

3. デング出血熱の病態解明の進展とワクチン開発の現状

倉根 一郎

1. はじめに

トガ・フラビウイルスは多くのウイルスがヒトに感染し重篤な感染症をおこす。西ナイルウイルス、黄熱等、近年世界各地で問題となっているものも多いが、そのうちデングウイルスは患者数、世界的な分布、重篤度等から最も重要なものと言える^{1,2)}。デングウイルスは蚊によって媒介されるフラビウイルスである。デングウイルス1型—4型の4つの血清型が存在し、いずれの血清型のデングウイルスの感染によっても同様の病態を示す。即ち、病態からは感染したデングウイルスの型は推定できない。デングウイルスに感染した場合多くは不顕性感染に終わるが、典型的な症状を示す場合一過性の熱性疾患であるデング熱、致死性の疾患であるデング出血熱という2つの異なる病態を示す。

重篤なデング出血熱の病態の解明はデングウイルス感染症研究の最も大きなテーマの一つとなってきた。なぜ、ある患者はデング熱で終わり、ある患者はデング出血熱の病態を示すか、即ち、デング出血熱の病態はなぜおこるかは現在でもデングウイルス感染症研究の最も大きなテーマといえる。デング出血熱の病態機序は過去2つの観点から説明がなされてきた。一つは感染する生体の免疫状態によるもの、一つはデングウイルス自体の毒性の違いによるものとするものであり、従来この2つの説は互いに相反するものと考えられてきた。しかし、近年のデータからは、ウイルスの性状、生体の免疫状況いずれもがデング出血熱の病態形成の一面を反映しているとする考え方が支持されてきている。以下、このような考え方の基となるデータを示しながら、主にデング出血熱の病態解明の現状について述べる。

2. デング熱とデング出血熱^{3,4)}

1) デング熱

デングウイルス感染によって典型的な症状を示す患者の大多数を占める一過性の熱性疾患である。感染後2-7日の潜伏期を経て、突然の発熱で発症し、頭痛、眼窩痛、筋肉痛、関節痛が主症状として現れる。発症後数日してから体幹から始まる発疹が出現し、四肢、顔面へ広がる。症状は1週から10日で消失し、普通後遺症なく回復する。臨床的に、他のウイルス性疾患には存在せずデング熱にのみ存在するものはない。

2) デング出血熱

デング熱と同様に発症し経過した患者において血漿漏出と出血傾向を主症状とする重篤な致死性の病態を示すことがあり、デング出血熱と呼ばれる。デング熱とデング出血熱を病態生理学的に区別するものは著しい血漿漏出である。出血傾向は軽微なものから消化管出血等重篤なものまで程度が異なる。血小板数は減少し $100,000/\text{mm}^3$ 以下となる。肝臓腫脹が高頻度である。血漿漏出が進行すると循環血液量の減少からショックになり、この病態はデングショック症候群と呼ばれることもある。血漿漏出やショックは解熱時におこることが特徴的である。

3. デングウイルス感染症の病態の理解を複雑にしている要因

デングウイルスには4つの血清型が存在する。同型のデングウイルスに対する防御免疫は終生持続するが、他の型に対する防御免疫は短期間（数ヶ月程度と考えられている）持続するのみであり、その後他の型のウイルスには感染しうる⁵⁾。1つの血清型のデングウイルス初感染により誘導される免疫応答は、液性免疫、細胞性免疫とも型特異性の応答と、型交叉性の応答が混在したものである。型特異性の免疫応答は防御に働くが、初感染によって誘導された型交叉性の応答は防御には働かないと考えられている。2つの血清型に感染した後は、全ての型に対する交叉防御免疫が誘導されるので、一般的には3度目の感染（第3の血清型による感染）はないとされている。

国立感染症研究所ウイルス第一部（〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1）

Development in the analysis of the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever, and current status of dengue vaccine.

Ichiro Kurane

Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases

1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan

TEL: 03-5285-1111

防御免疫の本質に関してはまだ完全に明らかになったわけではないが、中和抗体が主体であると考えられている。即ち、初感染においてはウイルス型特異的の中和抗体が出現するので、型特異的の防御が成立するが、型交叉性中和抗体はほとんど出現しないので型交叉性防御は成立しない。しかし、2つの血清型に感染すると誘導される中和抗体は4つの型に対して交叉性であるため、第3、第4の血清型には感染しないと考えられている。一方、T細胞の応答も、抗体とほぼ同様である。即ち、初感染後のT細胞免疫応答は型特異性と型交叉性の応答が型特異性優位に混在するが、他の血清型による2度目の感染後は型交叉性の細胞が優位となる^{6,7)}。さらに、近年ほとんどの熱帯亜熱帯地域においては複数の型の Dengue ウイルスが存在し、年ごとに優勢な血清型が異なるという、複雑な疫学的状況を呈している。

4. Dengue 出血熱の病態形成機序

Dengue ウイルスが生体のどの細胞に感染しているかについては完全に解明されているわけではない。蚊の刺咬によって生体に入った後、皮膚のランゲルハンス細胞にまず感染すると考えられている⁸⁾。また、単球・マクロファージ系細胞が生体内で感染する主な細胞であるとの報告が多く⁹⁻¹³⁾、ウイルスは皮膚や所属リンパ節の単球・マクロファージ系細胞でも増殖すると考えられている。また Dengue ウイルスは特定の標的器官を持たず脾臓、肝臓等種々の臓器で増殖する。また細胞変性効果が強くないため感染細胞がある期間生存していると考えられる。このことは感染単球や感染マクロファージによる免疫系の刺激、感染細胞自体からサイトカインやケミカルメディエーターの放出が長期持続しうることとなる。また、非中和抗体の存在下で Dengue ウイルスの感染が大幅に増殖されるという抗体依存性感染増強という現象が知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。

1) 感染増強抗体を主体とした考え方

特にタイ国での疫学的研究に基づく。タイ国において1964年、Dengue 出血熱患者の人口1,000人あたりの発生率を調べるとその曲線は2峰性であった。第1のピークは生後約8ヶ月、第2のピークは約4歳であった。ふたつのカーブの谷は生後約12ヶ月であった。患者の絶対数としては1歳未満が10%、1歳以上が90%であった^{17,18)}。これらの Dengue 出血熱患者の99%は抗 Dengue ウイルス抗体を有していた。興味深いことに1歳以上の Dengue 出血熱患者のほとんどは再感染による患者、1歳未満の患者のほとんどは初感染の患者であった。また、この1歳未満の患者のほとんどは Dengue ウイルス抗体を有する母親から生まれた小児であった。Dengue 出血熱患者の多くが再感染であるというデータは他の調査においても報告されている¹⁹⁻²¹⁾。タイなど東南アジア各国においては Dengue 出血熱は小児にみられる

ことが多いが、疫学的状況が異なる国においては大人にも Dengue 出血熱は発生しうる。例えば、キューバで発生した Dengue 出血熱患者の多くが大人であり再感染であったことが報告されている²²⁾。

以上のようなデータに基づき、Dengue 出血熱は母子移行抗体として獲得された抗体、あるいは初感染時に誘導された中和能を有しない交叉性抗体が感染時（1歳未満では初感染、1歳以上では再感染）特に単球・マクロファージ等 IgG-Fc レセプターを有する細胞の Dengue ウイルス感染を増強させることが Dengue 出血熱の基盤であると解釈された。この感染増強抗体については、1歳未満の小児においては、母親の血中抗 Dengue 抗体価が高いほどこの小児が Dengue 出血熱を発症する月数が遅いというデータがある²³⁾。これは母子移行中和抗体のレベルが低下し、中和能を失い Dengue ウイルス感染を増強させうる状態により長い時間を必要とするためと解釈されている。また、1歳以上の小児では、流行した血清型に対して中和抗体を有している個体群においては患者は発生せず、中和抗体を有していない群に Dengue 出血熱が発生したというデータも示されている²⁴⁾。このような感染増強抗体を主体とした説は長い間 Dengue 出血熱の病態形成を論ずる上で支持されているものである。感染増強抗体が Dengue 出血熱の大きな要因であるとすれば、Dengue 出血熱患者においては Dengue 熱患者に比し、より高いレベルのウイルス価が見られることが期待される。実際、Dengue 出血熱患者においては Dengue 熱患者に比し、血中ウイルス価が高いというデータが近年発表された²⁵⁾。一方、この再感染説に反するデータとして1歳以上の患者でも初感染時に Dengue 出血熱が発生しうるということも事実である。さらに感染増強抗体によるウイルス価が増強したとして、どのような機序によって血漿漏出や出血傾向という Dengue 出血熱に特徴的な病態が出現するかは解明されていない。

2) Dengue ウイルスの強毒性を主体とした考え方

上記、感染増強抗体を主体とした説に対して、Dengue ウイルス株にはいわゆる毒性の強いものと弱いものがあり、強毒株は Dengue 出血熱を、弱毒株は Dengue 熱をおこすという説も支持されてきた²⁶⁾。この説を支持するデータとして、上述のように全く抗 Dengue ウイルス抗体を有しない患者においても初感染時 Dengue 出血熱が発生するという事実がある。感染増強抗体や免疫の関与がない状況でも Dengue 出血熱となりうることであり、ウイルスの毒力の差が病態を決定するというものである。しかし、いわゆる強毒性、弱毒性という言葉がウイルスのどのような性質を反影しているかについては、おそらく増殖性を反映していると考えられているが、まだ明確にはされていないと言わざるをえない。

この説を疫学的にサポートするものとして、以下のよう

なものがある。従来南米にはデングウイルス2型は存在したがデング出血熱の発生はみられなかった。しかし、1980年代から中南米においてもデングウイルス2型によるデング出血熱の発生が報告されるようになった。中南米においてデング出血熱を引き起こしているデングウイルス2型の遺伝子解析から、このウイルスは東南アジア由来のデングウイルス2型であることが明らかとなった²⁷⁻²⁹⁾。さらに、中南米においても東南アジア由来のデングウイルス2型が侵入していない都市においてはデング熱患者の発生は見られるがデング出血熱患者が見られないことも報告されている³⁰⁾。このような、疫学的解析とともに、デングウイルスの強毒性を決定する因子の解析も進められている。同一地域において、デング熱患者とデング出血熱患者から分離されたウイルス株の遺伝子を比較することによって、E 遺伝子、5' nontranslated region、3' nontranslated region の遺伝子に相違が見られる³¹⁾、あるいは PreM, NS1, NS2 A, NS3, NS5 遺伝子に相違が見られる³²⁻³⁵⁾ことが報告されている。従って、いわゆる強毒性は複数の遺伝子によって規定されている可能性が存在する。さらに、デングウイルス2型の遺伝子解析と各ウイルス株が分離された患者の血清学的、臨床データから、デングウイルス株が、再感染でデングショック症候群を引き起こす株、初感染ではデング熱、再感染ではデング出血熱を引き起こす株、初感染再感染いずれにおいてもデング熱しか起こさない株に分類され、各グループ間に一定のアミノ酸配列上の特徴があるという報告もある。しかし、動物モデルが確立されていないことから、あるアミノ酸変異を導入することによりデング出血熱を引き起こすウイルス株を作製するという実験はまだなされていない。

5. 病態形成に関する現在の考え方 (表1, 図1)

デング出血熱の病態形成機序に関する上記2つの考え方はこれまで対立するものとされてきた。しかし、いずれの考え方についても支持するデータが蓄積されてきた現在では、2つの考え方は、いずれもデング出血熱の病態形成の一面を示すものと考えられている。即ち、各ウイルス株が持つ増殖性が病原性を決定する大きな要素であり、ある種のウイルス株にとってはデング出血熱を起こすに至る程度に増殖するためには感染増強抗体の存在が必要であるといえる。

しかし、あるデングウイルス株が感染増強抗体の存在あるいは非存在で高レベルに増殖するとしても、ウイルスの増殖がどのような機序で、デング出血熱に特徴的な病態、例えば血漿漏出、出血傾向、血小板減少等を引き起こすに至るかについては解明されていない。臨床的に、デング出血熱患者はひとたび回復が始まると血漿漏出傾向からの回復が非常に早いことが知られている。さらに、デング出血熱によって死亡した患者検体の研究においても、毛細血管

表1 デング出血熱の病態形成に関与する種々のファクター

1. デングウイルス
1) 感染増強抗体なしによく増殖する強毒株ウイルス
2) 感染増強抗体を必要とする強毒株ウイルス
2. 感染増強抗体 (中和能を有しない型交叉性抗体)
1) ウイルス感染の増強
2) 補体活性化
3. 単球・マクロファージと樹状細胞
1) デングウイルスの増殖
2) サイトカイン産生
3) 補体活性化
4. T細胞 (型交叉性 T細胞)
1) リンホカイン産生
2) ウイルス感染細胞の破壊
5. 補体
血漿漏出
6. 血小板
出血傾向
7. 血管内皮細胞
1) 血漿漏出
2) サイトカイン産生
8. 遺伝的素因
1) 組織適合抗原
2) 人種その他の素因

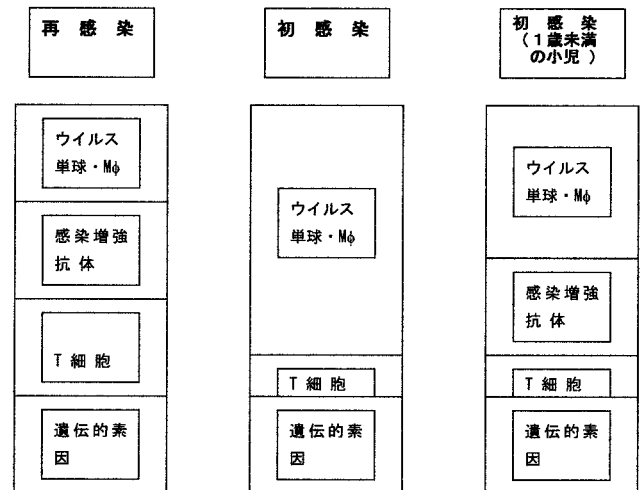


図1 デング出血熱の病態形成に関わると考えられるファクターの、初感染と再感染における相対的重要度

内皮細胞がデングウイルスに感染し破壊されていると言う像は得られない。従って、少なくとも血漿漏出は血管の破壊によるものではなく、血管血管内皮細胞の一時的な機能不全によると考えられている^{36,37)}。

血管内皮細胞の機能不全と血漿漏出を誘発するものとして、種々のサイトカインの関与が考えられる。デング熱患者に比しデング出血熱の患者血清中で高濃度であることが報告されているものとして、TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IFN- γ 等がある³⁸⁻⁴⁷⁾。また、胸膜腔への浸出液中ではIL-8やMCP-1の濃度が高いことも報告されている⁴⁸⁾。これらのサイトカインには特にTNF- α の

ように他の疾患や実験系において血漿漏出を引き起こすことが知られているものもあるが、デング出血熱における血液漏出の誘導に何がもっとも大きな役割を果たしているかは明らかになっていない。これらのサイトカインがどの細胞によって産生されているかに関してはデングウイルス感染単球や感染マクロファージ、デング出血熱患者で著しく活性化されていることが知られているT細胞、血管内皮細胞、マスト細胞、好塩基球等の報告がある⁴⁸⁻⁵¹⁾。さらに、デング出血熱患者においては補体の活性化が著しいことも長く知られている。補体活性化により産生されるC3a, C5aの血中レベルが血漿漏出の程度と相関しているという報告もあり、何らかの形で補体の関与も考えられる⁵²⁾。一方、出血傾向や血小板減少の機序についてはまだ明確な機序は知られていない。

以上を総合すると、デング出血熱の病態形成は現在のところ以下のように考えられる。初感染においても再感染においてもデングウイルスがある程度以上に増殖する能力を有するものであることが必要である。デングウイルス抗体陽性の母親から生まれた1歳未満の小児初感染、1歳以上の小児や大人における再感染時には感染増強抗体の存在がウイルスの増殖を一層促進させる。一方、高増殖性のウイルスは感染増強抗体の関与なしに十分に増殖しうる。このような機序によるウイルス増殖時、感染単球や感染マクロファージからは種々のサイトカインが産生される。また再感染時には初感染時に誘導された型交叉性T細胞の過剰な活性化により大量のサイトカイン（リンホカイン）が産生される。一方、ウイルス・抗体複合体によって、あるいはウイルス感染単球上において補体の活性化も誘発される。このような機序により多種のサイトカイン、ケミカルメディエーターが短時間に高レベルに産生される。これらのサイトカインやメディエーターの相乗、相加作用により血管内皮細胞の機能不全、ひきつづく血漿漏出がおこると考えられる⁵³⁻⁵⁵⁾。このような機序は出血傾向、血小板減少にも何らかの役割を果たしていると考えられてはいるが明らかとなっていない。一方、遺伝的素因も関与していると考えられているがその実体は明らかになっていない。

6. デングワクチンの開発

このようなデングウイルス感染に対する対処としてデングウイルスワクチンの開発が長期間試みられてきた。疫学的に再感染時にデング出血熱の発生が増加するというデータから、4つの血清型に対して十分な防御免疫を誘導するため、デングウイルス1型、2型、3型、4型それぞれに対する弱毒生ワクチンを作製し、それを混ぜた4価のワクチンを作製する試みが複数の研究グループによってなされている⁵⁶⁾。それぞれの型に対するワクチン候補株によっては型特異的中和抗体が誘導されるが、4価のワクチンとして接種した場合1回の免疫では特定の型に対しての中和抗

体が優勢になり4つの型それぞれに対して期待されるレベルの中和抗体が誘導されない場合がある。しかし4価ワクチンに含まれる各型ワクチンの混合比を変えたり、複数回接種する等の変更により、現在は4つの型に期待される中和抗体を誘導する4価の弱毒生ワクチンが作製されつつある。このワクチンに関しては、今後、第3相試験によって実際にデング出血熱の発生を減少させることの確認、さらに、逆にワクチン接種者の中でのデング出血熱の発生数の増加がないことを確認する必要がある。また、黄熱ウイルス17Dワクチン株をベースとしそのE遺伝子を、デングウイルスE遺伝子と入れ替えた黄熱・デングキメラワクチンの開発も動物実験の結果は有望である。

7. おわりに

種々のデータの蓄積にもかかわらず、デング出血熱の病態はまだ完全に解明されたわけではない。その原因の一つとして、デング出血熱がヒトにおいてのみ観察され動物モデルがないことがあげられる。動物モデルの開発が今後の病態解明への大きな要因となろう。ワクチンについては、現在開発されているものが4つの血清型のデングウイルス感染を等しく防御し、さらにデング出血熱へと向かわないことを確認することが重要である。また、デング出血熱の病態解明は他のウイルス性出血熱の病態解明への糸口となることも期待される。

文 献

- 1) Monath T. P. (1994) Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 2395-2400.
- 2) Halstead SB (1997) Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In, *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, ed by Gubler D. J. and Kuno G. pp23-44. CBA International. Oxon UK.
- 3) World Health Organization (1997) *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control*. pp12-23. World Health Organization, Geneva
- 4) George R and Lum L. C. S. (1997) Clinical spectrum of dengue infection. In, *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, ed by Gubler D. J. and Kuno G. pp89-113. CBA International. Oxon UK.
- 5) Halstead SB: Dengue viruses. (1992) In, *Infectious Diseases*, ed by Gorbach SL et al. pp1830-1835. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- 6) Kurane I, Meager A, Ennis FA. (1989) Dengue virus-specific human T cell clones: serotype-cross-reactive proliferation, interferon gamma production and cytotoxic activity. *J. Exp. Med.* **170**, 763-775.
- 7) Mathew, A., Kurane, I., Green, S., Stephens, H. A. F., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., Ennis, F. A., and Rothman, A. (1998) Predominance of CTL responses to serotype crossreactive epitopes on nonstructural protein following natural secondary dengue virus infection. *J. Virol.* **72**, 3999-4004.

- 8) Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. (2000) Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* **6**, 816–820.
- 9) Halstead SB, O'Rourke, EJ and Allison AC (1977) Dengue virus and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes support *in vitro* infection. *J. Exp. Med.* **146**, 218–229.
- 10) Bhamarapravati, N., Tuchinda, P. and Boonpucucknavig, V. (1967) Pathology of Thailand hemorrhagic fever : a study on 100 autopsy case. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **61**, 500–510.
- 11) Boonpucucknavig, S., Boonpucucknavig, V., Bhamarapravati, N. and Nimmannitya, S. (1979) Immunofluorescence study of skin rashes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Arch. Path. And Lab. Med.* **103**, 463–466.
- 12) Yoksan, S. and Bhamarapravati, N. (1983) Localization of dengue antigen in tissue from fatal cases of DHF. In: *Proceedings of the International Conference on Dengue Haemorrhagic Fever 1982*. pp406–410. University of Malaya, Malaysia.
- 13) Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Jaeck D, Kirn A, Deubel V. (1999) Infection of primary cultures of human Kupffer cells by dengue virus : no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J Virol.* **73**, 5201–5206.
- 14) Halstead S. B. (1977) Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature.* **265**, 739–741.
- 15) Halstead, S. B, O'Rourke, E. J. (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J. Exp. Med.* **146**, 210–217.
- 16) Kurane, I, Mady B. J. and Ennis, F. A. (1991) Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Rev. Med. Virol.* **1**, 211–221.
- 17) Halstead S. B. (1980) Immunopathological parameters of togavirus disease syndromes. In: *The Togaviruses*. ed by Schlesinger W. pp107–173. Academic press New York
- 18) Halstead SB. (1988) Pathogenesis of dengue. Challenge to molecular biology. *Science* **239**, 476–481.
- 19) Burke D. S., Nisalak, A., Johnson, D. and Scott, M. (1988) A prospective study of dengue virus infection in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**, 172–180.
- 20) Sangkawibha, N., Rojanasuphot, S., Ahandrik, S., Viriyapongse, S., Jatanasen, S., Salitul, V., Phanthumachinda, B. and Halstead, S. b. (1984) Risk factors for dengue shock syndrome : a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am. J. Epidemiol.* **120**, 653–669.
- 21) Thein, S., Aung, N. N., Shwe, T. N., Aye, M., Zwa, A., Aya, K., Aye, K. M. and Aaskov, J. (1997) Risk factors in dengue shock syndrome. **56**, 566–572.
- 22) Guzman, M. G., Kouri, G. P., Bravo, J., Soler, M., Vazquez, S. and Morier, L. (1990) Dengue hemorrhagic fever in Cuba. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**, 179–184.
- 23) Kliks SC, Nimmannitya S, Nisalak A, Burke DS. (1988) Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg.* **38**, 411–419.
- 24) Kliks SC, Nisalak A, Brandt E. E., Wahl L., Burke DS. (1989) Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* **40**, 444–451.
- 25) Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.* **181**, 2–9.
- 26) Rosen L. (1997) The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**, 337–343.
- 27) Rico-Hesse R. (1990) Molecular evolution and distribution of dengue viruses types 1 and 2 in nature. *Virology* **174**, 479–493.
- 28) Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. (1997) Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* **230**, 244–251.
- 29) Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA. (1998) Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* **58**, 96–101.
- 30) Watts, D. M., Porter K. R., Putvatana, P., Vasquez, B., Calampa, C., Hayes, C. G. and Halstead, S. B. (1999) Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue hemorrhagic fever. *Lancet.* **354**, 1431–1434.
- 31) Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R. (1999) Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* **73**, 4738–4747.
- 32) Mandgada MN, Igarashi A. (1998) Molecular and *in vitro* analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology* **244** : 468–466
- 33) Soemonto BE, Hasebe F, Igarashi A. (1999). Infection of dengue 2 virus strains isolated from patients exhibiting different disease severities to human peripheral blood leukocytes and production of cytokines in the infected culture supernatant. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **30**, 729–734.
- 34) Pandey BD, Igarashi A. (2000) Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol.* **44**, 179–188.
- 35) Pandey BD, Morita K, Hasebe F, Parquet MC, Igarashi A. (2000) Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **31**, 266–272.
- 36) Kurane I, Rothman AL, Livingston PG, Green S, Gag-

- non SJ, Janus J, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Ennis FA. (1994). Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol (Suppl)*. **9**, 59-64
- 37) Rothman AL, Ennis FA. (1999). Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology*. **257**, 1-6.
- 38) Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, Ennis FA. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. (1991) High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD 4, soluble CD 8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J. Clin. Invest.* **88**, 1473-1480.
- 39) Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, Imbert P, Pecarere JL, Vergez-Pascal R, Wattre P, et al. (1993). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**, 324-331.
- 40) Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, Kapoor S, Misra A, Mathur A, Nusrat H, Azizieh F, Khan MA, Mustafa AS. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. (1998) *J Med Virol*. **56**, 280-285.
- 41) Hober D, Nguyen TL, Shen L, Ha DQ, Huong VT, Benyoucef S, Nguyen TH, Bui M, Loan HK, Le BL, Bouzidi A, De Groote D, Drouet MT, Deubel V, Wattre P. (1998) Tumor necrosis factor alpha levels in plasma and whole-blood culture in dengue-infected patients: relationship between virus detection and pre-existing specific antibodies. *J Med Virol*. **54**, 210-218.
- 42) Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman WA, Cardosa MJ, White NJ, Kwiatkowski D. (1998). Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* **177**, 778-782.
- 43) Laur F, Murgue B, Deparis X, Roche C, Cassar O, Chungue E. (1998) Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**, 654-656.
- 44) Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, Lew R, Innis BL, Kurane I, Rothman AL, Ennis FA. (1999). Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J. Infect. Dis.* **179**, 755-762.
- 45) Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, Rothman AL, Ennis FA. (1999). Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J. Med. Virol.* **59**, 329-334.
- 46) Pinto LM, Oliveira SA, Braga EL, Nogueira RM, Kubelka CF. (1999) Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**, 387-394.
- 47) Pacsa AS, Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. (2000). Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **28**, 151-155.
- 48) Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. (1998) Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J. Immunol.* **161**, 6338-6346.
- 49) Huang, Y. H., Lei, H. Y., Liu, H. S., Lin, Y. S., Liu, C. C. and Yeh, T. M. (2000) Dengue virus Infects human endothelial cells and Induces IL-6 and IL-8 production. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
- 50) Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC. (1997) Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol.* **71**, 4226-4232.
- 51) King CA, Marshall JS, Alshurafa H, Anderson R. (2000) Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J Virol.* **74**, 7146-7150.
- 52) Malasit P. (1987) Complement and dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *SE Asian J. Trop. Med. Public Health.* **18**, 316-320.
- 53) Kurane I, Ennis FE. (1992) Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol.* **4**, 121-127.
- 54) Kurane I, Ennis FA. (1994) Cytokines and dengue virus infection. *Seminars Virol.* **5**, 443-448.
- 55) Kurane I, Ennis FA (1997) Immunopathogenesis of dengue virus infections. In, *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, ed by Gubler D. J. and Kuno G. pp273-290. CBA International. Oxon UK.
- 56) Bhamarapravati N, Sutee Y. (2000). Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* **18** (Suppl 2), 44-47.