

私立中山醫學院生物化學研究所

碩士論文

指導老師：林克亮 博士

第一部份：台灣蛺蝶型態之研究

**Part I : The Morphological Study Of The Biting Midge,
Forcipomyia (Lasiohelea) Taiwana (Shiraki)**

第二部份：台灣蛺蝶叮咬後之血清病學研究

**Part II : Serological Epidemiology Of The Biting Midge,
Forcipomyia (Lasiohelea) Taiwana (Shiraki)**

研究生：黃杏英

中華民國八十九年七月

誌 謝

本論文得以完成，首先要感謝恩師林克亮博士對學生在學業上的提攜與指導，使學生無論在治學方法、學習態度及人生的處事哲學上受益匪淺。師恩之浩蕩，永誌銘心。

另外，在論文進行期間，感謝系上李瑤玲、王麗娜老師對於論文的悉心指教及實驗方面的多方面指導，同時感謝、邱慧玲、張懿欣老師給予的指導。在實驗進行期間，感謝澤民、威廷、智凱等學弟妹在各方面提供的各種協助。

最後，要感謝我的我的父母親，以及我的家人，尤其是我的先生對我這幾年來的無怨無悔的支持，謝謝你們一路陪伴我走過這漫長的路。

黃杏英 謹誌於

中山醫學院生物化學研究所

中華民國八十九年七月

目 錄

目 錄.....	I
表目錄.....	III
圖目錄.....	IV
第一部份 台灣蜚蠊形態之研究	1
中文摘要.....	2
Abstract	2
第一章 文獻回顧.....	4
第一節 台灣蜚蠊發現的歷史.....	4
第二節 台灣蜚蠊的分類學地位.....	4
第三節 台灣蜚蠊的生態研究.....	5
第四節 台灣蜚蠊的型態研究.....	6
第五節 台灣蜚蠊的危害及防治工作.....	7
第二章 材料之來源與標本製作.....	9
第一節 材料來源 - 人體誘集法(human bait method)及培育法.....	9
第二節 標本製作	9
第三節 微細形態之掃描電子顯微鏡之觀察.....	10
第三章 實驗結果.....	11
第一節 一般形態之描述.....	11
第二節 微細構造之觀察結果.....	23
第四章 結 論.....	31
第二部份 台灣蜚蠊叮咬後之血清流行病學研究	34
中文摘要.....	35
Abstract	36
第一章 前 言.....	37
第二章 文獻探討.....	39

第一節 昆蟲過敏原的發現及發展	39
第二節 蚊蟲叮咬後引起的過敏性反應種類及症狀	40
第三節 過敏反應的機轉	43
第四節 蚊蟲過敏原之間的交叉反應研究	47
第三章 實驗材料及方法	48
第一節 製備蚊蟲抗原萃取液	48
第二節 蚊蟲過敏原蛋白分析	49
第四章 實驗結果	52
第一節 台灣蜾蠃雌蟲叮咬人血及引起的皮膚反應	52
第二節 台灣蜾蠃蟲體抗原及唾液腺抗原萃取液的電泳結果	52
第三節 台灣蜾蠃蟲體的特異性 IgE	52
第四節 分析具有一般皮膚反應病人血清中的台灣蜾蠃蟲體特異性 IgE 抗體	55
第五章 討 論	57
第一節 蟲體唾液腺抗原與蟲體抗原的蛋白質分布情形	57
第二節 分析不同時期(stage)的叮咬後皮膚反應與 mosquito- . specific IgE 濃度的相關性	57
第三節 分析叮咬頻率與特異性 IgE 抗體的血清流行病學變化	58
第六章 結 論	60
參考文獻	61

表目錄

表 1. 統計檢定結果	56
-------------------	----

圖目錄

圖 1. 台灣蛺蝶蟲卵之外觀	12
圖 2. 台灣蛺蝶蟲卵之圓形卵孔	12
圖 3. 台灣蛺蝶蟲卵之卵殼末端	13
圖 4. 台灣蛺蝶蟲卵孵化後之卵殼	13
圖 5. 台灣蛺蝶老熟幼蟲之體節	15
圖 6. 台灣蛺蝶幼蟲之體節剛(刺)毛	15
圖 7. 台灣蛺蝶幼蟲蟲體之小刺突	16
圖 8. 台灣蛺蝶幼蟲前胸之偽足	16
圖 9. 台灣蛺蝶幼蟲腹部之角狀突起	17
圖 10. 台灣蛺蝶幼蟲之腹部偽足	17
圖 11. 台灣蛺蝶蛹時期之頭、胸及胸背部	18
圖 12. 台灣蛺蝶成蟲之整體外觀	19
圖 13. 台灣蛺蝶成蟲之複眼	20
圖 14. 台灣蛺蝶成蟲之觸角	20
圖 15. 台灣蛺蝶成蟲之口器	21
圖 16. 台灣蛺蝶成蟲之翅膀及平均棍	21
圖 17. 台灣蛺蝶成蟲之腹部	22
圖 18. 台灣蛺蝶成蟲之腹部儲精囊	22
圖 19. 台灣蛺蝶成蟲之爪	23
圖 20. 台灣蛺蝶幼蟲之頭部	26
圖 21. 台灣蛺蝶幼蟲之腹部及胸部	26
圖 22. 台灣蛺蝶蛹期之頭部	27
圖 23. 台灣蛺蝶蛹期之胸部	27
圖 24. 台灣蛺蝶雌蛹之尾部	28

圖 25. 台灣蜾蠃雄蛹之尾部	28
圖 26. 台灣蜾蠃成蟲之複眼	29
圖 27. 台灣蜾蠃成蟲之口器	29
圖 28. 台灣蜾蠃雌蟲之觸角	30
圖 29. 台灣蜾蠃雌蟲叮咬手臂之情形	53
圖 30. 台灣蜾蠃叮咬後產生的一般型皮膚反應	53
圖 31. 以台灣蜾蠃蟲體為抗原的 SDS-PAGE 及西方墨點法分析	54
圖 32. 分析具有一般皮膚反應的台灣蜾蠃蟲體特異性 IgE	56

第一部份 台灣蛺蝶形態之研究

**Part I : The morphological study of the biting midge,
Forcipomyia (Lasiohelea) taiwana (Shiraki)**

中文摘要

台灣蛭蠓於 1913 年被發現並命名為 *Forcipomyia (Lesiohelea) taiwana* (Shiraki) , 民間另有若干俗稱如“小黑蚊”。過去其分佈較為單純, 而近幾年以極快的速度蔓延到各處, 幾乎遍佈台灣全省。同時, 近幾年來亦時有此蚊蟲騷擾當地居民。

目前環保署等相關單位主要針對台灣蛭蠓進行幼蟲孳生源的調查及生態和防治的研究, 結果發現化學防治法對於台灣蛭蠓幼蟲的效果, 並不如成蟲之理想, 而本亞屬之成蟲在分類上很難區別, 因此必須輔以其他各期的型態, 方能做正確的分類。此外, 這些微細的構造, 對此類昆蟲的鑑定也非常重要。本研究是以採自台中大坑之台灣蛭蠓成蟲, 經實驗室飼育後, 對於卵、幼蟲、蛹及雌雄成蟲做一重新描述, 並以掃描式電子顯微鏡觀察此蟲之各期型態, 觀察其微細之構造且加以敘述, 希作為分類鑑定之參考, 更希望能提供防治工作一個新的指標。

Abstract

Forcipomyia (Lesiohelea) taiwana (Shiraki) was discovered and designated in 1913. This species is also called by many other names. The distribution of Shiraki was restricted, however, in recent years it was spread out rapidly and covered almost the whole Taiwan. In this local area (Taichung), this mosquito has been found and become an annoyance to local people. The Environment Protection Authority (EPA) and related departments have conducted the studies about larva breeding, ecology, and control of *Forcipomyia (Lesiohelea) taiwana* (Shiraki). The result showed that the efficacy of chemical control to larva is not as good as that to the mature mosquito. Since the classification of *Forcipomyia spp* based on the morphology of mature mosquito is difficult, the study on the morphology of other stages would be of great help in the classification. Therefore, the analysis for morphological characters in all stages are also important to the classification of a bloodsucking midge, *Forcipomyia (Lesiohelea) taiwana* (Shiraki). The materials in this study are collected from Ta-Ken area in Taichung by human baiting method. The ultra-structure of the midge was studied by means of scanning electron microscopy and analyzed for all stages. The data from this study will be helpful in the classification and chemical control for *Forcipomia taiwana*.

第一章 文獻回顧

第一節 台灣蛺蝶發現的歷史

台灣蛺蝶的確實記錄,最早是由日本昆蟲學家 Shiraki 於 1913 年在台灣北、中部所發現的,並將台灣蛺蝶命名為 *Forcipomyia(Lesiohelea) taiwana* (Shiraki)。除此之外還有許多的民間通稱,例如俗稱小黑蚊,亦有人稱之為“黑微仔”、“網微仔”或“小金剛”等。1937 年由 Tokunaga 再對此蟲加以描述。

第二節 台灣蛺蝶的分類學地位

台灣蛺蝶在分類學上是屬於動物界,節肢動物門中的六足綱(又稱昆蟲綱)、雙翅目(Diptera)、蛺蝶科(Ceratopogonidae)、蛺蝶屬(*Forcipomyia*)、蛺蝶亞屬(*Lesiohelea*)。昆蟲綱有許多特點:舉凡身體各部的附肢如腳、觸角等均分節以及在成蟲時期具有六隻腳等。絕大多數的昆蟲具有變態的性質,而變態又分為完全變態和不完全變態兩種;完全變態的昆蟲必須經過卵、幼蟲、蛹、成蟲四個階段,而不完全變態者則不具有蛹這個階段,因此不完全變態者幼蟲和成蟲的差異僅於翅膀之有無、性器官之發育完全與否以及個體之大小,其他的外表均無差異;但在完全變態類的昆蟲在幼蟲及成蟲的差異性卻很大,不但是外型

截然不同，而且生活習性常常相差很遠。昆蟲綱的雙翅目被認為現今種類最多、族群最大的一種。蠅、蚊、虻等之多數昆蟲皆屬於本目，大抵為中型乃至微小之種類。其頭部由狹長之頸狀部與胸部相連，故能自由運動。複眼發達，往往佔頭部表面之大部分，另外還有三個單眼。觸角位於複眼之間，其形態多變化，在分類上頗為重要。口器適於吸收；其構造因不同科而大異。如蚊之口器各部皆延長成針狀，適於穿刺及吸收，而家蠅之口器則無大小顎，其他各部僅適於舔食。另外蚊科的翅膀僅前翅發達，脈相與基本型相似，而後翅則退化成一種只具平衡的功能，而缺少飛翔能力的棍狀之器官，故稱為平均棍(Haltere of Balancer)。胸部以中胸為最發達。腳形態不一，跗節一般為五節。

第三節 台灣蚊蠅的生態研究

台灣蚊蠅為雙翅類屬變態完全，其習性甚為複雜。台灣蚊蠅的幼蟲為路棲生活，雄性成蟲蛀食於植物之莖幹中，雌性成蟲則嗜吸人血，以血液中營養可使得體內之卵發育。

蠅科至少有 60 屬，包括庫蠅屬 (Culicoides)、蚊蠅屬 (Forcipomyia)、勒蠅屬 (Leptoconps) 及裸蠅屬 (Austraconps) 等等。台灣蚊蠅主要分佈區在中國大陸及台灣，如大陸地區的四川省(張本華, 1951 年)、福建省(陳和蔡, 1962 年)、廣東省、廣西省、湖南省、湖北省、山東省(李鐵生, 1975 年；1978 年)。目前在台灣已知蚊蠅亞屬之種類

共有 24 種之多，但其中僅台灣蜨蠊及三地蜨蠊(*Forcipomyia anabaenae*) 確定會叮吸人血(Lien, 1989 ; 1991)，而以台灣蜨蠊危害最為嚴重。過去發現台灣蜨蠊分布的範圍較為單純，以中部的南投縣及台中縣，南部的台南縣及嘉義市(莊益源, 1994 年)與東部的花蓮縣(Chen., et al., 1979 年)較為嚴重，而近幾年來以極其快的速度蔓延到各處，幾乎遍佈台灣全省。目前除基隆、苗栗、屏東及台東等縣市沒有發現台灣蜨蠊的危害記錄外，各縣市在靠近山邊的地方皆有所聞。而其危害的範圍也有從鄉村逐漸蔓延到都市邊緣的趨勢。例如台中市大坑、太平市、花蓮市、彰化市、嘉義市以及附近的風景區皆難以倖免。過去分布的高度也由過去在鹿谷鄉廣興村約 350 公尺海拔的高度 (莊益源, 1994 年)到 1996 年信義鄉自強村約 470 公尺高的高度 (張伯熙, 1997 年)。

第四節 台灣蜨蠊的型態研究

1913 年素木氏首先在台灣記錄此小蟲，並對其形態做簡單之描述。1937 年間再由 Togunaga 對此蟲加以重新描述 (陳錦生, 1980 年)。大陸方面，1951 年張本華等人在四川採集所得雌蟲，做了形態方面之描述。1967 年 Sun.及 1971 年 Sun 等人經由實驗室之飼育描述卵、幼蟲、蛹期之各期形態，並仔細描述成蟲之各部形態。1980 年由裘和榮報導防治台灣蜨蠊時，對於幼蟲孳生地防治效果的評估認為必須依賴幼期(卵、幼蟲、蛹)型態方面的鑑定，以區別蜨蠊屬內其他亞屬和非吸血蠊類之卵、幼蟲、蛹期之形態，並指出台灣蜨蠊幼蟲最重要形態之變異在

第一齡幼蟲脫皮前後，而二到四齡幼蟲形態改變不大。1980 年由陳錦生等人提出蟻蠓亞屬(*Lasiohelea*)不同種類間之成蟲差異極微，須輔以各蟲期之形態作為分類之依據，故於實驗室內飼育台灣蚊蠓，以各蟲期之形態特徵，作更完整詳細之描述，並配合掃描式電子顯微鏡觀察各部份詳細構造。

第五節 台灣蚊蠓的危害及防治工作

台灣蚊蠓為日間、室外吸血危害之小型的吸血性蚊子。在台灣，它是屬於一種區域性，但大量分佈於本省東部，中部及南部各縣市，尤其於每年 5-8 月更是其猖獗時期，穿過居家的紗窗、紗門進入室內叮吸人血。雌性成蟲嗜吸人血，體長約 1.44mm (Sun, 1967)，經常群體攻擊裸露的部份，尤其是小腿部。常會造成常見的皮膚反應，而這種皮膚反應既痛且有奇癢，同時有紅色丘疹出現久而不退(俗稱紅豆冰)，其症狀依個人體質不同而異。除了上述因叮咬造成個人身體之不適外，甚至可能因此而影響地區的經濟，尤其在中部地區小黑蚊引發的問題更是嚴重，以南投地區尤甚，南投鹿谷鄉魚蝦保護區清水溪沿岸一帶發現其大量分布，而使觀光事業受損甚鉅。

近年來，一些環保團體及研究單位為了瞭解並防治其所造成的各種危害，已投注相當的人力及物力進行研究幼蟲孳生源調查(王凱淞，1997 年)及生態和防治的研究，但對於危害逐年加厲之小黑蚊至今仍無

法有效控制其族群密度，受害較嚴重之縣市僅能於成蟲密度較高之月份實施藥劑噴灑，稍減其危害程度，然而常因成效不佳而束手無策。

第二章 材料之來源與標本製作

第一節 材料來源 - 人體誘集法(human bait method)及培育法

選擇位於台中市大坑的某處竹林，將手腳完全暴露於環境中，數分鐘後即可利用採蚊器捉回正在叮吸人血之台灣蚊蠓雌蟲。採回吸血之雌蟲放於內置潮溼濾紙之紙杯或小試管內，約三日後即可見其產卵於濾紙上。將所產之蟲卵移置於直徑九公分，高約 3.5 公分之玻璃培養皿內，皿內預置約 1 公分厚，以消毒過之泥土與酵母粉以 1：1 比例混合的飼育基底，並壓平以做為幼蟲活動之基底。再置於黑暗之生長箱(28℃，80%RH)飼育，發現大部分的卵於產下約 3 日後孵化，幼蟲期約 16-18 日，蛹期約 3-5 日，整個生活史從卵到成蟲約需 21-26 日，飼育出之成蟲最久可活 26 日(Sun, et al., 1971)。

第二節 標本製作

將孵化的卵，幼蟲，蛹及成蟲分別依需要製作標本。幼蟲以四齡為主，先以毛筆沾酒精或水，將蟲體移出，放入開水中殺死，並使蟲體伸直。之後分別於 70%，80%，90%，95%及 100%中酒精脫水 10 分鐘，再移入木鱉油與二甲苯 1：1 混合液中浸泡約 24 小時後，移至玻片，以加拿大膠封入即可觀察。蛹則先於 1% KOH 中加熱約 3 分鐘，再經由

水洗，脫水等步驟，其餘程序與幼蟲標本製作法相同。應注意者係本種之幼蟲於化蛹時，常將脫下之皮黏附於蛹之尾端，因此，製作標本前，須先使用微針將幼蟲遺留之皮除去，方能清楚的觀察。至於成蟲標本之製作過程，亦與蛹標本之製作法相同，惟雌蟲須將頭，胸，腹及兩翅以微針挑開以利觀察；而雄蟲除了上述幾部份外，尚須將交尾器挑開，做更詳細之觀察。

第三節 微細形態之掃描電子顯微鏡之觀察

本研究對於卵、幼蟲、蛹及雌雄成蟲之微細特徵觀察，係以各期之標本先以酒精脫水後，再經由 CO₂ 之臨界點乾燥(critical point drying)，以防止其變形。乾燥後之標本再置於蒸著器中，於 $1-5 \times 10^{-5}$ Torr 之高真空下，以碳與金雙重蒸著(coating)，蒸著後之標本，在 15KV 條件下，以 JSM-15 型掃描電子顯微鏡觀察(以下簡稱 SEM 檢查)(王重雄，羅竹芳，1975 年)。

第三章 實驗結果

第一節 一般形態之描述

本研究係利用已處理過的標本進行一般形態之觀察與測量，描繪作業則採顯微鏡加裝投影機方式直接描繪。各期形態特徵之記述主要依 1965 年 Chan and Feroux, 1964 年 Saunder 及 1979 年 Chen 等人之方法。

1. 蟲卵之觀察結果

- (1) 外觀：呈長橢圓形，從側面觀看時則稍為彎曲。卵的一端有一個圓形卵孔，含有一層薄膜封住。幼蟲孵化時，卵殼自末端約三分之一處斜裂。幼蟲孵化後遺留之卵殼呈拖鞋狀，內部為褐色且呈光滑狀，有關其外觀特徵部份請參見圖 1 至圖 4。
- (2) 長度：約為 0.28mm，最寬處約 0.08mm。
- (3) 卵殼顏色：為黑色，無明顯花紋。

說明：台灣蛺蝶蟲卵的外觀呈橢圓形

圖 1. 台灣蛺蝶蟲卵之外觀

說明：台灣蛺蝶蟲卵的一端有一個圓形卵孔，由一層薄膜封住。

圖 2. 台灣蛺蝶蟲卵之圓形卵孔

說明：台灣蛺蝶蟲卵將孵化幼蟲時，自卵殼末端的三分之一處斜裂。

圖 3. 台灣蛺蝶蟲卵之卵殼末端

說明：台灣蛺蝶之蟲卵孵化後遺留的卵殼呈拖鞋狀。

圖 4. 台灣蛺蝶蟲卵孵化後之卵殼

2.老熟幼蟲之觀察結果

- (1) 體長：約 2.7mm，具有 12 個體節，請參見圖 5。
- (2) 顏色：呈棕褐色。
- (3) 外觀：每一體節上皆長有二對剛(刺)毛，左右對稱。幼蟲體表分布許多小刺突，在顯微鏡下呈鱗片狀，請參見圖 6 至圖 7，說明其主要特徵如下：
 - (a) 頭部份：頭部深褐色。
 - (b) 胸部份：前胸及腹部最後一節各具一偽足，其餘各節均無足，胸部三節及腹部一至八節各具二對剛(刺)毛，左右對稱，分別位於背面及體側面。前胸偽足發達，具五對黑色之鉤刺及五對透明之鉤狀毛，請參見圖8。
 - (c) 腹部份：腹部倒數第二節及最末一節各具一對向後之角狀突起，腹部末端偽足則具9對黑色鉤刺，請參見圖9至圖10。

3.蛹之觀察結果：蛹為裸蛹，雌者體長約1.9mm，雄者約2.1mm，初蛹化時為淺褐色，而後顏色漸深，至羽化前，變為深褐色。蛹殼表面具有許多小刺突，頭部、胸部及胸背部之中央均有瘤突，請參見圖11。

說明：台灣蛺蝶老熟幼蟲具有 12 個體節。

圖 5. 台灣蛺蝶老熟幼蟲之體節

說明：台灣蛺蝶幼蟲的每一個體節皆長有兩對剛(刺)毛且為左右對稱

圖 6. 台灣蛺蝶幼蟲之體節剛(刺)毛

說明：台灣蛺蝶幼蟲蟲體的小刺突，在顯微鏡下呈鱗片狀。

圖 7. 台灣蛺蝶幼蟲蟲體之小刺突

說明：台灣蛺蝶幼蟲前胸的偽足具五對黑色的鉤刺及鉤狀毛。

圖 8. 台灣蛺蝶幼蟲前胸之偽足

說明：台灣蛺蝶幼蟲的腹部倒數第一及第二各具一對向後之角狀突起。

圖 9. 台灣蛺蝶幼蟲腹部之角狀突起

說明：台灣蛺蝶幼蟲的腹部末端偽足具九對黑色鉤刺。

圖 10. 台灣蛺蝶幼蟲之腹部偽足

說明：台灣蛺蝶蛹時期的頭、胸及胸背部之中央均有瘤突。

圖 11. 台灣蛺蝶蛹時期之頭、胸及胸背部

4.成蟲之觀察結果

(1) 身體長度：約 $1.44 \pm 0.2\text{mm}$ ($n=30$)，請參見圖 12。

(2) 外觀

(a) 頭部部份：呈黑色，觸角及口器則為深褐色；兩複眼相連，連接處長約4個小眼面；觸角14節，基節較大，暗褐色，2-9節為念珠狀，10-14節則明顯延長，小顎鬚有5節，第三節膨大，請參見圖13至圖14。

(b) 口器部份：大顎約具16齒，小顎外葉約有20齒。頭楯約具19根鬚毛，請參見圖15。

- (c) 胸部部份：為暗褐色，小盾板具7-8根粗鬃
- (d) 翅膀部份：長度約 $1.0 \pm 0.1\text{mm}$ ，翅寬約 $0.4 \pm 0.1\text{mm}$ 。翅不具斑點，翅面密生小毛及粗毛，翅脈呈黑色。平均棍1對，呈淺褐色，請參見圖16。
- (e) 腹部部份：背板暗褐色，腹板褐色，腹板體節上中央具有一心形之孔，尾毛為圓形，呈淡褐色，儲精囊為一個，呈圓形，請參見圖17至圖18。
- (f) 爪部份：呈彎形，為雙鉤，爪間體發達，請參見圖19。

圖 12. 台灣蛺蝶成蟲之整體外觀

說明：台灣蛺蝶成蟲的複眼相連，連接處長約 4 個眼面。

圖 13. 台灣蛺蝶成蟲之複眼

說明：台灣蛺蝶成蟲的觸角有 14 節，觸鬚有五節。

圖 14. 台灣蛺蝶成蟲之觸角

說明：台灣蛺蝶成蟲的大顎約有 16 齒，小顎外葉約有 20 齒。

圖 15. 台灣蛺蝶成蟲之口器

說明：台灣蛺蝶成蟲的翅膀及平均棍的表面密生小毛及粗毛、。

圖 16. 台灣蛺蝶成蟲之翅膀及平均棍

說明：台灣蛺蝶成蟲的腹部具有一個心型之孔，尾毛成圓形。

圖 17. 台灣蛺蝶成蟲之腹部

說明：台灣蛺蝶成蟲的腹部尾端具有一個儲精囊。

圖 18. 台灣蛺蝶成蟲之腹部儲精囊

說明：台灣蛺蝶成蟲的爪呈彎形且為雙鉤。

圖 19. 台灣蛺蝶成蟲之爪

第二節 微細構造之觀察結果

成蟲之口器構造，觸角感覺毛之分佈，小顎鬚感覺毛之分布及其他各期之特徵，主要依 Snodgrass (1935); Chu-Wang, et al.(1975) , Matsuo et. al.(1974a,b)及 Wirth Navai (1978)等人的方法。

1.卵之外觀特徵

(1) 顏色：黑色

- (2) 外觀：卵殼外膜散佈許多不規則形之白色乳突，有些乳突則 2-3 個相連，平均每 $100\ \mu^2$ 之面積約有 20 個乳突。卵殼內膜較平滑，無乳狀突起，乳突之分佈為散生。

2.老熟幼蟲之外觀特徵

- (1) 頭部份：頭部主要剛毛排列有三對及一對觸角較粗短請參見圖 20。
- (2) 胸部份：胸部及腹部一至八節之背面及側面各具火炬形剛毛一對，各剛毛上覆有 10 隻小剛毛，請參見圖 21。
- (3) 腹部份：腹部倒數第二節及最末一節各有一對向後伸出之角狀刺突。

3.蛹之外觀特徵

- (1) 頭部份：頭部具呼吸管一對，各具 14 個氣孔突起，呼吸管長 0.1mm，最寬處 0.04mm，氣管位於呼吸管中央。頭部及胸部背面具許多小瘤突，請參見圖 22。
- (2) 胸部份：胸部背面中央具長形之脊狀突起，請參見圖 23。
- (3) 尾節部份：尾節之形狀，雌雄不同，雌蟲具三角形之尾部突起一對，左右對稱，最寬處約 0.06mm，長約 0.07mm，此外，雄蟲尾

部具有一對中央性片，此為雌雄蛹之主要區別，請參見圖 24 至圖 25。

4.成蟲之外觀特徵

- (1) 頭部份：複眼由許多小眼構成，此等小眼是以六角錐形方式排列，小眼面並非六角形而是圓形，小眼面之直徑約 $10\ \mu\text{m}$ ，請參見圖 26。
- (2) 口器部份：口器由大顎、上唇上咽頭、小顎外葉、下唇側舌等部位構成，與蚊之口器相似。大顎為針狀，為主要之穿刺器官，其前端一側為鋸齒狀，約 16 齒；小顎外葉亦有較不明顯之鋸齒約 20 齒。下唇端之唇瓣向外擴展成寬盤形；在唇瓣間裂隙孔前方之內壁，可清楚見到較細長之齒狀物，稱為小口前齒，請參見圖 27。
- (3) 觸角部份：雌蟲之觸角上具各種感覺毛，其種類依各節之不同而異，最末一節較複雜，包括有剛毛感覺器，錐狀感覺器及毛狀感覺器，在最頂狀的乳狀突起，應屬於鐘狀感覺器，請參見圖 28。

說明：台灣蛺蝶幼蟲的頭部有三對剛毛及一對粗短的觸角。

圖 20. 台灣蛺蝶幼蟲之頭部

說明：台灣蛺蝶幼蟲的腹部及胸部的剛毛呈火炬型。

圖 21. 台灣蛺蝶幼蟲之腹部及胸部

說明：台灣蛺蝶蛹期的頭部具一對呼吸管，氣管位於呼吸管中央。

圖 22. 台灣蛺蝶蛹期之頭部

說明：台灣蛺蝶蛹期的胸部背面中央具長形之脊狀突起。

圖 23. 台灣蛺蝶蛹期之胸部

說明：台灣蛺蝶雌蛹具有三角形之尾部突起一對。

圖 24. 台灣蛺蝶雌蛹之尾部

說明：台灣蛺蝶雄蛹除尾部突起外，還具一對中央性片。

圖 25. 台灣蛺蝶雄蛹之尾部

說明：台灣蛺蝶成蟲的複眼由小眼以六角錐形方式排列構成。

圖 26. 台灣蛺蝶成蟲之複眼

說明：台灣蛺蝶的口器由大顎、上唇上咽頭、小顎外葉、下唇側舌等部位所構成。

圖 27. 台灣蛺蝶成蟲之口器

說明：台灣蛺蝶雌蟲的觸角上具各種感覺毛包括剛毛感覺器，錐狀感覺器及毛狀感覺器。

圖 28. 台灣蛺蝶雌蟲之觸角

第四章 結 論

在台灣雖然尚未發現台灣蜾蠃會傳播疾病，但有報告指出台灣蜾蠃雌蟲有多次取食習性，且在兩次取食間時間隔很短，容易機械式傳播病原菌(裘和榮，1981 年)。除此之外，台灣蜾蠃對居民造成極大騷擾與傷害，隨著經濟發展、生活品質不斷提升，環保意識抬頭，此問題乃逐漸受到重視。

此蟲個體極微小，幼蟲孳生源分佈廣泛。過去對其生態研究甚少，肆虐區的環境衛生水準普遍不高，另外防治工作也未見確實執行；再加上 921 大地震的土質變動，造成幼蟲孳生源分佈更形擴散。因此，可以預期的是台灣蜾蠃將是台灣未來重要的戶外環境害蟲之一。

第二部份 台灣蜚蠊叮咬後之血清流行病學研究

**(Part II : Serological Epidemiology of the Biting Midge,
Forcipomyia (Lasiohelea) Taiwana (Shiraki))**

中文摘要

本篇研究主要目的是分析被台灣蜆蠓叮咬後血清中出現的特異性 IgE 抗體情況和蟲體過敏原之間的相關性以及血清流行病學調查，希望以此篇研究做為基礎將台灣蜆蠓過敏原研究成為本土性研究的一部份。

本研究乃利用免疫轉印法及酵素連結免疫分析法來分析被台灣蜆蠓叮咬的病人體內的台灣蜆蠓特異性 IgE 抗體。這些受到叮咬的人皆具有一般型叮咬後的皮膚反應。結果發現被叮咬後具有明顯皮膚反應者其血清中台灣蜆蠓特異性 IgE 抗體較被叮咬後不具明顯皮膚反應者血清的中 IgE 抗體濃度較高($P < 0.05$)。同時我們亦注意到，位於台灣蜆蠓分佈區的人，血清內 IgE 的濃度相較於生活於非台灣蜆蠓分佈區的人為低 ($P < 0.05$)。

從結果我們知道台灣蜆蠓特異性 IgE 抗體和受到台灣蜆蠓叮咬者所產生的皮膚反應之間應有相當密切的關係，而且皮膚症狀與叮咬頻率似乎也有相關性。顯示免疫反應在皮膚紅腫的致病機轉有其重要性，希望這些發現對臨床診斷上有其應用的價值。

Abstract

The major purpose of the study is to analyze the relationship between the specific IgE of the *Forcipomyia taiwana* bitten volunteers to mosquito allergen and serological epidemiology study. Based on this study, we hope to conduct the studies about *Forcipomyia taiwana* mosquito allergen locally and provide informations for the futural study. In this study, Western blot and ELISA technique were used to analyze the IgE antibody specific to the whole body extract components of *Forcipomyia taiwana* from 32 volunteers with common reactions belonging to stage 2 to 5. The result showed that the IgE level is higher in subjects with distinct skin reaction than that with faint skin reaction ($P<0.05$). Furthermore, it was noticed that the serum IgE level of people lived in *Forcipomyia taiwana* distributed area is lower than that in non-distributed area. A closed relationship between specific IgE and the skin reaction after exposed to mosquito bite has been observed in this study and so does the frequency of biting. These results revealed the importance of mosquito specific IgE antibodies in pathogenesis of mosquito-bite wheal. This finding is important in potential application for clinical diagnosis.

第一章 前言

由於節肢動物的過敏原所造成的各種過敏疾病多樣性及嚴重性已逐漸為大眾所了解，並且有逐漸使用節肢動物的過敏原作為預防及治療過敏疾病的趨勢(Thomas, 1993)。昆蟲所導致的免疫反應是透過三種方式(Gluck and Pacin, 1986)：

- 1.一種為無傷害性例如吸入性過敏，如吸入家塵 過敏原。
- 2.將尾部的毒針所含的過敏原注入受害者，如西方國家深以為害的大黃蜂或蜜蜂螫咬。
- 3.或者是利用含有唾液腺分泌物的口器螫咬被害者，如蚊蟲之叮咬人體。

研究較清楚的昆蟲過敏原有蜜蜂、胡蜂、蟑螂等，甚至螞蟥也有引起過敏的病例報告(Ford, 1991; Watemberg, 1995; Thomas, 1995)。

相較於被蜜蜂或是胡蜂類螫人所產生的各種人體反應（如毒性反應、過敏性反應等等）所造成的人體傷害，顯然的，受到小昆蟲叮咬後，人體所產生的皮膚反應(skin reaction)，大部分是皮膚紅腫、紅斑、丘疹等的小硬塊，也因為如此昆蟲性叮咬反應並未受到廣泛性研究。

事實上，從各種之前的研究結果顯示蚊蟲叮咬所造成的過敏性反應主要是一般性皮膚反應，包括即發型 (Immediate reaction)及遲發型反

應(Delayed reaction)，在人體中，常可見到這兩種過敏反應所造成的複雜反應(OKA, 1989)，但也有少數全身性過敏反應，甚或致死的病例。

近十幾年來蚊蟲過敏原已逐漸受到重視，其研究的內容主要包括：1. 蚊蟲過敏原所導致的過敏疾病種類、2.過敏疾病的免疫機轉、3.過敏原之間的交叉反應。

利用各種免疫相關技術確定何種蚊蟲叮咬，並及早利用蟲體抗原作為減敏療法是相當必需的。在台灣，由於台灣蜆蠊的過敏原所造成的立即型過敏反應已日趨嚴重，但就目前為止，並沒有相關台灣蜆蠊的過敏相關研究，但是台灣蜆蠊造成的當地居民生活上的不便及身體不適卻時有所聞。

第二章 文獻探討

第一節 昆蟲過敏原的發現及發展

遠在十八世紀時，人類就知道蚊蟲叮咬人體時經由口器刺入人體，將唾液注射進入皮膚，當時認為唾液腺內含有毒性物質 (toxic substance)，可使得皮膚產生叮咬性反應。在 1948 年 Gordon 及 Grewe 兩位學者提出藥理學假設：蚊蟲唾液腺內含有組織胺(histamine)及遲緩反應物(slow reacting substance)，可導致即發型條紅(Immediate wheal)及遲發型反應(Delay reaction)，接者有另一組實驗結果指出；蚊蟲唾液腺內無法測到 histamine (McKiel, 1959; Wilson, et al., 1965)。經由 salivary duct cut off 實驗(Hudson, 1960)及 1946 年 Mellanby、1965 年 McKiel 證明：在昆蟲唾液腺內含有某些物質，可導致人體的特異性致敏反應 (specific sensitization to mosquito saliva)，造成皮膚反應。

接著有學者研究提出”allergic reaction”假設(Oka, 1989)，更有人利用 prausnitz-Kustner technique 證明，受叮咬的病人血清中 mosquito specific IgE 是造成立即性反應的原因，即經由 P-K test 中發現將受到叮咬且具有立即性反應的病人的血清，注射到 non mosquito allergic 病人體內後所產生的皮膚反應與被叮咬而產生立即性反應的症狀是相同的 (Reunala, 1994)。

根據目前研究蚊蟲過敏的研究報告指出，受到小昆蟲叮咬後，人體所產生的反應大部分為一般皮膚反應(common skin reaction)，其症狀大部分是皮膚條紅、紅腫、紅斑、丘疹等的小硬塊，至於全身性過敏症狀(systemic anaphylaxis) 病例很少(Oka, 1994; Tokura, 1990)，但仍有因蚊蟲叮咬而死亡的病例報告(Ohtaki, 1983)。

第二節 蚊蟲叮咬後引起的過敏性反應種類及症狀

1.一般性皮膚反應

(1) 條紅及紅腫反應(Wheal-and-flare reaction)

主要是因為蚊蟲叮咬後將過敏原注射進入皮膚內，致使局部性肥大細胞被活化，產生立即性的血管滲透性增加，另外肥大細胞活化亦可能刺激神經軸反射，造成被叮咬處之周圍血管舒張，造成條紅及紅腫反應(wheal-and-flare reaction)。

該症狀屬於即發型皮膚反應，因為發生的時間大約在被蚊蟲叮咬皮膚後的 10-15 分鐘內產生，20-30 分鐘達到最大，之後漸漸消退，並且在 1 小時內消失。

其判讀標準如下 (以 score 0 - 2 為分級)

0：條紅 < 4mm 及紅斑 < 4mm

1：5mm < 條紅 < 9mm 以及（或）5mm < 紅斑

2：10mm < 條紅

上述的 score 1 及 score 2 皆可算是陽性的即發性反應(Positive Immediate reaction)

(2) 晚期反應(late phase reaction)

當第一型過敏反應漸漸消退時，由於肥大細胞釋放媒介物，會引起另外一種的局部的發炎反應 (localized inflammatory reaction)，稱之為晚期反應，這種反應大約發生在第一型過敏反應後 4-6 小時，可持續 1-2 天。此種反應的特徵為被叮咬的患處由嗜中性白血球、嗜酸性白血球、單核球、嗜鹼性白血球、巨噬細胞、淋巴球所浸潤。

(3) 亞瑟氏反應(Arthus reaction)

Arthus phenomenon 主要是因為壞死、免疫複合物所媒介的一種過敏反應。而以皮膚反應為症狀的 Arthus reaction，其症狀主要是一些小型至大型的膿 (pustular) 及出血性或壞死性的病灶。

(4) 遲發型皮膚反應 (Delayed cutaneous reaction)

延遲型皮膚反應是指叮咬後需數小時後產生皮膚反應，大約在 8-24 小時達到高峰，可持續 3 天或更久的時間。主要的皮膚反應有紅斑(erythromatosus)、丘疹(papula) 、水泡(blister) ...，並且多伴有難以忍受的搔癢感等等。該反應判斷標準如下(以 score 0 - 3 為分級)

0：紅斑 < 4 mm 以及丘疹 < 3 mm

1：5 mm < 紅斑 < 9 mm 及 (或) 4 mm < 丘疹

2：10 mm < 紅斑 < 14 mm

3：15 mm < 紅斑或水泡

上述的 score 1 至 score 3 皆是陽性的遲發性反應(positive delayed reaction)

2.全身性過敏反應

由蚊蟲叮咬造成嚴重型過敏反應的報告數目相較於一般型的局部性皮膚反應少了許多，但是其症狀卻相當嚴重，甚至有死亡病例報告。根據不同國家的研究知道，其症狀包括惡性組織細胞增生(malignant

histocytosis) , 高燒 (high fever) , 淋巴瘤 (lymphoma) , 肝脾腫大 (hepatosplenomegaly) (Ohtaki , 1994), 以及伴隨有腎絲球腎炎的瀰漫性血管內凝固(Disseminated Intravascular coagulopathies; DIC) (Shan, et al., 1995)。

第三節 過敏反應的機轉

依據叮咬的次數不同，發生皮膚反應種類的先後分為五種步驟(5 stage), 首先出現為 stage I, 即第一次接受叮咬後並沒有產生皮膚反應，接下來連續受到叮咬後會出現遲發型反應，此時稱之為 stage II，若是重複性的受到叮咬，則同時出現立即型和遲發型反應時謂之 stage III，stage IV 則是繼續暴露於蚊蟲叮咬，遲發型反應將消失，只剩下立即型反應，stage V 是受到上千次相同的蚊蟲叮咬後，最後連遲發型反應也消失，亦即沒有任何的皮膚反應(Mellanby, 1946)。

叮咬後皮膚反應主要有以下幾種的過敏反應機轉參與：

1. IgE媒介過敏反應(IgE mediated hypersensitivity)

由 IgE 抗體媒介的過敏症狀，包括條紅(Wheal)、紅腫(flare)及晚期反應(late-phase reaction)。依據下列實驗結果可證實是一種 IgE-mediated reaction。



- (1) Immediate wheal-and –flare reaction 症狀和 IgE、histamine 所引起的症狀是相同的。
- (2) 以抗組織胺(anti-histamine) 藥物治療病人時可以減緩症狀。
- (3) placebo-controlled treatment 說明 histamine 在 mosquito bite whealing 是重要的媒介物
- (4) 被蚊蟲叮咬後具有立即型反應的人比不具該反應的人，所測到的蚊蟲特異性 IgE (mosquito-specific IgE)濃度及平均值都較為有意義的增加
- (5) 在 Prausnitz-Kustner test (P-K test) 中，利用被叮咬後具有皮膚反應者的血清以注射方式被動轉移到不具皮膚反應的受叮咬病人的結果發現有皮膚反應的產生，因此更加確定說明 mosquito-specific IgE 在人體內具有生理意義(Reunala, 1994)。

至於晚期反應，過去均認為它是一種由沈澱的 IgG 抗體所造成的第三型過敏反應(由免疫複合體所媒介)，就像發生在肺部的肺麴菌病(aspergylosis)。然而近年來的研究並未在這種晚期的反應上發現沈澱抗體的存在，進一步的研究已經確認它是一種 IgE 依賴型的反應(Ohtaki, 1994)，後續引起一些多形核細胞參與其中，主要的參與細胞如下：

嗜酸性白血球在晚期反應扮演一個重要的角色，此種細胞大約佔了浸潤細胞的 30%。首先是因為肥大細胞釋放的嗜酸性白血球趨化因

子(eosinophile chemotactic factor)吸引大量的嗜酸性白血球來到患處，接下來不同的細胞激素(cytokines)如 IL-3、IL-5 及 GM-CSF 能增強嗜酸性白血球的分化與生長。

嗜中性白血球是在 late-phase reaction 中另外一個重要的細胞。嗜中性白血球是被肥大細胞分泌的嗜中性白血球趨化因子(neutrophile chemotactic factor)吸引而來，同時一些的細胞激素也可以活化嗜中性白血球，導致釋放顆粒內容物，包括溶解 (lytic enzyme)、血小板活化因子(platelet activating factor)及白三烯素(Leukotriene)。

2.第三型過敏反應 type III- IgG mediated reaction (Arthus reaction)

在蚊蟲叮咬引起的 Arthus reaction 中，可視為一種局部性的第三型過敏反應。由於被叮咬之處聚積大量的 mosquito-specific IgG，且會和 mosquito antigen 形成大量的、局部性的免疫複合物擴散進入組織。接下來由於免疫複合物和補體的結合，這些免疫複合物藉著肥大細胞和其他的白血球細胞表面上的 Fc receptor 而結合到上述細胞，導致局部的發炎反應引起血管通透性增加，如此則使得組織液和細胞，特別是多形核白血球進入受叮咬之處，因此我們在 3-8 小時內可以看到紅斑(erythematous)及紅斑性反應(erythematous reaction)。此種反應則稱之為 Arthus reaction。

也有研究報告指出 Arthus reaction 亦參與早期的遲發型皮膚反應 (Peng, 1996)。

3.第四型過敏反應(type IV-cell mediated reaction)

將以下不同時期的皮膚反應的兔子(即發型加遲發型皮膚反應有 3 隻兔子、只具遲發型皮膚反應有 3 隻、只具即發型反應的兔子有 3 隻之血清，注射到未被叮咬的 9 隻天竺鼠體內，當這些天竺鼠再次受到叮咬時，發現天竺鼠產生即發型的反應比例為 5/6，但是產生遲發型反應的比例則為 0/6，但是若以由天竺鼠的脾臟細胞被動轉移到不具反應的動物身上則會出現相同的遲發型反應 (Allen, 1966)。另外也有實驗分析不同時期的皮膚反應的血清與特異性 IgE、IgG 抗體之間的相關性，同時也利用蟲體抗原刺激，來偵測淋巴球增殖反應，得到特異性的淋巴球與遲發性反應(delayed reaction)具有相關性(Peng, et al., 1996)。

4.昆蟲叮咬引起的全身性過敏反應 (mosquito-bite systemic reaction)

雖然此種過敏反應症狀相當嚴重，但我們對於其致病機轉仍不甚清楚。近十幾年來，專家致力於研究後認為，至少有兩種過敏機制與此種反應有關。首先研究得知 IgE mediated hypersensitivity，因為嚴重型反應(severe reaction)的病人比一般型(common reaction)的人血清中有較高的 IgE 含量(Shan, et al., 1995)。另外一種是 Arthus type reaction，因為從嚴重型過敏反應的人之皮膚檢體發現，有明顯的出血、血管擴張、伴隨有嗜中性白血球及嗜酸性白血球浸潤的壞血性血管炎。同時進一步發

現皮膚檢體經免疫螢光染色，可偵測到泛血管性的 IgG 抗體沈積以及腎絲球腎炎的病人，其腎絲球環間膜部位有補體 C1q 堆積。最近更有學者提出自然殺手細胞亦和此種過敏反應有關 另外蚊子所叮咬後所造成的遲發型丘疹(delayed papula)似乎是因為特異性 IgE 抗體、嗜伊紅性白血球所導致的皮膚性晚期反應(cutaneous late phase)及第四型的淋巴球媒介的過敏反應所共同參與 (Oka, 1989; Peng, et al., 1996)。

第四節 蚊蟲過敏原之間的交叉反應研究

目前研究蚊蟲叮咬之過敏反應較多使用的蚊蟲有 *Aedes communis*、*Aedes albopictus*、*Aedes aegypti*、*Culex quinquefasciatus* 等等。有部份研究團體針對各種蚊蟲叮咬造成過敏反應之間的交叉反應發現，受到某一屬(*Aedes.aegypti*)叮咬的血清中含有對抗不同屬(*Aedes.vexans*)蟲體的特異性 IgE 及 IgG 抗體。另外也發現 *A.vexans* 蟲體抗原可以抑制 *A.aegypti* 的酵素免疫吸附法(ELISA test)，因此提出不同屬(species)的蚊蟲蟲體間有相同(species-shared antigen)的及不相同的抗原(species-unique antigen)存在(Peng, 1997)。目前較為大家所知道的昆蟲唾液腺內的物質有一些酵素物質，例如腺苷三磷酸雙磷酸(ATPase)、酯(esterase)及 α -配糖酶(α -glucosidase)。最近也有研究團體將 *Aedes.aegypti* 的一個分子量 37KD 的 saliva-specific protein 給選殖出來，但對於這個 species-shared 的重組抗原(recombinant antigen)的功能尚待研究(Brummer-Kovencovics, et al. 1994)。

第三章 實驗材料及方法

第一節 製備蚊蟲抗原萃取液

1.製備台灣蜚蠊蟲體之抗原萃取液(preparation of whole body extract of *Forcipomyia taiwana*)

首先將冰凍在-80 的蟲體取出，置於研磨盤上，並且保持於低溫狀態。以 0.02M PBS 清洗兩次，接著用研磨棒研磨至懸浮液狀態。再以超音波震盪器，震盪時間約 3 分鐘。再將此均質化的抗原懸浮液置於冷凍離心機以 8,820g，40 分鐘離心。離心後取出上清液後再以 0.22 μ m 的 millipore filter 過濾，過濾後得到的濾液稱之為蟲體抗原萃取液(whole body extract; WBE)，儘速於-80 冷凍保存。

2.製備台灣蜚蠊唾液腺之抗原萃取液(preparation of salivary gland extract of *Forcipomyia taiwana*)

首先將冰凍在-80 低溫的蟲體取出，置於解剖顯微鏡上，儘速將唾液腺取出，置於 eppendorf 試管內，同樣以 0.02M PBS 為緩衝液，冰凍於-80 低溫，此種抗原溶液稱之為唾液腺抗原萃取液(salivary gland extract; SGE)。

3.被叮咬之血清製備

被叮咬的血清來源包括中部某家教學醫院之病患，經確定為具有不同時期的皮膚反應者(stage of skin reaction)，有 12 位。另外還有 20 位，為中台醫護技術學院之學生的血清。

由於該醫護技術學院位於大坑，屬於台灣蜆蠓分佈之地區，因此我們初步取得 96 位學生之血清，再依問卷調查中初步得知該同學曾受台灣蜆蠓叮咬，並且具有皮膚症狀者，抽樣取出 20 位學生之血清進行研究。

第二節 蚊蟲過敏原蛋白分析

1.SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel electrophoresis)

利用 Hoffer SE-250 設備，將玻璃用 detergent 洗淨，以 95%酒精擦拭，擦乾後裝在製備 gel 的架子上，經確定不會漏之後，再配置電泳膠。下層膠濃度採 10% Acrylamide gel, 再以 75%酒精壓平下膠。待凝膠後，再配置 3%上層膠。插好齒梳約 10 分鐘後即可聚膠完成，裝設在電泳架上，添加跑膠之緩衝液，最後依序加入已染色的標準蛋白質為標記 (prestain marker) 蟲體抗原萃取液、唾液腺抗原萃取液。以 120V 跑膠，至蛋白標準液之染液至玻璃底時，即可取出。以 coomassie blue 染色液隔夜染色，再以脫色液將膠片脫色至背景透明即可。

2.台灣蚊蠓特異性IgE分析(specific-IgE analysis)

(1) Autoradiography

將上述跑膠完成之膠片取出後，利用轉印技術將蛋白質轉印至醋酸纖維膜(nitrocellulose membrane)。以 0.02M PBS 清洗 NC paper，清洗好的 NC paper 加入 5% skim milk-TBS 溶液至浸滿為主，再置於室溫搖動至少 1 小時，此目的是防止背景太雜(稱之為 blocking)。然後加上已經過五倍稀釋的被叮咬者之血清(血清與 TBS 比例為 1 : 4)，於室溫中作用 2 小時，接下來以 0.1%Tween-Tris-buffered saline (TTBS) 沖洗 3 次，每次各須 5 分鐘，再加入第二次抗體(即 10^6 cpm 的 ^{125}I labelled anti-human IgE) 經過隔夜孵育，接下來再以 0.1%Tween-Tris-buffered saline (TTBS) 沖洗 3 次，每次各須 5 分鐘，經過乾燥 1 小時，接著覆蓋 X-ray film，放入卡匣後呈現影像。

(2) 酵素連結免疫吸附法 (Enzyme linked immunoabsorbant assay; ELISA)

首先以 0.05 M carbonate buffer (pH9.6) 將 mosquito whole body extract (WBE) 調整為 0.05ug/well 的蛋白質濃度，取 100ul 的台灣蚊蠓蟲體抗原萃取液加到免疫盤(coating)，放置於 4℃，隔夜孵育 (Incubation overnight)。以 washing buffer (0.05% Tween 20 加上 0.01M PBS，pH7.2) 洗 3 次，加 blocking buffer (0.02% 的 bovine

serum albumin 加上 98%的 washing buffer)放置於室溫下 1 小時，再以相同的 washing buffer 洗 3 次。以 ELISA buffer (0.2%的 BSA 加上 99.8%washing buffer)稀釋受叮咬病人的血清檢體(IgE 20 倍血清稀釋)，接著將稀釋過的血清檢體加入每個反應洞(well)，再置於室溫下隔夜孵育。然後以 washing buffer 洗去沒有結合上的抗體。以 ELISA buffer 稀釋二次抗體(goat anti-human IgE conjugate 為 2000 倍稀釋)，經過 37 約 1.5 小時的孵育，再以 washing buffer 洗去沒有結合上的二次抗體。然後加上 0.1ml 的 enzyme substrate (以 1 克 p -nitrophenyl phosphate 溶解於 diethanolamine buffer)，置於 4 隔夜孵育，最後加上 0.1ml 的 1N NaOH 停止呈色，再以 410nm 波長比色。

第四章 實驗結果

第一節 台灣蜆蠓雌蟲叮吸人血及引起的皮膚反應

大約每年的 5-7 月為台灣蜆蠓最猖狂之月份，大坑、太平、南投等中部地區皆可輕易吸引台灣蜆蠓來叮吸人血。圖 29 至圖 30 為台灣蜆蠓停在暴露的手腳及引起的皮膚反應，大部份皆屬於一般型皮膚反應。

第二節 台灣蜆蠓蟲體抗原及唾液腺抗原萃取液的電泳結果

以台灣蜆蠓蟲體抗原及唾液腺抗原萃取液的電泳結果(圖 31.a)看到，前者有較多的蛋白質分佈，分子量大約從 14 KDa 至 120 KDa 都有出現。

第三節 台灣蜆蠓蟲體的特異性 IgE

圖 31.b 是以西方墨點法分析台灣蜆蠓蟲體特異性 IgE，血清以至醫院求診的 12 位被叮咬病人來進行。結果可以看到，不同的血清認識不同的蛋白質，如在 94 KDa 至 67 KDa 之間、43 KDa 至 30 KDa 之間的分子量有一些 IgE-binding band，但是大約在 18 KDa 分子量附近，有

多位病人具有一個明顯的 IgE-binding band。而且這個蛋白質同時在唾液萃取液及蟲體抗原萃取液皆可發現。

- a. 台灣蜾蠃雌蟲停在手臂 b. 台灣蜾蠃雌蟲停在手臂(放大)

圖 29. 台灣蜾蠃雌蟲叮咬手臂之情形

圖 30. 台灣蜾蠃叮咬後產生的一般型皮膚反應

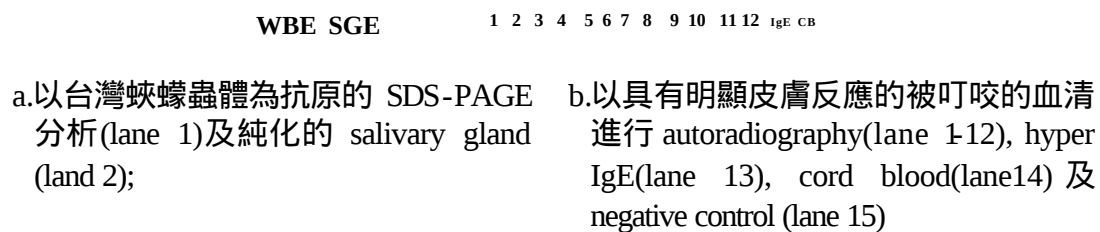


圖 31. 以台灣蜾蠃蟲體為抗原的 SDS-PAGE 及西 autoradiography 分析

第四節 分析具有一般皮膚反應病人血清中的台灣蜾蠃蟲體特異性 IgE 抗體

以 ELISA 分析至醫院求診的 12 位被叮咬病人血清及台中市大坑地區 20 位學生之血清內的特異性 IgE 抗體，並以吸光值(OD)來表示，兩組資料分別定義為 Hospital Group 及 School Group，兩組的統計平均值分別為 1.18 及 0.64，各分組樣本分佈如圖 32 所示。

考量台中市大坑地區為台灣蜾蠃蟲之分佈區，本研究經調查確認 School Group 受檢者接受叮咬之頻率較高，可能導致皮膚反應之分期傾向於第四期甚或第五期，皮膚症狀反應稍輕；至於 Hospital Group 之受檢者大多為皮膚反應嚴重。總體而言，上述兩群組織皮膚症狀反應以 Hospital Group 較高。本研究為了解兩群組之 IgE 濃度是否有顯著之不同，故進行統計一因子變異數分析(Analysis of Variance; ANOVA)，進行統計檢定。

本研究使用 MINITAB 軟體進行統計一因子變異數分析(one-way ANOVA)，受影響因子為 OD 值，影響因子為「分組別」，檢定結果如表 1 所示，p-value 為 0.014，小於顯著水準 0.05，顯示兩群組之 OD 值有顯著之不同，即兩群組之 IgE 濃度水準有明顯之差異。

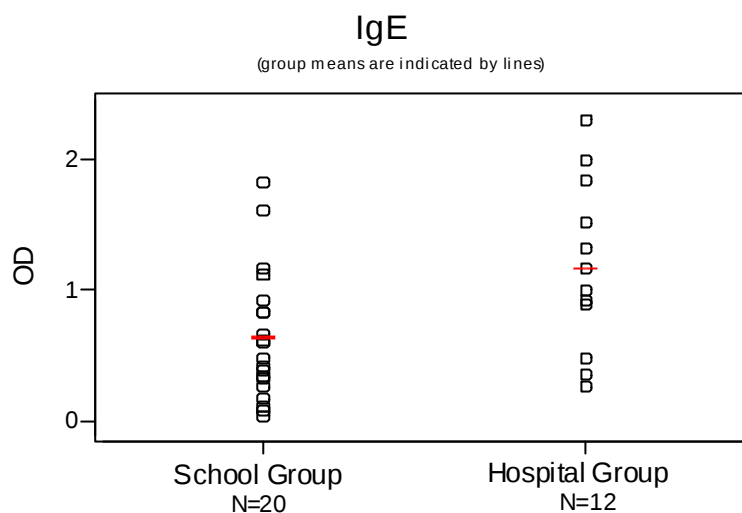


圖 32. 分析具有一般皮膚反應的台灣蜾蠃蟲體特異性 IgE

表 1. 統計檢定結果

One-way Analysis of Variance					
Analysis of Variance for OD					
Source	DF	SS	MS	F	P
Group	1	2.131	2.131	6.78	0.014
Error	30	9.432	0.314		
Total	31	11.562			
Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev					
Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----	
School Gr.	20	0.6445	0.4967	(------*-----)	
Hospital Gr.	12	1.1775	0.6567	(-----*-----)	
Pooled StDev = 0.5607				-----+-----+-----+-----	
				0.70 1.05 1.40	

第五章 討 論

第一節 蟲體唾液腺抗原與蟲體抗原的蛋白質分布情形

從圖 31 的蟲體唾液腺抗原與蟲體抗原的蛋白質電泳及 autoradiography 結果，可以看到被叮咬者的血清內的 IgE 抗體可以認識不同的台灣蜆蠓蟲體唾液腺抗原與蟲體抗原，蛋白質分子量從 14 kd 到 120 kd。關於認識非唾液腺抗原的 IgE 抗體，有可能為經過消化道、呼吸道或皮膚接觸到蟲體抗原所產生的(Peng, 1996)。

第二節 分析不同時期(stage)的叮咬後皮膚反應與 mosquito-specific IgE 濃度的相關性

本次實驗主要的病人來自於叮咬後皮膚反應的不同，一種為被叮咬後因產生各種不同 stage 的皮膚反應至醫院求診而確定的病人，另外一種則是中部大坑地區某所醫護技術學院之被叮咬的學生，其並無明顯的皮膚反應問題。至醫院求診的病患經由醫師確定診斷，有較明顯且嚴重的叮咬後皮膚反應，包括第二期到第四期的皮膚反應，並且多伴有難以忍受的搔癢或紅腫反應。相反的，該所醫護技術學院之被叮咬的學生多不具明顯皮膚反應的病患，經問卷調查得知多屬於第四期的皮膚反應。因此我們利用 ELISA 方法分析這兩群(Hospital group 及 Student

group)病人血清的 IgE 含量，結果發現具有明顯皮膚反應的病人血清的 IgE 濃度高於不具明顯皮膚反應的病人的血清內的 IgE 濃度 ($P < 0.05$) (見表 1)。因此我們認為台灣小黑蚊叮咬人們後所產生的特異性 IgE 與皮膚反應的進行具有相關性。

第三節 分析叮咬頻率與特異性 IgE 抗體的血清流行病學變化

由於本次實驗的血清來源有兩種，一種為被叮咬後因產生各種不同 stage 的皮膚反應至醫院求診而確定的病人，另外一種則為長期求學於台灣蜆蠓分佈區的地區的學生。本實驗利用 ELISA 方法偵測這兩種血清的 IgE 含量，結果發現醫院求診的病人血清的 IgE 濃度高於長期求學於台灣蜆蠓分佈區的被叮咬血清內的 IgE ($P < 0.05$)。同時我們可以將這兩種血清視為不同叮咬頻率的血清，亦即至醫院求診的病人即有可能較少接觸蚊蟲過敏原，故其可視為一種季節性的叮咬(Seasonal biting)。而位於台灣蜆蠓分布區的血清則有較高的接觸頻率，故可視為一種高頻率的叮咬(frequency biting)。

因此較少受到叮咬的病人的皮膚反應包括第二期 到第四期，且有較明顯的皮膚反應，同時血清的 IgE 抗體濃度含量亦相對較高；相反的，較高頻率受到叮咬的病人所產生的皮膚反應較不明顯，所產生的 IgE 似乎也較少(Peng, 1996)。因此我們認為此種差異是一種免疫機制所致。較高頻率接觸過敏原時，會引起去致敏作用(Desensitization)，所

以產生的皮膚反應會從第一期愈趨向第五期,同時皮膚反應越來越不明顯,同時 IgE 含量也相對較低。此部份結果也和目前利用過敏原來治療過敏疾病的減免療法所依據的免疫機制是相似的(Reunala, et al., 1994)。

另外也有研究指出每當昆蟲叮咬季節末時期,過敏病人的的 IgE、IgG4 及 IgG1 會增加,此種現象和利用花粉進行去過敏化(Desensitization)的免疫療法機制是相同的(Palosuo, 1997)。

第六章 結 論

台灣目前尚沒有因台灣蜆蠓叮咬而發生嚴重型過敏反應致死的病例，而在日本、芬蘭、加拿大當地發生多例的嚴重病例，甚至日本也有多起致死的病人(Hidano, 1982; Ohtaki, 1994)，因此上述國家已積極研究昆蟲叮咬的過敏機轉。

從國外研究蚊蟲叮咬所產生的各種叮咬反應和各種免疫分子的相關性得知，目前較被接受的是 IgE、IgG 抗體和立即型皮膚反應(Immediate reaction)具有相關性，而細胞媒介反應則與遲發行反應具有較大的相關性(Peng, 1996)。另外更有研究指出具有低 IgE 濃度、高 IgG4 濃度的病人，相對的皮膚症狀較輕微(Brummer-Kovenkontio, 1994)。

由本實驗結果可以發現被台灣蜆蠓叮咬的病人產生特異性 IgE，同時依症狀程度也有不同的意義，因此可證明 IgE 媒介的過敏反應在台灣蜆蠓叮咬反應扮演某種角色，可以預見將來台灣蜆蠓在台灣造成的影響及防治問題的重要。未來本實驗更希望收集更多受到叮咬的病人進一步分析由台灣小黑蚊叮咬所產生的各種皮膚反應中與人體所產生的特異性 IgE、IgG、IgG4 之間的相關性，以及細胞性反應所扮演的角色。

參考文獻

1. Aalberse R.C., Gaag V.D.R., Van L.J., "Serological Aspects of IgG4 antibodies," 1. Prolonged Immunization Result in an IgG₄-Restricted Response. *J. Immunol*, 1983; 130:722-6.
2. Ailus K., Palosuo T., Herikki B.K., et al., "Demonstration of Antibodies to Mosquito Antigen in Man by Immunodiffusion and ELISA," *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1985; 17:503-511.
3. Allen J.R., "Passive Transfer Between Experimental Animals of Hypersensitivity to *Aedes aegypti* bite," *Exp Parasito* 1966; 19:132-7.
4. Asahi M., "Insect Bite Allergens in the Mosquito Saliva," *Nishinohon J Dermatol*, 1987; 49:246-51.
5. Brummer-Kovénkontio H., Lappalainen P., Reunala T., et al., "Immunization of Rabbit with Mosquito Bite: Immunoblot Analysis of IgG Antimosquito Antibodies in Rabbit and Man," *Int Arch Allergy Immuno*, 1990; 93:14-8.
6. Brummer-Kovénkontio H., Lappalainen P., Reunala T., et al., "Detection of Mosquito Saliva-Specific IgE and IgG4 Antibodies and Distribution of These Antibodies in Human Sera," *Ann Allergy Asthma Immuno*, 1995; 74:259-64.
7. Brummer-Kovénkontio H., Palosuo K., Mikkola J., et al., "Seasonal Increase in Human IgE and IgG4 Antisaliva Antibodies to *Aedes* Mosquito bites," *Int Arch Allergy Immunol*, 1997; 114:367-72.
8. Brummer-Kovénkontio H., Msc, Pekka A., et al., "The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1994; 93:551-5.
9. Dudler T., Machado D.C., Kolbe L., et al., "A Link Between Catalytic Activity, IgE-Independent Mast Cell Activation, and Allergenicity of Bee Venom Phospholipase A₂," *The Journal of Immunology*, 1995; 78:2607-15.
10. Fan P.C., Chang H.N., "Hypersensitivity to Mosquito Bite: A Case Report." *Kaohsiung Journal of medical Sciences*, 1995; 11(7):420-4.
11. Feingold B.F., Benjamini E., Michaeli D., "The Allergic Response to

- Insect Bites,” A Rev Ent, 1968; 13:137-57.
12. Ford S.A., Baldo B.A., Weiner J., et al., “Identification of Jack-Jumper ant (*Myrmecia pilosula*) venom allergens,” Clinical and Experimental Allergy, 1991; 21: 167-71.
 13. Galindo PA., Homez E., Borja J., “ Mosquito Bite Hypersensitivity.” Allergologia et Immunopathologia, 1998; 26(5):251-4.
 14. Graham O.S., Gerald J.G., Robert E., et al., “The Late Phase of the Immediate Wheal and Flare Skin Reaction,” The Journal of Clinical Investigation, 1976; 58, 408-420.
 15. Hidano A., Kawakami M., Yago A., “ Hypersensitivity to Mosquito Bite and Malignant Histocytosis,” Japan J. Exp. Med, 1982; 52:303-6.
 16. Ishihara S., Ohshima K., Tokura Y., et al., “ Hypersensitivity to Mosquito Bite Conceals Clonal Lymphoproliferation of Epstein-Barr viral DNA-Positive Natural Killer Cells.” Japanese Journal of Cancer Research, 1997; 88(1):82-7.
 17. James A.A., Blackerman K., Marinottii O., et al., “Isolation and Characterization of the Gene Expressing the Major Salivary Gland Protein of the Female Mosquito, *Aedes aegypti*,” Mol Biochem Parasitol, 1991; 44:245-54.
 18. James A.A., Rossigonol P.A., “Mosquito salivary glands: Parasitological and Molecular Aspects,” Parasitol today, 1991; 7:267-71.
 19. Killby V.A., Silverman P.H., “Hypersensitive Reactions in Man to Specific Mosquito Bites,” Am J Trop Med Hyg, 1967; 16:374-80
 20. Konishi E., “Distribution of ImmunoglobulinG and E Antibody Levels to Salivary Gland Extracts of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Several Age Groups in Japanese Population,” J Med Entomol, 1990; 27:519-22.
 21. Leong M, Bras C, Castelain C., et al., “Severe local reactions to mosquito bites. Apropos of 20 cases.” Allerg Immuno (Paris), 1986;18(9), 21-2
 22. McCormack D.R., Salata K.F., Hershey J.N., et al., “Mosquito bite Anaphylaxis: Immunotherapy with Whole Body Extracts,” Ann Allergy

- Asthma Immunol, 1995; 74:39-44.
23. Mellanby K., "Mans Reaction to Mosquito Bites," Nature, 1946; 158:554-6.
 24. Mizuki M., Ueda S., Tagawa S., et al., " Natural Killer Cell-dervied large granular Lyphocyte Lyphoma of Lung Developed in a Patient with Hypersensitivity to Mosquito bites and Reactivated Epstein-Barr Virus Infection." Am J Hematol, 1998; 59(4):309-15.
 25. Neal S.P., Jai K.N, Bernstein H., et al., "Mosquito Salivary Gland Antigens Identified by Circulating Human Antibodies," Arch Dermatol, 1989; 125:219-223.
 26. Nsslein H.G., Spiegelberg H.L., "Interleukin-4 Induces Both IgG₄ and IgE Secretion by Peripheral Blood B Cell," J Clin Lab Anal, 1990; 4: 414-9.
 27. Oka K., "Correlation of *Aedes albopictus* Bite Reaction with IgE Antibodies Assay and Lymphocyte Transformation Test to Mosquito Salivary antigens," J Dermatol, 1989; 16:341-7.
 28. Oka K., Ohtaki N., "A Quantitative Study of Specific Immunoglobulins to Mosquito Salivary Gland Antigen in Hypersensitive and Common Types of Mosquito Bite Reaction," The Journal of Dermatology, 1994; 21:639-44.
 29. Oka K., Ohtaki N., "Clinical Observations of Mosquito Bite Reactions in Man: A Survey of the Relationship Between and Bite Reaction," The Journal of Dermatology, 1989; 16:212-9.
 30. Oka K., Ohtaki N., Yasuhara T., et al., "A Study of Mosquito Salivary Gland Components and Their Effects on Man," The Journal of Dermatology, 1989; 16:469-74.
 31. Palosuo K., Brummer-Kovenkontio H., Mikkola J., "Seasonal Inncrease in Human igE and IgG₄ Antisaliva Antibodies to Aedes Mosquito Bites," In Arch Allergy Immunol, 1997; 114:367-72.
 32. Peng K., Festelle R.S., "Comparison of Protein, IgE, and IgG Binding Antigens, and Skin Reactivity in Commercial and Laboratory-made mosquito Extracts," Annals of Allergy, Asthma, & Immunology, 1996; 77:371-6.

33. Penneys N.S., Nayar J.K., Bernstein H., et al., "Mosquito Salivary Gland Antigens Identified by Circulating Human Antibodies," Arch Dermatol, 1989; 90:271-3.
34. Pennys N.S., Nayar J.K., et al., "Circulating Antibody Detection in Human Serum to Mosquito Salivary Gland Proteins by the Avidin-Biotin-Peroxidase Technique," J Am Acad Dermatol, 1988; 18:87-92.
35. Peng ZK., Yang M, Simon F.E.R., "Measurements of Mosquito (*Aedes vexans*) Salivary Gland-Specific IgE and IgG Antibodies and the Distribution of these antibodies in Human sera," Ann Allergy Asthma Immunol, 1995; 74:259-64.
36. Peng ZK., Li H., Simon F.E.R., "Immunoblot analysis of IgE and IgG Binding Antigens in Mosquito Extracts of *Aedes vexan*, *Culex tarsalis* and *Culiseta inornata*," Int Arch Allergy Immunol, 1996; 110:46-51.
37. Peng ZK, Yang Ming., Simons F.E.R, "Immunologic Mechanisms in Mosquito Allergy: Correlation of Skin Reactions with Specific IgE and IgG antibodies and lymphocyte Proliferation Response to Mosquito Antigens," Annals of Allergy, Asthma, & Immunology, 1996; 77:238-44.
38. Racioppi J.V., Spielman A., "Secretory Proteins from the Salivary Glands of Adult *Aedes aegypti* Mosquitos," Insect Biochem, 1987; 17:503-511.
39. Reunala T., Brummer-Kovénkontio H., Palosuo K., et al., "Frequent Occurrence of IgE and IgG₄ Antibodies Against Saliva of *Aedes comminis* and *Aedes aegypti* Mosquitos in Children," Int Arch Allergy Immunology, 1994; 104:366-71.
40. Reunala T., Brummer-Kovénkontio H., Rasanen L., et al., "Passive Transfer of Cutaneous Mosquito-bite Hypersensitivity by IgE Anti-saliva Antibodies," J Allergy Clin Immunology, 1994; 94:902-6.
41. Reunala T., Pappalainen P., Brummer-Kovénkontio H., et al., "Cutaneous Reactivity to Mosquito Bites: Effect of Cetirizine and Development of Antimosquito Antibodies," Clin Exp Allergy, 199; 2:617-22.
42. Sabbah A., Sainte-Laudy J., Hassoun S., "Allergy to Mosquitos and Use of New Immunobiological Parameters." Allerg Immuno, 1997; 29(5):126-8

43. Shan E.Z, Tanguchi Y., Shimazu M., “Immunoglobulins Specific to Mosquito Salivary Gland Protein in the Sera of Persons with Common or Hypersensitive Reactions to Mosquito Bites,” *The Journal of Dermatology*, 1995; 22: 41-418.
44. Shen H.D., Chen C.C., Chang H.N., et al., “Human IgE and IgG Antibodies to Mosquito Proteins Detected by the Immunoblot Technique,” *Annals of Allergy, Asthma, & Immunology*, 1989; 63:143-6
45. Solley G.O., Gleich G.J., Jordan R.E., et al., “The Late Phase of the Immediate Wheal and Flare Skin Reaction: Its Dependence Upon IgE Antibodies,” *J Clin Invest*, 1976; 58:408-20.
46. Suzuki S., Negishi K., Tomizawa S., et al., “A Case of Mosquito Allergy, Immunological Studies,” *Acta Allerg*, 1976; 31:428-41.
47. Tokura Y., Ishihara S., Ohshima K., “ Severe Mosquito Bite Hypersensitivity, Natural Killer Cell Leukemia, Latent or Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection and Hydroa Vacciniforme-like Eruption,” *British Journal of Dermatology*, 1998; 138(5):905-6.
48. Tokura Y., Tamaru Y., Takigawa M., et al., “Severe Hypersensitivity to Mosquito Bites Associated with Natural Killer Cell Lymphocytosis,” *Arch Dermatol*, 1990; 126:362-8.
49. Tsai WC., Luo SF., Liaw SJ., et al., “Mosquito bite allergies terminating as hemophagocytic histiocytosis : report of a case.” *Taiwan I Hsueh Hui Tsa Chih*, 1989 ; 88:639-42.
50. Urbanek R., Krauss U., Ziupa J., et al., “Specific IgE and IgG Antibodies as a Measurement of the Degree of the Protection in Insect-sting Sensitive Patients,” *Clin Allergy*, 1983; 13:229-34.
51. Walker G.B., Harrison P.V., “Seasonal Bullous Eruption due to Mosquitos,” *Clin Exp Dermatol*, 1985; 10:127-32.
52. Watemberg N., Weizman Z., Shahak E., et al., “fatal multiple Organ Failure Following Massive Hornet Stings,” *Clinical Toxicology*, 1995; 33(5):471-7.
53. Wilson A.B., Clements A.N., “The Nature of the Skin Reaction to

- Mosquito Bite in Laboratory Animals,” *Int Arch Allergy*, 1965; 23:294-314.
54. Wu C.h., Lan J.K., “Immunoblot Analysis of Allergen in Crude Mosquito Extracts,” *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1989; 90:271-3.
 55. Xu W., Simons FE., Peng Z., “ Expression and Rapid Purification of an *Aedes aegypti* Salivary Allergen by a Baculovirus System.” *International Arches of Allergy & Immunology*, 1998; 115(3):245-51.
 56. 王凱淞，葉金彰，「台灣蚊蠓幼蟲孳生源調查」，行政院環保署第九屆病媒防治研討會論文集，1997年，111-123頁。
 57. 王惠鵬，葉金彰，莊益源，「台灣蚊蠓之田間防治實務」，行政院環保署第九屆病媒防治研討會論文集，1997年，151-175頁。
 58. 陳錦生，連日清，徐世傑，「台灣蚊蠓之形態及掃描電子顯微鏡觀察（雙翅目：蠓科）」，1980年，國立中興大學昆蟲學報15：211-226。
 59. 王惠鵬，「南投地區台灣蚊蠓之化學防治」，1997年，國立中興大學昆蟲學系碩士論文。52頁。
 60. 莊益源，「台灣蚊蠓之生活史極其在南投地區之季節消長」，1994年，國立中興大學昆蟲學系碩士論文，52頁。
 61. 裘明華，榮雲龍，「台灣蚊蠓幼期之形態（雙翅目：蠓科）」，1980年，中國昆蟲學報23（1）：66-75
 62. 周欽賢，連日清，王正雄，醫學昆蟲學。南山堂出版社，1985年，台北，458頁。
 63. 張伯熙，「台灣蚊蠓之殺蟲劑篩選及其誘集研究」，1997年，國立中興大學昆蟲學系碩士論文，39頁。

私立
立化中學
生物化學
醫學研究
院所

碩士論文

台灣
蜆蠓過敏
機轉之研究

研究生：黃杏英
撰