

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

臺灣海生寄生性蠕蟲相之查明與資料庫之建立(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2621-B-002-009-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生命科學系

計畫主持人：施秀惠

計畫參與人員：黃淑敏 查詩婷 周宜瑩 林俊嘉

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 25 日

摘要

本研究擬查明台灣海生寄生性蠕蟲相並建立可供檢索之資料庫以利信息之交流與分享。計畫擬分兩年進行，第一年的工作要項為蒐集檢索關於台灣海生寄生性蠕蟲之所有登載記錄和文獻，除國內學者之研究外，美籍、日籍和大陸學者之成果亦為檢索重點；此外將採集以海魚為主，海生浮游動物、環節動物、軟體動物和鯨豚類哺乳動物為輔等寄主動物體內的蠕蟲，範圍包括圓形動物門、扁形動物門之複殖吸蟲綱和條蟲綱，經由傳統形態學方法及分子生物學中核酸限制圖譜多型性分析法鑒定其分類地位，繼而以系統學分析其支序圖和分布關係。最後已將研究結果登錄編纂建構成資料庫並運作順利。

關鍵詞：寄生性蠕蟲相、圓形動物門、複殖吸蟲、資料庫。

Abstract

The aims of this study are to inventory the marine helminth parasite fauna in Taiwan and establish a Data Base provided with a searching machine to interchange and share information. This project will be carried out for two years. The main objectives of the first year are searching and collecting all records and papers concerning Taiwan marine parasitic helminths published by not only the Taiwanese scientists, but also American, Japanese, and Mainland's. Helminths including the Phylum Nematoda, Digenea and Cestoda of the Phylum Platyhelminthes will be collected from marine fish, zooplanktons, annelids, mollusks, and mammals, such as dolphins and whales. Helminth classification is processed using either traditional morphological procedures or molecular analysis or restriction fragment length polymorphism (RFLP). Helminth cladogram and distribution will be drawn. Finally, a Data Base have been constructed and carried out well.

Keywords: Parasitic helminth fauna, Nematoda, digenean, database.

一、研究目的

本研究之目的在於系統性查明與登錄台灣周圍海域中海生動物體內之蠕蟲類寄生蟲相，製作標本且負責典藏，此外並將獲得之寄生性蠕蟲多樣性成果建構為置於全球資訊網上之資料庫，提供檢索系統以利於信息之交流。研究肇始於原有文獻記錄之搜集與檢索，範圍除本地學者之研究外，更包括美籍、日籍與大陸學者之研究成果，務求搜集與檢索工作完備周全；繼而進行蠕蟲標本之採集、製作、鑒定、登錄與典藏，對象包括本研究室近年來自行採集、其他研究領域學者交流贈送，以及執行本研究中所採集之標本；最後建立可供檢索與交流信息之資料庫，與生物多樣性研究學群分享研究成果，催化兼具多學科和綜合性研究構想之萌發，以及對生態系功能、物種和棲地之保育與復育等進階性研究之形成。此資料庫並可作為台灣未來「生物多樣性資料庫」中蠕蟲部分之基礎和前身。

二、研究方法

(1) 搜集檢索文獻記錄

由於台灣目前完全缺乏任何寄生性蠕蟲類資料庫，因而本研究必須由零出發，從頭做起。首先搜集檢索國內外所有相關之文獻記錄，對象諸如：Helminthological Abstracts 和

Biological Abstracts 等。此外早年若干外籍學者對台灣寄生性蠕蟲之研究成果，如美(美國海軍第二醫學研究所)、日(日據時代)學者調查台灣海魚之寄生蟲相，以及近年來大陸學者調查台灣海峽魚類寄生蟲結果等皆將登錄納入新建之資料庫中。

在確認物種分類時，將特別關注近二十年來蠕蟲分類上的若干重要改變，例如圓形動物門之異尖線蟲科中物種，已根據其排泄孔開口位置而將原屬於對盲囊線蟲屬(*Contracaecum*)中開口於神經環附近而非唇基部者改隸於新設之宮脂線蟲屬(*Hysterothylacium*)內，對於發表時描述明確清晰者將確認或調整其分類地位。至於其它發表之物種紀錄則遵循前人採用之處理方式：直接接受其命名和相關數據之正確性，先行規畫設計資料庫，而暫緩且減輕在分類工作之負擔(Thompson, 1997)。

(2) 鑒定查明與登錄新標本

[1] 標本來源

本研究室近年來執行多項箱網養殖魚類內寄生蟲調查和圓蟲多樣性查明性計畫，同時亦與大陸南開大學合作執行海魚複殖吸蟲系統學研究三年期計畫，搜集累積許多寄生性蠕蟲標本，此外多年來亦由其他領域學者處獲贈諸如浮游動物、軟體動物、環節動物和海魚等可能擔任蠕蟲各階段寄主之動物標本，皆可望於執行本計畫時逐一分離、檢視、鑒定、查明並登錄之。

除原有標本外，更將繼續採集台灣周圍海域中以魚類為主之各種海生動物，分離搜集其體內各類寄生性蠕蟲標本，同步完成上述分類和登錄工作。為擴大採樣之空間尺度，擬依循以往之模式，在多年來建立之合作基礎上，和包括水產試驗所、澎湖技術學院水產養殖系、海洋大學水產養殖系、高雄大學生命科學系和中央研究院動物學研究所等機構中眾多研究漁業、養殖、魚病和生態學者們繼續合作，分享其採獲之海生動物中蘊藏寄生蠕蟲之消化道和相關臟器標本。而鯨豚內蠕蟲標本則已獲鯨豚救援協會王建平教授和祁偉廉醫師同意合作，將由擱淺死亡者體內採集之。

[2] 標本之製備與保存

浮游動物直接添加酒精保存，觀察前先經離心或靜置方式濃縮標本後，在配備有數位相機之解剖顯微鏡(Nikon SMZ-U)下檢視並照相記錄之。

魚類標本則分別以生理鹽水淘洗消化道和鰓，或以人工胃液(0.7% Pepsin)徹底分解肌肉，清洗靜置反應液後，以解剖顯微鏡鏡檢。獲得之圓蟲標本經生理鹽水洗淨後再以 70% 酒精進行固定與保存，由海獸體內採獲者亦經相同方式處理。而吸蟲和條蟲標本則以 5% 福馬林液壓片展平固定，經洋紅過染隔夜，再以酸酒精退染至蟲體內臟清晰可辨時，逐步脫水，封片製成永久性 Whole mount 玻片標本保存之。

[3] 圓蟲標本之分類鑒定與系統學分析

鑒定方法主要以傳統之形態特徵為依據。將保存之標本浸於純甘油中，俟其透明化後仍以甘油包埋製成臨時性片子，置於光學顯微鏡下觀察。以顯微鏡上配置之數位相機初步記錄其形態特徵並測量重要構造之長寬度，而以描圖管(Drawing tube)輔助進行繪圖。

分類方式以 CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates 第一卷中定義之構造特徵為依據，並根據其索引表依序分類至亞綱、目及亞科。而其第二卷中則針對蛔蟲上科進行分類索引，其中包括本研究擬為重點之安尼線蟲科，此系列檢索表可分類至屬。新近才清楚界定其特徵差異之 *Contracaecum* 和 *Hysterothylacium* 二屬則根據排泄孔開口位置分類之。此外對較細微不易觀察區別之構造，如間唇與齒脊或為更確認排泄孔時，一方面可

切下蟲體前端，以伊紅或胭脂紅染色後觀察；另一方面亦可將標本以甲醛固定，再以鐵酸進行後固定，經系列脫水、臨界點乾燥、鍍膜後，利用掃描式電子顯微鏡觀察辨別之。

此外亦將參考 Yamaguti (1961) 所著之蠕蟲分類學經典 - *Systema Helminthum* 第三卷：The Nematodes of Vertebrates, Part I, II，釐清魚類和哺乳類之寄生性圓蟲分類學問題。

除上述傳統形態特徵之鑑定分類外，針對重要圓蟲物種(即安尼線蟲科)由於其幼蟲難以區分，因而已發展出分子分類法。Zhu 等(1998)分析下列三種線蟲：*Anisakis simplex*, *Hysterothylacium aduncum*, *Contracaecum osculatum* 的 nuclear ribosomal DNA 之差異後，設計出兩種以聚合酶連鎖反應(PCR)為基礎分子分類方式- Restriction fragment length polymorphism (RFLP)和 Single-strand conformation polymorphism (SSCP)，可明確區別三種圓蟲。由於 PCR-SSCP 圖譜分析需使用 [³²P]ATP 進行放射性標誌，因而不擬進行。而採用 PCR-RFLP 圖譜之比對，其方法概述如下：萃取圓蟲 genomic DNA，以 NC5 和 NC2 兩個引子進行 PCR 後，純化其 PCR 產物，再以核酸限制酶 Rsa I 或 HaeIII 作用 4 小時。經 2.5% agarose 電泳分析其 restriction fragments 組成，以 ethidium bromide 染色後照相記錄其 PCR-RFLP 圖譜。

[4] 扁蟲標本之分類鑑定與系統學分析

鑑定方法主要以傳統之形態特徵為依據。將 Whole mount 標本置於光學顯微鏡下觀察，以顯微鏡上配置之數位相機初步記錄其形態特徵並測量重要構造之長寬度，並以描圖管(Drawing tube)輔助進行繪圖，必要時將利用掃描式電子顯微鏡解析其超微之三維結構以利分類。由於吸蟲類之構造遠較圓蟲複雜，至今已有可信和完善之檢索表供依據使用，學界並未發表任何分子分類法。

分類參考文獻包括：Yamaguti (1961) 所著之「*Systema Helminthum*」第一卷：The Digenetic Trematodes of Vertebrates, Part I, II；大陸「科學出版社」出版之「中國動物誌-扁形動物門吸蟲綱複殖目(一)」(陳心陶等編著，1985 年)、「魚類寄生蟲與寄生蟲病」(張劍英等編著，1999 年)、「黃渤海魚類吸蟲研究」(申紀偉、邱兆社著，1995 年)、「海南島海魚寄生複殖吸蟲」(申紀偉著，1990 年)等。此外亦可對照邱兆社教授贈送之複殖吸蟲模式標本，藉以鑒別與釐清魚類和哺乳類之寄生性複殖吸蟲分類學問題。

條蟲之分類則有賴前述「魚類寄生蟲與寄生蟲病」書中關於條蟲之分類檢索表進行之。

(3) 架設資料庫(Data base)與試驗運行

建立於 Microsoft Access 2002 系統，暫存於本系伺服器上，由本研究室負責維護管理，開放提供所有網路上之使用者(user)檢索。日後當國家級生物多樣性資料庫成功時則轉置其中，作為蠕蟲類的基礎資料。

三、結果與討論

已採集鑑別而查明寄生於 29 科 37 種魚類體內之複殖吸蟲相，總計報告 8 科 12 屬 15 種複殖吸蟲(Table 1)，其中並由石狗公採獲一新種- *Lecithochirium tetraorchis* (四睪指腺吸蟲) (Figure 1)。而由重要經濟性魚種白帶魚採獲與查明 4 種海獸胃線蟲科圓蟲(*Anisakis simplex*, *Hysterothylacium aduncum*, *Porrocaecum decipiens*, *Raphidascaris trichiuri*)、1 種複殖吸蟲和 1 種條蟲幼蟲 (Table 2)，並利用 PCR-RFLP 方法，定序 PCR 產物，比較序列之差異，經由巨分子資料庫之分析繪製個別之 restriction map 而建立足以區別此 4 種圓蟲之

分子鑑定法(Figure 2)。此外已完成鯖魚內寄生蟲相之查明工作，可利用其內寄生蟲相中優勢線蟲 *A. simplex* 擔任研究其系群區分之生物性標籤。研究進展至今已可確認臺灣周圍海域確實屬於海獸胃線蟲科圓蟲盛行區域，其中尤以全球多有病例報告之 *A. simplex* 和 *P. decipiens* 為嚴重，前者更被確認為嚴重之食物過敏(Daschner et al., 2000)，臺灣至今雖未有病例報告，但以被感染魚種之豐富，感染盛行率和魚體內線蟲密度之高，無一不顯示出此類人畜共通寄生蟲對臺灣海洋撈捕與箱網養殖漁業以及人類健康之潛在威脅。相關之漁政、衛生與食品安全部門必須及早規劃政策以為因應。

參考文獻

- Daschner A, et al. (2000) Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105, 178-181.
- Overstreet RM (1997) Parasitological data as monitors of environmental health. *Parassitologia* 39, 169-175.
- Overstreet RM, Hawkins WE and Deardorff TL (1996) The western mosquitofish as an environmental sentinel: parasites and histological lesion. In: *Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents* (MR Servos, KR Munkittrick, JH Carey, and GV Van Der Kraak, eds), St. Lucie Press, Deiray Beach, FL. pp. 495-509.
- Thompson FC (1997) Names: the keys to biodiversity. In: *Biodiversity II: Understanding and Protecting our Biological Resources* (ML Readka-Kudlia, DE Wilson and EO Wilson, eds), Joseph Henry Press, National Academy of Sciences, Washington, DC. pp. 199-211.
- Williams HH, MacKenzie K and McCarthy AM (1992) Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet, and phylogenetics of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2, 144-176.
- Zhu XQ, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB (1998) Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 28, 1911-1921.

四、計畫成果自評

研究內容與原計畫完全符合，已完成預期工作項目如下：

- (1) 查明本研究室多年來收集累積之寄生蠕蟲標本和執行計畫期間新採標本。
- (2) 登錄完成前述蠕蟲標本，登錄方式有二：已於 93 年 1 月 9 日提供簡要資料登載於中央研究院動物學研究所主導之「生物多樣性」資料庫，且另自行編纂詳盡資料建構包括圓形動物門和扁形動物門之寄生性蠕蟲資料庫，暫置於本系伺服器內，網址為：
<http://www.lifescience.ntu.edu.tw/nemato/content.htm>，以利信息交流與各方檢索使用。
- (3) 已將查明之寄生性蠕蟲相撰寫 2 篇論文發表於 SCI 期刊：
[1] Shih HH (2004) Parasitic helminth fauna of the cutlass fish, *Trichiurus lepturus* L., and the differentiation of four anisakid nematode third-stage larvae by nuclear ribosomal DNA sequences. *Parasitology Research* 93, 188-195.
[2] Shih HH, Liu W and Qiu ZZ (2004) Digenean fauna of marine fishes around Taiwanese waters with description of a new species- *Lecithochirium tetraorchis* sp.nov. *Zoological*

Studies 43, 671-676。

(4) 參與研究之助理和研究生獲得寄生性蠕蟲之系統分類學訓練並建立和維護資料庫之能力。除上述 2 篇論文外，另發表 2 篇碩士論文：

[1] 臺灣大學動物學研究所查詩婷「安尼線蟲科圓蟲與白帶魚之寄生關係」；

[2] 臺灣大學動物學研究所周宜瑩「海獸胃線蟲與花腹鯖之寄生關係及系群區分之應用」。

Table 1. Digeneans collected and identified from marine fishes around Taiwanese waters

Digeneans	Hosts
Family Accacoeliidae	
<i>Odhnerium</i> sp.	<i>Mola mola</i>
Family Bivesiculidae	
<i>Bivescula lutiani</i> (Gu et Shen, 1979)	<i>Apogon cookii</i>
Family Bucephalidae	
<i>Bucephalopsis ablennus</i> (Gu et Shen, 1976)	<i>Ablennes hians</i>
<i>Prosorhynchus facilis</i> (Ozaki, 1924)	<i>Seriola dumerili</i>
Family Gyliuacheniidae	
<i>Gyliuachen oligoglandulosus</i> (Gu et Shen, 1979)	<i>Siganus fuscescens</i>
Family Hemiuridae	
<i>Dinurus longissimus</i> (Looss, 1907)	<i>Coryphaena hippurus</i>
<i>Lecithochirium fusiformis</i> (Luhe, 1901)	<i>Branchiostegus auratus</i>
<i>L. fusiformis</i> (Luhe, 1901)	<i>Euthynnus affinis</i>
<i>L. fusiformis</i> (Luhe, 1901)	<i>Siganus spinus</i>
<i>L. magnaporcum</i> (Manter, 1940)	<i>Suggrundus longirostris</i> ^b
<i>L. priacanthi</i> (Yamaguti, 1953)	<i>Megalops cyprinoides</i>
<i>L. tetraorchis</i> sp. nov. (Shih et Qiu, 2003) ^a	<i>Sebastiscus marmoratus</i>
<i>L. trichiuri</i> (Gu et Shen, 1981)	<i>Scomberoides commersonianus</i>
<i>L. trichiuri</i> (Gu et Shen, 1981)	<i>Trichiurus lepturus</i>
<i>Parahemiurus collichthydis</i> (Li, 1986)	<i>Branchiostegus auratus</i>
Family Lobatovitelliovariidae	
<i>Lobatovitelliovarium fusifome</i> (Yamaguti, 1965)	<i>Leiognathus lineolatus</i>
Family Opeceolidae	
<i>Opecoelus ditrematis</i> (Yamaguti, 1942)	<i>Siganus fuscescens</i>
<i>O. lateolabracis</i> (Yamaguti, 1958)	<i>Chirocentrus dorab</i>
Family Syncoeliidae	
<i>Syncoelium cypseluri</i> (Yamaguti, 1970)	<i>Thunnus albacares</i>

^a New species.

^b New host record.

Table 2. Parasitic helminths of the cutlass fish, *Trichiurus lepturus* L., from Taiwanese water with indication of stage and location in the host

Parasites	Stage	Location in host
Nematoda		
<i>Anisakis simplex</i>	Larvae III	Stomach, free in abdominal cavity or encysted on mesenteries or liver
<i>Hysterothylacium aduncum</i>	Larvae III	Stomach
	Larvae IV	Stomach
	Adult	Stomach and intestine
	Larvae III	Stomach, free in abdominal cavity

<i>Porrocaecum decipiens</i>	Larvae III	Stomach
<i>Raphidascares trichiuri</i>	Larvae IV	Stomach
	Adult	Stomach and intestine
Digenea	Adult	Intestine
<i>Lecithochirium trichiuri</i>		
Cestoda	Plerocercoid	Intestine
<i>Proteocephalus</i> spp.		

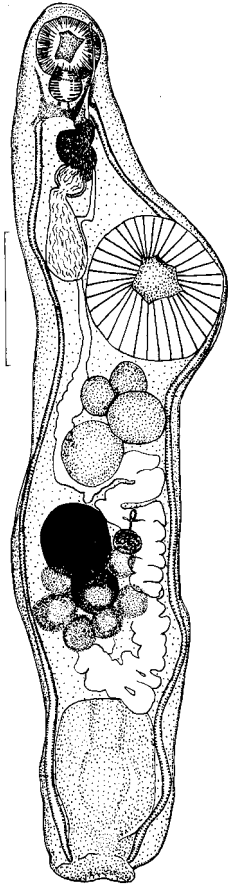


Figure 1. Whole-mounted holotype of *Lecithochirium tetraorchis* sp.nov. Scale bar=0.3 mm.

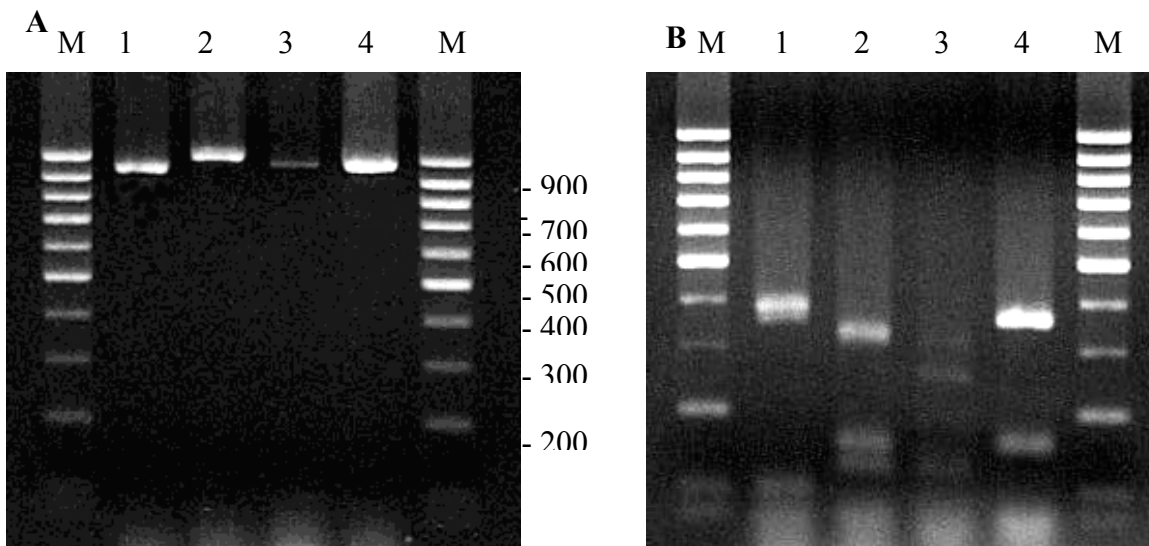


Figure 2 Molecular delineation of the third stage larvae of *Anisakis simplex* (lane 1), *Hysterothylacium aduncum* (lane 2), *Porrocaecum decipiens* (lane 3), and *Raphidascaris trichiuri* (lane 4) by PCR-linked restriction fragment length polymorphism of NC5-NC2 PCR products (representing the first internal transcribed spacer, 5.8S gene and second internal transcribed spacer) using a restriction enzyme *TaqI*. (A) Products of PCR amplification of the rDNA fragment. (B) Restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA fragments digested with *TaqI*. M: DNA molecular marker (100-bp ladder)