

デング熱に対する4価弱毒生ワクチン開発に  
関する非臨床基礎研究

令和6年  
(2024)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科

吉村 昌也

Non-clinical basic studies on the development of tetravalent  
live attenuated vaccine against dengue fever

2 0 2 4

YOSHIMURA Masaya

Graduate School of  
Animal and Veterinary Sciences and Agriculture  
Obihiro University of  
Agriculture and Veterinary Medicine

## 目次

略語・定義	1
背景	3
目的	9
<b>第1章 デング熱に対する弱毒生ワクチン候補株の作製及び組み合わせの選定</b>	<b>10</b>
1-1 緒論	10
1-2 材料及び方法	11
1-2-1 ウイルス	11
1-2-2 ワクチン候補株の作出	11
1-2-3 動物試験概要	12
1-2-4 使用動物及び動物倫理	13
1-2-5 中和抗体価測定	14
1-2-6 RNAemia level 測定	15
1-2-7 親株及び候補株 A のディープシーケンシング	16
1-3 結果	17
1-3-1 親株とワクチン候補株間のアミノ酸相違の同定	17
1-3-2 中和抗体価	18
1-3-3 RNAemia level	19
1-4 小括	21
1-5 図表	23
<b>第2章 4 価弱毒生デング熱ワクチンの用量検討及び防御能確認</b>	<b>30</b>
2-1 緒論	30
2-2 材料及び方法	30
2-2-1 ワクチン及びウイルス	30
2-2-2 動物試験概要	31
2-2-3 中和抗体価測定	31
2-2-4 RNAemia level 測定	32
2-2-5 使用動物及び動物倫理	32
2-3 結果	32
2-3-1 中和抗体価	32
2-3-2 RNAemia level	33
2-4 小括	34
2-5 図表	36
<b>第3章 TDV の投与回数 の検討及び免疫持続性確認</b>	<b>39</b>
3-1 緒論	39

3-2 材料及び方法	39
3-2-1 ワクチン及びウイルス	39
3-2-2 動物試験概要	39
3-2-3 中和抗体価測定	40
3-2-4 RNAemia level 測定試験	41
3-2-5 使用動物及び動物倫理	41
3-2-6 統計分析	42
3-3 結果	43
3-3-1 中和抗体価	43
3-3-2 RNAemia level	44
3-4 小括	45
3-5 図表	47
<b>第4章 被験動物の免疫状態と TDV の有効性に関する検証</b>	<b>51</b>
4-1 緒論	51
4-2 材料及び方法	51
4-2-1 ワクチン及びウイルス	51
4-2-2 動物試験概要	51
4-2-3 中和抗体価測定	52
4-2-4 RNAemia level 測定	52
4-2-5 使用動物及び動物倫理	52
4-3 結果	53
4-3-1 中和抗体価	53
4-3-2 RNAemia level	54
4-4 小括	55
4-5 図表	57
<b>結言</b>	<b>62</b>
研究のまとめ	62
今後の課題	64
<b>Summary</b>	<b>67</b>
謝辞	71
参考文献	72

## 略語・定義

ADE	Antibody Dependent Enhancement (抗体依存性増強)
C	Capsid (カプシド)
DENV	Dengue Virus (デングウイルス)
DHF	Dengue Hemorrhagic Fever (デング出血熱)
DSS	Dengue Shock Syndrome (デング熱に起因するショック症状)
E	Envelope (エンベロップ)
FFU	Focus Forming Unit (フォーカス形成単位)
FRNT <sub>50</sub>	50% Focus Reduction Neutralization Titer (中和抗体価測定系で50%のウイルスを中和する血清希釈倍率)
GEq	Genome Equivalent quantity (ゲノム相当量)
PDK	Primary Dog Kidney (イヌ初代腎臓)
PFU	Plaque Forming Unit (プラーク形成単位)
PGMK	Primary Green Monkey Kidney (ミドリザル初代腎臓)
prM	Pre-Membrane (プレメンブレン)
RNAemia	Viral RNA in Blood (ウイルス RNA 血症：血中ウイルスゲノムが検出される状態)
RNAemia level	Level of Viral RNA in Blood (血中ウイルスゲノムが検出され

る程度)

TDV                      Tetravalent Dengue Vaccine (4価 Dengue 熱ワクチン)

WHO                     World Health Organization (世界保健機関)

## 緒言

### 背景

デング熱は、急激な発熱、発疹、嘔吐、頭痛などの症状を呈し、重篤化すると死に至る可能性もあるウイルス感染症である。本疾病は蚊媒介性のウイルス感染症であり、熱帯地域及び亜熱帯地域の都市部を中心に世界中で発生しており、感染率とその地理的範囲は拡大傾向にある [1, 2]。感染のリスクは世界人口の約半数にあり、年間1億から4億人が感染していると推定されている [3-6]。2019年に世界保健機関 (World Health Organization: WHO) がより良い健康と福祉を確保することを目的に、対応すべき健康課題として挙げた「グローバルヘルスに対する10の脅威」の中にもデング熱が挙げられており [7]、後天性免疫不全症候群、結核、マラリアといった世界三大感染症に次ぐ注視すべき感染症であるといえる。2009年にWHOが発表した症例報告件数は1960年代初頭と比較して約30倍に増加しており、100箇国を超える流行地域において医療費増大等の経済的負担が深刻となっている [8-10]。感染拡大傾向の要因として、商業や観光等を目的とした物理的なヒトの移動や、急速な都市化に追いつかない不十分な下水処理システム及び媒介節足動物である蚊のコントロール不足が挙げられる [2, 11-13]。デング熱の原因となるデングウイルス (Dengue virus: DENV) を媒介する蚊は、アフリカを起源に持つネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) が主であるとされている。ネッタイシマカは、住居内で生活しヒトからの吸血を好むため、黄熱ウイルスやDENVを

効率的に媒介する [1]。本節足動物は、日本ではかつて小笠原諸島や沖縄県で観察されたが現在は土着していないとされている。一方で、1942年にマレーシアからの貨物船の乗組員を介して長崎県において23,000人以上のヒトが発症したデング熱症例も報告されており [14]、日本においても継続的な警戒が必要である。また、日本の本州全域に土着しているヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) も DENV を媒介することが知られており [15]、2014年に東京都代々木公園を中心としたデング熱国内感染事例においてもヒトスジシマカが媒介したのではないかと推測されている [16]。

デング熱は不顕性感染が多く、感染したほとんどのヒトで、症状がないか軽微な症状を呈する。DENVに感染した蚊に刺された約1週間後に発症し、「発熱期」、「重篤化期」、「回復期」に大別される過程をたどる [8]。「発熱期」は通常3~7日間続き、頭痛、吐き気、筋肉痛、及び関節痛を伴う39~40°Cの発熱を呈する [17-20]。重篤化した場合、血管透過性亢進による血漿漏出を起因とするショック症状 (Dengue shock syndrome: DSS) や、止血異常や出血異常を呈するデング出血熱 (Dengue hemorrhagic fever: DHF) と称される病態となり、死に至る場合がある [21, 22]。重篤化傾向は成人と比較して子供で高い傾向にあることが多数報告されている [23-26]。「重篤化期」に補液等の対症療法を施せば通常2~3日のうちに「回復期」に移行する。子供では短期間に回復するが、成人では倦怠感や無気力症を伴い回復までの期間が長引くことがある。また、「発熱期」から「回復期」にかけてデング熱特有の発疹が頻繁に発現する [27]。

DENV は、フラビウイルス科オルトフラビウイルス属に属するエンベロープウイルスである [28]。同じ属には黄熱ウイルスや日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスなどがあり、これらのウイルスは節足動物が媒介するためアルボウイルスに属する。DENV は 1 本鎖プラス鎖 RNA ゲノムを持ち、3 つの構造タンパク質をコードする遺伝子 (Capsid: C, pre-Membrane: prM, Envelope: E) と 7 つの非構造タンパク質をコードする遺伝子 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) から成る [29]。構造タンパク質のうち、C タンパク質はウイルス骨格の形成に関与する。prM タンパク質は未成熟ウイルスの表面に存在し、感染細胞からの放出時にフーリンによって切断され M タンパク質となり、その結果ウイルスは感染性を有するようになる。E タンパク質は細胞への侵入に関与する DENV の主要抗原タンパク質であり、後述する血清型の決定に大きく関係している。DENV は蚊の吸血により生体内に侵入し、皮膚の上皮細胞やランゲルハンス細胞、マスト細胞といった皮膚常在細胞で増殖した後、単球やマクロファージなどの血球細胞を標的細胞として感染する。その後、血管やリンパ管などを介して感染細胞が全身を巡り、指向性を示す肝臓や脾臓、リンパ節などの諸臓器にも到達することが報告されている [30]。ウイルスはエンドサイトーシスを介して細胞に感染し、細胞質内でウイルス RNA を複製後、小胞体内でエンベロープに格納されゴルジ体から成熟ビリオンが分泌される [31]。

DENV の大きな特徴の一つとして、4 つの血清型 (DENV1~4) を持つことが挙げら

れる。いずれの血清型もヒトへの病原性に差はなく [32], 4つの血清型のウイルス全てがマレー半島を起源に霊長類と蚊の間に生活環を形成してきたとされている [33]。各血清型の DENV はアミノ酸レベルで相同性は 60~70%程度と報告されているが [32], いくつかの免疫原性に関するエピトープは共通しており, 1つの血清型に感染した場合, その血清型に対する特異的な免疫とともに他の血清型に対する交差的な免疫が誘導される [34, 35]。一般的な感染症に対する免疫応答と同様に, 熱発から 5~6 日後に DENV に対する IgM が産生されはじめ 2~3 箇月間持続する一方, IgM 誘導から数日後に IgG も産生され始める。これら免疫応答のうち, 感染した血清型に対する「型特異的」な免疫は終生免疫であるとされているが, 他の血清型に対する「交差反応性」抗体は徐々に減衰すると報告されている [36]。再感染時に他の血清型に感染した場合は, 複数の血清型に対する「交差反応性」防御免疫が成立するとされるため, 3 度目の感染は稀であると考えられている。上述の DSS や DHF といった重症事例は, 異なる血清型の DENV による 2 度目の感染であることが多い [37]。これは, 初回感染時に誘導された「交差反応性」抗体が異なる血清型の DENV 感染時にリスク因子として働いたことに関連するとされている。この現象は抗体依存性増強 (Antibody dependent enhancement: ADE) と称され, DENV だけでなく RS ウイルスや猫伝染性腹膜炎ウイルスなどのウイルスでも引き起こされる [38, 39]。通常, DENV と中和抗体の複合体は, Fc $\gamma$  レセプターを介して食細胞や樹状細胞に取り込まれることにより, 抗原提示を受けた T 細胞

の活性化によって排除される。一方、DENV 感染における ADE は、中和能が弱いまたは中和能を欠く抗体が DENV と結合し、Fc $\gamma$  レセプターを介した食細胞や樹状細胞への侵入を機に効率的にウイルスが増殖してしまうことによって生じると考えられている [40, 41]。ADE を介したウイルスの増殖や、それに伴う炎症性サイトカインの過剰分泌や血小板減少症が起因となり、血管透過性の亢進や播種性血管内凝固症候群が引き起こされ重篤化に繋がる [21, 42]。重症化例は 2 歳未満の乳幼児にも頻繁に認められ、これは母体からの移行抗体が ADE に関与しているのではないかと考えられている [43, 44]。

2024 年現在、デング熱に対する特異的な治療法はなく、解熱鎮痛剤による対症療法が主に行われる。重篤化した患者は入院が必要となり、補液などの処置がされている。媒介節足動物である蚊の撲滅も事実上困難であることから、他のアルボウイルスへの対策と同様に、100 年近くの年月をかけてデング熱ワクチンの開発が世界中で実施されてきた [45]。上述の ADE の問題を解決するため、4 つすべての血清型に対する抗体を誘導すべく 4 価デング熱ワクチン (Tetravalent dengue vaccine: TDV) の開発が実施され、2024 年現在、2015 年に承認された Sanofi Pasteur 社 (Lyon, France) が販売する Dengvaxia と 2022 年に承認された武田薬品工業株式会社 (東京, 日本) が販売する QDENGGA が使用可能である [46]。Dengvaxia は黄熱病ワクチンのワクチン株である YF-17D 株を骨格とし、prM と E を各血清型の DENV の配列に置換した 4 価の遺伝子

組換え生ワクチンである。このワクチンは第3相臨床試験において、9歳以上の患者に対し65.6%の有効性が立証された [47]。しかしながら、長期的な追跡試験の結果、誘導された抗体がワクチン最終投与後3年日以降に減衰していくことが判明し、また、2～5歳のグループにおいて入院リスクの増加が認められた [48, 49]。このリスクは9歳以上のグループでは認められなかったことから、Dengvaxiaの接種は9～45歳の既往歴があるヒトまたは流行地域の中にいるヒトにのみ推奨されることとなった [50]。

QDENG Aは、DENV2のPDK53-V株に加え、PDK53-V株骨格のprM及びEの領域をそれぞれDENV1, 3, 4の遺伝子配列と置換した3種の遺伝子組換えウイルスを含む4価の生ワクチンであり、4～60歳のヒトに対して接種可能なワクチンとなっている [51]。このワクチンは、非臨床試験の段階から組成の骨格となるDENV2に対する中和抗体誘導能が高い一方で、DENV3, 4に対する中和抗体誘導能が低い傾向にあった [52]。

臨床試験においても、DENV3, 4に対する有効性が特に既往歴の無い被験者において低い結果を示している [53]。DENV3に対するワクチンの有効性の低さについては、臨床試験実施地域におけるDENV3症例数の少なさに起因すると考察されているが、既往歴がないヒトにおける入院リスクの増加がないことを確認するために長期的な調査分析が必要である。

## 目的

背景に記載した通り、デング熱に対するワクチンは上市されているものの重症化例の多い2歳未満の乳幼児に接種可能なワクチンは未だ存在していない。また、Dengvaxiaは3回接種、QDENGGAは2回接種を必須としたワクチンプログラムとなっているが、接種スケジュールの簡略化、短縮化が望まれている。このような現状の中、筆者はADEを回避可能で、被接種者のDENV感染経歴に関係なく接種することができ、かつ効果の高いデング熱ワクチンの開発が望まれていると考えた。そこで筆者は、乳幼児に接種されるBCGワクチンやMR（麻疹・風疹）ワクチン等と同様の製法による遺伝子組換えでない弱毒生ワクチンの有用性に着目し、デング熱ワクチン開発を試みた。

即ち、第1章においては、弱毒生ワクチン候補株を作製し、その4価の組み合わせを選定した。

第2章では、動物試験により、第1章で選定した4価弱毒生ワクチンの用量選定を試みた。

第3章では、第1章から第2章にかけて確認された組成及び用量の4価弱毒生ワクチンを用いて、動物試験により、その免疫応答の持続性及び防御能を評価した。

最後に第4章において、このワクチンがデング流行地域で接種されることを想定し、動物試験により、DENV感染歴がワクチン応答に影響を及ぼさないかを評価した。

## 第1章 デング熱に対する弱毒生ワクチン候補株の作製及び組み合わせの選定

### 1-1 緒論

デング熱ワクチンの開発における障壁の1つに、各血清型 DENV のワクチン株及び用量の選定が容易ではないことが挙げられる。緒言で述べた通り、DENV は初回感染時と異なる血清型の感染により重篤化が懸念されるウイルスである。ウイルス感染時に防御的に働くべきワクチンによって誘導される抗体が、その感染を増悪させることはあってはならない。そのため、同時に4つの血清型に対して中和能を有する抗体を誘導可能な4価ワクチンの作出が必須となる。一方で、単価で投与した場合に高い中和抗体を誘導可能であっても、4価混合して投与すると各血清型の DENV に対する中和抗体レベルが均一とならないケースが認められることがあり、これは他の混合ワクチンでも起こり得る干渉作用による現象である [54, 55]。マヒドン大学 (Bangkok, Thailand) と Sanofi Pasteur 社が 1990 年代に共同で開発していたデング熱弱毒生ワクチン (以下、マヒドン大学のデング熱ワクチン) は、単価及び DENV1, 2, 4 混合の3価ワクチンでは良好な免疫原性を示していた。一方、DENV3 を加えた4価ワクチンとすると、干渉作用が認められ DENV3 以外の血清型に対する中和抗体価の低下が認められたことから [56]、開発が断念されている。そこで筆者の研究グループはマヒドン大学のデング熱ワクチンをベースとした新たな弱毒生ワクチンの開発を目的とし、DENV3 株の改良を中心としたワクチン候補株を作製してきた。本研究では、同時に4つの血清型に対し

て中和能を有する抗体を誘導可能なことに加え、より弱毒化されて安全性が高まっていること、即ち惹起される血中ウイルスゲノムが検出される状態（RNAemia）の程度（RNAemia level）が親株と比較して低値を示すことを選定の基準とし、作製した各血清型の候補株の組み合わせと用量についてカニクイザルを用いた試験で検証した。

## 1-2 材料及び方法

### 1-2-1 ウイルス

ワクチン候補株作出の基となる臨床分離株を親株とした。DENV1 の親株には 2003 年にタイ王国で 7 歳齢のデング熱患者から分離された 03135 株を使用した。DENV2 の親株には 1999 年にタイ王国で 10 歳齢の DHF 患者から分離された 99345 株を使用した。DENV3 の親株には 1964 年にフィリピンで DHF 患者から分離された 16562 株を使用した。DENV4 の親株には 1976 年にインドネシアでデング熱患者から分離された 1036 株を使用した。各血清型の親株はマヒドン大学から化学及血清療法研究所（現、KM バイオロジクス株式会社、熊本、日本）に分与された。

### 1-2-2 ワクチン候補株の作出

ワクチン候補株の作出は、各血清型の親株 DENV をヒト以外の動物細胞で複数代継代することにより、ヒトへの病原性を減弱させる方法を用いた。DENV1, DENV2, 及

び DENV4 の親株は、イヌ初代腎臓 (Primary dog kidney: PDK) 細胞にて複数回継代した。PDK 細胞はオランダ国立公衆衛生環境研究所 (Utrecht, the Netherlands) にて 6~9 週の SPF ビーグル犬の腎臓から作出され、分与されたものを使用した。DENV3 の親株は、ミドリザル初代腎臓 (Primary green monkey kidney: PGMK) 細胞での複数回継代の後に更に PDK 細胞で継代した。PGMK 細胞は、ハワイ大学 (Honolulu, HI) にて 2 匹の成熟したアフリカミドリザルの腎臓より作出され、分与されたものを使用した。

DENV1 については、PDK 細胞での複数回継代の後に、Vero 細胞 (ATCC, Manassas, VA, cell no. CCL-81) による継代を追加で実施し、1 種類の候補株を作出した。DENV2, 3, 4 については PDK 細胞での継代数によりそれぞれ 2 種類の候補株 (候補株 A, B) を作出した。ワクチン候補株の作出はマヒドン大学で実施され、化学及血清療法研究所 (現、KM バイオロジクス株式会社) に分与された。継代歴の詳細について表 1-1 に示す。

### 1-2-3 動物試験概要

ウイルスの感染価は Vero 細胞を使用したプラークアッセイ法で定量し [57]、プラーク形成単位 (Plaque forming unit: PFU) /mL で表した。1-2-2 項で作出したワクチン候補株を組み合わせて TDV を作製し、組み合わせた候補株の種類とその用量に対応するように TDV ワクチンを命名した。例えば、4 つの血清型についていずれも  $5 \log_{10}$

PFU/animal の候補株 A を組み合わせた場合には、TDV-AAAA-5 と称した。陽性対照としては、各血清型の親株を Vero 細胞で複数代継代したウイルス (wtDENV1, 2, 3, 4) を使用した。表 1-2 に示すように、複数の組み合わせの TDV を作製し、群 5 から 8 のカニクイザルの上腕皮下に投与した。群 1 から 4 のカニクイザルには、単価の wtDENV1 ~4 を投与した。図 1-1 に示すスケジュールでサルから採血し、得られた血清を用いて中和抗体価及び RNAemia level について試験した。

#### 1 - 2 - 4 使用動物及び動物倫理

Dengue 熱ワクチンの開発における障壁には、ヒトにおける Dengue 熱発症を模倣できる動物モデルが存在しないことも挙げられる。感受性のある動物は原則サルのみとされており、WHO のガイドラインでは、インターフェロン- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  のレセプターをノックアウトした遺伝子改変マウス (AG129) を用いるか、Non-human Primates をモデルとして推奨している。このことから、本研究の試験には動物モデルとしてカニクイザルを使用することとした。一方、DENV に対して感受性を持つ Non-human Primates であっても発熱等の症状を示すことは無く、ウイルス血症や中和抗体の産生の有無で評価することとなる [57]。

2~5 歳 (2.9~6.3 kg) の合計 24 匹のカニクイザルを試験に供試し、性別と体重によって無作為に群分けし、8 群を設けた。本試験は、AAALAC international に認定されて

いる米国の Southern Research Institute (Frederick, MD) にて実施され、試験プロトコルは施設内動物実験委員会で審査、承認された。動物の取り扱い、実験動物の管理と使用に関するガイドライン第8版 (Institute of Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council: National Academy press, Washington, D.C., 2011) 及び米国農務省発行の動物福祉法 (Public Law 99-198) に準拠した。試験中、健康状態に変化は観察されなかった。

#### 1 - 2 - 5 中和抗体価測定

各血清型の wtDENV に対する中和抗体価をアカゲザル腎臓由来株化細胞である LLC-MK2 細胞 (ATCC, CCL-7) を用いた下記に示す免疫組織化学的アッセイで定量した。各 wtDENV と 4 倍段階希釈した血清 (初期希釈率 1: 10) を等量混合し、37°C で 1 時間反応させた。あらかじめ準備しておいた LLC-MK2 細胞を播種した 96 ウェルプレートに、ウイルスと血清の混合液を 100  $\mu$ L 接種した。1 時間の吸着後、メチルセルロースを主成分とする重層培地をプレートに添加し、5% CO<sub>2</sub> 条件下で一晩培養した。翌日、ホルマリン固定後、各血清型特異的抗 DENV 抗体 (Milipore, Burlington, MA, DENV1: clone D3-2H2-9-21, DENV2: clone 3H5-1, DENV3: clone 5D4-11, DENV4: clone 1H10-6) を一次抗体とし、ヤギ抗マウス IgG (H+L) HRP 抗体 (SeraCare Life Sciences Inc., Milford, MA) を二次抗体として使用し、TrueBlue ペルオキシダーゼ基質

(SeraCare Life Sciences Inc.) をプレートに添加することでプレートを染色した。染色後のプレートを BioSpot スキャナー (Cellular Limited Technology, Cleveland, OH) で解析した。免疫染色法により可視化されたフォーカスが 50%減少する血清希釈倍数を中和抗体価 (50% Focus reduction neutralization titer: FRNT<sub>50</sub>) として表した。10 倍以上の中和抗体価を陽性と判断した。

#### 1 - 2 - 6 RNAemia level 測定

RNAemia level は, RT-qPCR により血中の DENV ゲノムを検出することで定量した。プライマーとプローブは, 既報 [58, 59]を参考に設計し, Operon (Huntsville, AL) または Eurofins MWG Operation LLC (Huntsville, AL) に合成を依頼した。ウイルス RNA は RNA Stat-60 RNA Extraction Reagent (コスモ・バイオ株式会社, 東京, 日本) を使用して抽出し, TaqMan RNA-to-CT 1-Step Kit (Invitrogen, Waltham, MA) を用いた RT-qPCR 反応に供した。あらかじめ作製しておいた各血清型 DENV のスタンダード DNA を用いて検量線を作成し, 試験に供した検体量, 抽出ゲノム液量, 測定値から検体 1 mL あたりのゲノム相当量 (Genome equivalent quantity: GEq/mL) を算出した。検出限界下限値は当該試験の予備試験結果に従い DENV1 で 500 GEq/mL, DENV2 ~4 で 1000 GEq/mL に設定した。

### 1-2-7 親株及び候補株 A のディープシーケンシング

親株と候補株 A について、Illumina シークエンサー (Illumina, San Diego, CA) を使用してディープシーケンシングを実施した。親株については、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Venlo, the Netherlands) を使用し、感染細胞から回収した培養液から RNA を抽出した。抽出した RNA を外部シーケンシングサービスプロバイダー (北海道システムサイエンス株式会社, 北海道, 日本) に依頼し、Illumina HiSeq プラットフォームでのシーケンシングを実施し、ペアエンド 101 bp のシーケンズデータを得た。候補株 A については、UF カートリッジ濃縮, ベンゾナーゼ (Merck, Darmstadt, Germany) 処理後の培養液から ZR Viral RNA キット (Zymo Research, Irvine, CA) を使用し、RNA を抽出した。NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, MA) を使用してシーケンズライブラリーを調製後、Illumina MiSeq プラットフォームでシーケンシングを実施し、ペアエンド 151 bp のシーケンズデータを得た。

得られたシーケンズデータは次の方法で解析した。まず、FASTX Toolkit 0.0.14 ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)) を使用してリードの 3'末端から 1 塩基をトリミングした後、あいまいなヌクレオチドを含むリードを取り除いた。次に、Cutadapt 1.6 [60] を使用してアダプター配列を含むリードを取り除くとともに、シーケンズの品質スコアが低いリードを取り除くために、品質スコア 20 以上の塩基を 80%

以上含むリードのみを残し、更に品質スコア 20 未満の塩基を 3'末端からトリミングした。クリーニングしたリードを再度ペアリングさせた後、Burrows-Wheeler Aligner 0.7.10 を使用して MEM アルゴリズム [61] でマッピングし、SAMtools 1.1 [62] 等を使用して各血清型の親株と候補株 A についてアミノ酸配列を比較した。比較の際、親株 - 候補株 A 間において、同一アミノ酸位置で検出されるアミノ酸残基の頻度に 10% 以上の変化があった場合に相違と定義した。

### 1-3 結果

#### 1-3-1 親株とワクチン候補株間のアミノ酸相違の同定

親株を異種培養細胞により複数回継代することで、ワクチン候補株を作出した。作出した候補株のうち、ワクチン候補株 A におけるアミノ酸の相違について表 1-3 に示した。候補株 A においては親株と比較し、DENV1 では構造タンパク質で 5 箇所、非構造タンパク質で 6 箇所のアミノ酸に、DENV2 では構造タンパク質で 4 箇所、非構造タンパク質で 9 箇所のアミノ酸に、DENV3 では構造タンパク質で 7 箇所、非構造タンパク質で 6 箇所のアミノ酸に、DENV4 では非構造タンパク質に 7 箇所のアミノ酸に相違が認められた。

### 1-3-2 中和抗体価

図 1-2 に Day 14, 30, 60 の各群の中和抗体価の推移を幾何平均値として示す。投与後 14 日目 (Day 14) の時点で、全ての群の中和抗体価は 4 つの血清型に対して陽性 (10 倍以上) を示した。群 5 から 8 の TDV 候補投与群において、Day 14 時点での各血清型に対する中和抗体価の幾何平均対数値 ( $\text{Log}_{10} \text{FRNT}_{50}$ ) はそれぞれ wtDENV1 に対して 3.02~3.77, wtDENV2 に対して 2.26~3.30, wtDENV3 に対して 1.75~3.23, wtDENV4 に対して 2.74~3.81 の範囲内にあった。群 5 (TDV-AAAA-5) では、Day 60 において Day 14 と比較し中和抗体価の上昇が認められ、Day 60 の各血清型に対する中和抗体価の範囲は、wtDENV1 に対して 3.32~3.78, wtDENV2 に対して 2.47~3.05, wtDENV3 に対して 2.60~2.81, wtDENV4 に対して 2.97~3.22 であった。誘導された中和抗体価は、Day 14 時点では群間のバラつきが大きかったが、接種後日数が更に経過するとバラつきが小さくなり、この傾向は wtDENV3 に対する試験で特に顕著であった。なお、DENV2, 3, 4 の血清型について低用量 ( $3 \log_{10} \text{PFU}/ \text{animal}$ ) に調整した TDV 候補も作製し検討を行ったが、本章で示した DENV1, 2, 3, 4 の全ての容量が  $5 \log_{10} \text{PFU}/ \text{animal}$  の TDV 候補を解析した場合と比較して免疫応答の差は観察されなかった (データ示さず)。また、候補株の種類 (A または B) によって誘発される中和抗体応答にも明確な差は認められなかった。TDV 候補と wtDENV の中和抗体価誘導能について比較すると、Day 60 時点において wtDENV1, 3, 4 に対する中和

抗体価に大きな差は認められなかった一方、wtDENV2 に対する中和抗体価については wtDENV2 投与群（群 2）の方が TDV 候補投与群と比較して最大 20 倍程度高値を示した。

### 1 - 3 - 3 RNAemia level

wtDENV または TDV 候補投与後に検出された血中 DENV ゲノム量の推移を図 1-3 に示す。群 5 から 8 の TDV 候補投与によって検出された血中ウイルスゲノム量はいずれも、各血清型の wtDENV 投与による検出よりも低値を示した。

群 1 から群 4 のカニクイザルには、 $1 \times 10^5$  PFU の wtDENV1, 2, 3, または 4 を皮下注射で単回投与した。wtDENV1 を投与した群 1 では、Day 1 と Day 2 に 3 匹すべてのカニクイザルで DENV1 ゲノムが検出され、個体別のウイルスゲノム量はそれぞれ 4.13 ~ 5.77  $\log_{10}$  GEq/mL 及び 3.86 ~ 4.51  $\log_{10}$  GEq/mL の範囲であった。wtDENV2 を投与した群 2 では、Day 1 に 3 匹のうち 2 匹のカニクイザルで DENV2 ゲノムが検出された。wtDENV3 を投与した群 3 においては、一過性かつ散発的にのみ DENV3 ゲノムが検出された。wtDENV4 投与群においては強い RNAemia が認められ、群 4 の 3 匹すべてのカニクイザルで Day 1 に個体別で 4.18 ~ 5.54  $\log_{10}$  GEq/mL の範囲で DENV4 ゲノムが検出された。

群 5 から 8 の TDV 候補を投与されたカニクイザルは、いずれの群においても対応す

る血清型の wtDENV を投与されたカニクイザル（群 1 から 4）と比較して血中ウイルスゲノム量が低値であった。特に、群 5（TDV-AAAA-5）のカニクイザルからは、Day 0～14 の試験期間中にいずれの血清型のウイルスゲノムも検出されなかった。候補株 B を含む群 6（TDV-AAAB-5）では、3 匹すべてのカニクイザルで Day 1 に DENV4 ゲノムが検出され、ウイルスゲノム量は  $3.50\sim 4.50 \log_{10} \text{ GEq/mL}$  の範囲であった。DENV2 の候補株 B を追加した群 7（TDV-ABAB-5）では、3 匹すべてのカニクイザルで Day 1 に DENV2 及び DENV4 のウイルスゲノムが検出され、個体別のウイルスゲノム量はそれぞれ  $3.00\sim 3.24 \log_{10} \text{ GEq/mL}$ ,  $3.97\sim 4.29 \log_{10} \text{ GEq/mL}$  の範囲であった。3 匹中 2 匹のカニクイザルで Day 3 にも一過性に DENV4 ゲノムが検出された。更に、この群では、Day 1 に 3 匹のうち 2 匹で DENV1 ゲノムも検出された。DENV1 以外の血清型について候補株 B を組み合わせた群 8（TDV-ABBB-5）は、群 7（TDV-ABAB-5）と同様の RNAemia プロファイルを示した。

候補株 B が含まれる群 6 から群 8 では、候補株 A のみが含まれる群 5 と異なり、DENV4 を中心とした血中 DENV ゲノムが検出されることが判明した。ただし、群 6 から 8 における TDV 候補によって惹起される DENV4 の RNAemia 定量値のピークは、群 4 で wtDENV4 によって惹起されるウイルスゲノム量の約 10 分の 1 程度であった。

#### 1-4 小括

今回ワクチン候補株作出に使用する親株として、DENV3 及び DENV4 はマヒドン大学のデング熱ワクチンの親株と同じ株を使用した。マヒドン大学のデング熱ワクチンは、DENV3 に対する中和抗体価が他の 3 つの血清型の DENV に対する中和抗体価よりも高値を示していたことから [56]、DENV3 の弱毒化が十分でなくウイルスの複製能が高かったと推測している。今回の弱毒化に際し、弱毒化の傾向を一致させるために DENV3 については他の血清型と同様に PDK 細胞での継代を実施した。また、マヒドン大学の試験結果において最も中和抗体価が低値であった DENV4 については [56]、DENV3 とは逆に生体内での複製能が低く、抗原刺激が不十分であったと考えられた。そこで、複製能を維持させる目的で継代数を減らすこととした。マヒドン大学のデング熱ワクチンの作出方法については表 1-1 に記載のとおりである。

1-2-2 項で作出した候補株のうち、候補株 A と親株についてアミノ酸配列を比較し、相違を確認した。親株及び候補株 A 双方で、「Glu/Lys」のように 2 種類のアミノ酸が複数の箇所を確認されたことから、分離されたウイルスは単一ではなく少しずつアミノ酸の異なる複数のウイルスが混在していることが確認された。複数回の継代による異種細胞への馴化のために生じた淘汰、他種アミノ酸の置換、選抜といった変化がウイルスの増殖性を変化させ、RNAemia level の低下等の弱毒化指標に関与したと考えられた。

作出した候補株 A 及び候補株 B の組み合わせについて、中和抗体誘導の観点から評

価した場合、差は認められなかった。一方で、弱毒化（RNAemia 回避）の観点から評価した場合には、候補株 B を含有する TDV 組成では、血中からウイルスゲノムがより検出される傾向にあった。DENV2 及び DENV4 については候補株 B の方が異種細胞での継代回数が多いため弱毒化が進んでいると予想されたが、反する結果となった。

以上より、中和抗体誘導能、RNAemia 回避能がいずれも確認された群 5 の TDV-AAAA-5 組成を基準に第 2 章にて用量反応性を詳細に解析することとした。

1-5 図表

表 1-1 : DENV の各血清型の親株及びワクチン候補株

本研究におけるワクチン候補株				
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
親株				
株名	03135 株	99345 株	16562 株	1036 株
分離患者	7 歳齢 デング熱患者	10 歳齢 DHF 患者	DHF 患者	デング熱患者
分離国	タイ王国	タイ王国	フィリピン	インドネシア
分離年	2003 年	1999 年	1964 年	1976 年
ワクチン株				
候補株 A	PDK15V3	PDK25	PGMK30PDK4	PDK40
候補株 B	—	PDK35	PGMK30PDK3	PDK45
マヒドン大学のデング熱ワクチン [56, 63]				
親株				
株名	16007 株	16681 株	16562 株	1036 株
分離患者	DHF 患者	DHF 患者	DHF 患者	デング熱患者
分離国	タイ王国	タイ王国	フィリピン	インドネシア
分離年	1964 年	1964 年	1964 年	1976 年
ワクチン株				
株名	PDK13	PDK53	PGMK30FRhL3	PDK48

PDK : イヌ初代腎臓細胞, V : Vero 細胞, PGMK : ミドリザル初代腎臓細胞, FRhL : アカゲザル胎児肺細胞

各ワクチン株の名前は, 培養細胞株の後に継代数が記載されている (例 : PDK15V3 株は PDK 細胞で 15 回, Vero 細胞で 3 回継代培養されている)。

表 1-2：デング熱ワクチン候補株組み合わせ選定試験における試験群の設定

群	投与した wtDENV または TDV	用量	N 数
1	wtDENV1	5 log <sub>10</sub> PFU/animal	3
2	wtDENV2	5 log <sub>10</sub> PFU/animal	3
3	wtDENV3	5 log <sub>10</sub> PFU/animal	3
4	wtDENV4	5 log <sub>10</sub> PFU/animal	3
5	TDV-AAAA-5	5, 5, 5, 5 log <sub>10</sub> PFU/animal	3
6	TDV-AAAB-5	5, 5, 5, 5 log <sub>10</sub> PFU/animal	3
7	TDV-ABAB-5	5, 5, 5, 5 log <sub>10</sub> PFU/animal	3
8	TDV-ABBB-5	5, 5, 5, 5 log <sub>10</sub> PFU/animal	3

カニクイザルを用いた試験を行い，群 5 から 8 については，1-2-2 項で作出したワクチン候補株を組み合わせで作製した TDV を投与した。TDV-XXXX-Y の X に入る表記は組み合わせた候補株の種類に対応し，Y に入る数字は用量に対応する（例：各血清型について 5 log<sub>10</sub> PFU/animal の候補株 A を組み合わせた場合，TDV-AAAA-5）。

表 1-3：各血清型 DENV の親株とデング熱ワクチン候補株 A 間におけるアミノ酸の相違

領域	位置	親株	候補株 A
DENV1			
prM	85	Glu/Lys	Glu
E	204	Lys	Glu/Lys
E	205	Glu	Lys
E	206	Lys	Arg / Lys
E	290	Lys	Arg
NS1	224	Val / Ile	Ile
NS3	188	Asn	Lys
NS4B	109	Ile / Thr	Thr
NS4B	113	Leu	Leu / Phe
NS4B	116	Val / Ala	Val
NS4B	120	Ala	Thr / Ala
DENV2			
PrM	29	Asp	Asn
E	118	Lys / Met	Met
E	120	Thr	Lys
E	204	Lys / Arg	Lys
NS1	327	Asp	Asn
NS2A	181	Leu	Phe
NS2B	116	Val	Val / Ala
NS3	179	Glu	Lys
NS4A	97	Tyr	Tyr / Cys
NS4B	104	Pro	Pro / Leu
NS4B	108	Ile	Thr
NS5	337	Thr	Thr / Met
NS5	529	Ala	Ala / Thr

DENV3			
prM	82	Gln / His	Gln
M	4	Ile	Leu
E	205	Leu / Met	Met
E	302	Ser	Gly
E	391	Lys / Arg	Lys
E	407	Ala	Val
E	484	Thr	Ile / Thr
NS2A	86	Phe	Leu
NS2A	112	Ala	Thr
NS2B	58	Glu / Asp	Asp
NS3	90	Gln	Lys
NS4B	197	Val / Ala	Ala
NS5	404	Ala / Thr	Thr
DENV4			
NS1	253	Gln	His
NS2B	85	Ser / Phe	Ser
NS4A	95	Leu	Phe
NS4A	125	Lys / Arg	Lys
NS4B	102	Ile / Thr	Thr
NS4B	112	Phe / Leu	Ser
NS5	390	Asn / Lys	Asn

図 1-1：デング熱ワクチン候補株組み合わせ選定試験における動物試験スケジュール概

要図

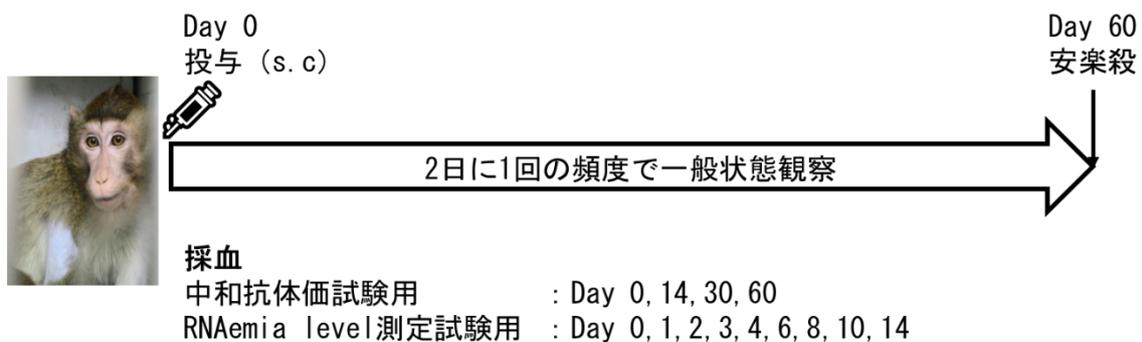


図 1-2：デング熱ワクチン候補株組み合わせ選定試験における中和抗体価の測定結果

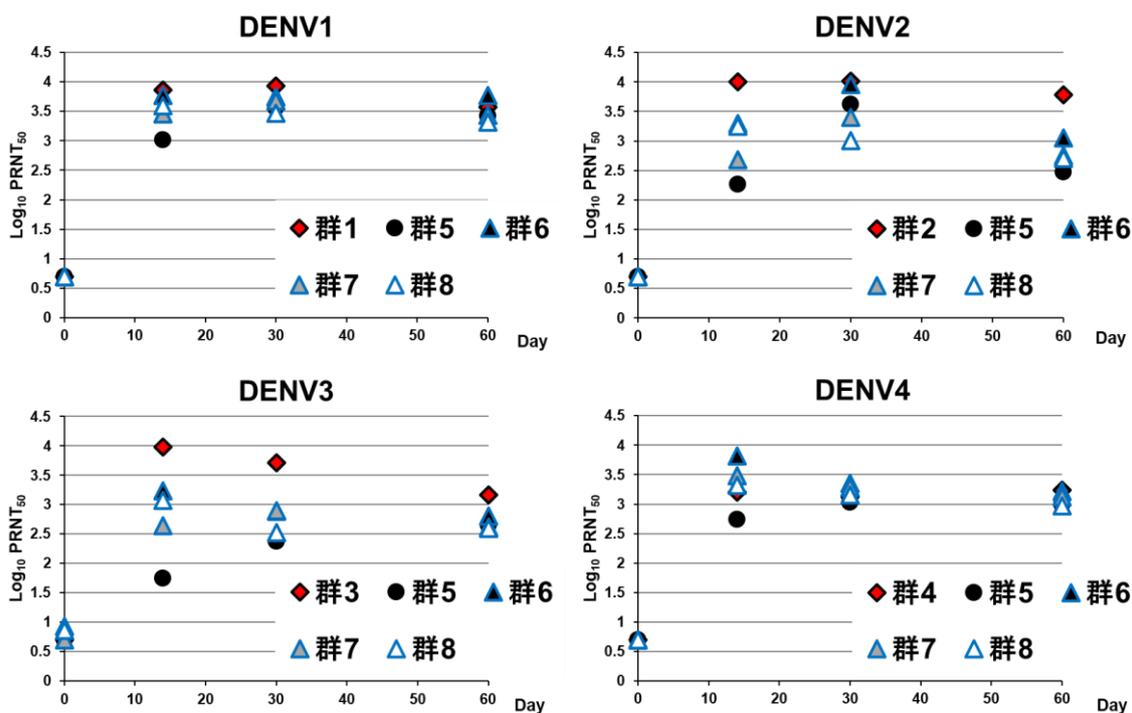


表 1-2 に示す群 1 から 8 における各血清型に対するカニクイザルの中和抗体価の推移を示す。縦軸は中和抗体価の対数値を、横軸は投与からの日数を示し、データプロットは各群における中和抗体価の幾何平均値 (N=3) を示した。幾何平均値計算のため、中和抗体価”<10”を”5”に、”≧10240”を”10240”に換算した。

図 1-3：デング熱ワクチン候補株組み合わせ選定試験における RNAemia level 測定結果

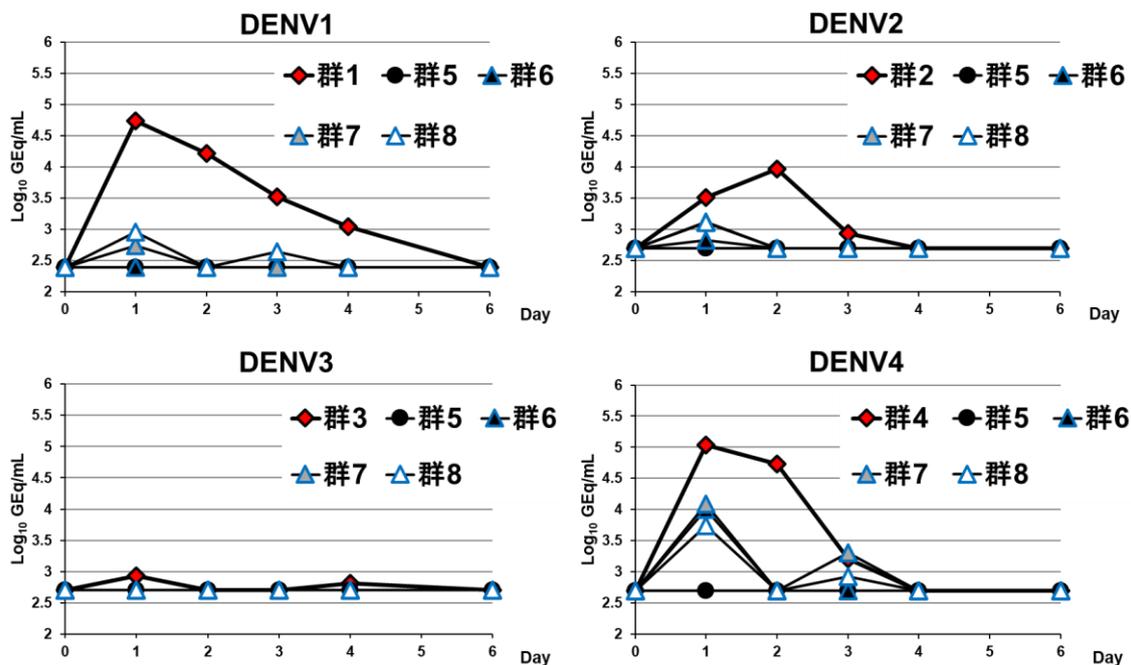


表 1-2 に示す群 1 から 8 におけるカニクイザルの各血清型に対する血中 DENV ゲノム量の推移を示す。縦軸はウイルスゲノム量の対数値を、横軸は投与からの日数を示し、データプロットは各群におけるウイルスゲノム量の幾何平均値 (N=3) を示した。投与 8 日目以降はいずれの個体も検出限界下限値未満であったため、省略している。幾何平均値計算のため、DENV1 では”<500 GEq/mL”を”250 GEq/mL”に、DENV2~4 では”<1000 GEq/mL”を”500 GEq/mL”に換算した。

## 第2章 4価弱毒生 Dengue 熱ワクチンの用量検討及び防御能確認

### 2-1 緒論

第1章にて選定した組成の TDV (TDV-AAAA-5) についてワクチン効果の投与用量反応性を確認するとともに、親株攻撃試験に対する防御能確認を目的とした動物試験を実施した。投与用量反応性は中和抗体誘導能で判断し、防御能確認については RNAemia level を指標として判断した。

### 2-2 材料及び方法

#### 2-2-1 ワクチン及びウイルス

各血清型 DENV の感染価は Vero 細胞と第1章 1-2-5 項に記載の血清型特異的なモノクローナル抗体を使用した免疫組織化学的アッセイで定量し [57]、フォーカス形成単位 (Focus forming unit: FFU) /mL で表した。ウイルスの感染価測定に用いた方法は、第1章ではプラークアッセイ法を、本章以降では免疫組織化学的アッセイで測定している。これは、TDV 作製後に各血清型の DENV の感染価を測定するには、それぞれの血清型に特異的な抗体を用いたアッセイが適していると判断したためである。PFU と FFU の相関関係を解析したところ、DENV1 および 4 はほぼ同値であったが、DENV2 および 3 では最大 10 倍程度 FFU の方が高い値を示すことが分かった。一方で、PFU で規定した TDV-AAAA-5 と FFU で規定した TDV-AAAA-5 をそれぞれカニクイザル

に投与した試験において、中和抗体応答に差がなかったことから（未発表データ）、以降の試験では FFU でウイルスの感染価を定量する。

第 1 章で決定した TDV 組成（TDV-AAAA-5）について、各血清型のウイルスを 5, 4, または  $3 \log_{10}$  FFU/dose に調製し、TDV-AAAA-5（群 1）、TDV-AAAA-4（群 2）、TDV-AAAA-3（群 3）を設定した。攻撃用ウイルスとして、各血清型のウイルス親株を Vero 細胞で複数代継代したウイルス（wtDENV1, 2, 3, 4）を使用した。攻撃時のウイルス感染価は、wtDENV1, 2, 4 については  $5 \log_{10}$  FFU/dose に設定し、wtDENV3 については第 1 章の試験で RNAemia が検出しづらかったことから  $6 \log_{10}$  FFU/dose とした。

### 2-2-2 動物試験概要

上述の各用量に設定した TDV を作製し、TDV 群として群 1 から 3 のカニクイザル（N=24）の上腕皮下に投与した。陰性対照として、ウイルスを含まない培地成分（Vehicle）投与群（群 4）を設定した（N=12）。ワクチン投与 60 日後に各 TDV 群を 6 匹ずつの 4 群に、Vehicle 群を 3 匹ずつの 4 群に群分けし、それぞれに 4 血清型の wtDENV を皮下接種し攻撃した。中和抗体価及び RNAemia level の測定のため、図 2-1 に示すスケジュールでサルから採血し、得られた血清を用いて以下の試験を行った。

### 2-2-3 中和抗体価測定

各血清型の wtDENV に対する中和抗体価を LLC-MK2 細胞を用いた免疫組織化学的

アッセイで定量した。方法は第 1 章記載の通りである。

#### 2 - 2 - 4 RNAemia level 測定

RNAemia level は、RT-qPCR による血中の DENV ゲノムを検出することで定量した。方法は第 1 章記載に準じたが、ウイルス RNA の抽出に使用する試薬を QIAamp Viral RNA Mini Kit に変更した。

#### 2 - 2 - 5 使用動物及び動物倫理

3～5 歳 (2.0～6.0 kg) の合計 84 匹のカニクイザル (雄 42 匹, 雌 42 匹) を試験に供し、性別と体重によって無作為に群分けした。本試験は、AAALAC international に認定されている米国の Southern Research Institute にて実施され、試験プロトコルは施設内動物実験委員会で審査、承認された。動物の取り扱いは、実験動物の管理と使用に関するガイドライン第 8 版及び米国農務省発行の動物福祉法 (Public Law 99-198) に準拠した。試験中、健康状態に変化は観察されなかった。

### 2 - 3 結果

#### 2 - 3 - 1 中和抗体価

Day 14 の時点で TDV を投与した各群のすべての個体において、中和抗体は 4 つの血清型に対して陽性を示した (図 2-2)。一方、群 1 から 3 の間で中和抗体価に有意差

は認められず、TDV 効果の用量反応性は観察されなかった。wtDENV 攻撃から 14 日後の Day 74 に、wtDENV 攻撃前 (Day 60) と比較し、TDV を投与したすべての個体において、DENV1, 2, 3, 4 に対する中和抗体価の若干の上昇を示した。Day 90 においても、すべての群で Day 74 と同等の高い中和抗体価を維持し、各血清型の wtDENV に対する中和抗体価の幾何平均対数値は、DENV1 に対して 3.7~3.8, DENV2 に対して 3.3~3.4, DENV3 に対して 2.8~2.9, DENV4 に対して 3.6~3.7 であった。Day 60 に各血清型の wtDENV で攻撃された群 4 の対照サル (TDV 非接種群) においても Day 74 の時点で中和抗体陽転を示し、対応する血清型の DENV に対して、TDV 投与群と同程度の高い抗体価の中和抗体が誘導された。対照群の Day 90 時点における各血清型の wtDENV に対する中和抗体価の幾何平均対数値は、DENV1 に対して 3.9, DENV2 に対して 3.7, DENV3 に対して 2.4, DENV4 に対して 3.7 であった。

### 2-3-2 RNAemia level

TDV 投与及びその後の wtDENV による攻撃によって引き起こされた RNAemia について測定した結果を、血中ウイルスゲノム量の推移として図 2-3 に示した。

#### *TDV 投与後 (Day 0~60)*

群 1 (TDV-AAAA-5) のサルからは、すべての血清型のウイルスゲノムが検出された。ウイルスゲノム量は Day 1 にピークに達し、DENV4 > DENV1 > DENV2 > DENV3

の順で多いゲノム量が確認された。群 2 (TDV-AAAA-4) のサルからは、DENV1, 2, 4 のウイルスゲノムは検出されたが、DENV2 については検出限界下限値の 2 倍程度であった。群 3 (TDV-AAAA-3) のサルから検出されたウイルスゲノム量は、いずれの血清型についても群 1 及び 2 と比較して低値であった。wtDENV 攻撃直前 (Day 60) には群 4 の対照サルを含めたどのサルからも血中ウイルスゲノムは検出されておらず、群 4 の対照サルはすべて、Day 60 の wtDENV1, 2, 3, 4 による攻撃時点で未感染であったことが確認された。

#### *wtDENV 攻撃後 (Day 61~74)*

群 4 の対照サルでは、各血清型の wtDENV で攻撃した後 1 日の時点 (Day 61) から血中ウイルスゲノムが検出され、そのウイルスゲノム量は群 1 から 3 の TDV 投与後 1 日の時点 (Day 1) よりも明らかに高値を示した。一方で、TDV 投与群の個体を各血清型の wtDENV で攻撃した場合は、TDV の用量に関係なく、攻撃後の血中ウイルスゲノム量は全て検出限界下限値未満であり、wtDENV 攻撃を完全に防御していることが確認された。

## 2-4 小括

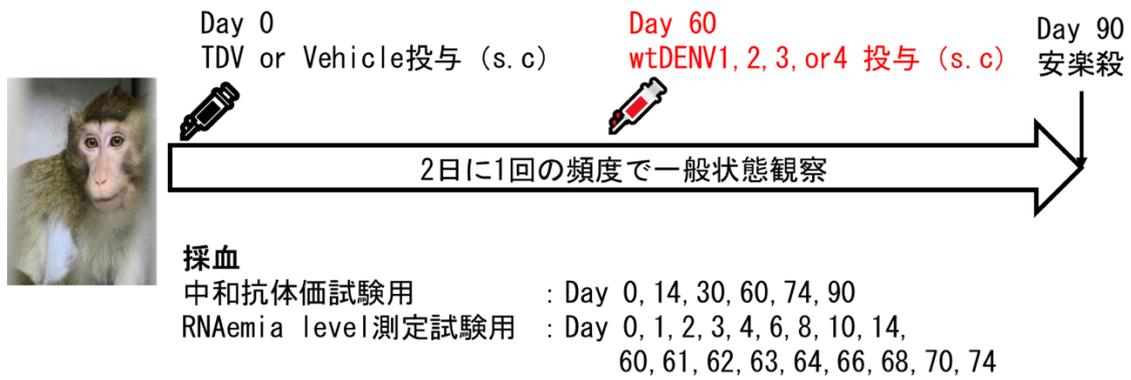
第 1 章の試験結果では TDV-AAAA-5 投与後のサルの血中からウイルスゲノムは検出されなかったが、本章の試験では、対照群における各血清型の wtDENV 攻撃後の測

定値よりも低値ではあるものの、TDV-AAAA 投与後のサルから 4 血清型すべてについてワクチン投与量に依存した RNAemia level の上昇が確認された。これは、ウイルス RNA 抽出に供試するキットを変更したことにより、抽出プロセスがより最適化され感度が上昇したものによると考察される。中和抗体誘導能の観点では、第 1 章の試験結果と同様に、Day 14 にすべての TDV 投与群で各血清型の中和抗体陽転が確認され、Day 60 まで同程度の抗体価の持続が確認された。血清型間のバランス面については、幾何平均値の直接比較では DENV3 に対する中和抗体価は他の 3 血清型に対する抗体価よりもやや低いことが確認された。一方で、Day 60 に実施した wtDENV 攻撃試験において、いずれの血清型のウイルスゲノムも検出されなかったことから、TDV-AAAA 投与によって誘導された中和抗体は Day 60 において感染防御に必要な抗体価を保持していたことが確認された。

第 1 章及び本章の結果より、TDV-AAAA 組成のワクチンは単回投与後 14 日間という短時間で全 4 血清型に対して中和抗体を誘導可能であり、かつ、wtDENV の感染を防御可能な有望なワクチン候補であると判断した。一方で、誘導される抗体が ADE の起因となつてはならない旨は記載した通りであるが、これまでの試験結果は Day 60 までの評価しかできていない。そこで、感染防御能を有する抗体を維持するために必要な TDV の投与回数及び免疫持続性について、第 3 章にて評価することとした。

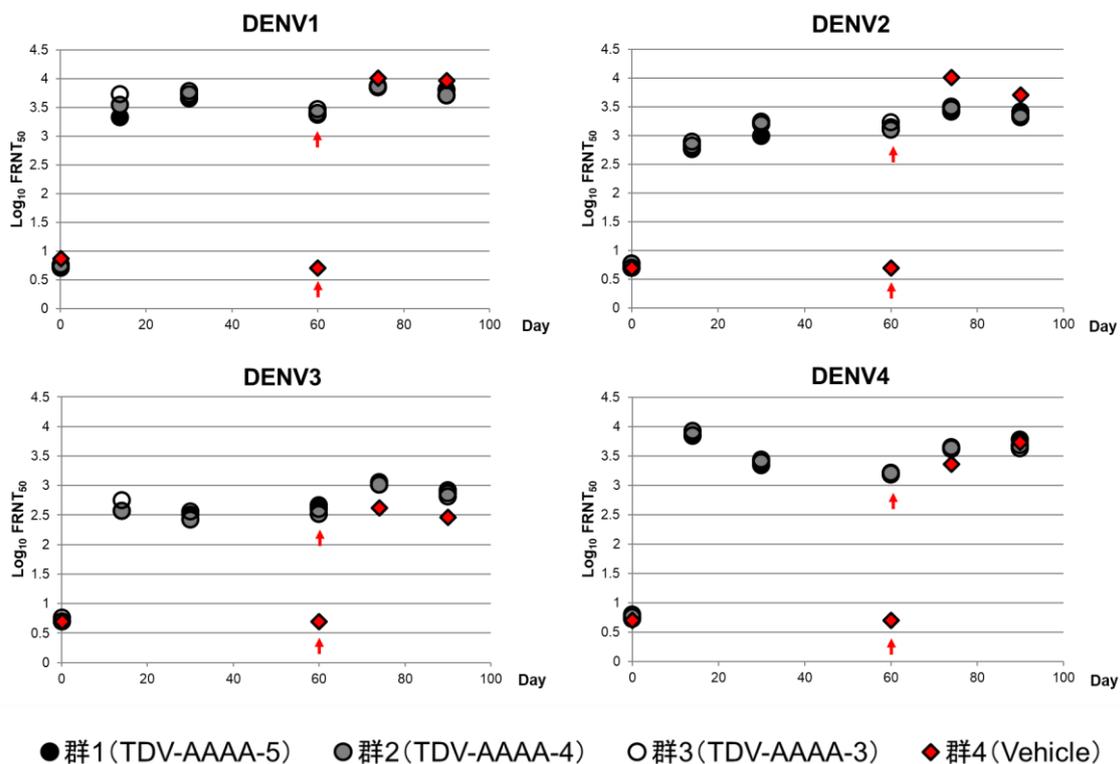
2-5 図表

図 2-1：TDV 効果の用量反応性確認試験における動物試験スケジュール



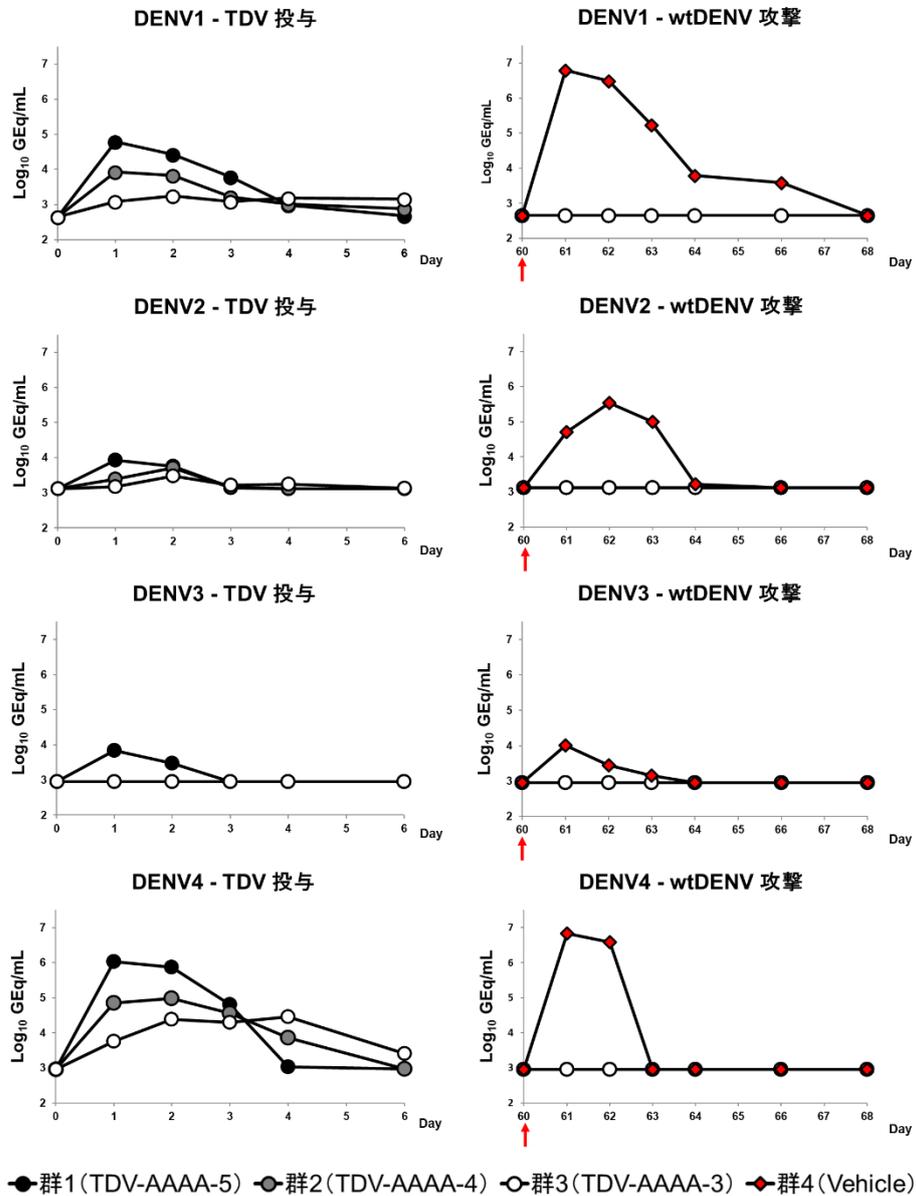
群 4 については Day 14 及び 30 時点での採血は実施していない。

図 2-2：TDV 効果の投与用量反応性確認における中和抗体価の測定結果



カニクイザルを用いた試験における各血清型に対する中和抗体価の推移を示す。縦軸は中和抗体価の対数値を、横軸は投与からの日数を示し、データプロットは各群における中和抗体価の幾何平均値（群 1~群 3: N=12, 群 4: N=3）を示した。幾何平均値計算のため、中和抗体価”<10”を”5”に、”≧10240”を”10240”に換算した。  
赤矢印：wtDENV 攻撃

図 2-3：TDV 効果の投与用量反応性確認における RNAemia level 測定結果



カニクイザルを用いた試験における各血清型に対する血中 DENV ゲノム量の推移を示す。縦軸はウイルスゲノム量の対数値を、横軸は TDV 投与からの日数を示し、データプロットは各群におけるウイルスゲノム量の幾何平均値 (TDV 投与後: 群 1~群 3: N=12, wtDENV 攻撃後: 群 1~群 3: N=6, 群 4: N=3) を示した。wtDENV による攻撃は Day 60 に実施した。TDV 投与 8 日目 (Day 8) 以降及び wtDENV 攻撃後 8 日目 (Day 68) 以降はいずれの個体も検出限界下限値未満であったため、省略している。幾何平均値計算のため、DENV1 では“<500 GEq/mL”を“250 GEq/mL”に、DENV2~4 では“<1000 GEq/mL”を“500 GEq/mL”に換算した。  
赤矢印：wtDENV 攻撃

## 第3章 TDVの投与回数の検討及び免疫持続性確認

### 3-1 緒論

第2章までに得られた結果から、作出したTDV-AAAAは、投与後短時間に抗体の陽転化を認め、それら抗体は全4血清型のDENVに対する中和能を有し、かつ、wtDENVと比較して惹起するRNAemia levelが低いワクチンであることが確認できた。本章では、感染防御能を有した中和抗体の維持に必要なTDV-AAAAの投与回数及び誘導される免疫持続性について確認することを目的として、動物試験を実施した。

### 3-2 材料及び方法

#### 3-2-1 ワクチン及びウイルス

TDV-AAAAについて、各血清型のウイルスを $5 \log_{10}$  FFU/doseに調製したワクチンを使用した。攻撃用ウイルスとして、wtDENV1を使用した。

#### 3-2-2 動物試験概要

カニクイザルをTDVの投与回数に基づいて下記3群に群分けした(各群N=6):単回投与群(群1)、1箇月間隔2回投与群(群2)、6箇月間隔2回投与群(群3)。また、陰性対照(negative control: N.C.)として、ウイルスを含まない培地成分単回投与群(群4)を設定した(N=2)。初回ワクチン投与から15箇月(Month 15)まで経時的に採血

し、得られた血清を用いて各群の中和抗体価の推移を解析した。

更に、誘導された中和抗体の持続性を確認するために、群 1 及び群 4 については約 5 年間継続飼育し、中和抗体価の推移をモニタリングした。また、単回投与から 5 年後の時点で群 1 及び群 4 に対して wtDENV1 で攻撃した。攻撃後 30 日間経時的に採血し、得られた血清を用いて中和抗体価及び RNAemia level の測定を行った。

TDV 及び wtDENV1 の投与箇所は前腕皮下で統一した。

### 3-2-3 中和抗体価測定

各血清型の wtDENV に対する中和抗体価については、第 1 章に記載の方法から一部変更したアッセイで定量した。変更点は下記の通りである。

- ・ 試験に供する細胞を LLC-MK2 細胞から Vero 細胞に変更した。
- ・ 細胞培養プレートを 96 ウェルプレートから 48 ウェルプレートに変更した。
- ・ 培養時間を 1 日間から 2~3 日間に延長させた。
- ・ 一次抗体として、各血清型の DENV に対する抗体を産生するハイブリドーマ細胞（ATCC, DENV1: Catalog No. HB-47, DENV2: HB-46, DENV3: HB-49, DENV4: HB-48）を購入して培養し、培養上清を精製して使用した。なお、抗 DENV1 抗体については、第 1 章で供試したクローン（clone D3-2H2-9-21）から clone 15F3-1 に変更した。DENV2, 3, 4 については clone の変更はなかつ

た。

- ・ 染色基質を TrueBlue ペルオキシダーゼ基質から TMB (MOSS Inc. Pasadena, MD) に変更した。
- ・ 画像取り込み用スキャナーを BioSpot スキャナーから ELISpot アナライザー (Cellular Technology Limited, Cleveland, OH) に変更した。

#### 3-2-4 RNAemia level 測定試験

wtDENV1 攻撃後の RNAemia について、RT-qPCR により血中の DENV ゲノムを検出することで定量した。方法は第 1 章記載の方法に準じたが、第 2 章と同様にウイルス RNA の抽出について使用する試薬を QIAamp Viral RNA Mini Kit に変更し、RT-qPCR に供試するキットを TaqMan®Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に変更した。

#### 3-2-5 使用動物及び動物倫理

2 歳 (1.8~3.6 kg) の合計 20 匹のカニクイザル (雄 10 匹, 雌 10 匹) を試験に供し、性別と体重によって無作為に 4 群に群分けした。本試験は、「動物実験の適正な実施に関するガイドライン」 [64] に準拠し、KM バイオロジクス株式会社の内部委員会によって承認され、同社の施設内で試験された。試験開始前に 14 日間の順化期間を確保し、飼育期間中に市販の飼料 (モンキービット, 日本農産工業株式会社, 神奈川県, 日本),

リンゴ、サツマイモを給餌し、自由に飲水できる環境とした。ワクチン投与、ウイルス接種、及び採血の前にはサルをケタミン（10 mg/kg）で麻酔した。試験終了時は、すべてのサルにケタミン（10～20 mg/kg）で事前麻酔後、ペントバルビタールナトリウム（100～150 mg/kg）を静脈内投与することで安楽死させた。初回投与から 38 箇月時点において、群 1 の 6 匹のカニクイザルのうち、2 匹において細菌感染が確認されたため、この時点で安楽殺処理を実施した。

### 3-2-6 統計分析

統計分析は、SAS® software version 9.4（SAS Institute Inc., Cary, NC）を使用して実行した。追加 TDV 投与の必要性を分析するために、各群における TDV 最終投与後 1 箇月時点の各血清型に対する中和抗体価について、群 1 と群 2 間及び群 1 と群 3 間で t 検定を実行した。また、抗体検出のアッセイ感度を評価するために、TDV 接種 2 箇月後の DENV3 に対する中和抗体価について、群 4 と群 1 間で t 検定を実行した（群 1 と群 4 の差が最も近いこの点を統計検定の代表として使用した）。抗体の持続性を評価するために、群 1 の各血清型に対する中和抗体応答について、TDV 投与 1 箇月時点（Month 1）と 60 箇月時点（Month 60）間に対応のある t 検定を実施した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 中和抗体価

第2章までの試験では、TDVを単回投与したカニクイザルにおいて、全4血清型に対して中和抗体が誘導可能であることが確認された。しかし、追加投与によるブースター効果を評価できていなかったため、本試験で確認した。

その結果、再現性よく、TDV単回投与により群1から3のカニクイザルでMonth1時点で全4血清型に対する中和抗体が検出された。群2と群3ではそれぞれMonth1、Month6時点で2回目のTDV投与を実施し中和抗体価の変動を比較した。結果を図3-1に示す。追加投与の必要性を分析するために、各群におけるTDV最終投与後1箇月時点の結果について検定した結果、群1（単回投与）のMonth1と群2（1箇月間隔2回投与）のMonth3の間でwtDENV4に対する抗体を除き中和抗体価に有意差はなく、群1（単回投与）のMonth1と群3（6箇月間隔2回投与）のMonth7間にも有意差は認められなかった。wtDENV4に対する中和抗体価について群1、2間に有意差を認めしたが、群1の方が高値を示した（図3-1\*1）。また、TDVの追加投与の有無が血中中和抗体価の持続性に与える影響を評価するために、Month15時点まで中和抗体価の推移をモニタリングしたが、各群において初回投与によって誘導された各血清型に対する中和抗体価は1年以上変化しなかった。ウイルス接種をおこなっていない群4（N.C.）において10倍以上の中和抗体価が時折確認されたが、TDV接種群で誘導された抗体

価よりも明らかに低く（群間に統計的に有意差あり， $p<0.05$ ），すなわち中和抗体価測定における非特異的抗体反応によるものと考えられ，偽陽性であると判断した（図 3-1\*2）。

次に，TDV 単回投与によって誘導された中和抗体について，血中抗体価の持続性を調査するため，群 1（単回投与）と群 4（N.C.）のカニクイザルについて長期追跡調査を実施した。5 年間にわたるモニタリング結果を図 3-2 に示す。血中抗体価の持続性を評価するための Month 1 と Month 60 間の検定の結果，群 1 において，wtDENV2，wtDENV3，及び wtDENV4 に対する中和抗体価について差は認められなかった。wtDENV1 に対する中和抗体価については Month 1 と Month 60 間で有意差が認められたものの（ $p=0.0167$ ），すべての個体が Month 60 において抗体価陽性を維持していた。

TDV 単回投与によって誘導された免疫応答が，5 年後に wtDENV による攻撃から防御可能かを判断するために，5 年経過（Month 60）時点で wtDENV1 による攻撃試験を実施した。5 年後であっても，群 1 の 4 匹中 2 匹で，攻撃後 14 日目及び 30 日目の中和抗体価上昇が攻撃前と比較して 4 倍未満であった（表 3-1）。

### 3 - 3 - 2 RNAemia level

5 年経過（Month 60）時点で wtDENV1 で攻撃後，血中の DENV1 ウイルスゲノム

量を定量した。攻撃後のウイルスゲノム量は、TDV で免疫したすべての群 1 の個体 (N=4) で検出限界下限値未満であったが、免疫していない対照動物 (群 4) では、2 匹中 2 匹で血中 DENV1 ゲノムが確認され、その定量値のピークはそれぞれ  $6.15 \log_{10}$  GEq/mL (攻撃後 2 日目)、 $5.78 \log_{10}$  GEq/mL (攻撃後 4 日目) であった (図 3-3)。

### 3-4 小括

DENV の自然感染では初回感染時に、感染した血清型に対する特異的な中和抗体と交差反応性中和抗体の両方の産生が誘導されるが、特異的な中和抗体は長期間持続的に産生される一方、交差反応性抗体は短期間で徐々に消失すると報告されている [36]。異種血清型の DENV による二次感染は、以前に暴露された血清型だけでなく、以前に暴露されていない他の血清型に対しても中和抗体を誘導し、かつ、その中和抗体は長期間持続することで三次感染の発症からの防御に関与している [65, 66]。デング熱ワクチンは二次自然感染後と同等に、高度に防御的な血清状態を誘発する必要がある。

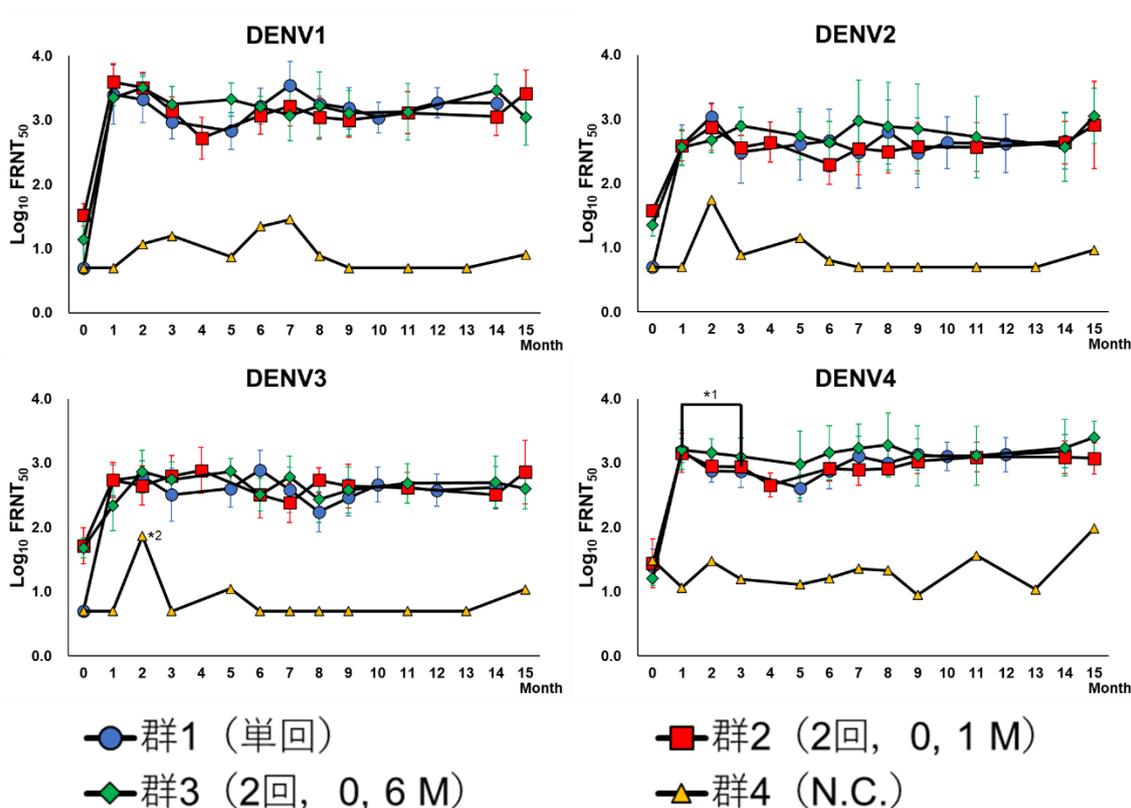
本章の研究では、2 回目のワクチン投与を Month 1 もしくは Month 6 時点で実施したが、追加のワクチン投与による中和抗体価の有意な上昇は認められなかった。更に、誘導された血清中和抗体価は、単回投与後 5 年間持続していた。これらのデータから、本研究に用いた TDV の単回投与により十分な中和抗体を誘導することが可能であり、追加免疫が必要ないことが示された。

更に、TDV 単回投与群（群 1）に対して、5 年経過（Month 60）時点で wtDENV1 による攻撃試験を実施したところ、半数の個体で中和抗体価の増加が 4 倍未満であり、幾何平均値でも 5 倍程度までの上昇にとどまった。攻撃試験により新たなウイルス感染に刺激された際に、中和抗体価の上昇がないことは、血中に存在する抗体により抗原が速やかに中和・排除されたことを意味し、即ち強固な免疫が誘導されていたと判断される [67]。また、すべての TDV 投与個体から DENV1 ゲノムが検出されなかったことから、攻撃後のウイルス複製が 5 年経過（Month 60）時点でも十分に阻止されていたと考えられた。

以上の結果より、開発した TDV は感染防御可能な中和抗体を誘導し、かつ少なくとも 5 年間免疫を維持可能なワクチン候補品であると判断した。

### 3-5 図表

図 3-1：TDV の投与回数の検討試験における中和抗体価の推移

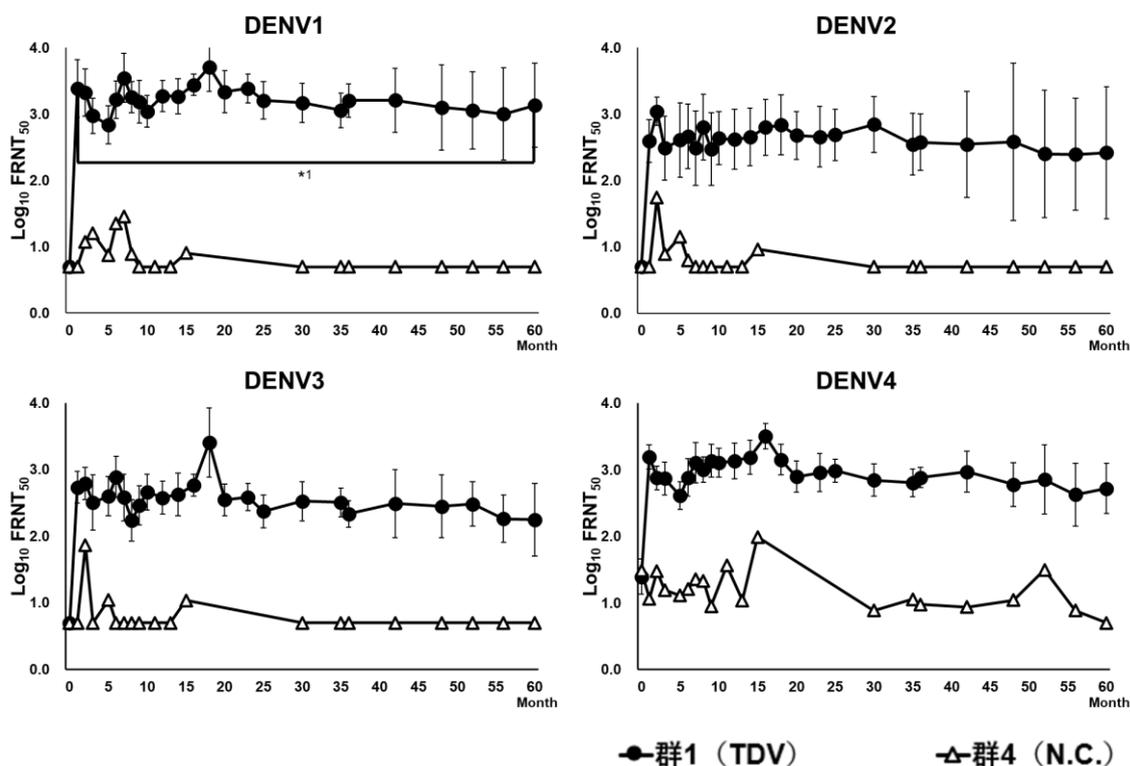


カニクイザルを用いた単回または2回 TDV 投与試験における各血清型に対する中和抗体価の推移を示す。縦軸は中和抗体価の対数値を、横軸は初回投与からの月数を示し、データプロットは各群における中和抗体価の幾何平均値 (群 1~群 3: N=6, 群 4: N=2) を示した。幾何平均値計算のため、中和抗体価”<10”を”5”に、” $\geq 10240$ ”を”10240”に換算した。エラーバーは 95%信頼区間を示す (群 4 は N=2 であるため省略)。

\*1：群 1 (Month 1) - 群 2 (Month 3) 間で、中和抗体価を比較 ( $p < 0.05$ )

\*2：群 1 (Month 2) - 群 4 (Month 2) 間で、wtDENV3 に対する中和抗体価を比較 ( $p < 0.05$ )

図 3-2 : TDV 単回投与によって誘導される中和抗体価の 5 年間の推移



カニクイザルを用いた単回 TDV 投与試験における各血清型に対する中和抗体価の推移を示す。縦軸は中和抗体価の対数値を、横軸は投与からの月数を示し、データプロットは各群における中和抗体価の幾何平均値 (群 1: N=4~6, 群 4: N=2) を示した。幾何平均値計算のため、中和抗体価 “<10” を “5” に, “ $\geq 10240$ ” を “10240” に換算した。エラーバーは 95%信頼区間を示す (群 4 は N=2 であるため省略)。血中抗体価の持続性を評価するため、各血清型について Month 1 時点と Month 60 時点の中和抗体価について対応する t 検定を実行した。

\* : 群 1 において Month 1 時点と Month 60 時点間で有意差あり ( $p < 0.05$ )

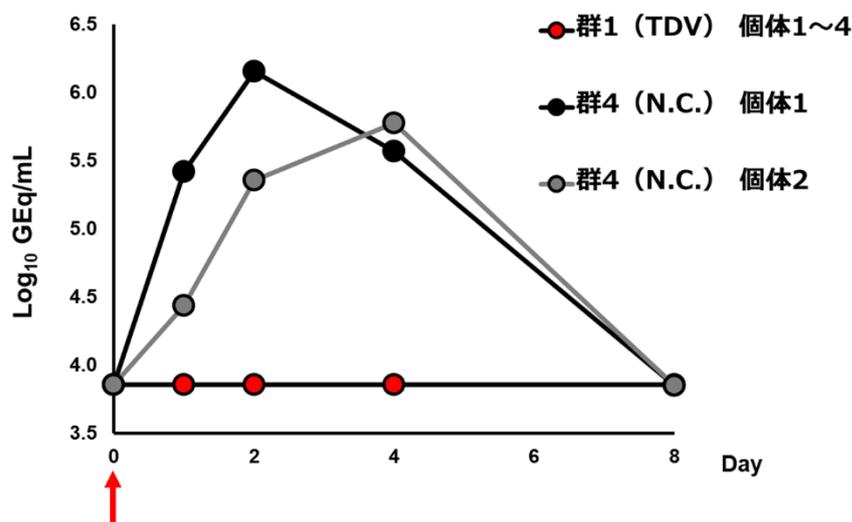
表 3-1 : TDV 単回投与 5 年後における wtDENV1 攻撃後の中和抗体価の推移

		中和抗体価：FRNT <sub>50</sub>							
		DENV1		DENV2		DENV3		DENV4	
日		個体別	GMT	個体別	GMT	個体別	GMT	個体別	GMT
0	群 1	505		81		62		420	
		3495	1351	973	263	375	177	988	523
		773		71		158		279	
		2442		855		269		648	
	群 4	5	5	5	5	5	5	5	5
		5		5		5		5	
14	群 1	<b>10240</b>		<b>558</b>		<b>556</b>		1059	
		10240	6923	844	651	491	388	949	778
		<b>9554</b>		<b>410</b>		450		547	
		2294		931		185		667	
	群 4	<b>10240</b>	10240	<b>190</b>	148	<b>163</b>	238	<b>57</b>	85
		<b>10240</b>		<b>116</b>		<b>349</b>		<b>129</b>	
30	群 1	<b>10240</b>		<b>396</b>		<b>539</b>		1011	
		10240	7169	892	513	331	355	568	624
		<b>4974</b>		184		310		442	
		5066		1067		290		599	
	群 4	<b>10240</b>	10240	<b>73</b>	121	<b>66</b>	166	<b>71</b>	116
		<b>10240</b>		<b>201</b>		<b>419</b>		<b>192</b>	

カニクイザルを用いた単回 TDV 投与試験において、群 1 (TDV 単回投与) 及び群 4 (N.C.) について 5 年経過 (Month 60) 時点で wtDENV1 による攻撃を実施した。攻撃直前 (0 日) 及び攻撃 14, 30 日後の中和抗体価の推移を示す。各血清型の wtDENV に対する中和抗体価を記載した。幾何平均値 (GMT) 計算のため、中和抗体価 “<10” を “5” に、 “≧10240” を “10240” に換算した。太字の値は、攻撃前後で中和抗体価が 4 倍を超えて増加した抗体価を示す。

図 3-3 : TDV 単回投与 5 年後における wtDENV1 攻撃後の血中 DENV1 ウイルスゲノ

ム量の比較



カニクイザルを用いた単回 TDV 投与試験において、群 1 (TDV 単回投与) 及び群 4 (N.C.) について 5 年経過 (Month 60) 時点で wtDENV1 による攻撃を実施した。wtDENV1 攻撃直前 (0 日) と攻撃後 1, 2, 4, 及び 8 日目に採取した血清サンプル中のウイルスゲノム量を RT-qPCR によって測定した。縦軸はウイルスゲノム量の対数値を、横軸は wtDENV1 攻撃からの日数を示した。データプロット表記のため、”<500 GEq/mL”を”250 GEq/mL”に換算した。

赤矢印：wtDENV 攻撃

## 第4章 被験動物の免疫状態と TDV の有効性に関する検証

### 4-1 緒論

第3章までに得られた結果から、本研究で作出した TDV は単回投与で全4血清型に対する中和抗体を誘導し、かつ、少なくとも5年間、血中中和抗体価を維持可能なワクチンであることが確認できた。デング熱ワクチンは、DENV 流行地域での投与が見込まれるが、ワクチン投与されるヒトはすでに自然感染による既存免疫を有する可能性がある。本章では、TDV の免疫原性に対する既存免疫の影響を評価するため、動物試験を実施した。

### 4-2 材料及び方法

#### 4-2-1 ワクチン及びウイルス

第3章と同様に、TDV-AAAA について、各血清型のウイルスを  $5 \log_{10}$  FFU/dose に調製したワクチンを使用した。攻撃用ウイルスとしては、wtDENV1, 2, 3, 4 を使用した。

#### 4-2-2 動物試験概要

カニクイザルを表4-1に示すように5群に群分けした。事前に任意の血清型 wtDENV で免疫し (wtDENV priming, Month 0), その2箇月経過時点で TDV を投与した。TDV 接種から27箇月後 (Month 29) に、二次異種 DENV 感染に対する防御効果を評価す

るために、wtDENV priming に使用しなかった血清型の wtDENV で攻撃し、防御効果を評価した。TDV 及び wtDENV の投与箇所は前腕皮下で統一した。

#### 4 - 2 - 3 中和抗体価測定

各血清型の wtDENV に対する中和抗体価について、第 3 章に記載の方法に準じて定量した。

#### 4 - 2 - 4 RNAemia level 測定

wtDENV priming 後, TDV 投与後, 及び攻撃後の RNAemia level について, RT-qPCR により血中の DENV ゲノムを定量した。方法は第 3 章記載の方法に準じたが, RT-qPCR に供試するキットを TaqMan®Fast Virus 1-Step Master Mix から THUNDERBIRD Probe One step qRT-PCR Kit (東洋紡, 大阪, 日本) に変更した。

#### 4 - 2 - 5 使用動物及び動物倫理

2 歳 (2.2~3.1 kg) の合計 15 匹のカニクイザル (雄 8 匹, 雌 7 匹) を試験に供し, 性別と体重によって無作為に 5 群 (N=3) に群分けした。本試験は, 「動物実験の適正な実施に関するガイドライン」 [64] に準拠し, KM バイオロジクス株式会社の内部委員会によって承認され, 同社の施設内で試験された。順化期間, 飼育環境, 麻酔, 安楽殺方法は第 3 章に記載の通りである。TDV 投与後 12 箇月 (Month 12) の時点で, 群

4 (wtDENV4 で priming) の 1 匹のサルにおいて細菌感染が確認されたため安楽死させた。したがって、群 4 の攻撃試験には wtDENV2 と 3 のみを使用した。残りのサルは、攻撃から 1 箇月後に安楽死させた。ワクチン投与後 10 箇月 (Month 10) の時点において、群 1 と群 5 の各 1 匹は持続的な下痢症状を呈していたため採血を行わなかった。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 中和抗体価

DENV に対する既存免疫がワクチン投与によって誘導される免疫応答に与える影響を評価するため、wtDENV で事前刺激 (priming) した群 1 から 4 のサルにおいて TDV 投与によって誘導される抗体のプロファイルを調査した。Priming 後及び TDV 投与後の中和抗体価の推移および各血清型に対する中和抗体価の増加率を表 4-2 に示す。各血清型の単価 wtDENV による priming 後、血清型特異的な中和抗体価が上昇するとともに交差反応性の中和抗体も誘導されたが、交差反応性中和抗体価は血清型特異抗体と比較して 10 倍以上低値であった。2 箇月後、これら priming 個体におけるワクチン投与後の全 4 血清型に対する免疫応答を評価するために TDV を投与した。TDV 投与後、DENV で priming していない naive なサル (群 5) に対する免疫応答と同様に、既存の免疫を有する群 1 から 4 のいずれのサルにおいても、各血清型に対する中和抗体価が誘導されたことが確認された (表 4-2)。更に、誘導された血中の中和抗体価は、減少する

ことなく 2 年以上持続することが確認された (図 4-1)。次に、異なる血清型による二次感染に対する防御能を評価するために、TDV 投与から 27 箇月後に priming で供試した血清型以外の wtDENV で攻撃試験を実施した。表 4-3 は、攻撃直前 (Month 29 時点) と攻撃後 30 日目 (Month 30 時点) の中和抗体価を示す。中和抗体価が攻撃前後で 4 倍を超えて増加した個体を太字で示した。11 匹中 5 匹のサルにおいて、攻撃後に 4 血清型すべてに対する中和抗体価の上昇は 4 倍未満であった。その他 6 匹のサルにおいては、4.6~74 倍以上の上昇であった。

#### 4 - 3 - 2 RNAemia level

ワクチンの安全性プロファイルを評価するために、血中のウイルスゲノム量を wtDENV priming 後と TDV 投与後のそれぞれ 7 日間にかけて測定した。wtDENV priming によって誘発されたウイルスゲノム量のピークは、DENV1 で  $6.93 \log_{10}$  GEq/mL (群 1, Day 2), DENV2 で  $5.37 \log_{10}$  GEq/mL (群 2, Day 2), DENV3 で  $4.88 \log_{10}$  GEq/mL (群 3, Day 1), DENV 4 で  $5.87 \log_{10}$  GEq/mL (群 4, Day 2) であった。一方、TDV 投与後については、主として、DENV4 または DENV1 のウイルスゲノムが検出されたが、ピークはそれぞれ DENV 4 で  $4.88 \log_{10}$  GEq/mL (群 3, Day 1), DENV1 で  $4.30 \log_{10}$  GEq/mL (群 4, Day 4) であり、wtDENV priming 後と比較して明らかに低値であった (図 4-2)。また、第 3 章の試験結果と同様に、TDV 投与後のサ

ルに対する wtDENV 攻撃後, どの個体からも血中ウイルスゲノムは検出されなかった。

#### 4-4 小括

DENV 感染後に生じるに最も重症化リスクが高いと想定される, 1つの血清型による自然感染歴のある状態において, 生ワクチン投与による「既存免疫に起因する不均一な免疫応答: 自然感染により誘導された抗体が生ワクチン株に対して防御能を示すことにより, 特定の血清型に対する中和抗体が誘導されない現象」や「既存免疫による ADE 様症状の惹起: 自然感染により誘導された抗体に起因した生ワクチン株の生体内における異常な複製」といった副反応が考えられる。本研究で開発した TDV についてその副反応誘起の可能性を否定するために, 本章では単一血清型 DENV に対する既存免疫状態をサルで模倣し, TDV 投与によって誘導される中和抗体価及び惹起される RNAemia level を測定し, 影響を評価した。

単一の血清型の wtDENV で priming することで既存免疫状態を模倣したサルを TDV で免疫した場合, priming に供した血清型に対する中和抗体価は, priming されていないサルと比較して高値を示した。一方, priming 血清型以外の血清型に対する中和抗体価は, priming されていないサルと同等の免疫応答を示した。これらの中和抗体の抗体価は 2 年以上持続することも確認された。本試験に使用した TDV によって誘導される中和抗体の血清型特異性は未確認ではあるが, 事前の免疫状態に関係なく長期持続的な

中和抗体を誘導できることが可能なワクチンであることが判明した。また、ワクチン投与後に DENV4, 1 を中心とした RNAemia が認められたが、wtDENV 投与時に確認される RNAemia level と比較して明らかに低値であり、ワクチン投与による ADE 様症状は否定できると考えられた。第 2 章から本章にかけて実施された動物実験において、TDV 投与後に再現性よく認められる一過性かつ低値の RNAemia は、既存の抗体の有無に関係なく、投与した TDV 自体の複製が生体内で制限され、安全な弱毒化生ワクチンとして十分に感染制御されていることを示していると考えられた。

#### 4-5 図表

表 4-1：カニクイザルを用いた既存免疫による TDV の有効性への影響の確認試験における試験群の設定

群	N	投与物質		
		Month 0 (priming) <sup>1)</sup>	Month 2 (TDV 投与)	Month 29 (攻撃) <sup>1)</sup>
1	3	wtDENV1	TDV-AAAA	wtDENV2
				wtDENV3
				wtDENV4
				wtDENV1
2	3	wtDENV2	TDV-AAAA	wtDENV3
				wtDENV4
				wtDENV1
				wtDENV2
3	3	wtDENV3	TDV-AAAA	wtDENV4
				wtDENV1
				wtDENV2
				wtDENV4
4 <sup>2)</sup>	3	wtDENV4	TDV-AAAA	wtDENV2
				wtDENV3
5	3	Not primed		Not tested <sup>3)</sup>

1) wtDENV1, 2, 4 は  $5 \log_{10}$  FFU/dose で、wtDENV3 は他の血清型よりもウイルス血症を誘発する傾向が低いため、 $6 \log_{10}$  FFU/dose で priming または攻撃した（攻撃時点 N=1）。

2) 群 4 の 1 匹は細菌感染が確認されたことにより安楽死させたため、wtDENV1 による攻撃試験は実施しなかった。

3) 群 5 に対する攻撃試験は実施しなかった。

表 4-2：カニクイザルにおける wtDENV priming 後及び TDV 投与後における中和抗体

価の比較

群		各血清型に対する中和抗体価							
		Month 1 (priming 1 箇月後)				Month 3 (TDV 投与 1 箇月後)			
		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
1	wtDENV1	4726	202	180	337	5202	2203	801	3416
2	wtDENV2	181	3307	23	69	2043	9700	684	3086
3	wtDENV3	96	35	1163	117	1565	1661	2939	2321
4	wtDENV4	52	36	11	1431	1913	2401	728	5829
5	None	5	6	8	31	3533	1370	1196	1405

群		TDV 投与前後の抗体増加率 (倍)			
		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
1	wtDENV1	1.1	10.9	4.5	10.1
2	wtDENV2	11.3	2.9	29.7	44.7
3	wtDENV3	16.3	47.5	2.5	19.8
4	wtDENV4	36.8	66.7	66.2	4.1
5	None	706.6	228.3	149.5	45.3

上段の表には、各血清型の wtDENV に対する中和抗体価の幾何平均値を記載した。幾何平均値計算のため、中和抗体価“<10”を”5”に、“ $\geq 10240$ ”を”10240”に換算した。下段の表には、Month 1 と Month 3 の中和抗体価の比を TDV 投与前後の抗体増加率として表した。グレーでハイライトした箇所は、wtDENV priming で使用した血清型に対応する箇所を示す。

図 4-1 : wtDENV priming 及び TDV 投与後のカニクイザルの中和抗体価の推移

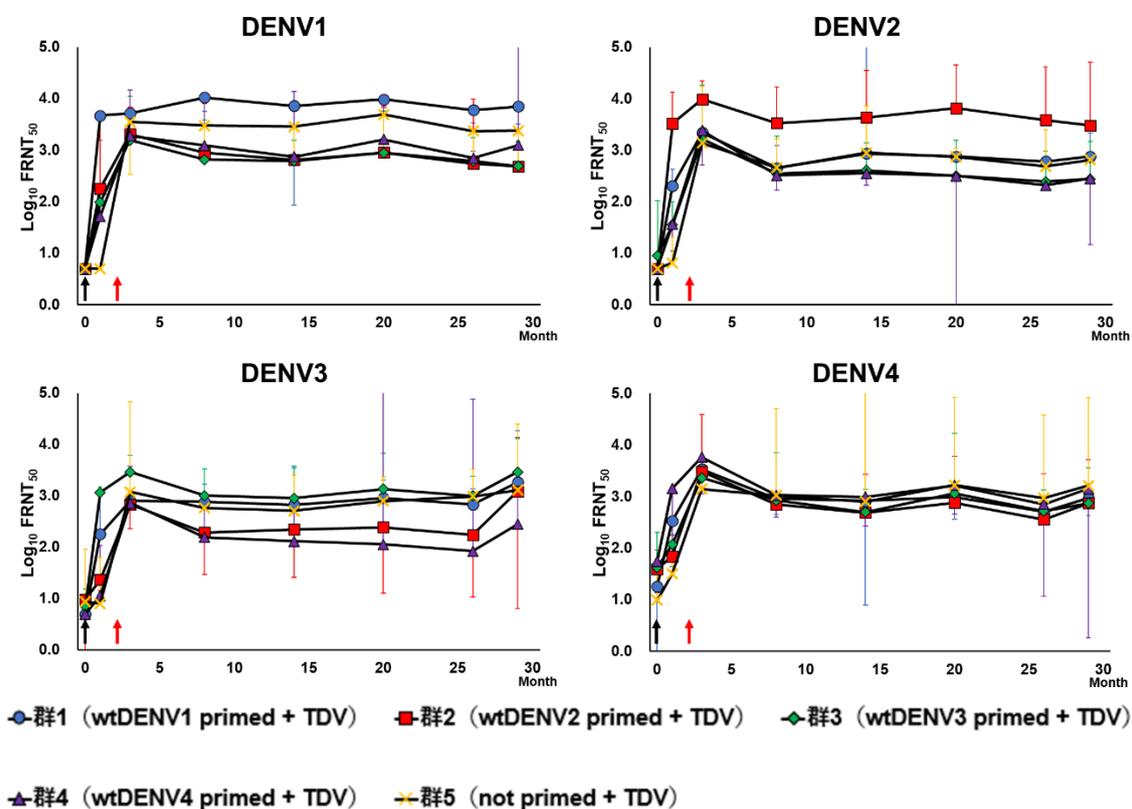


表 4-1 に示す群 1 から 5 の Month 0~30 における各血清型に対する中和抗体価の推移を示す。縦軸は中和抗体価の対数値を、横軸は wtDENV priming からの月数を示し、データプロットは各群における中和抗体価の幾何平均値 (N=2~3) を示した。幾何平均値計算のため、中和抗体価”<10”を”5”に、”≧10240”を”10240”に換算した。エラーバーは 95%信頼区間を示す。

黒矢印：wtDENV priming

赤矢印：TDV 投与

カニクイザルの持続的な下痢症状個体または細菌感染に伴う安楽殺個体により N=2 と なる計測ポイントがいくつか存在するため、95%信頼区間が図から逸脱した。

表 4-3：カニクイザルを用いた既存免疫による TDV の有効性への影響確認試験における wtDENV 攻撃前後の中和抗体価の推移

群	Priming	攻撃	各血清型に対する中和抗体価							
			DENV1		DENV2		DENV3		DENV4	
			Month 29	Month 30	Month 29	Month 30	Month 29	Month 30	Month 29	Month 30
1	wtDENV1	wtDENV2	≥10240	≥10240	890	3535	3277	5697	952	1276
		wtDENV3	5783	9868	467	1406	3056	2175	1262	1098
		wtDENV4	5998	8752	1041	912	630	1187	<b>677</b>	<b>3135</b>
2	wtDENV2	wtDENV1	<b>138</b>	≥10240	<b>834</b>	<b>4713</b>	<b>149</b>	<b>7906</b>	375	840
		wtDENV3	1148	1143	7383	≥10240	≥10240	2135	1744	1103
		wtDENV4	720	905	4451	5088	1212	433	630	1400
3	wtDENV3	wtDENV1	<b>412</b>	≥10240	<b>144</b>	≥10240	<b>2009</b>	≥10240	<b>395</b>	<b>7084</b>
		wtDENV2	813	4433	<b>265</b>	<b>4219</b>	5900	≥10240	1404	4465
		wtDENV4	355	877	552	523	2147	1137	752	1451
4	wtDENV4	wtDENV1	データなし							
		wtDENV2	3094	≥10240	<b>355</b>	≥10240	<b>385</b>	≥10240	2407	5912
		wtDENV3	<b>508</b>	≥10240	<b>223</b>	<b>3710</b>	<b>209</b>	<b>7859</b>	<b>843</b>	<b>4692</b>

表 4-1 に示す群 1 から 4 の各個体の Month 29 および 30 における各血清型の wtDENV に対する中和抗体価の推移を記載した。増加倍数計算のため、”≥10240“を”10240“に換算した。グレーでハイライトした箇所は、wtDENV priming で使用した血清型に対応する箇所を示す。黒色の太字は、Month 29 と Month 30 を比較して 4 倍以上増加した交差反応性の中和抗体価を示す。赤色の太字は、Month 29 と Month 30 を比較して 4 倍以上増加した血清型特異的中和抗体価を示す。

図 4-2 : wtDENV priming 後と TDV 投与後のカニクイザルの血中ウイルスゲノム量

の比較

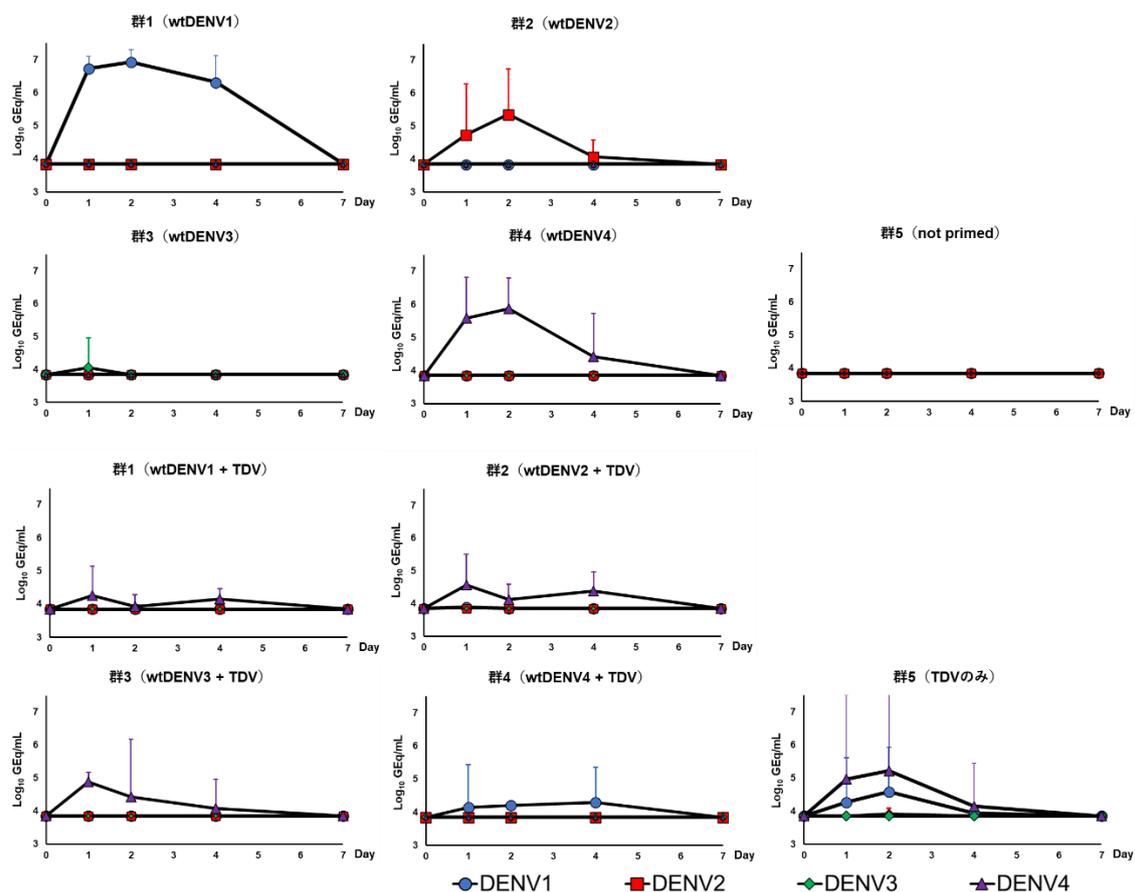


表 4-1 に示す群 1 から 4 の wtDENV priming 及び TDV 投与後の各血清型に対する血中 DENV ゲノム量の推移を示す。それぞれ、投与前と投与後 1, 2, 4, 及び 7 日目に採取した血清サンプル中のウイルスゲノム量を RT-qPCR によって測定した。縦軸はウイルスゲノム量の対数値を、横軸は投与からの日数を示す [wtDENV 投与は Month 0 からの起算日を (図上側), TDV 投与は Month 2 からの起算日を示す (図下側)]。データプロットは各群におけるウイルスゲノム量の幾何平均値 (N=3) を示し、エラーバーは 95%信頼区間を示す。幾何平均値計算のため、DENV1 では”<500 GEq/mL”を”250 GEq/mL”に、DENV2~4 では”<1000 GEq/mL”を”500 GEq/mL”に換算した。

## 結言

### 研究のまとめ

今日に至るまで、多くの感染症がワクチンによって制御されてきた。デング熱に対するワクチンの開発は、マラリアや後天性免疫不全症候群に対するワクチンと同様に公衆衛生上重要な課題の1つであった。しかしながら、先述の通りデング熱に対するワクチン開発には常に ADE のリスクが存在する。DENV 感染における ADE は、中和能が低いまたは欠く抗体が原因であることから、4つの血清型すべてに対して長期間持続性の防御免疫反応、特に中和抗体を誘導できる TDV を開発することが重要である。この点に関して、単回投与で以下の特徴を提供できるワクチンが理想的であると筆者は考える。

- 1) ワクチン投与後短期間で全4血清型に対する中和抗体誘導が可能
- 2) 全4血清型に対するバランスの取れた中和抗体の誘導
- 3) 全4血清型に対する長期間持続性の免疫を誘導
- 4) ワクチン投与前の免疫状態に関係なく、一貫した免疫反応を誘導可能
- 5) 弱毒化生ワクチンの場合、ワクチン投与後の RNAemia level が低値

今回、第1章で記載したように、マヒドン大学作出の TDV をベースにワクチン株の変更や弱毒化方法について改良を施し、新たな TDV を試作し、カニクイザルモデルによって TDV 候補の有用性を評価した。第1章から第4章の試験に一貫して、TDV 投与後短期間（14日もしくは30日）ですべての血清型に対するバランスの取れた中和抗

体の誘導が確認できた。また、TDV 投与のいずれのタイミングにおいても、TDV によって惹起される RNAemia level は wtDENV によるものと比較して低値を示した。これらのデータは、要件 1) , 2) 及び 5) を満たすと考える。また、第 3 章において、誘導される血中中和抗体価の持続性を確認したところ、カニクイザルにおいて 5 年間の持続が確認された。第 4 章にて実施された、既存免疫状態を模倣したカニクイザルでの試験結果より、被験動物の既存の免疫状態に依存せず TDV 投与により良好な中和抗体誘導を実現可能であることが示された。以上より、要件 3) 及び 4) についても満足できるワクチンが開発できたと筆者は考察する。近年の研究により、現在利用可能な Dengue 熱ワクチンは、既存免疫がある被験者 (sero-positive) に対する免疫応答よりも既存免疫が無い被験者 (sero-negative) に対する免疫応答が弱く、かつ、持続性が低いことが明らかとなり問題視されている。そのため、既存の Dengue 熱ワクチンの利用条件には「既往歴があるヒト、または流行地域の中にいるヒト」といった条件が課されることとなった [50, 51]。一方で、本研究で開発した TDV は本試験結果からも明らかなように、sero-negative なカニクイザルにおいても有効でかつ持続性のある中和抗体が産生されている。Dengvaxia や QDENGGA を投与した後の免疫応答について、サル類を用いた非臨床試験結果とヒトにおける臨床試験結果が相関していることから [48, 49, 52, 53, 68], 本 TDV についてもヒトで良好な免疫応答が誘導可能と推察される。

## 今後の課題

本論文では、液性免疫に焦点をおいて試験を行い結果について考察してきたが、近年、細胞性免疫のデング熱防御への関与が注目されている。液性免疫と細胞性免疫のバランスは、DENV 感染に対する防御にとって重要であるとされている [69]。特に、memory B 細胞、memory CD4<sup>+</sup> T 細胞、及び memory CD8<sup>+</sup> T 細胞は、デング熱の重症化を防ぐ鍵となるとされている [70, 71]。これら免疫細胞は、DENV の NS タンパク質をはじめとしたウイルスタンパク質によって感作される。DENV が属するフラビウイルス科のウイルスは NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 といった複数の NS タンパク質をコードする遺伝子を持ち、宿主細胞において産生される NS タンパク質はそれぞれ表 5 に示す様々な機能を持つとされている。

これらすべてのウイルスタンパク質に対して免疫反応は認められるが、特に NS3 はヒトにおいて CD4<sup>+</sup> T 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞の標的となるエピトープを有する主要なタンパク質であるという報告がある [72–78]。実際に武田薬品工業株式会社によって実施された第 2 相治験において、QDENGGA を投与された被験者のサンプルから NS3 をはじめとする NS タンパク質特異的な T 細胞の活性化を認めている [79, 80]。QDENGGA によって誘導される DENV に対する免疫応答は、組換えウイルスの骨格となる DENV2 に対して最も高値を示したことが報告されている [79]。本研究で開発した TDV は遺伝子組換えワクチンでなく 4 価弱毒生ワクチンであることから、ワクチン

投与後の生体内での複製過程ですべての NS タンパク質が産生されるため、すべての血清型に対してより強い細胞性免疫応答を誘導できると推測できる。実際、本研究において TDV を投与したカニクイザルが wtDENV による攻撃試験において完全防御を達成できたことから、本 TDV による免疫が液性免疫（中和抗体の誘導）だけでなく、CD4<sup>+</sup> 及び CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化を誘導した可能性も考えられる。このことを確認するために、今後の研究では、サルより小型の動物モデルとして WHO が推奨する AG129 マウス [57]を用いたより多くの実験の実施や、第 1 相治験でのヒトサンプルを使用して T 細胞の活性化を分析することで、ウイルス NS タンパク質に対する細胞性免疫応答を解析して行きたいと考えている。

表 5：フラビウイルスの NS タンパク質の機能

領域	機能	参考文献
NS1	ウイルス RNA 複製の補因子	81, 82, 83
	補体活性化のアンタゴニスト	84, 85
NS2A	ウイルス RNA 複製に関与	86, 87
	インターフェロン $\alpha/\beta$ シグナル伝達の阻害	88, 89
	ウイルスアセンブリ	90, 87, 91
	ウイルス膜の生合成	91
NS2B	NS3 タンパク質分解活性の補因子	92, 93
NS3	ウイルス前駆体ポリタンパク質の切断	94, 95
	I 型インターフェロン反応の阻害	96
	ヘリカーゼ能	92, 97
	RNA/DNA 三リン酸酵素	98
	脂肪酸シンターゼの動員と刺激	99
	ウイルスアセンブリ	90, 100, 101, 102
NS4A	RNA 複製	103, 104
	膜変化の誘導	105
	オートファジー制御	106
	インターフェロン $\alpha/\beta$ シグナル伝達の阻害	89
NS4B	1 本鎖 RNA からのヘリカーゼ (NS3) 乖離	107
	インターフェロン $\alpha/\beta$ シグナル伝達の阻害	89
NS5	RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ能	108
	メチルトランスフェラーゼ能	109
	グアニリルトランスフェラーゼ能	110
	STAT2 との結合及び分解	111

## Summary

Dengue fever is a mosquito-borne viral infection that affects people around the world, particularly in urban areas in tropical and subtropical regions. Dengue virus (DENV), which causes dengue fever, is an enveloped virus belonging to the genus *Orthoflavivirus*, family *Flaviviridae*, and is characterized by having four serotypes. Dengue fever is thought to be exacerbated by antibody-dependent enhancement (ADE) caused by insufficient induction of neutralizing antibodies against each serotype of DENV. In order to avoid ADE, tetravalent dengue vaccines have been developed to induce antibodies against all the four serotypes. As of 2023, Dengvaxia, developed by Sanofi Pasteur and approved in 2015, and QDENG, developed by Takeda Pharmaceutical Company Limited and approved in 2022, are available. These two vaccines are genetically recombinant tetravalent live vaccines, and they have drawbacks such as increased hospitalization rates in younger age groups and low efficacy against certain serotypes of dengue viruses, respectively. I speculated that these problems were due to the genetic modification, i.e., the absence of some genes of DENV antigens in the recombinant vaccine. Therefore, I focused on a non-genetically modified, host-range mutant live attenuated vaccine containing all the DENV antigenic components. I believe that the tetravalent live attenuated dengue vaccine will induce a reliable immune response similar to that can be seen during natural infection, and will have a higher preventive effect. In this study, I prepared live attenuated vaccine candidate strains for four serotypes of DENV and evaluated their efficacies in cynomolgus monkey studies.

In Chapter 1, live attenuated vaccine candidate strains were produced through multiple passages using mammalian cells. One or two candidate strains were produced for each DENV serotype, and the tetravalent vaccines composed of various combinations of

candidate strains were evaluated for their efficacies to induce neutralizing antibodies against the four serotype and to avoid onset of RNAemia. As a result, I was able to determine the best tetravalent live attenuated vaccine composition that can induce neutralizing antibodies against all the four serotypes within 14 or 30 days and avoid RNAemia.

In Chapter 2, the dose response in the efficacy of the tetravalent live attenuated vaccine having the composition selected in Chapter 1, was confirmed. The vaccine doses were set at three levels, and the neutralizing antibody responses and protective ability against challenge with the wild-type parental strain were evaluated for the three doses. As a result, no dose-related differences were observed in the ability to induce neutralizing antibodies. However, importantly, no viral genome was detected in the blood of vaccinated monkeys after the challenge with the wild-type parental strain (no RNAemia).

In Chapter 3, the tetravalent live attenuated vaccine containing the candidate strains selected on the basis of the above-mentioned study results, was used to evaluate the durability of the induced neutralizing antibodies and their protective efficacy. Neutralizing antibodies against the four serotypes were induced in all the vaccinated monkeys one month after the single vaccination. Furthermore, it was confirmed that the neutralizing antibodies were persisted for 5 years after a single administration of the vaccine. When challenged with the wild-type parental DENV1 strain five years after the vaccination, no viral genome was detected in the blood. In other words, these results suggest that *in vivo* viral replication after the virus challenge was sufficiently inhibited even 5 years post vaccination.

In Chapter 4, assuming that the dengue vaccine would be used in a dengue-endemic area, I evaluated the influence of a history of DENV infection on the vaccine efficacy. Cynomolgus monkeys were pre-immunized against one of the four serotypes using the corresponding wild-type strain, and then a live attenuated tetravalent vaccine was

administrated. The neutralizing antibody titers and RNAemia levels were evaluated. The results showed that the live attenuated tetravalent vaccine was capable of inducing long-lasting neutralizing antibodies under both conditions of presence and absence of pre-existing immunity to DENV, and that the administered vaccine virus did not cause abnormal viral replication *in vivo*.

In conclusion, in this study, I evaluated the potential of the developed dengue vaccine candidate strains using a cynomolgus monkey model. Consistently in chapters 1 to 4, a well-balanced induction of neutralizing antibodies against all the four serotypes was confirmed within a short period of time after the administration of the tetravalent live attenuated vaccine. Furthermore, vaccine-induced RNAemia levels were lower than those induced by the wild-type parental strain at all the time points tested post vaccine administration. In addition, in Chapter 3, I confirmed the persistence of the induced neutralizing antibodies for 5 years in the vaccinated cynomolgus monkeys. Further, the results of the study in Chapter 4 that mimicked the natural infection status showed that it was possible to achieve good induction of neutralizing antibodies by the vaccination developed in this study, regardless of the pre-existing immunity. In summary, this vaccine satisfies the following five requirements as a desired dengue vaccine:

- 1) Neutralizing antibodies against all the four serotypes can be induced within a short period of time after vaccination;
- 2) Induction of well-balanced neutralizing antibodies against all the four serotypes;
- 3) Long-lasting immunity against all the four serotypes;
- 4) Consistent immune response irrespective of the pre-vaccination immune status;
- 5) Low levels of RNAemia after vaccination.

According to the immune response of the previously developed vaccine products,

there has been a correlation between the results of non-clinical studies in monkeys and the ones of clinical studies in humans, so it may be possible to infer that this dengue vaccine can induce a good immune response in humans.

In this study, I have focused only on the humoral immunity, but in recent years the importance of cellular immunity in dengue fever protection has been attracting attentions. Future research will need to involve the studies on cellular immune responses.

## 謝辞

指導教員として本論文を何度も校閲くださり、懇切丁寧なご助言とご指導を賜りました帯広畜産大学 小川晴子教授に心より感謝申し上げます。また、本論文草稿作成にあたり、ご精読いただき貴重なご助言、ご校正を賜りました帯広畜産大学 横山直明教授、岡村雅史教授、武田洋平准教授に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご協力いただくとともに、本論文作成をご承諾下さった園田憲悟氏、新村靖彦氏をはじめとする KM バイオロジクス株式会社の皆様、マヒドン大学 Sutee Yoksan 名誉教授に深く感謝の意を表します。

最後に本論文の作成にあたり、温かく見守り、応援してくれた家族に感謝の意を示し、謝辞とさせていただきます。

## 参考文献

1. Gubler DJ. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):319-330. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.013
2. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VVC, and Wills B. Dengue. *N Engl J Med.* 2012; 366(15):1423-1432. doi: 10.1056/NEJMra1110265
3. World Health Organization. [Dengue and severe dengue](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue). January 2022. Retrieved December 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> [Accessed 11th September 2023]
4. Beatty ME, Letson GW, Margolis HS. Estimating the global burden of dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009;81(5 Suppl 1):231
5. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. [published correction appears in *Lancet.* 2013 Feb 23;381(9867):628. AlMazroa, Mohammad A [added]; Memish, Ziad A [added]] *Lancet.* 2012;380(9859):2095-2128. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0
6. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504-507. doi: 10.1038/nature12060
7. World Health Organization. [Ten threats to global health in 2019](https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019). January 2019. Retrieved December 2022. <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019> [Accessed 11th September 2023]
8. World Health Organization. (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188> [Accessed 11th September 2023]

9. Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):200-207. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0503
10. Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA. Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(2):e2055. doi: 10.1371/journal.pntd.0002055
11. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-496. doi: 10.1128/CMR.11.3.480
12. Jacobs M. Dengue: emergence as a global public health problem and prospects for control. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94(1):7-8, doi:10.1016/s0035-9203(00)90416-4
13. Guzman A, Istúriz RE. Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36 Suppl 1:S40-S42. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.018
14. Hotta S. Dengue and dengue viruses. *Tanaka print Co. Ltd, Kyoto, Japan.*
15. Asgarian TS, Vatandoost H, Hanafi-Bojd AA, Nikpoor F. Worldwide status of insecticide resistance of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*, vectors of arboviruses of chikungunya, engue, zika and yellow fever. *J Arthropod Borne Dis.* 2023;17(1):1-27. doi: 10.18502/jad.v17i1.13198
16. Seki N. 代々木公園を中心とした都内のデング熱国内感染事例発生について. *IASR.* Vol. 36 p. 37-38: 2015 年 3 月号. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2305-related-articles/related-articles-421/5449-dj4211.html> [Accessed 11th September 2023]
17. Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol.* 2002;156(1):40-51. doi: 10.1093/aje/kwf005

18. Gregory CJ, Santiago LM, Argüello DF, Hunsperger E, Tomashek KM. Clinical and laboratory features that differentiate dengue from other febrile illnesses in an endemic area--Puerto Rico, 2007-2008. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(5):922-929. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0552
19. Biswas HH, Ortega O, Gordon A, et al. Early clinical features of dengue virus infection in nicaraguan children: a longitudinal analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(3):e1562. doi: 10.1371/journal.pntd.0001562
20. Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, et al. Dengue infection in children in Ratchaburi, Thailand: a cohort study. II. Clinical manifestations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1520. doi: 10.1371/journal.pntd.0001520
21. Wills BA, Oragui EE, Dung NM, et al. Size and charge characteristics of the protein leak in dengue shock syndrome. *J Infect Dis.* 2004;190(4):810-818. doi: 10.1086/422754
22. Thein TL, Leo YS, Lee VJ, Sun Y, Lye DC. Validation of probability equation and decision tree in predicting subsequent dengue hemorrhagic fever in adult dengue inpatients in Singapore. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(5):942-945. doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0149
23. Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis.* 2002;6(2):118-124. doi: 10.1016/s1201-9712(02)90072-x
24. Hammond SN, Balmaseda A, Pérez L, et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(6):1063-1070.
25. Anders KL, Nguyet NM, Chau NV, et al. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City,

- Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(1):127-134. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0476
26. Trung DT, Thao le TT, Dung NM, et al. Clinical features of dengue in a large Vietnamese cohort: intrinsically lower platelet counts and greater risk for bleeding in adults than children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(6):e1679. doi: 10.1371/journal.pntd.0001679
  27. Murugesan A, Manoharan M. Dengue Virus. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens.* 2020;281–359. doi: 10.1016/B978-0-12-819400-3.00016-8
  28. Lindenbach BD, Thiel HJ, and Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Lippincot William & Wilkins, Philadelphia; 2011: 1101-1113.
  29. Henschel EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(4):376-396. doi: 10.1128/CMR.3.4.376
  30. Begum F, Das S, Mukherjee D, Mal S, Ray U. Insight into the tropism of dengue virus in humans. *Viruses.* 2019;11(12):1136. doi: 10.3390/v11121136
  31. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe.* 2009;5(4):365-375. doi: 10.1016/j.chom.2009.03.007
  32. Gubler DJ, Kuno G, and Markoff L. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin D, Lamb M, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincot William & Wilkins, Philadelphia, 2007: 1153-1252.
  33. Rudnick A. Ecology of dengue virus. *Asian Journal of Infectious Diseases.* 1978;2, 156-160.
  34. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med.* 1970;42(5):350-362.

35. Halstead SB. The Alexander D. Langmuir Lecture. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease. *Am J Epidemiol.* 1981;114(5):632-648. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113235
36. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952;1(1):30-50. doi: 10.4269/ajtmh.1952.1.30
37. Halstead SB. Dengue. *Lancet.* 2007;370(9599):1644-1652. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61687-0
38. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol.* 1969;89(4):422-434. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120955
39. Petersen NC, Boyle JF. Immunologic phenomena in the effusive form of feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res.* 1980;41(6):868-876.
40. Halstead SB, O'Rourke EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature.* 1977;265(5596):739-741. doi: 10.1038/265739a0
41. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 1977;146(1):201-217. doi: 10.1084/jem.146.1.201
42. Wills BA, Oragui EE, Stephens AC, et al. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic fever: Serial investigations in 167 Vietnamese children with dengue shock syndrome. *Clin Infect Dis.* 2002;35(3):277-285. doi:10.1086/341410
43. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(1):172-180. doi: 10.4269/ajtmh.1988.38.172
44. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop*

- Med Hyg.* 1988;38(2):411-419. doi: 10.4269/ajtmh.1988.38.411
45. Prompetchara E, Ketloy C, Thomas SJ, Ruxrungtham K. Dengue vaccine: Global development update. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2020;38(3):178-185. doi: 10.12932/AP-100518-0309
  46. Kariyawasam R, Lachman M, Mansuri S, Chakrabarti S, Boggild AK. A dengue vaccine whirlwind update. *Ther Adv Infect Dis.* 2023;10:20499361231167274. doi: 10.1177/20499361231167274
  47. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, et al. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. *N Engl J Med.* 2015;373(13):1195-1206. doi: 10.1056/NEJMoa1506223
  48. Tran NH, Chansinghakul D, Chong CY, et al. Long-term immunogenicity and safety of tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in healthy populations in Singapore and Vietnam: 4-year follow-up of randomized, controlled, phase II trials [published correction appears in *Hum Vaccin Immunother.* 2021 Jun 3;17(6):1877]. *Hum Vaccin Immunother.* 2019;15(10):2315-2327. doi: 10.1080/21645515.2019.1578595
  49. Sridhar S, Luedtke A, Langevin E, et al. Effect of dengue serostatus on dengue vaccine safety and efficacy. *N Engl J Med.* 2018;379(4):327-340. doi: 10.1056/NEJMoa1800820
  50. Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 - Recommendations. *Vaccine.* 2019;37(35):4848-4849. doi:10.1016/j.vaccine.2018.09.063
  51. Angelin M, Sjölin J, Kahn F, et al. Qdenga® - A promising dengue fever vaccine; can it be recommended to non-immune travelers? *Travel Med Infect Dis.* 2023;54:102598. doi: 10.1016/j.tmaid.2023.102598
  52. Osorio JE, Brewoo JN, Silengo SJ, et al. Efficacy of a tetravalent chimeric dengue vaccine (DENVax) in *Cynomolgus* macaques. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(6):978-987. doi:

10.4269/ajtmh.2011.10-0592

53. Biswal S, Reynales H, Saez-Llorens X, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children and adolescents. *N Engl J Med.* 2019;381(21):2009-2019. doi: 10.1056/NEJMoa1903869
54. Berger R, Just M, Glück R. Interference between strains in live virus vaccines, I: combined vaccination with measles, mumps and rubella vaccine. *J Biol Stand.* 1988;16(4):269-273. doi: 10.1016/0092-1157(88)90014-5
55. Berger R, Just M. Interference between strains in live virus vaccines. II: combined vaccination with varicella and measles-mumps-rubella vaccine. *J Biol Stand.* 1988;16(4):275-279. doi: 10.1016/0092-1157(88)90015-7
56. Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, et al. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(3):264-272. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.264
57. World Health Organization. Guidelines on the quality, safety and efficacy of dengue tetravalent vaccines (live, attenuated), Annex 2, TRS No 979. 8 October 2013. [https://www.who.int/publications/m/item/TRS\\_979\\_annex-2-dengue](https://www.who.int/publications/m/item/TRS_979_annex-2-dengue) [Accessed 11th September 2023]
58. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses.* 2012;4(1):62-82. doi: 10.3390/v4010062
59. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):4977-4983. doi: 10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005
60. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.

*EMBnet J.* 2011;17:10-12. doi: 10.14806/ej.17.1.200

61. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14),1754-1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
62. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
63. Yoksan S. A short history of dengue and Mahidol dengue vaccine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2017;48;Suppl 1.
64. Guidelines for proper conduct of animal experiments. Science Council of Japan 2006.
65. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988;239(4839):476-481. doi:10.1126/science.3277268
66. Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(5):910-913.
67. Ambuel Y, Young G, Brewoo JN, et al. A rapid immunization strategy with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine elicits protective neutralizing antibody responses in non-human primates [published correction appears in *Front Immunol.* 2014;5:436]. *Front Immunol.* 2014;5:263. doi: 10.3389/fimmu.2014.00263
68. Guy B, Barban V, Mantel N, et al. Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80(2):302-311.
69. Guy B, Jackson N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(1):45-54. doi: 10.1038/nrmicro.2015.2
70. Zellweger RM, Eddy WE, Tang WW, Miller R, Shresta S. CD8+ T cells prevent antigen-

- induced antibody-dependent enhancement of dengue disease in mice. *J Immunol.* 2014;193(8):4117-4124. doi: 10.4049/jimmunol.1401597
71. Weiskopf D, Bangs DJ, Sidney J, et al. Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(31):E4256-E4263. doi: 10.1073/pnas.1505956112
72. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003;9(7):921-927. doi: 10.1038/nm887
73. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* 2006;176(6):3821-3829. doi: 10.4049/jimmunol.176.6.3821
74. Simmons CP, Dong T, Chau NV, et al. Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *J Virol.* 2005;79(9):5665-5675. doi: 10.1128/JVI.79.9.5665-5675.2005
75. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2008;225:300-313. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00678.x
76. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(39):16922-16927. doi: 10.1073/pnas.1010867107
77. Kurane I, Matsutani T, Suzuki R, et al. T-cell responses to dengue virus in humans. *Trop Med Health.* 2011;39(4 Suppl):45-51. doi: 10.2149/tmh.2011-S09
78. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):532-543. doi: 10.1038/nri3014

79. Waickman AT, Friberg H, Gargulak M, et al. Assessing the diversity and stability of cellular immunity generated in response to the candidate live-attenuated dengue virus vaccine TAK-003. *Front Immunol.* 2019;10:1778. doi: 10.3389/fimmu.2019.01778
80. Sharma M, Glasner DR, Watkins H, et al. Magnitude and functionality of the NS1-specific antibody response elicited by a live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate. *J Infect Dis.* 2020;221(6):867-877. doi: 10.1093/infdis/jiz081
81. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology.* 1996 ;220(1):232-240. doi: 10.1006/viro.1996.0307
82. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol.* 1997;71(9):6650-6661. doi: 10.1128/JVI.71.9.6650-6661.1997
83. Panyasrivanit M, Khakpoor A, Wikan N, Smith DR. Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 2):448-456. doi: 10.1099/vir.0.005355-0
84. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med.* 2010;207(4):793-806. doi: 10.1084/jem.20092545
85. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol.* 2011;187(1):424-433. doi: 10.4049/jimmunol.1100750
86. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and

- NS4A. *Virology*. 1998;245(2):203-215. doi: 10.1006/viro.1998.9156
87. Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J Virol*. 2003;77(14):7804-7813. doi: 10.1128/jvi.77.14.7804-7813.2003
88. Liu WJ, Wang XJ, Mokhonov VV, Shi PY, Randall R, Khromykh AA. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J Virol*. 2005;79(3):1934-1942. doi: 10.1128/JVI.79.3.1934-1942.2005
89. Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*. 2005;79(13):8004-8013. doi: 10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005
90. Kümmerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol*. 2002;76(10):4773-4784. doi: 10.1128/jvi.76.10.4773-4784.2002
91. Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol*. 2008;82(10):4731-4741. doi: 10.1128/JVI.00002-08
92. Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol*. 1999;73(4):3108-3116. doi: 10.1128/JVI.73.4.3108-3116.1999
93. Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, et al. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(4):372-373.

doi: 10.1038/nsmb1073

94. Bazan JF, Fletterick RJ. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology*. 1989;171(2):637-639. doi: 10.1016/0042-6822(89)90639-9
95. Preugschat F, Yao CW, Strauss JH. In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B, and NS3. *J Virol*. 1990;64(9):4364-4374. doi: 10.1128/JVI.64.9.4364-4374.1990
96. Rodriguez-Madoz JR, Belicha-Villanueva A, Bernal-Rubio D, Ashour J, Ayllon J, Fernandez-Sesma A. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. *J Virol*. 2010;84(19):9760-9774. doi: 10.1128/JVI.01051-10
97. Warrenner P, Tamura JK, Collett MS. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J Virol*. 1993;67(2):989-996. doi: 10.1128/JVI.67.2.989-996.1993
98. Wengler G, Wengler G. The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology*. 1991;184(2):707-715. doi: 10.1016/0042-6822(91)90440-m
99. Heaton NS, Randall G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe*. 2010;8(5):422-432. doi: 10.1016/j.chom.2010.10.006
100. Chiou CT, Hu CA, Chen PH, Liao CL, Lin YL, Wang JJ. Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumour susceptibility gene 101 (TSG101) protein. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 10):2795-2805. doi: 10.1099/vir.0.19201-0
101. Patkar CG, Kuhn RJ. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *J Virol*. 2008;82(7):3342-3352. doi:

10.1128/JVI.02447-07

102. Carpp LN, Galler R, Bonaldo MC. Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. *Microbes Infect.* 2011;13(1):85-95. doi: 10.1016/j.micinf.2010.10.010
103. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol.* 1999;73(6):4611-4621. doi: 10.1128/JVI.73.6.4611-4621.1999
104. Jiang L, Yao H, Duan X, Lu X, Liu Y. Polypyrimidine tract-binding protein influences negative strand RNA synthesis of dengue virus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;385(2):187-192. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.036
105. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem.* 2007;282(12):8873-8882. doi: 10.1074/jbc.M609919200
106. McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J Biol Chem.* 2011;286(25):22147-22159. doi: 10.1074/jbc.M110.192500
107. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 9):2605-2614. doi: 10.1099/vir.0.81844-0
108. Bartholomeusz AI, Wright PJ. Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5. *Arch Virol.* 1993;128(1-2):111-121. doi: 10.1007/BF01309792

109. Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* 2002;21(11):2757-2768. doi: 10.1093/emboj/21.11.2757
110. Issur M, Geiss BJ, Bougie I, et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA.* 2009;15(12):2340-2350. doi: 10.1261/rna.1609709
111. Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, García-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol.* 2009;83(11):5408-5418. doi: 10.1128/JVI.02188-08