

# 家畜日本腦炎免疫用減毒株之研究

詹益波 黃智明 蘇杰夫 鍾明華

(臺灣省家畜衛生試驗所)

劉永和

(中國農村復興聯合委員會)

## 一、緒言

日本腦炎不僅可感染人類，使部份兒童發生腦炎而死亡，對於家畜生產上之損害亦頗鉅。馬及山羊感染本病後呈顯性感染者，將發生腦炎甚至斃死，懷孕母猪感染本病後將發生死產<sup>13</sup>，由於豬隻為臺灣重要之經濟動物，因而所遭受之經濟損失不貲。家畜中又以豬隻之 Viremia 最顯著，故豬隻被認為在日本腦炎之疫學上扮演著極重要之角色<sup>9,14</sup>，而人類日本腦炎之傳染路徑則被推斷為由有毒蚊子傳染於豬，豬發生 Viremia 時再經蚊子傳染於人<sup>9,10</sup>。因此如能有效控制豬之日本腦炎不僅可防止母猪之死產而提高豬隻增產，間接亦可減少人類之日本腦炎病例。目前在臺灣為預防母猪之死產而使用之疫苗為鼠腦疫苗，但其效果並不顯著。

近年來有許多研究者曾從事於日本腦炎減弱病毒之研究。1962年 Rohitayodhin等<sup>11</sup>，曾將分離自蚊子之病毒以低溫培養方法通過於 hamster kidney tissue culture 而獲得 Cold strain。Shimizu<sup>16</sup> 於1963年將 Hotta strain 亦累代通過於 HK 而獲得減弱病毒。Inone<sup>4</sup> 則於1964年將 Mukai Strain 通過於白鼠胎兒皮細胞而產生 m 突變毒株 (mutant)。Sazawa 等<sup>13</sup> 曾將分離自豬胎之 Sagara strain 通過於培養在 30°C 之牛腎細胞而獲得減毒 S<sup>-</sup> strain。Takehara 等<sup>19,10</sup> 則將分離自豬血之 AT<sub>31</sub> strain 高度繼代於 HK 而獲得減弱病毒。Kodoma 等<sup>9</sup> 則嘗試應用減弱病毒免疫豬隻以資預防母猪之死產。

筆者曾將分離自豬血之日本腦炎病毒通過於 Piglet kidney (PK) 及 hamster kidney (HK) cell culture 各10代，並經 Cloning 後再通過於 Guinea pig kidney cell culture (GPK) 5代，茲將所得結果報告如下，敬請海內外先進賜於指正。

## 二、試驗材料及方法

供試毒株：日本腦炎新莊株，為筆者於1967年分離自豬血之毒株，曾通過於哺乳白鼠腦7代，經冷凍乾燥後儲存於-20°C。另由日本家畜衛生試驗場分讓 Fugii 及 Nakayama strain 曾在本所繼代於白鼠腦12代及21代。

供試白鼠：由本所動物繁殖室生產之2~6日齡之哺乳白鼠及3週齡之白鼠。

供試豬隻：為本所 Specific pathogen free animals center 所育成之 Specific pathogen free (SPF) 豬隻，經抽血檢查日本腦炎抗體均為陰性。

細胞培養方法：無論 PK、HK 或 GPK 均去除腎盂及髓質部，以剪刀剪成碎片後使用 0.25% Trypsin 消化，經洗滌、收集細胞後以 0.8% 之比例加入 15% 牛血清及 0.5% Lactoalbumin hydrolysate 之 Earle's solution，分裝於角瓶 (bottle) 5ml 及試管 (tube) 1ml。置 37°C 約經 3~5 天即形成 monolayer，維持液則以 5.5% Bovine albumin solution 加入 2%，置換牛血清。

病毒通過於細胞培養方法：於形成 monolayer 後以 Earle's solution 洗滌兩次，接種病毒液

於角瓶  $0.2^{ml}$ ，試管  $1^{ml}$  置於  $37^{\circ}C$  培養，部份曾置  $30^{\circ}C$  培養做觀察比較試驗，經 3~5 天於培養液中產生 hemagglutinin 並出現 cytopathic effect (CPE) 後抽取培養液接種於次代。

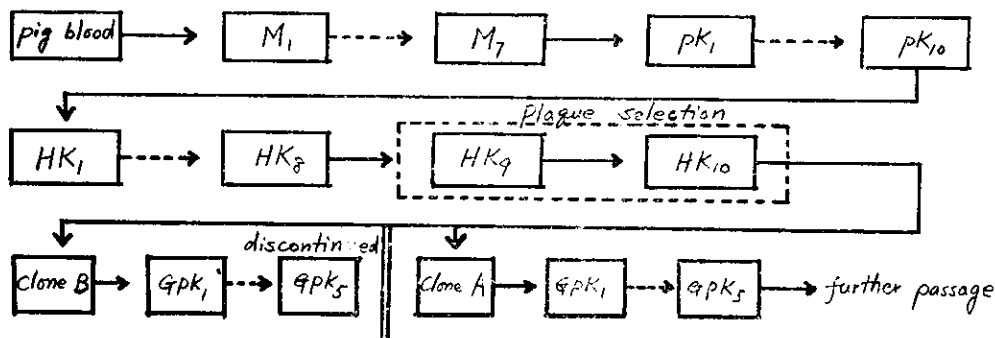
病毒感染價測定法：病毒液以 10 進法稀釋後，將各階段稀釋液接種於 4 支 HK cell culture，培養於  $37^{\circ}C$  觀察其 CPE 並於 7 天後加入同量之 0.33% 鵝血球液，檢查 hemagglutination，然後以 Reed 及 Macnch 之方法計算其  $TCID_{50}$ 。

HI 價測定法：依照 Clarke 及 Casals<sup>2</sup> 之方法實施。HI test 抗原係日本腦炎病毒 (JEV) Fuji strain 感染哺乳白鼠腦乳劑經 acetone 及 ether 處理後冷凍乾燥者。

### 三、試驗結果

#### 1. 新莊 Strain 之組織培養細胞通過：

新莊 Strain 之組織培養細胞通過其大綱如圖 1 所示，首先通過於 piglet kidney cell culture (PK) 10 代，其次通過於 hamster kidney cell culture (HK) 10 代，在 9~10 代時曾以 plaque selection method 實施 cloning 2 次，選出 clone A 及 B，分別再通過於 guinea pig kidney cell culture (GPK) 5 代，除 Clone B 暫時停止繼代外，Clone A 擬繼續累代通過 GPK。



M: Suckling mice

PK: Primary piglet kidney. HK: Primary hamster kidney。

GPK: Primary guinea pig kidney

圖1. 新莊 Strain 之組織培養細胞通過。

#### 2. 新莊 Strain 接種於 PK (tube) 後 CPE 之出現及 hemagglutinin 之產生情形：

將新莊 Strain 通過 PK 5 代後接種於培養在試管內之 PK 置  $37^{\circ}C$  培養時，經 2~3 天即發生 CPE，但如置於  $30^{\circ}C$  培養則需 5 天後始發生 CPE。另每日檢查 hemagglutinin 之產生情形結果，發現 hemagglutinin 在未發生 CPE 之前即已產生並隨著 CPE 之進展而逐漸消失。培養於  $37^{\circ}C$  者雖其 CPE 之發生較早，但 hemagglutinin 之消失亦較快。培養於  $30^{\circ}C$  者其 CPE 之發生雖較遲，但 hemagglutinin 則保持較久，詳見表 1。

#### 3. 新莊 Strain 在 PK (bottle) 中培養於 $37^{\circ}C$ 及 $30^{\circ}C$ 之增殖情形：

新莊 Strain 於  $37^{\circ}C$  及  $30^{\circ}C$  PK (bottle) 培養液中之增殖情形如圖 2 所示，培養於  $37^{\circ}C$  者較培養於  $30^{\circ}C$  之增殖約早 1 日，兩者取約略相同之曲線而增殖，於接種後 5、6 天達最高力價 ( $10^{6.0} \sim 10^{7.5} TCID_{50}/ml$ ) 過後即開始下降。如觀察病毒增殖與 CPE 出現之關係；在 CPE 未出現前病毒係在繼續增殖中，CPE 出現之翌日病毒力價即達最高峰，以後則隨着 CPE 之進展而逐漸降低。

表 1：新莊 Strain 接種於 PK (tube) 後 CPE 出現及 hemagglutinin 之消長

Cell cultures passaged	Culture temperature	CPE & HA titer	days after inoculation						
			1	2	3	4	5	7	10
PK <sub>6</sub>	37°C	CPE	-	+	++	+++	+++		
		HA	8	128	16	16	8		
	30°C	CPE	-	-	-	-	+	++	+++
		HA	8	64	128	128	64	32	32

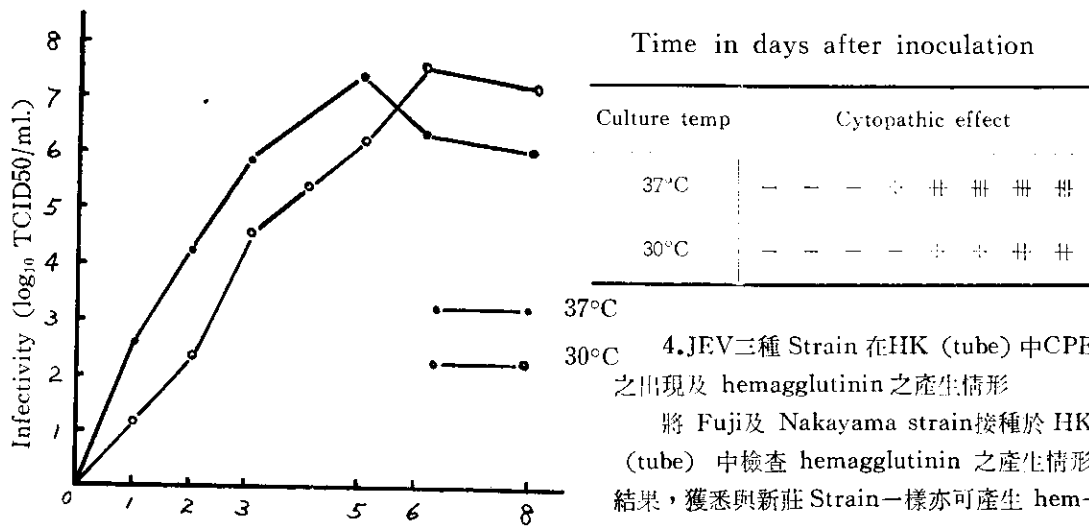


圖 2. 新莊 Strain 在 PK (bottle) 之增殖曲線與出現 CPE 之關係

圖 2. 新莊 Strain 在 PK (bottle) 之增殖曲線與出現 CPE 之關係。圖中之增殖情形與在 PK 中之增殖情形相類似，惟新莊 Strain 在 HK 中之增殖力價係在  $10^{7.0} \sim 10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml. 之間，較 PK 中之增殖力價 ( $10^{6.0} \sim 10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml.) 為高。Fuji 及 Nakayama strain 均為經白鼠腦高度繼代之毒株，其在接種於 PK 第一代時，需時 6~7 天始發生 CPE 但通過 PK 3 代及 HK 3 代後，發生 CPE 之時間已縮短為 2~3 天。

表 2 JEV 三種 Strain 在 HK (tube) 中出現 CPE 及產生 hemagglutinin 之情形

Strain & cell culture Passaged	CPE & HA titer	days after inoculation			
		1	2	3	4
新 莊 PK <sub>10</sub> HK <sub>6</sub>	CPE	-	+	+++	
	HA	64	128	16	
Fuji PK <sub>3</sub> HK <sub>5</sub>	CPE	-	+	+++	
	HA	64	128	32	

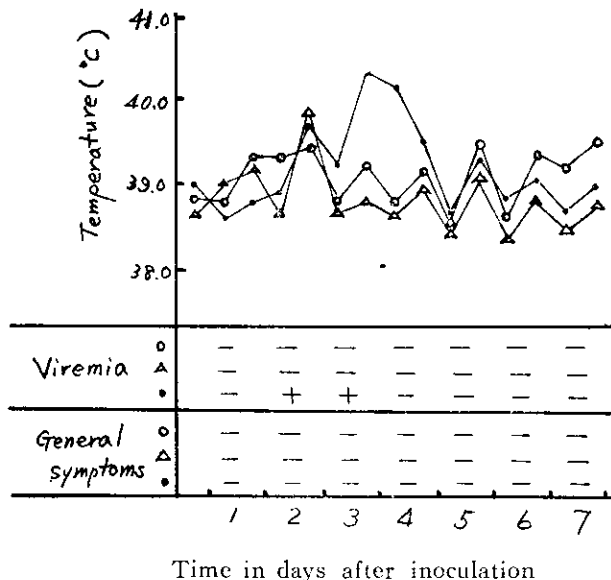
Nakayama PK <sub>3</sub> HK <sub>3</sub>	CPE	-	-	+	+
	HA	16	64	32	16

5. 新莊 Strain PK<sub>10</sub>-HK<sub>10</sub> 通過毒對於 SPF 豬之病原性：

將新莊 Strain 通過 PK<sub>10</sub> 代及 HK<sub>10</sub> 代並以 Chicken embryo cell (CE) 實施 Cloning 2 次後，選取 plaque 之 Size 較大 (Clone A) 與較小 (Clone B) 者兩種與 Original mouse brain virus 同時接種於 SPF 豬 (4 月齡) 各一頭，並於接種後每日採血檢查 Viremia 之出現情形，發熱情形及一般臨床症狀結果 (圖 3) 除接種 Original mouse brain virus 者呈現 40°C 左右之發熱並於第 2、3 日檢出 Viremia 以外，其餘兩隻接種 Clone A 與 Clone B 者均未見臨床症狀亦未能檢出 Viremia，是否供試 SPF 豬月齡過大所致，擬選擇月齡較小豬隻再試。

6. PK<sub>10</sub>-HK<sub>10</sub> 通過毒接種豬之 HI 抗體消長試驗：

將上述 PK<sub>10</sub>-HK<sub>10</sub> 通過毒及 Original mouse brain virus 接種豬於接種後每隔 1 週採取血液，檢查其 HI 抗體之消長情形結果，如圖 4 所示 Clone A 接種豬與原毒接種豬呈現約略相同之消長情形，即於接種後 1 ~ 2 週即上升至 320 ~ 640 倍，3 ~ 5 週保持 320 倍，6 ~ 9 週則維持於 160 ~ 320 倍之間，但 Clone B 接種豬，



- Inoculated with clone A, 10<sup>7.16</sup> TCID<sub>50</sub>
- △ Inoculated with clone B, 10<sup>6.25</sup> TCID<sub>50</sub>
- Inoculated with original virus, 10<sup>5.16</sup> TCID<sub>50</sub>

圖3. 新莊 Strain PK<sub>10</sub>-HK<sub>10</sub> 通過毒及原毒對於 SPF 豬之病原性。

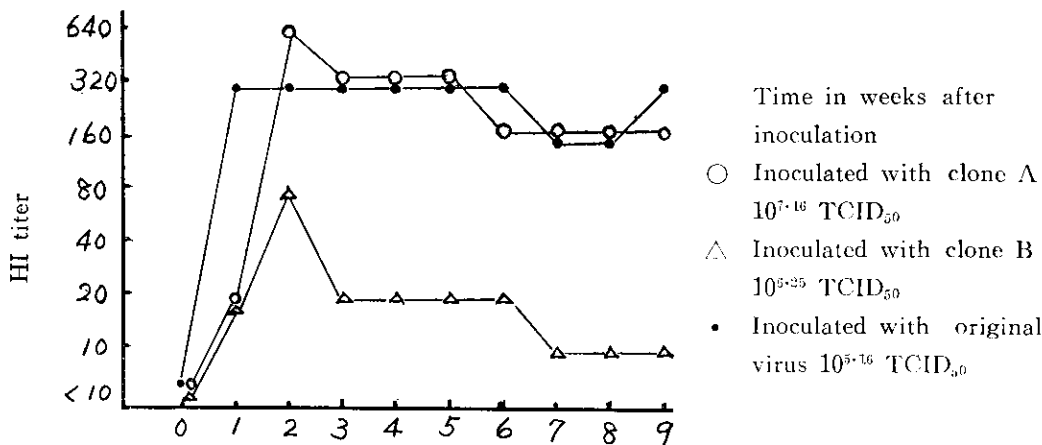


圖4. PK<sub>10</sub>-HK<sub>10</sub> 通過毒及原毒接種豬之 HI 抗體消長情形

則僅於接種後第 2 週上昇至 80 倍，3—6 週雖保持 20 倍，但 7—9 週即下降為 10 倍。clone B 之病原性及免疫原性似乎已相當減弱。

### 7. IgM 及 IgG 抗體產生時期檢查

吾人已知 IgM (19S) 抗體之出現較 IgG (7S) 為早，IgM 抗體對 2-Mercaptoethanol (2-ME) 具有 Sensitive，但 IgG 則否，故可以利用 2-ME 將兩種抗體予以鑑別。為明瞭 IgM 及 IgG 抗體究於何時產生，乃利用上述病毒接種豬，於每週採血之便，分離血清經 2-ME 處理後實施 HI test，另置未處理 2-ME 者為對照。其結果列如表 3；由表中成績可知接種病毒後 1 週內所出現之抗體全為 IgM 抗體，至第 2 週 IgG 抗體開始出現，但其抗體價尚較 IgM 為低，但至第 3 週則兩抗體成同一 titer 或 IgG 抗體價較 IgM 抗體價低 1 稀釋階級。故對 2-ME 呈顯 Sensitive 之血清均為接種病毒後 2 週內者。換言之，經 2-ME 處理後實施 HI test 而呈顯 Sensitive 之豬隻，即表示該豬隻曾於最近 2 週內有過病毒之感染。

表 3 2-mercaptoethanol 處理與否之 HI test 結果

Virus inoculated	Weeks after inoculation,	Treatment	Result of HI test								Remarks (2-ME)
			1:10	20	40	80	160	320	640	1280 cont.	
Clone A	1	no	○	○	⊕	+	+	+	+	○	Sensitive
		2-ME	+	+	+	+	+	+	+	○	
	2	no	○	○	○	○	○	○	○	+	Resistance
		2-ME	○	○	○	○	○	○	+	+	
	3	no	○	○	○	○	○	⊕	⊕	+	Resistance
		2-ME	○	○	○	○	⊕	⊕	+	+	
Clone B	1	no	○	○	+	+	+	+	+	○	Sensitive
		2-ME	+	+	+	+	+	+	+	○	
	2	no	○	○	○	○	+	+	+	○	Sensitive
		2-ME	○	○	+	+	+	+	+	○	
	3	no	○	○	⊕	+	+	+	+	○	Resistance
		2-ME	○	○	+	+	+	+	+	○	
Original Virus	1	no	○	○	○	○	○	⊕	+	○	Sensitive
		2-ME	+	+	+	+	+	+	+	○	
	2	no	○	○	○	○	○	⊕	+	○	Sensitive
		2-ME	○	○	○	○	⊕	+	+	○	
	3	no	○	○	○	○	○	±	+	○	Resistance
		2-ME	○	○	○	○	○	⊕	+	○	

#### 四、討 論

Morimoto 等<sup>8</sup>曾報告將 JEV Sagara strain 接種於 Primary bovine kidney cell culture 而培養於 30°C 者與培養於 37°C、40°C 者之間，其病毒之增殖特性有顯著之不同。但如接種於 embryonic swine kidney established (ESK) cell culture 則無顯著之不同。筆者將 JEV 新莊株接種於 Primary PK, HK cell culture，結果培養於 30°C 者除病毒之增殖與 CPE 之出現較 37°C 為緩慢以外，病毒之增殖力價與 hemagglutinin 之產生方面，兩者之間並無顯著之差異。Lee 等亦曾使用 Primary swine kidney cell culture 培養白鼠繼代數較少而分離白豬血，人腦及蚊子等之 Strain 時，80—100% 之細胞在接種後 2—5 天之內即出現 CPE，但當培養 Nakayama strain 時在接種後 6—10 天仍無變化。Sugino 等<sup>18</sup>亦報告 Nakayama strain 較其他 strain 所產生之 hemagglutinin 較少，所出現之 CPE 較弱亦較慢，筆者亦在本試驗中發覺 Nakayama strain 出現 CPE 之時間較其他 strain 為遲（PK 第一代需時 7 天）。但此種情形可隨着培養細胞繼代數之增加，而逐漸縮短，至 PK 3 代-HK 3 代後已縮短為 3 天。

Sugimoto 等<sup>18</sup>認為在 ESK 中能產生高價之 hemagglutinin 是由於 ESK 優良之能力及以 bovine albumin 置換含有 HA inhibitor 之 bovine Serum 所致。並且推測維持液中之 bovine albumin 對於 hemagglutinin 有安定劑之作用。筆者亦同意 Sugimoto 等之看法，但據筆者之試驗成績，培養於 37°C PK 中之 hemagglutinin 在 CPE 達頂點後即逐漸降低其 titer。但如培養於 30°C 則影響較少，此種 hemagglutinin 如保存於 -20°C 則極不安定，原有 1:2048 titer 者，貯存 -20°C 10 週後即降低為 1:80。

筆者曾於民國 57 年至 59 年為明瞭臺灣冬季之豬隻是否亦有日本腦炎病毒之感染，自 57 年 11 月至 58 年 2 月以及 58 年 11 月至 59 年 2 月每月採取屠宰豬血清 60 頭至 80 頭不等，採血地點包括苗栗、清水、大甲、彰化、嘉義、高雄、屏東等地，採血返所後實施 2-ME 處理之 HI test 結果，僅發現在 11 月 10 日及 11 月 26 所採血者計 130 頭中有 17 頭 (13%) 呈顯 sensitive，其餘 12 月至翌年 2 月之豬者均為 Resistance。由本報告中接種病毒後 2 週內之血清始可顯現 sensitive 之成績推斷則顯示 10 月底至 11 月上旬之間，尚有少數豬隻感染日本腦炎病毒。但自 11 月下旬至翌年 2 月之間似無日本腦炎病毒之感染。

Sazawa 等報告云：豬隻有隨著月齡之增高而減低對病毒之感受性之傾向。筆者此次使用 4 月齡之 SPF 豬隻，月齡似嫌過大，或許因月齡過大，致未發生 Viremia 亦有可能。擬選擇月齡較小豬隻再試。今後並擬繼續累代通過於 GPK，每隔 10—20 代經 Cloning 後接種於各 2 頭 SPF 豬，除檢查 Viremia 與 HI 抗體外，增加中和抗體檢查，並於接種病毒後 3—5 週後以強毒接種攻擊，檢查其抑制 Viremia 之效果，另以 Suckling mice 檢查其病原性之減弱程度。

#### 五、結 言

為探求使豬隻不發生 Viremia 而仍具有優良免疫原性之活毒疫苗用種株，以預防因日本腦炎所引起之懷孕母豬之死產，並阻止病毒之傳播，間接減少人類之日本腦炎病例，曾將筆者於 1967 年分離自豬血之日本腦炎病毒 (JEV) 新莊 strain 通過於 Piglet kidney (PK)，hamster kidney (HK) 及 guinea pig kidney (GPK) 等細胞培養。

JEV 新莊，Fuji 及 Nakayama 等三種 strain 均可增殖於 PK HK 及 GPK 等 Cell culture。在培養液中產生 hemagglutinin 並使細胞發生 cytopathic effect，而 hemagglutinin 之產生則較 CPE 之出現為早。

新莊 strain 接種於 PK (bottle) 中培養於 37°C 時，其增殖速度較培養於 30°C 時約早 24 小時，並取約略相同之曲線而逐漸增殖，於接種後 5—6 天達最高力價 ( $10^{6.0} \sim 10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml) 以後即開始下降。本 strain 接種於 HK 時其病毒力價較 PK 為高，達到  $10^{7.0} \sim 10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml，接種

病毒後 CPE 未出現以前，病毒係在繼續增殖之中，CPE 出現後之翌日病毒感染價達最高峰，以後則隨著 CPE 之進展而逐漸降低。

將新莊 strain 通過 PK 及 HK 各 10 代後實施 Cloning 選取 clone A 及 clone B 與 Original mouse brain virus 接種於四月齡之 SPF 豬各 1 頭，檢查其病原性結果，接種 clone A 及 B 者均未見任何臨床症狀，亦未能檢出 Viremia，但接種 Original mouse brain virus 者則呈現 40°C 左右之發熱，並於第 2，3 日檢出 Viremia。該 3 頭豬於接種後每隔一週採血檢查其 HI 抗體之消長情形結果 clone A 與 Original virus 接種豬呈現約略相同之消長情形，即於接種後 1—2 週上升至 320—640 倍，3—5 週保持 320 倍，6—9 週則維持於 160—320 倍之間。但 clone B 接種豬，則僅於接種後第 2 週上升至 80 倍，3—6 週下降 20 倍，7—9 週更下降為 10 倍。

以 2-Mercaptoethanol 處理後血清實施 HI test，檢查 IgM 及 IgG 抗體之出現時間結果，獲悉接種病毒後 1 週內所出現之抗體全為 IgM 抗體至第 2 週 IgG 抗體即開始出現，但其抗體價尚較 IgM 抗體價低，至第 3 週則兩抗體成同一 titer 或 IgG 抗體價較 IgM 抗本價低一稀釋階段。故經 2-ME 處理後實施 HI test 而呈顯 Sensitive 之豬隻，即表示該豬隻曾於最近 2 週內有過病毒之感染。

註：本文要旨曾於民國 59 年 12 月提出於臺灣省畜牧獸醫學會 59 年年會上報告。

## 誌 謝

本研究之完成得國家科學委員會及農復會之經費補助，並承蒙農復會李秘書長崇道博士，余組長如桐及本所陳所長守仕之懇切指導與鼓勵，謹誌衷心之謝忱。

## 六、參考文獻

1. Bang, F. B., Gey, G. O., Foard, M. and Minnegan, D.: Chronic Infections Produced in Cultured Cell Strains by the Virus of Eastern Equine Encephalomyelitis. *Virology* 4, 404-417 (1957).
2. Clarke, D. H. and Casals, J.: Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-inhibition with Arthropod-borne Viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 7, 561-573 (1958).
3. 今野、遠藤、我妻、宇都野、野家、山可、茂庭、石田：日本腦炎の疫學—昭和 39 年度宮城縣に於ける調査成績，*醫學のあゆみ*，53，113—118 (1965)
4. Inoue, K. Y.: An Attenuated Mutant of Japanese Encephalitis Virus. *Bull. Wld. Hlth. Organ.* 30, 181-185 (1966).
5. Kodama, K., Matsubara, T., Watanabe, U., Nakai, M., Sasaki, N. and Inoue, Y.: Studies on Attenuated Japanese Encephalitis Live Virus Vaccine in Swine, Effects of Mixed Inoculation with Hog Cholera GPE-Strain of Virus Inoculation to Pregnant Sows. *The 16th Ann. Meet. Soc. Jap. Virologist* 2038 (1968)
6. Kodama, K., Sasaki, N. and Inoue, K. Y.: Studies of Live Attenuated Japanese B Encephalitis Vaccine in Swine. *J. Immunol.* 100, 194-200 (1968).
7. Lee, H. W., Hinz, R. W. and Scherer, W. F.: Porcine Kidney Cell Cultures for Propagation and Assay of Japanese Encephalitis Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 99, 579-583 (1958).
8. Morimoto, T., Sugimori, T., Miura, Y., Sazawa, H., Watanabe, M.: Growth

Characteristics and Persistent Infection of Japanese Encephalitis Virus in Bovine Kidney Cell Culture at Different Temperatures. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 9, 65-73 (1969) .

9. 中村稔治、高松泰人、宮本猛：子豚に於ける日本脳炎経鼻感染試験並びにワクチン應用試験、*日本獣醫協會雜誌*，3,240—244 (1950)

10. 中村、砂盃、松山、大谷、奥野：ブタの日本脳炎ウイルス血症と患者發生との關係、*醫學のあゆみ*，58，20—21 (1966)

11. Rohitayodhin, S. and Hammon, W. McD.: Studies of Japanese B Encephalitis Virus Vaccines from Tissue Culture. II. Development of An Attenuated Strain of Virus. *J. Immunol.* 89, 589-597 (1962) .

12. Rohitayodhin, S. and Hammon, W. McD.: Studies on Japanese B encephalitis Virus Vaccines from Tissue Culture. III. Further Selection and Testing of Attenuated Virus Line OCT-541. *J. Immunol.* 89, 823-833 (1962) .

13. Sazawa, H., Sugimori, T., Morimoto, T., Miura, Y. and Watanabe, M. : Response of Swine to An Attenuated Strain of Japanese Encephalitis Virus Obtained by Passage in Bovine Kidney Cell Cultures. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 9, 74-82 (1969) .

14. Scherer, W. F., Moyer, J. T. and Izumi, T. : Immunologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan. V. Maternal Antibodies, Antibody Response and Viremia Following Infection of Swine. *J. Immunol.*, 83, 620-626 (1959) .

15. Shimizu, T., Kawakami, Y., Fukuhara, S. and Matumoto, M. : Experimental Stillbirth in Pregnant Swine Infected with Japanese Encephalitis Virus. *Japan J. Exp. Med.* 24, 363-375 (1954) .

16. Simizu, B. : Studies on the Variation of Virulence of Japanese Encephalitis Virus. *Virus*, 13, 5-10 (1963) .

17. 順川章夫：日本脳炎血球凝集抑制反應、*家畜傳染病の診斷*，PP52-54.

18. Sugimori, T., Morimoto, T., Miura, Y. and Sazawa, H. : Hemagglutination of Japanese Encephalitis Virus Produced in Embryonic Swine Kidney Cell Cultures. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 9, 55-64 (1969) .

19. Takehara, K., Mitsui, T., Nakamura, H. and Nakamura, J. : Studies on Japanese Encephalitis Live Virus Vaccines. I. Development of An Attenuated Strain of Virus by Serial Passage in Hamster Kidney Cell Cultures. *NIBS Bull. Biol. Res.*, 8, 11-22 (1969) .

20. Takehara, K., Mitsui, T., Nakamura, H., Fukusho, K., Kuramasu, S., and Nakamura, J. : Studies on Japanese Encephalitis Live Virus Vaccines II. Immunization of Pigs with An Attenuated Strain of Virus. *NIBS Bull. Biol. Res.*, 8,23-37 (1969) .



# Study on the Living Vaccine Strain of Japanese Encephalitis for Domestic Animals

I. P. Chan, C. M. Huang, J. F. Su, M.H. Chung

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Y. H. Liu

## English Summary

(Joint Commission on Rural Reconstruction)

For the purpose of getting a JE living vaccine seed strain which posses excellent immunogenicity but do not cause viremia in pigs, using this strain to prevent the stillbirth in pregnant sows due to JE infection and to block the virus transmission, furthermore, to diminish the JE cases in human being, the author had passed the Hsin-Juang strain of JE virus which was isolated from the blood of a healthy pig by the present authors in 1967 in piglet kidney (PK), hamster kidney (HK) and guinea pig kidney (GPK) cell cultures.

All the three strains, Hsin-Juang, Fugui and Nakayama, of JE virus propagated in PK, HK and GPK cell cultures well. Haemagglutinin was detected from the infected culture fluid and appeared earlier than cytopathic effect.

The growth of the Hsin-Juang strain in PK incubated at 37°C showed 24 hours earlier than that incubated at 30°C. The infectivity titre reached a maximum ( $10^{6.0}$ - $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml) on the 5th day postinoculation, and then the titre declined slowly. When inoculated this strain in the HK cell cultures the virus titre ( $10^{7.0}$ - $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml) was higher than that of inoculated in the PK cell cultures. The viruses multiplied continuously during the period of postinoculation to CPE occurrence. The virus infectivity titre reached to the peak one day after the CPE was observed. The decrease in virus titre accompanying the progress of the CPE development was noted.

Virus cloning was carried out several times after the Hsin-Juang strain had been passed in PK and HK 10 generations respectively. Clone-A and clone-B were selected as the seed strains. These two cloned viruses and the original mouse brain virus (MBV) were inoculated in each of 4-month-old SPF piglets. Pathogenicity was checked, results showed that piglets inoculated with the two cloned viruses manifested no clinical signs and no viremia was demonstrated. While the MBV inoculated piglet showed a little fever (about 40°C) and viremia occurred on the 2nd and 3rd days postinoculation. In all of the three inoculated piglets, the development of the HI antibody was determined at an one-week intervals, results showed that the development of the HI antibody of the piglet inoculated with clone-A virus was similar to that of MBV inoculated piglet. The HI titre of both reached to x320-x640 in 1-2 weeks after inoculation, remained x320 in 3-5 weeks, decreased to x160-x320 in 6-9 weeks. While the HI titre of the Clone-B inoculated piglet

( 44 )

showed as follows: x80 in 2 weeks postinoculation, x20 in 3-5 weeks, x10 in 7-9 weeks.

In order to determine the producing time of the IgM and IgG antibodies, the HI test was carried out after the sera had been treated with 2-mercaptoethanol (2-ME) . The results indicated that all the antibodies were the IgM antibody in the first one week postinoculation. The IgG antibody existed in the second week but had a lower titre than that of the IgM antibody. These results indicated that the pigs had infected the JE virus within recent two weeks if the HI antibody showed sensitivity to 2-ME treatment.