

金霉素、氯霉素和鏈霉素對沙眼病毒 包涵體形態的影響

葉宗藩 湯飛凡

(衛生部生物製品研究所)

抗生素對病毒性疾病有療效者幾僅限於大型病毒所致的疾病,如淋巴肉芽腫、鸚鵡熱及內含結膜炎等^[1]。1956年湯飛凡氏等^[2-3]在研究各種抗生素對沙眼病毒的作用時,證明青霉素、金霉素及氯霉素等七種對此病毒也有顯著的影響,而鏈霉素、新霉素等四種則否。

意大利眼科學者 Bietti 氏^[4]將青霉素、氯霉素、土霉素等六種抗生素應用於臨床時,發現沙眼包涵體可被暫時消散,但用藥一旦中止,包涵體又可重復發現。他認為在被傳染的組織中,可能有比較抵抗力強而普通顯微鏡所不易看見的病毒形態存在,但用電子顯微鏡觀察沙眼患者結合膜的括片時, Bietti 氏未能得出結論。

本文在湯氏等研究結果的基礎上,復用雞胚作了一系列實驗,觀察到沙眼病毒在金霉素、氯霉素和鏈霉素三種抗生素作用後的形態變化。茲將研究結果報告如下。

材 料

1. 毒種: 試驗中所用的毒種係湯氏等所分離的 TE 8 病毒株^[2]。該病毒株經雞胚卵黃囊接種 23 代後,即保存於 -50°C 低溫中。1957 年 3 月取出,按湯氏等^[2]所述方法接種於 7 日齡雞胚卵黃囊內,傳代二次,發現雞胚於注射後 5—6 日死亡。取當日死亡之雞胚,用無菌手續由氣室端取出卵黃囊,置於無菌玻璃組織研磨器內磨碎,用肉浸液-鹽水稀釋成 10% 懸液,經低速沉澱 10 分鐘後,取上清液作為試驗毒種。

2. 抗生素: 根據湯氏等的研究結果採用 3 種抗生素: 金霉素,係 Hydrochloride, 膠囊裝結晶體, Lederle 廠出品。氯霉素,亦係膠囊裝結晶體,為中國醫藥公司出品。鏈霉素,係 Dihydrostreptomycin, 粉劑, Specia-Paris 出品。將此三種抗生素分別溶解於肉浸液-鹽水中,使 0.2 毫升中分別含金霉素 0.25 毫克,氯霉素 0.25 毫克及鏈霉素 500 單位。

3. 雞胚: 係採用在 39°C 孵育 7 天的萊亨雞胚。

實 驗 與 結 果

實驗 I. 已感染的雞胚一次注射抗生素之試驗

(1) 初步試驗: 將 10% 沙眼病毒懸液接種於 7 日齡雞胚卵黃囊內,共接種雞胚 9 隻,

每只注射量爲 0.2 毫升。注射後置 35°C 溫箱內孵育,並於孵育後 48、72 及 96 小時分別每次取出雞胚 3 隻解剖。取出卵黃囊膜少許,除作直接塗片,用馬氏 (Macchiavello) 染色法染色,進行鏡檢外,另將一部分卵黃囊膜固定於福爾馬林溶液內,準備切片(方法詳後)。塗片鏡檢結果:48 小時的塗片,結果陰性(塗片上見不到紅色病毒顆粒);在 72 小時的塗片上可見到少數紅色病毒顆粒;在 96 小時的塗片中,則到處見到病毒顆粒。切片結果完全與塗片所得者相符。塗片和切片結果指出雞胚在感染病毒 72 小時後,才開始有包涵體的形成,因此,此時似即爲注射抗生素觀察反應最適宜的時候。

(2) 實驗方法:在注射抗生素之前,照上面方法將病毒感染雞胚 60—80 隻,並分成四組孵育,每組 15—20 隻。感染 72 小時後,前三組分別注射金霉素、氯霉素和鏈霉素,每雞胚注射 0.2 毫升於卵黃囊內。第四組作爲對照組不注射任何抗生素。注射後再將雞胚孵育於 35°C 溫箱內,隨後於 2、4、8、12、24、48、72、96 小時在各組中分別解剖活胚 3 隻,每隻取卵黃囊膜一小塊固定於 10% 福爾馬林溶液中,送病理組用石蠟包埋,切成厚 2 微米的組織切片標本,並用姬氏 (Giemsa) 染色法染色。對照組則於病毒感染後 72、96、120、144、168 小時分別解剖活胚 3 隻,取卵黃囊膜作組織切片。

(3) 實驗結果:對照組的卵黃囊膜切片檢查:沙眼病毒包涵體在卵黃囊細胞內的大小形態不很一致,但病毒顆粒大小均勻,密集排列,少數顆粒散在包涵體四周,姬氏法染色爲深紫色(圖 1)。標本內所見包涵體之數目似有因孵育時間的加長而增多的現象。

金霉素組切片檢查:在注射抗生素 24 小時以內,病毒顆粒大部分有膨大現象,其大小比正常發育者約大 1—2 倍不等,並有部分的顆粒相互粘連,開始融合一起(圖 2、3)。在包涵體內部及邊緣之病毒顆粒亦大爲膨大(圖 4),但姬氏法染色仍爲深紫色。48 小時後包涵體的形態變化更爲顯著(圖 5),此時病毒顆粒大部分已融結成片狀,姬氏法染色變淺而且不勻。融結的片狀物並無一定的形態和組織,有的形成爲着色深、大而厚的片狀物,四周繞有散在的顆粒。有的形成爲淺紅色的薄片物質,內部有許多大小不一致的空斑,惟膨大的顆粒仍可看見。在同一個包涵體的連續切片中,也可見到有的部位已融結成片狀物,有的部位還存在有大小不一致的顆粒(圖 5、6)。72 與 96 小時的包涵體多已縮小。有的爲稀疏的大小不一的小顆粒集團;有的爲小顆粒組成的小片(圖 7、8);姬氏法染色多爲淺紅或淺藍。此片狀物由大變小而稀疏的現象,可能是包涵體消失的前階段。注射金霉素後在上列過程各視野中所見到的包涵體數目比在同一時期的對照組所見到的要少。

氯霉素組切片檢查:鏡檢結果大致與金霉素組相同(圖 9、12)。24 小時後病毒顆粒膨大;48 小時包涵體內部已融結成片狀,着色性不勻不深,略帶紅色;72 小時包涵體變爲組織稀疏的小顆粒集團,或形成小片狀,着色性與金霉素組結果相同。但在 96 小時的切片中又有少數如同正常形態的包涵體出現,這可能是再生現象。氯霉素注射後各時期所觀察的包涵體數目同樣比同時期的對照組也要少。

鏈霉素組切片檢查:切片中未見有包涵體的任何形態上的改變,各時期的組織切片觀察幾乎完全與同時期之對照組無異。包涵體的數目也不減少,同樣因培養時間的加長而增多。

實驗 II. 已感染的雞胚多次注射抗生素之試驗

(1) 實驗方法：感染雞胚的方法，開始注射抗生素的時間，作組織切片的間隔時間及方法等，均與實驗 I 同。

將另一批 60—80 隻已感染沙眼病毒之雞胚分成四組，除對照組外，其他三組分別作三種抗生素多次注射，每日一次，共五次，每次劑量為 0.2 毫升。為了避免多次卵黃囊注射易引起雞胚死亡，僅第一次注射抗生素於卵黃囊內，以後四次均採用 Bloom 及 Gordon 二氏^[5]的氣室注射法。先將雞蛋氣室端鋸一小孔，再將連附在注射器上之短針頭淺淺的插入孔內，並注入抗生素溶液於內層壳膜上。每次注射抗生素後均將雞胚放入 35°C 溫箱內繼續孵育。由第一次注射抗生素起，於上述間隔時間內分別解剖活胚 3 隻，並將卵黃囊膜製成切片。對照組之組織切片時間與實驗 I 同。

(2) 實驗結果：金霉素與氯霉素兩組對沙眼病毒包涵體的作用，雖連續多次注射，其結果與實驗 I 相似。卵黃囊組織切片觀察：24 小時病毒顆粒有膨大現象，48 小時包涵體內部已融結成大小不同的片狀物，72 小時以後包涵體變小，同樣有着色也淺的組織稀疏的小顆粒集團，或小片狀物出現。但氯霉素組在 96 小時以後不再有正常包涵體的存在。在各時間所見的包涵體數目同樣比同時期的對照組少。

至於鏈霉素組結果仍然是陰性，包涵體發育正常，並與培養時間的加長而增多，與對照組無異。

實驗 III. 抗生素與沙眼病毒混合注射之試驗

(1) 實驗方法：將沙眼病毒製成 20% 懸液，抗生素的濃度改配製為 0.1 毫升肉浸液-鹽水中分別含金霉素 0.25 毫克，氯霉素 0.25 毫克及鏈霉素 500 單位。再將三種抗生素分別與病毒懸液等量混合，此時病毒懸液與抗生素的濃度恰與實驗 I 相等。混合後置 4°C 冰箱內 1 小時，然後分別作一次注射於三組 7 日齡正常雞胚卵黃囊內，每只雞胚 0.2 毫升。雞胚數目亦與實驗 I 相同。另一組 7 日齡正常雞胚與實驗 I 相同，注射沙眼病毒 10% 懸液，不注射抗生素，作為對照組。四組雞胚注射後置於 35°C 溫箱內孵育，然後於 72、96、120、144 及 168 小時分別取活的雞胚 3 隻解剖，並取卵黃囊膜作組織切片以備鏡檢。

(2) 實驗結果：抗生素與病毒混合注射後之結果，與上述二實驗之結果完全不同。金霉素組在 72 小時的卵黃囊膜組織切片中，未找到包涵體，隨後 96、120、144 及 168 小時同樣也未見到包涵體。氯霉素組的結果與金霉素組基本相同，在 120 小時以前未找到包涵體，但在 144 小時以後又有小型的正常包涵體出現。至於鏈霉素組，仍然未有影響，各時期的卵黃囊膜組織切片與對照組相同，包涵體發育正常，多而且密。

討 論

根據本實驗的雞胚卵黃囊膜組織切片觀察，沙眼病毒在金霉素與氯霉素的作用下，引起了包涵體發生顯著的形態變化。其變化可概括為三個階段：第一階段為膨大現象，沙眼病毒顆粒受抗生素的影響而首先表現為大小不等的膨大現象。第二階段為融結階段，病毒

顆粒由膨大而互相密結成團，因而使包涵體部分組織模糊，最後顆粒破裂融結成各種形態的片狀物。第三階段為消失階段，片狀物逐漸變小，同時遺留有殘餘的小顆粒，這種趨勢是說明了沙眼病毒包涵體受到破壞並走向消失的過程。Weiss 氏^[6]及 Gogolak 與 Weiss 二氏^[7]等作了類似的研究，他們觀察了青霉素與金霉素對鼠肺炎病毒及貓肺炎病毒的作用，亦得出與本實驗相似的結果。

金霉素與氯霉素兩種抗生素對沙眼病毒包涵體的作用，似乎是有區別，因氯霉素在試驗後期往往復有形態正常的包涵體出現，可意味着病毒活動性的還原，而在金霉素組則尚未發現相同現象。此種現象可能說明金霉素的作用比氯霉素強。

抗生素與病毒混合後注射於雞胚，無包涵體的出現，說明病毒受了抗生素的直接作用而失去其活動性，不能形成包涵體，因此，在臨床上早期用藥之重要性是不言而喻的。

總 結

本實驗用雞胚為試驗動物，研究了金霉素、氯霉素及鏈霉素三種抗生素對沙眼病毒包涵體的作用。依照抗生素給與的方法分為三種實驗進行，即將感染病毒的雞胚一次注射抗生素、多次注射抗生素、及抗生素與病毒混合後注射雞胚，然後在一定間隔時間內解剖雞胚，將卵黃囊膜製成切片鏡檢。結果證明金霉素與氯霉素對沙眼病毒包涵體有顯著的影響，金霉素復強於氯霉素，而鏈霉素則無作用。三種實驗方法中，除混合注射之雞胚卵黃囊膜組織切片中未發現有包涵體形成外，其他二種實驗之結果相同。概括的說，沙眼病毒在抗生素的作用下，其包涵體之變化可分為三個階段：第一階段為膨大現象，第二階段為融結，第三階段為消失現象。

本文圖片承中國協和醫學院蔣漢澄同志攝製，特此致謝。

參 考 文 獻

- [1] Smadal, J. E.: *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **31**: 704, 1955.
- [2] 湯飛凡、張曉樓、黃元桐、王克乾：微生物學報，**4**: 189, 1956.
- [3] 黃元桐、王克乾、湯飛凡：幾種新抗生素及胆汁、胆鹽對沙眼病毒的影響，中華醫學雜誌，**10**: 765—768, 1957.
- [4] Bietti, G.: *Am. J. Ophth.*, **39**: 112, 1955.
- [5] Bloom, H. H. and Gordon, F. B.: *J. Bact.*, **70**: 260, 1955.
- [6] Weiss, E.: *J. Inf. Dis.*, **87**: 249, 1950.
- [7] Gogolak, F. M. and Weiss, E.: *J. Inf. Dis.*, **87**: 264, 1950.

STUDIES ON THE MORPHOLOGICAL CHANGES OF TRACHOMA INCLUSION BODIES UNDER THE INFLUENCE OF AUREOMYCIN, CHLOROMYCETIN AND STREPTOMYCIN

YEH CHANG-FAN and T'ANG FEI-FAN

(*National Vaccine and Serum Institute, Peking*)

In this paper, three experiments dealing with studies on the morphological changes of trachoma inclusion bodies under the influence of aureomycin, chloromycetin and streptomycin were described. Seven-day-old chick embryos, divided into 4 groups, were used as the experimental animal. The first 3 groups were treated with aureomycin, chloromycetin and streptomycin respectively while the 4th was kept without treatment as control. In the first experiment only one single dose of the respective antibiotic was injected into yolk sac of the embryos three days following the inoculation of the virus; in the second experiment multiple injections of the antibiotics were made; while in the third, the virus was first mixed with the corresponding antibiotic, kept at 4°C for an hour before administration. After a certain intervals of incubation, the embryos were examined, pieces of yolk sac tissues were collected and fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and thin sections (2 μ) cut, and stained with Giemsa.

Microscopical examinations revealed great changes in the morphology of the cell inclusions under the influence of aureomycin and chloromycetin, but not with streptomycin. The results of the first and second experiments were essentially identical. The morphological changes of the inclusions may be described under three stages. Firstly, there was an enlargement of the virus particles inside or outside of the inclusion bodies within 24 hours after the administration of aureomycin or chloromycetin. Secondly, there was a sort of conglomeration of the inclusions after 48 hours. The conglomerated parts were irregular in size and shape with vacuoles and stained unevenly. Thirdly, the whole inclusion was seen disappearing. After 72 to 96 hours, the large conglomerated inclusions were seen becoming smaller and smaller and fragmented, leading to their final disappearance. In the third experiment no inclusions were seen in the yolk sac cells signifying that the virus activity was checked right away when it was mixed with the antibiotics. In the control groups, inclusions were seen developing with full vigour without any change and ran their own course of progress.