

トリコモナス類の酸性フォスファターゼに関する研究

第1報 口腔トリコモナスおよび膣トリコモナスにおける細胞化学的検出

大 橋 叔

慶応義塾大学医学部歯科学教室

(昭和46年8月2日 受領)

緒 言

人体に寄生する三種のトリコモナス (*Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*) のそれぞれについての形態, 疫学, 病原性などを検討した発表は数多いが, 生理生化学的研究はきわめて乏しい. *Trichomonas tenax*(口腔トリコモナス)では, Lynch (1915) にはじまり, Ohira and Noguchi (1917), 赤津 (1921), 重浦 (1930), 大田, 山元 (1935), 遠藤 (1953), 榎本 (1953) 等々が受けついで培養法の開発があるが生理生化学的研究はみられない. その理由はこの原虫の無菌的培養法の困難なことにある. 上記の諸氏の培養法はいずれも細菌類との共棲培養であり, 生理的研究に使用しうる虫体は得られない. 確実な無菌的培養法としては Diamond (1962) の報告があるが, 1965年に著者も発表したように, この方法を以つて培養しうるのは特殊な株に限定されるようで, 著者の試みた数株では全て不成功に終り, 普遍性に欠ける方法である.

一方, 形態学的にきわめて相似した *Trichomonas vaginalis* (膣トリコモナス) では無菌的培養は容易であり, 幾つかの生理生化学的発表が行なわれている. したがって現在では膣トリコモナスにおいて得られた知見をもつて口腔トリコモナスの生理生化学を類推するということに止まっているが, 現在までの生物学的性状に関する知見からみて, 両者に著しい差はないと判断してよいであろう. 膣トリコモナスにおいては活発な含水炭素利用がその代謝の特長の一つであり (Asami, 1956; 浅見, 1965, 1967), 口腔トリコモナスにおいても同様であろうことは培養虫体の細胞質内に貪食された多数の米粉粒が顕微鏡下で認められることからもうかがわれる. 著者は寄生原虫の虫体内構造物の機能を明らかにする研究の手はじめとして活発な澱粉貪食を行なうこの原虫の酸性フォスファターゼ活性の分布局在を細胞化学的に検

討することを取上げた. 本論文は光学顕微鏡レベルでの本酵素活性部位の証明であり, 微細な局在部位についての電子顕微鏡レベルでの検討は次報に述べる.

原虫類の酸性フォスファターゼの細胞化学的研究は大形の自由生活性原虫類における食胞での酸性フォスファターゼ活性について幾つか発表されているが, 寄生性原虫類ではきわめて乏しい. トリコモナス類では Gomori 法を用いた野村 (1956, 1957a, c) の報告が唯一のものであるが, 後述の如く, 著者の得た知見とは相当に異なる点がある.

実験材料ならびに方法

口腔トリコモナス培養虫体は慶応義塾大学医学部附属病院に入院中の患者, ならびに外来患者で, 特に口腔内清掃不十分な年長者を選び, その歯肉囊内より歯垢, 歯石を滅菌した妻揚子, あるいは探針にて採取し田辺千葉培地, (0.1%のアスパラギン酸を加えたリングル氏液の寒天斜面に馬血清を8:2の割合に加え, 使用前に予じめ100°C 3日間, 間歇滅菌した米粉を1白金耳加えた培地), で37°C の孵卵器内で分離培養を行なった. 分離培養後の継代培養では虫体の増殖が余り良好でないため, 培地の液体部を人血清に代えて上記と同様に培養を行なった. 分離後48時間経過した株では活発に増殖しているのが見られ, 72時間で最高値を示した. この人血清加培地を用いて72時間毎に継代培養を行ない50代以上継代した株についてさらに運動, 増殖共に良好な株を実験材料として使用した. 培養後, 液体部を攪拌し, 米粉その他の不純物を, 増殖した虫体と分離するためにガーゼ2枚ないし3枚で濾過した. この液に活発な虫体が存在することを顕微鏡下で再確認したのち, 生理食塩水, あるいは0.1M 磷酸塩緩衝食塩水を用いて, 2,000r.p.m., 5分間宛, 冷却遠心器 (久保田 KR-6P 型) で遠沈洗滌を数回繰り返したのち, その上清をすて虫体沈査を実験

材料に供した。

一方、腔トリコモナス虫体は慶応義塾大学医学部寄生虫学教室において無菌的に継代培養を行ない、そのうち運動、増殖共に活発な株を選び、遠心器にて虫体を集め上記と同様の操作で試料作製を行なった。

方 法

1. Gomori 法変法

1941年 Gomori によつて発表された方法を本原虫に適用するために、わずかな改変を加えた野村 (1956) の術式に近い方法を用いた。

まず、材料の1白耳を、あらかじめ卵白グリセリンを塗布しておいたカバーガラスに薄く塗抹し、完全に乾燥しないうちに無水アセトン液、あるいは4%冷グルタルアルデヒド液中に塗抹面を下にして浮かべ、1~2分後、塗抹面を上にして固定液中に浸した。10~20分間の固定後、軽く水洗し(アセトン固定の場合は脱アセトンを行なつてから)、反応液中に浸した。

反応液としては pH 5.0とした0.05M の醋酸緩衝液 1 l に対して1.2g の硝酸鉛を含む溶液と、0.1M のβ-グリセロリン酸ナトリウム溶液を1:10の割合に混合した。沈澱の生じた場合は濾過して沈澱物を除去したのち、pH を5.5に調製して使用した。反応液中に浸した試料は37°C の孵卵器中に入れるか、予じめ37°C に調製した温浴槽中に試料皿を浮かべ、孵卵器の中で1時間、12時間、24時間と反応を進行せしめた。反応終了後、蒸留水を用いて6~8回、30分間、十分に反覆洗滌し、稀釈した硫酸アンモニウム液に約2分間浸した。この操作により磷酸鉛の反応部位を硫化鉛として可視的なものとしたのち水洗し、グリセリンにて包埋し、光学顕微鏡で観察した。対照群としては、反応液中の基質の代りに蒸留水を等量に加えたものと反応阻止剤である弗化ナトリウム(0.04%)を加えた群とで上記同様の操作を施して対照実験とした。

2. Gomori 法の Barka 改良法

醋酸緩衝液またはペロナール緩衝液は不適當であるとして Barka が改良を加えた方法(水谷, 1967)によつた。材料を薄く塗抹したカバーガラスを前法と同様に塗抹面を下にして、4%冷グルタルアルデヒド液に浮かべ1~2分後、塗抹面を上にして固定液中に浸した。20分間の固定後、十分に反覆水洗し、反応液中に入れて1時間、3時間、4時間、5時間、20時間とそれぞれ反応を進行させた。反応液としては0.1M トリス・マレイン酸緩衝液(pH 5.0)、蒸留水、1.25% β-グリセロリン酸ナト

リウム(塩酸で pH 5.0にしておいたもの)をそれぞれ10ml ずつ混合し、これに20ml の0.2%硝酸鉛をよく振りながら滴下したものを使用した。反応終了後、水洗しグリセリン、あるいはポリビニールアルコールで包埋し、光学顕微鏡にて観察した。対照実験としては0.04%弗化ナトリウムを反応液に入れて、上記と同様の操作を施したのち光学顕微鏡で観察した。

3. Barka-Anderson 法

Barka-Anderson (1962) の方法に準じた。前法と同様にして集めた虫体をカバーガラスに塗抹し、無水冷アセトン、4%冷グルタルアルデヒド、またはフォルモールカルシウムを用いて10分~30分間固定を行なつたが、フォルモールカルシウム固定液が他の固定液と比較して幾分虫体の固定、保存に良好と思われたため、主としてこれを固定液として使用した。固定後水洗し、反応液中に1時間、3時間、4時間、5時間と浸漬し反応を進行させた。反応液としてはパラロザニン液0.5ml と4%ニトレイト液0.5ml を混合し、これをアセテート・ペロナールバッファー(pH 5.0) 19ml にα-ナフチールフオスフェート10ml を溶かしたものの中に入れ、pH 5.0 に調製して使用した。それぞれの反応終了後、アルコール脱水、ポリビニールアルコールにて包埋して光学顕微鏡で観察した。

また別に虫体を遠心器で集め、磷酸塩緩衝液で2~3回遠沈洗滌を繰り返したのち、その沈渣に2%の寒天を加えてかため、フォルモールカルシウム固定、ないしは冷アセトン固定を20分間行ない、水洗(アセトン固定の場合は蒸留水を幾度か換えて脱アセトンを行ない)し、Teddington の YM 型クリオスタットで切片とし、あらかじめ卵白グリセリンを塗布しておいたカバーガラスに載せ、室温で乾燥させたのち上記の反応液に浸漬し20~30分間反応を進めた。対照実験として基質の代りに等量の蒸留水を加えたものを使用した。

実験結果

口腔トリコモナス虫体は無菌的培養が不可能のため虫体を集める際、米粉、細菌、その他の不純物を取り除くため、ガーゼで濾過を試みたが完全には除去出来ず、視野はきわめて汚れていた。しかし虫体の観察には特に支障はなかつた。また口腔トリコモナス、腔トリコモナス両虫体とも固定の際、カバーガラスから塗抹した試料が落ちることが多かつた。対照実験群では各法とも反応所見は全く認められなかつた。

1. Gomori 法変法による反応所見

口腔トリコモナス虫体を使用し、冷アセトン、あるいは4%冷グルタルアルデヒド固定を行なった実験においてはいずれも20分間固定したものが最も良い保存が得られるように思われた。1時間、12時間反応させた虫体においては殆んど反応所見は認められなかったが、24時間反応群では虫体全域に活性の認められるものが多かった。そのうちでも虫体細胞質内の構造が比較的に見分けられるものについて観察した結果、酸性フォスファターゼ反応部位は各虫体とも核周囲、細胞質内の核に近接して存在する空胞様構造物に活性が認められた。(Fig. I) 特に米粉粒を貪食して形成された phagosome と思われる細胞膜に近接した空胞にも強い活性が認められた (Fig. I-1, 2, 3)。また虫体の軸索と思われる部位や虫体細胞膜にも活性の認められるものがあつた (Fig. I-3, 4)。活性の認められなかった部位は核、ならびに鞭毛で波動膜はそれ自体光学顕微鏡で観察出来なかつた。

2. Gomori 法の Barka 改良法による反応所見

口腔トリコモナス虫体を試料として使用した。

固定された虫体はその形態も比較的良く保存され、虫体内の反応は全般的にきわめて濃厚であつたが、円形に近い虫体で反応の認められないものもあつた。反応時間を1時間、3時間、4時間、5時間、20時間と種々変えて行なった実験のうち4時間～5時間の反応群において最も良い所見が観察出来た。反応部位は核周囲に特に強く、核に近接して存在する細胞質内の空胞様構造物周囲にも沈着像が認められた (Fig. II-2, 3)。虫体細胞膜の近辺に存在する phagosome と考えられる空胞周囲にもかなり濃厚な反応が認められた (Fig. II-2, 3, 4) が、これらの構造物が他の構造物と如何なる関係にあるかは明らかにすることが出来なかつた。

3. Barka-Anderson 法による反応所見

口腔トリコモナス、口腔トリコモナス両虫体を使用した結果、冷アセトン固定、4%冷グルタルアルデヒド固定を行なった虫体に比較して冷フォルモールカルシウム固定を施した虫体の方が虫体の大きさはより収縮するが、その形態の保存は良好のように思われた。両虫体とも反応時間が1時間以内のものでは反応が全く認められず、3時間反応させたものでは一部の虫体のみ反応が認められ、5時間反応群では虫体全域が染色されているような像が認められた。最も良い反応所見を示したのは4時間反応群で各虫体とも反応部位は淡黄色に染まり、虫体細胞質内に散在する空胞様の構造物に反応が認められた (Fig. III-1, 3, 4, 5)

また核に近接した parabasal body と思われる部位に

も反応が認められた (Fig. III-2)。

一方、口腔トリコモナス虫体でも上記の口腔トリコモナス虫体と同様の所見が認められたが、米粉粒を摂取した phagosome の周囲に特に強い反応が認められた (Fig. IV)。またクリオスタットを使用して作製した虫体の切片標本はカバーガラスに塗沫し、反応液に浸漬する際に直接塗沫試料の場合よりカバーガラスから試料の落ちる率が非常に多く、さらに染色性の良いものを得ることが出来なかつた。

考 察

原虫類の酸性フォスファターゼに関する細胞化学的研究は自由生活性の種類では相当に多数の発表が見られる。殊に1955年頃から酸性フォスファターゼ活性と lysosome との関係が明らかとなつて以来 (de Duve, 1963)、原虫類の嚥胞 (Seaman, 1961) あるいは pinocytotic droplet (Birns, 1960) での本酵素を検討した報告がいくつか見られる。

一方、寄生原虫類でのこの方面の研究は少ない、その理由は光学顕微鏡レベルでは虫体の小さな寄生種の場合、十分な観察が行なわれ得ないことにあるのではないかと思われる。人体寄生の原虫では Carrera and Changus (1948) が赤痢アメーバの酸性フォスファターゼ活性を Gomori 法で観察しその存在を報じているが、技術的な紹介が主であつて反応所見についての記述は殆んどなされていない。わが国では Hara *et al.* (1954) が赤痢アメーバの細胞化学的研究を発表しているが、酸性フォスファターゼについては実験を行なっていない。野村 (1956, 1957a, b, c) はネズミの腸腔に寄生する大型のトリコモナス *Trichomonas muris* を用いて広範な細胞化学的研究を行ない、幾つかの新しい知見を得ている。氏は Gomori 法で酸性フォスファターゼ反応生成物の虫体内局在を報じている (野村, 1956) が、それは著者のこの実験成績とは相当に異つたものである。

野村によるとアルカリフォスファターゼに比べて酸性フォスファターゼは強く反応し、核、核周囲、鞭毛根部が反応部位であるが、中でも核が最も強く反応したと報告している。

著者の実験では Gomori 法においても核には反応が認められなかったが、反応時間が長すぎると虫体全体に沈着物が見られるようになることから、野村 (1956) の場合は過剰反応が生じて核へも沈着物の形成が見られたものと思われる。野村 (1956) は基質液の中にて24時間反応させて観察しているが、著者は24時間では長過ぎ

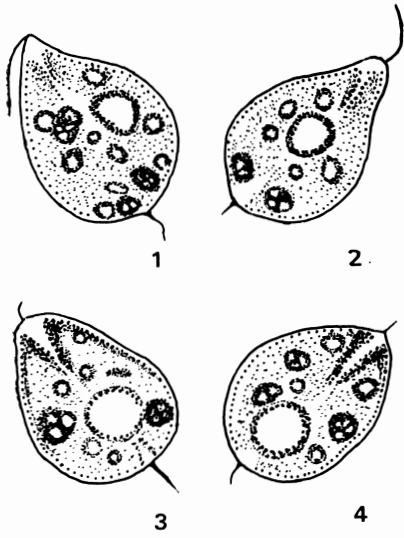


Fig. I

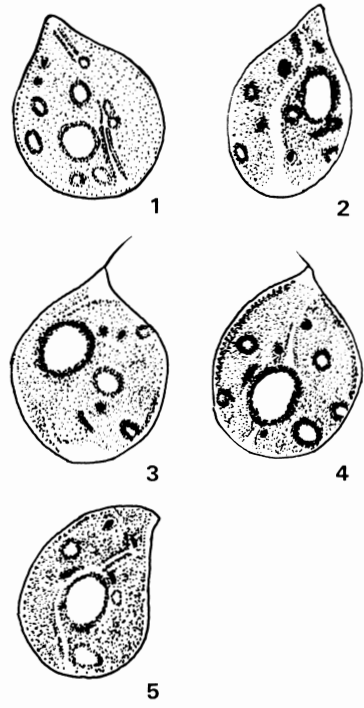


Fig. II

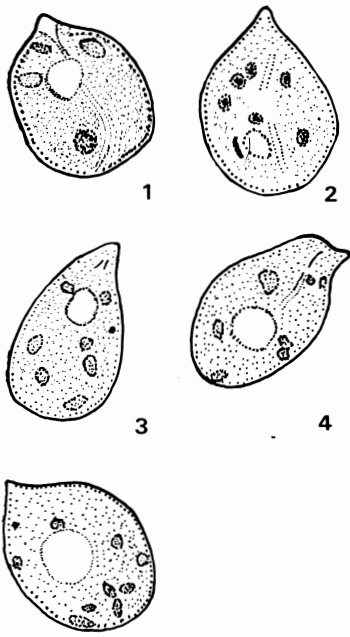


Fig. III

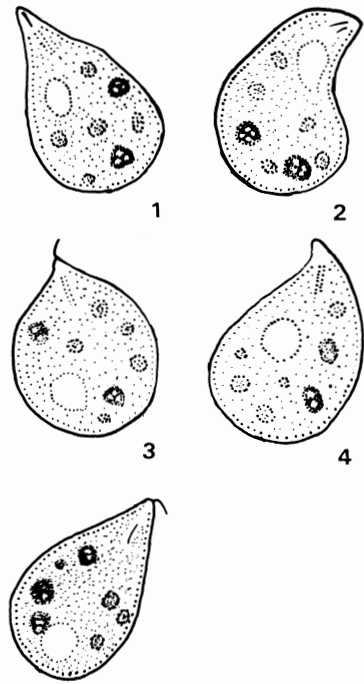


Fig. IV

ることを予備実験で確認している。また酸性フォスファターゼ反応において核に反応の生じている標本は過剰反応として除外されるべきものであると言われていることから野村 (1956) の所見は反応時間が長過ぎたための誤認があると思われる。著者の成績では Gomori 原法, Gomori 法の Barka 改良法, Azo 色素法の三者で著しい差は見られなかったが, Gomori 法では原法に比べて Barka 改良法が反応の明確度でやや優れていた。Azo 色素法は他の二者に比べて反応生成物の位置の確認がより容易であるように見えた。つまり細胞質内の反応顆粒の輪廓が明瞭で, 食泡など酸性フォスファターゼ陽性の胞状物の存在を思わせる所見が得られ, parabasal body と思われる棍棒状の強く反応した物体が核の近くに認められた。原虫類の food vacuole が phagosome であり, 酸性フォスファターゼをはじめ幾つかの酵素が存在することは *paramecium* など自由生活原虫で証明されている (Müller *et al.*, 1960; Müller, 1963)。また自由生活アメーバの *Chaos chaos* を材料とした実験で Birns (1960) は Gomori 法でこのアメーバの細胞質内の反応生成物の本態を検討している。それによるとアメーバを飢餓状態におくときは内肉では一様に淡い反応を生じ, 外肉には pinocytotic droplet 様のものが反応するが, 餌を与えると強く反応する food vacuole が現われるという。Quertier は1959年に同じく自由生活アメーバである *Amoeba proteus* を用いて pynocytotic droplet, 酸性フォスファターゼ, lysosome の関係を検討している。また自由生活線虫の *Tetrahymena* を材料として Seaman (1961) は大きな口器から餌をとり込み多数の food vacuole を虫体内に持つ線虫虫体においてもここに強い酸性フォスファターゼ反応の生ずることを証明し, food vacuole と lysosome との関係を示唆している。著者の実験では用いたトリコモナス虫体が自由生活アメーバに比べて著しく小さいために pinocytotic vesicle あるいは lysosome にあたるものを見出すことは不可能であったが, food vacuole に強い酸性フォスファターゼ活性があり, lysosome 様の作用を行なっていることは観察

された。小川ら (1970) によると, 細胞が外来性の物質を摂取して生じた hetero-phagosome は pre-lysosome であり, 酸性フォスファターゼ活性は証明されないが, これが, hetero-lysosome となつて酵素活性が明らかとなるという。トリコモナス類では活発な喰作用により多数の喰胞が虫体内にあることは光学顕微鏡でも容易に判別し得るが, どの喰胞に酸性フォスファターゼ活性があるかその有無については酵素反応を行なつても光学顕微鏡では依然として不明である。これらの点は統報の電子顕微鏡による細胞化学的な酸性フォスファターゼ証明によつて明らかとなるであろう。酸性フォスファターゼ活性のない hetero-phagosome の段階であれ, 活性の現われる hetero-lysosome の段階であれ, 原虫類の形態からはこれらはいずれも喰胞 (food vacuole) として取扱われてきたものであり, food vacuole の lysosome 様機能は明らかである。本実験で Azo 色素法の標本に parabasal body と思われる構造物に酵素反応が強く陽性に現われたことは興味深い。寄生原虫類の多くが持っている parabasal body と呼ばれる organella が高等動物細胞の Golgi 装置であるということが判明してきたのは比較的新しい (Piteaka, 1963)。

一方, 高等動物細胞においても時には Golgi 装置に酸性フォスファターゼ活性が証明されている (小川, 1967)。寄生原虫では parabasal body に酸性フォスファターゼ反応が証明されたということが僅に El Mofty (1957) によつて報告されている。彼は白アリに寄生する鞭毛虫 *Trichonympha* の特異な形態の parabasal body を Gomori 法で反応させて, 酸性フォスファターゼの強い陽性反応結果を見出している。著者のこの実験において核のそばに見出された酸性フォスファターゼ陽性物質がその位置および形態から parabasal body であることは間違いない。その上, 原虫類の parabasal body が Golgi 装置であるならば, これが酸性フォスファターゼ反応に陽性に現われることは理解出来る。トリコモナス類の parabasal body の生理的意義が明らかとなつたことは原虫の微細構造物とその機能を究明してゆく作業の上で

- Fig I. 口腔トリコモナス (Gomori 法変法による)。1, 2, 3. 花粉を貪喰した phagosome と思われる空胞に陽性反応。3, 4. 虫体の軸索と思われる部位と細胞膜に陽性反応
- Fig II. 腔トリコモナス (Barka 改良法による)。1, 5 細胞質内の空胞様・構造物に沈着像を認める。2, 3, 4 虫体細胞膜に近接する phagosome と思われる空胞周囲, 並に核周囲に濃厚な反応を認める
- Fig III. 腔トリコモナス (Barka-Anderson 法)。1, 3, 4, 5. 細胞質内に散在する空胞様構造物に陽性反応。2. 核に近接した parabasal body と思われる部位に陽性反応
- Fig IV. 口腔トリコモナス (Barka-Anderson 法)。米粉粒を摂取した phagosomes の周囲に強い反応を認める

大きな意義のあることと思われる。

結 語

トリコモナス類 (*Trichomonas tenax*, *Trichomonas vaginalis*) の虫体内の酸性フォスファターゼ活性について Gomori 法, Gomori 法の Barka 改良法並びに Azo 色素法により細胞化学的に検討し次のような結果を得た。

1. 酸性フォスファターゼ活性部位は核周囲, 核に近接して存在する空胞様構造物周囲に, また虫体細胞膜の近辺に存在する phagosome と思われる空胞周囲にも反応が認められた。

2. Azo 色素法では parabasal body と思われる構造物にも酵素反応が認められた。

3. 何れの方法においても, 核には酸性フォスファターゼ活性は認められなかった。

稿を終るに臨み御指導と御校閲を賜った本学寄生虫学教室松林久吉教授並びに浅見敬三助教授に深甚の謝意を表すとともに御協力いただいた竹内勤先生を初め寄生虫学教室の皆様にご感謝の意を表します。(本論文の要旨は第35回日本寄生虫学会総会に於て発表した)。

文 献

- 1) 赤津誠内(1921): トリコモナスの試験管内培養. 京都医学誌, 18, 883-890.
- 2) 浅見敬三(1965): 寄生性鞭毛虫類. 日本における寄生虫学の研究, 5, 362-421.
- 3) 浅見敬三(1967): トリコモナス類. 医学のあゆみ, 61, 302-304.
- 4) Asami, K. (1956): Physiological studies on *T. vaginalis*. Keio J. Med., 5, 169-190.
- 5) Barka, T. and Anderson, P. J. (1962): Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. J. Histochem Cytochem., 10, 741-753.
- 6) Birns, M. (1960): The localization of acid phosphatase activity in the ameba chaos chaos. Exp. Cell. Res., 20, 202-205.
- 7) Carrera, G. M. and Changus, W. G. (1948): Demonstration of acid phosphatase in *Entamoeba histolytica*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 68, 610-611.
- 8) De duve, C. (1963): Lysosomes, Ciba foundation symposium, Little Brown Co.
- 9) Diamond, L. S. (1962): Axenic cultivation of *Trichomonas tenax*, the oral flagellate of man. 1. Establishment of cultures. J. Protozool., 9, 442-444.
- 10) El Mofty, M. M. (1957): Cytochemical localization of acid phosphatase in *Trichonymphatuskestamica*. Nature, 180, 1367.
- 11) 遠藤忠衛(1953): *Trichomonas elongata* の培養. 菌科学報, 53, 554-560.
- 12) 榎本義文(1953): 口腔内原虫の研究. 菌科学誌, 9, 13-21.
- 13) Hara, K., Oka, S., Sawada, T. and Fuse, M. (1954): Cytochemical observation on *Entamoeba histolytica*. Gunma J. Med., 3, 249-265.
- 14) Lynch, K. M. (1915): Cultivation of trichomonas from the human mouth. Am. J. Trop. Med., 2, 531-538.
- 15) 水谷昭(1967): 酵素組織化学, 304頁, 朝倉書店. 東京.
- 16) Müller, M., Töth, J. and Törö, I. (1960): Increase of esterase activity during intracellular digestion in a *Histophagus ciliata*. Nature, 187, 65.
- 17) Müller, M. (1963): Lysosome, Ciba foundation symposium.
- 18) 野村弘(1956): 寄生原虫類の細胞化学的研究 (I). 慶応医学, 33, 241-247.
- 19) 野村弘(1957 a): 寄生原虫類の細胞化学的研究 (II). 慶応医学, 34, 75-88.
- 20) 野村弘(1957 b): 寄生原虫類の細胞化学的研究 (III). 慶応医学, 34, 131-140.
- 21) 野村弘(1957 c): 寄生原虫類の細胞化学的研究 (IV). 慶応医学, 34, 471-480.
- 22) 小川和朗・斉藤多久馬・馬屋原宏(1970): ライソゾームの微細構造, 細胞, 2, 2-10.
- 23) 小川和朗(1967): 酵素組織化学, 476頁, 朝倉書店, 東京.
- 24) Ohira, T. and Noguchi, H. (1917): The cultivation of trichomonas of the human mouth (*Tetratrichomonas hominis*). J. Exp. Med., 25, 341-347.
- 25) 大田堅蔵・山元謹吾(1935): *Trichomonas elongata* の新培養法について. 大日本歯科会誌, 17, 1-8.
- 26) Piterka, D. R. (1963): Electron microscopical structures of protozoa, Pergamon Press.
- 27) Seaman, G. R. (1961): Acid phosphatase activity associated with phagotrophy in the cillata, tetrahymena. J. Biophys Biochem. Cytol., 9, 243-246.
- 28) 重浦卓一(1930): 口腔に寄生するトリコモナスの培養. 東京医事新誌, 27, 12-14.

AbstractSTUDIES ON ACID PHOSPHATASE IN TRICHOMONADS. 1. CYTOCHEMICAL
DEMONSTRATION OF THE ENZYME ACTIVITY IN
TRICHOMONAS TENAX AND *T. VAGINALIS*

OSAMU OHASHI

(Department of Odontology, Keio University School of Medicine, Tokyo)

Cytochemical demonstration of acid phosphatase in *T. tenax* and *T. vaginalis* was carried out by using methods of Gomori original and modified by Barka, and Barka-Anderson. In Gomori's method, best results were obtained by incubating the smeared material for 12 to 24 hours. Gomori's method modified by Barka showed better results than Gomori's original method. In these methods, the reaction product precipitated most markedly in the area surrounding nucleus, moderately in vacuolar structures near the nucleus and some vesicles which appeared to be phagosome locating near cytoplasmic membrane, and slightly in cytoplasmic membrane. The precipitates were not observed in nucleus at all.

In addition to the precipitates above described, a rod-shaped structure near the nucleus was demonstrated as clearly positive organella by Barka-Anderson's method. This structure seemed to be a parabasal body of the trichomonads based on its morphology and location. Relationship between food vacuole of the trichomonads and the lysosome was discussed with correlation to that in free-living protozoa previously reported. No definite difference between *T. tenax* and *T. vaginalis* was found in localization of the precipitates.