

平成30年杉浦賞論文

### 3. デングウイルスに対するワクチン・治療法開発のための 評価系構築とそれを用いた発症メカニズムの解析

モイメンリン

長崎大学熱帯医学研究所

デングウイルス、ジカウイルスなどのフラビウイルス感染症の流行は世界的に急速に拡大している。2014年にデング熱国内流行が発生し、デング熱対策は国内外においても急務である。世界人口の約1/3がデング熱流行地で生活しているにも関わらず、デング熱に対するワクチンはいまだに実用化されていない。その背景には、①デングウイルスに対する防御免疫が解明されていないこと、②ワクチンの接種によって誘導された抗体が感染増強作用を保有し、症状を悪化させる可能性があること、③適切なモデル動物がないことがあげられる。デングウイルス感染における抗体の役割を明らかにすることによって安全かつ有効なワクチンの開発が可能となる。我々はこれまでに、生体内におけるデングウイルス防御を反映する中和抗体測定法を開発するため、FcγR発現細胞を用いた新規アッセイ法を確立し、感染増強活性および中和活性を同時に測定することが可能となった。さらに、我々は霊長類マーマセツモデルを用いたデングウイルス感染モデルを確立し、本モデルは高ウイルス血症およびヒトにおける病態を反映することから、ワクチン評価モデルとしても有用であることが明らかとなった。

#### 1. はじめに

デングウイルス (DENV) によるデング熱 (DF)・出血熱 (DHF) は、年間世界的に約960万人が発症し、大きな問題となっている感染症である<sup>1)</sup>。さらに、世界人口の1/3が流行地域の熱帯・亜熱帯地域に生活しているにもかかわらずDENVに対するワクチンと抗ウイルス薬がない。デング熱の流行地は、近年急速に拡大しており、この数年間ではウイルスが侵入・土着した地域として亜熱帯地域ネパールと台湾が挙げられる。日本においては近年のデング熱輸入症例数が増加傾向にあり、1999年には輸入症例が9症例であったが、2013年には249症例が報告されている。さらに、2014年には70年ぶりに160人規模のデング熱

2014年の国内流行が発生し、輸入症例数の165症例と合わせた総デング熱症例数は325症例であった<sup>2,3)</sup>。

デングウイルスは、重篤な症状を引き起こす日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルスと同じフラビウイルス属に属する。デングウイルスは、4つの血清型が存在し、いずれの血清型もヒトに感染すると同様の病態を示すため、血清型の鑑別診断は実験室診断が必要である。デングウイルスに感染した場合(約20%–90%)は、不顕性感染であるが、典型的なデング熱(DF)の主症状は高熱、発疹や痛みであり、約1週間後には回復するケースが多い。しかし、致死的なデング出血熱(DHF)は、適切な治療が施されない場合は致死率が約20%である。世界では年間約25,000人のDHF患者が亡くなっている<sup>4-6)</sup>。

デング熱・デング出血熱の発症機序解明はもっとも重要なデング熱の研究課題の一つである。特にデング熱では、感染によって誘導された免疫は感染防御に重要な役割を担っていると同時に、重症化へと導く役割も果たしている。このことから、予防と免疫療法の開発においては、防御免疫を誘導するワクチン開発、ウイルス増幅抑制治療が必要である一方で、生体の免疫状況により相反する効果が生じる可能性もある。

#### 連絡先

〒852-8523  
長崎県長崎市坂本1-12-4  
長崎大学熱帯医学研究所  
TEL: 095-819-7829  
FAX: 095-819-7830  
E-mail: sherry@nagasaki-u.ac.jp

(A) 重症型 Dengue 熱の病態形成に関わるファクターの相対的重要度



(B) 重症型 Dengue 熱の免疫病態

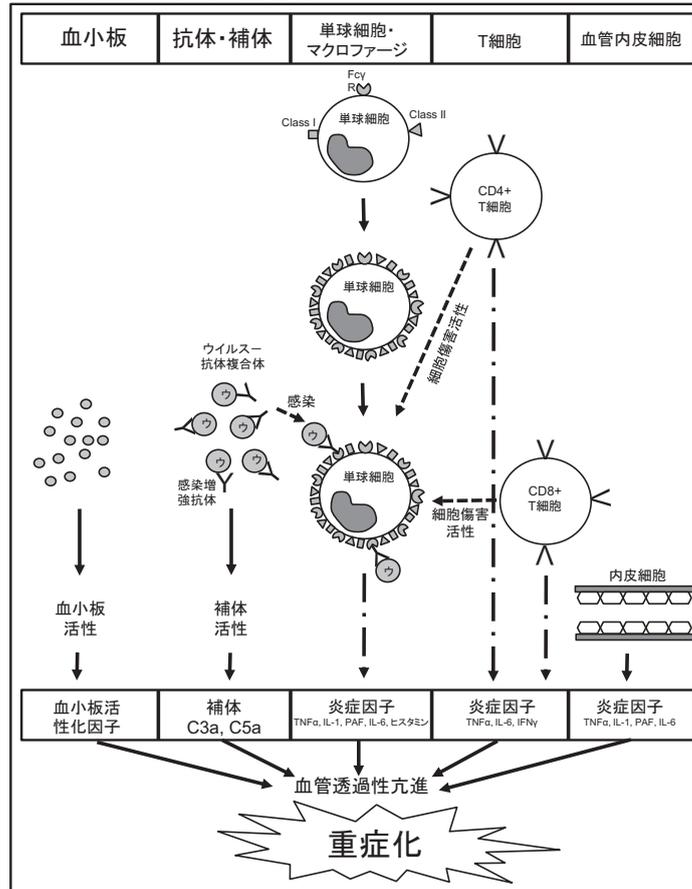


図 1 重症型 Dengue 熱の病態形成に関わるファクター。

ウイルス感染時には、液性免疫、細胞性免疫とも感染されたウイルス血清型のみに対応する「型特異性免疫」、および複数の Dengue ウイルス血清型と交叉反応を示す「型交叉性免疫」が誘導される。ウイルス感染以外にも母子抗体移行によって免疫応答の種類（初感染、再感染）が異なってくる。初感染では、一つの血清型ウイルスに感染されると誘導された免疫 (1) 液性免疫（抗体）、(2) 細胞性免疫（T 細胞など）型特異性および型交叉性の免疫反応が誘導される (A)。一方、初感染において型交叉性免疫はほとんど出現しないため、交叉防御能を有しない。Dengue 熱重症化メカニズムにおいては、抗体や T 細胞などの免疫状況の複数のファクターの相乗効果によって形成されると考えられている (B)。

2. Dengue ウイルス感染症における免疫病態機構

Dengue ウイルスには 4 つの血清型が存在するが、一つの血清型に感染すると同血清型に対する免疫は終生免疫である。他の血清型に対する防御免疫は、初回感染(初感染)数ヵ月後に消失する。そのため、血清型間の交叉性防御免疫が消失した後、初感染と異なる血清型に感染しうる状態となる<sup>7,8)</sup>。多くの Dengue ウイルスの流行地で複数の血清型ウ

イルスが同地域に存在し、数年ごと (2~4 年) に優勢な血清型が入れ替わる。ウイルス感染時には、液性免疫、細胞性免疫とも感染されたウイルス血清型のみに対応する「型特異性免疫」、および複数の Dengue ウイルス血清型と交叉反応を示す「型交叉性免疫」が誘導される。ウイルス感染以外にも母子抗体移行によって免疫応答の種類(初感染、再感染)が異なってくる。初感染では、一つの血清型ウイルスに感染すると (1) 液性免疫 (抗体)、(2) 細胞性免疫

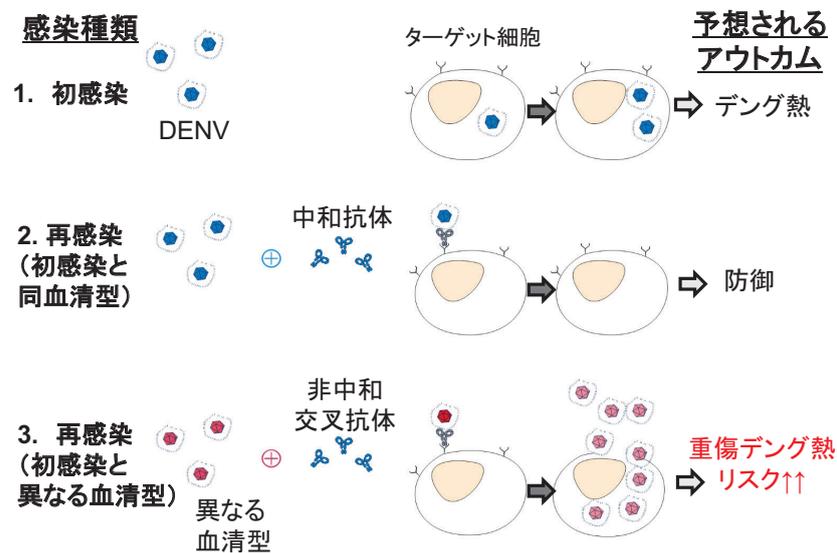


図2 デング熱再感染における重症化メカニズム—抗体依存性感染増強現象による重症化.

初感染において型交叉性免疫はほとんど出現しないため、防御能を有しない。デングウイルス感染で誘導された抗体は全てのウイルス血清型に対し交叉性を有するが、抗体は(1)中和、(2)感染増強の二つの相反する活性を有するため、中和活性が優位の場合は、感染防御が成立すると考えられてきた。

(T細胞など)型特異性および型交叉性の免疫反応が誘導しうる(図1)。しかし、初感染において型交叉性免疫はほとんど出現しないため、防御能を有しない。再感染後では2つの血清型ウイルスの感染によって誘導された免疫は、複数の血清型に対する交叉性防御免疫がみられるため、3度目の感染は稀であると考えられている。

重症型のデング熱(DHF, DSS)を発症した患者の多くは異なる血清型ウイルスの感染による2度目の感染であることから、免疫が病態と関与する説が提起されてきた(図2)。東南アジアや南米では、デング出血熱は小児にみられることが多い。タイでは、1歳未満のデング出血熱の初感染患者においては感染前に抗デングウイルス抗体を有していた患者が多く、デングウイルス抗体を有する母親から生まれた小児であった。1歳未満の小児においては、時間の経過とともに母子移行抗体の中和レベルが低下し、中和能が消失することによって感染防御が成立しないことが考えられる。通常、デングウイルス感染で誘導された抗体は全てのウイルス血清型に対し交叉性を有するが、抗体は(1)中和、(2)感染増強の二つの相反する活性を有するため、中和活性が優位の場合は、感染防御が成立すると考えられてきた。

### 2-1. 抗体感染増強活性を含まれた中和抗体価の測定：FcγR発現細胞を用いた新規中和アッセイの確立

デングウイルス感染の防御は主として中和抗体によってなされると考えられている。また、抗体のデングウイルスに対する中和能は、通常プラーク減少法を用いてVero細胞等FcγR非発現細胞にて測定されている。しかし、プラーク

減少法にて高い中和活性が検出されたにも関わらずデングウイルスに感染した患者が存在するという報告がある<sup>9,10</sup>。従来のプラーク減少法は、FcγR非発現細胞において中和活性を検出することは可能だが、デングウイルスの感染標的細胞であるmonocyte/macrophage等FcγR発現細胞に対する感染増強能を同時に検出することは困難である。そこで、我々はプラークの形成能を有するBHK細胞にFcγRを恒常的に発現させ、感染増強活性(antibody-dependent enhancement, ADE)と中和能を総合的に測定する方法(新中和アッセイ法)を確立した<sup>11,12</sup>。さらに、FcγR発現細胞を用いたプラーク法にて初感染および再感染患者血清における患者血清中の中和能を測定したところ、FcγR発現BHK細胞を用いた中和抗体価は非発現細胞を用いた場合よりも低く、感染増強活性は抗体の中和能を低下させることが示唆された<sup>13</sup>。これらの結果により、確立したFcγR発現細胞を用いた中和試験は、感染増強活性と中和活性を合わせた生物学的に意義のある抗体価の測定が可能であることが示唆された。

その一方、デングウイルス流行地であるマレーシアおよびベトナム患者血清を本アッセイにて検討したところ、その多くはADE活性を有し、非FcγR発現細胞による測定された中和抗体価はFcγR発現細胞より中和能が高い。その中、再感染のDENV-1患者においてDENV-1に対し、非FcγR中発現細胞では、中和抗体(DENV-1 PRNT50 = 1:10-1:80)が検出された一方、FcγR発現細胞をアッセイ細胞として用いたところ、DENV-1中和抗体が検出されなかった(表1)<sup>13</sup>。さらに、デング熱流行期後のベトナムの健常者においては、抗体価の上昇が認められたが、流行

表1. FcγR 発現細胞を用いた中和アッセイにて測定されたデング熱患者の中和抗体価は BHK 細胞より低い。

急性期検体	患者 ID	DENV 中和抗体価 (PRNT <sub>50</sub> )							
		BHK 細胞				FcγR 発現 BHK 細胞			
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
感染ウイルス 血清型 (DENV-1)	46	80	40	20	20	<10	10	<10	<10
	47	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	48	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	49	10	1280	<10	<10	<10	160	<10	<10
	56	10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	57	<10	40	<10	<10	<10	40	<10	<10
	58	<10	320	<10	<10	<10	10	<10	<10

<sup>1</sup> 文献 [13] より抜粋。

期前の中和活性は患者より高いことと、相対的に感染増強活性が低いことから、感染増強活性による中和活性の相殺は、中和抗体の防御作用を低減させることが示唆された<sup>14)</sup>。

## 2.2. DENV 交叉抗体における感染増強活性

デングウイルス感染の重症化の要因の一つは抗体依存性感染増強 (ADE) 現象による抗体ウイルス複合体を含む高ウイルス血症と考えている。定量 PCR 及び FcγR を有しない細胞を用いた従来のウイルス定量法 (ブランクアッセイ) は、抗体-ウイルス複合体の感染能が反映されていないため、再感染時における感染増強抗体-ウイルス複合体による感染性ウイルス量の測定が困難である。しかし、FcγR 発現細胞を用いたところ、第 1 病日から第 5 病日までの患者血清におけるウイルス血症は、FcγR を有しない細胞を用いた場合より約 10 倍高かった (図 3A)。さらに、ウイルス血症も約 1 日長く継続した。同様な現象は、初感染では観察されなかった。これらの結果により FcγR 発現細胞では、再感染患者血清において ADE 活性を合わせたウイルス力価が測定できることが明らかとなった<sup>15)</sup>。すなわち感染能を有する抗体ウイルス複合体が再感染患者血清に存在することが示唆された。

非希釈検体を用いた ADE 試験では、再感染患者においては感染増強活性が検出されたが、活性のレベルはウイルス株により異なる<sup>16)</sup>。一方、マームセットを用いた in vivo 実験では、この中和活性は感染時期及びウイルス株により影響を受けることから<sup>17)</sup>。再感染における感染増強活性や免疫誘導は、感染時期およびウイルス株が重症化及び防御に関与していることが示唆された。

## 3. ワクチン開発における問題点

免疫状況によって症状が重症化する可能性があることから、ワクチン実用化には、4 つの血清型それぞれに対する十分な防御能を誘導するワクチンが必要である。近年、世界初となる 4 価ワクチン防御効力試験では、中和抗体が認められた被験者において重傷デング熱患者が発生した<sup>18-20)</sup>。さ

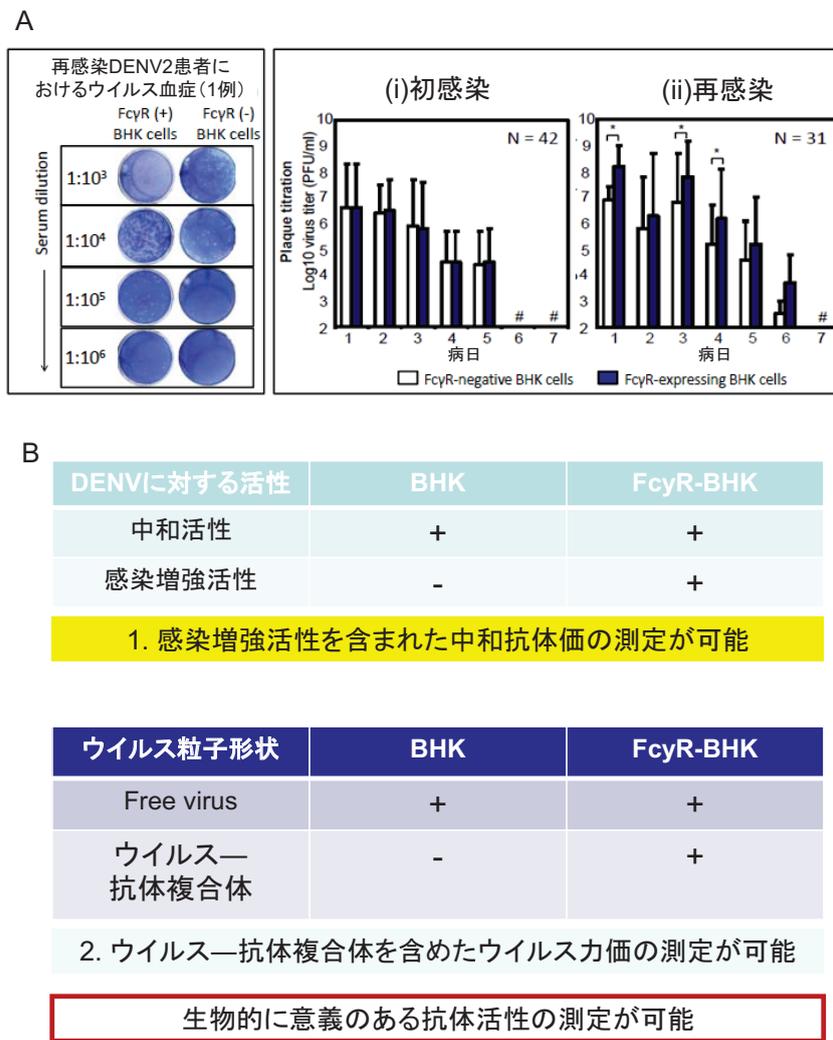
らに、デング熱ワクチンを導入されたフィリピンにおいても、重症デング熱症例・死亡事件が発生、ワクチンプログラム中止等の混乱を招いた<sup>21,22)</sup>。また、抗体陰性者がワクチン接種を受けることにより重症デング熱を発症するリスクが認められたため、WHO はデング熱の既往が確認された者のみにワクチン接種を行うことを推奨している<sup>23)</sup>。ワクチン接種による重症リスクの増悪原因は明らかとなっていないが、その背景にはワクチンの有効・安全性評価のための防御マーカーおよび適切なモデル生物が欠如していることが考えられる。

### 3.1. FcγR 発現細胞を用いた中和アッセイの有用性

現在広く用いられている中和試験法では、中和能のみを測定し、感染増強効果を反映させた中和能の測定が不可能である。我々の研究グループは、すでに 2013 年に Vero 細胞など FcγR のない細胞を用いた通常ブランク減少法 (PRNT 法) を用いて測定された中和抗体価は、感染増強活性を含んだ中和抗体価の測定が困難であること、ワクチンの有効性評価には FcγR を有する細胞が有用であることを提唱した<sup>25)</sup>。このアッセイの特徴は本稿の前半にも述べたが、FcγR 発現細胞を用いたアッセイ系は、「感染増強」および「感染防御」という相反する現象の相互作用の解析が可能である<sup>13,25)</sup>。感染増強活性を有する抗体が重症化に関与することのみならず、抗体の中和活性を相殺する作用を有することから、デング熱ワクチンの実用化には抗体の防御レベルを明らかにする必要がある。これに関連し、すべての 4 つ血清型に対し高いレベルの中和抗体を誘導可能なワクチンの開発には、ワクチンによって誘導された抗体による「感染増強」および「感染防御」という相反する現象の相互作用を明らかにすることが重要と考えている。

### 3.2. 新世界ザルマームセットを用いたデングウイルス感染モデル

デング熱ワクチンが開発困難なもう一つの理由は、適切



**図 3 FcγR 発現細胞を用いた新規中和アッセイの確立.**

従来のプラーク減少法は、FcγR 非発現細胞 (BHK 細胞) において中和活性を検出することは可能だが、デングウイルスの感染標的細胞である monocyte 等 FcγR 発現細胞に対する感染増強能を同時に検出することは困難である。FcγR 発現細胞を用いたプラーク法にて初感染および再感染患者血清における患者血清中の中和能を測定したところ、FcγR 発現 BHK 細胞を用いた中和抗体価は非発現細胞を用いた場合よりも低く、感染増強活性は抗体の中和能を低下させることが示唆された (A)。これらの結果により、確立した FcγR 発現細胞を用いた中和試験は、感染増強活性と中和活性を合わせた生物的に意義のある抗体価の測定が可能であることが示唆された (B)。

なモデル動物がないことである。一般的に、カニクイサル、アカゲザルなどの霊長類が病態解明研究とワクチン開発研究に用いられている。実験的にデングウイルスに感染された霊長類は、高ウイルス血症と症状 (発熱、生化学的な変化など) を呈しないため、ワクチン評価系としての活用は困難である。ここで我々の研究グループは、デング熱の霊長類マウスモデルを確立し、感染モデル及びワクチンの有効性評価モデルとしての有用性を検討した<sup>26-28)</sup>。本モデルは、初感染・再感染時にヒト DENV 感染と同様な症状 (高ウイルス血症、血小板・白血球減少症) を呈し、モデルにおける抗 DENV 抗体の上昇パターンもデング熱患者およびワクチン治療でみられる抗体上昇パターンと類

似する (表 2)<sup>28,29)</sup>。さらに、FcγR 発現細胞を用いた新規中和試験では、マウスモデルはデング熱患者と同様にウイルス—抗体複合体が血中に形成されることが明らかとなった<sup>29)</sup>。以上のデータからはマウスモデルはワクチン開発の霊長類モデルとして有用であることが示唆されたが、今後は発症メカニズム解明や治療法・ワクチン開発のモデル動物としての応用を期待している。

**4. おわりに**

デングウイルス、ジカウイルスなどのフラビウイルス感染症には、これまでに適切なモデル生物はなく、発症機序の解明や有効な予防法の開発の遅れの原因の一つである。

表2. マーモセットモデルにおける症状及び免疫誘導パターン

	患者	マーモセット
<b>(I) 症状</b>		
(1) 極期のウイルス血症	1x10 <sup>6</sup> -1x10 <sup>8</sup> GC/ml	1x10 <sup>4</sup> -1x10 <sup>7</sup> GC/ml
(2) 発疹	+	+
(3) AST・ALTの上昇	+	+
(4) 白血球・血小板減少症	+	+
(5) ウイルス-抗体複合体	+	+
<b>(II) 免疫反応</b>		
(1) DENV IgM・IgG 誘導	+	+
(2) ウイルス特異的中和抗体	+	+

デング熱・出血熱の病態は、免疫状況、遺伝子背景、ウイルスの毒性など複数のファクターの相乗効果によって形成されている。このように感染免疫機構を明らかにすることは、重症型デング熱の病態解明と同時に、デング熱ワクチン実用化への大きな要因となる。ワクチン開発において、防御マーカーを明らかにすることが重要である。我々はこれまでにFcγR発現細胞を用いた中和アッセイを確立し、このアッセイ系は「感染増強活性」と「中和活性」の活性を総合的に測定可能であったことが示唆された。今後は、このアッセイ系を応用し防御における中和抗体価の数値化および防御に関わる特徴的なマーカーを明示化について検討していきたい。また、デング熱ワクチンの評価系として、マーモセットを用いたモデル動物を確立しており、本モデルを用いて「ワクチン・治療法の開発」への応用研究にも取り組んでいる。東南アジアなどではデング熱などの蚊媒介感染症は公衆衛生上において深刻な問題であり、早急に安全、有効かつ安価なワクチンの実用化が重要であると考えている。デング熱の対策研究を促進するためにも、こうした技術を用いて、防御マーカーの明視化、発症メカニズム解明やワクチン・治療法開発に応用していきたい。

#### 謝辞

これまでに長崎大学熱帯医学研究所・森田公一所长、国立感染症研究所・倉根一郎先生、神奈川衛生研究所・高崎智彦所长および当研究所のスタッフや学生の方々、多くの共同研究者のご指導とご協力を賜り深く感謝しております。また杉浦奨励賞にご推薦くださいました森田公一先生、倉根一郎先生、高崎智彦先生、本研究をご評価いただきました日本ウイルス学会の先生方に厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496 (7446):504-7.
- 2) Kutsuna S, Kato Y, Moi ML, Kotaki A, Ota M, Shinohara K, Kobayashi T, Yamamoto K, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N. Dengue fever, Tokyo, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, in press, 2014.
- 3) 国立感染症研究所. 日本の輸入デング熱症例の動向について. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/dengue-imported.html>
- 4) WHO: Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, Geneva, 2009.
- 5) Dengue and dengue hemorrhagic fever. Ed. Duane J. Gubler, Goro Kuno, CABI, First Edition, 1997.
- 6) WHO: Global strategy for dengue prevention and control, 2012-2020. World Health Organization, Geneva, 2009.
- 7) Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, Balmaseda A, Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017 Nov 17;358(6365):929-932.
- 8) Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 2013 Jul;158(7):1445-59.
- 9) Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000

- Jan;181(1):2-9.
- 10) Anderson KB, Gibbons RV, Cummings DA, Nisalak A, Green S, Libraty DH, Jarman RG, Srikiatkachorn A, Mammen MP, Darunee B, Yoon IK, Endy TP. A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. *J Infect Dis*. 2014 Feb 1;209(3):360-8.
  - 11) Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing Fc gammaRIIA. *J Virol Methods*. 2010 Feb;163(2):205-9.
  - 12) Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Discrepancy in dengue virus neutralizing antibody titers between plaque reduction neutralizing tests with Fc gamma receptor (Fc gamma R)-negative and Fc gamma R-expressing BHK-21 cells. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Mar;17(3):402-7.
  - 13) Moi ML, Lim CK, Chua KB, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using Fc gamma R-expressing cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2),e1536, 2011.
  - 14) Ly MHP, Moi ML, Vu TBH, Tun MMN, Saunders T, Nguyen CN, Nguyen AKT, Nguyen HM, Dao TH, Pham DQ, Nguyen TTT, Le TQM, Hasebe F, Morita K. Dengue virus infection-enhancement activity in neutralizing antibodies of healthy adults before dengue season as determined by using Fc gamma R-expressing cells. *BMC Infect Dis*. 2018 Jan 10;18(1):31.
  - 15) Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc gamma R-expressing BHK-21 cells than Fc gamma R-negative cells in secondary infection but not in primary infection. *J Infect Dis*. 2011 May 15;203(10):1405-14.
  - 16) Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity of undiluted sera obtained from patients with secondary dengue virus infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013 Jan;107(1):51-8.
  - 17) Azami NAM, Moi ML, Ami Y, Suzaki Y, Lim CK, Taniguchi S, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Genotype-specific and cross-reactive neutralizing antibodies induced by dengue virus infection: detection of antibodies with different levels of neutralizing activities against homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 2 in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Virol J*. 2018 Mar 27;15(1):51.
  - 18) Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckenoghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*. 2012;380(9853):1559-67.
  - 19) Sridhar S, Luedtke A, Langevin E, Zhu M, Bonaparte M, Machabert T, Savarino S, Zambrano B, Moureau A, Khromava A, Moodie Z, Westling T, Mascareñas C, Frago C, Cortés M, Chansinghakul D, Noriega F, Bouckenoghe A, Chen J, Ng SP, Gilbert PB, Gurunathan S, DiazGranados CA. Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *N Engl J Med*. 2018 Jul 26;379(4):327-340.
  - 20) Gailhardou S, Skipetrova A, Dayan GH, Jezorwski J, Saville M, Van der Vliet D, Wartel TA. Safety Overview of a Recombinant Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine: Pooled Analysis of Data from 18 Clinical Trials. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jul 14;10(7):e0004821.
  - 21) Wichmann O, Vannice K, Asturias EJ, de Albuquerque Luna EJ, Longini I, Lopez AL, Smith PG, Tissera H, Yoon IK, Hombach J. Live-attenuated tetravalent dengue vaccines: The needs and challenges of post-licence evaluation of vaccine safety and effectiveness. *Vaccine*. 2017 Oct 9;35(42):5535-5542.
  - 22) Dyer O. Philippines to charge Sanofi staff and government officials over dengue vaccine. *BMJ*. 2019 Mar 7;364:l1088.
  - 23) Valido EM, Laksanawati IS, Utarini A. Acceptability of the dengue vaccination among parents in urban poor communities of Quezon City, Philippines before and after vaccine suspension. *BMC Res Notes*. 2018 Sep 10;11(1):661.
  - 24) WHO: Dengue vaccines: WHO position September 2018. World Health Organization, Geneva, 2018.
  - 25) Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Efficacy of tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren. *Lancet*. 2013 Mar 30;381(9872):1094.(letter to editor)
  - 26) Omatsu T, Moi ML, Takasaki T, Nakamura S, Katakai Y, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Akari H, Kurane I. Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *J Med Primatol*. 2012 Oct;41(5):289-96.
  - 27) Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viraemia and demonstration of protective immunity. *J Gen Virol*. 2011 Oct;92(Pt 10):2272-80.
  - 28) Moi ML, Omatsu T, Hirayama T, Nakamura S, Katakai Y, Yoshida T, Saito A, Tajima S, Ito M, Takasaki T, Akari H, Kurane I. Presence of Viral Genome in Urine and Development of Hematuria and Pathological Changes in Kidneys in Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) after Inoculation with Dengue Virus. *Pathogens*. 2013 May 13;2(2):357-63.
  - 29) Moi ML, Ami Y, Shirai K, Lim CK, Suzaki Y, Saito Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Formation of infectious dengue virus-antibody immune complex in vivo in marmosets (*Callithrix jacchus*) after passive transfer of anti-dengue virus monoclonal antibodies and infection with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Feb;92(2):370-6.
  - 30) Moi ML, Ami Y, Muhammad Azami NA, Shirai K, Yok-

san S, Suzaki Y, Kitaura K, Lim CK, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for evaluation of candi-

date dengue vaccines: induction and maintenance of specific protective immunity against challenges with clinical isolates. *J Gen Virol.* 2017 Dec;98(12):2955-2967.

## Development of *in-vitro* and *in-vivo* assays for dengue vaccine and therapeutics evaluation, and pathogenesis studies

MOI MENG LING

Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

Antibodies are considered central in the protective immunity to dengue and other flaviviruses. While Japanese encephalitis virus and yellow fever virus vaccines are available for more than half a century, there remains a need for the development of an effective dengue vaccine. An effective dengue vaccine should ideally elicit protective immunity against all four dengue virus serotypes. Cross-reactive antibodies play a competing role in dengue: high levels of neutralizing antibodies are associated with disease protection whereas non-neutralizing cross-reactive antibodies are associated with enhanced clinical presentation. During secondary infection, these cross-reactive, non-neutralizing antibodies are hypothesized to enhance virus infection of the Fcγ receptor (FcγR) bearing cells. In a series of experiments, (1) an *in-vitro* assay using FcγR-expressing BHK cells as assay cells and (2) a non-human primate (NHP) model using marmosets was developed to determine the levels of neutralizing antibodies that contribute to disease pathogenesis and protection. This study has several implications; (1) non-neutralizing, infection-enhancing activity hampers flavivirus neutralizing activity, contributing to an immune profile that fails to offer protection, (2) during secondary flavivirus infection, non-neutralizing antibodies form infectious virus-immune complexes, leading to higher infectivity of virus target cell *in vivo*, the FcγR-bearing cells, and (3) in comparison to conventional neutralizing assays, assays using the FcγR-expressing cells may better reflect the biological properties of antibodies *in vivo*. The results also suggest that common marmosets could be a reliable primate model for the evaluation of candidate vaccines.