

Cryptosporidium oocyst検出法

小野 一男 辻 英高¹⁾
 黒川 学²⁾ 柳田潤一郎
 石山 聡子 木村 憲司³⁾
 シバ クマ ライ⁴⁾ 宇賀 昭二⁵⁾

Detection Method of *Cryptosporidium* oocyst in Clinical and Environmental Samples

Kazuo ONO, Hidetaka TSUJI¹⁾, Manabu KUROKAWA²⁾,
 Jun-ichiro YANAGIDA, Satoko ISHIYAMA,
 Kenji KIMURA³⁾, Shiba Kumar RAI⁴⁾ and Shoji UGA⁵⁾

The protozoa *Cryptosporidium parvum* has been identified as one of the agents responsible for numerous outbreaks of diarrheal diseases. Detection of *C. parvum* oocysts in clinical and environmental samples is the key in the diagnosis of cryptosporidiosis in human and in identifying a water-borne and/or food-borne outbreaks. Therefore, it is very important and necessary to have simple, sensitive and specific methods. However, no such perfect methods are available as yet.

In this context, we studied the various methods available by modifying at different aspects and steps using samples collected in Nepal. This study revealed that morphological test using microscopy in combination with specific immunological is valuable for quick screening and the genetic method is effective method for identifying *Cryptosporidium* species.

1. はじめに

クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*) はコクシジウムの一類で、従来からウシ、ブタなどの家

畜の下痢起因腸管寄生原虫として知られてきた。塩素・消毒剤耐性が極めて大きく、感染性を有する耐久型のオーシストが体外に排出され、経口的に摂取されることにより感染が成立する¹⁾。*Cryptosporidium*は1907年にTyzzer²⁾によってマウスの胃から発見された。ヒトでは1976年にはじめてNimeら³⁾が腸炎症例を報告し、動物由来感染症として、また新たな下痢症微生物として知られ

1) 兵庫県立健康環境科学研究所
 2) 神戸市環境保健研究所
 3) 東北学院大学
 4) Nepal Medical College
 5) 神戸大学

るようになった。その後1980年代からAIDSなど免疫不全患者の慢性下痢症の原因微生物として広く注目されることになった⁴⁾。さらに近年、健常人にも感染することが明らかとなり、飲料水を介した集団発生が世界各地で相次ぎ^{5,6)}、現在最も危険度の高い水系病原微生物の一つであり、新興感染症の病原体として注目されている。

わが国では1999年4月施行の感染症法⁷⁾において、本症は赤痢アメーバ症やジアルジア症とともに4類感染症に分類され、更に2004年4月施行の改正感染症法⁸⁾では5類に分類され、全数把握疾患として病原体サーベランスの対象疾患に定められている。

*Cryptosporidium*による下痢症の診断は、糞便からのオーシストの検出が診断の決め手となる。そのためには迅速かつ特異性の高い検査法が必要であるが、これまで国内では本原虫下痢症の集団発生事例の報告が少なかったことから、統一された検査が確立されていないのが現状である。

今回、ネパールにおける感染症に関する研究の一環として、下痢症患者から*Cryptosporidium parvum*を分離し、本虫の検査法について検討を行なったので報告する。

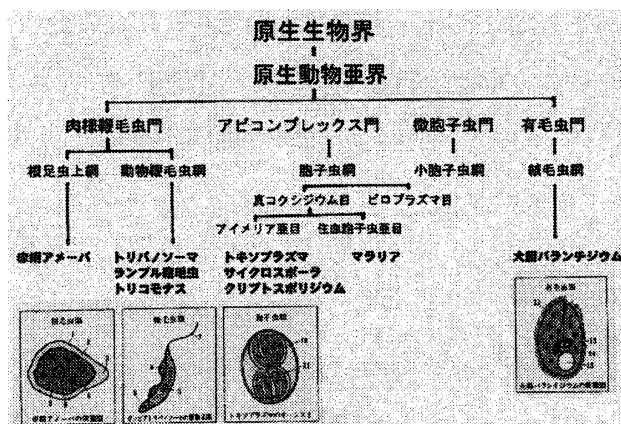
2. 病原性

*Cryptosporidium*は図1に示す通り、孢子虫類に属する原虫で、このうちヒトに感染して下痢を主徴とするクリプトスポリジウム症の原因となるのは小腸に寄生する小型種の*C.parvum*⁹⁾であるが、七面鳥を宿主とする*C.meleagridi*による感染¹⁰⁾や、免疫不全者では胃腺上皮細胞に寄生する大型種の*C.muris*^{*11)}やニワトリを宿主とする*C.baileyi*の感染例¹³⁾も報告されている。いずれも有性生殖で形成された感染性を有するオーシストが糞便中に排出される。*C.parvum*のオーシストは直径約4~5 μmの類円形、*C.muris*のそれは8×6 μmの楕円形で、それぞれ内部に4個のスポロゾイトを包含している。オーシストが経口的に摂取されると、温

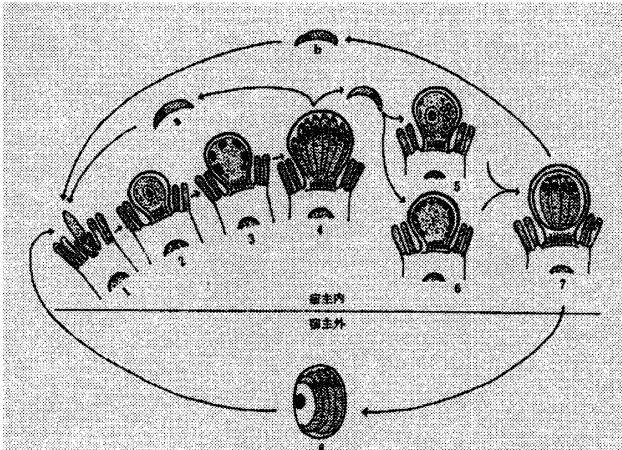
度変化や胃酸の刺激などによりスポロゾイトがオーシストから遊出〈脱囊〉し、*C.muris*では胃腺上皮細胞の微絨毛、*C.parvum*では小腸粘膜上皮細胞の微絨毛に侵入する。微絨毛は膨化・拡張して袋状となり内部に寄生胞を形成し、そこでスポロゾイトは球状の栄養型となった後に核分裂して無性生殖と有性生殖により急激に増殖する。有性生殖の過程で形成されたオーシストは微絨毛内で成熟し、莫大な数の感染性を有する成熟オーシストが糞便とともに排出される。排出される1日当たりのオーシスト数は感染ウシ1頭で100億個、感染者1人で10億個にのぼるといわれている¹⁴⁾。感染形態はオーシストを経口的に摂取することにより感染が成立する典型的な糞口感染であり、接触感染の可能性もあることから性感染症の一つともいえる。(図2にライフサイクルを示した)

本症の主症状は下痢で、腹痛、悪心、軽度の発熱などの症状がしばしば複合してみられる。潜伏期は4~5日で、下痢は軟便から水様便まで様々であるが、その頻度は1日当たり数回~数十回までと多様で、数日から2週間程度持続し、その間はオーシストの排出が続く。

*最近、新呼称として*Cryptosporidium andersoni*¹²⁾が使われるが、ここでは旧来の*C.muris*とする。



〈図1 原虫類の分類〉



〈図2 Cryptosporidiumのライフサイクル〉

(井関基弘：クリプトスポリジウム症、臨床と微生物、14(1987)より抜粋)

1～4. 無性生殖の過程

1. スポロゾイトまたはメロゾイトが粘膜上皮細胞の微絨毛へ侵入
2. 微絨毛内の寄生胞内で发育した栄養型
3. 核分裂しつつあるシズント
4. 成熟シズント、8個のメロゾイトを形成

5と6. 有性生殖の過程

5. 雌性生殖母細胞
6. 雄性生殖母細胞、16個のミクロガメートを形成
7. 成熟オーシスト、4個のスपोロゾイトを形成
8. 体外に排出された成熟オーシスト

a: 成熟シズントから遊離したメロゾイト

b: 成熟オーシストから遊離したスポロゾイト

3. 分 布

*Cryptosporidium*は広範な宿主域を有し、ヒト以外にもウシ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、イヌ、ネコ、ネズミなどにも自然感染しており、世界各地に広く分布している¹⁵⁾。これまで宿主のちがいにより分類が行なわれてきたが、現在は表1に示した8種が独立種と考えられている¹⁶⁾。しかし最近の分子生物学的研究によりさらに細分化される方向にあり流動的である。ヒトおよび家畜における感染状況は地域あるいは国により異なるが、1997年の調査では健康人下痢とHIV陽性者下痢における本原虫の起因割合は、発展途上国ではそれぞれ6.1%と24%、先進国ではそれぞれ2.1%と14%を占めると報告されている¹⁷⁾。家畜についてはウシを中心として高い感染率が報告されているが、わが国ではウシおよびブタの感染率は2.1%と1.1%と報告されている¹⁸⁾。

表1 *Cryptosporidium*の独立種

種	宿主	オーシストの大きさ(μm)
<i>C. parvum</i>	哺乳類	4.5×5
<i>C. andersoni</i> (<i>C. muris</i>)	哺乳類	5.6×7.4
<i>C. meleagridis</i>	七面鳥	4.6×5.2
<i>C. baileyi</i>	ニワトリ	4.6×6.2
<i>C. felis</i>	ネコ	4.5×5
<i>C. wraire</i>	モルモット	
<i>C. serpentis</i>	ヘビ類	5.3×6.2
<i>C. nasorum</i>	魚類	

(文献1より抜粋)

糞便中に排出されたオーシストは水や食品など環境を汚染することになり、その汚染は世界的に広がっている。とりわけ*C. parvum*のオーシストは原虫類としては最小の部類に属し、さらに塩素消毒に強い抵抗性を有する。現在のところ、水系感染を起こす微生物の中で最も消毒耐性の高い原虫であり、通常の浄水処理では原水中に含まれるオーシストを完全には除去できない。本原虫の水道水による集団発生は1980年代中頃から欧米を中心に数多く報告^{19,20)}されており、わが国でも1995年と1997年および2002年に飲料水中の*C. parvum*が原因となった集団下痢症が発生^{21,22,23)}している。食品による集団発生は1994年の米国における生鮮アップルサイダーをはじめとしてサラダや生乳など相次いで報告^{24,25,26)}されてきている。

これまでわが国では本原虫による感染は散発的で、水系集団感染例も知られていなかったために、検出方法の開発・改良や普及が充分になされておらず、環境中の汚染実態はほとんどわかっていないのが現状である。しかし、前述の1995年と1997年の2例の集団発生を契機として環境汚染調査が行なわれるようになり、汚染実態が明らかになりつつある^{27,28)}。これまでの下水の汚染調査成績から、ヒトの感染率はそれほど高くはないと考えられている。散発事例は1986年の国内初の感染症例²⁹⁾以来、今日まで50例程度が確認されており、海外旅行者、AIDS患者およびウシからの感染者などが主である。しかし、検査が充分になされていない現状を考えると、この数字は氷山の一角であるかも知れない。一方、家畜とりわけウシの感染や河川の汚染が諸外国と同様に高いレベルにある実

態が明らかとなってきた。今日の海外旅行者や輸入食品の急増とこれら環境汚染の実態を考えると、国内にクリプトスポリジウム汚染が広範囲に存在すると考えられる。

4. 分離・同定法

クリプトスポリジウムの診断はオーシストを検出することによるが、検体の違いやオーシストの数によりその検出方法は異なる。ここでは糞便および環境水からの検出法について述べる。(図16参照)

検査対象とするべき事例

1. 散発あるいは集団下痢症において起因細菌やウイルスなどが検出されない場合。特に海外旅行者下痢症の場合には重要である。
2. 免疫機能低下の基礎疾患を有する宿主で、原因不明の下痢が持続する場合
3. 散発あるいは集団下痢症において本虫が起因病原体として確定した場合の汚染源調査

A) 糞便からのオーシストの検出

本原虫のオーシストは小さいので直接生鮮塗抹法や一般的な寄生虫卵を集めるホルマリン・エーテル法³⁰⁾など、通常の方法では夾雑物や酵母などの鑑別が困難で検出は極めて困難である。急性期の下痢便で多数のオーシスト数が含まれる検体では、糞便塗抹標本の位相差顕微鏡観察³¹⁾と抗酸染色法³²⁾あるいはネガティブ染色³³⁾の併用により、特徴的なオーシストの形態を確認できる。しかし、オーシスト数が少ない検体では、シヨ糖遠心沈殿浮遊法³⁴⁾で糞便からオーシストを浮遊させて集め、位相差顕微鏡観察で形態を確認し、ノマルスキー微分干渉顕微鏡³⁵⁾でスポロゾイトの有無を調べた後、特異抗体を用いた直接蛍光抗体法³⁶⁾およびDAPI蛍光染色³⁷⁾を行い、特異蛍光およびスポロゾイトの核を確認して同定する。

糞便中にオーシストが検出されなかった場合でも、間隔を置いて3回程度の間歇検査の実施が望

ましい。

検体と保存

検査試料としては大量のオーシストを排出している急性期の新鮮な下痢便がよい。感染を防ぐために蓋付き採便専用容器に数gを採取する。検査までに時間を要する場合には冷蔵庫で一時保存する。輸送の場合にはバイオハザード対応専用容器に密封して感染防御を図る。数日にわたり検査が出来ない場合には、糞便に等量の2%重クロム酸カリ液を加えておけば一定期間(半年程度)は保存できる³⁸⁾。10%ホルマリンでの保存も可能であるが一部の染色検査法では影響を受ける。

1. シヨ糖遠心沈殿浮遊法による集オーシスト法³⁴⁾

シヨ糖液とオーシストとの比重差により、オーシストは液面に浮遊し夾雑物は沈殿する。

〈手 技〉

糞便の前処理(固定と大きな夾雑物の除去)

- 1) 糞便1g程度を短試験管に取る。
- 2) 10%ホルマリン水 約5mlを入れて竹串で充分にほぐしてボルテックスで攪拌。
- 3) 室温で30分間放置して固定する。
- 4) 小漏斗にガーゼを敷き試料液を10mlの短試験管へ濾過
- 5) 遠心1,000g(卓上遠心機で2,000rpm), 10分間
- 6) 沈渣に蒸留水5ml加えボルテックスで攪拌
- 7) 遠心1,000g(卓上遠心機で2,000rpm), 10分間

シヨ糖浮遊法

- 8) 沈渣にシヨ糖液(比重1.2) 4ml加えて充分にボルテックスで攪拌
- 9) 遠心1,000g(卓上遠心機で2,000rpm), 10分間
- 10) 液最表面をエーゼで注意深く採取し検査試料とする。

〈注意点〉

- ・ 2時間以内に観察する
- ・ この検査試料を一般光学生物顕微鏡あるいは位

相差顕微鏡観察以外の検査法に供する場合には、必ず水に再浮遊した試料を用いる。

- ・集オーシスト法としては、他に硫酸亜鉛液（比重1.18）を使った遠心沈殿浮遊法³⁵⁾があるが本法の方が夾雑物が少なく見易い。

〈試薬と器材〉

シヨ糖液

サッカロース（1級でよい）500gに水650mℓを加えて溶解する（比重1.2になる）。

長期間保存するにはフェノールを少量加える。

短試験管 10mℓ滅菌ポリプロピレンシリコン処理丸底試験管

卓上遠心機

2. 位相差顕微鏡観察³¹⁾

物体の屈折率や厚さが違えば透過光に位相差が生じる。この位相差を明暗の差に変えると構造が見やすくなる。一般的には生細胞の観察に不可欠な顕微鏡である。簡便なスクリーニング法として有用である。

〈手 技〉

- 1) 糞便あるいは集オーシスト法を行なった検査試料をスライドガラスに塗抹
- 2) カバーガラスを載せて位相差装置を用いて鏡検（600倍）

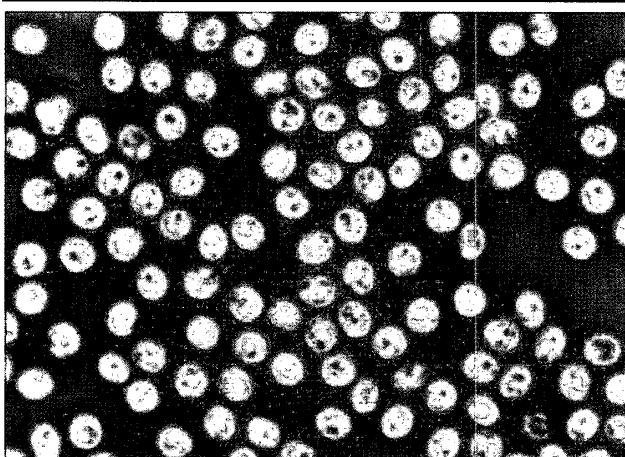


図3 *Cryptosporidium* oocystの位相差顕微鏡像

〈結 果〉

オーシストは直径4～5 μmの類円形または楕

円形（大型種では8×6 μm）で白く輝いて見え、内部に直径1 μm程度の球状の残体と大小の顆粒が明らかな黒点として認められ、オーシスト自体のコントラストは明瞭である。内部構造は明瞭でなくスポロゾイトははっきり見えない。酵母との鑑別が必要であるが、酵母などは屈光性が異なるので、薄く緑色を帯びて見える。

〈注意点〉

- ・集オーシスト法を行なった検査試料は、標本作製後5～10分間放置する（オーシストがカバーガラス面まで浮上する）。観察は液層の最表部すなわちカバーガラスの裏面にオーシストが密着しているのでピント合わせに気をつける。
- ・オーシストを比重0.150以下のシヨ糖液あるいは水に浮遊させた場合、オーシストは透明となり本法での観察はできない。

〈試薬と器材〉

位相差装置

一般光学生物顕微鏡

3. Kinyoun抗酸染色法³²⁾

クリプトスポリジウムのオーシストの抗酸性を利用して抗酸染色を行う。スクリーニング法として有用である。

〈手 技〉

糞便あるいは集オーシスト法を行い蒸留水に再浮遊させた検査試料をスライドガラスにやや厚めに塗抹

- 1) 風乾
- 3) メタノール固定 1～2分間
- 4) 風乾
- 5) カルボールフクシン液（チール石炭酸フクシン液でも可）を塗抹面にのせて染色、3～5分間
- 6) 流水で水洗（塗布面を下にしてフクシンの色が消えるまで）、10～20秒程度
- 7) 1%硫酸で脱色（赤色がなくなるまでを目安とする、2～3分間）

- 8) 水洗
- 9) 0.1%ライトグリーン液で後染色、30秒程度
- 10) 水洗
- 11) 乾燥後にバルサムで封入
- 12) 一般光学生物顕微鏡を用いて鏡検 (600, 1000倍)

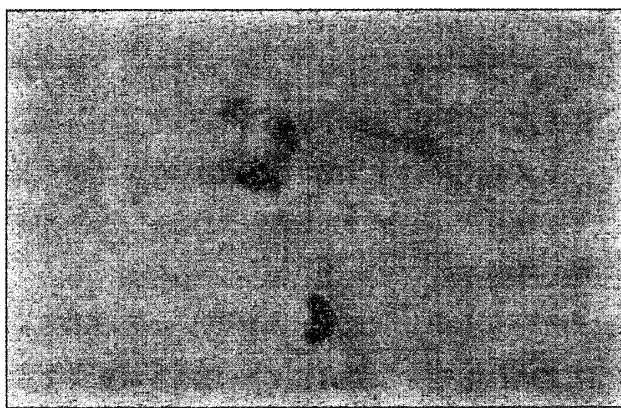


図4 *Cryptosporidium* oocystのKinyoun抗酸染色像

〈結果〉

オーシストはピンクから赤色に馬蹄形あるいはドーナツ形に染色され、部分的に薄く抜けた部分が存在し、染色性は多様である。内部構造は明瞭でなく染色されないものもある。酵母や細菌は緑色に染まるので鑑別しやすい。

〈注意点〉

- ・酸による脱色が不十分な場合には、夾雑物が赤染して赤い無構造の類似円形顆粒が多くなり、オーシストの鑑別が困難となる。

〈試薬と器材〉

カルボールフクシン液

- 塩基性フクシン 4 g
- 石炭酸 8 g
- 95%エタノール 20ml
- 蒸留水 100ml

ライトグリーン液

- ライトグリーン S F 0.1 g
- 氷酢酸 0.1ml
- 蒸留水 100ml

一般光学生物顕微鏡

4. ネガティブ染色³³⁾

オーシスト自体は染まらないが、酵母や細菌あるいは夾雑物が染まることにより分別が容易となる。

蛍光顕微鏡の設備がない場合の便宜的な方法である。簡便なスクリーニング法として有用である。

〈手技〉

- 1) スライドガラス上に糞便あるいは集オーシスト法を行い蒸留水に再浮遊させた検査試料を少量取り、検体より多い目のニューメチレン青染色液を加えて攪拌する。(検体量は18mm×18mmカバーガラスに対して10μl以下を目安とする)
- 2) カバーガラスをかけ100~200倍で観察する。(乾燥を防ぐためパラフィンなどで4隅をシールする)
- 3) 一般光学生物顕微鏡を用いて鏡検 (200~400, 1000倍) コンデンサーを絞り込み、焦点を微動調整しながら観察する。オーシストらしい粒子が検出された場合には高倍率で観察する。

〈結果〉

オーシストは染色されないが、酵母、細菌、残渣などは青色に染まり、多様な形をした無色のオーシストが過剰な色素の青い背景の中に白く浮かんで見える。高倍率の観察ではスポロゾイトなどのオーシストの内部構造が不明瞭ながらも確認される。

〈注意点〉

- ・予め試験管内で検体と色素液と混和してからスライドガラス上に移してもよい。
- ・ニューメチレン青染色液のかわりに尿沈渣観察に用いられるステルンハイマー液でも可。この場合は酵母や夾雑物は青や赤に染まる)。
- ・本法はあくまでもスクリーニング法であり、他の方法による確認が必要である。

〈試薬と器材〉

染色液

ニューメチレン青染色液

ニューメチレン青	2.5 g
シュウ酸カリウム・1水塩	8.0 g
精製水	500ml

ろ過してから使用する。

一般光学生物顕微鏡

4. ノマルスキー微分干渉顕微鏡観察

(Nomarski法)³⁵⁾

光源には偏光が用いられる。標本中の光学的厚さの差によって生じる光路差をコントラストの差、あるいは色の差に変えて見る。オーシストの内部構造の観察に適している。同定法としての価値が高い。

〈手 技〉

- 1) 糞便あるいは集オーシスト法を行い蒸留水に再浮遊させた検査試料をスライドガラスに薄く塗抹
- 2) カバーガラスを載せてノマルスキー微分干渉装置を用いて鏡検 (600, 1000倍)

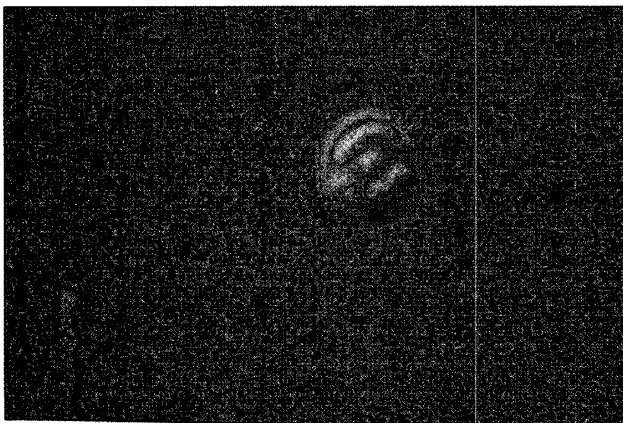


図5 *Cryptosporidium oocyst*の
ノマルスキー微分干渉顕微鏡像

〈結 果〉

屈折率の関係でオーシストはピンク、青、オレンジなど様々な色に見える。

オーシストは残体を取り囲んでいるスポロゾイトや大小の顆粒が明瞭に確認できる。

スポロゾイトは常に4個すべてが確認できるとは限らないが、特徴的な内部構造を確認することが大切である。

〈注意点〉

- ・重積したオーシストでなく単一のものについて観察する。従って、できるだけ薄い標本を作製する。
- ・その都度、コンデンサーの位置、開口絞りなどを適正に調整して、最適の観察条件を整えて観察する。

〈試薬と器材〉

微分干渉装置

一般光学生物顕微鏡

5. 直接蛍光抗体法 (FA)³⁶⁾ と DAPI 蛍光法³⁷⁾

FAは抗原抗体の免疫反応を利用してオーシスト壁を染色し、その特異蛍光を観察する。同時にDAPIを用いてスポロゾイトの核DNAを染色し、その蛍光を観察する。観察には蛍光顕微鏡装置が必要である。両法は感度が高く、FAはスクリーニング法として、また、両法の併用は同定法として優れている。

〈手 技〉

- 1) 糞便あるいは集オーシスト法を行い蒸留水に再浮遊させた検査試料を、無蛍光リングスライドガラス上に検体10 μ lを薄く塗抹
- 2) 風乾後メタノールで固定する。
- 3) FITC標識抗クリプトスポリジウムモノクローナル抗体液25 μ lを載せ、室温で30分間反応。
- 4) 0.15M FA用リン酸緩衝食塩水 (FPBS, pH 7.3) で洗浄。
- 5) 直ちにDAPI液10 μ lを載せ、室温で2分間染色
- 6) 洗浄・風乾後、無蛍光グリセリン液で封入し、蛍光顕微鏡を用いてBV励起法により虫体表層のFITCの特異蛍光を、またUV励起法によりスポロゾイト核の蛍光を観察する。

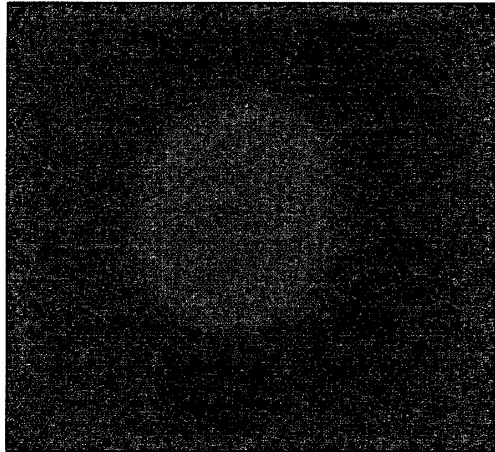


図6 *Cryptosporidium* oocystのFA染色像

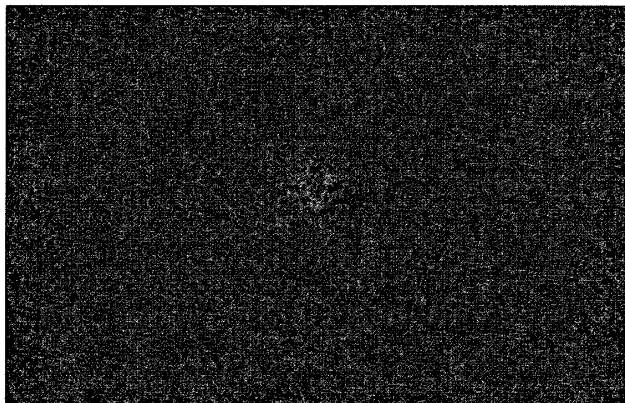


図7 *Cryptosporidium* oocystのDAPI蛍光染色像

〈結果〉

FA法ではオーシストはFITC特有のアップルグリーンに輝き、オーシスト自体のコントラストは極めて明瞭であるが、内部構造は観察できない。

DAPI蛍光法ではオーシストは青白色に輝き、内部構造のスポロゾイトの核が点状に青色に染色されている。オーシストおよびスポロゾイトの核自体のコントラストは明瞭であった。

スポロゾイトの核は常に4個すべてが確認できるとは限らないが、内部構造における特徴的なコントラストを確認することが大切である。

〈注意点〉

- ・ 検体の種類（特に湿潤試料）によっては、FA染色を試験管内で行なうことも可能である。
- ・ 市販の蛍光抗体試薬は属特異性であり、*C. parvum*以外の*Cryptosporidium*とも反応する。また、一部の藻類等と交叉反応することも報告されている。

- ・ 新鮮オーシストではDAPIに染まらないことがある。
- ・ DAPIの濃度と染色時間を予め検討しておく。下記の処方では1～2分間である。
- ・ ホルマリン固定をしたオーシストでは染まりが悪い場合がある。

〈試薬と器材〉

蛍光抗体試薬

DAPI染色液

4-6-diamino-2, phenyl-indole 2 mgを無水メチルアルコール 1 mlに溶解

蛍光顕微鏡

透過型より落射型蛍光顕微鏡の方が輝度が明るく微少な蛍光を観察できる。

BVとUV励起がフィルターの切り替えで瞬時にでき、位相差装置や微分干渉装置も装着できる専用落射型蛍光顕微鏡が有用である。

B) 環境水からのオーシストの検出

水系感染による集団発生にともない、環境水からのオーシストの検出が感染を未然に防ぐためにも、また汚染実態を知る上でも重要となっている。環境水からのクリプトスポリジウムオーシストの試験方法は未だ発展段階にあり、現在世界的に普及している方法は1996年に発表されたEPAのInformation collection ruleで採用されている米国の標準法(ICR法)³⁹⁾である。わが国では前述の集団発生事例を契機として、1996年にこの「標準法」を日本の実状に合わせた「クリプトスポリジウム暫定対策指針」⁴⁰⁾が発表され、更に1998年にその改正がなされて試験方法も改正されて免疫磁気ビーズ(IMS)法⁴¹⁾の導入も可能となった。EPAも1997と1998年の両年で3度改正しており、未だ確立された標準方法はない。ここでは暫定法と我々が河川調査で実施し、その有用性が確認されているEPA改変法⁴²⁾について、それぞれの検査法の概略とその特徴を述べる。

1. 暫定法⁴⁰⁾

試水は加圧器によるセルロースアセテート膜 (CF: 孔径 $1.2\mu\text{m}$) を用いたディスクフィルター法により濾過濃縮する。CFをアセトンで溶かし $1,050\times g$ ($2,500\sim 3,000\text{rpm}$) で10分間遠心後、上清のアセトンを吸引除去する。さらにアセトンを加えて同様の処理を行なった後、沈渣に蒸留水を加えて同様に遠心し上清を吸引除去後、PBS液を加えて同様の処理をして完全にアセトンを除去する。沈渣をPBS液中に再浮遊させて回収用試料としシヨ糖遠心沈殿浮遊法を行なう。前述の糞便のシヨ糖遠心沈殿浮遊法と原理は同じであるが、微少なオーシストの回収を図るために若干、手技が異なる。

- ①試料 (PBSに再懸濁させた液の半分量) を 15ml の遠心沈澱管に入れる。
- ②比重 1.2 のシヨ糖液を水層の下に界面を乱さないように注入する (二層分配の下層法、シヨ糖液量は 2.0ml 程度にする。)
- ③ $2,500\sim 3,000\text{rpm}$ で10分間遠心する。
- ④パストールピペットで上層 (水層) と下層 (シヨ糖層) との界面のフラッフ層 (中間) およびシヨ糖層の上部を回収する。
- ⑤残りのシヨ糖液に5倍量以上のPBSを加え沈渣を再懸濁する。
- ⑥同条件で再遠心沈澱する。
- ⑦同様にフラッフとシヨ糖層上部を回収して④と合わせ検出用試料とする。

次に多試料サンプリングマニホールドに装着した孔径 $0.22\mu\text{m}$ のCF上で間接蛍光抗体法 (IFA)⁴³⁾ を行った後、エタノールを用いて脱水を行い、DABCOグリセロール液で封入し透明化を行なう。そして特異蛍光を観察しNomarski法でスポロゾイトを確認できたものを*Cryptosporidium*オーシストと同定する。

この方法の特徴はオーシストの濃縮・捕捉・回収・観察方法にある。濃縮・捕捉は、ICR法がカー

トリッジ法であるのに対してディスクフィルター法を採用している。回収は濃縮・捕捉後のフィルターをアセトンで可溶化した後、シヨ糖遠心沈殿浮遊法で回収する。そしてフィルターで濃縮して、その膜上でIFA法を行いそのまま観察し、更にNomarski法で同定する。この方法ではアセトンやシヨ糖の除去のために頻回に洗浄・遠心操作を行なわねばならず、遠心操作によるオーシストのロスが大きい。しかし最大の問題点は透明化したフィルター膜上での顕微鏡観察である。除去されなかった夾雑物はFAやNomarski法の観察を妨げるばかりでなく、DAPI蛍光法は非特異蛍光のために観察は不可能で、藻類との鑑別に支障を来す。判定はFA法とNomarski法ともに陽性を示した試料を陽性とする。

2. EPA改変法⁴²⁾

試水は暫定法と同様にディスクフィルター法⁴⁴⁾ あるいはカートリッジ法⁴⁵⁾ により濾過濃縮後、ディスクフィルター法は超音波処理と遠心操作によりオーシストを回収し、免疫磁気ビーズ (IMS) 法により捕捉する。すなわち、濾過膜は、氷冷した 0.01% Tween80と 0.02% SDSを含む 0.15M リン酸緩衝食塩水 (TSPBS) の入ったシャーレへ移し、ペンシル型超音波発生器のペンシル先端の超音波発生口を膜上に向け、数mmの間隔を保ちながら膜表面をなぞってオーシストと夾雑物を膜から剥離する。剥離液は遠心管へ移して $3,000\text{rpm}$ で15分間遠心後、精製水で 10ml に調製したものをIMS法に供する。カートリッジ法は専用の緩衝液を用いて濃縮物を溶出させ、同様の処理を行なう。表面に*Cryptosporidium*オーシストに対する精製抗体がコートされた磁性高分子ポリマービーズ $100\mu\text{l}$ を所定の緩衝液 2ml とともに専用ガラス管中のサンプル水 10ml へ加え、ミキサーを用いて室温で1時間混和し抗体にオーシストを捕捉させる。次いで試験管を専用磁石に取り付け、2分間転倒混和しながらその複合体を分離する。上澄み液全部をビー

カー壁に沿って泡立てないように移し、さらにパスツールピペットを用いて試験管内と複合体表面に付着した夾雑物を蒸留水で注意深く洗って除去する。所定の緩衝液 1 ml で磁石により管壁に分離された複合体を洗い、その懸濁液をマイクロ遠心管へ移す。(ビーカーに移した上澄み液については、さらに同様の分離回収操作を 2 回行った。) 次に遠心管に専用磁石を取り付け、1 分間転倒混和しながらその複合体を分離する。そして上澄み液を除去後、0.1N HCl 50 μ l を添加して 5 分間静置し、オーシストをビーズから剥離させる。

(除去した上澄み液については、さらに同様の分離回収操作を 2 回行う。) 再び専用磁石を取り付けてビーズを管壁に集め、ゲローダチップを用いて上澄み液を完全に採取し、スライドガラス上の 1N NaOH 5 μ l と混和して中和させ、風乾後メタノール固定する。次に FITC 標識抗クリプトスポリジウムモノクローナル抗体液を用いて FA 法を行い、特異蛍光を示した虫体について Nomarski 法によりスポロゾイトの有無を確認する。さらに DAPI 蛍光法を行い、スポロゾイトの核を確認できたものを *Cryptosporidium* オーシストと同定する。

〈試薬と器材〉

IFA 検査キット

EnSys 社のハイドロフルオール・コンボなどの製品がある。

DABCO 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane クリプトスポリジウムの IMS 法キット

ダイナビーズ アンチクリプトスポリジウムキット (ダイナル社) など市販品がある。

FITC 標識抗クリプトスポリジウムモノクローナル抗体液

Cellabs 社など市販品がある。

多試料サンプリングマニホールド

ミリポア社製

加圧器 ミリポア社など市販品がある。

ディスクフィルターホルダー

ミリポア社など市販品がある。

ペンシル型超音波発生器

トミー精工など市販品がある。

ゲローダチップ

エンツペンドルフ社など市販品がある。

この方法の特徴は暫定法がフィルターからの CPO の回収に可溶剤を用いているのに対して、ペンシル型の超音波破碎器を用いてフィルターから CPO を剥離させる超音波処理法を導入したこと、夾雑物からの CPO 捕捉に IMS 法を用いたこと、更に同定法に DAPI 蛍光法を追加したことである。超音波処理法⁴⁶⁾は極めて簡便・迅速に剥離回収ができ、夾雑物の影響が軽微で、また、IMS 法は免疫反応であるために特異性に優れ、磁性による回収は夾雑物の除去が容易である。そして最大の利点はリングスライド上で FA 法、Nomarski 法、DAPI 蛍光法の 3 法の同定法が実施でき、更に夾雑物の混入が少ないために顕微鏡観察が極めて容易であることである。判定は 3 法すべてが陽性を示した試料を陽性とする。

我々が検討した暫定法と EPA 改変法による河川水からのオーシストの回収率は、それぞれ 2~14% と 62~88% であった⁴²⁾。

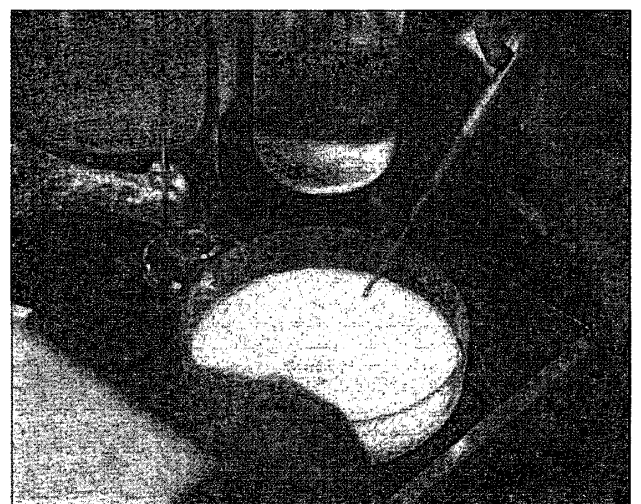


図 8 超音波処理法

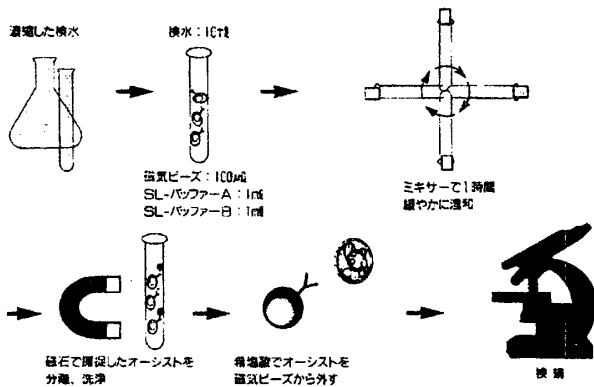


図9 免疫磁気ビーズ法の測定手順

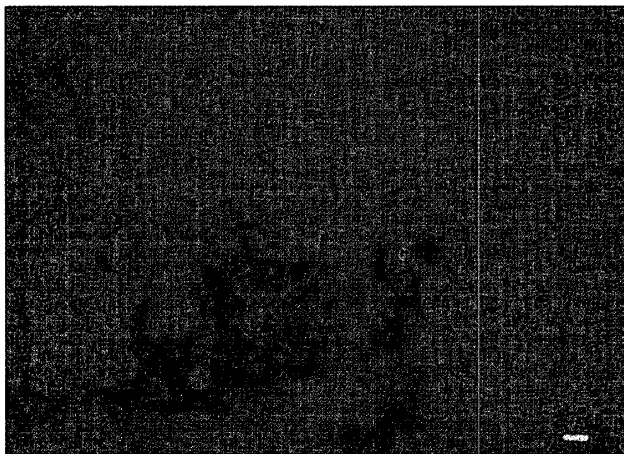


図10 暫定法によるCryptosporidium oocystのFA染色像

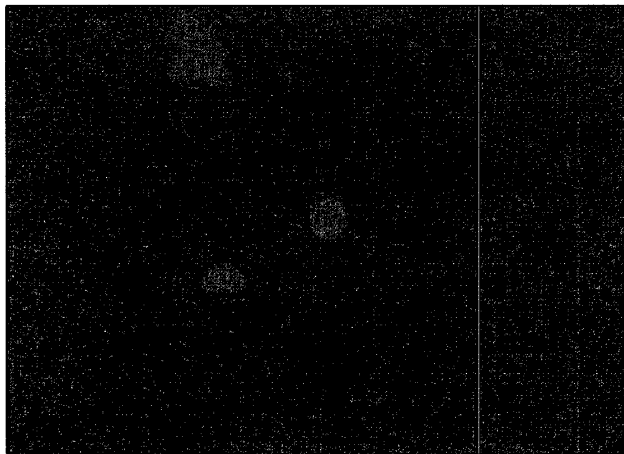


図11 EPA改変法によるCryptosporidium oocystのFA染色像

5. 遺伝子検査

近年、遺伝子研究と技術の進歩により、感染症の診断・治療・疫学に遺伝子検査が導入され大きな成果を挙げている。特にPCR法⁴⁷⁾などの遺伝子増幅法が開発されてからは、迅速性と感度に優れた病原体検出の迅速検査として不可欠な検査となっている。

原虫感染症の遺伝子診断については、これまで赤痢アメーバの病原性・非病原性の鑑別などで、その有用性が確認されている⁴⁸⁾。

クリプトスポリジウムの遺伝子診断については、これまで主に種の同定⁴⁹⁾や遺伝子型⁵⁰⁾および疫学的解析⁵¹⁾において実施されてきている。

ここでは我々が実態調査や汚染源調査で行なっている、種の同定を目的としたPCR制限酵素切断多型性分析(PCR-RFLP)⁵²⁾と遺伝子型別を目的としたPCR-RFLP⁵³⁾について方法を述べる。

クリプトスポリジウムのGenotyping

方法	種	標的遺伝子
1 PCR-RFLP	<i>Cryptosporidium</i> species & <i>Eimeria</i> species	18S rRNA
2 PCR-RFLP	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Poly-T

方法1. PCRによる*Cryptosporidium* species と *Eimeria* species 遺伝子の増幅およびPCR-RFLPによる*Cryptosporidium parvum*の確認

方法2. PCRによる*Cryptosporidium parvum* 遺伝子の増幅およびPCR-RFLPによる*Cryptosporidium parvum*のhuman typeと bovine typeの確認

検査法

1. PCR試料の調整

- 1) 精製オーシストを遠心(2,500rpm、5分間)して沈渣に10μlの滅菌蒸留水を加える。
- 2) その2μlを20μlのlysis Buffer*¹に加え、55℃1時間、95℃10分間反応させ、遠心する(10,000rpm、1分間)。
- 3) 20μlの上清を80μlのPCR反応液に加えてPCRを行う。

*1 lysis Buffer ; 10 mM tris [pH8.0] 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂ 0.45% NP-40, 0.45% Tween20, 0.01% Proteinase K

2. PCR

1) プライマーセット:

方法1

5' - AGTGCTTAAAGCAGGCAACTG - 3'

5' - CGTTAACGGAATTAACCAGAC - 3'

方法2 (CRY-44/373)

5' - CTCTTAATCCAATCATTACAAC - 3'

5' - AGCAGCAAGATATGATACCG - 3'

2) 温度プログラム

94℃ 3分 - (94℃ 0.5分 - 53℃ 0.5分 - 72℃ 0.5分) - 72℃ 5分 () 内40サイクル

PCR反応生成物はPCR-Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、増幅産物の確認を行い、制限酵素処理用の試料とする。

3. PCR-RFLP

方法1

精製したPCR-増幅産物 (10-20 μl) に等量の制限酵素Bufferと制限酵素Mae I 2 μlを加え、45℃ 2~3時間反応させる。

方法2

精製したPCR-増幅産物 (25 μl) に制限酵素Buffer 3 μlと制限酵素Rsa I 2 μlを加え、37℃ 2~3時間反応させる。

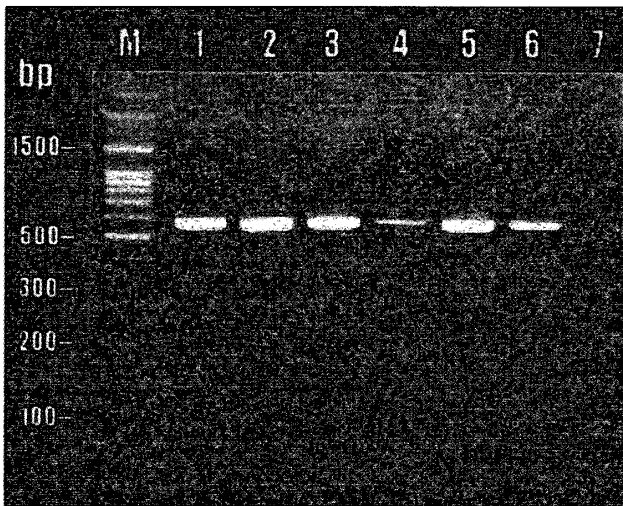


図12 Mae I 消化前(Method 1)

M: サイズマーカー, lane 1, 2, 4~6: *C. parvum*, lane 3: *C. andersoni*(*C. muris*)



図13 Mae I 消化後(Method 1)

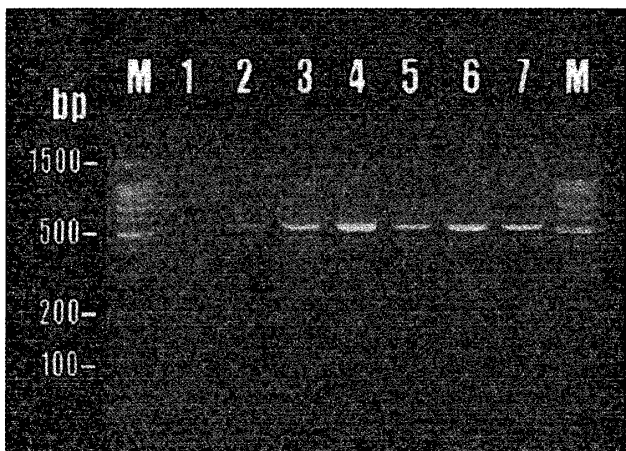


図14 Rsa I 消化前(Method 2)

M: サイズマーカー, lane 1: *C. andersoni*, lane 2, 3, 5~7: *C. parvum*, bovine genotype lane 4: *C. parvum*, human genotype

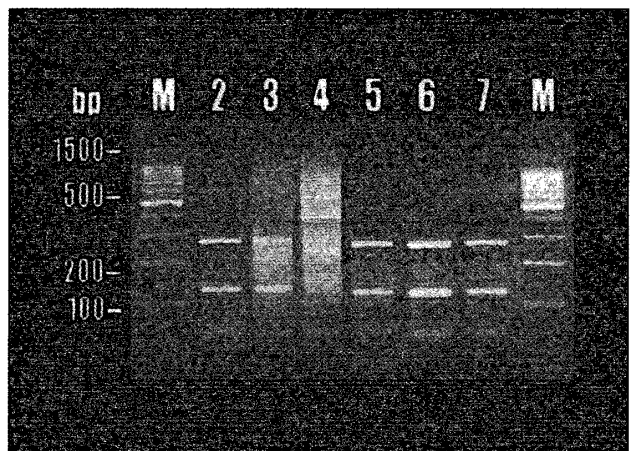


図15 Rsa I 消化後(Method 2)

4. 結果

方法	PCR 増幅産物	種	PCR-RFLP 酵素切断後の主要バンド
1.	556	<i>C.parvum</i>	273, 283
		<i>C.muris</i>	475, 275, 156, 80
		<i>C.baileyi</i>	
2.	518	<i>C.parvum</i> (human)	400, 50
		<i>C.parvum</i> (bovine)	270, 130, 50

〈注意点〉

- ・オーシストからのDNAの抽出方法は検査試料の違いや数により大きく異なる。糞便は多くの阻害物質が含まれており、一般的には精製したオーシストを用いる。我々は精製に免疫磁気ビーズ法を用いて良好な結果を得ている。
- ・汚染を防ぐために専用の実験室で行なわねばならない。

〈試薬と器材〉

1) 基本的なもの

PCRチューブ (0.5ml, 0.2ml)
疎水性フィルター付きPCR用ピペットチップ
微量ピペット (10, 200, 1,000 μ l)
微量高速冷却遠心機
恒温水槽
滅菌精製水 (DW/MiliQなど)
TEバッファ (10mM, Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) など

2) DNA抽出用

NP-40
Tween20
Proteinase K
加熱用ブロックヒーター
ミネラルオイル など

3) PCRならびに電気泳動用

サーマルサイクラー
電気泳動装置
Taq DNA polymerase キット
プライマー

制限酵素

アガロース
TBEバッファ
泳動用サンプルバッファ
DNAサイズマーカー
エチジウムブロマイド (EtBr) 溶液 など

一般的に感染症における病原体のPCRによる遺伝学的同定は、使用するプライマーによって増幅できる病原体の種や遺伝型は限られている。*Cryptosporidium*についても標的とする主な遺伝子は18SリボソームRNA (18SrRNA)⁵²⁾, Oocyst wall protein (COWP)⁵⁴⁾, Polythreonin (Poly-T)⁵³⁾およびThrombospondin related adhesive protein-1 (TRAP-C1)⁵⁵⁾などで、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを作製して増幅させて同定する。河川などの環境から検出された*Cryptosporidium*の最終的な種の確定には、そのPCRによる増幅産物の塩基配列の解析が必要である。

6. 治療と予防

本症は正常な免疫機能があれば抗体が産生され、一過性の下痢に終始して数週間で自然治癒するが、AIDSなど免疫機能が低下している場合には慢性の重症下痢症となり死に至ることもある。今日まで数多くの抗原虫剤、抗生物質、抗真菌剤などが、患者や家畜に対して試験投与が行なわれてきたが、未だ有効な治療薬は見つかっていない。従って、重症の下痢に対しては輸液、鎮痛剤、止瀉剤などを用いての対症療法を行なうが、下痢の改善にパロモマイシンやアジスロマイシンが幾分有効とされる⁵⁶⁾。

一般的に原虫は感染を成立させるために必要な最小感染量が極めて小さい。普通、食中毒では食品1g当たり 10^5 程度以上の菌が存在しないと感染しないといわれている。細菌の場合、多くは胃酸によって死滅するが、オーシストは逆に脱囊の引き金となって感染を促すことになり、極めて少

数でも感染する。本原虫の感染を起こすオーシストLD₅₀は132個との報告⁵⁷⁾もあるが、現在では1個摂取したときの感染確立は約2%と計算されている。Haasら⁵⁸⁾の確率関係式では、1個/20ℓ濃度の浄水を2ℓ/1日飲用した場合、1日当たり10,000人に約4人、1年間では10,000人のうち1,400人が感染すると試算されており、感染力は極めて高い。

原虫類のシストやオーシストは一般的に消毒薬耐性値(指標としてCT値[オーシストを不活化するために必要な消毒剤の濃度と(分)の積]が用いられている)が大きい、とりわけ本原虫のオーシスト壁は強固で、70%エタノールや10%ホルマリン水に10分間浸けても感染性を失わず、日常使用される消毒剤では死滅しない。特に塩素では99%不活化に要するCT値が7,200mg・min/liter(1mg/literの塩素濃度で1週間必要)と著しく高く、大腸菌の24万倍もの耐性を有する。4℃の水中では1年後でも細胞への感染性を有するというが、幸い熱や乾燥に弱く、60℃以上で30分、煮沸で1分、-20℃で24時間以上、また常温で1~4日の乾燥で不活化される⁵⁹⁾。

検体処理や器材の汚染除去のための消毒については有効な方法はない。唯一、アンモニアに消毒効果が認められており、アンモニア系消毒剤OOCIDE(ANTEC社)が利用できるが、最も簡単な方法は煮沸を完全に行なうことであろう。

7. 実験室における感染防止対策

本原虫は消毒薬耐性が極めて大きくまた、最小感染量が小さいことから、検査従事者はその取り扱いに十分に注意しなければならない。検査を実施する場合には、検査室内はもちろん環境汚染や二次感染防止への配慮も重要である。

以下のバイオハザードに準じた防止対策を取るのが望ましい。

- ①検査試料の採取においてはゴム手袋を着用する。

- ②採取容器は感染を防ぐための専用容器を用いる。
- ③検査試料の取り扱いにおいては、その飛散に注意する。
- ④試料および検査に使用した器具で煮沸可能なものはすべて加熱処理し、煮沸不可能なものは、70℃以上で10分同程度加湿処理する。
- ⑤検査に使用した試薬等の廃液は加熱処理した後、廃棄又は処理委託する。
- ⑥検査者の手指や身体の一部が汚染された時は、直ちに流水でよく洗いアルコール綿などで拭いて十分に乾燥させる。流水は必ず加熱処理する。
- ⑦実験台や機材が汚染された時も、同様にアルコール綿などで拭いて十分に乾燥させる。
- ⑧使用したアルコール綿や紙タオル等は焼却処理する。

8. ま と め

新興感染症の一つであるクリプトスポリジウム症の診断および飲料水を介した本虫による集団下痢症の疫学調査では、糞便および飲料水からの*Cryptosporidium* oocystの検出と種の同定が不可欠である。糞便からの検出は、まず最初に従来から用いられている形態学的な検査法を行い、次に特異性の高い形態学的あるいは免疫学的検査法で同定を行なう2ステップ検査システムが迅速性に優れており、更に確定診断として遺伝学的検査法による種の同定が必要である。飲料水からの検出は、暫定法よりもEPA改変法の方がオーシストの捕捉性と特異性に優れており、有用性が高いと考えられる。疫学調査においては遺伝学的検査に加えて塩基配列解析法の導入が重要である。

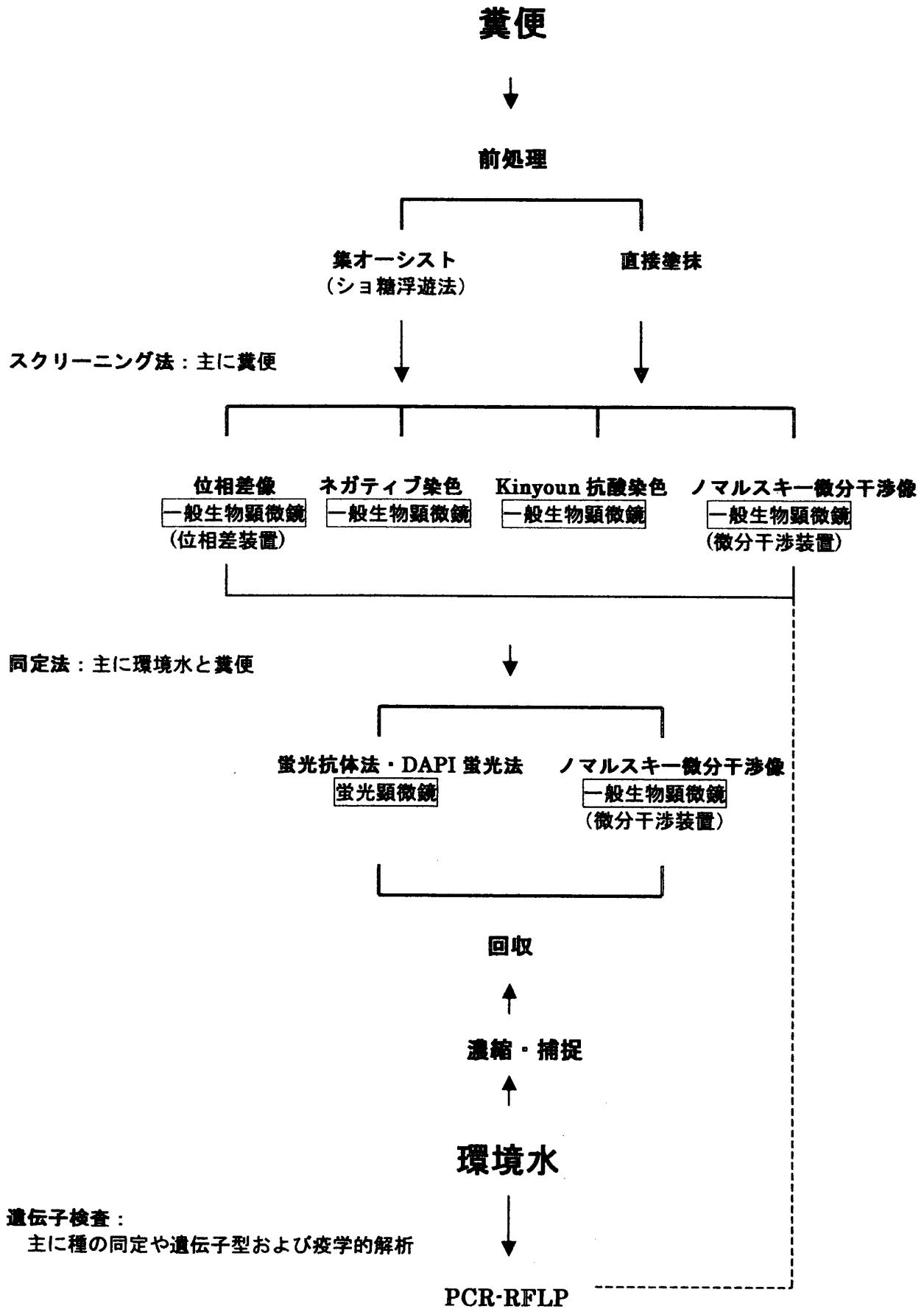


図16 クリプトスポリジウムの分離・同定法手順

9. 文 献

- 1) Korich, D. G., Mead, J. R., Madore, M. S., Sinclair, N. A., and Sterling, C. R.: Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1423-1428 (1990)
- 2) Tyzzer, E. E.: A protozoan found in the peptic glands of the common mouse, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 5, 12-13 (1907)
- 3) Nime, F. A., Burek, J. D., Page, D. L., Holscher, M. A., and Yardley, J. H.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*, *Gastroenterol.*, 70, 592-598 (1976)
- 4) Centers for Disease Control: Cryptosporidiosis: Assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *MMWR*, 31, 589-592 (1982)
- 5) Antonio, R. G. D., Win, R. E., Taylor, J. P., Gustafson, T. L., Current, W. L., Rhodes, M. M., Gary, G. W., and Zajac, R. A.: A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts, *Ann. Inter. Med.*, 103, 886-888 (1986)
- 6) Fox, K. R., and Lytle, D. A.: The Milwaukee cryptosporidiosis outbreak: Investigation and recommendation, *Proc. AWWA Water Qual. Technol.*, 1767-1783 (1993)
- 7) 厚生労働省: 感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律, (1999)
- 8) 厚生労働省: 感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律一部改正, (2003)
- 9) Tyzzer, E. E.: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse, *Arch. Protistenk.*, 26, 394-418 (1912)
- 10) Slavin, D.: *Cryptosporidium meleagridis* (sp. Nov.), *J. Comp. Pathol.*, 65, 262-266 (1955)
- 11) Tyzzer, E. E.: An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. Et sp. Nov.) of the gastric glands of the common mouse, *J. Mes. Res.*, 23, 487-509 (1910)
- 12) Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R., and Blagburn, b. L.: *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos taurus*, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47, 91-95 (2000)
- 13) Ditrich, O., Palkovic, L., and Sterba, J.: The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man, *Parasitol. Res.*, 77, 44-47 (1991)
- 14) Fayer, R., Casbarre, L., and Pasquali, P.: *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patts, *Int. J. Parasitol.*, 28, 49-56 (1998)
- 15) Navin, T. R., and Juranek, D. D.: Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review, *Rev. Infect. Dis.*, 6, 313-327 (1984)
- 16) Fayer, R.: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, CRC press, NY, USA (1997)
- 17) 国立感染症研究所感染症情報センター: 感染症の話—クリプトスポリジウムのお話, *Infect. Dis. Week. Rep.*, 38・39, 31-34 (1999)
- 18) 農林水産省: クリプトスポリジウムに係わる調査について(報告), *家畜衛生週報*, 2480, 5-6 (1997)
- 19) Antonio, R. G. D., Win, R. E., Taylor, J. P., Gustafson, T. L., Current, W. L., Rhodes, M. M., Gary, G. W., and Zajac, R. A.: A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts, *Ann. Inter. Med.*, 103, 886-888 (1986)

- 20) Fayer, R., and Unger, B. L. P.: *Cryptosporidium spp.* and cryptosporidiosis, *Microbial. Rev.*, 50, 458-483 (1986)
- 21) 黒木俊郎, 渡辺祐子, 浅井良夫, 山井志朗, 遠藤卓郎, 宇仁茂彦, 木俣 勲, 井関基弘: 神奈川県内で集団発生した水系感染 *Cryptosporidium* 症, *感染症学雑誌*, 70, 132-139 (1996)
- 22) 埼玉県衛生部: クリプトスポリジウムによる集団感染症報告書 (1997)
- 23) 押部智宏, 辻 英高, 小野一男, 増田邦義: クリプトスポリジウムの集団感染事例・兵庫県, *病原微生物検出情報*, 23, 145 (2002)
- 24) Casemore, D. P.: Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis, *Epidemiol. Infect.*, 104, 1-28 (1990)
- 25) Millard, P. S., Gensheimer, K. F., Addiss, D. G., Sosin, D. M., Beckett, G. A., Houck-Jankoski, A., and Hudson, A.: An outbreak of cryptosporidiosis from fresh pressed apple cider, *JAMA*, 272, 1592-1596 (1994)
- 26) Centers for Disease Control: Foodborne outbreak of diarrheal illness associated with *Cryptosporidium parvum*-Minnesota, 1995, *MMWR*, 46, 451-452 (1997)
- 27) 橋本温, 平田 強: 相模川水系におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジアの汚染レベル, *水環境学会誌*, 21, 119-122 (1998)
- 28) Ono, K., Tsuji, H., Rai, S. K., Yamamoto, A., Masuda, K., Endo, T., Hotta, H., Kawamura, T., and Uga, S.: Contamination of river water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in Western Japan, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3832-3836 (2001)
- 29) 鈴木了司, 岡村宣典, 倉繁隆信, 倉繁 柚, 浜田義文, 是沢俊輔, 雑賀光一: ネフローゼ症候群の1患者のクリプトスポリジウム症, *日熱医学会誌*, 13-21 (1986)
- 30) Mowlvin, D. M., and Beooke, M. M.: Laboratory procedures for the diagnosis of intestinal parasites, 3rd ed, U. S. Department of Health and Human Services Pub, Atlanta, GA (1982)
- 31) Garcia, L. S., Brucker, D. A.: *Diagnostic Medical Parasitology*, 2nd ed (1993) ASM, Washington DC
- 32) Edward, K. M.: *Hunter's Tropical Medicine*, 7th, ed. by Strickland, G. T., 1080-1081 (1991), Saunders, Philadelphia.
- 33) Balows, A., Hausler, W. J., and Herrmann, K. L.: *Manual of clinical Microbiology*, 6th ed (1995), ASM, Washington DC
- 34) Edward, K. M.: *Hunter's Tropical Medicine*, 7th, ed. by Strickland, G. T., 1079-1080 (1991), Saunders, Philadelphia.
- 35) Edward, K. M.: *Hunter's Tropical Medicine*, 7th, ed. by Strickland, G. T., 1079 (1991), Saunders, Philadelphia.
- 36) 小野一男, 辻 英高, 増田邦義, Shiba Kumar Rai, 宇賀昭二, 松村武男, 川村 隆: 水系腸管病原性原虫 *Cryptosporidium* の検出法の検討, *兵庫県立衛生研究所年報*, 32, 100-106 (1997)
- 37) Kawamoto, F., Mizuno, S., Fujioka, H., Kumada, N., Sugiyama, E., Takeuchi, T., Kobayashi, S., Iseki, M., Yamada, M., Matsumoto, Y., Tegoshi, T., and Yoshida, Y.: Simple and rapid staining for detection of *Entamoeba* cysts and other protozoans with fluorochromes, *Jpn. J. Med. Sci. Bol.*, 40, 35-46, (1987)
- 38) Campbell, A. T., Robertson, L. J., and Smith, H. V.: Effects of preservatives on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4361-4362 (1993)
- 39) U. S. EPA: Proposed ICR protozoan method for detection *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody

- procedure, Federal Register. , 59, 6416-6429 (1994)
- 40) 厚生省水道環境部水道整備課：水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針について (1996)
- 41) Campbell, A. , and Smith, H. , : Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from water samples : round robin comparison of techniques, Wat. Sci. Technol, 35, 397-401 (1997)
- 42) 小野一男, 辻 英高, 島田邦夫, 増田邦義, 中西重喜, 宇賀昭二, Shiba Kumar Rai, 遠藤卓郎, 堀田 博, 川村 隆：水源の汚染実態調査, 兵庫県健康福祉部編, 兵庫県におけるクリプトスポリジウム汚染実態調査報告書. (2000)
- 43) Sterling, C. R. , Arrowood, M. J. , Marshall, M. M. , and Stetzenbach, L. D. , : The detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from water sources using monoclonal antibodies, In Proc. AWWA Water Quality Tech. Conf. , AWWA, Denver, CO (1987)
- 44) Aldom, J. E. , and Chagla, A. H. , : Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method, Letters in Appl. Microbiol, 20, 166-167 (1995)
- 45) Matheson, Z. , Hargy, T. M. , McCuin, R. M. , Clancy, J. L. , and Fricker, C. R. , : An evaluation of the Gelman Envirochek capsule for the simultaneous concentration of *Cryptosporidium* and *Giardia* from water, J. Appl. Microbiol, 85, 755-761 (1998)
- 46) 小野一男, 辻 英高, 島田邦夫, 増田邦義, 遠藤卓郎：河川水からの*Cryptosporidium*と*Giardia*の検出状況, 感染症学誌, 74, 1-8(2001)
- 47) Podzorski, R. P. , and Persing, D. H. , : Molecular detection and identification of microorganisms, 130-143, Manual of Clinical Microbiology, ASM, Washington, DC (1995)
- 48) Tachibana, H. , Kobayashi, S. , and Takekoshi, M. , : Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction, J. Infect. Dis, 164, 825-826 (1991)
- 49) Xiao, L. , Morgan, U. M. , Limor, J. , Escalante, A. , Arrowood, H. , Shulaw, W. , Thompson, R. C. A. , Fayer, R. , and Lal, A. A. , : Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species, Appl. Environ. Microbiol, 65 3386-3391 (1999)
- 50) Sulaiman, I. M. , Lal, A. A. , and Xiao, J. , : A population genetic study of the *Cryptosporidium parvum* human genotype parasites, J. Eukaryot. Microbiol. Suppl, 24-27 (2001)
- 51) Morgan, U. M. , and Thompson, R. C. A. , : PCR detection of *Cryptosporidium* : The way forward ?, Parasitol. Today, 14, 241-245 (1998)
- 52) Awad-EI-Kariem, F. M. , Warhurst, D. C. , and McDonald, V. , : Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction, Parasitol, 109, 19-22 (1994)
- 53) Carraway, M. , Tzipori, S. , and Widmer, G. , : A new restriction fragment length polymorphism from *Cryptosporidium parvum* identifies genetically heterogeneous parasite populations and genotypic changes following transmission from bovine to human hosts, Infect. Immun, 65, 3958-3960 (1997)
- 54) Xiao, L. , Limor, J. , Morgan, U. M. , Sulaiman, I. M. , Thompson, R. C. , and Lal, A. A. , : Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites, Appl. Environ. Microbiol, 66, 5499-5502 (2000)
- 55) Spano, F. , Putignani, L. , Guida, S. , and Crisanti,

- A., : *Cryptosporidium parvum* : PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondin-related adhesive protein of *Cryptosporidium*-1) gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin, *Exp. Parasitol*, 90, 195-198 (1998)
- 56) Fayer, R., and Ellis, W., : Paromomycin in effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves, *J. Parasitol*, 79, 771-774 (1993)
- 57) Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., Sterling, C. R., and Dupon, H. L., : *Cryptosporidium parvum* : intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers, *J. Infect. Dis*, 173, 232-236 (1996)
- 58) Hass, C. N., Crockett, C. S., Rose, J. B., Gerba, C. P., and Fazil, A. M., : Assessing the risk posed by oocysts in drinking water, *J. Am. Water Works Assoc*, 88, 131-136 (1996)
- 59) 平田 強 : 水道によるクリプトスポリジウム症の集団発生, *食衛誌*, 38, 153-157 (1997)