した家畜の飼養管理という情報が公開されている³⁶⁾。

また、OIE は、動物衛生や人獣共通感染症に関する国際基準の策定等を行っている182の国と地域が加盟している（2018年現在）政府間機関であるが、現在では動物衛生のみならず、食品安全およびアニマルウェルフェアの分野も対象にしており、昨年に豚の生産システムにおけるアニマルウェルフェアに関する OIE の基準を公開している⁴³⁾。この中では、豚におけるアニマルウェルフェアの基準や測定に関する指標として、1. 行動、2. 罹病率、3. 死亡率及び淘汰率、4. 体重及び体型の変化、5. 繁殖効率、6. 外観、7. 取り扱い時の反応、8. 跛行、9. 飼養管理上の処置による合併症が挙げられている。

さらに、よりよいアニマルウェルフェアの実現のための推奨項目として、1. 職業訓練、2. 取り扱い及び検査、3. 痛みを伴う処置への対応、4. 飼料及び水の給与、5. 環境改良、6. 異常行動の予防、7. 飼育施設、8. 空間

的ゆとり、9. 床、敷料及び寝床の表面、10. 空気の性状、11. 温度環境、12. 騒音対策、13. 照明、14. 分娩及び泌乳、15. 離乳、16. 混合、17. 遺伝的選抜、18. 捕食動物や害虫からの保護、19. バイオセキュリティ及び動物の健康・疾病予防、20. 緊急時計画、21. 災害管理、22. 人道的殺処分の22項目について、推奨項目が述べられている。

もちろん、加盟国それぞれに異なる豚の生産システムの特色が存在し、現在の生産性や疾病対策レベルを維持しながら、すべての推奨項目を直ちに実行するのは困難かもしれない。しかしながら、我が国でも、畜産技術協会による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チェックリストが作成され、アンケート結果が取りまとめられて公表されており²⁵⁾、概ね良好な結果が得られているものの、更なる向上を目指した取り組みも必要と考えられる。実際に、我が国における、先進的なアニマルウェルフェア農場の存在とウェルフェアフードの生産成果について紹介された書籍も刊行されている³³⁾。

3 各種生体センシング技術とアニマルウェルフェアの向上

近年のIOTやAI技術の進展は目覚ましいものがあり、家畜においても各種のカメラ、マイクロフォンおよびセンサーを活用した、生体情報のリアルタイムモニタリング技術を活用した精密個体管理や疾病の早期発見技術の開発が進められている。これらの技術は、従来飼養管理者や獣医師の感覚（視覚、聴覚、嗅覚等）や経験等に頼っていた日常の飼養管理における異常の発見を、センシング技術を用いて個体ごとのリアルタイムのモニタリングやトラッキングにより自動で行える可能性を有している。

以下は、BenjaminとYikによる総説²⁾から引用する。表1に、現在利用可能なセンサーデバイスとその特徴や欠点および適応について示す。これらの技術は、豚のアニマルウェルフェアの向上にもつながる可能性も有している。跛行は、豚のウェルフェアレベルの低下を示す指標の1つであり、ビデオやカメラ画像の動作トラッキングや足に取り付けた加速度センサーのデータ等の連続的モニタリングで跛行の早期発見や改善につながれば、ウェルフェアレベルの改善に資する可能性がある。また、Force platesやThe GaitFourという圧力を測定可能なマットが、跛行を呈する豚において、異常あるいは非対称の圧力の同定に信頼できる技術で

ある^{34,39,50)}。

また、KnauerとBaitingerが報告した²⁸⁾、雌豚用のカリパスによる定量的なボディコンディションスコア(BCS)の測定を用いれば、群から早期にBCSの悪い豚を淘汰することが可能となる。また、最近では、豚の3D形状を抽出することで、自動的に体重の評価が可能であるとする報告もある^{4,27,67)}。

さらに、子宮脱、膣脱、直腸脱の発生率は米国では2013年の1.0%から2016年には3.0%に増加しているが⁴⁹⁾、これらは臓器の突出に基づいて容易に同定できることから、イメージング技術と機械学習を用いれば、原因となる変化、例えば表現系や特徴的な姿勢等を検出できるかもしれない。

群レベルでは、ネガティブな豚の行動としては、耳、わき腹及び尾かじりがある⁶⁴⁾。と畜場の調査では、尾かじりのある豚は低体重、呼吸器病変、膿瘍及び関節炎の増加リスクとなると報告されている³¹⁾。ビデオ画像や動作トラッキング解析により、飼育ペンレベルでの問題行動（敵対行動、追いかけ、尾かじりやわき腹かじり、闘争）をモニタリングすることが可能であるが⁶⁶⁾、現在のところ、大規模な群における個体レベルでの動作追跡は困難である。

また、音声記録が、豚の暑熱ストレス¹⁵⁾や尾かじりや闘争の結果としての痛みによる高頻度の叫び⁶⁵⁾を解析するアルゴリズムの開発に用いられる。市販されているSoundtalks (<https://soundtalks.com/>)は、限られたエリア内ではあるが、飼育ペンレベルで音声を認識し、呼吸器病や換気の変化への対応を可能にする⁵⁷⁾。ストレスに関連した鳴き声と正常な鳴き声を区別することが出来れば、アニマルウェルフェアの向上に対して有用であるだろう。

さらに、赤外線サーモグラフィーにより非侵襲的に個体や体の特定部位の放熱を測定することで、乳房炎、歩行障害および呼吸器病を牛で早期に検出できるという報告がある。豚では、赤外線サーモグラフィーを用いて体温と最も高い相関が見られる皮膚部位は、耳根部、目および乳房である⁵⁶⁾。ワクチネーションにより、群飼の離乳子豚に高い皮膚温と群居反応がワクチン接種20時間後まで観察されたとする報告もある⁷⁾。

もちろん、豚の快適性やアニマルウェルフェアの向上のために、日々の観察により、異常行動や疾病の臨床徴候、けがや痛みをモニタリングすることが重要であることは言うまでもないが、さらに疾病に関連する行動として、震え、群居および休息等の行動の変化、

表1 様々なセンサーとその適応についての比較²⁾

表1 様々なセンサーとその適応についての比較		ハードウェア比較	
センサーデバイス と製造業者の例	特色	欠点	適応
カメラ類			
2D(RGB) Lorax eYanamic 3D(RGBD) Microsoft Kinect Intel Realsense eYegrow	正確な位置や色の バリエーションデータ 高精度で多数のデータ リモートセンシング 読み込みが早い 個別あるいはグループで解析可	役に立つ情報を得るために フィルタリングが必要 性能が光の条件に依存する 環境因子から守るための 保護カバーが必要	視覚的な特徴認識 特徴抽出 動きの検出 トポロジー抽出 個体分布と行動
体温計類			
赤外線イメージング FLIR FLUKE TESTO875	生物学的観察や夜間視に有用 低可視性における高性能 リモートセンシング(非侵襲的) 読み込みが早い	高価(数百から数千ドル/ユニット) 環境要因がデータに影響	リモート体温センシング 低照明イメージング 生理学的な反応 (個別およびグループ)
サーミスター	体温の変動の検知に有用 高価ではない ウェアラブルセンサー内に統合	変化が遅い 既製品がない	接触温度センシング 生理学的な反応
マイクフォン			
Soundtalks PCM Monitor	音声やその頻度の変動検知 すばやい読み取り 高価ではない	雑音による妨害を受けやすい	周期的な生理学的 過程のモニタリング (区画や小屋ごと)
加速度計			
ワイヤレスセンサー ネットワークの例 Remote Insights Smartbow	動作追跡に有用 即時に近い読み取り ワイヤレスセンサーネットワーク の中に使用されるウェアラブル センサー内に組込	置換や速度データを得るために 外部処理が必要 情報が相対的 壊れやすい	動作決定/観察 (歩行、営巣行動) 位置的状態の追跡 (横臥、起立)

出典: Benjamin M and Yik S. (2019) Precision Livestock Farming in Swine Welfare: A Review for Swine Practitioners. Animals, 9:133. Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>).

社会的相互作用の変化、摂食や飲水の低下が挙げられる³⁵⁾。また、豚の温度環境の快適性も行動で示され、寒すぎる、快適および暖かすぎる等の状況が、飼育ペンの中での横になる場所や姿勢に基づいて判定できるとの報告もあり⁴⁶⁾、これらの行動の変化検出に対して、統合センシング技術によるリアルタイムモニタリング・トラッキングシステムの活用が期待される⁴⁰⁾。(出典: Benjamin M and Yik S. (2019) Precision Livestock Farming in Swine Welfare: A Review for Swine Practitioners. Animals, 9:133. Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>))

おわりに

以上のように、最近の豚の唾液中の非侵襲的なストレスマーカーの研究、アニマルウェルフェアの向上に向けた OIE のガイドラインおよび各種センシング技術や画像解析システム等の活用について解説してきた。また、本稿ではあまり触れなかったが、唾液を口腔液 (Oral Fluid) と捉えて、PRRSV 等の病原体の抗原や抗体の検出も可能であり、豚群におけるハードヘルスの向上を目指した取り組みも期待される⁵¹⁾。2015年に国

連が示した、持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals; SDGs) には17の項目が挙げられていて³⁷⁾、2030年までの取り組みが求められている。これらは主に持続可能な世界を実現するための人間社会での取り組みが主体となっているが、One Health の考え方に基づけば、家畜を含めた動物全体に対しても適応可能な目標である。中でも「すべての人に健康と福祉を」という目標は「すべての動物に健康と福祉を」という目標にそのまま置き換えられる SDG であり、令和の時代には、豚の生産システムにおいても、唾液や口腔液を利用した非侵襲的なストレスマーカーや病原体の検査および各種生体センシング技術の利活用により、ストレスや疾病の低減とアニマルウェルフェアの向上に取り組みながら、この SDG 目標を達成する時代となることが期待される。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Akhtar N, et al. (2018) An efficient method for saliva collection from mature pigs to determine

- their enzymatic and electrolytic profiles. *J Vet Med Sci*, 80:147-151.
- 2) Benjamin M, et al. (2019) Precision livestock farming in swine welfare: A review for swine practitioners. *Animals*, 9:133.
 - 3) Casal N, et al. (2017) Effect of environmental enrichment and herbal compound supplementation on physiological stress indicators (chromogranin A, cortisol and tumor necrosis factor- α) in growing pigs. *Animal* 11:1228-1236.
 - 4) Condotta ICF, et al. (2018) Evaluation of a depth sensor for mass estimation of growing and finishing pigs. *Biosyst Eng*, 173:11-18.
 - 5) Contreras-Aguilar MD, et al. (2018) Changes in alpha-amylase activity, concentration and isoforms in pigs after an experimental acute stress model: an exploratory study. *BMC Vet Res*, 14:256.
 - 6) Cook NJ, et al. (1997) Radioimmunoassay for cortisol in pig saliva and serum. *J Agric Food Chem*, 45:395-399.
 - 7) Cook NJ, et al. (2015) Infrared thermography detects febrile and behavioral responses to vaccination of weaned piglets. *Animal*, 9:339-346.
 - 8) Diana A, et al. (2017) Do weaner pigs need in-feed antibiotics to ensure good health and welfare? *PLOS One*, 12:e0185622.
 - 9) Escribano D, et al. (2014) Saliva chromogranin A in growing pigs: A study of circadian patterns during daytime and stability under different storage conditions. *Vet J*, 199:355-359.
 - 10) Escribano D, et al. (2015) Changes in saliva biomarkers of stress and immunity in domestic pigs exposed to a psychosocial stressor. *Res Vet Sci*, 102:38-44.
 - 11) Escribano D, et al. (2014) Effect of repeated administration of lipopolysaccharide on inflammatory and stress markers in saliva of growing pigs. *Vet J*, 200:393-397.
 - 12) Escribano D, et al. (2018) Stability of selected enzyme in saliva of pigs under different storage conditions: a pilot study. *J Vet Med Sci*, 80:1657-1661.
 - 13) Escribano D, et al. (2019) Salivary biomarkers to monitor stress due to aggression after weaning in piglets. *Res Vet Sci*, 123:178-183.
 - 14) Eze JL, et al. (2015) Comparison of respiratory disease prevalence among voluntary monitoring systems for pig health and welfare in the UK. *PLOS One*, 10:e0128137.
 - 15) Ferrari S, et al. (2013) Heat stress assessment by swine related vocalizations. *Livest Sci*, 151:29-34.
 - 16) Fuentes-Rubio M, et al. (2014) Porcine salivary analysis by 2-dimensional gel electrophoresis in 3 models of acute stress: A pilot study. *Can J Vet Res*, 78:127-132.
 - 17) Gibson TJ, et al. (2017) The economics of animal welfare. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 36:125-135.
 - 18) Goumon S, et al. (2017) Influence of loading handling and facilities on the subsequent response to pre-slaughter stress in pigs. *Livestock Sci*, 200:6-13.
 - 19) Gutierrez AM, et al. (2013) Detection of potential markers for systemic disease in saliva of pigs by proteomics: A pilot study. *Vet Immunol Immunopathol*, 151:73-82.
 - 20) Gutierrez AM, et al. (2013) Circadian pattern of acute phase proteins in the saliva of growing pigs. *Vet J*, 196:167-170.
 - 21) Gutierrez AM, et al. (2017) Easy and non-invasive disease detection in pigs by adenosine deaminase activity determination in saliva. *PLOS One*, 12:e0179299.
 - 22) Gutierrez AM, et al. (2017) Detection and first characterization of an uncommon haptoglobin in porcine saliva of pigs with rectal prolapse by using boronic acid sample enrichment. *Animal*, 11:845-853.
 - 23) Huang Y, et al. (2017) Salivary haptoglobin and chromogranin A as non-invasive markers during restraint stress in pigs. *Res Vet Sci*, 114:27-30.
 - 24) Japan GAP Foundation(2017)JGAP 農場用管理点と適合基準. 家畜・畜産物. 2017 http://jgap.jp/LB_01/JGAP_Livestock_2017Ver.2_190329.pdf
 - 25) Japan Livestock Technology Association (2017) 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チェックリストに関するアンケート調査結果. http://jlta.lin.gr.jp/report/animalwelfare/H28/factual_investigation_pig_h28.pdf

- 26) Japan Livestock Technology Association (2019) 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 (第4版). http://jlta.lin.gr.jp/report/animalwelfare/R01/pig_awguideline_the4edition.pdf
- 27) Khanji MS, et al. (2018) Using body measurements to estimate body weight in gilts. *Can J Anim Sci*, 98:362-367.
- 28) Knauer MT, et al. (2015) The sow body condition caliper. *Appl Eng Agric*, 31:175-178.
- 29) Marco-Ramell A, et al. (2016) Proteomics and the search for welfare and stress biomarkers in animal production in the one-health context. *Mol Biosyst*, 12:2024-2035.
- 30) Marco-Ramell A, et al. (2016) Biochemical and proteomic analyses of the physiological response induced by individual housing in gilts provide new potential stress markers. *BMC Vet Res*, 12:265.
- 31) Marques BMF, et al. (2012) Influence of tail biting on weight gain, lesions and condemnations at slaughter of finishing pigs. *Pesq Vet Bras*, 32:967-974.
- 32) Martínez-Miró S, et al. (2016) Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Vet Res*, 12:171.
- 33) Matsuki Y. (2016) 日本と世界のアニマルウェルフェア畜産 上巻 人も動物も満たされて生きる。ウェルフェアフードの時代, 養賢堂, 東京
- 34) Meijer E, et al. (2014) Pressure mat analysis of the longitudinal development of pig locomotion in growing pigs after weaning. *BMC Vet Res*, 10:37
- 35) Milliman ST, et al. (2007) Sickness behavior and its relevance to animal welfare assessment at the group level. *Anim Welf*, 16:123-125.
- 36) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (2019) アニマルウェルフェアに配慮した家畜の飼養管理. http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/attach/pdf/animal_welfare-41.pdf
- 37) Ministry of Foreign Affairs of Japan (2019) 「持続可能な開発目標」(SDGs) について. https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/oda/sdgs/pdf/about_sdgs_summary.pdf
- 38) Ministry of Health, Labour and Welfare (2016) 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン 2016-2020. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>
- 39) Mohling CM, et al. (2014) Evaluation of mechanical and thermal nociception as objective tools to measure painful and nonpainful lameness phases in multiparous sows. *J Anim Sci*, 92:3073-3081.
- 40) Molapo NA, et al. (2019) Real-time livestock tracking system with integration of sensors and beacon navigation. *Wirel Pers Commun*, 104:853-879.
- 41) Muneta Y, et al. (2010) Salivary IgA as a useful non-invasive marker for restraint stress in pigs. *J Vet Med Sci*, 72:1295-1300.
- 42) Muneta Y, et al. (2011) Interleukin-18 expression in pig salivary glands and salivary content changes during acute immobilization stress. *Stress*, 14:549-556.
- 43) OIE-Terrestrial animal health code chapter 7.13 (2018). Animal welfare and pig production systems. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_aw_pigs.pdf
- 44) Olsen C, et al. (2013) Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Vet J*, 198:158-163.
- 45) Ott S, et al. (2014) Different stressors elicit different responses in the salivary biomarkers cortisol, haptoglobin, and chromogranin A in pigs. *Res Vet Sci*, 97:124-128.
- 46) Paris-Garcia M. (2016) Mitigating and managing pain in swine production. *Am Assoc Swine Vet*, pp14-17.
- 47) Parrot RF, et al. (1989) Salivary cortisol in pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. *Br Vet J*, 145:362-366.
- 48) Pineiro M, et al. (2013) The use of acute phase proteins for monitoring animal health and welfare in the pig production chain: The validation of an immunochromatographic method for the detection of elevated levels of pig-MAP. *Meat Sci*, 95:712-718.
- 49) Pittman JS (2016) Sow prolapse syndrome. *Proc*

- of the ISU-James D. McKean Swine Disease Conference, 45-58.
- 50) Pluym LM, et al. (2013) Development of a system for automatic measurements of force and visual stance variables for objective lameness detection in sows: SowSIS. Biosyst Eng, 116:64-74.
- 51) Prickett JR, et al. (2010) The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. Anim Health Res Rev, 11:207-216.
- 52) Rey-Salgueiro L, et al. (2018) Meat quality in relation to swine well-being after transport and during lairage at the slaughterhouse. Meat Sci, 142:38-43.
- 53) Sanchez J, et al. (2019) Porcine breed, sex and production stage influence the levels of status biomarkers in saliva samples. Front Vet Sci, 6:32.
- 54) Sassu EL, et al. (2017) Host-pathogen interplay at primary infection sites in pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. BMC Vet Res, 13:64.
- 55) Schonreiter S, et al. (1999) Salivary cortisol as a stress parameter in piglets. Tierarztl Prax Ausg G: Grosstiere Nutztiere, 27:175-179.
- 56) Sellier N, et al. (2014) A review of methods to measure animal body temperature in precision farming. Am J Agric Sci Technol, 2:74-99.
- 57) Silva M, et al. (2008) Cough localization for the detection of respiratory diseases in pig house. Comput Electron Agric, 64:286-292.
- 58) Soler L, et al. (2012) Serum amyloid A measurements in saliva and serum in growing pigs affected by porcine respiratory and reproductive syndrome in field conditions. Res Vet Sci, 93:1266-1270.
- 59) Soler L, et al. (2013) Response of salivary haptoglobin and serum amyloid A to social isolation and short road transport stress in pigs. Res Vet Sci, 95:298-302.
- 60) Tecles F, et al. (2016) Cholinesterase in porcine saliva: analytical characterization and behavior after experimental stress. Res Vet Sci, 106:23-28.
- 61) Tecles F, et al. (2017) Total esterase measurement in saliva of pigs: validation of an automated assay, characterization and changes in stress and disease conditions. Res Vet Sci, 114:170-176.
- 62) Thomsson O, et al. (2014) Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay developed for measuring cortisol concentration in human saliva and serum for its applicability to analyze cortisol in pig saliva. Acta Vet Scand, 56:55.
- 63) Tsujita S, et al. (1999) Secretory IgA in saliva can be a useful stress marker. Environ Health Prev Med, 4:1-8.
- 64) Valros A. (2017) Tail biting. Adv Pig Welf, 137-166.
- 65) Vandermeulen J, et al. (2015) Discerning pig screams in production environments. PLOS One, 10:1-15.
- 66) Viazzi S, et al. (2014) Image feature extraction for classification of aggressive interactions among pigs. Comput Electron Agric, 104:57-62.
- 67) Wang K, et al. (2019) Automated calculation of heart girth measurement in pigs using body surface point clouds. Comput Electron Agric, 156:565-573.