

Encyclometra asymmetrica 囊蚴體外

培養爲成蟲的試驗

陳 俊 民

(生 物 系)

一、導 言

寄生蟲的體外培養對於了解寄生蟲的生理有很重大的意義。前人對寄生蠕蟲寄生階段的人工培養做了一些工作，其中將幼蟲在體外培養爲成蟲獲得成功的報告有下列幾項：

Glaser (1931) 將寄生在日本甲蟲的線蟲 *Neoplectana glaseri* 培養在面上長有酵母菌的牛肉汁葡萄糖琼脂培養基上首先獲得成功，在琼脂斜面上加一塊滅菌的兔腎、兔卵巢、牛腎、雞胚或小鼠胚，這線蟲也能繁殖許多代 (1940 a)，但是經培養幾代後雌蟲不能產卵。在培養基中加入牛卵巢或甲蟲物質則生育能力可以恢復 (1940 b)。Glaser, Mc Coy 和 Girth (1942) 將 *N. glaseri* 及 *N. chresima* 培養在經高壓蒸汽滅菌過的含有磨碎的牛腎或牛肝的琼脂培養上也都能繁殖許多代 (2年)。*N. glaseri* 還能在加有生肝抽出液的犢牛肉或牛心浸出液中發育並且繁殖一代以上。(Stoll, 1953)。

Weller (1943) 以含有剪碎的 8—10 天雞胚的培養基培養 *Trichinella spiralis* 幼蟲達性分化程度，但不能成熟產卵。

von Brand 和 Simpson (1944) 能夠使 *Eustrongylides ignotus* 幼蟲于 20°C 及 37°C 下很好地生活在牛肉汁葡萄糖或且白朮葡萄糖培養基中，但是一千多幼蟲中只有一條在前一培養基中 (37°C) 蛻皮爲未成熟的雄性稚蟲。

Weinstein 和 Jones (1956) 很成功地在無菌狀態下在由雞胚抽出液、酪蛋白水解液、肝抽出液和鼠血清組成的培養基中培養 *Nippostrongylus muris* 從卵經過自由生活幼蟲期及寄生生活幼蟲期達到性成熟的成蟲期 (獲得 8 條成蟲)。這些成蟲形態正常，但體形較小，而且從第五期幼蟲到成蟲所需發育時間比在老鼠體內延長了 3—4 倍。

Joyeus 和 Baer (1942) 將條虫 *Ligula* 的幼虫培養在加入腹水 (ascitic fluid) 或馬血清或二者的生理鹽水中得到性成熟並且產卵，但却不能產生精子。

Smyth (1946—1950) 發現溫度提高到 40°C 是導致 *Ligula* 和 *Schistocephalus* 性成熟的重要因素之一。但起初他所得到的卵不能形成胚胎。後來他加入碳酸鈣以防止培養液變酸，並且降低了氧的分壓，則部分卵可形成胚胎。他用血清、旦白鹼溶液或單純無機鹽溶液例如 75% Locke 氏溶液加碳酸鈣都獲得成功。因此只要理化環境合適，這兩種幼虫體內所貯藏的養分已經足夠保證發育的需要。

吸虫方面的報告有兩篇。Stunkard (1940) 將 *Plagitura parva* 囊蚴培養在含有活酵母菌的無菌培養基中達性成熟時期，但他沒報告實驗的詳細情形。Ferguson (1940) 將 *Posthodiplostomum minimum* 囊蚴培養在由稀釋的台氏液，雞血清和酵母菌抽出液或牛卵巢抽出液組成的無菌培養基中，在 39°C 下 4 日內（在宿主體內只需 36—48 小時）就發育為成虫，但只產生不活動的精子和不正常無活力的卵。

本實驗以 *Encyclometra asymmetrica* 囊蚴為材料，試驗它在各種培養基中的發育。我所以選擇這種吸虫有兩個理由：

1. 這種吸虫的大小相差很大（江靜波，1952），大的囊蚴生殖器官比較發達，而且發育成熟所需要的時間較短，因此體外培養為成虫的可能性也較大。

2. 這種吸虫是在冷血動物（蛇）消化道中發育的，因此可以在室溫下進行培養，而在物質條件限制不能達到無菌狀態的情況下進行初步的試驗選用室溫培養多少可以減少細菌的大量繁殖。

二、材料與方法

先用帶鉤的鑷子夾毀鬥魚 (*Macropodus opercularis*) 的腦髓，再用帶鉤的小鑷子把皮剝掉，然後用解剖針從肌肉中分離 *Encyclometra asymmetrica* 虫囊，暫時放入台氏液 (Tyrode's solution——冷血動物用) 或生理鹽水中。

將虫囊移到載玻片上置低倍顯微鏡下用目鏡微尺測量其直徑，把虫囊分為 0.6 毫米以下，0.6 毫米以上，0.8 毫米以上，1.0 毫米以上和 1.2 毫米以上五級（特大的虫囊則註明具體數字），分別放入小培養皿中。然後在雙筒解剖鏡下用解剖針仔細將囊壁撕開，使囊蚴脫出。

將囊蚴用滅菌過的滴管吸出，將它移到裝有滅菌生理鹽水的試管中，使囊蚴從液體上部自然下沉，另用滅菌的滴管將它移到第二支試管中，這樣洗滌幾次，以除

去附在上面的細菌。最後把每一個或同級的幾個囊幼分別放入裝有各種滅菌過的培養基的指管中，將指管放在室溫下培養，每隔二至幾天移植一次。

在全部操作過程中盡量採用無菌手續。

本試驗培養基計有：生理鹽水，各種不同濃度(60—100%)的任氏液(Ringer's solution)和台氏液(冷血動物用)，上述台氏液分別加上活酵母、干酵母、生的肝碎片、腦心粉(Bacto-brain heart infusion medium)、羅氏血清(Bacto Löffler's-serum)或羅氏血清與干酵母。除了肝碎片培養基外，各種培養基都預先放入裝有未脫脂棉花塞的指管中，在15磅高壓蒸氣下滅菌20分鐘。

每次移植前先把棉花塞打開，把指管放在雙筒解剖鏡下觀察，將死亡或接近死亡的虫體取去，夾在兩片蓋玻片間置顯微鏡下觀察其發育情況，然後加以固定保存或進一步染色封片。

三、結 果

茲將培養結果列表于下：

表1. 囊幼在各種培養基中培養結果的比較

培 養 基	囊幼數	其中直徑 1.2毫米以 上的囊幼數	生存最 長日數	溫 度 (攝 氏)	成 熟 情 况
0.7% 水鹽	17	0	9	23.0—34.5	未成熟
60% 任氏液 + 0.2% 葡萄糖	6	0	5	24.5—35.6	未成熟
80% 任氏液 + 0.2% 葡萄糖	12	0	7	24.5—35.6	未成熟
任氏液 + 0.5% 葡萄糖	10	0	6	24.5—35.6	未成熟
60% 台氏液	16	0	9	23.0—34.5	未成熟
80% 台氏液	17	1	7	23.0—34.5	未成熟
90% 台氏液	9	0	18	23.0—34.8	未成熟
台氏液	10	0	18	23.0—34.8	未成熟
腦心粉 + 90% 台氏液	21	0	6	24.0—25.0	未成熟
0.1% 羅氏血清 + 90% 台氏液	82	1	17	23.5—35.6	未成熟
0.05% 干酵母 + 90% 台氏液	3	0	15	24.0—35.0	未成熟
活酵母 + 80% 台氏液	14	3	13	23.5—35.6	其一〔註1〕培養11 天後子宮含卵2個
0.1% 羅氏血清 + 0.05% 干 酵母 + 90% 台氏液	122	1	15	24.0—35.0	未成熟
肝碎片 + 台氏液	〔註2〕	〔註2〕	〔註2〕	〔註2〕	其一〔註3〕培養8 天後子宮含卵8個

〔註1〕 培養前直徑1.65毫米，最初3天是在80%台氏液中培養的。

〔註2〕 記錄不完整。

〔註3〕 培養前直徑特別大，記錄不全。

上表所列各種培養基的各組培養試驗結果有2個 *E. asymmetrica* 囊蚴發育為成虫，這兩種培養基是活酵母台氏液和生的肝碎片台氏液。後一培養液中所得到的成虫形態上頗為正常。

培養時間以90%台氏液及台氏液為最長，達18天，其次是羅氏血清台氏液17天，羅氏血清干酵母台氏液、干酵母台氏液15天，活酵母台氏液13天，其餘不上10天。



圖 1.

E. asymmetrica 囊蚴在肝碎片台氏液中培養8日後，子宮中含有卵8個。

圖 2.

E. asymmetrica 囊蚴在活酵母台氏液中培養11日後，子宮中含卵2個。

圖 3.

同圖 2. 高度放大示卵及部份生殖器官。

四、討 論

根據江靜波(1952)的報告，以5個直徑1.2毫米以上的 *F. asymmetrica* 虫囊飼養蜥蜴 (*Takydromus saxlineatus meridionalis*) 13—19 天後獲得成虫1，未成熟稚虫2，而直徑0.45毫米以下囊蚴92個則雖在飼養動物後15—30天仍未能獲得成熟的虫體。至於經動物飼養試驗能夠發育為成虫的囊蚴的最小直徑究竟多大，需要幾天才能發育成熟，則未有確切的報告。根據本試驗結果，培養為成虫獲得成功的2例均為大型(直徑1.6毫米以上)的囊蚴，至於直徑較小的囊蚴能否經人工培養為成虫則由於試驗例數不夠多，並且培養時間不夠長，因此不能得出結論。但是大的 *E. asymmetrica* 囊蚴容易培養成功，亦即該種囊蚴在中間寄主體內的發育程度具有重大意義的事實則與江靜波的報告相符合。

不同大小的囊蚴發育所需要的時間是不一致的。發育成熟的 2 例所需要的時間分別為 11 天和 8 天，前者在培養前虫囊直徑為 1.65 毫米，後者則未經測量，但相信必大於前者，因為培養後所制成的標本大於前者。前者最初 3 天是在 80% 台氏液中培養的，因此兩者發育所需的時間相去不遠。同是在活酵母台氏液中，直徑 1.65 毫米的囊蚴在 11 天內（如果除去在 80% 台氏液中的 3 天則只有 8 天）發育成熟，而另一直徑 1.41 毫米的囊蚴則經 13 天後雖然生殖器官發育良好，但仍未有卵形成；至于直徑 1.24 毫米的第 3 個囊蚴則 11 天後生殖器官的發育還是較差的。這也和江靜波的報告相一致。因此在考慮這種吸虫發育所需要的時間時，應該注意到囊蚴的大小。

在本試驗中 *E. asymmetrica* 囊蚴發育成熟所需的時間和江靜波的動物飼養試驗結果相接近，甚至短了一些，這可能是由於囊蚴成熟程度不同的結果。而 Ferguson (1940) 及 Weinstein 和 Jones (1956) 的體外培養試驗却要求較長的發育時間，這種差別可能與三種幼虫成熟程度的不同有關。

Glaser (1931, 1932, 1940), Ferguson (1940), Stunkard (1940), 及 Weinstein 和 Jones (1956) 等都發現含活酵母，肝臟或它們的抽出液的培養基能滿足寄生蠕虫的發育，Glaser 還認為活酵母菌中含有某種生長因素。本試驗培養成功的 2 例也是在含有生的肝碎片或活酵母的培養基中得到的，雖然由於培養時間不夠長，所用大型囊蚴數目也太少，因此還不夠證明囊蚴不能在其他培養基中完成發育，但是根據試驗結果，生肝碎片台氏液和活酵母台氏液無疑的是 *E. asymmetrica* 的良好培養基，這一點也是和上述報告相一致的。

根據前人的研究，寄生蠕虫所含的維生素均屬水溶性。Chance 和 Dirnhuber (1949) 證明 *Fasciola hepatica*, *Moniczia benedeni*, *Ascaris lumbricoides* 和 *Nippostrongylus muris* 均含有豐富各種維生素 B，並認為是它們營養所必需的。Latif 和 El-Kordy (1946) 證明棘球蚴的囊液中含有 B₁ B₇。肝臟和活酵母均含有很豐富各種維生素 B，因此維生素 B 對 *E. asymmetrica* 的發育可能具有重大意義。

在本試驗中，細菌的繁殖可能是影響培養時間不能延長的一個重大因素，特別是含養分較豐富的培養基更難避細菌的大量繁殖。細菌除了消耗某些養分外還產生代謝產物，同時也合成維生素等，因此要獲得更準確更良好效果必須採用無菌培養，這是今後必須加以改進的。

E. asymmetrica 在各種的基液中的培養時間以台氏液為最長，因此用它作為基

液較爲合適。但是要研究蠕虫的生理必須找出蠕虫能正常發育的培養基，而爲了避免盲目性就有必要對蠕虫及其環境的化學組成進行全面的了解。

因爲培養前只測量虫囊的直徑而沒直接測量囊幼的大小，而且虫體多是死亡後才加以固定，因此生長的情況不能進行比較。至於發育成熟與否則根據卵之有無加以判斷。因爲所獲得的蟲卵數量太少沒有觀察其演發能力。

五、結 論

1. 本試驗以 *Encyclometra asymmetrica* 囊幼在各種培養基中進行人工培養，結果有 2 個囊幼發育爲成虫。

2. *E. asymmetrica* 囊幼之大小，也就是它在中間寄主體內的發育程度，對於它的進一步發育爲成虫具有重大的意義。

3. 本實驗證明生的肝碎片台氏液和活酵母台氏液是 *E. asymmetrica* 的良好培養基，它們能滿足該囊幼發育爲成虫所需要的營養。這兩種培養基中所含的豐富的維生素 B 可能也是該吸虫發育所不可缺少的。

六、參考文獻

1. von Brand, T. 1952. Chemical physiology of endoparasitic animals. Academic Press, New York.
2. von Brand, T., & Simpson, W. F. 1944. Physiological observations upon larval *Eustrongylides*. VII. Studies upon survival and metabolism in sterile surroundings. J. Parasitol. 30, 121—129.
3. Chance, M. R. A., & Dirnhuber, P. 1949. The water-soluble vitamins of parasitic worms. Parasitol. 39, 300—301.
4. Chiang, C. P. (江靜波) 1952. A comparative study of two species of *Encyclometra* metacercariae and their development in experimental hosts. (Trematoda: Plagiorchiidae) Ling. Sci. J. 25, 201—216.
5. Ferguson, M. S. 1940. Excystment and sterilization of metacercariae of the avian strigeid trematode, *Posthodiplostomum minimum* and their development to adult worms in sterile cultures. J. Parasitol. 26, 359—372.
6. Glaser, R. W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. Science 73, 614—615.
7. Glaser, R. W. 1940a. The bacteria-free culture of a nematode parasite. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 43, 512—514.

8. Glaser, R. W. 1940 b. Continued culture of a nematode parasitic in the Japanese beetle. J. Exp. Zool. 84, 1—12.
9. Glaser, R. W., Mc Coy, E. E., & Girth, H. B. 1942. The biology and culture of *Neoalectana chresima*, a new nematode parasitic in insects. J. Parasitol. 28, 123—126.
10. Joyeux, C., and Baer, J. G. 1943. Bull. Mus. Hist. Nat. Marseille 2, 1.
(摘自 von Brand 1952)
11. Latif, N., & El-Kordy, M. I. 1946. On the vitamin content of hydatid fluid. J. Roy. Egypt. Med. Ass. 29, 71—75.
12. Smyth, J. D. 1946. Studies on tapeworm physiology. I. The cultivation of *Schistocephalus solidus in vitro*. J. Exp. Biol. 23, 47—70.
13. Smyth, J. D. 1947. Studies on tapeworm physiology. II. Cultivation and development of *Ligula intestinalis in vitro*. Parasitol. 38, 173—181.
14. Smyth, J. D. 1948. Development of cestodes *in vitro*: Production of fertile eggs; cultivation of plerocercoid fragments. Nature 161, 138.
15. Smyth, J. D. 1949. Studies on tapeworm physiology. IV. Further observations on the development of *Ligula intestinalis in vitro*. J. Exp. Biol. 26, 1—14.
16. Smyth, J. D. 1950. Studies on tapeworm physiology. V. Further observations on the maturation of *Schistocephalus solidus* (Diphyllobothriidae) under sterile conditions *in vitro*. J. Parasit. 36, 371—383.
17. Štoll, N. R. 1953. Axenic cultivation of the parasitic nematode, *Neoalectana glaseri*, in a fluid medium containing raw liver extract. J. Parasitol. 39, 422—444.
18. Stunkard, H. W. 1940. Life history studies and the development of parasitology. J. Parasitol. 26, 1—15.
19. Weinstein, P. P. & Jones, M. F. 1956. The *in vitro* cultivation of *Nippostrongylus muris* to the adult stage. J. Parasitol. 42, 215—236.
20. Weller, T. H. 1943. The development of the larvae of *Trichinella spiralis* in roller tube tissue cultures. Am. J. Path. 19, 503—515.
21. Эбарский Б. И., Иванов, И. И., и Мардашев, С. Р. 1954. (王琳芳譯) 生物化學。 Медгиз, Москва.