

2. 日本脳炎

竹上 勉

はじめに

本邦における日本脳炎の患者発生はここ30年間は目立った流行もなく、近年では感染患者数は年間数名のレベルで推移している。では日本脳炎ウイルス (JEV) は日本からいなくなったのだろうか? 否, 実際には日本各地に棲息 (?) している。また, 広く世界に目を向ければ日本脳炎感染地域は拡大していることがわかる。JEV の病原性は強いもので, 感染者に急性脳炎を起し, 致死率は感染者の約30%にもなる。また後遺症として神経, 精神障害を生じる¹⁾。こうした疫学的, 臨床的問題を抱えながら, JEV のウイルス学はそれほど進んでいないのが実状である。その理由には, 先進国における主要な疾病であるか否かが基礎研究の進展を決めている, とするからくりが見える。しかしながら, 少数とはいえ地道に進められている JEV 研究から近年におけるウイルス変異に関わる興味ある報告が出され, 注目されている^{2,3)}。現在の JEV を取り巻く課題について今一度整理し今後の研究方向を探っていきたい。

1. 最近の動向

近年のウイルス分布をみると, 1995年にオーストラリア北部で日本脳炎患者が出たことが話題になり, いままで報告されてない地域にウイルス侵入があったことが明らかになった^{4,5)}。いわゆるウォーレス線を越えて JEV 分布域が拡大していることが示されたのである。その原因として媒介蚊が強い風によってパプアニューギニアからオーストラリアにきた可能性が指摘されている⁵⁾。その拡大は続き, オーストラリア大陸には1998年に患者が出ている。オース

トラリアでの分離ウイルス株 FU については遺伝子解析が行われ特徴ある配列を有していることが明らかになった⁴⁾。

広くみると, 日本脳炎患者の数としては東南アジアが最も多く, 年間数万人に昇り, その20-40%が亡くなっている。感染者が出ている主なウイルス分布域は熱帯地域を含むタイ, ベトナム, カンボジア, ラオス等の東南アジアを中心にして, 南はインドネシア, 西はインド, 北はネパール, チベットそして台湾, 中国, 日本, 韓国の温帯地域と広範囲にわたっている⁶⁻⁹⁾。世界的視野に立てば, 日本脳炎は患者発生数を増やし, 感染域を拡大していると言える。決して克服されているとは言えないウイルス感染症の一つである。

2. 感染病態

日本脳炎の病態は高熱, 頭痛, 意識障害を起こす急性脳炎であり, 死亡率は約30%と高く, 回復してもその半数に精神, 神経障害を後遺症として残す。ウイルスの媒介蚊はアカイエカなどの *Culex* 類であり, 抹梢から蚊の刺し口, 血液を介して感染が起こる。ただ大部分の感染は不顕性感染であり, 顕性感染は0.1~1%とされている。しかし子供が感染し, 発症すると, 先に述べたような重い後遺症が残りやすく, 重篤なケースが続発する。1994-1997年のベトナムのホーチミン市における調査 (患者144名の134名が子供であり, その17名は死亡し, 33名に重度後遺症) でもそうした実態が明らかにされている¹⁾。

抹梢皮膚部から侵入したウイルスは末端のリンパ組織, 血液を介して増殖を広げ, さらに脳血管関門を通過して中枢に達する。そこでは脳内毛細血管内皮細胞を手始めに, 脳内細胞主として神経細胞に感染し, 視床, 大脳皮質, 小脳等に感染域を広げ, 臨床症状として意識障害, 発作を起こすことになる。しかし, 中枢への感染, 脳血管関門での状態, 神経細胞感染等の機構の詳細は必ずしも明らかではない。JEV 実験動物にはよくマウスが用いられるが, 感受性の高いマウスに比べ, ラットのウイルス感受性は低い。幼弱ラットを用いた実験から発生の段階によるウイルス感受性の違いが示されているが^{10,11)}, この点についての解析は不十分のままである。また, マウス株間での感受性の違いも示されていて, ウイルス感染増殖と宿主因子の関

金沢医科大学・総合医学研究所・分子腫瘍学研究部門
(〒920-0293 石川県河北郡内灘町)

Japanese encephalitis

Tsutomu Takegami

Division of Molecular Oncology and Virology, Medical
Research Institute, Kanazawa Medical University

Uchinade, Ishikawa, Japan 920-0293

TEL: 076-286-2211

FAX: 076-286-0521

e-mail: takegami@kanazawa-med.ac.jp

与が指摘されている。しかしながら、こちらもまた未解決の状態である。

3. 遺伝子の複製と発現

3-1 遺伝子構成と複製

JEVはフラビウイルス科に属し、プラス鎖1本鎖RNA(10977ヌクレオチド)をゲノムとするウイルスであり、ポリ蛋白(3432アミノ酸)をコードしている。ゲノムRNAには5'端と3'端に非コード領域(NCR)があり、ポリA鎖の付加はない^{12,13}。3'端NCRは580ヌクレオチドからなり特異な2次構造を有している¹⁴。コードされるウイルス蛋白はウイルス粒子に取り込まれる構造蛋白(C, prM, M, E)と感染細胞内においてウイルス複製に関わる非構造蛋白(NS1, NS2a/b, NS3, NS4a/b, NS5)から成り、各々は宿主細胞由来およびウイルス蛋白分解酵素NS3によってポリ蛋白がプロセッシングされて生じる。

遺伝子構成全長の解析は代表的なウイルス株については早く(1980年代)に行われた(JaOArS982株(1982年分離)¹²、北京株(1948年分離)¹³。構造蛋白領域を中心にした部分的なヌクレオチド解析は数多いが、全長ヌクレオチド解析が行われたJEVは限られていてその数は現在のところ18株である。全長解析はウイルス変異、病原性との関連をみる上で不可欠と考えられるが、日本での野外採取株の中で実験室でよく用いられているウイルスJaGAR01株の全長解析は1998年になってからであり¹⁵、全体としてこの視点からの解析は遅れていた。

ウイルスゲノムRNA複製機序については次のように記される。ウイルス感染直後に合成されるウイルス蛋白、NS5がRNA依存性RNAポリメラーゼとして作用し、マイナス鎖RNAが合成され、さらに感染細胞内の核膜周辺の膜画分における複製複合体の中でプラス鎖RNAが合成される^{16,17}。合成されたプラス鎖RNAはmRNAとして機能し、続いてウイルス蛋白が合成される。その後さらにプラス鎖RNAが多量に合成され、それらはゲノムRNAとしてコア蛋白と結合し、さらに他の構造蛋白M及びEと結合し、ウイルス粒子を形成し、さらに細胞外へと放出される。

3-2 各ウイルス蛋白の役割

<構造蛋白>

ウイルス蛋白の中でウイルス表面エンベロープ(E)糖蛋白(分子量53kDa)はもっとも良く解析され、その生理的役割も詳細に調べられている。E蛋白はウイルス感染時の細胞吸着に必須な蛋白であり、ウイルス中和抗体の認識蛋白となっている。後述のワクチンに直結する蛋白であるため、蛋白精製やE蛋白に対する単クローン抗体の作成等が1980年代から積極的に行われた¹⁸⁻²⁰。JEVと同じくフ

ラビウイルスに属するダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)のE蛋白については単クローン抗体を用いた解析を基盤にし、結晶解析によって最終的にドメインI、II及びIIIに分かれることが明らかにされた²¹。こうした構造解析は日本では少ないが欧米では盛んに行われ、フラビウイルス科のデングウイルスではE蛋白のみならずウイルス粒子構造全体が明らかにされている²²。今や、フラビウイルスを立体的にみる事が可能になってきた。

他の構造蛋白の中でコア(C)蛋白はウイルスRNAに結合し、ヌクレオカプシドを形成することが知られているが、M蛋白の機能については不明な点が多い。M蛋白はウイルス粒子構造においてE蛋白とヘテロ多量体を形成して、ウイルス感染時における細胞への吸着等で作用していることが推定されている。

<非構造蛋白>

ウイルス非構造蛋白NS1はウイルス感染に伴う細胞性免疫応答に関わる事が推察されているが詳細は不明である²³。またNS2a/bについてはNS3の補助因子の可能性はあるが、これも明確ではない。非構造蛋白の中で、比較的機能解析が進んでいるのがNS3(分子量70kDa)とNS5(分子量100kDa)である。NS3はアミノ末端側に蛋白分解酵素活性(セリンプロテアーゼ)があり、中央からカルボキシル側にATPaseそしてRNAヘリカーゼ活性を有している²⁴。NS3内部のアミノ酸配列DExHは酵素活性に関わる領域で、その領域のアミノ酸配列を部位特異的変異法で置換を行うと酵素活性の低下、ウイルス感染性が消失となることが示された²⁵。またNS5は先に述べたようにRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を有することが示されている。これらの蛋白が感染細胞の核膜周辺に局在していることは知られており、ウイルス複製複合体の主要蛋白として機能していると考えられている²⁶。NS4a/bについてもこうした複製複合体の構成蛋白と推定されている。後述する持続感染変異ウイルスの変異がこのNS4aに集中している事実からウイルス複製にNS4a領域に関わることが示唆される。

4. 病原性とウイルス変異

4-1 神経毒性

JEVによる神経毒性がどのような機序によるのかは不明であるが、一つには神経細胞に対する親和性があるという点である。免疫組織学的検索によって、ウイルスはグリア細胞ではほとんど感染せず、神経細胞での感染増殖が際立っていることが分かった^{27,28}。培養細胞株を用いた実験においても、グリア由来の細胞株MGC118におけるJEV感染増殖は他の細胞株に比べ、格段に低かった^{29,30}。こうした事実から神経細胞でのJEV複製関連宿主因子の存在が示唆されるが、残念ながらその実体は未だ不明である。親株と弱毒変異株の遺伝子解析結果からウイルス側におけ

る神経毒性関連領域としてはE蛋白が先ず上げられる。弱毒株 SA14-14-2 の解析からはE蛋白の279番目のアミノ酸が強毒株のMetからLysに変異しており、このヒンジ領域が神経毒に関わるとしている³¹⁾。保井らはやはり弱毒株の遺伝子解析からE蛋白の138番目のアミノ酸が毒性に関わっているとしている^{32,33)}。他の報告では306及び390番目のアミノ酸が関与するとされている³⁴⁾。それらはドメインⅢに関わる領域で、細胞へのウイルス吸着に関連する部位と推定されており、JEVの神経毒性の決定因子の一つは細胞（神経細胞）への吸着侵入のプロセスにあることは間違いない³⁵⁾。

4-2 持続感染

ウイルス持続感染は種々のウイルスで起こっている。フラビウイルスの仲間ではC型肝炎ウイルスによる慢性肝炎が直ぐ浮かぶ。サイトメガロウイルス、EBウイルスやパピローマウイルス等のDNAウイルスに比べ、RNAウイルスにおける持続感染では宿主遺伝子に組み込まれることはないが、宿主因子との相互作用のバランスの中でウイルスが存続していることでは共通している。JEVについては豚の血球細胞におけるウイルス持続感染が知られている。脳炎患者でのウイルス存続の有無が議論されたこともあるが、可能性は全く無しともいえないようだ。筆者は疑いのある例について血球からRNAを抽出し、そのサンプルについてRT-PCRを行ったが、JEV-RNAは検出されなかった。

培養細胞を用いたウイルス持続感染系の確立はこうした持続感染のモデルとして有効であろう。人肝細胞由来培養細胞株 KN73を用いることでJEV持続感染系を作り出すことができた³⁶⁾。この系では(1)変異ウイルスの出現と(2)宿主細胞におけるdsRNA誘導性蛋白キナーゼ(PKR)の活性とがウイルス持続感染の維持に必要であることが明らかになった。変異ウイルスの病原性は顕著に低下しており、マウスに対する毒性は親株のその1/1000以下となっていた。変異ウイルスのヌクレオチド解析を行った結果、興味深いことに非構造蛋白NS4aに変異が集中していた。この事実はウイルス持続感染成立とNS4aの機能との間に関連性があることを示唆している。未だ不明なNS4aの機能を探るうえに有効な切り口になると考えられる。持続感染ウイルスにはもう一箇所、注目すべき変異部位がある。3'末端NCRの終止コドン近傍における7-10ヌクレオチド欠損が見出された。ウイルス病原性の低下と関わるのかもしれない。インターフェロン経路に位置するPKRについてはピコルナウイルス(EMCV)を用いた解析でも持続感染につながるデータが出されており³⁷⁾、重要な因子であることはいうまでもない。

4-3 複製関連宿主因子

JEVを含めフラビウイルスは昆虫から人まで広く感染増殖するウイルスであり、宿主特異性は希薄である。また培養細胞株においては広範囲に感染し得ること等から、宿主域を決定するウイルスレセプターが存在するか否かについては否定的な論議がある。ただ、先に述べたように動物種によっては感受性がないものもあること、agingにより感受性が変化すること、さらに神経細胞親和性であること等からJEV複製に関わる何らかの宿主因子が存在することは確かなことと言える。培養細胞からウイルスのE表面蛋白と結合する宿主蛋白の検出が試みられ、実際に同定されたが、それがレセプターとは言えないまでも、ウイルス複製に関わる蛋白である可能性はある³⁸⁾。ウイルス複製に関わる領域と推定されるゲノムRNA 3'末端NCRと結合する宿主蛋白の検索も進んでいる³⁹⁾。ウエストナイルウイルスの3'NCR結合宿主蛋白の一つは蛋白合成伸長因子EFと推定されている⁴⁰⁾。

フラビウイルスに対する抵抗性遺伝子(Flv)は以前から知られていたが、その実体が次第に明らかにされつつある。ウエストナイルウイルス感染抵抗性マウスを用いてその遺伝子領域を狭め、最終的に突き止められたものは2'-5'-OA合成酵素遺伝子であった⁴¹⁾。同様なことがJEVでも言えると考えられる。今後のさらなる解析が必要である。

4-4 ウイルス変異

遺伝子解析を元にしてウイルス分類を改めて行おうとする視点は他のウイルス同様、JEVについても行われ⁴²⁾、現在では5型(初期には4型)に分類されている。初期にはウイルス構造蛋白領域の一部prMについてのヌクレオチド配列の比較だけでウイルス遺伝子型別にしていたことからこうした分類に対して批判的な意見も多かったが、その後E蛋白あるいは全長の配列の比較から分類していくことが行われ受け入れられている。現在、遺伝子型はI型からV型まで分類されている。これまで日本における分布ウイルスは全てⅢ型であり、分離ウイルスとしては最古の中山株(1935年分離)始めJaGAR01株(1959年分離)あるいはワクチン株として用いられている北京株(1948年分離)についても同じように分類される。他方、東南アジアでの主流の遺伝子型はI型であり⁴³⁾、この種類のウイルスが広く分布していた。

ところが、1990年代に入って様相が変わってきた。1994年に高島らにより石川県の豚の血球から分離されたJEV(石川株)は配列解析からどうやらこれまで日本で分離されているウイルス株とは異なり、I型に分類される株であることが判明したのである⁴⁴⁾。また石川株の遺伝子配列で興味深い点としてゲノムRNA 3'末端NCRに13ヌクレオチドの欠損があることが分かった⁴⁴⁾。1994年以前のJEV分離株について、特に都立衛生研の吉田らによって継続し

て分離されている東京株で注意して比較してみると、どうやら1990年頃に遺伝子型の異なるウイルスの侵入があったようである。また韓国で分離されたK94P05株（1994年分離）で比較すると、これも韓国にそれ以前にみられていたⅢ型株ではなく、Ⅰ型株であることが分かった。こうした事実から1990年代にアジア北部に新たな種類のウイルス株が分布域を広げていたことが明らかになった。こうしたウイルス分布の実態について最近 Solomon ら^{2,3)}はウイルスの起源、進化的側面から論じ、JEVの起源はマレーシア-インドネシア域にあるとしているが、それにとどまらず、近年のある時期にこうした大変動があったことは環境の変化と関係はないのだろうか、とする視点もありうるように思う。

5. ワクチン及び抗ウイルス剤

5-1 ワクチン

本邦における日本脳炎の流行は1960年代を最後にして大規模流行はなくなった。その理由には媒介蚊の生息数を減少させたこと、生活様式の変化等もあるが、大きな理由の一つには不活化ワクチン接種が積極的に行われたことがあげられる。それは韓国でも同じ状況である。韓国では日本での流行時に遅れて1970年代に大きな流行がみられたが、日本と同じく不活化ワクチンの接種によって、1982年の約1200名感染者報告を最後にして、今や脳炎流行は抑えられている。しかし、マウス脳を材料とする日本型不活化ワクチンはアレルギー等の副作用を起こす可能性があることとされ、欧米での評価は芳しくない。これに変わるものとして、最近では Vero 細胞において増殖させたウイルスを不活化し、それをワクチンに用いようとしている。他方では中国を中心とする弱毒ワクチンあるいはキメラワクチンを含む DNA ワクチンの開発が行われている⁴⁵⁾。

DNA ワクチンには発現プラスミドに JEV の prM-E あるいは E 蛋白領域を挿入し、発現ベクターを構築し、それを接種するというものである。これまでの報告では中和抗体の上昇は若干はみられるが大きくはない。しかしウイルス感染防御は顕著にみられた⁴⁶⁻⁴⁹⁾。そこでは中和抗体のみならず、細胞性免疫も関わっているとする考えもある。しかし、チャレンジウイルス感染直後の中和抗体上昇の程度からするとやはり中和抗体が防御の要であるといえよう。キメラワクチンとしては黄熱病ウイルスベクターを基盤にして JEV-E 領域を発現させようとするものがあり、それは抗原発現にはより効果的であろう⁴⁵⁾。

5-2 抗ウイルス剤

フラビウイルス複製増殖に対する阻害剤はいくつか報告されている。ウイルス一般に対する特異性があるか否かで区別される2種類のタイプの抗ウイルス剤(候補)がある。前者の代表として、インターフェロンの使用は日本脳炎で

も臨床的に既に試みられている⁵⁰⁾。特異性は無いが JEV 増殖阻害効果がみられたものにはスラミン⁵¹⁾、FNQ⁵²⁾その他⁵³⁾がある。それらに比べ、より特異性が高いと期待されるのはウイルス独自の酵素、例えば蛋白分解酵素 NS3 あるいは RNA ポリメラーゼ NS5 に対する阻害剤であろう⁵⁴⁾。最近では、特定のウイルス配列領域に対応する RNAi が特異性の高いウイルス複製阻害剤候補として注目されている。

おわりに

これから日本脳炎ウイルスはどこへ行くのか？将来的には温暖化の影響について、より注意しておくことが必要であろう。NYにおけるウェストナイルウイルスによる流行については無論のこと、他のウイルス感染症と共に節足動物媒介のフラビウイルス感染症について関心を持つべきであろう^{3,55)}。最近、気になる報告がヨーロッパから出されている。JEV グループに属する USUTU ウイルスがヨーロッパに現れたとの報告がある⁵⁶⁾。今後はウイルス分布域の変動、拡大がさらに進む可能性は高い。

ウイルスの動向について鳥瞰的に見ると共にミクロ的に見る必要がある。ウイルス複製に関わるウイルス蛋白と宿主細胞との相互作用についてはより深く解析していくことが肝要であろう。それが日本脳炎ウイルス特有の感染複製機序を明らかにし、さらには効果的ウイルス感染防御の方式を見出すことにも通じるであろう。

(なお本邦には日本脳炎ウイルス関連研究の情報交換の場として38年間継続している「日本脳炎ウイルス生態学研究会」及び10年前から続く「トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会」があり、活動していることを付記する)

文 献

- 1) Solomon T, Dung N M, Kneen R, Thao le T T, Gainsborough M, Nisalak A, Day N P, Kirkham F J, Vaughn D W, Smith S, White N J : Seizures and raised intracranial pressure in Vietnamese patients with Japanese encephalitis. *Brain* **125** : 1084-1093, 2002.
- 2) Solomon T, Ni H, Beasley D W C, Ekkelenkamp M, Cardosa M J, Barrett D T : Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia. *J Virol.* **77**, 3091-3098, 2003.
- 3) Chin G : Mapping virus history. *Science* **300** : 19, 2003.
- 4) Williams D T, Wang L, Daniels P W, Machenzie J S : Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. *J gen Virol* **81** : 2471-2480, 2000.
- 5) Ritchie S A, Rochester W : Wind-blown mosquitoes and introduction of Japanese encephalitis into Australia. *Emerg Infect Dis* **7** : 900-903, 2001.
- 6) Chattopadhyay U K : A study on the status of Japanese encephalitis infection in Arunachal Pradesh. *J Commun Dis* **33** : 261-265, 2001.

- 7) Vрати S, Agarwal V, Malik P, Wani S A, Saini M : Molecular characterization of an Indian isolate of Japanese encephalitis virus that shows an extended lag phase during growth. *J gen Virol* **80** : 1665–1671, 1999.
- 8) Chang K J : Seasonal prevalence of anti-Japanese encephalitis virus antibody in pigs in different regions of Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* **35** : 12–16, 2002.
- 9) Srey V H, Sadones H, Ong S, Maam M, Yim C, Sor S, Grosjean P, Reynes J M, Grosjean P, Treynes J M : Etiology of encephalitis syndrome among hospitalized children and adults in Takeo, Cambodia, 1999–2000. *Am J Trop Med Hyg* **66** : 200–207, 2002.
- 10) Ogata A, Nagashima K, Hall W W, Ichikawa M, Kimura-Kuroda J, Yasui K : Japanese encephalitis virus neurotropism is dependent on the degree of neuronal maturity. *J Virol* **65** : 880–886, 1991.
- 11) Kimura-Kuroda J, Ichikawa M, Ogata A, Nagashima K, Yasui K : Specific tropism of Japanese encephalitis virus for developing neurons in primary rat brain culture. *Arch Virol* **130** : 477–484, 1992.
- 12) Sumiyoshi H, Mori C, Fuke I, Morita K, Kuhara S, Kondou J, Kikuchoi Y, Nagamatu H, Igarashi A : Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. *Virology* **161** : 497–510, 1987.
- 13) Hashimoto H, Nomoto A, Watanabe K, Mori T, Takezawa T, Aizawa C, Takegami T, Hiramatsu K : Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the genome of Japanese encephalitis virus Beijing-1 strain. *Virus Genes* **1** : 305–317, 1988.
- 14) Takegami T, Washizu M, Yasui K : Nucleotide sequence at the 3' end of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *Virology* **152** : 483–486, 1986.
- 15) Mangada M N M, Takegami T : Molecular characterization of the Japanese encephalitis virus representative immunotype strain JaGAR01. *Virus Res* **59** : 101–112, 1999.
- 16) Takegami T, Hotta S : Synthesis and localization of Japanese encephalitis virus RNAs in the infected cells. *Microbiol Immunol* **34** : 849–857, 1990.
- 17) Uchil P D, Satchidanandam V : Characterization of RNA synthesis, replication mechanism, and *in vitro* RNA-dependent RNA polymerase activity of Japanese encephalitis virus. *Virology* **307** : 358–371, 2003.
- 18) Takegami T, Miyamoto H, Nakamura H, Yasui K : Biological activities of the structural proteins of Japanese encephalitis virus. *Acta Virol* **26** : 312–320, 1982.
- 19) Kimura-Kuroda, Yasui K : Topographical analysis of antigenic determinants on envelope glycoprotein V 3 (E) of Japanese encephalitis virus, using monoclonal antibodies. *J Virol* **45** : 124–132, 1983.
- 20) Hasegawa H, Yoshida M, Shiosaka T, Fujita S, Kobayashi Y : Mutation in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* **191** : 158–165, 1992.
- 21) Rey F A, Heinz F X, Mandl C, Kunz C, Harrison S C : The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375** : 291–298, 1995.
- 22) Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus : implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108** : 717–725, 2002.
- 23) Lin Y, Chen L, Liao C, Yeh C, Ma S, Chen J, Huang Y, Chen S, Chiang H : DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS 1 elicits protective immunity in mice. *J Virol* **72** : 191–200, 1998.
- 24) Takegami T, Sakamuro D, Furukawa T : Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS 3 has RNA binding and ATPase activities. *Virus Gene* **9** : 105–112, 1994.
- 25) Utama A, Shimizu H, Hasebe F, Morita K, Igarashi A, Shoji I, Matsuura Y, Hatsu M, Takamizawa K, Hagiwara A, Miyamura T : Role of the DExH motif of the Japanese encephalitis virus and hepatitis C virus NS 3 proteins in the ATPase and RNA helicase activities. *Virology* **273** : 316–324 2000
- 26) Takegami T, Hotta S : *In vitro* synthesis of Japanese encephalitis virus (JEV) RNA : membrane and nuclear fractions of JEV-infected cells possess high levels of virus-specific RNA polymerase activity. *Virus Res* **13** : 337–350, 1989.
- 27) Kimura-Kuroda J, Ichikawa M, Ogata A, Nagashima K, Yasui K : Specific tropism of Japanese encephalitis virus for developing neurons in primary rat brain culture. *Arch Virol* **130** : 477–484, 1993.
- 28) Wang J J, Liao C L, Yang C L, Lin Y L, Chiou C T, Chen L K : Localization of NS 3 and E protein in mouse brain infected with mutant strain of Japanese encephalitis virus. *Arch Virol* **43** : 2353–2369, 1998.
- 29) Sahara M, Takegami T : Reproduction of Japanese encephalitis virus in human glioma cells, 118MGC : Inhibitory effect of host factor(s). *Virus* **39** : 129–136, 1989. (in Japanese)
- 30) Takegami T : Flavivirus RNA replication and involvement of host factors. *Virus* **46** : 91–97, 1996. (in Japanese)
- 31) Monath T P, Arroyo J, Levenbook I, Zhang Z X, Catalan J, Draper K, Guirakhoo F : Single mutation in the flavivirus protein hinge region increase neurovirulence for mice and monkeys but decreases viscerotropism for monkeys : relevance to development and safety testing of live, attenuated vaccines. *J Virol* **76** : 1932–1943, 2002.
- 32) Yasui K : Neuropathogenesis of Japanese encephalitis virus. *J Neurovirol Suppl* **2** : 112–114, 2002.
- 33) Morita K, Tadano M, Nakaji S, Kosai K, Mathenge EG, Pandey BD, Hasebe F, Inoue S, Igarashi A. : Locus of a virus neutralization epitope on the Japanese encephalitis virus envelope protein determined by use of long PCR-based region-specific random mutagenesis. *Virology* **287** : 417–426, 2001.
- 34) Lee E, Lobigs M : Mechanism of virulence, attenuation of glycosaminoglycan binding variants of Japanese encephalitis virus and Murray Valley encephalitis virus. *J Virol* **76** : 4901–4911, 2002.
- 35) Lin C Wu S : A functional epitope determinant on do-

- main III of the Japanese encephalitis virus epitope protein interacted with neutralizing antibody combining sites. *J Virol* **77** : 2600-2606, 2003.
- 36) Feng G, Takegami T, Zhao G : Characterization and E protein expression of mutant strains during persistent infection of KN73 cells with Japanese encephalitis virus. *Chin Med J* **115** : 1324-1327, 2002.
- 37) Yeung M C, Chang D L, Camantigue R E, Lau A : Inhibitory role of the host apoptogenic gene PKR in the establishment of persistent infection by encephalomyocarditis virus in U937 cells. *Proc NAS*, **96** : 11860-11865, 1999.
- 38) Kimura T, Kimura-Kuroda J, Nagashima K, Yasui K. Analysis of virus-cell binding characteristics on the determination of Japanese encephalitis virus susceptibility. *Arch Virol* **139** : 239-251, 1994.
- 39) Malancha T A, Vрати S : Mov34 protein from mouse brain interacts with the 3' noncoding region of Japanese encephalitis virus. *J Virol* **74** : 5108-5115, 2000.
- 40) Li W, Brinton MA : The 3' stem loop of the West Nile virus genomic RNA can suppress translation of chimeric mRNAs. *Virology* **287** : 49-61, 2001.
- 41) Perelygin AA, Scherbik SV, Zhulin IB, Stockman BM, Li Y, Brinton MA : Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *Proc NAS* **99** : 9322-9377, 2002
- 42) Chen W C, Tesh R B, Rico-Hesse R : Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature. *J gen Virol* **71** : 2915-2922, 1990.
- 43) Ali A, Igarashi A, Paneru L R, Hasebe F, Morita K, Takagi M, Suwonkerd W, Tsuda Y, Wada Y : Characterization of two Japanese encephalitis virus strain isolated in Thailand. *Arch Virol* **140** : 1557-1575, 1995.
- 44) Takegami T, Ishak H, Miyamoto C, Shirai Y, Kamimura K : Isolation and molecular comparison of Japanese encephalitis virus in Ishikawa, Japan. *Jpn J Infect Dis* **53** : 178-180, 2000.
- 45) Monath T P : Japanese encephalitis vaccines : current vaccine and future prospects. *Curr Top Microbiol Immunol* **267** : 105-138, 2002.
- 46) Chen H, Pan C, Liao M, Jou R, Tsai C, Wu H, Lin Y, Tao M : Screening of protective antigens of Japanese encephalitis virus by DNA immunization : a comparative study with conventional viral vaccines. *J Virol* **73** : 10137-10145, 1999.
- 47) Konishi E, Yamaoka M, Win K, Kurane I, Mason P : Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *J Virol* **72** : 4925-4930, 1998.
- 48) Konishi E, Yamaoka M, Win K, Kurane I, Takada K, Mason P : The anamnestic neutralizing antibody response is critical for protection of mice from challenge following vaccination with a plasmid encoding the Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *J Virol* **73** : 5527-5534, 1999.
- 49) Zhao Z, Wakita T, Yasui K. : Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus PrM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in BALB/c mice. *J Virol* **77** : 4248-4260, 2003.
- 50) Solomon T, Dung NM, Wills B, Kneen R, Gainsborough M, Diet TV, Thuy TT, Loan HT, Khanh VC, Vaughn DW, White NJ, Farrar JJ. : Interferon alfa-2a in Japanese encephalitis : a randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* **361** : 821-826, 2003.
- 51) Xu K, Takegami T : Antiviral activity of Suramin : inhibitory effect on Japanese encephalitis virus replication. *Jpn J Trop Med Hyg* **24** : 99-105, 1996. (in Japanese)
- 52) Takegami T, Simamura E, Hirai K, Koyama J : Inhibitory effect of furanonaphtoquinone derivatives on the replication of Japanese encephalitis virus. *Antiviral Res* **37** : 37-45, 1998.
- 53) Andoh T, Kawamata H, Umatake M, Terasawa K, Takegami T, Ochiai H : Effect of bafilomycin A 1 on the growth of Japanese encephalitis virus in Vero cells. *J Neurovirol* **4** : 627-631, 1998.
- 54) Borowski P, Deinert J, Schalinski S, Bretner M, Ginalski K, Kulikowski T, Shugar D : Halogenated benzimidazoles and benzotriazoles as inhibitors of the NTPase/helicase activities of hepatitis C and related viruses. *Eur J Biochem* **270** : 1645-1653, 2003.
- 55) Shlim D R, Solomon T : Japanese encephalitis vaccine for travelers : exploring the limits of risk. *Clin Infect Dis* **35** : 183-188, 2002
- 56) Weissenbock H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N : Emergence of USUTU virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis* **8** : 652-656, 2002.