

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細菌・
ウイルス等による感染症の蔓延防止、
予防、診断、治療に関する研究

平成17～19年度 総合研究報告書

平成20年 3 月

主任研究者

佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

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細菌・ウイルス等による感染症の
蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究」

班員名簿

氏名	所属	職名
佐多 徹太郎	国立感染症研究所 感染病理部	部長
森川 茂	国立感染症研究所 ウイルス第1部	室長
山田 章雄	国立感染症研究所 獣医科学部	部長
岸本 壽男	国立感染症研究所 ウイルス第1部	室長
遠藤 卓郎	国立感染症研究所 寄生動物部	部長
高橋 英之	国立感染症研究所 細菌第1部	主任研究官
高橋 元秀	国立感染症研究所 細菌第2部	室長
牧野 壮一	帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター	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 感染症分野	教授
松本 哲哉	東京医科大学 微生物学講座	教授
中村 修	慶応義塾大学 環境情報学部	教授
山本 保博	日本医科大学	教授
出口 弘	東京工業大学大学院 総合理工学研究科 知能システム科学	教授
金谷 泰宏	防衛医科大学校・防衛医学研究センター	准教授
大日 康史	国立感染症研究所 感染症情報センター	主任研究官

目 次

- I. 総合研究報告書（平成 17-19 年度）
生物テロに使用される可能性の高い細菌・ウイルス等による
感染症の蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究・・・・・・・・・・ 1
主任研究者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

- II. 研究成果に関する刊行一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

I. 総合研究報告書

平成19年度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細菌・ウイルス等による感染症の蔓延防止、
予防、診断、治療に関する研究

総合研究報告書

主任研究者 佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部 部長）

研究要旨 バイオテロ対策として迅速で特異的な診断法を開発整備し、一次対応者への情報提供を目的とした臨床診断・検査等の対応支援ホームページの作製、自治体支援方法、天然痘対応指針の改定、そしてさまざまなシナリオを用いたコンピューターシミュレーションによる被害予測および対応評価を可能にすることで、バイオテロ対策に役立てることを目的とした。バイオテロ病原体等の迅速検査法の開発が進められ、遺伝子診断法のみならず、抗原や抗体検査法が開発され、実験室診断法が充実した。バイオテロ疾患の情報提供手段としてバイオテロ対応ホームページがほぼ完成したが、感染症専門医としてのICDへのアンケートによりさらに改善点が明らかとなった。また、バイオテロによるコンピューターシミュレーションが可能となり、感染対策の評価が可能となった。これらの結果により、バイオテロ対策に利用できるツールの整備が進んだ。

分担研究者：

- 森川 茂（国立感染症研究所ウイルス1部 室長）
山田章雄（国立感染症研究所獣医科学部 部長）
岸本寿男（国立感染症研究所ウイルス1部 室長）
遠藤卓郎（国立感染症研究所寄生動物部 部長）
高橋英之（国立感染症研究所細菌1部 主任研究官）
高橋元秀（国立感染症研究所細菌2部 室長）
牧野壮一（国立大学法人帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター 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）
松本哲哉（東京医科大学微生物講座 教授）
H18-19年度
中村 修（慶応大学環境情報学部 教授）
山本保博（日本医科大学救急医学 教授）
出口 弘（東京工業大学大学院総合理工学研究科知能システム科学 教授）
H18-19年度
金谷泰宏（防衛医科大学校防衛医学研究センター 准教授）H18-19年度
大日康史（国立感染症研究所感染症情報センター 主任研究官）H18-19年度

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。わが国では公衆衛生上の被害は発生していないが、これらの事件に対し、バイオテロや新興感染症等の緊急事態における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ある。現在バ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感染症には、人獣共通感染症を中心に、節足動物媒介性ウイルス、痘瘡ウイルス、出血熱ウイルス、ニパウイルス、炭疽、ペスト、野兔病、鼻疽、類鼻疽、ブルセラ、Q熱、ボツリヌス毒素、アメーバなどがあり、またSARS等の新興感染症も含まれる。これらの病原体による感染症は現在では一般に稀で、また存在しないものであり、いったん感染すると多くの患者は潜伏期の後、急性発症し高い致死率を示す。従って、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、感染拡大を防止する必要がある。本研究では1)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

することを目的とする。本研究によって病原体に対する網羅的な緊急対応迅速診断法が確立されるとともに消毒、滅菌、治療が早期に行われ、自治体の対応支援とともに、被害の拡大が未然に防がれる。また、開発された技術を各都道府県の衛生研究所等に移転してさらに迅速な緊急時対応の実現を図るとともに、2) 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。さらに、3) 現場における人為的感染災害対応の現状と問題点がより明確化され、今後のマニュアルおよび訓練に反映されることにより、バイオテロ災害対応のため国、自治体、感染研や地方衛研、自衛隊等の連携強化などの基盤整備の充実が期待される。平成 18 年度からの追加課題として、4) 天然痘対応指針の改訂を開始し、また、5) シナリオにもとづいた感染の拡大をコンピュータでシミュレーションし被害予測を行う。適切な対応がとられた場合の被害の軽減についてもシミュレーションし、対応策が検討できるようにする。これらによって、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

現時点で生物テロに利用されることが危惧される病原体として、節足動物媒介性ウイルス、痘瘡ウイルス、サル痘ウイルス、出血熱ウイルス、ニパウイルス、炭疽、ペスト、野兔病、鼻疽、類鼻疽、ブルセラ、Q 熱、ボツリヌス毒素、クリプトスポリジウムやアメーバ等対象として、1) 緊急時対応可能な迅速実験室診断法を確立する。a) ウイルス検査：環境中からの検出や最新の情報をもとにプライマーの至適化を行い、Realtime PCR 法や LAMP 法の高感度化、患者の臨床症状から病原体が想定できない場合に対応するために未知のウイルスを検出同定できる PCR 法を開発する。テロを想定したシミュレーション実験を行う。ワクチンが実

用化されている疾病についてはサイトカイン産生組み換えウイルスなどを作製し基礎的データを作製する。b) リケッチャ検査：*Coxiella burnetii* の特異的迅速検出法と Q 熱の迅速診断法は未だ確立されていないので、抗原および遺伝子検出法をさまざまな方法を駆使して確立する。c) 原虫検査：*Naegleria fowleri* の感染組織での迅速検出法の開発を行い、あわせて *Acanthamoeba sp.* あるいは *Balamuthia mandrillaris* に起因する疾患との鑑別を可能とする検出方法として、免疫染色法ならびに *in situ* hybrAT-CSA 法の利用を検討する。動物感染モデルから陽性対照を作製し、必要に応じて供給体制を整備する。さらにクリプトスポリジウムによる水系感染に対し、大量の水から効果的に検査ができるようにする。d) 細菌検査：サルモネラ菌、ペスト菌、チフス菌、赤痢菌などの下痢性腸内細菌の検出同定法と治療薬剤に対する薬剤耐性を迅速に調べられる方法を開発する。近縁種との交差が解消されていない野兔病、類鼻疽、ブルセラの特異的迅速検出法として、LAMP 法を作製する。そして免疫学的診断法として ELISA 法を開発する。細菌感染症診断の網羅的スクリーニングシステムの開発を行う。e) 毒素検査：*Staphylococcus aureus* の産生するエンテロトキシン B および *C. septicum* α 毒素の迅速検出法の検討をおこなう。2) 臨床対応の検討：バイオテロは一般には稀な疾患を引き起こすため、バイオテロ関連疾患と気づかなければ発生を把握することさえできない。また感染拡大防止においても臨床医の診断と治療に関する役割は大きい。そのためにも多くの医師が最新の知識を得ておくことが必要となる。したがって、バイオテロや新興感染症関連疾患情報については、可能な限り常時更新され、適時公開されていくことが必要で、わが国の準備態勢を確立し向上させる。バイオテロや新興感染症が発生した際には、初期対応に協力し、当該疾患の臨床的特徴、臨床診断、治療法の研究を行い、マニュアルとして各種媒体での公開を目指す。その情報公開に対し有効かつ効果的なアクセスを可能とする研究開発を行う。3) 自治体支援：バイオテロ発生現場の各自治体における実践的行動マニュアルの作製、模擬演習（シミュレーション）法の作成、

アセスメントシートの作製により、自治体の対応能力向上を目的とした支援を行う。4) 天然痘対応マニュアル改訂：平成 16 年度の天然痘対応指針（第 5 版）の改訂をおこなう。5) シミュレーション：シミュレーションモデルを構築してコンピュータを用いて感染被害を予測し、予防措置に役立てる。

（倫理面への配慮）

ヒトの検体や感染情報を使用する際には、所属機関の研究倫理委員会への申請および許可を受けて行う。動物実験は動物に与える苦痛を最小限にとどめ、各班員所属の動物実験委員会への申請および許可を受けてから、また組換え DNA 実験は当該委員会への申請および許可を受けてから行った。

C. 研究結果

1) 緊急時対応可能な迅速実験室診断法の確立：生物テロに使用されるウイルスを検出するには、スクリーニングとして網羅的な検索が可能でかつ定量的な方法がのぞましい。この目的にあう Realtime PCR 法を開発しさらに改良を行った。各地研で検査が行えるように、96 ウェルプレート上で 104 種類の既知のウイルスを同時に検出できるシステムを開発した（佐多）。天然痘ウイルスは生物テロに使われる危険性が高いとされている。現在は根絶されているため、鑑別としてサル痘ウイルス感染サルモデルでウイルス検出系の評価をおこなった。感染後 3 日でウイルスゲノム血症が確認された。サル痘ウイルスを共通に検出する Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を開発した。天然痘ウイルスと他のオルソポックスウイルスの鑑別、および大痘瘡と小痘瘡ウイルスの鑑別するための LC-PCR 法を開発した。また GHSAG のワークショップとして天然痘について米国 CDC で行われ、高感度でかつ特異的に検出できることが判明した（森川）。ニパウイルスの遺伝子および血清診断系の開発を行った。Real time PCR 法や PCR 法を開発した。ニパウイルス抗原検出系に利用する各種抗原に対する抗体を作製した。抗血清は ELISA において十分な抗体価が確認された。NiV 感染細胞において特異的に NiV 抗原を検出することが

できた。また、NiV-N 蛋白質発現細胞を用いた抗体検出 IFA を開発し、種々の動物血清に対する反応性を解析し、動物種によっては、高い非特異反応が認められた（山田）。生物テロとして *C. burnetii* が使われる可能性は浄水や環境水などの水系汚染であることを想定し、Real time PCR 法を開発した。Q 熱のスクリーニングとして血清診断が行われているが、非特異反応が問題となっていたが解決することができた。リケッチアの迅速検出系として、Taqman MGB プローブを用いた Spotted fever group に共通した検出系を開発した。加えて、ロッキー山紅斑熱の病原体 *R. rickettsii*、発疹チフスの *R. prowazekii*、日本紅斑熱の *R. japonica* をそれぞれ特異的に検出できる系も開発した（岸本）。*Cryptosporidium parvum* は水道あるいは親水施設を対象とした故意の汚染に用いられる原虫である。本原虫の検出は比較的多量の水の濃縮と迅速検出法が必要なため、可溶性の粒子を用いたケーキろ過濃縮と LAMP 法（遺伝子検出法）によるモニタリングシステムを提案した。*N. fowleri* に限らず、*B. mandrillaris* および *Acanthamoeba* spp. の鑑別診断の必要性からこれら 3 種類のアメーバを対象とした in situ hybridization 法の応用について検討し、特異的なシグナルを得ることができた。アメーバ病原体の traceability を確保する目的で国内外の研究機関に保存・研究使用されている *N. fowleri* 主要株およびわが国の分離株の遺伝子解析を行い、それぞれの特異配列を明らかとした。赤痢アメーバ検出用 PCR 法を用意し、病理組織標本を用いて *N. fowleri* およびそれ以外の計 4 種類のアメーバの鑑別診断が可能となった（遠藤）。ペスト菌のニューキノロン耐性ペスト菌を Real time PCR 法を用いて迅速に検出する方法を確立した。ペスト菌の類縁菌である仮性結核菌のニューキノロン耐性株を用いて検討した結果、有意に区別して検出することが可能であった。更にペスト特異的 DNA 領域のプローブを用いた duplex real time PCR を実施することにより、ペスト菌の同定とニューキノロン感受性の同時判定が可能な系も確立した。チフス菌・パラチフス A 菌のニューキノロン耐性を点変異が検出できるサイクリングプローブ法で迅速に検出する方法を確立した。ペスト菌

の F1 antigen に対するモノクローナル抗体を用いた直接抗体法を用いてホルマリン処理したペスト菌を迅速に検出する方法を確立した（高橋英）。*Staphylococcus aureus enterotoxin B* (SEB)と *C. septicum* α 毒素の検出用抗体を作成し、イムノクロマト法の構築を行った。SEB 検出系での実用化にはブロッキング剤等の選定がさらに必要であることがわかった。AT 検出系では反応は特異的で十分実用化できることが明らかとなった。平成 15 年に作製したボツリヌス抗毒素の力価は安定であることが確認された。ボツリヌス毒素検出用ラテックス凝集反応キットはボツリヌスレファレンスセンターに配付した（高橋元）。炭疽菌、野兎病菌、鼻疽・類鼻疽菌に主に焦点をあて研究を進めた。炭疽菌では、炭疽菌芽胞特異的抗体を作成し、その抗体に感染防御能があることを明らかにし、防御効果のあると考えられる抗原を検出した。炭疽菌の防御抗原に対する抗体を用いた診断法を開発した。炭疽菌およびブルセラ属菌を検出する LAMP 法を開発し、高感度でしかも 30 分で検出できた。野兎病に関しては、PCR 法による野兎病菌に対する特異的迅速同定法を確立し、このキットを完成させた。野兎病菌に対する特異抗原の精製を行いながら、もう一つの特異抗原の発現及び精製条件の検討を行った。類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) に関しては、熱帯および熱帯地方の土壌、水田および河川に生息しているが、有効な選択培地がないため、遺伝子を使った迅速高感度な検出法が不可欠である。これまで *B. pseudomallei* 検出系を作成してきた。しかし *B. thailandensis* において非特異増幅が検出される欠点があった。そこでカプセル合成因子の一部を用い、Luminex を使用した鼻疽/類鼻疽の免疫学的検査法を確立した。さらに、バイオテロに関係する病原体を網羅的な遺伝子増幅法の開発も行った（牧野）。

2) 臨床対応の検討：生物テロ関連疾患の診断・検査・治療マニュアルのホームページ(HP)を作製し、専門家の意見を取り入れながら、修正とアップデートを行ってきた。診療面の支援を積極的に対応可能な体制を作ることを目的として、国内の infection control doctor(ICD)を対

象としたアンケート調査を行った。多くの ICD が高い認識をもってはいるものの、自らの施設では準備に至っていない現状が示唆された。また HP について多くの要望が明らかとなり、さらに充実させていく必要がわかった。技術的には常に最新の情報を提供するためにコンテンツ管理システムの試作をおこなった（岩本、松本、中村）。

3) 自治体支援：地域における基盤整備を充実させるためには、災害対応の基盤における継続したサイクルでの準備が必要となり、このため生物テロに対する地域および病院の基盤整備評価ツールの開発することにより、指針となる方向性を示すことが可能となる。そのため、評価による技術的基盤整備は重要である。地域の基盤整備の評価として、①地域で、ワクチン、解毒剤と医薬品を提供するために準備ができているか。②地域で、生物テロが発生したときに十分な検査施設と対応が可能であるか。③地域で、生物兵器（炭疽菌など）などの専門的知識を持つ研究員を確保できているか。④地域で、生物テロに対して十分に対応できる研究所を持っているか。⑤地域で、生物テロを早期発見できるサーベイランスシステムを保有しているか。⑥地域の病院は、生物テロにおける対応計画を持ち、非医療施設（例えばコミュニティセンター、スポーツアリーナまたはホテル）が、地域の連携に組み込まれているか。⑦地域では、アウトブレイクした場合に対応する医療従事者の供給、継続医療の計画、サポートシステムができているか。⑧地域の病院は、感染の疑いがあった場合、24 時間のいつでも専門家との即時（15 分以内で）電話相談ができるシステムになっているか。⑨地域病院の医療従事者は、感染性の生物テロ発生時に優先的にワクチンまたは抗ウイルス剤を投与できるシステムが構築されているか。⑩地域の病院では、呼吸不全患者が大量発生した場合に、十分な人工呼吸器装置の備蓄（10 台以上）とその他の必要物品の準備ができているかを検討する。また、病院における生物テロ災害準備の評価として①地域との連携、②生物テロ対応の行動マニュアルの作成、③教育と反復練習、④患者のトリアージと診断治療、⑤感染予防、除染、蔓延防止

と隔離、⑥感染拡大のサーベイランス、⑦災害時における、治療能力の拡大、⑧感染に対する検査機関の充実、⑨医薬品とワクチンの備蓄および供給、⑩患者および医療従事者の安全と精神的支援、⑪情報公開・共有を大項目とした。これらの詳細な評価項目とシートを作成したので、今後、具体的な準備すべき方向性が統一され、各都道府県の地域および病院のより効率的に基盤整備が進捗すると考える（山本）。

4) 天然痘対応マニュアル改訂：天然痘対応指針の改定にむけて検討し、新型インフルエンザ対応ガイドラインを応用し、ワクチン接種戦略を提示することが必要であった。訓練を通して改訂し、バイオテロおよび新興感染症への対応手法が開発できた（山本）。

5) シミュレーション：生物テロの被害予測を種々のパラメーターを設定しコンピュータシミュレーションを行うシナリオを作製し、1万人規模の仮想都市における被害見積もりと感染予防対策の効果を検討した。また建物内部のヒトからヒトへの感染確率を実際の教育施設の協力を得て推計した（金谷）。Spot oriented agent role simulator(SOARS)を用いたシミュレーション疫学モデルを用い、机上演習が行えるモデルを作製し、実施した。そして、「感染症対策の机上演習マニュアル」を作製した（出口）。インディビジュアルベースモデルと東京都市圏パーソントリップ調査データを用い、首都圏人口 3300 万人の中で考えられる感染症拡散モデルを構築した。炭疽菌と肺ペストについてシミュレーションを行い、発症者数と探知および対策の開始時期によって相当程度の救命が可能であることが示された（大日）。

D. 考 察

生物テロかどうかも含めて臨床診断が困難な場合もあるため、地研で利用可能なスクリーニング法として網羅的ウイルス検出と定量ができる Realtime PCR 法を開発した。今後は簡易なキットを作成し、地研等へ配付を考えている。オルソポックスウイルスの検出、サル痘ウイルス、痘瘡ウイルス及びこれらの強毒型、弱毒型の鑑別も迅速に行なえることになった。ニ

パウイルスに関する診断系に使える抗体が得られ、今後は ELISA や蛍光抗体法、中和試験における陽性対照などに利用可能である。ヒトや動物検体に対するデータを得て、感度や特異度を確認する必要がある。Spotted fever group に共通した迅速かつ簡便な real time PCR 検出系を開発した。加えて、*R. rickettsii*、*R. japonica*、*R. prowazekii* をそれぞれ特異的に検出できる系も開発した。検出感度は従来の PCR 法と比較し、高感度で迅速であったことから、不明熱患者発生時における、簡便かつ迅速な原因菌同定法と考えられた。*Naegleria fowleri* は 26°C 以上の水温を好む自由生活性のアメーバであるが、鼻腔を介してヒトに感染するときわめて重篤な急性髄膜脳炎（Primary Amoebic Meningoencephalitis : PAM）を引き起こし、大半の患者が 1 週間程度で死亡する。今回、国内外の研究機関に保存され実験に供されている *N. fowleri* 主要株およびわが国での分離株の遺伝子鑑別ができたので、*N. fowleri* 主要株の traceability が高まった。ペスト菌 DNA を検出するほかに免疫学的な検出方法を確立した。種々の抗原検出が可能な抗体を用いた検出法について検討を続ける。SEB の検出系としてイムノクロマト法では非特異反応の減少が課題として残った。ボツリヌス毒素の簡易検出キットを国内レファレンスセンターに配付できたので、今後とも利用されていく。バイオテロ関連細菌病原体の検出方法には種々の方法を準備しておくことに意義がある。炭疽菌および鼻疽・類鼻疽菌の検出方法はほぼ完成した。野兔病の迅速診断・同定法が本年度作製した抗原で可能となった。今後の課題として網羅的な細菌遺伝子検査法を充実する必要があると考えられる。

生物テロ対応マニュアルは第一線の医師のみならず、看護師、臨床検査技師等もその対象範囲に入れ、さまざまな分野の職種においても利用が可能になることを目指している。一般公開をめざして問題点の克服にほぼめどがつき、およその準備が終了した。今回のアンケート調査によって得られた要望を入れて改訂と充実を行い、バイオテロの早期探知に役立てたい。

自治体への支援を目的として今回作成した評価シートは、大項目において検討し、細部においては実際の生物テロ発生時における病院

の詳細な行動計画を記載し評価することにした。これにより、日常から地域の災害拠点病院がこのような基盤整備ができていることを確認することが可能となり、実際に災害発生時に十分な対応が可能であると考ええる。当然、現時点では、どの基幹病院においても十分でないことは容易に推測できるが、このような評価シートを作成し、指針となる方向性を示すことにより、少しずつではあるが改善されることが十分に期待される。天然痘対応指針の改訂をめざして研究協力組織を作り、基本方針の策定、さらに訓練を行った。これらにより新型インフルエンザガイドラインにワクチン接種法を考慮して指針を完成させる予定である。

生物テロの発生から終息するまでをコンピュータシミュレーションでき、さらに感染対策評価が可能な机上演習システムが完成した。これにより、天然痘やインフルエンザを対象とした検討により、問題点を明らかにできた。今後、このシステムを用いた机上演習を広く行い、地方自治体の状況に合わせた対策の評価が可能である。

E. 結 論

緊急時対応可能な迅速実験室診断法の開発が進み充実した。網羅的ウイルス検出 Realtime PCR 法、天然痘との鑑別に必要なサル痘の LC-PCR 法、ニパウイルスの抗原や抗体作製、リケッチャの realtime PCR 法、アメーバの追跡に役立つ塩基配列情報、ペスト菌の迅速蛍光抗体法、SEB や AT の検出系、炭疽、ブルセラ、野兔病、鼻疽、類鼻疽の遺伝子および抗体検出法が行われた。バイオテロ発生時の一次対応支援となるバイオテロ対策マニュアルのホームページの公開に向けて準備がほぼできた。天然痘対応指針の改訂が可能となった。バイオテロの被害予測と感染対策に利用可能なコンピュータシミュレーションができた。これらの結果により、バイオテロ対策に利用できるツールの整備が進んだ。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ⅱ. 研究成果に関する刊行物一覧および代表的な論文を掲載した。

2. 学会発表

各分担研究者の各年度総括研究報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

江崎:特願 2006-272329 DnaJ 遺伝子を使った細菌の検出・同定法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Saijo M, Niikura M, Maeda A, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S	Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay.	J Med Virol	76	111-118	2005
Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S	Persisting humoral antiviral immunity within the Japanese population after the discontinuation in 1976 of routine smallpox vaccinations.	Clin Diagn Lab Immunol	12	520-524	2005
Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S	Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody.	J Med Virol	77	83-88	2005
Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura J, Hiramata C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A	An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection.	J Virol	79	11873-91	2005
Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S	LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox.	J Virol	80	5179-88	2006
Saijo M, Niikura M, Ikegami T, Kurane I, Kurata T, Morikawa S	Laboratory diagnostic systems for Ebola and Marburg hemorrhagic fevers developed with recombinant proteins.	Clin Vaccine Immunol	13	444-451	2006
Morita M, Ito K, Hirose K, Takahashi H, Shimuta K, Terajima J, Ohnishi M, Harada M, Matsuzaki M, Watanabe H, Izumiya H	Development of a Real-time PCR assay for detection of <i>gyrA</i> mutations associated with reduced susceptibility to ciprofloxacin in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi and Paratyphi A.	Microbiol Immunol	50	707-711	2006

Enkhtuya J, Kawamoto K, Kobayashi Y, Uchida I, Rana N, Makino S	Significant passive protective effect against anthrax by antibody to <i>Bacillus anthracis</i> inactivated spores that lack two virulence plasmids.	Microbiology	152	3103-3110	2006
Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Lim CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H	Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses.	Emerg Infect Dis	13	322-324	2007
Iihara H, Niwa T, Shah MM, Nhung PH, Song SX, Hayashi M, Ohkusu K, Itoh Y, Makino S, Ezaki T	Rapid multiplex immunofluorescent assay to detect antibodies against <i>Burkholderia pseudomallei</i> and taxonomically closely related nonfermenters.	Jpn J Infect Dis	60	230-234	2007
Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI	Rapid detection of <i>Brucella</i> spp. by the loop-mediated isothermal amplification method.	J Appl Microbiol		(in press)	2008
Masue N, Deguchi T, Yokoi S, Yamada T, Ohkusu K, Ezaki T	System for simultaneous detection of 16 pathogens related to urethritis to diagnose mixed infection.	Int J Urol	14	39-42	2007
Ohkusa Y, Sugawara T	Application of an individual-based model with real data for transportation mode and location to pandemic influenza.	J Infect Chemother	13	380-389	2007

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; Anonymus, 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 N²⁺-resin purification system (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The GST-MBG-NP/C-half was also purified with glutathione Sephalose 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>GATTGATC</u> AGAACCTATAAGATC	MBG-NP 8F	1771–1796	Forward
CAGGAATGATCAAGGATGAGGGAAAGCC	MN8/2F	1819–1845	Forward
CTCTGGAATTCATGTTTGCAGAAGATCA	MN8/2R	1944–1971	Reverse
TTCACATGATCAGAGGATAATCAGCAG	MN8/3F	1864–1890	Forward
CAGGAATTCAGTATTCTCAACGAGGGC	MN8/3R	1984–2011	Reverse
AAGAAGTGATCAACTTTCCTTTATC	MN8/4F	1915–1939	Forward
TTCATGAAATTCACATGTCGGGCCAATC	MN8/4R	2035–2061	Reverse
GCTGAATTCCTGGACTACAAGTTC	MBG-NP 8R	2079–2103	Reverse
CAGGGATCCTGGCCACAAAAGAGTG	M8/2F-6	1885–1908	Forward
AATGGATCCCAAAGAGTGGTGAC	M8/2F-8	1891–1913	Forward
CCAGGATCCGTGGTGACAAAAGAAG	N8/2F-10	1897–1920	Forward
GCAGAAGAATTC AAGGATAAAAGGAAAG	M8/3R-6	1928–1954	Reverse
GATCATGAATTC AAGGAAAGTTCTAC	M8/3R-8	1922–1948	Reverse
TAGGAGAATTC AAGTTCTACCCTTC	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 (GemBack Accession No. X68495).

Protein Assay™ (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 µl 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 µl 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 µl 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 µl 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, "WPQRVVTKKGRFTL (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

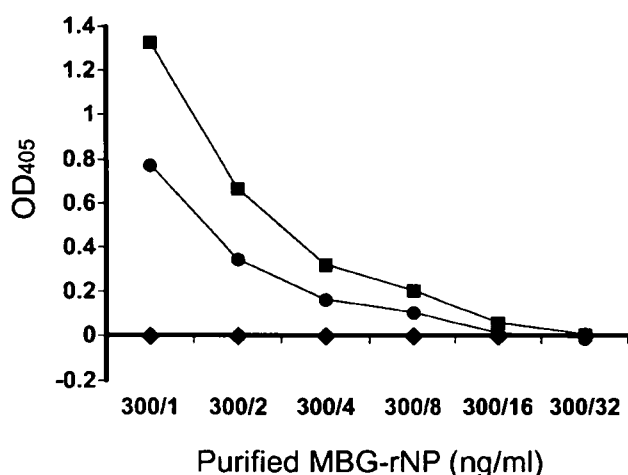


Fig. 1. Reactivity of each monoclonal antibody in the antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) format. Purified monoclonal antibodies (■, MAb2A7; ●, MAb2H6; ◆, mock) were coated onto the microplates as described in the text, and their ability to capture the rNP of Marburg virus (MBGV)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

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

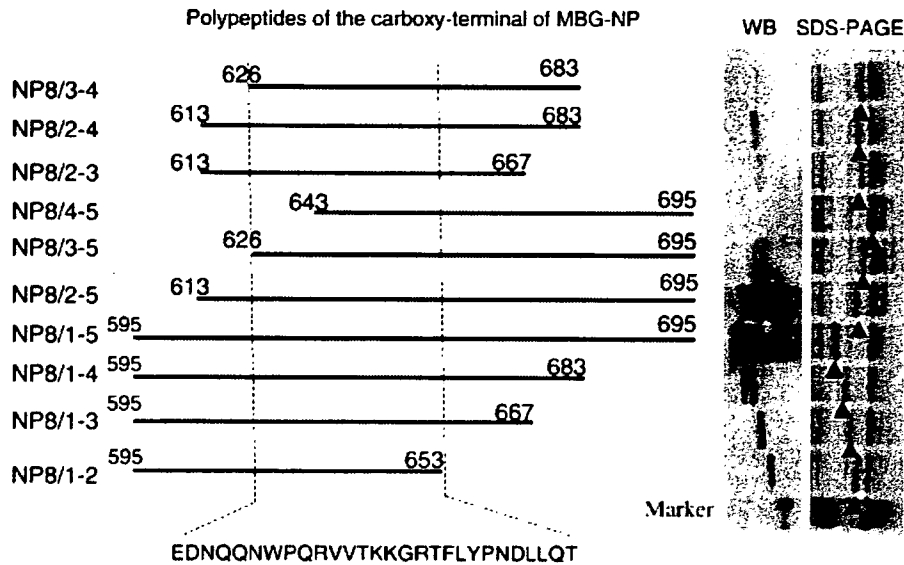


Fig. 2. Schematic representation of the truncated polypeptides (left part), expression levels of these polypeptides determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis (right part, SDS-PAGE), and reactivity of MAb2A7 to these polypeptides in Western blotting (WB) (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

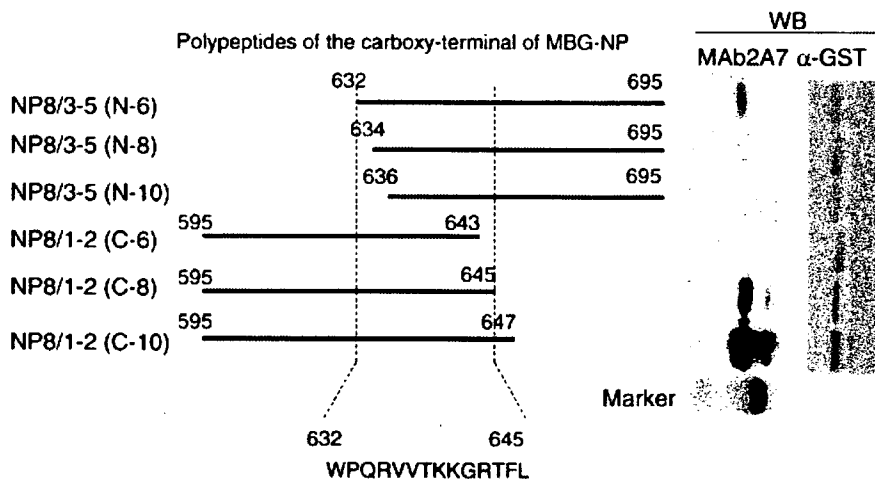


Fig. 3. Schematic representation of the truncated polypeptides (left part), and reactivity of MAb2A7 and anti-glutathione S-transferase (GST) monoclonal antibody to these polypeptides in WB. The numbers shown for each schematic polypeptide indicate the amino acid positions of the MBGV nucleoprotein.

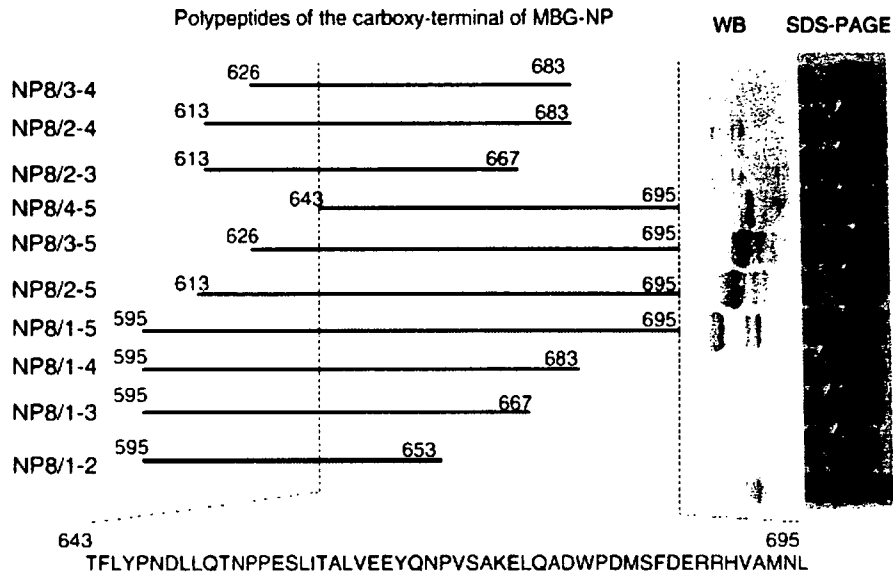


Fig. 4. Schematic representation of the truncated polypeptides (**left part**), expression levels of these polypeptides determined by SDS-PAGE analysis (**right part, SDS-PAGE**), and reactivity of MAb2H6 to these polypeptides in Western blotting (**right part, WB**). The numbers shown for each schematic polypeptide indicate the amino acid positions of the MBGV nucleoprotein.

(Fig. 6), indicating that the newly developed MBGV nucleoprotein-detection ELISA was specific for MBGV infections.

The amino acid sequence of the polypeptide recognized by MAb2A7 was conserved among Marburg virus

isolates so far deposited in the GenBank, and there is no significant diversity in the amino acid sequences of the carboxy-terminal regions among Marburg virus isolates (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>, Accession nos. AAR85460, AAR85453,

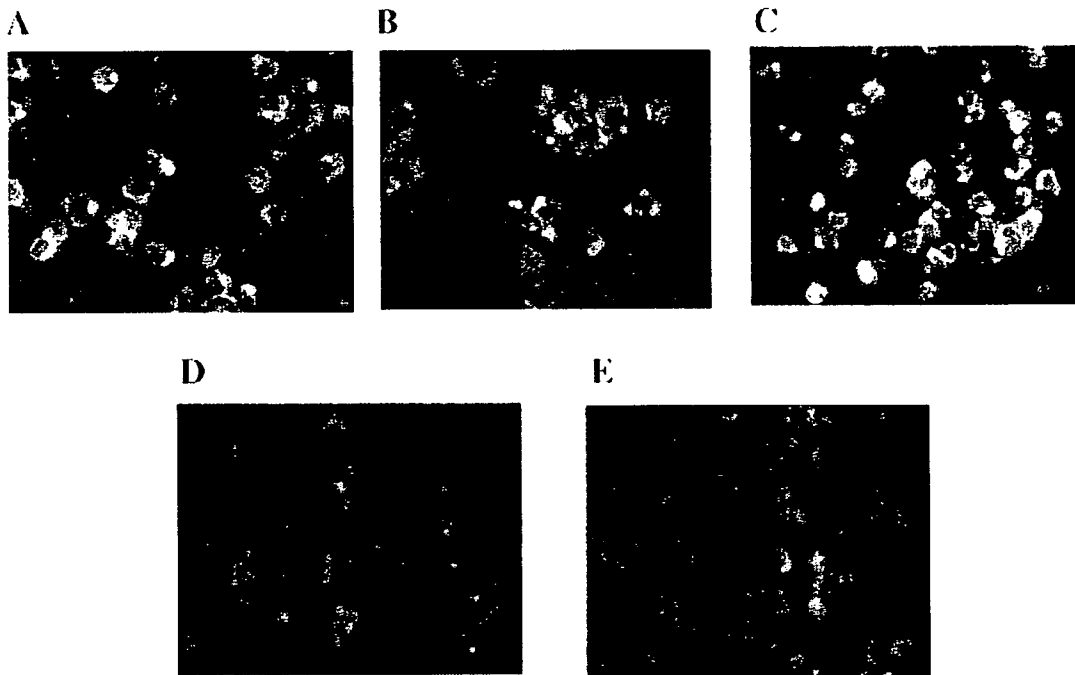


Fig. 5. Reactivity of MAb2A7 (A), MAb2H6 (B), anti-MBGV rNP rabbit serum (C), negative control mouse serum (D), and rabbit serum (E) to authentic MBGV antigens in Vero E6 cells in the immunofluorescence assay.

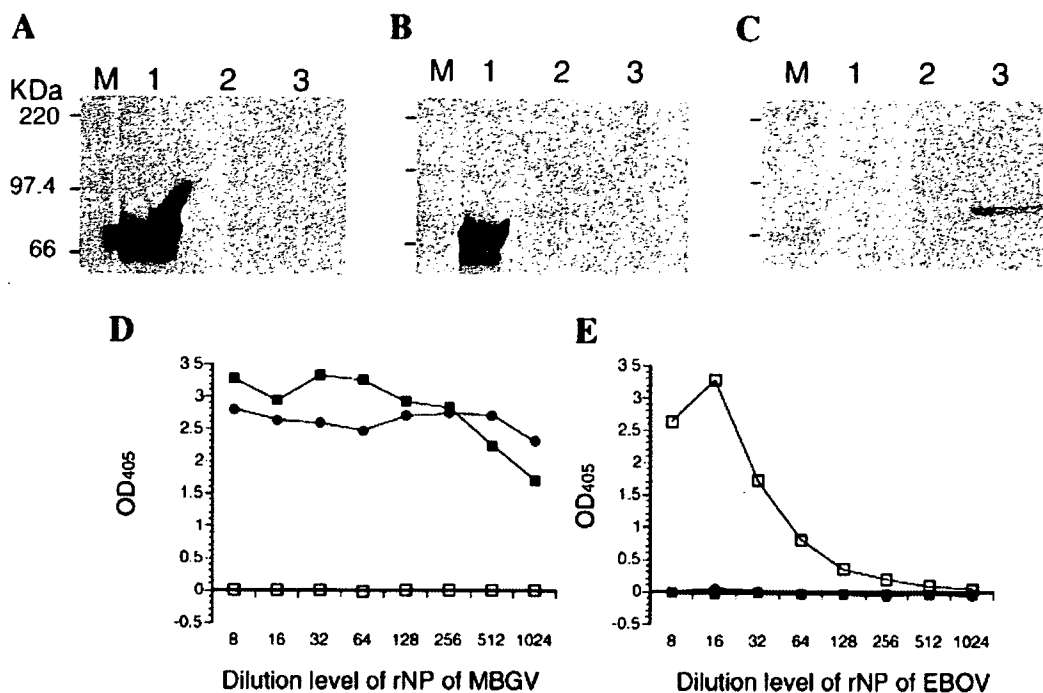


Fig. 6. Reactivity of the monoclonal antibodies to rNPs of MBGV and EBOV. Reactivity of MAb2A7 (A), MAb2H6 (B), and MAb3-3D (C) to MBGV rNP and EBOV rNP was examined in Western blotting. Lanes "M," "1," "2," and "3" indicate the lanes blotted with markers, GST-tagged MBG-NP/C-half, negative control antigen prepared from *Tn5*

insect cells infected with the recombinant baculovirus without expression of foreign genes, and His-tagged rNP of EBOV, respectively [Saijo et al., 2001]. Reactivity of these monoclonal antibodies to the rNPs of MBGV (D) and EBOV (E) was also examined in the antigen-capture ELISA using MAb2A7 (■), MAb2H6 (●), or MAb3-3D (□).

NP_042025, AAQ55255, S44049, VHIWMV, P35263, 2110212A, P27588, CAA78114, CAA82536, AAA46563). Therefore, it is quite likely that the newly developed antigen-capture ELISA system for MBGV is useful for detecting most MBGV isolates, although further study is needed.

In conclusion, an MBGV nucleoprotein-detection ELISA system using unique monoclonal antibodies was developed, and the monoclonal antibodies useful for detecting nucleoprotein of the MBGV in the system were characterized. The combined use of the MBGV nucleoprotein-capture ELISA in the present study with the EBOV nucleoprotein-detection ELISA developed in a previous study [Niikura et al., 2001; Ikegami et al., 2003] may be useful for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers due to filovirus infections.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was performed with the approval of the ethical committee for animal experiments established in the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan. We thank Prof. H.D. Klenk, Institute of Virology, Philipps-University, Marburg, Germany, for providing the DNA of the nucleoprotein of Marburg virus. We also thank Dr. J.B. McCormick, former head of the Special Pathogens Branch, Centers Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, for providing the inactivated authentic Marburg virus antigens for IFA. We thank Ms. M. Ogata, Department of Virology 1, National

Institute of Infectious Diseases, for her technical and clerical assistance.

REFERENCES

- Anonymous. 1999. Marburg fever, Democratic Republic of the Congo. *Wkly Epidemiol Rec* 74:145.
- Bausch DG, Borchert M, Grein T, Roth C, Swanepoel R, Libande ML, Talarmin A, Bertherat E, Muyembe-Tamfum JJ, Tugume B, Colebunders R, Konde KM, Pirad P, Olinda LL, Rodier GR, Campbell P, Tomori O, Ksiazek TG, Rollin PE. 2003. Risk factors for Marburg hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis* 9:1531-1537.
- Conrad JL, Isaacson M, Smith EB, Wulff H, Crees M, Geldenhuys P, Johnston JJ. 1987. Epidemiologic investigation of Marburg virus disease, Southern Africa, 1975. *Am J Trop Med Hyg* 27:1210-1215.
- Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S. 2002. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 40:2323-2330.
- Feldmann H, Slenczka W, Klenk HD. 1996. Emerging and reemerging of filoviruses. *Arch Virol Suppl* 11:77-100.
- Gear JS, Cassel GA, Gear AJ, Trappler B, Clausen L, Meyers AM, Kew MC, Bothwell TH, Sher R, Miller GB, Schneider J, Koornhof HJ, Gomperts ED, Isaacson M, Gear JH. 1975. Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br Med J* 4:489-493.
- Ikegami T, Niikura M, Saijo M, Miranda ME, Calaor AB, Hernandez M, Acosta LP, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. 2003. Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:552-557.
- Johnson ED, Johnson BK, Silverstein D, Tukei P, Geisbert TW, Sanchez AN, Jahrling PB. 1996. Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya. *Arch Virol Suppl* 11:101-114.