

〈論文〉

培養細胞への *Cryptosporidium parvum* の感染と ELISA による検出

加藤 敏朗* 竹内 りさ** 小野 芳朗**
三木 理* 河原 長美**

Infection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts to Cultured Cells and Detection of the Oocysts by ELISA

Toshiaki KATO*, Lisa TAKEUCHI**, Yoshiro ONO**,
Osamu MIKI*, Osami KAWARA**

* Advanced Technology Research Laboratories, Technical Development Bureau, Nippon Steel Corp., 20-1 Shintomi, Futtsu, Chiba 293-8511 Japan

** Department of Environmental and Civil Engineering, University of Okayama, 3-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530 Japan

Abstract

For developing water treatment system to prevent waterborne Cryptosporidiosis, it is necessary to estimate the inactivation of *Cryptosporidium*. Recently, cell culture model has developed into a tool that can be used for assessing the viability and/or infectivity of *Cryptosporidium* oocysts. In this study, we investigated to develop quantitative and sensitive detection method for determining the infectivity of *Cryptosporidium* oocysts by combining cell culture with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Human ileocecal epithelial cells (HCT-8), which were seeded in gelatin-coated 96-well plates at the density of 1×10^4 cells/well¹ and incubated at 37°C for 48h, were infected with the oocysts. After inoculation, HCT-8 cells were re-incubated with fresh culture media at 37°C for 48h, then were processed for ELISA. The absorbance values in ELISA were increased in an inoculating dose-dependent manner. In the experimental condition, the number of the oocysts from 1×10^2 to 3×10^4 per well was quantitatively detected.

Key words : *Cryptosporidium parvum*, protozoan, infectivity, cell culture, ELISA

1. はじめに

Cryptosporidium, *Giardia* 等の原虫類を原因とした水系感染症の発生が世界的な問題となっている¹⁻³⁾。これら原虫類に関するモニタリングシステムの構築や防除技術の確立を目指した研究開発が活発化しているが、このためには原虫類の存否や生死を定量評価するための検査技術が必要不可欠である。*Cryptosporidium* オーシスト(以下、オーシストという)の検査法として、様々な形態学的手法、分子生物学的手法、免疫学的手法⁴⁾が実用ないしは提案されている⁵⁾。このうち、脱嚢試験⁶⁾やバイタル染色⁷⁾などの形態学的手法や RT-PCR^{8),9)}を用いた分子生物学的手法は、*Cryptosporidium* の生育活性を判定することができるが報告されているが、生育活性があるからといって必ずしも病原性や感染性を保持しているとは限らない。水質衛生学上で問題視されるのは感染性を保持した病原体の存否であり、この点から *Crypto-*

sporidium の感染性を判定する検査技術が益々重要になってきている。*Cryptosporidium* の感染力を評価する方法として、動物感染実験法が報告されている。例えば、*Cryptosporidium* オーシストを含んだ水試料をマウスへ経口接種し、接種後 7 日目の小腸を摘出し、その磨砕物からオーシストを回収¹⁰⁾、もしくは、糞便とともに排泄されたオーシストを回収¹¹⁾する検査方法が提案され、病原性の発現をも含めて評価できる技術として極めて有用であるが、感染動物の維持管理が煩雑な上に、検出操作に供するオーシストを組織や糞便から分離回収する必要があり、効率的な検査が難しい。最近、動物を用いることなく *Cryptosporidium* の感染性を検査する方法として、培養細胞実験法が注目され始めている¹²⁾。オーシストもしくは予め脱嚢させたオーシストを培養細胞に接種することにより、培養細胞内で *Cryptosporidium parvum* の完全な生活環が進行すること^{13),14)}、オーシスト接種後の細胞を培養した後に観察される発育段階の *Crypto-*

* 新日本製鐵株式会社技術開発本部先端技術研究所 〒293-8511 千葉県富津市新富 20-1

** 岡山大学環境理工学部環境デザイン工学科 〒700-8530 岡山市津島中 3-1-1

sporidium 数を計数すればオーシストの感染性を評価できること¹⁵⁻¹⁷⁾などが報告されており、オーシストの感染性を評価するための実験系として培養細胞の有用性は既に明らかにされている。しかしながら、培養によって細胞内で増殖した *Cryptosporidium* の評価手法として用いられている顕微鏡観察では効率的な検出が難しいため、それに代わる評価手法の確立が切望されているのが現状であろう。例えば、RT-PCR によって *Cryptosporidium* に特異的な遺伝子を検出する方法¹⁸⁾や ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) によってオーシストの存在量を定量する方法¹⁹⁾などが検討されている。

本研究においては、*Cryptosporidium* の感染性に着目し、培養細胞へのオーシスト接種と ELISA 法との組み合わせによって、感染力を有したオーシストを定量的に検出する方法について検討した。オーシスト接種に供する細胞の前培養条件や ELISA 条件等を至適化することによって、オーシスト接種濃度が $1 \times 10^2 \sim 3 \times 10^4$ oocysts \cdot well⁻¹ の範囲で定量的に検出することができた。

2. 方法

2.1 培養細胞

宿主細胞として、ヒト回盲腺癌由来細胞株 HCT-8 (human ileocecal adenocarcinoma cell; ATCC #CCL 244) を用いた。細胞は、10% ウマ血清 (Donor Horse Serum, 非動化済; ICN Biomedicals, Inc.), 1mM ビルビン酸ナトリウム (ICN Biomedicals, Inc.), 0.2% 重炭酸ナトリウム (和光純薬), 0.1g \cdot l⁻¹ カナマイシン硫酸塩 (和光純薬) を添加した RPMI1640 培地 (ICN Biomedicals, Inc.) (以下、維持培地という) にて、37°C \cdot 5% 炭酸ガスの CO₂ インキュベーター内で培養し、3 日毎に継代した。

オーシストの接種試験では、前記した維持培地 10ml に対して 2×10^5 個の細胞を懸濁させた細胞液を細胞培養用フラスコ (培養面積 25cm²) へ注ぎ、3 日間培養した後 (被覆率 75%程度) にトリプシン溶液 [0.25% トリプシン; 0.02% EDTA; PBS(-)] を用いて培養容器より細胞を剥離させ、遠心分離 (1,000 rpm \times 5 min) して上澄液を捨て、さらに、回収した細胞を洗浄するため沈殿物を PBS(-) に再懸濁させて再び遠心分離した後に、 5×10^4 cells \cdot ml⁻¹ (ないしは 1×10^5 もしくは 1.5×10^5 cells \cdot ml⁻¹) となるように維持培地 (もしくは血清濃度を 5% に減じた維持培地) に懸濁させた細胞懸濁液をマルチプレートへの植種細胞液として用いた。なお、本培養条件ではフラスコ 1 本あたり約 2×10^6 個の細胞が回収された。

2.2 感染

1) 培養細胞の前培養: 前項で述べた手順で調製した植種細胞液を 96 穴マルチプレートの各ウェルに 200 μ l ずつ注ぎ、37°C \cdot 5% 炭酸ガスの CO₂ インキュベーター内で 48 時間 (ないしは 24 時間) 培養した。マルチプレートは予め以下の操作によってゼラチンコートした。すなわち、終濃度 0.1% (w/v) となるようにゼラチン (Sigma) を溶解させた水溶液を各ウェルに 200 μ l ずつ分注して室温にて 1 時間静置した後に、ゼラチン溶液を除去してから PBS(-) を 200 μ l ずつ分注してウェルを洗浄した。

2) オーシストの接種: 葉酸 (1mg \cdot l⁻¹), p-アミノ安息

香酸 (4mg \cdot l⁻¹), パントテン酸 (2mg \cdot l⁻¹), アスコルビン酸 (35mg \cdot l⁻¹) を添加¹⁹⁾した維持培地 (以下、増殖培地という) をオーシストの希釈用および後培養用に用いた。*Cryptosporidium parvum* オーシスト (10^6 oocysts \cdot ml⁻¹, 滅菌水; Waterborne Inc.) を増殖培地で希釈して $20 \sim 6 \times 10^5$ oocysts \cdot ml⁻¹ の濃度範囲でオーシスト懸濁液を調製した。細胞を前培養したウェルよりピペットで培地を除去し、オーシスト懸濁液 100 μ l を各々のウェルに注ぎ、37°C \cdot 5% 炭酸ガスの CO₂ インキュベーター内で 1.5 時間培養して、オーシストを培養細胞へ接触させた。なお、実験に用いたオーシストの生育活性を DAPI/PI 染色法⁷⁾でしらべたところ、95% 以上のオーシストに生育活性が認められた。

3) 培養細胞の後培養: オーシストを接種したウェルよりオーシスト懸濁液をピペットで除去し、ウェルを 200 μ l の PBS(-) で 3 回洗浄した後に、増殖培地を 200 μ l ずつ注いで 37°C \cdot 5% 炭酸ガスの CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養した。

2.3 ELISA

1) 固定: 後培養後のウェルより培地をピペットで除去し、200 μ l の固定液 [4% パラホルムアルデヒド; PBS(-)] を分注し、室温にて 2 時間反応後、固定液をピペットで除去して、ウェルを 200 μ l の PBS(-) で 3 回洗浄した。

2) ブロッキング: ブロッキング液 [1% ウシ血清アルブミン (Fraction V; Sigma); 0.002% Tween 20 (和光純薬); PBS(-)] を 200 μ l ずつ分注し、室温にて 30 分反応させた後にピペットでブロッキング液を除去した。

3) 一次処理: *Cryptosporidium parvum* オーシストに対するモノクローナル抗体を含んだ Aqua-Glo™ G/C Indirect (ビオチン標識, 20 倍濃縮液; Waterborne Inc.) の一次抗体液をブロッキング液で 20 倍に希釈し、ブロッキング後の各ウェルに 33 μ l ずつ分注した。室温にて 1 時間反応後、溶液をピペットで除去し、ウェルを 200 μ l の PBS(-) で 3 回洗浄した。

4) 二次処理: ブロッキング液で 300 倍に希釈したストレプトアビジン-パーオキシダーゼ複合体 (Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex; Amersham) (以下、二次標識化合物という) を一次処理後の各ウェルに 33 μ l ずつ分注し、室温にて 30 分反応後、溶液をピペットで除去し、ウェルを 200 μ l の PBS(-) で 3 回洗浄した。

5) 発色: 200 μ l の過ホウ酸ナトリウム含有リン酸クエン酸緩衝液 [phosphate-citrate buffer with sodium perborate; Sigma] で二次処理後の各ウェルを洗浄した後、0.4mg \cdot ml⁻¹ OPD [*o*-phenylenediamine dihydrochloride; Sigma] を添加した過ホウ酸ナトリウム含有リン酸クエン酸緩衝液を 100 μ l ずつ分注した。室温にて 1 時間反応させた後、波長 595nm をレファレンスとして波長 450nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (model 550; Bio Rad) で測定した。

3. 結果・考察

3.1 ELISA 検出の特性把握

ELISA 法においては基質液を添加した場合に観測される発色が目的とする抗原に対して特異的な反応か否かが

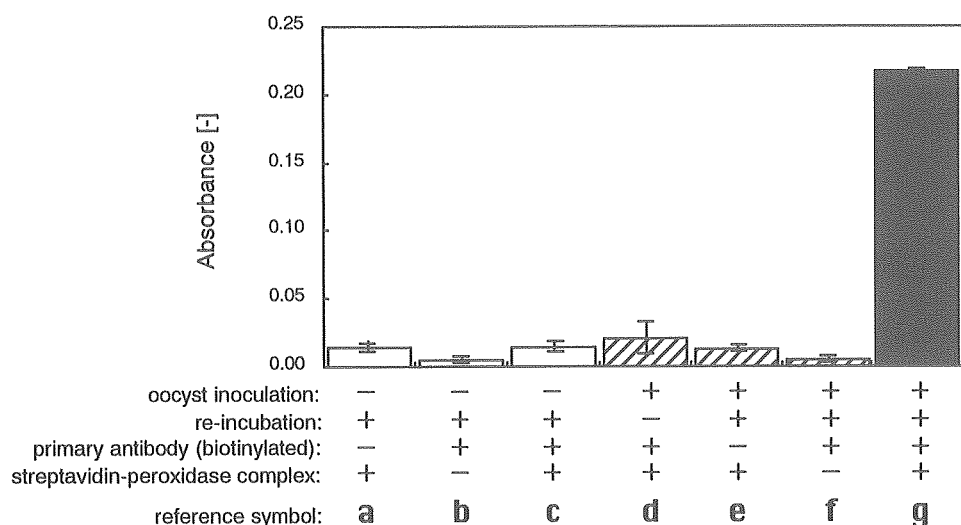


Fig. 1 Characterization of ELISA detection.

HCT-8 cells seeded at a density of 1×10^4 cells \cdot well⁻¹ were incubated for 48h prior to infection, then inoculated with oocysts at a density of 1×10^4 oocysts \cdot well⁻¹ (oocyst inoculation: +) or not (oocyst inoculation: -). After inoculation, plates were washed, then re-incubated with fresh culture medium (re-incubation: +) or immediately processed for ELISA (re-incubation: -). When ELISA was carried out, the primary antibody and/or streptavidin-peroxidase complex were used (+) or not (-). Results are expressed as means \pm the standard deviations of duplicates.

課題であり、種々の要因で発色のバックグラウンドが高まることが予想された。例えば、本研究で実施した ELISA 検出法は、二次標識化合物に由来したパーオキシダーゼ活性としてオーシストを検出することを試みており、培養細胞もしくは *Cryptosporidium* に起因した内在性のパーオキシダーゼ活性や培養細胞等への二次標識化合物の非特異的な吸着によるパーオキシダーゼ活性などが発色のバックグラウンドとなる可能性が懸念された。また、オーシストの存在に依存した発色が観察されたとしても、オーシストを接種した際に洗浄によっても除去されずに残っているオーシストを検出する可能性も考えられた。そこで、本研究で実施した ELISA 法を用いた場合の検出特性を把握するために、オーシスト接種の有無、接種後培養の有無、一次抗体添加の有無、二次標識化合物添加の有無について組み合わせを変えた ELISA 検出を実施し、比較検討した。結果を Fig. 1 に示した。実験では、ゼラチンコートした 96 穴マルチプレートに 1×10^4 cells \cdot well⁻¹ で細胞を植種し、血清濃度を 5% に減じた維持培地にて 48 時間培養した細胞について、i) オーシストを接種せずに増殖培地への培地交換のみを行って 48 時間培養後に ELISA 検出 (図中 a~c), ii) オーシストを接種し、洗浄後、増殖培地を注ぎ、48 時間培養後に ELISA 検出 (図中 e~g), iii) オーシストを接種し、洗浄後直ちに ELISA 検出 (図中 d) した。また、ELISA 検出については、細胞をホルマリン固定し、ブロッキングの後、i) 一次処理を省略した場合 (図中 a, e), ii) 二次処理を省略した場合 (図中 b, f), iii) 一次処理・二次処理ともに実施した場合 (図中 c, d, g) とを比較した。なお、オーシストの接種条件は 1×10^5 oocysts \cdot ml⁻¹ のオーシスト懸濁液を 1 ウェルあたり 100 μ l ずつ分注して 2 時間反応させた。

Fig. 1 に示したように、オーシスト接種に続いて後培養した後に、手順通りに ELISA 検出した試験区 (図中 g)

においてのみ吸光度 0.2 以上の顕著な発色が観察された。これに対して、オーシストを接種しなかった対照区 (図中 a~c) や一次処理もしくは二次処理を省略した対照区 (図中 a, b, e, f) においてはいずれも吸光度が 0.015 以下であったことから、内在性および二次標識化合物の非特異吸着に起因したパーオキシダーゼ活性は低く、オーシスト検出上の障害にはならないものと判断した。さらに、オーシストを接種した後に洗浄のみを行った場合 (図中 d) においては前述の対照区で観察された吸光度よりも僅かに高い 0.02 程度の吸光度が観察された。この理由としてオーシスト接種に伴い細胞表面に吸着し洗浄によって除去されずに残っているオーシストもしくはその断片を検出している可能性が考えられたが、試験区 (図中 g) に比べて 1/10 程度の吸光度であったことから測定上のバックグラウンドとして許容できるものと判断した。

以上のことより、少なくとも検討した範囲内では、オーシストを接種した後に培養した HCT-8 細胞に関してのみ高い吸光度が観察されたことから、本研究の ELISA 法は、HCT-8 細胞内で増殖した *Cryptosporidium* を検出していることが強く示唆された。但し、本研究で用いた一次抗体については、オーシスト以外の生育段階にある *Cryptosporidium* に対する結合特性が不明であり、本研究の ELISA 法がオーシストのみを検出しているのかかについて現時点では厳密な判断はできない。

3.2 前培養条件の至適化の検討

オーシストの検出感度をさらに高めることを目的として、オーシスト接種に供する細胞の前培養条件としての培地中の血清濃度および植種細胞濃度が ELISA 検出に及ぼす影響について調べた。

まず、オーシスト接種に供する細胞を前培養する際の培地中の血清濃度と培養時間について調べた。実験では、 2×10^4 cells \cdot well⁻¹ の濃度で細胞を植種し、2 種類の条件で前培養した後にオーシストを接種した。前培養条件は、

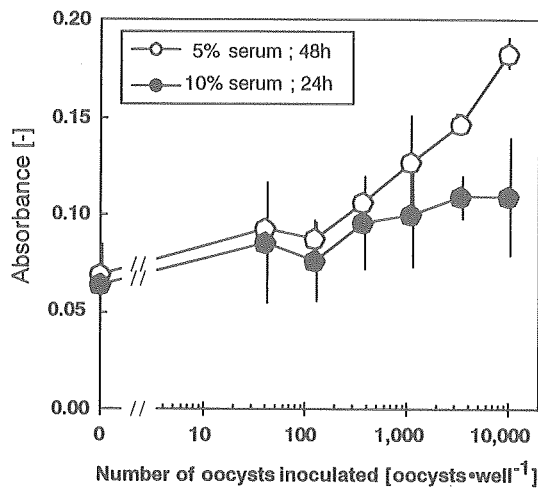


Fig. 2 Effects of serum concentration and incubation period in pre-culturing of host cells on ELISA detection.

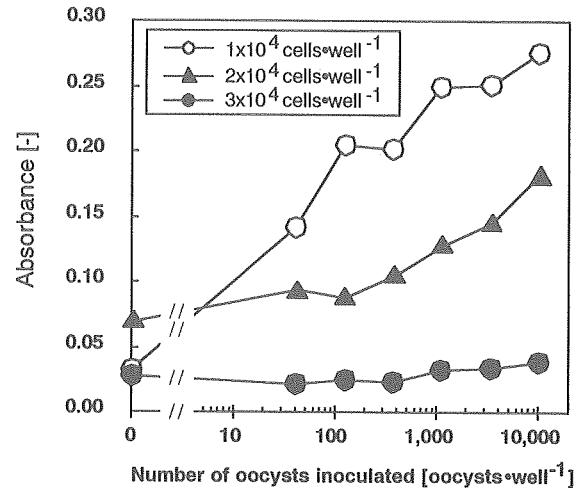


Fig. 3 Effects of initial cell plating density in pre-culturing of host cells on ELISA detection.

i) 条件1：維持培地（10%血清濃度）にて24時間培養，
ii) 条件2：血清濃度を5%に減じた維持培地にて48時間培養について比較した。前培養した細胞に、 $0\sim 1\times 10^4$ oocysts \cdot well $^{-1}$ の濃度範囲でオーシストをそれぞれ接種して、洗浄後、増殖培地にて48時間培養した後にELISA検出した。結果をFig. 2に示した。比較した両条件ともにオーシスト接種濃度に依存して吸光度が高まったが、条件2（図中○印）の方が条件1（図中●印）に比べて高い吸光度となった。前培養後の細胞をオーシスト接種前に顕微鏡観察したところ、条件2では被覆率がほぼ100%の単層であったが、条件1では被覆率がほぼ100%程度であったが部分的な重層化が認められたことから、両条件においては細胞の増殖活性に違いがあり、その結果として*Cryptosporidium*の感染に対する抵抗性に違いが生じていることが推察された。すなわち、10%血清含有の培地で前培養した場合には、5%血清時に比べて細胞の増殖活性が高いために*Cryptosporidium*の感染が成立しにくかった可能性が考えられた。

ついで、オーシスト接種に供する細胞を前培養する際の植種細胞濃度について調べた。実験では、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ の3段階の濃度で細胞をそれぞれ植種し、血清濃度を5%に減じた維持培地にて48時間培養した。前培養した細胞に、 $0\sim 1\times 10^4$ oocysts \cdot well $^{-1}$ の濃度範囲でオーシストをそれぞれ接種して、洗浄後、増殖培地にて48時間培養した後にELISA検出した。結果をFig. 3に示した。植種細胞濃度を 1×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ （図中○印）および 2×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ （図中▲印）とした試験区では、オーシスト接種濃度に依存して吸光度が高まる結果を得、前者は後者の1.5-2倍程度の吸光度であった。これに対して植種細胞濃度を 3×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ とした試験区（図中■印）では、オーシスト接種濃度を高めても吸光度の顕著な増高は観察されなかった。オーシスト接種後培養した細胞をELISA検出前に顕微鏡観察したところ、 1×10^4 ないしは 2×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ で

植種した試験区においては被覆率がほぼ100%の単層であったが、 3×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ で植種した試験区においては部分的な重層化が認められた。さらに、ELISA検出後のウェルを顕微鏡観察したところ、 3×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ で植種した試験区についてはウェル底面の周縁部を除いて細胞が剥離していた。これらのことより、植種細胞濃度を 3×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ に高めると細胞の重層化が生じ、ELISA操作時に細胞が剥離し易くなるため、結果的としてELISAで検出できないことが考えられた。

植種細胞濃度を 1×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ 以下に減じることによってELISA検出時の吸光度が高まる可能性が残されているが、検討した限りにおいては、 1×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ で細胞を植種し、血清濃度を5%に減じた維持培地で48時間培養する前培養条件が至適であった。

3.3 検出感度の検討

前項までに至適化した前培養条件で調製したHCT-8細胞を用いて、ELISA検出結果（すなわち、吸光度として計測される発色強度）に及ぼすオーシスト接種濃度の効果について検討した。実験では、 1×10^4 cells \cdot well $^{-1}$ で植種して血清濃度を5%に減じた維持培地で48時間培養したHCT-8細胞に対して、 $0\sim 6\times 10^4$ oocysts \cdot well $^{-1}$ でオーシストを接種し、洗浄後、増殖培地にて48時間培養した後にELISA検出した。なお、後培養の効果を明確にするために、オーシストを接種後、細胞を洗浄し、後培養せずに直ちにELISA検出する対照実験を実施した。結果をFig. 4に示した。まず、接種後の培養を行った試験区（図中○）においては、少なくとも $1\times 10^2\sim 3\times 10^4$ oocysts \cdot well $^{-1}$ の範囲でオーシスト接種濃度に依存して吸光度が高まる傾向が認められた。 6×10^4 oocysts \cdot well $^{-1}$ で接種した場合に吸光度の低下が観察されたが、これはWoodsら¹⁷⁾が指摘しているように培養細胞量に対して接種オーシスト量が過剰であったために、感染によってダメージを受けた一部の細胞が死滅し、培養容器表面から脱落したことが吸光度低下の原因として推定された。ま

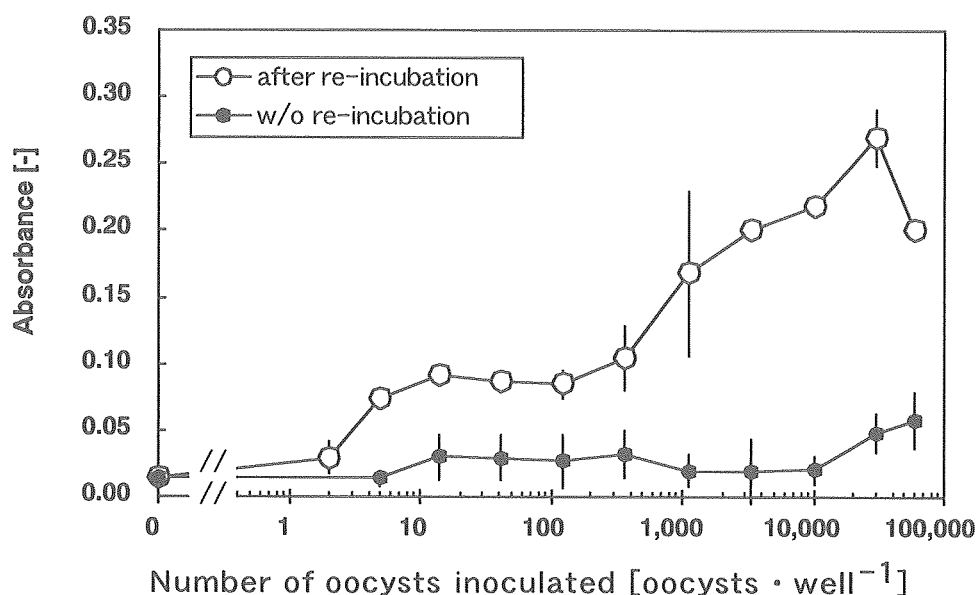


Fig. 4 The results of dose-dependent response of *C. parvum* oocysts inoculated in HCT-8 cells.

After inoculation, washed plates were immediately processed for ELISA (●) or re-incubated with fresh medium at 37° C for 48h, then processed for ELISA (○). Each data point represents the mean of duplicate ± the standard deviation of the mean.

た、オーシスト接種濃度が 1×10^2 oocysts · well⁻¹ 以下ではバックグラウンド（すなわち、オーシスト無接種時）に比べて高い吸光度であったが、オーシスト接種濃度に依存した吸光度の変化が認められなかった。この理由としてオーシストの脱糞率や細胞への sporozoite の感染率等の確率的な要因によって不安定な検出結果となっている可能性が推定され、故に、本研究の実験条件下での検出下限は 1×10^2 oocysts · well⁻¹ 程度であるものと推定した。一方、接種後の培養をせずに ELISA 検出した対照区（図中●印）においては、オーシスト接種濃度が 3×10^4 oocysts · well⁻¹ 以下の範囲ではバックグラウンド程度の吸光度でほぼ一定しており、接種濃度に依存した吸光度の変化は観察されなかった。しかしながら、 3×10^4 oocysts · well⁻¹ 以上で接種した時の吸光度は 0.05 程度まで高まり、これは洗浄によって除去されずに残ったオーシストもしくはその断片を検出している可能性が考えられたが、同じ濃度で接種した試験区の吸光度に比べて低かったことから、試験区で観察された吸光度はオーシスト接種後の培養によって HCT-8 細胞内で増殖した *Cryptosporidium* の量を反映していることは明らかである。

以上のことから、本研究の検査法を用いることによって少なくとも $1 \times 10^2 \sim 3 \times 10^4$ oocysts · well⁻¹ の濃度範囲で接種オーシスト濃度を定量的に検出できるものと結論した。但し、 1×10^2 から 3×10^4 oocysts · well⁻¹ へとオーシスト接種濃度を指数的に増加させても、検出される吸光度は高々 2 倍程度であり、指数的な吸光度の変化は観察されなかった。この理由として、接種量を指数的に増加させても細胞への感染量は指数的に増加しない可能性、細胞内での *Cryptosporidium* 増殖量に限界がある可能性、種々の生育段階の *Cryptosporidium* は細胞内で接種オーシスト濃度に依存して指数的に増加しているが本研究で

用いた一次抗体で検出されない可能性等が推定されたが、これらの点について今後明らかにしていきたい。

4. まとめ

本研究においては、*Cryptosporidium* の感染性に着目し、培養細胞へのオーシスト接種と ELISA 法との組み合わせによって、感染力を有したオーシストを定量的に検出する方法について検討した。以下に本研究で得られた知見を列挙する。

1) *Cryptosporidium parvum* オーシストを HCT-8 細胞に接種し、接種後の培養によって細胞内で増殖したと推定される *Cryptosporidium* を ELISA 法で定量的に検出することができた。

2) 検討した範囲内では 1×10^4 cells · well⁻¹ で接種し、血清濃度を 5% に減じた維持培地で 48 時間培養することが、オーシスト接種に供する HCT-8 細胞の前培養条件として至適であった。

3) ELISA 検出に用いる試薬類として、ビオチン化抗クリプトスポリジウム抗体 [Aqua-Glo™ G/C Indirect ; Waterborne Inc.] を一次抗体とし、ストレプトアビジン-パーオキシダーゼ複合体 [Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex ; Amersham] を二次標識化合物とし、OPD を発色基質として用いた場合、吸光度のバックグラウンドは低く、HCT-8 細胞内で増殖した *Cryptosporidium* の量を反映していることを強く示唆する吸光度の増高が観察された。

4) 本実験では、少なくとも $1 \times 10^2 \sim 3 \times 10^4$ 個の範囲で Waterborne 社から購入した *Cryptosporidium parvum* オーシストの接種量に依存した ELISA における吸光度の変化を確認できた。

(原稿受付 1999年10月25日)

(原稿受理 2000年5月12日)

参 考 文 献

- 1) 平田 強, 橋本 温, 保坂三継 (1996) クリプトスポリジウム汚染と水道, 水道協会雑誌, 64(12), 2-10.
- 2) 保坂三継 (1998) 水系原虫感染症—原因生物と流行発生—, 用水と廃水, 40, 119-132.
- 3) 金子光美 (1998) 原虫類やその他の病原性微生物の検出とその除去技術, 用水と廃水, 40, 322-336.
- 4) De La Cruz, A. A., Sivaganesan, M. (1994) Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in source water samples by commercial enzyme-immunoassay kits, *Proc. 1994 AWWA Water Qual. Technol. Conf.*
- 5) 遠藤卓郎, 八木田賢司 (1997) クリプトスポリジウムの検査法, 環境技術, 26, 555-560.
- 6) Woodmansee, D. B. (1987) Studies of in vitro excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves, *J. Protozool.*, 34, 398-402.
- 7) Campbell, A. T., Robertson, L. J. and Smith, H. V. (1992) Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3488-3493.
- 8) Stinear, T., Matusan, A., Hines, K., and Sandery, M. (1996) Detection of a single viable *Cryptosporidium parvum* oocyst in environmental concentrates by reverse transcriptase-PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3385-3390.
- 9) Widmer, G., Orbacz, E. A., Tzipori, S. (1999) β -tubulin mRNA as a marker of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1584-1588.
- 10) Finch, G. R., Daniels, C. W., Black, E. K., Schaefer III, F. W., and Belosevic, M. (1993) Dose response of *Cryptosporidium parvum* in outbred neonatal CD-1 mice, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3661-3665.
- 11) 宮永総子, 坂野千絵, 眞上佳則, 木俣 勲, 井関基弘, 松本みどり, 島田 豊, 河野 孝 (1999) マウス感染実験による *Cryptosporidium parvum* の不活性化評価, 第33回日本水環境学会年会講演集, p.354.
- 12) Clancy, J. L., Fricker, C. (1998) *Crypto's* protocol prospects, *Water Qual. Int.*, May/June, 11-14.
- 13) Yang, S., Healey, M. C., Du, C., Zhang, J. (1996) Complete development of *Cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells, *Infect. Immun.*, 64, 349-354.
- 14) Slifco, T. R., Friedman, D., Rose, J. B., Jakubowski, W. (1997) An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3669-3675.
- 15) Upton, S. J., Tilley, M., Nesterenko, M. V., Brillhart, D. B. (1994) A simple and reliable method of producing in vitro infections of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa), *FEMS Microbiol. Lett.*, 118, 45-49.
- 16) Upton, S. J., Tilley, M., Brillhart, D. B. (1994) Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines, *FEMS Microbiol. Lett.*, 118, 233-236.
- 17) Upton, S. J., Tilley, M., Brillhart, D. B. (1995) Effects of select medium supplements on in vitro development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells, *J. Clin. Microbiol.* 33, 371-375.
- 18) Rochelle, P. A., Ferguson, D. M., Handojo, T. J., De Leon, R., Stewart, M. H., Wolfe, R. L. (1997) An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2029-2037.
- 19) Woods, K. M., Nesterenko, M. V., Upton, S. J. (1995) Development of a microtitre ELISA to quantify development of *Cryptosporidium parvum* in vitro, *FEMS Microbiol. Lett.*, 128, 89-94.