

陳春榮

台中榮民總醫院 教學研究部

日本腦炎是亞洲地區最重要的蚊媒病毒性腦炎，台灣每年也都有病例發現。日本腦炎病毒為一急性腦炎的病媒，幼童為常見之侵犯對象。日本腦炎病毒侵犯人類，初期感染部位為淋巴、血球或內皮細胞。許多證據顯示，中樞神經系統為最終的病發部位。神經功能失常或神經細胞大量破壞被認為是引發腦炎的原因。這種病毒如何造成腦部病變的原因尚不明確。在很多情形下，這種病毒並不直接來破壞腦組織而是間接地激活細胞媒介的免疫反應，例如毒殺性的細胞等而引發細胞病變。事實上，日本腦炎病毒感染後的神經組織會聚集大量的發炎細胞，研究結果亦顯示，病人血樣中發炎介質的濃度會增加且濃度高病人的預後越差。一般而言，微生物感染後寄主細胞的反應最主要的目的將是清除致病源，發炎反應是常見的作用機制，發炎反應的產生除了可控制微生物外，也會對寄主細胞造成傷害。然而目前對於病毒感染神經系統後病毒與寄主細胞的交互作用導致腦炎的過程所知較少。目前對於日本腦炎病毒如何從週邊轉移至中樞神經系統、如何引發免疫反應、如何造成神經損傷及引發神經症狀，為何日本腦炎病毒有神經組織的喜好性，不同神經組織及神經細胞間的病毒敏感程度等，仍然不甚了解。本文乃針對日本腦炎相關臨床及實驗研究發現進行整合性介紹，以期增進我們對病毒性疾病的了解。

前 言

在 21 世紀的今天科學日新月異、醫藥技術不斷的進步，但對於諸多重大危害國人健康甚鉅的常見疾病，包括癌症、糖尿病、感染症、心血管疾病、神經病變等，仍有許多未知之處，造成疾病的預防、診斷、治療出現瓶頸。如何改善增進民眾健康需各界的努力，其中若能以生物基礎詳細剖析疾病進展的分子細胞過程、影響的組織細胞趨性、危害因子的作用機制、組織細胞的內在反應、傷害的媒介等等，都能提供於疾病的預防、診斷、治療及研發對抗藥物的依據參考。其中感染症病毒性疾病除了患者本身的病變外，也因有感染性可造成傳染大流行，造成社會恐慌。更不幸的，病毒性疾病一般都沒有有效的治療藥物，只是治標性的支持性療法，雖然有些問題目前已發展出對抗性的疫苗，但大多數的病毒仍無疫苗可用，因此增進我們對病毒性疾病的了解，病毒生長複製及傷害的過程，將有助於發展對抗因應的策略。日本腦炎(Japanese encephalitis)是亞洲地區最重要的蚊媒病毒性腦炎，台灣每年也都有病例發現。目前對於日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus)如何從週邊轉移至中樞神經系統、如何引發免疫反應、如何造成神經損傷及引發神經症狀，多年來相關的研究雖有不錯的進展但仍然不甚了解。有鑑於此，本文章特別整理歸納這些年來有關日本腦炎方面的研究發現，例如日本腦炎病毒感染及造成神經系統病變的過程，病毒生物的生長複製特性，組織細胞的因應變化，宿主傷害及對抗的運作模式等等資訊，以供防疫人員及社會大眾對日本腦炎有深一層的認知與了解。

臨床症狀與流行特徵

日本腦炎是亞洲地區重要的公共衛生問題更是兒童的重要病毒性傳染病。日本腦炎係感染日本腦炎病毒所引起的急性腦膜腦炎，受損部位包括腦、脊髓及腦膜。蚊子為傳染媒介，潛伏期 5-15 天。典型的病程演進可分為四個時期，包括前驅期、急性期、亞急性期及恢復期。感染者大部分為無症狀感染，臨床症狀輕者常見發燒、頭痛、嘔心、倦怠、腹痛或出現意識障礙，重症病例多以突發高燒、頭痛、嘔吐開始發病，接著出現脊髓膜炎現象，3-5 日出現肌強直、異常行為、意識明顯變化甚至昏迷、死亡，即使是倖存者，也有一半以上的人會留下癡呆、智力與運動障礙等中樞神經系統方面的不良後遺症。目前每年流行的地區範圍：北起西伯利亞、日本延伸至臺灣、菲律賓、馬來西亞，印尼、斯里蘭卡、澳大利亞之間的西太平洋諸島嶼，及由韓國至中國、尼泊爾、中南半島、印度之間的東亞地區。日本腦炎的消長受氣後及季節兩大因素影響，大致可區分為兩種流行型態，在熱帶區的流行為散發性，全年皆有，無季節性，南印度、印尼、馬來西亞、新加坡、泰國南部的流行屬於此類。但在熱帶區域北部的流行則有明顯的季節性，主要發生在夏季，尤其是雨季結束的時節，此時病媒蚊的群數最高，發生的型態是爆發性，通常持續幾個月，中國、日本、台灣、印度北部、泰國北部、緬甸北部、越南的流行屬於此類(相關資料請詳閱衛生署疾病管制局教育網站)。

台灣地區流行概況

日本腦炎每年在台灣一定流行已成夏季地方性流行傳染病，流行地區幾乎遍布全台。日本腦炎在台灣流行有幾項重要發展關卡，民國 44 年正式訂定為應報告傳染病，民國 49 年左右每年約有數百名病例，到了民國 56 年有一波流行高峰，高達 1,000 例以上的病例。對於防治管控方面，台灣地區自民國 57 年起開始為 2-4 歲幼兒接種日本腦炎疫苗，更於民國 59 年發起台灣省預防日本腦炎五年計畫，加強流行病學調查，病媒蚊防治及預防接種。自此，日本腦炎疫情獲得控制，確定病例數逐年下降，每年約 10-30 病例，甚至控制到達成位數的病例，台灣已是屬於日本腦炎控制良好的地區。在台灣此病毒較容易感染九歲以下小孩，然而近年來患者年齡層有上升的趨勢，成人亦有病例發生，原因未知。威信可能為病毒種變異或疫苗免疫效力持續性出了問題。通常小孩及老人感染後較容易發生臨床症狀，其他年齡層則較多不顯性感染。

傳染途徑與防治策略

日本腦炎是經由蚊蟲媒介的病毒性傳染病，由日本腦炎病毒感染所引起。通常，日本腦炎為一種在動物間傳染的疾病，人類可能因介入動物生活環境而受到感染(圖一)。日本腦炎病毒可由口腔感染的方式在許多節肢動物內繁殖，目前蚊子為一確定之重要媒介。受感染之病媒蚊並無病徵呈現，但終其一生具有傳染力。三斑家蚊(*Culex tritaeniorhynchus* Giles)為最重要之病媒蚊，其分佈幾乎涵蓋所有流行區，其它的病媒蚊尚包括環紋家蚊(*Culex vishnui* Edwards)及白頭家蚊(*Culex fuscocephala* Theobald)。在台灣地區已知的傳播媒介是以水稻田及污水為主要孳生地的三斑家蚊和環紋家蚊為主，尤其是前者。在自然狀況下日本腦炎病毒只會在人類、豬與馬引發疾病。日本腦炎病毒在人類引起病毒血(viremia)的

現象極為短暫，通常在各種病徵與腦炎症狀出現前病毒血症可能已消失，因此日本腦炎並不會經由人傳人而散佈。豬可被日本腦炎病毒感染引起病毒血症但不會發病，又稱為增幅宿主，故豬為病媒蚊感染人類重要的病源。許多地區即以病媒蚊指數及每年例行性的豬血清學檢查來監控當年日本腦炎發生的時序及危險度。流行期的傳染窩以豬、鳥類及病媒蚊成蚊為主。但是非流行期病毒越冬的機制則尚未完全瞭解，可能由帶病毒的蝙蝠、爬蟲類、兩棲類或殘存的蚊卵或成蚊，把病毒帶過冬天後再開始新的流行期。豬及許多動物因被帶有日本腦炎病毒的病媒蚊叮咬而受到感染，而未帶病毒的病媒蚊則在叮咬正處於病毒血症的動

物時受到感染。病媒蚊的感染大部分來自豬，蚊子一旦被感染則終生具感染力。豬及鳥類的病毒血症期通常為 2-5 天，但在蝙蝠、爬蟲類及兩棲類，尤其是在冬眠時，期間可能延長(相關資料請詳閱衛生署疾病管制局教育網站)。

日本腦炎是亞洲地區最重要的蚊媒病毒性腦炎，日本腦炎病毒藉蚊子叮咬傳入血液，再到腦部形成廣泛性腦炎。預防接種是預防傳染病最直接、最有效和最經濟的方法，並且發生嚴重不良反應的機率很低，因此可以有效隔絕傳染病，其防治效果為公共衛生的重大突破。預防日本腦炎最有效的方法是施打日本腦炎疫苗，民國 56 年台灣血清疫苗研究製造所開始生產日本腦炎疫苗，為由鼠腦生產，去活化的日本腦炎病毒所製造。台灣地區自民國 57 年起對二歲兒童作全面性的預防接種，因此該病的年發生率由民國 56 年的 7.8/100,000 下降到 0.35/100,000。在台灣地區日本腦炎流行季節主要在每年 5 月至 10 月，病例高峰通常出現在 6、7 月，因此目前幼兒日本腦炎疫苗常規預防接種時間，集中於每年 3 至 5 月，可延長至 9 月，接種對象為滿 15 個月之幼兒，基礎劑應接種二劑，其間間隔二週，隔年再接種一劑，國小一年級再追加一劑。另外、加強環境衛生避免病媒蚊孳生亦是一良好之防治措施。

病毒的分子特性

日本腦炎的致病源為黃病毒科(Flaviviridae)黃病毒屬(flavivirus)中的日本腦炎病毒。日本腦炎是在 1871 年於日本最早被發現，病毒則於 1933 年在日本首先被分離出。日本腦炎病毒顆粒的直徑約為 40-50 nm，為單股正向(single strand, positive sense)具封套膜(envelope)的 RNA 病毒。此類病毒尚包括黃熱病毒(Yellow fever virus)、登革病毒(Dengue virus)、蜱傳腦炎病毒(Tick-borne encephalitis virus)、聖路易腦炎病毒(St. Louis encephalitis virus)、墨累谷腦炎病毒(Murray Valley encephalitis virus)及西尼羅病毒(West Nile virus)等。日本腦炎病毒的基因體總長約 11 kb。5 端與 3 端各有一段非轉譯區，主要應與病毒的生長複製及病毒蛋白表現有關。研究發現，病毒基因體的 3 端末端區有特殊的 stem-loop 結構，相關的病毒株都保有這段結構會與許多的細胞蛋白質及病毒蛋白質結合，為病毒複製所必須。病毒蛋白由約三千多個氨基酸所組成之多蛋白(polyprotein)，最後經細胞及病毒本身蛋白分解酵素作用，產生病毒的結構性蛋白(structural protein)及非結構性蛋白(non-structural protein)。結構性蛋白包括核心蛋白(capsid protein)、前膜/膜蛋白(pre-membrane/membrane protein)及封套膜蛋白(envelope protein)。非結構性蛋白則包括非結構性蛋白 1、2a、2b、3、4a、4b、5(NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5)，其中前膜蛋白、膜蛋白及封套膜蛋白為糖化蛋白[1]。核心蛋白具高鹼性會結合病毒的 RNA 基因體，最後形成核酸蛋白複合物(ribonucleoprotein complex)而組裝至病毒顆粒(virion)。最近研究發現，核心蛋白可分佈在感染細胞的細胞核及細胞質而細胞核內分佈的核心蛋白可促進病毒的複製能力[2]。前膜/膜蛋白則為病毒顆粒外圍成份之一，為病毒顆粒成熟組裝的重要因子。封套膜蛋白是日本腦炎病毒顆粒表面最主要的抗原蛋白，封套膜蛋白單獨存在即可進行組裝程序而釋放至細胞外，陸續加入前膜/膜蛋白及核心蛋白則所形成之顆粒就更近似成熟的日本腦炎病毒顆粒，若再有 RNA 基因體存在，就會產生具感染力的成熟日本腦炎病毒。整個病毒顆粒的組裝過程有所缺陷就會產生所謂的缺陷性或干擾性病毒(defective virus, DI particle)，此種缺陷性或干擾性病毒會影響正常病毒的生長複製，是造成病毒持續性感染(persistent infection)的原因之一。目前並沒有發現日本腦炎病毒的缺陷性或干擾性病毒存在，但是有文獻發現，日本腦炎病毒感染的哺乳類細胞及蚊子細胞中有約 500 個核酸長度正向基因小片段的存在，是否這小片段基因可調控病毒的複製過程尚無直接證據[3]。封套膜蛋白是日本腦炎病毒進行感染與細胞接受器(receptor)結合

辨認的成份，亦具有引發中和性抗體的能力。日本腦炎病毒的非結構性蛋白主要存在於受感染的細胞內，主要是提供酵素及調控的功能。目前 NS1 的功能尚不清楚，但發現此蛋白會表現於感染細胞的細胞膜上且會釋放至細胞外，亦有引發保護性抗體的能力[4]。研究顯示當日本腦炎病毒進行持續性感染時，此蛋白會被進行修飾，此種修飾作用在日本腦炎病毒進行持續性感染的角色目前正被廣泛的探討。NS3 已被發現具有蛋白酵素(protease)、核酸水解酵素(NTPase)、解螺旋酵素(helicase)功能[1]。而病毒生長複製所須的核酸聚合酵素活性(RNA dependent RNA polymerase)則被發現存在於 NS5。對於其它分子量較小的親脂性非結構蛋白功能大多未知(NS2a, NS2b, NS4a, NS4b) <GoX3>，<GoX0>其中 NS2b 則會與 NS3 共同作用執行蛋白酵素功能 [1]<GoX3>，<GoX0>研究文獻也指出，親脂性非結構蛋白會改變破壞細胞膜的完整性，可能是日本腦炎病毒誘發細胞傷害的原因之一[5]，另外，也可能透過這些親脂性非結構蛋白的協助方可將複製復合物聚集在膜組織附近，以利病毒生長複製。病毒的生長複製是發生在細胞質的膜組織區，病毒顆粒的成熟組裝主要是在細胞質內的膜組織而非細胞膜組織上進行，過程中歷經內質網及高爾基氏體而釋放至細胞外[1]。雖然細胞膜上日本腦炎病毒的專一性接受體尚未被證實，初步實驗結果認為 heparin sulfate 可能是早期感染的關鍵[6]。

病毒的感染特性

日本腦炎病毒最初藉由蚊子叮咬進入寄主體內，一般而言，叮咬部位的周邊組織是病毒的第一線局部複製場所，可能包括血球細胞、淋巴細胞或血管內皮細胞。當病毒一旦進入體內，日本腦炎病毒會誘發一系列免疫反應，包括體液性及細胞性[7-10]。感染後大部份病人的血清及腦脊髓液可偵測到 IgM 抗體的產生，然後轉變為 IgG 抗體[8]。病毒感染後同時也會誘導 MHC-I、MHC-II、ICAM-1 等分子表現，影響免疫細胞活性，造成白血球增生、貼附及遷移聚集[7,9]感染部位的組織病理變化方面也發現，感染區有顯著的發炎反應，免疫細胞浸潤，特別是巨噬細胞、噬中性白血球及 T 淋巴細胞，甚至感染後期的周邊單核球細胞仍發現有病毒的潛伏感染。受到病毒感染的免疫細胞，例如巨噬細胞，噬中性

血球或其他尚未證實的細胞，會釋放大量的發炎相關因子，例如 macrophage-derived chemotactic factor (MDF)、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)、第八型介白質(interleukin-8, IL-8)、干擾素、第六型介白質(IL-6)、RANTES 等[10-13]。目前認為這些大量產生的發炎因子可能具有保護作用或著引發後續的免疫反應促成組織細胞的損傷。陸續的發現顯示，病患的嚴重程度或死亡率通常與血清中或腦脊髓液中，這些發炎因子的濃度成正相關[12]。臨床上有興趣的發現，嚴重感染者的腦脊髓液中干擾素的濃度明顯上升，干擾素通常是一種有效的抗病毒介質，近來發現日本腦炎病毒會干擾抑制干擾素的作用，這種作用導致干擾素失效[14]。另外，活化的免疫細胞也是防禦病毒感染的一項措施，活化的噬中性白血球會透過氧化壓力來破壞分解病毒基因[15]日本腦炎的臨床症狀主要是神經系統方面的變化。雖然體外細胞實驗方面發現，多數不同組織的細胞株都可被日本腦炎病毒感染、傷害及產生感染性的病毒顆粒，活體實驗分析結果卻顯示，日本腦炎病毒主要的侵犯對象為中樞神經系統，通常神經元細胞(neuron)為最重要的感染細胞，感染區主要是腦的灰質區，特別是視丘、中腦及腦幹。除了主要的神經元細胞外，後續的實驗也發現星狀神經膠細胞(astrocyte)、微神經膠細胞(microglia)及內皮細胞(endothelium)也是日本腦炎病毒感染侵犯的對象[16,17]，目前為止，為何日本腦炎病毒有神經組織的喜好性，不同神經組織及神經細胞間的病毒敏感程度等，仍大多未知。當病毒感染人體後，先會在感染部位進行小幅生長複製，日本腦炎病毒如何通過血腦屏障(blood-brain barrier; BBB)，從周邊感染進而轉變成侵犯中樞神經系統的病源，目前相關的機制仍不清楚。一般而言，親腦性的病毒可能透過下列幾種途徑來侵犯中樞神經系統：1.病毒先感染周邊的神經元細胞，再透過神經元細胞間

的聯繫，直接經由周邊神經元細胞感染延伸至中樞神經元細胞(retrograde axonal transport)，與血腦屏障關係不大，如同 pseudorabies、herpes simplex virus。2.病毒經由淋巴循環侵犯中樞神經系統，但是這種可能性較低，因為中樞神經系統中的淋巴系統通常較不發達。3.大部分會侵犯中樞神經系統的病毒多是經由血液循環系統，通過血腦屏障。包括血腦屏障完整性的改變使得病毒分子可穿過到達中樞神經組織、或攜帶有病毒分子的免疫細胞穿過血腦屏障進入，也可能是病毒分子透過一連串的細胞感染過程得以進入。例如，HTLV-1 可刺激血液中的白血球分泌腫瘤壞死因子、第一型介白質、第六型介白質等細胞激素來改變血腦屏障的通透性，HIV-1 可透過 Tat 蛋白質的作用造成通透性增加，也可經由細胞間的內胞飲作用將病毒分子送至中樞神經系統。文獻顯示，日本腦炎病毒感染會刺激巨噬細胞產生 MDF，而 MDF 則會破壞血腦屏障的完整性，另一方面，電子顯微鏡實驗觀察發現，日本腦炎病毒可感染血腦屏障中的內皮細胞及 pericyte[16]，這些研究發現認為日本腦炎病毒可能是透過血液循環系統來進行中樞神經系統感染，但是這個假說仍需更多的實驗證據來證實。

病毒的傷害機制

神經性病毒感染所造成的損傷過程中可發現神經細胞的功能缺失及神經細胞死亡，神經病理變化方面則可發現發炎反應的產生及發炎相關因子的累積。有些病毒本身就具有直接的細胞毒性，有些病毒則是透過間接方式來造成細胞傷害，例如減少神經滋養因子的產生、降低神經保護因子的產生、增加神經傷害因子的表現或透過發炎反應。對於日本腦炎病毒引發神經損傷的機制目前仍有許多未知。

體外細胞實驗中發現，多數不同來源的細胞株都可被日本腦炎病毒感染，提供病毒生長複製環境及產生明顯的細胞病變。一些研究結果顯示，日本腦炎病毒感染後的複製過程會造成細胞傷害，而傷害作用與自由基的產生及 NF-90 大 B 的活化無關[18-21]，可能的原因包括 extracellular signal-regulated kinase (ERK)活性的下降及病毒親脂性非結構蛋白的細胞膜作用[5,20,21]。病毒感染後所造成的細胞傷害模式可經由細胞凋亡路徑，一般抗細胞凋亡的 Bcl-2 家族分子可延緩細胞凋亡，但是沒有明顯的抗病毒效果[22]，後續研究更發現感染早期，病毒會活化 PI-3K 路徑分子來抑制細胞凋亡的進行[23]。關於誘導細胞凋亡的原因方面，文獻顯示，內質網的 unfolded protein response (UPR)以及活化的 CHOP 基因是細胞凋亡的關鍵[24]。另有實驗結果發現，UV 去活化的日本腦炎病毒仍可促使神經元細胞株死亡，過程中氧化自由基的產生及 NF-90 大 B 的活化是細胞傷害的原因，但是這種缺陷性的病毒並無法造成非神經元細胞株的傷害[25]。

體外細胞實驗中日本腦炎病毒感染會造成顯著的細胞傷害，利用體外神經元及非神經元細胞株為分析模式發現，NSAID 藥物中的 aspirin、indomethacin、salicylate 可抑制病毒的生長複製及降低細胞傷害，這種作用與 COX-2 的抑制無關，但是與 ERK 的活化有關[18,20]。蛋白質糖化修飾作用的抑制劑 iminosugar 衍生物及含硫小分子 diethyldithiocarbamate 也發現會抑制病毒生長複製以及細胞傷害[26,27]。一氧化氮更是一種作用強的病毒抑制劑，不論是外界給予一氧化氮或感染組織所產生的一氧化氮，都有抑制日本腦炎病毒的作用[28]。神經固醇類物質 DHEA 也具有抑制病毒複製的功效，ERK 活性調控是活性的作用方式之一[21]。這些研究結果指出 ERK 分子相關的訊息傳遞路徑應該在日本腦炎病毒生長複製及細胞病變的過程中扮演重要角色。除了 ERK MAPK 外，新近的研究也發現 PI-3K 相關作用分子也參與日本腦炎病毒的細胞傷害及細胞凋亡[23]。

陸續的研究發現認為發炎反應及過量產生的發炎介質可能是細胞傷害的重要媒介。臨床病例分析發現，日本腦炎患者的腦脊液及血液中存在較高濃度的發炎因子，例如 MDF、腫瘤壞死因子、第六型介白質、第八型介白質、RANTES 等，通常濃度愈高者病狀較嚴重[7-13]，這些臨床發現顯示，免疫發炎反應可能是神經細胞傷害的導因之一，但是目前仍欠缺明確的實驗證據，並且這些發炎因子的產生來源也大多未知。同時日本腦炎患者血液中的葡萄糖含量及鐵離子濃度比正常人低，這種變化的生理意義大多未知。目前動物實驗方面的資料較少，有文章認為感染的腦組織會產生一氧化氮，一氧化氮一方面會抑制病毒的生長，另一方面過量的一氧化氮也會造成神經細胞傷害[28]。另一方面，病毒會誘導基因表現並且破壞血腦屏障[29]。一些初代神經細胞的實驗發現，日本腦炎病毒感染可造成神經元細胞的死亡，當有神經膠細胞存在時，過量產生的腫瘤壞死因子、第一型介白質、第六型介白質會伴隨著神經元細胞的死亡，酪氨酸激酶抑制劑可降低腫瘤壞死因子、第一型介白質產生，同時也可減緩神經元細胞傷害[30]。

疫苗的發展

預防傳染病最好的方式為實行疫苗預防注射。一般而言，疫苗來源為去活化的病毒(inactivated viruses)、活的減毒病毒(attenuated viruses)、基因病毒(engineered viruses)、嵌合病毒(chimeric viruses)、基因工程疫苗(subunit vaccine, peptide vaccine, DNA vaccine)。目前廣泛被採用的日本腦炎疫苗為經福馬林處理去活化的病毒，所須病毒採集自病毒感染過的鼠腦，已上市的不活性鼠腦疫苗按病毒株種類可分為兩種，一為中山株疫苗(Nakayama-NIH strain)，另一為北京株疫苗(Beijing-1 strain)。此種鼠腦疫苗有效地降低日本腦炎的發生，由動物實驗顯示，接種北京株疫苗產生的中和抗體比接種中山株的中和抗體效價較高，其對不同日本腦炎野外病毒株的中和能力也較優，血清流行病學的研究發現也有相近的結果，這兩種鼠腦疫苗都被應用於台灣的日本腦炎防治。近年來細胞培養方式亦被應用於生產去活化的病毒。然而使用此種去活化病毒疫苗最大的問題為無法提供長期之免疫力。此外，為有效提高免疫力所追加的疫苗注射次數需增加，這將造成成本負擔，而增加疫苗注射次數亦可能引發過敏反應，因此連國際衛生組織(World Health Organization, WHO)亦重視此一問題，希望有更好的疫苗生產方式

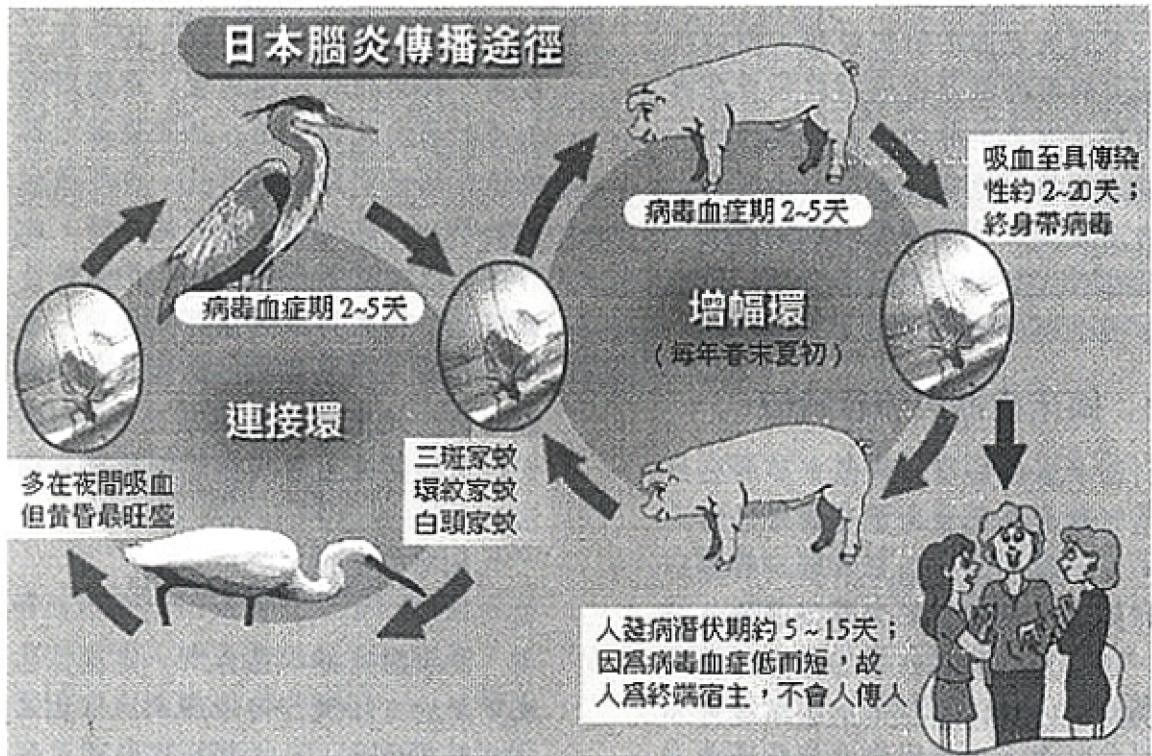
及預防注射計畫。近年來另一有效安全的日本腦炎疫苗被採用，特別是在中國，此疫苗為活的減毒病毒(SA14-14-2) [31]。通常活的減毒病毒疫苗有一些別於去活化病毒疫苗的特性，此疫苗進入人體會進行一定程度的複製，造成不嚴重的臨床症狀，類似正常病毒感染的抗原表現，會引發良好的體液性及細胞性免疫，此一免疫可提供長期之保護，可能只須進行一次疫苗注射即可，有效結省成本及降低不良反應。此種活的減毒病毒疫苗最大的缺點在於可能會再度活化病毒，造成病毒感染的後遺症，特別是那些免疫不良個體，因此每批疫苗須鑑定病毒疫苗基因的穩定度及正確性。有鑑於活的減毒病毒疫苗具備許多優點，一些處理方式陸續提出，以定點方式進行基因突變，降低病毒毒力，再以此處理過之基因病毒當為活的減毒病毒疫苗，SA14-14-2 即為一例。另一方式則是製造嵌合病毒，此嵌合病毒可以正常感染複製，但所引發之毒性較低，黃熱病毒減毒株(YF17D)與日本腦炎病毒疫苗株(Nakayama)的嵌合病毒已被製造(chimericVaxJE)，此嵌合病毒的特性及利用於疫苗生產的可能性，陸續被評估中[32]。基因重組的次單原疫苗(recombinant subunit vaccine)亦是努力發展的一個方向，病毒結構性及非結構性蛋白都是良好的抗原對象，這些基因重組蛋白大多利用大腸桿菌系統，酵母菌系

統，昆蟲系統來表現，經過純化後當為免疫抗原使用，這種疫苗可提供保護作用，然而其效價的維持及疫苗注射時程仍須進一步評估。針對日本腦炎病毒方面，封套膜蛋白的重要抗原表現區也陸續被探討成為保護性疫苗的研發目標。裸露的 DNA 疫苗是一種新的方式，通常利用細菌來的基因表現質體，具有強的真核

細胞啓動子/活化子(promoter/enhancer)，抗原轉譯區(antigen coding region)，多重 A 訊號(polyadenylation signal)及轉錄停止訊號(transcriptional termination signal)。免疫方式為將此表現質體直接肌肉注射或皮下注射。抗原在免疫個體內直接從 DNA 製造出來，製造及修飾條件及環境均與正常病毒感染時相似，其結構及形狀的特性容易被體內的組織相容性抗原所認識、呈現而來誘發免疫反應。一般而言，在免疫個體中會發現有廣泛性的免疫反應，包括抗體，毒殺性淋巴細胞，輔助型淋巴細胞。這種免疫方式已被應用於幾類病毒感染，例如人類免疫不全病毒(human immunodeficiency virus)，B 型肝炎病毒(hepatitis B virus)，流行性感冒病毒(influenza virus)及日本腦炎病毒。此種免疫方式若有其它基因共同注射，例如熱休克蛋白(heat shock protein 70)，其效果有加成作用。在日本腦炎病毒疫苗方面常見是以封套膜蛋白，前膜/膜蛋白及非結構性蛋白 NS1 為表現抗原[4,33,34]。報導發現抗體的產生比毒殺性淋巴細胞扮演更重要的角色[35]。且免疫個體的不同反應或添加不同免疫媒介亦會左右保護效果，例如有細胞素 12 (interleukin12)反而降低其作用[36]。

結 論

日本腦炎是一種蚊媒病毒性腦炎。日本腦炎病毒藉蚊子叮咬傳入血液，再到腦部形成廣泛性腦炎，主要的組織病理變化及臨床症狀是發生在中樞神經系統，動物實驗方面也發現感染侵犯部位為神經組織而呈現神經病變。總合研究文獻顯示：日本腦炎病毒感染會於寄主體內進行增殖及誘發免疫發炎反應，周邊感染的日本腦炎病毒應該是透過血液循環經由血腦屏障進入中樞神經系統，日本腦炎病毒可透過感染神經元細胞直接造成傷害，另一方面也可透過旁邊的免疫神經膠細胞間接的引發神經元細胞死亡或干擾功能。寄主細胞因應病毒感染表現干擾素及一氧化氮來限制病毒的侵犯，然而病毒也會採取干擾策略來對抗，過程中細胞凋亡及免疫發炎反應是顯著的組織病理變化。抗體中和策略、抗發炎策略等目前是抑制日本腦炎病症的方式之一。



圖一 日本腦炎傳播途徑 (摘錄自衛生署疾病管制局教育網站)

參考文獻

1. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, et al: Flavivirus genome, organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990;44: 649-88.

2. Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, et al: Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J Virol* 2005;79:3448-58.

3. Lin KC, Chang HL, Chang RY: Accumulation of a 3'-terminal genome fragment in Japanese encephalitis virus-infected mammalian and mosquito cells. *J Virol* 2004;78:5133-38.

4. Lin YL, Chen LK, Liao CL, et al: DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J Virol* 1998;72:191-200.

5. Chang YS, Liao CL, Tsao CH, et al: Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. *J Virol* 1999;73:6257-64.

6. Su CM, Liao CL, Lee YL, et al: Highly sulfated forms of heparin sulfate are involved in Japanese encephalitis virus infection. *Virology* 2001;286:206-15.
7. Chaturvedi UC, Mathur A, Tandon P, et al: Variable effect on peripheral blood leucocytes during JE virus infection of man. *Clin Exp Immunol* 1979;38:492-8.
8. Burke DS, Nisalak A: Detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M antibodies in serum by antibody capture radioimmunoassay. *J Clin Microbiol* 1982;15:353-61.
9. Mathur A, Bharadwaj M, Kulshreshtha R, et al: Immunopathological study of spleen during Japanese encephalitis virus infection in mice. *Br J Exp Pathol* 1988;69:423-32.
10. Winter PM, Dung NM, Loan HT, et al: Proinflammatory cytokines and chemokines in humans with Japanese encephalitis. *J Infect Dis* 2004;190:1618-26.
11. Khanna N, Agnihotri M, Mathur A, et al: Neutrophil chemotactic factor produced by Japanese encephalitis virus stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol* 1991;86:299-303.
12. Ravi V, Parida S, Desai A, et al: Correlation of tumor necrosis factor levels in the serum and cerebrospinal fluid with clinical outcome in Japanese encephalitis patients. *J Med Virol* 1997;51:132-6.
13. Singh A, Kulshreshtha R, Mathur A. Secretion of the chemokine interleukin-8 during Japanese encephalitis virus infection. *J Med Virol* 2000;49:607-12.
14. Lin RJ, Liao CL, Lin E, et al: Blocking of the alpha interferon-induced Jak-Stat signaling pathway by Japanese encephalitis virus infection. *J Virol* 2004;78:9285-94.
15. Srivastava S, Khanna N, Saxena SK, et al: Degradation of Japanese encephalitis virus by neutrophils. *Int J Exp Pathol* 1999;80:17-24.
16. Liou ML, Hsu CY. Japanese encephalitis virus is transported across the cerebral blood vessels by endocytosis in mouse brain. *Cell Tissue Res* 1998;293:389-94.
17. Chen CJ, Chen JH, Chen SY, et al: Upregulation of RANTES gene expression in neuroglia by Japanese encephalitis virus infection. *J Virol* 2004;78:12107-19.
18. Liao CL, Lin YL, Wu BC, et al: Salicylates inhibit flavivirus replication independently of blocking nuclear factor kappa B activation. *J Virol* 2001;75:7828-39.

19. Raung SL, Kuo MD, Wang YM, et al: Role of reactive oxygen intermediates in Japanese encephalitis virus infection in murine neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 2001;315:9-12.
20. Chen CJ, Raung SL, Kuo MD, et al: Suppression of Japanese encephalitis virus infection by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Gen Virol* 2002; 83:1897-905.
21. Chang CC, Ou YC, Raung SL, et al: Antiviral effect of dehydroepiandrosterone on Japanese encephalitis virus infection. *J Gen Virol* 2005;86:2513-23.
22. Liao CL, Lin YL, Wang JJ, et al: Effect of enforced expression of human bcl-2 on Japanese encephalitis virus-induced apoptosis in cultured cells. *J Virol* 1997;71:5963-71.
23. Lee CJ, Liao CL, Lin YL: Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *J Virol* 2005;79: 8388-99.
24. Su HL, Liao CL, Lin YL: Infection of Japanese encephalitis virus initiates an unfolded protein response. *J Virol* 2002;76:4162-71.
25. Lin RJ, Liao CL, Lin YL: Replication-competent virions of Japanese encephalitis virus trigger neuronal cell death by oxidative stress in a culture system. *J Gen Virol* 2004;85:521-33.
26. Wu SF, Lee CJ, Liao CL, et al: Antiviral effects of an iminosugar derivative on flavivirus infections. *J Virol* 2002;76:3596-604.
27. Saxena SK, Mathur A, Srivastava RC: Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by diethyldithiocarbamate is independent of its antioxidant potential. *Antivir Chem Chemother* 2003;14:91-8.
28. Lin YL, Huang YL, Ma SH, et al: Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J Virol* 1997;71:5227-35.
29. Mathur A, Khanna N, Chaturvedi UC: Break-down of blood-brain barrier by virus-induced cytokine during Japanese encephalitis virus infection. *Int J Exp Pathol* 1992;73:603-11.
30. Raung SL, Chen SY, Liao SL, et al: Tyrosine kinase inhibitors attenuate Japanese encephalitis virus-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:399-406.
31. Chambers TJ, Tsai TF, Pervikov Y, et al: Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization Meeting. *Vaccine* 1997;15:1494-502.

32. Chambers TJ, Nestorowicz A, Mason PW, et al: Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. *J Virol* 1999;73:3095-101.
33. Konishi E, Yamaoka M, Khin-Sane-Win, et al: The anamnestic neutralizing antibody response is critical for protection of mice from challenge following vaccination with a plasmid encoding the Japanese encephalitis virus pre-membrane and envelope genes. *J Virol* 1999;73:5527-34.
34. Chen W, Lin YL, Liao, CL, et al: Modulatory effects of the human heat shock protein 70 on DNA vaccination. *J Biomed Sci* 2000;7:412-9.
35. Pan CH, Chen HW, Huang HW, et al: Protective mechanisms induced by a Japanese encephalitis virus DNA vaccine: requirement for antibody but not CD8(+) cytotoxic T cell responses. *J Virol* 2001;75:11457-63.
36. Chen HW, Pan CH, Huan HW, et al: Suppression of immune response and protective immunity to a Japanese encephalitis virus DNA vaccine by coadministration of an IL-12-expressing plasmid. *J Immunol* 2001;166:7419-26.