

國立臺灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學系



碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

豬隻運輸過程中緊迫源與唾液腎上腺

皮質醇之關聯性

The Correlation between Stressors and Salivary Cortisol  
during Transportation in Swine

陳正軒

Jeng-Shiuan Chen

指導教授：鍾德憲、邱智賢 博士

Advisor: De-Shien Jong, Chih-Hsien Chiu, Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July 2019

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

豬隻運輸過程中緊迫源與唾液腎上腺

皮質醇之關聯性

The Correlation between Stressors and Salivary Cortisol  
during Transportation in Swine

本論文係陳正軒（R06626027）在國立臺灣大學動物科學技術學系完成之碩士學位論文，於民國 108 年 7 月 10 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：   籍德憲   (指導教授)

  邱智賢   (指導教授)

  林品凡  

  吳雨新  

系主任、所長   吳信志   (簽名)

## 致謝



人生漫漫，充斥著各種機緣與巧合，就像數年前我曾信誓旦旦覺得自己不會念研究所，現在卻正在提筆為碩士班生活寫下總結。是的，這兩年多來的經歷像是場驚奇的旅程，我在其中經歷了許多，有過情緒，有過懷疑，曾為了研究有所進展而興奮、為了研究遭遇困難與挫折而失落，曾質問自己是否有能力面對接踵而至的挑戰，也曾想逃避和放棄。若不是一路上有許多人點燈，我想我可能沒法走到今天。為此，我十分感激，難以忘懷。

在碩士班七百多個日夜裡，我接受過許多人的幫助。感謝鍾德憲老師、邱智賢老師與吳兩新老師的諄諄教誨，提供研究的大方向讓我去思考，並且修正思路的邏輯性，同時要求留意細節，讓我在科學上有所累積，解決問題與表達陳述的能力亦得以培養。感謝中興大學林怡君老師，提供了本研究的雛型，並在執行的過程中多次給予建議與協助，且為我在動物福利科學上指點迷津。感謝賴俊甫先生對我的歡迎和照顧，讓我在屏東可以順利進行研究，感謝賴英傑先生與林原聰先生載我見識豬隻運輸的現況，不嫌麻煩地分享運輸中的見聞。感謝屏東科技大學楊國泰老師借用研究相關器材，讓我在屏東採集到檢體後能做初步的處理。感謝生理研究室的夥伴，沐恩學長、孟傑學長、黃謙學長、恩加學長、秀如、思芃、宜軒、張珉、于翔與助理們，無論在實驗或生活上都給予了我許多幫助。能接受這麼多人的幫助，我認為自己非常地幸運，也由衷地感謝大家。

最後感謝我的父母從小到大對我的扶養與教導。兩年的時間我完成了碩士學業，而父母卻更加年邁，白駒過隙，前些日子意外地發現雙親的衰老更甚以往，是他們的青春成就了我，希望我這一點時光淬鍊的結果能讓他們驕傲。


## 中文摘要



隨著家畜飼養方式集約化與規模化，活體運輸在現代肉豬生產過程中時屬必要，運輸期間動物是否感到緊迫、痛苦逐漸引起社會大眾的關心。因此，動物運輸在近年來已成為動物福利探討的重要議題之一。本試驗旨在以高屏地區商用肉豬為對象，調查運輸過程中豬隻唾液腎上腺皮質醇含量與緊迫源的關聯。每趟運輸隨機採集 1 至 3 隻豬隻，於牧場繫留欄位內、牧場車體上和肉品市場車體上之唾液樣本，以酵素聯結免疫吸附分析法 (ELISA) 檢測腎上腺皮質醇 (Cortisol) 含量，記錄運輸過程中各項緊迫源變化，再以簡單迴歸、多元複迴歸與非線性迴分別歸探討兩者間之關連，並在調查前針對唾液採集裝置對皮質醇的回收率、唾液腎上腺皮質醇的日夜節律以及豬隻的緊迫試驗進行基礎測驗，確保調查之準確性。

基礎測驗結果顯示：本試驗所使用的唾液採集裝置 Cortisol-Salivette® 有良好的皮質醇回收率；唾液皮質醇的日夜節律高峰在 09:00、11:00 以及 15:00；緊迫試驗中，豬隻唾液皮質醇可以即時地反映豬隻緊迫程度。運輸調查結果發現：電擊棒使用頻率、豬隻承載密度和豬隻驅趕前後的皮質醇變化無顯著關聯 ( $P=0.9184$ ,  $0.5294$ )。豬隻承載密度和豬隻運輸前後皮質醇變化亦無顯著關聯 ( $P=0.2456$ )。驅趕與運輸時間和豬隻在驅趕及運輸前後的皮質醇變化無顯著關聯 ( $P=0.6760$ ,  $0.5520$ )，但當運輸時間界於 35 至 70 分鐘時，運輸時間與皮質醇變化有顯著關聯 ( $R^2=0.5699$ ,  $P=0.0187$ )。而豬隻驅趕前後的皮質醇變化與豬隻運輸前後的皮質醇變化有顯著的關聯 ( $R^2=0.3947$ ,  $P=0.0161$ )。總時間與豬隻在整趟運輸前後的皮質醇變化則存在幾乎顯著的非線性關聯 ( $P=0.0871$ )。

本研究以調查台灣運輸現況為主軸，調查結果顯示，在現行豬隻運輸過程與操作中，電棒使用頻率與豬隻承載密度等被視為影響動物福利的緊迫源，與豬隻皮質醇變化沒有顯著關聯性。而運輸時間 (介於 35 至 70 分鐘) 與皮質醇變化的顯著關



聯顯示豬隻在此時間範圍內，運輸時間越長，皮質醇含量越低，說明豬隻有適應運輸緊迫的能力；豬隻驅趕前後皮質醇變化與運輸前後皮質醇變化之間的顯著關聯，則顯示部分豬隻對於驅趕緊迫並不敏感。

總上所述，雖無法明確得知影響豬隻驅趕和運輸的主要緊迫源為何，但可確定豬隻驅趕前後與運輸前後的腎上腺皮質醇含量變化，兩者之間有關連。肉豬場應於豬隻在進入車體前給予良好照護，以提升豬隻運輸時之動物福利。


關鍵語：豬隻動物福利、動物運輸、緊迫、腎上腺皮質醇

# Abstract



With the scale-intensive production of animal husbandry, whether animals feel stressed during transportation has gradually aroused the concern of the public. Thus, animal transportation has become an important issue in animal welfare discussion in recent years. The study aimed to investigate the transportation of commercial pigs in Southern Taiwan. The saliva samples were taken from several pigs randomly before loading, after loading and arrival at the meat market in each transportation. The cortisol level was tested via ELISA. The relationships between cortisol level and various stressors were analyzed via simple linear regression, multiple regression and nonlinear regression. Basal experiments were done before investigation, including recovery rate of saliva collection device, circadian rhythm of salivary cortisol in swine and response of salivary cortisol to stress in swine, in order to ensure the accuracy of investigation.

The results of basal experiments showed the saliva collection device in this study has acceptable recovery rate; peaks of circadian rhythm of salivary cortisol are at 09:00, 11:00 and 15:00; salivary cortisol in swine can instantly reflect the degree of stress. The results of investigation of transportation showed no significant correlation between cortisol change after loading and stressors, for example, the use of electric sticks ( $P=0.9184$ ), loading density ( $P=0.5294$ ) and loading time ( $P=0.6760$ ). Same results were



found between loading density and cortisol change after transport ( $P=0.2456$ ). Similarly, no significant correlation was found between cortisol change after transport and transport time ( $P=0.5520$ ). However, there was a significant correlation between time and cortisol change after transport when the duration is between 35 to 70 minutes ( $R^2=0.5699$ ,  $P=0.0187$ ). Also, a significant correlation was found between cortisol change after loading and after transport ( $R^2=0.3947$ ,  $P=0.0161$ ). There is an almost significant nonlinear correlation between total time and cortisol changes ( $P=0.0871$ ).

This study focused on the current status of swine transportation in Taiwan. Interestingly, during the process and the handling of transportation, the use of electric sticks and loading density, the stressors that assumed to compromise animal welfare, have no significant correlation with cortisol changes in pigs. Whether the pigs are able to adapt in the situation of transportation requires further studies. Correlation between cortisol change after loading and after transport showed part of pigs are not sensitive to loading stress.

In conclusion, it's sure that cortisol change after transport is related to cortisol change after loading although the main stressors that exactly affect loading and transport are unclear. Good animal care should be provided when loading pigs into vehicle, in order to improve animal welfare during transportation.

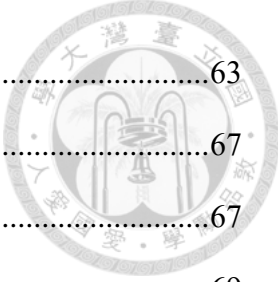
Key Words: Animal welfare, Animal transportation, Stressors, Cortisol

# 目錄



口試委員會審定書 .....	i
致謝 .....	ii
中文摘要 .....	iii
英文摘要 .....	v
目錄 .....	vii
圖目錄 .....	ix
表目錄 .....	x
第一章 前言 .....	1
第二章 文獻探討 .....	2
2.1 認識動物福利 .....	2
2.2 動物之緊迫生理 .....	5
2.3 運輸過程中緊迫源與其對動物福利之影響 .....	25
第三章 材料與方法 .....	30
3.1 試驗動物與場地 .....	30
3.2 檢體採集方法 .....	31
3.3 試驗設計 .....	31
3.4 腎上腺皮質醇酵素免疫分析法 .....	34
3.5 統計模式 .....	36
第四章 結果 .....	37
4.1 基礎試驗結果 .....	37
4.2 運輸緊迫源與腎上腺皮質醇之關聯 .....	44
第五章 討論 .....	63





5.1 研究限制 .....	63
5.2 唾液採集裝置 Cortisol-Salivette®之回收率 .....	67
5.3 豬隻唾液皮質醇之日夜節律 .....	67
5.4 豬隻緊迫試驗 .....	69
5.5 運輸緊迫源與腎上腺皮質醇之關聯 .....	70
<b>第六章 結論 .....</b>	<b>73</b>
<b>第七章 參考文獻 .....</b>	<b>74</b>
<b>第八章 附錄 .....</b>	<b>84</b>

# 圖目錄



圖 1. 動物對緊迫之生理反應之模型框架 .....	8
圖 2. 類固醇內分泌素之生成路徑 .....	12
圖 3. 腎上腺皮質醇代謝分解示意圖 .....	14
圖 4. 腎上腺皮質醇代謝分解路徑圖 .....	14
圖 5. 動物應對緊迫源之假想進程 .....	18
圖 6. 唾液採集裝置 .....	32
圖 7. 運輸各階段 .....	32
圖 8. 豬隻唾液皮質醇之日夜節律 .....	41
圖 9. 緊迫試驗中各時間點的豬隻與血清皮質醇濃度 .....	42
圖 10. 表現相近的豬隻在緊迫試驗中各時間點的平均唾液皮質醇濃度 .....	43
圖 11. 運輸中三個採集點之平均唾液皮質醇濃度 .....	53
圖 12. 驅趕時間與驅趕緊迫之簡單直線迴歸圖 .....	54
圖 13. 豬隻承載密度與驅趕緊迫之簡單直線迴歸圖 .....	55
圖 14. 電棒使用頻率與驅趕緊迫之簡單直線迴歸圖 .....	56
圖 15. 運輸時間與運輸緊迫之簡單直線迴歸圖 .....	57
圖 16. 運輸時間介於 35 至 70 分鐘時，與運輸緊迫之簡單直線迴歸圖 .....	58
圖 17. 豬隻承載密度與運輸緊迫之簡單直線迴歸圖 .....	59
圖 18. 驅趕緊迫與運輸緊迫之簡單直線迴歸圖 .....	60
圖 19. 驅趕緊迫較低組與較高組在運輸中三個採集點之平均唾液皮質醇濃度 .....	61
圖 20. 總運輸時間與總緊迫之間簡單直線迴歸圖 .....	62
圖 21. 總運輸時間與以比值表現的總緊迫之散佈圖 .....	62

# 表目錄



表 1. 豬隻唾液皮質醇濃度之日夜節律 .....	39
表 2. Cortisol-Salivette®對四個皮質醇濃度溶液的回收率 .....	39
表 3. 豬隻唾液與血清皮質醇濃度在緊迫測試中之表現 .....	40
表 4. 豬隻在運輸過程中三個採集點的唾液皮質醇濃度 .....	51
表 5. 豬隻運輸時每趟旅程之條件 .....	52



# 第一章 前言

動物運輸是家畜禽在屠宰前必經的程序，且隨著家畜飼養方式的集約化與規模化，經濟動物的活體運輸在畜產品生產中實屬必要。在運輸期間動物是否受到緊迫與痛苦，逐漸引起社會大眾的關心。因此，近年來動物運輸已成為動物福利所探討的重要議題之一。

一般而言，動物運輸被認為是農場動物最主要且無法避免的緊迫源，對動物健康、福利、表現及產品品質皆具有負面影響（Borell and Schaffer, 2005）。運輸緊迫源包括對環境改變之恐懼、運輸間禁食造成的飢餓與脫水、車輛微氣候不適造成的冷熱緊迫、車輛乘載過高密度之動物所造成的擠壓與疼痛以及車輛設計和路況不良時造成的震動等（Roldan-Santiago *et al.*, 2013），並在運輸過程中對動物造成傷害，如皮膚與肌肉損傷、肌肉出血、腎上腺皮質醇過度分泌、暈眩嘔吐、昏厥、無法行走甚至死亡，且動物屠體品質亦會下降，如肌肉肝醣過度消耗所導致的暗乾肉（DFD）與水漾肉（PSE）等。運輸中緊迫導致了畜產業的重大經濟損失（Ritter *et al.*, 2009），更迫使農場動物在其中承受巨大的痛苦，動物福利受到損害。而這些緊迫源主要與運輸距離、時間、季節以及人員管理操作等多項因素有關，以非侵入式的緊迫指標—唾液腎上腺皮質醇，釐清兩者之間的關聯，有助於減輕農場動物在運輸過程中所遭遇的緊迫，進一步提升運輸過程中的動物福利。

台灣豬隻產業發達，產值佔畜牧總產值約四成六，豬隻在養頭數約 540 萬，運輸遍佈全國，故本試驗以豬隻運輸為主軸，試驗對象為商用肉豬種，試驗地區為高屏地區，取豬隻唾液中腎上腺皮質醇含量作為緊迫指標，探討各項運輸中的緊迫源如時間、豬隻密度、電棒使用等與腎上腺皮質醇變化的關聯，期許未來能藉此改善台灣豬隻運輸之過程。



## 第二章 文獻探討

### 2.1 認識動物福利


現今的動物福利 (animal welfare) 係指動物在人為飼養環境下，應該擁有而非被給予的基本權利與自由，以避免痛苦之情形及追求正向愉快之經驗，其定義應將動物基本需求、健康與緊迫等層面，經過科學性的評估與測量後納入考量，對象應涵蓋伴侶動物、經濟動物、展演動物、實驗動物與任何被人類使用之動物。動物福利亦包括人類對動物利用系統 (animal-usage systems) 中的永續性、道德與食物品質是否符合社會大眾之要求 (Broom, 2010)。

而動物福利並非一成不變，隨著社會變遷，動物的飼養與利用不停變化，人類對待動物的方式與倫理道德亦不斷地更動，動物福利的基本概念便隨著年代的進展而不停蛻變。因此，認識動物福利的緣由與演變，方能對動物福利有較為通盤的了解。

#### 2.1.1 動物福利起源與演變

無論東西方文化，自互古人類馴養動物以來，皆具有禁止虐待動物的倫理與傳統，避免動物在人類飼養下遭受不必要的痛苦、傷害。直到 20 世紀中葉，主流思想或哲學對於對待動物之倫理已有足夠的共識及關心，然而此時社會正逢劇烈變遷，使得當時動物之倫理與傳統面臨挑戰與檢討 (李，2015)。

動物在農業與畜牧業上的利用，為人類使用動物之主要目的，在 20 世紀前葉以使用經濟動物為主的年代，動物福利與倫理便建立在傳統的畜牧業之上。彼時，動物提供食物、勞力、纖維、原料，而人類給予庇護，維持動物生存之條件、保護其不受惡劣天候及掠食者之影響，傳統畜牧業像是動物與人類之間的契約，提供一



個雙贏局面，讓雙方都可以獲益 (Rollin, 1995)。在這樣的共生關係下，人類自然而然會去關心動物的健康、禁止虐待動物、避免動物生病，確保動物能有最佳經濟表現。此時，對動物的關懷出自於人類需要動物維持健康狀態的人本位思考，而非動物在人為飼養環境下應該擁有的自由與福利。然而在當時的社會環境下，如此的動物倫理，已足夠滿足動物之需求，良好的畜牧者會照顧好動物而謀取利益；反之，當業者不善待動物，會因為動物之表現低落，導致經濟利益損失而被淘汰。

直到 20 世紀中葉，拜工業發展所賜，畜牧業迎接了交通運輸與畜產品保存的技術突破，使畜產品可以銷售至更遠的區域，劇烈地改變當時的產業結構。屠宰與加工產業可以從廣大腹地取得動物及畜產品，因此邁向集約，畜牧產業需要大量地生產動物，而促成規模化與企業化，伴隨而來的是生產者之間高度競爭與生產每頭動物之利益降低。此時飼養動物的模式大幅改變，機械化的設備與科技應用，協助人類以低人力資本飼養大量的動物，動物不僅獲得較少的照護，還被飼養在與牠們本質不同的環境中，以方便管理。同時，生產每頭動物所獲得的利益降低勢必影響提供給動物的福利，當動物在飼養過程中不安適時，經濟的考量會限制生產者能負擔的照顧成本，使動物福利受損。

這樣的情形在 1964 年被 Ruth Harrison 登載於動物機器 (Animal Machines) 一書中，此書反映在當時集約飼養制度下，動物遭遇痛苦的狀況，引發社會大眾的震撼與關注。英國議會因此委託 Roger Brambell 成立委員會進行調查，隔年 1965 年的調查報告 (Brambell report) 確認了遭受痛苦的動物已然是當時普遍之事實，並指出動物在人為飼養環境下應該擁有可以站立、躺下、轉身、自我清理以及伸展四肢的自由。以提升經濟動物之福利為目標。英國於 1967 年成立了「農場動物福利諮詢委員會」(Farm Animal Welfare Advisory Committee)，並於 1979 年轉型為「農場動物福利委員會」(Farm Animal Welfare Council, FAWC)，同年提出的五大自由 (Five Freedoms) 擴充了 Brambell report 的內容，更明確指出動物在人為飼養下理應受的待遇，成為舉世皆準的普遍性動物福利目標。



1980 年代開始，隨著社會穩定、文明發展，社會大眾對動物福利的關心大幅增加，相關的研究亦與日俱增，使動物福利逐漸發展成一門科學，維護及推廣動物福利的組織相繼成立 (Broom, 2010)。動物福利出現明確定義，個體之福利在於其試圖應對環境的狀態 (Broom, 1986)，應對環境意味著個體對身體與心理的穩定有能力控制。至今，動物福利關心的層面亦有了擴張，相較以往著重避免動物遭遇負面經驗，現今動物福利更強調促使動物擁有正面的經歷或情緒 (Mellor, 2009)，正向動物福利評估亦有所發展 (Yeates and Main, 2008)。此外，動物福利的優劣也被消費者作為評估生產系統或程序的標準，成為畜產品價值的一部份，生產過程中擁有優良動物福利的畜牧產品較能被社會大眾接受，而具備永續性。綜上所述，動物福利的蓬勃發展，影響到社會的無數層面，人類與動物之間關係與倫理的更迭，正全面性地改變人們的生活。

### 2.1.2 淺談五大自由

FAWC 在 1979 年提出的五大自由 (Five Freedom) 具有歷史性的意義，其內容涵蓋了維持正常生物功能、自然行為表現與避免負面心理感受等層面，引導社會大眾對於動物福利的關懷應該有全盤性的考量，因此被普遍地認為是現今動物福利之基礎。

五大自由分別為：免於飢渴的自由 (Freedom from hunger and thirst)、免於不適的自由 (Freedom from discomfort)、免於疼痛受傷與疾病的自由 (Freedom from pain, injury or disease)、能表現自然行為的自由 (Freedom to express normal behavior) 以及免於恐懼與痛苦的自由 (Freedom from fear and distress)。飢渴的狀態會直接影響動物的存活與否，而身體不適、疼痛與疾病，無法表現自然行為及遭遇痛苦、恐懼之經驗則降低動物的生活品質，兩者皆非人們樂見。設立五大自由讓動物福利的關注與評估得以聚焦，避免特定的威脅發生在動物上。然而現今，五大自由僅作為評估動物福利的初步指南，若需要科學證據佐證，則得針對物種考量動物的諸多需



求，方能更進一步探討動物福利。

### 2.1.3 動物福利之檢驗

福利 (welfare) 的概念起源於來自哲學，它並非客觀可測量的事情，因此評估時難跳脫高度的主觀詮釋，為避免口說無憑，對動物福利的評估應從其定義出發。根據 Broom 於 1986 年所提，動物福利的定義為個體動物試圖適應環境的狀態，其優劣取決於動物應付環境的狀況，當動物很艱難地應付或無法應付環境時，動物福利較差。承此定義，欲評估動物福利，需了解動物原先的正常身體功能，以及在環境的挑戰下動物應對環境之策略與生理狀態之變化，而這些知識屬於緊迫生理學的範疇。

緊迫生理學 (stress physiology) 是現今評估動物福利的基礎，主要探討不同緊迫源刺激下，動物如何反應與適應來維持身體持恆，以及其後果對生物體之影響。面臨緊迫時，動物擁有許多應對的方式，例如行為、內分泌與免疫等反應，測量其中各項參數以及原先生理功能參數的變化，能為評估動物福利提供可量化的科學證據，同時考量遺傳、環境和時間的因素，方能對動物福利做出最客觀的判斷。

## 2.2 動物之緊迫生理

### 2.2.1 緊迫之認識

緊迫的意涵經歷了數次演變，其最早的概念出現在 1929 年，由 Cannon 氏所提出的「戰鬥或逃跑 (Fight-or-flight response)」理論。該理論認為動物在認知到一個可能有害之事件或威脅時，體內的交感神經系統 (sympathetic nervous system) 會被刺激，促使腎上腺髓質分泌腎上腺素 (adrenaline) 及正腎上腺素 (norepinephrine)，引起生理變化，如血糖升高、心跳與呼吸加速、血壓上升等，最終迅速將動物預備成戰鬥或逃跑的狀態，使其能有效排解緊急狀況 (Cannon, 1929)。1932 年，Cannon 氏提出持恆 (homeostasis) 的觀念，並假定當持恆受到緊

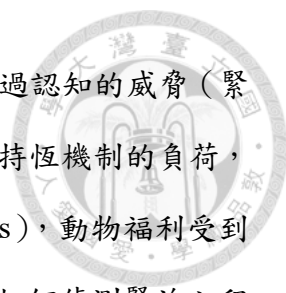


迫的擾亂時，生物體會設法透過自主神經系統的作用回復到先前的平穩狀態 (Cannon, 1932)。

Cannon 氏的研究與理論被 Selye 氏延續並擴充，1936 年 Selye 氏提出「一般適應徵候群 (general adaptation syndrome, GAS)」，認為有危害之事件或緊迫源會刺激下視丘-腦垂腺-腎上腺皮質軸 (hypothalamo- pituitary- adrenocortical axis, H-P-A 軸)，使腎上腺髓、皮質分泌下游內泌素影響生理，並將緊迫引起的反應分為三階段，戰鬥或逃跑反應為警告階段 (stage of alarm reaction)，動物設法脫離緊迫之環境，同時活化 H-P-A 軸與自主神經以備不時之需。其次為動物對緊迫之抵抗階段 (stage of resistance)，此時腎上腺皮質開始活動，分泌醣類皮質素 (cortisol and corticosterone) 促使後續生理反應，試圖對抗緊迫並回復持恆狀態。最後，當緊迫超出動物所能負荷，生理功能開始失常、疲勞並產生病態反應，即為竭盡階段 (stage of exhaustion)。在 GAS 理論中，Selye 氏認為醣類皮質素是主要的傳訊因子，並率先探討了緊迫與醣類皮質素的關聯，開啟了此領域一新扉頁，爾後更多科學家從醣類皮質素的角度投入研究，擴展對緊迫之認識。

綜合 Cannon 氏與 Selye 氏的理論，緊迫與 H-P-A 軸、醣類皮質素以及生物體持恆機制有密切關聯。然而動物受到緊迫後的生理反應十分複雜，以內分泌反應為例，除了 H-P-A 軸，泌乳素 (prolactin)、生長素、升糖素 (glucagon)、胰島素、血管加壓素 (vasopressin)、褪黑激素 (melatonin)、性內泌素 (sex hormone)、甲狀腺素以及某些神經傳導物質等皆會受到影響 (Ranabir and Reetu, 2019)，故僅以 H-P-A 軸、醣類皮質素與持恆之間的關聯來探討緊迫仍不夠全面。此外，動物對緊迫的反應亦受到心理學層面影響，動物對一個事件的認知，會決定此事件是否成為緊迫以及嚴重程度，這取決於動物的先前經驗 (農場動物與工作人員相處之經驗將決定動物是否將人的出現視為緊迫) 與遺傳特徵如脾氣暴躁或溫馴等 (Grandin and Shively, 2015)。

隨著研究成果累積，對緊迫的了解越發透徹，緊迫的定義與日俱增。其中與動



物福利最相關的說法係由 Moberg 所提出，他定義緊迫為個體經過認知的威脅（緊迫源，影響持恆）所引起的生物反應，當緊迫反應超出動物原先持恆機制的負荷，需要額外改變生理機能來適應緊迫，動物便會經歷痛苦（distress），動物福利受到損害（Moberg, 2000）。因此，如何確定緊迫造成動物之痛苦以及如何偵測緊迫之程度，成為以緊迫生理角度探討動物福利時之重大挑戰。

### 2.2.2 動物之緊迫模式

為解決上述的挑戰，Moberg 發展出一個框架模型，將動物緊迫相關知識整合至統一且可經測試的觀念，協助科學家專注在緊迫與動物福利之間的關聯。此模型如圖 1 所示，將動物應對緊迫的過程分為三個階段：緊迫源認知、緊迫反應、緊迫反應之後果，各階段再包含數個部分。首先，緊迫起源於中樞神經系統認知到一個可能威脅生物體持恆的刺激，其中涉及到個體先前之經驗、基因、年齡以及當下心理狀態。一旦中樞神經系統認知到某一刺激並視之為威脅，此刺激便成為緊迫，引發後續之緊迫反應，包含行為、自主神經、神經內分泌以及免疫反應，單獨或共同作用來協助生物體逃離、抵抗或適應緊迫源。最後，當緊迫反應打破生物體原先的持恆，意味著生物體必須額外改變自身生理功能來應付緊迫源，並且面對緊迫反應之後果，例如痛苦、預病理狀態甚至發展成疾病。

Moberg 認為不論動物使用何種手段來應對緊迫源，影響到動物福利的都是動物應付緊迫源之後的結果，如果動物能以原先的持恆狀態應對緊迫源，其生理功能維持正常，動物福利上不會受到影響；相反地，當緊迫源無法以原先的持恆狀態應對，生物體會改變自身生理功能（緊迫的代價，Biological cost of stress）以應付緊迫源，此時動物逐漸感到痛苦，若緊迫過於嚴峻或期間過長，動物極有可能發展成預病理狀態甚至疾病，則動物福利儼然受到損害。

對動物福利而言，生物功能是否因為應對緊迫而改變比牽涉在緊迫反應中的機制來得重要。Moberg 相信應該以緊迫源導致的生理功能改變作為動物福利的衡



量，因為緊迫之代價正是了解緊迫何時成為痛苦的關鍵，而當動物感受到痛苦，其動物福利才開始有受到損害的風險。

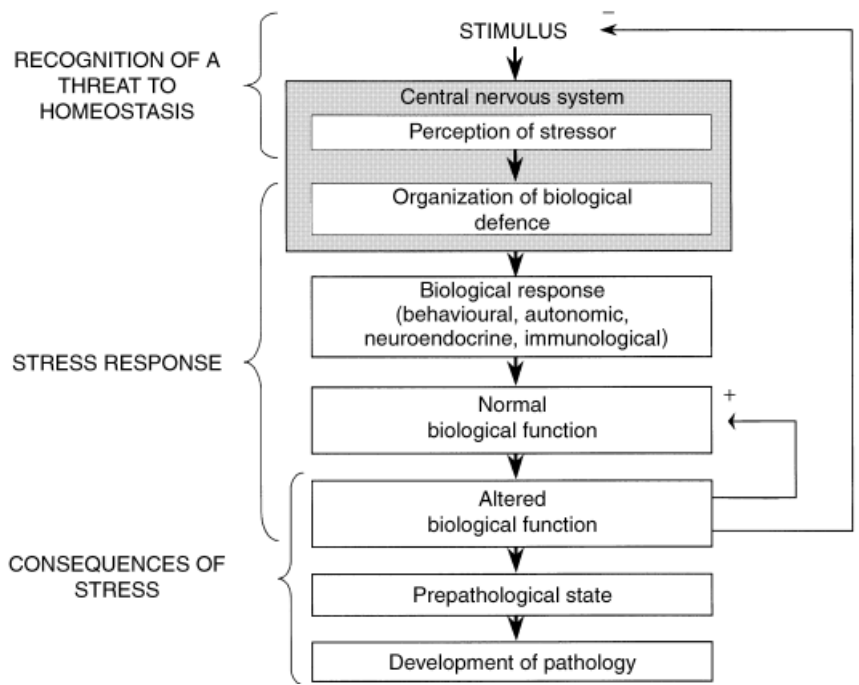



圖 1. 動物對緊迫之生理反應之模型框架

Fig 1. Model framework of stress response of animal

(Moberg, 2000)

### 2.2.3 動物對緊迫之生理反應

緊迫源引發諸多生理反應，包含行為、自主神經、神經內分泌以及免疫反應，協助生物體逃離、抵抗或適應緊迫源。行為反應是許多緊迫源最快速直接引起的，動物可以藉由「戰鬥或逃跑」或「暫止」(freeze) (Bracha *et al.*, 2004) 將自己免於處在緊迫源的環境下，若動物無法逃離緊迫源，則可能發展出刻板行為來協助適應。自主神經系統反應，為動物體應對緊迫源的第二道防線，透過自主神經快速地引起心血管、胃腸系統與腎上腺髓質的反應，促使動物體心律、血壓及腸胃道活動力改變，即時地協助生物體。相較之下，神經內分泌系統擁有更長時間及更廣泛的作用效果，例如 H-P-A 軸系統，可透過下視丘、腦垂腺與腎上腺之間的訊息傳遞，來



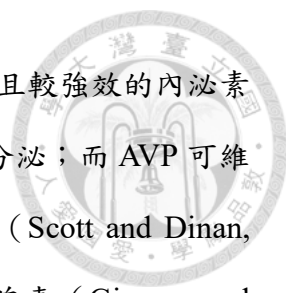
釋放醣類皮質素影響生物體能量代謝、生殖與免疫等系統。至於免疫反應，除了受到醣類皮質素的抑制外，亦會因應特定緊迫源而產生變化，如紅白血球數的改變、細胞激素 (Cytokines) 的分泌等。儘管這些緊迫反應十分重要，但以反應之嚴峻程度來探討動物福利，則以神經內分泌的 H-P-A 軸反應最為適合，因為 H-P-A 軸的普遍性，多數緊迫源都可引起反應，且反應耗時較長，動物在反應過程中有可能經歷痛苦 (Distress)，較具有討論動物福利的意義。

### (1) 下視丘-腦垂腺-腎上腺皮質軸

H-P-A 軸由下視丘、腦垂腺前葉與腎上腺皮質所組成，藉由彼此間的內分泌傳訊，共同調控醣類皮質素的分泌，並透過醣類皮質素的生理功能，參與代謝之持恆，決定能量流向 (energy flux) (Dallman *et al.*, 1993)。一般認為，緊迫反應時 H-P-A 軸的致活，可協助生物體將能量用在應對緊迫源上。

#### i. H-P-A 軸之調節

生物體認知到威脅後，下視丘之腦室旁核 (paraventricular nucleus, PVN) 其中的小細胞神經元軸突會自正中隆突 (median eminence) 分泌激腎上腺皮質素釋放素 (corticotrophin releasing hormone, CRH) 與精胺酸加壓素 (arginine vasopressin, AVP) 進入門脈毛細管床，並作用在腦垂腺前葉的激腎上腺皮質素細胞 (corticotrophs) 上，使其分泌激腎上腺皮質素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 至血液中，最終 ACTH 刺激腎上腺皮質束狀帶合成及分泌醣類皮質素 (Mormède *et al.*, 2007)。進入循環系統的醣類皮質素將運輸至各器官組織內發揮生理功能，作為緊迫反應以應對緊迫源，同時參與對 CRH 與 ACTH 的負回饋調控 (negative feedback)，作用在下視丘與腦垂腺前葉，抑制 CRH、ACTH 的分泌，避免過度刺激 H-P-A 軸 (Manteuffel, 2002)。



H-P-A 軸線受到數種內泌素的調控，在下視丘，CRH 為主要且較強效的內泌素 (River and Plotsky, 1986)，負責在急性緊迫反應中刺激 ACTH 分泌；而 AVP 可維持 ACTH 的基礎分泌以及在長期緊迫下輔助刺激分泌 ACTH (Scott and Dinan, 1998)。腦垂腺亦受其他內泌素刺激而產生 ACTH，例如腎上腺素 (Giguere and Labrie, 1983) 以及催產素 (oxytocin) (Link *et al.*, 1993)。此外，在認知威脅時，H-P-A 亦受到複雜的上游調控，腦室旁核可從下視丘其它核區、腦幹、下穹窿體 (subfornical organ) 與邊緣系統 (limbic system) 接受生理或心理的訊號引發下游腦垂腺與腎上腺的反應 (Mormède *et al.*, 2007)，賦予 H-P-A 軸的高度敏感性與相對非特異性，能針對多數緊迫源引起反應。

H-P-A 軸線調控的複雜度，說明此系統牽涉的生理反應眾多，在持恆作用上扮演關鍵角色，其功能完整性之維持十分重要。在諸多能調控 H-P-A 軸功能的因素中，晝夜節律 (circadian rhythm) 與緊迫源是重要內源性及外源性因素。

## ii. H-P-A 軸與日夜節律之關聯

生物有許多生理現象具有節律性，會隨著時間呈週期變化。若節律之週期接近二十四小時，即稱為日夜節律 (diurnal rhythm)，具有此特性的生理反應除了 H-P-A 軸，還有新陳代謝、體溫、採食飲水、睡眠、活動力與其他內泌素分泌等 (Ingram and Dauncey, 1985)。節律性被生物體內的生理時鐘 (endogenous oscillators) 調控 (Aschoff, 1963; 1966)。生理時鐘能感應呈週期性變化的環境因子 (zeitgeber)，並依此調整生理反應之節律，協調身體各項功能共同或獨立運作以適應環境週期。

一般而言，光亮/黑暗循環是影響 H-P-A 軸日夜節律的重要環境因子，光的訊號可透過傳入下視丘前葉的視交叉上核 (suprachiasmatic nuclei, SCN) 進行調節。日行性動物如人、猴、牛、馬以及綿羊，其 ACTH 與醣類皮質素在清晨或睡醒前會達到高峰；相反地，夜行性動物如齧齒類，則在傍晚達到高峰。本次試驗對象豬隻屬日行性動物，故醣類皮質素的分泌高峰在上午 (Koopmans *et al.*, 2005)。以限飼

圈養豬隻為例，血漿中皮質類固醇濃度在下午為 15 ng/ml，而在上午可達 45 ng/ml 的高峰值 (Barnett et al., 1981)；然而，有研究指出 H-P-A 軸反應的高峰出現在下午，且受到豬隻採食行為的影響 (Hillmann et al., 2008)，顯示出 H-P-A 軸的日夜節律性除了受光照外，亦受其他因素調控，例如年齡、性別與緊迫等 (Ruis et al., 1997; Boumans et al., 2017)。

H-P-A 軸線之日夜節律性對於緊迫反應的檢測十分重要，將動物一天各時間醣類皮質素的基礎值納入考量，方能做出有效的緊迫測量，準確地解讀動物的動物福利狀態。

### iii. 醣類皮質素之特性

醣類皮質素種類會因動物而異，在綿羊、豬、貂、狐狸、犬、貓與魚中主要為皮質醇 (Cortisol)；在鳥類與齧齒類中主要為皮質酮 (Corticosterone)；在反芻動物，兩者分泌量相近 (白等, 1996)。以本次試驗對象豬隻所分泌的皮質醇為例，說明其合成、運輸、代謝相關機制以及生理功能。

#### A. 皮質醇之合成與化學特性

膽固醇 (cholesterol) 為皮質醇的前驅物，可透過腸胃吸收或體內醋酸鹽 (acetate) 合成。膽固醇在腎上腺皮質的束狀帶細胞內的平滑內質網與粒線體中逐步合成為皮質醇如圖 2 所示，主要參與的酵素為膽固醇側鏈裂解酶 (Cholesterol side-chain cleavage enzyme)、 $17\alpha$ -羥化酶 ( $17\alpha$ -hydroxylase)、 $3\beta$ -羥化類固醇脫氫酶 ( $3\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenases)、 $21\alpha$ -羥化酶 ( $21\alpha$ -hydroxylase) 與  $11\beta$ -羥化酶 ( $11\beta$ -hydroxylase)。皮質醇由四個碳環組成，為脂溶性分子，能自由擴散血腦屏障與細胞膜，發揮生理作用。

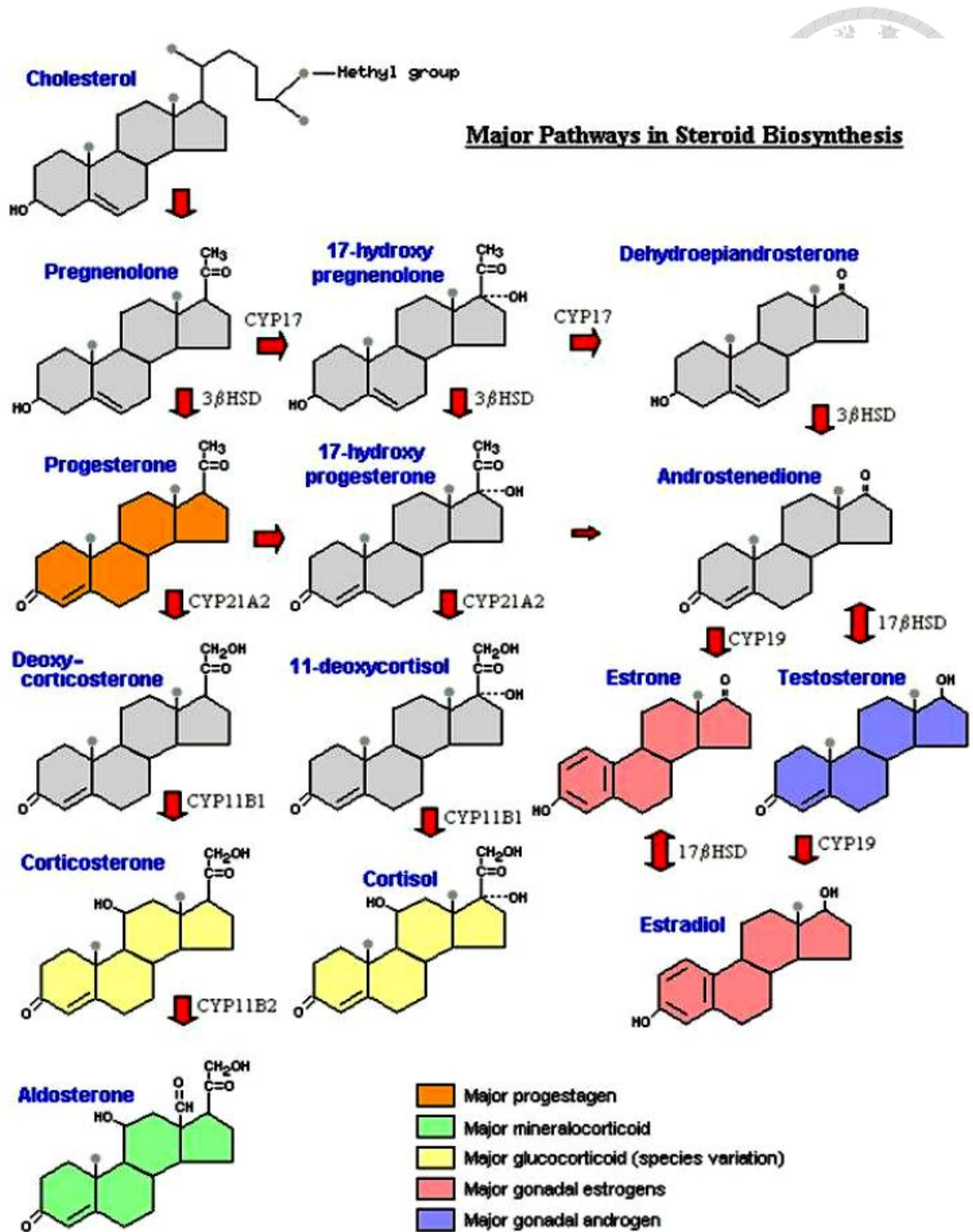


圖 2. 類固醇內分泌素之生成路徑。

Fig 2. Pathway for the biosynthesis of steroid hormones.

(Bowen, 2001)



## B. 皮質醇之運輸與代謝

由於皮質醇為脂溶性非極性小分子，在血液中需要與大分子之蛋白質結合，避免被肝臟、腎臟或血中酵素分解，故在循環系統中將近 90% 的皮質醇與運送蛋白結合成結合態，未與蛋白質結合的皮質醇即為游離態 (free forms)，具有生理活性，能被吸收進細胞內引發反應。運送蛋白為對皮質醇具有親和力的蛋白分子，包含白蛋白 (albumin) 與皮質類固醇轉運蛋白 (corticosteroid-binding globulin, CBG)。兩者對於皮質醇的親和力不一，白蛋白親和力較低但血中含量高，能與大量皮質醇結合；相反地，皮質類固醇轉運蛋白親和力較高，總結合量卻較低(白等, 1996)。功能上，皮質類固醇轉運蛋白負責皮質醇基礎量的結合，而白蛋白在皮質醇分泌量增加時負責與增多的皮質醇結合，兩者濃度的高低，可共同調控皮質醇的生物可利用性 (Gayrard *et al.*, 1996)。進入循環系統後，皮質醇作用於標的器官並且隨即被代謝排出體外，其半衰期因物種而異，一般不超過兩個小時。皮質醇代謝分解之示意圖如圖 3 所示，主要發生在肝臟，部分在腎臟與其他器官進行。除了使皮質醇失去生理活性，分解異化作用目的在增加類固醇分子的親水性，將葡萄糖醛酸 (glucuronic acid) 或硫酸鹽連接至皮質醇，使之成為親水的化合物，隨後，親水皮質醇代謝物可藉肝臟膽汁的分泌進入消化道中，由糞便 (25%) 排出，亦可由腎臟從血液過濾至尿液，由尿液 (75%) 排出體外 (Honour, 1984)。而皮質醇在肝臟與腎臟進行代謝時參與的酶和反應路徑如圖 4 所示。此外，皮質醇以及相關代謝產物也存在乳汁、唾液與毛髮中。

## C. 皮質醇之作用機制與生理功能

皮質醇透過簡單擴散進入標靶細胞後，於細胞質內與特定受體結合成複合體，此複合體再經過其他條件的活化，如溫度、時間、離子等，進入細胞核影響轉錄，活化或抑制基因組上的某些片段，隨後新蛋白質形成，發揮生理機能，最後皮質醇



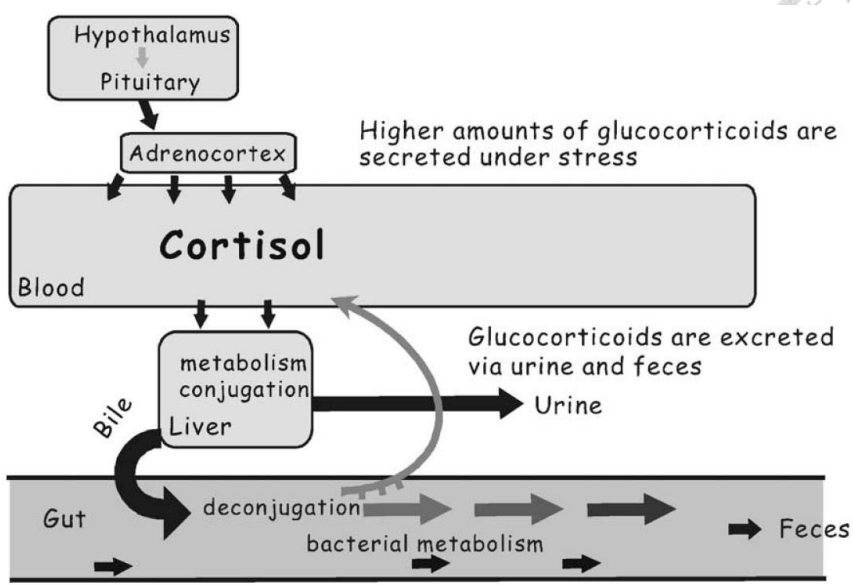


圖 3. 腎上腺皮質醇代謝分解示意圖

Fig 3. Schematic diagram of the metabolism of adrenal cortisol

( Möstl and Palme, 2002 )

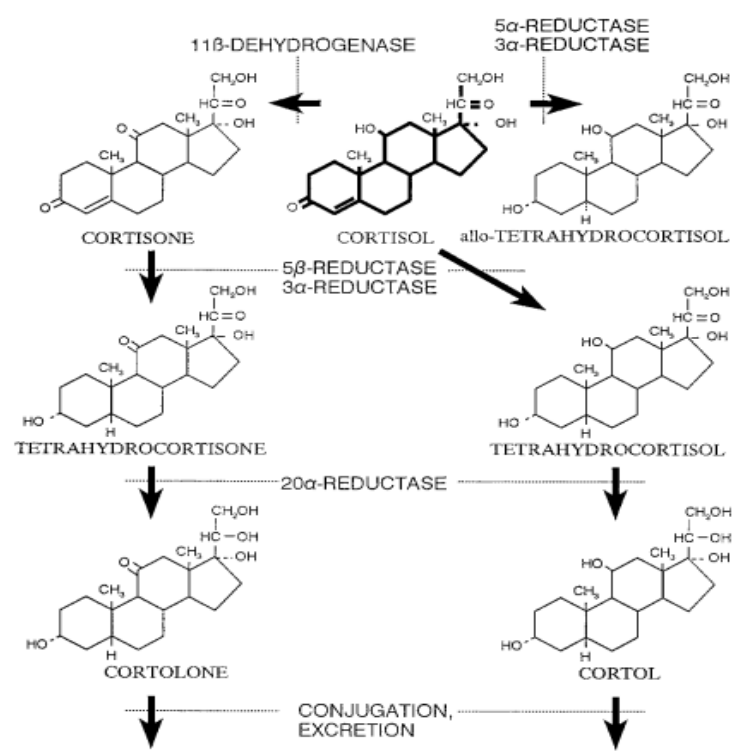


圖 4. 腎上腺皮質醇代謝分解路徑圖

Fig 4. Pathway for the metabolism of adrenal cortisol

( White *et al.*, 1997 )



代謝後喪失功能。由於大多數器官組織都具備皮質醇受體，能接受其訊號，故皮質醇的生理功能十分廣泛，影響諸多生理功能。其主要功能分項說明如下：

a. 對能量代謝之影響

皮質醇能引起周圍組織（peripheral tissues）中蛋白質與脂質的異化作用（catabolism）分解出碳骨架，並抑制周圍組織的蛋白質同化作用、降低細胞對胺基酸的吸收；在肝臟，皮質醇會促使肝細胞碳骨架合成為葡萄糖，增加葡萄糖新生成作用（gluconeogenesis），同時增進肝醣與血漿蛋白質的合成（McMahon *et al.*, 1988）。另外，皮質醇能抑制細胞對葡萄糖的利用，進而增加血糖與胰島素分泌，且皮質醇亦能作用在下視丘造成食慾、採食增加。藉由中央與周圍機制的合作，皮質醇增加生物體內的能量可利用性（Tempel *et al.*, 1994）。皮質醇對能量代謝調控，在應對緊迫源時，可使動物有充足的血糖水平以供使用（通常藉由行為反應）。

過量皮質醇作用會促使肌肉組織過度分解，導致肌肉損失及衰弱，若皮質醇引發的能量流動沒有被生物體以行為方式立即應對緊迫，能量會重新以脂肪形式儲存，淨效應為生物體將蛋白質轉成脂肪（Devenport *et al.*, 1989）。脂肪組織的重新分布與累積，即為醣類皮質素過度分泌導致的病徵—月亮臉、水牛肩，此時動物福利即有受到損害的疑慮。

b. 對水分及電解質代謝之影響

皮質醇與鹽類皮質素功能上有部分重疊效果，原因為細胞核內的鹽類皮質素受體能接受皮質醇的訊號引發反應（Pascual-Le *et al.*, 2005）。雖然皮質醇對水分與電解質之影響遠小於鹽類皮質素，但仍有回收鈉離子、排出鉀離子之功能，甚至過量的皮質醇也會引起水腫、高血鈉、低血鉀、多尿與頻渴等症狀。



### c. 對抗發炎與免疫系統之影響

發炎與免疫反應可視為動物體應對外來感染的緊迫反應，皮質醇對於兩者的抑制，作用在於防止過度的緊迫反應威脅到生物體之持恆 (Munck *et al.*, 1984)。對於發炎反應，皮質醇可抑制初級發炎反應如纖維蛋白沉積、微血管擴張和白血球移動與吞噬，以及後期發炎反應如纖維細胞增生與膠原細胞沉積。對於免疫反應，皮質醇能減緩磷脂酶 A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>) 的釋出，抑制由磷脂酶 A<sub>2</sub> 引起的下游反應—釋出花生四烯酸 (arachidonic acid)。花生四烯酸為前列腺素 (Prostaglandin)、白三烯 (Leukotriene) 以及免疫相關內分泌物的前驅物，藉由抑制花生四烯酸的分泌，皮質醇可壓抑免疫反應。


過度的皮質醇分泌會導致免疫反應被過度壓抑，此時生物體對於外來病原失去可以抵禦的機制，容易患病而影響動物福利。

### d. 對內分泌系統之影響

過多的皮質醇可透過負回饋抑制下視丘與腦垂腺分泌 CRH 與 ACTH，促使皮質醇分泌回到基礎量。若長期過量的皮質醇分泌，會對下視丘、腦垂腺造成嚴重的抑制，導致腎上腺皮質萎縮、腎上腺功能降低。其他內分泌系統亦會受到皮質醇影響，例如性腺系統。在皮質醇過量下，下視丘的促性腺激素釋放激素 (gonadotropin-Releasing Hormone, GnRH) 被抑制，其下游腦垂腺促濾泡激素與黃體素的分泌以及性腺功能皆被影響，生殖生理功能受到干擾。在嚴峻的緊迫下，動物的內分泌系統紊亂，失去原先的生理功能，動物福利受到損害。

## (2) 持恆與變穩態

持恆為 Cannon 所提出的概念，是生物體內在的穩定能力，意即生物體有能力藉由生理系統的回饋圈 (feedback circle)，將各項生理反應或跡象穩定在固定範圍 (適合生物體存活的範圍) 內，諸如體溫、血糖、水分與電解質等等，其過程無需



付出任何代價。當緊迫源威脅到生物體原先持恆，擾亂生理反應或跡象，生物體會藉由許多機制作用（即緊迫反應），嘗試應對緊迫源、重新恢復持恆。如果緊迫源僅輕微干擾，則生物體無需花費太多代價便能恢復；反之，當生物體遭遇到強烈或長期緊迫，超過生物體所能負荷，其持恆之恢復則需要付出相當的代價，甚至會改變原先持恆所固定的生理範圍。

為了解釋持恆範圍的變化，McEwen（1998）提出了變穩態（allostasis）的觀念。Allostasis 是指生物體經由改變持恆範圍來達到並維持穩定的能力。當生物體遭遇到無法逃離或克服的緊迫源，僅能設法適應，過程中生物體整合各項資訊，調整生理系統回饋圈，改變原先持恆，將生物體準備成能適應緊迫源的狀態，並且維持在那個狀態直到緊迫源消失。藉由 Allostasis，生物體得以適應緊迫源並在正常生理範圍外獲得一新持恆，穩定下來與緊迫源共存。當然，改變正常生理範圍的適應機制必有其代價，長期的 Allostasis 反應所要求生物體支付的代價稱為變穩態負擔（Allostasis loads），通常伴隨著慢性疾病的發生。

用 Allostasis 的觀念詮釋動物福利狀態，可以較準確地區分動物之正常生理狀態與適應緊迫源時之變穩態，藉此判斷動物何時感受到痛苦(Distress)，當 Allostasis loads 出現在動物時，無疑是動物福利的損害。故近年來，Allostasis 已成為評估動物福利的重要觀念(Korte *et al.*, 2007)。圖 5 可以說明動物如何應對緊迫源(Moberg, 2000)，功能正常運作下，生物體除了基礎功能外還具備若干生理功能（F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> 至 F<sub>n</sub>），並有餘裕（reserve）能維持正套生理系統的持恆，若動物無須改變原先持恆狀態便可應對緊迫源如圖 5.a 所示，即動物應對緊迫源時仍有餘裕維持恆定，生理功能與動物福利皆不受負面影響；反之，當出現強烈或長期的緊迫源如圖 5.b,c 所示，僅憑動物原先餘裕不足以應對，得調整生理系統的持恆範圍方可應付，其他生理功能受到壓抑，此時動物開始經歷痛苦，動物福利開始受損。

若以 H-P-A 軸說明 Allostasis 時可能發生的生理現象，當外在威脅引起激烈的 H-P-A 軸反應，釋放過量皮質醇進入循環系統，在腦部原本能改善認知記憶的皮質

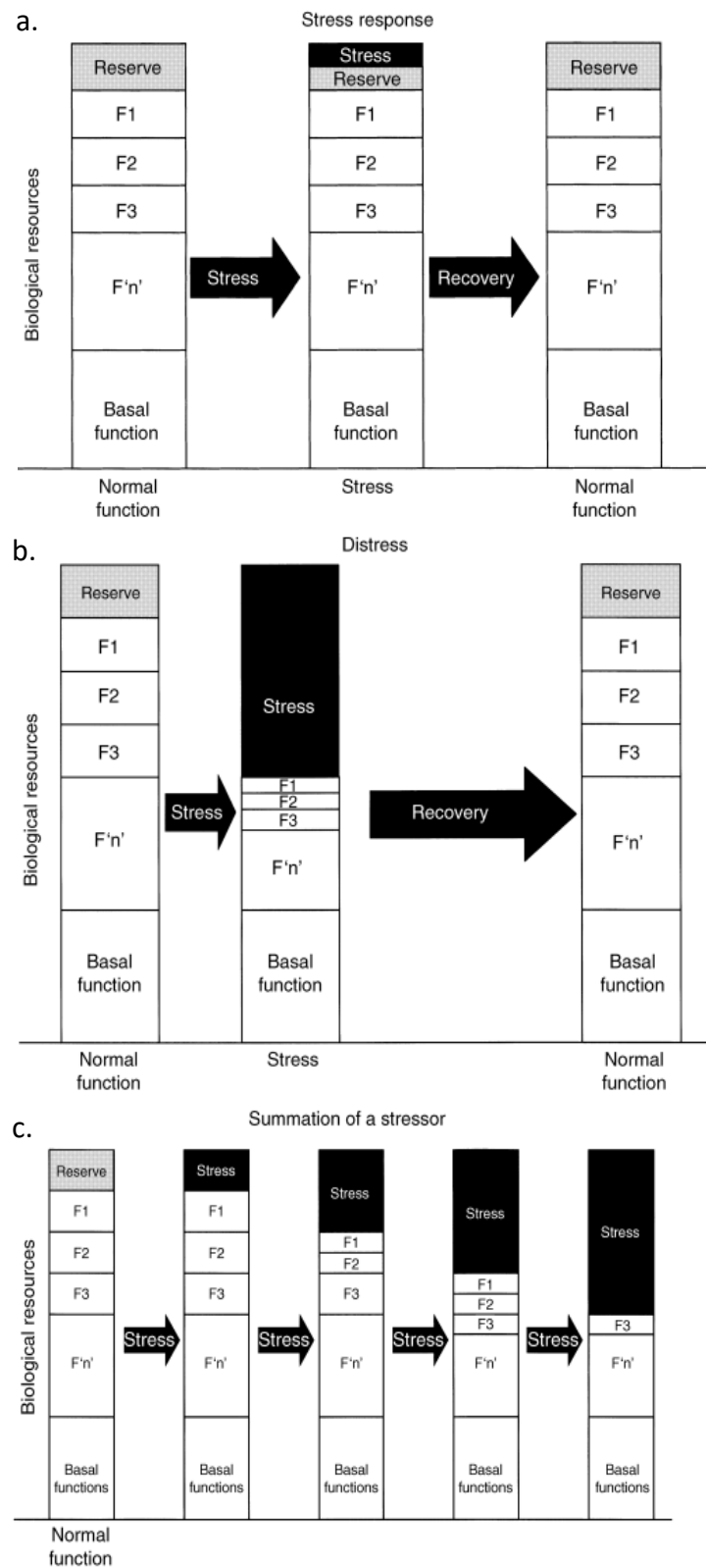



圖 5. 動物應對緊迫源之假想進程

Fig. 5. Hypothetical process of how animal respond to stressors (Moberg, 2000)

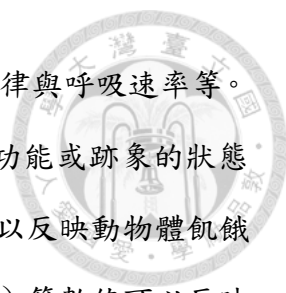


醇長期分泌下會導致神經源萎縮、記憶衰退及恐懼感增加 (Roosendaal, 2000)。對於免疫系統，適量的皮質醇可以避免免疫反應過度打破持恆，而過量皮質醇會壓抑免疫系統導致疾病發生 (Dhabhar and McEwen, 1999)。能量代謝方面，適量皮質醇能增加能量流以供給動物利用，然而過量的醣類皮質素分泌，導致能量流無法全部被動物使用，多餘的能量將以脂肪儲存，導致肥胖甚至胰島素阻抗或心血管的疾病 (Brindley and Rolland, 1989)。綜上所述，H-P-A 軸影響生理甚鉅，若反應超出持恆的範圍進入 Allostasis 就有可能造成動物的不適與痛苦，進而對動物福利造成負面的影響。

#### 2.2.4 緊迫源與緊迫指標

以動物福利觀點定義，能挑戰動物五大自由的內外因子，便為緊迫源，在家畜的飼養過程中，緊迫源通常為不安適的環境因素或人為操作。緊迫源可從質與量去區分，質的部分包括物理性（冷熱、機械性傷害、電擊、噪音）、化學性（麻醉、毒素、藥物）、營養性（食物或水的缺乏）與心理性（隔離、併欄、保定、動物社會位階更動）的緊迫源 (Martínez-Miró *et al.*, 2016)，甚至有結合多個緊迫源的威脅如運輸 (Roldan-Santiago *et al.*, 2013) 與分娩 (Fell and Shutt, 1986) 等。量的部分則依照緊迫源的強度（分貝、安培或將緊迫源量化的單位）與持續時間（急性、慢性與亞急性）作區別。緊迫源的量化能協助科學家了解緊迫源的性質，然而卻無法反映動物的真實感受與生理狀態。動物體內緊迫反應的程度，是否打破持恆造成痛苦，才是動物福利學關心的事物，因此需要緊迫指標 (Stress indicator)，來反映動物在應對緊迫源之過程中的真實體驗與生理狀態。

緊迫指標是可量化及可重複測量的生理反應、跡象或表現，用以反映緊迫源所引起反應之程度，並藉此評估動物之生理與動物福利狀態。各種不同的緊迫源，能引起各式各樣的緊迫反應，故作為緊迫程度的指標很多。分類上，緊迫指標有普遍性與特異性的區別，普遍性之緊迫指標表示多數緊迫源能引起某一生理跡象的變



化，反映出生物整體的狀態，例腎上腺皮質醇的分泌量、體溫、心律與呼吸速率等。而特異性的緊迫指標只受特定緊迫源刺激，僅能顯示某項生物功能或跡象的狀態以及程度，例如血中游離脂肪酸、酮體、葡萄糖與尿素等濃度可以反映動物體飢餓程度，滲透壓、總蛋白、白蛋白與血球容積（Packed-cell volume）等數值可以反映脫水狀態，而乳酸與肌酸激酶（creatine kinase）的濃度可以凸顯動物活動的劇烈與肌肉受損之程度，血管加壓素（vasopressin）的多寡則可以顯示動物運輸過程中暈眩的程度（Knowles and Warriss, 2000）。

緊迫指標的選用需配合緊迫源之性質與其可能引發的緊迫反應，本次試驗為調查現行運輸下豬隻的動物福利，運輸過程即為豬隻所遭遇的緊迫源，常見適用於分析運輸的緊迫指標如下：

#### (1) 死亡率與屠體品質

死亡率是非常直接的評估標準，若動物無法應對所遭遇的緊迫，其生理機制無法維持持恆，最糟糕的結果就是無法存活。在動物運輸的動物福利研究中，動物的死亡率可以對運輸過程的緊迫程度，提供非常直觀的證據。一趟運輸過程中，死亡率越高表示動物所面對的環境越加嚴峻，其動物福利越有可能受到挑戰（Knowles and Warriss, 2000）。然而，死亡率作為緊迫指標有其缺點。以動物運輸研究為例，運輸中較貧弱的動物才会有死亡的可能，整體的死亡率相當低，大約在 1% 左右，意味著需要大量足夠的動物數量才能準確地估計預探討的變因之影響。

屠體品質作為緊迫指標，以動物屠宰後的損傷狀態來評估動物生前的情況。以動物運輸研究為例，常見的屠體損傷可分為兩類：物理機械性損傷與肌肉代謝異常。前者如皮膚損傷、肌肉瘀傷、肌肉撕裂出血以及骨骼斷裂，來自車體上或屠宰廠內的擠壓或打鬥、駕乘等行為。後者為水漾肉（PSE）與暗乾肉（DFD），為運輸過程中肌肉過度使用，肌肉中的肝醣大量消耗，屠後肌肉中酸鹼值失衡所導致。兩者的



成因都跟動物遭遇的緊迫有關，且過程中動物會感受到疼痛與不適。因此，屠體的狀態確實地可以反應動物生前的動物福利狀態。

## (2) 動物行為


動物行為科學可為動物的感受提供證據，各種動物都具備一定的行為反應準則，趨向喜歡的環境、逃避討厭的環境，因此，動物對各種不同刺激的反應與選擇，可以作為評估動物福利最直觀的指標（李，2015）。此外，動物行為的改變是重要的適應機制，亦是動物經歷痛苦的最早徵象（Ayo *et al.*, 2002）。

運輸過程中豬隻的行為變化，以站姿、臥姿與坐姿的轉換以及侵略性行為（騎乘、頂咬）為主。藉由站姿、臥姿與坐姿的比例，可以推論動物是否疲勞、暈眩或緊張。例如短期運輸（低於3小時）的豬隻以站姿為主（Bradshaw *et al.*, 1996），原因為豬隻尚未習慣運輸環境，但若運輸環境較佳，豬隻有可能適應環境，並以躺姿為主（Lambooij and Engel, 1991）；然而動物表現躺姿亦有負面意涵之可能，Knowles *et al.*（1999）發現長期運輸（高於24小時）的牛隻多以躺姿為主，且血漿中皮質醇比站姿的牛隻高，表示牛隻不勝負荷長期的運輸，而無力站立。當豬隻進行社會位階重新排位（social regrouping）或競爭車體上資源（充足可休息的空間）時，容易發生侵略性行為，導致為疼痛、皮膚損傷、屠體瘀傷、肌肉過度運動與肝醣耗盡以及皮質醇水平上升等，對動物福利造成傷害。

## (3) 腎上腺皮質醇

根據 Cannon 與 Style 氏的理論，H-P-A 軸活動為非特異性反應能接受多數緊迫源之刺激而引發，因此在測量緊迫時，用直接或間接的方法評估腎上腺之分泌功能，為常見的緊迫測量方式（Stott, 1981）。縱使現已證實並非所有緊迫源皆會刺激 H-P-A 軸反應，但評估腎上腺分泌的能力，也就是腎上腺皮質醇的含量多寡，仍舊為評估緊迫時的主流方法。除了腎上腺皮質醇外，亦可藉由腎上腺大小、血液與腦垂





腺中 ACTH 濃度與下視丘中 CRH 濃度來作為判斷 H-P-A 軸活動的依據 (Vernikos-Danellis and Heybach, 1980)。對於長期的緊迫反應，可進行反應性 (responsiveness) 的評估，如施加外源性 ACTH 或 CRH 刺激 H-P-A 軸線，檢查各器官分泌的能力 (Gaillard and Al-Damluji, 1987)。

使用腎上腺皮質醇做為緊迫指標有其限制，除了日夜節律的變化需要考量，皮質醇的分泌為脈衝性 (pulsatile)，以約九十分鐘為周期。此性質出現在某些物種上，例如人 (Follenius *et al.*, 1987)、牛 (Thun *et al.*, 1981) 與羊 (Fulkerson *et al.*, 1979)。另外，腎上腺功能的高變異性已在實驗室動物 (Popova *et al.*, 1981; Sarrieau *et al.*, 1998) 與經濟動物 (Garcia-Belenguer *et al.*, 1996; Desautes *et al.*, 1997) 上被充分描述，此個體差異之存在乃受到基因背景調控。在豬隻，皮質類固醇運轉蛋白 (CBG) 的基因多態性會影響循環的皮質醇水平 (Desautes *et al.*, 2002)。腎上腺分泌功能亦具有極限，隨著緊迫源的強度上升或持續，皮質醇分泌量會達高原期而無法反映緊迫源之程度，有研究指出豬隻在僅暴露於新環境的刺激下，其皮質醇分泌量已達高峰 (Choi *et al.*, 2012)。最後，緊迫源的持續時間與檢驗腎上腺功能的時間點為重要解讀 H-P-A 軸活動力的因素。H-P-A 軸運作需要各器官的整合，故皮質醇在循環系統中的增加為一緩慢過程，面對緊迫源時需要數分鐘的時間血中皮質醇方會上升，緊迫源消失後約一小時皮質醇含量才會回到基底水平 (Mormède *et al.*, 2007)。若緊迫源維持或重複一段時間，則有可能加速動物適應，而導致腎上腺對緊迫源不產生反應。研究指出，豬隻在經歷連續一個月的不定期電擊刺激後，對於刺激仍有行為反應，但其腎上腺皮質醇濃度卻與未處理組相同 (Jensen *et al.*, 1996)。

綜上所述，腎上腺皮質醇做為非特異性緊迫反應之緊迫指標，可以反映動物生理狀態、判讀動物福利。然而，將腎上腺皮質醇分泌方式與規律、個體間之高度差異性、分泌極限量與緊迫源之持續時間納入考量，方能作出精確之判斷。



### 2.2.5 腎上腺皮質醇之評估

欲瞭解動物腎上腺分泌功能，需檢測動物檢體中的內分泌素含量，而常見的腎上腺皮質醇評估方法，從競爭性蛋白質分析法（Competitive protein binding analysis, CPB）、放射免疫分析法（Radioimmunoassay, RIA）逐漸發展到酵素免疫分析法（Enzyme immunoassay, EIA），或稱酵素連結免疫吸附法（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）。ELISA 的原理為將酵素標幟在抗原上，經由免疫反應，抗原與抗體結合後，加入基質（substrate）產生酵素呈色反應，並利用呈色之吸光值對檢體中抗原濃度加以定量。酵素連結免疫吸附法有許多優點，如成本較便宜、步驟與操作簡單、無放射性之廢料與汙染、容易進行判別或定量（Blake and Gould, 1984）。近年來免疫與生化技術進步，改善 ELISA 的靈敏度，已逐漸取代其他測量方法，並廣泛應用於生物醫學、環境科學等產業（Monroe, 1984）。ELISA 有許多種類，本實驗室使用競爭型酵素免疫分析法（competitive EIA）。原理為利用酵素標幟抗原（抗體與過氧化酶之連結體），與檢體內標的物競爭抗體之結合位，並與基質產生呈色反應，透過標準溶液內不同濃度之抗原所建立的標準曲線，經由吸光值換算出動物檢體內未知標的物的濃度。

從動物取得檢體的方式又可分為侵入式（invasive）與非侵入式（non-invasive）。前者會使用器具侵入動物身體，如以針具取得血液、腦脊隨液、部分器官組織等，過程中人為操作、疼痛甚至麻醉都是額外緊迫源，對動物福利造成傷害，同時影響皮質醇之分泌，使評估的數值有高估之疑慮；而以非侵入式獲取檢體較不會造成動物不適，能避免皮質醇分泌的變動，減少採集過程中動物福利的損害。常見的非侵入式檢體為唾液、尿液、糞樣、乳樣與毛髮等，甚至動物行為之變化亦可提供充足資訊以解讀其動物福利。本節將說明以各檢體為來源，評估腎上腺皮質醇含量與動物生理狀態的優缺點。



### (1) 血漿


在動物福利研究中，血漿是分析腎上腺皮質醇時最常被使用的檢體，可以檢測動物總皮質醇濃度。血漿作為檢體，其優點為可以即時地測出最直觀且準確的皮質醇濃度，同時亦可檢測激腎上腺皮質素 (ACTH)、兒茶酚胺 (catecholamines)、血糖和白血球數量與型態等與 H-P-A 軸功能致活相關的指標 (Mormède *et al.*, 2007)。而缺點為血漿是侵入性的檢體，取得的過程會造成額外的緊迫，不但造成動物福利的損害，而影響了皮質醇的評估與判讀。

### (2) 糞便與尿液

尿液是代謝醣類皮質醇的主要路徑之一，血液中皮質醇經肝臟、腎臟代謝之產物，經由腎臟過濾而形成尿液排出體外，可作為非侵入式的檢體，採集過程中不會額外造成動物緊迫。另外，尿液作為排泄產物，會累積數小時才會排出，因此尿液皮質醇與其代謝產物之濃度可以提供一段時間內 H-P-A 軸活動力的綜合評估，亦可校正血漿皮質醇濃度之波動。同理，血漿中皮質醇經由肝臟代謝，同膽汁一起進入消化道，最後以糞便排出體外，使得糞便中皮質醇之檢測亦成為非侵入式之單位時間內的腎上腺功能綜合評估方式。

### (3) 唾液

使用唾液作為檢體提供了非侵入且無壓力的採集方式，因此近年來廣受歡迎。唾液主要由三對唾腺 (salivary gland) 產生，形成於唾腺內特化的分泌性末梢腺泡或分泌小管。腺泡藉由鈉離子幫浦耗能運輸將血液中鈉離子移往分泌小管內引起滲透壓失衡，促使液體從血液移至管腔成為唾液 (Vining and McGinley, 1987)。由於腺泡細胞的緊密連結 (tight junctions)，血液中許多有機物無法自由過濾至唾液中，例如尿素、葡萄糖、脂質、大分子蛋白等，這些物質在唾液中的濃度遠低於血液。而游離態的固醇類內分泌素具有脂溶性質，能快速地以被動擴散方式進入腺泡



細胞 (Riad-Fahmy et al., 1982)，這使得唾液中的皮質醇以游離態為主，約為血液中皮質醇濃度的 5-10% 左右，因此需要較靈敏的分析系統。游離態皮質醇被動擴散的速率非常快，足以維持血漿與唾液中的皮質醇濃度平衡，因此唾液中皮質醇濃度不受到唾液流速的影響 (Vining and McGinley, 1984)。當緊迫源引發 H-P-A 軸反應促使血中皮質醇上升時，其快速的被動擴散使唾液能及時地反映動物生理狀態 (Bushong et al., 2000)。綜上所述，以唾液中腎上腺皮質醇做為緊迫指標監測動物之生理狀況，有其實用性與潛力，得在不侵擾動物下，提供立即性之資訊以供解讀其生理狀態與動物福利狀態。

然而以唾液做為檢體檢測皮質醇濃度有其限制，唾液中以游離態存在的皮質醇濃度僅有血液中皮質醇濃度的 5-10%。除了需要靈敏的分析系統之外，唾液中較低的皮質醇含量，會導致當唾液中部分蛋白質、微生物、食物殘渣、齦溝液 (gingival crevicular fluid) 或者外界汙染時，唾液皮質醇濃度會受到嚴重干擾，造成評估誤差。在採集人類的唾液之前，通常會注意被採集者的口腔清潔、是否留有食物殘渣或是否有出血之情形；在動物的唾液採集，則避免在動物進食後採集，且採集前數週便開始讓動物習慣被唾液採集之過程，避免造成額外刺激。然而，在本研究中，以調查台灣豬隻運輸現況為主，這些事前須注意之細節不易周全。

### 2.3 運輸過程中緊迫源與其對動物福利之影響

動物運輸是現今畜牧業重要的組成部分 (Speer, Slack, & Troyer, 2001)，且已被證實會對動物福利造成影響 (Grandin, 2000)，動物在運輸過程中會遭遇受傷、疲勞、疾病甚至死亡之威脅，其屠體品質亦有下降之可能 (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012)。運輸過程中的各項條件如運輸時間 (duration)、豬隻承載密度 (Loading density)、工作人員操作手法 (handling) 與車輛微環境 (trailer microclimate) 等，將影響運輸緊迫之劇烈程度以及動物於運輸時的動物福利，本節即為說明各項條件之變動與運輸過程中動物福利之關聯。



#### 2.4.1 運輸時間

動物運輸既已被認定為緊迫源，其時間長短便是量化此緊迫源之首要條件，運輸距離同理。一般認為運輸時間或距離越長，對動物造成的緊迫越大，如 Voslarova et al. (2017) 將運輸距離分為五個段落 (< 50 Km, 50-100 Km, 101-200 Km, 201-300 Km, >300 Km)，發現豬隻死亡率隨運輸距離增長而上升，在運輸時間上也有相似的研究結果 (Warriss, 1993)。然而，亦有研究顯示出相反的結果，Haley et al. (2008) 以普查方式研究豬隻運輸條件與死亡率的關聯，發現當運輸距離增加 50 Km 時，豬隻死亡率會下降。在血液生化值上，運輸 3 小時豬隻血中的乳酸 (lactate) 與皮質醇含量比運輸 15 分鐘來得低，而且屠體品質較無水樣肉的可能 (Perez et al., 2002)。

這樣相反的結果顯示出時間或距離對豬隻的影響可能為非線性的關係，Sutherland et al. (2009) 發現豬隻死亡率在運輸時間 30 分鐘至 4 小時間上升，但在運輸時間超過 4 小時後有下降的情形。動物行為上亦發現，比起長期運輸，動物經歷短期運輸後 (短於 30 分鐘)，有較難以驅趕的情況，且較可能有水樣肉之發生 (Grandin, 1994)，顯示出動物尚未適應運輸環境，仍處於較躁動的狀態。運輸環境之優劣也需要被考量，如果整趟旅程平順、流暢，長時間的運輸可提供豬隻適應與休息之可能；反之，當旅程粗糙且充滿干擾，即使是短期的運輸也會對豬隻造成很大的傷害。

動物運輸前的操作亦會影響動物運輸的品質。運輸前的餵飼會使豬隻容易在運輸過程中感到不適、暈眩，通常需要禁食 (Bradshaw et al., 1996)，而在熱季時運輸前對車體上豬隻進行灑水，也能有效降低其熱緊迫，改善運輸環境。由此可見，在探討動物運輸時間或距離時，許多運輸條件的異同，會造成試驗結果的分歧，應該將諸多的條件均納入考量。



#### 2.4.2 豬隻承載密度

豬隻承載密度對動物福利與經濟收益有重要之影響，密度過低會造成豬隻在移動車體上容易失去平衡而摔倒，密度過高則會造成豬隻彼此擠壓，兩者都會讓豬隻發生皮膚損傷、肌肉瘀傷、受傷 (Eldridge and Winfield, 1988)，嚴重者在抵達目的地時無法行走 (non-ambulatory, non-injured, NANI)，甚至死亡 (death on arrival, DOA)，這無疑是對動物福利與經濟收益的傷害。另外，承載密度也決定了一趟車次可容納多頭數豬隻，對於牧場而言是重要的成本考量。

關於合適的豬隻承載密度，Ritter *et al.* (2006) 在北美地區的研究發現當承載密度從  $0.5 \text{ m}^2/100 \text{ kg}$  ( $200 \text{ Kg} / \text{m}^2$ ) 提高至  $0.4 \text{ m}^2/100 \text{ kg}$  ( $250 \text{ Kg} / \text{m}^2$ ) 時，豬隻死亡率會從 0.08% 上升至 0.27%，並認為密度是  $0.48 \text{ m}^2/100 \text{ kg}$  ( $208.3 \text{ Kg} / \text{m}^2$ ) 時，最能減少運輸時的損失。在加拿大亦有同樣的研究結果，單位面積上的豬隻頭數越多，死亡率越高 (Whiting and Brandt, 2002)。而近年來的研究更指明承載密度與運輸時間之間具有交互作用，當承載密度較低且短程運輸時，豬隻容易發生水樣肉 (Guàrdia *et al.*, 2004)，有研究者甚至建議在短程運輸時使用高密度的承載；歐盟 (EU) 對密度的規範 ( $235.3 \text{ Kg} / \text{m}^2$ , CEC, 2005) 亦被建議應適用在超過三小時的運輸。承載密度對動物的影響，除了自身變化外，亦需考慮與時間、溫度甚至是操作強度的交互關係，台灣目前法規對豬隻承載密度的規範為每平方公尺不得超過 315 公斤，實際上對動物的影響仍不清楚。

#### 2.4.3 工作人員操作手法

運輸過程中，工作人員操作主要集中在驅趕上下車的階段 (loading and unloading)，且會帶給動物相當大的緊迫。有許多變因影響驅趕過程是否緊迫，工作人員接觸動物所引起的恐懼 (Hemsworth *et al.*, 1997)、過程中器具的使用、畜舍的設計與動線規劃。由此可見，動物在牧場端的經歷存有很大的差異，根據 Dewey

*et al.* (2004) 的調查，各趟運輸過程中豬隻死亡率的變異有 55% 的部分可由牧場端的差異解釋。


驅趕耗時是一個重要的變因，當工作人員嘗試加快速度，儘管動物維持同樣的移動方向，仍有錯置腳步、滑倒、摔傷與瘀傷的可能 (Atkinson, 2000)。當牧場動線規劃不佳 (過陡的上升坡度、走道充滿障礙物、走道寬度過窄或長度過長、走道具有大角度彎道等) 及工作人員不了解豬隻移動習性 (習慣以小群體移動、會緩慢探索未知環境、會反抗推擠的力量而非順從、驚嚇時容易集聚而造成驅趕困難等)，此時若迫使豬隻快速移動會造成很嚴峻的緊迫。

驅趕器具也很重要，擋豬板是主要使用的器具，來驅趕大部分的豬隻，輔以電擊棒來對付較頑強的豬隻。社會大眾普遍地認為電棒的使用會對動物福利造成損害，然而，在較高豬隻承載密度下，使用電棒能快速迫使豬隻移動到車體上，進而減少豬隻屠體瘀傷的情形 (Guise and Penny, 1989a)。的確電擊棒會造成豬隻疼痛，不該使用在豬隻敏感的部位上，如眼、鼻、耳與陰部，台灣目前法令規範不得不當電擊便是此意。

綜上所述，操作人員的訓練、豬場硬體設施的優劣會決定驅趕的難度，若有良好的教育訓練及牧場規劃，並且適當地使用驅趕工具，可在驅趕過程中盡量地減少豬隻感受的緊迫。

#### 2.4.4 車輛微環境

車輛微環境 (trailer microclimate) 通常是指在運輸過程中車體內部的溫度與濕度，與該運輸發生的地理位置、季節與車輛設計有關。以溫度為例，當車上環境溫度沒有維持在豬隻臨界溫度 (critical temperature) 的上下限內，也就是 26°C 至 31°C 時，豬隻就會經歷冷熱緊迫，其動物福利會受到損害，嚴重者更會導致死亡。Voslarova *et al.* (2017) 發現在捷克地區的豬隻，在冬季時有最高的死亡率，夏季次之，春秋季死亡率最低，顯示該地區冷緊迫的影響大於熱緊迫。而 Haley *et al.* (2008)



則發現加拿大地區的運輸過程中，溫度每上升 1°C，死亡率則增加為原先的 1.26 倍，顯示該地區的運輸較容易面對熱緊迫的挑戰，Grandin（1994）的研究也有相似的結果，當外在溫度超過 35°C 時，死亡率會從 0.15% 上升至 0.30%。而 Sutherland *et al.*（2009）則使用 NANI 與 DOA 作為緊迫指標，發現車體溫度達 25°C 以上時死亡率最高，而 0°C 以下最低，但豬隻無法行走的數量則是隨溫度下降而上升，0°C 以下時最高，這顯示高低溫對豬隻的影響不盡相同，但皆對動物福利造成損害。

在炎熱的地區，Randall（1993）建議運輸車輛內的溫度不應該超過 30°C，而台灣主要為亞熱帶及熱帶地區，豬隻在運輸過程中時常要面對嚴峻的熱緊迫，卻缺乏對溫度的相關法令規範。在台灣熱緊迫對豬隻的影響，仍待更詳盡的研究。





## 第三章 材料與方法

### 3.1 試驗動物與場地

#### 3.1.1 運輸緊迫源與腎上腺皮質醇之關聯

運輸試驗的豬隻來自屏東地區的台糖豬場—大響一畜殖場、大響二畜殖場、四林繁殖場與四林畜殖場，以及部份的私人豬場。豬隻為商用肉豬，品系主要為 LYD（藍瑞斯母豬 x 約克夏公豬 x 杜洛克公豬）與 YLD（藍瑞斯公豬 x 約克夏母豬 x 杜洛克公豬），體重約介於 110 至 120 公斤間，主要運輸至台南市善化肉品市場、高雄市岡山、旗山與鳳山肉品市場以及屏東縣肉品市場、台糖生鮮肉品工廠與信功肉品廠。豬隻在運輸前一天移至豬場繫留欄位等待並且禁食，隔日司機抵達後進行驅趕，驅趕時司機利用豬擋板、電擊棒等工具迫使豬隻移動至車體上。運輸貨車有兩層，可利用液壓系統升降，裝載完畢後經過磅便開始運輸。運輸過程中，司機會視情況使用車體上的灑水系統或遮蔭裝置，為車上的豬隻降溫。抵達至目的地後，司機會用高壓水柱清洗車上的豬隻，等待豬隻穩定後驅趕豬隻下車進入目的地繫留欄位中，等待活體拍賣或屠宰。運輸時程因目的地而異，若運輸至肉品市場，通常為上午八點到十二點，若運輸至台糖生鮮肉品市場及信功肉品廠，運輸時程則可能延遲至下午兩點。當貨車承載兩層時，上下層豬隻有可能要送往不同目的地，司機得依照當天出豬的豬場以及目的地優化出最佳路線。

#### 3.1.2 日夜節律試驗與緊迫試驗

此二試驗之豬隻來自高雄地區的私人肉豬場，品系為 LYD 豬種，試驗時約四個月齡，共 8 隻豬隻參與試驗。該豬場為水廉式豬舍，溫度恆介於 24-25°C，例行操作為早上八點至九點、下午四點至五點的餵飼與定期性的投藥。



### 3.2 檢體採集方法

#### 3.2.1 唾液採集

本研究以唾液中腎上腺皮質醇作為緊迫指標，因此唾液的採集十分重要。本研究使用的唾液採集裝置為 Cortisol-Salivette® (Sarstedt)，由口蓋、棉條、內管與採集管組成，如圖 6 所示。事先在棉條上綁棉線，並將棉條投入豬隻口腔中，等待豬隻咀嚼約 30 秒至 1 分鐘唾液浸潤棉條後，扯動棉線收回棉條。之後，將棉條放入內管與採集管、蓋上口蓋，以 1000 g 離心 2 分鐘，便可將唾液離心至採集管內，並以 -20°C 保存唾液樣本，等待測定皮質醇含量。

#### 3.2.2 血液採集

採集血液前以鼻圈套索進行保定，確保豬隻不會隨意移動，並以 18 G 針頭 (TERUMO) 與 10 ml 的針筒 (TERUMO) 進行採血。採血的方式為豬隻前腔靜脈採血，將豬頭部仰起後，可見豬胸部兩側第一對肋骨與胸骨結合處前側 (胸骨柄兩側旁約 2 公分左右) 各有一個前腔靜脈凹陷窩，取針具由下而上以垂直角度向凹陷窩進針，進針後拉緊活塞使針筒內呈現負壓，扎破前腔靜脈壁後即會有血液流入針筒。若無血液流出，可上下左右微調針頭，直到有血液流入針管。收集之血液以室溫暫置，等待凝集後以 1,000 x g 離心後取上清液血清，再將血清置於 -20°C 保存，等待測定皮質醇含量。

### 3.3 試驗設計

#### 3.3.1 運輸緊迫源與腎上腺皮質醇之關聯

本研究欲探討豬隻運輸過程中唾液中腎上腺皮質醇變化與緊迫源之間的關聯，因此需要在運輸過程中進行豬隻唾液採樣。唾液採集的時間點分別為，豬隻位於豬場繫留欄位時 (第一點)、經過驅趕移動至車體時 (第二點)、經過運輸抵達目的地時 (第三點) 如圖 7 所示。採樣後，唾液採集管先後以 4°C、-20°C 暫存，等待離




圖 6. 唾液採集裝置，由上而下為口蓋、棉條、內管與採集管。

Fig 6. Saliva collection device are made of cover, swab, inner tube and collecting tube.



圖 7.運輸各階段。圖 7-1 為驅趕前豬隻於牧場繫留欄位內、圖 7-2 為驅趕過程、圖 7-3 為驅趕後豬隻於車體上、圖 7-4 為豬隻運輸後於車體上。

Fig 7. Each stage of transportation. Fig 7-1 show pigs in the picked-up facility before loading. Fig 7-2 show the processing of loading. Fig 7-3 show pigs on the vehicle after loading. Fig 7-4 show pigs on the vehicle after transport.



心與皮質醇含量測定。在豬場繫留欄位採集唾液後，以動物用著色筆標記豬隻，針對標記者進行後續採樣，每趟運輸流程結束後，一隻標記豬隻應該有三次唾液採集，運輸過程中亦會紀錄驅趕與運輸的時間 (minutes)、司機在驅趕時使用電棒的頻率 (times/minute) 以及豬隻承載密度 ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ) 等緊迫源數值。

將豬隻於第二時間點採集的唾液皮質醇含量減去第一時間點採集的皮質醇含量即為豬隻在驅趕前後的皮質醇變化，定義為驅趕緊迫 (loading stress)；同理，運輸緊迫 (transport stress) 即為豬隻在第三時間點與第二時間點的唾液皮質醇差值，而總緊迫 (total stress) 則為豬隻整趟驅趕與運輸過程中的皮質醇變化，為第三點減去第一點的皮質醇數值。將驅趕緊迫、運輸緊迫與總緊迫，與時間、豬隻承載密度、電棒使用頻度等緊迫源，以簡單直線迴歸 (simple linear regression)、多元複迴歸 (multiple regression analysis) 與非線性迴歸 (nonlinear regression analysis) 探討驅趕、運輸緊迫與緊迫源之間的關係。

### 3.3.2 唾液採集裝置回收率試驗

使用 Cortisol-Salivette® 之前，必須先確認此採集裝置對皮質醇具有優良之回收率。本試驗以 10 ng/ml、20 ng/ml、40 ng/ml、80 ng/ml 四個濃度皮質醇溶液，各取 1 ml 滴於 Cortisol-Salivette® 的棉條上，經過離心後測定其皮質醇濃度，重複三次。另外取一組溶液不經過棉條，直接測定皮質醇濃度，作為控制組。將三組重複平均值除以控制組濃度即可得到回收率。

### 3.3.3 日夜節律試驗

本試驗欲探討豬隻每日唾液腎上腺皮質醇隨時間之變化，試驗對象為 8 隻 LYD 豬隻，各自以動物用著色筆標記，於一天的 05:00、07:00、09:00、11:00、13:00、15:00 等六個時間點採集唾液，並以  $-20^{\circ}\text{C}$  保存唾液採集管，等待離心與皮質醇含量測定。進行試驗前兩日開始，每日對豬隻採集唾液一至兩次，使其習慣操作流程以



及操作人員之存在。

### 3.3.4 緊迫試驗

本試驗以鐵製鼻圈套索保定模擬緊迫施加於豬隻上，欲探討豬隻遭遇緊迫後，其唾液與血液中腎上腺皮質醇之變化。試驗對象同日夜節律試驗，為同樣 8 隻 LYD 豬隻。每隻豬總共會採集檢體九次，前三次為緊迫前採集唾液，以確立豬隻尚未緊迫時之皮質醇水平，第四次至第六次為施加緊迫後先後採集血液與唾液，每次保定時間不超過 5 分鐘即鬆開套索，第七次至第九次為緊迫結束後採集唾液，以非侵入方式得知豬隻在緊迫後皮質醇水平之變化，是否有下降趨勢，唯第九次採集唾液後額外進行採血，以血液樣本再次確認豬隻皮質醇水平。每次採集檢體的間隔皆為 0.5 小時，共歷時 4 小時。

唾液採集後之處置同上，而血液採集後置於室溫約 30 分鐘，待血液凝固後置於 4°C 暫存，後以 1000 x g 離心取其上清液血清，再將血清置於 -20°C 保存，等待測定皮質醇含量。

### 3.4 腎上腺皮質醇酵素免疫分析法

研究中所使用的腎上腺皮質醇酵素聯結免疫吸附分析法 (F-ELISA) 與抗腎上腺皮質醇抗體 (cortisol-antibody)、酵素標幟抗原 (cortisol-HRP) 等重要材料皆沿用本實驗室先前所建立的檢測系統 (周, 1999)，並已對腎上腺皮質醇酵素免疫分析法建立完整評估，顯示此法在抗體專一性 (cross-reactivity)、靈敏度 (sensitivity) 與精密度 (precision) 有良好表現 (各項數值參見附錄)。皮質醇酵素免疫分析法的材料方法如下：

#### (1) 儀器及材料

96 孔微滴盤 (Costar 3590)



ELISA Reader (Biotek 公司，型號： $\mu$ Quant)

微量稀釋器 (Hamilton 公司，型號：Microlab 500 series)

微滴盤清洗儀 (Dynex 公司，型號：Ultrawash PLUS)

## (2) 溶液 (配方參見附錄) 及藥品

抗體吸附液 (coating buffer)

填充緩衝液 (blocking buffer)

分析緩衝液 (assay buffer)

沖洗緩衝液 (washing buffer)

磷酸鹽緩衝液 (PB 6.0)

雙氧水 (35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

8N 硫酸溶液 (8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 35%

呈色劑鄰一苯二胺 (o-phenylene diamine, OPD)

## (3) 標準溶液配製

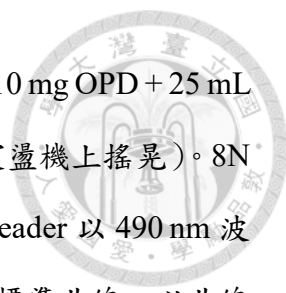
精秤 10 mg/mL 皮質醇 (Cortisol; Sigma)，溶於 99.5% 甲醇 10 mL，成 1 mg/mL 之標準保存液 (stock)；以分析緩衝液等比稀釋為 1.563、3.125、6.25、12.5、25 及 50 ng/mL 的標準溶液，保存於 -20°C。

## (4) 微滴盤抗體吸附 (antibody coating)

將抗皮質醇抗體以抗體吸附液稀釋適當倍數後，加入 200  $\mu$ L 於微滴盤每槽中，4°C 靜置。之後取出待回溫，用微滴盤清洗儀以沖洗緩衝液清洗 1 次後，於每槽添加 300  $\mu$ L 填充緩衝液，4°C 靜置至少 8 小時後備用，可保存 2 周。

## (5) 皮質醇標準溶液及試樣分析

分析前將微滴盤、試劑、標準溶液與樣本回溫至室溫，並將樣本震盪均勻。微滴盤洗去充填緩衝液後，每槽先後加入標準溶液 (或樣本) 50  $\mu$ L 以及 150  $\mu$ L 標幟抗原，於室溫下避光反應 30 分鐘 (置於震盪機上搖晃) 後以沖洗緩衝液清洗去



除游離態抗原，再於每槽加入 200  $\mu$ L 之 OPD 溶液（每盤配置 10 mg OPD + 25 mL PB 6.0 + 2.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>），室溫下避光呈色反應 20-30 分鐘（置於震盪機上搖晃）。8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 為終止劑，每槽加入 50  $\mu$ L 終止呈色反應。使用 ELISA Reader 以 490 nm 波長測吸光值、630 nm 波長去除背景值，獲取標準溶液吸光值之標準曲線，以曲線推算未知試樣之濃度。

### 3.5 統計模式

全部的數據資料以統計軟體 SAS v.9.4 分析。REG 程式語言（Proc REG）使用在運輸緊迫源與腎上腺皮質醇變化關聯的簡單直線迴歸與多元複迴歸上，以皮質醇變化為 Y、緊迫源數值為 X（Model  $Y = X_1$ ； Model  $Y = X_1 X_2 X_3 \dots$ ）。多元複迴歸另外以向前選取法（forward）、向後選取法（backward）與逐步迴歸法（stepwise）進行緊迫源排序。非線性迴歸則以 SAS Enterprise Guide 進行分析。皮質醇日夜節律變化、緊迫測試結果則使用 GLM（General Linear Model）程式語言進行 ANOVA 分析，隨後進行兩兩比較。另外，GLM 中的 Student t-test 也被使用。



## 第四章 結果

### 4.1 基礎試驗結果

唾液採集裝置 Cortisol-Salivette®之回收率、豬隻唾液皮質醇之日夜節律與豬隻緊迫測試等試驗，皆為本研究主軸—探討運輸緊迫源與腎上腺皮質醇之關聯的基礎試驗。確保運輸過程中的唾液採集裝置有優良的回收率、不會影響皮質醇濃度，方能進行唾液採集。得知豬隻在未受刺激的狀態下，其唾液皮質醇含量之日夜節律變化，方能對各時間點採集的唾液進行校正，較精準地得到豬隻的驅趕與運輸緊迫。了解豬隻應對緊迫時的血清與唾液皮質醇變化，方能確認本研究以唾液皮質醇作為緊迫指標的可行性。

#### 4.1.1 唾液採集裝置 Cortisol-Salivette®之回收率

使用 Cortisol-Salivette®對四種濃度（10、20、40 與 80 ng/ml）的回收率結果如表 1 所示，10 ng/ml 組別的平均濃度為 11.90 ng/ml，控制組濃度為 11.87 ng/ml，20 ng/ml 組別的平均濃度為 21.00 ng/ml，控制組濃度為 19.20 ng/ml，40 ng/ml 組別的平均濃度為 41.99 ng/ml，控制組濃度為 39.92 ng/ml，80 ng/ml 組別的平均濃度為 86.48 ng/ml，控制組濃度為 77.85 ng/ml。

平均濃度除以控制組濃度所得到的回收率，在 10、20、40 與 80 ng/ml 的表現分別為 100、109、105 與 111%，顯示出使用 Cortisol-Salivette®的組別，其皮質醇溶液經過棉條的吸收以及離心後，濃度有稍微上升的情形。

#### 4.1.2 豬隻唾液皮質醇之日夜節律

八隻 LYD 豬隻在一天六個時間點（05:00、07:00、09:00、11:00、13:00、15:00）



的唾液腎上腺皮質醇含量如表 2 所示，其中有 5 個唾液樣本有受到汙染的情形而無法檢測。將時間點與皮質醇的關係繪製成折線圖，如圖 8，可看見唾液皮質醇含量 (Mean ± S.E.M) 在 09:00 (24.27 ± 2.74 ng/ml)、11:00 (21.70 ± 1.50 ng/ml) 與 15:00 (27.17 ± 3.24 ng/ml) 有較高的情形，而在 05:00 (17.32 ± 1.97 ng/ml)、07:00 (12.68 ± 1.26 ng/ml) 與 13:00 (8.03 ± 1.20 ng/ml) 有較低的情形。

經過 ANOVA 變方分析及鄧氏兩兩比較後發現，05:00、07:00 與 13:00 的豬隻唾液皮質醇之間無顯著差異，05:00、09:00、11:00 與 15:00 的豬隻唾液皮質醇之間無顯著差異，05:00、07:00、09:00、11:00 的豬隻唾液皮質醇之間亦無顯著差異。然而，15:00 與 07:00、13:00 相比，豬隻唾液皮質醇含量顯著較高 ( $P < 0.05$ )，09:00 與 11:00 的唾液皮質醇含量也比 13:00 顯著較高 ( $P < 0.05$ )。

#### 4.1.3 豬隻緊迫試驗

本試驗預以 8 隻 LYD 豬隻進行，然而過程中有一隻豬 (No.5) 經歷較大的不適與緊迫，擔心施加緊迫之過程造成豬隻過大的傷害，因此放棄對這隻豬的採樣。

七隻豬的唾液與血清皮質醇隨試驗時間點的表現如表 3 所示，其中 No.2 豬缺乏第九個點的採樣。7 隻豬隻的平均唾液與血清皮質醇濃度隨試驗時間點的表現如圖 9。在試驗中於時間點 4、5、6 施加緊迫，可看到唾液同血清皮質醇濃度在 5、6 點有上升的趨勢，且唾液皮質醇在第 7 點達到高峰，而血清皮質醇在第 9 點回到第 4 點的水平。儘管可以從圖 9 中看出唾液與血清皮質醇的趨勢，但在統計上兩者的皮質醇含量在 9 個試驗點之間皆無顯著差異 ( $P = 0.1287$ 、 $0.2162$ )。這可能受到豬隻個體差異的影響，從唾液皮質醇含量隨試驗時間點的表現便可看出，No.2、No.3、No.4、No.7 豬有類似的反應曲線。針對這四隻豬進行 ANOVA 變方分析，在 9 個試驗點之間發現存有顯著差異 ( $P < 0.001$ )，結果如圖 10，最高點出現在第 7 點。另外 3 隻豬不同試驗時間點的唾液皮質醇濃度之間則沒有顯著差異，而血液皮質醇濃度隨試驗時間點之變化，則 7 隻豬的反映皆有相似的模式。

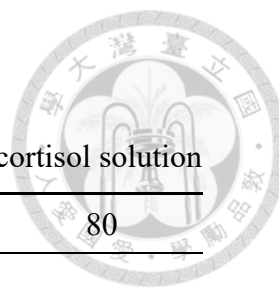


表 1. Cortisol-Salivette®對不同皮質醇濃度溶液的回收率

Table 1. Recovery rate of Cortisol-Salivette® to four concentrations cortisol solution

Conc. (ng/ml)	10	20	40	80
	Cortisol level (ng/ml)			
No.1	11.96	20.31	41.33	86.54
No.2	11.95	20.57	45.38	90.57
No.3	11.80	22.11	39.27	82.33
AVG	11.90	21.00	41.99	86.48
Control	11.87	19.20	39.92	77.85
Recovery rate (%)	100%	109%	105%	111%

- 回收率為平均濃度除以控制組濃度

Recovery rate is average concentrations divided by concentrations of control group

表 2. 豬隻唾液皮質醇濃度之日夜節律

Table 2. The circadian rhythm of salivary cortisol in swine

Time	05:00	07:00	09:00	11:00	13:00	15:00
Pigs	Cortisol level (ng/ml)					
No.1	7.61	14.82	12.03	23.63	7.80	44.29
No.2	15.11	4.81	6.16	28.80	5.46	17.29
No.3	21.11	14.58	35.82	16.83	2.79	#
No.4	7.44	7.34	18.08	24.99	2.10	17.29
No.5	10.22	22.30	43.19	35.86	13.92	#
No.6	27.24	18.58	21.14	20.78	4.76	15.27
No.7	10.92	#	46.52	10.26	19.35	41.69
No.8	38.9	6.33	11.18	12.44	#	#
Avg	17.32	12.68	24.27	21.70	8.03	27.17
S.E.M	3.93	2.52	5.48	3.01	2.40	6.48

- 以#符號表示受到汙染而無法測定的唾液樣本
- Use symbol # to indicate the sample that is unable to measure due to contamination

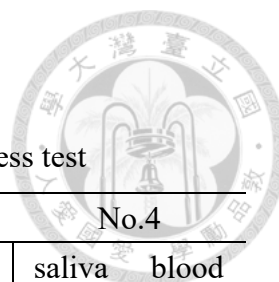


表 3. 豬隻唾液與血清皮質醇濃度在緊迫測試中之表現

Table 3. Concentrations of saliva and serum cortisol of swine in a stress test

Pigs		No.1		No.2		No.3		No.4	
Time (hours)		saliva	blood	saliva	blood	saliva	blood	saliva	blood
Before stress	-1.5	26.97		17.29		38.37		20.22	
	-1	14.62		21.65		18.53		4.81	
	-0.5	5.58		35.66		25.02		8.9	
Stress	0	9.01	16.15	7.95	6.44	5.69	18.87	4.49	9.52
	0.5	10.72	19.76	2.98	9.45	8.8	32.31	11.09	12.03
	1	15.79	13.67	34.38		26.25	31.81	7.24	14.34
After stress	1.5	7.18		26.67		44.38		18.87	
	2	17.78		13.71	3.25	15.51		28.13	
	2.5	20.77	8.97			3.9	12.64	7.21	4.92
Pigs		No.6		No.7		No.8			
Time (hours)		saliva	blood	saliva	blood	saliva	blood		
Before stress	-1.5	14.53		5.82		26.45			
	-1	20.38		25.84		28.24			
	-0.5	10.57		23.53		7.68			
Stress	0	22.23	8.94	7.91	9.34	17.68	11.39		
	0.5	36.20	25.47	5.91	40.24	7.24	13.57		
	1	14.35	21.59	30.54	63.83	5.80	19.76		
After stress	1.5	11.51		64.56		25.30			
	2	26.38		26.20		11.97			
	2.5	26.79	#	16.20	31.77	44.17	8.38		

- 數值的單位為 ng/ml
- 以#符號表示受到汙染而無法測定的唾液樣本
- No.2 豬只施加兩次緊迫，整個流程減少一次採樣；No.5 豬因為採樣過程中感受到較大緊迫，故放棄對其採樣
- The unit of value is ng/ml
- Use symbol # to indicate the sample that is unable to measure due to contamination
- Pig No.2 was stressed only twice, so there are less 1 sample in the entire process; pig No.5 experienced more stress during sampling, thus quit its sample.

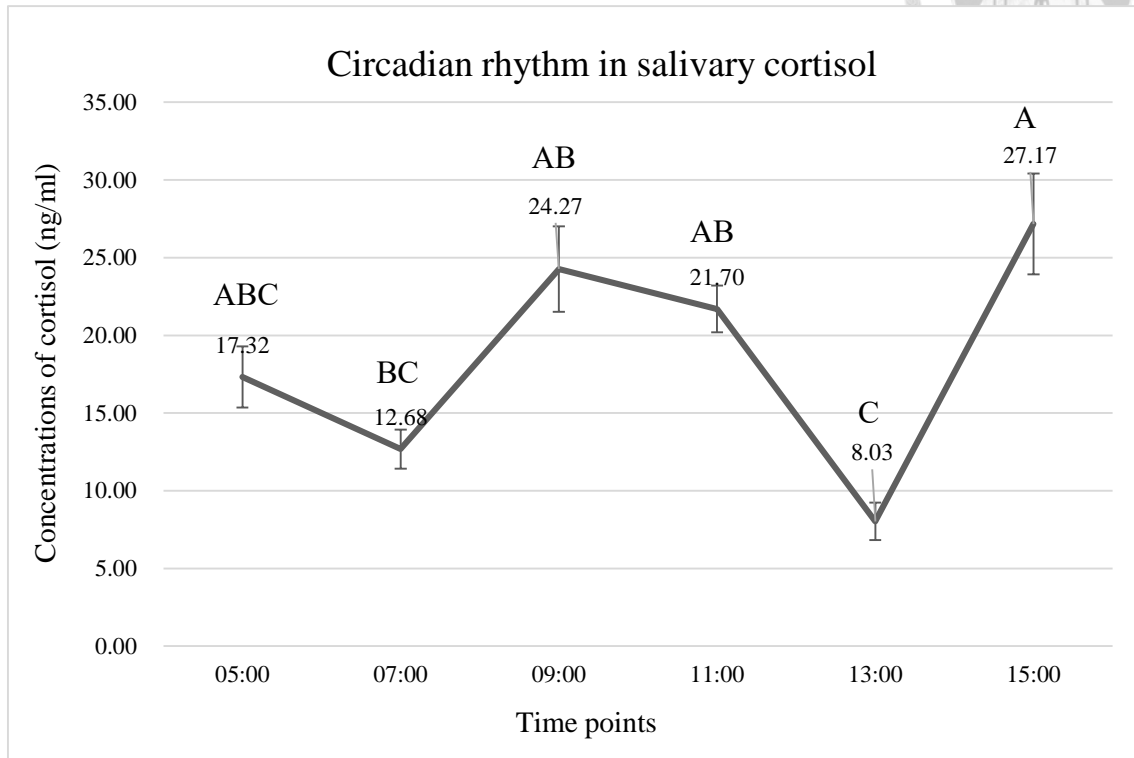


圖 8. 豬隻唾液皮質醇之日夜節律 (N=8)，以平均濃度 (Mean ± S.E.M) 表示。經過 AVONA 變方分析出有顯著差異，再進行鄧肯 (Duncan) 兩兩比較，不同字母表示兩者之間有顯著差異 (P < 0.05)。結果顯示 05:00、09:00、11:00、15:00 間無顯著差異，05:00、07:00、13:00 間無顯著差異，05:00、07:00、09:00、11:00 間無顯著差異，而 09:00、11:00、15:00 比 13:00 顯著較高，15:00 比 07:00 顯著較高。

Fig 8. Circadian rhythm in salivary cortisol of swine (N=8), expressed as average concentration (Mean ± S.E.M). There is a significant difference between time points after ANOVA F-test, which is compared with each other by Duncan multiple comparison. Result shows that there is no significant difference between 05:00, 09:00, 11:00 and 15:00. There is no significant difference between 05:00, 07:00 and 13:00. There is no significant difference between 05:00、07:00、09:00、11:00. However, concentrations of cortisol in 09:00, 11:00 and 15:00 are significantly higher than 13:00, and concentration of cortisol in 15:00 is significantly higher than 07:00.

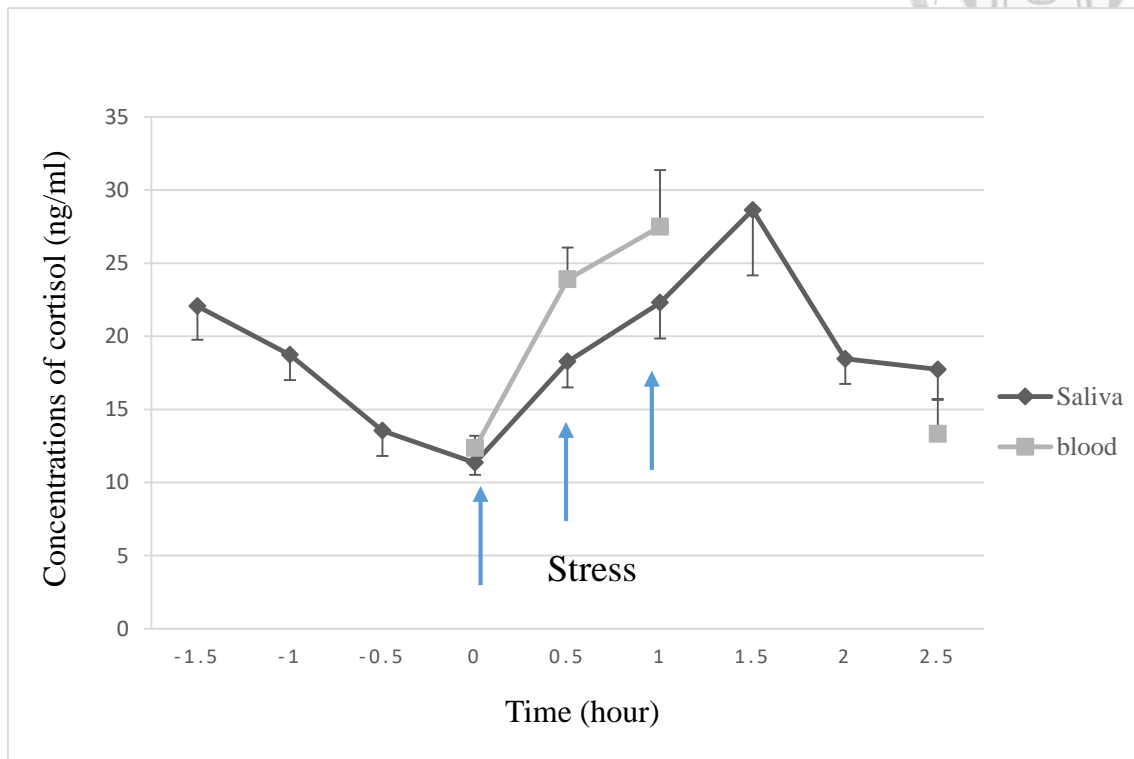


圖 9. 緊迫試驗中各時間點（每點間隔 0.5 小時），豬隻唾液（◆）與血清（□）的皮質醇平均濃度（Mean ± S.E.M）（N=7）。緊迫在試驗時間點 4、5、6 點施加，可看到唾液同血清皮質醇濃度在 5、6 點有上升的趨勢，唾液皮質醇在第 7 點達到高峰，而血清皮質醇在第 9 點回到第 4 點的水平。然而統計上，不同點的血清與唾液皮質醇之間沒有顯著差異。

Fig 9. Average concentrations (Mean ± S.E.M) of porcine salivary (◆) and serum (□) cortisol in each experiment points (0.5 hour interval between each points) (N=7). Stress is induced at points 4, 5 and 6; the concentrations of salivary and serum cortisol tend to increase at points 5 and 6. The peak of salivary cortisol is at point 7 and at point 9 serum cortisol returns to the level of point 4. However, there is no statistically significant difference in salivary and serum cortisol between each experiment points

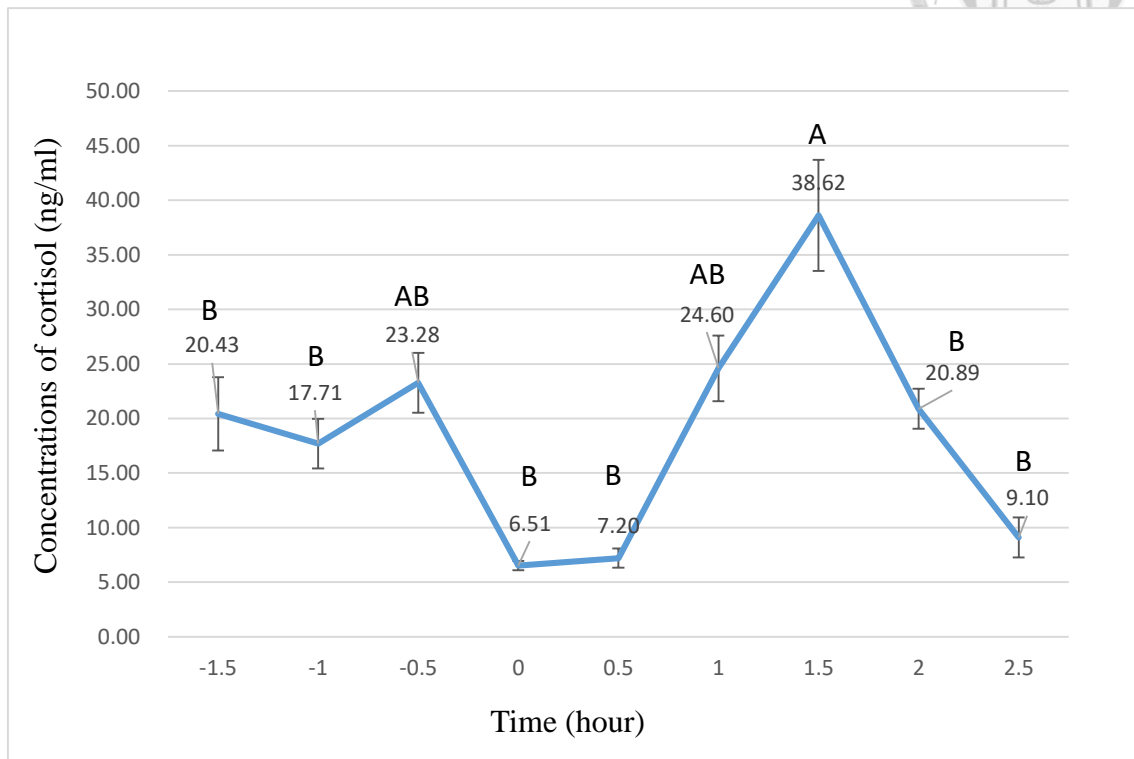


圖 10. 四隻表現相近的豬隻 (No.2、No.3、No.4 與 No.7, N=4) 在緊迫試驗中各時間點 (每點間隔 0.5 小時) 的平均唾液皮質醇濃度 (Mean  $\pm$  S.E.M)。ANOVA 變方分析有顯著差異, 經過鄧肯 (Duncan) 檢定進行兩兩比較, 不同字母表示兩者之間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。結果顯示緊迫施加後, 唾液皮質醇高峰出現在第七點。

Fig 10. Average concentrations (Mean  $\pm$  S.E.M) of salivary cortisol in each experiment points (0.5 hour interval between each points) from pigs with similar performance (No.2, No.3, No.4 and No.7, N=4). ANOVA F-test shows significant difference, and after Duncan multiple comparison, there is significant difference between different letters. Result showed the peak of salivary cortisol is at point 7.



## 4.2 運輸緊迫源與腎上腺皮質醇之關聯

豬隻運輸過程中緊迫源與唾液腎上腺皮質醇的關聯為本研究之主軸，在運輸過程中的三個時間點進行唾液採集，第一點於驅趕前，第二點於驅趕後，第三點於運輸後，將各點間的皮質醇差異定義為緊迫，並探討其與緊迫源之間的關聯。

簡述採集唾液與 ELISA 測定的結果。本研究從 25 趟豬隻運輸過程中採集到 29 隻豬在驅趕前、驅趕後與運輸後的唾液樣本，經過酵素免疫分析法測定後，其腎上腺皮質醇含量，與來自的豬場、車次和運輸日期如表 4 所示。表 4 中有些許的採集點沒有腎上腺皮質醇的數值，部分是因為在運輸過程中採集不易，當豬隻經過運輸後有暈眩、不適與嘔吐之情形時，會大幅減低豬隻咀嚼採集棉條之意願，較難成功採集到唾液。另外，當唾液被豬隻糞便、尿液或嘔吐物污染時，糞尿中的皮質醇代謝物與嘔吐物中的食物殘渣與雜質，有可能影響本實驗室的 ELISA 系統中標幟抗原與樣本抗原對抗體結合位的競爭，導致唾液中皮質醇濃度無法被 ELISA 系統檢測（濃度超出檢測範圍）。表 5 則顯示每趟豬隻運輸的各項緊迫源，包括驅趕時間、運輸時間、電棒使用頻率與豬隻承載密度等各項緊迫源，如表 5 所示驅趕時間的範圍介於 2 到 19 分鐘，運輸時間的範圍介於 22 到 138 分鐘，電棒使用頻率的範圍介於 3.40 到 13.60 次每分鐘，豬隻承載密度的範圍介於 282.16 到 377.84 公斤每平方公尺，且礙於運輸過程中紀錄不易及人手不足，部分運輸的緊迫源紀錄有缺失。

豬隻在運輸過程中三個採集點皮質醇變化如圖 11 所示，在第一採集點總共採集到 28 隻豬的唾液，其皮質醇平均含量（Mean  $\pm$  S.E.M）為  $26.18 \pm 3.62$  ng/ml，在第二採集點則採集到 29 隻豬的唾液，其皮質醇平均含量為  $28.80 \pm 4.52$  ng/ml，而在第三採集點僅採集到 15 隻豬的唾液，其皮質醇平均含量為  $33.82 \pm 4.55$  ng/ml。根據變方分析的結果，唾液皮質醇含量在三採集點之間無顯著差異，顯示豬隻在經過驅趕與運輸過程後，其唾液中皮質醇含量沒有顯著的變化。然而，本研究為調查台灣豬隻運輸現況，每趟驅趕與運輸的條件、豬隻來自的豬場與豬隻自身的狀態皆



不盡相同，因此豬隻感受到的緊迫程度便有可能不一樣，故在本研究有限的樣本數下，即使三個採集點之間的唾液皮質醇含量沒有顯著差異，亦無法證實驅趕與運輸過程不會對豬隻造成緊迫。

而不同豬場可能造成的影響，本研究嘗試以統計方式找出。依豬場（大響一、大響二、四林畜殖場與四林繁殖場）將豬隻分組後，再各自針對組內三個採集點的唾液皮質醇含量進行變方分析，試圖消彌豬場的影響。結果發現，無論豬隻來自哪個豬場，豬隻三個採集點的皮質醇含量之間皆無顯著差。更藉由區集（Block）的統計模式（RCBD）對豬場的影響進行分析，結果發現豬場的異同對唾液皮質醇含量沒有顯著影響（ $P=0.14$ ）。（進行討論）

承上，在本次研究範圍中，豬場對豬隻在運輸過程中腎上腺皮質醇含量的多寡沒有顯著差異，會造成豬隻在運輸過程中有不同緊迫反應的因素僅剩下相異的運輸條件，即不同的緊迫源數值，此部分將於下一小節以簡單直線迴歸、多元複迴歸與非線性迴歸等方式說明。

#### 4.2.1 驅趕緊迫

驅趕緊迫即為豬隻於第二點（驅趕後）的唾液皮質醇含量減去第一點（驅趕前）的唾液皮質醇含量，與驅趕時間、豬隻承載密度和電棒使用頻率之間可能存在關聯。

##### i. 驅趕時間

本研究所紀錄的驅趕時間介於 2 到 19 分鐘，與驅趕緊迫之間的簡單值線迴歸如圖 12 所示，兩者的關聯可以  $Y = -0.391x + 7.6079$  表示，即當驅趕時間增加每 1 分鐘，驅趕緊迫會下降 0.391 ng/ml 的皮質醇含量。此迴歸的決定係數（coefficient of determination,  $R^2$ ）僅為 0.0068，說明此迴歸數學式對驅趕緊迫之變異量的解釋力很低，以驅趕時間的多寡無法解釋與預期驅趕緊迫的變化。P-value 為 0.6760，





即此迴歸模型在統計上不被接受而無法被證明其存在。綜上所述，驅趕時間的變動與豬隻唾液中皮質醇在驅趕過程前後的變化不具關聯性。

#### ii. 豬隻承載密度

本研究所紀錄豬隻承載密度介於 282.16 到 377.84 Kg/m<sup>2</sup>，與驅趕緊迫之間的簡單直線迴歸如圖 13 所示，兩者的關聯可以  $Y=0.1323x-38.581$  表示，即當豬隻承載密度增加每 1 Kg/m<sup>2</sup>，驅趕緊迫會增加 0.1323 ng/ml 的皮質醇含量。而此迴歸式的 R<sup>2</sup> 值為 0.0167、P-value 為 0.5294，說明豬隻承載密度的變動不具備解釋豬隻唾液中皮質醇在驅趕過程前後變化的能力，兩者間沒有關聯。另外，依台灣法規的規範將豬隻承載密度分為超過 315 Kg/m<sup>2</sup> 與低於 315 Kg/m<sup>2</sup> 兩組，其驅趕緊迫平均值 (Mean±S.E.M) 分別為 6.77±3.49 ng/ml、0.275±1.95 ng/ml，使用 Student t-test 進行分析，發現兩組之間沒有顯著差異 (P = 0.21)，表示當豬隻承載密度超過現行法規的限制時，在驅趕過程中豬隻唾液中的皮質醇含量不會有顯著的變化。

#### iii. 電棒使用頻率

本研究所紀錄電棒使用頻率介於 3.40 到 13.60 次每分鐘，與驅趕緊迫之間的簡單直線迴歸結果如圖 14 所示，兩者的關聯可以  $Y=0.1867x+1.8178$  表示，即當電棒使用頻率增加每分鐘增加 1 次，驅趕緊迫會增加 0.1867 ng/ml 的皮質醇含量。R<sup>2</sup> 值為 0.0005、P-value 為 0.9184，說明豬隻唾液中皮質醇在驅趕過程前後的變化，不會因為電棒使用頻率的增減而改變，兩者間沒有關聯。

#### iv. 複迴歸分析

利用複迴歸分析，可以同時檢視驅趕時間、豬隻承載密度與電棒使用頻率等變因與驅趕緊迫之間的關聯，在固定其他變因下找出各個變因對於驅趕緊迫的解釋能力。向前選取法的結果僅有驅趕時間與豬隻承載密度被納入複迴歸模型，解釋力

低且不顯著 ( $R^2 = 0.0775$ 、 $P = 0.5918$ )，而使用向後選取法與逐步選取法的結果為三個變因皆無法納入複迴歸模型中，顯示在驅趕時間、豬隻承載密度與電棒使用頻率等變因皆提供解釋力的情況下，仍無法有效地解釋驅趕緊迫的變化，再次說明此三變因與驅趕緊迫之間可能不存在關聯性。

#### 4.2.2 運輸緊迫

運輸緊迫即為豬隻於第三點（運輸後）的唾液皮質醇含量減去第二點（驅趕後，運輸前）的唾液皮質醇含量，與運輸時間、豬隻承載密度與驅趕壓力之間可能存在關聯。

##### i. 運輸時間

本研究所紀錄運輸時間介於 22 至 138 分鐘，與運輸緊迫之間的簡單直線迴歸結果如圖 15 所示，兩者的關聯可以  $Y = -0.1588x + 12.318$  表示，即當運輸時間每增加 1 分鐘，運輸緊迫會減少 0.1588 ng/ml 的皮質醇含量。 $R^2$  值為 0.0274、P-value 為 0.552，說明運輸過程的時間長短無法解釋豬隻唾液中皮質醇在運輸前後的變化，兩者間沒有關聯。

然而仔細觀察圖 15 後，可發現當運輸時間為 60 分鐘時，運輸緊迫最小，而當運輸時間低於或高於 60 分鐘時，運輸緊迫有上升的情形。這顯示了兩者間似乎有非線性的趨勢。以 SAS EG 進行非線性迴歸分析，發現在  $Y = a + b*x**c$  的數學模型下可以收斂 (Convergence)，但卻不顯著 ( $P = 0.6$ )，無法證實運輸時間與運輸緊迫之間有非線性關聯的存在。此外，參考 Sutherland *et al.* (2009) 的調查，將運輸時間分段後與運輸緊迫進行簡單迴歸分析，發現當運輸時間介於 35 至 70 分鐘時，運輸時間與運輸緊迫之間有顯著的直線關係 ( $R^2 = 0.5699$ 、 $P < 0.05$ ) 如圖 16 所示，兩者的關係可以  $Y = -3.0219x + 140.45$  表示，即在 35 至 70 分鐘的範圍內，運輸時間的變化可以解釋與預測腎上腺皮質醇含量的變化，每增加 1 分鐘，運輸緊迫會



減少 3.0219 ng/ml 的皮質醇含量。而其他時間段落（20 至 35 分鐘、70 至 140 分鐘）的簡單迴歸分析皆無顯著結果。

### ii. 豬隻承載密度

本研究所紀錄豬隻承載密度介於 282.16 到 377.84 Kg/m<sup>2</sup>，與運輸緊迫之間的簡單直線迴歸結果如圖 17 所示，兩者的關聯可以  $Y = -0.444x + 147.99$  表示，即當豬隻承載密度每增加 1 Kg/m<sup>2</sup>，運輸緊迫會減少 0.444 ng/ml 的皮質醇含量。R<sup>2</sup> 值為 0.1021、P-value 為 0.2456，說明豬隻承載密度的多寡無法解釋豬隻唾液中皮質醇在運輸前後的變化，兩者之間可能沒有關聯。

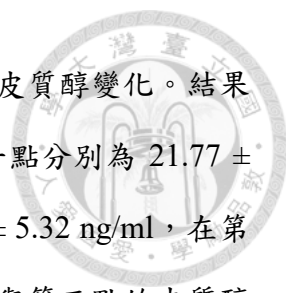
參考台灣法規的規範將豬隻承載密度分為超過 315 Kg/m<sup>2</sup> 與低於 315 Kg/m<sup>2</sup> 兩組，其運輸緊迫平均值 (Mean ± S.E.M) 分別為  $-2.09 \pm 6.75$  ng/ml、 $7.81 \pm 5.44$  ng/ml，使用 Student t-test 進行分析，發現兩組之間沒有顯著差異 (P=0.30)，說明當豬隻承載密度超過現行法規的規範時，運輸過程中的豬隻唾液中腎上腺皮質醇不會因此有顯著的變化。

### iii. 驅趕緊迫

驅趕被認為是整趟運輸過程中，動物經歷最多緊迫的階段。在車體上運輸時，動物必須在已感受到驅趕緊迫的狀態下面臨新的環境與緊迫源挑戰。因此驅趕緊迫的多寡可能對動物後續的運輸緊迫有所影響，故本研究探討兩者之關聯性。

驅趕緊迫與運輸緊迫之間的關聯如圖 18 所示，可以  $Y = -0.9473x + 9.2947$  表示，即當動物經歷的驅趕緊迫每增加 1 ng/ml，運輸緊迫會減少 0.9473 ng/ml 的皮質醇含量。R<sup>2</sup> 值為 0.3968、P-value 為 0.0161，說明驅趕緊迫與運輸緊迫確實存在的線性關聯，並且能以此關聯解釋運輸緊迫的變化。

此關聯所描繪的現象是，當驅趕緊迫越大，運輸緊迫越小；反之，當驅趕緊迫越小時，運輸緊迫越大。因此，將豬隻分為驅趕緊迫較小（低於 0 ng/ml）與驅趕



緊迫較大（高於 0 ng/ml）兩組，探討兩組豬隻於三個採集點的皮質醇變化。結果如圖 19 所示，兩組的皮質醇平均濃度（Mean  $\pm$  S.E.M）在第一點分別為 21.77  $\pm$  3.15、25.90  $\pm$  4.00 ng/ml，在第二點分別為 16.44  $\pm$  2.50、51.08  $\pm$  5.32 ng/ml，在第三點分別為 30.97  $\pm$  2.45、30.48  $\pm$  2.62 ng/ml，可見到兩組第一點與第三點的皮質醇濃度接近（Student t-test 沒有顯著差異），而第二點的皮質醇濃度有顯著差異（ $P < 0.01$ ）。這顯示在一趟運輸過程中，最大的變異可能出現在驅趕的階段。

然而，比較兩組組內三點的皮質醇濃度，發現皆沒有顯著差異，即不論驅趕緊迫較高或較低的組別，在統計上，豬隻經過驅趕、經過運輸後的唾液皮質醇含量與豬隻驅趕前的皮質醇水平相同，顯示驅趕與運輸對皮質醇的影響力有限。然而，驅趕緊迫較高的組別，其 ANOVA F-test 的結果接近顯著（ $P = 0.09$ ），說明在驅趕緊迫較高組別的三點皮質醇含量比較中，其實有可能存在著差異。

#### iv. 複迴歸分析

以向前選取法、向後選取法與逐步選取法對運輸緊迫與其變因（豬隻承載密度、運輸時間、驅趕緊迫）進行複迴歸分析。向後選取法與逐步選取法的結果皆僅有驅趕緊迫進入複迴歸模型，且有顯著水準（ $R^2$  值為 0.3968、 $P$ -value 為 0.0158）。而向前選取法按照解釋力大小逐漸將變因輸入模型中，首先輸入驅趕緊迫， $R^2$  值為 0.3968、 $P$ -value 為 0.0158，再輸入豬隻承載密度， $R^2$  值為 0.4426、 $P$ -value 為 0.0402，最後輸入運輸時間， $R^2$  值為 0.4808、 $P$ -value 為 0.0768。這表示驅趕緊迫的解釋力最大且顯著，隨著輸入其他變因，解釋力雖小幅提升，但  $P$ -value 卻下降。這表示其他變因貢獻的變異量比貢獻的解釋力多，且各變因的相關係數檢定，在向前選曲法的各步驟中，亦只有驅趕密度一直維持顯著（ $P < 0.05$ ）。

三種複迴歸的結果再次說明，在本研究所使用的變因中，可能僅有驅趕緊迫對於運輸緊迫具有顯著的解釋與預測能力。而豬隻承載密度及運輸時間與運輸緊迫之間沒有關聯性。



### 4.2.3 總緊迫

總緊迫即為豬隻於第三點的唾液皮質醇含量減去第一點的唾液皮質醇含量，其生理意義為豬隻在整趟運輸過程（驅趕與運輸）前後的唾液腎上腺皮質醇變化，亦可視為豬隻遭遇所有緊迫（驅趕緊迫與運輸緊迫）後的皮質醇變化。本研究探討總時間（驅趕時間與運輸時間）與總緊迫的關聯，其簡單直線迴歸如圖 20 所示，可以  $Y = -0.2126x + 22.307$  表示，即當總時間每增加 1 分鐘，總緊迫會減少 0.2126 ng/ml 的皮質醇含量。此迴歸式的  $R^2$  為 0.1096、P-value 為 0.2476，說明此兩者之間的關聯解釋力低且不顯著。

以非線性迴歸探討總緊迫與總時間的關聯，結果為一個符合收斂原則的數學式  $Y = a * x ** b$ ，P-value 為 0.2，在統計上不能證實兩者之間有非線性關係之存在。而經由資料轉換，將總緊迫重新定義為第三點皮質醇含量與第一點皮質醇含量的比值（即為經過驅趕、運輸後，皮質醇增減的比例），其與總時間的散佈圖如圖 21。兩者非線性迴歸分析的結果為一個符合收斂原則的數學式  $Y = a + b * x ** c$ ，且 P-value 為 0.08 接近顯著水準，說明非線性的關聯可能存在總時間與以比值表現的總緊迫之間。

表 4. 豬隻在運輸過程中三個採集點的唾液皮質醇濃度

Table 4. Concentrations of salivary cortisol during transportation in swine

No.	Date	Trip.	Farm	Sampling point 1	Sampling point 2	Sampling point 3
				Cortisol level (ng/ml)		
1	7/18	1	A	57.69	79.29	31.34
2	7/18	2	D	25.93	23.15	20.14
3	7/19	3	B	19.17	7.01	35.82
4	7/19	4	A	18.09	16.35	#
5	7/19	5	E	9.68	19.89	#
6	7/21	6	E	13.32	46.18	#
7	7/24	7	D	34.46	14.00	#
8	7/24	7	D	68.29	15.15	#
9	7/24	8	D	65.13	93.34	27.45
10	7/24	9	C	29.85	12.96	#
11	7/25	10	B	5.18	6.26	#
12	7/27	11	D	20.74	37.80	16.74
13	7/30	12	A	13.35	23.58	13.77
14	7/30	13	D	27.32	24.62	42.40
15	8/1	14	B	4.65	7.85	#
16	8/1	14	B	31.00	8.60	#
17	8/1	15	B	17.53	85.85	39.76
18	8/1	16	C	27.67	46.49	#
19	8/5	17	C	#	9.80	78.05
20	8/6	18	C	6.50	41.70	31.43
21	8/6	18	C	46.65	33.35	28.11
22	8/6	19	C	6.58	21.83	60.57
23	8/7	20	C	63.26	57.38	#
24	8/7	20	C	32.19	15.91	#
25	8/7	21	A	16.87	12.13	#
26	8/8	22	B	3.63	2.88	44.48
27	8/8	23	C	40.73	38.90	#
28	8/9	24	B	7.92	7.60	14.88
29	8/9	25	D	19.71	25.23	22.36

- 以#符號表示受到汙染而無法測定的唾液樣本
- 採集點一在驅趕前採集，採集點二在驅趕後採集，採集點三在運輸後採集
- # indicates the sample that is unable to measure due to contamination
- Sampling point 1 was before loading; point 2 was after loading; point 3 was after transport

表 5. 豬隻運輸時每趟旅程之條件

Table 5. Condition of each trip of transportation in swine

No.	Date	Trip.	Farm	Loading Time (min)	Transport Time (min)	Total time (min)	Use of electric sticks (times/min)	Loading density (Kg/m <sup>2</sup> )
1	7/18	1	A	12	134	146	#	306.49
2	7/18	2	D	12	50	62	#	337.30
3	7/19	3	B	10	110	120	#	308.00
4	7/19	4	A	10	#	#	#	303.78
5	7/19	5	E	10	#	#	#	305.00
6	7/21	6	E	14	#	#	6.31	344.86
7	7/24	7	D	17	#	#	4.78	341.08
8	7/24	7	D	17	#	#	4.78	341.08
9	7/24	8	D	19	64	83	5.06	377.84
10	7/24	9	C	14	#	#	8.60	#
11	7/25	10	B	16	#	#	8.60	308.65
12	7/27	11	D	17	22	39	8.20	375.67
13	7/30	12	A	11	86	97	3.40	282.16
14	7/30	13	D	2	26	28	11.50	312.43
15	8/1	14	B	17	#	#	4.65	310.81
16	8/1	14	B	17	#	#	4.65	310.81
17	8/1	15	B	9	60	69	9.89	331.35
18	8/1	16	C	7	#	#	4.00	321.62
19	8/5	17	C	#	35	#	#	#
20	8/6	18	C	9	38	47	8.89	315.14
21	8/6	18	C	9	38	47	8.89	316.75
22	8/6	19	C	7	38	45	#	316.75
23	8/7	20	C	5	#	#	13.60	316.75
24	8/7	20	C	5	#	#	13.60	316.75
25	8/7	21	A	5	#	#	12.40	302.16
26	8/8	22	B	6	47	53	#	358.92
27	8/8	23	C	6	#	#	#	#
28	8/9	24	B	9	138	147	#	332.97
29	8/9	25	D	17	39	56	#	325.16

- 以#符號表示豬隻運輸過程中因人為因素缺失的條件
- # indicates the missing data of condition of transportation due to human factors

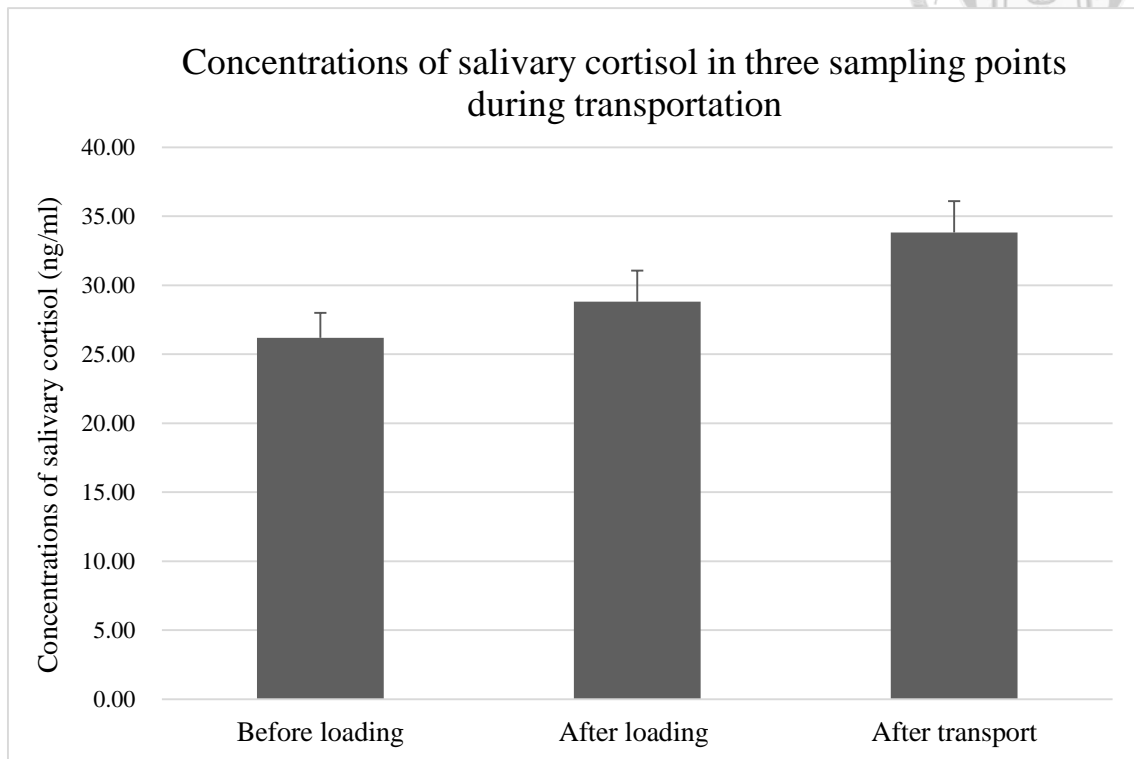


圖 11. 運輸中三個採集點之唾液皮質醇平均濃度 (Mean  $\pm$  S.E.M)，第一點之樣本數為 28，第二點之樣本數為 29，第三點之樣本數為 15。經過 ANOVA 變方分析後發現三者間沒有顯著差異，表示豬隻經過驅趕與運輸後，唾液皮質醇沒有顯著變化。

Fig 11. Average concentrations (Mean  $\pm$  S.E.M) of salivary cortisol in three sampling points during transportation. Sample size of sampling points 1, 2 and 3 is 28, 29 and 15, respectively. There is no significant difference between sampling points after ANOVA F-test, which indicates that porcine salivary cortisol do not change after loading or transport process.



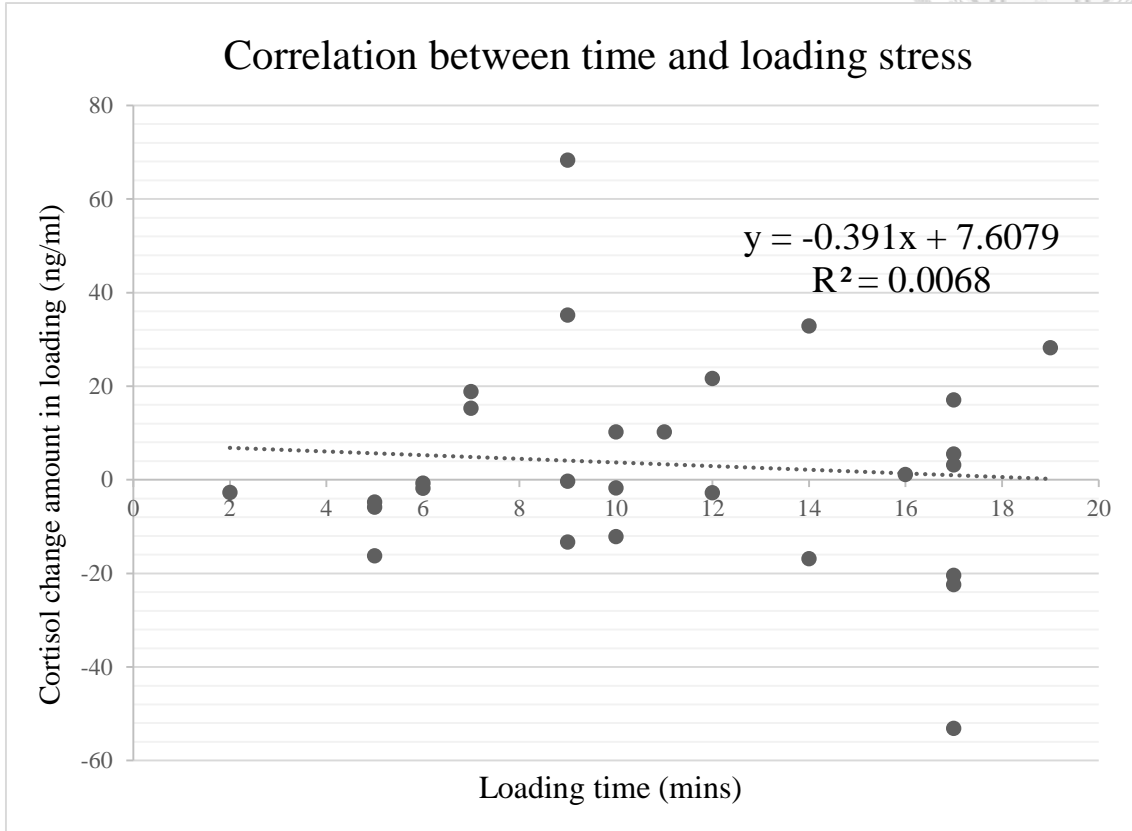


圖 12. 驅趕時間與驅趕緊迫之簡單直線迴歸圖 ( $R^2 = 0.0068$ 、 $P = 0.6760$ 、 $N = 28$ )。結果顯示驅趕時間與驅趕緊迫之間沒有關聯性。

Fig 12. Simple linear regression between loading time and loading stress ( $R^2 = 0.0068$ 、 $P = 0.6760$ 、 $N = 28$ )。Result indicates that there is no correlation between loading time and loading stress.

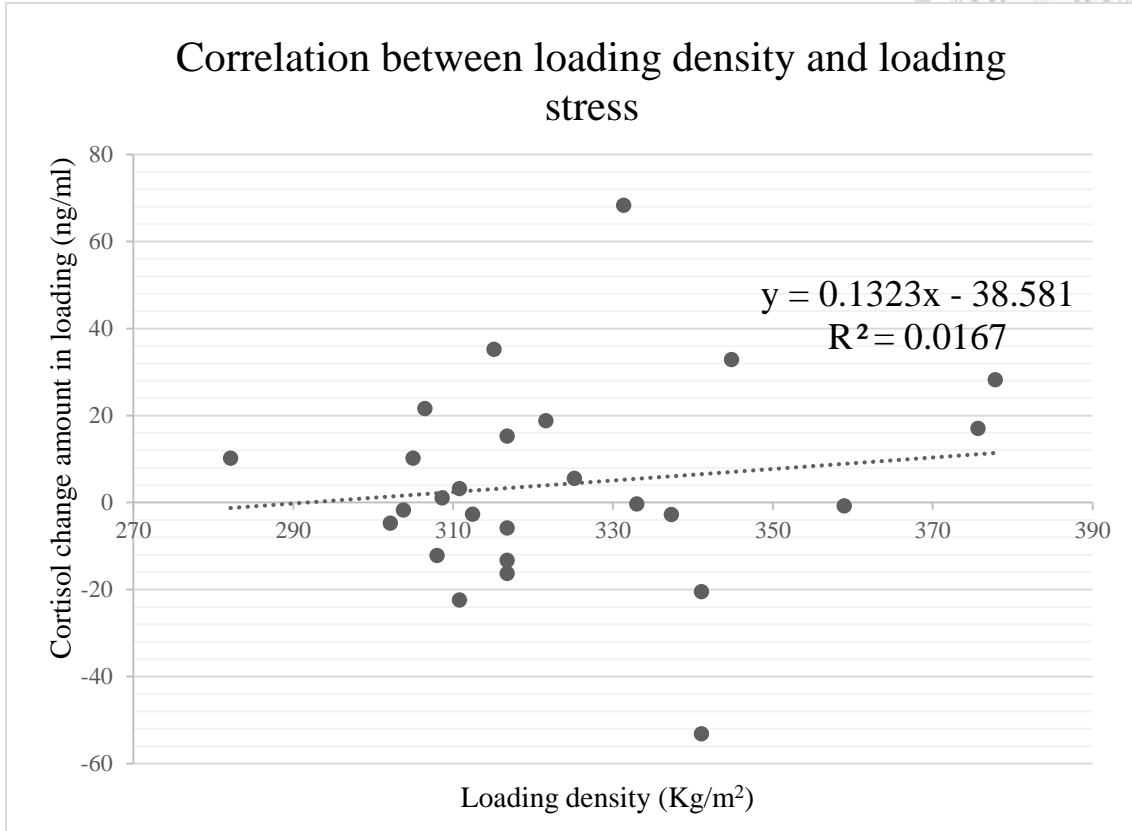


圖 13. 豬隻承載密度與驅趕緊迫之簡單直線迴歸圖 ( $R^2 = 0.0167$ 、 $P = 0.5294$ 、 $N = 26$ )。結果顯示豬隻承載密度與驅趕緊迫之間沒有關聯性。

Fig 13. Simple linear regression between loading density and loading stress ( $R^2 = 0.0167$ 、 $P = 0.5294$ 、 $N = 26$ )。Result indicates that there is no correlation between loading density and loading stress.

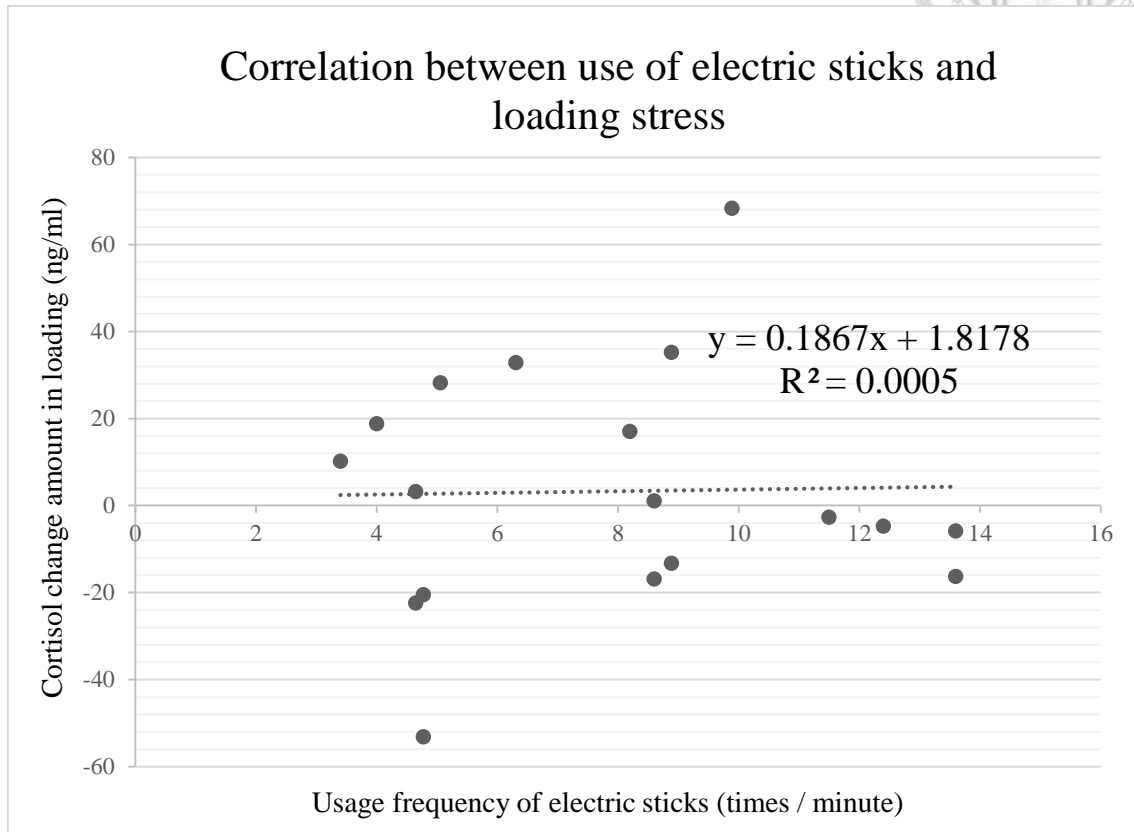


圖 14. 電棒使用頻率與驅趕緊迫之簡單直線迴歸圖 ( $R^2 = 0.0005$ 、 $P = 0.9184$ 、 $N = 18$ )。結果顯示電棒使用頻率與驅趕緊迫之間沒有關聯性。

Fig 14. Simple linear regression between the use of electric sticks and loading stress ( $R^2 = 0.0005$ 、 $P = 0.9184$ 、 $N = 18$ )。Result indicates that there is no correlation between the use of electric sticks and loading stress.

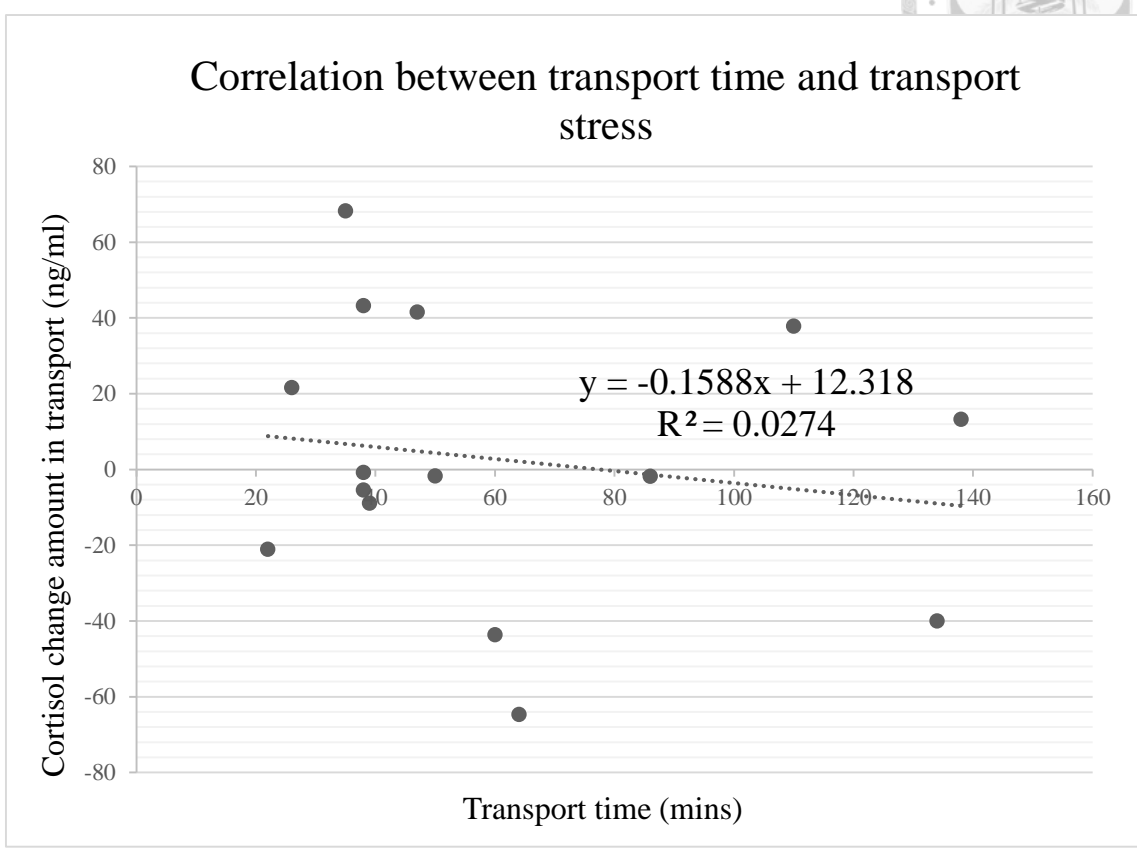


圖 15. 運輸時間與運輸緊迫之簡單直線迴歸圖 ( $R^2 = 0.0274$ 、 $P = 0.552$ 、 $N = 15$ )。結果顯示電棒使用頻率與驅趕緊迫之間沒有關聯性。

Fig 15. Simple linear regression between transport time and transport stress ( $R^2 = 0.0274$ 、 $P = 0.552$ 、 $N = 15$ )。Result indicates that there is no correlation between transport time and transport stress.

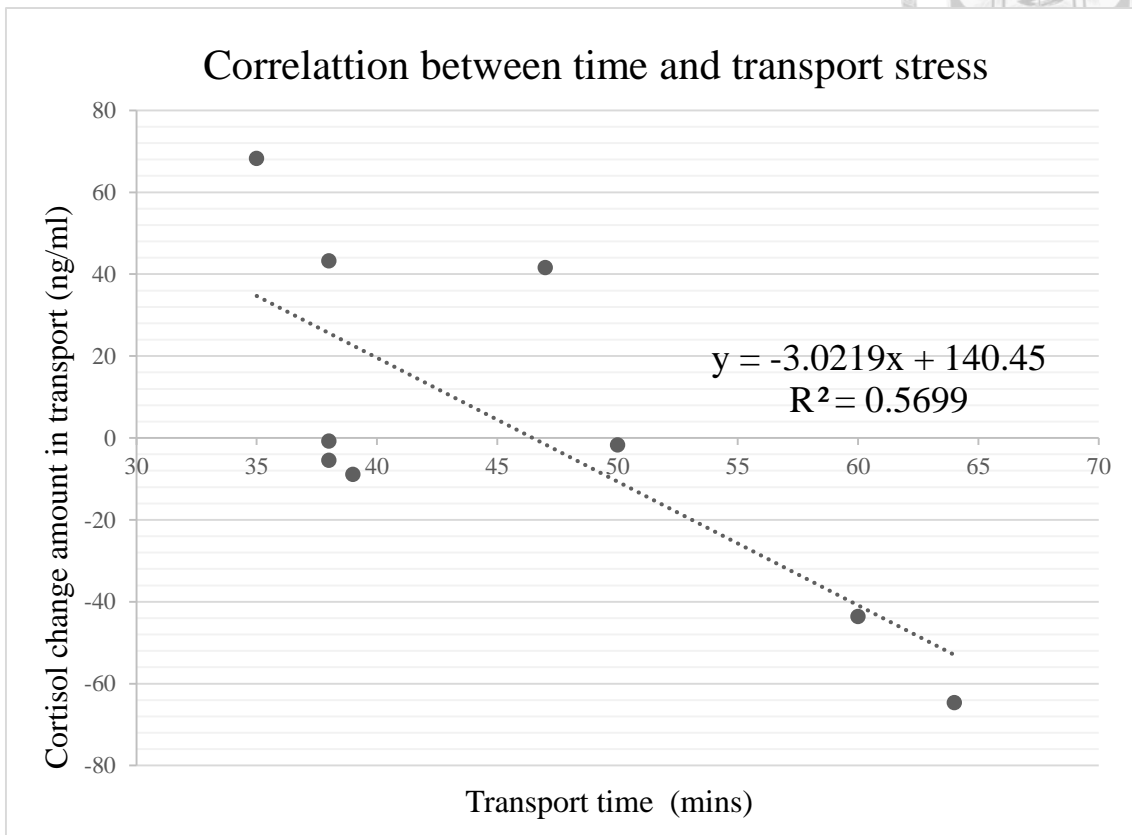


圖 16. 運輸時間介於 35 至 70 分鐘時，與運輸緊迫之簡單直線迴歸圖 ( $R^2 = 0.5699$ 、 $P = 0.0187$ 、 $N = 9$ )。結果顯示當時間介於 35 至 70 分鐘時，兩者之間存在著顯著的關聯。

Fig 16. Simple linear regression between transport time and transport stress ( $R^2 = 0.5699$ 、 $P = 0.0187$ 、 $N = 9$ )。Result indicates that there is a significant correlation between transport time and transport stress when transport time is from 35 to 70 minutes.

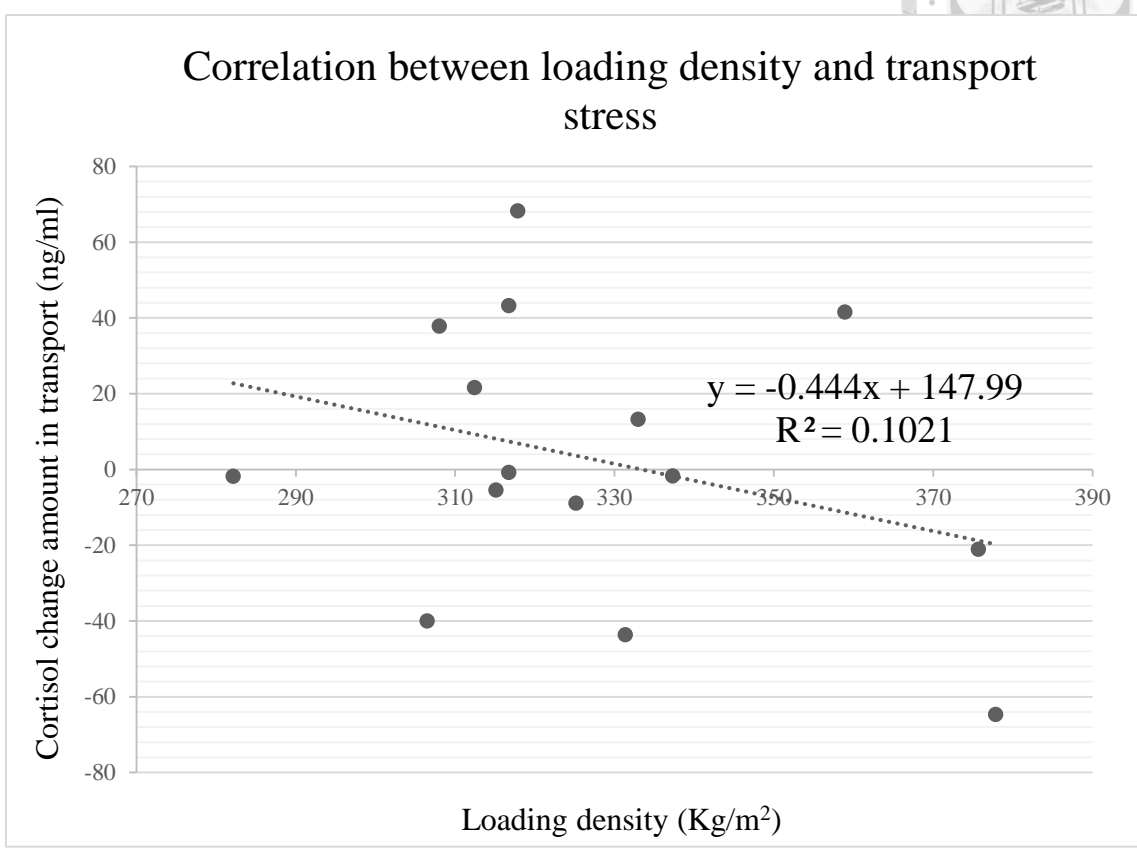


圖 17. 豬隻承載密度與運輸緊迫之簡單直線迴歸圖 ( $R^2 = 0.1021$ 、 $P = 0.2456$ 、 $N = 15$ )。結果顯示豬隻承載密度與運輸緊迫之間沒有顯著關聯。

Fig 17. Simple linear regression between loading density and transport stress ( $R^2 = 0.5699$ 、 $P = 0.0187$ 、 $N = 9$ )。Result indicates that there is no correlation between loading density and transport stress.

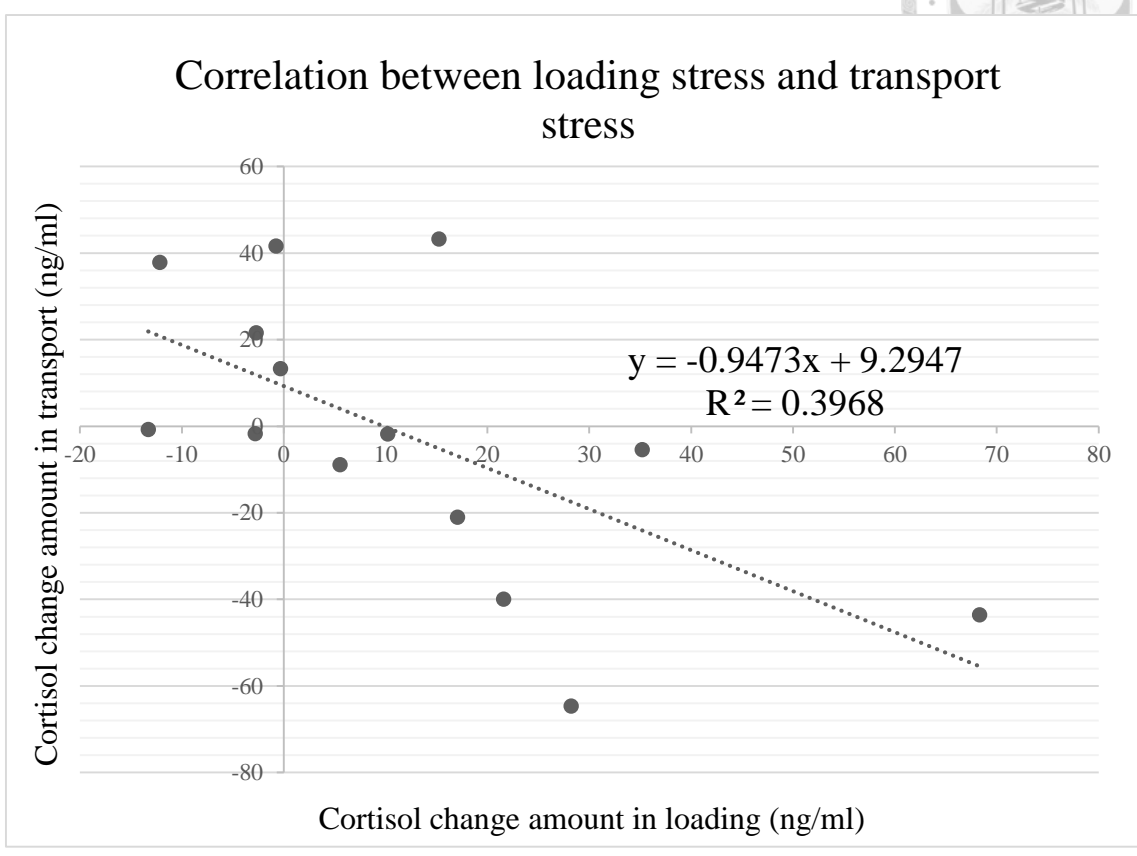


圖 18. 驅趕緊迫與運輸緊迫之簡單直線迴歸圖 ( $R^2 = 0.3968$ 、 $P = 0.0161$ 、 $N = 15$ )。結果顯示驅趕緊迫與運輸緊迫之間存在顯著關聯。

Fig 18. Simple linear regression between loading stress and transport stress ( $R^2 = 0.3968$ 、 $P = 0.0161$ 、 $N = 15$ )。Result indicates that there is a significant correlation between loading stress and transport stress.

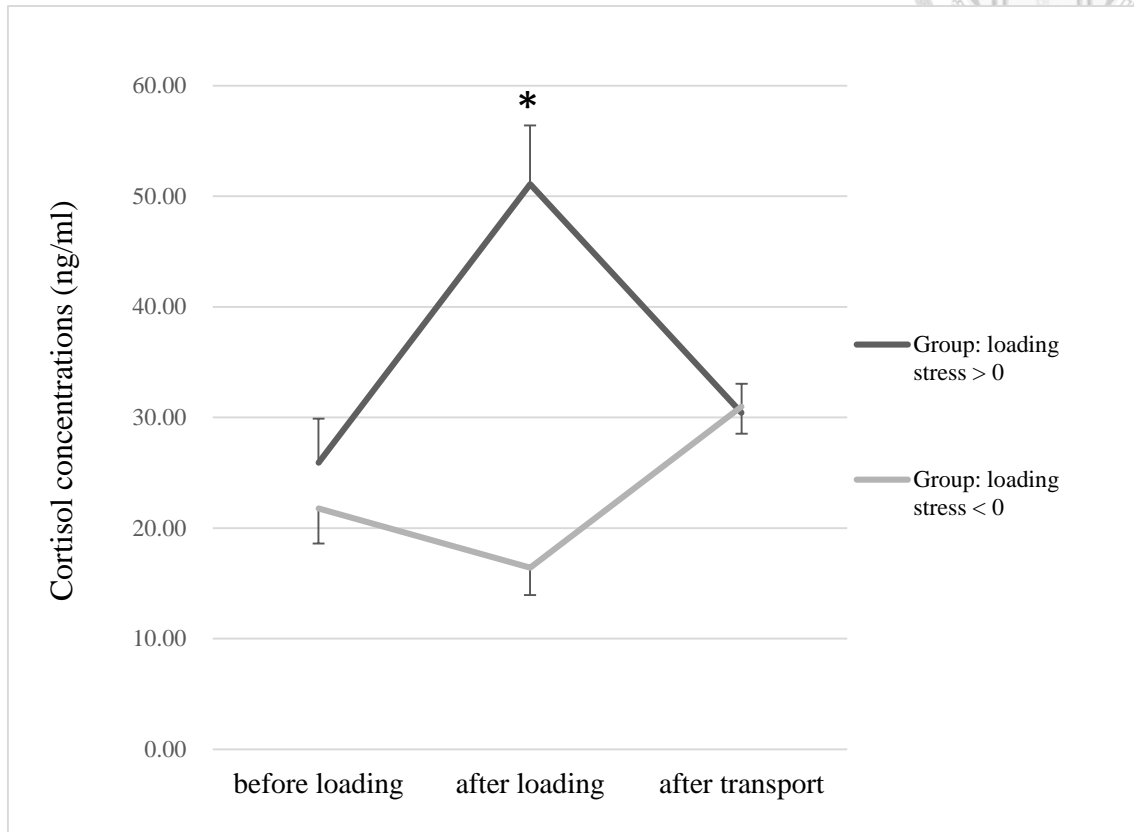


圖 19. 驅趕緊迫較低組與較高組，在運輸中三個採集點之平均唾液皮質醇濃度 (Mean  $\pm$  S.E.M)。比較兩組組內三點的皮質醇濃度，發現皆沒有顯著差異，然而驅趕之後的皮質醇濃度，兩組之間有顯著差異，\*  $P < 0.05$ 。

Fig 19. Concentrations of two group (lower or higher loading stress) in three sampling point during transportation. Result is that there is no significant difference between three sampling point within each group. However, there is a significant difference in concentration of cortisol sampled after loading between two groups.



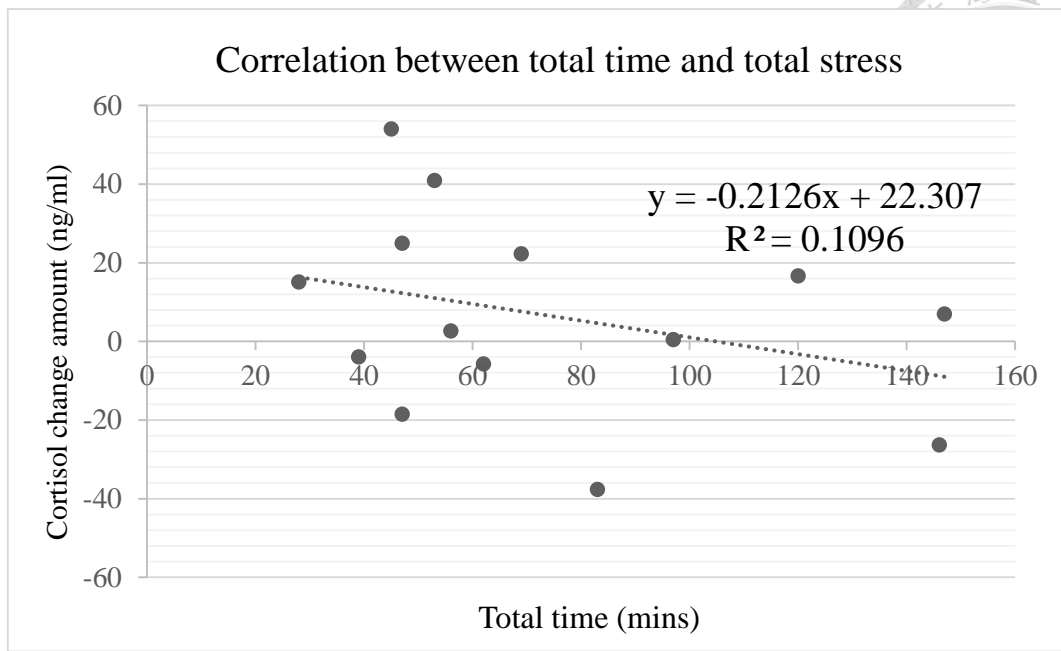


圖 20. 總運輸時間與總緊迫之間簡單直線迴歸圖 ( $R^2 = 0.1096$ 、 $P = 0.2476$ 、 $N = 14$ )。結果顯示總運輸時間與總緊迫之間沒有顯著關聯。

Fig 20. Simple linear regression between total transport time and transport stress ( $R^2 = 0.1096$ 、 $P = 0.2476$ 、 $N = 14$ )。Result indicates that there is no significant correlation between total transport time and transport stress.

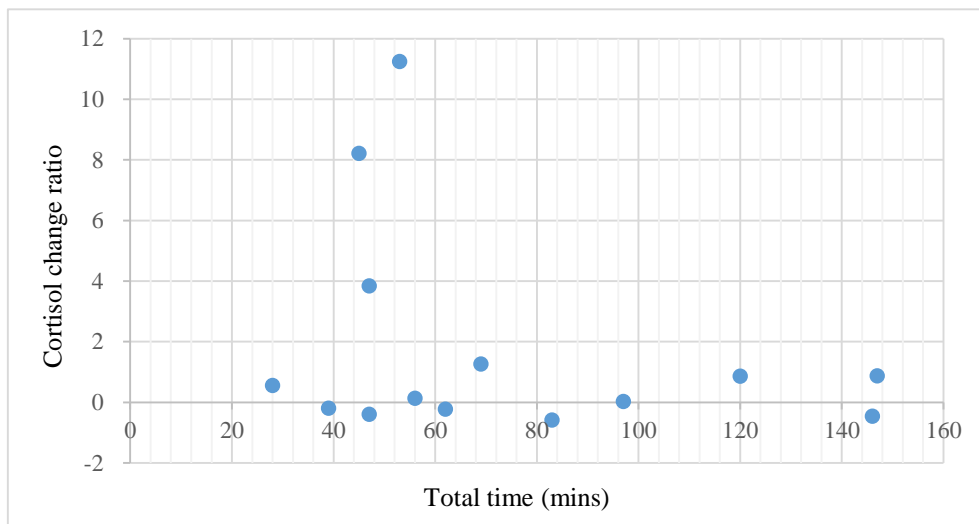


圖 21. 總運輸時間與以比值表現的總緊迫之散佈圖

Fig 21. Scatter plot between total stress and total transport time.



## 第五章 討論


### 5.1 研究限制

本研究以調查台灣豬隻運輸現況為主，在豬隻運輸過程中採集豬隻唾液，並以 ELISA 系統分析唾液中腎上腺皮質醇濃度，再與運輸過程中紀錄的緊迫源數值進行簡單直線回歸、多元複迴歸、非線性回歸的統計分析。然而，整個研究過程中有一些不可抗力的限制，會影響到研究結果的正確性。在此列出研究中可能的限制，並討論其如何影響研究之準確性。

#### 5.1.1 調查過程中人為因素


本研究以調查為主，會直接接觸到從事豬隻養殖與豬隻運輸的人員，以及肉品市場與屠宰場的工作人員。這些從業人員通常有時間壓力，必須盡快將豬隻送往目的地進行拍賣（必須在中午十二點前將豬隻送往肉品市場，肉品市場才能在下午進行拍賣）或屠宰（屠宰場亦有排程與時間期限）。因此在調查豬隻運輸時，須以不干擾各位從業人員的工作為前提，故在整個豬隻運輸過程中，僅有些許的時間可以採集豬隻唾液與紀錄緊迫源數值，不充足的操作時間便成為了本研究的一項限制。

時間的限制會影響採集唾液的成功率，因為採集豬隻唾液時需要將棉條放進豬隻口腔內，等待豬隻咀嚼一段時間後方能取出，無論是在繫留欄位或者車體上，豬隻都需要一段時間來適應採集人員的存在與操作，若時間不夠充分會減少成功採集到唾液的次數，特別車體上的唾液採集本身具有一定難度（需要在車體四周的欄杆上移動），且運輸過後的豬隻又特別虛弱，不願意咀嚼採集棉條，更增加了採集的難度與時間。當成功採集的次數減少，意味著統計模型的樣本數降低，影響了統計的準確性。



另外時間的限制也會對驅趕前後唾液採集之準確性產生影響。通常，運輸人員會等待豬隻於第一點（牧場繫留欄位，驅趕前）的唾液採集與標記（動物用色筆）完成後進行驅趕，當驅趕開始後便有時間的壓力，為避免耽誤運輸人員的時間，尚未等驅趕完成，筆者就在車邊等待被標記的豬隻被趕上車，進行第二次採樣。然而，每次驅趕的時間與過程都不一樣，不是每次驅趕被標記的豬隻都能在驅趕完成前成功採集到唾液。這使得每次第二點採集（牧場車體上，驅趕後）的時間點都不盡相同，有些豬隻在驅趕還沒完成，車體上還沒有很多豬隻存在時就採集到唾液，有些豬隻則在驅趕完成後，車體上滿是豬隻時才採集到唾液，兩種情況的豬隻所經歷的緊迫程度並非相同，後者的豬隻在車體上會經歷更多擠壓、堆疊與不適。簡言之，第二點的唾液檢體是預期豬隻經歷完整驅趕緊迫之後，再進行採集，但有部分的豬隻，礙於時間因素，在尚未經歷完整的驅趕緊迫前就先進行唾液採集，意味著部份豬隻的第二點唾液中皮質醇濃度，並不能反映豬隻經歷完整驅趕過程後的生理狀態。這影響了後續對於驅趕緊迫與運輸緊迫的分析，因為驅趕緊迫的定義為第二點與第一點的皮質醇濃度相減，而運輸緊迫的定義為第三點與第二點的皮質醇濃度相減，如果部分豬隻第二點唾液中皮質醇無法反映豬隻經歷完整驅趕後的狀態，那驅趕緊迫與運輸緊迫的意義就有待商榷，這也解釋了圖 19 中部份豬隻在經歷驅趕之後，其唾液中皮質醇沒有上升的現象，因為那些豬隻可能尚未經歷完整的驅趕緊迫，便已經採集其唾液檢體。

另外一項人為因為的限制，是這些豬隻為畜牧業者的財物。運輸人員最重要的工作，就是將豬隻安全地送往目的地，避免豬隻在運輸過程中死亡。畢竟運輸是充滿緊迫的過程，當被標記的豬隻出現一些狀況，如被其他豬隻堆疊而無法移動、發出低鳴或豬緊迫性綜合症的症狀（肌肉僵硬與皮膚發紺等），而被運輸人員認為豬隻有死亡之風險時，筆者基於對畜牧業者與運輸人員的尊重，和避免對該豬隻造成額外的緊迫而發生意外，會放棄對該豬隻進行唾液採樣，意外著採集的成功率與統計模型的樣本數降低，影響到調查結果的準確性。




承上，由於豬隻屬於業者的財物，無法使用侵入式的檢體如血液，因為有對豬隻造成傷害的疑慮。其他的緊迫指標在本次調查中亦不便使用，例如心率、心律變異率與體溫，前二者需要將儀器貼合在豬隻的皮膚並且固定，確保運輸過程中不會掉落，然而，運輸時車體上空間狹小，豬隻彼此之間的擠壓讓儀器無法固定在豬隻皮膚上，故在豬隻運輸過程中無法進行心率的偵測。而體溫的檢測則需要將小型儀器投入致豬隻的消化道中，藉以偵測豬隻體溫，並在屠宰時取出，但本研究僅調查至運輸結束，因此豬隻的體溫也不便收集。基於這些人為因素的限制，本研究調查過程中僅使用唾液腎上腺皮質醇作為緊迫指標，解釋豬隻生理狀態的能力有限。

#### 5.1.2 唾液腎上腺皮質醇做為緊迫指標的限制

使用唾液腎上腺皮質醇，作為緊迫指標有許多優點，包括非侵入性的檢體採集方式與即時性地反應生理狀態等，但同時也有一些缺點與限制需要注意，例如日夜節律的影響、在連續變動的腎上腺活動中僅能反映瞬間的數值、採集過程仍會對動物造成一些緊迫與唾液中皮質醇數值較低易受汙染等。

唾液中皮質醇僅能反映瞬間動物的生理狀態，而糞便中皮質醇卻可以提供一段時間內的腎上腺活動的資訊，但得要考慮豬隻排泄的頻率與糞便形成的耗時，本研究中所調查的運輸時間皆在三個小時內，小於豬隻糞便形成的時間。換言之，豬隻受到緊迫所分泌的皮質醇尚未形成糞便或排出，豬隻的運輸便已結束，故糞便在本研究中並非合適的緊迫指標。而且，藉由試驗設計中不同採集點的唾液皮質醇濃度相減，可計算出豬隻在驅趕與運輸後皮質醇的累積變化量，嘗試克服唾液皮質醇僅能反映動物體瞬間生理狀態的限制。而本次調查的基礎試驗，亦對豬隻唾液中腎上腺皮質醇之日夜節律進行探討，並以該結果對運輸過程中的豬隻唾液皮質醇濃度進行校正，並嘗試消除唾液皮質醇日夜節律的限制與影響。

然而在本研究中，唾液中皮質醇亦受汙染的限制造成較多影響。在豬隻運輸過程中，豬隻容易受到驚嚇而排泄，糞尿常常散佈在車體，經過豬隻擠壓與堆疊，糞




尿往往沾染在豬隻身上，而豬隻又常以口鼻探索未知環境，導致在採集唾液時豬隻口腔內有糞便或尿液存留，採集唾液時難免受到糞尿的汙染，干擾 ELISA 系統對皮質醇濃度的分析。雖然並非糞便與尿液中的皮質醇代謝物所會與標誌抗原競爭抗體結合位，但由於糞便與尿液中皮質醇代謝物含量為生物體於一段時間內的累積，其濃度遠高於唾液中皮質醇，意味著即使只有一點糞尿的汙染，也會影響 ELISA 系統的分析，使得在評估豬隻唾液中皮質醇濃度時多了一項變數。在採集過程中偶有豬隻口腔因為運輸時的擠壓與碰撞而出血，同樣地，血液的汙染亦有與糞尿相同的影響，對皮質醇含量的分析造成誤差，而且血液與糞尿中亦有其他固醇類內分泌素，其中孕酮 (Progesterone) 與其代謝物 17-羥孕酮 (17 $\alpha$ -OH Progesterone)，與 ELISA 系統中的抗體具有較高的交叉反應比率 (見附錄)，表示這些固醇類內分泌素會與標誌抗原競爭抗體結合位，影響唾液中皮質醇濃度的分析。綜上所述，在本研究中採集唾液的過程裡，豬隻唾液容易受到糞便、尿液與血液的汙染，其中的皮質醇、皮質醇代謝物與固醇類內分泌素會競爭 ELISA 系統中抗體之結合位，對於唾液中皮質醇的評估造成影響，有高估之疑慮。

另外，本研究為運輸現況的調查，在採集豬隻唾液之前，無法提前一段時間重複採集使豬隻習慣人員之存在與操作，故在採集唾液時有可能對豬隻造成額外的緊迫，進而增加豬隻 H-P-A 軸活動，影響唾液中腎上腺皮質醇濃度之分析與豬隻生理狀態之評估。

### 5.1.3 迴歸模型的限制

迴歸模型係藉由統計的運算，找出自變數與應變數 (應變數受到自變數的影響) 之間的關係。無論是簡單直線迴歸、多元複迴歸與非線性迴歸，都需要足夠的樣本數，與一定範圍的自變數 (過於集中的自變數有可能無法解釋應變數的變化)，方能找出自變數與應變數之間的關聯性。在本研究中，各項緊迫源為自變數，腎上腺皮質醇濃度為應變數，然而本研究是以短程運輸為主的現況調查，每趟運輸過程中



的條件變動幅度不大，緊迫源數值有可能不具有足夠範圍以查明自變數與應變數之間的關係，例如運輸時間不超過三個小時，無法探討長途運輸對腎上腺皮質醇濃度的影響，而豬隻承載密度的數值中，僅有一個低於 300 Kg/m<sup>2</sup>，無法探討低豬隻承載密度與腎上腺皮質醇濃度之間的關聯。

如先前小節所討論，運輸過程中有需多因素會影響唾液的採集，使得本次研究中的樣本數不夠充足，而足夠的樣本數可以降低迴歸模型中的誤差方均和（mean sum of square of error, MSE）進而增加迴歸模型達到顯著的機會。本次研究中許多不顯著的結果，有可能受到不充足樣本數的影響。而多元複迴歸模型會同時探討多項自變數對應變數的影響，每一項自變數都會消耗由樣本數所提供的自由度，對於樣本數的需求更為嚴苛，故本研究中多元複迴歸的結果，亦有因樣本數不足而無法精準解釋自變數與應變數之間關聯性的疑慮。

## 5.2 唾液採集裝置 Cortisol-Salivette®之回收率

若僅憑皮質醇溶液經過唾液採集裝置回收後測定的濃度與控制組比較，會認為此 Cortisol-Salivette®裝置收集後會有可能使溶液（或唾液）中皮質醇濃度上升。然而，經過採集裝置回收到以 ELISA 測定，中間有許多步驟，些許的誤差是可以被接受的。先前研究認為可接受的回收率為 80%至 120%（Abraham, 1975），本次試驗四個濃度（10、20、40 與 80 ng/ml）的回收率分別為 100%、109%、105%與 111%，皆在可接受範圍內，顯示 Cortisol-Salivette®在本次試驗中是可行的裝置，能針對含有皮質醇的溶液進行採集。

## 5.3 豬隻唾液皮質醇之日夜節律

豬隻唾液皮質醇存在著日夜節律，其含量隨著環境的更迭（光暗、溫度、溼度等）而變動，是身體整合各項刺激後所作的應對，目的在於協助生物在一天各時間點有最適的腎上腺反應。動物福利研究中若有使用皮質醇作為緊迫指標，皆應考量

皮質醇自身的日夜節律，方能不同時間點間有效地比較皮質醇含量。

本研究僅探討一天中六個時間點(05:00、07:00、09:00、11:00、13:00 與 15:00)的皮質醇節律，因為這段時間為本次研究之豬隻運輸進行的主要範圍，且豬隻為日行性動物，皮質醇濃度變化主要在白天而非整日。結果發現高峰在 09:00、11:00 與 15:00。一般認為，豬隻作為日行性動物，其皮質醇高峰會出現在醒覺前，也就是上午時段，且到下午時會迅速下降 (Eckel *et al.*, 1996; Désautés *et al.*, 1999; Hay *et al.*, 2000)。然而，上下午各有一高峰的現象 (Bigeminus pattern) 也在很多研究中被觀察到 (Ruis *et al.*, 1997; De Jong *et al.*, 2000; Geverink *et al.*, 2003; Hillmann *et al.*, 2008; Munsterhjelm *et al.*, 2009)。豬場的餵飼習慣，也許能為此相反之結果提供解釋。Koopmans *et al.* (2005) 的研究以 12 小時為間隔進行餵飼，待豬隻習慣後於每日 06:00 與 18:00 進行採樣，皆發現在餵飼前有皮質醇的高峰，這可能跟禁食時期能量代謝需要較強的糖質新生有關。Boumans *et al.* (2017) 的研究也說明了採食量與皮質醇分泌之日夜節律會彼此影響，皮質醇的高峰常出現在一天中採食量較低的時候，因此個體採食行為的差異會影響到皮質醇的日夜節律。本次試驗的豬場在早上 8 至 9 點、下午 4 至 5 點各有一次餵食，上下午各有一次皮質醇高峰的現象似乎可以被解釋。而且，唾液中皮質醇濃度在採食後上升，也有唾液被食物殘渣污染而導致分析誤差的可能。若能增加採樣時間點、採樣頭數與縮減採樣時間間隔，本試驗便可對於豬隻唾液皮質醇日夜節律進行更仔細的探討。

日夜節律亦可能受到其他變因如性別、年齡體重或長期緊迫的影響，Hillmann *et al.* (2008) 發現不同體重的豬隻，其日夜節律高峰落在不同時間；但 Ruis *et al.* (1997) 發現 3、4、5 與 6 月齡的豬隻，其日夜節律的高峰時段相近，僅 3 月齡時基礎值有較高的現象，同時還發現性別間的高峰時段亦沒有差異，唯公豬的基礎值顯著較高。長期緊迫的影響，會讓皮質醇日夜節律之高峰趨緩接近於基礎值，是檢測長期動物福利的一個指標 (Munsterhjelm *et al.*, 2009)。本次實驗沒有對這些變因進行固定，因此也可能是試驗誤差的來源。



#### 5.4 豬隻緊迫試驗

在圖 9 與圖 10 皆可看到 1、2、3、4 點的皮質醇平均含量，儘管沒有統計差異，但就平均量討論有下降的趨勢，原因可能為豬隻一開始接觸到操作人員液感受到緊迫，隨著幾次採集唾液，豬隻逐漸習慣而使皮質醇含量下降。同樣就皮質醇平均量討論，可從圖 7 看到豬隻第 4 點開始施加緊迫後，第 5 點的血清與唾液皮質醇平均濃度皆有上升的情形，說明若以每 30 分鐘為見隔進行採樣，唾液與血清皮質醇擁有類似的即時反應性，能快速反應腎上腺活動。血液的高峰值無法推測，因為沒有採集 7、8 點，然而唾液皮質醇高峰值在圖 9 或圖 10 皆在第 7 點，約緊迫結束後半小時，符合前人的研究結果 (Kirschbaum and Hellhammer, 2007)

本次緊迫測試說明唾液如同血液一般能即時地反應豬隻生理狀態，但結果中亦有幾點令人費解。在圖 10 中，第 5 點的皮質醇沒有受到緊迫刺激而上升，反而同第 4 點一樣維持在低水平含量。以鼻圈保定是公認嚴峻的緊迫源，為何沒有誘發豬隻緊迫反應引起皮質醇含量上升，可能的原因也許是操作過程中，操作人員以最短時間進行保定與採血，時間不足完整地刺激到豬隻 H-P-A 軸反應，豬隻意識到被保定是痛苦的但尚未引發完整的緊迫反應，緊迫就結束了，而第 6、7 點時皮質醇濃度可以上升，應該是豬隻不願意被保定，保定過程中變長，感受緊迫的時間增加。

另外一個令人不解的是唾液的皮質醇含量竟與血清皮質醇相近，一般而言唾液中皮質醇濃度為血中的 5 至 10%，因此本實驗就唾液與血清皮質醇濃度的比較上有很大的爭議。可能原因為在採集唾液的過程中有可能受到糞便、尿液與血樣的汙染 (詳情見 5.1.2 小節)，或者，在採集後未即時置於低溫的環境中，唾液中孳生細菌，分解皮質醇出各衍生物，而本實驗室的 ELISA 系統所使用的抗體無法排除與之結合的可能性，意味著皮質醇代謝物會與標誌抗原的競爭抗體結合位，而產生高濃度的假象。





## 5.5 運輸緊迫源與腎上腺皮質醇之關聯

### 5.5.1 豬隻唾液皮質醇與運輸過程中三點的變化

根據圖 11 所示，豬隻在本研究中經過驅趕與運輸，其皮質醇沒有顯著的變化，且不同豬場對於豬隻在運輸過程中的腎上腺皮質醇含量沒有影響，這有悖於一般對動物運輸的認知，即運輸過後動物腎上腺皮質醇濃度升高 (Bradshaw *et al.*, 1996)，且來自不同豬場的豬隻擁有相異的生理狀態，對運輸緊迫源的反應可能不盡相同。不同豬場對豬隻緊迫反應沒有影響的原因，可能為將豬隻依場次分類後過少的樣本數，無法準確分析豬場的效應；運輸過程中三點沒有顯著變化的原因，可能為豬隻對於驅趕緊迫存有相異反應，部分豬隻經歷驅趕後腎上腺皮質醇含量不會升高。如圖 19 所示，將豬隻的驅趕緊迫分為高低兩組後，其皮質醇含量於運輸過程中三點之變化，就可以於驅趕緊迫較高的組別中清楚地看到，且 ANOVA 變方分析有接近顯著的水準 ( $P=0.09$ )，且不論是高或低的驅趕緊迫組別，豬隻皮質醇含量經過運輸後相當接近 ( $30.97 \pm 2.45$ 、 $30.48 \pm 2.62$  ng/ml)。當豬隻經歷大的驅趕緊迫，在之後的運輸過程中皮質醇下降，有適應運輸的傾向；而即使豬隻沒有經歷驅趕緊迫，爾後的運輸過程亦會提供一定的緊迫使皮質醇含量上升。這可能表示運輸本身所貢獻的緊迫變化不大，真正地影響一趟運輸緊迫大小的原因為驅趕緊迫，這與前人研究的結論相似 (Goumon *et al.*, 2013)。

影響豬隻經歷驅趕緊迫的變因，可能為豬隻先前經驗、個體遺傳背景 (性格脾氣、有無帶緊迫基因等)、驅趕者的技巧與牧場硬體設備是否完善。然而，如 5.1 小節所述，本次研究的試驗設計中可能存在著一個造成此現象的缺失。採樣的過程為標記一隻豬後，在牧場內採集唾液，並等待豬隻被驅趕上車後採集第二次。如果標記的豬隻在一開始就被驅趕上車，走道、車體的空間上充足，豬隻就不會在過程中感受到過多緊迫，當被標記的豬隻上車後，考量現場時間急迫，必須馬上進行採樣，若豬隻在車體上沒有經歷擠壓、爭搶充足空間等，豬隻所經歷的緊迫也會遠小於有經歷者。因此，圖 19 中所顯示的低驅趕緊迫組別，除了有可能是豬隻所經歷的驅



趕緊迫真的較少，也有可能是在豬隻尚未感受到完整的驅趕緊迫時，就被進行採樣而導致的誤差，亦有機會兩者皆是。

豬隻在運輸後（第三點）的皮質醇水平相近，即運輸結束後豬隻的生理狀態相近，意味著高驅趕緊迫的豬隻可從驅趕緊迫中回復，但以動物福利觀點考量，仍應減少過程中豬隻感受的痛苦不適，因此釐清到底是何種變因導致豬隻在驅趕過程中感受到緊迫，可能是未來豬隻運輸之動物福利研究的方向之一。

### 5.5.2 豬隻承載密度、電棒使用頻率與驅趕時間

豬隻承載密度、電棒使用頻率被視為影響動物福利甚鉅的緊迫源，然而在本次研究中，其與驅趕緊迫與運輸緊迫之間卻沒有關聯。本次豬隻承載密度範圍主要為 300 至 380 Kg/m<sup>2</sup> 之間，最高者僅為法定規範（315 Kg/m<sup>2</sup>）的 1.2 倍，而歐盟的密度規範為 235.3 Kg/m<sup>2</sup>，由此可見台灣的規範已較高，在豬隻承載密度較高的基礎上，即使再有變動可能也沒甚麼影響。我們也可以說，在現行的豬隻運輸過程中，即使豬隻承載密度的高低看似會造成豬隻在車體上有更嚴重的擠壓、打鬥甚至堆疊的情形而導致更嚴峻的緊迫反應，但以唾液皮質醇含量進行分析後，豬隻承載密度的變動與豬隻於驅趕與運輸時經歷的緊迫程度並無相關性。若要針對豬隻承載密度進行更詳細的探討，在緊迫指標上可能要使用能解釋肌肉損傷狀態與動物活動力的乳酸、磷酸肌酐、屠體損傷或水漾肉與暗乾肉之發生率等。電棒使用頻率沒有影響的可能原因為沒有不當的使用，以及電壓大小的選用適當（僅 50 伏特）。在本研究中可以觀察到驅趕者使用電棒的情形，確實大部分落在豬之臀肌、背肌等大範圍肌群，而非眼、鼻、口與陰部等脆弱部位。在本試驗所觀察電棒使用頻率範圍為 3 到 14 次每分鐘，至少在這段範圍內，驅趕者使用電棒與豬隻腎上腺活動、豬隻唾液皮質醇含量，沒有顯著的關聯性。然而，本研究對於電棒使用會造成豬隻群體的緊迫有個先決的假設，認為電棒刺激豬隻後會引起豬隻嚎叫、衝撞進而造成整群豬隻的緊迫，因此我們相信即使標記的豬隻在驅趕過程中沒有被電棒刺激，其皮

質醇也可以反映電棒使用的影響。電棒使用頻率與皮質醇之間沒有關聯，也可能代表著此先決假設存在著缺失需要修正。

驅趕時間與驅趕緊迫沒有關聯性，原因可能為豬隻個體差異、硬體設施優劣與驅趕者技術等。儘管四個台糖豬場的硬體設備相近、運輸過程中的驅趕者大多為同一個人、豬隻多為同樣品系，本研究對這些變因依舊無法嚴謹地固定，每趟運輸中依然有很多細節在變動，因此可能造成驅趕時間與驅趕緊迫之間的無關聯性。驅趕緊迫與各變因之間的無關聯性，也可能是受到上述提及的採樣缺失所影響。

### 5.5.3 運輸時間與總時間

運輸時間與豬隻唾液皮質醇含量之間並無相關，而前人研究以豬隻死亡率作為緊迫指標進行調查，則發現運輸時間與死亡率之間存有關聯 (Haley *et al.*, 2008; Sutherland *et al.*, 2009; Voslarova *et al.*, 2017)。如此相異的結果，可能原因為緊迫指標的選用，豬隻皮質醇含量存在個體差異，在不充足樣本數下無法反映豬隻緊迫反應的趨勢。然而，當運輸時間介於 35 至 70 分鐘時，與皮質醇有顯著關聯，皮質醇含量隨著時間增加而下降，說明豬隻有適應運輸緊迫的傾向，在前人的研究中可以看到類似的結果 (Perez *et al.*, 2002)。這表示豬隻有自身的適應能力，在此段時間內可以協助豬隻降低腎上腺水平。台灣的豬隻運輸以短距離為主，將近五成的運輸小於 50 公里，如果能配合豬場與目的地的位置進行運輸路線的優化，讓豬隻在車體上的時間落在此區間，也許可以提升豬隻運輸時的動物福利。

總時間與以皮質醇改變比例表現的總緊迫之間有接近顯著的非線性關係，總時間較短時，皮質醇上升的幅度較大；反之總時間較長時，皮質醇上升的幅度較小。這同樣說明，在豬隻剛經歷運輸過程（驅趕與運輸）緊迫時，容易有較大的緊迫反應，爾後隨著豬隻適應，皮質醇含量變逐漸下降。

## 第六章 結論



1. 經過 AVONA 變方分析以及鄧氏兩兩比較，豬隻唾液皮質醇含量的日夜節律高峰落在 09:00、11:00 與 15:00 等時間點，其平均濃度 (Mean  $\pm$  S.E.M) 分別為  $24.27 \pm 2.74$  ng/ml、 $21.70 \pm 1.50$  ng/ml 與  $27.17 \pm 3.24$  ng/ml。
2. 由緊迫測試表示本研究使用唾液是可以同血清一樣即時表現皮質醇含量，且在緊迫結束後 0.5 小時達唾液皮質醇高峰。唯血清與唾液皮質醇濃度相近，需要後續的分析與釐清。
3. 豬隻承載密度與電棒使用頻率，兩個被認為影響豬隻動物福利甚鉅的緊迫源，在本研究中台灣運輸現況所使用的範圍內，對豬隻唾液皮質醇沒有顯著影響。豬隻承載密度與驅趕、運輸緊迫沒有顯著關聯 ( $P = 0.5294, 0.2456, R^2 = 0.0167, 0.1021$ )。電棒使用頻率與驅趕緊迫沒有顯著關聯 ( $P = 0.9184, R^2 = 0.0005$ )。
4. 整趟運輸過程中，驅趕緊迫對豬隻造成的影響最大，且與運輸緊迫之間存有顯著關聯性 ( $R^2 = 0.3968, P = 0.0161$ )。本研究未能找出驅趕過程中影響驅趕緊迫的緊迫源，無法解釋豬隻間驅趕緊迫的高變異率，還望後續有研究能繼續釐清驅趕緊迫的變因為何。
5. 運輸時間介於 35 至 70 分鐘時，與運輸緊迫有顯著的關聯性 ( $P = 0.0187, R^2 = 0.5699$ )，表示豬隻在此時段內開始適應車體上環境。總時間與總緊迫之間的幾乎顯著的非線性關係，也說明了豬隻的適應能力，剛接觸到緊迫時皮質醇濃度較高，過一段時間後開始下降。


## 第七章 參考文獻



- 白火城、吳兩新、林仁壽，1996。家畜內分泌學。藝軒圖書出版社。台北。
- 李淵百，2015。動物福祉，動物福祉的緣由與歷史演進，第 14 頁。社團法人中華民國保護動物協會，台北。
- 李淵百，2015。動物福祉，動物福祉與行為學，第 71 頁。社團法人中華民國保護動物協會，台北。
- 周佳琪。1999。涼熱季節對台灣山羊皮質醇分泌之影響。國立台灣大學畜產學研究所碩士論文。台北。
- Aschoff, J. 1963. Comparative physiology: diurnal rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* 25: 581–600.
- Aschoff, J. 1966. Circadian activity pattern with two peaks. *Ecology.* 47:657–662.
- Atkinson, S. 2000. Farm animal transport, welfare and meat quality. Swedish Univ. Agric. Sci., Skara, Sweden. Dissertation.
- Ayo, J. O., S. B. Oladele, and A. Fayomi. 2002. Behavioural reactions of cattle to stress situations: A review. *J. Agric. Tech.* 8:15-20.
- Boumans, I. J. M. M., I. J. M. de Boer, G. J. Hofstede, S. E. la Fleur, and E. A. M. Bokkers. 2017. The importance of hormonal circadian rhythms in daily feeding patterns: an illustration with simulated pigs. *Horm. Behav.* 93:82-93.
- Bradshaw, P. H., S. J. G. Hall, and D. M. Broom. 1996. Behavioural and cortisol response of pigs and sheep during transport. *Vet. Rec.* 138:233-234.
- Brindley, D., and Y. Rolland. 1989. Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin. Sci.* 77:453-61.



- Broom, D. M. 1986. Indicators of poor welfare. *Br. Vet. J.* 142:524–526.
- Broom, D. M. 2005. Animal welfare education: Development and prospects. *J. Vet. Med. Educ.* 32:438-441.
- Broom, D. M. 2010. Animal welfare: an aspect of care, sustainability, and food quality required by the public. *J. Veterinary. Med. Education.* 37:83–88.
- Bushong, D. M., T. H. Friend, and D. A. Knabe. 2000. Salivary and plasma cortisol response to adrenocorticotropin administration in pigs. *Lab. Anim.* 34:171-181.
- CEC. 2005. Regulation No.1/2005 relative to the protection of animals during transportation. The Council of the European Communities. December 22, 2004. Amends Directives 64/432/EEC and 93/119/EC and Regulation (EC) No. 1255/97.
- Choi, Y. M., K. C. Jung, J. H. Choe, and B. C. Kim. 2012. Effects of muscle cortisol concentration on muscle fiber characteristics, pork quality, and sensory quality of cooked pork. *Meat Sci.* 91:490–8.
- Dallman, M. F., A. M. Strack, S. F. Akana, M. J. Bradbury, E. S. Hanson, K. A. Scribner, and M. Smith. 1993. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front. Neuroendocrinol.* 14:303–47.
- De Jong, I. C., T. I. Prella, J. A. van de Burgwal, E. Lambooi, S. M. Korte, H. J. Blokhuis, and J. M. Koolhaas. 2000. Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiol. Behav.* 68:571–578.
- Desautels, C., J. P. Bidanel, D. Milant, N. Iannuccelli, Y. Amigues, F. Bourgeois, J. C. Caritez, C. Renard, C. Chevalet, and P. Mormède. 2002. Genetic linkage mapping of quantitative trait loci for behavioral and neuroendocrine stress response traits in pigs. *J. Anim. Sci.* 2002;80: 2276–85.

- 
- Desautés, C., J. P. Bidanel, and P. Mormède. 1997. Genetic study of behavioral and pituitary–adrenocortical reactivity in response to an environmental challenge in pigs. *Physiol. Behav.* 62:337–45.
- Désautés, C., A. Sarrieau, J. C. Caritez, and P. Mormède. 1999. Behavior and pituitary–adrenal function in Large White and Meishan pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 16:193–205.
- Devenport, L., A. Knehans, A. Sundstrom, and T. Thomas. 1989. Corticosterone's dual metabolic actions. *Life. Sci.* 45:1389–96.
- Dewey, C., C. Haley, T. Widowski, and R. Friendship. 2004. Factors associated with in-transit losses. *Proceedings of the London swine conference.* pp. 51–54. London, Canada.
- Dhabhar, F., and B. McEwen. 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:1059-64.
- Eldridge, G. A., and C. G. Winfield. 1988. The behaviour and bruising of cattle during transport at different space allowances. *Aust. J. Exp. Agric.* 28:695-698.
- Ekkel, E. D., S. J. Dieleman, W. G. P. Schouten, A. Portela, G. Cornélissen, M.J.M. Tielen, and F. Halberg. 1996. The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiol. Behav.* 60:985-999.
- Follenius, M., C. Simon, G. Brandenberger, and P. Lenzi. 1987. Ultradian plasma corticotropin and cortisol rhythms: time-series analyses. *J. Endocrinol. Investig.* 10:261–6.
- Fulkerson, W. J., and B. Y. Tang. 1979. Ultradian and circadian rhythms in the plasma concentration of cortisol in sheep. *J. Endocrinol.* 81:135–41.

Garcia-Belenguer, S., J. Palacio, M. Gascon, C. Acena, R. Revilla, and P. Mormède. 1996.

Differences in the biological stress responses of two cattle breeds to walking up to mountain pastures in the Pyrenees. *Vet. Res.* 27:515–26.

Gayraud. V., M. Alvinerie, and P. L. Toutain. 1996. Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domest. Anim. Endocrinol.* 13:35–45.

Geverink, N. A., W. G. P. Schouten, G. Gort, and V. M. Wiegant. 2003. Individual differences in behaviour, physiology and pathology in breeding gilts housed in groups or stalls. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81:29–41.

Giguere, V., and F. Labrie. 1983. Additive effects of epinephrine and corticotropinreleasing factor (CRF) on adrenocorticotropin release in rat anterior pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110:456-462.

Goumon, S., J. A. Brown, L. Faucitano, R. Bergeron, T. M. Widowski, T. Crowe, M. L. Connor, and H. W. Gonyou. 2013. Effects of transport duration on maintenance behavior, heart rate and gastrointestinal tract temperature of market-weight pigs in 2 seasons. *J. Anim. Sci.* 91:4925–4935.

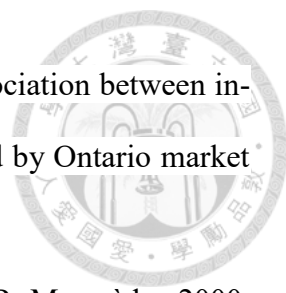
Grandin, T. A. 1994. Methods to reduce PSE and bloodsplash. *Proceedings of the 21<sup>st</sup> Allen D. Lemay Swine Conference.* pp. 206–209.

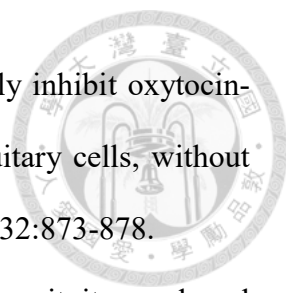
Grandin, T. 2000. Introduction: Management and economic factors of handling and transport. In T. Grandin (Ed.), *Livestock handling and transport.* pp.1–14.

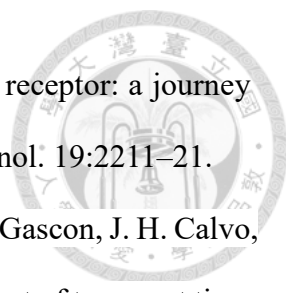
Guàrdia, M. D., J. Estany, S. Balash, M. A. Oliver, M. Gispert, and A. Diestre. 2004. Risk assessment of PSE condition due to pre-slaughter conditions and RYR1 gene in pigs. *Meat Sci.* 67:471–478.

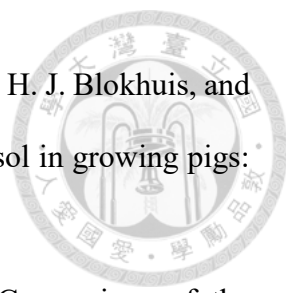
Guise, H. J., and H. C. Penny. 1989a. Factors influencing the welfare and carcass and meat quality of pigs. 1. The effects of stocking density in transport and the use of electric goads. *Anim. Prod.* 49:511–515.

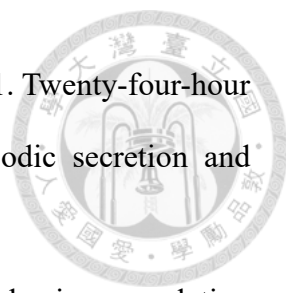


- 
- Haley, C., C. E. Dewey, T. Widowski, and R. Friendship. 2008. Association between in-transit loss, internal trailer temperature, and distance traveled by Ontario market hogs. *Can. J. Vet. Res.* 72:385–9.
- Hay, M., M. C. Meunier-Salaun, F. Brulaud, M. Monnier, and P. Mormède. 2000. Assessment of hypothalamic–pituitary–adrenal axis and sympathetic nervous system activity in pregnant sows through the measurement of glucocorticoids and catecholamines in urine. *J. Anim. Sci.* 78:420–8.
- Hemsworth, P. H., J. L. Barnett, and C. Hansen. 1997. The influence of inconsistent handling by humans on the behaviour, growth and corticosteroids of young pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 17:245-252.
- Hillmann, E., L. Schrader, C. Mayer, and L. Gygax. 2008. Effects of weight, temperature and behaviour on the circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs. *Animal.* 2:405–9.
- Jensen, K. H., L. J. Pedersen, E. K. Nielsen, K. E. Heller, J. Ladewig, and Jorgensen E. 1996. Intermittent stress in pigs: effects on behavior, pituitary–adrenocortical axis, growth, and gastric ulceration. *Physiol. Behav.* 59:741–748.
- Knowles, T. G., P. D. Warris, S. N. Brown, and J. E. Edwards. 1999. Effects of cattle transport by road for up to 31 hours. *Vet. Rec.* 145:575-582.
- Koopmans, S. J., J. van der Meulen, R. Dekker, H. Corbijn, and Z. Mroz. 2005. Diurnal rhythms in plasma cortisol, insulin, glucose, lactate and urea in pigs fed identical meals at 12-hourly intervals. *Physiol. Behav.* 84:497–503.
- Korte, S. M., B. Olivier, and J. M. Koolhaas. 2007. A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiol. Behav.* 92:422-428.
- Lambooj, E., and B. Engel. 1991 Transport of slaughter pigs by truck over a long distance: some aspects of loading density and ventilation. *Livest. Prod. Sci.* 28:162-174.

- 
- Link, H., G. Dayanithi, and M. Gratzl. 1993. Glucocorticoids rapidly inhibit oxytocin-stimulated adrenocorticotropin release from rat anterior pituitary cells, without modifying on intracellular calcium transients. *Endocrinology*. 132:873-878.
- Manteuffel, G. 2002. Central nervous regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and its impact on fertility, immunity, metabolism and animal welfare, a review. *Arch. Tierz.*45:575–95.
- Martínez-Miró, S., F. Tecles, M. Ramón, D. Escribano, F. Hernández, J. Madrid, J. Orengo, S. Martínez-Subiela, X. Manteca, and J. J. Cerón. 2016. Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC. Vet. Res.* 12: 171.
- McEwen, B. S. 1998. Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load. *Ann. New York Acad. Sci.* 840:33-44.
- McMahon M., J. Gerich, and R. Rizza. 1988. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes. Metab. Rev.* 4:17–30.
- Mellor, D. J. 2012. Animal emotions, behavior and promotion of positive welfare states. *New. Zeal. Vet. J.* 60:1-8.
- Mormede P, S. Andanson, B. Auperin, B. Beerda, D. Guemene, J. Malnikvist, X. Manteca, G. Manteuffel, P. Prunet, C. G. van Reenen, S. Richard, and I. Veissier. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* 92:317–339.
- Möstl, E., and R. Palme. 2002. Hormones as indicators of stress. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23: 67–74.
- Munsterhjelm, C., A. Valros, M. Heinonen, O. Hälli, H. Siljander-Rasi, and O. A. T. Peltoniemi. 2010. Environmental enrichment in early life affects cortisol patterns in growing pigs. *Animal.* 4:242–249.

- 
- Pascual-Le Tallec, L., and M. Lombes. 2005. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol. Endocrinol.* 19:2211–21.
- Perez, M. P., J. Palacio, M. P. Santolaria, M. C. Acena, G. Chacon, M. Gascon, J. H. Calvo, P. Zaragoza, J. A. Beltran, and S. Garcia-Belenguer. 2002. Effect of transport time on welfare and meat quality in pigs. *Meat Sci.* 61:425–433.
- Popova, N. K., and L. A. Koryakina. 1981. Some genetical aspects on pituitary–adrenal response to stress in mice. *Endocrinol. Exp.* 15:45–54.
- Randall, J. M. 1993. Environmental parameters necessary to define comfort for pigs, cattle and sheep in livestock transporters. *Anim. Prod.* 57:299–307.
- Riad-Fahmy, D., G. F. Read, R. F. Walker, and K. Griffiths. 1982. Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr. Rev.* 3:367–95.
- Ritter, M. J., M. Ellis, J. Brinkmann, J. M. DeDecker, K. K. Keffaber, M. E. Kocher, B. A. Peterson, J. M. Schlipf, and B. F. Wolter. 2006. Effect of floor space during transport of market-weight pigs on the incidence of transport losses at the packing plant and the relationships between transport conditions and losses. *J. Anim. Sci.* 84: 2856–2864.
- River, C. L., and P. M. Plotsky. 1986. Mediation by corticotropin-releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 48:475-494.
- Roldan-Santiago, P., R. Martinez-Rodriguez, A. Yanez-Pizana, M.E. Trujillo-Ortega, M. Sanchez-Hernandez, E. Perez-Pedraza, and D. Mota-Rojas. 2013. Stressor factors in the transport of weaned piglets: a review. *Vet. Med.* 58:241-251.
- Rollin. B. E. 1995. *Farm animal welfare: Social, bioethical and research issues.* Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Roosendaal, B. 2000. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology.* 25:213-38.

- 
- Ruis, M. A. W., J. H. A. Te Brake, B. Engel, E. D. Ekkel, W. G. Buist, H. J. Blokhuis, and J. M. Koolhaas. 1997. The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress. *Physiol. Behav.* 62:623–30.
- Sarrieau, A., F. Chaouloff, V. Lemaire, and P. Mormède. 1998. Comparison of the neuroendocrine responses to stress in outbred, inbred and F1 hybrid rats. *Life. Sci.* 63:87–96.
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., L. Faucitano, S. Dadgar, P. Shand, L. A. González, and T. G. Crowe. 2012. Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. *Meat Sci.* 92:227–243.
- Scott, L. V., and T. G. Dinan. 1988. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implication for the pathophysiology of depression. *Life. Sci.* 62:1985-1998.
- Speer, N. C., G. Slack, and E. Troyer. 2001. Economic factors associated with livestock transportation. *J. Anim. Sci.* 79:166–170.
- Stott, G. H. 1981. What is animal stress and how is it measures? *J. Anim. Sci.* 52:150-153.
- Sutherland, M. A, A. McDonald, and J. J. McGlone. 2009. Effects of variations in the environment, length of journey and type of trailer on the mortality and morbidity of pigs being transported to slaughter. *Vet. Rec.* 165:13–8.
- Tempel, D. L., and S. F. Leibowitz. 1994. Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J. Neuroendocrinol.* 6:479–501.

- 
- Thun, R., E. Eggenberger, K. Zerobin, T. Luscher, and Vetter W. 1981. Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinology*. 109:2208–12.
- Vernikos-Danellis, J., and J. P. Heybach. 1980. Psychophysiologic mechanisms regulating the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. In: H. Selye, eds. *Selye's guide to stress research*, vol. 1, Van Nostrand Reinhold company, New York. P.206-251.
- Vining, R. F., and R. A. McGinley. 1984. Transport of steroids from blood to saliva. In *Immunoassays of Steroids in Saliva* (Edited by G. F. Read, D. Riad- Fahmy, R. F. Walker and K. Griffiths). *Alpha Omega*, 62. pp. 56-63.
- Vining, R. F., and R. A. McGinley. 1987. The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *J. steroid. Biochem.* 27: No.1-3, 81-94.
- Voslarova, E., V. Vecerek, A. Passantino, P. Chloupek, and I. Bedanova. 2017. Transport losses in finisher pigs: impact of transport distance and season of the year. *Asian-australas. J. Anim. Sci.*1:119–24.
- Walter, Cannon. 1929. *Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage*. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Walter, Cannon. 1932. *Wisdom of the Body*. United States: W.W. Norton & Company. ISBN:0393002055.
- Warriss, P. D. 1993. Ante-mortem factors which influence carcass shrinkage and meat quality. 39<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology.
- White, P. C., T. Mune, and A. K. Agarwal. 1997. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr. Rev.* 18:135–156.
- Whiting, T. L., and S. Brandt, S. 2002. Minimum space allowance for transportation of

swine by road. *Can. Vet. J.* 43:207–212.

Yeates, J. W., and D. C. J. Main. 2008. Assessment of positive welfare: a review. *Vet. J.* 175:293-300.



## 第八章 附錄



### 腎上腺皮質醇酮素免疫分析法評估

研究室前人研究建立的腎上腺皮質醇酮素免疫分析法已有完整評估(周, 1999)。在此僅簡述結果, 詳細評估方法與討論請參閱前人研究。

#### 1. 抗體專一性 (cross-reactivity)

為檢測實驗室制備的抗體是否能結合其他類固醇抗原, 而產生誤差。前人結果如下, 雌酮 (Estrone)、雌二醇 (Estradiol)、雌三醇 (Estriol)、膽固醇與孕烯醇酮 (Pregnenolone) 等類固醇與皮質醇抗體的交叉反應皆小於 0.01%, 然而與皮質固酮 (Corticosterone)、孕酮 (Progesterone) 和 17-羥孕酮 (17 $\alpha$ -OH Progesterone) 與皮質醇抗體的交叉反應較大, 分別為 17.8%、21.3%、66.2%。

#### 2. 靈敏度 (sensitivity)

靈敏度為本系統偵測皮質醇濃度的極限值, 也就是對皮質醇含量的解析度。本系統的靈敏度為 1.29 ng / ml。

#### 3. 精密度 (precision)

精密度為本系統檢測皮質醇濃度的變異度, 前人研究以分析內變異係數與分析間變異係數進行探討。分析內變異係數為同批樣本於同次分析內測定值的變異, 而分析間變異係數為同批樣本於不同次分析間測定值的變異。本系統的分析內變異係數為 1.47-3.65%, 而分析間變異係數為 5.40-6.31%, 是非常精準的精密度。



## ELISA 使用之 Buffer 配置方法

\* X :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$     \* Y :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1. Assay buffer    2 L    pH    7.0

Gelatin    2 g, 0.1%    SIGMA G2500    置於 4°C 冰箱

【溶於加熱 70-80°C 之 1L d.d water】

NaCl    17.5 g    MERCK 6404

X    10.86 g    MERCK 6580

Y    5.38 g    MERCK 6346

Thimerosal    0.2 g, 0.01%    SIGMA T5125    置於乾燥盆中

【溶於 1L d.d water 後與 Gelatin 溶液混合，冷卻後測 pH 值】

2. Washing buffer    10 L    pH    7.0

【先使用 2 L d.d water 溶解】

X    10.86 g

Y    5.38 g

Thimerosal    1 g

Tween-20    10 mL    SIGMA 1379

【界面活性劑，比重大，緩慢吸取】

3. PB 6.0 buffer    2 L    pH    6.0

X    4.38 g

Y    24.205 g

Thimerosal    0.2 g





4. Coating buffer    1 L    pH    9.6  
NaHCO<sub>3</sub>    2.93 g    MERCK 6329  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>    1.59 g  
Thimerosal    0.1 g

5. Blocking buffer    2 L    pH    8.0  
Gelatin    5.0 g

【溶於加熱 70-80°C 之 1L d.d water】

NaCl    17.5 g  
Tris-base    12.1 g    SIGMA T1503  
EDTA    3.6 g  
Tween-20    1.0 mL

【溶於 1L d.d water 後與 Gelatin 溶液混合，冷卻後測 pH 值】