

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

生物テロに使用される可能性の高い病原体による
感染症の蔓延防止、予防、診断、
治療に関する研究班

平成14～16年度 総合研究報告書

平成17年3月

主任研究者

島田 馨

(東京専売病院)

平成16年度新興・再興感染症研究事業
 生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延防止、
 予防、診断、治療に関する研究班
 班員名簿

氏名	所属	職名
島田 馨	東京専売病院	院長
佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
神山 恒夫	国立感染症研究所獣医科学部	室長
渡辺 治雄	国立感染症研究所細菌第一部	部長
森川 茂	国立感染症研究所ウイルス第一部	室長
岸本 寿男	国立感染症研究所ウイルス第一部	室長
高橋 元秀	国立感染症研究所細菌第二部	室長
牧野 壮一	帯広畜産大学原虫病研究センター	教授
江崎 孝行	岐阜大学医学部微生物学講座	教授
倉園 久生	岡山大学医学部保健学科検査技術科学	教授
岩本 愛吉	東京大学医科学研究所先端医療研究センター	教授
相楽 裕子	横浜市民病院感染症部	部長
河野 茂	長崎大学医学部第二内科	教授
山口 恵三	東邦大学医学部微生物学講座	教授
賀来 満夫	東北大学大学院医学系研究科病態制御学講座	教授
角田 隆文	東京都立荏原病院感染症科	部長
大西 健児	東京都立墨東病院感染症科	部長
吉開 泰信	九州大学生体防御医学研究所感染防御研究センター	教授
中村 修	慶応義塾大学環境情報学部	助教授

目 次

I. 総合研究報告書（平成 14～16 年度）

生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延防止、
予防、診断、治療に関する研究班・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
主任研究者：島田 馨（東京専売病院）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

III. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

I. 総合研究報告書

生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延 防止、予防、診断、治療に関する研究

主任研究者 島田 馨（東京専売病院院長）

研究要旨 パイオテロ関連疾患はカテゴリ-A から C まで分類され多数の疾患がある。いずれも現在ではわが国には存在しないか稀な感染症であり、最初に診断する医師が疑わなければその発生を把握することさえ出来ない。臨床医の診断・検査・治療における役割は大きい。一般臨床医、検査技師等に役立つような生物テロ関連感染症について臨床診断・検査・治療マニュアルを作製した。ホームページを作製中で近々公開予定である。また検査診断法として、迅速病理・免疫組織化学診断法、天然痘、サル痘、エボラ出血熱、ペスト菌、炭疽菌、野兔病菌、鼻疽・類鼻疽菌、Q 熱コクシエラの核酸迅速診断法、ニューキノロン耐性ないし低感受性菌の検出系、ブルセラ、エボラ出血熱、クリミア-コンゴ出血熱、Q 熱コクシエラの血清診断系を開発し、炭疽菌、野兔病菌、類鼻疽菌の免疫診断用抗原を作製した。これらの検査診断法をさらに発展させ、迅速化、特異性を高め、高感度化をはかった。またボツリヌス毒素の簡易診断キットとボツリヌストキソイドを作製した。開発した検査診断法についてはキット化およびマニュアル化を進め、さらに網羅的スクリーニング法を開発していく必要がある。

分担研究者：

（感染研小班）

佐多徹太郎 国立感染症研究所部長
神山恒夫 国立感染症研究所室長
渡邊治雄 国立感染症研究所部長
森川 茂 国立感染症研究所室長
高橋元秀 国立感染症研究所室長
岸本寿男 国立感染症研究所室長

（大学小班）

牧野壮一 帯広畜産大学教授
江崎孝行 岐阜大学医学部教授
倉園久生 岡山大学医学部教授

（臨床小班）

岩本愛吉 東京大学教授
相楽裕子 横浜市民病院部長
河野 茂 長崎大学教授
山口恵三 東邦大学教授
賀来満夫 東北大学教授

角田隆文 東京都立荏原病院部長
大西健児 東京都立墨東病院部長
吉開泰信 九州大学教授
中村 修 慶応義塾大学助教授

A. 研究目的

2001年9-10月にアメリカで発生した炭素菌芽胞混入郵便物を用いたテロ事件に続いて、わが国で同様の模倣事件が多発した。これらの事件に対処する過程で、パイオテロ等の緊急事態に対応して、従来以上の迅速な病原体検出法、蔓延防止策、予防、診断、治療法の開発とその普及の必要性が強く指摘された。さらに本年米国でリシン散布事件が起こった。現在パイオテロに利用されることが危惧される病原体ならびに疾病には、節足動物媒介性ウイルス、痘瘡ウイルス、出血熱ウイルス、炭疽、ペスト、野兔病、ブルセラ、Q熱、ボツリヌス毒素などが

あり、米国 CDC はその重要性からカテゴリー A から C に分類している。カテゴリー C には SARS ウイルスやニパウイルス等の新興感染症が含まれる。これらの病原体による疾患は現在では一般に稀であるか、あるいは自然界に存在しないか、あるいは動物由来感染症である。患者の多くは急性で高い致死率を示す。したがって、バイオテロ対策として迅速な診断システムを開発整備し、その技術を各都道府県の衛生研究所等に移転し、迅速な緊急時対応の体制実現を図ることが必要である。さらに、最初に患者を診る臨床医へのバイオテロ関連疾患の知識を普及し、適切な臨床診断法および治療法をマニュアルとして種々の媒体を用いて提供することも重要である。これらを整備することにより、適切な患者検体の採取と適切な検査診断機関への依頼が可能となり、患者の適切な治療および感染の拡大防止につながる。したがって、本研究では緊急時に環境材料ならびに臨床検体から、これらのバイオテロ病原体を短時間に検出する実験室診断法の開発と、治療薬の効果の検討ならびに臨床診断、治療への対応に関して検討し、マニュアル化することを目的とする。さらに、単なるマニュアル作製にとどまらず、多くの関係者が利用しうる実用的な媒体を検討する。これらの研究によって、事件が発生した場合の緊急対応が可能となり、国民の生物テロに対する不安が軽減されるのみならず、生物テロ事件および模倣事件に対する抑止効果も期待される。

B. 研究方法

実験室診断法の開発には、国立感染症研究所グループ（感染研班小括）と帯畜大牧野らのグループ（牧野班小括）計 9 名により、バイオテロ関連疾患のうち CDC が分類したカテゴリー A から C に属するウイルスや細菌感染症等について検査診断法の開発を行い、またバイオテロに関する疾患の臨床診断および治療マニュアルの作製を目的として、岩本班員らによる臨床班計 7 名（臨床班小括）、そして Web での情報公開にあたっての問題点や方法の検討に 1 名、そして全体の統括に主任研究者があたる体

制を組み、班会議等により相互の情報交換を行い、総体的にバイオテロ対策の確立にむけた研究を行う。

実験室検査診断法の開発には、国立感染症研究所グループは、迅速病理診断法、ペスト菌、耐性菌、天然痘およびウイルス性出血熱およびボツリヌス毒素について分担し、帯畜大グループは炭疽菌、ブルセラ症、鼻疽・類鼻疽菌、野兔病菌を分担した。

臨床小班は、診断・検査・治療マニュアルを、基礎班分担研究者のみならず、研究協力者のサポートを得てまとめる。

C. 研究結果

1. 感染研小班

エボラ出血熱、SARS、サル痘の免疫組織化学法を確立した。また、約半日程度で包埋から抗原検出まで可能な迅速病理包埋・迅速免疫組織化学法を開発し、実験材料でその有用性、有効性について確認した（佐多）。ペスト菌ゲノムの PCR 法、Real time PCR 法、そして LAMP 法を開発した。検出感度は Real time PCR 法が優れていた。さらにペスト菌の病原性に係わるプラスミッド 3 種を検出する Real time PCR 法を開発し、陽性対照を作製した（神山）。ペスト菌の薬剤感受性を検討し、ニューキノロンの効果を確認した。実験モデルとしてチフス菌のニューキノロン系薬剤に対する耐性菌を迅速に検出する PCR-RFLP 法を開発した。ニューキノロン耐性ペスト菌を迅速に検出できる PCR clamping 法を開発した（渡邊）。痘瘡ウイルス DNA を 10 コピー程度の感度で迅速に検出できる real time PCR 法を作製した。エボラウイルスのうち、ヒトへの病原性のあるものではないレストン株を抗原捕捉 ELISA 法で鑑別検出することが可能となった。各ボックスウイルス特異的な Real time PCR 法を作製した。天然痘との鑑別が必要なサル痘ウイルスの Real time PCR 法を開発し、実験感染サルの血液で特異性等を検討した（森川）。ゼラチン粒子を抗体で感作した免疫学的方法で検出する簡易キットを作製した。ボツリヌス毒素の 4 型について毒素を精製し、多価トキシイドを作製した。

各型の毒素ともに純度の高い標品を得た。GMP grade のトキシソイドの製造中である（高橋）。Q 熱コクシエラとオウム病クラミジアの迅速遺伝子検出法として Real time PCR を開発した。また卵黄からの検出を目的に DNA 抽出方法を樹立した（岸本）。

2. 大学小班

炭疽の発症機構の一端を解明し治療へのヒントを得た。炭疽のリアルタイム PCR 法を実証し、またその発症機構の一端を解明し治療へのヒントを得た。炭疽菌芽胞に対する抗体を作製し、免疫ビーズ法で土壌中の炭疽菌を含むバシラス属の芽胞の回収を行い、疫学調査で有効性を確認した。芽胞に対する抗体を作製し、感染防御効果を確認した。またブルセラ症の感染機構に対するマクロファージへの取り込み機構を解析した。ブルセラ症の ELISA 法を開発し、発生国であるモンゴルで大規模疫学調査を行い、その有用性を明らかにした（牧野）。鼻疽・類鼻疽を検出する新しい PCR 法を開発した。網羅的検出を目的に、Real time PCR 法とマイクロアレイを使ったスクリーニング法を開発し、タイの下水から鼻疽・類鼻疽菌の DNA、および flagellin 遺伝子を検出した。慢性疾患であり化学療法後では検出率が低下するので、細菌性病原体のスクリーニングシステムとして 16 ウェルの PCR チューブで同時に検出する方法を開発した。血清診断法の確立を目標として抗原となる遺伝子のクローニング、抗原蛋白の大量発現系を作製した（江崎）。16S rDNA, FopA、および MMP を標的とした野兎病菌の検出に特異性の高い実用的感度を持つ PCR 法を開発し、さらに陽性対照を作製することで、キット化した（倉園）。

3. 臨床小班

ウイルス、細菌、真菌、毒素によるバイオテロ関連疾患について分担して、疫学、臨床症状、治療法、予防法についてさらに情報を収集し提言をまとめた。またワクチンで予防可能な疾患や日本人の治療薬投与量に関する検討を行った。さらに感染予防策の実際について検討した。最終年度には、臨床診断や治療に対しては、臨

床班員が分担して天然痘、ウイルス性出血熱、SARS、ウエストナイル熱、狂犬病、炭疽、ブルセラ症、ペスト、ボツリヌス毒素、野兎病、鼻疽・類鼻疽、消化管感染起因菌感染症、多剤耐性結核、コクシジオイデス症、Q 熱について病原体の特徴、疫学、感染経路、臨床症状、診断、患者の管理および対策、治療、予防ワクチンについて、わが国の現状にあった形で、「バイオテロが疑われる状況と対応のフローチャート」、「バイオテロ疾患の概要」、「写真・図」、そして「疾患の詳細」の順でまとめ、「生物テロ関連感染症の診断・検査・治療マニュアル」として冊子版（分担研究報告書 2）を作製した。この内容をもとにインターネットでアクセスできるように、試験運用で形式や内容を各班員が全体でチェックしたのち、国立感染症研究所のホームページにおくことにした。

D. 考 察

従来実施困難である培養を基本とした生物学的検査診断法でなく、新しい免疫化学的ないしは核酸増幅法を用いた診断法を使用しなければならないのが、バイオテロ関連疾患の検査診断法である。そのために用いられる PCR 法、RT-PCR 法、Real time PCR 法、LAMP 法などを開発できた。とくに、LAMP 法はその取り扱い易さや迅速性そして特異性が優れていると考えられ、現場での使用が可能である。また、環境中からの検出を目的に DNA 抽出法を開発した。しかしながら確認のためには近い将来培養法等の生物学的診断法が必要となろう。一部の対象疾患では疫学調査でその検出系の有用性や有効性を明らかにすることができた。しかしながら実際の疾患はわが国にはほとんどないため、実際の現場での使用を十分に想定しているかどうかにはやや不安がある。今後一層、この方面での検査の可能性について検討していく必要がある。また細菌病原体の検出で試みられている網羅的診断法の開発に重点を移す必要が考えられる。これまでに開発した系を応用する形で今後研究を進めていくべきであろう。検査診断法の確立はわが国の危機管理対策への貢献になるものと考えられる。

診断・検査・治療マニュアルは初版が完成したが、いまだ掲載疾患に限られており、随時追加していく必要がある。また今後はホームページにマニュアルを掲載する。更新されない情報は意味がないので、新知見が加わった場合も含めて年2回程度は、細かく更新をしていく必要がある。最前線の医師等にとってはバイオテロ疾患をまず疑うことが必要であり、その点で図、写真等、一目でわかる素材が必要である。しかし、わが国では関連資料がほとんど存在しないことがこの経過で明らかとなった。著作権の関係もあって、ホームページ上ではリンクを多用することが必要となろう。

E. 結論

- (1) 天然痘、サル痘、エボラ出血熱、ペスト菌、炭疽菌、野兎病菌、鼻疽・類鼻疽菌、Q熱コクシエラの核酸迅速診断法(PCR, RT-PCR, Real time PCR-ABI or LC-, LAMP)を作製した。
- (2) ニューキノロン耐性ないし低感受性菌(ペスト菌、チフス菌・パラチフス A 菌)の検出系を開発した。
- (3) ボツリヌス毒素の簡易診断キットと GMPグレードのボツリヌストキソイドを作製した。
- (4) ブルセラ、エボラ出血熱、クリミアーコンゴ出血熱、Q熱コクシエラの血清診断系を開発した。
- (5) 炭疽菌、野兎病菌、類鼻疽菌の免疫診断用抗原を作製した。
- (6) エボラ出血熱、SARS、サル痘の免疫組織化学法を作製し、迅速病理組織標本作製法を開発した。
- (7) 生物テロ関連疾患の臨床、検査、治療について冊子版のマニュアルを作製し、さらにホームページを開設して公表する予定である。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

各研究分担研究者の項を参照。

2. 学会発表

各研究分担研究者の項を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
牧野壮一	ブルセラ	竹田美文、 林英生	細菌学	朝倉書店	日本	2002	242-244
牧野壮一、 内田郁夫	炭疽菌 (<i>Bacillus anthracis</i>)	櫻井 純、 本多武司、 小熊恵二	細菌毒素 ハンドブ ック	サイエンス フォーラム	日本	2002	30-46
牧野壮一	人畜共通感染症	高野健人、 伊藤洋子	社会医学 辞典	朝倉書店	日本	2002	138-139
牧野壮一	炭疽菌 (<i>Bacillus anthracis</i>)	松本慶蔵	病原菌の 今日的意 味	医薬ジャー ナル	日本	2003	272-280
牧野壮一	バシラス属 (好気 性有芽胞菌) と感 染症	見上 毅	獣医微生物 学	文永堂出版	日本	2003	93-96
牧野壮一	リステリア属と感 染症	見上 毅	獣医微生物 学	文永堂出版	日本	2003	99-100
廣瀬健二 渡辺治雄	腸チフスワクチン	日本ワクチ ン学会	ワクチン の辞典	朝倉書店	日本	2004	230-239
廣瀬健二 渡辺治雄	腸チフス・パラチ フス	国立感染症 研究所学友 会	感染症の 辞典	朝倉書店	日本	2004	158-160
高橋元秀、 岩城正昭、 荒川宜親	ボツリヌス症	日本医師会 感染症危機 管理対策室 および厚生 労働省健康 局結核感染 症課	感染症の 診断・治療 ガイドラ イン 2004	日本医師会	日本	2004	160-163
吉開泰信	感染に対する免疫	中島 泉、 高橋利忠、 吉開泰信	シンプル 免疫学	南江堂	日本	2004	109-150
吉開泰信	感染症の発症機構 -病原体と宿主の 攻防：微生物感染 とたたかう生体防 御機構	吉開泰信	ウイル ス・細菌 と感染症 がわかる	羊土社	日本	2004	12-18
牧野壮一	炭疽	日本医師会	感染症の 診断・治療 ガイドラ イン	医学書院	日本	2004	134-135
高橋元秀	ボツリヌス症	山崎修道	感染症予 防必携	財)日本公 衆衛生協会	日本	2005	361-365

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
Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda MEG, Calaor AB, Hernandez M, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, <u>Morikawa S</u>	Development of an immunofluorescence method for the detection of antibodies to Ebola virus subtype reston by use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells.	Microbiol Immunol	46 (9)	633-638	2002
<u>Morikawa S</u> , Qing T, Xinqin Z, Saijo M, Kurane I	Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolates in China.	Virology	296	159-164	2002
Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Sakai K, Prehaud C, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G Antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus.	J Clin Microbiol	40 (2)	372-375	2002
Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Prehaud C, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	Recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus.	J Clin Microbiol	40 (5)	1587-1591	2002
Ikegami T, Miranda MEG, Calaor AB, Manalo DL, Miranda NJ, Niikura M, Saijo M, Une Y, Nomura Y, Kurane I, Ksiazek TG, Yoshikawa Y, <u>Morikawa S</u>	Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in cynomolgus macaques during the Philippine outbreak in 1996.	Exp Anim	51 (5)	447-455	2002
Torii Y, Tokumarua Y, Kawaguchia S, Izumia N, Maruyamaa S, Mukamotoc M, Kozaki S, <u>Takahashi M</u>	Production and immunogenic efficacy of botulinum tetravalent (A, B, E, F) toxoid.	Vaccine	20	2556-2561	2002
Watarai M, <u>Makino S-I</u> , Shirahata T	An essential virulence protein of <i>Brucella abortus</i> , VirB4, requires an intact nucleoside triphosphate-binding domain.	Microbiology	148	1439-1446	2002
Watarai M, <u>Makino S-I</u> , Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T	Modulation of <i>Brucella</i> -induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication.	Cell Microbiol	4 (6)	341-355	2002
<u>Makino S-I</u> , Watarai M, Cheun HI, Uchida I	Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of <i>Bacillus anthracis</i> on the pathogenesis of Anthrax.	J Infect Dis	186 (2)	227-233	2002

Erdenebaatar J, Sugar S, Yondondorj A, Nagabayashi T, Shuto B, Watarai M, <u>Makino S-I</u> , Shirahata T	Serological Differentiation of <i>Brucella</i> -Vaccinated and -infected domesticated animals by the agar gel immunodiffusion test using <i>Brucella</i> polysaccharide in Mongolia.	J Vet Med Sci	64 (9)	839-841	2002
Watarai M, <u>Makino S-I</u> , Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S, Shirahata T	Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to <i>Brucella abortus</i> infection of mice.	Infect Immun	70 (9)	4818-4825	2002
Kim S, Watarai M, <u>Makino S-I</u> , Shirahata T	Membrane sorting during swimming internalization of <i>Brucella</i> is required for phagosome trafficking decisions.	Microbiol Pathog	33	225-237	2002
Yanagihara K, Tomono K, Sawai T, Miyazaki Y, Hirakata Y, Kadota J, <u>Kohno S</u> .	Mycobacterium avium complex pleuritis.	Respiration	69 (6)	547-549	2002
Hirose K, Tamura K, <u>Watanabe H</u>	Screening method for <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi and Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism.	Microbiol Immunol	47 (2)	161-165	2003
Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda ME, Calaor AB, Fernandez M, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, <u>Morikawa S</u>	Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus.	Epidemiology and Infection	130	533-539	2003
Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever serologically diagnosed by recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems.	Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology	10 (3)	489-491	2003
Ikegami T, Niikura M, Saijo M, Miranda ME, Calaor AB, Henandez M, Acosta LP, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, <u>Morikawa S</u>	Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein.	Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology	10 (4)	552-557	2003
Maeda A, Lee B-H, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, <u>Morikawa S</u>	The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of HantaanVirus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (Ubc9).	Virology	305	288-297	2003

Tang Q, Saijo M, Han L, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays.	J Virol Meth	108	111-116	2003
Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurata T, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	Analysis of linear B-cell epitopes of the nucleoprotein of ebola virus that distinguish ebola virus subtypes.	Clin Diagn Lab Immunol	10 (1)	83-87	2003
<u>Makino S-I</u> , Cheun H-I	Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores.	J Microbiol Meth	53	141-147	2003
Kim S, Watarai M, Kondo Y, Erdenebaatar J, <u>Makino S-I</u> , Shirahata T	Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of <i>Brucella abortus</i> deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells.	Infect Immun	71 (6)	3020-3027	2003
Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, <u>Makino S-I</u> , Horiuchi M, Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S	Cellular prion protein promotes <i>Brucella</i> infection into macrophages.	J Exp Med	198 (1)	5-17	2003
Cheun H-I, <u>Makino S-I</u> , Watarai M, Erdenebaatar J, Kawamoto K, Uchida I	Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR.	J Appl Microbiol	95	728-733	2003
Erdenebaatar J, Bayarsaikhan B, Watarai M, <u>Makino S-I</u> , Shirahata T	Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals infected with <i>Brucella</i> species from those of animals infected with <i>Yersinia enterocolitica</i> O9.	Clin Diagn Lab Immunol	10 (4)	710-714	2003
Jiao Z, Kawamura Y, Mishima N, Yang R, Li N, Liu X, <u>Ezaki T</u>	Need to differentiate lethal toxin producing strains of <i>Burkholderia gladioli</i> , which cause severe food poisoning: description of <i>B. gladioli</i> pathovar <i>cocovenans</i> and an emended description of <i>B. gladioli</i> .	Microbiol Immunol	47 (12)	915-925	2003
Mukae H, Ashitani J, Tokojima M, Ihi T, <u>Kohno S</u> , Matsukura S	Elevated levels of circulating adhesion molecules in patients with active pulmonary tuberculosis.	Respirology	8 (3)	326-331	2003
Inokuchi N, Sugahara K, Soda H, Usui T, Hirakata Y, Fukushima K, Yamada Y, <u>Kohno S</u> , Kamihira S	Relationship between whole-blood interferon-gamma production and extent of radiographic disease in patients with pulmonary tuberculosis.	Diagn Microbiol Infect Dis	46 (2)	109-114	2003

Kaneko Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Tsukamoto K, Hirakata Y, Tomono K, Kadota J, Tashiro T, Murata I, <u>Kohno S</u>	Effects of DQ-113, a new quinolone, against methicillin- and vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> -caused hematogenous pulmonary infections in mice.	Antimicrob Agents Chemother	47 (12)	3694-3698	2003
Chong PY, Chui P, Ling AE, Franks TJ, Tai DYH, Leo YS, Kaw GJL, Wansaicheong G, Chan KP, Oon LLE, Teo ES, Tan KB, Nakajima N, <u>Sata T</u> , Travis W	Analysis of deaths during the severe acute respiratory syndrome (SARS) epidemic in Singapore: challenges in determining a SARS diagnosis.	Arch Pathol Lab Med	128	195-204	2004
Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections.	J Med Virol	75	295-299	2004
Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	Modification of endothelial cell functions by hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus infected endothelial cell monolayers.	Arch Virol	149	1279-1292	2004
Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, <u>Morikawa S</u>	Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child.	Jpn J Infect Dis	57	55-57	2004
Erdenebaatar J, Bayarsaikhan B, Yondondorj A, Watarai M, Shirahata T, Jargalsaikhan E, Kawamoto K, <u>Makino S-I</u>	Epidemiological and serological survey of brucellosis in Mongolia by ELISA using sarcosine extracts.	Microbiol. Immunol.	48 (8)	571-577	2004
Kim S, Watarai M, Suzuki H, <u>Makino S-I</u> , Kodama T, Shirahata T	Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of <i>Brucella abortus</i> .	Microb Pathog	37	11-19	2004
Kim S, Kurokawa D, Watanabe K, <u>Makino S</u> , Shirahata T, Watarai M	<i>Brucella abortus</i> nicotinamidase (PncA) contributes to its intracellular replication and infectivity in mice.	FEMS Microbiol Lett	234	289-295	2004
Ogushi K, Wada A, Niidome T, Okuda T, Llanes R, Nakayama M, Nishi Y, <u>Kurazono H</u> , Smith KD, Aderem A, Moss J, Hirayama T	Gangliosides Act as Co-receptors for <i>Salmonella enteritidis</i> FliC and Promote FliC Induction of Human β -Defensin-2 Expression in Caco-2 Cells	J Biol Chem	279 (13)	12213-12219	2004

<p><u>Kohno S</u>, Masaoka T, Yamaguchi H, Mori T, Urabe A, Ito A, Niki Y, Ikemoto H.</p>	<p>A multicenter, open-label clinical study of micafungin (FK463) in the treatment of deep-seated mycosis in Japan.</p>	<p>Scand J Infect Dis</p>	<p>36 (5)</p>	<p>372-379</p>	<p>2004</p>
<p>Saijo M, Niikura M, Maeda A, Kurane I, <u>Sata T</u>, Kurata T, <u>Morikawa S</u></p>	<p>Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay.</p>	<p>J Med Virol</p>	<p>76</p>	<p>111-118</p>	<p>2005</p>
<p>Yajima T, Nishimura H, Sad S, Shen H, Kuвано H, Yoshikai Y</p>	<p>A novel role of IL-15 in early activation of memory CD8⁺ CTL after reinfection.</p>	<p>J Immunol</p>	<p>174</p>	<p>13590-13597</p>	<p>2005</p>

Development of an Immunofluorescence Method for the Detection of Antibodies to Ebola Virus Subtype Reston by the Use of Recombinant Nucleoprotein-Expressing HeLa Cells

Tetsuro Ikegami^{1,2}, Masayuki Saijo¹, Masahiro Niikura¹, Mary E.G. Miranda³, Alan B. Calaor³, Marvin Hernandez³, Daria L. Manalo³, Ichiro Kurane¹, Yasuhiro Yoshikawa², and Shigeru Morikawa^{*,1}

¹Special Pathogens Laboratory, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan, ²Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan, ³Veterinary Research Department, Research Institute for Tropical Medicine, Department of Health, Muntinlupa City 1770, Philippines

Received April 24, 2002; in revised form, June 5, 2002. Accepted June 6, 2002

Abstract: An indirect immunofluorescent assay (IFA) to detect Ebola virus subtype Reston (EBO-R) antibodies was developed by the use of a HeLa cell line stably expressing EBO-R nucleoprotein (NP). This IFA has a high specificity for the detection of EBO-R IgG antibodies in both hyperimmune rabbit sera and monkey sera collected during an EBO-R outbreak in the Philippines in 1996. Furthermore, this IFA showed a higher sensitivity for the detection of EBO-R antibodies than did the IFA using HeLa cells expressing the NP of Ebola virus subtype Zaire. These results suggest that this new IFA is useful for seroepidemiological studies of EBO-R infection among monkeys.

Key words: Ebola virus subtype Reston, IFA, *Cynomolgus* macaque, Recombinant nucleoprotein

Ebola virus is divided into 4 subtypes: Ebola subtype Zaire (EBO-Z), subtype Sudan (EBO-S), subtype Ivory-Coast (EBO-IC), and subtype Reston (EBO-R) (6, 7). All the Ebola subtypes except EBO-R are reported to be highly pathogenic to human and nonhuman primates (13, 23, 24). EBO-R infection has caused high mortality among cynomolgus monkeys originating in the Philippines, but only asymptomatic EBO-R infections have been reported in humans (3, 4, 15, 25). Several EBO-R outbreaks were reported among monkey colonies imported from the Philippines to the United States and Italy (2–4, 8, 10, 17, 25). However, the natural reservoir of EBO-R and the prevalence of antibodies to EBO-R among wild monkeys are not yet known.

An indirect immunofluorescent assay (IFA) using virus-infected Vero cells has been widely used for the detection of antibodies to Ebola viruses (1, 4, 11, 21, 22, 24). However, the specificity of the IFA became the

subject of discussion when some populations, including human and nonhuman primates, with no history of Ebola virus infection showed low IFA titers to filoviruses (1, 3–5, 11, 22). We previously developed an IFA using HeLa cells expressing the recombinant nucleoprotein (rNP) of EBO-Z and demonstrated that this assay had a high sensitivity and specificity for the detection of antibodies to Ebola virus in human sera (18). In the present study, we established another IFA using HeLa cells stably expressing EBO-R rNP and compared the sensitivity to EBO-R antibodies of these two IFA. We found that the IFA using the EBO-R rNP had higher sensitivity to EBO-R antibodies than the IFA using the EBO-Z rNP did.

We constructed the recombinant plasmids, pKS336-

Abbreviations: CMV-IE, cytomegalovirus immediate-early; EBO-IC, Ebola virus subtype Ivory Coast; EBO-R, Ebola virus subtype Reston; EBO-S, Ebola virus subtype Sudan; EBO-Z, Ebola virus subtype Zaire; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FITC, fluorescein isothiocyanate; GST, glutathione S-transferase; IFA, indirect immunofluorescent assay; NP, nucleoprotein; ORF, open reading frame; PBS, phosphate-buffered saline; rNP, recombinant nucleoprotein.

*Address correspondence to Dr. Shigeru Morikawa, Special Pathogens Laboratory, Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan. Fax: +81-42-561-2039. E-mail: morikawa@nih.go.jp

EBO-R-NP and pKS336-EBO-Z-NP, for the expression of EBO-R rNP and EBO-Z rNP, respectively. The entire DNA of the nucleoprotein (NP) open reading frame (ORF) of EBO-R was amplified from the cDNA of EBO-R (9) (DDBJ accession no. AB050936) by PCR using the primers EBO(R) NP/F (5'-AGG GGA TCC CGA TAT GGA TCG TGG GAC-3'; the *Bam*HI restriction site is underlined) and EBO(R) NP/R (5'-TGG GAT CCG GTT ACT GAT GGT GCT GC-3'; the *Bam*HI restriction site is underlined). The amplification conditions were as follows: 2 cycles of denaturation at 94 C for 1 min, annealing at 40 C for 1.5 min, annealing at 55 C for 1.5 min, and extension at 72 C for 3 min. This was followed by an additional 15 cycles of denaturation at 94 C for 1 min, annealing at 55 C for 3 min, and extension at 72 C for 3 min; and a final extension at 72 C for 5 min. The PCR product was then purified and cloned into a pGEM-Teasy vector (Promega, Madison, U.S.A.) to generate pTe-EBO-R-NP. The insert was confirmed to have the identical nucleotide sequence as the original. The pTe-EBO-R-NP and the plasmid carrying the entire NP ORF of EBO-Z, pAcYM1CMV-EBO-NP (18), were digested with *Bam*HI. The NP ORF of EBO-R and that of EBO-Z were then purified and subcloned into the *Bam*HI site of the expression vector, pKS336 (20), which expresses a foreign gene under the control of the EF-BOS promoter (16). The pKS336 plasmids carrying the NP ORF of EBO-R and that of EBO-Z were designated as pKS336-EBO-R-NP and pKS336-EBO-Z-NP, respectively.

HeLa cells were then transfected with either pKS336-EBO-R-NP or pKS336-EBO-Z-NP by the use of FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and OPTI-MEM-I (Life Technologies, Rockville, Md., U.S.A.), according to the manufacturer's instructions. The HeLa cells transfected with the respective plasmid were selected in Dulbecco's minimum essential medium containing 2 µg/ml of blasticidin-S-hydrochloride (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.), 5% heat-inactivated fetal bovine serum, and kanamycin. The selected HeLa cells were confirmed to express the EBO-R rNP or the EBO-Z rNP by IFA.

The HeLa cells stably expressing EBO-R rNP or EBO-Z rNP were trypsinized, washed with PBS, spotted on 14-well Teflon-coated slide glasses (Cat. No. JL926101, AR Brown Co., Ltd., Tokyo), air dried, and fixed with acetone at room temperature for 5 min. The slides were stored at -80 C until use, then thawed and dried just before use. Serum samples were twofold serially diluted from 1:20, and 20 µl of each dilution was spotted on the well of the slide and incubated under humidified conditions at 37 C for 1 hr. After washing with PBS, the slides were reacted with fluorescein iso-

thiocyanate (FITC)-conjugated goat antihuman IgG antibody (Cat. No. 62-7111, Zymed Laboratories Inc., Calif., U.S.A.) or FITC-conjugated goat antirabbit IgG (Cat. No. 62-6111, Zymed Laboratories Inc.) at a dilution of 1:100. The slides were washed with PBS and examined for the staining pattern under a fluorescent microscope. The antibody titer in the IFA was determined as the reciprocal of the highest dilution showing positive staining.

We prepared two types of EBO-R rNPs, His-EBO-R-NP and glutathione *S*-transferase-tagged partial rNP of EBO-R (GST-EBO-R-ΔNP), for the immunization of rabbits. The pQE31 plasmid (QIAGEN, Hilden, Germany) was digested with *Eco*RI and *Sal*I. Then, the flashed 88-bp insert was subcloned into the blunt-ended *Bam*HI site of pAcYM1 (14) to generate pAcYM1-QE31. The pTe-EBO-R-NP digested with *Bam*HI was subcloned into the *Bam*HI site of pAcYM1-QE31 to generate pAc-His-EBO-R-NP. Then, the His-EBO-R-NP was expressed in Tn5 cells by the transfection with the recombinant baculovirus (Ac-His-EBO-R-NP), as reported previously (19). The GST-EBO-R-ΔNP was made as follows. A partial EBO-R NP gene corresponding to the C-terminal half (amino acid 360 to 739) was amplified from the cDNA of EBO-R by PCR using the primers, EBO(R)NP5F (5'-GCT GGA TCC AGA GAA CTC GAC AGC CT-3', the *Bam*HI restriction site is underlined) and EBO(R)NP8R (5'-GTG GAA TTC TTA CTG ATG GTG CTG CAA-3', the *Eco*RI restriction site is underlined). The PCR fragment was subcloned into a pGEX-2T vector (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.). Then, the GST-EBO-R-ΔNP was expressed in *E. coli* (BL-21 strain).

Three rabbits were immunized with the His-EBO-R-NP or the GST-EBO-R-ΔNP 4 times using IMJECT-ALUM (Pierce, Rockford, Ill., U.S.A.). Sera were collected from these rabbits, and used in the study. We used 16 cynomolgus monkey serum specimens collected in the monkey export and breeding facility (Facility A) in the Philippines that had experienced an Ebola Reston outbreak in 1996 (15). We also used 96 cynomolgus monkey serum specimens collected in another monkey breeding facility (Facility B) in the Philippines where no Ebola outbreak had been documented.

In the IFA, the HeLa cells expressing EBO-R rNP showed a unique pattern after staining with the EBO-R-antibody positive sera from rabbit and monkey, while those stained with normal sera and normal HeLa cells stained with the EBO-R-antibody positive sera did not show such a pattern (Fig. 1).

We examined the reactivity of serum samples from 3 rabbits immunized with the EBO-R rNP and from 16 monkeys in Facility A by IFA using the HeLa cells

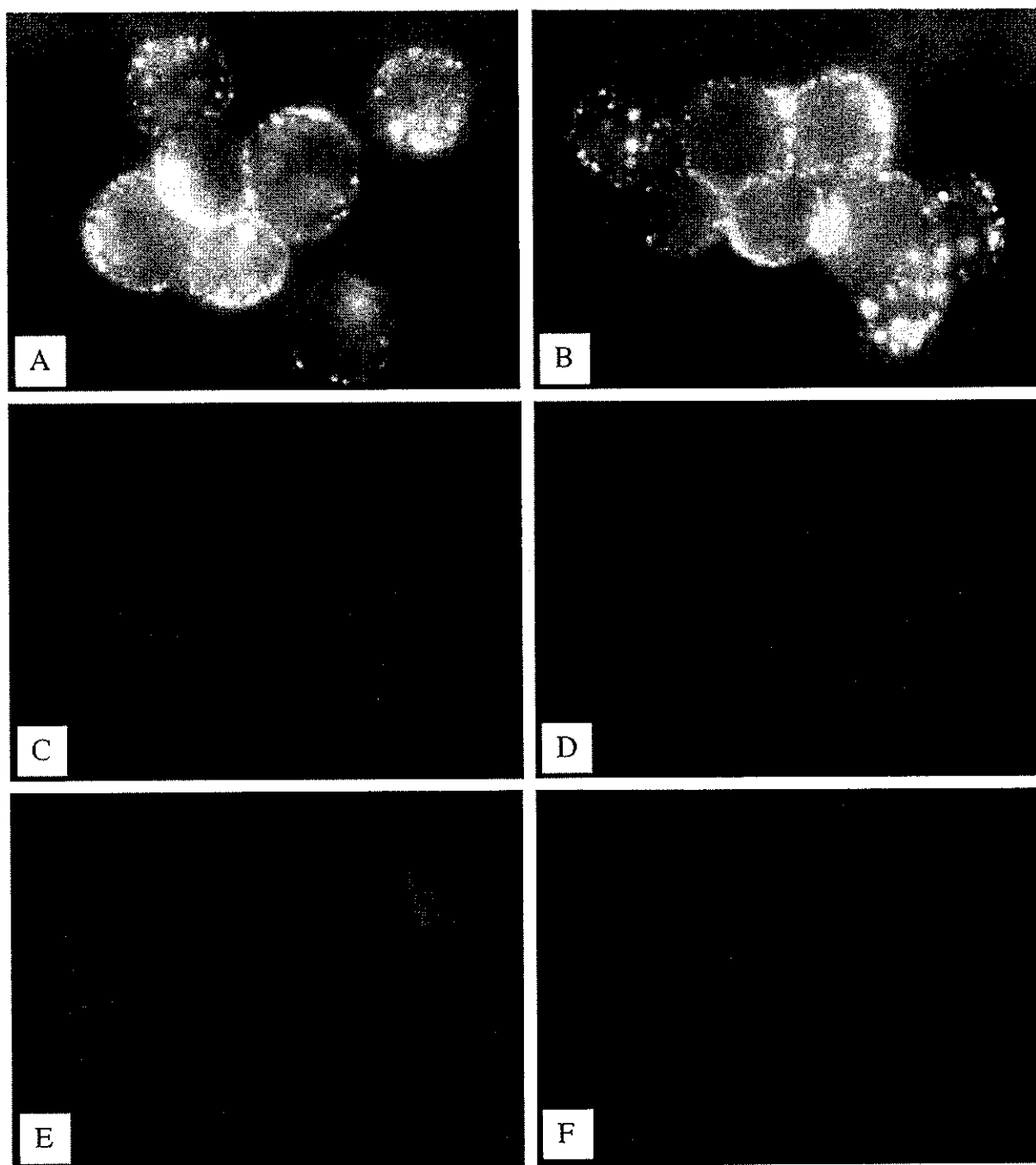


Fig. 1. The specific staining patterns of HeLa cells expressing EBO-R rNP in the IFA. IFA staining patterns of HeLa cells expressing EBO-R rNP with anti-EBO-R rNP rabbit serum No. 1 (A), EBO-R infected monkey serum (No. 2408) from Facility A (B), normal rabbit serum (C) and EBO-R uninfected monkey serum from Facility B (D), and those of normal HeLa cells with anti-EBO-R NP rabbit serum No. 1 (E) and EBO-R infected monkey serum (No. 2408) (F). Each serum was tested at the dilution of 1:160.

expressing EBO-R rNP and EBO-Z rNP (Table 1). None of the 96 monkey serum samples collected in Facility B, where no Ebola outbreak had been reported, reacted with EBO-Z rNP or EBO-R rNP. On the other hand, all sera showed positive staining with both HeLa cells expressing EBO-R rNP and EBO-Z rNP. However, the

antibody titers determined by the two cell lines were different. All 3 rabbit sera and 12 of the 16 monkey sera had titers equal to or greater than 1,280 in the IFA using EBO-R rNP. Two of the 3 rabbit sera and 7 of the 16 monkey sera had antibody titers equal to or greater than 1,280 in the IFA using EBO-Z rNP. One of the 3 rabbit

Table 1. EBO-R antibody titers obtained by the IFA using HeLa cells expressing EBO-R rNP and those expressing EBO-Z rNP

Serum specimens	Antibody titers to		Ratio of the titers ^{d)}
	EBO-R rNP	EBO-Z rNP	
I: EBO-R rNP-immunized rabbits			
Normal ^{a)}	<20	<20	ND ^{e)}
No. 1 ^{b)}	10,240	10,240	1
No. 2 ^{c)}	2,560	320	8
No. 3 ^{c)}	1,280	1,280	1
II: Monkeys in Facility A during the EBO-R outbreak in the Philippines ^{d)}			
No. 2408	10,240	1,280	8
No. 2194	5,120	2,560	2
No. 2713	5,120	1,280	4
No. 2195	2,560	1,280	2
No. 2696	2,560	2,560	1
No. 2669	2,560	640	4
No. 2404	1,280	640	2
No. 2180	1,280	160	8
No. 2189	1,280	1,280	1
No. 2739	1,280	1,280	1
No. 2921	1,280	320	4
No. 2728	1,280	320	4
No. 2191	640	640	1
No. 2190	160	160	1
No. 2693	160	20	8
No. 2181	80	40	2
III: Monkeys in Facility B in the Philippines ^{d)}			
Nos. 1-96	<20	<20	ND

^{a)} Serum from a normal rabbit.

^{b)} Serum from a rabbit immunized with GST-EBO-R-ΔNP (C-terminal half: AA.360 to 739).

^{c)} Sera from rabbits immunized with His-EBO-R-NP.

^{d)} Sera from monkeys that had been confirmed to have EBO-R-specific antibodies.¹⁸⁾

^{e)} Ninety-six monkey sera from Facility B where no EBO-R outbreaks occurred.

^{f)} Calculated by the formula: Antibody titers obtained with EBO-R rNP/those obtained with EBO-Z rNP.

^{g)} Not done.

sera and 11 of the 16 (69%) monkey sera showed higher antibody titers with EBO-R rNP than with EBO-Z rNP in the IFA.

IFA using Ebola virus-infected cells has been mainly used for detecting antibodies to Ebola virus. This IFA, however, has often been demonstrated to show low specificity (1, 3-5, 11, 21). Alternatively, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been used as a reliable method for investigating the Ebola antibody prevalence (12). In the present study, we developed an immunofluorescent assay using HeLa cells stably expressing EBO-R rNP. We then demonstrated a unique staining pattern, using sera from EBO-R rNP-immunized rabbits and from the monkeys in the breeding facility where several EBO-R outbreaks had occurred in the

Philippines. On the other hand, 96 monkey serum samples from another facility where no Ebola outbreak had ever occurred did not react with EBO-R rNP in the IFA. This indicates that the IFA using HeLa cells expressing EBO-R rNP or EBO-Z rNP has high specificity for monkey sera. This IFA has a number of advantages over the IFA using Ebola virus-infected cells because these cell lines can be prepared and used safely in the laboratories without biosafety level-4 facilities.

We recently demonstrated that the IFA using HeLa cells expressing EBO-Z rNP showed high sensitivity and specificity to convalescent human sera from patients infected with EBO-Z (18). In the IFA, the expression pattern and the sensitivity of EBO-Z rNP expressed by the EF-BOS promoter in HeLa cells were virtually the

same as those expressed by the cytomegalovirus immediate-early (CMV-IE) promoter, previously reported by Saijo et al. (18) (data not shown). Therefore the IFA using HeLa cells expressing EBO-Z rNP by the EF-BOS promoter is thought to have a sensitivity as high as the IFA using CMV-IE.

The 16 sera collected from monkeys during the EBO-R outbreak in the Philippines in 1996 reacted with both EBO-R rNP and EBO-Z rNP in the IFA. However, 11 of these sera showed higher reactivity with EBO-R rNP than with EBO-Z rNP. Therefore the IFA using the HeLa cells expressing EBO-R rNP is more suitable than the IFA using EBO-Z rNP for detecting EBO-R-specific antibodies in monkeys. The new IFA using EBO-R rNP has a high sensitivity and specificity and is useful for the seroepidemiological study of EBO-R infection among wild monkeys.

We gratefully acknowledge Ms. M. Ogata of the National Institute of Infectious Diseases and the staff of the Research Institute for Tropical Medicine for their technical assistance. We also thank Dr. H. Cho and the staff of INA Research Philippines, Inc., for kindly providing a part of monkey sera for this study. This work was partly supported by a grant from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan.

References

- 1) Bouree, P., and Bergmann, J.F. 1983. Ebola virus infection in man: a serological and epidemiological survey in the Cameroons. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 1465-1456.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention. 1996. Ebola-Reston virus infection among quarantined nonhuman primates-Texas, 1996. *MMWR* **45**: 314-316.
- 3) Centers for Disease Control and Prevention. 1990. Epidemiologic notes and reports updates: filovirus infection in animal handlers. *MMWR* **39**: 221.
- 4) Centers for Disease Control and Prevention. 1990. Update: filovirus infections among persons with occupational exposure to nonhuman primates. *MMWR* **39**: 266-273.
- 5) Elliott, L.H., Bauer, S.P., Perez-Ornoz, G., and Lloyd, E.S. 1993. Improved specificity of testing methods for filovirus antibodies. *J. Virol. Methods* **43**: 85-99.
- 6) Feldmann, H., and Kiley, M.P. 1999. Classification, structure, and replication of filoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **235**: 1-21.
- 7) Feldmann, H., Klenk, H.D., and Sanchez, A. 1993. Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch. Virol. (Suppl)* **7**: 81-100.
- 8) Hayes, C.G., Burans, J.P., Ksiazek, T.G., Del Rosario, R.A., Miranda, M.E., Manaloto, C.R., Barrientos, A.B., Robles, C.G., Dayrit, M.M., and Peters, C.J. 1992. Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**: 664-671.
- 9) Ikegami, T., Calaor, A.B., Miranda, M.E., Niikura, M., Saijo, M., Kurane, I., Yoshikawa, Y., and Morikawa, S. 2001. Genome structure of Ebola virus subtype Reston: differences among Ebola subtypes. *Arch. Virol.* **146**: 2021-2027.
- 10) Jahrling, P.B., Geisbert, T.W., Dalgard, D.W., Johnson, E.D., Ksiazek, T.G., Hall, W.C., and Peters, C.J. 1990. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet* **335**: 502-505.
- 11) Johnson, K.M., Elliott, L.H., and Heymann, D.L. 1981. Preparation of polyvalent viral immunofluorescent intracellular antigens and use in human serosurvey. *J. Clin. Microbiol.* **14**: 527-529.
- 12) Ksiazek, T.G., West, C.P., Rollin, P.E., Jahrling, P.B., and Peters, C.J. 1999. ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J. Infect. Dis. (Suppl)* **179**: 192-198.
- 13) Le Guenno, B., Formentry, P., Wyers, M., Gounon, P., Walker, F., and Boesch, C. 1995. Isolation and partial characterization of a new strain of Ebola virus. *Lancet* **345**: 1271-1274.
- 14) Matsuura, Y., Possee, R.D., Overton, H.A., and Bishop, D.H. 1987. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **68**: 1233-1250.
- 15) Miranda, M.E., Ksiazek, T.G., Retuya, T.J., Khan, A.S., Sanchez, A., Fulhorst, C.F., Rollin, P.E., Calaor, A.B., Manalo, D.L., Roces, M.C., Dayrit, M.M., and Peters, C.J. 1999. Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J. Infect. Dis. (Suppl)* **179**: 115-119.
- 16) Mizushima, S., and Nagata, S. 1990. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* **18**: 5322.
- 17) Rollin, P.E., Williams, R.J., Bressler, D.S., Pearson, S., Cottingham, M., Pucak, G., Sanchez, A., Trappier, S.G., Peters, R.L., Greer, P.W., Zaki, S., Demarcus, T., Hendricks, K., Kelley, M., Simpson, D., Geisbert, T.W., Jahrling, P.B., Peters, C.J., and Ksiazek, T.G. 1999. Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to United States. *J. Infect. Dis. (Suppl)* **179**: 108-114.
- 18) Saijo, M., Niikura, M., Morikawa, S., and Kurane, I. 2001. Immunofluorescence method for detection of Ebola virus immunoglobulin G, using HeLa cells which express recombinant nucleoprotein. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 776-778.
- 19) Saijo, M., Niikura, M., Morikawa, S., Ksiazek, T.G., Meyer, R.F., Peters, C.J., and Kurane, I. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1-7.
- 20) Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Sakai, W., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S. 2002. Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 372-375.
- 21) Van der Groen, G., Kurata, T., and Mets, C. 1983. Modifications to indirect immunofluorescence tests on Lassa, Marburg, and Ebola material. *Lancet* **1**: 654-655.
- 22) Van der Waals, F.W., Pomeroy, K.L., Goudsmit, J., Asher, D.M., and Gajdusek, D.C. 1986. Hemorrhagic fever virus infections in an isolated rainforest area of central Liberia. Limitations of the indirect immunofluorescence slide test for