鶏コクシジウムの基礎生物学的研究

Eimeria tenella, *E. brunetti* および

E. acervulina の孵化鶏卵培養

板垣啓三郎・坪倉 操・平 靖*

鳥取大学農学部家畜微生物学教室

(昭和46年8月7日受付)

鶏コクシジウムがもつ極めて強い宿主特異性については、よく知られているところである。本原虫は、野鶏を除いては家鶏以外の動物に感染しない。寄生臓器も厳密に腸管に限られ、また、種類によっては強い部位選択性を有する。この寄生部位特異性は、オーシストまたはスポロゾイトの非経口接種によっても保たれる。^{2,11,19)}

ところが近年 LONG¹⁰⁾ は、*Eimeria tenella* のスポロゾイトを孵化鶏卵の尿液腔内に接種することにより、漿尿膜 (CAM) 内でオーシストが形成される事実を明らかにし、固有の発育場所である鶏の盲腸以外でも、ライフサイクルを完了し得るという興味ある知見を発表した。さらに LONG¹²⁾ は、*E. tenella* のほか、*E. brunetti* および *E. mivati* も、CAM 内でオーシストを完成するが、*E. necatrix* は Asexual stage の発育にとどまり、*E. acervulina* および *E. maxima* は全く発育しないことを明らかにした。次いで RYLEY¹⁸⁾ は、*E. tenella* ではオーシストの発育をみたが、*E. brunetti* では発育期の虫体を認めなかったと報告している。石井および大永⁹⁾ は、*E. brunetti* の発育性に関する LONG¹²⁾ および RYLEY¹⁸⁾ の成績の違いに注目し、追試した結果、LONG¹²⁾ と同様、*E. tenella* および *E. brunetti* が、いずれも CAM 内で発育を完了する成績を得た。以上は CAM における発育に関する報告であるが、最近 LONG¹⁴⁾ は、*E. tenella* のスポロゾイトを孵化鶏卵の静脈内に接種し、肝臓内に Sexual stage の虫体を検出した。石井および大永⁹⁾ は、卵黄嚢内接種により、卵黄柄の組織内にシズントを検出している。

一方、孵化鶏卵培養とほとんど時を同じくして、*E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina* および *E. bovis* では、組織培養も試みられているが、^{1,4-7,13,15,16,20-24)} 供試細胞は正常寄生を行なう細胞ではない。

コクシジウムの培養に関する研究は、近年になって始められたものであるため、宿主特異性あるいは種類による発育の差異についての研究は、これからの問題として残されている。また培養虫体の発育様相に関する観察も十分ではない。

著者らは、上述の問題を含めたコクシジウムの基礎生物学的な研究を進める上に、培養法が有用な方法であると考え、鶏コクシジウムの代表的な種について、培養試験を行なっている。本試験は、*E. tenella*, *E. brunetti* および *E. acervulina* を用いて、孵化鶏卵培養に関する追試を行なうと同時に、その発育について、本原虫の生物学的な面より検討を加えることを目的としたものである。

材料および方法

コクシジウム：*E. tenella*, *E. brunetti* および *E. acervulina* の3種を用いた。*E. tenella* および *E. acervulina* は、著者らが野外例より分離したものである。*E. brunetti* は、上野製薬株式会社・渡辺正太博士より分与を受けた。

孵化鶏卵：Hy-Line 種または肉用種の孵化鶏卵を用い、38°C で孵卵した。

溶液：(a) PBS. 組織培養に常用されている液をそのまま用いた。(b) YLE 培地 (Yeast extract-Lactalbumin hydrolysate-Earle's). Earle 液に Lactalbumin 水解物 (NBC) 0.5%, Yeast extract (Difco) 0.1% の割に溶解し、Penicillin

* 現在の所属：住友化学工業株式会社医薬事業部研究部

100u/ml および Streptomycin 0.1 mg/ml を加える。(c) 消化液. 0.25% Trypsin (Difco 1:250) PBS 溶液に, 5% の割に新鮮な雞胆汁を加える。

オーシストの収集および洗浄: 単個接種によって得たオーシストを経口投与した Hy-line 雄雞の糞を集め, 3% 重クロム酸カリ溶液に浮遊して発育させた後, 2,000 rpm 5 分間遠心して沈殿を集める。これを水道水で再浮遊し, 同様の操作を 5~6 回くり返して, 主として細菌と重クロム酸カリを除く。次に飽和食塩水に再浮遊し, 3,000rpm 10 分間遠心する。オーシストは白色の層となって浮き上るので, 上液のおよそ 1/3 を集める。沈殿は同様の処理を合計 3 回行なう。集めた上液は, 水道水でおよそ 10 倍に希釈するか, セロファン・チューブを用い水道水で一夜透析した後, 1,000 rpm 3 分間遠心により沈殿を集める。この沈殿は, ほとんどオーシストのみからなるが, 要すれば水道水で数回洗浄する。

スポロゾイトの脱囊: 洗浄オーシストに同量の水道水を加え, さらにこの浮遊液と同量の 5% 次亜塩素酸ナトリウム液を加える。室温に 2~12 時間置いた後, 2,000 rpm 3 分間遠心により, 滅菌蒸留水で 3 回洗浄する。以下は DORAN and FARR³⁾ の方法に準じて, スポロゾイトの脱囊を行なう。

洗浄オーシストを乳鉢で約 40 分間磨砕する。鏡検で 90% 以上のスポロシストが脱出していることを確かめた後, PBS に浮遊し, 2,000 rpm 5 分間遠心して沈殿を得る。これにおよそ 2 倍量の消化液を加えて, 40°C の温浴中で時々振盪しながら消化する。鏡検により, スポロシスト: スポロゾイトの比が 1:5 以上となれば, 消化を中止した。所要時間は 30 分~1 時間半であった。2,000 rpm 5 分間遠心して上液を捨て, YLE 培地で 2 回洗浄する。最後は 300 rpm 3 分間の遠心により上液を取り, これを 2,000 rpm 5 分間遠心すると, スポロゾイトは沈殿部に集まる。要すればさらに 300 rpm と 2,000 rpm の遠心の組み合わせにより夾雑物を除く。

次いで, 抗生物質を多量に加えた YLE 培地 (Penicillin 1,000u/ml, Streptomycin 5mg/ml) に適量浮遊し, 37°C に 30 分静置した後, 血球計算盤でスポロゾイトを数え, 所要濃度になるよう

培地で希釈し, 接種材料とした。

メロゾイトの収集: *E. tenella* についてのみ行なった。5~10×10⁴ 個のオーシストを感染させた雞を 4~5 日目にと殺し, 盲腸を摘出する。その内容および軽くかき取った腸粘膜を, 乳鉢で軽く磨砕する。YLE 培地を加え, ガーゼ 2 枚で濾過し, 濾液を 2,000 rpm 5 分間遠心すると, メロゾイトは沈殿の上層に集まる。この層をピペットで吸い取り, YLE 培地に浮遊し, 300 rpm 5 分間遠心した上液から, 2,000 rpm 5 分遠心により沈殿を得た。以下はスポロゾイトと同様に処理して接種材料とした。

接種および検査方法: スポロゾイトまたはメロゾイトを, YLE 培地 0.1~0.2 ml 中に 1×10⁴~5×10⁶ 個を含むよう調製し, 10 日令の孵化鶏卵の尿液腔内に接種した。38°C の孵卵器に納め, 翌日より 10 日目まで, 毎日 1~3 個の接種卵を取り出し検査した。被検材料は主として CAM と尿液であるが, そのほか羊膜および胎児の肝, 脾, 腎および腸管も調べた。CAM および羊膜は, 少なくとも膜全体の 1/2 から, およそ 1×4 cm の短冊形の標本を切り取り, スライドガラスに貼り付け, カバーガラスで覆って, 200~400 倍の拡大で鏡検する。生鮮標本で観察した後はホルマリンで固定し, 常法によりパラフィン切片標本とし, ヘマトキシリン・エオジン染色および PAS 染色を施して観察した。尿液は軽く遠心して得た沈渣につき, また臓器はすべて切片標本として検査した。

実験成績

1. *E. tenella*

a. スポロゾイト接種例: 5×10⁴ および 1×10⁵ 個のスポロゾイトを接種した。1×10⁵ 個では, 切片標本の検査で, 3 日目より未成熟シズントが観察された (Fig. 1), 同時に成熟シズントもごく少数検出されるが (Figs. 2 および 3), 5 および 6 日目に急激に増加し, 遊離メロゾイトも多い (Figs. 4 および 5)。6 日目の一部の例には, 羊膜にも多数の寄生が認められた (Fig. 6)。7 日目にはシズントは急に消失し, 代って少数のガメトサイトが発育する。8 日目にガメートおよびオーシストが検出されるが, いずれも少数である (Fig. 7)。シ

ゾントは全く検出されない。6日目に、少数のメロゾイトがバナナの房状に配列された小型シゾントを認めたが、これが第3代シゾントかどうかは、明らかにされなかった。

生鮮標本では、3日目にシゾントを確認することは困難で、4日目に初めて検出した。5および6日目には、切片標本と同様、多数の成熟シゾントおよび遊離メロゾイトが観察された (Figs. 8 および 9)。これらは同時に尿液中にも検出される。ガメトサイトは7日目に、オーシストは8日目より検出された (Fig. 10)。

胎児は5, 6 および 7日目に多数斃死した。これらの例ではすべて CAM より出血し、尿液腔は多量の血液を含む。一般には、原虫の寄生に基づく変化はほとんどないが、シゾントは概して集合して发育する傾向があるので (Fig. 11)、寄生部位が隆起する例があった (Fig. 12)。また、多数寄生した部位では、CAM の上皮の一部の剝離が観察される。興味ある点は、发育期により寄生部位が異なることである。初代シゾントは表層の細胞内に寄生し、第2代シゾントは表層の直下より膜の深部およそ $1/3$ の部位に多く検出された。次いで Sexual stage の虫体はすべて表層にのみ寄生する。

各发育期の形態およびメロゾイト数は、正常宿主内のそれと特に異なるところがないが、5および6日目の切片標本で、シゾントの Protoplasm が大小の球状に分割したものが多数観察された (Fig. 13)。これが変性過程のものか否かは明らかでないが、中には Blastophore 様の虫体も検出された (Fig. 14)。また Protoplasm の周囲からメロゾイトが发育する、いわゆる Budding と思われる像も見られた (Fig. 15)。表層の細胞に寄生した虫体の周囲には、不染性の空胞様構造が認められる。

5×10^4 個のスプロゾイト接種例も、 1×10^5 個接種例とはほぼ同じ所見であったが、成熟シゾントは5日目に、オーシストは10日目に検出された。

b. メロゾイト接種例: 1×10^6 個接種例の切片標本で、2日目にガメトサイトが検出できた。3日目にマクロガメートが多数観察されたが、オーシストは検出できなかった。 5×10^6 個接種例では、3日目に多数のマクロガメートと、少数のミ

クロガメートが観察され (Fig. 16)、5日目には急に減少した。同時に少数のオーシストが検出された。いずれの接種例にも、Asexual stage の虫体は全く認められない。

2. *E. brunetti*

スプロゾイト 1×10^5 個の接種により、6日目に未成熟シゾントが検出され、次いで7日目に成熟シゾントを観察した (Fig. 17)。オーシストは9日目に認められた (Fig. 18)。すべての发育型とも、*E. tenella* に比して著しく少数である。

3. *E. acervulina*

スプロゾイト 5×10^4 , 1×10^5 および 1×10^6 個の接種で、全く寄生を認めなかった。

考 察

1965年に LONG¹⁰⁾ が成功した孵化鶏卵培養法は、厳格な部位選択性を有するコクシジウムを、固有宿主以外で发育させたという点で、極めて画期的な研究といえよう。さらに LONG¹²⁾ は、種類によって发育性が異なる点を指摘した。HORTON-SMITH and LONG⁸⁾ は、LONG¹²⁾ の実験による孵化鶏卵内での发育性と、鶏の盲腸における发育性とがよく一致することを明らかにした。著者らは、*E. tenella*, *E. brunetti* および *E. acervulina* の3種について試験した結果、LONG¹²⁾ および石井および大永⁹⁾ らの知見を肯定し得たほか、コクシジウムの基礎生物学的な研究を推進する上に、若干の示唆が得られたものと考ええる。

著者らは LONG¹⁰⁾ の成績を参考とし、孵化鶏卵の尿液腔内接種を行ない、胎児の各臓器を検査した結果、CAM が发育可能部位であることを確認した。最近 LONG¹⁴⁾ は鶏胎児の静脈内にスプロゾイトを接種し、肝臓に寄生を見ているが、发育の様相を観察するには CAM が適していると考ええる。

孵化鶏卵内における发育が、正常宿主の場合より遅れることは、今までの研究者が同様に指摘するところである。著者らの試験においても、オーシストの産生は、*E. tenella* で1日、*E. brunetti* で4日遅れた。観察方法によって検出日数に差が生ずることは、著者らの成績で予想できるとしても、发育の遅れは否定できない。組織培養では、培養温度が发育に著しい影響を与えるといわれて

いる。^{13,16)} 著者らの *E. brunetti* の組織培養でも、37°C では発育せず、40°C で発育する成績を得ている。これらのことから、ことに *E. brunetti* における発育遅延の一因としては、培養温度が考えられる。いずれにしても、生体に比して抵抗性が極めて弱いと考えられる孵化鶏卵で、観察される発育の遅延は、CAM が原虫の発育に必ずしも好適な場でないことを示している。

メロゾイトの接種では、LONG¹⁰⁾ は 1.35×10^6 個で 48~72 時間後に多数のオーシストが回収できたと報告している。著者らの試験では、 1×10^6 個では、2 日目にマクロガメートを検出したのみで、オーシストは陰性であった。この成績の違いは、供試メロゾイトの性状の差に基づくものと考えられる。メロゾイト接種例では、全く Asexual stage への発育は起こらず、すべて Sexual stage へ移行していることは、接種時のメロゾイトが、すでに次の Stage へ移行すべき性格を備えていたものと考えてよい。そして、 1×10^6 個接種例でオーシストが検出されなかったことは、ミクロガメトサイトに進む虫体が少数であったことによると想像される。

シゾントの数に比して、Sexual stage の発育は著しく悪く、さらにオーシストの形成が一段と少数であることは、LONG¹³⁾ が述べているように、Sexual stage の発育および受精が、Asexual stage に比して厳しい条件を要求するものと考えられる。

CAM 内における原虫の寄生部位については、あまり注意されていない。わずかに LONG¹²⁾ が *E. mivati* について、シゾントは上皮細胞の内側で発育し、Sexual stage のものは上皮細胞内で発育すると述べているに過ぎない。著者らは、*E. tenella* において、初代シゾントおよび Sexual stage の虫体が、表皮細胞内で発育し、第2代シゾントが膜の内層で発育することを認めている。メロゾイトの細胞嗜好性、あるいは侵入力と関係があらうが、Sexual stage の場合においては、オーシストとなって宿主細胞より離脱する準備とも考えられる。

虫体の形態については、通常の発育型では、正常宿主内のものと異なるところがないが、LONG¹³⁾ および STROUT and OUELLETTE²⁴⁾ が、*E. tenella* の組織培養で認めている Blastophore type、ある

いは Budding を形成した発育型を検出した。鶏コクシジウムでは、正常宿主内でこのような発育は見られず¹³⁾、組織培養で初めて知られたものであるが、詳細な検討は行なわれていない。著者らの試験で、孵化鶏卵培養でも検出されることが、明らかとなったが、発育環境が不良なために生じる異常型かどうか、今後明らかにしたい。虫体の周囲に見られる parasitophoric vacuole については、生体でも認められているが、組織培養では一層明瞭である^{4,6,16,20,24)}。この意義についても、今後の検討が必要である。

孵化鶏卵のような通常でない部位で発育することについて、LONG¹⁴⁾ は宿主の免疫能力の欠除を重視しているが、なお明らかでない点が多い。種によって発育に差異があることと合わせて検討する必要がある。著者らはこの点に関して、組織培養と平行して試験中であるが、孵化鶏卵に発育可能な種は、組織培養でも発育が可能であり、それらは一般に病原性が強いといわれている種である点に注目したい。これについては次報で述べる。

孵化鶏卵培養の利用性につき、RYLEY^{17,18)} は抗コクシジウム剤の薬効の機序に対する研究に応用できると述べている。LONG^{10,12)} は、種の保存の簡便化、抗原虫剤の評価および純粋な抗原の供給のために、また宿主の抵抗が最少であるので、発育状態の研究に適すると考えた。また、HORTON-SMITH and LONG⁸⁾ は発育の有無から種の同定、および特定の種の純化に役立つといい、STROUT and OUELLETTE²⁴⁾ は組織培養法が、コクシジウムの基礎生物学的研究に利用できると考えている。コクシジウムの Life-cycle についての詳細な研究には、鶏のような複雑な宿主系より、単純な孵化鶏卵または組織培養法を用いることが、より有利であることは否定できない。種類による発育の差がどのような原因によるか、Asexual stage から Sexual stage への移行の機構、受精現象または寄生部位の選択性など、多くの興味ある問題が解明できるものと考えられる。

要 約

Eimeria tenella, *E. brunetti* および *E. acervulina* のスポロゾイトおよび *E. tenella* のメロゾイトを、10日令の孵化鶏卵の尿液腔内に接種し

て、次の知見を得た。

1. *E. tenella*

a. スポロゾイトを 5×10^4 個または 1×10^5 個接種すると、胎児はすべて感染した。3~6日後に多数のシizontが漿尿膜または尿液中に検出され、オーシストは8日目 (1×10^5 個接種) または10日目 (5×10^4 個接種) に認められた。シizont数に比して、オーシストの産生は著しく少数である。

b. 1×10^5 個接種例において、5および9日目に多数の Blastophore 様の虫体、および少数の Budding を行ないつつある發育型を認めた。

c. 初代シizontおよび Sexual stage の虫体は、漿尿膜の表層細胞に寄生し、第2代シizontは膜の深部で發育する。また、表層に寄生した虫体の周囲には、Parasitophoric vacuole が明瞭である。

d. メロゾイト 1×10^6 個の接種では、3日目にガメートが検出されたが、オーシストは認められなかった。 5×10^6 個では、5日目にオーシストが検出された。

2. *E. brunetti* のスポロゾイト 1×10^5 個接種により、7日目にシizont、また9日目にオーシストが検出された。

3. *E. acervulina* のスポロゾイトでは、 1×10^6 個接種でも、發育期の虫体は認められなかった。

4. 孵化鶏卵培養の意義について考察した。

本報告の要旨は、第69回(1970年)日本獣医学会で発表した。

Eimeria brunetti を分与して下さった上野製薬株式会社渡辺正太博士にお礼を申し上げる。

文 献

- 1) BEDRNIK, P. (1967): *Folia Parasitol.*, **14**, 361~363.
- 2) DAVIS, S. F. M. and JOYNER, L. P. (1962): *Nature (Lond.)*, **194**, 996~997.
- 3) DORAN, D. J. and FARR, M. M. (1962): *J. Protozool.*, **9**, 154~161.
- 4) DORAN, D. J. and VETTERLING, J. M. (1967): *J. Protozool.*, **14**, 657~662.
- 5) DORAN, D. J. and VETTERLING, J. M. (1967): *Proc. helminth. Soc. Wash.*, **34**, 59~65.
- 6) FAYER, R. and HAMMOND, D. M. (1967): *J. Protozool.*, **14**, 764~772.
- 7) HAMMOND, D. M. and FAYER, R. (1968): *J. Parasitol.*, **54**, 559~568.
- 8) HORTON-SMITH, C. and LONG, P. L. (1966): *Parasitology*, **56**, 569~574.
- 9) 石井, 大永 (1971): 寄生虫学雑誌, **20**, 45~51.
- 10) LONG, P. L. (1965): *Nature (Lond.)*, **208**, 509~510.
- 11) LONG, P. L. and ROSE, M. E. (1965): *Exp. Parasit.*, **16**, 1~7.
- 12) LONG, P. L. (1966): *Parasitology*, **56**, 575~581.
- 13) LONG, P. L. (1969): *Parasitology*, **59**, 757~765.
- 14) LONG, P. L. (1971): *J. Protozool.*, **18**, 17~20.
- 15) MATSUOKA, T., CALLENDER, M. E. and SHUMARD, R. F. (1969): *Amer. J. vet. Res.*, **30**, 1119~1122.
- 16) PATTON, W. H. (1965): *Science*, **150**, 767~769.
- 17) RYLEY, J. F. (1967): *J. Parasitol.*, **53**, 1151~1160.
- 18) RYLEY, J. F. (1968): *Parasitology*, **58**, 215~220.
- 19) SHARMA, N. N. (1964): *J. Parasitol.*, **50**, 509~517.
- 20) STROUT, R. G., SOLIS, J., SMITH, S. C. and DUNLOP, W. R. (1965): *Exp. Parasit.*, **17**, 241~246.
- 21) STROUT, R. G. and OUELLETTE, C. A. (1969): *Science*, **163**, 659~696.
- 22) STROUT, R. G., OUELLETTE, C. A. and GANGI, D. P. (1969): *Exp. Parasit.*, **25**, 324~328.
- 23) STROUT, R. G., OUELLETTE, C. A. and GANGI, D. P. (1969): *J. Parasitol.*, **55**, 406~411.
- 24) STROUT, R. G. and OUELLETTE, C. A. (1970): *Amer. J. vet. Res.*, **31**, 911~918.

BASIC BIOLOGICAL STUDIES ON AVIAN COCCIDIUM DEVELOPMENT OF *EIMERIA TENELLA*, *E. BRUNETTI* AND *E. ACERVULINA* IN CHICK EMBRYOS

Keizaburo ITAGAKI, Misao TSUBOKURA and Yasushi TAIRA*

Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori

(Received for Publication August 7, 1971)

Studies were made on the basic biology of coccidia, including the cultivation of representative species of avian coccidia. It was their purposes to supplement information on the growth of *Eimeria tenella*, *E. brunetti*, and *E. acervulina* in avian embryos, and to examine the biological aspects of these parasites.

Sporozoites and merozoites (*E. tenella*) were inoculated into the allantoic cavities of chick embryos on the 10th day of incubation. Histological sections and unstained specimens of the chorioallantoic membrane (CAM) were prepared from embryos which had been killed serially at different intervals of time or died after inoculation. They were examined for growth of the parasites.

Sporozoites were obtained by the *in vitro* method described by DORAN and FARR (1962). Merozoites were collected from the cecal contents of infected chickens.

The results obtained are summarized as follows:

1. *E. tenella*.

a. All the inoculated embryos produced infections. A large number of schizonts developed in the tissue of CAM 3~6 days after inoculation. They disappeared 7~8 days after inoculation. At this time, the sexual stage of the parasite was observed.

b. Oocysts were first seen on the 8th day (1×10^5 sporozoites per embryo) and on the 10th day (5×10^4 sporozoites per embryo) after inoculation. The number of oocysts formed in the tissue of CAM was small, as compared with the large number of schizonts grown.

c. Many blastophore types and budding forms were seen in the CAM 5~6 days after inoculation with 1×10^5 sporozoites.

d. First-generation schizonts and parasites of the sexual stage were situated in the epithelial cells of CAM. Second-generation schizonts were situated below the epithelium.

e. Many parasites of the sexual stage were found 2 days after inoculation with 1×10^6 merozoites, but no oocysts were produced by this time. When 5×10^6 merozoites were introduced, oocysts were recovered from the CAM 5 days after inoculation. No parasites of the asexual stage were found in any inoculated embryo.

2. Oocysts were recovered from the CAM 9 days after inoculation with 1×10^5 sporozoites of *E. brunetti*.

3. No parasites of the developing stage were detected from the CAM inoculated with 1×10^6 sporozoites of *E. acervulina*.

* Present address: Takarazuka Research Laboratories, Pharmaceuticals Division, Sumitomo Chemical Co., Ltd., Takarazuka.

EXPLANATION OF PLATES

All the histological specimens are formalin-fixed paraffin sections, which were stained with hematoxylin and eosin. Figs. 1-15 show specimens inoculated with *Eimeria tenella* sporozoites.

PLATE I

- Fig. 1. Schizonts in chorioallantoic membrane (CAM) 3 days after inoculation. $\times 400$.
Figs. 2 and 3. Mature schizonts in CAM 3 days after inoculation. $\times 400$.
Figs. 4 and 5. Mature schizonts and released merozoites in CAM 5 days after inoculation. $\times 400$.
Fig. 6. Mature schizonts and released merozoites in amnion. $\times 400$.
Fig. 7. Gametocytes and oocyst in CAM 8 days after inoculation. They have grown only within epithelial cells. $\times 400$.
Fig. 8. Mature schizonts in CAM 5 days after inoculation. Unstained preparation. $\times 400$.
Fig. 9. Released merozoites in CAM 5 days after inoculation. Unstained preparation. $\times 400$.

PLATE II

- Fig. 10. Oocysts in CAM 8 days after inoculation. Unstained preparation. $\times 400$.
Fig. 11. Schizonts which have grown collectively and are situated below the epithelium of CAM. $\times 100$.
Fig. 12. Protuberance of the parasitic region of CAM. $\times 100$.
Fig. 13. Unidentified forms. They may be either blastophore types or degenerative schizonts. $\times 400$.
Fig. 14. Blastophore type. $\times 1,000$.
Fig. 15. Budding-like form. $\times 400$.
Fig. 16. Gametocytes of *E. tenella* 3 days after inoculation with merozoites. $\times 100$.
Fig. 17. Mature schizonts of *E. brunetti* in CAM 7 days after inoculation. Unstained preparation. $\times 400$.
Fig. 18. Oocysts of *E. brunetti* in CAM 9 days after inoculation. Unstained preparation. $\times 400$.