

31-9

# 日本腦炎疫學調查

林敬覆\* 黎南榮 林榮培 林有良  
陳聖怡 潘居祥 楊揚輝

台灣省家畜衛生試驗所豬瘟研究系

**摘要** 為了解日本腦炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus; JEV) 在本省活動情形，而於 1994 年每月下旬分別採集本省北 (宜蘭縣) 中 (臺中縣) 及南 (臺南縣) 部之 2 個月齡 (8~10 週齡) 之小豬血清 30 或 50 頭，測定其日本腦炎之 HI (Hemagglutination-Inhibition) 力價。結果發現北部於 3 月即有感染 JEV 之陽性豬隻出現，中部及南部，則分別在 4 及 2 月出現其陽性豬隻，到 6 月全省陽性豬隻比率達到高峰後，持續到 9~10 月才下降。故 JEV 在本省於 2 月便開始活躍，6~10 月維持在高峰狀態，11~12 月仍是其活動期，翌年 1~2 月始為其靜態期。

**關鍵詞：**日本腦炎病毒，血清中和試驗，血球凝集反應，血球凝集抑制反應

## 緒言

日本腦炎為人畜共同傳染之一種病毒性疾病，本病毒屬於黃病毒科 (Flaviviridae)，係為 RNA 單鏈正股核酸病毒，對人及豬具有高度致病率<sup>[1, 3]</sup>。本病於 1933 年首次由日人 Fujita 及 Taniguchi 等二人分離及同定<sup>[1, 2, 3]</sup>。1935 年 Sakai 首度報告台灣有日本腦炎病例<sup>[2, 3]</sup>。此後由於常年流行嚴重及防疫措施之需要，於是省衛生處於 1955 年七月公佈日本腦炎為法定報告傳染病<sup>[2]</sup>，以了解其疫情。便於往後防疫措施制定之參考，同時研發疫苗，至 1977 年行政院衛生署終於自行開發了人用日本腦炎疫苗，實施注射，成效良好。由 1955~1977 年平均每年死亡人數 64 人減至近年 1977~1980 年來平均每年死亡人數為 3 人。由於近 20 年來疫苗注射，人文及生態環境之變遷。其流行狀況已有改變，如其感染之年齡層升高及月份提前等之改變，故其防疫措施有再檢討之必要<sup>[2, 3, 8, 9]</sup>。

日本腦炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus; JEV) 越冬保存者，蝙蝠可能是其中之一<sup>[3]</sup>，其主要病媒蚊是環紋家蚊 (Culex annulus) 及三斑

家蚊 (Culex tritaeniorhynchus)，而豬隻是日本腦炎病毒主要增幅動物，藉著蚊…豬…蚊…豬…蚊之間同心圓波紋擴散似地病媒蚊帶病毒者急速增加，而導致受檢豬隻之日本腦炎陽性抗體同時增多而達 100% 之陽性率<sup>[2, 3, 4, 5, 7, 8, 11]</sup>。然而 JEV 在豬主要是為害懷孕母豬，使其發生有黑仔木乃伊、死、流產胎兒。如能適期恰當地使用疫苗防疫，可預防本病毒為害懷孕母豬避免發生死流產，減少農民損失，以增加收益。

由於日本腦炎係人畜共同傳染疾病，於公共衛生上至為重要。而豬隻又是本病毒之主要增幅動物<sup>[3]</sup>，故可由初次感染 JEV 之陽性豬隻之出現，測知而了解 JEV 活動情形，不但可有效監控豬隻之疫情，亦可供人醫日本腦炎防疫措施制定時之參考，以便早日撲滅日本腦炎。

## 材料與方法

### 血清：

於 1994 年每月下旬分別採取本省北 (宜蘭縣)，中 (臺中縣) 及南 (臺南縣) 部種豬場或一貫場之 2 月齡 (8~10 週齡) 種豬或肉豬血液，

\*抽印本索取作者  
台灣省家畜衛生試驗所

或 50 頭，分離其血清，於 56 °C 之恆溫水槽不活化處理 30 分鐘後，保存於 -20 °C 冰櫃備試。

#### 病 毒：

日本腦炎病毒中山株 (JEV-中山株) 及 JAGAR 株 (JEV-JAGAR) 係本所藉哺乳小白鼠腦內增殖保存。同時為測定其中和抗體力價，部份改以豬羶丸株化細胞馴化增殖，保存於 -70 °C 冰櫃備用。

#### 血球凝集反應 (Hemagglutination; HA) 及血球凝集抑制反應 (Hemagglutination - inhibition; HI) 抗原之製備：

依 Clarke 和 Casals 之方法<sup>[10]</sup> 製備測定 HA 及 HI 之抗原<sup>[2, 3, 4, 5, 7]</sup>。以 JEV-中山株 0.01~0.02 ml / 隻劑量腦內注射於哺乳小白鼠腦內，約於注射後 4 天發病，將發病之小白鼠收存於 -70 °C 冰櫃備試。

將收存於 -70 °C 度冰櫃之小白鼠取出回溫後，立即以酒精棉消毒，去其頭皮，採取其腦部組織，將所收集之小白鼠腦部組織，以硼酸緩衝液 (Borate Buffered Saline PH 9.0; BBS) 製成乳劑，經 6,000 rpm 30 分鐘離心，取其上清液，即為 HA 及 HI 之抗原。如欲進一步純化，則須以 -20 °C 冰凍之丙酮三度萃取，於最後一次萃取離心倒棄其上清液後，其沉澱抗原於真空乾燥後，依原體積加入 BBS 於 4 °C 18 小時溶解萃取，於測定其 HA 力價之後保存於 -70 °C 冰櫃備用。

#### HA 及 HI 力價之測定：

取上述製備之 HA 哺乳小白鼠腦乳劑製成之抗原以 2 倍階稀釋至 4096 倍，依 Clarke 和 Casals 之方法測定其 HA 力價<sup>[10]</sup>，即以含 0.4 % BA (Vovine Albumine) 之 BBS (BABBS) 將上述之抗原 (0.05 µl) 以 2 倍階梯次稀釋方法稀釋至 4096 倍後，每一稀釋階加入 0.33 % 鵝紅血球 (8 % 鵝紅血球以 virus Adjusting Diluent; VAD 之緩衝液，稀釋 24 倍) 0.05 ml 充分震盪後，靜止平放於 37 °C 感作 1 小時後，判定計算其 0.05 ml / 孔之 HA 反應力價。以供測定其 HI 力價之用。

取上述之經不活化處理之血清 0.1 ml，加入 -20 °C 冰凍之丙酮 1.90 ml 振盪 10 分鐘後，3,000 rpm 離心，倒棄其上清液，其沉澱物加入 -20 °C 冰凍之丙酮 1.90 ml 振盪 10 分鐘後，再以 3,000 rpm 離心如此反覆三度處理其血清，於最後

一次萃取之沉澱物於真空乾燥後，依原體積加入 BBS 於 4 °C 18 小時溶解萃取，以除去其非特異之抗凝元，接著以鵝之 RBC Packed Cell 於 4 °C 振盪處理 10 分鐘後，以 3,000 rpm 離心，取其上清液，以除去其非特異之凝集元。經上述處理後之血清，已被稀釋 20 倍，故其 HI 力價之測定是由 20 倍開始測定，之後以 2 倍階稀釋至 2560 倍，依 Claeke 和 Casals 之方法測定其 HI 力價<sup>[10]</sup>，即取經上述處理後之血清，0.025 ml 以 0.4 % BABBS 依 2 倍階梯次稀釋方法稀釋至 2560 倍後，每一稀釋階加入 0.025 ml 上述之抗原 (8 U-HA/0.025 ml) 充分震盪後，靜止平放於 4 °C 感作 18 小時後，每一稀釋階加入 0.05 ml 之 0.33 % 鵝紅血球 (8 % 鵝紅血球以 VAD 稀釋 24 倍) 經充分震盪後，靜止平放於 37 °C 感作 1 小時後，判定其 HI 反應力價。

#### 中和抗體力價之測定：

用於測定中和抗體力價所用之病毒抗原 (virus-Ag) 感染力價之測定，則以 96-孔之塑膠培養盤測定其 0.025 ml / 孔之病毒感染力價 (TCID<sub>50</sub>) 後，保存於 -70 °C 冰櫃以供測定其中和抗體力價時使用。

取上述已經不活化處理之血清，以 2 倍階稀釋至 256 倍後，每一稀釋階加入 Viru-Ag (100 TCID<sub>50</sub>/0.025 ml) 後，放入 5 % CO<sub>2</sub> 37 °C 之恆溫箱感作 1 小時後，取出加入豬羶丸株化細胞 (0.05 ml / 孔)，再放入 5 % CO<sub>2</sub> 37 °C 之恆溫箱於 7 天後判定其中和抗體力價。

#### 結 果

依上述之試驗材料及方法測定其 HI 力價之結果顯示，北部之宜蘭縣，於 3 月時 JEV 已開始活躍，在中部之臺中縣及在南部之臺南縣，則分別於 4 月及 2 月開始活躍，然後逐月增加，到 6~10 月間維持在高峰狀態，在 11~12 月仍是其活月仍是其活動期，直到翌年 1~2 月才為其靜態期。詳如表 1。

#### 討 論

由於日本腦炎之移行抗體約於仔豬出生後 1 個月左右消失，而新感染者於感染後 2~4 週其 HI 力價達到最高，故每個月份之下旬採血測試

其 HI 力價，正逢最恰當時期。故於測試 2 個月齡小豬之 JE-HI 力價時，其結果如是陽性，這表示是初次感染者，是被帶有 JEV 之病媒蚊叮咬所致。如此可推知 JEV 活動情形。詳如表 1。

由於水稻田亦是提供病媒蚊孳生的好地方，故農民於水稻田噴撒農藥時病媒蚊之數量亦相對的減少，連帶著豬隻被帶有 JEV 之病媒蚊叮咬之機會亦相對的減少，故雖於 JEV 活躍之高峰期測試 2 個月齡小豬之 JE-HI 力價時，其陽性率亦隨之起伏因而未必能達到 100%。

由於測定日本腦炎之 HI 力價時，其血清之處理即繁雜又費時，故擬以測定中和抗體力價代之，但其結果與 HI 力價者不一定吻合。詳如表 2 及表 3。故本試驗仍採 HI 力價計算其結果。

由於日本腦炎病媒蚊因生態環境之改變而提前活動<sup>[3]</sup>，依上述之結果可知日本腦炎病毒除 1~2 月外，其餘月份所有豬隻均有被帶有 JEV 之病媒蚊叮咬而感染日本腦炎病毒之機會。故於 3

~4 月配種之女豬應分別於 1~2 月接種豬用日本腦炎活毒疫苗，以預防懷孕女豬因感染本病毒而發生死流產，所引起之損失。

由於豬隻日本腦炎防疫工作所涉及時空層面廣泛，除加強環境清潔，更應定時定期消毒，以防止病媒蚊孳生，降低蚊豬之間感染頻率，以減低日本腦炎罹患率，使日本腦炎防疫工作更容易落實。

目前預防感染日本腦炎之主要方法仍沿用來自鼠腦純化或組織培養之減毒疫苗，但是這些疫苗的缺點，是可能含有來自鼠腦純化或組織培養之過敏原及不同日本腦炎不同株間之差異，致使疫苗引起之免疫反應不能具有完整的免疫保護效果，加上其製造昂貴且費時，價錢高故無法普遍使用，基於此因，宜應全力研發一價廉而具有完整的免疫保護效果之遺傳工程之重組疫苗，以供田間廣泛使用，以期能早日撲滅日本腦炎，造福農民，樂利民生。

表 1 1994 年 1~12 月本省北（宜蘭縣），中（臺中縣）及南（臺南縣）部 8~10 週齡之種肉豬之 JE-HI 力價測定結果

1994 年 月 份	陽性頭數 / 受測頭數 (HI 力價)		
	宜 蘭 縣	臺 中 縣	臺 南 縣
1	0 / 50	0 / 50	0 / 30
2	0 / 50	0 / 30	6 / 30
3	11 / 50	0 / 30	23 / 30
4	4 / 50	28 / 30	14 / 30
5	18 / 50	2 / 30	8 / 30
6	49 / 50	26 / 30	29 / 30
7	35 / 50	30 / 30	30 / 30
8	41 / 50	27 / 30	30 / 30
9	50 / 50	30 / 30	29 / 30
10	23 / 50	23 / 30	8 / 30
11	27 / 50	4 / 30	11 / 30
12	23 / 50	1 / 30	13 / 30

依 Clarke 和 Casals 之方法測定 JE-HI 力價時，判定其 HI  $\geq$  X 40 為陽性。

表 2 宜蘭縣 1994 年 8 月採取 8~10 週齡豬隻及經產母豬日本腦炎血清中和試驗 (JE-SNT) 及其血球凝集反應 (JE-HI) 之抗體力價

編號	JE-SNT	JE-HI	編號	JE-SNT	JE-HI	編號	JE-SNT	JE-HI
♀ 00	X 8	X 640	310	< X 2	X 20	1062-1	X 64	X 640
♀ 143	X 256	> X 2560	340	X 2	X 40	1062-2	X 64	X 160
♀ 134	> X 256	> X 2560	340-1	X 2	X 20	1062-3	X 256	X 1280
♀ 340	X 32	X 640	340-2	X 2	X 80	1062-4	X 128	X 1280
♀ 359	X 64	X 320	340-3	< X 2	X 80	1066	X 128	X 1280
♀ 1062	X 256	> X 2560	340-4	X 2	X 20	1066-1	X 32	X 1280
♀ 1066	> X 256	> X 2560	359	X 8	X 640	1066-2	> X 256	X 1280
♀ 1097	X 2	X 1280	359-1	X 16	X 640	1066-3	X 128	X 1280
♀ 4046	X 32	X 1280	359-2	X 16	X 640	1066-4	> X 256	X 640
♀ 4844	X 64	X 160	359-3	X 8	X 160	1097	X 4	X 20
89	< X 2	X 160	359-4	X 16	X 20	1097-1	X 4	< X 20
143	X 8	X 80	466	X 8	X 20	3764	X 16	X 320
143-1	X 8	X 160	467	X 2	X 40	4046	X 4	X 160
143-2	X 16	X 160	469	X 2	X 40	4046-1	X 4	X 20
160	X 16	X 160	470	X 128	X 20	4046-2	X 4	X 40
164	X 8	X 80	1021	X 16	X 80	4844	X 16	X 80
164-1	X 8	X 160	1021-1	X 16	X 40	4844-1	X 4	X 160
164-2	X 16	X 160	1021-2	X 16	X 160	4844-2	X 16	X 80
164-3	X 16	X 160	1052	X 4	X 160	4844-3	X 16	X 40
194	X 32	X 160	1062	X 64	X 80	4844-4	X 16	X 80

♀：為經產母豬。

表 3 臺中縣 1994 年 8 月採取 8~10 週齡豬隻之 JE-SNT 及 JE-HI 之抗體力價

編號	JE-SNT	JE-HI	編號	JE-SNT	JE-HI	編號	JE-SNT	JE-HI
1	X 4	X 160	11	X 8	X 160	21	< X 2	X 40
2	< X 2	X 80	12	X 8	X 1280	22	X 8	X 40
3	X 2	X 80	13	X 4	X 80	23	X 4	X 20
4	X 4	X 40	14	X 2	X 80	24	X 2	X 40
5	< X 2	X 160	15	X 2	X 40	25	X 8	X 80
6	X 4	X 320	16	X 2	X 80	26	X 4	X 80
7	X 4	X 320	17	X 4	X 20	27	X 4	X 160
8	X 2	X 320	18	X 2	X 20	28	X 2	X 160
9	X 8	X 640	19	X 2	X 40	29	X 4	X 40
10	X 8	X 640	20	X 4	X 40	30	X 4	X 160

誌謝 本報告之完成呈蒙宜蘭縣家畜疾病防治所，台中縣家畜疾病防治所及台南縣家畜疾病防治所所長及全體同仁之協助採血，特此致十二萬分之感謝。

### 參考文獻

1. 林勝育、蔡向榮。日本腦炎。引自臨床豬病學。中華民國獸醫學會主編。P. 401-406, 1984.
2. 張亞倫。日本腦炎病毒之 E 和 NS1 單源抗體特性及其抗原決定位分析。國立台灣學獸醫學研究所碩士論文。中華民國八十年六月，1991.
3. 張國井、曾燦璋。台灣地區日本腦炎流行病學之研究：中華微免雜誌。25：25-37, 1992.
4. 詹益波、呂清泉、陳茂振、劉燃炎。台灣家畜日本腦炎之研究：1. 越夏及未越夏日本腦炎 HI 抗體調查。台灣省畜衛試研報 No. 4：1-11, 1967.
5. 詹益波、陳茂振、蘇杰夫、劉燃炎、劉永和。台灣家畜日本腦炎之研究：(2) 豬隻日本腦炎病毒之分離及其性狀。台灣省畜衛試研報 No. 5：113-121, 1967.
6. 詹益波、蘇杰夫、黃智明、黃瑞禎。家畜日本腦炎免疫用滅毒株之研究。台灣省畜衛試研報 No. 7：35-44, 1970.
7. 鍾明華、林敬覆、蔡紹前、詹益波、楊揚輝、李全。豬日本腦活毒疫苗之研製及其免疫效果。台灣省畜衛試研報 No. 11：63-70, 1974.
8. Chen WF, Lai CY, Tsaur NJ. Monoclonal antibodies specific for Japanese Encephalitis Virus. J. Chin Soc. Vet. Sci. 16：11-22, 1990.
9. Choi, C. S. Molior, T. W. and Joo, H. S. Inhibition of porcine parvovirus replication by empty virus particles. Arch. Virol. 96：75-87, 1987.
10. Clarke, D. H. and Casals, J. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition with Arthropod borne virus Amer. J. Med. Hyg., 7：561-573, 1958.
11. Igarashi-A. Epidemiology and control of Japanese Encephalitis. World-Health-Stat-Q. 45 (2-3), 1992.

## Studies on the Seroepidemiology of Japanese Encephalitis in Taiwan

King-Fu Lin,\* N. Y. Li, Y. P. Lin, Y. L. Lin,  
S. Y. Chen, C. S. Pan and Y. H. Yung

Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.

**SUMMARY** In order to confirm the period of Japanese Encephalitis (JE) prevalence in Taiwan, we had tested the sero-conversion of Hemagglutination- Inhibition (HI) antibodies positive against Japanese Encephalitis Virus (JEV) of 2 months old pigs (slaughters and gilts), 30 or 50 heads, from North (Yilan Prefecture), Middle (Taichung Prefecture) and South (Tainan Prefecture) region in Taiwan. The results revealed the HI antibodies positive against JEV pigs appeared at March, April and February in Yilan, Taichung and Tainan prefectures, respectively, and then the percentages of HI titer positive pigs were increasing gradually to 100 % at June and maintaining to October. In other words, the period of JE prevalence in Taiwan was from February to December and the period of JE major epidemic was from June to October.

**Key words:** *Japanese Encephalitis Virus, Serum-Virus Neutralization Test, Hemagglutination, Hemagglutination-inhibition.*

---

\*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.