

組織培養中美洲錐形蟲發育的研究

唐仲璋

(蘭州大學生物系)

近代組織培養的技術可作為研究動物體的組織與病原微生物相互關係的極好方法。此技術曾經科學者們用為研究病毒,立克次體,細菌以及原生動物的培養工具。因為在活細胞裏面,這些微生物或其所引致的病理現象易於觀察。(參看 Hoeppli 1940^[1])。

本文敘述作者用組織培養的方法研究美洲錐形蟲 (*Trypanosoma Cruzi*) 在培養細胞中繁殖情形,以及被寄生的組織對於它的反應。Kofoid, Wood 與 McNeil (1935)^[2] 在血瓊膠的培養基中,繁殖了美洲錐形蟲的梭形期 (Crithidia) 並利用這一期的鞭毛蟲來感染鼠肌肉的組織而獲得成功。Hawkings 氏 (1946)^[3] 用鼠胎的組織培養美洲錐形蟲到了 59 天。Romana 與 Meyer 二氏 (1942) 及 Meyer (1949)^[4] 均能在雞胚胎的組織培養中觀察到此錐形蟲的利什曼期的分裂並轉變為鞭毛體的現象。Muniz 與 de Freitas (1946)^[5] 用豚鼠的腹膜液培養此種原蟲並研究它的發育。由於上述各學者的工作成果,我們知道最近數年來關於美洲錐形蟲的生活史有好些新知識被發現了。這些新知識在該原蟲發現後四十餘年方始闡明,在各類人體錐形蟲的研究上是富有興趣的 (參看 Elkeles 1951^[6])。

材料與方法

此次研究用小鼠的組織為試驗材料。因愈小的鼠,它的心肌愈易培養。剛生出一天或兩天的鼠便拿來感染美洲錐形蟲。法用含有美洲錐形蟲的血液注射入腹腔內。感染後 7—10 日,血內的錐形蟲數目到達最高峯的時候,該小鼠使用哥羅芳悶斃,取出心臟和脾臟的組織作為若干懸滴的培養。用雞的血漿與胚胎的液汁作培養基,並在 38°C 的溫度內培養。懸滴的玻片可以經常不斷的觀察,2—7 天移植一次。除却觀察白血球吞食錐形蟲時用脾臟的組織外,所有其他研究,均利

用心臟組織為培養的材料。作傳染試驗時，雞胚胎的心肌組織與鼠胎的心肌組織都有應用。切片的標本與全部封裝的標本用鐵鑿蘇木精以及蘇木精與伊紅染色。培養出來的錐形蟲的塗片則用 Giemsa 染色。

美洲錐形蟲在組織培養中發育的情形

已感染的鼠心臟組織在懸滴培養中繼續生長，如普通的組織培養一樣。細胞增多時，在內部寄生的原蟲也大大的繁殖。外移的細胞，在蓋玻片上向週圍擴散，在顯微鏡下可窺見細胞質內含有許多利什曼蟲體。它們數目的增多可由整塊培養組織的切片而看到。培養歷時愈久，蟲體的數目便愈多。培養的細胞內利什曼蟲體不但增多，且常變為錐形蟲型而出現於液化的培養基中。此現象約在第二次或第三次移植時發生。極多的錐形蟲聚集在生長組織的邊緣。在染色的塗片上詳細的檢查可看出這些錐形蟲與經常鼠血液中美洲錐形蟲期完全一樣。

能夠游動的錐形蟲體也會鑽入凝固的培養基中，似小蛇一樣蠕動着。許多錐形蟲體能鑽入新生的細胞中而回復利什曼蟲體的形態。錐形蟲如何鑽入細胞不易見到，它們顯然能穿入胞膜，在細胞內活動的情形容易觀察。它們在轉變為利什曼期時先縮為圓形或橢圓形。鞭毛隨即消失，而短粗的根狀體 Rhizoplast 則於此時出現。根狀體或是鞭毛縮短而成。在一個細胞內，蟲體和它的胞核頗易與宿主的細胞質區別，但其詳細構造則必須染色後方可看出。上述的觀察證明了美洲錐形蟲可直接由利什曼期變為錐形蟲期，或回復過來由錐形蟲期變為利什曼期而無須經過梭形期 (Crithidial stage) 的階段。此現象與前此作者所報告的相同 (Elkeles 1940; Muniz 與 de Freitas 1946^[5])。

在本項實驗中，利什曼蟲體由於不斷的分裂增裂，所以有的體質極小，形成大和小的不同的利什曼體。這觀察和 Mayer 氏 與 da Rocha-Lima 氏 (1914)^[6] 所敘述的“小利什曼期”和“大利什曼期”的現象相同。Elkeles (1940)^[7] 也曾報告由於梭形期的裂殖法分裂，小型的利什曼期也可發生。梭形期的多核性複分裂法 (Multiple division) 在自然狀態下只在昆蟲宿主體內發生，在人工培養中，只在平常的室內溫度可以觀察，在本次實驗中沒有見到。在脊椎動物體內或在較高溫度的組織培養中，美洲錐形蟲的主要生殖方法是細胞內利什曼蟲體的分法，這是美洲錐形蟲與別種錐形蟲不同的特點。(Hoare 1948)^[8]。

美洲錐形蟲鑽入一個細胞時，在原形質中，它的周圍出現了液泡。這液泡最

初只是圍繞該原蟲的圓圈隨後發展成一個很大的液泡。液泡的輪廓與所含的利什曼蟲的形狀完全符合。證明美洲錐形蟲能夠分泌一種物質藉以溶解宿主的細胞質而吸取為養料。當錐形蟲因分裂而增殖時，所形成的液泡愈來愈大把細胞核擠向一邊。被寄生的細胞，其胞核較其他健康的細胞核着色較深。在鐵蔡蘇木精的染片上呈深黑色，這表示病態的現象。當增殖的美洲錐形蟲的利什曼蟲體充滿一個細胞時，空胞內體引逗了利什曼蟲體轉變為錐形蟲的形態。他們隨即穿出胞膜而分散各處。前此的研究者在活的動物體內也曾經報告過腦細胞和腺細胞內含有錐形蟲的空胞 (Vianna 1911^[9]; Wenyon 1926^[10])。因為當時空胞的性質不大明瞭，原蟲學者們曾稱它為“胞囊”或“假胞囊”。(Wenyon 1926^[10]; Knowles, 1928^[11])。此名稱容易與其他原蟲的胞囊混淆。Wenyon 氏曾經指出此胞囊的性質接近於空胞。在本次實驗所闡明的現象 Meyer 氏 (1949)^[4] 亦曾有敘述。“只有一隻細胞全部被利什曼蟲體充塞時，它們轉變為錐形蟲期方才開始。”組織培養的實驗中更證明細胞質的液化狀態是促使利什曼蟲體轉變為錐形蟲的原因。在液化的血漿培養基也能促使錐形蟲出現，而凝固的培養基則促使其成為利什曼蟲體。

新組織的感染試驗

為要觀察美洲錐形蟲的梭形期 (Crithidial form) 如何鑽入哺乳類的細胞，作者曾舉行下面所述的試驗。鼠胎組織在 38°C 培養到了 8 日之後在懸滴的培養基中種入了美洲錐形蟲的梭形期。該蟲已在三恩氏培養基 (NNN medium) 在室溫中已繁殖了 40 天。這樣的懸滴培養一共作了 16 個玻片。除却一片放在室溫的環境以備觀察之外，其餘 15 片均放在 38°C 的溫箱裏，並經常舉行檢查。在室溫中培養的片子可見到許多梭形期的蟲體，以它們的前端附着於組織細胞，有似該蟲在昆蟲宿主腸管附着於管壁細胞的情形。許多梭形期的蟲體也常聚集成菊花狀的排列 (rossett) 以前端鞭毛互相纏繞。這樣的梭形期繼續觀察了 3 天，沒有看到其他的變化。在生活狀態中，梭形期的蟲體，其胞核等構造均能看見。

在 38°C 培養的組織中，梭形蟲很快死掉了，但有一些個體却能鑽入細胞內寄生。3 天後感染的組織移植在新的培養基裏，又經過 4 天的孵育，活動的錐形蟲又在新生的細胞間出現了。用梭形蟲來感染培養的細胞前此的學者亦曾有報告過了 (Kofoid Wood and McNeil 1935)^[2]。本次的實驗雖能夠證明美洲錐形蟲的

梭形蟲期不能在較高的溫度 38°C 生存，但能夠鑽入細胞內的是否全係梭形蟲期，抑或存在培養基中是否尚有他期的蟲體向未能完全確定。

爲要證明從感染組織中出來的錐形蟲能夠侵入新的細胞，作者舉行另一試驗，一塊新的組織安置在已經感有美洲錐形蟲的組織的旁邊，相距約 1—1.5 毫米，這樣使兩邊的生長出來的細胞不互相接觸。經過兩三天的培養後一些錐形蟲出來了，他們逐漸分散，有的穿入凝固的血漿裏面。不久後凝固的培養基一部液化了。多量的蟲體到了對方的組織中而鑽入細胞內。新生的健康組織的細胞隨即發現有很多的利什曼蟲體。它必定是從已感染的組織來的。這塊新組織嗣後經分開而移植後，培養了 7 天，錐形蟲又在液化的培養基裏出現。這試驗證實了從感染組織出來的錐形蟲能夠立刻侵入新的細胞而不必停留於血液中。同樣的試驗用雞胚胎的心臟組織安排在已感染的鼠組織旁邊一起培養。所用的培養基仍是雞的血漿與雞胚胎壓榨的汁液。從鼠肌中出來的錐形蟲，很快的就鑽入雞組織的細胞而變爲利什曼蟲體。新感染的組織分開移植後，第二天就有一些錐形蟲出來，第三天出來的更多。第二次移植後雞組織內尚有一些錐形蟲，但數量已大大減少。

很多次的試驗證明雞的組織不適合美洲錐形蟲的生長。雖然固定後而經過染色的雞組織顯示了細胞內的原蟲在形態與構造上均是正常，但經培養三、四天後，血漿培養基液化，情況便不適合錐形蟲的生存了。在這樣的培養中，許多鞭毛蟲凝集在一起的現象便會發生。最初只有兩三個黏集在一處，隨後許多的個體凝集成菊花狀，或聚成一團，首先它們的鞭毛尚能動作自如，但歷時稍久，它們便死亡了。死的鞭毛蟲全體直升。這樣凝集的現象，類似錐形蟲在免疫血清中所生的狀態，表示了雞組織和血漿是不適合於美洲錐形蟲長期生存的。Roubaud 及 Romana 二氏 (1939)^[12]曾用雞的胚胎培養美洲錐形蟲到了 7 天，但沒有觀察它們的增殖。寄生原蟲在分類位置相差太遠的宿主體內是不易生長的。

感染細胞的反應與病理現象

在培養的組織中，各類的細胞都可受美洲錐形蟲的感染。因爲許多的細胞從原來的組織遷移出來而且培養中增殖與變更形態，從組織學的觀點來斷定它們的來源便不易了。但這些細胞羣當中的大噬食細胞 (macrophage) 與成纖維細胞 (fibroblast)，根據 Maximow (1928) 與 Carrel 及 Ebeling (1926) 的敘述，是可以分別出來的。前者有不規則的外形，小而橢圓或圓形的胞核或鈍的假足，後者有梭

形的細胞外表與橢圓的胞核。雖然各類細胞都能感染大噬食細胞或表皮狀細胞常感染得較多。蟲體的數目各細胞不同。有的一個細胞內可能有一百個以上的錐形蟲。它們只寄生於細胞質內，雖是含蟲最多的細胞，胞核內也沒有蟲體寄生。錐形蟲沒有對胞質中任何部分有選擇，只是平均的分佈。即使纖維狀細胞的突出部分也可找到利什曼蟲體。

動物體內白血球吞食錐形蟲的現象曾有數個科學家作過觀察。這現象不但發生於游離的白血球也發生於固定的血管管壁細胞，(Laveran 與 Mesnil 1901^[13]; Levaditi 與 Sevin 1905^[14])。在本次實驗中，作者曾數次在脾臟組織的培養中觀察到單核白血球吞食錐形蟲的現象。錐形蟲的後端被白血球吞食了，前端的鞭毛尚能揮動。它擺動的劇烈常能使整個的白血球也擺動起來。已被吞食的，失却動作能力的蟲體則如新月形似的，在胞核的一邊。

被美洲錐形蟲寄生的組織，其細胞有明顯的特徵，即含有空胞與胞體的腫大。如前所述，每個利什曼蟲體的周圍分泌一種物質溶解宿主細胞的原形質而形成一個空胞。蟲體不斷增殖時，這空胞也逐漸增大。此種病理的影響使宿胞細胞的分裂受了障礙。感染較多的組織，兩核與多核的細胞是極其普遍。它們多是大噬食細胞與表皮狀的細胞。一部分的纖維狀細胞也有此現象。兩核細胞的形成是因為胞核分裂時病態的胞質不能跟着完成分裂。一些的細胞還有大小不等的胞核，這顯然表示着它們或是由無絲分裂來的。不正常的有絲分裂在這些組織內也有存在。多核的細胞則顯然是由數個細胞溶合來的。這樣的大形細胞有的直徑到了44—100 μ 。它們的外形是不整齊的。有的溶合細胞的外緣尚可認得，也有溶合得更為完整。此種畸形的現象是因為美洲錐形蟲的毒素所致。多核的巨大細胞在感染美洲錐形蟲的動物體內的組織，曾有研究者的報告，(Vianna 1911^[9]; Dias 1934^[15])證明這並不是由於在人工培養狀態下才能發生。

討 論

美洲錐形蟲與動物組織同時培養的試驗曾經若干學者進行研究。Kofoid, Wood 與 McNeil 三人^[2](1935)培養含有美洲錐形蟲的組織到了7天。Kolondny 氏(1939)^[16]用 Ringer 氏或 Lock 氏生理食鹽水培養心臟或脾臟組織同時也培養美洲錐形蟲到了12天之久。Hawking 氏(1946)^[3]用鼠胚胎組織能夠培養到了49天。這表示如果培養的技術增進，美洲錐形蟲在這樣的環境中可以更多的

蕃殖。

著名的原生動物學者 Wenyon 氏在他的原生動物學 (1926 P. 492)^[10] 書中曾提起一個題即哺乳類宿主體內細胞的感染,是由於血內的錐形蟲,或由於從細胞破裂而分散的利什曼期。這問題可以從研究美洲錐形蟲形態的變換而得到答覆。由本次實驗所示,當一個感染的細胞充滿着利什曼蟲體,並膨大的液泡時,它們就可直接轉變為錐形蟲期。這裏一個主要的條件,就是細胞的液化便能引逗利什曼蟲體的轉變。新轉變出來的錐形蟲能夠穿出胞膜而分散於液化的培養基中。這現象可以闡明美洲錐形蟲在哺乳類宿主體內組織與血液中兩型的變態。新生的錐形蟲可以直接侵入新細胞而無須在血液中停留。

雞的胚胎組織可以培養美洲錐形蟲,但這個不平常的宿主它的細胞不適於錐形蟲持久的生長。在細胞裏面利什曼蟲體,很快就變為錐形蟲而出來了。在細胞內停留的時間較短就表示沒有在裏面增殖。錐形蟲在雞的血漿中凝集與死亡的現象是饒有興趣的,因為用雞的血漿與鼠的心肌組織來培養美洲錐形蟲並沒有發生這現象。只有用雞的血漿與雞的組織來培養時,這現象才發生。證明主要消滅錐形蟲的要素是細胞與血液兩者共同產生的。

許多以往的科學家曾研究細胞內空胞形成的原因。自從梅契尼可夫 Metchnikoff (1888)^[17] 與 Le Dantec (1890) 闡明噬食細胞吞食外物與細胞內消化現象以來,許多人就注意液泡形成與外物侵入的關係。Laveran 與 Mesnil (1912)^[18] 曾觀察白血球吞食錐形蟲時有空胞的形成。在他們合著的“錐形蟲與錐形蟲疾病”一書中曾有一些圖畫證明了這一點。白血球吞食細菌時也有空胞形成。這顯然是細胞消化外物的作用。至於美洲錐形蟲在宿主細胞內所形成的空胞須作另一方面的解釋。它的利什曼蟲體能夠抵抗宿主細胞的防護機構而適應於細胞內的寄生生活。如前所述,它所形成的液泡,其輪廓與蟲體的形狀符合證明了美洲錐形蟲必能分泌一種能夠溶解宿主細胞質的一種物質。靠着這分泌物錐形蟲才能夠使宿主細胞的原生質變成易於吸收的狀態。蘇聯科學家曾報告由美洲錐形蟲體內可以提取一種內毒素,當注射於癌腫組織時能溶解癌腫細胞。此種溶癌毒素他們種為 KR。對於鼠的腫瘍如 Kroker 氏肉腫, Ehrlich 氏腺癌腫及 Flexner-Jobling 氏自發性鼠癌的細胞有破壞和溶解的能力。他們由動物體中或培養基分離出來的錐形蟲在蒸溜水中分解後可以提出此種溶癌的物质。它也可以應用於人體某種癌病的治療。蘇聯科學家並能證明美洲錐形蟲具有腫瘍親和性。它們

能集中於腫瘍組織內，侵入並破壞惡性的癌腫細胞。藉以使腫瘍組織的溶解。(Klyuyeva 與 Roskin 1946^[19]; Klyuyeva 與 Bobritskaya 1946^[20]; Roskin 1946^[21]) 從美洲錐形蟲體內分離出來的物質曾被稱為 Trypanosin (Malisoff 1947)^[22]。關於此物質的研究和應用在蘇聯是尚在發展的。

另一個有趣的現象在本次實驗中發現的即巨形細胞的形成。若干的作者曾敘述 Langhans 氏巨形細胞的形成是由於幾個細胞的融合。研究這問題的有 Lewis 氏 (1927)。據她的觀察，形成的步驟可分為二，最初是外漿的混合，繼為各細胞中部顆粒狀部分的細胞質的混合。在當中的部分稱為胞中心，Cytocentrum。Langhans 氏巨形細胞的特徵即是細胞核圍繞在這個顆粒狀的細胞中心的周圍。在本實驗中不同形式的細胞，它們互相融合，融合的程度並不超過外漿混合的階段。若干的學者，曾報告病原微生物如鳥及牛類的結核菌，麻瘋菌等均能為產生巨形細胞的因素。但他們之中所產生巨形細胞的完整性有不同的程度，例如因麻瘋桿菌所刺激而形成的巨形細胞比結核菌所產生的較為不完整。(Cowdry 1938)^[23] 而由美洲錐形蟲所刺激而成的更為簡單。它只是幾個細胞邊緣的融合而沒有更動胞核的位置，這與 Langhans 氏的巨形細胞有異。兩核細胞與多核巨形細胞的形成是由於美洲錐形蟲分泌毒素所致。這現象顯然不是由於培養細胞自己的一般性的退化的緣故。在美洲錐形蟲感染的活動物的體組織裏面，多核的巨形細胞也曾經有發現過 (Vianna 2911^[9]; Dias 1934^[15])。

本文所敘述的實驗研究闡明了美洲錐形蟲在細胞中的發育與變態，侵入新細胞的情況，宿主組織對於它的反應，吞噬細胞對於錐形蟲的作用，被寄生的細胞發生的病理現象如空胞的形成，雙核細胞與多核的巨形細胞的形成等等。這些事實可以幫助我們明瞭美洲錐形蟲在哺乳類宿主體內的一部分生活史以及它所引致的病理作用。雖然，我們必須瞭解割裂出來的小塊組織的培養與宿主整個的身體不同，因而錐形蟲所表現出來發育與變態也必定受着人為環境的影響。組織培養可以長期地培植美洲錐形蟲，這方法對於除滅這一種原蟲的藥物試驗上是有價值的。因為至目前為止，我們尚沒有醫療 Chagas 氏錐形蟲病的特效藥。此類藥品必須能殺滅病原蟲而同時對於宿主細胞又必須無害。同時美洲錐形蟲能夠溶解宿主細胞的物質以及它對於細胞分裂的影響，因為它在醫學上有應用的可能，是必須加以進一步研究的。

參 考 文 獻

- [1] Hoeppli, R., *Chinese Med. Jour. Suppl.* 1940, **3**, 629-692.
- [2] Kofoid, C. A., Wood, F. D. and Mc Neil, E., *Univ. of Calif. Publ.* 1935, 23-24.
- [3] Hawking, F., *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 1946, **40**, 345-349.
- [4] Meyer, H., *Monogr. Instituto de Biofisica Universidade do Brazil*, 1949.
- [5] Muniz, J. and de Freitas, G., *Rev. Brasil. Biol.* 1946, **0**, 467-484.
- [6] Mayer, M. and da Rocha-Lima, H., *Arch. Schiff-Tropen-Hyg.* 1914, **18**, 101-136.
- [7] Elkeles, G., *Jour. Parasit.* 1951, **37**, 379-386.
- [8] Hoare, C. A., *Fourth Intern. Cong. Trop. Med. and Mal.* 1948, **2**, 1110-1116.
- [9] Vianna, G., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1911, **3**, 276.
- [10] Wenyon, C. M., *Protozoology*. Bailliere, Tincall and Cox, London, 1926, 491.
- [11] Knowles, R., *An Introduction to Medical Protozoology*. Thacker Spink and Co., Calcutta, 1928, 314.
- [12] Roubaud, E. et Romana, J. *Bull. Soc. Path. Exot.* 1939, **32** (9), 874.
- [13] Laveran, A. and Mesnil, F., *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1901, **15**, 673-714.
- [14] Levaditi, C. and Sevin., *Compt. rend. Soc. Biol.*, 1905, **58**, 695-697.
- [15] Dias, E., *Instuto Oswaldo Cruz.* 1934, **28**, 1-110.
- [16] Kolodny, M. H., *Jour. Parasit.* 1939, **25**, 282.
- [17] Metchnikoff, E., *Arch. of Path. Anat.* 1888, **113**, 63.
- [18] Laveran, A. and Mesnil, F., *Trypanosomes et trypanosomiases*. Masson et Cie. Editeurs Paris, 549, 1912.
- [19] Klyuyeva, N. G. and Roskin, G. I., *Vrachenbnoe Delo*, 1946, **26**, 107. Translation in *Amer. Rev. Soviet Med.* 1946, **4**, 127-129. Translation in Chinese. 克魯萊娃, 羅斯金: 濟席物質, 見聯蘇醫學。
- [20] Klyuyeva, N. G. and Bobritskaya, A., *Byulleten experimentalnoy biologii imeditsiny* 1946, **8**, Translation in Chinese. 克魯萊娃, 布貝里斯卡妮, 實驗上 Cruz 氏裂體錐形蟲對惡性腫瘤之作用 (見聯蘇醫學)。
- [21] Roskin, G. I., *Byulleten experimentalnoy biologii i meditsiny* 1946, 11. Translation in Chinese. 羅斯金: 經過 Cruz 氏裂體錐形蟲內毒素作用後惡性腫瘤之細胞學及組織變化。(見聯蘇醫學)。
- [22] Malisoff, W. M., 1947, *Science Dec.* 1947, 591-594.
- [23] Cowdry, E. V., *A Textbook of Histology*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1938.
- [24] Craig, C. F., *Laboratory Diagnosis of Protozoan Diseases*. 2nd Ed., Lea and Febiger Philadelphia, 1948.

THE STUDY ON TRYPANOSOMA CRUZI IN TISSUE CULTURE

TANG C. C.

Foochow University

Kofoid, Wood and Mc Neil (1935) studied the cultures of *T. cruzi* in explanted tissue of a period as long as seven days. It was shown by Kolodny (1939) that *T. cruzi* could remain viable for twelve days in the tissue of heart and spleen kept in a sealed tube of buffered Ringer's or Lock's solution. Hawking (1946) cultured *T. cruzi* in rat embryonic tissue media for a period up to 59 days. In the present study the simultaneous cultivation of tissue elements and trypanosomes were obtained from a period as long as 49 days.

Wenyon (1926, p. 492) brought up the question as to whether the infection of fresh cells with *T. cruzi* in the body of a mammalian host is brought about by the blood trypanosomes or whether new cells are infected by Leishmanian forms escaping from the ruptured cell. This question can be answered through a study of the behavior of *T. cruzi* inside an infected cell. Evidences indicated that Leishmanian round forms can change directly

to trypanosome forms, when a cell is completely filled with parasites and fully vacuolated. The emerged trypanosomes penetrated through the cell membrane and dispersed in the liquefied medium. All such revealed the transformation process which normally must have taken place in the body of a mammalian host.

Experiments performed in infecting the normal tissue cultures through contact indicated that the emerged trypanosomes will readily penetrate into new cells when chance contact permits. There is probably no need for the parasites to remain in the blood for any length of time.

Normal heart tissue of chicken embryo grown in vitro was successfully infected with *T. cruzi*. The cells of this abnormal host apparently did not provide an appropriate medium for the parasites, as shown by the rapid emergence of the trypanosomes, and the consequent limitation of reproduction. Phenomenon of agglutination and trypanocidal action of the liquefied plasma medium is interesting especially in view of the fact that culturing *T. cruzi* in mouse tissue grown in chicken plasma did not produce such a phenomenon, while chicken plasma plus chicken tissue provided highly unfavorable environment for the parasite.

Formation of vacuoles in animal cells was studied by different investigators. The one in relation to phagocytosis or intracellular digestion has been well known since the work of Metchnikoff (1888) and Le Dantec (1890). Vacuoles formation in leucocytes containing different species of trypanosomes was noted by Laveran and Mesnil (1912). In their comprehensive treatise on trypanosomes and trypanosomiasis figures were given through stained preparations compiled from different authors. Digestive vacuoles were also found to develop through the invasion of other parasitic organisms such as bacteria. It was usually considered that the formation of vacuoles is often resulted from the destruction of parasites, while with *T. cruzi*, this protozoan evidently can overcome the cellular defence mechanism of the host and adapt itself to intracellular parasitism. Furthermore, it evidently can secrete a kind of substance which has lytic effect on the protoplasm of the host cell. As stated in the foregoing paragraph, the formation of vacuoles with their shapes corresponding with the outlines of the enclosed parasites clearly indicated the existence of such a substance. Soviet scientists reported the finding of an endotoxin obtained from the lysed cells of *T. cruzi*, which can produce lysis on certain malignant mouse tumors. The substance was designated as KR and was used clinically for the treatment of human cancer. (Klyuyeva and Roskin 1946, Klyuyeva and Bobritskya 1946, Roskin 1946). For this active ingredient of KR, the term trypanosin was suggested by Malisoff (1947).

Several authors have definitely established the fusion of cells as the usual mode of the formation of the Langhans giant cells. The process in detail was followed by Lewis (1927). According to her observation it can be divided into two stages, first the coalescence of the clear homogeneous ectoplasm and then the central granular areas of respective cells, which, united together form a large center, the cytocentrum. This central granular area together with the peripheral arrangement of the nuclei were the main characteristics of the giant cells of the Langhans type. In the present experiment, the fusion of the cells of the heart tissue did not go beyond the first stage. The giant cells formed through the stimulation of different parasitic organisms probably differ in the degree of completeness in their fusion. Thus the giant cells developed in response

to the leprosy bacilli are smaller and less highly organized than those in tuberculosis (Cowdry 1938). Those produced in cultures infected with *T. cruzi* are still less typical. In all probability, the formation of binucleate and multinucleate giant cells was due to the presence of toxin secreted by *T. cruzi*. It was not due to the general degeneration of the cultured tissue, since multinucleate and giant cells also occurred in the tissue of animals with Chagas disease (Vianna 1911, Dias 1934).