

沙眼病原研究

II. 猴体傳染試驗

湯飛凡 張曉樓 李一飛 路苏容

(中央生物制品研究所及北京市同仁医院)

沙眼的病原問題,經苏联及英美学者的研究,目前虽然沒有得到最后解决,但根据沙眼包涵体的研究^[1],無疑地可以認為是病毒病。沙眼之有傳染性而可以由人傳染給人,人們久已观察到。拿破崙侵埃时沙眼發生流行而傳染至欧洲大陸的歷史,我們已經談到过。1807年 Vetch 氏^[2a]做了关于沙眼傳染性的很有兴趣的科学研究。Vetch 氏將英軍部隊編作使用和不准使用公共手巾的兩隊,結果沙眼在兩隊中的散布情况有天壤不同,不用公共手巾的部隊中沙眼例子很少,而使用公共手巾的部隊中則很多。試驗結果虽然極明顯的指出傳染沙眼的媒介物,可惜在 150 余年后的今天,公共手巾还在繼續使用着。1823 年 Wernicke 氏^[2a]以人体試驗方法,首先証明可以直接接种由人傳染于人。自 1823 年至 1937 年間,重复人体試驗者,据 Julianelle 氏^[2b],有 35 人,共作試驗 108 次,結果陽性者有 68%。

由于普通試驗室动物对沙眼無敏感性,故研究者除人类自願者外,只得采用猿猴类灵長动物如黑猩猩(*Chimpansee*)、猩猩(*Orang-utan*)、狒狒(*Baboon*)、長臂猿(*Gibbon*)及十余种普通低級猴子(*Cercopithecus* var. *grivet*, *guenon*, *vervet*; *Semnopithecus*; *Macacus* var. *innus*, *rhesus*, *cynomolgus*, *sinicus*; *Mordax*; *Cebus capucinus*)。我們知道 1907 年 Prowazek 及 Halberstaedter 二氏关于沙眼包涵体歷史性的發現,是在爪哇由沙眼材料接种猩猩后得到的。据 Julianelle 氏^[2b]的总計,在 81 只猿类的接种結果,陽性者为 40%,而在 406 只低級猴子,陽性率則为 52%。406 只中除少数为非洲長尾猴(*Cercopithecus grivet* 和 *Vervet*)及南美卷尾猴(*Cebus capucinus*)外,其余的 366 只均为亞洲恒河猿猴(*Macacus rhesus*)。由此看來恒河猿猴在目前似为研究沙眼的理想动物。沙眼的傳染問題是沙眼病原研究工作中的重要題目,加之我國地处亞洲,恒河猿容易獲得,所以我們重复了一些前人已做过的試驗,茲將試驗結果报告如下。

猴体感染試驗

試驗所用的猴子除一只系由北京西郊公園獲得外，其余的均購自廣西宜山，由火車运京。到試驗室后每只猴子均經過了仔細的檢查，特別关于眼結膜的健康情况。这些猴大半是年青、体重 8 磅左右，毛色光潤，伶俐活潑的。檢查 40 余只結果未發現自發性濾泡性結膜炎。关于猴子的分类，我們自己不內行，只按照头、齒、鼻、頰囊、腎底、四肢及毛色等的特征，認識恒河蛮猴。自西郊公園獲得的老猴則未予鑒定。所有的猴子均分別飼养于 $2\frac{1}{2} \times 2\frac{1}{2} \times 4\frac{1}{2}$ 呎的铁絲籠內待用。

臨床标本包括沙眼的濾泡摩擦，濾泡切除及濾泡压挤，均取自北京市同仁医院沙眼門診。選擇 MacCallen 氏第二期無并發症且未曾用藥的典型沙眼病例，進行标本采取。先將患者的眼臉翻轉，做塗片后，用消毒棉棒在濾泡或乳头的表部普遍摩擦，借以擦取含病毒的上皮細胞，置棉棒于含 0.15 毫升的泰洛氏 (Tyrode) 液小管中，立即放于冰盒內。如有濾泡切除或压挤，則在手術后将切除或压挤物附加于上述之棉棒上，帶回試驗室，在最短時間內(約 3 小时)，將标本在瑪璃乳鉢內加少許玻璃粉研磨，然后沾于原用的棉棒上進行接种。將猴固定于手術台上，再一次檢查兩眼的情况，如仍正常，即將左眼翻开，將沾吸傳染物之棉棒在結膜上輕輕摩擦，先上結膜而后下結膜，各擦約半分鐘，然后將棉棒插入于上下穹窿深处，复擦片刻。有时在棉棒上附加玻璃粉少許，以保證摩擦之成功。右眼不接种，留作对照。接种后将猴置回原籠，但加扣頸鏈，以便日后檢查时捕捉。茲將接种結果簡述于次。

猴 21 号 1954 年 7 月 16 日由病例 335620 号(男, 15 歲, 沙 II, 包涵体-)接种左眼。7 月 24 日檢查, 左眼略紅, 右眼正常; 8 月 10 日, 左右眼血管腫脹, 已有少数濾泡, 故潜伏期約 24 天。9 月 16 日双眼皆有濾泡; 10 月 27 日左下險有 5、6 顆濾泡, 上險 2 顆, 右上下各 2、3 顆; 11 月 15 日, 双眼均有濾泡, 左多于右; 11 月 27 日, 左上下險各 3、4 顆濾泡, 右恢复正常無濾泡; 12 月 16 日左上險 2 顆, 下無, 右正常。1955 年 1 月 14 日左上 1 顆, 下数顆, 右正常, 包涵体陰性。2 月 26 日左上 3 顆, 下無, 右正常; 6 月 27 日双眼正常。

猴 27 号 1954 年 7 月 16 日由病例 335653 号(男, 13 歲, 沙 II, 包涵体+)接种左眼。7 月 24 日檢查, 左下險略紅, 右眼正常; 8 月 10 日双眼正常; 9 月 16 日左上下險結膜均有顯著的濾泡, 右正常, 潜伏期約在 24—60 天之間。塗片檢查未找到包涵体。9 月 23 日取左眼摩擦物注射小白鼠 7 只, 雞胚 4 只并傳代 3 次, 結果均陰性。9 月 29 日, 左眼有顯著濾泡, 右正常; 10 月 7 日, 左上下險均有濾泡, 但有消退傾向, 右正常, 左眼塗片包涵体陽性。10 月 11 日, 左眼繪圖(圖版 I, 1)。11 月 15 日及 12 月 16 日左上下險均有濾泡,

右正常；3月17日，左上臉無，下臉3顆，右上臉1、2顆，下數顆；4月7日，左右眼上下臉皆有數顆濾泡；4月27日，左無，右上臉1、2顆，下數顆；4月4日，左右眼上下臉皆有數顆濾泡；4月27日，左無、右上似有一顆，下無；5月21及6月23日，双眼均正常。

猴28号 1954年7月23日由病例336549(男，14歲，沙II，包涵体-)接种左眼。8月10日，左眼結膜开始性濾泡，右正常，潜伏期17天；9月16日，左臉濾泡多而顯著，右上數顆，下無，左眼塗片包涵体陽性；9月23日，左眼摩擦物注射雞胚5只，傳遞了3代均陰性；9月29日，双眼上下均有濾泡，左多于右；10月7日，左上臉漸消退，下濾泡仍多，右上下皆退，左塗片陰性；10月11日左眼繪圖(圖版I, 2)；11月15日，左上下皆有濾泡，右下數顆，上無；12月16日，左上下穹窿內濾泡仍多，右無。1955年1月14日，左上下濾泡漸退，左正常；2月3日，發現气喘，疑是肺炎，注射盤尼西林30万單位；2月10日頻死解剖，內臟滿呈結核病变，左右結膜完全正常，切下固定于福馬林內，待切片檢查。

猴22号 1954年7月23日由病例335634(男，9歲，沙II，包涵体+)接种左眼。8月10日，左眼血管充血，臉上似有5顆濾泡，右正常；9月16日，双眼正常；9月20日，左下臉开始性濾泡，右正常。自10月7日起至1955年3月10日止每月觀察1次，共7次，双眼均正常。

猴19号 1954年7月23日由病例336402(女，15歲，沙II，包涵体+)接种左眼。8月16日，左眼可疑，右正常；9月16日，左上下臉可疑，右一顆；9月20日，双眼正常。自10月17日至1955年1月14日每月觀察5次，双眼均正常。

猴11号 1954年7月30日由病例345023(男，11歲，沙II，包涵体-)接种左眼。自8月10日至本年1月14日，每月1次共觀察6次，双眼均正常。

猴37号(西郊公園猴) 1954年7月30日由病例337531(男，12，沙II，包涵体+)接种左眼。自8月10日至11月15日共觀察5次，双眼均正常。

猴32号 1954年7月30日自病例337822(沙II，包涵体+)接种左眼。自8月10日至1955年2月26日共觀察8次，双眼均正常。

由上述我們知道，接种的猴子8只中有3只陽性(猴21, 27, 28号)，2只可疑(猴19, 22号)。以猴的类别而言，8只中有7只是廣西宜山的恒河猴，1只是北京西郊公園的类屬不明的老猴。如以接种的总数計算，接种陽性率为37.5%，如僅以恒河蜆猴計算，則陽性率为42.8%。关于接种傳染的潜伏期，即自接种日起至濾泡出現的一段時間，我們沒有逐日檢查猴子，予以嚴格觀察，但短的約17日(猴28号)，長的約24日(猴21号)或24—50天之間(猴27号)。接种后数日，多数的猴呈現輕度的結膜浮腫，血管充血，眼內常有分泌物及流泪怕光等現象，此后或發展至濾泡階段，或漸次恢复正常。起始

时,濾泡出現于近兩背部的臉結膜,沿血管漸向中部蔓延,最后則侵及穹窿部。濾泡为半圓形或半橢圓形,大小参差不勻,小的直徑約半毫米,大的約 2、3 毫米(圖版 I, 1、2)。猴安靜时,濾泡色灰白,但猴如急躁,則濾泡立即变血紅。猴 27 及 28 号接种后約 80 天,濾泡漸有消退傾向,但后来又复繼續,保持一个很長的时间。猴 21 及 28 号接种后一月,右眼也發現了濾泡,但猴 27 号則 8 个月后才从左眼蔓延至右眼。系由猴手指傳染或其他途徑傳染,則未肯定。

濾泡出現前,臉結膜即有輕度的浮腫,前已提及。此种浮腫現象在 27 号猴特別顯著,濾泡出現后又与濾泡并存,歷时有八九个月之久,但濾泡一旦消失后,浮腫也隨之而去。猴 28 号結膜浮腫情形与 27 号猴相彷彿,但較不顯著。在接种后 175 天,此猴死于結核,解剖时觀察,結膜已完全恢复正常,無癰痕,無縮繃,無血管翳,亦無浮腫。

濾泡消失的迟早,各猴間不相同,一般的說,自己傳染的右眼比接种傳染的左眼消失得快些。猴 21 号左眼的濾泡發現后六个月还未消失完,但右眼的則在三个多月后即完全退去;猴 27 号左眼濾泡持續到 210 天,而右眼的在 40 天后即失去;猴 28 号左眼濾泡持續到 90 天,而右眼的僅存 59 天。濾泡消退后結膜完全恢复正常,無癰痕,亦無縮繃。

病人臨床标本中細胞包涵体存在与否,与接种的結果似無甚关系。如上所述,獲得陽性結果的 3 个标本中有 2 个(335620, 336549)不含包涵体,而結果陰性的 5 个标本中,却有 4 个(335634, 336402, 337531 及 337822)反而都含有包涵体。

猴体傳染后包涵体檢查

上皮細胞包涵体为現在診斷沙眼唯一的實驗室証据。在試驗动物傳染中除猩猩或狒狒傳染后偶有此种包涵体的發現外,在低級猴中,尚未見有报告。恒河猴既然可以傳染沙眼,尋找包涵体自系重要。在 21、27 及 28 号三只接种陽性的猴中,我們虽然沒有布置系統化的工作,但在不同的时候却做了一些塗片檢查。將猴眼臉翻轉,用白金小鏟在濾泡組織上堅穩而輕快的橫刮一下,如普通作血片一样,將刮下物在玻璃片上塗布,干后加木酒精固定 3 分鐘,以姬氏(Giemsa)染色法染色,進行鏡檢,結果見表 1。

28 号猴在接种后第 23 天,27 号猴在接种后第 80 及 260 天,在濾泡塗片中我們都找到了包涵体。第 23 天从 28 号左眼制备了兩張塗片。一張塗片染色后鏡檢时,在一油鏡視野內,我們發現了兩個含包涵体的上皮細胞,一个是含帽型包涵体(capping form inclusion)的,另一个是含初期散在型或始体包涵体(early initial body inclusion)的。姬氏染色后,包涵体染深藍,与染紫紅色的細胞核及染淡青色的細胞漿相映照,診斷極

表 1 猴体傳染后包涵体的檢查結果

檢 查 日 期 (接种後天数)	包 涵 体		
	猴 21	猴 27	猴 28
23			+
60		-	
75			-
80		+	
100			-
110		-	
180	-	-	
260		+	
310		-	

其明顯，不能錯誤(圖版 I, 3)。在另一塗片上我們發現了一个含帽型及散在型兩種包涵体的上皮細胞(圖版 I, 4)。在猴 27 号接种后第 80 及 260 日，我們亦發現了包涵体。80 日所得为位于細胞核一旁的初期散在型包涵体(圖版 I, 5)，而 260 日檢查所得者为帽型包涵体，惟此包涵体不靠近細胞核而存在于細胞一端的邊緣(圖版 I, 6)。

連續傳代傳染

致病性微生物，普通可以用动物連續傳代法，增加它們对这种动物的毒力，巩固它們的致病性，此是實驗技術中大家所知道的。在一定的限度內，傳遞次數愈多，毒力則愈强，致病性則愈高而愈穩定。沙眼病毒之能感染恆河猴，似已無問題，倘能利用此原則使病毒適應于猴，進而發展之，則对研究之意义自不言而喻，因此我們做了一些試驗。利用上述的几个接种陽性猴为起点，以直接摩擦接种法，由第一代傳至第二代，以至第三代，逐次傳遞，仔細觀察，茲將結果列于表 2。

表 2 連續傳代試驗結果

試驗 I	
日 期	傳代及觀察
	病人 335653
	↓
16/ 7 /54	猴 27(第一代)
10/ 8 /54	双眼正常
16/ 9 /54	左眼濾泡顯著，右正常
4 /11/54	左上下許多濾泡，右正常
	由左眼
4 /11/54	↓
	猴 18(第二代)
15/11/54	左上濾泡頗多，下數顆，右可疑

27/11/54	左右有少数濾泡
14/1/55	左上下皆有濾泡, 右正常
26/1/55	双眼皆有濾泡
10/3/55	双眼皆有濾泡
	由左眼 ↓
10/3/55	猴 39(第三代)
17/3/55	双眼正常
7/4/55	双眼正常
27/4/55	双眼結膜有充血現象
21/5/55	左上臉充血, 并似有一顆濾泡
23/6/55	双眼上下似有小濾泡數顆
27/6/55	双眼正常

試驗 II

期	傳代及觀察
	病人 336549 ↓
	猴 28(第一代)
28/7/54	
10/8/54	左眼可疑, 右正常
16/9/54	左右均有濾泡, 左多于右
29/9/54	左右均有濾泡, 左多于右
1/11/54	左右均有濾泡, 左多于右
4/11/54	由左眼 ↓
4/11/54	猴 20(第二代)
15/11/54	左下臉在上臉有可疑的濾泡
27/11/54	左上下, 右上皆有濾泡, 右下可疑
16/12/54	左下數顆濾泡
14/1/55	左上穹窿內有許多濾泡
26/2/55	左右皆有濾泡
10/3/55	左右皆有濾泡
	由左眼 ↓
10/3/55	猴 38(第三代)
17/3/55	双眼正常
31/3/55	双眼正常
27/4/55	双眼正常
21/5/55	双眼正常
23/6/55	双眼正常

猴体傳染第一代情形前已叙及, 茲不贅。第二代傳染, 在兩次試驗中, 潛伏期均較第一代為短, 約 11 天左右, 但濾泡數目較少, 而存在的时间却与第一代有同样的長。第三代傳染, 据第一次試驗, 結果可疑(猴 39), 接种 47 天后双眼結膜稍微充血, 71 天后似有一兩顆濾泡出現, 但旋即消失。在另一次試驗中(猴 38), 則結果完全陰性, 接种后觀察了一百余天, 猴眼結膜毫無变化。

討 論

以猿猴為試驗動物從事沙眼研究者，如前指出，頗不乏人，我們的研究結果，除在潛伏期、傳染率、連續傳染情形及病態方面等能証實前人的工作外，還似有一特點，即在恆河猿猴傳染中發現了沙眼包涵體。Julianelle 氏在他所收集的 74 篇論文中，39 篇未提及到包涵體的問題，其餘 35 篇，有 13 篇只談及猿傳染中的偶然獲得，22 篇則明確指出在低級猴包括恆河猴中，從未找到過包涵體。Julianelle 氏^[2c]總結說“十分奇怪，在恆河猿猴的傳染中，細胞包涵體尚待發現”。Thygeson 氏^[3]亦說“沙眼包涵體在猿試驗傳染中雖有發現，但在低級猴及狒狒的傳染中則從未找到過”。Thygeson 氏以為包涵體的缺欠係因為猴沙眼病情非常的輕，既無炎症，又無滲出物，故不引起包涵體的產生。按 Bland 氏^[4]，非洲長尾猴 (*grivet*) 對沙眼比較敏感，但感染後亦找不到包涵體。我們所發現的包涵體的形態、組成及染色，均極典型，且找到的時候不止一次，同時有許多陰性塗片作對照，故結果之正確似不致有何問題。包涵體既與沙眼病毒分不開，猴既可以傳染沙眼，其發現自不稀奇。

低級猴之沙眼感染率，作者間的數字極不一致。據 Julianelle 氏^[2b]自 1902 年至 1938 年 30 余年中各作者共用猴 406 只，其中包括 366 只恆河猴，陽性感染率為 52%。按作者之一和周誠謙氏^[5]從前的研究結果，9 只恆河猴中僅 2 只為陽性，陽性率為 22%，而我們現在的陽性率則為 42.8% (7 只中有 3 只陽性)。此中差異，恐係在於標本之不同或試驗動物數目不多所引起，而不是因為猴本身之有許多分別。

猴沙眼與人沙眼表現完全不同，既無角膜血管翳，又無癍痕現象，因此引起了從前研究者如 Addaris^[2b]及 Howard 氏^[6]等不承認猴的傳染為沙眼，吉民生氏^[7]引 Thygeson 氏的看法則不同，以為猴的結膜構造，外表雖與人結膜相似，但血管不如人的稠密，且缺欠腺體層，故傳染沙眼後，根本不能發生與人相同的病狀。Thygeson 氏的解釋，我們以為近理。

連續傳代方法，用之于沙眼工作中，不特不能增加反而減低了沙眼的傳染性，接連傳遞二代後，傳染原或病狀即完全消失。矛盾的是，如以傳染陽性率而論，則問題卻又不同；在第一代的傳染試驗中，7 只恆河猴中僅 3 只為陽性，陽性率為 42.8%。在第二代 (猴 27 傳 18, 28 傳 20) 傳代感染中，二只猴皆為陽性，故陽性率為 100%，病毒又似已有適應性產生的趨向。但這或僅偶然之事而已，需要更多次的試驗來予以証實。連續傳染失敗之意義，表示沙眼病毒的適應性差，同時說明猴非十分敏感的动物。沙眼病毒的適應性差，是大家所知道的。以人的組織來說，此病毒專嗜結膜上皮細胞，在稍微深點

的細胞內便不能生長,这在 Mitsui 氏^[8]的工作中,表現得非常透徹。Mitsui 氏从眼外皮膚方面注射沙眼刮取物 (scraping) 研磨液至穹隆內恰达到結膜下層 (subconjunctiva), 但不使穿过。用此法接种 10 次中無一次有陽性結果, 但同一标本, 如直接滴于結膜表面上, 則百發百中, 能引起沙眼之發生。沙眼病毒对人类組織, 選擇犹如此嚴格, 一旦脱离人体在其他动物組織中, 适应之难可以想及。組織選擇性的奥秘如不被揭穿, 敏感动物如不能發現, 或不能以特殊方式处理动物, 使其增加敏感性, 則沙眼病原問題恐一时不易解决。

总 結

以猴为試驗动物, 在沙眼病原研究工作中, 我們作了一系列的試驗, 包括直接傳染試驗及連續傳染試驗。在直接傳染試驗所用的 8 只猴中, 有 7 只是恒河蛮猴, 1 只是类屬不明的西郊公園的老猴。接种結果, 8 只中有 3 只陽性, 故傳染率为 37.5%, 但如僅以恒河猴計算則傳染率为 42.8%。所用的臨床标本, 是由同仁医院取得, 置入冰盒, 在 2, 3 小时內以棉棒, 有时或加玻璃粉, 塗擦猴的左眼結膜。接种后經過 17—24—60 日之間在接种的結膜上, 即發現大小不同的, 半圓或半橢圓形濾泡, 結膜亦同时增厚。猴安靜时濾泡色灰白, 但猴如急燥, 則濾泡立即变血紅。有 2 猴(猴 21, 28)接种一月后, 1 猴(猴 27) 接种八个月后, 濾泡由左眼蔓延至右眼。濾泡存在的时间長久者为 6—7 个月(猴 21, 27), 短者約 3 个月(猴 28), 然后消失。消失前后从未見有血管翳或癍痕的發生。在猴 27 及 28 号的濾泡組織塗片上, 我們發現了極典型的帽型及散在型細胞包涵体。在恒河蛮猴傳染中發現包涵体, 据我們所知, 文献上尙無报告, 因此引起了我們注意。連續傳代傳染, 不特不能增加沙眼的傳染性, 反而减弱, 一代不如一代, 傳至第三代时傳染原已絕跡。傳染失敗之原因和意义, 文中有所討論。

参 考 文 献

- [1] 湯飛凡、張曉鐘、李一飛、黃元桐: 沙眼病原研究 I. 沙眼包涵体的研究, 微生物学报 4(1): 1—14, 1956.
- [2] Julianelle, L. A., The etiology of trachoma, 1938, The Commonwealth Fund, New York, (a) pp. 42-43; (b) pp. 43—59; (c) p. 58; (d) p. 53.
- [3] Thygeson, P. Rivers, Viral and Rickettsial infections of man, Lippincott, p. 360.
- [4] Bland, J. O. W., *J. Path. Bact.*, 56: 161, 1944.
- [5] Tang, F. F. and Chou, C. H., *J. Infect., Dis.* 56: 270, 1935.
- [6] Howard, H. J., *Am. J. Ophth.*, 16: 218, 1933.
- [7] 吉民生, 同济医学季刊, 复刊第一期, 第1頁, 1950.
- [8] Mitsui Y., *Am. J. Ophth.*, 32: 1189, 1949.

STUDIES ON THE ETIOLOGY OF TRACHOMA II. EXPERIMENTAL INFECTION IN MONKEYS

TANG FEI-FAN, CHANG HSIAO-LOU, LI YI-FEI and LU SO-JUNG

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

Although the etiological agent of trachoma is generally considered to be a virus, the problem is far from completely solved. In the previous study on trachoma inclusions, the authors have agreed to the likelihood of virus as an etiological agent for trachoma. In view of the importance of the solution of this problem to the welfare of the mankind and in view of the availability of macacus monkeys, experiments aimed at isolating the virus and reproducing the disease in this species of animal were carried out.

This experimental work was divided into two parts. In the first place, direct inoculation with scrapings from diagnosed cases of trachoma was applied to higher monkeys, seven of which were *M. rhesus*, and the eighth was probably so. It was found that three out of the inoculated animals showed typical clinical manifestations of trachoma with an incubation period lasting 17-60 days, and the course, 3-7 months. After the disappearance of the follicles, pannus and scarring were not produced. In two of these animals, typical trachoma inclusions were found from the scrapings of the conjunctival materials, which, as far as the authors are aware, had not hitherto been described in literature.

In the second part of the experiment, attempts were made to passage the infected materials in series, but both trials resulted in the disappearance of infection in the 3rd generation. The reasons for this failure are briefly discussed in this paper.