

ELISAを用いたCryptosporidium parvumオーシストの生育活性評価法と紫外線による不活化の検討

著者	加藤 敏朗, 竹内 りさ, 小野 芳朗, 三木 理
著者別表示	Kato Toshiaki, Takeuchi Risa, Miki Osamu
雑誌名	水環境学会誌
巻	25
号	10
ページ	613-617
発行年	2002-10-10
URL	http://doi.org/10.24517/00064530

doi: 10.2965/jswe.25.613



ELISA を用いた *Cryptosporidium parvum* オーシストの生育活性評価法と紫外線による不活化の検討

加藤 敏 朗*
小野 芳 朗**

竹内 り さ**
三木 理*

Determination of Viability and Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Quantitative ELISA during UV Irradiation

Toshiaki KATO*, Risa TAKEUCHI**,
Yoshiro ONO** and Osamu MIKI*

* 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

Two ELISA methods were investigated for the quantitative detection of viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. One is to detect the sporozoites attached to the cell surface, and another is to detect the oocysts developing in host cell. It was thought that the former method, named "Fixed-cell" ELISA, could assess the viability of oocysts, and the latter method, named "Living-cell" ELISA, could assess the infectivity of oocysts. In both ELISA systems, the resulting optical density was related to the number of oocysts inoculated. Inactivation of oocyst by ultraviolet (UV) irradiation was evaluated using these two ELISA systems. One-log reduction in infectivity of oocysts was achieved by $10 \text{ mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ of UV irradiation. At this UV dose, no reduction in viability determined by "Fixed-cell" ELISA was observed.

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⁾。これら原虫類は、塩素剤に対して耐性があるため、これに替わる対策技術の確立を目指した取り組みが活発化している。原虫対策技術としては、膜分離除去法^{4),5)}やオゾン処理⁶⁾ないしはオゾン/紫外線処理⁷⁾の適用が検討されているが、最近、紫外線消毒により原虫類を不活化できることが報告され、注目をあつめるようになった⁸⁾。

紫外線消毒に関する初期の報告⁹⁾では、*Cryptosporidium* オーシストは $15000 \text{ mW} \cdot \text{s}^{-1}$ の紫外線源より 150 分以上紫外線を照射しないと死滅させることができないため、原虫類の消毒法として紫外線消毒は必ずしも効果的な手段ではないとされていた。しかしながら、最近、米国の複数のグループから数 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ 程度の低用量の紫外線照射によって *Cryptosporidium* オーシストの感染性を 99 % 程度以上不活化できることが報告され

た^{10,11)}。

消毒の目的を病害の防除に求めるとすれば、病原微生物を死滅させなくとも感染能力を消失させることができれば、この目的を達成していると考えられる。この水質衛生学上の観点から原虫対策技術として紫外線消毒の適用が大いに期待されている。

物理的な除去と異なり、消毒の場合は原虫類の生存性と感染性といった生育活性を指標として消毒性能を評価する必要がある。生存性の検定法については、脱囊試験¹²⁾、バイタル染色¹³⁾が汎用されている。一方、感染性の検定法としては、動物感染試験^{14,15)}、培養細胞試験¹⁶⁾が提案されている。本論文では、生育活性として生存性と感染性に着目し、培養細胞系を用いた ELISA 法について検討した。

Joe ら¹⁷⁾は、脱囊処理したオーシスト懸濁液から分離精製したスポロゾイトを、ホルマリン固定した培養細胞に接触させ、細胞表面に付着したスポロゾイトを ELISA にて検出する方法を報告している。本法を改良、発展させ、予

* 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

めスポロゾイトを精製することなく ELISA にて検出することができれば、脱嚢試験に相当する生存性検定法となることが期待された。

また、Woods ら¹⁹⁾は、培養細胞にオーシスト懸濁液を接種し、細胞内で増殖したオーシストを ELISA にて検出する方法を報告した。我々は、Woods らの方法を進展させ、培養条件や ELISA 条件を検討した結果、 $1 \times 10^2 \sim 3 \times 10^4$ 個の範囲でオーシストを定量検出できることを既に報告している¹⁹⁾。この方法は、*Cryptosporidium* オーシストの感染性を検定できると考えている。

本論文においては、培養細胞系を用いた ELISA 法として、脱嚢性からみた生存性検定と培養細胞への感染性検定を検討し、これらの検査法を用いて紫外線による *Cryptosporidium* オーシストの不活化の可能性について検討した。その結果、紫外線によって *Cryptosporidium* オーシストは死滅しないが、感染性が顕著に低減することを確認できた。

2. 方法

2.1 培養細胞

1) 宿主細胞株および継代培養：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。細胞の培養条件等については既報に準じ、10% ウマ血清等を添加した RPMI1640 培地で培養し、3日毎に継代した。

2) 培養細胞の前培養：継代後3日間培養した HCT-8 細胞をトリプシン処理により培養容器より剥離させ、PBS(-)で洗浄した後、5% ウマ血清等を添加した RPMI1640 培地に懸濁し、予めゼラチンコートした 96 穴マルチプレートの各ウェルに 1×10^4 cell ずつ分注した。CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養した後に、以下の ELISA に供した。

2.2 生存性検査のための“Fixed-cell” ELISA

1) 細胞の前処理：オーシスト接種に先立って、マルチプレートで前培養した HCT-8 細胞に対してホルマリン固定処理を行った。すなわち、培養後の各ウェルから培地液を除去し、PBS(-)でウェルを洗浄し、ホルマリン溶液 [4% パラホルムアルデヒド ; PBS(-)] を各ウェルに 200 μ l ずつ分注し、室温にて 30 分反応させた。その後、ウェルを PBS(-)で 2 回洗浄した。

2) オーシストの接種：*Cryptosporidium parvum* オーシスト (Waterborne Inc.) を増殖培地 (5% ウマ血清 ; $1 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 葉酸 ; $4 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ *p*-アミノ安息香酸 ; $2 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ パントテン酸 ; $35 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ アスコルビン酸 ; RPMI1640 (pH7.1 \pm 0.1)) で希釈し、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ [oocysts \cdot ml⁻¹] の範囲でオーシスト懸濁液の希釈列を調製した。ホルマリン固定処理後の各ウェルにオーシスト懸濁液を 100 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 2 時間培養し、ELISA に供した。なお、実験に先立って供試オーシストを DAPI/PI を用いたバイタル染色で検定したところ 95% のオーシストに生育活性が認められ、また、供試オーシストを前述の増殖培地に懸濁し、37°C \cdot 5%炭酸ガスの CO₂ インキュベーター内で 2 時間反応させた場合の脱嚢率は 85% 以上であった。

3) ELISA：既報¹⁹⁾に準じ、固定、一次処理、二次処

理、発色反応を行い、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。但し、一次処理液として、抗スポロゾイト抗体 (フルオレセイン標識物 ; Sporoglo™ ; Waterborne Inc.) をブロッキング液 [1% ウシ血清アルブミン (Fraction V ; Sigma) ; 0.002% Tween 20 (和光純薬) ; PBS(-)] にて 20 倍に希釈した溶液を、また、二次処理液として、抗フルオレセイン抗体 (HRP (horse radish peroxidase) 標識物 ; Amersham) をブロッキング液で 300 倍に希釈した溶液をそれぞれ用いた。

2.3 感染性検査のための“Living-cell” ELISA

1) オーシストの接種：既報¹⁹⁾に準じた。すなわち、マルチプレートで前培養した後の各ウェルから培地液を除去し、PBS(-)で洗浄した後、オーシスト懸濁液 100 μ l を注ぎ、37°C \cdot 5%炭酸ガスの CO₂ インキュベーター内で 2 時間反応させた。その後、オーシスト懸濁液を除去し、PBS(-)にて細胞を洗浄した後に前記した増殖培地を分注し、37°C \cdot 5%炭酸ガスの CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養した後に ELISA に供した。なお、*C. parvum* オーシスト (Waterborne Inc.) を前述の増殖培地で希釈し、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ oocysts \cdot ml⁻¹ の範囲でオーシスト懸濁液の希釈列を調製して用いた。

2) ELISA：既報¹⁹⁾に準じ、固定、一次処理、二次処理、発色反応を行い、吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。なお、一次処理液として、抗オーシスト抗体 (ビオチン標識物 ; Aqua-Glo™ G/C Indirect ; Waterborne Inc.) をブロッキング液にて 20 倍に希釈した溶液を、また、二次処理液として、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体 (Streptavidin-biotinylated horse radish peroxidase complex ; Amersham) をブロッキング液で 300 倍に希釈した溶液をそれぞれ用いた。

2.4 *C. parvum* オーシストへの紫外線照射実験

1) 供試試料の調製：*C. parvum* オーシストを 1×10^6 oocysts \cdot ml⁻¹ となるように PBS(-)にて希釈し、96 穴マルチプレートに 100 μ l 分注し、紫外線照射に供した。

2) 紫外線照射：*C. parvum* オーシスト懸濁液を分注したマルチプレートの上部から 15W 低圧水銀ランプにて 10~100 秒間紫外線を照射した。なお、プレート面における紫外線照射強度は 0.1 mW \cdot s \cdot cm⁻² (λ , 254nm) とした。

3) 生育活性検査：紫外線照射後のオーシスト懸濁液を回収し、前記した増殖培地にて 10 倍に希釈した後のオーシスト懸濁液 100 μ l を、前述の“Fixed-cell” ELISA および“Living-cell” ELISA にそれぞれ供してオーシストの生育活性を評価した。また、紫外線未照射のオーシスト懸濁液についても同様に生育活性を評価した。

3. 結果・考察

3.1 “Fixed-cell” ELISA を用いた生育活性の評価

本 ELISA によるオーシストの脱嚢に関する定量性を確認するために、あらかじめホルマリン固定処理した HCT-8 細胞へ $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ oocysts \cdot well⁻¹ の範囲でオーシストを接種し、ELISA にて検出した。また、比較のため、熱処理 (100°C \cdot 10 分) により不活化したオーシストについても $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ oocysts \cdot well⁻¹ の範囲

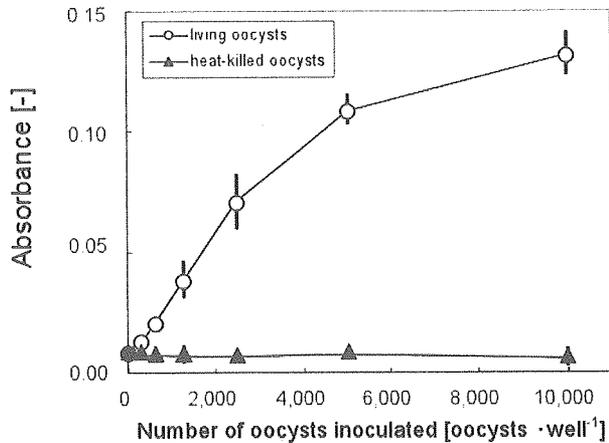


Fig.1 Dose-response studies for "Fixed-cell" ELISA. Live or heat-killed oocysts were incubated with fixed HCT-8 cells for 2h, and attached sporozoites were quantified by ELISA. Each data point represents the mean \pm the standard deviation of triplicates.

で接種し、ELISAにて検出した。結果を Fig. 1 に示した。熱処理により不活化したオーシスト (図中▲) については接種量を高めても吸光度に変化がみられなかった。一方、不活化していないオーシスト (図中○) については接種量に依存して吸光度が高まった。また、データは示さないが、抗スポロゾイト抗体ではなく抗オーシスト抗体を用いて検出した場合には接種量に依存した吸光度の変化がみられなかった。これらのことより、脱嚢により産生したスポロゾイトがホルマリン固定した HCT-8 細胞の表面に付着して保持され、ELISAにてこのスポロゾイトを ELISAにて検出することができ、さらに ELISAにおける吸光度の程度からスポロゾイトの相対的な量を判断できると考えられる。Joe ら¹⁷⁾は、精製したスポロゾイトを細胞へ接種して ELISAにて検出する方法を報告している。これに対して本研究では、オーシストを細胞へ接種した。オーシスト接種後、CO₂インキュベーター内で2時間培養することによって、生育活性のあるオーシストが脱嚢し、スポロゾイトを ELISAにて検出できたものと考えられる。接種量に依存して吸光度が高まったことから、本法によってオーシストの脱嚢性を定量的に検出できる可能性が推定された。

3.2 "Living-cell" ELISA を用いた生育活性の評価

本 ELISA によるオーシストの感染に関する定量性を確認するために、あらかじめホルマリン固定処理した HCT-8 細胞へ $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ oocysts · well⁻¹ の範囲でオーシストを接種し、ELISAにて検出した。また、比較のため、熱処理 (100°C · 10分) により不活化したオーシストについても $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$ oocysts · well⁻¹ の範囲で接種し、ELISAにて検出した。結果を Fig. 2 に示した。オーシスト接種量が 1×10^3 oocysts · well⁻¹ 以下の範囲で熱処理したオーシストとそうでないオーシストの吸光度が同程度であったが、熱処理により不活化したオーシスト (図中▲) については接種量を高めても吸光度に変化がみられなかったのに対して、熱処理していないオーシスト

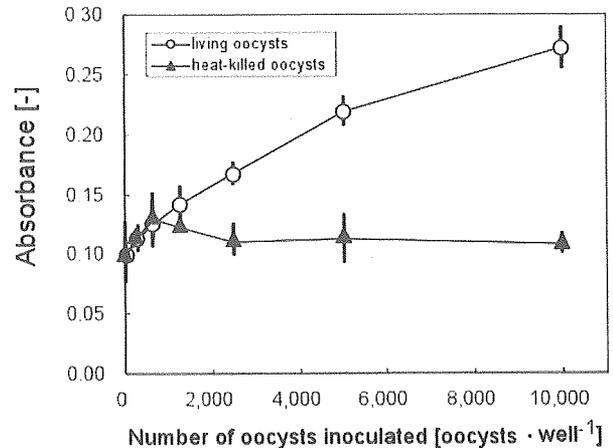


Fig.2 Dose-response studies for "Living-cell" ELISA. Live or heat-killed oocysts were incubated with HCT-8 cells for 2days, and developed oocysts were quantified by ELISA. Each data point represents the mean \pm the standard deviation of triplicates.

(図中○) については接種量に依存して吸光度が高まった。また、データは示さないが、抗オーシスト抗体ではなく抗スポロゾイト抗体を用いて検出した場合には接種量に依存した吸光度の変化がみられなかった。さらに、前報¹⁹⁾で述べたようにオーシスト接種後ただちに ELISA を実施した場合には接種量に依存した吸光度の変化が観察されなかったことから、"Living-cell" ELISA では培養細胞内で生成したオーシストを検出していることが示唆されている。これらのことより、本法によってオーシストの感染性を定量的に検出できる可能性が推定された。

3.3 紫外線によるオーシスト不活化

Fig. 1 および Fig. 2 における living oocysts に関する接種オーシスト量と吸光度の関係を検量線として、紫外線未照射および照射後の試料に関する ELISA の吸光度からそれぞれの試料における見掛け上の接種オーシスト量を算出した。算出された見掛け上の接種オーシスト量は、生育活性のある、すなわち脱嚢性ないしは感染性を保持したオーシスト量を反映しているものと推定している。紫外線照射後の試料に関するオーシスト量を、紫外線未照射の試料についてのオーシスト量で除して百分率を算出し、生存率 (Viability ratio) [%]とした。

結果を Fig. 3 に示した。横軸に紫外線照射量を、縦軸にそれぞれの生存率をプロットした。"Living-cell" ELISA の検出結果を○印で示し、"Fixed-cell" ELISA の検出結果を▲印で示した。また、比較のため、DAPI/PI を用いたバイタル染色の結果を□で示した。

"Fixed-cell" ELISA の検出結果は、実験した紫外線照射量の範囲内では生存率に変化がみられなかった。また、バイタル染色の結果は"Fixed-cell" ELISA とほぼ同様の傾向であり、実験した紫外線照射量の範囲内では生存率に変化がみられなかった。バイタル染色に基づく生育活性と脱嚢率との間に相関性があることが報告されており、本研究において"Fixed-cell" ELISA の結果とバイタル染色の結果が同様の傾向であったことから、"Fixed-cell" ELISA

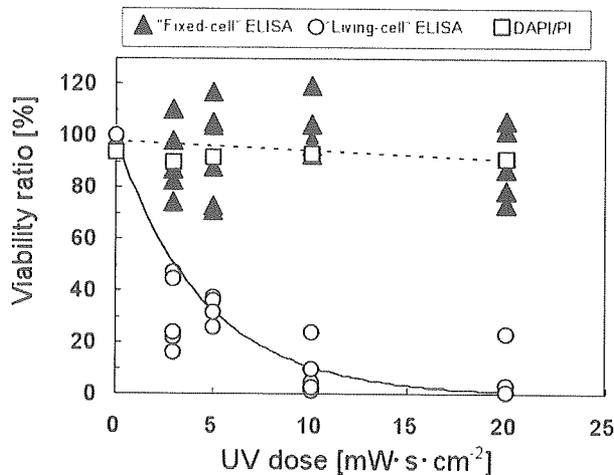


Fig 3 The results of viability ratio versus UV dosage. All trials shown were done at oocyst concentration of 1×10^6 oocysts \cdot ml $^{-1}$. After UV irradiation, oocyst suspensions were diluted to ten times and then each 100 μ l of diluted suspension is processed for the both ELISA or the vital dye staining.

によって脱嚢性を評価していることが類推される。バイタル染色および"Fixed-cell" ELISAにて評価した場合、10 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ 程度の紫外線照射ではオーシストの脱嚢性に影響がみられない。

これに対して、"Living-cell" ELISAの検出結果は、紫外線照射により顕著に生存率が低減し、10 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ の紫外線照射にて生存率が10%に低減し、紫外線照射によって*Cryptosporidium*オーシストの感染力を不活化できることが強く示唆された。

オーシストへ紫外線照射すると、脱嚢性を保持しているにもかかわらず、感染性が低減する可能性が推定され、実験した範囲の紫外線照射量ではオーシストを死滅させることはできないが、感染力を不活化できることが強く示唆された。紫外線による感染性低減のメカニズムについては、紫外線照射によって細胞へのスポロゾイトの侵入行動が不活化された可能性、あるいは紫外線照射によってDNAが損傷し、DNAの複製が阻害されたために宿主細胞内で増殖できなかった可能性が推定される。

紫外線照射によって*Cryptosporidium*オーシストの感染力を不活化できるのであれば、水処理における消毒の第一の目的、すなわち水系感染症の防除を達成しているとの考え方ができよう。但し、紫外線照射後に再び活性を取り戻す現象について留意する必要がある。この点について、オーシストへ紫外線を照射した場合、DNA中のピリミジン塩基の二量体化が生じるが、このDNA損傷は光回復や暗回復によって修復されるものの、感染力は回復しなかったこと²⁰⁾、また、紫外線照射量が25 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ 以下では宿主の体内で再活性化する可能性があるが、60 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ 以上の紫外線照射では、*in vivo* / *ex vivo*共に再活性化しないこと²¹⁾などが報告されているものの、紫外線による感染性の不活化のメカニズムや再活性化の可能性について更なる検討が待たれる。

バイタル染色や脱嚢試験による生育活性を指標として評価した場合、紫外線照射で*Cryptosporidium*オーシス

トを90%不活化するには80 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ 程度、99%不活化するには120 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ 程度以上の照射量が必要であることが報告されている^{22,23)}。本研究においても、脱嚢性を指標とした*Cryptosporidium*オーシストの生存性で評価した場合には実験を行った20 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ 程度の紫外線照射では生存率の顕著な低減は観察されなかった。

これに対して、マウスや培養細胞を用いた感染性を指標として評価した場合、10ないしは25 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ にてそれぞれ99%、99.9%不活化²⁴⁾、もしくは、3 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ にて99.9%以上不活化¹⁰⁾という数値が報告されており、感染性の低減は生育活性の低減に比べて少ない紫外線照射量によって引き起こされると考えられる。本研究では、10 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ にて感染性が90%低減し、従来の報告に比べて紫外線照射の効果が低い結果であった。これは、ELISAにて測定した吸光度から見掛け上の生存オーシスト濃度を検量線に基づいて推算することによる定量下限の影響が推定される。

4. おわりに

本研究においては、*Cryptosporidium*の生育活性および感染性を検出・定量する方法として培養細胞実験系に着目し、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、オーシストの脱嚢性を評価する"Fixed-cell" ELISA、オーシスト感染性を評価する"Living-cell" ELISAを検討した。さらに、紫外線照射によるオーシストの不活化効果を上記2種類のELISAを用いて評価した。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、接種後の培養した後に抗オーシスト抗体にて検出する"Living-cell" ELISAによって細胞内で増殖したと推定されるオーシストを検出できた。検出感度や精度については更なる検討が必要ではあるが、この方法によってオーシストの感染性について相対的な量比を評価することができるものと推定された。

2) 予めホルマリン固定したHCT-8細胞に*Cryptosporidium parvum*オーシストを接種し、抗スポロゾイト抗体にて検出する"Fixed-cell" ELISAによって接種後の培養により脱嚢したと推定されるスポロゾイトを定量的に検出できた。この方法によってオーシストの脱嚢性について相対的な量比を評価できるものと推定された。

3) オーシストに20 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ 以下の紫外線を照射すると、"Fixed-cell" ELISAで評価される生育活性はバイタル染色の結果と同様に紫外線照射量にかかわらず顕著な変化がみられないが、"Living-cell" ELISAで評価される生育活性は紫外線照射量を高めるにつれ顕著に低減した。

4) 本研究では、10 $\text{mW} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-2}$ の紫外線照射によってオーシストの感染性が90%低減することが推定された。

(原稿受付 2002年2月21日)

(原稿受理 2002年7月16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) Gregory, J. (1994) *Cryptosporidium* in water: treatment and monitoring methods, *Filtr. Sep.*, **31**(3), 283-289.
- 5) Mazounie, P., Bernazeau, F. and Alla, P. (2000) Removal of *Cryptosporidium* by high rate contact filtration: the performance of the prospect water filtration plant during the Sydney water crises, *Wat. Sci. Technol.*, **41**(7), 93-101.
- 6) 竹馬大介, 志村有通, 本山信行, 茂庭竹生, 金子光美, 藤原正弘, 平田強 (2001) オゾンによる *Cryptosporidium parvum* オーストの不活化に及ぼす pH の影響, 水道協会雑誌, **70**(7), 15-22.
- 7) Kanjo, Y., Kimata, I., Iseki, M., Miyanaga, S., Okada, H., Banno, C., Matsumoto, M. and Shimada, Y. (2000) inactivation of *Cryptosporidium* spp. Oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by *in vitro* excystation and animal infectivity, *Wat. Sci. Technol.*, **41**(7), 119-125.
- 8) Hargy, T. M., Clancy, J. L., Bukhari, Z. and Marshall, M. M. (2000) Shedding UV light on the *Cryptosporidium* threat, *J. Environ. Health*, **63**(1), 19-22.
- 9) Lorenzo-Lorenzo, M. J., Ares-Mazas, M. E., Villacorta-Martinez de Maturana, I. and Duran-Oreiro, D. (1993) Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *J. Parasitol.*, **79**(1), 67-70.
- 10) Shin, G.-A., Linden, K. G. and Sobsey, M. D. (2000) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts by monochromatic UV radiation, *10th Health-Related Water Microbiology Symposium*, 51-52.
- 11) Huffman, D. E., Slifko, T. R., Coulliette, A., Rose, J. B. and Dussert, B. W. (2000) Comparison of cell culture and animal infectivity analysis of low and medium pressure UV treated *Cryptosporidium parvum* oocysts, *ibid*, 52-53.
- 12) Woodmansee, D. B. (1987) Studies of *in vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves, *J. Protozool.*, **34**, 398-402.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 宮永総子, 坂野千絵, 貫上佳則, 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.
- 16) Clancy, J. L. and Fricker, C. (1998) Crypto's protocol prospects, *Water Qual. Int.*, May/June, 11-14.
- 17) Joe, A., Verdon, R., Tzipori, S., Keusch, G. T. and Ward, H. D. (1998) Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to human intestinal epithelial cells, *Infect. Immun.*, **66**: 3429-3432.
- 18) Woods, K. M., Nesterenko, M. V. and Upton, S. J. (1995) Development of a microtitre ELISA to quantify development of *Cryptosporidium parvum* *in vitro*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **128**, 89-94.
- 19) 加藤敏朗, 竹内りさ, 小野芳朗, 三木理, 河原長美 (2000) 培養細胞への *Cryptosporidium parvum* の感染と ELISA による検出, **23**(7), 427-432.
- 20) Oguma, K., Katayama, H., Mitani, M., Morita, S., Hirata, T., and Ohgaki, S. (2001) Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(19), 4630-4637.
- 21) Belosevic, M., Craik, S. A., Stafford, J. L., Neumann, N. F., Kruithof, J. and Smith, D. W. (2001) Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation, *FEMS Microbiol. Lett.*, **204**(1), 197-203.
- 22) Ransome, M. E., Whitmore, St. N. and Carrington, E. G. (1993) Effect of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum*, *Wat. Suppl.*, **11**(1), 103-117.
- 23) Campbell, A. T., Robertson, L. J., Snowball, M. R. and Smith, H. V. (1995) Inactivation of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by ultraviolet irradiation, *Wat. Res.*, **29**(11), 2583-2586.
- 24) Craik, S. A., Weldon, D., Finch, G. R., Bolton, J. R. and Belosevic, M. (2001) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation, *Wat. Res.*, **35**(6), 1387-1398.