

# 關於住肉孢子虫(*Sarcocystis* sp)漿液培養 試驗的初步報告

江 靜 波

(生物系)

## 一 引 言

對於勒帕辛斯卡婭的“新細胞學說”中所根據的各種事實，最近在蘇聯有許多學者提出了相反的意見。Жинкин 和 Михайлов(1955)綜合了這些相反的意見之後說：“凡是有關細胞學說，細胞發育及有關生活物質概念的問題，展開自由討論是必要的。”

本文作者也認為，對以“活質學說”為基礎的研究工作，應予以更嚴肅的研討。因為只有這樣，才能使我們更明確那一些事實是對的，那一些事實是錯誤的。也只有這樣，才能使我們對“活質”的問題，得出更正確的概念來。

例如，作者(1955)曾觀察過同盤吸虫(*Diplodiscus*)卵發育過程中卵黃部分顆粒的演發。曾提到：“目前的研究，初步證明了對盤吸虫卵發育過程中，卵黃部分可演發成顆粒，這些顆粒有可能進一步演發成細胞的形態”。當時作者得出上項結論的根據之一是：“那些顆粒聚集成細胞的過程，和勒帕辛斯卡婭在高等動物卵黃體所見是極其相似的，兩者之間，似不應有根本上的不同，可能是同屬於細胞演發的過程。”

該文發表後，作者曾再從事觀察，發現一部分同盤吸虫卵，其卵黃部分是有核的。因此該文所述顆粒變化的過程，到底是細胞的演發過程，或者是卵黃體的退化過程，必須再予仔細的研究。同時，該現象既然與勒帕辛斯卡婭在鳥類卵黃球中所見者相似，那麼在這方面再予重新考慮也是應該的。

雖然，直到目前為止，“新細胞學說”所根據的事實不見得都是可靠的，但這不等於說“活質”問題沒有研究的價值了。Жинкин 和 Михайлов 認為不能說現在“所有”的動植物還能重演這個已經完成的過程。那麼，到底那些動植物還能夠

呢？細胞形態的演發是遵循着那些規律呢？這依然還是存在着的重大問題，必須經過多方面嚴密的研究才能予以解答。

作者認為，要了解“活質”演發的規律，首先以下等動植物為研究的對象是適當的。這不但因為下等的動植物與“活質”可能比較接近，同時在它們中間，確還存在着好些與“活質”有關的特殊問題。

杜平(1955)在“蘇聯方面近年來對細菌濾過形態的研究概況”一文中，綜述了蘇聯對細菌濾過形態的研究工作，他指出四十年來有很多學者“分別在很多的細菌中都發現了這種形態。例如，不僅在人和動物植及物的致病菌中並且在土壤裏的非致病菌中，以及甚至在單細胞種——錐虫螺旋體中都同樣發現了這種形態。”雖然在這方面仍存在着許多尚未解決的問題，但是這些工作至少指出在這構造簡單的微生物的範疇內來研究“活質”的問題是有廣濶的前途和重大的意義的。

作者於1953年開始，即從事住肉孢子虫(*Sarcocystis sp*)所製成的“活質”——漿液——的研究。因為作者認為住肉孢子虫是原生動物中相當特殊的類羣。首先是它們的分類位置，至今仍未很確定。如 Pratt (1916), Parker 和 Haswell (1947) 把它們列在 Neosporidia 亞綱下為 Sarcosporidia 目。Hymen (1940) Matbee (1947) 等把它們另立為 Sarcosporidia 亞綱。其實 Wenyon (1926) 曾把 Haplosporidia, Globidium, Sarcosporidia 和 Rhinosporidium 同列為分類位置尚未確定的一羣。他並引證謂 Ashworth (1923) 已證明 Rhinosporidium 是真菌，因此 Globidium 和 Sarcosporidia 亦可能如是。這一問題被提出後，至今尚未解決。其次，住肉孢子虫對寄主的選擇是很不嚴格的，而且可以通過不同的方式來感染。Theobald Smith (1901, 1905) 發現以孢子飼小鼠可使之得到感染；Negri (1910) 和 Darling (1910) 發現從鼠所得之孢子可以感染豚鼠；Erdman (1910) 以羊體所得之孢子使小鼠受感染；Darling (1910) 以從鼠所得之孢子使豚鼠受感染；李、鄺二氏 (徐威, 1954) 用含孢子虫的羊肉飼小雞，一星期後在小雞肌肉中發現孢子虫；二氏又將含住肉孢子虫之羊肉磨碎，注入小雞皮下，經一星期後，在全身肌肉中可找到孢子虫，並推測其生命史可能經吸血昆蟲以傳播。Crawley (1916) 描述過孢子在小鼠腸中發育的經過，但 Wenyon (1926) 指出他所描述的可能是退化的類型和 *Eimeria falciformis* 的發育時期；Marullaz (1920) 亦描述孢子在小鼠中發育情形；Scott (1943) 發現其孢子由血至消化道，然後到外界使寄主得到感染。由此可見住肉孢子虫的生命史也是很特殊的。我們目前所知道的還很少，這是分類位置不容易確定的主要原因。由於住肉孢子虫對寄主的選

擇不嚴格，這一屬 (*Sarcocystis*) 中到底有多少種，是很難確定的。Alexieff(1913) 認為所有皆屬於一種，即 *S. miescheriana* (Kuhn, 1865)。

由於住肉孢子虫中存在着上述種種特異性，作者疑其與“活質”的演發能力有關。因此自1953年起，即開始探索住肉孢子虫所製成的“活質”——漿液——的演發能力。經過28次之培養試驗，發現這非細胞形態的漿液在外界具有高度的演發能力，可作為研究“活質”演發規律的良好對象。

作者在研究過程中，承本校生物系解剖學教研組主任陳伯康教授，植物生理學教研組主任于志性教授不斷的關懷、鼓勵和提供寶貴意見，于教授並為作者閱讀手稿；業師陳心胸教授亦在百忙中為作者檢視玻片和閱讀手稿；謹此深致感佩之忱。此外在研究過程中，承我組助理員廖月霞協助操作和繪圖，本系技術員劉元，技術助理曾沛亦經常幫助採集和技術工作，並此致謝。

## 二 材料與方法

在本市東屠場蔡忠義，吳百年二醫師之協助下，把新鮮帶有米氏管(Miescher's tube)之牛食道從該屠場取回。將其中的米氏管小心剖出，投入 Ringer 氏液中。每次剖得之數量約 50 至 100 條。用 Ringer 氏液沖洗 3—4 次，然後放入研鉢中與玻璃粉混合研磨 30 分鐘（此時若發現漿液太濃，有乾去的情形，就再加數滴 Ringer 氏液）；磨畢將此漿液連同玻璃粉用滴管吸注離心管內，在 2,500 轉電動離心機中旋轉 15 分鐘，再將其上面漿液吸注另一離心管內，繼續旋轉 15 分鐘；然後用滴管吸取其表面下之漿液，滴在蓋玻片上（液滴不宜太大或太厚）；同時將凹載玻片近凹陷處之邊緣塗凡士林，並將蓋玻片連同漿液滴反蓋在凹載玻片上成密封懸滴。每次製成 15—100 片，分別放在室溫，和 20°C，30°C 和 36°C 之恆溫箱中。在預定時間內，將蓋玻片向一旁徐徐推開，使其有一細縫通外，讓其中漿液懸滴緩緩乾去（乾却時間很不一致，20°C 下由數小時至 2—3 天）。然後用羅曼諾斯基染色法予以染色，並用加拿大膠製成標本玻片。在操作過程中，一切玻璃用器，解剖用器和 Ringer 氏液皆是經滅菌處理的。同時在製懸滴前，先將漿液滴在載玻片上，任其乾去，用羅曼諾斯基法染色製成 3—6 片，以資對照。

## 三 住肉孢子虫漿液之演發

住肉孢子虫懸滴演發之速度和具體的細節，每片不都是完全相同的。但根據 28

次試驗的結果，其基本方式和過程是一致的。現將其於 20°C 之下的一般演發過程敘述如下：

未經製成懸滴的對照製片，是無任何結構的藍色或紫色的一片（圖 I-1）。有時外圍紫紅色，中央紫色或藍色。有時還凝成一塊一塊的，有的地方較深色，有的地方較淺色。但是看不出任何有結構的跡象。

經過了 3 小時後懸滴所製成的玻片，粗放的看去，似乎與對照沒有什麼差別。但是仔細的觀察，可見一部分此時期的製片，常凝聚成密緻的網狀，一般是深藍色的。

懸滴經過了 7 小時之後，再製成玻片（圖 I-2，圖 II-1），可見大部分的漿液都凝聚成粗的，互相連結的，疏鬆的網狀。呈深藍色和淺藍色。看去和胚胎間葉組織有點相似（但沒有核）。同時散在網狀構造的空隙間，還可見一些斷條或球狀構造。此時期整片所給我們的印象也還是雜亂的。仍未出現有規律的結構形態。

經過了 4—5 日之後，（圖 I-3，圖 II-2,3），所製成的玻片裏出現了顯然是由上述網狀構造進一步演變而來的腊腸形，香蕉形和少數橢圓形、球形的構造。它們是深藍色、淺藍色、有時畧呈紫色。大多數的情況下，它們有聚集成堆的趨勢。因此用低倍鏡（10×10 或 10×44）檢視時，常見它們是一塊一塊地分佈着。它們的構造表現出已是處于向有規律的形態演發的過渡時期了。

6—9 日後懸滴所製成的玻片（圖 I-4,5；圖 II-4,5,6），視野裏出現了一塊一塊（即一唯一堆）充滿了有明顯的結構的集團。這些結構是着色鮮艷的圓形或橢圓形的球體。它們顏色鮮明（藍色或深紫色），輪廓清楚，形態齊整。作者認為把它們稱之為“原生質球”是恰當的。而且，和上一階段作一比較，很可能是由腊腸形等構造斷裂而成的。這些球體一般是 2—3.5 微米，大的可達 4 微米以上。好些拉長了，原生質向兩端集中，形成桿狀或啞鈴狀，很像是在分裂過程中。在一堆之內，這些原生質球的疏密程度是不盡相同的。有時一堆有數百個，非常密集，上下重疊；有時一堆只有一二十個，稀疏得像棋子一般的散佈着。在堆與堆之間，也可能有少數的原生質球存在。比較後期的，其原生質球間的“介質”常染成較深的顏色，並且其中一部分的原生質球，中央部分顏色甚淡，呈空泡狀。

到了 11 日左右（圖 I-6）原生質球一般比較畧小一些，數目也比較稀少。原生質球內的空泡非常明顯，呈退化的情狀。更有一部分發現瓦解碎裂成顆粒的情形。此時原生質球之間，有許多比原生質球細小甚多的“顆粒體”。這些顆粒體大小也

很不一致，一般是0.4—1.2微米之間。

11日以後(11—16)所製得的玻片(圖I—8; II—9.10)，原生質球全部不見，而所見的盡是大小不同的顆粒體。它們呈球狀，桿狀或啞鈴狀，還有一部分是桿狀而兩端較濃，染成藍色或紫色。它們也是一塊一塊(即一堆一堆)的分佈在視野中，和原生質球的分佈情形是完全一致的。

上述的演發過程，是根據冬季所做的10次的試驗記述的，在操作時的室溫是6—12°C。每次試驗的結果是基本相同的。

但是在不同的條件下，住肉孢子虫漿液演發的速度和具體細節是有差異的。這些差異至少和溫度，漿液的濃度，懸滴的大小，厚薄，乾却時間的長短都有關係。譬如在30°C恆溫箱中的懸滴，在2—4日之內就形成很顯明的原生質球了，縮短了一半的時間。同時常看不見腊腸形的時期，在網狀期之後很快就出現原生質球了。所形成的原生質球，通常也比較畧小一些。

在36°C恆溫箱中的，1—3日內就形成數目衆多的顆粒體了。只有少數的製片中，才追溯到原生質球的形成。

同時，操作過程中的溫度不同，也會影響其演發。譬如在室溫20°C左右進行操作，雖然同是置於20°C恆溫箱中，但其演發一般也比較快些。

懸滴較小或較薄的，通常演發比較快些，而所形成的原生質球一般也比較小些。

由此可見住肉孢子虫漿液演發的過程中，對種種條件的反應是很靈敏的。

特別值得注意的是，在20°C下培養了三日之後，再移置36°C中，經一日之後製片，發現許多球狀體都形成了鮮明的藍色指環狀體(圖I—7，圖II—7.8)。每一環都有一個似核的紅點或紅塊，因此和瘧原虫的指環期是很相似的。而且在一片之內，數以千百計的指環狀體都是如此。它們像是更高級的發展形態。但是作者經6次反覆試驗，只有二次成功，類似的玻片只製成三片。其他的玻片中，少數可見退化的指環狀，多數只見許多顆粒狀體。

在試驗的過程中，作者曾以新鮮的牛肉，羊肉和雞肉來代替米氏管，用相同的方法製成懸滴來做對照試驗，先後一共做9次(每種材料3次)，從未發現有類似上述原生質球演發的任何象跡。因此可見上述的發展，是住肉孢子虫漿液所具有的演發現象。

## 四 似菌微生物的出現

在少數情況下，懸滴在 2—5 天之內出現了肉眼可見的直徑通常在 0.5—1.5 耗左右的細菌羣落。同樣的細菌羣落在培養牛肉，羊肉作對照時也曾出現過。這顯然是受細菌污染的結果。

但是有一類很像細菌的東西 (圖 I—9)，它們通常出現在 18 天以後的懸滴中。它們是球狀，桿狀和葉狀，與上述顆粒體很相類似，但却比較更齊整而有規律些。作者對這類似菌的構造曾加雞肉汁，兔血清等作營養來培養它們。結果常出現了桿狀和竹葉狀似細菌的微生物，通常二端有極其清楚的“極核”。

在未經製成懸滴的瓶裝漿液中也曾出現上述類似細菌的構造。用它們來住入小白鼠肌肉中，或飼入小白鼠消化道中，發現死亡率很高 (12 隻中死去 9 隻)。

這類似細菌的構造和培養成的有極核的微生物是什麼？是否由演發而成的顆粒體進一步演發而來的？或者是受污染的結果？就形態上看，類似細菌的構造 (圖 I—9) 很像是由培養得的顆粒體演發而來的。但是，由於操作過程中無法保證一定不受細菌污染 (食道的組織中本身就可能有細菌)，加以設備和經驗的缺乏，目前在這方面要作出結論來是不可能的。

## 五 討 論

最近蘇聯微生物學家們，在細菌的濾過形態的演發上做了許多的研究工作 (見杜平, 1955)，許多學者們都同意和記載了許多細菌濾過形態的存在及其演發的過程。有興趣的是，如蘇聯微生物學雜誌編輯部在“微生物非細胞形態問題討論的總結”中指出：“在細菌細胞發生濾過型時，原始型照例並不是即出現。在其再生的第一階段所形成的培養物，是與原始型在形態學，培養特性，生理學，血清學等特性方面有嚴格的差別。”

對於細菌濾過形態演發的過程，在蘇聯有二種不同的看法 (摘要見杜平 1955)。一種是 Г. П. калина 等的意見，認為細菌的濾過形態是細菌的正常發育階段。另一種是 С. Н. Муромцев 等的看法，認為細菌的濾過形態和演發，是細菌裂片和它的再生現象。

根據目前的試驗結果，作者認為，住肉孢子虫的漿液是具有相當的演發能力的。它的演發途徑，既不是碎片的再生，也不是小顆粒的長大，而是由於“活質凝

聚”的緣故。起初分散的活質凝聚成網狀（如圖I—2；圖II—1），後來進一步形成各種條狀（如圖I—3；圖II—2, 3），再斷裂成球狀體（如圖I—4；圖II—4, 5, 6），此球狀體並可進行分裂或碎裂而繁殖。作者認為，這種方式可能是更接近原始沒核細胞的演發過程。

活質發展的更高階段，作者認為是核質與細胞質分開，自行凝聚成“核”的構造。作者(1955)曾培養過華枝翠卵的漿液，發現其核質有和細胞質分離而集中的趨向。在這一次培養住肉孢子虫漿液的過程中，在少數的玻璃片上，也發現每一環狀構造有一核似的紅點或紅塊（圖I—7；圖II—7, 8）。雖然這些試驗都不能說已真正的培養出“核”來了，但是作者認為，較原始的“核”的形成方式，也可能是通過一種核質的凝聚現象。

在時間長一些的懸滴所製成的玻璃片上（如圖I—5），看見球體中出現了空泡，呈退化情形，有的碎裂成顆粒體。這種現象和Красильников(1954)直接觀察細菌懸滴形態的變化：“在強烈膨脹的，變形的，所謂退化了了的細胞內部由原生質物質而成極小顆粒或小體；”是很相似的。不過目前的試驗，却是原生質球退化而成似細菌的顆粒罷了。

## 六 結 論

住肉孢子虫的漿液懸滴，具有強烈的演發能力。最初形成網狀構造，後來形成條狀，終而形成球狀體，作者稱之為“原生質球”。這些原生質球形態齊整，着色鮮明，而且一部分呈分裂情狀。

在時間較長的滴懸上，發現球體內部出現空泡並碎裂成“顆粒體”。這些顆粒體與細菌甚相似，不過大小形狀頗不一律。

在特別情形下（懸滴由20°C 移到36°C）球體可發育成指環狀體。每一環有一個核的紅點或紅塊的構造，與瘧原虫的指環期相仿。

作者認為，住肉孢子虫漿液凝聚成球狀體的過程，反映了活質演發成原始無核細胞的過程。

## A preliminary report on culturing the grounded *Sarcocystis sp*

(Summary)

Chiang Ching-Po

The uncertainty of the life history of *Sarcocystis* as well as taxonomical position suggested to the writer that it might be an interesting material for the study of the properties of living substance.

The Miescher's tubes from esophagus of buffaloes were dissected out and grounded with glass-powder and centrifuged. The supernatant fluid was cultured as sterile hanging drops at different temperatures. The cultures were stained with Romanasky stain at intervals. The process of development at 20°C was as follows:

1. Before cultured, it appeared to be quite homogeneous without any definite structure when stained.

2. About 7 hours after, when stained, protoplasm appeared light and deep blue and aggregated to become net-like in appearance.

3. 4-5 days after, when stained, protoplasm became aggregated into sausage-shaped or rod-like structures distributed as colonies in the field.

4. 9 days after, distinctive protoplasmic spheres of blue or dark purple color appeared in the prepared slides. They were mostly of 2-3.5 microns with some bigger than 4 microns in diameter. Their distribution is similar to the sausage-shaped and rod-like structures mentioned above. Phenomena suggesting cell division were very common.

5. In about 11 days old culture, vacuoles appears within the protoplasmic spheres some of which appeared to break into bacteria-like granules.

6. Prepared slices of 11 days after showed disappearance of the protoplasmic spheres, and the bacteria-like granules were observed to distribute in the same manner as protoplasmic spheres.

7. In some of the hanging-drops stained after being in 20°C for 3 days and in 36°C for 1 day, thousands of ring-forms each with a nucleus-like red dot or red mass appeared.

The rate and the details of above development varied with the temperatures and other factors involved.

The writer believes that such a phenomenon of aggregation to form protoplasmic spheres may probably be related to the early process of cell-formation from living substance.

### 圖版 I 說明

1. 未經懸滴培養製片，成藍色均勻團塊。
2. 在20<sup>0</sup>c下經7小時後懸滴製片，原生質凝成雜亂網狀。
3. 在20<sup>0</sup>c下經2日後懸滴製片，原生質多凝集成各種條狀，有斷裂情狀。
4. 在20<sup>0</sup>c下經6日後懸滴之製片，出現了完整清楚的原生質球，它們並有分裂情狀。
5. 在20<sup>0</sup>c下經9日後懸滴之製片，與圖3基本相同，但介質較濃，一部分原生質球中央呈空泡狀。
6. 在20<sup>0</sup>c下經11日後懸滴製片，原生質球中央出現了空泡，在退化中，一部分有解體和碎裂成顆粒情形。
7. 在20<sup>0</sup>c下經3日後再移置36<sup>0</sup>c中一日，然後製片，出現許多環狀構造，每環有一似核的紅點或紅塊。
8. 在20<sup>0</sup>c下經15日後懸滴製片，原生質球全部不見，剩下許多大小不同的“顆粒體”。
9. 在20<sup>0</sup>c下經20日後懸滴製片，出現許多似菌構造。

### 圖版 II 說明

1. 在20<sup>0</sup>c下經7小時後懸滴製片，原生質凝成雜亂網狀。
- 2—3. 在20<sup>0</sup>c下經4—5日後懸滴之製片，原生質凝聚成各種條狀。
- 4—5 6. 在20<sup>0</sup>c下經6—9日後懸滴之製片，原生質球出現。
- 7—8. 在20<sup>0</sup>c下經3日再移置36<sup>0</sup>c經1日後懸滴製片，原生質形成許多指環狀構造，每一環有一似核的紅點或紅塊（圖8特別放大）。
- 9 10. 在20<sup>0</sup>c下經15日後懸滴製片，出現許多顆粒體。

### 參 考 文 獻

- (1) К дискуссии по проблеме неклеточных форм жизни у микроорганизмов. Микробиология 1954, XIII(2), 197—203 (殷天節譯載微生物學譯報, 1955年, 第2卷第4期 233—236頁)。

- (2) Жинкин, Л. Н. и Михайлов, В. П. 1955. «Новая клеточная теория» и ее фактическое обоснование. Успехи Современной Биологии, xxxix (2) 228—244 (蘇醒譯載科學文摘—解剖學1955年第1期17—27頁)。
- (3) Красильников, Н. А. 1954. О неклеточных формах у микроорганизмов. Успехи Современной Биологии, xxxvii, (1), 22—32. (王學武、許文山節譯載微生物學譯報1955年第2卷第4期236—239頁)。
- (4) Матвеев, Б. С. 等1949. 動物學教程 (蕭前桂譯, 166—167頁)。
- (5) Alexieff, A. Recherches Sur les Sarcosporidies. I. Etude morphologique. Arch. Zool. Exp., LI, 521. 1913.
- (6) Ashworth, J. H. On *Rhinosporidium seeberi* (Wernicke, 1903) With special reference to its sporulation and affinities. Trans. Roy. Soc. Edin., LIII, 301. 1923.
- (7) Darling, S. T. Experimental sarcosporidiosis in the guinea pig and its relation to a case of sarcosporidiosis in man. Journ. Exp. Med., XII, 19. 1910
- (8) Hyman, L. H. The Invertebrates: protozoa through Ctenophora. 161—164. 1940
- (9) Kudo R. R. Protozoology. Third Edition, 507—510. 1950
- (10) Marullaz, M. Sur L'évolution de *Sarcocystis muris*. Ann. Inst. Pasteur XXXIV, 547. 1920
- (11) Parker, T. J. and Haswell, W. A. A Text Book of Zoology. P.81. 1947
- (12) Pratt, H. S. A Manual of the Common Invertebrate Animals. P.48. 1916
- (13) Scott, J. W. Life history of Sarcosporidia, with Particular reference to *Sarcocystis tenella*. Bull. Univ. of Wyoming Agr. Exp. Stat., NO.259 (見Kudo: Protozoology. 507—508)
- (14) Wenyon, C. M. Protozoology. 1926.
- (15) 杜平: 蘇聯方面近年來對細菌濾過形態的研究概況。微生物學譯報。1955年, 第2卷, 第4期, 225—232頁。
- (16) 徐威: 住肉孢子蟲。中華衛生雜誌。1954年, 第6號, 498—501頁。
- (17) 江靜波: 對盤吸蟲卵發育過程中卵黃部分顆粒演發的初步觀察。動物學報。1955年第7卷第1期17—30頁。
- (18) 江靜波: 華枝羣漿液之培養 (1955年中山大學科學討論會理科分組會報告。)

註: (5)(6)(7)(10) 摘要見 Wenyon, C. M. Protozoology. 1926

(本文於1956年5月10日收到)