

沙眼病原研究

I. 沙眼包涵体的研究

湯飛凡 張曉樓 李一飛 黃元桐

(中央生物制品研究所, 北京市同仁医院)

沙眼是一極古老的疾病。据吉民生氏^[1]紀元前 3400 年在埃及即有关于沙眼的記載, 但按 Julianelle 氏^[2]則紀元前 1553—1500 年間始有記錄。Julianelle 氏曾举埃及最古的草紙書 (Papyrus Ebers) 作为憑据, 故其說或較正确, 惟彼时此病似不如今日之猖獗, 沒有引起很大的注意, 直至紀元后 1481 及 1580 年, 才有第二及第三次的叙述。但自 16 世紀以后, 沙眼在埃及漸已根深蒂固, 深入民間, 故有称埃及为沙眼的老家者。古希臘 Herodotus (紀元前 482—424), Plato (紀元前 427—348) 及 Aristotle (紀元前 384—322) 諸氏, 对沙眼都有認識。Hippocrates 氏 (紀元前 460—377) 曾作短文描寫沙眼及倒睫, 并推荐醋酸銅及新鮮葡萄汁为治療藥剂。羅馬医学盛兴时 Celsus 氏 (紀元前 25—紀元后 50) 在他所著的內科大全 (de medicina) 中, 亦有沙眼的叙述, 并采用 “Aspirtudo” (粗糙) 和 “Lippitudo” (蒙糊) 的字样形容沙眼; 紀元 60 年 Dioscorides 氏始創用 “Trachoma” 的名詞。在阿拉伯医学發达时, 人們始認識到血管翳 (Pannus) 与沙眼之关系, 并采用刮削为治療沙眼的方法。由埃及至希臘, 而羅馬而阿拉伯, 在沙眼的發展过程中, 頗有國際意义。沙眼在我國的源流, 据李濤氏^[3]引外方密要, 秦 (紀元前 246—207)、漢 (紀元前 206—紀元后 220) 时始有記載, 但畢華德氏^[4]曾引用黃帝內經, 認為紀元前 2679 年即有沙眼的存在, 惟近日來畢氏已不再坚持其說。我國的沙眼是否由西方輸入頗堪研究。

歐洲之有沙眼, 比較新近。一說 1069—1270 年間十字軍东征时, 即將沙眼傳至歐洲, 但引起世人注意的廣泛流行則系自拿破崙时代开始。1798 年拿破崙率大軍三万, 進攻埃及, 英國、俄國和普魯士亦同时出兵, 不数月, 法軍傳染了沙眼, 發生了沙眼的流行, 随着法軍的敗退, 沙眼即傳播至意大利及法國; 英軍把沙眼傳染至地中海馬耳他、西西里各島嶼及直布羅陀一帶, 西班牙和英國; 普軍將沙眼傳至瑞典。俄國軍隊中当时虽沒有明顯的流行, 但后仍將沙眼傳至俄國。此后沙眼在歐洲大陸, 到处流行, 后又由西班牙

牙傳播至美洲新大陸，從此世界上凡舟車所至人力所通的地方，或多或少皆有沙眼的蹤跡。

沙眼在我國傳染很廣，特別是在農村以及風沙多、雨水少的地方。據周誠辭^[5]、張文山^[6]及陳耀真、李鳳鳴、張莪等氏^[7]最近的調查報告，沙眼率高者達 86.3%，而低者亦有 15.4%，平均約 54.8%。據甘肅省某眼病防治站 1952 年的報告^[8]，有的地區沙眼患病率竟達 99.7%，這數字更是驚人。沙眼為我國盲目的主要原因，一般致盲率，據陳耀真^[9]報告為 5.02%。這些事實，充分說明沙眼危害我國勞動人民健康，影響國防和經濟建設的嚴重性。

關於沙眼的病原問題，自 19 世紀末葉以至於今，半世紀中人們做了許許多多的研究，基本問題雖然沒有得到解決，但結果對病原問題形成了好幾個學說。除淋巴體質和營養失調之說已太陳舊可以不談外，我們現在可以把細菌、立克次體和病毒三個學說簡單的溫習一下。

細菌學說 凡普通在沙眼內找得到的細菌，如葡萄球菌、淋球菌、肺炎球菌、結膜干燥症桿菌、枯草桿菌、類白喉桿菌、流行性感冒桿菌、郭魏氏桿菌、及微菌如囊球菌和酵母菌等 80 余种微生物，在過去 50 或 60 年中，曾被研究者認為是沙眼的病原菌，甚至有稱之為“沙眼球菌”或“沙眼桿菌”者。在細菌學開始萌芽，操作技術尚欠完善的時候，研究工作之難於正確，自是不可諱言的，因此細菌學說久已成為過去。學說之所以不能成立，主要是因為無論上述的那一種細菌或微菌，接種於人或猿猴眼結合膜內，均不能引起沙眼病狀的發生，而在能引起沙眼的沙眼組織之濾液中，無論用何種圓滿的培養基，包括組織培養在內，却均不能培養出任何細菌。

野口氏顆粒性桿菌 (*B. granulosis* Noguchi)^[10] 是細菌學說中最後提出的一種微生物。1928 年野口氏在一患沙眼小孩結膜刮取物中，分離出一種有運動力，嗜血性的革蘭氏陰性小桿菌，注射於猴結膜內，能引起濾泡的產生，因此野口氏認為此菌與沙眼病原有關。但野口氏的假說不能為人們所証實，顆粒性桿菌的命運遂亦與其他的細菌一樣的，同遭淘汰。

立克次體學說 1933 年 Busacca 氏^[11] 根據乳頭、濾泡及其他沙眼材料的培養，獲得了立克次體的結果，在馬德里國際眼科學會，首次宣布立克次體為沙眼病原的學說，並建議“沙眼立克次體”的名稱。1935 年 Cuénod 和 Nataf^[12] 在北非突尼斯巴斯德研究院，在 Nicolle 氏院長直接領導下，用該院自己喂養的虱子，進行了一系列的實驗，結果不特証實而且發展了 Busacca 氏的理論。1936 年 Poleff^[13] 應用組織培養，對立克次體學說，也給予了許多的支持。

苏联学者 Трапезонцева 氏^[14]对 Busacca 及 Cuénod 和 Nataf 氏的工作,表示了怀疑及反对。Трапезонцева 認為在 Cuénod 和 Nataf 二氏的虱子感染試驗中,注射沙眼材料后所得的立克次体,为普通常常存在于成虱腸道中的無害寄生物,即 Da Rocha Lima 氏立克次体,而非致病性的立克次体。据在立克次体方面極有权威的波蘭研究者 Weigl 氏的意見,当时在突尼斯巴斯德研究院喂养的虱群中并無嚴格隔离的措施,故对于 Da Rocha Lima 立克次体的侵入是很可能的,且在 Cuénod 和 Nataf 的試驗中又無对照,因此結果不很可靠。Weigl 氏^[15]將沙眼标本注入他自己所喂养的正常虱子,从未得到任何立克次体。在 Жив^[16]的工作中亦提出了对沙眼立克次体学說的嚴厉反对。作者由沙眼患者及沙眼地区健康人所獲得的虱子体中从未發現过立克次体。

立克次体与沙眼之無关,有下列三点亦可証明:(一)在沙眼的流行病学中,从未發現过任何昆虫中間宿主,(二)立克次体病在临床上普通为急性症,且痊愈后有高度的免疫力,可以用外斐氏反应測驗;沙眼则为慢性,且缺乏免疫力,(三)对位胺基苯甲酸(PABA)在临床上对立克次体病有療效作用,但对沙眼則無影响;相反的,磺胺制剂对沙眼有相当的療效,但对立克次体疾病則否。

由于立克次体与沙眼病毒的原体(elementary body)或始体(initial body)在形态上和染色上頗相似,因此引起了誤会,但立克次体普通嗜內皮及中胚叶細胞而沙眼病毒則嗜單核上皮細胞,且二者在細胞內的分布及結構各有不同,在有經驗者的眼中不难分辨。

病毒学說 沙眼的病毒学說由來已久,在 1907 年以前即有倡議之者。1907 年捷克学者 Prowazek 和 Halberstaedter 二氏^[17]率領一科学調查团,在爪哇原拟研究梅毒,但發現当地有許多的沙眼病例后,即順便將沙眼材料接种几只狒狒,由得病的动物及人刮取結膜材料作塗片,利用当日 Schaudinn 氏染螺旋体的方法,在塗片中發現了沙眼的包涵体。当时对此种包涵体的真象虽然不甚明了,認為是屬於原虫,但它的發現給病毒研究者一个很有力的証据。在 20 世紀二三十年代之間,当野口氏之顆粒性桿菌及 Cuénod 和 Nataf 氏的立克次体学說失敗后,Thygeson^[17,18]、Julianelle^[19]、Bland^[20]及他們的同工等一系列的研究者在第二次世界大战的前后及当中,对沙眼病原的工作,做了很多的研究,供給了我們極珍貴的資料,說明沙眼是一病毒病。他們的試驗証明了病毒与包涵体的关系,包涵体中之原体及始体的相互关系,且認定原体即为病毒的最小單位。他們的試驗結果也說明了沙眼病毒是不容易過濾的,但如采用的方法合宜,困难仍可克服。他們也闡明了沙眼病毒是介于立克次体及牛痘病毒之間的微生物,且指出了它与鸚鵡热、花柳性淋巴肉芽腫及鼠肺炎等大型病毒的密切关系。

最近苏联学者如 Чирковский、Гроссфельд、Чумаков 及 Мошковский 等氏^[21],对

病毒學說予以極大的支持，因之病毒學說，得以漸趨穩定。但關於沙眼病毒的分離、鑒別、性質及對流行病學、預防、治療等等有關問題，我們的知識是仍然極其有限，故尚須作進一步的努力。因此結合國家需要及學理上的要求，在過去一年中我們進行了一些試驗。在整個沙眼病原研究的題目中，我們把工作分作三段來報告，即沙眼包涵體的研究，猴體傳染試驗及病毒分離試驗。

沙眼包涵體在過去半世紀中是研究題目中研究得最多者。雖然如此，自1907年 Prowazek 及 Halberstaedter 二氏發現沙眼包涵體之後，關於它的實在面目，迄今仍極模糊。關於包涵體的組成及與病毒的關係，雖經英美及蘇聯學者盡多年的研究闡明，但目前仍有對之懷疑者^[22]。我們的研究目的，是求了解沙眼包涵體的形態組成，與病毒及宿主細胞的關係，借以獲得對整個沙眼的病原問題的正确觀念。

材料及方法

自1954年6月初至1955年6月底一年之中，每周一次我們在北京市同仁醫院眼科門診工作半天。選擇活動性的、無併發症且未經治療的典型沙眼病例後，我們即將患者一眼或雙眼上臉結膜翻轉，如有分泌物則以沾有生理鹽水旋即擠干的棉花球輕輕揩淨，以白金小鏟（圖版I，1）在靠臉板上緣及穹窿部病變最顯著處，堅穩而輕快的橫刮一下，惟小心勿使出血。將鏟上的刮取物按照普通作血片的方法，立即輕輕的塗布于清潔的玻璃片上。刮取和塗布之好壞，對檢查結果有很大的關係。如刮取上皮細胞時，眼內分泌物或膿血太多，或塗布太厚或太薄，皆將影響結果。

為了改進技術，避免細胞在塗片時為壓力所擠破，根據Покровская氏^[23]免疫機制細胞學研究的方法，在少數病例中（25例）除照尋常方法作塗片外，我們添做了一些印片，即以消毒的7/8吋方蓋片，按Покровская氏的方法在具有顯著沙眼病變結膜表面上，垂直地壓印一下，旋即垂直地提起，以免把細胞及內容物拖壞。塗片印片標本帶回天壇試驗室後，即以無水及不含丙酮的甲醇（木酒精）固定3分鐘，然後進行染色，鏡檢。關於染色，我們曾用過姬氏（Giemsa）、克氏（Castaneda）、馬氏（MacChiavello）、魏氏（Wright）、梅氏（May-Grünwald）和波氏（Poleff）六種方法。茲將各種染色方法簡單分述如下：

1. 姬氏（Giemsa）染色法^[24]

稱取可靠的姬氏粉末顏料0.5克，在瑪瑙乳鉢內磨碎，加中性甘油33毫升，轉入于小燒杯內，在水浴中加熱（55—60°C）1½小時，加甲醇33毫升，使其溶化。必要時置干燥器內一晚，次晨，避免沉淀而將溶液小心地倒至一帶橡皮塞的黃色小口瓶內，塞緊，置室中暗處待用。每次用時，將染色液稀釋50倍，稀釋液是用M/150的pH 7.0的磷酸鹽

緩沖液。塗片做好后很快即用甲醇固定3分鐘，染色前以蠟筆在塗片兩端玻璃片上各划粗綫一道，將染色液滴滿于塗片上，勿使溢出紅綫界，染色45分鐘。到時，將染液倒去，立即以 pH 7.0 的緩沖液沖洗 5—10 秒鐘，待自干后鏡檢。如塗片很厚時則可不用甲醇固定，而逕以姬氏染色液染 45 分鐘，沖洗自干后鏡檢。必須注意稀釋及沖洗用的緩沖液的中性點 (pH 7.0)，偏酸則染色將太紅，偏鹼則太藍。磷酸緩沖液的準備如次：

鹼性磷酸鈉, Na_2HPO_4 M/15	61.1 毫升
酸性磷酸鈉或鉀, NaH_2PO_4 或 KH_2PO_4 M/15	38.9 毫升
雙蒸水	900.0 毫升

混合，調整反應至 pH 7.0，置冰箱內可保存一月，但如發現沉淀，應隨時停止使用。

用前將液倒出若干置室溫內，待其溫度與室溫相近時然後使用。

2. 克氏 (Castaneda) 染色法——Bedson 及 Bland 氏改良法^[25]

染液 I 磷酸鹽緩沖液 M/15 pH 7.0	47.5 毫升
福馬林 pH 6.9	2.5 毫升
天青 II (Azure II) 1%	5.0 毫升
染液 II 沙黃 1%	

用染液 I 染 2 分鐘，水洗，用染液 II 染 2—3 秒鐘，水洗，讓自干后鏡檢。

3. 馬氏 (Macchiavello) 染色法^[26]

染色 I 鹼性復紅, 0.25% 雙蒸水溶液, pH 7.2—7.4	
染色 II 檸檬酸, 0.5% 雙蒸水溶液	
染色 III 美藍, 1% 水溶液	

塗片固定后用濾過的復紅染 5 分鐘，迅速以檸檬酸液洗 5 秒鐘，繼用水洗，然后用美藍染 20 秒鐘，水洗，自干后鏡檢。

4. 魏氏 (Wright) 染色法^[27]

稱取魏氏粉末顏料 0.1 克，在瑪瑙乳鉢內磨碎，加甲醇至 60 毫升，轉入于小口瓶，塞緊，24 小時后過濾，盛于染色瓶內保存于室溫中待用。用時將染液滴于塗片上，1 分鐘后，加等量的 pH 7.0 的磷酸緩沖液，5—10 分鐘后以緩沖液沖洗，干后鏡檢。

5. 梅氏 (May-Grünwald) 染色法^[28]

梅氏染料如為粉末，則稱取粉末 0.5 克，溶化于 100 毫升加熱至 55°C 的無水及不含丙酮的甲醇內，靜置 24 小時，過濾，儲藏于暗色瓶中應用。用時將染液加于未固定的塗片上使染 3—5 分鐘，用水沖洗，干后鏡檢。如為液體 (Grübler 或 Hollborn) 則進行如次：

- (1) 將塗片用純甲醇固定 3 分鐘；
- (2) 以等量的梅氏液體染液及雙蒸水混合液染 5 分鐘 (臨用前調配)；

(3) 用 1% 美藍水溶液染 20 秒鐘；

(4) 以双蒸水冲洗，自干后鏡檢。

梅氏染料为美藍及伊紅的混合染料，可以自制：將等量的 1.25% 水溶液的伊紅及 1% 美藍混合，24 小时后將沉淀過濾并在濾紙上用双蒸水將沉淀洗滌，干燥后饱和溶于甲醇內即为液体梅氏染液。

6. 波氏(Poleff)染色法^[29]

染液 1%美藍双蒸水溶液+0.5%檸檬酸

塗片加热或以甲醇固定 3 分鐘后，將染液滴上，使染 3 分鐘，用水洗滌，干后鏡檢。

鏡 檢 結 果

以姬氏染色法染色后，細胞核染紫紅色，細胞漿染淺藍色，包涵体則染深藍色；克氏染色法，細胞漿及細胞核染紅色，包涵体染藍色；馬氏染色法染色后，細胞漿及細胞核染藍色，包涵体則染紅色，与克氏法的結果恰恰相反；波氏法染色后，胞核胞漿染天藍，包涵体則染成紫藍色。魏氏及梅氏染色結果与姬氏法相彷彿。六种方法之中以姬氏法最为方便，因为操作易于掌握，情况可以标准化，且染出來的顏色可以持久，因此我們經常使用此法。

染色的成敗一半在染色技術的掌握，一半則在于塗片是否做的得法。如刮取塗片和染色均合適，則塗片上的細胞等物散布均勻，彩色清晰，且血球不多，碎屑亦少，惟我們的檢查对象是上皮細胞。沙眼塗片中所發現的上皮細胞，据 Agarwal 氏^[30]有四种，即圓柱形上皮細胞、多面形上皮細胞、立方形上皮細胞及酒杯形上皮細胞，前二者占数最多，在 80% 以上，后二者較少。除上皮細胞外，塗片上还有各种多核細胞，嗜中性多核細胞特別的多，單核細胞包括淋巴細胞、漿細胞、胚細胞 (Polyblast) 及巨型吞噬細胞或間質細胞等。

在一般檢查工作中，每病例我們只檢查塗片一張，平均約半小时。鏡檢時先用低倍鏡將塗片从上至下从左至右普遍檢查一次，如發現有疑似包涵体之处，隨即以高倍鏡及油鏡复查之。如獲得典型标本，詳細研究后可以用“鑽石划圈鏡頭”在塗片上圍繞着包涵体細胞的地方划一小圓圈，加柏油一滴，以盖片复盖保存，以便日后复查或照相。如無划圈鏡頭，則可在油鏡檢查后將目的物穩定于顯微鏡台上勿讓移动。將油鏡升高，用混和二甲苯 (xylol) 及擦鏡紙把塗片上的柏油輕輕擦去，小心勿动移塗片的位置。將油鏡頭自顯微鏡上取下，把油揩淨，再在鏡頭極頂，用牙籤头沾上柏油一極小点，將鏡頭重裝于顯微鏡上，輕輕放下使油鏡在塗片原來位置上接触一下，此时接触处必有一小油

点。將油鏡頭再次提高，把玻片取出，在油点对面玻璃上划一小圈，此即目的物所在之地。

自1954年6月初至1955年6月底一年中我們共檢查201例病例，結果見表1。

表1 沙眼塗片檢查結果

病 例 总 数	臨 床 診 断			患 者 性 别		包 涵 体		陽 性 率
	沙 I	沙 II	沙 III	男	女	陽 性	陰 性	
201	3	195	3	98	103	48	153	23.8%

表1說明201例沙眼病例中有48例为包涵体陽性，陽性率等于23.8%。201例的臨床診斷，按MacCallan氏^[31]分期絕大多数为II期沙眼，I, III期各僅3例。按性別在檢查的病例总数中，男女差不多各占一半。年齡最小者为7个月，最大者68歲，大多数为十几至二十多歲的青年。

表1中未包括印片檢查的結果。自25例印片檢查的結果，陽性者只3例，故百分率为12%，僅及塗片結果的一半。

沙眼包涵体的分析

在塗片中所發現的包涵体，依其形狀，可以分为散在型、帽型、桑椹型及填塞型四种。

1. 散在型包涵体 散在型包涵体是由相当大顆粒的始体組成的，形圓或橢圓，姬氏法染色后呈深藍或暗紫色，常常离开染紫紅色的細胞核而散布于天青色的細胞漿內。一个上皮細胞可含一至二三个或更多的这样散在型包涵体。散在型包涵体的組織，并不是雜亂無章，而是如葡萄球菌或双球菌似的，有規律排列而成的。每一顆粒及整个散在型包涵体的周圍，似有一層不着色的空白包繞，有如細菌之莢膜，光度不强时尤易識別(圖版I, 2, 3)。

2. 帽型包涵体 帽型包涵体，形如便帽或如新月形的瓜皮帽，或稍稍相隔，或緊貼戴于細胞核上(圖版I, 4, 5, 6, 7, 8)。帽型包涵体大小不一，染深藍或暗紫色，多半是由大顆粒的始体联系排列組成的，故也可視為始体包涵体(initial body inclusion)。

3. 桑椹型包涵体 桑椹型包涵体，或独立或一面依附于細胞核上，堆積成相当大的由始体及原体組成的包涵体。原体的顆粒比始体的顆粒要小兩三倍，染紅色，故辨別容易。因为是由顆粒性的物体堆積組成圓形或橢圓形的集体物，外貌酷似桑椹或草莓，故有此名称(圖版II, 9, 10, 11, 12)。

4. 填塞型包涵体 填塞型包涵体是巨大的包涵体,常常把整个细胞填塞充满,而将细胞核压挤成梭形或别的形状物,由中央排挤至边缘。细胞受填塞,常被胀大。填塞型包涵体绝大部分是由原体组成的,但有时原体之间亦间有少数始体。在填塞型包涵体中原体与始体的分别格外清楚,原体的颗粒大小均匀,多作圆状,始体的颗粒的大小及形状则不一致。有的大小与原体相差不多,有的则大三、四倍。有的是圆形或椭圆形而有的则作双球菌形如肺炎球菌(图版 II, 13、14、15)。填塞型包涵体如再向前发展,势必使细胞破裂。细胞破裂后,原体一湧而出,形成游离原体(图版 II, 17)再进袭别的健康细胞,重复传染。

据我们检查的结果,包涵体在临床沙眼中的发现率仅 23.8%,且涂片中含包涵体细胞的数目亦极少。经平均半小时的寻找,每片至多只不过找到一二个包涵体,但 143、152 及 159 号标本却是例外,在这三个标本中有的油镜视野内可以看到 3 个或 4 个典型的包涵体(图版 II, 16、18)。

除 125 号标本外,其余的阳性涂片均取自上穹窿靠近睑板部分。125 号作了睑结膜涂片同时亦作了角膜缘滤泡涂片检查;该患者在上角结膜缘边部有滤泡三个,检查结果睑结膜阴性,角膜则为阳性。

在印片检查不容易找到包涵体,这在前面我们已谈到过,在 25 例印片中仅发现阳性三例(图版 III, 19、20)。

按照包涵体的形状分析,我们所得的结果见表 2。

表 2 包涵体按型分析

总 数	散 在 型	帽 型	桑 椹 型	填 塞 型	未 分 型
48	12	12	8	5	11

表 2 说明,依包涵体的类型分析,散在型和帽型同样的多,桑椹型次之,填塞型为数较少。

按含包涵体的上皮细胞的种类分析,结果见表 3。

表 3 沙眼包涵体细胞分析

病 例 总 数 \ 上 皮 细 胞	圆 柱 形	多 面 形	立 方 形	酒 杯 形	未 分 形
48	14	7	2	1	16

表 3 说明圆柱形上皮细胞含包涵体最多,多面形细胞次之,立方形细胞又次之,酒

杯形細胞含包涵体为最少。四种上皮細胞有多寡不同，前已言及，因此含包涵体的數目，或自有差异。

上面叙述依包涵体形狀或以細胞形狀的分类，自然是極其机械的，不过便于分析而已，且一个标本甚至一个細胞之內有时可以含兩種包涵体，因此我們不能过于拘束。

沙眼包涵体与宿主細胞的关系

自 1907 年捷克学者發現沙眼包涵体以后，人們对包涵体与細胞的相互关系，即有两种不同的看法。一說以为包涵体在宿主細胞中因寄生日久，細胞对包涵体的存在，產生了耐性，因此若無其事；一說恰恰相反，認為寄生物对細胞的新陈代謝有嚴重影响，因此發生各种病变。在含散在型包涵体的細胞中，我們虽沒有看到顯著的变化，但在含帽型、桑椹型及填塞型的細胞內則常观察到整个細胞的膨脹，細胞核萎縮，变長，摺皺或發生空泡及染色清淡等現象。有填塞型包涵体的細胞变化格外顯著。細胞核常被挤压成梭狀物或其他形狀，由中央排斥至細胞之一隅，細胞漿几完全被小顆粒的 原体 所代替，只有靠近細胞膜的一小薄層殘存，給人們一个它随时可破裂的印象（圖版 II, 13、14、15），有的細胞大部分已經崩潰只剩下染淺色的細胞核。有的細胞似因为包涵体刺激之影响，除膨脹外，常顯很活动的分裂增生現象，常見一个胞核分裂为二或成三（圖版 III, 20、21）。据 Agarwal 和 Saxena^[30] 及 Feldman^[32] 等氏最近的报告，包涵体的存在，对細胞的新陈代謝及其他的生理情况，都有很大的影响。

人 工 包 涵 体

人工包涵体或假包涵体，常常擾乱是非，混淆診斷。它的形成的因素甚多，在刮取标本，塗片，固定及染色各項操作过程中，如稍微粗枝大叶即可促使其成。塗片时如使勁稍强，亦可將細胞核的核質(chromatin)挤出，或使細胞漿集聚成点，干燥后即成为人工包涵体。又塗片前玻璃片不干淨，或染色时染液含沉淀或环境多灰塵，均可形成假包涵体。在我們工作中所遇見的人工包涵体，多半是核質溢外造成的。此种假包涵体多作帽形，位于細胞核的一旁，常見其与細胞核有連接，但有的却無連接，且与細胞核隔开，而核膜亦似完整無破裂。判別真假在乎洞悉其染色性及包涵体內部之組成。真包涵体姬氏染色后普通呈深藍色，与染紫紅色的細胞核顯然不同，且內部組成是屬顆粒性的。人工包涵体染紫紅色，与細胞核同色，且內容坚实均匀，故二者甚易区别（圖版 III, 22、23）。

有的人工包涵体是上皮細胞因吞噬現象形成的（圖版 III, 24），有的与單核巨細胞不

容易分清楚。巨細胞或“沙眼細胞”又名 Leber 氏細胞是網狀內皮細胞系統的一種游離細胞，負責保衛及清潔工作，故常見滿載吞噬物如細胞核的碎屑、細胞的染色體、紅血球及細菌等異物。Leber 氏細胞比一般上皮細胞要大三、四倍，且吞噬內容物在構造及染色性質上與上皮細胞及沙眼包涵體根本不同，故不難分辨(圖版 III, 25、26)。

討 論

因為病毒的最小傳染單位——原體，在顯微鏡下可以解剖，洗滌，分離出來，接種一個這樣的單位至細胞後能引起同樣的傳染，所以有幾種病毒包涵體如雞痘^[33]、小鼠脫腳病^[34]、疱疹^[35]及傳染性軟疣^[36]等的包涵體久已被人們視為病毒在宿主細胞中的集體生活方式，即等於細菌在培養基上所形成的菌集落。沙眼包涵體發現雖早，但這樣的證明還付缺如，因此到現在我們還不能把沙眼包涵體與沙眼的病原關係確定。主要原因恐系沙眼病毒格外嬌嫩，它的毒力又十分微弱，所以上述的單位分離試驗難以成功。但 Thygeson 和 Proctor 及 Richards 氏等曾以 10 個沙眼病例的材料制成懸液，過濾沉淀後，在沉淀中看到了無數的原體，用此濾液接種至入眼後，仍能引起沙眼，故似已證明原體為沙眼的傳染原。根據形態上的觀察，我們也有些體會：原體和始體均為沙眼病毒的演變形式 (evolutionary forms) 亦即包涵體的主要組成部分。原體小而圓，相互間的大小一致，直徑據 Thygeson^[37]約 0.25 微米，姬氏法染紅色。始體一般比原體大 3、4 倍，但個別的大小極有出入，形狀上也有作短桿菌、雙球菌或其他形狀者，姬氏染色呈深藍或紫色。原體代表靜止，始體代表活動繁殖狀態。原體變始體，始體又產生原體。原體、始體及整個包涵體的周圍，有由碳水化合物——肝淀粉 (glycogen) 組成的莢膜似的母基質 (matrix) 包圍，可以用碘液染色^[38]，為鑒別包涵體為非細胞附產物有力的証據。根據 Bedson 及 Bland^[39]和 Bland 及 Canti^[40]等氏的鸚鵡熱病毒研究，我們可以推論沙眼病毒的原體侵入或被吞噬至上皮細胞內，即增大其體積變為始體，繁殖發展成散在型包涵體，以後繼續發展為帽型或桑椹型終至填塞型的包涵體。此時或在此之前，始體復變為原體。最後細胞被原體填塞以致破裂，原體湧出，再侵襲別的健康細胞，重複傳染。這些事實首先說明包涵體的生活性。苟非有生機的物體，似不能引起如此逐步改變的變遷。其次，這些觀察可以說明病毒在細胞中活動的步驟。此類活動方式是否可視作病毒繁殖的循環自是另一問題，有待於將來的解決，但 Grossfeld 氏^[41]不特不承認沙眼病毒有繁殖循環的可能，而且拒絕始體的存在。Grossfeld 氏只認原體。這似乎是太主觀而過於保守。

沙眼包涵體與沙眼病原既有密切關係，包涵體的發現率在診斷上自是重要。據

Гроссфельд^[21]的觀察，在早期沙眼即結膜变化还未典型化且臨床診斷根本还不可能时，極容易找到大量的包涵体，在一視野內可以見到二三十个，但当血管翳出現，癍痕成立，臨床診斷很明顯时，則包涵体或完全找不到，或僅在很多小时的尋找后才發現一二个。沙眼包涵体之不易尋找，是試驗室和臨床工作者的同感，因此使人們怀疑它与沙眼病原的关系。其实病原微生物之分离或尋找，在一般傳染病程中，都是愈早愈易，愈晚愈难。比如百日咳，据 Miller 氏等^[42]，在病的第一周百日咳桿菌的發現率为 81%，第三周即降至 50%，第五周 32%，第七周則僅为 8%。有此事实存在，則对沙眼包涵体尋找之困难不会急躁，而于病原关系之怀疑亦可冰釋。我們所獲得的陽性率为 23.8% 比畢華德^[4]、陈道瑜^[43]、蔡鉞侯^[44]諸氏的結果均低，較張文山^[45]所得者更低。我們研究的病例除三例为 I 期，三例为 III 期外，其余的均为 II 期沙眼。可能畢氏等所選擇的病例是格外早期的。初期沙眼，除非具有早期的血管翳或胚胎型濾泡，在臨床診斷上頗难肯定，故不易找到。但奇怪的是在我們的三例 I 期病例中無一例是陽性的。除病程迟早及技術問題外，檢查塗片的数目及檢查時間与陽性發現率自然还有关系。我們每病例只檢查塗片一張，每張塗片平均費时不过半小时，毫無疑問的，如增加塗片数目及檢查時間，我們的陽性率亦可能增高。陽性發現率低的另一原因，則可能是因為防止假包涵体的混淆，我們只統計了那些肯定是真正包涵体的病例。

据郭秉寬氏^[46]“沙眼細胞”或 Leber 氏細胞的發現，对沙眼有診斷价值，但在我們的工作中，却未能建立其中的关系。往往在塗片中我們發現了包涵体而找不到沙眼細胞，或找到了沙眼細胞却發現不着包涵体。但我們十分觉得，在这方面的工作做的太少，应繼續進行。

Покровская 氏的免疫机制細胞学研究印片的方法，用之于沙眼工作，似不十分適合。在 25 例的印片檢查中，包涵体陽性發現率僅达于塗片結果之一半。除技術上我們尚須努力外，陽性率低的原因恐系結膜細胞非游离細胞之可比，不易压印。此点亦应繼續研究。

总 結

为了明了沙眼包涵体与沙眼病原的关系，自 1954 年 6 月初至 1955 年 6 月底一年內我們总共研究了絕大多數属于 II 期典型的沙眼病例 201 例，其中發現有包涵体者有 48 例，發現率等于 23.8%。所發現的包涵体有散在型、帽型、桑椹型和填塞型四种，四种之中以散在型和帽型居多，桑椹型次之，填塞型最少。散在型包涵体为大顆粒的始体組成的。填塞型包涵体大半为小顆粒的原体組成的，而帽型及桑椹型包涵体則为大小二种

不同的顆粒組成的。在文中我們討論了原體與傳染原之關係。以研究工作中的觀察為背景，我們也討論了原體，始體，散在型、帽型、桑椹型及填塞型包涵體的相互關係，及其對於整個病原問題的聯繫。我們有理由相信沙眼包涵體即沙眼病毒的集體生活方式，而原體即病毒最小的傳染單位。在研究中我們發現了人工包涵體，喚起了注意。我們認為大小包涵體對於宿主細胞都有不利。沙眼細胞的存在與沙眼的診斷似無甚關係。印片方法用之于沙眼檢查似不適宜。

本文承中國協和醫學院蔣漢澄同志幫助照相謹此致謝。

參 考 文 獻

- [1] 吉民生: 同濟醫學季刊, 復刊第一期, 第1頁, 1950.
- [2] Julianelle, L. A., The etiology of trachoma, 1938, The Commonwealth Fund, New York, P. 24-28.
- [3] 李鴻: 私人談話.
- [4] 畢華德: 中華醫學雜誌, 50:1465, 1936.
- [5] 周誠謙: 中華醫學雜誌, 20:333, 1940.
- [6] 張文山: 中華醫學雜誌, 29:347, 1944.
- [7] 陳耀真等: 中華眼科雜誌, 2:101, 111, 113, 118, 1954; 3:231, 1954.
- [8] 蘭州眼病防治站: 中華眼科雜誌, 4:308, 1953.
- [9] 陳耀真、毛文書: 中華眼科雜誌, 第五號, 321, 1953.
- [10] Noguchi, H., *J. Exp. Med.* 48 (Suppl. No-2): 1, 1928.
- [11] Busacca, A., Чирковский трахома, 1953, Медгиз, P.106.
- [12] Cuénod, A. and Nataf, R., Чирковский трахома, 1953, Медгиз, P.106.
- [13] Poleff, L., Чирковский трахома, 1953, Медгиз, P.108.
- [14] Трапензонцова, Е., Чирковский трахома, Медгиз, 1953, P. 107.
- [15] Weigl, R. *Zbl Bakt., Abt. I Orig.*, 143: 291, 1939.
- [16] Жив, Чирковский трахома, 1953, Медгиз, P. 108.
- [17] Thygeson, P., *Am. J. Ophth.* 17: 737, 1934, *Am. J. Path.* 14: 455, 1938.
- [18] Thygeson, P. and Proctor, F. I. and Richards, P., *Am. J. Ophth.*, 18: 811, 1935.
- [19] Julianelle, L. A., The etiology of trachoma, 1938, Commonwealth Fund, New York, P. 1--196.
- [20] Bland, J. O. W., *Brit. J. Ophth.*, 29: 407, 1945.
- [21] Чирковский трахома, 1953, Медгиз, P. 106--114.
- [22] Mori, *Brit. J. Ophth.* 35: 553, 1951.
- [23] Покровская М. П., 中蘇科學技術交流訪問團報告, 1955年1月.
- [24] Standard Method, Wadsworth, 3rd ed., 1947, P. 34--35.
- [25] Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases, *Am. Pub. Health Assoc.*, 1948, P. 26.
- [26] Zinsser's Text-book of Bacteriology, Smith and Martin, 9th ed. 1948, P. 909.
- [27] Laboratory Method of the U. S. Army, Simmons Gentzkow 5th ed., 1946, P. 103.
- [28] Laboratory Method of the U. S. Army, Simmons Gentzkow 5th ed., 1946 P. 103--104.
- [29] *Am. J. Ophth.* 36: 947, 1953.
- [30] Agarwal, L. P. and Saxena-Agra, R. P., *Ophthalmologica*, 129: 93, 1955.

- [31] MacCallan, A.F., Van Rooyen, *Virus diseases of Man*, 1948, P. 694.
- [32] Feldman, L. F., *Ophthalmologica*, 101: 79, 1941.
- [33] Woodruff, C. E. and Goodpasture, E. W., *Am. J. Path.*, 5:1, 1929.
- [34] Baumgarten, G., *Zbl. Bakt. Abt. I, Orig.* 133: 282, 1935.
- [35] Baumgarten, G., Van Rooyen and Rhodes, *Virus diseases of man*, 1948, P. 90.
- [36] Van Rooyen, C. E., *J. Path. and Bact.*, 46: 425, 1938.
- [37] Thygeson, P., *Rivers: Viral and Rickettsial infections of Man*, Lippincott, 1948, P. 360.
- [38] Pice, C. E., *Am. J. Ophth.*, 19: 1, 1936.
- [39] Bedson, S. P. and Bland, J. O. W., *Britt. J. Exp. Path.*, 13: 461, 1932.
- [40] Bland, J. O. W. and Canti, R. G., *J. Path. and Bact.*, 40: 231, 1935.
- [41] Grossfeld, H., *Am. J. Ophth.*, 34: 462, 1951.
- [42] Miller, J. J. et al., *Am. J. Pub. Health*, 33: 839, 1943.
- [43] 陳道瑜：中華眼科雜誌，1:275, 1951。
- [44] 蔡鉞侯：中華眼科雜誌，2:227, 1952。
- [45] 張文山：中華眼科雜誌，4:311, 1954。
- [46] 郭秉寬：醫務生活，1:26, 1951。

STUDIES ON THE ETIOLOGY OF TRACHOMA

I. STUDY OF THE INCLUSIONS OF TRACHOMA

TANG FEI-FAN, CHANG HSIAO-LOU, LI YI-FEI and HUANG YUAN-TUNG

National Vaccine and Serum Institute, and Municipal Tang Jen Hospital, Peking

After a brief review of the related recent literature dealing with the discovery and interpretation of the significance of inclusions found in the conjunctival smears of trachoma patients, the authors undertook an attempt to make a further study on the histological nature of the inclusions, and their relationship to the etiological agent as well as to the host cells, in order to advance another step in the elucidation of the nature of trachoma etiology. For one year, beginning from June, 1954, conjunctival scrapings from 201 cases of trachoma, most of which belonged to type II according to MacCallan's classification, were carefully stained by methods of Giemsa, Castaneda, Macchiavello, Wright, May-Grunwald and Poleff stains, and each slide was examined for half an hour for inclusions. In 28.8 % of the cases, typical trachoma inclusions of various types were seen, among which, the "discrete" type of inclusions was considered to be formed of initial bodies, while the "distension" type formed of elementary bodies. By carefully noting the relationship between various types of inclusions and the host cells, it was suggested that the trachoma inclusions are clumpings of the virus of trachoma, and the elementary bodies are the units of infectious agents.

In the course of the study, artificial inclusions were frequently found, and their difference from the true trachoma inclusions were noted. Attention is also called to the importance to rule out these artefacts in the study of trachoma.