

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

分離自小琉球日本腦炎病毒之遺傳分析

Genetic analysis of Japanese encephalitis virus isolated from Liu-Chiu island

研究報告

執行機構：長庚大學醫學院公共衛生暨寄生蟲學科

計劃主持人：陳維鈞

研究人員：邱賢松、王聿韻

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

** 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 **

中文摘要

日本腦炎病毒屬於黃色病毒科，在自然界裡經由蚊蟲媒介而傳播，會侵犯中樞神經系統並造成腦炎及相關症狀。該病目前仍然是臺灣地方性傳染病之一。由於豬是其主要的增幅宿主，因此是一種典型的人畜共通傳染病。每年 5 月至 10 月是臺灣日本腦炎病毒的流行季節。根據以往的調查，日本腦炎以三斑家蚊 (*Culex tritaeniorhynchus*)、環紋家蚊 (*Culex annulus*) 和白頭家蚊 (*Culex fuscocephala*) 為主要的傳播媒介，這些病媒蚊之孳生地均以水稻田為主。然而，在無水稻栽培之小琉球，當地居民及仔豬血清中均呈現偏高的抗體陽性率，顯示儘管無臨床病例，日本腦炎病毒依舊於當地流傳。本實驗室於 1997 年 7 月從採集自小琉球的白腹叢蚊分離到一株新的病毒株，命名為 T1P1 strain。在大量培養並就此病毒株進行一系列的的特性分析之後，發現此病毒株在 C6/36 及 Vero 等非神經細胞的感染型態雖然不盡相同，但產量都很很高，反之，在 neural-2a 及 CCL-127 等神經細胞的情形則否。比較 T1P1 strain 和另一台灣分離株 (CH1392)，發現 T1P1 strain 在神經細胞的感染情形較 CH1392 strain 差。測定病毒對乳鼠之神經毒性，發現 CH1392 strain 的半致死劑量 (50% lethal dose; LD₅₀) 為 2.46 log PFU/ml，而 T1P1 strain 則為 6.39 log PFU/ml。同樣以 100 PFU 接種於乳鼠，以 T1P1 strain 病毒接種的乳鼠遲至 7 天後才可以從腦細胞偵測到病毒，但以 CH1392 接種者則早在接種後 2 天即可偵測到病毒。這都顯示 T1P1 strain 的毒性甚低，可能這正是小琉球雖有高抗體陽性率，卻無臨床病例發生的重要原因之一。本計劃並已完成 T1P1 strain 和 CH1392 strain E 基因的核苷酸定序，在 1500 個核苷酸 (nt 978-nt2477) 序列中並無發現差異。但由於兩株病毒在細胞內的增殖情形差異甚大，據判斷 E 基因和病毒的增殖能力並沒有密切的關係。

關鍵詞：日本腦炎病毒 白腹叢蚊 病毒分離

前言

日本腦炎是一種經由蚊蟲媒介侵犯中樞神經系統的病毒性疾病。該病主要分佈於東南亞及太平洋西部地區。雖然感染病毒的發病率只有 1/300，但罹病者卻有 20-40%之死亡率 (Grossman et al. 1973; Burke et al. 1985)。即使復原者也有大約 15%會留有不同程度之後遺症 (張 et al. 1987)。日本腦炎病毒係黃色病毒科 (Flaviviridae) 中大約 68 種黃病毒之一。在自然界，該病毒經由病媒蚊蟲在適當的脊椎動物之間傳播，其中豬是主要的增幅宿主 (amplifying host)，另外蒼鷺 (herons) 也可能是脊椎動物宿主之一 (Detels et al. 1970)。由於日本腦炎病毒多經由豬之大幅增殖，而提高其在自然界傳播之機會，因此是一種典型的人畜共通傳染病。

臺灣自 1938 年真正確定了有日本腦炎病毒的存在，每年五月至十月都是日本腦炎病毒的流行季節 (Hsu et al. 1978)。1967 年，病例數達到最高峰，當年全台共出現 1,024 名病例，其中有 20 人死亡。1968 年起，衛生單位積極實施預防接種，病例數即顯著下降，流行的趨勢也逐年減緩 (吳等 1995)。近年來，由於生活及農業環境顯著改變，確定的病例數並不多，據統計，1995 年確定病例數僅 27 人 (中華民國公共衛生概況 1996)，然而，因感染而造成的後遺症及死亡的例子卻依然年年出現，似乎目前的疫苗所產生的抗體，在保護效果上仍未臻完美 (Ku et al. 1994; Hayes and Halstead 1996; Shyu et al. 1997)。

在臺灣，傳播日本腦炎的主要病媒蚊有三斑家蚊 (*Culex tritaeniorhynchus*) 及環紋家蚊 (*Culex annulus*)，而白頭家蚊 (*Culex fuscocephala*) 雖然和人類關係並不密切，但因嗜叮豬隻，在自然界顯然也參與病毒傳播 (Detels et al. 1970; Hsu et al. 1978; Rosen et al. 1989)。以上病媒蚊之孳生地均以水稻田為主 (連 1978)，而根據流行病學調查，在無水稻栽培之小琉球，當地居民及豬隻血清中呈現日本腦炎抗體陽性反應者卻年年存在 (顧家琦 1992 臺灣大學流行病學研究所碩士論文)，雖然人體臨床病例未見報導，但日本腦炎病毒在當地流傳之事實則無可置疑。日本腦炎發生於缺乏主要病媒蚊的情形也曾見諸其它報導 (Rosen 1986)，因此，探討日本腦炎病毒在小琉球之傳播確實是個重要的課題。

目前已有 14 種蚊蟲被證實具有傳播日本腦炎病毒的能力 (Rosen 1986; Sucharit et al. 1989)，而小琉球因無水稻種植，上述三種家蚊孳生不易，據推斷必然有其它種類蚊蟲參與該地區日本腦炎病毒之傳播。在小琉球既有的蚊蟲種類中，至少曾有熱帶家蚊 (*Culex quinquefasciatus*)，白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 和白腹叢蚊 (*Armigeres sulbalbatus*) 曾經在世界上其它地方被分離出日本腦炎病毒 (Wu and Wu 1957; Schijo et al. 1974; Fukumi et al. 1975; Rosen 1986; Sucharit et al. 1989)。在這個大前提之下，本實驗室在過去的一段時間裡，即嘗試從小琉球當地的蚊蟲中分離病毒。1997 年 7 月，在一池白腹叢蚊的研磨液中確實分離到一株日本腦炎病毒 (Chen et al. 1999)。在大量培養此病毒株後，我們即進行探討此病毒株在不同細胞中之增殖特性，以及對乳鼠的神經毒性，並分析及比較其

E 基因之核苷酸序列與臺灣其它的分離株之異同，同時就其基因結構與病毒特性之相關性作一探討。

材料與方法

(一) 供試蚊蟲

本研就所用之蚊蟲以白腹叢蚊爲主，此蟲已於實驗室中建立飼養系統。飼養時，幼蟲以每盤 200-300 隻之密度飼養於白色塑膠盤 (23 x 28 x 3 cm)，化蛹後即挑出移至養蚊籠內，羽化後兩天之成蟲即供予適當的動物以餵血，待產卵後即開始另一飼養循環。在本實驗過程所用的蚊蟲包括熱帶家蚊、白腹叢蚊、埃及斑蚊及白線斑蚊等。

(二) 病毒分離

採集自小琉之白腹叢蚊按性別分類後，以 50 隻爲一池 (pool)。置於內含 5 ml 以 PBS (phosphate-buffered saline) 稀釋的 30% 胎牛血清 (fetal bovine serum) 的組織研磨器中研磨。將研磨液於 4 °C，1500 rpm 下離心 10 分鐘，取上清液，以 0.22 μ m millipore filter 過濾，所得之濾液分裝儲存於 -86°C 以備日後進行病毒繁殖或檢測之用。繁殖病毒時，先將上述之病毒研磨液接種至培養於 C6/36 細胞，於 37°C 經 1 小時的吸附 (absorption)，將這些細胞培養於含 10% FBS 的 EMEM 培養基，於 28°C 下培養七天後，回收細胞以免疫螢光抗體技術檢測細胞感染病毒之情形，培養基則取出分裝，再冷凍於 -86°C 備用。

(三) 經口感染成蚊

經口感染主要參考 Gubler and Rosen (1976) 與 Takahashi and Suzuki (1979) 之敘述，其步驟簡述如下：首先將禁食 18-20 小時的雌蚊吸入 1200 ml 的塑膠桶中 (封口處以致密的尼龍網罩住)。其次將配好的血食以 3ml 針筒滴於網上，每一滴不宜太大，以避免直接穿過網子而直接滴入杯底。在 28°C 下靜置 1 小時。期間可以輕吹網面，以吸引蚊子吸血。待吸完血，將吸飽血的蚊子放入雙層的養蚊籠中飼養，直到觀察所需的時間 (約 20 天)。每次並讓 5 隻雌成蚊同上法吸血，但只吸取未加病毒之血液稀釋液，作爲對照組。

使用於經口感染的血食成分爲：兔血 3ml (須在實驗前才抽，並放入含抗凝血劑的抽血管中)，蔗糖 0.3 gm 和 T1P1 病毒液 1ml (效價爲 1.25×10^7 PFU/ml)，最終病毒效價爲 3×10^6 PFU/ml。至於對照組的血食成分則包含 3ml 兔血 (來源同上)，0.3 gm 蔗糖和 1ml EMEM。

(四) 免疫螢光抗體技術

病毒感染之檢測係以免疫螢光抗體技術爲之。進行時，將已感染的細胞或解剖出來的蚊蟲唾腺，在 teflon-coated 玻片上塗成薄膜，風乾後，於 -20°C 的丙酮中固定 10 分鐘，取出後風乾，再與適當稀釋倍數 (1:1000) 之日本腦炎病毒單株抗體 (monoclonal antibody against JE virus) 於 37°C 下反應一小時，以 PBS 洗滌後，在各孔加入一滴已離心過的 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (稀釋

成 1:2000)，於 37°C 之烘箱中靜置 30 分鐘，取出後以 PBS 洗滌 10 分鐘，最後將滴有封片液 (glycerol:PBS= 3:7) 的蓋玻片覆蓋其上，再於螢光顯微鏡下觀察。

(五) 病毒效價之測定

測定效價時，首先將 BHK-21 cells 接種於 24 孔培養盤，至 monolayer 將形成之時，以 100 μ l 不同稀釋倍數 (10^1 ~ 10^6) 之病毒稀釋液加入已事先抽掉培養基之培養盤的各孔，於 37°C 下經 1 小時吸附，再於各孔中加入 1 ml 含 0.4% agarose 之新鮮培養基，於 37°C 下培養 7 天後取出固定並染色，風乾後計算各孔之蝕斑，再依稀釋倍數換算成每 ml 所含有之蝕斑形成單位 (PFU/ml)。

(六) 生長曲線測定

本研究將選取 BHK-21 及 C6/36 等細胞，將 T1P1 strain 的日本腦炎病毒株以 MOI=0.1 接種於其中，於 37°C 下培養 4 至 5 天，取出觀察這些細胞對於病毒之感受性，以及其在這些細胞中增殖之情形。在連續一週的觀察中，每天均取部份細胞，以免疫螢光抗體技術檢查是否已受病毒感染 (詳細步驟參照下節病毒感染檢測部份)；同時，取定量之舊培養基，進行蝕斑試驗 (plaque assay) 測定其中病毒之效價，以瞭解本株病毒的生長曲線。感染神經細胞 (neural-2a 及 CCI-127 cells) 時，則以 MOI=5 接種，於 37°C 下培養後，於 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 小時，分別取出細胞，觀察病毒在這些細胞中增殖之情形。

(七) RNA 抽取

本方法係按照 QIAGEN 公司產品的說明書所述，其方法概述如下：

1. 取 140 μ l 的病毒懸浮液，置於 1.5 ml 的微離心管內。
2. 加 560 μ l 的 AVL 緩衝液於微離心管內，振動混合均勻。
3. 於室溫下放置 10 分鐘。
4. 加入 560 μ l 的 96-100%酒精，振動混合均勻。
5. 取 630 μ l 混合液，以 QIAamp spin column 過濾於另一支 2ml 的微離心管內。丟棄率液。
6. 重複上一步驟。
7. 打開 QIAamp spin column，加入 500 μ l 的 AW 緩衝液。離心一分鐘。置離心過的 QIAamp spin column 於另一 2 ml 的微離心管內。
8. 打開 QIAamp spin column，再加入 500 μ l 的 AW 緩衝液。於 14,000 rpm (20,000 g) 離心三分鐘。
9. 將 QIAamp spin column 置於另一乾淨的 1.5 ml 微離心管內。
10. 打開 QIAamp spin column，將 RNA 以 50 μ l 的 RNase-free water (預熱至 80°C) 洗出，於 6,000 g (8,000 rpm) 下離心一分鐘。

(八) 聚合酶鏈鎖反應：

① 引子之選定---

在檢測病毒時所用的引子對 (primer pair) 位於 E 基因，其正相引子 (sense primer) 為 5'-AGTTAACATCAGGCCACCTGA-3' (1813-1833)，反相引子 (complementary primer) 則為 5'-GTTCCATCTCGACCAGCAC-3' (2085-2103)。PCR 產品之 cDNA 長度為 291 bp。而用於定序 E 基因核苷酸的引子對 (primer pairs) 共有三組，其設計主要係參考已發表日本腦炎病毒株之核苷酸序列所得 (Jan et al. 1996; Hasegawa et al. 1992)。其中正相引子包括: (1) 5'-GGATGCTTGGCAGTAACAAC-3' (nt 904-923) (2) 5'-GTGCATGGAACCACCACT-3' (nt 1404-1421) (3) 5'-AGTTAACATCAGGCCACCTGA-3' (nt 1813-1833); 反相引子則為: (1) 5'-TGACCCACGGTCATGAC-3' (nt 1584-1601) (2) 5'-CTTTGAGCTCCCTTCAAAGTT-3' (nt 2204-2224) (3) 5'-TCTTGTGATGTCAATGGCAC-3' (nt 2488 to 2507)。

而用於核苷酸定序的病毒包括 T1P1 strain 及 CH1392 strain 等病毒株。

② RT-PCR 之操作---

本實驗的步驟簡述如下:

1. 以 5 μ l 抽取出來的 RNA 混合 1 μ l 的 complementary primer 及 4 μ l 的 DEPC-treated water 於一 2 ml 的微離心管。
2. 於 75°C 之下 incubate 10 分鐘，取出置於冰上 5 分鐘。
3. 加入 1 μ l 的 sense primer 於上述之微離心管。
4. 將裝有混合物的微離心管置於 PCR machine 中。
5. 加入 14 μ l 的 RT-PCR reaction buffer。
6. 加 30 μ l 的 mineral oil 於微離心管。
7. 隨後進行 35 PCR cycles，每個 cycle 的反應條件訂為: 94°C 1 分鐘→50°C 1 分鐘→72°C 2 分鐘。最後讓產物在 72°C 停留 10 分鐘。
8. PCR 產物可保存 4°C 或更低的溫度或於 2% 含 ethidium bromide 的澱粉凝膠進行電泳，結果於螢光板上觀察並照相。

* RT-PCR reaction buffer:

DEPC-treated water	9 μ l
10% PCR buffer	2.5 μ l
DIG-dNTP(2.5mM)	2 μ l
DTT (0.5M)	0.125 μ l
RNAsin (40ug/ μ l)	0.25 μ l
Reverse transcriptase (15 μ g/ μ l)	0.035 μ l
Tag (5 μ g/ μ l)	0.035 μ l

③ 核酸定序---

核酸定序係依據 direct sequencing design 進行，其步驟簡述如下：

1. 取 50 μ l 之 PCR 產物，利用一組 MicroSpin S-400 HR Columns (Pharmacia

- Co.)將 primers 和 dNTPs 過濾掉。
2. 所得到之濾液以酒精沉澱，然後於 vacuum centrifuge 中乾燥，使用前再將之溶於適量的水中。
 3. 定序則以 Cycle Sequencing Kit (Boehringer Mannheim Biochemica) 爲之。
 4. 首先配製 20 μ l 含下列成份的混合液---
 - 1 pmol (1 μ l) of DIG primer (each complementary PCR primer)
 - 50 fmol (0.4 μ l) of PCR product
 - 2 μ l of reaction buffer
 - steril ddH₂O to 19 μ l
 - 1 μ l (3 Units) *Taq* DNA polymerase
 5. 上下搖動混合。
 6. 加 2 μ l of the four termination mixture 至每一 labeled reaction vials。
 7. 將上述 reaction mixture 置於 PCR machine，上鋪一層 mineral oil。
 8. 在機器中，共反應 30 cycles，其條件設定如下：96°C；30 sec → 60°C；30 sec → 70°C；1 min。
 9. 每個 vial 加入 2 μ l 的 formamide buffer (to stop the reaction)。
 10. 於 95°C 加熱 3 分鐘後，置於 GATC CCU1500 Sequencer 進行定序分析。
 11. 完成定序之 nitrocellulose membrane 先於 50°C 的烘箱中乾燥 30 分鐘，再於 UV 下 cross-linking 二分鐘。

④ 呈色反應---

1. 讓 membrane 與 blocking solution 反應 10 分鐘。
2. 將 membrane 放入內含 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate 的瓶中。
3. 將瓶子置於 30°C 的 hybridization oven 中反應 30 分鐘。
4. 倒掉反應液，以 washing buffer 洗滌。
5. 於瓶中加入含 nitroblue tetrazolium salt (NBT) 和 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X-phosphate) 的受質，令其呈色。
6. 判讀序列並記錄之。

(九) 毒性測定

測定毒性時，先取出生 48 小時內之乳鼠 6 胎，每胎 11-13 隻。以 1 ml 針筒配上 17 號針頭，吸取 0.01 ml 病毒懸浮液（濃度分別爲 1×10^2 PFU/ml, 1×10^3 PFU/ml, 1×10^4 PFU/ml, 1×10^5 PFU/ml 及 1×10^6 PFU/ml），將病毒懸浮液透過針頭自頭背下方右（或左）腦葉打入，然後將同一處理的乳鼠送回母鼠的籠子內。每天觀察被注射乳鼠的病徵及死亡情形，另取一組乳鼠僅注射不含病毒之稀釋液，做爲對照組。每天計算各處理組及對照組之死亡率，直至第 10 天爲止，並取第 6 天的死亡率估算其半致死劑量（50% lethal dose; LD₅₀）。

結果

本實驗室於 1997 年 7 月，從採集自小琉球的白腹叢蚊分離出日本腦炎病毒，經免疫螢光抗體測定證實，再以聚合酶鏈鎖反應檢測，也發現有一 291 bp 的 cDNA 被合成 (圖一)，進一步證實係日本腦炎病毒無誤，此新病毒株經命名為 T1P1 strain。以此病毒株於實驗室經口感染白腹叢蚊 1、5、10、15 and 20 天後，其唾腺感染率分別為 0、11%、25%、40% and 79% (表一)。

本計劃已完成 T1P1 strain 和 CH1392 strain 等日本腦炎病毒 E 基因的核苷酸定序，全長從 nt 978 到 nt2477 共 1500 個核苷酸，根據已經得到的資料顯示，這兩株病毒的核苷酸序列並無差異 (圖二)。

當接種 T1P1 strain 至 C6/36 細胞，發現病毒產量甚高，而且細胞持續被感染的時間，遠超過另一株在台灣本島分離到的病毒株--CH1392 strain。根據實驗結果顯示，T1P1 strain 在 C6/36 細胞中的最高病毒效價 (peak titer) 在感染後 6 天可達 11.98 log PFU/ml，而 CH1392 strain 則僅有在感染後第 3 天達 8.26 log PFU/ml 後即逐日下降 (圖是 T1P1 strain 或 CH1392 strain 對於被感染的 C6/36 細胞都不會引起明顯的三)，而無論細胞病變 (cytopathic effect) 及死亡 (cell death) (圖三)。而以 T1P1 strain 病毒株接種至 Vero cells，發現在感染後 2 天即達最高病毒效價 (8.10 log PFU/ml)，而 CH1392 strain 則在感染後 5 天才達到 5.03 log PFU/ml 的最高病毒效價 (圖四)。被病毒感染之 Vero cells 中，受 T1P1 strain 感染的生長受到的限制顯然較大，大部份細胞在感染後 7 天即死亡，而被 CH1392 strain 感染的細胞並無顯著地減少 (圖四)。

以 MOI=5 的 T1P1 strain 病毒感染 CCL-127 (a human neuroblastoma cells) 和 neural-2a (a mouse neuroblastoma cells) 等兩種神經細胞，發現 T1P1 strain 在 CCL-127 細胞中的感染情形較 CH1392 strain 差，據觀察，在接種後 10-12 小時，CH1392 strain 釋放出來的病毒量大約是 T1P1 strain 的 10-50 倍，而兩株病毒都在接種後 48 小時達到最高病毒效價 (圖五)。T1P1 strain 和 CH1392 對 neural-2a 細胞的感染力顯然較差，但感染的趨勢則與在 CCL-127 細胞感染的情形類似。兩者在接種後 2 小時，病毒效價就以已達高峰，之後一直到 24 小時，病毒效價都維持穩定，不過 CH1392 的效價大約是 T1P1 strain 的 50 倍，至 24, 48, 72 小時則分別為 5, 13 及 7 倍 (圖六)。

至於病毒神經毒性之測定，經以 10 倍稀釋之病毒懸浮液於乳鼠 (ICR strain) 顱內注射，六天後測其半致死劑量 (50% lethal dose; LD₅₀)，結果顯示 CH1392 strain 為 2.46 log PFU/ml，而 T1P1 strain 則為 6.39 log PFU/ml (表二)。同樣以 100 PFU 接種於乳鼠，以 T1P1 strain 病毒接種的乳鼠遲至 7 天後才可以從腦細胞偵測到病毒，但以 CH1392 接種者則早在接種後 2 天即可偵測到病毒 (圖七)。

討論

日本腦炎在台灣的流行季節每年大約從五月持續至十月 (Detels et al. 1970)，這和病媒蚊的季節分佈大略相同。台灣主要的病媒蚊包括 *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex annulus* 和 *Culex fuscocephala*，這幾種蚊蟲都以水稻田為其主要的孳生地 (Wang et al. 1962; Lien 1978; Detels et al. 1970; Hsu et al. 1978; Sucharit et al. 1989; Takagi et al. 1997)。然而，在臺灣西南方的離島--小琉球，因水源缺乏，早無水稻田，多年來也無日本腦炎病例在這個小島上出現的報導，這相對於一水之隔的屏東縣其它鄉鎮偶有病例報導的情形，迥然不同。今年 (1999 年) 的首例日本腦炎確定病例也已於四月下旬出現在屏東縣南州鄉。由於小琉球絕少有日本腦炎的臨床病例，但根據血清流行病學的調查顯示，小琉球的抗體陽性率雖比臺灣本島略低 (64% vs 73%)，幾何平均效價亦然 (11.2 vs 18.6) (林上青 1995 臺灣大學流行病學研究所碩士論文)，但基本上，從小琉球與臺灣本島日本腦炎抗體的分佈情形來看，無論臨床病例有無或多寡，均無法忽略日本腦炎病毒存在的事實。

另一方面，除居民外，日本腦炎抗體在當地仔豬的陽性率也顯著偏高 (顧 1992; Ku et al. 1994)，在 1997 年，更有一株病毒 (T1P1 strain) 從當地的白腹叢蚊分離出來 (Chen et al. 1999)，更顯示日本腦炎病毒於無水稻田環境中活躍的事實。由於 T1P1 經口感染白腹叢蚊 20 天後可以使其唾腺感染率達到 79% 顯示此蚊蟲在自然界傳播日本腦炎病毒的潛力 (Takahashi and Suzuki 1979; Bosio et al. 1998; Chen et al. 1999)。但由於小琉球絕少有日本腦炎的臨床病例，因此我們判斷這一株病毒有可能是自然界中一株低毒性或是無毒性的病毒株。

由於這一株新的病毒株在臨床表現上不不一致，因此本研究最重要的目的之一，是希望探討此病毒株與臺灣本島分離株的異同，以探究日本腦炎病毒在小琉球當地是否自成一個傳播循環。此外我們也希望從病毒的遺傳分析中，尋找病毒致病特性強弱在基因上的意義。我們對於病毒基因型的分析主要以 E 基因為對象，目前的結果顯示 T1P1 和 CH1392 的核苷酸序列並無不同，一般而言，黃病毒的 E 蛋白的功能之一係與細胞膜融合 (membrane fusion)，因此可能與侵入細胞的能力有關 (Rey et al. 1995; Chung et al. 1996)，而根據本研究的結果顯示，這兩株病毒感染細胞的能力並無明顯差異，進一步證明此說法之正確性。至於 T1P1 strain 和 CH1392 strain 病毒在細胞內複製之速度及最終效價都有所不同，更顯示 E 蛋白雖然具有 cell-binding 的活性 (Wang et al. 1999)，但對病毒增殖的影響並不大 (Griffin and Hardwick 1998)。雖然有些研究指出，在 E 基因的第 138 號氨基酸如果從 E (Glutamic acid; Glu) 突變成 K (Lysine; Lys)，即可能增加其毒性 (Mangada and Takegami 1999)，但這樣的推論顯然和本研究的結果不相符合，因此，若要進一步證明這些差異的分子意義，除更深入探究同屬結構蛋白的 C 及 M 等基因外，NS3 及 NS5 這兩個非結構蛋白基因也是值得深入探討分析的對象，因為這兩段基因分別具有 helicase 及 polymerase 活性 (Gorbalenya et al. 1989;

Tan et al. 1996), 可能和病毒的複製有關 (Bartholomeusz and Wright 1993; Raviprakash et al. 1998; Reed et al. 1998)。也有報導指出, NS3 基因一旦發生突變, 可能導致低毒性病毒株的產生 (Valle and Falgout 1998)。

有些研究顯示, 表現在細胞表面的受體 (receptors) 可能和細胞是否被感染有關 (Miller and Mitchell 1991), 例如 HepG2 及 Vero 這兩種細胞與 dengue 1 virus 結合的受體就有所不同 (Marianneau et al. 1996)。本研究結果顯示 T1P1 strain 在 neural-2a 和 CCL-127 兩種細胞的感染率大不相同, 也可能和這兩種 neuroblastoma cells 表現的受體有關。從另一方面來看, 病毒感染可能刺激 anti-apoptotic genes 的表現, 從而影響病毒感染力 (viral infectivity) 及毒性 (Griffin and Hardwick 1998)。事實上, anti-apoptotic bcl-2、Bcl-w and Bcl-xl 等蛋白質已知都可以正常地表現在老鼠的腦神經細胞 (Griffin and Hardwick 1998)。

T1P1 在兩種非神經細胞 (C6/36 cells 及 Vero cells) 的增殖情形都十分良好, 反之, 在神經細胞 (neural-2a cells 及 CCL-127 cells) 的增殖速度則十分緩慢, 對乳鼠的神經毒性也顯著偏低, 相對於 CH1392 strain 的情形則有相當程度的差異, 顯示同樣是臺灣的分離株, 在特性上卻不盡相同。過去已有報導臺灣本地所分離的日本腦炎病毒株在毒性上並不一致 (Wu et al. 1998), 但其差異上的機轉則仍不明瞭。就已報導的資料來看, 影響病毒毒性的因素有: differences in quasispecies、DI particles、persistent infection、immunopathology, 甚至是由於病毒突變所致之侵犯器官改變 (Kimura-Kuroda et al. 1992; Chen et al. 1996; Sistayanarain et al. 1996; Bielefeldt-Ohmann and Barclay 1998)。從本研究結果來看, T1P1 strain 較不易在神經細胞內建立感染, 其病毒產量也較低, 因此, 除了像 host proteases 這類細胞本身的因素外 (Falgout and Markoff 1995), 這些特性在決定 T1P1 strain 病毒毒性上很可能也扮演了重要的角色。

從以上結果可以推論, 分離自小琉球的日本腦炎病毒株具有低毒性之特性, 在小琉球的自然環境中存在這樣一株低毒性的病毒, 應可解釋何以當地雖有高抗體陽性率, 卻無臨床病例發生的原因。針對這一株在遺傳特性上屬於低毒性的病毒株, 頗值得進一步探討作為新疫苗株的可能性 (Lin et al. 1996)。

謝誌

本研究承衛生署之經費補助 (DOH88-TD-1018), 進行期間並蒙邱賢松、董志峰、翁明富、王聿澗、仇俐茵等人在實驗工作上之幫忙, 謹致謝意。

參考文獻

- 吳盈昌、連日清、郭兆溪。1989。揮不去的夏日訪客--日本腦炎。科學月刊 20:750-757。
- 連日清。1978。本省產蚊蟲生態及其防治。中央研究院動物研究所專刊第三號。pp. 37-69。
- 張明杰、汪美先、姜紹諄、馬文煜。1987。單克隆抗體治療日本乙型腦炎的實驗研究。病毒學雜誌 4:27-33。
- Bartholomeusz, A. I. and Wright, P. J. 1993. Synthesis of dengue RNA *in vitro*: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5. *Arch. Virol.*, 128:111-121.
- Bielefeldt-Ohmann, H., and J. Barclay. 1998. Pathogenesis of Ross River virus-induced diseases: a role for viral quasispecies and persistence. *Microb. Pathogen.*, 24:373-383.
- Bosio, C. E., B. J. Beaty, and W. C. Black, IV. 1998. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59:965-970.
- Burke, D. S., Lorsomrudee, W., Leake, C. J., Hoke, C. H., Nisalak, A., Chongswasdi, V., and Laorakpongse, T. 1985. Fatal outcome in Japanese encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34:1203-1210.
- Chen, L. K., Y. L. Lin, C. L. Liao, C. G. Lin, Y. L. Huang, C. T. Yeh, S. C. Lai, J. T. Jan, and C. Chin 1996. Generation and characterization of organ-tropism mutants of Japanese encephalitis virus *in vivo* and *in vitro*. *Virology*, 223:79-88.
- Chen, W. J., Dong, C. F., Chiu, L. Y., and Chuang, W. L. 1999. Potential role of *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae) in the transmission of Japanese encephalitis virus in the absence of rice culture on Liu-Chiu islet, Taiwan. *J. Med. Entomol.*, (in press)
- Chung, Y. J., J. H. Nam, S. L. Ban, and H. W. Cho. 1996. Antigenic and genetic analysis of Japanese encephalitis viruses isolated from Korea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55: 91-97.
- Detels, R. Cates, M. D., Cross, J. H., Irving, G. S., and Wattens, R. H. 1970. Ecology of Japanese encephalitis virus on Taiwan in 1968. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19:716-723.
- Falgout, B., and Markoff, L. 1995. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.*, 69:7232-7243.

- Fukimi, H., Hayashi, K., Mifune, K., Shichijo, A., Matsuo, S. et al. 1975. Ecology of Japanese encephalitis virus in Japan. I. Mosquito and pig infection with the virus in relation to human incidence. *Trop. Med.*, 17:97-110.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., and Blinov, V. M. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.*, 17:4713-4729.
- Grossman, R. A., Edelman, R., Willhight, M., Pantuwatana, S., and Udomsakdi, S. 1973. Study of Japanese encephalitis in Chiangmai Valley, Thailand: III. Human seroepidemiology and inapparent infections. *Am. J. Epidemiol.*, 98:133-149.
- Griffin, D. E., and J. M. Hardwick. 1998. Apoptosis in alphavirus encephalitis. *Sem. Virol.*, 8:481-489.
- Hasegawa, H., Yoshida, M., Shiosaka, T., Fujita, S., and Kobayashi, Y. 1992. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured and virulence in mice. *Virology*, 191:158-165.
- Hayes, C. G. and Halstead, S. B. 1995. Dengue and Japanese encephalitis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 9:308-312.
- Hsu, S. H., Huang, W. G., and Cross, J. H. 1978. The isolation of Japanese encephalitis virus from Taiwan mosquitoes by mosquito cell cultures and mouse inoculation. *J. Med. Entomol.*, 14:698-701.
- Kimura-Kuroda, J., M. Ichikawa, A. Ogata, K. Nagashima, and K. Yasui. 1992. Specific tropism of Japanese encephalitis virus for developing neurons in primary rat brain culture. *Arch. Virol.*, 130:477-484.
- Ku, C. C., King, C. C., Lin, C. Y., Hsu, H. C., Chen, L. Y., Yueh, Y. Y., and Chang, G. J. J. 1994. Homologous and heterologous neutralization antibody responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan children. *J. Med. Virol.*, 44:122-131.
- Lin, Y. L., C. L. Liao, C. T. Yeh, C. H. Chang, Y. L. Huang, Y. Y. Huang, J. T. Jan, C. Chin, and L. K. Chen. 1996. A highly attenuated strain of Japanese encephalitis induces a protective immune response in mice. *Virus Res.*, xxx-xxx.
- Mangada, M. N. M., and T. Takegami. 1999. Molecular characterization of the Japanese encephalitis virus representative immunotype strain JaGAr 01. *Virus Res.*, 59:101-112.
- Marianneau, P., Megret, F., Olivier, R., Morens, D. M., and Deubel, V. 1996. Dengue I virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J. Gen. Virol.*, 77:2547-2554.
- Miller, B. R., and C. J. Mitchell. 1991. Genetic selection of a flavivirus-refractory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,

45:399-407.

- Raviprakash, K., Sinha, M., Hayes, C. G., and Porter, K. R. 1998. Conversion of dengue virus replicative form RNA (RF) to replicative intermediate (RI) by nonstructural proteins NS-5 and NS-3. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58:90-95.
- Reed, K. E., Gorbalenya, A. E., and Rice, C. M. 1998. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family Flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinase. *J. Virol.*, 72:6199-6206.
- Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, and S. C. Harrison. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375:291-298.
- Rosen, L. 1986. The natural history of Japanese encephalitis virus. *Ann. Rev. Microbiol.*, 40:395-414.
- Rosen, L., Lien, J. C., and Lu, L. C. 1989. A longitudinal study of the prevalence of Japanese encephalitis virus in adult and larval *Culex tritaeniorhynchus* Mosquitoes in northern Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 40:557-560.
- Shichijo, A., Mifune, K., Hayashi, K., Wada, Y., Ito, S., et al. 1968. Ecological Studies on Japanese encephalitis virus. Survey of virus dissemination in Nagasaki area, Japan, in 1966 and 1967. *Trop. Med.*, 10:168-180.
- Shyu, W. R. II., Wang, Y. C., Chin, C., and Chen, W. J. 1997. Assessment of neutralizing antibodies elicited by a vaccine (Nakayama) strain of Japanese encephalitis virus in Taiwan. *Epidemiol. Infect.*, 119:79-83.
- Sistayanarain, A., Maneekarn, N., Polprasert, B., Sirisanthana, V., Makino, Y., Fukunaga, T., and Sittisombut, N. 1996. Primary sequence of the envelope glycoprotein of a dengue type 2 virus isolated from patient with dengue hemorrhagic fever and encephalopathy. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 27:221-227.
- Sucharit, S., Surathin, K., and Shrestha, S. R. 1989. Vectors of Japanese encephalitis virus (JEV): species complexes of the vectors. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 20:611-621.
- Takahashi, M., and K. Suzuki. 1979. Japanese encephalitis virus in mosquito salivary glands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28: 122-135.
- Tan, B. T., Fu, J., Sugrue, R. J., Yap, E. H., Chan, Y. C., and Tan, Y. H. 1996. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology*, 216:317-325.
- Valle, R. P., and Falgout, B. 1998. Mutagenesis of the NS3 protease of dengue virus type 2. *J. Virol.*, 72:624-632.
- Wang, S., He, R., and Anderson, R. 1999. PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J. Virol.*, 2547-2551.

- Wang, S. P., J. T. Grayston, and S. M. K. Hu. 1962. Japanese encephalitis on Taiwan. III. Virus isolations from mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 11: 141-148.
- Wu, C. J., and Wu, S. Y. 1957. The species of mosquitoes transmitting Japanese B type encephalitis in Fukien. *Acta Microbiol. Sin.*, 5:27-32.
- Wu, S. C., W. C. Lian, L. C. Hsu, Y. C. Wu, and M. Y. Liau. 1998. Antigenic characterization of nine wild-type Taiwanese isolates of Japanese encephalitis virus as compared with two vaccine strains. *Virus Res.*, 55:83-91.

英文摘要

Japanese encephalitis (JE) is a mosquito-borne viral disease which usually causes symptoms in central nervous system. At present, the disease is still one of endemic infectious diseases in Taiwan; which has been prevalent from May through October each year. JE is eventually a zoonosis since its major amplifying host is pigs. Previous reports showed that *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex annulus*, and the zoophilic species *Culex fuscocephala* are principle vectors in Taiwan. All species described above are known to breed in the paddy field. However, the seropositive rate of JE virus in Liu-Chiu was shown higher than it was expected even paddy cultivation has been quit here a long time ago. In fact, we have obtained a new isolate of JE virus (TIP1) from *Armigeres subalbatus* collected in Liu-Chiu in July, 1997. For this new strain of JE virus, we found that TIP1 strain grew much better in non-neuronal cells including C6/36 cells and Vero cells compared to that in neuroblastoma cells (neural-2a and CCL-127). In comparison on the growth patterns in neuroblastoma cells between TIP1 and CH1392 (another Taiwan isolate), CH1392 grew better and produced higher titer than TIP1. In addition, the neurovirulence between two strains was also different; the LD50 of CH1392 was 2.46 log PFU/ml while TIP1 was 6.39 log PFU/ml. For suckling mice which has been inoculated with 100 PFU, the virus can be detected as early as 2 days for CH1392 while 7 days in TIP1. The present results have revealed that the TIP1 strain is an avirulent, or at least less virulent, strain of JE virus; which may account for the high antibody prevalence but low clinical cases in Liu-Chiu. The sequence of E gene obtained in this study did not show not different between two strains of the JE virus. Since the replication pattern was different between two strains, suggesting that E gene may not play an important role in the virus replication although it has been known involved in the attachment to the host cells.

keywords: Japanese encephalitis virus *Armigeres subalbatus* virus isolation

圖表及說明

表一. 以 T1P1 日本腦炎病毒經口感染白腹從蚊 (*Armigeres subalbatus*) 後之唾腺感染率^a

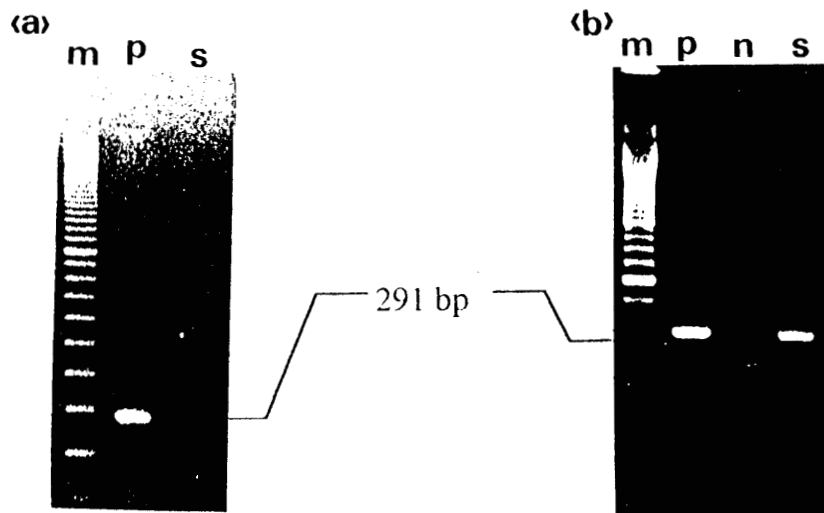
經口感染後天數	感染率 ^b (n)
1	0 (8)
5	11% (9)
10	25% (8)
15	40% (10)
20	79% (14)

^a A control group of 5 mock-infected mosquitoes was included at each time point. No positive reaction was shown in all controls.

^b A result of $P < 0.05$ in the comparison among time points was inferred by Fisher's Exact Test.

表二. 以 T1P1 和 CH1392 兩株日本腦炎病毒於 ICR 乳鼠進行顱內注射所得半致死劑量 (LD_{50}) 之以較

Virus strains	Days after inoculation	LD_{50} s
T1P1	6	6.39 log PFU/ml
CH1392	6	2.46 log PFU/ml



圖一、以聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 檢測自小琉球探回之白腹叢蚊之日本腦炎病毒。(a) 白腹叢蚊之研磨液; (b) 經 C6/36 細胞之懸浮液。m: marker; p: positive control (CH1392); n: mock-infected; s: the positive pool。

圖二. TIP1 strain 及 CH1392 strain 日本腦炎病毒 E 基因之核甘酸序列

	1					
TIP1	TTTAAATTGTC	TGGGAATGGG	CAATCGTGAC	TTCATAGAAG	GAGCCAGTGG	AGCCACTTGG
CH1392	TTTAAATTGTC	TGGGAATGGG	CAATCGTGAC	TTCATAGAAN	GAGCCAGTGG	AGCCACTTGG
	61					
TIP1	GTGGACTTGG	TGCTAGAAGG	AGATAGCTGC	TTGACAATTA	TGGCAAACGA	CAAACCAACA
CH1392	GTGGACTTGG	TGCTAGAAAG	AGATAGCTGC	TTGACAATTA	TGGCAAACGA	CAAACCAACA
	121					
TIP1	TTGGACGTC	GCATGATCAA	CATCGAAGCT	AGCCAACTTG	CTGAGGTCAG	AAGTTACTGT
CH1392	TTGGACGTC	GCATGATCAA	CATCGAAGCT	AGCCAACTTG	CTGAGGTCAG	AAGTTACTGT
	181					
TIP1	TATCATGCTT	CAGTCACTGA	CATCTCGACG	GTGGCTCGGT	GCCCCACGAC	TGGAGAAGCC
CH1392	TATCATGCTT	CAGTCACTGA	CATCTCGACG	GTGGCTCGGT	GCCCCACGAC	TGGAGAAGCC
	241					
TIP1	CACAACGAGA	AGCGAGCTGA	TAGTAGCTAT	GTGTGCAAAC	AAGGCTTCAC	TGATCGTGGG
CH1392	CACAACGAGA	AGCGAGCTGA	TAGTAGCTAT	GTGTGCAAAC	AAGGCTTCAC	TGATCGTGGG
	301					
TIP1	TGGGGCAACG	GATGTGGACT	TTTCGGGAAAG	GGAAGCATTG	ACACATGTGC	AAAATTCTCC
CH1392	TGGGGCAACG	GATGTGGACT	TTTCGGGAAAG	GGAAGCATTG	ACACATGTGC	AAAATTCTCC
	361					
TIP1	TGCACCAGTA	AAGCGATTGG	GAGAACAATC	CAGCCAGAAA	ACATCAAATA	CGAAGTTGGC
CH1392	TGCACCAGTA	AAGCGATTGG	GAGAACAATC	CAGCCAGAAA	ACATCAAATA	CGAAGTTGGC
	421					
TIP1	ATTTTGTGTC	ATGGAACCAC	CACTTCGGAA	AACCATGGGA	ATTATTCAGC	GCAAGTTGGG
CH1392	ATTTTGTGTC	ATGGAACCAC	CACTTCGGAA	AACCATGGGA	ATTATTCAGC	GCAAGTTGGG
	481					
TIP1	GCGTCCCAGG	CGGCAAAGTT	TACAGTAACA	CCCAATGCTC	CTTCGATAAC	CCTCAAACCT
CH1392	GCGTCCCAGG	CGGCAAAGTT	TACAGTAACA	CCCAATGCTC	CTTCGATAAC	CCTCAAACCT
	541					
TIP1	GGTGACTACG	GAGAAATCAC	ACTGGACTGT	GAGCCAAGGA	GTGGACTGAA	CACTGAAGCG
CH1392	GGTGACTACG	GAGAAATCAC	ACTGGACTGT	GAGCCAAGGA	GTGGACTGAA	CACTGAAGCG
	601					
TIP1	TTTACGTCA	TGACCGTGGG	GTCAAGGTCA	TTTCTGGTCC	ATAGGGAATG	GTTTCATGAC
CH1392	TTTACGTCA	TGACCGTGGG	GTCAAGGTCA	TTTCTGGTCC	ATAGGGAATG	GTTTCATGAC
	661					
TIP1	CTCGCTCTCC	CCTGGACGTC	CCCTTCGAGC	ACAGCGTGGAG	AAACAGAGA	ACTCCTCATG
CH1392	CTCGCTCTCC	CCTGGACGTC	CCCTTCGAGC	ACAGCGTGGAG	AAACAGAGA	ACTCCTCATG
	721					

TIP1 GAGTTTGAAG AGGCGCACGC CACAAAACAG TCCGTTGTTG CTCTTGGGTC ACAGGAAGGA
 CH1392 GAGTTTGAAG AGGCGCACGC CACAAAACAG TCCGTTGTTG CTCTTGGGTC ACAGGAAGGA
 781

TIP1 GGCCTCCATC AGGCGTTGGC AGGAGCCATC GTGGTGGAGT ACTCAAGCTC AGTGAAGTTA
 CH1392 GGCCTCCATC AGGCGTTGGC AGGAGCCATC GTGGTGGAGT ACTCANGCTC AGTGAAGTTA
 841

TIP1 ACATCAGGCC ACCTGAAATG TAGGCTGAAA ATGGACAAAC TGGCTCTGAA AGGCACAACC
 CH1392 ACATCAGGCC ACCTGAAATG TAGGCTGAAA ATGGACAAAC TGGCTCTGAA AGGCACAACC
 901

TIP1 TATGGCATGT GCACAGAAAA ATTCTCGTTC GCGAAAAATC CGGCGGACAC TGGTCACGGA
 CH1392 TATGGCATGT GCACAGAAAA ATTCTCGTTC GCGAAAAATC CGGCGGACAC TGGTCACGGA
 961

TIP1 ACAGTTGTCA TTGAACTCTC CTA CTCTGGG AGTGATGGCC CCTGCAAAAT TCCGATTGTC
 CH1392 ACAGTTGTCA TTGAACTCTC CTA CTCTGGG AGTGATGGCC CCTGCAAAAT TCCGATTGTC
 1021

TIP1 TCCGTTGCGA GCCTCAATGA CATGACCCCC GTTGGGCGGC TGGTGACAGT GAACCCCTTC
 CH1392 TCCGTTGCGA GCCTCAATGA CATGACCCCC GTTGGGCGGC TGGTGACAGT GAACCCCTTC
 1081

TIP1 GTCGCGACTT CCAGTGCCAA TTCAAAGGTG CTGGTCGAGA TGGAAACCCCC CTTCGGAGAC
 CH1392 GTCGCGACTT CCAGTGCCAA TTCAAAGGTG CTGGTCGAGA TGGAAACCCCC CTTCGGAGAC
 1141

TIP1 TCCTACATCG TAGTTGGAAG GGGAGACAAG CAGATCAACC ACCATTGGCA CAAAGCTGGA
 CH1392 TCCTACATCG TAGTTGGAAG GGGAGACAAG CAGATCAACC ACCATTGGCA CAAAGCTGGA
 1201

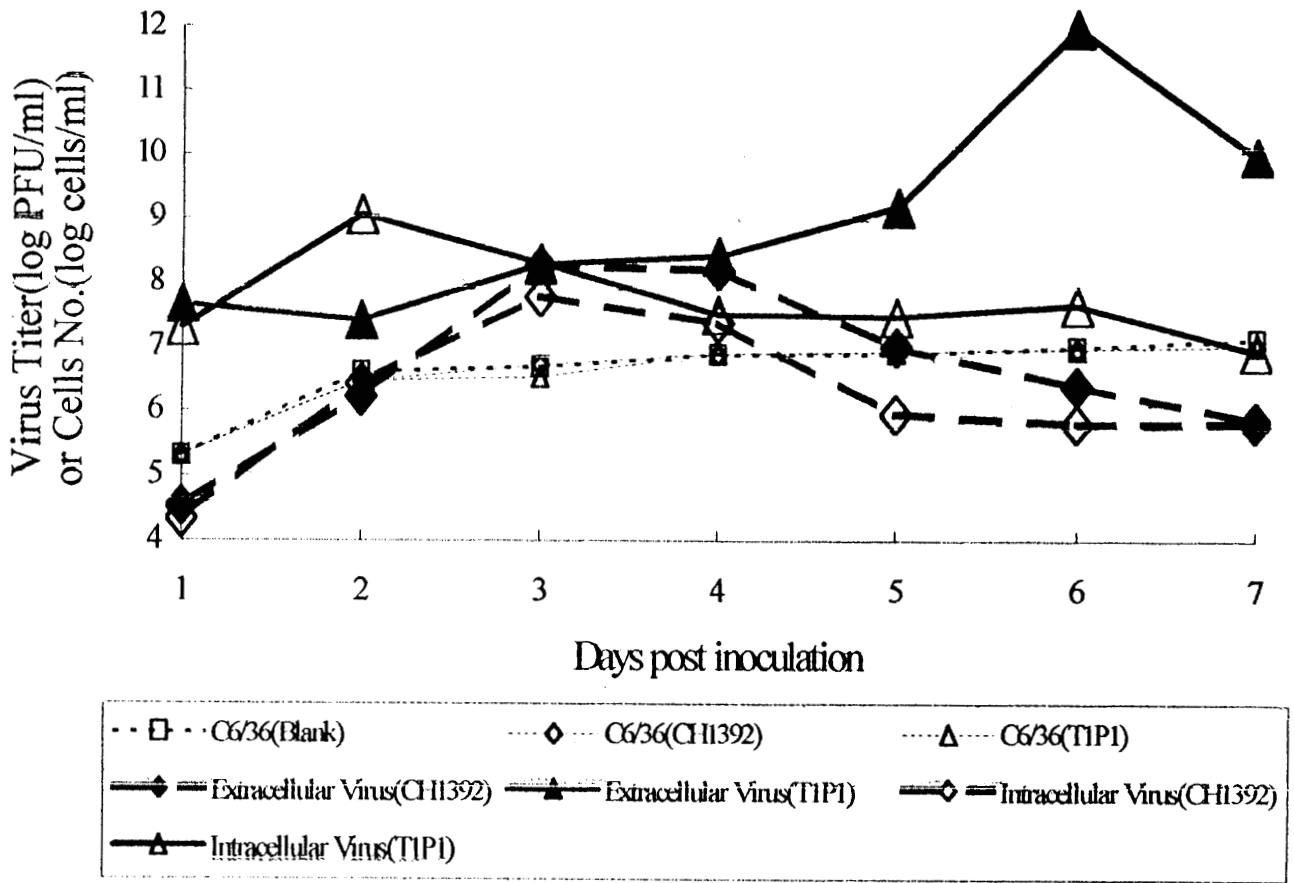
TIP1 AGCACGCTGG GCAAAGCCTT TTCAACA ACT TTGAAGGGAG CTCAGAGACT GGCAGCGTTG
 CH1392 AGCACGCTGG GCAAAGCCTT TTCAACA ACT TTGAAGGGAG CTCAGAGACT GGCAGCGTTG
 1261

TIP1 GGTGACACAG CCTGGGACTT TGGCTCCATT GGAGGGGTCT TCAACTCCAT AGGAAAAGCC
 CH1392 GGTGACACAG CCTGGGACTT TGGCTCCATT GGAGGGGTCT TCAACTCCAT AGGAAAAGCC
 1321

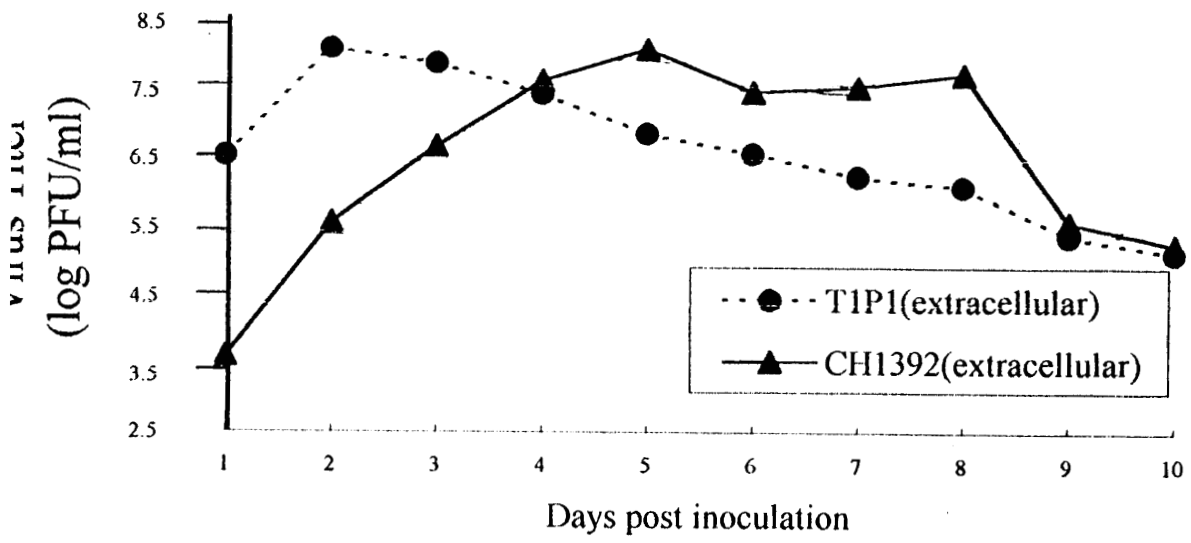
TIP1 GTTACCAAG TGTTTGGTGG TGCCCTCAGA ACACTCTTTG GGGGAATGTC TTGGATCACA
 CH1392 GTTACCAAG TGTTTGGTGG TGCCCTCAGA ACACTCTTTG GGGGAATGTC TTGGATCACA
 1381

TIP1 CAAGGGCTAA TGGGTGCCCT ACTACTCTGG ATGGGCGTCA ACGCACGAGA CCGATCAATT
 CH1392 CAAGGGCTAA TGGGTGCCCT ACTACTCTGG ATGGGCGTCA ACGCACGAGA CCGATCAATT
 1441

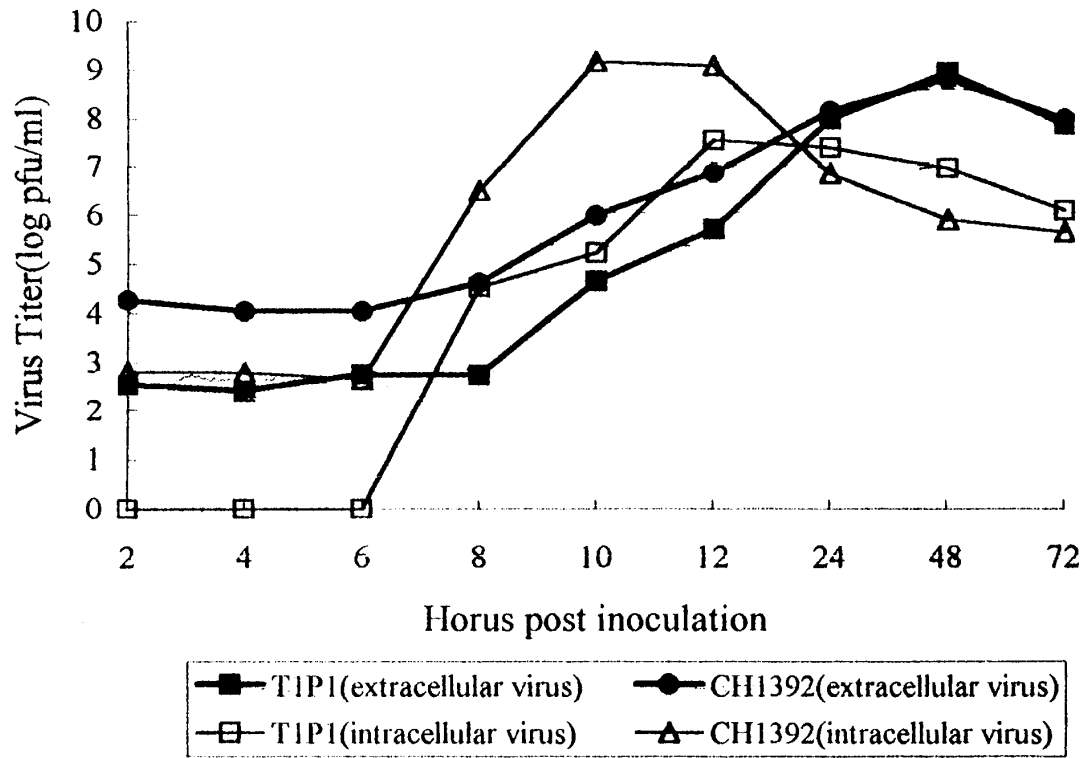
TIP1 GCTTTGGCCT TCTTAGCCAC AGGAGGTGTG CTCGTGTCT TAGCGACCAA TGTGCATGCT
 CH1392 GCTTTGGCCT TCTTAGCCAC AGGAGGTGTG CTCGTGTCT TAGCGACCAA TGTGCATGCT



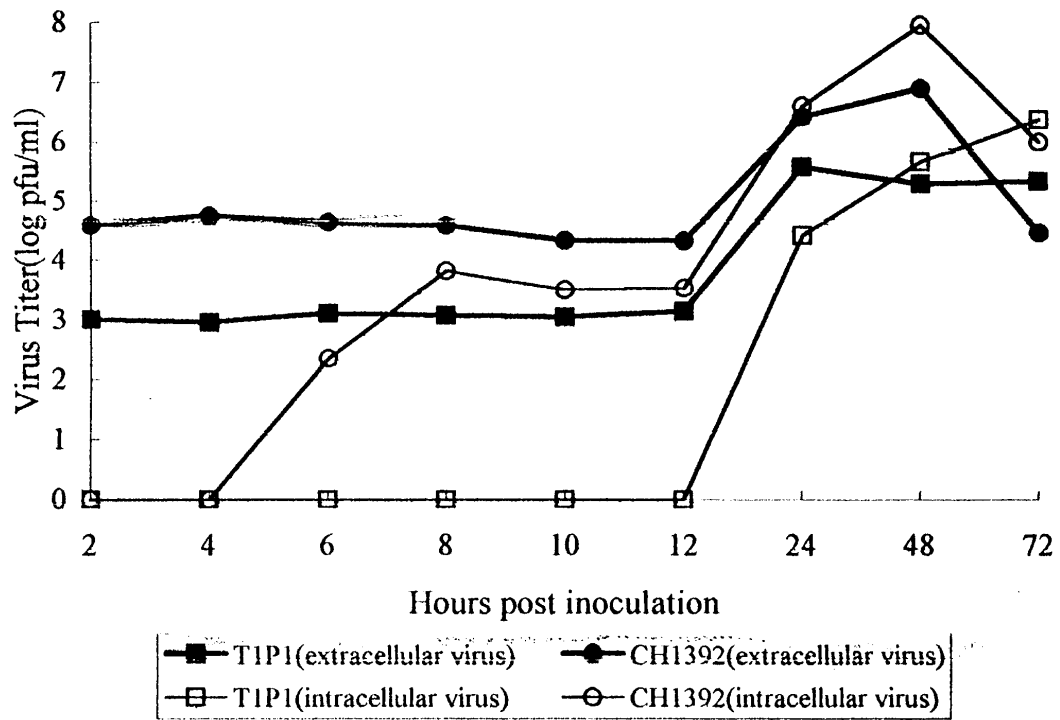
圖三. TIP1 和CH1392日本腦炎病毒在C6/36 Cells之生長曲線



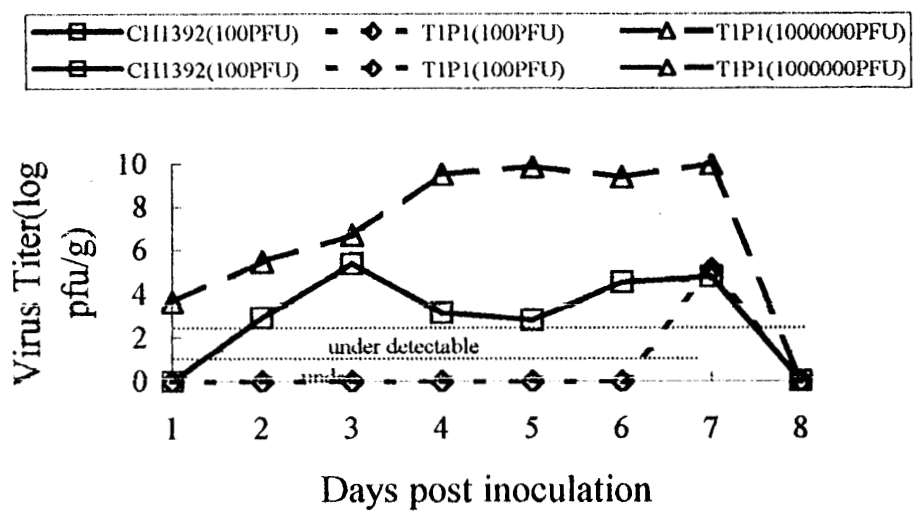
圖四. T1P1 和CH1392日本腦炎病毒在Vero cells之生長區線



圖五. T1P1 和Ch1392在 CCL-127 (a Human Neuroblastoma Cells)之生長曲線



圖六. TIP1和CH1392日本腦炎病毒在 Neural-2a (a mouse neuroblastoma cells)之生長曲線



圖七. T1P1和CH11392日本腦炎病毒在乳鼠腦內之生長曲線