日本に見られる鶏マラリアについて

III. 赤血球外発育型の培養

坪 倉 操・板垣啓三郎・森 垣 忠 啓

鳥取大学農学部

(昭和47年6月5日受付)

Plasmodium の培養は、早くも前世紀の終りごろより試みられている。最初は赤血球内発育型(赤内型と略す)について研究がなされたが、その当時の研究は、培養というよりは、むしろ保存と呼ぶ方が適当であろう。今世紀の初めになって、BASS and JOHNS²⁾ が *Plasmodium vivax* および *P. falciparum* を in vitro で発育させたという報告を行なった。以来、数種の *Plasmodium* について培養試験がなされ、血球への侵入の条件についても検討された²⁸⁾。最近 TRAGER³¹⁾ は、特殊な装置を考案して、*P. coatneyi* および *P. falciparum* でシゾゴニーを2回行なわせることに成功した。

赤血球外発育型(赤外型と略す)の培養は、この発育型の発見が赤内型より遅れたこともあって、最初の報告は1935年に HUFF and BLOOM¹⁵⁾ によってなされた。彼らは *P. elongatum* 感染雛の骨髓のスライドグラス培養で、少なくとも48時間は感染能力を保持したと述べた。次いで HEGNER and WOLFSON¹³⁾ が *P. cathemerium* 感染カナリアの脳、肺および脾などの培養8日目ものをカナリアに接種し、感染を起こさせたが、これが赤外型によるものか、赤内型が生存していたことによるものか、不明であると述べている。その後、赤外型の培養は、1940年から1950年代に集中して行なわれた。赤外型が寄生している組織片を、Plasma clot 法で培養する方法が、基本的な培養法であって、鳥類に寄生する種が主として用いられた。

HAWKING^{10~12)} および TONKIN and HAWKING³⁰⁾ は、*P. gallinaceum*, *P. relictum* および *P. lophurae* の感染雛の臓器を培養し、赤外型発育を行なわせるとともに、詳細な形態学的観察を行なっている。ZUCKERMAN³²⁾ および DUBIN⁷⁾ は、

HAWKING らが行なった感染雛臓器を培養するより、感染胎児組織が培養しやすいと報告した。LEWERT^{19,20)} は、*P. gallinaceum* 感染雛の臓器について同様に試験する一方、脳軟膜の培養は105日間雛に感染力をもったと述べた。DE OLIVEIRA and MEYER⁴⁾ は、1年間継代に成功している。DUBIN^{7,8)} は、人寄生 *Plasmodium* について試験した。すなわち、*P. vivax* および *P. falciparum* 感染患者の骨髓を培養し、赤外型に似た形態を観察したが、これを赤外型発育とすることに躊躇した。これらの試験はすべて Plasma clot 法によって行なわれたものであるが、HUFF ら¹⁶⁾ および BEAUDOIN and STROME³⁾ は、赤外型感染臓器をトリプシン処理し、単層培養を行ない、赤外型の発育を観察している。

赤内型を培養細胞に接種して、赤外型の培養を試みた試験は乏しい。MEYER²²⁾ は鶏胎児脳の培養に *P. gallinaceum* 感染血液を接種して、赤外型を検出した。LEWERT²⁰⁾ は同様の試験に失敗しており、その原因として、臓器を血漿で包埋することが、原虫の細胞内侵入を困難にすると考えた。

近年は、これまでに確立された感染雛臓器の培養法を応用して、*Plasmodium* の詳細な研究がなされている。ことに赤外型の電顕的観察は、組織培養法の応用で容易となった^{14,24,25)}。さらに生鮮標本の観察^{16,17)}、化学療法剤の研究³⁾ などが進められている。

赤内型から赤外型への移行は、*Plasmodium* 症において興味ある点であるが、これに関する研究はほとんど行なわれていない。私たち¹⁸⁾ は、*P. juxtannucleare* について、感染血液を雛に接種し、臓器中に赤外型が検出されることを報告した。したがってこの種の原虫は、赤内型から赤外型への移行の現象を研究する上に、適していると考え、こ

れを *in vitro* において追求するため、培養に関する若干の試験を行なった。本報ではその成績を述べる。

実験材料および方法

供試原虫：VFP および 2011 の 2 株を用いた。いずれも私たちが *P. juxtannucleare* と同定したものである。VFP 株は既報の実験¹⁸⁾ に用いたものと同じで、その後 1~2 カ月間隔で感染血球を初生雛に接種し、継代した。2011 株は、1966 年 10 月に野外例より得て、VFP 株と同じ方法で継代している株である。

鶏胎児細胞の培養：10 日齢前後の鶏胎児をトリプシン処理し、Eagle 液（牛血清 10% 添加）を用い、約 6×32 mm のカバースリップを敷いた試験管に単層培養を行なった。

感染血球の接種：感染血球は前記原虫の人工感染雛より、心臓穿刺によって得た。凝固阻止剤として、5% クエン酸ナトリウム溶液を 1/10 量加え、直ちに 2,500 rpm, 10 分間遠心し、上清を捨て、Eagle 液に再浮遊し、2,500 rpm, 10 分間遠心した。沈殿血球を Eagle 液に 0.25% の割合に浮遊し、その 1 ml を培養細胞に接種し、37°C または 40°C に 1~3 日間静置した。

培養液の交換：血球浮遊液を除去した後、Eagle 液（pH 7.7-7.8）に換え、原則として 3 日に 1 回、培養液の交換を行なった。

標本の作成：経時的にカバースリップを取り出し、培養細胞をメチルアルコールで約 10 分間固定し、希釈ギムザ液（蒸留水 2 ml にギムザ原液 1 滴の割合で作成）で約 20 時間染色した。染色後、蒸留水で 2~3 回洗浄し、3 系列のキシロールとアセトンの混合液（キシロール：アセトン、5:95, 40:70, 70:30）に約 10 分間順次浸した後、キシロールで約 10 分間処置し、カナダバルサムで封じた。

観察：標本は原則として 1 回に 2 枚以上を作成し、全視野を鏡検した。

感染雛の赤内型および赤外型の観察：第 I 報¹⁸⁾ の方法と同じである。

実験成績

数十回にわたる予備的な培養試験の後、38 回試

験を試みた。培養条件はいくらか異なるが、そのうち 20 試験例において赤外型の発育を観察した。

1. 培養細胞において発育した赤外型の形態

培養細胞内で発育した赤外型を、形、大きさおよび核数から、A 型、B 型、C 型および D 型に分類した。

A 型：1 個の核質をもつ形態である。おおむね円形で直径 2 μ 前後の大きさをもつ。原形質は比較的均一に、やや濃い青色に染まる。核質は大きく、不正形で赤紫色を呈す (Figs. 1 および 2)。この型は生体臓器では検出されにくい。

B 型：2 個以上の核質を有する形態である。大きさは 2~十数 μ と不定であるが、多くは 5~7 μ の円形である。原形質は青く染まる。核質は 2 個以上数十個認められ、赤紫色に染まり、点状、コンマ状、馬蹄形、楔状および環状など多形性を示す。その周囲の原形質に不染性部分が見られる (Figs. 3 および 4)。この型は生体臓器でもっとも多く観察される。

C 型：核質はやや大きく、ほぼ円形となり、原形質内で集合する傾向がある。多くは外側に環状に集合する。原形質は染色性に乏しく、しばしば大きな空胞様の不染部が見られる (Figs. 5 および 6)。

D 型：成熟シizont であって、紡錘形のメロゾイトが放射状に配列する。メロゾイトの数は 20~40 個である (Figs. 7 および 8)。シizont の中心部は、わずかに青染するか、不染性である。早いものでは培養 4 日目に認められた。

すべての発育型において、シizont の周囲には、不染性部分いわゆる Parasitophoric vacuole が認められる。

以上の 4 型のシizont のほかに、遊離メロゾイトが観察された (Figs. 9 および 10)。長径が 1.5~2.0 μ の紡錘形を呈し、一端がやや鋭で、他端は鈍円である。中心に円形の核を 1 個有する。この遊離メロゾイトは、生体臓器の塗抹標本では、ほとんど見いだすことはできない。

2. 培養細胞における赤外型の増殖

赤外型は早いものでは、培養後 1 日目において B 型が観察された。6 日目ごろまでは検出数は少なく、1 標本当たり 10 個内外であって、一般に B および C 型が多い。7 または 8 日目に A および

Table 1. Relationship between the Number of Erythrocytic Forms Inoculated and Growth of Exoerythrocytic Forms in Cultured Cells

Experiment No.	No. of erythrocytic forms*	Growth of exoerythrocytic forms	Experiment No.	No. of erythrocytic forms*	Growth of exoerythrocytic forms
1	45	+	20	1,000	+
2	200	—	21	1,115	+
3	385	+	22	1,200	+
4	400	+	23	1,265	+
5	430	+	24	1,380	—
6	451	+	25	1,433	+
7	454	—	26	1,460	—
8	480	—	27	1,550	+
9	510	—	28	1,600	—
10	514	—	29	1,870	—
11	560	—	30	1,890	+
12	647	+	31	2,250	+
13	710	—	32	2,350	—
14	780	+	33	2,440	—
15	800	—	34	2,650	—
16	834	+	35	2,920	—
17	893	—	36	3,610	+
18	920	+	37	7,660	—
19	960	+	38	8,300	+

* Number of erythrocytic forms per 10,000 erythrocytes.

B 型が急に増加し、1 標本当たり数百個以上観察される例もあった。これより 1 ないし 2 日遅れて、C および D 型が増加する傾向がある。おそらく、2 代か 3 代シゾントであろう。

今回の試験は、培養 2 週以内で観察を中止したため、それ以後の発育については不明であるが、10 日以後になると虫体数は減少した。数試験例では、標本中にほぼ均等に赤外型が発育したが、大半の試験例では、いくつかの個所に集合して発育する傾向が観察された。

同一標本で観察される発育型は種々であった。しかし、一カ所に集合している赤外型には、比較的同一の発育型が多い (Fig. 12)。また、しばしば D 型シゾントから、メロゾイトが放出されたと思われる像が観察され、その周辺に多数のメロゾイトが存在した。

3. 培養条件

今回の 38 試験例では、培養条件を検討する意味で、5 ないし 6 試験例ごとに条件を変えて実施し

ている。試験を通じて、赤外型が検出された標本数、または 1 標本当たりの赤外型数などから、次の点がわかった。

a. 培養温度: 37°C と 40°C では、後者が発育に好影響を与えた。

b. 接種に用いる感染血球の濃度および培養細胞との接触期間: 0.1, 0.25, 0.5 および 1.0% の濃度において、0.25% が細胞を損傷することが少なく、また赤外型の発育も良好であった。血球を培養細胞に接触させる期間を、1, 2 および 3 日間として試験した。その結果、2 および 3 日間はほぼ同程度であり、1 日間より発育が良好であった。

c. 血清の添加: 血球浮遊液または細胞維持液に、牛または雛の血清を 2~5% 量加えた例と、無添加の例とでは、明らかな差がなかった。

d. 供試原虫の株: 2 株については、発育に差を認めなかった。

e. 接種赤内型数: 接種に用いた赤内型は、赤

Table 2. Relationship between Parasitism of Exoerythrocytic Forms in Donor Chickens and Growth of Exoerythrocytic Forms in Cultured Cells

Exoerythrocytic forms in donor		Growth of exoerythrocytic forms in cultured cells	
		Positive	Negative
+	27	19	8
-	11	1	10
Total	38	20	18

血球 1 万個中わずか 45 個の少数から、8,300 個とほとんどの血球に寄生が認められたものまで、種々の数が用いられた。このうちで、感染力をもった成熟シズントは、もっと少数と考えてよい。Table 1 に示したように、赤外型の発育は、接種された赤内型原虫数と必ずしも関連はない。

4. 赤外型発育と供血雛の赤外型寄生

Table 2 に結果を示した。培養細胞に赤外型の発育を認めた例は、1 例を除けばすべて、臓器に赤外型の寄生があった供血雛の血液を接種したものであった。

考 察

Plasmodium の発育は、いくつかの複雑な発育期を経て完了する。本原虫の培養は、それぞれの発育期の虫体について試みられ、一応の知見が得られている。すなわち、赤内型の培養^{2,21,28,31)}、赤外型の培養^{3,4,7,8,10-13,15,16,19,20,22,30,32)} および蚊体内発育期の培養¹⁾ がそれである。

これらの培養試験のうち、もっとも研究が進められたのは、赤外型の培養であろう。これまでに用いられた *Plasmodium* は、*P. gallinaceum*, *P. lophurae*, *P. relictum* および *P. vivax* などで、宿主体内に赤外型を寄生させるためには、蚊を通過させねばならなかった。したがって、*in vitro* において赤内型から赤外型への移行を行なわせるための研究はほとんどない。MEYER が *P. gallinaceum* の感染血球を Plasma clot 法で培養した脳細胞に接種し、赤外型を検出したが、接種した血液中に赤外型が混在した可能性があるかも知れないと考えられている²³⁾。

私たちが用いた *P. juxtannucleare* は、すでに述べたように¹⁸⁾、蚊の仲介を必要とせず、感染血球

の接種で、容易に赤外型の寄生を起こし得る。この事実については、PARAENSE²⁶⁾ および DHANA PALA⁵⁾ が以前に報告しているところで、赤内型から赤外型への移行に関しては、他の種とは異なる性状を有するものと考えられる。本試験でこの種を用いたことが、赤内型を赤外型に移すことに成功した原因になったと考える。*P. juxtannucleare* を用いて培養を試みたこと、また単層細胞に赤内型を接種して、赤外型の発育を観察したことは、おそらく私たちが最初と思われる。

培養細胞中における赤外型シズントの増殖過程、および形態に関しては、HAWKING^{11,12)} および TONKIN and HAWKING³⁰⁾ の *P. gallinaceum*, *P. relictum* および *P. lophurae* についての詳細な記載がある。これらの研究は、生体内では困難な形態学的な観察を可能とした。しかし、用いた手技が Plasma clot 法であり、またすでに臓器内に寄生している赤外型を、試験管内に移したにすぎない。したがって、赤内型から赤外型への移行発育の過程を追及するには難点がある。この点に関しては、私たちの方法が、かなり満足し得る知見をもたらすものと考ええる。

私たちは、赤外型を A~D の 4 型に分け、それぞれの型の特徴、および発育過程における関連性について検討した。その結果、発育型については、HAWKING¹²⁾ および TONKIN and HAWKING³⁰⁾ が、それぞれ *P. relictum* および *P. lophurae* について分類したものと、基本的には同じであった。すなわち、私たちの A 型は、氏らの Small forms with one piece of chromatin に相当する。B 型は、Forms with several pieces of chromatin, C 型は、Large schizonts with twenty or more pieces of chromatin にほぼ一致し、D 型

は Forms in which merozoites are foreshadowed に相当する。

C 型には、しばしば空胞様の構造が認められるが、*P. gallinaceum*¹¹⁾ および *P. lophurae*³⁰⁾ にも知られている。また、D 型では完成したメロゾイトが放射状に並ぶが、*P. gallinaceum*⁴⁾ および *P. relictum*¹²⁾ にも認められている。*P. lophurae* では、放射状型は検出されなかったと報告されている³⁰⁾。しかし、この特徴的なメロゾイトの配列は、Sporozoa のシゾンに見られる共通的な形態と考えられるので、精査すれば *P. lophurae* にも観察されるものと思われる。

また、今回の試験で虫体の周囲に不染性の、いわゆる Parasitophoric vacuole を認めたことも、組織培養法の応用で容易にされたものである。これについて HAWKING ら^{11,12,30)} は言及していないが、コクシジウムの組織培養では常に観察されている^{6,9,27,29)}。しかし、この構造の意義は明らかでない。

P. juxtanucleare の赤外型メロゾイトが、紡錘形を示すことも、本試験で明らかになったのである。なお *P. relictum* および *P. gallinaceum* では、マクロメロゾイトおよびマイクロメロゾイトが認められている。私たちは D 型において、大型と小型のメロゾイトを有するシズントを観察しているが、それぞれの由来および性状については、明らかにし得なかった。

従来、*Plasmodium* の培養には 37~38°C の温度が用いられている。本試験で、37°C よりも、40°C で培養した場合が良好であったことは、高い体温をもつ鶏に寄生する原虫の、生物学的性状によるものと考えられる。しかし、このような温度が、赤外型の発育・増殖にどのように影響するかは明らかでない。

血球吸着期間について、1 日と 2 または 3 日の間に差が見られたのは、赤内型メロゾイトが細胞内に侵入する際、時間を要するのか、血球内で未熟シズントが成熟し、それが侵入したことによるのか明らかでない。感染血球を 3 日間細胞に接触させても、細胞が特に悪影響を受けとは思われなかったもので、吸着期間は 2 ないし 3 日が適当と考える。

培養標本で観察されるシズントは、多くの場合

数カ所に集合している。これは接種された赤内型のうちで、赤外型に移行し得るものが限られることを示唆している。接種された赤内型の中には、種々の発育期の虫体が混在するので、成熟シズントの数はかなり少数であろう。しかし、この点を考慮したとしても、もっと標本内に平等に赤外型が発育してもよいように思われる。上記の事実と関連して、接種赤内型原虫数と、培養細胞における赤外型発育との間に、特別な関係が見いだされない点、さらに、供血雛に赤外型の寄生が見られない場合、培養細胞にも赤外型発育がほとんど見られない点から、赤外型に移行し得る虫体は、宿主体内ですでにある性格を備えているように考えられる。

要 約

Plasmodium juxtanucleare 寄生血球を、培養鶏胎児細胞に接種し、培養試験を行なった。

1. 培養鶏胎児細胞に感染血球を接種することにより、赤血球外発育型 (赤外型) が発育した。

2. 赤外型を、発育の過程により、A 型 (核質を 1 個有し、小型でおおむね円形)、B 型 (核質を 2 個以上有し、大きさは不定、おおむね円形)、C 型 (核質がやや大きくなり、原形質に空胞様の不染部を有す) および D 型 (成熟シズントおよびメロゾイトが放射状に並ぶ) の 4 型に区別した。

3. 早いものでは、96 時間で成熟シズント (D 型) を形成する。

4. 培養温度は 40°C、感染血球吸着期間は 2 ないし 3 日間、および血球浮遊濃度は 0.25% で好結果を得た。

5. 牛または雛血清の添加 (2~5%) は、赤外型発育にとって特に有益ではなかった。

6. 原虫の株および赤内型の接種量と、赤外型の発育とは、直接の関係がなかった。

7. 赤外型が発育した試験例は、1 例を除けばすべて、赤外型の寄生が認められた雛の血液を接種したものであった。

本試験の一部は、第 69 回 (1970 年) 日本獣医学会で報告した。

文 献

- 1) BALL, G. H. (1964): *J. Parasit.*, **50**, 3~10.
- 2) BASS, C. C. and JOHNS, F. M. (1912): *J. exp. Med.*, **16**, 567~579.
- 3) BEAUDOIN, R. L. and STROME, C. P. A. (1970): *J. Parasit.*, **56**, 26.
- 4) DE OLIVEIRA, M. X. and MEYER, H. (1955): *Parasitology*, **45**, 1~5.
- 5) DHANAPALA, S. B. (1962): *Riv. Malar.*, **41**, 3~10.
- 6) DORAN, D. J. (1970): *Proc. helminth. Soc. Wash.*, **37**, 84~92.
- 7) DUBIN, I. N. (1947): *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **65**, 154~156.
- 8) DUBIN, I. N. (1948): *J. Nat. Malar Soc.*, **7**, 330~332.
- 9) FAYER, R. and HAMMOND, D. M. (1967): *J. Protozool.*, **14**, 764~772.
- 10) HAWKING, F. (1944): *Lancet*, **27**, 693~694.
- 11) HAWKING, F. (1945): *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **39**, 245~263.
- 12) HAWKING, F. (1946): *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **40**, 183~188.
- 13) HEGNER, R. and WOLFSON, F. (1939): *Amer. J. Hyg.*, **29**, 83~87.
- 14) HEPLER, P. K., HUFF, C. G. and SPRINZ, H. (1966): *J. Cell Biol.*, **30**, 333~358.
- 15) HUFF, C. G. and BLOOM, W. (1935): *J. inf. Dis.*, **57**, 315~336.
- 16) HUFF, C. G., PIPKIN, A. C. and JENSEN, D. V. (1957): *J. Parasit.*, **43**, 17.
- 17) HUFF, C. G., PIPKIN, A. C., WETHERSBY, A. B. and JENSEN, D. V. (1960): *J. Bio-phys. Biochem. Cytol.*, **7**, 93~102. (STROUT, R. C., SOLIS, J., SMITH, S. C. and DUNLOP, W. R. (1965): *Exp. Parasit.*, **17**, 241~246. より引用).
- 18) 板垣啓三郎, 坪倉 操 (1968): 日本獣医学雑誌, **30**, 1~6.
- 19) LEWERT, R. M. (1948): *Science*, **107**, 250.
- 20) LEWERT, R. M. (1950): *Amer. J. Hyg.*, **51**, 155~177.
- 21) MANWELL, R. D. and HEWITT, R. I. (1937): *Amer. J. trop. Med.*, **17**, 407~412.
- 22) MEYER, H. (1947): *Nature*, **160**, 155~156.
- 23) MEYER, H. (1949): *Rev. Bras. Biol.*, **9**, 211. (HUFF, C. G. (1969): *Exp. Parasit.*, **24**, 383~421. より引用).
- 24) MEYER, H. and DE OLIVEIRA MUSACCHIO, M. (1960): *J. Protozool.*, **7**, 222~228.
- 25) MEYER, H. and DE OLIVEIRA MUSACCHIO, M. (1965): *J. Protozool.*, **12**, 193~202.
- 26) PARAENSE, W. L. (1949): *Mem. Inst. Osw. Cruz.*, **45**, 813~824.
- 27) PATTON, W. H. (1965): *Science*, **150**, 767~769.
- 28) SHERMAN, I. W. (1966): *J. Parasit.*, **52**, 17~22.
- 29) STROUT, R. G., SMITH, J. S. S. C. and DUNLOP, W. R. (1965): *Exp. Parasit.*, **17**, 241~246.
- 30) TONKIN, I. M. and HAWKING, F. (1947): *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **41**, 407~414.
- 31) TRAGER, W. (1971): *J. Protozool.*, **18**, 239~242.
- 32) ZUCKERMAN, A. (1946): *J. inf. Dis.*, **79**, 1~11.

STUDIES ON AVIAN MALARIA IN JAPAN

III. TISSUE CULTURE OF THE EXOERYTHROCYTIC FORM OF THE PARASITE

Misao TSUBOKURA, Keizaburo ITAGAKI and Tadaaki MORIGAKI
*Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture,
Tottori University, Tottori*

(Received for Publication June 5, 1972)

Many studies have been made on the cultivation of the exoerythrocytic form of malarial parasites. In most of them, however, cultivation was achieved merely by the *in vitro* transfer of tissues infected with this form by the plasma clot method or the trypsin digestion method. Only MEYER²²⁾, utilizing the plasma clot method, has succeeded in cultivating this form in cultured cells which had been inoculated with blood parasitized by *Plasmodium gallinaceum*.

An attempt was made to cultivate the exoerythrocytic form in a monolayer culture of chick embryo cells by inoculation with blood parasitized by *P. juxtanucleare*. It was reported previously that this parasite was easily transferred to an exoerythrocytic form from the erythrocytic form *in vivo*¹⁸⁾. If a method was established for the *in vitro* cultivation of the exoerythrocytic form, it would be possible to make an attempt to clarify the mechanism of transfer of both forms *in vivo*.

Parasitized blood was obtained from experimental chickens by heart puncture and was anticoagulated by the addition of 5% citrate solution at the rate of 10:1. It was centrifuged at 2,500 rpm for 10 minutes. The sediment was resuspended in Eagle's medium and recentrifuged at 2,500 rpm for 10 minutes. The sedimented blood was resuspended in Eagle's medium at the rate of 0.25 per cent. Then 1.0 ml aliquots of the resulting suspension were inoculated into cell cultures and incubated in stationary racks at 37°C or 40°C for 24 to 72 hours.

Monolayer cultures were prepared in tubes (containing coverslips approximately 6×32 mm) from chick embryo cells by the trypsin digestion method. The cell growth medium employed was Eagle's medium (with 10% bovine serum added).

After inoculation 2 or more coverslips were removed daily, fixed with methanol, and stained with diluted Giemsa's solution for 20 hours. The entire field of each coverslip was examined for parasites of exoerythrocytic form. The following results were obtained.

1. Many different types of the exoerythrocytic form were developed in cultures inoculated with parasitized blood.

2. The exoerythrocytic form grown in tissue cultures was classified into four morphological types: type A (small, usually round in shape, and containing one piece of chromatin), type B (usually round, irregular in size, in variable states of development, and containing two or more pieces of chromatin), type C (with cytoplasm only lightly stained and showing clear areas, and chromatin increasing in size), and type D (mature schizont with elongated merozoites radially arranged).

3. A mature schizont was first seen 96 hours after inoculation.

4. The most suitable conditions for the in vitro cultivation of the exoerythrocytic form consisted of incubation at 40°C, contact maintained between the cell culture and the parasitized blood for 2-3 days, and a blood concentration of 0.25%.

5. The addition of bovine or chicken serum did not affect the development of the parasite.

6. There was no relationship between the number of inoculated parasites and growth of the exoerythrocytic form in cultures.

7. When parasitized blood harvested from infected chickens had no detectable exoerythrocytic form, it was impossible for this form to grow in a culture inoculated with it.

EXPLANATION OF PLATE

Exoerythrocytic forms in cultured cells (CE-cells). All specimens are stained with Giemsa. $\times 1,000$.

Figs. 1 and 2. Type A. Cells are small in size and have one piece of chromatin.

Figs. 3 and 4. Type B. Cells are irregular in size and have two or more pieces of chromatin.

Figs. 5 and 6. Type C. Nuclei are increasing in size. A vacuole-like structure is observed.

Figs. 7 and 8. Type D. Mature schizont. Elongated merozoites are arranged radially.

Figs. 9 and 10. Released merozoites. They are elongated in shape and have a round nucleus at the center.

Fig. 11. Different types, B, C, and D, are developing in a cell.

Fig. 12. Many parasites of type C are developing in a cell.