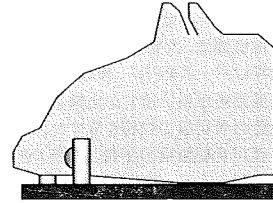


資料3

狂犬病の実習用モデル、教育・訓練用の教材の試作

仕様

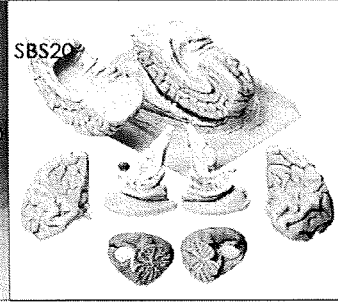
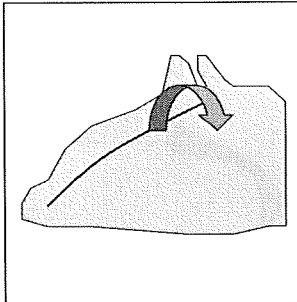
- 使用者は解剖、切断、脳摘、脳検査までの作業が可能
- モデルは原寸大で、発症の有無は問わない
- イヌに近いニュアンス(精度は高めが望ましい)
- 繰り返し使用できるように各部位の脱着が可能
- 脳の模型、骨切断の模型、解剖手技の模型の3点に分ける



解剖手技: サンプルモデル

骨切断: サンプルモデル

脳: サンプルモデル



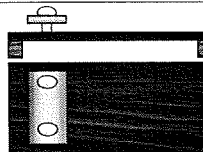
LTCZ DVS NIID

資料4

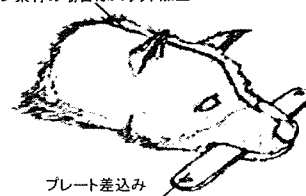
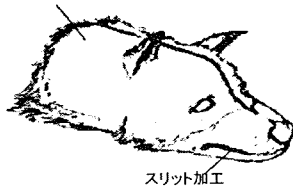
解剖手技モデル

作業①保定(シリコンの場合)

- シリコン素材+内部FRP造形
- <シリコン素材の特徴>
- ・素材感がかなり違う(柔らかい素材のため)
- ・毛の表現は彫刻仕上、または植毛仕上げ
- ・素材の厚さにより表皮がうまく開けない可能性がある
- ・スリット部分は、切りっぱなしとなる
- ・耐久性はホアより高い

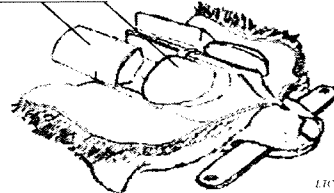
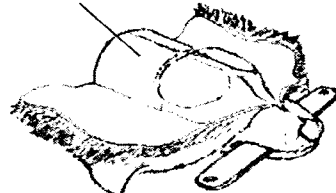


表面:シリコン素材の場合はスリット加工



筋肉の素材 ウレタン樹脂成型

立体パズル風組立仕様



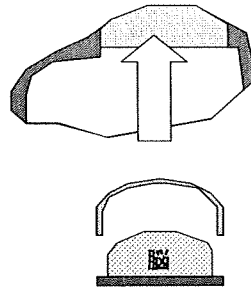
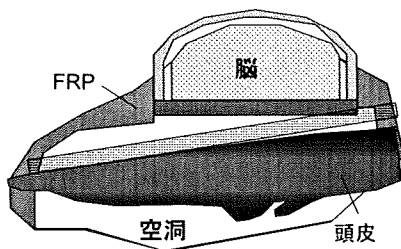
LTCZ DVS NIID

## 骨切断モデル

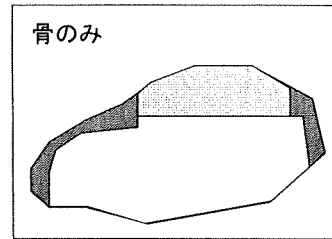
## 概要

- 骨切断モデルは骨のみ、と手技前の外形の2種類を作成
- 作成種類は、大型犬、中型犬、小型犬、ネコの4種類を作成したい
- 素材はベースをFRP、換装パーツは、エポキシ、石膏のいずれかを検討中
- 切除箇所は使い捨てが出来るよう、換装型のパーツを使用する
- 実際の骨切断の模様を表すため、頭皮切開、筋肉切除の後を想定し、皮と筋肉切除の跡を残す
- 外觀が骨切断前の手技と判断できれば、脳以外の内部構造は簡易なものでも可能あるが、脳の再現とその周囲の空間、骨切断の感触は再現したい
- 外觀のベースは中を空洞にし、換装パーツ(頭蓋骨と脳)をはめ込める穴をつける
- 換装パーツは頭骨と脳の隙間をつくるため、分けて作成する(光造形で一括で作成した場合も検証する)

## 皮、筋肉付き



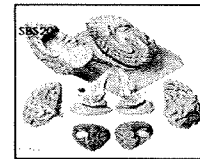
## 骨のみ



## 脳モデル

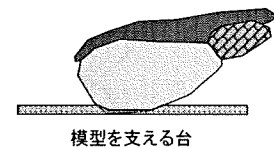
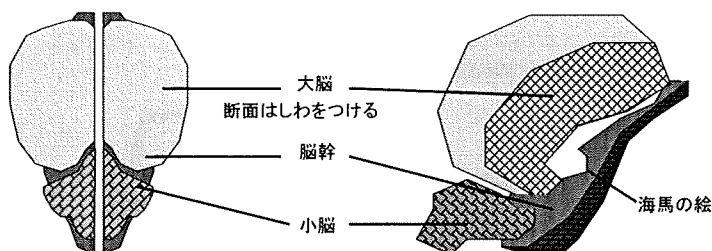
## 概要

- 脳の模型は脊髄から脳幹部(延髄、橋、視床)、小脳、大脳まで含めたもので、脳断面には海馬も作成
- 大脳×2、小脳×2、脳幹×2、分離可能(計6パーツ)断面には海馬のイラストを付ける
- 脳の大きさは大型犬、中型犬、小型犬の違いでは変わらないため作成は1つ
- オスメス咬合のバズル形式のため、硬い素材を使用...できれば断面観も作成したい
- 模型を支える台は必要
- 4種類を色分けする必要は無い、目視で海馬は白で周囲の組織(肌色系)と区別ができること
- 形状の簡略化:海馬の形状、大脳と小脳の脳幹部の形状が把握できる範囲での簡略化は可
- 検査に使用する脳幹部、小脳を移送するためのチューブを付けたい(50mlのポリプロピレン性)



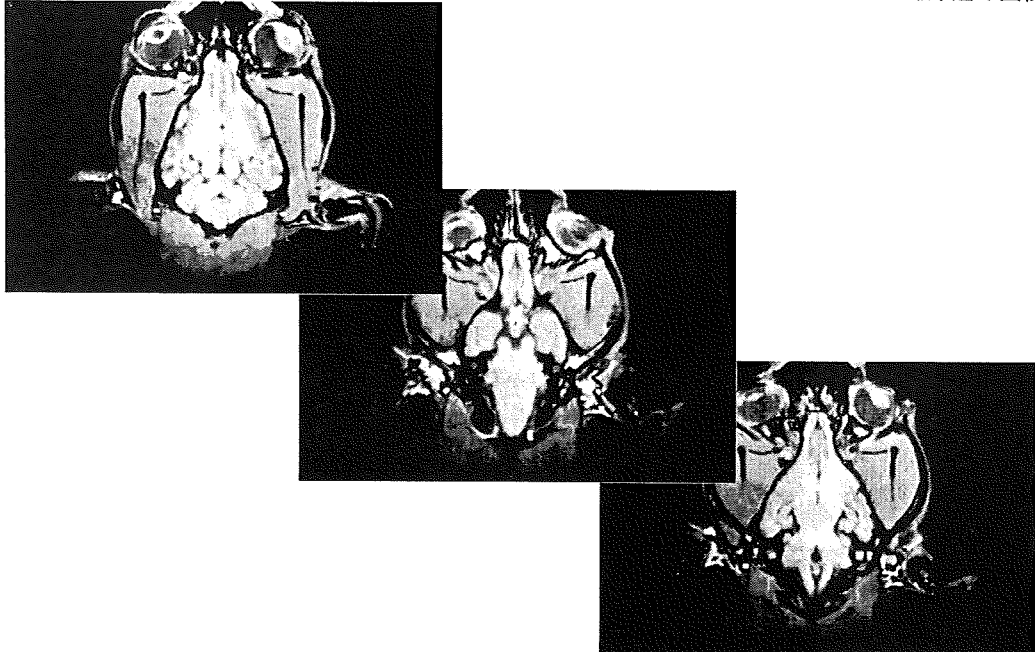
## 上面観

## 断面観(側面)



資料 7-1

MRI-CT 取り込み画像



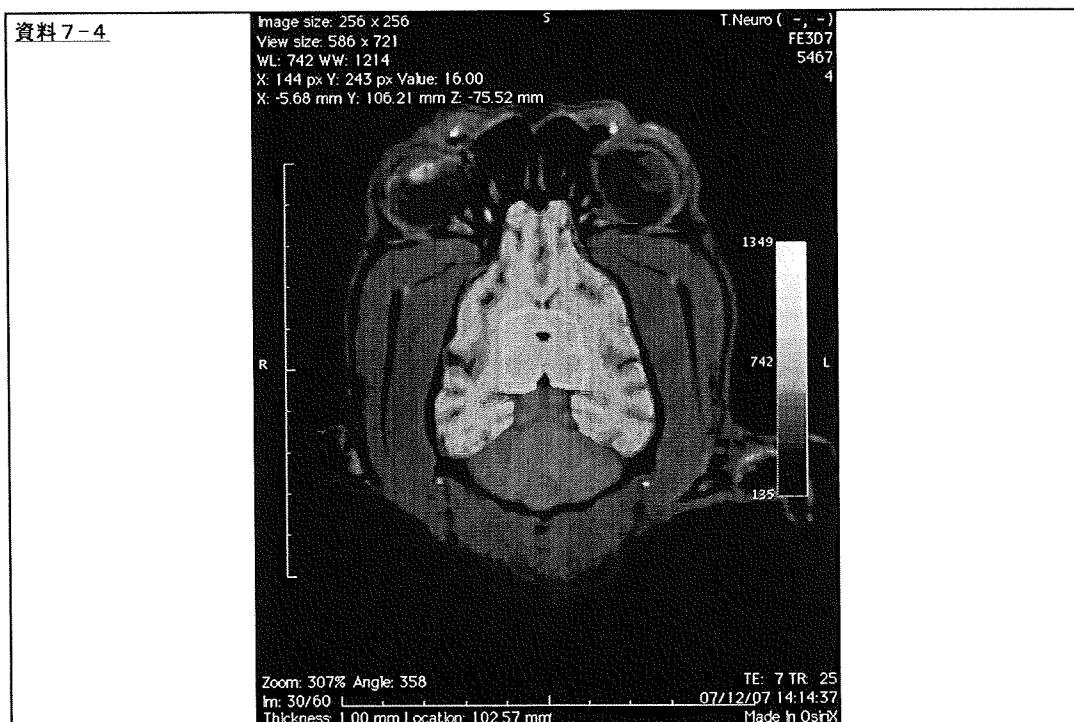
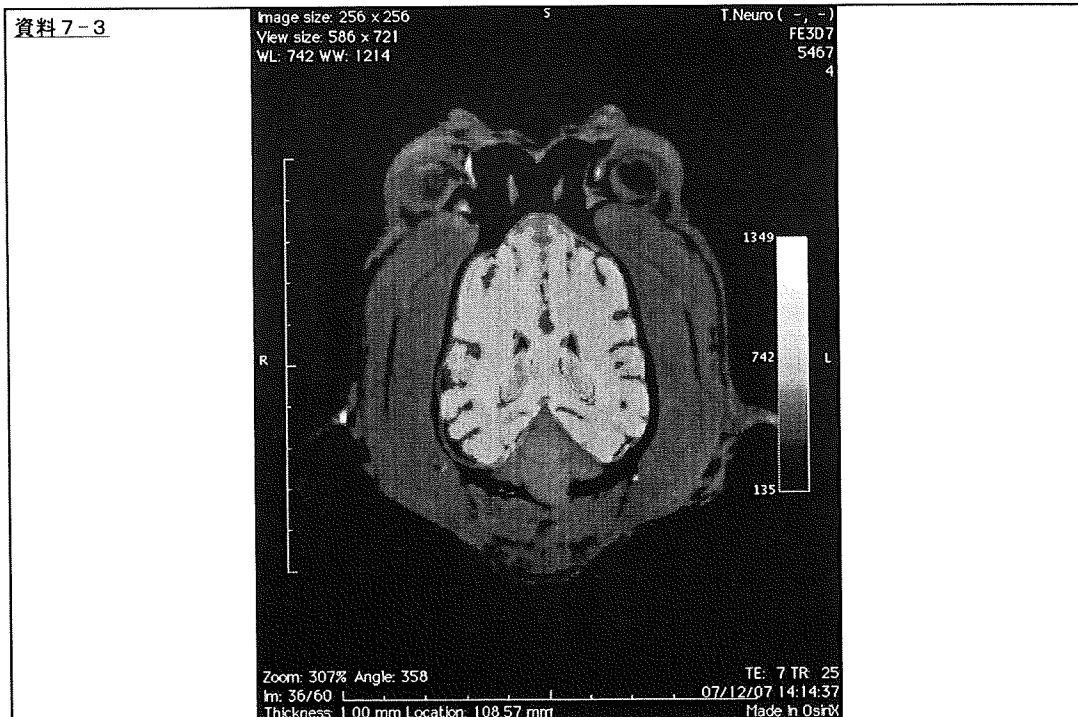
ETC/DAS NHU NIID

資料 7-2

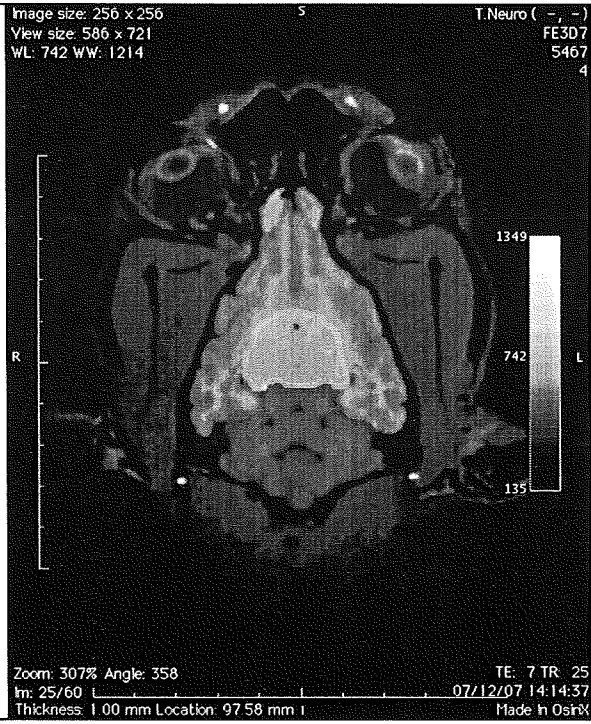
Image size: 256 x 256 S T.Neuro ( -, - )  
View size: 586 x 721 FE3D7  
WL: 742 WW: 1214 5467  
X: 147 px Y: 242 px Value: 9.00 4  
X: -4.23 mm Y: 121.27 mm Z: -74.86 mm



Zoom: 307% Angle: 358 TE: 7 TR: 25  
In: 45/60 07/12/07 14:14:37  
Thickness: 1.00 mm Location: 117.57 mmr Made in OstrX



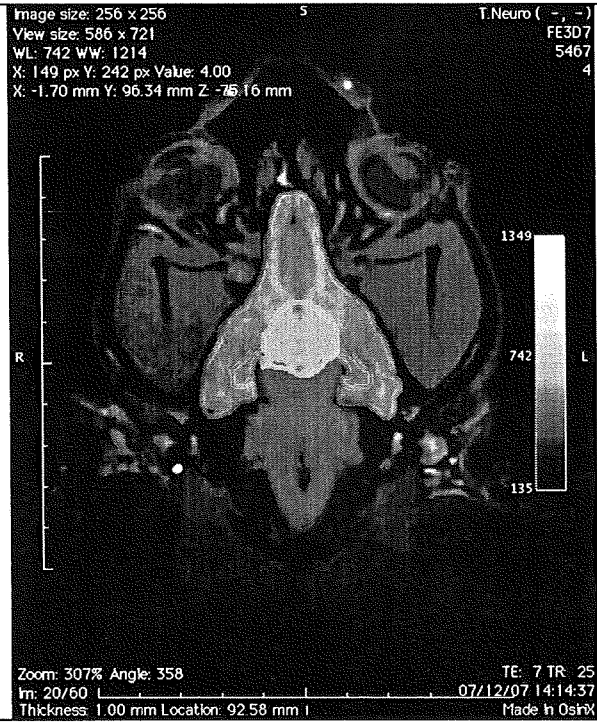
資料 7-5



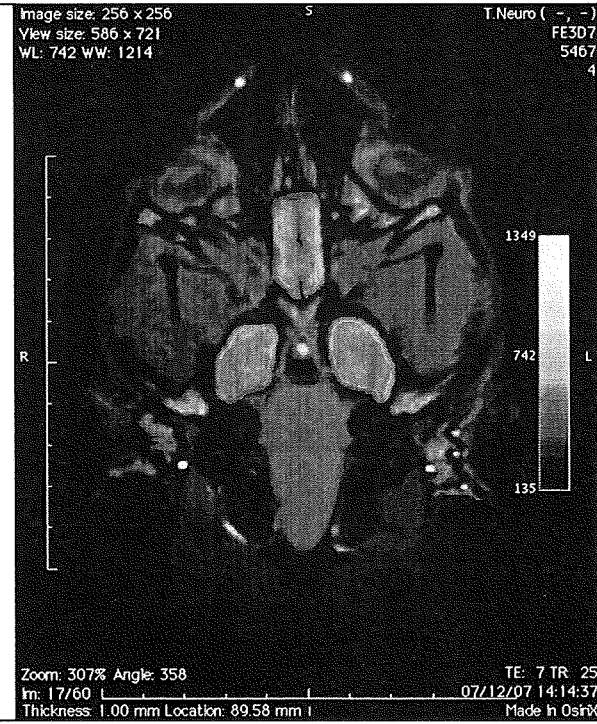
資料 7-6

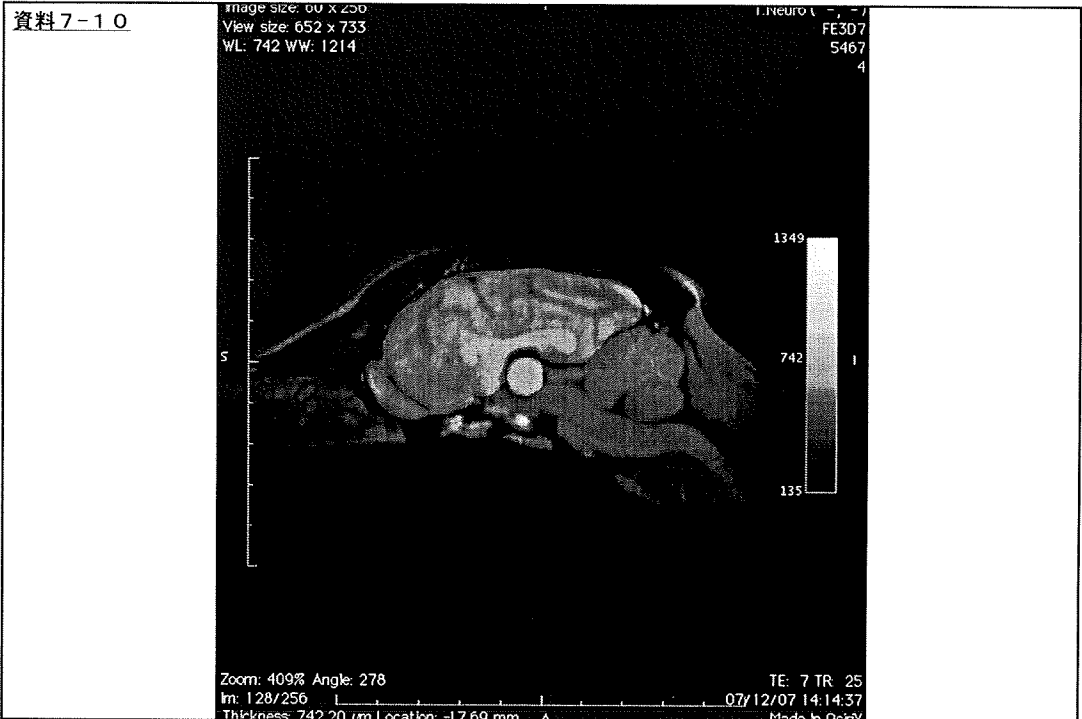
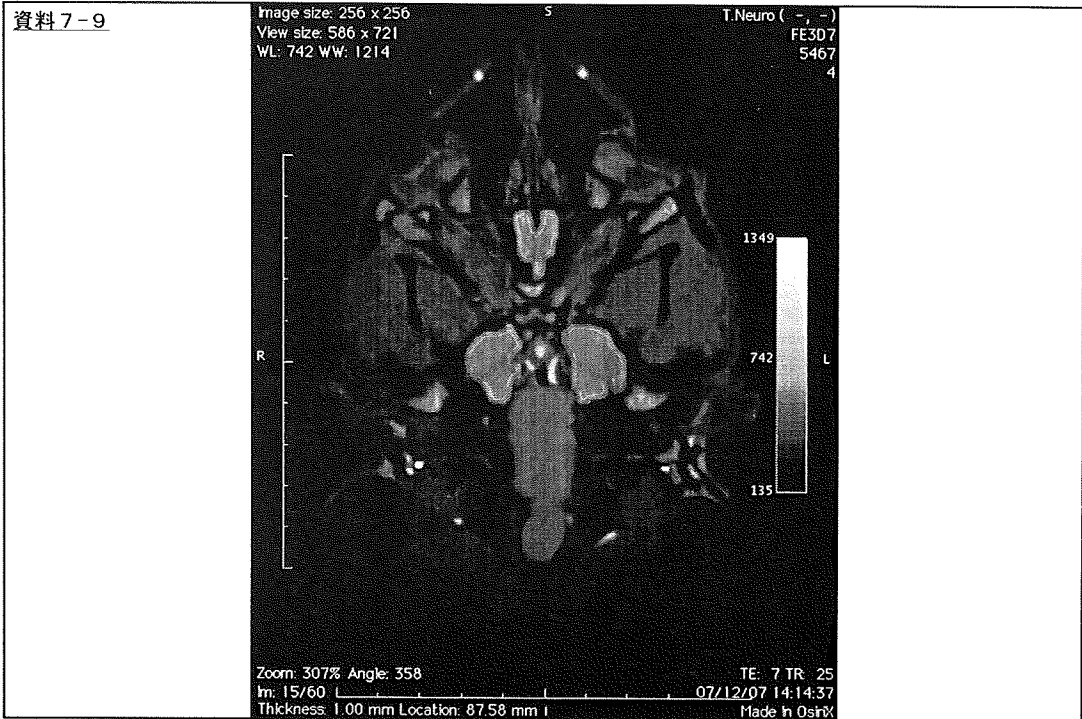


資料 7-7



資料 7-8





資料 7-1.1

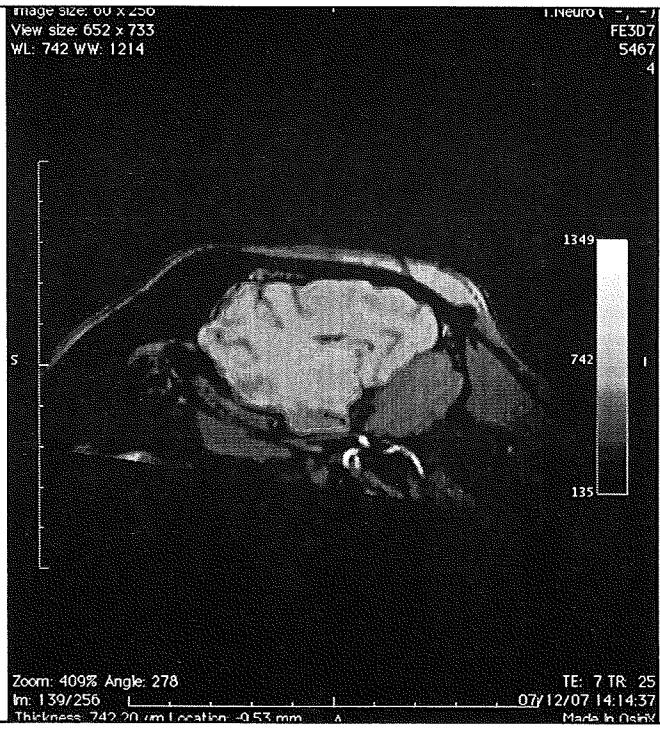


資料 7-1.2





資料 7-13



資料 7-14



資料 7-15

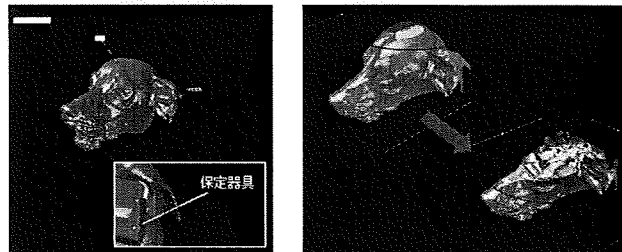


資料 8

### 3D化したデータの応用例

3D化されたデータはPCベースでインタラクティブに動かせるシステムの構築が可能です。実際の構築例を下記に示します。

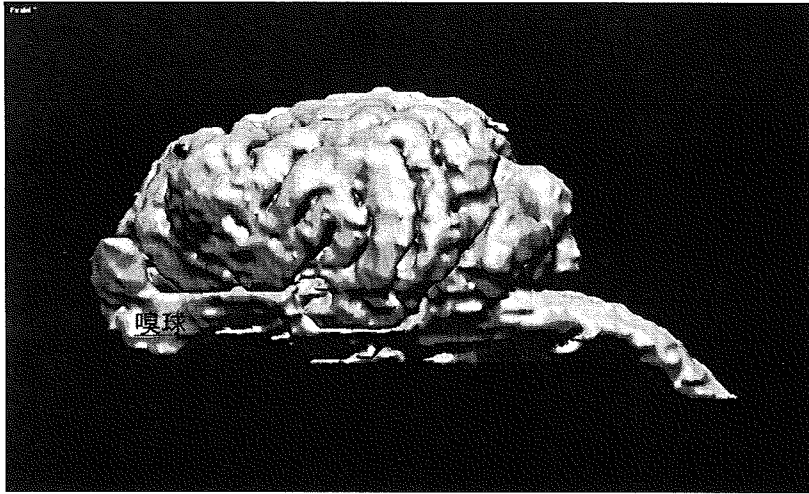
例2: 3次元の注釈をつけたり、断面を切ることが可能



CTやMRIの画像から3次元構築したデータのその他の応用

- ムービー形式
- 模型(3Dデータを元に構築)
- 学会用、プレゼン用: PowerPointで3Dをインタラクティブに動かすことが可能
- PC上で行うシミュレーション
- アプリケーション化

# 脳モデル



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（総括・**分担**）研究報告書

狂犬病の診断技術向上に必要な検査系の開発に関する研究

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長  
協力研究者：加来義浩 国立感染症研究所獣医科学部、研究員  
野口 章 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究員  
奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、研究員

研究要旨：狂犬病は海外からの侵入が憂慮される動物由来感染症であり、国内に侵入した感染動物を早期に察知するためには実験室内におけるウイルス学的な診断技術の向上と普及が求められる。これまで、「動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究（平成 16 年から平成 18 年）」で安全で簡便な抗原診断・遺伝子診断系の開発を行ってきたが、狂犬病は希少感染症であり確立した診断系による検査が頻繁に行われるわけではない。したがって、狂犬病の検査系を普及するためには頻回にしか行われたい検査の技術伝達や成績判定を安全に正しくかつ容易にできることが望まれる。そこで、今回は狂犬病の抗原診断に使用される抗体の力価・感度および反応性を簡単に検証できる方法として、組換え技術により抗原診断（DFA 法、直接蛍光抗体法）の標的である狂犬病ウイルス N 蛋白を培養細胞（BHK 細胞）に発現させて、生ウイルスを使用しないで安全かつ安価に再生産できる検査抗体の反応性を検証できる抗原スライドを作成した。

A. 研究目的

これまで、「動物由来感染症のサーベイランス手法の開発に関する研究（平成 16 年から平成 18 年）」において、安全で簡便な抗原診断・遺伝子診断系の開発を行ってきたが、狂犬病は希少感染症であり確立した診断系による検査が頻繁に行われるわけではない。したがって、狂犬病の検査系を普及するためには頻回にしか行われたい検査の技術伝達や成績判定を安全に正しくかつ容易にできることが望まれる。

そこで、今回は、狂犬病の抗原診断（DFA 法、直接蛍光抗体法）に使用される抗体の

力価・感度および反応性を容易に検証するために、組換え技術を利用して抗原診断の標的蛋白（狂犬病ウイルスの N 蛋白（RV-N））を培養細胞に発現させて、安全かつ安価に再生産できる生ウイルスを使用しないで抗体の反応性等を検証可能な抗原スライドの作出を目的とした。

B. 研究方法

RV-N 発現プラスミドの作成

狂犬病ウイルス CVS11 株の N 蛋白をコードする遺伝子を pcDNA3.1 V5/His にクローニングして、RV-N/pcDNA3.1 プラスミドを作成した。

## RV-N の発現

N 蛋白の発現は、RV-N/pcDNA3.1 プラスミドを BHK (baby hamster kidney) 細胞と MNA (mouse neuroblastoma) にトランスフェクトして行った。

### トランスフェクション

1) 0.8 $\mu$ g/100 $\mu$ l の RV-N/pcDNA3.1 プラスミドと 2 $\mu$ l/100 $\mu$ l の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を無血清 E-MEM 培地で調整して、等量混合の後に室温で 20 分以上静置。

2) E-MEM 培地 (含 10%FBS) を用いて、BHK 細胞を  $1.5 \times 10^6$  個/ml、MNA 細胞を  $1.0 \times 10^6$  個/ml に調製して 1) のプラスミド液とそれぞれの細胞液を 1:2 として 4-6 時間緩やかに転倒混和。

3) 抗原発現の陰性対照はプラスミド液を加えない無血清 E-MEM 培地とした。

4) 転倒混和した 2) 液を、8 穴ガラススライドの各ウェルに 100 $\mu$ l ずつアプライして、37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> incubator で培養。

5) 24 時間後、E-MEM 培地 (含 10%FBS) を交換してさらに 24 時間培養。

6) 培養後の 8 穴ガラススライドは、PBS 洗浄後に 100%アセトンで 30 分固定して乾燥の後、使用時まで -80 $^{\circ}$ C または室温で保存。

発現させた RV-N 抗原の保存性と安定性

RV-N を発現した細胞スライドは、-80 $^{\circ}$ C で 1、2、7 ヶ月、室温で 1、2、3、4 週間保存して DFA 法によって培養細胞に発現させた抗原の保存性と安定性を検討した。

## DFA 法

抗体には FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin (Fujirebio) を使用した。抗体液は PBS で 50 倍に希釈してエバンスブルーを終濃度 0.002% となるように加え、0.45 $\mu$ m フィルターを通してから使用した。抗体は、8 穴ガラススライド各ウェルに 100 $\mu$ l ずつ重層して室温で 30 分反応させた。反応後は PBS で洗浄して蛍光顕微鏡で観察を行った。

## C. 研究結果

### RV-N の発現と抗原性

RV-N/pcDNA3.1 プラスミドをトランスフェクトしてスライド上で培養した BHK 細胞、MNA 細胞いずれの細胞も RV-N の発現が DFA により確認できたが、MNA 細胞における RV-N の発現効率と蛍光強度は BHK スライドより低かった。RV-N を発現した BHK スライドの蛍光像を図 1 に示した。一方、陰性対照としたプラスミド非導入 BHK 細胞では蛍光が認められず、蛍光は RV-N 特異的であると考えられた。蛍光は細胞質内に均質に

広がっており、ウイルス感染細胞で一般的に見られる封入体様の構造は認められなかった。

#### RV-N を発現した細胞の安定性

RV-N/pcDNA3.1 プラスミドのトランスフェクションからアセトン固定に至る行程において、RV-N を発現させた MNA 細胞は BHK 細胞と比較してアセトン固定の際に細胞が培養したスライド表面から容易にはがれ落ちることが明かとなった。

#### 発現させた RV-N 抗原の保存性と安定性

RV-N を発現した細胞スライドは、 $-80^{\circ}\text{C}$  の保存では少なくとも 7 ヶ月間、室温保存で少なくとも 1 ヶ月の間、RV-N に対する抗体の反応性（蛍光強度、蛍光陽性細胞数）に変化が認められなかった。

#### D. 考察

狂犬病は希少感染症であり確立した診断系による検査が頻繁に行われるわけではない。したがって、狂犬病の検査系を普及するためには頻回にしか行われない検査の技術伝達や成績判定を安全に正しくかつ容易にできることが望まれる。

今回、組換え技術を利用して狂犬病ウイルスの N 蛋白 (RV-N) を培養細胞に発現させたスライドを作成して、DFA (直接蛍光抗体) 法等の抗原検出系で使用する検査抗体の反応性等の検証を可能にした。また、

RV-N 発現細胞スライドは安全で安価に再生産が可能である。

今後は、作出した RV-N 発現細胞スライドを使用することになる自治体の関係機関等の協力を得て、抗原の安定性と使用法等の課題点について検討を加える予定である。

#### E. 結論

組換え技術を利用して狂犬病ウイルスの N 蛋白 (RV-N) を培養細胞に発現させたスライドを作成して、狂犬病の抗原診断 (DFA 法、直接蛍光抗体法) に使用される抗体の力価・感度および反応性を容易に検証可能とした。

本研究の成果は、これまでに開発した狂犬病の抗原検出系を自治体等の関係機関において正しく習得・検証するための教材としても活用可能であり、国内に侵入した感染動物を早期に察知するために必要とされる狂犬病の実験室内診断技術の向上とその普及に大きな波及効果があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

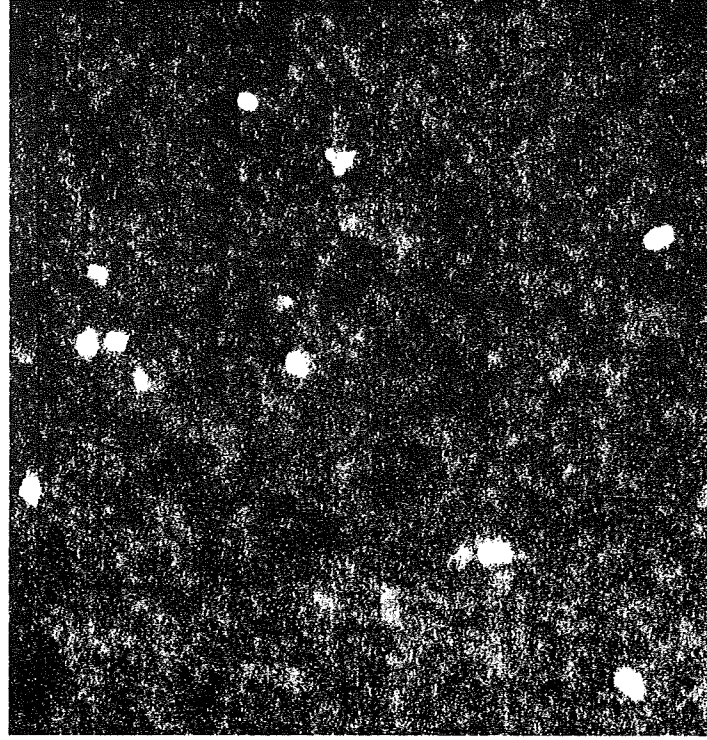
#### G. 研究発表

なし

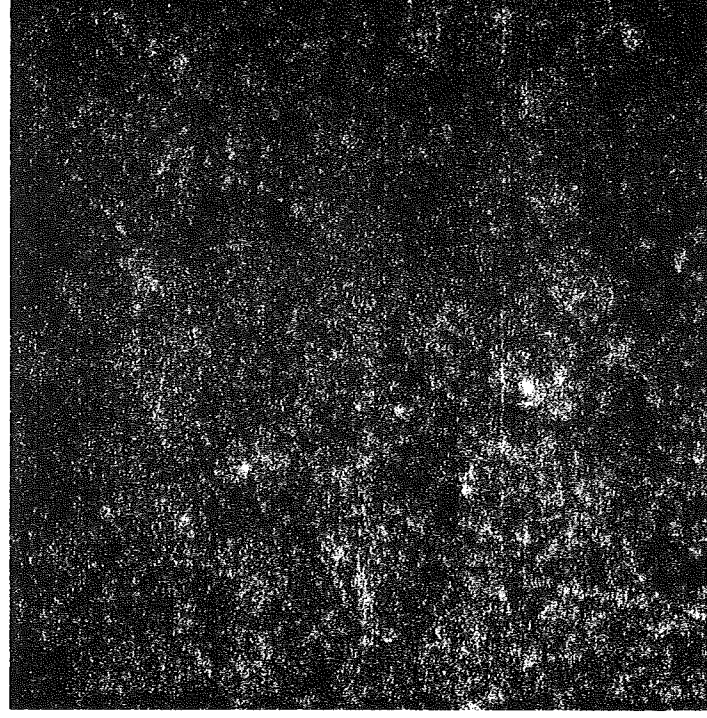
#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

図1 RV-N発現BHK細胞スライドを用いたDFA



RV-N発現BHK細胞




陰性対照BHK細胞

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A.	A. Simultaneous detection of the genus <i>Brucella</i> by combinatorial PCR.	Jpn. J. Inf. Dis.	60	137-139	2007
Kimura, M., Imaoka, K., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A.	Evaluation of a Microplate Agglutination Test (MAT) for Serological Diagnosis of Canine Brucellosis.	J. Vet. Med. Sci.	—	—	2008 (in press)
今岡浩一他	ブルセラ症 (1999年4 月～2007年3月31日現 在)	病原微生物検 出情報	28(8)	227-228	2007
Kimura, M., Tanikawa, T., Suzuki, M., Koizumi, N., Kamiyama, T., Imaoka, K. and Yamada, A.	Detection of <i>Streptobacillus</i> spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction	Microbiol. Immunol.	52(1)	1-7	2008
中込大樹, 出口順 啓, 矢ヶ崎晶子, 原田和俊, 柴垣直 孝, 島田眞路, 木 村昌伸, 今岡浩一	痲皮のPCRにより <i>Streptobacillus</i> <i>moniliformis</i> を検出した 鼠咬症の一例.	病原微生物検 出情報	28(8)	226-227	2007



 aptara <small>The Quality Standard for Journals</small>	MIM	mim'005	Dispatch: January 13, 2008	CE:
	Journal	MSP No.	No. of pages: 7	PE: Caroline

*Microbiol Immunol* 2008; 52: 1–7  
doi:10.1111/j.2008.1432-1033.00005.x

## ORIGINAL ARTICLE

## Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction

Masanobu Kimura<sup>1</sup>, Tsutomu Tanikawa<sup>2</sup>, Michio Suzuki<sup>1</sup>, Nobuo Koizumi<sup>3</sup>, Tsuneo Kamiyama<sup>1</sup>, Koichi Imaoka<sup>1</sup> and Akio Yamada<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Veterinary Science and <sup>3</sup>Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo and <sup>2</sup>Ikari Corporation, Chiba, Japan

**Correspondence**

Koichi Imaoka, Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Tel: +81 3 5285 1111 (ext. 2622); fax: +81 3 5285 1179; email: imaoka@nih.go.jp

Received 4 July 2007; accepted 15 October 2007.

**List of Abbreviations:** 16S rRNA, 16S ribosomal RNA; PCR, polymerase chain reaction; *R. norvegicus*, *Rattus norvegicus*; *R. rattus*, *Rattus rattus*; *S. moniliformis*, *Streptobacillus moniliformis*; SPF, specific pathogen free.

**Key words**

16S rRNA gene, polymerase chain reaction, rat-bite fever, *Streptobacillus* spp.

**ABSTRACT**

*Streptobacillus moniliformis* is an etiological agent of rat-bite fever and Haverhill fever in human infection. As the currently available methods for identifying the causative bacteria are not satisfactory, we attempted to establish them by PCR using newly designed primers for the 16S rRNA gene of *S. moniliformis*. We then determined the prevalence of *Streptobacillus* spp. in two species of feral rats that inhabit an urban region in Japan, because information on the prevalence of the bacteria in feral rats is obscure. The use of PCR with newly designed primers showed that an extremely high proportion of *R. norvegicus* harbored the bacteria (61/66, 92%), whereas the prevalence was only 58% in *R. rattus* (30/52). The nucleotide sequence analysis of the 16S rRNA gene of *Streptobacillus* spp. isolated from oral swabs of feral rats showed at least two different types of bacteria among isolates from *R. norvegicus* and *R. rattus*.

*Streptobacillus moniliformis* is a type of bacteria indigenous to the oral cavity of rats and other animal species, such as mice, guinea-pigs, gerbils, ferrets, cats, dogs, koalas, and non-human primates (1) and has been isolated from apparently healthy animals (2). However, *S. moniliformis* infection in humans may result in rat-bite fever or Haverhill fever. Two to 10 days after exposure to the bacteria through a bite or abrasion by rats or through the ingestion of water or food contaminated by rat feces containing the bacteria, acute symptoms such as fever, malaise, muscle pain, articular inflammation, and maculopapular, petechial, or pustular rash develop (3). *S. moniliformis* infection in humans has been reported worldwide, and mortality has been estimated to be 13% when untreated (3). However, the incidence of human infection might be underestimated because rat-bite fever is not only an uncommon disease, but the bacteria are difficult to isolate by conventional culture methods without the use of a spe-

cial culture medium, such as ATCC medium 488 broth (*Streptobacillus* medium) (1, 2, 4).

To our knowledge, two studies have reported that *S. moniliformis* can be identified by PCR (5, 6). Andre *et al.* (5) used universal primers for the detection of the 16S rRNA gene. This method requires subsequent nucleotide sequencing for identification, and the results may not be conclusive if the specimen contains several species of bacteria. Boot *et al.* (6) reported the use of PCR using specific primers for the 16S rRNA gene to detect *S. moniliformis*, but, in our preliminary study, some non-specific amplification was observed.

In the present study, we attempted to design new primers that would enable us to detect *S. moniliformis* more specifically. We also applied PCR using newly designed primers to study the prevalence of the bacteria in laboratory rats and in two species of feral rats that inhabit an urban region.

**Table 1.** Prevalence of *Streptobacillus* spp. in feral and laboratory-reared SPF rats

	<i>n</i>	PCR positive	Positive (%)
Feral rats			
Norway rat ( <i>R. norvegicus</i> )	66	61	92
Black rat ( <i>R. rattus</i> )	52	30	58
Total	118	91	77
Laboratory rats			
Fisher 344	28	0	0
Wistar	26	0	0
Total	54	0	0

## Materials and methods

### Rat samples

Feral *R. norvegicus* and *R. rattus* were captured at several urban areas of Tokyo and its vicinity in Japan. Most of the *R. norvegicus* were caught outdoors, whereas *R. rattus* were all captured inside buildings (Table 1). Oral swabs were obtained and kept at 4 °C until cultivation. SPF Fisher 344 and Wistar rats (*R. norvegicus*) were obtained from Japan SLC, Hamamatsu, Japan.

### Cultures and isolations

Oral swabs were suspended in ATCC medium 488 broth (*Streptobacillus* medium: heart infusion broth containing 0.9% peptone, 0.045% glucose, and 18.2% horse serum) and incubated overnight at 37 °C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. For the isolation of *Streptobacillus* spp., aliquots were inoculated in an ATCC medium 488 agar plate containing colisin nalidixic acid and sulfamethoxazole-trimethoprim, and the plate was incubated at 37 °C under anaerobic conditions (7).

### Bacterial strains and extraction of genomic DNA

The bacterial strains used in the present study are listed in Table 2. Bacterial species belonging to the family *Fusobacteriaceae* (*Fusobacterium* spp. and *Leptotrichia buccalis*) and commensal species of the oral cavity of humans and animals were included. Three reference strains of *S. moniliformis* (ATCC14647, ATCC49567, and ATCC49940) were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Strains of *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, and *Ensifer* were obtained from RIKEN BioResource Center (Wako, Saitama, Japan). *Fusobacterium nucleatum* GTC 04469 was from Gifu University (Gifu, Japan). Bacterial strains readily available in our laboratory

**Table 2.** Bacterial strains and polymerase chain reaction results

Bacterial strains	Amplification by primers	
	S5/AS2	S/AS
<i>S. moniliformis</i> , ATCC14647	+	+
<i>S. moniliformis</i> , ATCC49567	+	+
<i>S. moniliformis</i> , ATCC49940	+	+
<i>Bacillus anthracis</i> , PAII	-	-
<i>Bacillus cereus</i> , NBRC3466	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> , 3	-	-
<i>Brucella abortus</i> , 544	-	-
<i>Brucella canis</i> , QE13	-	-
<i>Brucella melitensis</i> , 16M	-	-
<i>Brucella suis</i> , 1330	-	-
<i>Capnocytophaga canimorsus</i> , ATCC35979	-	-
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i> , ATCC49044	-	-
<i>Capnocytophaga sputigena</i> , ATCC33612	-	-
<i>Coxiella burnetii</i> , Nine Mile	-	-
<i>Ensifer meliloti</i> , JCM20682	-	-
<i>Escherichia coli</i> , DH5 alpha	-	-
<i>Francisella tularensis</i> , LVS	-	-
<i>Fusobacterium equinum</i> , JCM11174	-	-
<i>Fusobacterium necrophorum</i> , JCM3718	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i> , GTC 04469	-	+
<i>Fusobacterium varium</i> , JCM3721	-	+
<i>Haemophilus influenzae</i> , Type B	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , ATCC13883	-	-
<i>Leptotrichia buccalis</i> , JCM12969	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i> , ATCC15315	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , ATCC27294	-	-
<i>Ochrobactrum anthropi</i> , ATCC49187	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , KH683	-	-
<i>Pasteurella aerogenes</i> , ATCC27883	-	-
<i>Pasteurella canis</i> , ATCC43326	-	-
<i>Pasteurella dagmatis</i> , ATCC43325	-	-
<i>Pasteurella gallinarum</i> , ATCC13361	-	-
<i>Pasteurella multocida</i> , ATCC12947	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC29247	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> , Pa177	-	-
<i>Yersinia pestis</i> , Yreka	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , 319	-	-

and used in the previous study (8) were also included. The reference and new isolates of *Streptobacillus* spp. were cultured on ATCC medium 488 agar plates at 37 °C overnight under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, and DNA was extracted using SepaGene (Sanko Junyaku, Tokyo, Japan) according to the protocol supplied by the manufacturer. DNA from non-*Streptobacillus* strains was also prepared as described previously (8).

### PCR and sequence analysis

Bacterial cells cultured in ATCC medium 488 broth overnight were collected by centrifugation at 8900 × g for

Detection of *Streptobacillus* spp. by PCR**Table 3.** Primers used in the present study

Primer name	Sequence	Target length	Location† (Z35305)
S5	5'-CATACTCGGAATAAGATGG-3'	269 bp	965-983
AS2	5'-GCTTAGCTCCTCTTTGTAC-3'		1233-1215
S	5'-GCTTAACACATGCAAATCTAT-3'	296 bp	39-59
AS	5'-AGTAAGGGCCGTATCTCA-3'		334-317
27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1482 bp	1-20
1492r	5'-GGCTACCTTGTTACGACTF-3'		1482-1464

Primers S5 and AS2 were newly designated in this study. S and AS were prepared according to reference 6. 27f and 1492r were prepared according to reference 10.

†Genbank accession number.

3 min and were then resuspended in 200 µL TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-2Na, pH 8.0). After being heated at 99 °C for 15 min, the clarified supernatant fluid was used as a template for specific amplification of *Streptobacillus* spp. DNA.

S5 and AS2 primers, which target the 16S rRNA gene of *S. moniliformis*, were newly designed (Table 3). PCR with S5 and AS2 primers was performed using puReTaq Ready-to-Go PCR beads (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA) in a 25 µL reaction volume containing 5 pmol (0.5 µl) of each primer, 2.5 µl cultured supernatant fluid, or 2.5 ng (2.5 µl) template bacterial DNA for verification. The PCR program consisted of initial denaturation at 95 °C for 3 min, 35 cycles of denaturation at 95 °C for 20 sec, annealing at 57 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and final extension at 72 °C for 7 min. A touchdown PCR procedure, which was used by Boot *et al.* (6), was also examined using both pairs of primers: S/AS and S5/AS2 (Table 3).

Sequencing templates from reference ATCC strains of *S. moniliformis* and isolates were prepared by PCR using the universal primers for the 16S rRNA gene of eubacteria, 27f and 1492r (Table 3) (9). Then, the PCR products were purified using GPX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Bio-Science Corp.) according to the manufacturer's instructions. The purity of products was also inspected by electrophoresis on agarose gels. Purified PCR products were adjusted to concentrations of 5–10 ng/µL and sequenced using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's directions with the sequencing primers 27f, S, S5, AS, AS2, and 1492r. Sequencing reaction products were purified using Centri-Sep Spin Columns (Princeton Separations, Adelphia, NJ, USA), dried, and resuspended in 20 µL Hi-Di formamide before capillary electrophoresis on ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequencing data sets were exported from the instrument and aligned using

the GENETYX-MAC Ver.13.0 software (GENETYX Corp., Tokyo, Japan).

### Biochemical tests

ATCC strains of *S. moniliformis* and isolates were tested with API 20E (API Laboratory Products, Hampshire, UK), IDtest NF-18 (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan), and BACTOLABO oxidase test (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), in accordance with the manufacturer's instructions. Included tests are listed in Table 4.

## RESULTS

### Detection of *S. moniliformis* gene by PCR

We first compared the specificity of newly designed primers (S5 and AS2) with those (S and AS) reported previously (6). As summarized in Table 2, specific amplification of *S. moniliformis* DNA was achieved with the primers S5 and AS2 (Fig. 1 and Table 2) without non-specific amplification of genes from other bacterial strains. In contrast, the S and AS primers amplified DNA fragments not only from *S. moniliformis* but also from *Fusobacterium* and *Leptotrichia*, which indicated that the primers S5 and AS2 are superior for the specific detection of *S. moniliformis* (Fig. 1, Table 2). Similar results were obtained when the touchdown PCR was performed (6). There was no apparent difference in the sensitivity between the PCR using different sets of primers. DNA samples of 1–5 pg were necessary for both methods.

The clarified supernatant fluid from bacterial culture in ATCC medium 488 broth was then examined by PCR using the S5 and AS2 primers to detect the presence of *S. moniliformis*-specific sequences. PCR results indicated an extremely high proportion of *R. norvegicus* (61/66, 92%); however, the prevalence of *Streptobacillus* spp.

**Table 4.** Biochemical characteristics of ATCC strains and isolates

Test	ATCC strains			<i>R. norvegicus</i> isolates				<i>Rattus rattus</i> isolates		
	ATCC No.			DDBJ Accession no.						
	14647	49567	49940	AB330754	AB330755	AB330756	AB330757	AB330758	AB330759	AB330760
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin in hydrolysis	-	-	+	-	-	W	W	-	-	-
Urea hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beta-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid produced from:										
Arabinose	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

W, weak reaction.

among *R. rattus* was much lower (30/52, 58%). All the laboratory SPF rats tested negative (Table 1).

#### Isolation of *Streptobacillus* spp.

After incubation for 24 hr on an ATCC medium 488 agar plate, several colonies of bacteria resistant to antimicrobial agents were observed. Colonies with a diameter of approximately 0.1 mm were chosen and tested by PCR with the S5 and AS2 primers. After examination of more than 1000 colonies, only four colonies obtained from *R. norvegicus* and three from *R. rattus* tested positive. The colonies that formed on the ATCC medium 488 agar appeared translucent and greyish white. When cultured in the ATCC medium 488 broth, cotton-puff-like colonies, which were

typical in the culture of *S. moniliformis* (10–13), showed agglomeration (Fig. 2a).

Microscopic observation showed that the isolates were pleomorphic Gram-negative bacilli with irregular, lateral bulbar swellings (Fig. 2b).

#### Biochemical character of isolates and ATCC strains

As summarized in Table 4, the biochemical characteristics of three reference ATCC strains of *S. moniliformis* and seven isolates were almost identical. All isolates and ATCC strains had positive reactions for nitrate reduction. Although the esculin hydrolysis test gave variable results, depending on the strain, other tests on all strains gave identical results.