

図 1. 単クローン抗体 2A7 (■) または 2H6 (●) を捕捉抗体とした Ag-capture ELISA のマールブルグウイルスの組換え核蛋白の検出感度.

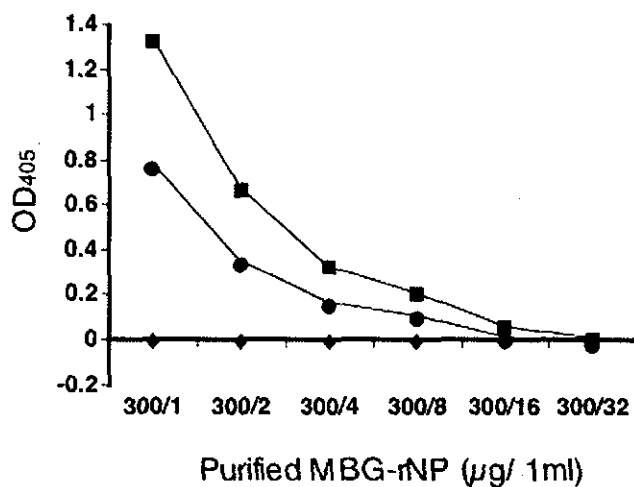


図 2. 単クローン抗体 2A7 のエピトープの決定 (パート 2). 線で表された部分蛋白上に示された番号は翻訳開始コドンからのアミノ酸番号である.

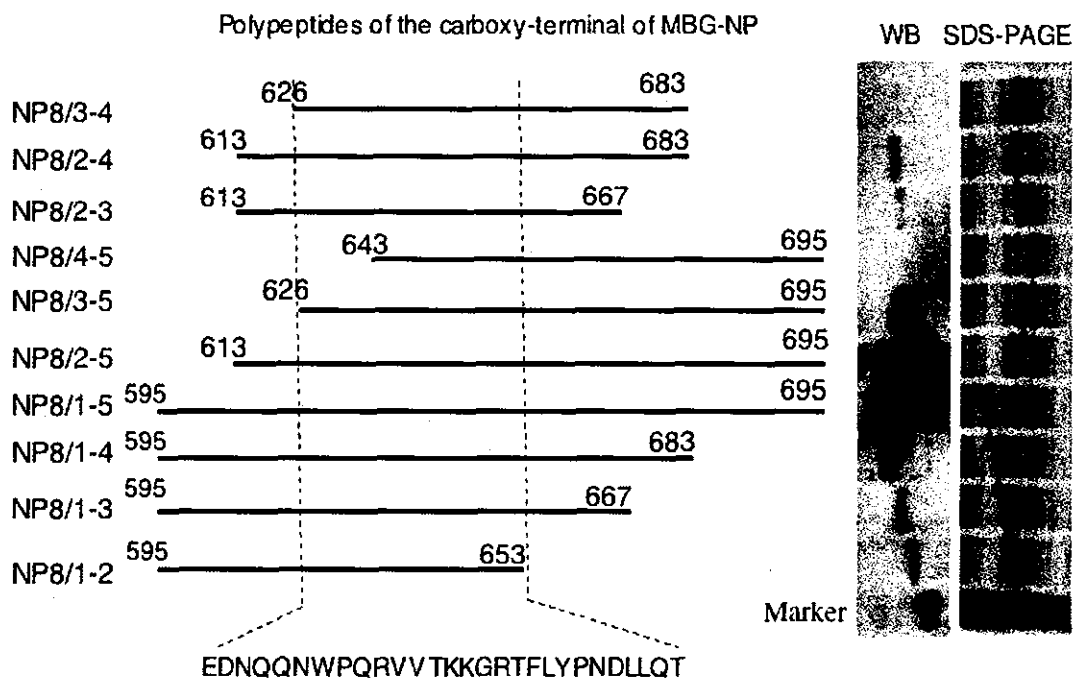


図 3. 単クローン抗体 2A7 のエピトープの決定 (パート 2). 線で表された部分蛋白上に示された番号は翻訳開始コドンからのアミノ酸番号である.

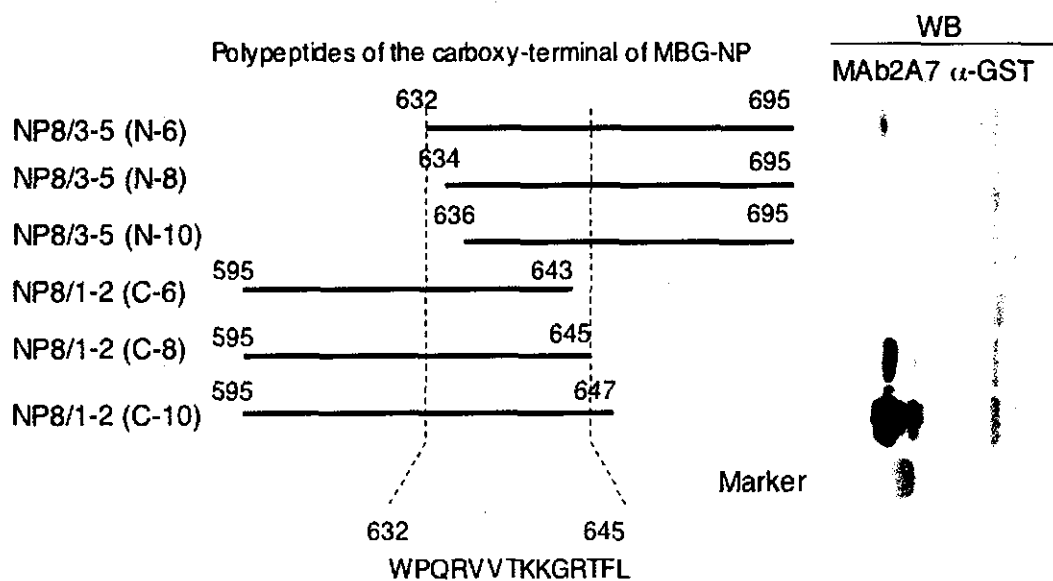


図 4. 単クローン抗体 2H6 のエピトープの決定. 線で表された部分蛋白上に示された番号は翻訳開始コドンからのアミノ酸番号である.

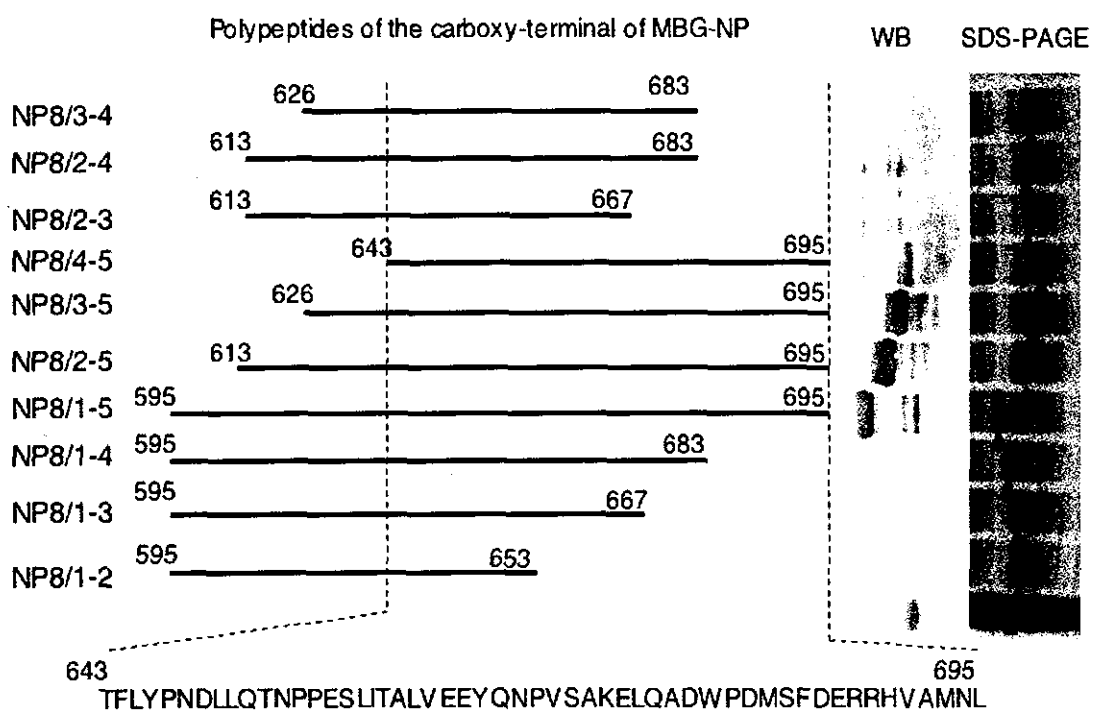


図 5. 間接蛍光抗体法における単クローン抗体 2A7 (A), 2H6 (B) およびウサギ抗マールブルグウィルス核蛋白抗体のマールブルグウィルス感染細胞との反応性. 対照として, 単クローン抗体 2A7 (D) と

2H6 (E) のマールブルグウイルス非感染 Vero 細胞との反応性を示した。

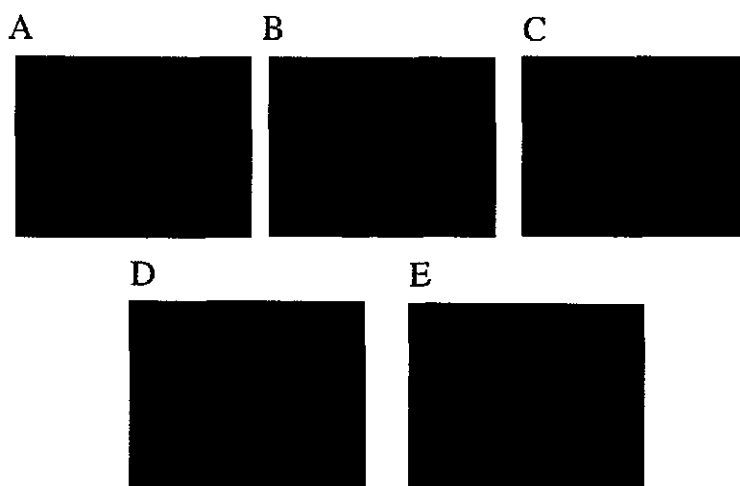
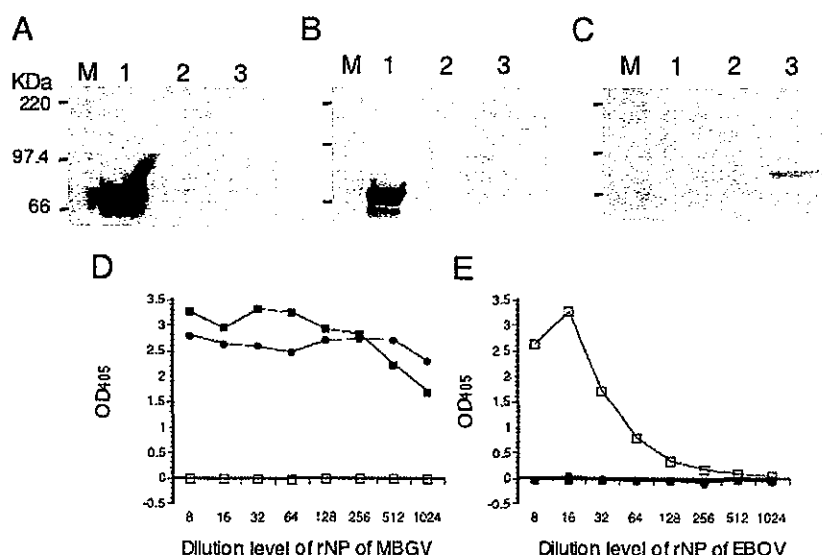


図 6. 単クローン抗体 2A7 (A), 2H6 (B), およびザイル型エボラウイルス核蛋白に対する単クローン抗体 3-3D (C) のマールブルグウイルス核蛋白とエボラウイルス核蛋白に対する Western blot 法における反応性と単クローン抗体 2A7 または 2H6 を捕捉抗体としたマールブルグウイルス核蛋白検出 ELISA によるマールブルグウイルス核蛋白とエボラウイルス核蛋白の検出 (D) および 3-3D を捕捉抗体としたエボラウイルス核蛋白検出 ELISA によるマールブルグウイルス核蛋白とエボラウイルス核蛋白の検出 (E). 尚, 図 A-C におけるレーン 1, 2, 3 は, それぞれマールブルグウイルス核蛋白, 対照, エボラウイルス核蛋白を示し, 図 D, E における ●, ■, および □, はそれぞれ 2A7 を捕捉抗体としたマールブルグウイルス核蛋白検出 ELISA, 2H6 を捕捉抗体としたマールブルグウイルス核蛋白検出 ELISA, 3-3D を捕捉抗体としたエボラウイルス核蛋白検出 ELISA を指す。



厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告

翼手目由来のウイルス感染症の疫学的解明

分担研究者 吉川泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
協力研究者 大松勉 東京大学大学院農学生命科学研究科 大学院生
久和茂 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授
明石博臣 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
遠矢幸伸 東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授

研究要旨

近年、翼手目由来もしくは翼手目の関与が疑われるウイルス感染症が世界的に問題となっている。それにも拘らず、これまで翼手目の分類・生態・免疫機能・感染病原体等を含めた統合的研究は行われていない。そこで翼手目に由来する感染症の疫学的解明のための基礎技術の開発および翼手目に関する基盤研究を進めた。

分子遺伝学および分子生物学的検索から翼手目は偶蹄目・奇蹄目・食肉目からなる群に近縁で、免疫応答に関連する蛋白の分子構造にもそれらの群と類似した特徴を持つことが明らかとなった。病理学的解析の結果から、リンパ組織における抗 IgG 抗体陽性 B 細胞の活性化が観察された。In vitro においては、日本の小型コウモリ由来 Yokose virus が肺由来初代培養細胞において CPE を示さないウイルス増殖が観察された。これらの結果は、翼手目が小動物を含めた産業動物全般のウイルスベクターとなりうることを示唆するものと考えられる。

A. 研究目的

近年、ヒトが感染した場合に致命的となる、ラブドウイルスに属する狂犬病を含めたリッサウイルス、およびパラミキソウイルスに属するニパウイルスやヘンドラウイルスなど翼手目に由来するウイルス感染症が世界的に問題となっている。またメナングルウイルスなど、これら以外の病原体も翼手目から分離されており、翼手目がこれまで考えられていた以上に、病原体の宿主動物である可能性が指摘されている。

それにも拘らず、これまで翼手目を対象とした研究は、その超音波機能や生殖戦略、社会行動などに限られており、感染症という視点からの基盤的研究は世界的にも欠落していた。したがって、翼手目の系統分類・生態・免疫機

能・感染病原体等についての研究は極めて稀であり、またそれらの統合的評価も行われていない。そこで本研究では、翼手目に由来する感染症の疫学的解明を目的として、そのための基礎技術の開発および翼手目に関する統合的基盤研究を進めた。

B. 研究方法

(1) 翼手目の系統学的解析: 翼手目は大きく、小翼手亜目と大翼手亜目に分類されており、ルーセットオオコウモリは大翼手亜目に分類されている。しかし、ルーセットオオコウモリは、唯一小翼手亜目が行うエコロケーション機能を保持しており、大翼手亜目のなかでは特異な存在である。そこで、エジプトルーセットオオコウモリの肝臓凍結サンプルより抽出したミトコン

ドリア DNA(mtDNA)についてその全長塩基配列を決定し、データベースより得た、翼手目および他動物種の mtDNA のシークエンス・データとともに系統学的解析を行った。

また、食虫コウモリである小翼手亜目は眼球の神経投射が完全に交差しており、果食コウモリである大翼手亜目は眼球の神経投射は霊長目と同様、両側に投射している。前述したように大翼手亜目の中で唯一、小翼手亜目の特徴であるエコロケーションを行うルーセットオオコウモリについては、これまで眼球の神経投射に関しては報告がなされていない。そこで抱水クロラール麻酔下で網膜に WGA-hRP を注入し視神経から中脳上丘への神経投射を検索した。さらにエコロケーションを行う小翼手亜目では蝸牛と頭蓋骨が分かれているが、エコロケーションを行わない大翼手亜目では霊長目と同様に蝸牛は頭蓋骨に陥入している。しかし、ルーセットオオコウモリの蝸牛については詳細な記載がない。ルーセットオオコウモリの系統発生上の位置を明らかにするため、聴覚系構造についても検討した。

(2) IgG 抗原エピトープの交差性から見た翼手目と他動物種の系統学的解析: これまでに行われている翼手目に関する感染病原体の疫学調査は、主としてウイルスに対する中和抗体法によるもので特異的な抗翼手目抗体を用いた広範な検索は行われていない。また、国内に生息する翼手目に関しても今後綿密な疫学調査を行う必要がある。

そのための第一段階としてルーセットオオコウモリ IgG に対する特異抗体を作成した。作成した抗オオコウモリ IgG 抗体が、広く小翼手亜目のコウモリ IgG にも反応し汎用性を持つか否かを検討した。またこの抗 IgG 抗体を用いて

IgG の抗原エピトープの交差性から見た翼手目と他動物種との関係を競合性 ELISA 法により検索した。

(3) 翼手目免疫機構の特性解析: 免疫機能に関連する主要な因子として CD4、IFN- α ・ β の遺伝子について蛋白コード領域の全塩基配列を決定し、比較動物学的な検索を行った。また、免疫担当器官である脾臓・リンパ節等についての病理学的な検索を行うとともに、前述の、抗 IgG 抗体を用いてリンパ組織内の免疫グロブリン陽性細胞の分布を免疫組織化学(IHC)的手法で検索した。

(4) 翼手目由来初代培養細胞を用いたウイルス感受性の検索: 翼手目由来腎臓および肺の初代細胞培養系を確立した。これらの初代培養細胞を用いて、家畜伝染病の病原体を含む各種ウイルスに対する感受性について、ウイルスの増殖曲線、細胞変性効果(CPE)の出現の有無、インターフェロン mRNA の発現などについて検索を進めた。

C. 研究結果

(1) 翼手目の系統学的解析: mtDNA の塩基配列を用いた解析の結果は、大翼手亜目が小翼手亜目と共に単系統をなしており、齧歯目や食虫目ではなく偶蹄目・奇蹄目・食肉目からなる群と近縁であるという説を支持するものであった。さらに翼手目内では、大翼手亜目は小翼手亜目のキクガシラコウモリ上科群と同一の祖先から分岐し、それがアフリカを起源として熱帯及び熱帯雨林に沿って東アジアへと広がったという新たな可能性が示唆された。この結果は翼手目の特性を明らかにし、比較動物学的な検索を行っていく上で重要である。

また翼手目の分布、生態とウイルスの分布の相関を検索していく上で非常に有益であると考えられる(図 1)。

眼球からの神経投射を検索する目的で、視神経から中脳上丘への神経投射を検索した結果、ルーセットオオコウモリは他の大翼手亜目のオオコウモリとともに、霊長目と同様な両側性の神経投射回路を示す事が明らかとなった(図 2)。今後、他のオオコウモリ・小型コウモリに関する同様な検索を進める。また、エコロケーションを特性とする小翼手亜目のコウモリの聴覚に関する組織解剖学的な検索を行う事により、翼手目におけるルーセットオオコウモリの系統学的特徴をさらに明らかにしていく予定である。

プレリミナリーなデータではあるが、これまでの mtDNA 塩基配列の検索結果、および眼球からの神経投射回路や蝸牛の構造特性に関する研究結果から、ルーセットオオコウモリは、キクガシラコウモリ上科とオオコウモリが分岐した時の、最も古いオオコウモリである(オオコウモリと小型コウモリのミッシング・リング)可能性が高い。

(2) IgG 抗原エpiteープの交差性から見た翼手目と他動物種の系統学的解析: 抗オオコウモリ IgG 抗体は霊長目、齧歯目、食虫目の IgG に対して 5~20% 以下と低い交差性を示した。これに対し、翼手目内では大翼手亜目、小翼手亜目ともに 95% 以上の高い交差性を示した(図 3)。これらの結果から、IgG の分子進化という観点から見ると大翼手亜目は小翼手亜目とかなりの近縁種で単系統と考えられ、翼手目は霊長目、齧歯目、食虫目とかなり以前に分岐した可能性が示唆された。この結果は mtDNA 塩基配列による分析結果と一致するものであった。本研究で作成された、この抗オオコウモ

リ IgG 抗体は汎翼手目 IgG 抗体として、今後疫学調査に用いる上で有用であることが示された。

(3) 翼手目免疫機構の特性解析: 遺伝子解析の結果、ルーセットオオコウモリの CD4 はアミノ酸 473 個からなる蛋白であった。他動物種の CD4 と系統学的比較を行った結果、塩基配列・アミノ酸ともに、偶蹄目、奇蹄目、食肉目との高い相同性が見られた。またその構造について検索を行った結果、ルーセットオオコウモリ CD4 はヒトやマウスと異なり細胞外 Ig-like C2 type1 領域に存在するシステイン対の片側がトリプトファンに置換され、ブタ、イヌ、ネコ、クジラなどと同様、同領域においてジスルフィド結合を作らないことが予想された(図 4)。この特徴は翼手目 CD4 がヒト、マウスとは異なった構造を作ることを示唆し、感染病原体のエpiteープに対する結合や MHC class II との結合、T 細胞の活性などに影響を及ぼしている可能性が示唆された。

IFN- α 、 β はそれぞれアミノ酸 561, 558 個からなる蛋白で、N 末端側の 23 個、21 個がシグナルペプチドとなる疎水性アミノ酸配列からなり、CD4 同様、偶蹄目、奇蹄目、食肉目との間に高い相同性が見られた。今後ウイルス感染初期の宿主の反応を検索する場合に、これらの情報が有用であると考えられる。

ルーセットオオコウモリを中心に、免疫担当器官の組織学的検索を行った。その結果、6 個体中すべての個体で白脾髄胚中心の明瞭化が観察され、マッソン・トリクローム染色および抗オオコウモリ IgG 抗体を用いた免疫染色の結果、胚中心の明瞭化は細胞質の豊富な抗 IgG 抗体陽性 B 細胞であることが分かった。さらに、リンパ節やパイエル板においても同様

の変化が観察された。これらの状態が、オオコウモリにおいて正常なものであるのか、何らかの病原体の持続感染状態が成立したために起こったものであるかについて、現在解析を進めている。初代培養細胞におけるインターフェロン mRNA の発現も、病原体による誘導、あるいは免疫学的な異常性の可能性を示唆している。今後の解析が必要である。

(4)翼手目由来初代培養細胞を用いたウイルス感受性の検索:ルーセットオオコウモリの腎臓、肺より初代細胞培養を行うための条件を確立した。DEM に 10%FCS を添加したものを増殖用培地とし、2%FCS 添加培地を細胞の維持培地とした。

初代培養細胞を用いてコウモリの関与が疑われるウイルスおよびコウモリより分離されたウイルスに対する感受性や感染時の細胞反応について検索を行った。これまで、日本のコウモリより分離された Yokose virus を用いた実験の結果、肺由来細胞に比べて腎由来細胞がより感受性の高く、肺由来細胞においては上清中のウイルス titer は上昇したが CPE が観察されなかった(図 5)。インターフェロンの産生を含め、この由来細胞間の差が何によるものか現在解析を行っている。オーエスキーウイルスはコウモリ由来の両初代培養細胞において比較的良好に増殖した。

また、牛流行熱ウイルス、アカバネウイルス、アインウイルス、ラブドウイルス福岡株、チュウザンウイルス等を用いた同様の実験も現在進行中である。

D. 考察

これまで感染症からの視点で系統立てた解析が行われてこなかった翼手目を対象に、感

染症疫学を進めるための基盤技術の開発を主目的に、系統分類、免疫機能の分子特性、初代培養細胞系の確立、ウイルス感染試験などを進めてきた。翼手目はほぼ全世界に分布し、齧歯目について種の多い哺乳類であり、感染症疫学を研究するにあたって最も適した種であると考えられる。

翼手目に関する基礎研究として行ってきたミトコンドリアや種々の免疫関連因子を対象とした遺伝子解析および抗原エピトープの解析、視覚・聴覚などの感覚器の構造特性から、ルーセットオオコウモリ属は大翼手亜目、小翼手亜目の中間的特徴を備えていることが示唆された。今後、オオコウモリと小型コウモリの病原体に対する特性を比較研究する上で非常に貴重な存在である。

免疫関連因子の遺伝学的解析の結果から、翼手目が偶蹄目・奇蹄目・食肉目といった群と近縁関係にあり分子構造などの特徴が類似していることから、感染病原体に対する結合や反応に分子構造が大きく関与する可能性があることをふまえると、翼手目が小動物を含めた産業動物全般のウイルスベクターとなりうることが示唆された。さらに、リンパ組織における抗コウモリ IgG 抗体陽性 B 細胞の活性化は、ある種の病原体の持続感染の可能性を示唆している。通常の細胞株で CPE を示さなかったウイルスが、翼手目由来腎臓初代培養細胞の IFN- β / β -actin 比の増大を誘導したことから、翼手目が何らかのウイルスベクターとしての役割を担っている可能性が考えられた。また、翼手目腎臓由来初代培養細胞を用いた Yokose virus 感染実験において Yokose virus が肺において潜伏感染する可能性を示唆する結果を得たことから、これらの細胞を用いた感染実験を行うことは、今後翼種目由来ウイルス感染症

を検索していく上で有用な研究手段となることが示された。

今後これまでの研究成果を基にして、様々な角度から翼手目の特徴を解明することによって翼手目由来感染症の疫学的解明に貢献したいと考える。

E. 結論と今後の展望

感染症法の見直しにより、平成16年11月から翼手目の輸入は全面禁止となり、輸入動物によるリスクは回避できたと考えられる。しかし、わが国には土着のコウモリが生息し、また沖縄や小笠原諸島にはオオコウモリも生息している。さらに野生のオオコウモリの飛翔能力を考慮すると台湾やフィリピンから野生動物として侵入してくる可能性もある。類似のリスクは小型翼手目について韓国などからの飛翔も考える必要がある。

こうした点を考慮すると、今後はアジア諸国との積極的な共同研究、特に翼手目の生態学、感染症疫学が必要になる。既にタイ国カセート大学、あるいはフィリピンの国立熱帯病研究所(RITM)との研究を進めているが、1つの病原体に限らず、広い視野にたった共同研究のネットワークを確立して行く必要がある。

いまや感染症、特に動物由来感染症は従来型の人やペットを対象とした下流の感染症対策や研究室の分析研究だけでは限界にきているのかも知れない。これからは環境科学、野生動物及び自然宿主に寄生する病原体の生態学やフィールド科学といった上流からの研究を進め、グローバルなリスク評価を行い、その対策をたてることが求められているのかも知れない。

F. 研究発表

口頭発表

- 1) 大松 勉、西村順祐、石井寿幸、寺尾恵治、久和 茂、吉川泰弘
翼手目免疫分子の特性解析について
第138回日本獣医学会 2004年
誌上発表

- 1) T. Omatsu, Y. Ishii, S. Kyuwa, E. G. Milanda, K. Terao, Y. Yoshikawa.
Molecular Evolution Inferred from Immunological Cross-reactivity of Immunoglobulin G among Chiroptera and Closely Related Species
Experimental Animals 52(5), 425-428, 2003

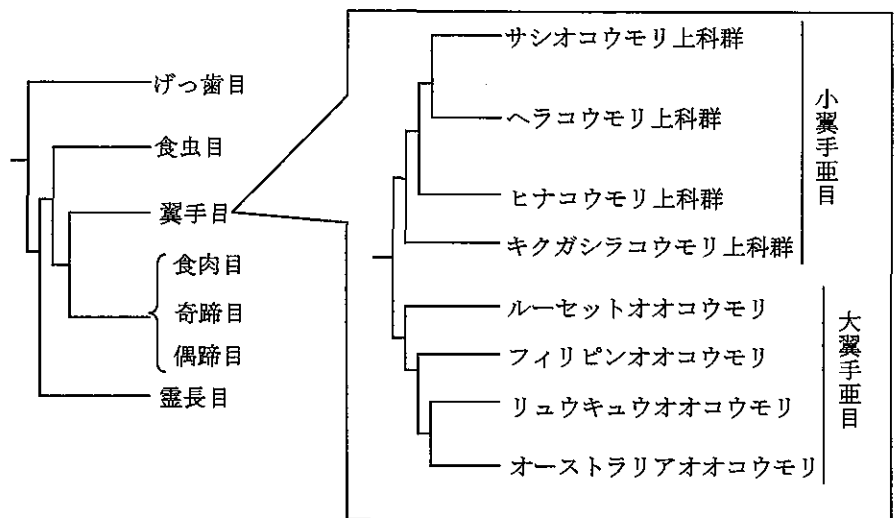


図 5030-1. mtDNA 塩基配列による翼手目と他動物種間 (左樹)、
および翼手目内 (右樹) の系統樹 (略図)

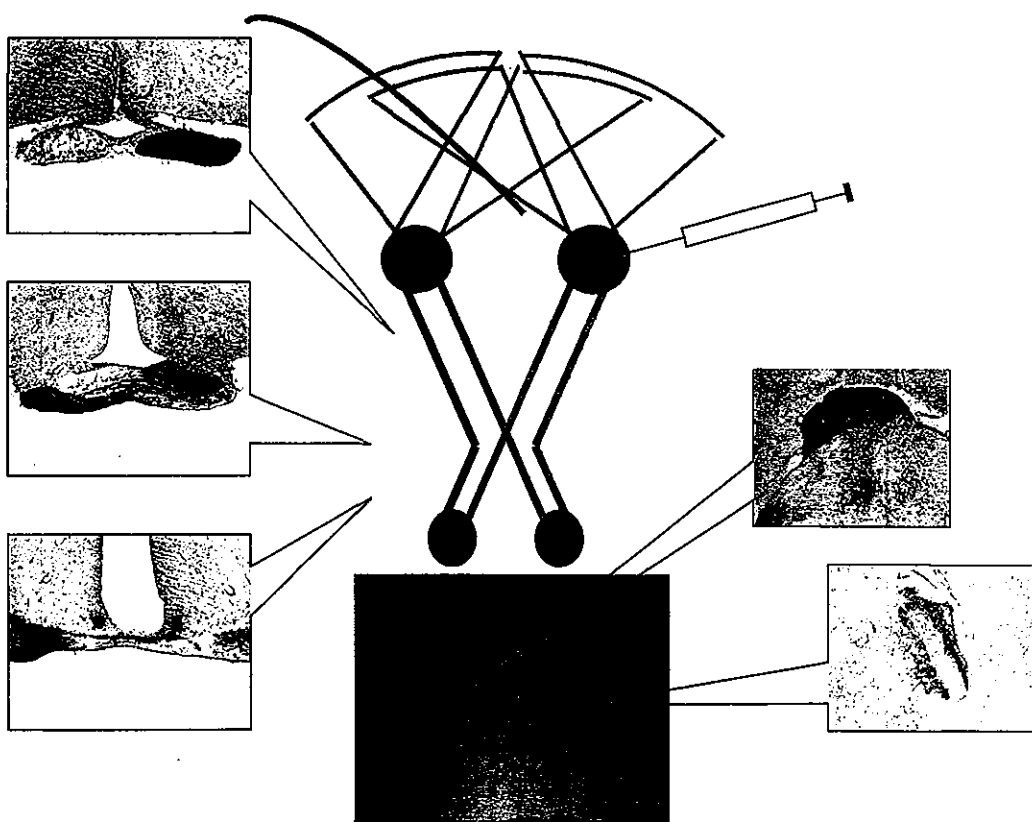


図5030-2.ルーセットオオコウモリの視神経回路、および中脳上丘への投射

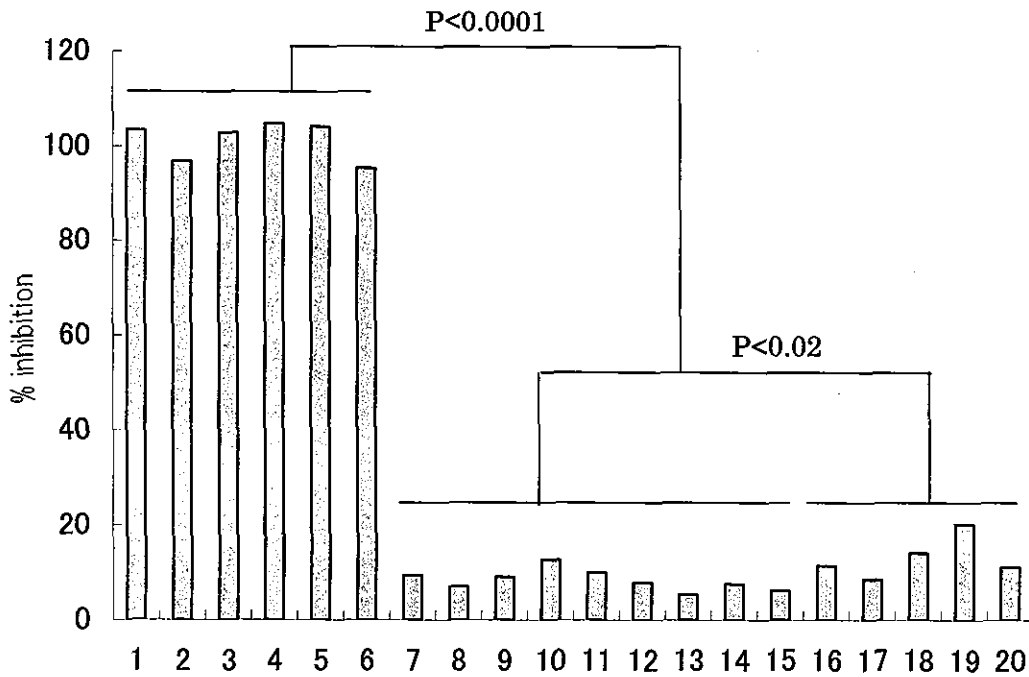


図5030-3. 抗オオコウモリIgG抗体の他動物種IgGとの交差性

ルーセットオオコウモリ (レーン 1, 2), 小型コウモリ (未同定種) (3), フィリピンオオコウモリ (4-6), モグラ (7-11), ジャコウネズミ (12-15), キツネザル (16, 17), カニクイザル (18), リスザル (19) ヒト (20).

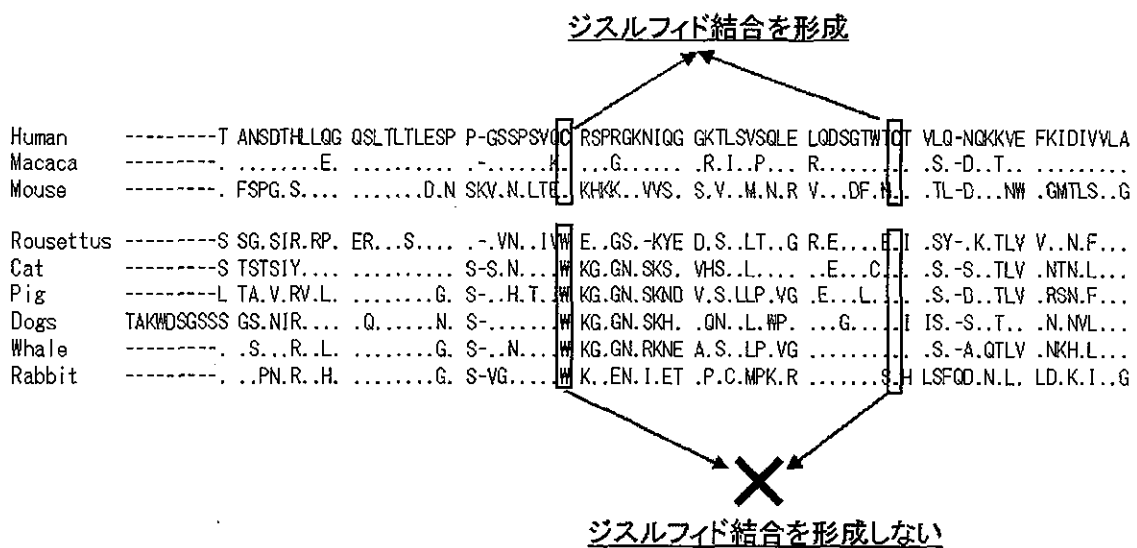
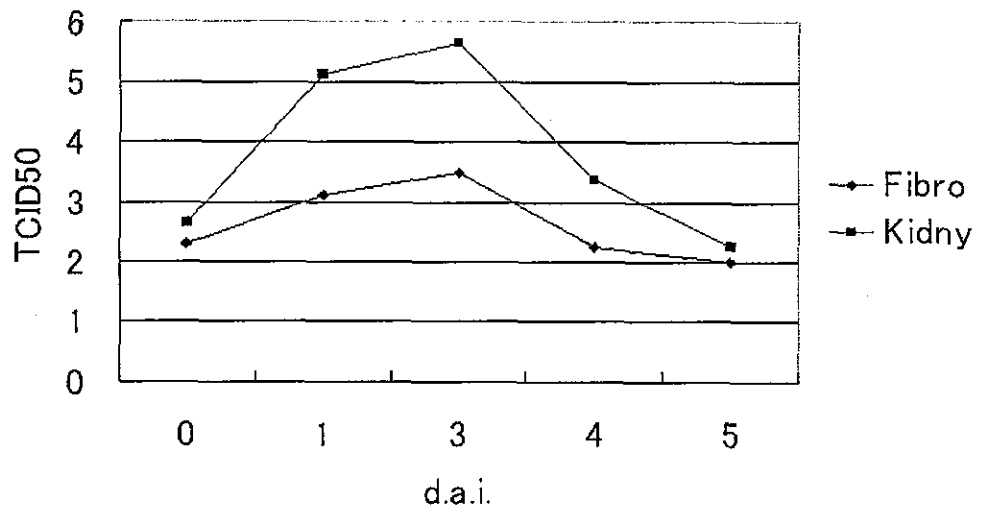


図5030-4. ルーセットオオコウモリ CD4 Ig like C2 type1 domain のアミノ酸配列



CPE	Kidney	-	-	-	+	+++
	Fibro	-	-	-	-	-

図030-5. コウモリ由来初代培養細胞におけるYokose virusの感受性について

マイクロチップによる動物の個体識別

(株)東レリサーチセンター

1. 目的

現在、動物の個体識別手法として、体内埋め込み型の小型マイクロチップが市販されており、イヌ・ネコを中心としたペット動物に利用されている。これらの体内埋め込み型個体識別マイクロチップ(以下マイクロチップという)の概要についてまとめた。

なお、ここでは個体識別のみを目的としたマイクロチップを対象とし、体温等のセンシングやテレメトリ機能をもつものは含めない。

2. マイクロチップ個体識別の仕組み

マイクロチップは、生体適合材料を使用したカプセル(生体適合ガラスやポリプロピレン)の中に、16桁のユニークな識別番号がプログラムされたICとコイルアンテナが封入されている構造をとっている。これを注射針に入れて動物の皮下に埋め込む。マイクロチップ自身はバッテリーを持たないが、リーダーからの特定の電波を受けると電磁誘導によってマイクロチップ内部のコイルアンテナに電力が発生し、この電力によって内部のICが起動して識別番号が発信され、リーダーに受信される仕組みとなっている(表 3-1)。

現在の市販品では、体内埋め込み後のマイクロチップの移動や脱落はほとんどなく、魚類や両生類等の水中にいる動物へ装着することも可能である。

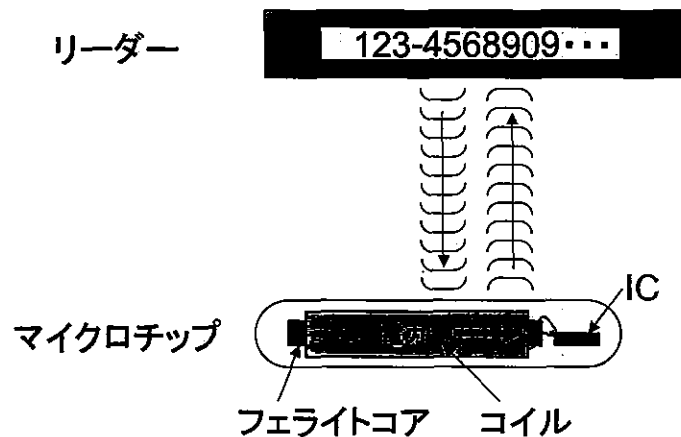


図 2-1 マイクロチップの仕組み

3. 日本で市販されているマイクロチップ(ISO 準拠)

現在、日本で市販されているペット用マイクロチップ(ISO 準拠製品)のメーカー及び商品名、サイズの一覧を表 3-1に示す。2002年にCAWC(Companion Animal Welfare Council/英国)が発表したコンパニオンアニマルの個体識別と登録に関するレポート¹においてもこの4つのメーカーが紹介されている。

表 3-1 日本で市販されているペット用マイクロチップ

会社名	商品名	サイズ(カタログ値)
Avid Identification Systems Inc.	AVID microchip	φ 2×13 mm
Digital Angel Corporation	LIFE CHIP	φ 2.1×11.0 mm
Trovan, Ltd.	ID 162A Micro Transponder	φ 2.12×11.5 mm
DATAMARS SA	FDX-B Transponder	φ 2×13.3 mm

AVID(American Veterinary Identification Device)社のマイクロチップは、獣医師が開発した製品である。企業のホームページ(<http://avidmicrochip.com/>)には、エキゾチックアニマルを含め、様々な動物への適用が可能であると述べられている。Digital Angel Corporation 社(旧 Destron Fering 社、<http://www.digitalangelcorp.com/>)も、同じく米国の企業である。埋め込み型のマイクロチップのほか、ウシやブタ等の家畜用のイヤタグ等も製造している。Trovan 社(<http://trovan.com/>)も米国の企業である。以前は、野生動物の保護団体などで使用されてきた独自規格のマイクロチップを採用していたが、現在では表中に示すような ISO 規格品も製造している。DATAMARS 社(<http://www.datamars.com/>)は、この 4 社中唯一のスイス企業で、衣料クリーニングや衣料レンタル向けの識別マイクロチップも製造している。

各社のマイクロチップの大きさにはほとんど違いはなく、いずれの商品もチップ単体、あるいは滅菌したインジェクターとのセットで販売されている。チップ1個あたりの価格はおよそ 1,500 円程度である。リーダーについては読み取り距離が短く、読み取り機能に限定したもので数万円、データメモリー機能やパソコンによる管理ソフトウェアを含めたフルセットになると 40 万円程度となっている。

¹ Report on the Identification and Registration of Companion Animals, The Companion Animal Welfare Council, 2002

資料・業績

4. 様々な動物への応用

イヌ・ネコ以外のペットや野生動物、稀少動物に対するマイクロチップの利用は既に欧米で進んでいる。BVZS²(British Veterinary Zoological Society)、CBSG(Conservation Breeding Specialist Group)、FZGGB(Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland)等では、脊椎動物におけるマイクロチップ埋め込み場所のガイドラインをまとめている。表 4-1に、BVZS が推奨する埋め込み場所を示す。

表 4-1 BVZS Advice for Commonly Microchipped Species

動物種		挿入部位
魚類		MIDLINe, anterior to dorsal fin.
両生類		Lymphatic cavity.
爬虫類	カメ	subcutaneously in left hind leg (intramuscularly in thin-skinned species); subcutaneously in the tarsal area in giant species.
	ワニ	anterior to nuchal cluster.
	トカゲ	Left quadriceps muscle, or subcutaneously in this area (all species) In very small species subcutaneously on the left side of the body.
	ヘビ	left nape of neck subcutaneously placed at twice the length of the head from the tip of the nose.
	it is recommended that tissue glue is placed over the needle entry site in all reptiles.	
鳥類	全般	Left pectoral muscle.
	ダチョウ	pipping muscle.
	ペンギン	subcutaneously at base of neck.
哺乳類	大型	left mid-neck subcutaneously.
	中型、小型	between scapulae.
	霊長類	alternative site - back of hand (metacarpal) or foot (metatarsal). This area is suitable if animals can be trained to present hands or feet through cage bars.
	ゾウ	behind the left ear, or wherever appropriate for the individual animal.

² <http://www.bvzs.org/>

Characterization of Monoclonal Antibodies to Marburg Virus Nucleoprotein (NP) That can be Used for NP-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Masayuki Saijo,^{1*} Masahiro Niikura,¹ Akihiko Maeda,¹ Tetsutaro Sata,² Takeshi Kurata,² Ichiro Kurane,¹ and Shigeru Morikawa¹

¹Special Pathogens Laboratory, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama, Tokyo, Japan

²Department of Infectious Disease Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama, Tokyo, Japan

After the first documented outbreak of Marburg hemorrhagic fever identified in Europe in 1967, several sporadic cases and an outbreak of Marburg hemorrhagic fever have been reported in Africa. In order to establish a diagnostic system for Marburg hemorrhagic fever by the detection of Marburg virus nucleoprotein, monoclonal antibodies to the recombinant nucleoprotein were produced. Two clones of monoclonal antibodies, MAb2A7 and MAb2H6, were efficacious in the antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At least 40 ng/ml of the recombinant nucleoprotein of Marburg virus was detected by the antigen-capture ELISA format. The epitope of the monoclonal antibody (MAb2A7) was located in the carboxy-terminus of nucleoprotein from amino acid position 634 to 647, while that of the MAb2H6 was located on the extreme region of the carboxy-terminus of the Marburg virus nucleoprotein (amino acid position 643–695). These monoclonal antibodies strongly interacted with the conformational epitopes on the carboxy-terminus of the nucleoprotein. Furthermore, these two monoclonal antibodies were reacted with the authentic Marburg virus antigens by indirect immunofluorescence assay. These data suggest that the Marburg virus nucleoprotein-capture ELISA system using the monoclonal antibodies is a promising technique for rapid diagnosis of Marburg hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* 76:111–118, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Marburg virus; antigen-capture ELISA; monoclonal antibody; diagnosis

INTRODUCTION

Marburg virus (MBGV) infections cause one of the most severe forms of hemorrhagic fevers with a high mortality rate [Feldmann et al., 1996; Anonymous, 1999; Bausch et al., 2003]. MBGV belongs to the genus Marburg-like virus, family Filoviridae. Ebola viruses (EBOVs), which belong to genus Ebola-like virus, family Filoviridae, also cause Ebola hemorrhagic fever with a high mortality rate [Peters and LeDuc, 1999]. The first documented outbreak of Marburg hemorrhagic fever occurred in the former West Germany and the former Yugoslavia in 1967 [Martini et al., 1968]. The outbreak occurred among scientists and technicians who had handled monkeys, or their tissues, imported from Uganda [Martini et al., 1968]. Thirty-two patients were affected and seven died in the outbreak. After the first documented outbreak, three sporadic cases of Marburg hemorrhagic fever were reported in Zimbabwe (1975) and Kenya (1980 and 1987), resulting in the diagnosis of six patients with Marburg hemorrhagic fever [Smith et al., 1982; Conrad et al., 1987; Feldmann et al., 1996; Johnson et al., 1996]. Human to human transmission of Marburg hemorrhagic fever was documented in an outbreak in South Africa after patients with Marburg hemorrhagic fever had been transferred there from Zimbabwe [Gear et al., 1975]. Three of the six patients in

Grant sponsor: Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

*Correspondence to: Masayuki Saijo, MD, PhD, Special Pathogens Laboratory, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan. E-mail: msaijo@nih.go.jp

Accepted 17 January 2005

DOI 10.1002/jmv.20332

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

these sporadic outbreaks died. From 1998 to 1999, there was a large outbreak of Marburg hemorrhagic fever in the Democratic Republic of Congo, former Zaire [Bausch et al., 2003]. More than 100 patients with Marburg hemorrhagic fever were reported in that outbreak and the mortality rate was more than 50%.

Marburg hemorrhagic fever should be confirmed by virus isolation, detection of virus antigen and/or virus genome, or by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) using samples from patients. Virus isolation, electron microscopic examination, and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) are used for the diagnosis of Marburg virus infection [Ksiazek et al., 1999; Sanchez et al., 1999]. Although antigen-capture ELISA systems have been used for the diagnosis of Ebola hemorrhagic fever [Ksiazek et al., 1999], no antigen-capture ELISA for Marburg virus has yet been used for confirmation of infection.

In the present study, monoclonal antibodies to the recombinant nucleoprotein (rNP) of MBGV were generated and an antigen-capture ELISA using these monoclonal antibodies was developed. These monoclonal antibodies efficacious were characterized.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Hybridomas and their parental cell line, P3/Ag568, were maintained in PRMI 1640 (Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), nonessential amino acids (Invitrogen), and antibiotics (streptomycin and penicillin G, Invitrogen). Hypoxanthine-aminopterin-thymidine supplement (Invitrogen) was added to the medium for selection of hybridomas, as recommended by the supplier. High five (Tn5) insect cells were maintained in TC100 (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 2% tryptose phosphate broth (Difco, Detroit, MI), and kanamycin (Invitrogen).

Authentic MBGV Antigen

Radiation-inactivated and acetone-fixed authentic MBGV (the Musoke strain)-infected Vero E6 cells spotted on slides for immunofluorescence testing were kindly supplied to T.K. in 1987 by Dr. J.B. McCormick, former chief of the Special Pathogens Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

rNP of MBGV

A full-length rNP of MBGV tagged with a 6× histidine at the amino-terminus was expressed using a baculovirus system [Saijo et al., 2001]. The DNA corresponding to each truncated NP fragment was amplified with the primers from a cDNA clone of NP of MBG provided by H.-D. Klenk, Philipps-University, Marburg, Germany. The full-length rNP of MBGV consisted of 695 amino acid residues. The truncated rNP fragments of the carboxy-terminal region of MBGV (MBG-NP/C-half, amino acid positions 341–695) was also expressed in an *Escherichia coli* (*E. coli*) system as a fusion protein with glutathione *S*-transferase (GST) as described previously [Saijo et al., 2001]. Smaller fragments of the rNP in the extreme carboxy-terminus (MBG-NP8, amino acid position 595–695) were also expressed as a form of GST-fusion protein at the amino-terminal portion in the *E. coli* system transformed with the respective pGEX-2T vector (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) inserted with the corresponding DNA of the MBGV nucleoprotein. The data on the primers used for making the corresponding DNA regions are shown in Table I. The nucleotide sequence of the inserted DNAs was determined to exclude PCR errors.

The full-length rNP of MBGV was purified with the N^{2+} -resin purification system (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The GST-MBG-NP/C-half was also purified with glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences Corp.). The protein concentration of the purified rNP of MBGV was measured by the Bradford method using

TABLE I. Primers Used in the Present Study

Sequence ^a	Name	Nucleotide position ^b	Direction
GGT <u>GAT</u> TGATCAGA <u>ACCT</u> TATAAGATC	MBG-NP 8F	1771–1796	Forward
CAGGAATGATCAAGGATGAGGGAAGCC	MN8/2F	1819–1845	Forward
CTCTGGAATTCATGTTTGCAGAAAGATCA	MN8/2R	1944–1971	Reverse
TTACATGATCAGAGGATAATCAGCAG	MN8/3F	1864–1890	Forward
CAGGAATTCAGTATTCCTCAACGAGGGC	MN8/3R	1984–2011	Reverse
AAGAAGTGA <u>TCA</u> ACTTTCCTTTATC	MN8/4F	1915–1939	Forward
TTCATGAATTCACATGTCGGGCCAATC	MN8/4R	2035–2061	Reverse
GCTGAATTCCTCTGGACTACAAGTTC	MBG-NP 8R	2079–2103	Reverse
CAGGGATCCTGGCCACAAAGAGTG	M8/2F-6	1885–1908	Forward
AATGGATCCCAAAGAGTGGTGAC	M8/2F-8	1891–1913	Forward
CCAGGATCCGTGGTGACAAAGAAG	N8/2F-10	1897–1920	Forward
GCAGAAAGAAATTCAGGATAAAGGAAAG	M8/3R-6	1928–1954	Reverse
GATCATGAATTCAAAGGAAAGTTCTAC	M8/3R-8	1922–1948	Reverse
TAGGAGAATTCAAAGTTCTACCCCTC	M8/3R-10	1917–1942	Reverse

^aRestriction sites are underlined.

^bNucleotide position is counted from the initiation ATG codon of the nucleotide gene of Marburg virus (GenBank Accession No. X68495).

Protein AssayTM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions.

rNP of EBOV

The full-length rNP of Zaire Ebola virus was expressed by the baculovirus system and purified as described previously [Saijo et al., 2001].

Establishment of Monoclonal Antibodies

BALB/c mice were immunized three times with the purified GST-MBG-NP/C-half. Spleen cells were obtained 3 days after the last immunization and fused with P3/Ag568 cells using polyethylene glycol (Invitrogen). The culture supernatants of the hybridoma cells were screened by ELISA with purified GST-MBG-NP/C-half as an antigen. Monoclonal antibodies were purified from the culture supernatant with an MAb Trap GII antibody purification kit (Amersham Biosciences Corp.) according to the manufacturer's instructions. The isotypes of the monoclonal antibodies were determined with a Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Invitrogen). The concentration of each purified monoclonal antibody was also determined by the Bradford method using Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's instructions.

Polyclonal and Monoclonal Antibodies

The polyclonal antibody was induced in rabbits by immunization with the purified rNP of MBGV expressed in the baculovirus system [Saijo et al., 2001]. Rabbit and mouse sera collected before immunization were used as controls.

A monoclonal antibody to rNP of EBOV (3-3D), which is efficacious in the EBOV nucleoprotein-capture ELISA, was used [Niikura et al., 2001].

Antigen-Capture ELISA

Purified monoclonal antibody was coated on microwell immunoplates (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) at >100 ng/well in 100 μ l of PBS at 4°C overnight, followed by blocking with PBS containing 5% nonfat milk and 0.05% Tween-20 (PBST-M) for 1 hr at room temperature (RT). After the plates were washed with phosphate-buffered saline solution (PBS) containing 0.05% Tween-20 (PBST), 100 μ l of samples containing serially diluted rNP of MBGV were added and the plates were incubated for 1 hr at 37°C. The plates were then washed with PBST, and 100 μ l of rabbit polyclonal antibody raised against rNP of MBGV diluted 1:500 with PBST-M was added to each well. After 1 hr incubation at 37°C, the plates were washed with PBST and horseradish peroxidase (HRPO)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA) was added. The plates were incubated for 1 hr at RT. After another extensive wash with PBST, 100 μ l of ABTS substrate solution [4 mM 2,2-azino-di[3-

ethylbenzthiazolinesulfate(6)] solution; 2.5 mM hydrogen superoxyphosphate (pH 4.2)] (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was added and the optical density (OD) was measured at a wavelength of 405 nm with a reference wavelength 490 nm after 30 min of incubation at 37°C. As a negative control, mock antigen-inoculated wells were tested. The adjusted OD values (OD₄₀₅) were calculated by subtracting the OD of the negative control well from the corresponding OD values.

Western Blotting

The monoclonal antibodies were tested for reactivity to the recombinant rNP fragments by Western blotting. Briefly, the expressed rNP fragment series were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the separated proteins were transblotted to the nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA). The monoclonal antibodies that reacted with the blots were detected with HRPO-conjugated goat anti-mouse IgG (Zymed) and peroxidase substrate (POD substrate, Wako Pure Chemical, Tokyo, Japan). The monoclonal antibody to GST produced in our laboratory was also used. The SDS-PAGE gels were prepared in the same way as those for Western blotting and were stained by Coomassie staining solution for visualization.

Indirect Immunofluorescence Assay (IFA)

The authentic MBGV for IFA were reacted with each of the monoclonal antibodies or control mouse serum at 37°C for 1 hr in humidified conditions. Slides were then washed with PBS and the antigens were reacted with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Zymed). As a control, the antigens were simultaneously reacted with either the polyclonal antibody to the rNP of MBGV or a control rabbit serum at 37°C for 1 hr in a humidified condition. The slides were washed with PBS and the antigens were reacted with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Zymed). After washing with PBS, the fluorescein-signal was observed under an immunofluorescent microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

RESULTS

Generation of Monoclonal Antibodies

Five hybridoma clones secreting IgG antibodies to GST-MBG-rNP/C-half were produced. The secreted monoclonal antibodies were purified and tested for reactivity to the rNP of MBGV in IgG-ELISA. Four monoclonal antibodies reacted with the rNP of MBGV in IgG-ELISA. Two of these four monoclonal antibodies secreted from the hybridoma clones, 2A7 and 2H6, could be used in the antigen-capture ELISA format. These two monoclonal antibodies were designated as MAb2A7 and MAb2H6, respectively. The isotype of MAb2A7 and MAb2H6 was IgG1.

Antigen-Capture ELISA Using the Monoclonal Antibodies

The antigen-capture ELISA with MAb2A7 or MAb2H6 detected at least 40 ng/ml of the purified rNP of Marburg virus, while the ELISA with mock-antibody (PBS) showed a negative reaction (Fig. 1). Furthermore, the ELISA did not react with negative control samples that did not contain rNP of MBGV.

Definition of Epitopes Recognized by the Monoclonal Antibodies

The MAb2A7 and MAb2H6 reacted with both GST-MBG-NP/C-half and GST-MBG-NP8 in Western blotting. Smaller fragments of the MBG-NP8 region were expressed and the reactivity of these monoclonal antibodies to these fragments was analyzed (Fig. 2).

The MAb2A7 reacted with all the fragments that contained the polypeptide of amino acid residues from amino acid position 626 to 653 (Fig. 2). Truncated polypeptides of this region were further designed and expressed as shown in Fig. 3. Reactivity of the monoclonal MAb2A7 to these fragments was evaluated (Fig. 3). The MAb2A7 reacted with the polypeptide, "WPQRVVTKKGRITFL (amino acid positions 632–645)" (Fig. 3). Although the epitope of the MAb2A7 was located in this region, MAb2A7 reacted with the MBG-NP8/1-5 (amino acid positions 595–695) more strongly than with the smaller fragments (Fig. 2), indicating that the reactivity of MAb2A7 with the nucleoprotein of MBGV was influenced by conformational and structural properties.

The MAb2H6 strongly reacted with the truncated polypeptides containing the extreme carboxy-terminal region and which were larger than the polypeptides mentioned above (Fig. 4). The smallest polypeptide to

react with MAb2H6 was that consisting of amino acid residues (amino acid positions 643–695). MAb2H6 did not react with any of the polypeptides lacking the extreme carboxy-terminal region (amino acid positions 584–695) (Fig. 4). These results indicate that MAb2H6 reacted with the conformational epitope composed of the extreme carboxy-terminal region.

Reactivity of the Monoclonal Antibodies to Authentic MBGV Antigen in IFA

MAb2A7 and MAb2H6 both reacted with the authentic MBGV antigens by the IFA test as well as the rabbit serum raised to rNP of MBGV. Negative control mouse and rabbit sera did not react with the authentic antigens (Fig. 5).

Reactivity of the Monoclonal Antibodies to rNP of EBOV

Neither of MAb2A7 and MAb2H6 reacted with the rNP of EBOV by both Western blotting and the antigen-detection ELISA, while MAb3-3D reacted with rNP of EBOV (Fig. 6). Both MAb2A7 and MAb2H6 reacted with rNP of MBGV by both the Western blotting and the antigen-detection ELISA, but MAb3-3D did not (Fig. 6).

DISCUSSION

Detection of MBGV antigen and amplification of viral genome of MBGV is necessary for rapid diagnosis of Marburg hemorrhagic fever. The application of RT-PCR and TaqMan PCR to MBGV genome amplification has been suggested [Sanchez et al., 1999; Drosten et al., 2002]. Although, serological diagnosis is also useful for the diagnosis of Marburg hemorrhagic fever, serum samples collected at both acute and convalescent phases are required, suggesting that serological diagnosis may not be suitable in certain areas and that it may not be applied in fatal cases without antibody responses. Therefore, a novel antigen-capture ELISA has been developed in the present study.

Two monoclonal antibodies (MAb2A7 and MAb2H6) developed in the study reacted with the authentic MBGV antigens by IFA (Fig. 5). At least 40 ng/ml of rNP of MBGV was detected in the MBGV nucleoprotein-capture ELISA using these monoclonal antibodies (Fig. 1). Unfortunately, the efficacy of the developed antigen-capture ELISA has not been validated using clinical samples, because clinical samples from patients with Marburg hemorrhagic fever at an acute phase were not available. It is generally accepted that antigen-capture ELISA is useful for the detection of viral antigens in blood and/or other organ tissue specimens collected not only from surviving patients but also from patients in whom the infection was fatal. The present study suggests that the antigen-capture ELISA using the unique monoclonal antibodies is a useful tool for diagnosis.

The nucleoprotein-detection ELISA systems for Zaire Ebola and Reston Ebola viruses were developed by

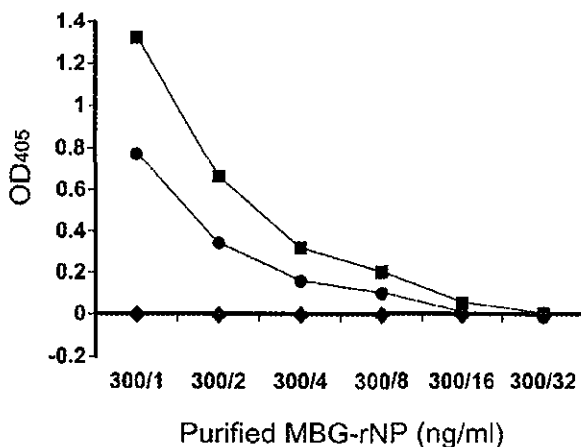


Fig. 1. Reactivity of each monoclonal antibody in the antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) format. Purified monoclonal antibodies (■, MAb2A7; ●, MAb2H6; ◆, mock) were coated onto the microplates as described in the text, and their ability to capture the rNP of Marburg virus (MBGV) was examined at various concentrations of MBGV rNP in the antigen-capture format.

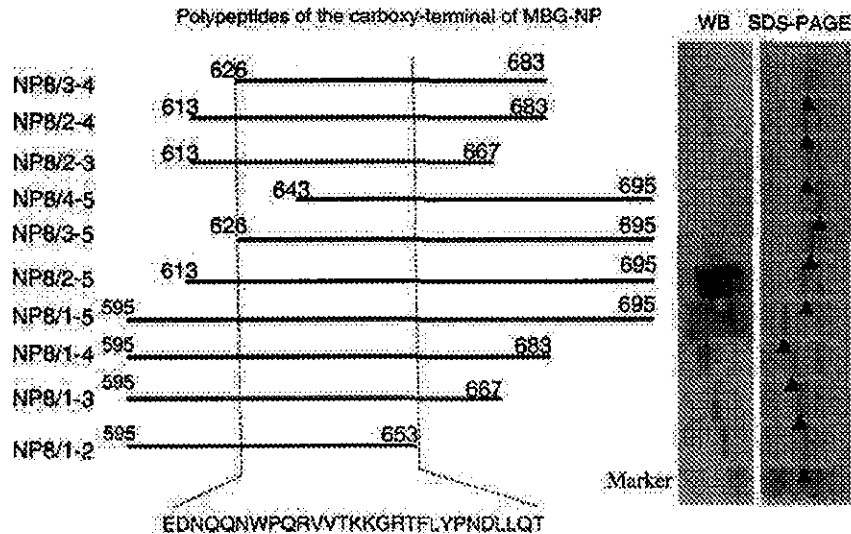


Fig. 2. Schematic representation of the truncated polypeptides (left part), expression levels of these polypeptides determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis (right part, SDS-PAGE), and reactivity of Mab2A7 to these polypeptides in Western blotting (WB) (right part, WB). The numbers shown for each schematic polypeptide indicate the amino acid positions of the MBGV nucleoprotein.

previous studies [Niikura et al., 2001; Ikegami et al., 2003]. Interestingly, the monoclonal antibodies, which could be used as antigen-capture antibodies in the antigen-capture ELISA systems, reacted with the carboxy-terminal regions of Ebola virus nucleoproteins. The monoclonal antibodies in the present study also reacted with a similar region of the nucleoprotein of MBGV. Although data are not shown here, none of monoclonal antibodies to nucleoproteins of Ebola and Marburg viruses, which reacted with regions other than the approximately 100 amino acid residues at the carboxy-terminal region, were found to be useful as

antigen-capture antibodies in the antigen-capture ELISA. Thus, it is likely that the monoclonal antibodies to nucleoproteins of filoviruses useful in antigen-capture ELISA systems react with the carboxy-terminal region of the nucleoproteins.

The symptoms due to MBGV infections in humans and non-human primates are indistinguishable from those due to EBOV infections. Therefore, it was considered that reactivity of the monoclonal antibodies to the nucleoprotein of EBOV should be examined. It was confirmed that neither of monoclonal antibodies, 2A7 and 2H6, cross-reacted with nucleoprotein of EBOV

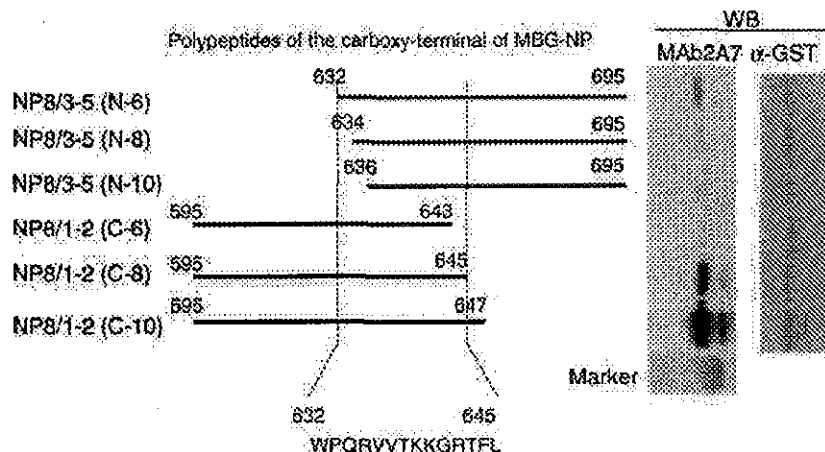


Fig. 3. Schematic representation of the truncated polypeptides (left part), and reactivity of Mab2A7 and anti-glutathione S-transferase (GST) monoclonal antibody to these polypeptides in WB. The numbers shown for each schematic polypeptide indicate the amino acid positions of the MBGV nucleoprotein.