

# フィールドサイエンス

*Journal of Field Science*

No. 14 2016



東京農工大学農学部附属広域都市圏  
フィールドサイエンス教育研究センター

平成28年 3月

# フィールドサイエンス 第14号

## 目 次

### 総 説

- 1 ウシ体外受精胚移植技術に関する研究／杉村智史

### 論 文

- 5 シリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) における唾液  $\alpha$ -アミラーゼ測定によるストレス評価法の検討／塩澤 望・鈴木 馨
- 13 牛糞便からの新規ウシエンテロウイルスの検出と遺伝子解析／岡田貴志・土赤 忍・増田恒幸・大松 勉・長井 誠・押谷 仁・水谷哲也

## 総説

## ウシ体外受精胚移植技術に関する研究

杉村 智史

Study of *in vitro* produced embryo transfer in cattle

Satoshi SUGIMURA

## はじめに

現在、我が国で生産されている肉用牛および乳用牛のほぼ100%が人工授精(AI)あるいは受精胚移植技術に由来する。雌雄の優れた資質を受け継いだ子牛を生産する技術としてAIが一般的に利用されているが、妊娠期間が280日にもおよぶ単胎動物のウシでは通常一年一産が限度である。一方、受精胚移植技術は、過排卵処理を施したドナー牛に精液を交配させた後、複数の胚を採取し、得られた胚を他の仮親(レシピエント牛)に移植することで、AIに比べより多くの産子獲得が期待できる。

近年、世界的に育種改良が進み1個体あたりの乳量が年々増加している。その一方で、繁殖性の低下が問題視され、1992年から2012年の20年間で我が国の乳用牛初回AI受胎率は66.8%から44.7%にまで減少している。乳量と繁殖性の直接的な因果関係は明らかになっていないが、高泌乳性と繁殖性低下の関係が示唆されている。この原因として、泌乳量増加に伴う負のエネルギーバランス(NEB)が指摘されている。NEBは生乳生産に必要なエネルギー要求量がエネルギー摂取量を超えることが引き金となる。これを補うため体脂肪や筋肉の動員が亢進し、結果としてインスリン、グルコースおよびIGF-Iの低下、さらには遊離脂肪酸(NEFA)や $\beta$ -ヒドロキシ酪酸(BHBA)の増加といった代謝・ホルモンプロファイルの異常が生じる。このNEBによって引き起こされる代謝・ホルモンプロファイルの異常は発情、排卵、受精および胚発育といった様々な繁殖現象に影響を与えることが報告されている(Butler & Smith 1989)。すなわち、NEBの結果、

授精できない、適期に授精できない、排卵しない、あるいは受精しても体内で胚が正常に発育できないといった問題が生じていることが推察される。

これらの問題を克服する手段として、体外で受精胚を作製し、それらをレシピエント牛へ移植する技術、“体外受精胚移植技術”が注目されている。体外受精胚移植技術は、食肉処理場由来卵巣あるいは経膣採卵(OPU)技術により卵胞から卵丘細胞-卵子複合体(COCs)を取り出し、体外成熟培養(IVM)、体外受精(IVF)、体外発生培養(IVC)により体外受精胚を作製、得られた胚をレシピエント牛へ移植することで、優れた資質を受け継いだ子牛を多数獲得する技術である。しかしながら、体外受精胚は新鮮胚、凍結胚共に体内生産胚に比べ生育性が低く、また妊娠期間の延長、過大子、産後直死といった異常が認められる。つまり、体外受精胚移植技術の発展および改良が今後の『安定的かつ効率的なウシ産子の生産』を左右すると言える。

## 胚の個別管理培養

ウシ体外受精胚の作製において、体外授精後の受精胚は微小滴内で集団で培養するのが一般的である。これは、胚個々のオートクライン、あるいは隣接胚からのパラクライン効果が得られるためである。しかしながら、OPU技術により乳用牛からCOCsを採取した場合、1個体から得られる培養可能胚数は7から11個と少数である。さらに、個体間ごとに生産できる培養可能胚数にばらつきがある。また、胚の生育評価マーカーの探索、あるいは品質評価を目的として胚の発生過程を追跡する場合、胚を個別に管理できるような培養システムが必要とな

2015. 1. 9 受付; 2016. 2. 1 受理

東京農工大学大学院農学研究生物生産科学部門 〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8: Institute of Agriculture, Department of Biological Production, 3-5-8, Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan

連絡担当著者: 杉村 智史

るが、単独、少数あるいは低密度での培養では胚盤胞形成率の低下、胚盤胞細胞数の減少、インターフェロンタウの分泌量低下といった異常が報告されている (Larson & Kubisch 1999)。これらは、胚の発生に重要となるオートクライン、あるいはパラクライン効果が十分得られていないためであると示唆されている。一方、少量微小滴の培養では胚発生に影響を与えるアンモニウムや活性酸素種の蓄積量が増加する (Gardner & Lane 1993)。培地交換により、培地中の有毒物質は除去されるが、同時に発生に重要な他のオートクライン・パラクライン因子を除去してしまう。

これらの問題を克服するため、4穴培養皿あるいは微小滴中にマイクロウェルを持つ well-of-the-well (WOW) が開発された (Vajta *et al.* 2000)。WOW は胚の発生を支持するオートクライン/パラクライン因子の蓄積、さらには胚の発生を阻害する有毒物質を拡散させる効果があると考えられている。しかしながら、従来の WOW は針やシリンダーを用いて手製でマイクロウェルを作製していたため、マイクロウェルの深さや直径が不均一であり、さらに顕微鏡下での胚の視覚性が極めて低かった。

Time-lapse cinematography (TLC) は継時的に胚の発生過程を観察することができ、発生速度や卵割様式等の発生カイネティクス解析を可能とする。しかしながら、手製の WOW を用いて TLC 観察を行った場合、胚の視覚性は極めて低く、発生カイネティクス解析は困難であった。一方、従来の集合培養では胚が動いてしまい発生過程を追跡できないといった問題があった。

そこで、我々は射出成型技術を用いた TLC 対応型のポリスチレン製マイクロウェル培養システムを開発した (Sugimura *et al.* 2010)。開発した培養システムの有効性を解析したところ、従来の集合培養と比較し胚盤胞形成率に違いは認められなかったが、従来の集合培養によって得られた受精胚を移植した場合に比べ、開発した個別管理培養システムで得られた胚を移植した場合で受胎率が増加した (21.9% vs. 51.7%)。また、低密度 (5 個/培養) で胚を培養した場合、従来の集合培養では胚盤胞形成率が低下したのに対し、個別管理培養システムでは胚盤胞形成率の低下は認められなかった。さらに、隣接胚の培養間隔を伸ばしても胚盤胞形成が低下しなかったことから、低密度の培養においても胚の胚盤胞形成率が低下しなかったのは、隣接胚のパラク

ライン効果ではなく、オートクライン効果に起因することが示唆された (Sugimura *et al.* 2013)。以上、開発した個別管理培養システムは TLC に対応可能だけでなく、得られる胚の品質も高いこと、さらに、少数の培養でも胚発生に負の影響を与えないことなど、様々な有用性が確認された。

### ウシ IVP 胚生育成否予測マーカーの探索

一般的にウシ体外受精胚の選別は国際胚移植学会 (IETS) が推奨する胚盤胞の形態学的品質評価 (Code1-3) に基づきオペレーターの主観的判断により行われる。しかしながら、この選択方法を用いて体外受精胚を移植した場合の受胎率は35-50%と低率である。そのため、客観的かつより高受胎性が期待できる胚の選択技術の開発が望まれている。

胚盤胞の形態学的評価以外に、胚の内部細胞塊 (ICM) および栄養外胚葉 (TE) 細胞数、アポトーシス細胞数、透明帯からの脱出能、染色体異常、遺伝子発現解析がある。しかしながら、このような品質評価方法の多くは侵襲的であるため、移植用の胚には適用できない。そこで、生育可能胚をより高精度に選択可能な非侵襲的な胚の品質評価マーカーの探索が望まれている。そこで、開発した個別管理培養システム、TLC そして胚のエネルギー代謝活性 (酸素消費) が解析可能な走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いて体外受精胚の生育成否予測マーカーの探索を行った。その結果、新規の予測マーカーとして、1) 第一卵割のタイミング、2) 第一卵割終了時の割球数、3) 第一卵割終了時の細胞断片化 (フラグメンテーション) の有無、4) 胚の一時休止期 (ラグフェイズ) での割球数、5) 酸素消費量が同定された (Sugimura *et al.* 2012)。予測マーカー 1 は染色体数、妊娠認識関連遺伝子 *IFN-tau* の発現およびインプリント遺伝子 *IGF2R* の発現と相関があること、予測マーカー 2 は染色体数および *IFN-tau* の発現と相関があること、予測マーカー 3 は aldo-keto 還元酵素関連遺伝子 *AKR1B1* の発現と相関があること、予測マーカー 4 はアポトーシス細胞数と相関があること、予測マーカー 5 は ICM・TE 細胞数、透明帯からの脱出能および胎盤関連遺伝子 *PLAC8* の発現と相関があることを明らかにした。これら 5 つの予測マーカーの組み合わせにより体外受精胚を選別し移植したところ、78.9% と高い受胎率が得られた。従来の選別方法により胚を選び移植した場合の受胎率が40.4%であったこと

から、新たに同定したウシ体外受精胚の発育成否予測マーカーが高受胎性が期待できる胚の高精度かつ客観的な選別に有効であることが示された。

### ウシ卵子の発生能獲得機構

体外受精胚の生産において、最初のステップとなるのが体外成熟 (In Vitro Maturation: IVM) であり、その後の胚発育を大きく左右する。IVM に供する未成熟卵子は食肉処理場卵巣あるいは OPU により 2-6 mm の小あるいは中卵胞より採取する。しかしながら、現行の IVM 技術で得られたウシ卵子は体内成熟由来に比べ発育性が劣る (Matoba *et al.* 2014)。

生体内において卵子成熟は顆粒層細胞や卵丘細胞といった卵胞細胞によって制御されている。この反応は黄体形成ホルモン (LH) や卵胞刺激ホルモン (FSH) といった性腺刺激ホルモン、および骨形成タンパク質 (BMP) 15 や成長分化因子 (GDF) 9 といった卵子分泌因子 (oocyte secret factors: OSFs) に依存する。

LH や FSH は amphireglin (AREG), epreghin (EREG), betacellulin (BTC) といった EGF-like factors の発現を誘導する (Hsieh *et al.* 2007)。これら EGF-like factors はプロテインキナーゼ A (PKA) を介して発現が誘導され EGF 受容体 (EGFR) に結合する。その後、EGFR シグナルはその下流因子、ERK1/2, PI3K/AKT および p38MAPK を活性化することで卵丘膨化関連遺伝子である *HAS2*, *TFNAIP6*, *PTX3* および *PTGS2* の発現を誘導する (Shimada *et al.* 2006)。ギャップ結合を介する顆粒層細胞/卵丘細胞からの cGMP あるいは cAMP の卵子内への流入が停止することで PDE3A が活性化され cAMP 濃度の減少により減数分裂が誘導される (Norris *et al.* 2009)。

一方、TGF- $\beta$  superfamily に属する BMP15 や GDF9 といった OSFs は卵成熟に重要な卵丘細胞の分化誘導に必須である (Eppig 2001)。OSFs は SMAD2/3 あるいは SMAD1/5/8 を介し卵丘細胞の増殖、遺伝子発現、あるいはアポトーシスおよび膨化を制御する。これまでに、BMP15 および GDF9 が EGFR の発現を制御すること、また ERK1/2 の活性化を刺激することが報告されている (Su *et al.* 2010)。

このように、卵丘膨化や卵子の減数分裂再開の機序は徐々に明らかになってきているが、効率的かつ安定的な胚生産と産子獲得に直結する“卵子の発生

能獲得機構”は詳細になっていない。最近、我々は EGF-like factors である AREG と OSFs である BMP15 が協調的にウシ卵子の発生能を向上させることを明らかにした (Sugimura *et al.* 2014)。これは AREG による卵丘細胞での解糖系の亢進と BMP15 によるギャップ結合の維持が卵子の発生能獲得に重要な代謝産物を効率的に卵丘細胞から卵子へ移行させたためである。これは、ウシ卵子の発生能獲得機構を理解するうえで極めて重要な知見であると言える。今後、さらにウシ卵子の発生能獲得機構の全容を明らかにすることで、生育可能な IVM 卵子の効率的かつ安定的生産が可能になると考えられる。

### おわりに

体外受精胚は2012年において全世界で凍結胚が36,761頭、新鮮胚が348,238頭に移植され、その80%はブラジルによるものである。国内での普及率は依然として低いものの、OPU 技術の普及に伴い徐々に現場レベルで利用され2011年に体外受精胚を10,198頭に移植し2,251頭が誕生している。現在、体外受精胚の受胎率は新鮮胚で42-44%、凍結胚で36-39%と低率である。体外受精胚移植技術の更なる普及には、受胎率の向上が必須である。したがって、現在、研究対象としている高受胎率が期待できる胚の選別技術や体外成熟・発生培養技術の開発に加え、飼養管理と卵子の品質、受胎牛の飼養管理と移植後の受胎性との関係を詳細にすることで、より現場レベルで求められる技術へと発展するものと考えられる。

### 引用文献

- Butler, W. R. and Smith, R. D. (1989): Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 72 : 767-783.
- Eppig, J. J. (2001): Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122 : 829-838.
- Gardner, D. K. and Lane, M. (1993): Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biology of Reproduction*, 48 : 377-385.
- Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D. C., Threadgill, D. W. and Conti, M. (2007): Luteinizing hormone-depen-

- dent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and Cellular Biology*, 27 : 1914-1924.
- Larson, M. A. and Kubisch, H. M. (1999) : The effects of group size on development and interferon-tau secretion by in-vitro fertilized and cultured bovine blastocysts. *Human Reproduction*, 14 : 2075-2079.
- Matoba, S., Yoshioka, H., Matsuda, H., Sugimura, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hashiyada, Y., Seta, T., Nakagawa, K., Lonergan, P. and Imai, K. (2014): Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *Journal of Dairy Science*, 97 : 743-753.
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O. and Jaffe, L. A. (2009): Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 136 : 1869-1878.
- Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I. and Richards, J. S. (2006): Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molecular Endocrinology*, 20 : 1352-1365.
- Su, Y. Q., Sugiura, K., Li, Q., Wigglesworth, K., Matzuk, M. M. and Eppig, J. J. (2010) : Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the cumulus-oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signaling. *Molecular Endocrinology*, 24 : 1230-1239.
- Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Aikawa, Y., Ohtake, M., Matsuda, H., Kobayashi, S., Kobayashi, E., Konishi, K. and Imai, K. (2013) : Effect of embryo density on in vitro development and gene expression in bovine in vitro-fertilized embryos cultured in a microwell system. *Journal of Reproduction and Development*, 59 : 115-122.
- Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Somfai, T., Inaba, Y., Hirayama, M., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Kobayashi, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, E., Konishi, K. and Imai, K. (2012) : Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PloS One*, 7 : e36627.
- Sugimura, S., Akai, T., Somfai, T., Hirayama, M., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hattori, H., Kobayashi, S., Hashiyada, Y., Konishi, K. and Imai, K. (2010) : Time-lapse cinematography-compatible polystyrene-based microwell culture system: a novel tool for tracking the development of individual bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 83 : 970-978.
- Sugimura, S., Ritter, L. J., Sutton-McDowall, M. L., Mottershead, D. G., Thompson, J. G. and Gilchrist, R. B. (2014): Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Molecular Human Reproduction*, 20 : 499-513.
- Vajta, G., Peura, T. T., Holm, P., Paldi, A., Greve, T., Trounson, A. O. and Callesen, H. (2000): New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Molecular Reproduction and Development*, 55 : 256-264.

## 論文

シリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) における  
唾液  $\alpha$ -アミラーゼ測定によるストレス評価法の検討塩澤 望・鈴木 馨<sup>†</sup>Validation of a stress evaluation method by means of the salivary  $\alpha$ -amylase  
measurement in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)Nozomu SHIOZAWA, Kaoru SUZUKI<sup>†</sup>

マウスやハムスターといった小型げっ歯類の実験動物では反復測定に優れたストレスマーカーは確立されていない。先行研究からハムスターにおいて唾液  $\alpha$ -アミラーゼによるストレス評価の可能性が示された。しかし、ハムスターは唾液量が少なく、個体によって測定に必要な唾液量を採取できない場合がある。本研究ではこうした欠点を補うため、麻酔下で生理食塩水をハムスターの頬袋に入れ再度回収することで唾液を含む測定用のサンプルとして使用できると考えた。測定の精度や安定性についてストレス反応性、同時再現性、希釈直線性および冷凍保存性で検討を行った。ストレスを負荷した際のサンプルは負荷しなかった際のサンプルに比べ有意に高い活性値を示し本測定法でストレス反応を捕捉することが出来た。同時再現性では全てのサンプルで変動係数が5%未満と高い精度を示し、直線性においても全てのサンプルで決定係数が0.97以上と安定的な直線回帰が認められた。冷凍保存性の結果から、1ヶ月程度であれば冷凍することで安定的な保存が可能であることが分かった。以上から本測定法は精度・安定性に優れたハムスターにおける新たなストレス評価方法となる可能性が示唆された。

キーワード：ストレス評価, ハムスター, ストレスマーカー, 唾液  $\alpha$ -アミラーゼ

## 緒言

ストレス評価は行動学や医学分野の研究で多くなされている。ストレスには急性や慢性ストレス、身体的や精神的ストレスなどの種類があり、その特徴は様々である。そのため、ストレスの種類によって生体内での反応も変わってくる。さらに、生物種が違えばその違いはさらに大きくなる。例えば、急性ストレスにより副腎皮質ホルモンの分泌は増えるが、この副腎皮質ホルモンはヒトではコルチゾールがその多くを占めるのに対し、げっ歯類ではコルチコステロンの方が主要である。また、慢性ストレスの反応としては免疫系の機能低下がある。そのため、慢性ストレス評価のバイオマーカーとしてサイトカイン類の可能性が示唆されている(田中・脇田2011)。また、精神的ストレスか身体的ストレスか

でも反応は異なる。クロモグラニンAという物質は精神的ストレスのみに反応するといわれている(中根1999, 井澤ら2007)。このように、ストレスを評価する上で重要になるのは、ストレスの種類や生物種の特性に合った測定法でストレスを評価することである。

現在、実験動物におけるバイオマーカーを用いたストレス評価法で主流となっているものにコルチゾールやコルチコステロンといった副腎皮質ホルモンの血中濃度の測定がある。しかし、マウスやハムスターといった小型げっ歯類においては測定に必要な血液量を得るためには心臓穿刺や断頭処理などが必要であり、同一個体を用いた反復測定が不可能である(Head et al. 1985)。また、侵襲性が高く動物福祉的な観点からも代替的な方法の開発が求められている。

2015. 2. 16受付; 2015. 2. 24受理

東京農工大学農学部附属広域都市圏フィールドサイエンス教育研究センター 〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

<sup>†</sup> 連絡担当著者: 鈴木 馨 メール: kaoru@cc.tuat.ac.jp

近年、ヒトにおいて侵襲性の低いストレス評価法として唾液 $\alpha$ -アミラーゼを用いた測定が注目され、研究がなされている (Nater and Rohleder 2009)。また、この唾液 $\alpha$ -アミラーゼを用いて簡易的にストレスを評価できるよう、医療用簡易測定器が商業用に開発され販売もなされた (山口・吉田 2005)。唾液 $\alpha$ -アミラーゼの分泌はストレス負荷により促進されることが知られている。これはストレスにより交感神経系が活性化することに起因している。交感神経系反応は副腎皮質ホルモンの分泌を促すホルモン系作用に比べ反応が速いといった特徴があり、急性ストレスのマーカーとして期待されている。最近では、ウシ (Kitagawa et al. 2011) やブタ (Muneta et al. 2010, Fuentes et al. 2011, 江原ら2012) といった家畜動物、またラット (Matsuura et al. 2012) やマウス (井上ら2009, Tsuchiya et al. 2014) といった実験動物を対象として、唾液 $\alpha$ -アミラーゼを指標としたストレス評価に関する報告もされている。

先行研究からシリアンハムスターにおいても唾液 $\alpha$ -アミラーゼによるストレス評価の可能性が示唆されている (津村・鈴木2014)。しかし、この研究では測定に必要なだけの唾液を採取できない個体も存在した。小型の動物では唾液量が少なく、またハムスターは唾液採取時の保定もマウスなどに比べ難しいため、唾液採取がうまく行えなかったと考えられる。そこで本研究はこうした問題を補完するための測定法の開発および正確性の検討を目的に行った。

本研究では全身麻酔によりハムスターを不動化させることで保定を容易に行えるようにした。ハムスターの形態的な特徴の一つに頬袋があり、サンプル量の確保はこの頬袋を利用することで可能になると考えた。麻酔下のハムスターの頬袋に生理食塩水を注入し再度回収することで唾液を含む十分量のサンプルを得ることに成功した。この方法で採取したサンプルにより正確な唾液 $\alpha$ -アミラーゼ測定が可能か否か、ストレス反応性、同時再現性、希釈直線性および冷凍保存性に関する試験を行いその結果から検討を行った。

## 材料および方法

### 使用動物

シリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) は日本エスエルシー株式会社 (静岡, 浜松) から購入したSlc: Syrianを使用した。実験は2~8ヶ月齢の性成熟したオス8個体 (体重: 77~131g) で行っ

た。飼育方法は、1ケージ (W: 396×H: 297×D: 240mm) ごと1匹あるいは2匹で飼育した。飼料は一般的な実験動物用固形飼料であるMF (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) を使用し、朝と夕の1日2回給餌した。飲み水は水道水を使用した。飼育中飼料と水は自由摂取させた。温度16~25℃、湿度は自然状態、明期12時間 (6:00-18:00) の環境で飼育した。全ての実験は10:00~15:00時の間に行った。動物実験は国立大学法人東京農工大学動物実験等に関する規定に則り、動物実験小委員会の承認を得て実施した。

### ストレス負荷

ストレス負荷の方法は、負荷により交感神経系が活性化することが報告されている強制水泳ストレスを選択した (Mabry et al. 1995)。強制水泳では、水槽 (W: 360×H: 210×D: 215mm) に深さ150mm、 $25 \pm 1$ ℃の水を張り泳がせた。ストレス負荷の時間は1~3分を各試験に合わせて適宜選択した。水泳をさせた個体は水泳後にタオルで水分を拭き取ってから、麻酔薬を投与しサンプル採取を行った。サンプル採取終了後、ドライヤーで十分に身体を乾かしてからそれぞれのケージに戻した。

### 麻酔

麻酔は斉藤の方法 (2000) に従いケタミン (50~100mg/kg) およびジアゼパム (3~5 mg/kg) の腹腔内投与で行った。麻酔は初めにケタミン50mg/kg およびジアゼパム 3 mg/kg を投与し麻酔深度により必要に応じて上記の範囲内で追加投与を行った。その後、麻酔による不動化を確認でき次第サンプルの採取に取りかかった。各個体において不動化までは5~20分の時間を要した。サンプル採取は保温マットにより体温の低下を防ぐ処置を行い、サンプル採取後ケージに戻し覚醒するまでの間はライトによる保温を行った。前回の麻酔の影響を受けないように実験は2週間以上の回復期間を設けて行った。

### サンプル採取

サンプル採取は全て麻酔によって不動化した状態で行った。まず初めに、ハムスターを横臥させ、誤嚥を防ぐため下側の頬袋に0.5mlの生理食塩水を注入した。その後、30秒間スパーテルを用い生理食塩水を頬袋内の口腔粘膜に沿うようにかき混ぜ、唾液を含む生理食塩水を回収した。生理食塩水の注入お

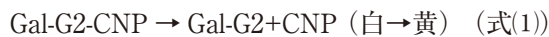


よび回収は1 ml シリンジに針を付けずに使用した。生理食塩水は全ての実験で70%以上の回収が可能であった。回収した生理食塩水は遠心分離(1分, 3600G)を行い, 沈下物を取り除きサンプルとし測定に使用した。

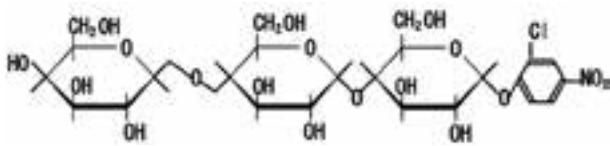
## 測定

唾液 $\alpha$ -アミラーゼの測定はレート法により行った。測定はGal-G2-CNP(2-クロロ-4-ニトロフェニル4- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシルマルトサイド)を基質として, 唾液 $\alpha$ -アミラーゼによる酵素反応の加水分解で生成する発色物質のCNP(2-クロロ-4-ニトロフェノール)(式(1))の主波長である405nmの光の反射率を測定し, アミラーゼ活性値に変換した(馬島ら1997)。基質の構造式は次に示す通りである。

AMY



基質の構造式:



測定機器は, 市販されている携帯型唾液アミラーゼモニター(酵素分析装置 唾液アミラーゼモニター, ニプロ株式会社, 大阪)を使用した。山口ら(2007)の研究方法に従い, 専用のチップに完全に飽和する検体量 $28 \mu\text{l}$ をマイクロピペットで定量および滴下した。その後, 速やかに説明書に従い唾液アミラーゼモニターにより唾液 $\alpha$ -アミラーゼの活性値を測定した。

## 試験項目

本研究ではシリアンハムスターにおいて唾液 $\alpha$ -アミラーゼ測定がストレス評価法として機能するか調査するためにストレス反応性, 測定の精度および安定性, サンプルの保存性に関しての試験を実施した。ストレス反応を評価することができるか検討するためにストレス検知試験, 測定の精度および安定性を検討するために同時再現性試験および希釈直線性試験, サンプルの保存性を検討するために冷凍保存性試験を行った。

まず初めにストレス検知試験では3個体を使用し, ストレスを2分間負荷した条件と負荷しなかった条件でサンプル採取し測定を行った。測定は三重

測定を行い, 各サンプルで平均値を算出した。群間の比較は対応のあるt検定で行い, P値 $<0.05$ を有意差ありと判断した。

同時再現性試験では4個体を使用し各個体から活性値の異なるサンプルを採取した。活性値の異なるサンプルを得るため, 個体により負荷するストレス強度を変えた。ストレス負荷をしなかった個体から採取したサンプル, ストレス1分間負荷した個体から採取したもの, 2分間負荷から採取したもの, 3分間負荷から採取したものを使用し試験した。各サンプルで連続5回の測定を行った。測定から各サンプルで平均値, 標準偏差および変動係数(CV)を算出した。

希釈直線性試験では6個体を使用し, 活性値の異なる3つのサンプルを調製した。一つ目のサンプルは水泳ストレスを負荷しなかった2個体分のサンプルを混合し調製した(サンプル①)。同様に, 二つ目のサンプルでは水泳ストレスを負荷しなかった1個体分および2分の水泳ストレスを負荷した1個体分のサンプルの混合により(サンプル②), 三つ目では2分の水泳ストレスを負荷した2個体分のサンプルを混合することで調製した(サンプル③)。調製したサンプルはそれぞれ生理食塩水により75, 50, 25, 12.5%の希釈系列を作成した。測定はそれぞれの希釈系列で三重測定を行った。それぞれのサンプルで回帰式を求め決定係数( $R^2$ )を算出した。

冷凍保存性試験におけるサンプルは希釈性試験と同様の手順により調製し, 3つのサンプルを用意した(サンプル①~③)。調製したサンプルは複数回の凍結融解を避けるため, それぞれ分注し冷凍保存した。測定は採取直後および採取後1~4週まで毎週行った。測定までの間サンプルは $-20^\circ\text{C}$ で冷凍保存した。解凍は測定の直前に行い, 自然解凍で室温まで戻した。測定は解凍後に三重測定を行った。統計はそれぞれのサンプルにおいて, 測定週を独立変数とした一元配置分散分析を行い, P値 $<0.05$ を有意差ありと判断した。

## 結果

ストレス検知試験において, ストレスを負荷しなかった際の3個体の平均値は $57 \pm 12 \text{KIU/L}$ (MEAN  $\pm$ SD)であった。また, ストレスを負荷した際の平均値は $88 \pm 9.3 \text{KIU/L}$ であった。t検定の結果はP=0.026であり, P $<0.05$ となり, ストレスを負荷した際の有意に高い活性値を確認した(図1)。この

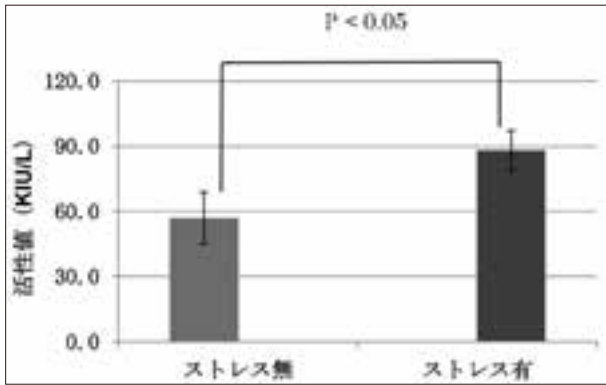


図1. ストレス検知試験

ことから強制水泳ストレスを負荷することで唾液 $\alpha$ -アミラーゼ活性の有意な上昇がみられることを確認した。

同時再現性試験の結果を表1に示す。水泳無しおよび水泳時間1～3分とストレス強度を変えることにより、平均値で42.6～148.8KIU/Lの範囲に値する活性値の異なるサンプルを得た。全ての活性値のサンプルにおいて変動係数は5%未満の値を示した。

希釈直線性試験では全てのサンプルにおいて高い直線回帰がみられた(図2)。希釈前の活性値が63KIU/Lであるサンプル②および79KIU/Lであるサンプル③においては、ともに決定係数0.99以上の結果を示した。また、38KIU/Lのサンプル①においても決定係数0.97以上の値を示した。

冷凍保存性試験の結果を図3に示す。3サンプルの採取直後の活性値はそれぞれ、 $42 \pm 1.7$ KIU/L、 $60 \pm 4.9$ KIU/L、 $79 \pm 1.4$ KIU/Lであった。測定週を独立変数とした一元配置分散分析の結果、全てのサンプルで週ごとの活性値平均の差に有意差はないという結果が示された(Sample ①:  $F(4,10)=0.64$   $P>0.05$ , Sample ②:  $F(4,10)=0.45$   $P>0.05$ , Sample ③:  $F(4,10)=3.39$   $P>0.05$ )。

表1. 同時再現性 (単位: KIU/L)

| Sample | n | MEAN  | MAX | MIN | SD   | CV(%) |
|--------|---|-------|-----|-----|------|-------|
| 0 min  | 5 | 42.6  | 46  | 40  | 1.96 | 4.6   |
| 1 min  | 5 | 57.8  | 60  | 53  | 2.56 | 4.4   |
| 2 min  | 5 | 82.2  | 85  | 79  | 1.94 | 2.4   |
| 3 min  | 5 | 148.8 | 153 | 141 | 4.66 | 3.1   |

(Sample: ストレス負荷時間, n: 標本数, MEAN: 平均, MAX: 最大値, MIN: 最小値, SD: 標準偏差, CV: 変動係数)

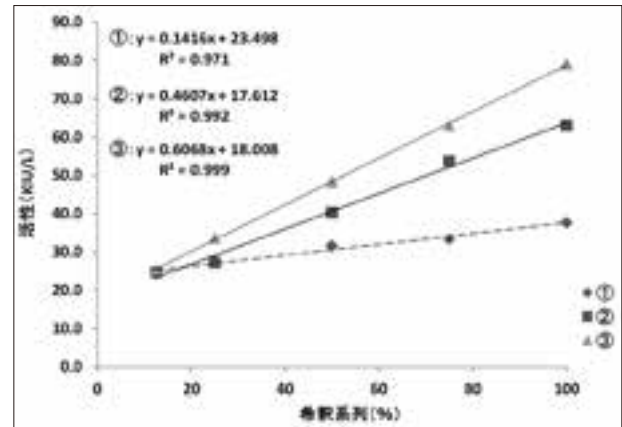


図2. 希釈直線性

サンプル①:  $N \times 2$ , サンプル②:  $N \times 1 + S \times 1$ ,  
サンプル③:  $S \times 2$   
(N: 非ストレス個体, S: ストレス個体)

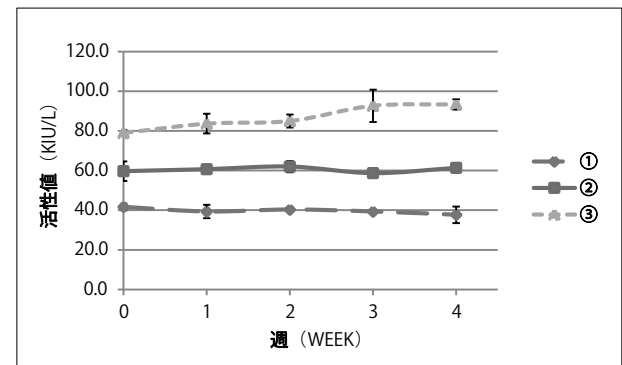


図3. 冷凍保存性

サンプル①:  $N \times 2$ , サンプル②:  $N \times 1 + S \times 1$ ,  
サンプル③:  $S \times 2$   
(N: 非ストレス個体, S: ストレス個体)

## 考察

交感神経はストレス刺激により活性化する。この交感神経の活動を測定することでストレスを評価することが出来る。交感神経が活性化すると副腎髄質におけるカテコールアミンの分泌が促進される。カテコールアミンの一種であるノルエピネフリンは以前から交感神経活動のマーカーとして研究されており、現在では確立したマーカーとして使われている(Mabry et al. 1995)。この血漿由来のノルエピネフリン濃度と唾液 $\alpha$ -アミラーゼ濃度には相関性がみられ、唾液 $\alpha$ -アミラーゼも交感神経活性のマーカーとしての可能性が示唆されるようになった(Chatterton Jr. et al 1996)。

唾液アミラーゼ測定でストレスを評価することには多くの利点がある。従来の方法では採血によるサンプル採取は侵襲性が高く、小型げっ歯類においては同一個体での反復測定が困難であった。唾液によ

るストレス評価はこれらの欠点を補うものとして大きな可能性を持っている。こうした唾液アミラーゼとストレスの関係についての研究はヒトにおいて展開されてきた。数年前に簡易測定が可能な携帯式の測定器も販売され唾液アミラーゼ測定は一般的なストレス評価系になりつつあるといえる。また、近年ではウシやブタといった家畜動物を中心に動物への応用も報告がなされるようになった。一方で、イヌやネコといった愛玩動物に対しては唾液アミラーゼによるストレス評価はなされてきていない。これはイヌやネコといった肉食動物ではデンプン分解酵素である唾液アミラーゼの分泌がほとんど無く測定が困難であるためと考えられる。また、マウスやハムスターといった小型げっ歯類の実験動物では、唾液アミラーゼの分泌は十分にあるが唾液そのものが少量で測定に必要な量を確保するのが困難であった。そのためハムスターにおいて、本研究では頬袋と生理食塩水を利用したサンプル採取法で、測定に必要な十分量のサンプル量の確保を試みた。

ストレス検知試験では、唾液を含む生理食塩水のサンプルを用いた測定でストレス反応を評価できるか検討した。試験の結果はストレスを負荷した際の活性値がストレスを負荷しなかった際のそれと比べ有意に高い値をとった。これは、ストレス負荷による唾液酵素の分泌促進反応、つまり交感神経系の活性化としてみられるストレス反応を本測定法により捉えることが可能であることを示している。先行研究(津村・鈴木 2014)からハムスター唾液によるストレス評価の可能性は示唆されており、本研究結果は予測していたものとなった。しかし、本研究と先行研究とで示された活性値に大きな違いがみられた。違いがみられたのはストレスを負荷しなかった際の値で、先行研究では平均値が $17 \pm 3.1$ KIU/Lであったのに対し、本研究の結果では $57 \pm 12$ KIU/Lであった。本研究と先行研究の違いは三つあり、一つは本研究では麻酔下でサンプルの採取を行ったこと、二つ目は、本研究ではサンプルとして生理食塩水に唾液を含ませたものを使用したのに対し、先行研究では測定用のチップを直接頬袋に挿入し唾液を採取し測定したことである。また、三つ目は負荷したストレスが異なり、今回は強制水泳ストレスを負荷したのに対し、先行研究では自転車輸送による輸送ストレスを負荷した。違いがみられたのは平常時の活性値であるためストレスの負荷方法はここでは関係がない。また、サンプルの採取法では、本研究

では唾液の溶液を使用しており、直接唾液をサンプルとしたものに比べ活性値は低値を示すことが予測されていた。そこで、この要因として麻酔の関与が疑われる。今回使用した麻酔薬にケタミンがある。ケタミンにより麻酔をかけると、心拍数や動脈圧、心拍出量の上昇がみられる。これは、ケタミンによる中枢の交感神経の興奮あるいは交感神経末端でのノルエピネフリンの再取り込みの阻害によるものである。また、血漿中のノルエピネフリンの上昇がケタミン注入後の2~4分後に起こり、15分後に元に戻るということが報告されている(柳澤ら 2009)。さらに、ノルエピネフリンと唾液 $\alpha$ -アミラーゼは正の相関を示すことを考慮すると、ケタミンを使用したことにより唾液 $\alpha$ -アミラーゼの活性値の上昇が起きたのだと考えられる。麻酔によりアミラーゼ活性が上昇する可能性があるため、無麻酔下および麻酔下でのストレス評価の結果を比較する際には注意する必要があるだろう。ストレス評価の中には外科手術によるストレスの評価などの麻酔使用を前提としたものも含まれる。こうした条件のストレス評価をより正確に行うためには、今後麻酔と唾液アミラーゼ分泌との関係に関する研究を進めていく必要があるだろう。

測定精度および安定性を検討するための同時再現性試験では、4つの濃度のサンプルで2.4~4.6%の変動係数を示し、高い再現性を確認することが出来た。再現性10%というのが一般的に許容される統計的判定の正確性であり、結果は全てこの10%以内のものであった。このことから十分に精度の高い測定が可能であることが確認された。また、正確性のもう一つの指標として行った希釈直線性試験の結果は、全ての濃度で $R^2 > 0.97$ という高い直線回帰がみられた。以上のことからハムスター唾液を生理食塩水で希釈しても高い正確性を保つことができ、高い精度の予測値を求めることも可能であることが分かった。今回使用した測定機器はヒト唾液用に開発されており、他の動物種に応用された報告はない。著者らの研究はこの機器の測定系に初めてハムスター唾液を使用したものである。結果からこの測定系へのハムスター唾液の交差性がみられ、精度の高い安定した測定が可能であることが分かった。

冷凍保存性試験の結果から活性値に影響を与えない安定した保存性も確認された。採取直後に測定を行えない場合にサンプルを冷凍保存することは一般的な方法であるとされている。また、ヒト唾液では

24時間以内であれば室温や冷蔵（4℃）条件での保存も可能であると報告されている（Granger et al. 2007）。今回の実験では複数回の凍結融解を避けるためにサンプルを分注し保存したが、上述の報告によれば複数回の凍結融解は唾液  $\alpha$ -アミラーゼアッセイに有意な影響を与えないとされている。このようなことから唾液は保存性に優れた試料であるといえる。こうした点にも唾液を試料とするストレス評価の利点がみてとれる。

本研究では急性ストレス反応に限定し、その反応性および測定精度の検討を行った。シリアンハムスターにおける唾液  $\alpha$ -アミラーゼ測定では、ストレスを検知することが可能であり、高い精度と安定性を確認した。また、サンプル凍結による安定的な保存法も確認できた。これらから、シリアンハムスターにおける急性ストレス反応では、唾液  $\alpha$ -アミラーゼ測定によるストレス評価が十分に可能であると考えられる。

今後のストレス評価研究の課題として慢性ストレスの評価があげられる。本測定法のような唾液試料を用いたストレス評価法は反復性に優れた方法であるため、継続的に慢性ストレスをモニターするのに適していると考えられる。しかし、慢性ストレスは急性ストレスに比べその研究報告は少なく、評価に使用できる確立されたマーカーも数少ない。唾液  $\alpha$ -アミラーゼにおいても同様に慢性ストレスマーカーとしての研究報告は少ないが、近年唾液  $\alpha$ -アミラーゼの慢性ストレスマーカーとしての可能性が示唆された。Matsuura ら（2012）の報告によれば、標準状態の唾液  $\alpha$ -アミラーゼの活性値と比較した際に、急性ストレス条件では有意に高い値を示すのに対し、慢性ストレス条件では有意に低い値を示す傾向にあることが示され、慢性ストレスによる交感神経活性の減弱が示唆された。しかしその一方で、他の研究ではクロモグラニン A の分泌動態から慢性ストレスによる交感神経活性の増進が確認されている（米山ら 2013）。このような違いは負荷している慢性ストレスのかけ方や実験動物対象種の違いなどに起因していると考えられる。しかし、慢性ストレスに関する研究が少ないためこうした議論を十分にするのは難しい。そのため、慢性ストレスによる生理的な反応に関する研究の積み上げが課題となっている。慢性ストレスマーカーを確立し、こうした研究の積み上げをすることによって、今後のストレス関連疾患の研究の進展に期待が出来る。

## 引用文献

- 1) Chatterton Jr., R. T., Vogelsong, K. M., Lu, Y. C., Ellman, A. B. and Hudgens, G. A. (1996): Salivary  $\alpha$ -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical Physiology*, 16: 433-448.
- 2) 江原史雄・塩見宜久・尾野喜孝（2012）：ブタにおける唾液アミラーゼ活性のストレス指標としての有効性. *Coastal Bioenvironment*, 19 : 49-53.
- 3) Fuentes, M., Tecles, F., Gutierrez, A., Ojal, J., Martínez-Subiela, S. and Ceroán, J.J. (2011): Validation of an automated method for salivary alpha-amylase measurements in pigs (*Sus scrofa domestica*) and its application as a stress biomarker. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23: 282-287.
- 4) Granger, D. A., Kivlighan, K. T., Mona, El-Sheikh, Godis, E. B. and Stroud, L. R. (2007): Salivary  $\alpha$ -amylase in biobehavioral research – recent developments and applications –. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098: 122-144.
- 5) Head, R. J., Jarrott, B., Libys, J., Robinson, R. L., Stitzel, R. E. and Zavisca, F. (1985): Influence of blood sampling conditions upon histamine concentrations in rat plasma: a study of a complex relationship with plasma epinephrine. *Neurochemistry International*, 7: 473-479.
- 6) 井上毅彦・植谷和義・木村穰・梶原景正（2009）：唾液中  $\alpha$  アミラーゼ量変動を用いたマイクロ無痛針最大許容外径の探索. 2009年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集, 49-50.
- 7) 井澤修平・城月健太郎・菅谷渚・小川奈美子・鈴木克彦・野村忍（2007）：唾液を用いたストレス評価—採取及び測定手順と各唾液中物質の特徴—. *日本補完代替医療学会誌*, 4 : 91-101.
- 8) Kitagawa, A., Akasaka, C., Ninomiya, S. (2011): The validity of salivary-amylase as stress-marker of cattle. *Journal of Integrated Field Science*, 8: 114.
- 9) Mabry, T. R., Gold, P. E. and McCarty, R. (1995): Age-related changes in plasma catecholamine responses to acute swim stress. *Neurobiology*

- of Learning and Memory, 63: 260-268.
- 10) 馬島肇一・浅野茂樹・川村良久 (1997): 2-クロロ-4-ニトロフェニル 4-O- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシルマルトサイド (Gal G2 CNP) を用いたアミラーゼ測定法. 臨床化学, 26: 63.
  - 11) Matsuura, T., Takiimura, R., Yamaguchi, M. and Ichinose, M. (2012): Estimation of restraint stress in rats using salivary amylase activity. Journal of Physiological Sciences, 62: 421-427.
  - 12) Muneta, Y., Yoshikawa, T., Mitagawa, Y., Shibahara, T. and Maeda, R. (2010): Salivary IgA as a useful non-invasive marker for restraint stress in pigs. Journal of Veterinary Medical Science, 72: 1295-1300.
  - 13) 中根英雄 (1999): 新規精神的ストレス指標としての唾液クロモグラニン A. 豊田中央研究所 R & D レビュー, 34: 17-22.
  - 14) Nater, U. M. and Rohleder, N. (2009): Salivary alpha amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. Psychoneuroendocrinology, 34: 486-496.
  - 15) 斉藤久美子 (2000): 麻酔と手術. ハムスター学入門, 75-82, インターズー, 東京.
  - 16) 田中喜秀・脇田慎一 (2011): ストレスと疲労のバイオマーカー. 日本薬理学雑誌, 137: 185-188.
  - 17) Tsuchiya, K., Saidin, M.Y.B., Inoue, T. and Kajiwara, K. (2014): Qualitative measurement of pain by analyzing the salivary alpha amylase. Precision Engineering, 38: 257-260.
  - 18) 津村遼・鈴木馨 (2014): ゴールデンハムスターにおける唾液 $\alpha$ -アミラーゼのストレスマーカーとしての利用可能性. フィールドサイエンス, 12: 7-10.
  - 19) 山口昌樹・吉田博 (2005): 唾液アミラーゼ活性による交感神経モニタの実用化. Chemical Sensors, 21: 92-98.
  - 20) 山口昌樹・花輪尚子・吉田博 (2007): 唾液アミラーゼ式交感神経モニタの基礎的性能. 生体医工学, 45: 161-168.
  - 21) 柳澤輝行・飯野正光・丸山敬・三澤美和 監訳 (2009): 全身麻酔薬. カツング薬理学 [原書10版], 443, 丸善株式会社, 東京.
  - 22) 米山早苗・砂川正隆・本田豊・池本英志・須賀大樹・岩本泰斗・石川慎太郎・中西孝子・久光正・岡田まゆみ (2013): 急性および慢性痛発生時のストレスマーカーとしての唾液クロモグラニンAの分泌動態. 昭和学士会雑誌, 73: 85-90.

## 論文

## 牛糞便からの新規ウシエンテロウイルスの検出と遺伝子解析

岡田 貴志<sup>\*1,2</sup>・土赤 忍<sup>\*1,3</sup>・増田 恒幸<sup>\*4</sup>・大松 勉<sup>\*1</sup>  
 長井 誠<sup>\*1,5</sup>・押谷 仁<sup>\*2</sup>・水谷 哲也<sup>\*1</sup>

## Detection and molecular analysis of novel bovine enterovirus from bovine feces

Takashi OKADA<sup>\*1,2</sup>, Shinobu TSUCHIYAKA<sup>\*1,3</sup>, Tsuneyuki MASUDA<sup>\*4</sup>, Tsutomu OMATSU<sup>\*1</sup>  
 Makoto NAGAI<sup>\*1,5</sup>, Hitoshi OSHITANI<sup>\*2</sup>, Tetsuya MIZUTANI<sup>\*1</sup>

Bovine enteroviruses (BEVs) are usually isolated from asymptomatic cattle. However, several studies have detected BEV in cattle with diarrhea suggesting that some BEVs may have ability to cause disease in cattle. Data on molecular analysis of BEVs are limited in Japan. In this study, we performed complete genome analysis of a BEV strain detected in Japan, designated as Tottori-U31. The complete genome of Tottori-U31 comprises 7,411 nucleotides, including a large open reading frame with three sub-genomic regions, P1, P2 and P3, which encodes 2,167 amino acids. The nucleotide identities of Tottori-U31 with those of other BEVs were 56.3–74.8% in VP1, 60.5–74.9% in P1, 66.7–79.9% in P2 and 68.7–84.7% in P3. Phylogenetic analysis of P1 region suggests that Tottori-U31 may fall into a novel BEV under *Enterovirus* species F. We tentatively named this novel genotype as F7. Further studies are required to understand prevalence and pathogenesis of that novel BEV strain.

**Keywords:** bovine enterovirus, cattle, next generation sequencing, Tottori-U31

ウシエンテロウイルス (BEVs) は、通常、無症状のウシから分離される。ウシエンテロウイルスは下痢症状を示すウシからも検出され、病気を引き起す可能性を示唆する研究結果もある。しかしながら日本でのウシエンテロウイルスの分子解析の知見はほとんどない。

そこで、我々は本研究において日本国内で検出されたウシエンテロウイルス Tottori-U31株の全塩基配列の解析をおこなった。Tottori-U31株の全塩基配列は7,411塩基で、2,167のアミノ酸からなる1つのOpen reading frameをコードし、その中に3つのサブゲノム領域 (P1, P2, P3) を含む。Tottori-U31株と他のBEVs株との塩基レベルでの相同性は、VP1は56.3–74.8%、P1は60.5–74.9%、P2は66.7–79.9%、P3は68.7–84.7%であった。P1領域を対象とした系統解析の結果、Tottori-U31株はエンテロウイルスF型に

2015. 11. 4 受付 ; 2016. 3. 16 受理

\*1 東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター Research and Education Center for Prevention of Global Infectious Diseases of Animal, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan

\*2 東北大学大学院医学系研究科微生物学分野 Department of Virology, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan

\*3 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagito, Gifu, Gifu 501-1193, Japan

\*4 鳥取県倉吉家畜保健衛生所 Tottori Prefecture Kurayoshi Livestock Hygiene Service Center, 2-132 Seidanichou, Kurayoshi, Tottori 680-1132, Japan

\*5 東京農工大学農学部共同獣医学科獣医伝染病学教室 Laboratory of Epizootiology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan

† 連絡担当著者 : 水谷哲也 東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター

〒183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8 Tel : 042-367-5749 Fax : 042-367-5742

e-mail : tmizutan@cc.tuat.ac.jp

属する新規ウシエンテロウイルスである可能性が示唆された。そのため、我々は Tottori-U31株を暫定的に新しい遺伝子型である F7とした。今後、この新規ウシエンテロウイルスの感染状況と病原性についてさらなる研究が必要である。

キーワード：ウシエンテロウイルス, ウシ, 次世代シーケンス, Tottori-U31

## 1. Introduction

The genus *Enterovirus*, belonging to the family *Picornaviridae*, is a non-enveloped small virus with positive single-stranded genomic RNA and comprises of 12 species: *Enterovirus* A-J and *Rhinovirus* A-C (<http://www.picornaviridae.com>). The species *Enterovirus* E and F were formerly classified as group A and B of bovine enteroviruses (BEVs) (Kunin and Minuse, 1985; Moscovici and La Placa, 1962). Enterovirus E and F, i. e. BEV-A and BEV-B are further subdivided into 10 serotypes (including EV-E1-4 and EV-F1-6) based on their molecular characteristics (Huck and Cartwright, 1964; Knowles and Barnett, 1985, Zell et al., 2006). BEVs were first isolated in the late 1950s (Kunin and Minuse, 1958; Moll and Finlayson, 1957). BEVs are widely circulating among livestock, particularly in cattle (Ley *et al.*, 2002). However their pathogenicity in cattle is still unclear. Since BEVs are usually isolated from asymptomatic cattle and calves, the viruses are therefore not considered to be associated with disease in cattle. However, some studies reported significant symptoms including fever, diarrhea, myocarditis, and abortion after experimental inoculations of BEVs in cattle (Blas-Machado *et al.*, 2007). There is limited information on BEV in cattle in Japan, and to our best knowledge, no molecular study of BEV has been conducted in Japan so far. In this study, we detected a novel BEV strain from a bovine in Japan and also performed complete genome analysis of this novel BEV strain.

## 2. Materials and methods

### Sampling of fecal sample

We collected 10 bovine fecal samples from asymptomatic or diarrheal cattle from the Tottori Prefecture Kurayoshi Livestock Hygiene Service

Center during December, 2012 to August, 2014 and virus isolation was performed using MDBK cells.

### Whole genome analysis by the next generation sequencing

Viral RNA was extracted from cell culture supernatant using the TRIzol LS Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Complementary DNA library for the next generation sequencing was constructed using the NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. The next generation sequencing was conducted using a MiSeq bench-top sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA) using 51 nucleotide (nt) single reads. Sequence analysis was performed using the MiSeq Reporter v1 (Illumina) to generate FASTQ formatted sequence data. Trimmed reads were assembled into contigs using *de novo* assembly in CLC Genomics Workbench 6.0 (CLC bio, Aarhus, Denmark). Pairwise sequence identity was determined using CLC Genomics Workbench 6.0 (CLC bio). Phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method in Molecular Evolutionary Genetics Analysis software ver. 6 (MEGA) including the nucleotide sequences of the coding P1 region (2,499 bp) of Tottori-U31 and other BEV sequences obtained from the GenBank.

## 3. Results

### Detection of a novel BEV strain

We first detected a novel BEV strain, Tottori-U31 by next generation sequencing from bovine feces of a total of 10 collected fecal samples. The complete genomic sequence of the BEV strain was deposited in the Gen Bank database under the accession number LC081216.

**Whole genome sequencing of the novel strain, Tottori-U31**

We then performed the whole genome sequencing of the detected novel strain, Tottori-U31. The result revealed that the genome of Tottori-U31 has 7,411 nt long excluding the poly (A) tail. It includes a single large open reading frame containing 6,501 nt, which encodes a polyprotein precursor of 2,167 amino acids (aa), flanked by the 5' untranslated region (UTR) (836 nt) and the 3' UTR (71 nt).

Phylogenetic tree was constructed from the nucleotide sequence of the P1 coding region of Tottori-U31 together with representative strains of BEVs. In the phylogenetic tree, Tottori-U31 was included in the same cluster with other *Enterovirus* species F (BEV-B), however it formed an independ-

ent lineage (Fig.1). The representative stains used for the analysis are shown in Table 1. Pair-wise alignment of the nucleotide sequence of Tottori-U31 with those of BEVs also found in close agreement with the results of the phylogenetic analysis.

The enterovirus VP1 gene sequencing provides an important source of information for classification of serotypes (Caro et al., 2001; Casas et al., 2001; Moll and Davis, 1959; Minor, 1990) (Shahzad Shaukat et al., 2012). Serotypes of enteroviruses used to be determined by serological testing including identification of the new serotype. For identification of a new serotype, cut-off values of <75% of nucleotide identity and <88% amino acid identity in VP1 gene sequence with any known genotypes have been proposed (Oberste et al., 1999; Shahzad

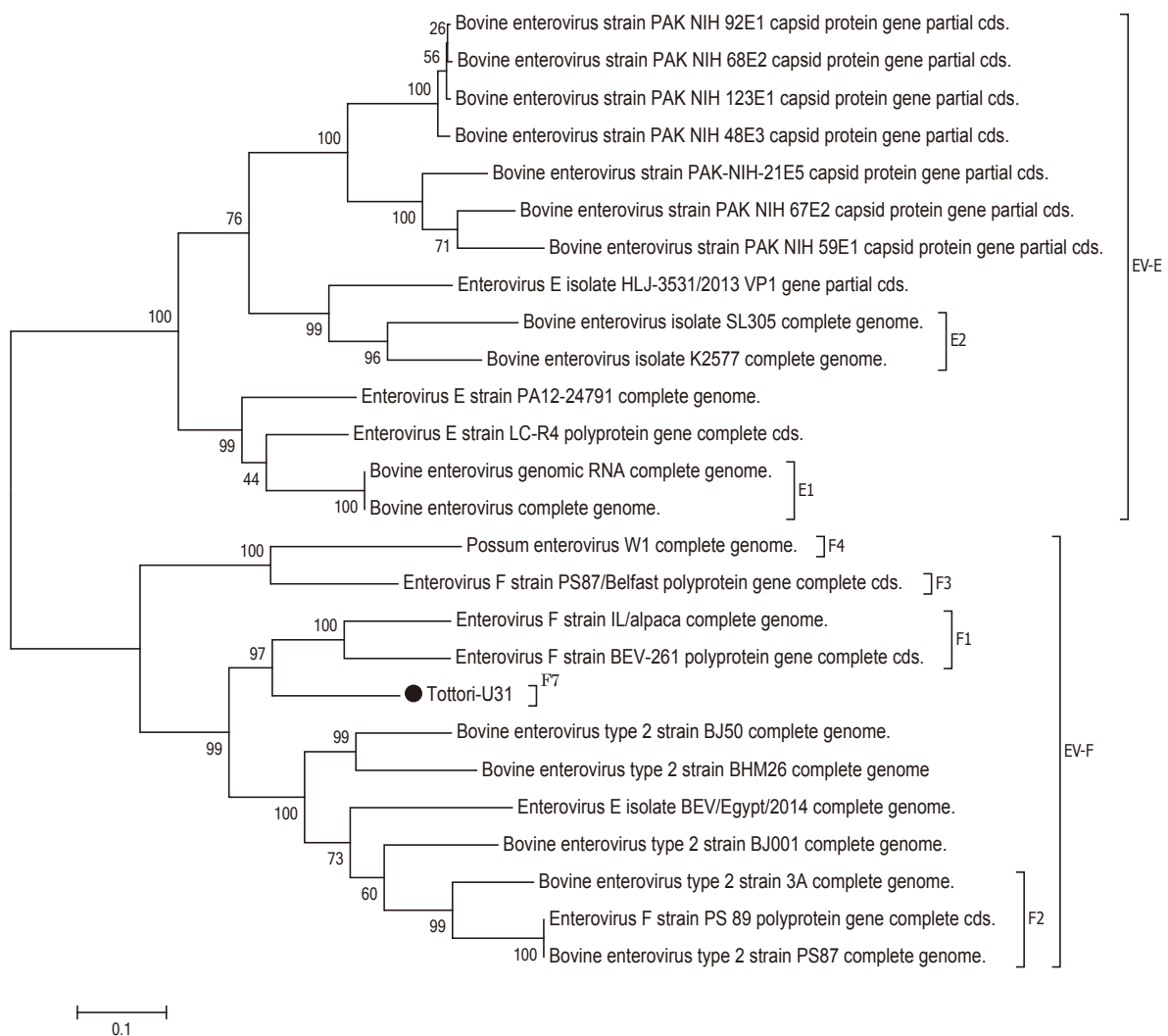


Figure 1. Phylogenetic tree constructed through the maximum likelihood method in MEGA 6.0 using complete P1 nucleotide sequences of Tottori-U31 strain (labeled ●) with reference BEV sequences from GenBank. The bootstrapping was performed with 1,000 times repetition



Table 1. Accession no. and Strain name from GenBank used in phylogenetic tree.

| Species | Serotype | Accession no. |   | Date | Host          | Country        |
|---------|----------|---------------|---|------|---------------|----------------|
| E       | 1        | NC001859      | Bovine enterovirus, complete genome                                       | 1987 |               |                |
| E       | 1        | D00214        | Bovine enterovirus genomic RNA, complete genome                           | 1988 |               |                |
| E       | 2        | AF123433      | Bovine enterovirus isolate SL305, complete genome                         | 1999 | Australia     |                |
| E       | 2        | AF123432      | Bovine enterovirus isolate K2577, complete genome                         | 1999 | Australia     |                |
| E       |          | JQ690746      | Bovine enterovirus strain PAK_NIH_92E 1 capsid protein gene partial cds.  | 2010 | sewage sample | Pakistan       |
| E       |          | JQ690745      | Bovine enterovirus strain PAK_NIH_68E 2 capsid protein gene partial cds.  | 2010 | sewage sample | Pakistan       |
| E       |          | JQ690744      | Bovine enterovirus strain PAK_NIH_67E 2 capsid protein gene partial cds.  | 2010 | sewage sample | Pakistan       |
| E       |          | JQ690743      | Bovine enterovirus strain PAK_NIH_59E 1 capsid protein gene partial cds.  | 2010 | sewage sample | Pakistan       |
| E       |          | JQ690742      | Bovine enterovirus strain PAK_NIH_48E 3 capsid protein gene partial cds.  | 2011 | sewage sample | Pakistan       |
| E       |          | JQ690747      | Bovine enterovirus strain PAK_NIH_123E 1 capsid protein gene partial cds. | 2010 | sewage sample | Pakistan       |
| E       |          | JQ690741      | Bovine enterovirus strain PAK-NIH-21E 5 capsid protein gene partial cds.  | 2009 | sewage sample | Pakistan       |
| E       | 1        | KC667561      | Enterovirus E strain PA12-24791 complete genome.                          | 2013 | bovine lung   | USA            |
| E       | 1        | DQ092769      | Enterovirus E strain LC-R 4 polyprotein gene complete cds.                | 2006 | USA           |                |
| E       |          | KJ956699      | Enterovirus E isolate HLJ-3531/2013 VP 1 gene partial cds.                | 2014 | bovine        | China          |
| F       | 1        | DQ092770      | Enterovirus F strain BEV-261 polyprotein gene, complete cds               | 2006 |               |                |
| F       | 1        | KC748420      | Enterovirus F strain IL/alpaca complete genome.                           | 2007 | alpaca        | USA            |
| F       | 2        | AY508696      | Bovine enterovirus type 2 strain PS87, complete genome                    | 2004 | bovine        | United Kingdom |
| F       | 2        | AY508696      | Enterovirus F strain PS 89 polyprotein gene, complete cds                 | 2006 | bovine        | United Kingdom |
| F       | 2        | AY508697      | Bovine enterovirus type 2 strain 3 A, complete genome                     | 2004 | bovine        | USA            |
| F       | 3        | DQ092794      | Enterovirus F strain PS87/Belfast polyprotein gene, complete cds          | 2006 | USA           |                |
| F       | 4        | AY462106      | Possum enterovirus W1, complete genome                                    | 2007 |               |                |
| F       | 2        | KM667941      | Enterovirus E isolate BEV/Egypt/2014 complete genome.                     | 2014 | bovine        | Egypt          |
| F       |          | HQ917061      | Bovine enterovirus type 2 strain BJ50 complete genome.                    | 2008 | bovine        | China          |
| F       |          | HQ663846      | Bovine enterovirus type 2 strain BJ001 complete genome.                   | 2009 | bovine        | China          |
| F       |          | HQ917060      | Bovine enterovirus type 2 strain BHM26 complete genome                    | 2008 | bovine        | China          |

Table 2. Pairwise nucleotide sequence identity (%) comparisons of Tottori-U31 to other bovine enteroviruses

| Species | Serotype | Strain name  | Accession no. | Pairwise nucleotide identity (%) |      |      |      |
|---------|----------|--------------|---------------|----------------------------------|------|------|------|
|         |          |              |               | VP 1                             | P 1  | P 2  | P 3  |
| E       | 2        | K2577        | AF123432      | 59.2                             | 61.0 | 67.1 | 69.1 |
| E       | 2        | SL305        | AF123433      | 56.3                             | 60.5 | 66.7 | 68.7 |
| F       | 1        | IL/alpaca    | KC748420      | 74.2                             | 74.9 | 79.9 | 83.4 |
| F       | 1        | BEV-261      | DQ092770      | 74.8                             | 74.7 | 78.9 | 84.7 |
| F       |          | BJ50         | HQ917061      | 71.2                             | 72.2 | 77.2 | 83.9 |
| F       |          | BJ001        | HQ663846      | 71.1                             | 71.9 | 78.4 | 81.6 |
| F       |          | BHM26        | HQ917060      | 71.0                             | 71.5 | 77.6 | 80.3 |
| F       | 2        | PS89         | DQ092795      | 72.5                             | 71.5 | 76.6 | 84.6 |
| F       | 2        | 3 A          | AY508697      | 71.4                             | 71.4 | 77.6 | 83.5 |
| F       | 3        | PS87/Belfast | DQ092794      | 64.1                             | 70.1 | 79.6 | 84.2 |

Shaukat et al., 2012). Pair-wise alignment of the nucleotide sequence of Tottori-U31 with other *Enteroviruses* species E strains were ranging from 56.3–59.2% for VP1, 60.5–61.0% for P1, 66.7–67.1% for P2 and 68.7–69.1% for P3 and those with species F

were from 64.1–74.8% for VP1, 70.1–74.9% for P1, 76.6–79.9% for P2 and 80.3–84.7% for P3 (Table 2). Pair-wise alignment of the amino acid sequence of Tottori-U31 with those of BEVs revealed that amino acid identities of Tottori-U31 with species E

Table 3. Pairwise amino acid identity (%) comparisons of Tottori-U31 to other bovine enteroviruses

| Species | Serotype | Strain name  | Accession no. | Pairwise amino acid identity (%) |      |      |      |
|---------|----------|--------------|---------------|----------------------------------|------|------|------|
|         |          |              |               | VP 1                             | P 1  | P 2  | P 3  |
| E       | 2        | K2577        | AF123432      | 32.4                             | 65.8 | 77.3 | 79.7 |
| E       | 2        | SL305        | AF123433      | 28.4                             | 65.3 | 77.2 | 79.2 |
| F       | 1        | IL/alpaca    | KC748420      | 43.1                             | 90.6 | 96.8 | 97.8 |
| F       | 1        | BEV-261      | DQ092770      | 45.3                             | 90.4 | 93.6 | 98.2 |
| F       | BJ50     | HQ917061     | 38.3          |                                  |      |      |      |
| F       | BJ001    | HQ663846     | 39.8          | 85.4                             | 92.7 | 94.8 |      |
| F       | BHM26    | HQ917060     | 38.0          | 86.3                             | 92.9 | 94.8 |      |
| F       | 2        | PS89         | DQ092795      | 43.5                             | 85.4 | 93.0 | 98.1 |
| F       | 2        | 3 A          | AY508697      | 39.4                             | 85.7 | 92.5 | 98.2 |
| F       | 3        | PS87/Belfast | DQ092794      | 35.0                             | 79.1 | 96.0 | 98.4 |

strains were ranging from 28.4–32.4% for VP1, 65.3–65.8% for P1, 77.2–77.3% for P2 and 79.2–79.7% for P3 and those with species F were ranging from 35.0–45.3% for VP1, 79.1–90.6% for P1, 92.5–96.8% for P2, 94.8–98.4% for P3 (Table 3). Tottori-U31 exhibited sequence variations with other BEVs in pairwise identity and phylogenetic tree suggesting that it may fall into novel BEV-B that we tentatively classify Tottori U31 as a member of the genotype F7.

#### 4. Discussion

We identified a BEV strain from a bovine in Tottori Prefecture in Japan designated as Tottori-U31, which may be a new genotype under *Enterovirus* species F. The maximum nucleotide and amino acid identities of Tottori-U31 with representative strains of known serotypes were 74.8% and 45.3%, respectively. The phylogenetic tree (Fig.1) also showed that Tottori-U31 formed a separate cluster from other known serotypes. The most closely related serotype is F1 in species F, but the bootstrap value of the common node for F1 and Tottori-U31 was 97. F5 and F6 were reported though their sequence data are not published in the databases (Shahzad Shaukat et al., 2012). Therefore, we consider Tottori-U31 as a new genotype of *Enterovirus* species F, tentatively designated as genotype F7.

BEVs are generally non-pathogenic and result in subclinical infections in cattle and calves (Ley et al., 2002). However, some studies reported significant

symptoms including fever, diarrhea, myocarditis, and abortion after experimental inoculations of BEVs to cattle (Blas-Machado et al., 2007). Pathogenesis of BEV in cattle is yet to be meticulously studied. Despite a lot of information available for human enteroviruses, there is insufficient information about BEV in cattle including its pathogenesis. The data on BEVs is also limited in Japan.

Recently a novel BEV in species E was identified from cattle with severe clinical symptoms (Zhang et al., 2014). Although Tottori-U31 strain was detected from an asymptomatic bovine, pathogenicity of the virus is yet to be defined.

Further studies are needed to understand the molecular epidemiology and pathogenesis of BEV and its inter-species transmission to other domestic animals and humans.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Research Project for Improving Food Safety and Animal Health of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan.

#### References

- Blas-Machado U, Saliki JT, Boileau MJ, Goens SD, Caseltine SL, Duffy JC, Welsh RD. (2007): Fatal ulcerative and hemorrhagic typhlocolitis in a pregnant heifer associated with natural bovine enterovirus type-1 infection. *Vet Pathol*, 44 : 110–115.

- Caro V, Guillot S, Delpeyroux F, Crainic R. (2001). Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J Gen Virol*, 82 : 79-91.
- Casas I, et al. (2001) Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples : comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol*, 65, 138-148.
- Huck, R. A. and S. F. Cartwright. (1964) Isolation and classification of viruses from cattle during outbreaks of mucosal or respiratory disease and from herds with reproductive disorders. *J Comp Pathol*, 74, 346-65.
- Knowles NJ, Barnett IT. (1985) A serological classification of bovine enteroviruses. *Arch Virol*, 83, 141-155.
- Kunin CM, Minuse E. (1958) The isolation in tissue culture, chick embryo and suckling mice of filtrable agents from healthy dairy cattle. *J Immunol*, 80, 1-11.
- Ley, V., J. Higgins, and R. Fayer. (2002) Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol*, 68, 3455-61.
- Minor PD. (1990) Antigenic structure of picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 161 : 121-154.
- Moscovici C, La Placa M. (1962) Further studies of bovine enteroviruses-tentative scheme of classification. *Am J Vet Res*, 23, 645-648.
- Moll T, Finlayson AV. (1957) Isolation of cytopathogenic viral agent from the feces of cattle. *Science*, 126, 401-402.
- Moll T, Davis AD. (1959) Isolation and characterization of cytopathogenic enteroviruses from cattle with respiratory disease. *Am J Vet Res*, 20, 27-32.
- Oberste MS, et al. (1999) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*, 37, 1288-1293.
- Shaukat S, et al. (2012) Molecular identification and characterization of a new type of Bovine Enterovirus. *Appl Environ Microbiol*, 78(12):4497-4500
- Zell R, Krumbholz A, Dauber M, Hoey E, Wutzler P (2006) Molecular-based reclassification of the bovine enteroviruses. *J Gen Virol*, 87, 375-385.
- Zhang, H., et al. (2014) Characterization of an Enterovirus species E isolated from naturally infected bovine in China. *Virus Res*, 191, 101-7.
- The Home of Picornaviruses: <http://www.picornaviridae.com/> Accessed on April 20, 2015

## 投稿規程

「フィールドサイエンス」(英文名: Journal of Field Science) は, 東京農工大学農学部附属広域都市圏フィールドサイエンス教育研究センターの年報誌で, 原則として年1回発行される。

本誌には, 広くフィールドサイエンスに関する研究成果などを掲載する。

### 1. 目的

フィールドサイエンスに関する研究成果などを公表し, その発展に寄与する。

### 2. 投稿者

東京農工大学に所属する者およびフィールドサイエンスに関心をもつ者。

### 3. 原稿の種類と内容

- (1) 論文: 研究報告で他誌に未発表のもの。
- (2) 資料: 測定・観察記録などで, 他誌に同一形態・形式で発表したものを除く。
- (3) 総説・解説: フィールドサイエンスに関するレビュー, 実験・調査方法の解説など。
- (4) その他: 編集委員長の依頼にもとづく記事など。

### 4. 原稿の使用言語と長さ

- (1) 原稿に使用する言語は日本語または英語とする。
- (2) 原稿は, 別に定める執筆要領に従って作成し, 刷り上がり20ページ以内とする。

### 5. 投稿手続き

原稿は, 編集ができない状態にした電子媒体に次の項目を記した送り状を添えて, 編集幹事に提出する。

- (1) 著者・所属機関・所在地・連絡担当著者と連絡先
- (2) 表題
- (3) 原稿枚数(図, 表および写真を含む)
- (4) 原稿の種類
- (5) 別刷希望部数

### 6. 原稿の採否

- (1) 原稿の採否は編集委員長が決定する。

- (2) 編集委員長は, 原稿の採否に関して, 編集委員ほか, しかるべき査読者から意見を求めることがある。
- (3) 編集委員長は, 必要に応じて著者に原稿の修正を求めることがある。

### 7. その他

- (1) 英語原稿は, あらかじめ英文校閲を行うこととする。
- (2) 著者は, 原稿の採用決定後, 最終原稿の編集ができない状態にした電子媒体と編集可能な電子媒体を編集幹事に提出する。
- (3) 別刷は, 50部を無料とし, 希望部数の50部を超える部分は著者の実費負担とする。

## 執筆要領

### 1. 論文

- (1) 日本語原稿: 1) ~ 3) を1ページ, 4) を2ページ, 5) を3ページ以降とし, 6) は5) と区分する。なお, 7) は後述のとおり1枚ずつ別葉とする。
  - 1) 表題
  - 2) 著者(ふりがな)・所属機関・所在地・連絡担当著者と連絡先
  - 3) ランニングタイトル(日本語)
  - 4) 要旨・キーワード(日本語)
  - 5) 本文(はじめに, 材料と方法, 結果, 考察などに原則として区分する)
  - 6) 引用文献
  - 7) 図, 表および写真
- (2) 英語原稿: 1) ~ 3) を1ページ, 4) を2ページ, 5) を3ページ以降とし, 6) は5) と区分する。なお, 7) は後述のとおり1枚ずつ別葉とする。
  - 1) 表題
  - 2) 著者・所属機関・所在地・連絡担当著者と連絡先
  - 3) ランニングタイトル(英語)
  - 4) 要旨・キーワード(英語)
  - 5) 本文(Introduction, Materials and Methods, Results, Discussionなどに原則として区分する)
  - 6) 引用文献
  - 7) 図, 表および写真

## 2. 資料、総説・解説およびその他

本文の区分などについては、必ずしも論文の形式に準じなくてもよい。

## 3. 用語等

- (1) 日本語原稿は、横書きとし、編集可能な電子媒体で1ページあたりおおむね40字×25行で作成する。
- (2) 英語原稿は、編集可能な電子媒体で1ページあたりおおむねアルファベット60字×25行で作成する。
- (3) 動物・植物等の日本名、外来語および原語によらない外国の地名・人名はカタカナとする。学名は国際表記にしたがうこととする。
- (4) 用語は、原則として文部省（文部科学省）編「学術用語集」に使われているものを用いる。
- (5) 単位は国際単位系（SI）を用いることが望ましい。

## 4. 要旨・キーワード

- (1) 日本語要旨はおおむね500字以内に、英語要旨はおおむね300語以内にまとめる。
- (2) キーワードは日本語、英語とも5個以内とする。

## 5. 引用文献

- (1) 引用文献は著者名のアルファベット順に記載し、本文の該当箇所に（著者、年号）または著者（年号）のように明示する。
- (2) 雑誌の場合は、著者（年号）：表題、雑誌名、巻または号（通巻ページでないものは巻号）：引用ページとする。
- (3) 単行本の場合は、著者（年号）：引用箇所表題、書名、編者名（編）、引用ページ、発行所、所在地とする。

## 引用文献の書き方（例）

文献は本文中に引用されたものすべてを記載する。雑誌名は原則として、省略しないで表記する。

### (a) 雑誌

田中阿歌磨・星野隆一（1933）：択捉島湖沼踏査概況及其の湖沼形態，水の理化学的所見，陸水学雑誌，3：1-19.

Birge, E. A. and Juday, C. (1934): Particulate and dissolved organic matter in inland lakes. Ecological Monograph, 4: 440-474.

### (b) 単行本

小林繁男（1993）：熱帯林土壌のせき悪化，熱帯林土壌，真下育久（編），280-333，勝美堂，東京.

Syrett, P. J. (1962): Nitrogen assimilation. Physiology and Biochemistry of Algae, Lewin, R. A. (ed.), 171-188, Academic Press, New York.

## 6. 図、表および写真

### (1) 図（写真は図として取り扱う）

- 1) 図（写真）の題名および注は図（写真）の下に書く。
- 2) 図（写真）は1枚ごとに別葉とし、図（写真）番号の表示は、図1. または Fig. 1. のようにする。本文中で図（写真）番号を示すときも同様とする。

### (2) 表

- 1) 表の題名は表の上に、注は表の下にそれぞれ記載する。
- 2) 表は1枚ごとに別葉とし、表番号の表示は、表1. または Table 1. のようにする。本文中で表番号を示すときも同様とする。

## 附 則

この規程は、平成25年4月1日から施行する。

## フィールドサイエンス編集委員会

|       |       |                                       |
|-------|-------|---------------------------------------|
| 編集委員長 | 横山 正  | 東京農工大学農学部 FS センター長, 教授                |
| 編集委員  | 松田 和秀 | FS センター准教授                            |
|       | 渡辺 直明 | FS センター助教                             |
|       | 鈴木 馨  | FS センター准教授                            |
|       | 伴 琢也  | FS センター准教授 (編集幹事, tban@cc.tuat.ac.jp) |
|       | 本林 隆  | FS センター講師                             |
|       | 千年 篤  | 生物生産学科教授                              |
|       | 夏目 雅裕 | 応用生物科学科教授                             |
|       | 伊豆田 猛 | 環境資源科学科教授                             |
|       | 酒井 憲司 | 地域生態システム学科教授                          |
|       | 田中 知己 | 共同獣医学科准教授                             |
| 事務局   | 五十嵐 明 | 府中地区事務部事務長補佐 (FS 担当)                  |

## Editorial Committee of Journal of Field Science

### Editor-in-Chief

Tadashi YOKOYAMA Director of Field Science Center, Professor of Tokyo University of Agriculture and Technology

### Editorial Board

Kazuhide MATSUDA Associate Professor of Field Science Center  
Naoaki WATANABE Assistant Professor of Field Science Center  
Kaoru SUZUKI Associate Professor of Field Science Center  
Takuya BAN Associate Professor of Field Science Center (Managing Editor, tban@cc.tuat.ac.jp)  
Takashi MOTOBAYASHI Lecturer of Field Science Center  
Atsushi CHITOSE Professor, Dept. of Biological Production  
Masahiro NATSUME Professor, Dept. of Applied Biological Science  
Takeshi IZUTA Professor, Dept. of Environmental and Natural Resource Sciences  
Kenji SAKAI Professor, Dept. of Ecoregion Science  
Tomomi TANAKA Associate Professor, Cooperative Dept. of Veterinary Medicine

### Management Office

Akira IGARASHI Chief of Field Science Center Office

---

平成28年3月25日 印刷

平成28年3月30日 発行

発行所 東京農工大学農学部附属 FS センター  
〒183-8509 府中市幸町3-5-8 ☎042-367-5798  
印刷所 電算印刷株式会社  
〒390-0821 松本市筑摩1-11-30 ☎0263-25-4329

---



# Journal of Field Science

---

No.14

Mar, 2016

---

## 目 次

### 総 説

- 1 ウシ体外受精胚移植技術に関する研究／杉村智史

### 論 文

- 5 シリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) における唾液  $\alpha$ -アミラーゼ測定によるストレス評価法の  
検討／塩澤 望・鈴木 馨
- 13 牛糞便からの新規ウシエンテロウイルスの検出と遺伝子解析／岡田貴志・土赤 忍・増田恒幸・大松  
勉・長井 誠・押谷 仁・水谷哲也

---

FIELD SCIENCE CENTER, TOKYO UNIVERSITY OF  
AGRICULTURE AND TECHNOLOGY  
Fuchu, Tokyo 183-8509, Japan