

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II報 電子顕微鏡による細胞化学的証明・ その局在と生理的意義の検討

大 橋 叔

慶応義塾大学医学部歯科学教室

(昭和46年12月13日 受領)

緒 言

トリコモナス類の電子顕微鏡による微細構造観察については現在までにいくつかの報告がある。すなわち動物に寄生する *Trichomonas foetus*, *Trichomonas muris* 及び人間に寄生する *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax* を対象とした報告であるが、これらはいずれも純形態学的な研究であり、トリコモナスの細胞質内微細構造物をその生理上の意義に結びつけて電子顕微鏡による観察を行なったものはまだ見あたらない。

著者(1971)は先きに *T. tenax* (口腔トリコモナス) 及び *T. vaginalis* (膣トリコモナス) について酸性フォスファターゼの細胞化学的証明を光学顕微鏡を用いて行ない、食胞と思われる細胞質内の大顆粒, parabasal body, 細胞膜などに反応の陽性所見の現われるのを見た。

今回の報告においては、電子顕微鏡による細胞化学的研究を行ない、酸性フォスファターゼの局在及び活性の出現状況を細胞質内の微細構造物と関係づけ、これによってそれらの微細構造物の生理上の意義を明らかにしようとした。*T. tenax* 及び *T. vaginalis* では貪食機能が極めて活発であることは培養、あるいは光学顕微鏡による形態学的研究により澱粉粒、細菌などを食胞 (food vacuole) 内にとり込んでいる事実から古くより言われていたことである。

酸性フォスファターゼは他の原虫類、あるいは一般の高等動物の細胞では phagosome 及びこれに関連のある構造物に主として認められており、phagosome と現在この酵素がそのマーカーとされている lysosome との関係は興味ある問題である。

実験材料ならびに方法

1) *T. tenax*, 及び *T. vaginalis*

T. tenax: 慶応義塾大学医学部附属病院歯科外来患者の歯肉嚢内より滅菌揚子にて採取、田辺千葉培地でこれを分離培養した。48時間培養後培地の液体部を攪拌し、2分~3分間静置して米粉が沈澱してからその上清を集めガーゼ3枚にて濾過したものを実験材料とした。

T. vaginalis: 患者より採取した膣トリコモナス虫体を浅見培地に分離培養し、48時間後活潑に増殖中の虫体を遠沈して集め実験材料とした。

2) 酸性フォスファターゼ反応

実験材料として得た虫体をいずれの場合も0.1M 磷酸食塩緩衝液で3回、遠沈洗滌を行つた後、4%グルタルアルデヒドにて10分~20分間前固定を行つた。この後、更に冷却下にて3回遠沈洗滌を行い、最後に得られた沈渣を後述する基質液中に懸濁し、37°C に incubate することによって反応を開始した。反応時間は30~60分間行つた。

基質液としては Barka 法(水谷1967)に従い、0.1M トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 5.0), 蒸留水, 予じめ塩酸で pH 5 にした1.25%グリセロ磷酸ナトリウムを夫々10ml ずつ混合し、これに20ml の0.2%硝酸鉛をよく振り乍ら滴下したものをを用いた。incubate 後直ちに冷却下にて0.1M 磷酸緩衝液を用いて2~3回遠沈洗滌を行い得られた沈渣を1%オスミウム酸で60分間後固定した。尚 *T. tenax* の場合は基質の分散を良くし、coupling を進め反応を円滑におこさせる意味で Bursstone ら (1957) による5%のジメチルスルホキシドを何例かに使用した。

3) 電子顕微鏡による観察

1%オスミウム酸による後固定液中に試料を1~2mm大に細切して入れた後、アルコール系列にて脱水し、Luft (1961)の組織包埋法によるエポキシ樹脂、又はKushida (1961)の包埋操作法によるスチレン樹脂で包埋を行った。この樹脂中の試料をtrimmingした後、Reichert (OM-U2型)の超薄マイクロームでガラスナイフを用いて超薄切片を作製し、得られた切片はコロジオン膜をはった銅あるいはニッケルメッシュにのせて乾燥させ30分間ウラン染色を施してから日本電子のT-6型電子顕微鏡で観察した。

4) 対照

基質液から基質を除き、蒸留水を同量に加えたものか、反応阻止剤である弗化ナトリウム(0.04%)を基質液に加えたものを用いて上記と同様の方法で観察した。

実験結果

1) 口腔トリコモナス (*T. tenax*)

酸性フォスファターゼの活性は虫体内の液胞これを形成する限界膜上、ゴルジ装置、および部分的には細胞膜上にも明瞭な陽性反応による沈着物として認められた。その他のorganellaたとえば核、軸索、鞭毛、dense bodyなどには全く反応は認められなかった。

対照として示した虫体(写真I-6)で見られるように*T. tenax*の場合細胞質内に多数の液胞が現われ、その内容も多種多様である。これらは培地内に加えられている澱粉粒、あるいは共棲する細菌類などをとり込んだいわゆる喰胞と呼ばれるものである。一方細胞質内のいわゆるdense bodyとよばれる顆粒が至つて少いことは後述の*T. vaginalis*のそれ(写真II-10)と比較すると大きな相違点である。これらの喰胞(food vacuole)はphagosomeに他ならないが酸性フォスファターゼ反応はその限界膜上に明瞭に現われるもの(写真I-2)、限界膜よりはむしろその内容物(写真I-3)あるいは内容物の膜構造(写真I-1)に現われるものなど区々であり同一虫体内でも全く反応せぬ喰胞から強く反応したものまで種々認められる。これらの喰胞の種々相に関しては考察の項で検討を加えてある。

ゴルジ装置にも陽性反応が見られたが(写真I-1)濃厚な沈着物として槽部に充満しているのみで、より詳細な反応部位の検討は不可能であった。

細胞膜における反応は部分的で虫体外面に全面的に反応している像は得られなかった(写真I-2, 3, 5)。写真I-4に見られた核の外側をとりまく沈着物のorganella

との関係は不明である。本来この部位には数列に並んだ粗面小胞体が存在するのであるが、酵素反応操作による虫体内部構造の変化のためこの反応を粗面小胞体と結びつけることは困難であった。

2) 膣トリコモナス (*T. vaginalis*)

本虫体での酸性フォスファターゼ反応は*T. tenax*と同じく液胞、lysosome、ゴルジ装置、小胞体と思われる構造物などに沈着物として陽性に認められた。虫体膜においては部分的にも反応沈着物は見られなかった。また核、軸索、鞭毛が反応陰性であったことは*T. tenax*と同一であった。

対照の虫体(写真II-10)で見られる如く本種では細胞質内にいわゆるdense bodyとよばれる顆粒が多数見られ、*T. tenax*の場合の様なheterophagyに由来した喰胞と思われるものは極めて乏しい。

*T. vaginalis*における液胞の内容物は殆んど全てがいわゆるdense bodyであることが全ての写真を通じて明らかである。つまりこれらはautophagosomeである。爾後の説明を簡略にする目的でde Dube and Wattiaux (1966)の分類に従い、これらautophagyに由来した液胞を発達段階に従つて名付けて、酸性フォスファターゼ陰性のものがautophagosome、陽性となつたものがsecondary lysosomeに属するautolysosome、液胞内での物質消化が更に進みtelolysosomeを経てdefecationに至るものとする。

*T. vaginalis*の液胞の各段階を上の名称にあてはめると、内容にdense bodyを含みながら反応陰性のもの(写真II-1)つまりprelysosomeとしてのautophagosome、液胞の限界膜に強い陽性反応を示すautolysosome(写真II-1, 2, 3, 4, 5)、全く内容を欠き、液胞の限界膜のみに強い反応を示すもの(写真II-8)。つまりlysosomeの最終段階としてのtelolysosome、更にはautophagyの終末段階であるdefecationを示すと思われる像(写真II-4)など種々な姿が認められる。また反応陽性のlysosomeと反応陰性のautophagosomeの接合によるautolysosomeの形成を思わせる像も見られる(写真II-9)。

ゴルジ装置には明瞭な陽性反応沈着物が見られるが(写真II-6, 9)、*T. tenax*の場合と同じくその局在をより詳細に観察することは不可能であった。

滑面小胞体と思われる構造物に反応の見られた例もある(写真II-5, 7)。反応操作による虫体の変性からしてこれを滑面小胞体と決めるには問題があるがその部位および構造はそれを十分に思わせるものがある。トリコ

モナスでは Golgi 装置がこの様な線状構造として現われることは無い。

細胞質内に lysosome と思われる沈着物が多数見られるが、その形態は一般細胞でのそれと同じく曲玉状、洋梨子状、歪鈴状など複雑な形である。

細胞膜上には *T. tenax* の場合と異り全く反応が見られなかった。このことは *T. tenax* では heterophagy を、*T. vaginalis* では autophagy を行なうことから虫体外膜の生理状態に相違があることを示すものかも知れない。

考 察

電子顕微鏡技術の導入によってトリコモナスの形態にもいくつかの新知見が加えられてきた。例えば軸索の構造、parabasal body、鞭毛、波動膜の構造などは光学顕微鏡で知られていた各々の形態の概念と大きく異っている。

しかしながら細胞質内の種々の顆粒については現在なおその詳細は不明で一般的に顆粒として名づけられているにすぎない。トリコモナスの電子顕微鏡像を初期に発表した Anderson (1955) によれば Costa にそつて並らぶ電子密度の高い円型顆粒は paracostal body、細胞質内に無秩序に存在する顆粒は inclusion body、あるいはミトコンドリアとされている。しかしトリコモナスにおけるミトコンドリアの有無は Anderson and Beam (1959)、Chakraborty et al. (1961) などの少数の研究を除き、電子顕微鏡的には証明されておらず (Inoki et al. 1959)、本実験でも形態学的にそれを思わせる構造物は見出されていない。更に純培養虫体を用いた生化学的研究でもミトコンドリアに局在する諸酵素活性を一般好気細胞でのその様に完全な形で証明している報告は無い。著者らの教室で行なわれたミトコンドリアに局在する脱水素酵素に関する一連の研究 (Asami 1956、真宅ら 1969、田中 1970、1971) の結果も否定的であり、嫌氣的微生物である本トリコモナスで TCA cycle がたとえ作動したとしてもそれは生理的代謝ではなく、むしろ異常代謝であると考えられる (浅見 1967)。従つてこの dense body というものがミトコンドリアである可能性は殆んどない。又 Smith and Stewart (1966) は細胞質内顆粒で鞭毛基部にあるものには dense granule、軸索に沿つて並らぶものは paracostal granule と命名しており、大野 (1960) は *T. tenax* で 300 μ m \sim 500 μ m 径の dense な顆粒その他にも形、大きさが種々の顆粒を観察しているが、これらが虫体固有のものか捕食されたもの

かは不明であるとしている。

Osada (1962) は *T. muris* について basal body、parabasal body、paracostal granule など他の研究者によつて記載された顆粒の他に細胞質内に散在する特異な膜構造物を cabbage-like body と名づけ記載している。又光学顕微鏡と位相差顕微鏡を用いて *T. vaginalis* の形態学的研究を行なつた Honigberg and King (1964) は Costa 及び parabasal apparatus にそつて規則的に走行する顆粒の他に任意に細胞質中に散在している顆粒があり腔分泌物中からの虫体では消化されつつある細菌も時としてこの様な顆粒として認められることを述べている。

以上の様にトリコモナスの純形態学的研究はかなり行なわれているが phagosome を細胞質内顆粒としてその機能面をもとりあげて研究したものは皆無といつてよく、phagosome らしきものとしてもわずかに Osada (1962) の記載した cabbage like body がそれに相当する。またいわゆる細胞質内 dense body に電子顕微鏡による細胞化学手技を用いて浅見・河村 (1967) がここに G-6-Pase を証明しているのが過去の僅かな知見である。

一方、他の寄生原虫では細胞質内の organelle と酸性フォスファターゼ活性の関係を検討したものがいくつか見られる。すなわち *Trypanosoma brucei* では鞭毛基部の口器付近の細胞質中にこの酵素活性が見られることを Brooker and Vickerman (1964) が証明し、*Toxoplasma* では Lund et al. (1966)、Hanson and Soulander (1968)、赤尾 (1971) が細胞質内に酸性フォスファターゼ陽性の空胞を発見している。

孢子虫類ではウサギの *Eimeria* の各期虫体でのこの酵素活性の比較を Frandsen (1968) が電子顕微鏡による観察に基いて発表している。

自由生活原虫の phagosome、lysosome、と酸性フォスファターゼの関係は線虫虫やアメーバ類を用いて多くの人々により検討されている。

これはこれらの原虫が単一細胞としては極めて大きいこと外在性の大きな顆粒性物質を明瞭な phagosome の中にとり込み消化してゆく過程が光学顕微鏡的にも容易に認められることなど細胞生理学上きわめて有利な材料としての特長を有しているためと思われる。

de Duve (1955) により lysosome の概念が確立されて以来 Müller and Törö (1962) が Paramecium を用いて phagosome の酸性フォスファターゼ活性の消長を細胞化学的に追求した研究は原虫の phagosome を lysosome と関連づけた最初の報告である。その中で彼

等は phagosome の形成から消滅までを酸性フォスファターゼ活性の面から4期にわけ、活性が現われない第1期、微弱な反応の見られる第2期、強い反応を示す第3期、空胞が拡大し、反応の消滅する第4期に分類し、この間約90分間位を必要とするとしている。de Duve and Wattiaux (1966)の分類では Müller and Törö (1962)の第1期のものは多分 prelysosome, 第4期のものは telolysosome であろう。

phagosome と lysosome との関係についてはかなり多くの研究が行なわれている。de Duve and Wattiaux (1966)によれば autophagy 系では酸性フォスファターゼの証明されない液胞が autophagosome であり、活性の証明される状態のものが autolysosome であり、更に進むと telolysosome となり最後に postlysosome となつて defecate されるとしている。

著者の教室では一貫してトリコモナス虫体の細胞質内 organella の生理上の意義について研究を行なつてきており、すでに Energy metabolism の一環をなすリンゴ酸脱水素酵素を指標としてトリコモナス虫体の細胞質内の organella との関連が教室の田中 (1970, 1971)によつて検討されている。著者 (1971)はこの研究の一環として酸性フォスファターゼとトリコモナス虫体の細胞質内 organella とを関連づけて、その構造物特に phagosome と lysosome との関係を明らかにするため第1報としてトリコモナス虫体の酸性フォスファターゼについての光学顕微鏡的細胞化学的所見について述べた。今回はこの関係をより明確にすべく電子顕微鏡を用いて酸性フォスファターゼの細胞化学的所見の追求を行なつた。その結果、*T. tenax* 及び *T. vaginalis* 特に後者において autophagocytosis の一連の像を観察し、更に Golgi 体、滑面小胞体、lysosome などに酸性フォスファターゼ活性の出現を見た。これらの所見は前報 (大橋 1971)の光学顕微鏡での細胞化学的所見と大体一致し、更に一層本酵素の局在を明確にし得たものである。

本実験において証明した酸性フォスファターゼ活性陽性の液胞は腔トリコモナス虫体の場合は前述の通り autolysosome と考えられる。

又本実験においては incubation の時間を大体一定とした為 Müller and Törö (1962)が *Paramecium* で観察したような形成から消滅までの時間を算出することは出来ないが、示した写真により phagosome 形成から autolysosome 形成、更に defecation に至るまでの auto phagy の経過が観察出来る。一方口腔トリコモナスにおいても酸性フォスファターゼ陽性の液胞が観察出

来たが腔トリコモナスの場合ほど明確に過程を追うことは出来なかつた。

autophagy は最初 Clark (1957)が出生直後のマウスの腎上皮細胞の電子顕微鏡的観察で一層の限界膜に囲まれ、内部に変性した mitochondria を入れた小体を認め、これを large dense body と名づけて報告したのがその初めである。その後 Novikoff (1959, 1962)は実験的に変性を起させた腎上皮細胞 肝細胞でこれを観察しこれに cytolysosome と名づけた。この生理的意義はこの頃はだま明らかでなかつたが、その後この cytolysosome に酸性フォスファターゼ活性が証明されこれも lysosome に他ならないことが判明した。Swift and Hruban (1964)は cytolysosome の生理的意義について細胞自身にとつて不用となつた自己の細胞質部分を排除するもので、細胞の自己保存反応の一つと解することが出来るといっている。現在 autolysosome の形成上最も問題となるのは、その加水分解酵素の由来であろう。heterophagy の場合は phagosome と primary lysosome との融合によつて lysosome 中の加水分解酵素が phagosome にうつされ phagolysosome が形成されることが判つているが、autophagy の場合はまだ確かめられていない。Matile (1969)によれば primary lysosome からうつされるかすでに存在する他の lysosome からうつされるか又は限界膜の形成にあづかる滑面小胞体などからうつされる、と説明されている。

本実験においても autophagosome と primary lysosome との確実な融合像を示すことは出来なかつたが、写真II-8に示したようにこれを推定するに足る像は得られている。更に写真II-9に見られるように酸性フォスファターゼ活性陽性の autolysosome と酸性フォスファターゼ活性陰性で内部に dense body をとりこんだ autophagosome との融合像も得られている。従つて autophagy の場合 heterophagy の場合と同様に一部の autophagosome は primary lysosome から加水分解酵素が運ばれ、残りの autophagosome は autolysosome から加水分解酵素が運ばれるという経路が考えられる。これは前述の Matile (1969)の述べた考えを支持するものといえよう。

尚、従来まで観察された autophagy の場合は mitochondria, ribosome などをはじめとして種々の細胞質内顆粒が autophagy の対象となつている。

本実験の場合 autophagosome 中にとりこまれているものは殆んど全てがいわゆる dense body といわれるもので、トリコモナス虫体の生理上このいわゆる dense

body といわれるものの機能がいかなるものか大変興味のある問題であるが明らかでない。更に、ゴルジ体及び滑面小胞体と思われる構造物に認められた酸性フォスファターゼ活性はゴルジ体と primary lysosome との異同の問題もあり大変興味があるが、明確な結論を出せるほど資料が得られなかった。ゴルジ体及び小胞体における酸性フォスファターゼは高等動物の肝臓、脾臓などを用いて良く研究されている。

Ogawa, Shinonaga, Suzuki (1962 b) はラットの小脳を用いてゴルジ体が lysosome と密接な関係にあることを述べ、Ogawa, Matsutani, Shinonaga (1962 a) はラットの空腸を用いて、ムチンの分泌過程において Goblet cell のゴルジ体、滑面小胞体に酸性フォスファターゼ活性が現われることを示し、この酵素がゴルジ体を介し、ムチンの分泌顆粒形成に関係を持っていることを示唆している。又、Carō (1961) はブタの脾臓を用いた研究で細胞質内で合成された蛋白質がゴルジ嚢内に集まり、そこで次第に分泌顆粒の形をとって行くとして述べている。いずれにせよ、本実験条件下では、*T. tenax* と *T. vaginalis* の虫体内で、いわゆる food vacuole として取扱われる構造物は、その本質は相当に異なるものであり、前者では heterophagosome、後者では autophagosome であることは興味深い。前者では澱粉粒や細菌などの固形物を含んだ培地内で培養されているが、後者では固形物を欠く液体培地で純粋に培養されているがために、栄養摂取能として pinocytosis は証明されている(真宅 1966)が、phagocytosis を行う必要の無い条件下に棲息している点が両種の phagosome の質的な相違点であるかも知れない。自然の寄生局所である腔内の虫体についてこの問題を再検討する必要がある。

T. tenax の場合にのみ認められた虫体膜の部分的酸性フォスファターゼ活性の生理的意義は不明であるが、Sommer (1965)は同じく鞭毛虫の *Euglena gracilis* を用いて虫体表層の pericellular ridge に酸性フォスファターゼ活性を認めており、本実験の結果と似た所見を発表している。*T. vaginalis* においては虫体膜に酸性フォスファターゼ活性を全く見出し得なかったがこれは両種間の本質的な差とするよりは、上述の様な培養条件の相違による適応変化と考える方が妥当であろう。

酸性フォスファターゼの生理的意義については未だ詳細に知られてはいない。基質特異性が乏しい点などから考えて恐らく数多くの加水分解反応に関与していることは確かであろうが明らかではない。本酵素の細胞生理学上の問題は大変興味深い。

結 論

口腔トリコモナス、腔トリコモナスの培養虫体を材料として酸性フォスファターゼ活性を電子顕微鏡による細胞化学的方法によって証明し、その局在、生理的意義についての検討を行った。

- 1) 口腔トリコモナスにおいては喰胞、ゴルジ装置、細胞膜の一部分に明らかな本酵素活性を認めた。
- 2) 腔トリコモナスでは喰胞、lysosome、ゴルジ装置滑面小胞体と思われる構造物などに活性の出現を見た。細胞膜は全く活性を欠いていた。
- 3) 本実験に用いた材料に関する限り、口腔トリコモナスの喰胞は殆んど全て heterophagy に由来した heterophagosome であり、一方、腔トリコモナスの喰胞はいわゆる dense body を内容とした autophagy に由来した autophagosome である。両者の喰胞には質的な相違があることが明らかにされた。
- 4) 腔トリコモナスにおいては autophagosome が lysosome と接合し autolysosome を形成し、発達して defection に至るまでの一連の経過を追求し得た。

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、浅見敬三助教授並びに歯科学教室中村保夫教授に深甚の謝意を表すと同時に御協力いただいた竹内勤助手を初め寄生虫学教室の皆様、並びに電子顕微鏡研究室藤原達司氏に感謝の意を表します。

(本論文の要旨は第39回日本寄生虫学会総会に於て発表した)。

文 献

- 1) 赤尾信吉(1971)：原虫におけるライソゾーム。細胞, 3, 28-29.
- 2) Anderson. E. (1955)：The Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis*. J. Protozool. 2, 114-123.
- 3) Anderson. E. and Beam. H. W. (1959)：The Cytology of *Trichomonas* as revealed by the electron microscope. J. Morph. 104, 205-235.
- 4) Asami. K. (1956)：Physiological studies on *Trichomonas vaginalis*. Keio. J. Med. 5, 169-190.
- 5) 浅見敬三(1967)：トリコモナス類—生理。生化学および構造機能との関連から、医学のあゆみ, 61, 302-304.
- 6) 浅見敬三・河村信夫(1967)：腔トリコモナスの G-6-Pase の局在について。寄生虫学雑誌, 16 (4), 263.

- 7) Brooker. B. E, and Vickerman. K. (1964) : acid phosphatase in Trypanosomes. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 58, 293-294.
- 8) Burstone. M. S, and Keyes. P. H. (1957) : The effect of inhibition of enzyme activity on developing bone and dentin. Am. J. Pathol. 33, 1229-1235.
- 9) Caro. L. G. (1961) : Electrone microscopic radioautography of thin sections: The golgi zone as assite of protein concentration in pancreatic a ciner cell. J. Biophys. bichem. Cytol. 10, 37-44.
- 10) Chakraborty. J, Das Gupta. n, n. and Ray. h. N. (1961) : An electron microscope study of Trichomonas criceti. Cytologia. 26, 320-326.
- 11) Clark. S. L. (1957) : Cellular differentlation in the Kidneys of newborn mice studies with the electrone microscopy. J. Biophy. Biochem. 3, 349-360.
- 12) De Duve C. (1957) : Intracellular distributions patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem. J. 60, 604-617.
- 13) de Duve C, and Wattiaux. (1966) : Function of lysosomes. Ann. Rev. Physiol. 28, 435-492.
- 14) Frandsen. J. C. (1968) : Eimeria stiedae: Cytochemical identification of acid and alkaline phosphatase, Carboxilic ester hydrolases, and Succinate, Lactate, and G-6-P, Dehydrogenases in Endogenous stage from Rabbit tissues. Exptl. Parasitol. parasit. 23, 398-411.
- 15) Honigberg. B. M, and King. V. M. (1964) : Structure of Trichomonas vaginalis Donne. J. Parasitol. 50, 345-364.
- 16) Hanson. H. A, and Sourander. P. (1968) : Ultrastructural demonstration of lysosomes in Toxoplasma gondii. Acta Patho. et Microbiol. Scandinavia. 74, 431-444.
- 17) Inoki. S, Nakanishi, K. and Nakabayoshi, T. (1959) : Observation on Trichomonas vaginalis by electron microscopy. Biken's. J. 2, 21-24.
- 18) Kushida, H. (1961) : A styrene methacrylate resin embedding method for ultrachin sectioning. J. Electronmicoroscopy. 10, 16-19.
- 19) Luft, J, H, (1961) : Improvements in epoxy resin embedding methods, J, Biophy, and Biochem, Cytol, 9, 409-414.
- 20) Lund, E, Hamsson H, A, Tycke, E, and Sourander, P, (1966) : Emzymatic activites of Toxoplasma gondii. Acta, Pathol, etd Microbiol, Scandinavia 68, 59-67.
- 21) Matile, Ph, (1969) : Vacuoles as lysosome of plant cells, Biochem, J, 111, 26-27.
- 22) 水谷 昭(1967) : 酵素組織化学, 304頁, 朝倉書店, 東京.
- 23) Müller, M, and Törö, I, (1962) : Studies on feedind and digestion in Protozoa, III, Acid phosphatase activity in food vacuoles of Paramecium multimicronucleatum, J, Protozool, 9, 98-102.
- 24) Novikoff, A, B, (1959) : The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis, J, Biophy, Biochem, Cytol, 6, 136-138.
- 25) Novikoff, A, B, (1962) : Cytolysosome and mitochondrial degeneration, J, Cell, Biol, 15, 140-146.
- 26) Ogawa, K, Masutani, K, and Shinonaga, Y, (1962a) : Electron histochemical demonstration of acid phosphatase in normal rat jejunum, J, Histochem, Cytochem, 10, 228-229.
- 27) Ogawa, K, Shinonaga, Y, and Suzuki, T, (1962b) : Electron histochemical demonstration of acid phosphatase activity in the rat cerebellum, J, Electronmicroscopy, 11, 111-113.
- 28) 大橋 叔(1971) : トリコモナス類の酸性フォスファターゼに関する研究. I, 光学顕微鏡による細胞化学的証明. 寄生虫学雑誌, 20, 399-405.
- 29) 大野正仁(1960) : Trichomonase tenax の電子顕微鏡に由る微細構造に関する研究. 大阪大学医学雑誌, 12, 563-569.
- 30) Osada, M, (1962) : Electron microscopic studies on protzoa, II, Studies on Trichomonas muris, Keio, J, med, 11, 227-252.
- 31) 真宅 篤(1966) : トリコモナスのフェリチン摂取について. 寄生虫学雑誌, 15(4), 64.
- 32) 真宅 篤・河村信夫(1969) : 膾トリコモナスの脱水素酵素について. 寄生虫学会雑誌, 18(4), 644-645.
- 33) Smith, B, F, and Stewart, B, T, (1966) : Fine structure of Trichomonas vaginalis, Exptl. Parasitol., 19, 52-63.
- 34) Sommer, J, R, and Blum, J, J, (1965) : Cytochemical localization of acid phosphatases in Euglena gracilis. J. Cell. Biol. 24, 235-252.
- 35) Swift, H. and Hruban, Z. (1964) : Focal degradation as a biological process. Federation proceedings. 23, 1026-1037.
- 36) 田中耕誠(1970) : トリコモナスの2~3の脱水素酵素に関する細胞化学的研究. 寄生虫学雑誌, 19, 603-609.
- 37) 田中耕誠(1971) : Trichomonas vaginalis の脱水素酵素に関する生化学的研究, 寄生虫学雑誌 20, 145-156.

Abstract

STUDIES ON ACID PHOSPHATASE IN TRICHOMONADS II. ELECTRON MICROSCOPICAL DEMONSTRATION OF THE ACTIVITY

OSAMU OHASHI

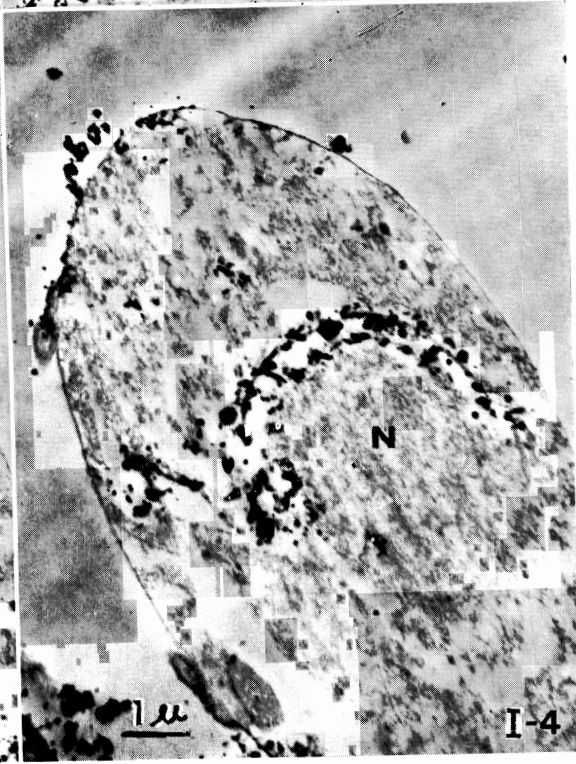
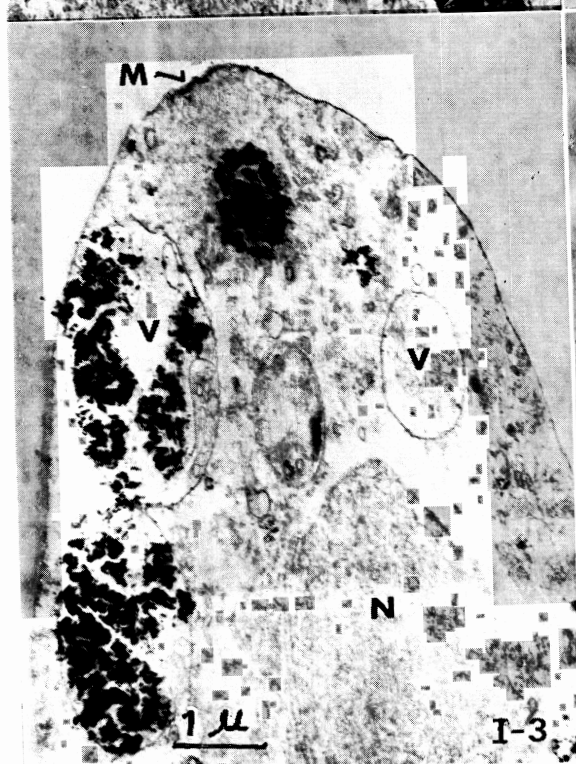
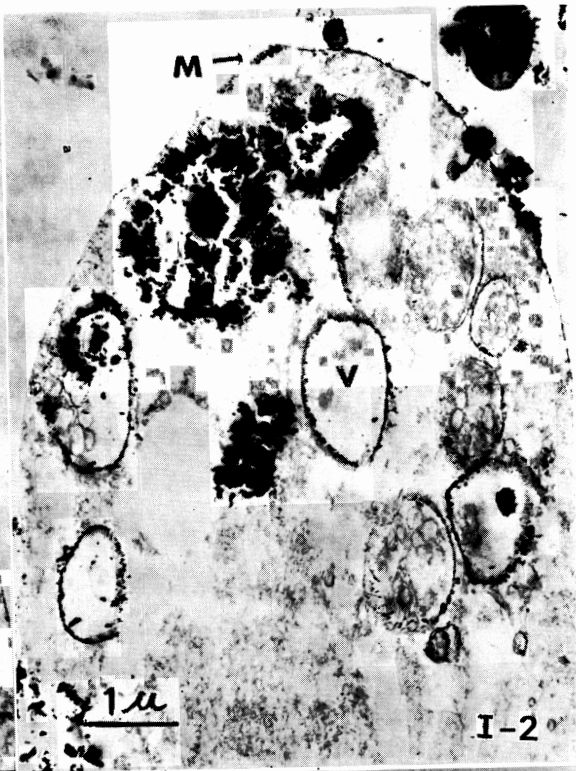
Department of Odontology, Keio University Medical School, Tokyo

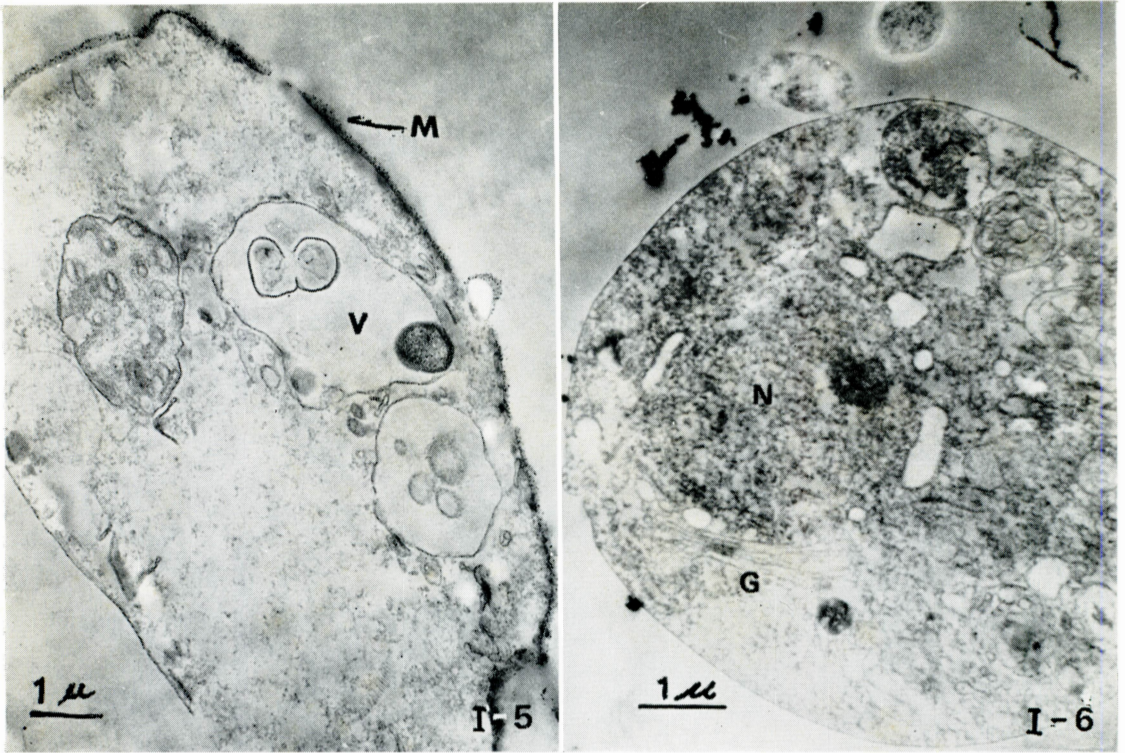
Localization of acid phosphatase activity in *Trichomonas tenax* and *T. vaginalis* was demonstrated by means of electronmicroscopical cytochemistry technique. A strain of *T. tenax* which has been maintained serially in Tanabe-Chiba medium with growing bacteriae was used throughout the present studies. *T. vaginalis* used was a strain maintained axenically in cystein-bouillon-serum medium. The actively motile trichomonads in the culture were collected by centrifugation with cold 0.1 M phosphate buffered saline, and thereafter they were pre-fixed by 10.0% glutar-aldehyde for 10 to 20 minutes. The incubation medium for the acid phosphatase reaction composed of; 10.0 ml of 0.1 M Tris-maleate buffer (pH 5.0), 10.0 ml of Aq. dest., 10.0 ml of 1.25% sod. glycerophosphate, and 20.0 ml of lead nitrate. After the incubation at 37°C for 30 to 60 minutes, the material was washed by cold buffer solution and fixed again by 1.0% osmic acid for 60 minutes at 4°C. The fixed materials which were dehydrated by graduated alcohol and embedded by styrene were cut using Reichert OM-U2 ultrathin microtome and observed by JEC model T-6 electron-microscope.

The incubation medium without the substrate or the medium containing sodium fluoride as an inhibitor was used for control.

Trichomonas tenax: Acid phosphatase activity was demonstrated definitely on part of cytoplasmic membrane, in cytoplasmic vacuoles as well as the membrane of the vacuoles, and in Golgi apparatus. No reaction was found in the other organelles such as nucleus, axostyle or dense body. In case of *T. tenax*, many food vacuoles containing probably starch grain or bacterial cell were found in the cytoplasm, while very few dense bodies were found in contrast to *T. vaginalis*. The reaction product precipitated in different ways in the food vacuoles showing the reaction only on the limiting membrane, both the membrane and inclusion, or only in the inclusion. Even in the same cell, some of the food vacuoles did not show any reaction at all.

Trichomonas vaginalis: The precipitates were found in cytoplasmic organelles such as vacuoles, lysosomes, Golgi apparatus and the structure which looked like endoplasmic reticulum. No reaction was recognized on the cell membrane at all. The organelles other than those above-described were completely negative in the reaction. In case of *T. vaginalis*, almost all of inclusions of the food vacuoles was identified to be a so-called dense body which was scattered throughout the cytoplasm. Various Processes of digestion of the dense body in the food vacuoles were demonstrated in the formation of the reaction product in food vacuole membrane/or dense body inside the vacuole. These findings indicated that the food vacuole of *T. vaginalis* means autophagosome, whereas those of *T. tenax* are heterophagosome. Size and shape of lysosome scattered in the cytoplasm were quite same as that of the general cells. So far as the materials used in the present studies are concerned, it seemed that the food vacuoles of *T. tenax* and *T. vaginalis* have a large difference in their quality.





写真説明

写真I 口腔トリコモナスにおける酸性フォスファターゼの局在

写真I-1 喰胞 (V) の内容物の膜構造並にゴルジ槽 (G) に陽性反応

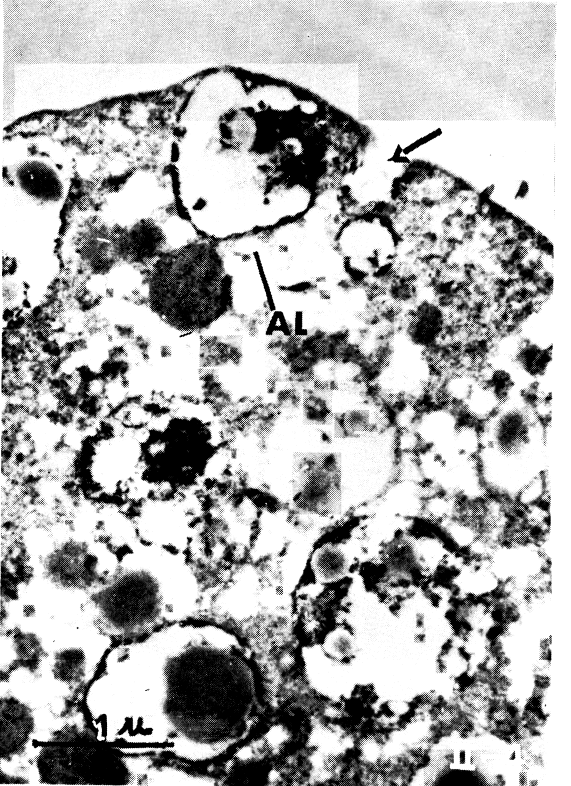
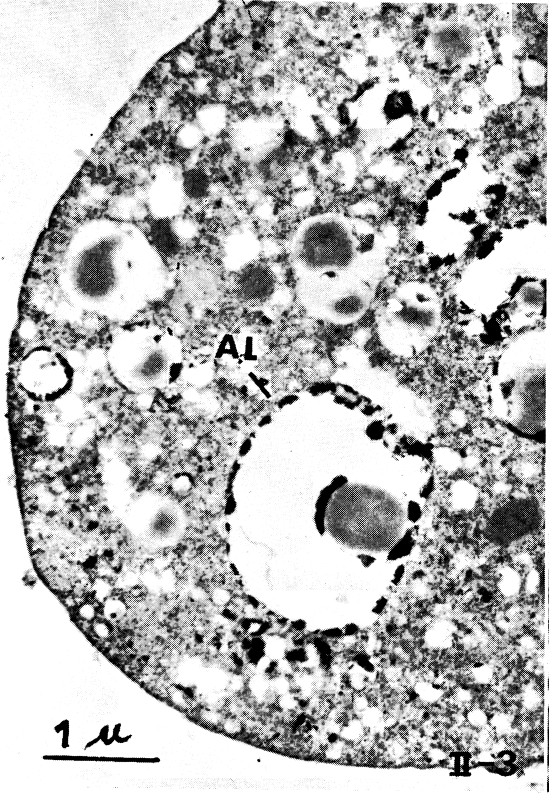
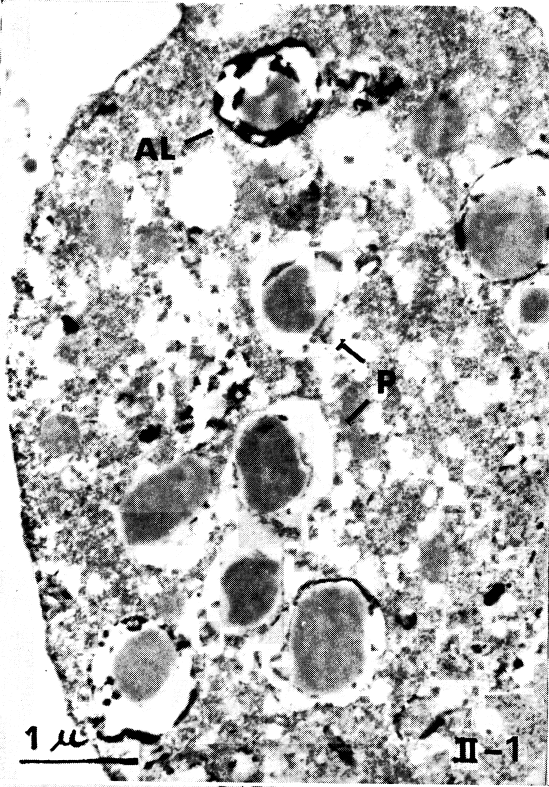
写真I-2 喰胞 (V) の限界膜上と細胞膜 (M) の一部に陽性反応

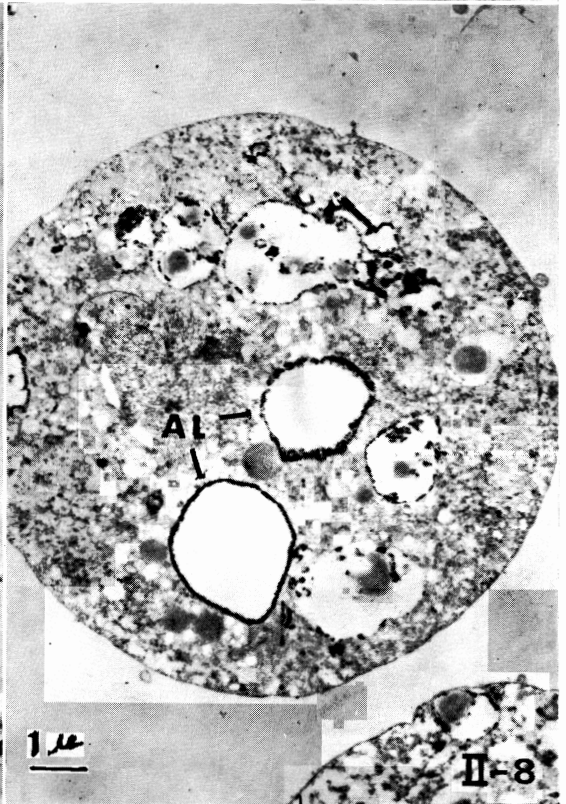
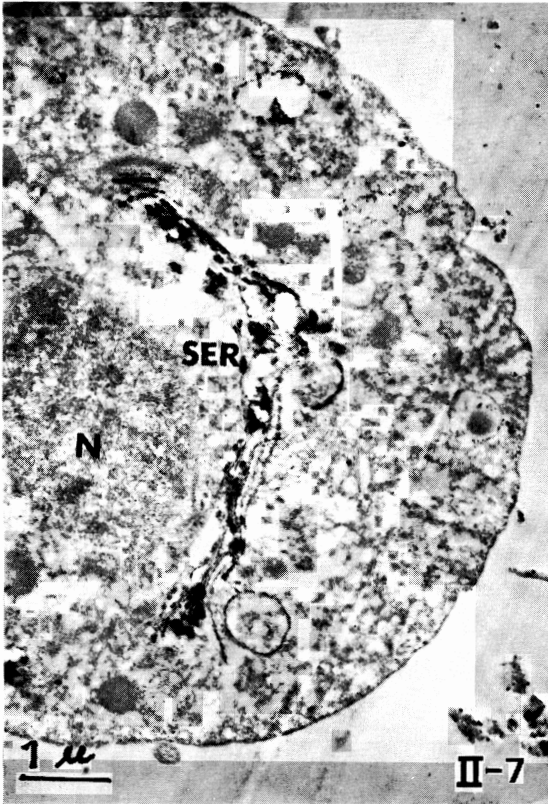
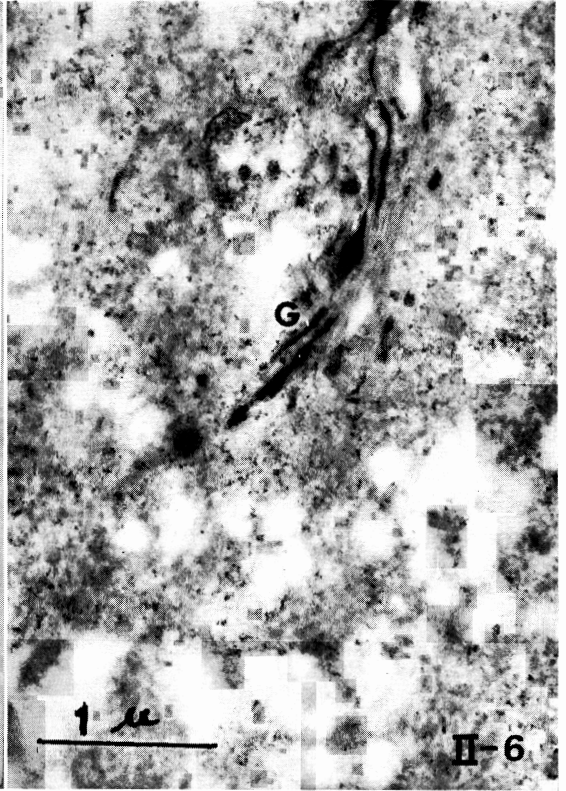
写真I-3 喰胞 (V) の内容物と細胞膜 (M) の一部に陽性反応

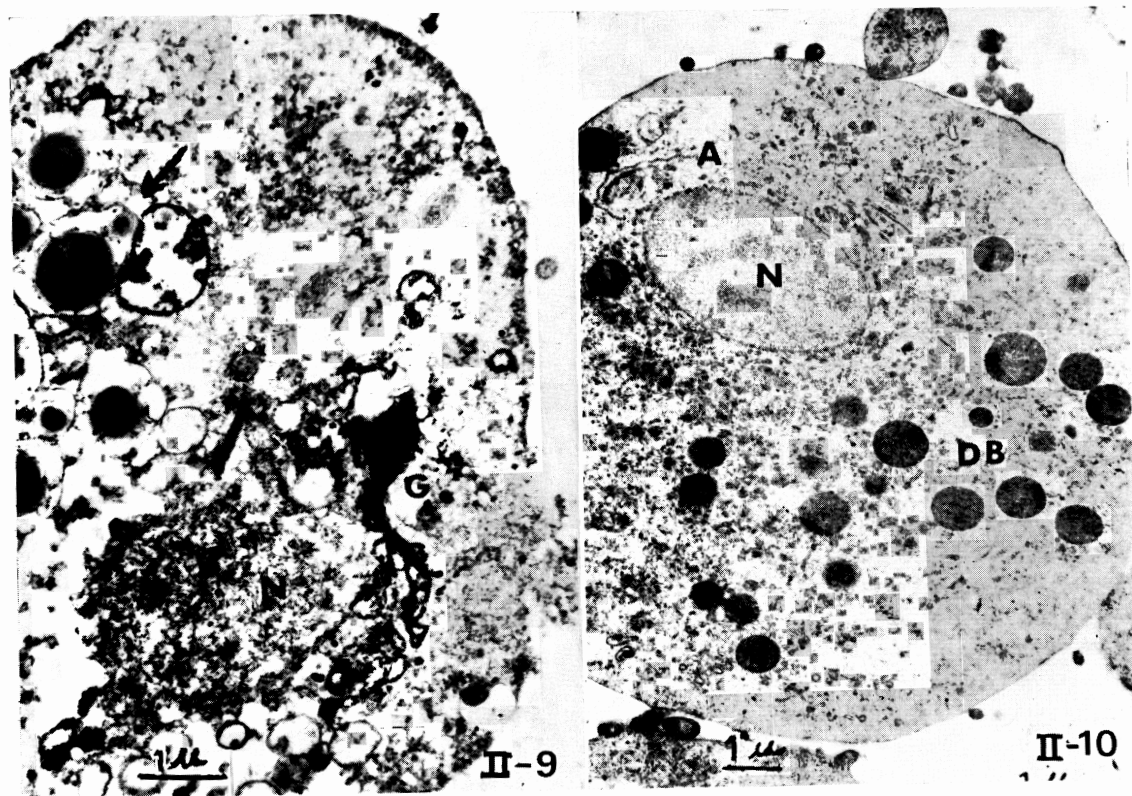
写真I-4 核 (N) 周囲の構造物にも陽性反応沈着物を認める

写真I-5 細胞膜 (M) に陽性反応

写真I-6 対照N:核, G:ゴルジ装置







写真説明

写真II 腫トリコモナスにおける酸性フォスファターゼの局在

写真II-1 液胞に dense body を含み反応陰性の phagosome (P) 液胞の限界膜に陽性反応を示す lysosome (AL)

写真II-1, 2, 3, 4, 5 液胞に dense body を含み限界膜に強い陽性反応を示す (AL)

写真II-4 Autophagy の終末段階である defection を示す(矢印)

写真II-6, 9 ゴルジ装置 (G) にも明確な陽性反応沈着物が認められる

写真II-7 滑面小胞体 (SER) と思われる構造物にも陽性反応を認める

写真II-3 内容を欠いた液胞の限界膜に強い陽性反応

写真II-9 反応陽性の lysosome と反応陰性の autolysosome の接合による autolysosome の形成を思わせる像(矢印)

写真II-10 対照 N:核, A:Axostyle, DB:Dense body.