

## 5. フラビウイルス

石川 知弘<sup>1)</sup>, 小西 英二<sup>2)</sup>

1) 獨協医科大学医学部微生物学講座,

2) 大阪大学微生物病研究所デングワクチン (阪大微生物病研究会) 寄附研究部門

フラビウイルス科フラビウイルス属は、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルスなど、全世界で公衆衛生学的問題となる感染症を起こす病原体を多く含む。これらウイルスはヒト以外の哺乳動物や鳥類が保有宿主・増幅動物となり、蚊またはダニにより媒介されるため、完全に自然界から排除することは不可能である。近年、ウイルスの宿主細胞内での複製機構や構造、免疫回避機構などが急速に解明されて来たため、これまでにない新しい抗ウイルス薬やワクチンの開発が可能となっている。本総説では、最新の知見を踏まえて、フラビウイルスの複製機構・免疫回避機構を解説するとともに、ワクチン・抗ウイルス薬開発の現状について紹介する。

### 1. はじめに

フラビウイルス科フラビウイルス属は、+鎖RNAをゲノムとするエンベロープウイルスで構成される。70種以上のウイルスが存在し、その殆どが吸血性節足動物により媒介される。蚊媒介性フラビウイルスとしては、日本脳炎ウイルス (JEV)、デングウイルス (DENV)、ウエストナイルウイルス (WNV)、黄熱ウイルス (YFV) などがあり、ダニ媒介性フラビウイルスとしては、ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) などが挙げられる<sup>1)</sup>。この他に媒介動物不明のフラビウイルスが14種報告されている。

フラビウイルス属には、日本脳炎やダニ媒介性脳炎、デング出血熱など、全世界で公衆衛生学的な問題となっている

る感染症を引き起こす病原体が多く含まれる。JEV, YFV, TBEV 感染症に対するヒト用認可ワクチンは存在するが、それぞれ年間数千～数万例以上の患者が現在でも世界で報告されている。ヒト以外の動物が保有・増幅宿主となること、感染蚊あるいは感染ダニとの接触を完全に絶つことは困難であるため、特異的治療法やワクチンの開発は重要課題である。本稿では、フラビウイルスの生活環・疫学、構造と複製機構、免疫応答・回避機構について解説し、最近のワクチン・治療薬開発についても紹介する。

### 2. フラビウイルスの生活環・疫学

JEV は、1935年に患者脳から初めて分離された<sup>2)</sup>。自然界では、鳥類が保有宿主として働き、鳥類と媒介蚊によって生活環を維持している<sup>3)</sup>。多くの哺乳類において抗体が検出されるが<sup>4-9)</sup>、そのウイルス血症のレベルや持続期間からブタが最も重要な増幅動物であると考えられている<sup>10)</sup>。ヒトおよびウマは感染し、脳炎を発症するが、ウイルス血症レベルは高くないことから終末宿主である<sup>1)</sup>。コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) が重要な媒介蚊である<sup>7,11)</sup>。

JEV は東アジア、南アジア、東南アジアに広く分布している (図1)。1995年には、オーストラリア北部のトレス海峡諸島に侵入し<sup>12)</sup>、その後オーストラリア本土でもJEVが分離されるなど<sup>13)</sup>、その分布域は現在も拡大している。JEVはI-V型の遺伝子型があり<sup>14)</sup>、インドネシアマレーシア地域を起源として各地に特定の遺伝子型ウイルスが伝播していると考えられている<sup>15)</sup>。我が国では、III

#### 連絡先

〒321-0293

栃木県下都賀郡壬生町北小林 880

獨協医科大学医学部微生物学講座

TEL: 0282-87-2131

FAX: 0282-86-5616

E-mail: toishika@dokkyomed.ac.jp

〒565-0871

大阪府吹田市山田丘 3 番 1 号

大阪大学微生物病研究所デングワクチン (阪大微生物病研究会) 寄附研究部門

E-mail: ekon@biken.osaka-u.ac.jp

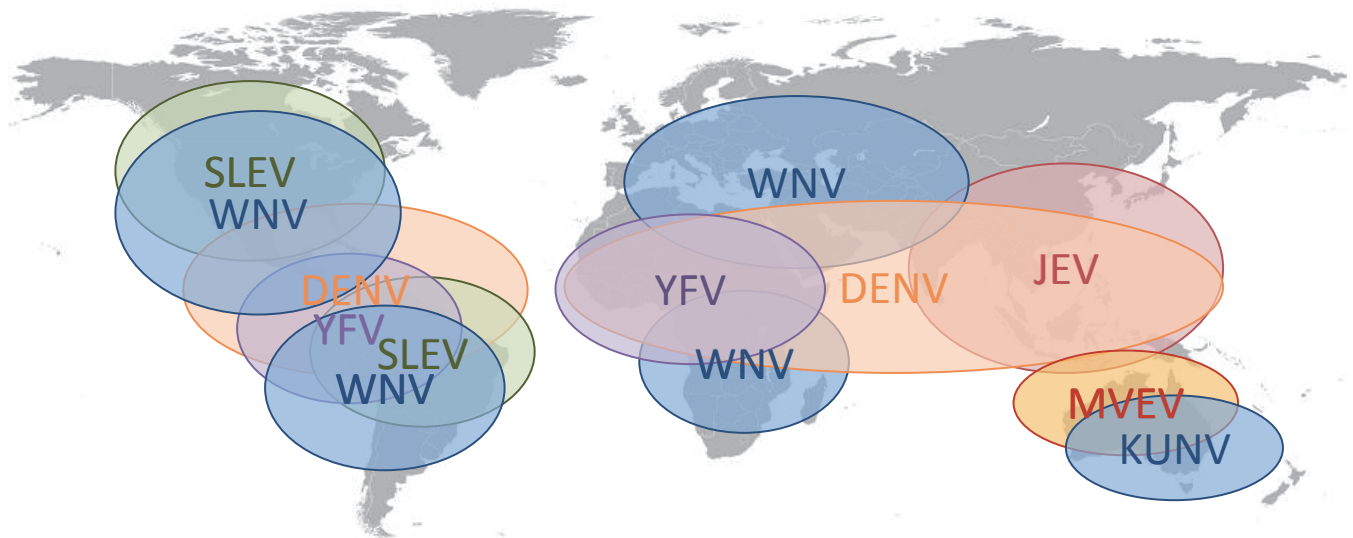


図1 フラビウイルスの分布

フラビウイルスの地理的分布を示す。JEV: 日本脳炎ウイルス, WNV: ウエストナイルウイルス, DENV: デングウイルス, YFV: 黄熱ウイルス, SLEV: セントルイス脳炎ウイルス, KUN: クンジンウイルス, MVEV: マレー渓谷脳炎ウイルス。

型ウイルスが主流であったが、90年頃からI型ウイルスが主流になっている<sup>16-19</sup>。同様の遺伝子型の移行は他の地域でも観察されているが<sup>3</sup>、そのメカニズムはよくわかっていない。さらに遺伝子型V型ウイルスが2009年に中国で<sup>20</sup>、2010年に韓国で<sup>21</sup>初めて分離されたことから、我が国にもV型ウイルスが侵入する可能性が示唆される。熱帯地域では1年を通してJEVの活動が認められるが、雨期開始後がその活動のピークである<sup>7,22</sup>。我が国を含む亜熱帯・温帯地域では、稲作期の蚊の増加に伴い5・6月から9・10月に流行が認められる<sup>7,22</sup>。

ヒトにおけるJEV感染症は殆どが不顕性感染である(顕性・不顕性感染比は1:25-1:1000)<sup>23,24</sup>。感染後5-15日の潜伏期を経て、発熱、髄膜炎、脳炎と様々な症状を呈する<sup>24</sup>。発症すると致死率が5-40%と比較的高く<sup>1</sup>、生残例でも精神神経学的後遺症を20-50%と高確率で認めることが特徴である<sup>25-31</sup>。現在、我が国での発症は年間10例以下であるが、世界では年間30,000-50,000例の発症報告がある<sup>2</sup>。

DENVには1型から4型の4種が存在し、DENV1・DENV2は1943, 1944年<sup>32,33</sup>に、DENV3・DENV4は1950年代<sup>34</sup>に初めて分離された。DENVは森林型生活環と都市型生活環を有している<sup>35</sup>。森林型生活環では、サル-蚊-サルの間で維持されている。主要な媒介蚊は、*Aedes luteocephalus*, *Aedes furcifer*, *Aedes niveus* spp.などのシマカである。一方、都市型生活環ではヒト-蚊-ヒトの間で維持されており、ヒトが唯一の保有宿主とされている。主要な媒介蚊は、*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis*などのシマカである。

DENV感染症にはデング熱と重症型のデング出血熱(DHF)・デングショック症候群(DSS)という2つの病態がある。DENVはアフリカ、南アジア、東南アジア、中南米の熱帯地域に広く分布しており(図1)、年間5,000万-1億例のデング熱患者が推定され、50万例のDHF・DSS患者が発生し、2万人以上の死者が報告されている<sup>2</sup>。デング熱は、感染後3-14日の潜伏期を経て、発熱、頭痛などの症状が3-7日持続する<sup>36</sup>。急性期に2-10日間のウイルス血症が観察される<sup>37</sup>。重症型のDHF・DSSは、デング熱の症状を呈した後、出血熱症状、血管透過性の亢進、血小板減少が認められる<sup>36,38</sup>。そのため、急性期においてデング熱とDHF・DSSとを鑑別するのは困難である。DHF・DSSでは、ウイルス血症レベルがデング熱と比して10-100倍高値を示す<sup>39</sup>。特にアジアでは15歳以下の小児でDHF・DSSの発症が多い傾向がある<sup>40,41</sup>。また、輸血<sup>42</sup>、臓器移植<sup>43</sup>、幹細胞移植<sup>44</sup>によるデング熱及びDHF・DSSの発症も報告されており、不顕性感染者からの血液・臓器提供に対する対策が必要である<sup>45</sup>。

DENV感染症における重症化のメカニズムについては、完全には解明されていない。宿主側の遺伝的要因や感染したウイルスの病原性因子なども報告されている<sup>46</sup>。1960年代にタイ国で行われた調査によると、重症化症例の85%が2回目以降の感染で、且つ既感染型と異なる型のウイルス感染時に発症したこと<sup>47</sup>、さらに乳児における母親由来の移行抗体の関与が報告されている<sup>48</sup>ことから、何らかの免疫システムが重症化に関わっていると考えられる。中でも、抗体依存性感染増強(ADE)の関与が強く示唆されている。既存の抗DENV抗体が異なる型のDENVに

対し交差的に結合した場合、あるいは、抗体濃度が低下した状態では中和が起こらず、ウイルス-抗体複合体がFcγレセプターを有する細胞に取り込まれ、結果的に抗体が無い場合と比較して、ウイルス感染細胞数が増加し、産生・放出されるウイルスが増加する<sup>49-51</sup>ことで重症化すると考えられる。さらに、非構造タンパクの1つであるNS1による補体システムへの関与<sup>52-54</sup>や、抗NS1抗体による細胞傷害が報告されている<sup>55,56</sup>。これら様々な要因が複合的に関与し、重症化が起こると考えられている<sup>46</sup>。

WNVは1937年に初めて分離された<sup>57</sup>。自然界では鳥類が保有宿主(増幅動物)となり、トリ-蚊-トリの生活環を有す。多種の蚊がWNVを媒介可能であるが<sup>58</sup>、イエカが中心である。アフリカ・ヨーロッパでは*Culex pipiens*, *Culex univittatus*, *Culex antennatus*が、アジアでは*Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui*, *Culex pseudovishnui*が、オーストラリアでは*Culex antennatus*が、アメリカでは*Culex pipiens*, *Culex restuans*, *Culex tarsalis*, *Culex quinquefasciatus*が重要である<sup>58</sup>。多くの脊椎動物が感染するが殆どは不顕性感染である<sup>59</sup>。ヒト及びウマは終末宿主となる。

WNVはアフリカ、ヨーロッパ、中東、中央アジア、ロシアに分布していた(図1)。オーストラリアにはクジンウイルスとして存在する。1999年、初めてアメリカに侵入し<sup>60</sup>、現在までに北米さらに中南米にまで拡大している<sup>61</sup>。ヒトにおけるWNV感染症は、温帯・亜熱帯地域では、夏から秋にかけて多く見られ<sup>62</sup>、熱帯地域では蚊が多くなる雨期に感染患者が増加すると考えられるが詳しい調査がなく不明である。1990年代中頃までは、神経症状を伴うような大きな流行はあまり報告されていないが、90年代中頃以降にはロシア、アメリカ、ルーマニア、イスラエルなどで致死性神経症状を伴う流行が起こるようになっていく<sup>63</sup>。

ヒトにおけるWNV感染症では、通常潜伏期は2-14日で、約80%が不顕性感染である<sup>64</sup>。発症すると、発熱、疲労感、頭痛、消化管症状などの軽度な病態から、髄膜炎や脳炎などの重篤な病態までを呈し、後遺症が認められることもある<sup>64</sup>。殆どの感染経路は感染蚊による刺咬であるが、輸血<sup>65</sup>、臓器移植<sup>66</sup>、経胎盤<sup>67</sup>、母乳<sup>68</sup>からの感染報告がある。

YFVは1927年に初めて分離され<sup>69</sup>、アフリカ及び南米に分布している(図1)。森林型と都市型の生活環を有している。森林型生活環では、サル-蚊-サルで維持され、*Aedes africanus*や*Haemagogus*属の蚊が主要な媒介蚊である<sup>70</sup>。都市型生活環ではヒト-蚊-ヒトの生活環を有し、*Aedes aegypti*が主要な媒介蚊である<sup>70</sup>。ヒトにおけるYFV感染症では、発熱、頭痛、嘔吐などの軽度な症状から、多臓器不全、出血熱などの致死的な症状を呈する<sup>71</sup>。初期症状の後、3-4日で症状は寛解し、多くはこの時点で

回復するが、発症者の25%は重篤な病態に移行し、内50%が死に至る。アフリカを中心に年間20万例の患者発生が推定されている。

TBEVは1937年に初めて分離され、ヨーロッパ、ロシア、中央アジア、東アジアに分布している(図1)。TBEVはヨーロッパ型、シベリア型、極東型の3つの亜型がある。TBEVはマダニと多くの哺乳動物、特にげっ歯類との間で維持されており<sup>72</sup>、ヨーロッパ型TBEVにおいては*Ixodes ricinus*が、シベリア型及び極東型TBEVにおいては、*Ixodes persulcatus*が主要な媒介ダニである<sup>73</sup>。ヒトTBEV感染症では、4-28日間の潜伏期の後、2相性の病態を呈するのが典型である。発熱、疲労感、頭痛などの症状が2-10日続き、その後1-21日間無症状期間があり、髄膜炎や脳炎を起こす(致死率は0-1.4%である。)<sup>73,74</sup>。慢性感染が観察されるのも本感染症の特徴である<sup>75</sup>。ヒトTBEV感染症は殆どが感染ダニ(若虫期、成虫期)による刺咬によるものであるため、ダニの活動が活発になる4月から10月に発生することが多い<sup>72</sup>。年間3,000例の症例発生が推定されている<sup>72,73</sup>。

### 3. 構造と複製機構

フラビウイルスゲノムは全長約11kbの+鎖RNAで、5'端にはcap構造を有しているが、3'端はpoly-A構造を有していない<sup>76</sup>。このゲノム上には一つの読み取り枠があり、3種の構造タンパク(C, prM, E)と7種の非構造タンパク(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5)がコードされている<sup>77</sup>(図2)。Cの5'端及び3'非翻訳領域に相補的な環状化配列があり、RNA複製に必須であることが報告されている<sup>78,79</sup>。さらに近年、DENV及びWNVにおいて、ウイルス複製に必須な別の環状化配列が報告され<sup>80,81</sup>、2種類の相補的配列を用いてゲノムRNAが環状化していることが明らかになっている。環状化により、翻訳時のリボソームの効率的な(再)活用が可能となると考えられている。

Cタンパクは2量体を形成し<sup>82,83</sup>、ゲノムRNAと共にヌクレオカプシドを形成する<sup>84</sup>。prMタンパクはMタンパクの前駆体であり、成熟過程においてゴルジ体酵素であるフリンにより切断されMタンパクとなる<sup>85</sup>。ウイルス粒子表面のエンベロープ上に存在し、細胞内の未成熟粒子ではprMが後述のEタンパクとヘテロ2量体を形成している<sup>86,87</sup>。Eタンパクはウイルス粒子上の最も重要なタンパクで、成熟粒子上ではホモ2量体を形成し、感染後エンドソーム内で低pHにさらされると、構造変化が起こり、ホモ3量体が形成される<sup>88</sup>。Eタンパクは3つのドメインからなり、フュージョンループはドメインIIに、レセプター結合領域はドメインIIIに存在する<sup>89</sup>。免疫原性が高く、多くの中和抗体エピトープがEタンパク上に存在する<sup>90</sup>。

NS1は感染細胞内で産生後すぐに2量体を形成し<sup>91</sup>、



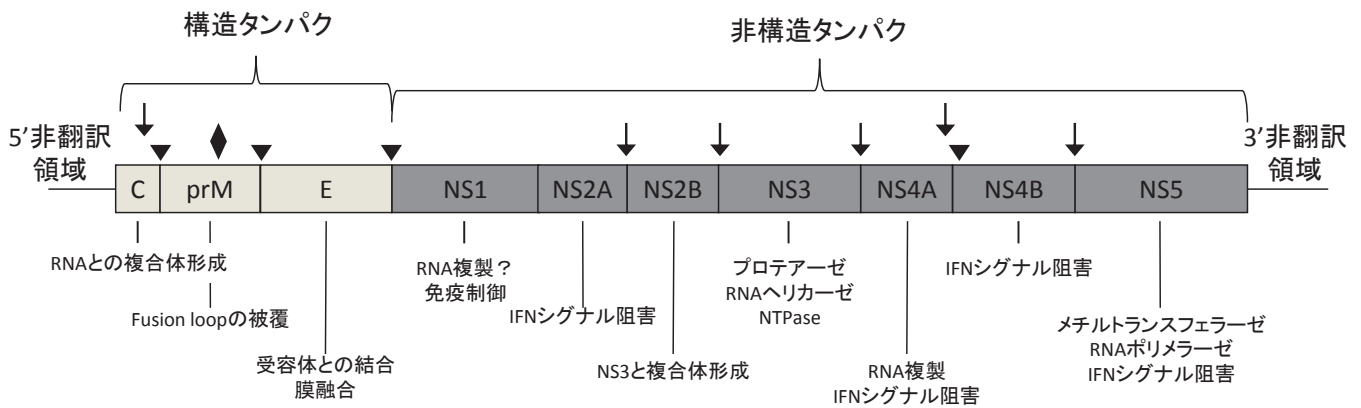


図2 フラビウイルスゲノムとタンパク機能

フラビウイルスゲノム RNA がコードするウイルスタンパクを示す。矢印はウイルスプロテアーゼ、矢頭は宿主シグナラーゼ、菱形はフリンによる切断箇所を示す。

細胞外では6量体としても存在する<sup>92)</sup>。さらに最近、NS1の6量体が高比重リポタンパクを有していることが明らかになった<sup>93)</sup>。その機能については不明な点が多いが、RNA複製において何らかの機能があると考えられている<sup>94,95)</sup>。また、補体・補体関連タンパクと結合し補体経路を制御するという報告や<sup>52-54,96)</sup>、WNV NS1が自然免疫応答の1種であるToll like receptor (TLR) 3のシグナル伝達を阻害することが報告されている<sup>97)</sup>。しかし、他のフラビウイルスではTLR3のシグナル伝達阻害が観察されないことから<sup>98)</sup>、フラビウイルス間での機能の差異が示唆されている。NS2Aはウイルスの組み立てにおける機能<sup>99-101)</sup>とともに、宿主免疫応答において重要なインターフェロン (IFN) シグナルを阻害すること<sup>102,103)</sup>が報告されている。NS2Bは後述のNS3と複合体を形成し、NS3のプロテアーゼ活性にコファクターとして寄与する<sup>104,105)</sup>。NS3は、N末端側にプロテアーゼ、C末端側にRNAヘリカーゼおよびヌクレオチド三リン酸分解酵素 (NTPase) 活性ドメインを有す多機能タンパクである<sup>106)</sup>。また、NS3単独、あるいはNS2Bとの複合体が感染細胞のアポトーシスを誘導する<sup>107-110)</sup>。NS4Aは、NS1と相互作用しRNA複製に関与すること<sup>100,111)</sup>、WNV NS4AがNS3のヘリカーゼ活性におけるコファクターとして機能すること<sup>112)</sup>が報告されている。さらに近年、NS4AがIFNシグナルを阻害するという報告や<sup>113)</sup>、上皮細胞においてオートファジーを誘導し、感染時の細胞死を防ぎ、ウイルス複製を増強させるという新たな機能が報告された<sup>114)</sup>。NS4BについてはIFNシグナル伝達を阻害するという報告が多くなされている<sup>115-118)</sup>。また、DENV NS4BがNS3と結合してウイルス複製を制御するという報告もある<sup>119)</sup>。NS5は、N末端側にメチルトランスフェラーゼ活性ドメインを有し、ゲノムRNA5'端におけるcap構造の付加に関わる<sup>120)</sup>。C末端側には、RNA依

存性RNAポリメラーゼ活性ドメインを有す<sup>121)</sup>。また、IFNシグナルを阻害することも報告されている<sup>122-126)</sup>。

フラビウイルスは直径50-60nmの球状粒子で、CタンパクとゲノムRNAで構成されるヌクレオカプシドを宿主小胞体膜由来のエンベロープが覆っている<sup>127)</sup>。細胞内未成熟粒子は、エンベロープ上にprM-Eのヘテロ2量体が180組あり、そのヘテロ2量体が3組で1つのスパイクを形成している<sup>87,128)</sup>。この構造時は、prMタンパクが膜融合に関わるEタンパク上のフュージョンループを覆い隠し、表出しないようにしている<sup>87)</sup>。その後、細胞内分泌経路を通りトランスゴルジネットワークへ達し低pHにさらされると構造変化を起こし、滑らかな表面構造となる<sup>129)</sup>。ゴルジ体酵素であるフリンによりprMが切断されMタンパクとなると<sup>85)</sup>、prM-Eヘテロ2量体は解消され90組のE-Eホモ2量体を形成し、成熟粒子となる<sup>130,131)</sup>。感染後、エンドソーム内で低pHにさらされると表面構造の再構成が起こり<sup>88)</sup>、スパイク状のE-E-Eホモ3量体を形成し<sup>132)</sup>、エンドソーム膜と膜融合を起こす。感染細胞では感染性ウイルス粒子と共に、ヌクレオカプシドを有さない粒子、subviral particle (SVP) (またはslowly-sedimenting hemagglutinin; SHA)も産生・放出される<sup>133)</sup>。さらに、ウイルスタンパクの内prMおよびEのみを発現させると、SVP様の粒子が産生されることが知られている<sup>134)</sup>。SVPはヌクレオカプシドを有さないため、感染性ウイルス粒子よりも小さいと考えられていたが、最近直径30nmの粒子と50nmの粒子という2種類の粒子が存在することが観察された<sup>135)</sup>。直径30nmのSVPは粒子表面に、30組のE-Eホモ2量体が存在し<sup>136)</sup>、感染性ウイルス粒子と同様の成熟過程を経ると考えられている。

フラビウイルスは媒介蚊またはダニによる刺咬により宿主に侵入する。第1標的細胞は皮膚に存在するランゲルハ

ンス細胞であることが示唆されている<sup>137-139</sup>。フラビウイルス感染における宿主細胞側のレセプターは未だ完全には同定されていないが、いくつか重要なタンパクが報告されている<sup>140</sup>。C型レクチンの一種のDendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) や DC-SIGNR が接着因子として DENV 及び WNV 感染時に重要であることが報告されている<sup>141-143</sup>。負電荷を有すグルコサミノグリカンも多くのフラビウイルスに対し接着因子として機能することが示されている<sup>144-147</sup>。その他、alpha v beta 3 インテグリンが JEV 及び WNV の<sup>148</sup>、C-type lectin domain family 5 member A (CLEC5A) が DENV の<sup>149</sup>、heat shock protein が DENV や JEV の<sup>150,151</sup>、マンノースレセプターが DENV の<sup>152</sup>、それぞれ接着因子あるいはレセプター候補として報告されている。フラビウイルス粒子はレセプターと結合した後、クラスリン依存性エンドサイトーシスにより細胞内エンドソームへと取り込まれる<sup>153</sup>。最近、DENV2 型において、クラスリン非依存性エンドサイトーシスが観察された<sup>154</sup>。これらの知見は、ウイルス種、そして感染細胞種によりフラビウイルスに対するレセプターおよび細胞内への侵入方法が異なる可能性を示唆している。エンドソーム内に取り込まれたウイルスは上述の機構により膜融合を起こし、ゲノム RNA が細胞質へ侵入する。細胞質内でゲノム RNA の複製およびウイルスタンパクの合成が行われる。prM および E タンパクは膜貫通領域を有し、粗面小胞体膜上で内腔側に向けて保持される<sup>155</sup>。また、ウイルス粒子が粗面小胞体内腔で観察されることから、ヌクレオカプシドが小胞体内腔側へ出芽することで子孫ウイルスが産生されると考えられている<sup>156</sup>。その後、細胞内分泌経路を通じて成熟し細胞外へ放出される。これまで、細胞外へ放出されるウイルス粒子はフリンによる切断を受けた成熟粒子または切断されなかった未成熟粒子の2種類が考えられていた。しかし最近、粒子上の一部のみが成熟したモザイク様ウイルスが認められ<sup>157</sup>、フラビウイルスの成熟が、粒子表面の1か所または複数か所を中心に展開するモデルが提唱されている<sup>158</sup>。

#### 4. 免疫応答・回避機構

ウイルス感染時には、宿主は自然免疫応答および獲得免疫応答により病原体および感染細胞を排除する。自然免疫応答は、病原微生物特異的なパターン分子 (PAMPs) を、種々の免疫担当細胞及び上皮細胞などがパターン認識受容体 (PRR) により認識することで開始される。一旦認識されると IFN が誘導され、さらに IFN が JAK-STAT 経路を介し多くの IFN 刺激遺伝子群を活性化することで多くのサイトカイン・ケモカインが誘導され、免疫応答を形成する。その詳細なシグナル伝達メカニズムに関しては、他の総説<sup>159-161</sup>を参照されたい。

フラビウイルス感染においては、これまでに二本鎖

RNA を認識する TLR3 および一本鎖 RNA を認識する TLR7 がその認識に関わっていることが WNV, DENV, TBEV, YFV を用いた研究で報告されている<sup>162-169</sup>。YFV 感染においてはさらに TLR2, TLR8, TLR9 の関与も報告されている<sup>163</sup>。また、細胞質内の二本鎖 RNA を認識する PRR として RIG-I および MDA5 が知られている。JEV は RIG-I により認識されるが<sup>170,171</sup>、WNV および DENV については RIG-I および MDA5 両者に認識されるという特殊なウイルスである<sup>172-175</sup>。さらに、WNV 感染細胞における IFN の産生には細胞質内の PKR (Protein kinase R) による認識が重要であるという報告もある<sup>176</sup>。

獲得免疫応答においては、細胞性免疫として細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が、液性免疫として中和抗体が中心となり、それぞれ Th1 細胞及び Th2 細胞により制御されている。フラビウイルス感染時には、Th1 及び Th2 両細胞が活性化され、両免疫系が惹起されるが、わずかに Th1 優位である<sup>177-179</sup>。CTL 誘導エピトープはフラビウイルスゲノム上の構造タンパク領域および非構造タンパク領域の両領域において知られており<sup>180-184</sup>、CTL 応答が感染防御に働くことが報告されている<sup>185-187</sup>。一方、中和抗体は殆どが構造タンパクの1つである E タンパクに対するものであり<sup>90</sup>、1:10 の中和抗体価で感染防御が可能であることが報告されている<sup>188</sup>。両免疫共にウイルスおよび感染細胞の排除に重要であるが、個体の感染防御という観点においては、中和抗体を中心とした液性免疫がより重要な働きを担うという知見が蓄積している<sup>189-193</sup>。

他方では、ウイルスはその複製過程において宿主免疫系を回避する機構を備えている。これまでに、最も研究が進められたのが IFN 応答の阻害であり、前述のように、フラビウイルスの非構造タンパク NS2A<sup>102,103</sup>、NS4A<sup>113</sup>、NS4B<sup>115-118</sup>、NS5<sup>122-126</sup> について報告がある。IFN 応答の阻害機構としては、STAT1 および STAT2 のリン酸化阻害、STAT2 発現抑制、Jak1 および Tyk2 のリン酸化阻害が知られている。また、フラビウイルス感染によって誘導される膜構造内に TBEV の二本鎖 RNA が検出されたことから、細胞内 PRR による二本鎖 RNA 認識を回避し、IFN 応答を遅延させる機構が最近報告された<sup>194</sup>。また、多くの他のウイルスと異なり、種々のフラビウイルスにおいては、MHC クラス I の発現が増強することが報告されている<sup>195-197</sup>。この MHC クラス I の発現上昇は、IFN 非依存性、NF $\kappa$ B 依存的であり<sup>198</sup>、また NK 細胞の活性を低下させることから、フラビウイルスの免疫回避機構に基づくと考えられている。この他にも、NS1 による補体系の制御<sup>52-54,96</sup>、同じく NS1 による TLR3 シグナル伝達阻害<sup>97</sup> も免疫回避機構の1種である。さらに最近 NS4A が上皮細胞においてオートファジーを誘導させ、感染細胞を生かし続けることでその間のウイルス複製を増強させる機構が報告された<sup>114</sup>。これも広義の免疫回避機構と言えよう。

表1 フラビウイルスワクチンの現状

ウイルス	製品 <sup>1</sup>	製造者	カテゴリー	ステータス
JEV	ジェービック V®	阪大微生物病研究会	不活化	認可
	エンセバック®	化学及血清療法研究所	不活化	認可
	Ixiaro®	Intercell	不活化	認可
	Live JE vaccine	CHENGDU INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS	弱毒生	認可
	IMOJEV®	Sanofi Pasteur	キメラ	認可
DENV	CYD-TDV	Sanofi Pasteur	キメラ	第3相臨床試験
	LATV	NIAID	キメラ	第1相臨床試験
	DenVAX	InViragen	キメラ	第1相臨床試験
	DIME100	Naval Medical Research Center	DNA	第1相臨床試験
	DEN-80E	Merck	サブユニット	第1相臨床試験
WNV	West Nile-Innovator®	Fort Dodge Animal Health	不活化	認可 (ウマ用)
	Recombitek®	Merial	リコンビナント	認可 (ウマ用)
	West Nile-Innovator® DNA	Fort Dodge Animal Health	DNA	認可 (ウマ用)
	Prevenile®	Intervet	キメラ	認可 (ウマ用)
	Vetera™ West Nile	Boehringer Ingelheim	不活化	認可 (ウマ用)
	WNVDNA	NIAID	DNA	第1相臨床試験
	ChimeriVAX-WN02	Sanofi Pasteur	キメラ	第2相臨床試験
YFV	ARILVAX®	Chiron	弱毒生	認可
	YF-VAX®	Sanofi Pasteur	弱毒生	認可
	Stamaril®	Sanofi Pasteur	弱毒生	認可
	Flavimun®	Berna	弱毒生	認可
	17DD	Bio-Manguinhos	弱毒生	認可
	XRX-001	Xcellerex	不活化	第1相臨床試験
TBEV	FEMS-IMMUN®	Baxter	不活化	認可
	FEMS-IMMUN®-junior	Baxter	不活化	認可
	Encepur® Adults	Novartis	不活化	認可
	Encepur® Children	Novartis	不活化	認可
	TBE Moscow Vaccine®	Chumakov Institute of poliomyelitis and Viral encephalitides	不活化	認可
	EnceVir®	Microgen	不活化	認可

<sup>1</sup> 未認可ワクチンの製品名については、参考文献中の記載に従う。

## 5. ワクチン・治療薬開発の現状

フラビウイルス感染症に対する特異的な治療薬は、現在までのところ認可されていない。しかし、近年フラビウイルスタンパクの機能や構造が明らかになるにつれ、多くの特異的阻害薬の開発が進められている。NS3はプロテアーゼ活性およびヘリカーゼ活性を有し、どちらもウイルス複製に必須であることから、プロテアーゼ活性阻害剤<sup>199-203)</sup>およびヘリカーゼ活性阻害剤<sup>204,205)</sup>が開発されている。同様に、NS5のメチルトラスフェラーゼ活性に対する阻害剤<sup>206,207)</sup>、NS5のRNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤<sup>208-210)</sup>についても効果が認められている。さらに最近、構造タンパクの1つであるEタンパクにおいて、抗ウイルス薬のターゲットになり得る構造上のポケットが発見され<sup>211)</sup>、感染時のEタンパクの構造変化を阻害する薬剤が探索さ

れている<sup>212,213)</sup>。

上記のような特異的抗ウイルス薬の他に、一般に広く用いられる抗ウイルス薬についても検討がなされている。IFNは米国FDAにおいて認可された抗ウイルス薬であるため、フラビウイルス感染症に対する効果についても検討がなされている。ヒトあるいはサルを用いた臨床試験において、セントルイス脳炎ウイルス感染症に対しては一定の効果が認められたが<sup>214)</sup>、DENVおよびJEV感染症に対しては有意な効果はこれまでのところ認められていない<sup>215,216)</sup>。プリンヌクレオシドアナログであるリバビリンも広く抗ウイルス活性を有し、様々なウイルスについて検討されている<sup>217)</sup>。フラビウイルスについてもin vitroの検討では、イノシン一リン酸脱水素酵素阻害によるGTP枯渇により<sup>218)</sup>、ウイルス複製を抑制する効果が観察されている<sup>219)</sup>。しかし、ヒトにおけるJEV感染症に対する臨床試験では、有意な



効果は認められなかった<sup>220)</sup>。最近、リバビリンと同様のスクレオシドアナログ ETAR が DENV などのフラビウイルス複製を抑制することが報告され<sup>221)</sup>、今後の検討が期待される。

また標的 RNA を分解させる RNAi<sup>222-225)</sup>、翻訳を阻害するモルフォリノオリゴ (PMO)<sup>226,227)</sup> といった新しい技術を用いた抗ウイルス薬も研究がなされており、動物モデルで一定の抗ウイルス作用が認められている。さらに、JEV に対する siRNA を狂犬病ウイルス由来ペプチドと結合させ<sup>228)</sup>、また DENV に対する siRNA を樹状細胞上リガンドと特異的に結合するペプチドと結合させることで<sup>229)</sup>、それぞれ中枢神経系および樹状細胞へ特異的に取り込ませることに成功している。これらの技術により、標的ウイルスが感染増殖している特定の臓器・細胞でのみ作用させることが可能となり、副反応も低減できると考えられるため、応用が期待される。

現在までのところ、特異的な治療薬がないため、ワクチン投与による防御免疫の誘導がフラビウイルス感染症対策としては、特に重要である。これまでに JEV, YFV, TBEV に対するワクチンが認可され使用されている。表 1 に現在認可されているワクチン及び臨床試験中のワクチンを示す。

JE ワクチンは、1954 年我が国で中山株を用いたマウス脳由来不活化ワクチンとして誕生した<sup>230)</sup>。その後精製法が改良され、1989 年以降は国内では北京 1 株が使用されるようになった<sup>231)</sup>。このマウス脳由来不活化ワクチンはアジア各国でも製造され、世界で認可されたワクチンである<sup>3)</sup>。しかしながら、2004 年にワクチン接種による副反応の可能性を否定できない急性散在性脳脊髄炎事例が国内で発生し、2005 年厚生労働省は本ワクチン接種の積極的勧奨の中止を発令した<sup>3)</sup>。そのため、マウス脳由来不活化ワクチンの製造は中止された。その後、2009 年に Vero 細胞由来不活化ワクチンのジェービック V® (阪大微生物病研究会) が、2011 年にエンセバック® (化学及血清療法研究所) が認可された。また、2009 年に同じく Vero 細胞由来不活化ワクチンの Ixiaro® (Intercell) が、EU, アメリカ, カナダ, オーストラリアで認可され、現在ではさらにスイスおよび香港でも認可を受けている。我が国においては、Vero 細胞由来ワクチンの供給状況に応じて、積極的勧奨が 3 歳児を対象に 2010 年に再開されている<sup>3)</sup>。中国では、PHK 細胞由来の不活化ワクチンが 1968 年に開発され使用されてきたが<sup>232)</sup>、1988 年に SA14-14-2 株を用いた弱毒生ワクチンが認可され、現在ではこの弱毒生ワクチンが主に使用されている<sup>233)</sup>。この生ワクチンは、ネパール、インド、スリランカ、韓国、タイにおいても使用されている<sup>233)</sup>。さらに 2010 年、後述の YF に対する弱毒生ワクチン株 (YF-17D) の遺伝子の中で、免疫原性に関わる prM-E 領域のみを JEV の相同部位に置き換えたキメラワ

クチン IMOJEV® (Sanofi Pasteur) がオーストラリアおよびタイで認可された。

DENV 感染症では前述のように、異なるウイルスの型に対する抗体が重症化に関与していることから、全ての型のウイルスに対して効果のある 4 価ワクチンの開発が望まれている。これまでのところ認可されたワクチンはないが、現在複数のワクチンが臨床試験段階にある。YF-17D をバックボーンとして、prM-E 領域をそれぞれの型の DENV 配列に置き換えた 4 価弱毒生ワクチン (CYD-TDV; Sanofi Pasteur) は、第 1 相および第 2 相臨床試験において 4 価ワクチンとしての免疫原性、安全性などが証明され、現在第 3 相臨床試験が行われている<sup>234)</sup>。また、3'非翻訳領域を一部欠損させることで弱毒化されることが示され<sup>235)</sup>、prM-E 領域のキメラ化と組み合わせた弱毒生ワクチンが開発されている。これまでサルおよびヒトにおいて単価ワクチンとしての免疫原性・安全性が報告され、現在では 4 価ワクチンとしての臨床試験が行われている<sup>236)</sup>。さらに、DENV2 16681 株を PDK 細胞にて 53 回継代した PDK53 と称する弱毒生ワクチン株<sup>237)</sup> をバックボーンとして、prM-E 領域を他の DENV の相同部位に置換したキメラワクチンが作製されている (DenVAX; InViragen)。これまでにサルにおいて免疫原性・安全性が確認されており、現在第 1 相臨床試験が行われている<sup>238)</sup>。これら弱毒生ワクチンに加えて、DENV1 に対する DNA ワクチンが第 1 相臨床試験<sup>239)</sup>、ショウジョウバエ細胞である S2 細胞由来 4 価 E タンパクワクチン (Merck) が第 1 相臨床試験中にある<sup>240)</sup>。この他多くのタイプのワクチンが前臨床段階にある<sup>241)</sup>。

ヒトに対する WN ワクチンはこれまでのところ認可されていないが、ウマ用ワクチンがいくつか実用化されている。2001 年、米国で不活化ワクチン West Nile- Innovator® (Fort Dodge Animal Health) が認可された<sup>242)</sup>。さらに 2004 年、カナリアポックスウイルスベクターに WNV の prM-E 領域を組み込んだリコンビナントワクチン Recombitek® (Merial) が認可された<sup>242)</sup>。現在はこれらに加えて、West Nile- Innovator® DNA (Fort Dodge Animal Health), YF-17D の prM-E 領域を WNV の相同領域に置換したキメラワクチン Prevenile® (Intervet)、最近の流行株を用いた不活化ワクチン Vetera™ West Nile (Boehringer Ingelheim) が認可されている。ヒト用ワクチンとしては、DNA ワクチンが第 1 相臨床試験<sup>243,244)</sup>、YF-17D の prM-E 領域を WNV に置き換えたキメラワクチン (ChimeriVAX-WN02; Sanofi Pasteur) が第 2 相臨床試験を行っている<sup>245)</sup>。

YFV に対するワクチンは、1936 年に Asibi 株を 176 回継代して得られた YF-17D が<sup>246)</sup> 弱毒生ワクチンとして広く用いられてきた。今日では、その亜株である、17DD 株がブラジルで、17D-204 株がその他の国々で使用されている<sup>247)</sup>。2001 年に、これまでのアナフィラキシーや神経症

状を伴う重篤な副反応の報告に加えて、多臓器不全を起こす新しいタイプの副反応が報告された<sup>248-250)</sup>。調査国によって差は認められるが、重篤な副反応の発生率は、100万ドーズ当たりおよそ0.5-15例となっている<sup>251)</sup>。YF-17Dワクチンは鶏卵を用いて製造されるため、鶏卵由来タンパクやゼラチンが副反応を惹起する原因物質であると考えられており、Vero細胞由来不活化ワクチンの開発が現在試みられている<sup>252)</sup>。

TBEVに対する最初のワクチンは、1976年に開発されたNeudoerfl株を用いた不活化ワクチンである(FEMS-IMMUN®; Baxter)<sup>253)</sup>。その後1991年にK23株を用いた不活化ワクチン(Encepur®; Chiron-Behring)が登場した。これらは改良が加えられ、現在はFEMS-IMMUN® (new), FEMS-IMMUN® junior (Baxter), Encepur® Adults, Encepur® children (Novartis)が主に欧州で使用されている。この他Sofjin株を用いた不活化ワクチンTBE Moscow Vaccine® (Chumakov Institute of poliomyelitis and Viral encephalitides) および205株を用いた不活化ワクチンEnceVir® (Microgen)がロシアで使用されている。現在開発中のワクチンとしては、DENV4ウイルスのprM-E領域をLangatウイルス由来株の相同領域に置換したキメラ生ワクチンが第1相臨床試験中にある<sup>254)</sup>。

## 6. おわりに

本稿では、フラビウイルスの生活環・疫学、複製機構、免疫応答・回避機構、抗ウイルス薬・ワクチン開発について最新の知見を踏まえ解説した。温暖化や移動手段の発達により、媒介蚊の生息域が変わり、今後もフラビウイルスの分布が変化する可能性がある。WNVが1999年に初めてアメリカに侵入した際に多くの感染者を出した様に、ウイルスが新しい地域に侵淫すると、多数の感染者を出す可能性が高い。そのため、我が国だけでなく世界各国において監視体制を整えるとともに、抗ウイルス薬・ワクチン開発のさらなる進展が望まれる。また、複製機構や免疫応答・回避機構の新たな知見は、新たな抗ウイルス薬・ワクチンの開発につながるため、これら分野の今後の発展が期待される。

## 参考文献

- Gubler DJ, Kuno G, Markoff L: Flaviviruses. In: *Fields virology* (Fifth edition). Knipe DM, Howley PM (Ed), Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1153-252, 2007.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* 10: S98-109, 2004.
- Ishikawa T, Konishi E. Combating Japanese encephalitis: Vero-cell derived inactivated vaccines and the situation in Japan. *Future. Virol.* 5:785-99, 2010.
- Sugiyama I, Shimizu E, Nogami S, Suzuki K, Miura Y, Sentsui H. Serological survey of arthropod-borne viruses among wild boars in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71:1059-61, 2009.
- Hamano M, Lim CK, Takagi H, Sawabe K, Kuwayama M, Kishi N, Kurane I, Takasaki T. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiol. Infect.* 135:974-7, 2007.
- Ohno Y, Sato H, Suzuki K, Yokoyama M, Uni S, Shibasaki T, Sashika M, Inokuma H, Kai K, Maeda K. Detection of antibodies against Japanese encephalitis virus in raccoons, raccoon dogs and wild boars in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71:1035-9, 2009.
- van den Hurk AF, Ritchie SA, Mackenzie JS. Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. *Annu. Rev. Entomol.* 54:17-35, 2009.
- Yang DK, Kweon CH, Kim BH, Hwang IJ, Kang MI, So BJ, Cho KO. The seroprevalence of Japanese encephalitis virus in goats raised in Korea. *J. Vet. Sci.* 8:197-9, 2007.
- Mall MP, Kumar A, Malik SV. Sero-positivity of domestic animals against Japanese encephalitis in Bareilly area, U.P. *J. Commun. Dis.* 27:242-6, 1995.
- Scherer WF, Moyer JT, Izumi T, Gresser I, McCown J. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. VI. Swine infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 8:698-706, 1959.
- Sucharit S, Surathin K, Shrestha SR. Vectors of Japanese encephalitis virus (JEV): species complexes of the vectors. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health.* 20:611-21, 1989.
- Hanna JN, Ritchie SA, Phillips DA, Shield J, Bailey MC, Mackenzie JS, Poidinger M, McCall BJ, Mills PJ. An outbreak of Japanese encephalitis in the Torres Strait, Australia, 1995. *Med. J. Aust.* 165:256-60, 1996.
- Van Den Hurk AF, Montgomery BL, Northill JA, Smith IL, Zborowski P, Ritchie SA, Mackenzie JS, Smith GA. Short report: the first isolation of Japanese encephalitis virus from mosquitoes collected from mainland Australia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75:21-5, 2006.
- Uchil PD, Satchidanandam V. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65:242-51, 2001.
- Solomon T, Ni H, Beasley DW, Ekkelenkamp M, Cardoso MJ, Barrett AD. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia. *J. Virol.* 77:3091-8, 2003.
- 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.* 53:178-9, 2000.
- Wang HY, Takasaki T, Fu SH, Sun XH, Zhang HL, Wang ZX, Hao ZY, Zhang JK, Tang Q, Kotaki A, Tajima S, Liang XF, Yang WZ, Kurane I, Liang GD. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China. *J. Gen. Virol.* 88:885-94, 2007.
- Ma SP, Yoshida Y, Makino Y, Tadano M, Ono T, Ogawa



- M. Short report: a major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69:151-4, 2003.
- 19) Yoshida Y, Tabei Y, Hasegawa M, Nagashima M, Morozumi S. Genotypic analysis of Japanese encephalitis virus strains isolated from swine in Tokyo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58:259-61, 2005.
  - 20) Li MH, Fu SH, Chen WX, Wang HY, Guo YH, Liu QY, Li YX, Luo HM, Da W, Duo Ji DZ, Ye XM, Liang GD. Genotype v Japanese encephalitis virus is emerging. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 5:e1231, 2011.
  - 21) Takhampunya R, Kim HC, Tippayachai B, Kengluetcha A, Klein TA, Lee WJ, Grieco J, Evans BP. Emergence of Japanese encephalitis virus genotype V in the Republic of Korea. *Virol. J.* 8:449, 2011.
  - 22) Oya A, Kurane I. Japanese encephalitis for a reference to international travelers. *J. Travel. Med.* 14:259-68, 2007.
  - 23) Vaughn DW, Hoke CH Jr. The epidemiology of Japanese encephalitis: prospects for prevention. *Epidemiol. Rev.* 14:197-221, 1992.
  - 24) Solomon T, Dung NM, Kneen R, Gainsborough M, Vaughn DW, Khanh VT. Japanese encephalitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 68:405-15, 2000.
  - 25) Ding D, Hong Z, Zhao SJ, Clemens JD, Zhou B, Wang B, Huang MS, Zeng J, Guo QH, Liu W, Tao FB, Xu ZY. Long-term disability from acute childhood Japanese encephalitis in Shanghai, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77:528-33, 2007.
  - 26) Schneider RJ, Firestone MH, Edelman R, Chieowanich P, Pornpibul R. Clinical sequelae after Japanese encephalitis: a one year follow-up study in Thailand. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health.* 5:560-8, 1974.
  - 27) Hoke CH Jr, Vaughn DW, Nisalak A, Intralawan P, Poolsuppasit S, Jongsawas V, Titsyakorn U, Johnson RT. Effect of high-dose dexamethasone on the outcome of acute encephalitis due to Japanese encephalitis virus. *J. Infect. Dis.* 165:631-7, 1992.
  - 28) Kumar R, Mathur A, Kumar A, Sharma S, Chakraborty S, Chaturvedi UC. Clinical features & prognostic indicators of Japanese encephalitis in children in Lucknow (India). *Indian. J. Med. Res.* 91:321-7, 1990.
  - 29) Kumar R, Mathur A, Singh KB, Sitholey P, Prasad M, Shukla R, Agarwal SP, Arockiasamy J. Clinical sequelae of Japanese encephalitis in children. *Indian. J. Med. Res.* 97:9-13, 1993.
  - 30) Rayamajhi A, Singh R, Prasad R, Khanal B, Singhi S. Study of Japanese encephalitis and other viral encephalitis in Nepali children. *Pediatr. Int.* 49:978-84, 2007.
  - 31) Ooi MH, Lewthwaite P, Lai BF, Mohan A, Clear D, Lim L, Krishnan S, Preston T, Chieng CH, Tio PH, Wong SC, Cardosa J, Solomon T. The epidemiology, clinical features, and long-term prognosis of Japanese encephalitis in central sarawak, malaysia, 1997-2005. *Clin. Infect. Dis.* 47:458-68, 2008.
  - 32) Kimura R and Hotta S. Experimental inoculation of dengue virus into mice. *Nippon. Igaku.* 3344:1378-9, 1943.
  - 33) Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1:30-50, 1952.
  - 34) Hammon WM, Rudnick A, Sather G, Rogers KD, Morse LJ. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Trans. Assoc. Am. Physicians.* 73:140-55, 1960.
  - 35) Vasilakis N, Cardosa J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:532-41, 2011.
  - 36) Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:480-96, 1998.
  - 37) Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull. World. Health. Organ.* 59:623-30, 1981.
  - 38) Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:518-28, 2007.
  - 39) Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.* 181:2-9, 2000.
  - 40) Guzman 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.* 6:118-24, 2002.
  - 41) Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujirarat D, Siripanichgon K. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *J. Clin. Virol.* 39:76-81, 2007.
  - 42) Tambyah PA, Koay ES, Poon ML, Lin RV, Ong BK. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N. Engl. J. Med.* 359:1526-7, 2008.
  - 43) Tan FL, Loh DL, Prabhakaran K, Tambyah PA, Yap HK. Dengue haemorrhagic fever after living donor renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20:447-8, 2005.
  - 44) Jirayu V, Udomsak B, Panisinee L, Chusana S. Dengue hemorrhagic fever in a peripheral blood stem cell transplant recipient: the first case report. *Infect. Dis. Rep.* 1:e3, 2009.
  - 45) Teo D, Ng LC, Lam S. Is dengue a threat to the blood supply? *Transfus. Med.* 19:66-77, 2009.
  - 46) Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:564-81, 2009.
  - 47) Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale. J. Biol. Med.* 42:311-28, 1970.
  - 48) Jain A, Chaturvedi UC. Dengue in infants: an overview. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 59:119-30, 2010.
  - 49) Brandt WE, McCown JM, Gentry MK, Russell PK. Infection enhancement of dengue type 2 virus in the U-937 human monocyte cell line by antibodies to flavivirus.

- virus cross-reactive determinants. *Infect. Immun.* 36:1036-41, 1982.
- 50) Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J. Exp. Med.* 146:201-17, 1977.
  - 51) Halstead SB, Venkateshan CN, Gentry MK, Larsen LK. Heterogeneity of infection enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 132:1529-32, 1984.
  - 52) Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, Ikuta K. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362:1051-6, 2007.
  - 53) Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, Atkinson JP. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J. Exp. Med.* 207:793-806, 2010.
  - 54) 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.* 187:424-33, 2011.
  - 55) Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, Hsiao YL, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab. Invest.* 88:1079-89, 2008.
  - 56) Cheng HJ, Lei HY, Lin CF, Luo YH, Wan SW, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. *Mol. Immunol.* 47:398-406, 2009.
  - 57) KC Smithburn, TP Hughes, AW Burke and JH Paul. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* s1-20:471-92, 1940.
  - 58) Blitvich BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim. Health. Res. Rev.* 9:71-86, 2008.
  - 59) van der Meulen KM, Pensaert MB, Nauwynck HJ. West Nile virus in the vertebrate world. *Arch. Virol.* 150:637-57, 2005.
  - 60) Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science.* 286:2333-7, 1999.
  - 61) Komar N, Clark GG. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev. Panam. Salud. Publica.* 19:112-7, 2006.
  - 62) Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet. Infect. Dis.* 2:519-29, 2002.
  - 63) Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. *Clin. Lab. Med.* 30:47-65, 2010.
  - 64) Murray KO, Walker C, Gould E. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction into the Western Hemisphere. *Epidemiol. Infect.* 139:807-17, 2011.
  - 65) Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, Stobierski MG, Signs K, Newman B, Kapoor H, Goodman JL, Chamberland ME. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N. Engl. J. Med.* 349:1236-45, 2003.
  - 66) Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, Pham SM, Zaki S, Lanciotti RS, Lance-Parker SE, DiazGranados CA, Winquist AG, Perlino CA, Wiersma S, Hillyer KL, Goodman JL, Marfin AA, Chamberland ME, Petersen LR. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 348:2196-203, 2003.
  - 67) Intrauterine West Nile virus infection--New York, 2002. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51:1135-6, 2002.
  - 68) Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding--Michigan, 2002. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51:877-8, 2002.
  - 69) Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *JAMA.* 300:960-2, 2008.
  - 70) Petersen LR, Marfin AA. Shifting epidemiology of Flaviviridae. *J. Travel. Med.* 12. Suppl. 1:S3-11, 2005.
  - 71) Barnett ED. Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin. Infect. Dis.* 44:850-6, 2007.
  - 72) Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV, Gould EA, Gritsun TS, Heinz FX, Labuda M, Lashkevich VA, Loktev V, Lundkvist A, Lvov DV, Mandl CW, Niedrig M, Papa A, Petrov VS, Plyusnin A, Randolph S, Suss J, Zlobin VI, de Lamballerie X. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10:1040-55, 2004.
  - 73) Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 371:1861-71, 2008.
  - 74) Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* 90:1781-94, 2009.
  - 75) Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral. Res.* 57:129-46, 2003.
  - 76) Wengler G, Wengler G, Gross HJ. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology.* 89:423-37, 1978.
  - 77) Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM: Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields virology* (Fifth edition). Knipe DM, Howley PM (Ed), Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1102-53, 2007.
  - 78) Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, Westaway EG. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J. Virol.* 75:6719-28, 2001.
  - 79) Kofler RM, Hoenninger VM, Thurner C, Mandl CW. Functional analysis of the tick-borne encephalitis virus cyclization elements indicates major differences between mosquito-borne and tick-borne flaviviruses. *J. Virol.* 80:4099-113, 2006.

- 80) Alvarez DE, Lodeiro MF, Luduena SJ, Pietrasanta LI, Gamarnik AV. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* 79:6631-43, 2005.
- 81) Zhang B, Dong H, Stein DA, Iversen PL, Shi PY. West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions. *Virology.* 373:1-13, 2008.
- 82) Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J. Virol.* 77:7143-9, 2003.
- 83) Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:3414-9, 2004.
- 84) Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *J. Virol.* 78:8078-84, 2004.
- 85) Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* 71:8475-81, 1997.
- 86) Guirakhoo F, Bolin RA, Roehrig JT. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology.* 191:921-31, 1992.
- 87) Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science.* 319:1830-4, 2008.
- 88) Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J. Virol.* 69:695-700, 1995.
- 89) Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature.* 375:291-8, 1995.
- 90) Kimura-Kuroda J, Yasui K. Protection of mice against Japanese encephalitis virus by passive administration with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 141:3606-10, 1988.
- 91) Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology.* 171:302-5, 1989.
- 92) Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J. Virol.* 73:6104-10, 1999.
- 93) Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, Larquet E, Charneau P, Krey T, Megret F, Guittet E, Rey FA, Flamand M. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:8003-8, 2011.
- 94) Hall RA, Khromykh AA, Mackenzie JM, Scherret JH, Khromykh TI, Mackenzie JS. Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. *Virology.* 264:66-75, 1999.
- 95) 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.* 71:6650-61, 1997.
- 96) Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, Atkinson JP, Diamond MS. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:19111-6, 2006.
- 97) Wilson JR, de Sessions PF, Leon MA, Scholle F. West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J. Virol.* 82:8262-71, 2008.
- 98) Baronti C, Sire J, de Lamballerie X, Querat G. Nonstructural NS1 proteins of several mosquito-borne Flavivirus do not inhibit TLR3 signaling. *Virology.* 404:319-30, 2010.
- 99) Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J. Virol.* 82:4731-41, 2008.
- 100) Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology.* 245:203-15, 1998.
- 101) Kummerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J. Virol.* 76:4773-84, 2002.
- 102) Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J. Virol.* 80:2396-404, 2006.
- 103) Liu WJ, Chen HB, Wang XJ, Huang H, Khromykh AA. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J. Virol.* 78:12225-35, 2004.
- 104) Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 65:2467-75, 1991.
- 105) Arias CF, Preugschat F, Strauss JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology.* 193:888-99, 1993.
- 106) 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.* 73:3108-16, 1999.
- 107) Yang TC, Shiu SL, Chuang PH, Lin YJ, Wan L, Lan YC,



- Lin CW. Japanese encephalitis virus NS2B-NS3 protease induces caspase 3 activation and mitochondria-mediated apoptosis in human medulloblastoma cells. *Virus. Res.* 143:77-85, 2009.
- 108) Ramanathan MP, Chambers JA, Pankhong P, Chattergoon M, Attatippaholkun W, Dang K, Shah N, Weiner DB. Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology.* 345:56-72, 2006.
- 109) Prikhod'ko GG, Prikhod'ko EA, Pletnev AG, Cohen JI. Langat flavivirus protease NS3 binds caspase-8 and induces apoptosis. *J. Virol.* 76:5701-10, 2002.
- 110) Duarte dos Santos CN, Frenkiel MP, Courageot MP, Rocha CF, Vazeille-Falcoz MC, Wien MW, Rey FA, Deubel V, Despres P. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology.* 274:292-308, 2000.
- 111) Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.* 73:4611-21, 1999.
- 112) Shiryayev SA, Chernov AV, Aleshin AE, Shiryayeva TN, Strongin AY. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *J. Gen. Virol.* 90:2081-5, 2009.
- 113) Lin CW, Cheng CW, Yang TC, Li SW, Cheng MH, Wan L, Lin YJ, Lai CH, Lin WY, Kao MC. Interferon antagonist function of Japanese encephalitis virus NS4A and its interaction with DEAD-box RNA helicase DDX42. *Virus. Res.* 137:49-55, 2008.
- 114) McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakari Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J. Biol. Chem.* 286:22147-59, 2011.
- 115) Evans JD, Seeger C. Differential effects of mutations in NS4B on West Nile virus replication and inhibition of interferon signaling. *J. Virol.* 81:11809-16, 2007.
- 116) Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, Garcia-Sastre A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* 79:8004-13, 2005.
- 117) Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, Foster GR, Jacobs M. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J. Virol.* 79:5414-20, 2005.
- 118) Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:14333-8, 2003.
- 119) 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.* 87:2605-14, 2006.
- 120) 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.* 21:2757-68, 2002.
- 121) Guyatt KJ, Westaway EG, Khromykh AA. Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin. *J. Virol. Methods.* 92:37-44, 2001.
- 122) Best SM, Morris KL, Shannon JG, Robertson SJ, Mizel DN, Park GS, Boer E, Wolfinbarger JB, Bloom ME. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J. Virol.* 79:12828-39, 2005.
- 123) Lin RJ, Chang BL, Yu HP, Liao CL, Lin YL. Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J. Virol.* 80:5908-18, 2006.
- 124) Werme K, Wigerius M, Johansson M. Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cell. Microbiol.* 10:696-712, 2008.
- 125) Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, Garcia-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J. Virol.* 83:5408-18, 2009.
- 126) Laurent-Rolle M, Boer EF, Lubick KJ, Wolfinbarger JB, Carmody AB, Rockx B, Liu W, Ashour J, Shupert WL, Holbrook MR, Barrett AD, Mason PW, Bloom ME, Garcia-Sastre A, Khromykh AA, Best SM. The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J. Virol.* 84:3503-15, 2010.
- 127) Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:13-22, 2005.
- 128) Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO. J.* 22:2604-13, 2003.
- 129) Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 319:1834-7, 2008.
- 130) 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.* 108:717-25, 2002.
- 131) Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ. Structure of West Nile virus. *Science.* 302:248, 2003.
- 132) Kaufmann B, Chipman PR, Holdaway HA, Johnson S, Fremont DH, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG. Capturing a flavivirus pre-fusion intermediate. *PLoS. Pathog.* 5:e1000672, 2009.
- 133) Shapiro D, Brandt WE, Cardiff RD, Russell PK. The proteins of Japanese encephalitis virus. *Virology.* 44:108-24, 1971.
- 134) Mason PW, Pincus S, Fournier MJ, Mason TL, Shope

- RE, Paoletti E. Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology*. 180:294-305, 1991.
- 135) Allison SL, Tao YJ, O'Riordain G, Mandl CW, Harrison SC, Heinz FX. Two distinct size classes of immature and mature subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* 77:11357-66, 2003.
- 136) Ferlenghi I, Clarke M, Ruttan T, Allison SL, Schalich J, Heinz FX, Harrison SC, Rey FA, Fuller SD. Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Mol. Cell.* 7:593-602, 2001.
- 137) Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Phenotypic changes in Langerhans' cells after infection with arboviruses: a role in the immune response to epidermally acquired viral infection? *J. Virol.* 70:4761-6, 1996.
- 138) Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birk DL, Hayes CG, Frankel SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat. Med.* 6:816-20, 2000.
- 139) Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J. Invest. Dermatol.* 114:560-8, 2000.
- 140) Kaufmann B, Rossmann MG. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes. Infect.* 13:1-9, 2011.
- 141) Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Despres P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO. Rep.* 4:723-8, 2003.
- 142) Davis CW, Nguyen HY, Hanna SL, Sanchez MD, Doms RW, Pierson TC. West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J. Virol.* 80:1290-301, 2006.
- 143) Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birk DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197:823-9, 2003.
- 144) Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 3:866-71, 1997.
- 145) Liu H, Chiou SS, Chen WJ. Differential binding efficiency between the envelope protein of Japanese encephalitis virus variants and heparan sulfate on the cell surface. *J. Med. Virol.* 72:618-24, 2004.
- 146) Germe R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*. 292:162-8, 2002.
- 147) Kroschewski H, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 308:92-100, 2003.
- 148) Chu JJ, Ng ML. Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *J. Biol. Chem.* 279:54533-41, 2004.
- 149) Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, Lee CK, Chiou TW, Wong CH, Hsieh SL. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature*. 453:672-6, 2008.
- 150) Das S, Laxminarayana SV, Chandra N, Ravi V, Desai A. Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus. *Virology*. 385:47-57, 2009.
- 151) Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.* 79:4557-67, 2005.
- 152) Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS. Pathog.* 4:e17, 2008.
- 153) van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS. Pathog.* 4:e1000244, 2008.
- 154) Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell. Microbiol.* 11:1533-49, 2009.
- 155) Op De Beeck A, Rouille Y, Caron M, Duvet S, Dubuisson J. The transmembrane domains of the prM and E proteins of yellow fever virus are endoplasmic reticulum localization signals. *J. Virol.* 78:12591-602, 2004.
- 156) Mackenzie JM, Westaway EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J. Virol.* 75:10787-99, 2001.
- 157) Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, Keelapang P, Puttikhunt C, Perera R, Chipman PR, Kasinrerk W, Malasit P, Kuhn RJ, Sittisombut N. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *J. Virol.* 84:8353-8, 2010.
- 158) Plevka P, Battisti AJ, Junjhon J, Winkler DC, Holdaway HA, Keelapang P, Sittisombut N, Kuhn RJ, Steven AC, Rossmann MG. Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. *EMBO. Rep.* 12:602-6, 2011.
- 159) McCartney SA, Colonna M. Viral sensors: diversity in pathogen recognition. *Immunol. Rev.* 227:87-94, 2009.
- 160) Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5:987-95, 2004.
- 161) Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* 19:3-19, 2008.
- 162) Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile

- virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* 10:1366-73, 2004.
- 163) Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gordon K, Flavell R, Akira S, Ahmed R, Pulendran B. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* 203:413-24, 2006.
- 164) Wang JP, Liu P, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW, Libraty DH. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J. Immunol.* 177:7114-21, 2006.
- 165) Daffis S, Samuel MA, Suthar MS, Gale M Jr, Diamond MS. Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection. *J. Virol.* 82:10349-58, 2008.
- 166) Tsai YT, Chang SY, Lee CN, Kao CL. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell. Microbiol.* 11:604-15, 2009.
- 167) Town T, Bai F, Wang T, Kaplan AT, Qian F, Montgomery RR, Anderson JF, Flavell RA, Fikrig E. Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing. *Immunity.* 30:242-53, 2009.
- 168) Welte T, Reagan K, Fang H, Machain-Williams C, Zheng X, Mendell N, Chang GJ, Wu P, Blair CD, Wang T. Toll-like receptor 7-induced immune response to cutaneous West Nile virus infection. *J. Gen. Virol.* 90:2660-8, 2009.
- 169) Kindberg E, Vene S, Mickiene A, Lundkvist A, Lindquist L, Svensson L. A functional Toll-like receptor 3 gene (TLR3) may be a risk factor for tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection. *J. Infect. Dis.* 203:523-8, 2011.
- 170) Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 441:101-5, 2006.
- 171) Nazmi A, Dutta K, Basu A. RIG-I mediates innate immune response in mouse neurons following Japanese encephalitis virus infection. *PLoS. One.* 6:e21761, 2011.
- 172) Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, Garcia-Sastre A, Katze MG, Gale M Jr. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J. Virol.* 82:335-45, 2008.
- 173) Nasirudeen AM, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 5:e926, 2011.
- 174) Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M Jr. Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *J. Virol.* 82:609-16, 2008.
- 175) Fredericksen BL, Gale M Jr. West Nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling. *J. Virol.* 80:2913-23, 2006.
- 176) Gilfoy FD, Mason PW. West Nile virus-induced interferon production is mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J. Virol.* 81:11148-58, 2007.
- 177) Ramakrishna C, Ravi V, Desai A, Subbakrishna DK, Shankar SK, Chandramuki A. T helper responses to Japanese encephalitis virus infection are dependent on the route of inoculation and the strain of mouse used. *J. Gen. Virol.* 84:1559-67, 2003.
- 178) Aberle JH, Aberle SW, Kofler RM, Mandl CW. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* 79:15107-13, 2005.
- 179) Smucny JJ, Kelly EP, Macarthy PO, King AD. Murine immunoglobulin G subclass responses following immunization with live dengue virus or a recombinant dengue envelope protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:432-7, 1995.
- 180) McMurtrey CP, Lelic A, Piazza P, Chakrabarti AK, Yablonsky EJ, Wahl A, Bardet W, Eckerd A, Cook RL, Hess R, Buchli R, Loeb M, Rinaldo CR, Bramson J, Hildebrand WH. Epitope discovery in West Nile virus infection: Identification and immune recognition of viral epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:2981-6, 2008.
- 181) Rothman AL, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Men R, Ennis FA. Dengue virus protein recognition by virus-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 67:801-6, 1993.
- 182) Murali-Krishna K, Ramireddy B, Ravi V, Manjunath R. Recognition of nonstructural protein peptides by cytotoxic T lymphocytes raised against Japanese encephalitis virus. *Microbiol. Immunol.* 39:1021-4, 1995.
- 183) Gagnon SJ, Zeng W, Kurane I, Ennis FA. Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J. Virol.* 70:141-7, 1996.
- 184) Co MD, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology.* 293:151-63, 2002.
- 185) Purtha WE, Myers N, Mitaksov V, Sitati E, Connolly J, Fremont DH, Hansen TH, Diamond MS. Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes protect against lethal West Nile virus encephalitis. *Eur. J. Immunol.* 37:1845-54, 2007.
- 186) Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, Shresta S. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J. Immunol.* 182:4865-73, 2009.
- 187) Murali-Krishna K, Ravi V, Manjunath R. Protection of adult but not newborn mice against lethal intracerebral challenge with Japanese encephalitis virus by



- adoptively transferred virus-specific cytotoxic T lymphocytes: requirement for L3T4+ T cells. *J. Gen. Virol.* 77:705-14, 1996.
- 188) Oya A. Japanese encephalitis vaccine. *Acta. Paediatr. Jpn.* 30:175-84, 1988.
- 189) Konishi E, Ajiro N, Nukuzuma C, Mason PW, Kurane I. Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine.* 21:3675-83, 2003.
- 190) Kyle JL, Balsitis SJ, Zhang L, Beatty PR, Harris E. Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. *Virology.* 380:296-303, 2008.
- 191) Pan CH, Chen HW, Huang HW, Tao MH. Protective mechanisms induced by a Japanese encephalitis virus DNA vaccine: requirement for antibody but not CD8(+) cytotoxic T-cell responses. *J. Virol.* 75:11457-63, 2001.
- 192) Larena M, Regner M, Lee E, Lobigs M. Pivotal role of antibody and subsidiary contribution of CD8+ T cells to recovery from infection in a murine model of Japanese encephalitis. *J. Virol.* 85:5446-55, 2011.
- 193) Diamond MS, Shrestha B, Marri A, Mahan D, Engle M. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J. Virol.* 77:2578-86, 2003.
- 194) Overby AK, Popov VL, Niedrig M, Weber F. Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles. *J. Virol.* 84:8470-83, 2010.
- 195) Mullbacher A, Lobigs M. Up-regulation of MHC class I by flavivirus-induced peptide translocation into the endoplasmic reticulum. *Immunity.* 3:207-14, 1995.
- 196) Momburg F, Mullbacher A, Lobigs M. Modulation of transporter associated with antigen processing (TAP)-mediated peptide import into the endoplasmic reticulum by flavivirus infection. *J. Virol.* 75:5663-71, 2001.
- 197) King NJ, Kesson AM. Interferon-independent increases in class I major histocompatibility complex antigen expression follow flavivirus infection. *J. Gen. Virol.* 69:2535-43, 1988.
- 198) Cheng Y, King NJ, Kesson AM. Major histocompatibility complex class I (MHC-I) induction by West Nile virus: involvement of 2 signaling pathways in MHC-I up-regulation. *J. Infect. Dis.* 189:658-68, 2004.
- 199) Stoermer MJ, Chappell KJ, Liebscher S, Jensen CM, Gan CH, Gupta PK, Xu WJ, Young PR, Fairlie DP. Potent cationic inhibitors of West Nile virus NS2B/NS3 protease with serum stability, cell permeability and antiviral activity. *J. Med. Chem.* 51:5714-21, 2008.
- 200) Johnston PA, Phillips J, Shun TY, Shinde S, Lazo JS, Huryn DM, Myers MC, Ratnikov BI, Smith JW, Su Y, Dahl R, Cosford ND, Shiryaev SA, Strongin AY. HTS identifies novel and specific uncompetitive inhibitors of the two-component NS2B-NS3 proteinase of West Nile virus. *Assay. Drug. Dev. Technol.* 5:737-50, 2007.
- 201) Cregar-Hernandez L, Jiao GS, Johnson AT, Lehrer AT, Wong TA, Margosiak SA. Small molecule pan-dengue and West Nile virus NS3 protease inhibitors. *Antivir. Chem. Chemother.* 21:209-17, 2011.
- 202) Tomlinson SM, Malmstrom RD, Russo A, Mueller N, Pang YP, Watowich SJ. Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. *Antiviral. Res.* 82:110-4, 2009.
- 203) Yang CC, Hsieh YC, Lee SJ, Wu SH, Liao CL, Tsao CH, Chao YS, Chern JH, Wu CP, Yueh A. Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55:229-38, 2011.
- 204) Zhang N, Chen HM, Koch V, Schmitz H, Liao CL, Bretner M, Bhadti VS, Fattom AI, Naso RB, Hosmane RS, Borowski P. Ring-expanded ("fat") nucleoside and nucleotide analogues exhibit potent in vitro activity against flaviviridae NTPases/helicases, including those of the West Nile virus, hepatitis C virus, and Japanese encephalitis virus. *J. Med. Chem.* 46:4149-64, 2003.
- 205) 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.* 270:1645-53, 2003.
- 206) Luzhkov VB, Selisko B, Nordqvist A, Peyrane F, Decroly E, Alvarez K, Karlen A, Canard B, Qvist J. Virtual screening and bioassay study of novel inhibitors for dengue virus mRNA cap (nucleoside-2'O)-methyltransferase. *Bioorg. Med. Chem.* 15:7795-802, 2007.
- 207) Lim SP, Sonntag LS, Noble C, Nilar SH, Ng RH, Zou G, Monaghan P, Chung KY, Dong H, Liu B, Bodenreider C, Lee G, Ding M, Chan WL, Wang G, Jian YL, Chao AT, Lescar J, Yin Z, Vedananda TR, Keller TH, Shi PY. Small molecule inhibitors that selectively block dengue virus methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 286:6233-40, 2011.
- 208) Yin Z, Chen YL, Schul W, Wang QY, Gu F, Duraiswamy J, Kondreddi RR, Niyomrattanakit P, Lakshminarayana SB, Goh A, Xu HY, Liu W, Liu B, Lim JY, Ng CY, Qing M, Lim CC, Yip A, Wang G, Chan WL, Tan HP, Lin K, Zhang B, Zou G, Bernard KA, Garrett C, Beltz K, Dong M, Weaver M, He H, Pichota A, Dartois V, Keller TH, Shi PY. An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:20435-9, 2009.
- 209) Chen YL, Yin Z, Lakshminarayana SB, Qing M, Schul W, Duraiswamy J, Kondreddi RR, Goh A, Xu HY, Yip A, Liu B, Weaver M, Dartois V, Keller TH, Shi PY. Inhibition of dengue virus by an ester prodrug of an adenosine analog. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54:3255-61, 2010.
- 210) Niyomrattanakit P, Chen YL, Dong H, Yin Z, Qing M, Glickman JF, Lin K, Mueller D, Voshol H, Lim JY, Nilar S, Keller TH, Shi PY. Inhibition of dengue virus polymerase by blocking of the RNA tunnel. *J. Virol.* 84:5678-86, 2010.
- 211) Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-

- binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:6986-91, 2003.
- 212) Wang QY, Patel SJ, Vangrevelinghe E, Xu HY, Rao R, Jaber D, Schul W, Gu F, Heudi O, Ma NL, Poh MK, Phong WY, Keller TH, Jacoby E, Vasudevan SG. A small-molecule dengue virus entry inhibitor. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53:1823-31, 2009.
- 213) Zhou Z, Khaliq M, Suk JE, Patkar C, Li L, Kuhn RJ, Post CB. Antiviral compounds discovered by virtual screening of small-molecule libraries against dengue virus E protein. *ACS. Chem. Biol.* 3:765-75, 2008.
- 214) Rahal JJ, Anderson J, Rosenberg C, Reagan T, Thompson LL. Effect of interferon-alpha2b therapy on St. Louis viral meningoencephalitis: clinical and laboratory results of a pilot study. *J. Infect. Dis.* 190:1084-7, 2004.
- 215) Ajariyakhajorn C, Mammen MP Jr, Endy TP, Gettayacamin M, Nisalak A, Nimmannitya S, Libraty DH. Randomized, placebo-controlled trial of nonpegylated and pegylated forms of recombinant human alpha interferon 2a for suppression of dengue virus viremia in rhesus monkeys. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49:4508-14, 2005.
- 216) 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.* 361:821-6, 2003.
- 217) De Clercq E. Another ten stories in antiviral drug discovery (part C): "Old" and "new" antivirals, strategies, and perspectives. *Med. Res. Rev.* 29:611-45, 2009.
- 218) Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev. Med. Virol.* 16:37-48, 2006.
- 219) Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral. Res.* 58:73-9, 2003.
- 220) Kumar R, Tripathi P, Baranwal M, Singh S, Tripathi S, Banerjee G. Randomized, controlled trial of oral ribavirin for Japanese encephalitis in children in Uttar Pradesh, India. *Clin. Infect. Dis.* 48:400-6, 2009.
- 221) McDowell M, Gonzales SR, Kumarapperuma SC, Jeselnik M, Arterburn JB, Hanley KA. A novel nucleoside analog, 1-beta-d-ribofuranosyl-3-ethynyl-[1,2,4] triazole (ETAR), exhibits efficacy against a broad range of flaviviruses in vitro. *Antiviral. Res.* 87:78-80, 2010.
- 222) Pacca CC, Severino AA, Mondini A, Rahal P, D'avila SG, Cordeiro JA, Nogueira MC, Bronzoni RV, Nogueira ML. RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo. *Virus. Genes.* 38:224-31, 2009.
- 223) Bai F, Wang T, Pal U, Bao F, Gould LH, Fikrig E. Use of RNA interference to prevent lethal murine west nile virus infection. *J. Infect. Dis.* 191:1148-54, 2005.
- 224) Murakami M, Ota T, Nukuzuma S, Takegami T. Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo. *Microbiol. Immunol.* 49:1047-56, 2005.
- 225) Kumar P, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. A single siRNA suppresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses. *PLoS. Med.* 3:e96, 2006.
- 226) Deas TS, Bennett CJ, Jones SA, Tilgner M, Ren P, Behr MJ, Stein DA, Iversen PL, Kramer LD, Bernard KA, Shi PY. In vitro resistance selection and in vivo efficacy of morpholino oligomers against West Nile virus. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51:2470-82, 2007.
- 227) Stein DA, Huang CY, Silengo S, Amantana A, Crumley S, Blouch RE, Iversen PL, Kinney RM. Treatment of AG129 mice with antisense morpholino oligomers increases survival time following challenge with dengue 2 virus. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:555-65, 2008.
- 228) Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature.* 448:39-43, 2007.
- 229) Subramanya S, Kim SS, Abraham S, Yao J, Kumar M, Kumar P, Haridas V, Lee SK, Shultz LD, Greiner D, N M, Shankar P. Targeted delivery of small interfering RNA to human dendritic cells to suppress dengue virus infection and associated proinflammatory cytokine production. *J. Virol.* 84:2490-501, 2010.
- 230) Barrett AD. Japanese encephalitis and dengue vaccines. *Biologicals.* 25:27-34, 1997.
- 231) Kurane I, Takasaki T. Immunogenicity and protective efficacy of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine.* 18. Suppl. 2:33-5, 2000.
- 232) Ding D, Kilgore PE, Clemens JD, Wei L, Zhi-Yi X. Cost-effectiveness of routine immunization to control Japanese encephalitis in Shanghai, China. *Bull. World. Health. Organ.* 81:334-42, 2003.
- 233) Schioler KL, Samuel M, Wai KL. Vaccines for preventing Japanese encephalitis. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD004263, 2007.
- 234) Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 29:7229-41, 2011.
- 235) Men R, Bray M, Clark D, Chanock RM, Lai CJ. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J. Virol.* 70:3930-7, 1996.
- 236) Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Schmidt AC, Whitehead SS. Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalent DENV vaccines to identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. *Vaccine.* 29:7242-50, 2011.
- 237) Yoksan S, Bhamarapavati N, Halstead SB. Dengue virus vaccine development: study on biological markers of uncloned dengue 1-4 viruses serially passaged in primary kidney cells. In: *Arbovirus Research in*

- Australia, Proceedings of the Fourth Symposium*. St. George TD, Kay BH, Blok J (Ed). CSIRO/QIMR, Brisbane, Australia 35-38, 1986.
- 238) Osorio JE, Huang CY, Kinney RM, Stinchcomb DT. Development of DENVax: A chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine*. 29:7251-60, 2011.
- 239) Danko JR, Beckett CG, Porter KR. Development of dengue DNA vaccines. *Vaccine*. 29:7261-6, 2011.
- 240) Collier BA, Clements DE, Bett AJ, Sagar SL, Ter Meulen JH. The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine*. 29:7267-75, 2011.
- 241) Schmitz J, Roehrig J, Barrett A, Hombach J. Next generation dengue vaccines: A review of candidates in preclinical development. *Vaccine*. 29:7276-84, 2011
- 242) Dauphin G, Zientara S. West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*. 25:5563-76, 2007.
- 243) Martin JE, Pierson TC, Hubka S, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, Andrews CA, Xu Q, Davis BS, Nason M, Fay M, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Gomez PL, Mascola JR, Chang GJ, Nabel GJ, Graham BS. A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase I clinical trial. *J. Infect. Dis.* 196:1732-40, 2007.
- 244) Ledgerwood JE, Pierson TC, Hubka SA, Desai N, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, Nelson S, Nason M, Gu W, Bundrant N, Koup RA, Bailer RT, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS. A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial. *J. Infect. Dis.* 203:1396-404, 2011.
- 245) Biedendener R, Bevilacqua J, Gregg AM, Watson M, Dayan G. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile virus vaccine in healthy adults. *J. Infect. Dis.* 203:75-84, 2011.
- 246) Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* 65:787-800, 1937.
- 247) Roukens AH, Visser LG. Yellow fever vaccine: past, present and future. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 8:1787-95, 2008.
- 248) Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, Monath TP, Rodrigues SG, Laval C, Costa ZG, Vilela MF, Santos CL, Papaiordanou PM, Alves VA, Andrade LD, Sato HK, Rosa ES, Froguas GB, Lacava E, Almeida LM, Cruz AC, Rocco IM, Santos RT, Oliva OF. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *Lancet*. 358:91-7, 2001.
- 249) Martin M, Tsai TF, Cropp B, Chang GJ, Holmes DA, Tseng J, Shieh W, Zaki SR, Al-Sanouri I, Cutrona AF, Ray G, Weld LH, Cetron MS. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. *Lancet*. 358:98-104, 2001.
- 250) Chan RC, Penney DJ, Little D, Carter IW, Roberts JA, Rawlinson WD. Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *Lancet*. 358:121-2, 2001.
- 251) Thomas RE, Lorenzetti DL, Spragins W, Jackson D, Williamson T. Active and passive surveillance of yellow fever vaccine 17D or 17DD-associated serious adverse events: systematic review. *Vaccine*. 29:4544-55, 2011.
- 252) Monath TP, Fowler E, Johnson CT, Balser J, Morin MJ, Sisti M, Trent DW. An inactivated cell-culture vaccine against yellow fever. *N. Engl. J. Med.* 364:1326-33, 2011.
- 253) Demicheli V, Debalini MG, Rivetti A. Vaccines for preventing tick-borne encephalitis. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD000977, 2009.
- 254) Wright PF, Ankrah S, Henderson SE, Durbin AP, Speicher J, Whitehead SS, Murphy BR, Pletnev AG. Evaluation of the Langat/dengue 4 chimeric virus as a live attenuated tick-borne encephalitis vaccine for safety and immunogenicity in healthy adult volunteers. *Vaccine*. 26:882-90, 2008.



## Flaviviruses

**Tomohiro ISHIKAWA<sup>1)</sup>, Eiji KONISHI<sup>2)</sup>**

1) Department of Microbiology, Dokkyo Medical University School of Medicine,

2) BIKEN Endowed Department of Dengue Vaccine Development, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

Family *Flaviviridae* genus flavivirus contains numerous pathogenic viruses such as Japanese encephalitis virus, dengue virus, West Nile virus, etc, which cause public health problems in the world. Since many mammals and birds can act as amplifying hosts and reservoir hosts in nature and those viruses are transmitted by haematophagous mosquitoes or ticks, those viruses could not be eradicated from the nature. In the recent few decades, the viral replication mechanism and the ultrastructure of viral proteins as well as the viral immune evasion mechanism have been elucidated extensively, leading to develop novel types of antivirals and vaccines. In this review, the flavivirus nature and epidemiology, replication mechanism, immune response and immune evasion, and antivirals and vaccines against flaviviruses were described.