

## クマネズミ由来 *Cryptosporidium* sp. の ラットにおける oocyst の排泄状況と免疫原性

山浦 常 白坂龍曠 松本克彦

(掲載決定：平成4年7月15日)

### 要 約

クマネズミから分離した *Cryptosporidium* の小型種 (*C. parvum* タイプ) の oocyst を Wistar 系 SPF 雌ラットに経口投与し、ラットの週齢による感受性の差および oocyst 投与数と oocyst 排泄状況との関係を調べた。更に初感染耐過ラットに oocyst を再投与して、その免疫原性について検討した。

4, 8, 12週齢のラット各群5匹に oocyst  $2.0 \times 10^6$  個を投与すると、全群に2日目から oocyst の排泄が認められた。いずれも OPG 値 (糞便 1g 中の oocyst 数) のピークは低く、投与後 2~3日目に  $10^4$  個台が示されたのみであった。以後3群の OPG 値はほぼ同様に推移し、ラットの週齢による顕著な差は認められなかった。Oocyst  $2.0 \times 10^6$  個から  $10^2$  個まで10倍階段希釈系列を作製し、4週齢ラット各群5匹に投与した。全群に2~3日目から oocyst の排泄が認められたが、 $10^4$  個以上の投与群では OPG 値のピークが3~5日目に  $10^4$  個台で、 $10^3$  個台以下の投与群では5~7日目に  $10^3$  個台を示し、両者間に差が見られた。免疫抑制剤である dexamethasone phosphate (DM) で処理した4週齢ラットに  $2.0 \times 10^6$  個の oocyst を投与すると、同量の oocyst を投与した無処理ラットと同様に2日目から oocyst を排泄するが、OPG 値が著しく上昇し3日目より観察期間の41日目まで  $10^5 \sim 10^6$  個台を持続した。Oocyst 排泄開始日 (投与後2日目) の DM 処理ラットの腸から macrogametocyte や zygote が検出されたので、2日目に認められた oocyst は投与 oocyst の感染によって新たに形成されたものであるものと思われた。DM 無処理で初感染耐過後42日目のラットに、 $2.0 \times 10^6$  個の oocyst を再投与したところ、蔗糖液浮遊法で oocyst が1~2日間検出されただけでそれ以降全く認められず、本種はかなり強い免疫原性を有することが示唆された。

**Key words :** *Cryptosporidium*, immunogenicity, oocyst production, dexamethasone

### 緒 言

Coccidia では宿主体内における原虫の感染状況を調べる上では、oocyst の排泄状況が重要視されており (Haberkorn, 1971; Frenkel, 1973; Matsui *et al.*, 1981; Stockdale and Cawthorn, 1981), 薬剤の効果判定にも応用されている (Dubey and Frenkel, 1974)。

*Cryptosporidium* は、人や多種動物から検出される coccidium の一種で、哺乳類では小型種と大型種の2種類が知られている。(Tyzzer, 1910, 1912; Upton and Current, 1985; Iseki, 1986)。本原虫は AIDS などの免疫不全患者における持続性の重症下痢症の病原体として注目されているが (Current *et al.*, 1983; Ungar, 1991), 現在までに患者から検出されているの

は全て小型種の oocyst である。本原虫の実験的動物感染は多数の報告があるが (Tzipori, 1983; Sherwood *et al.*, 1982; Fayer and Ungar, 1986; Iseki *et al.*, 1989; Yamaura *et al.*, 1990; Asahi *et al.*, 1991), 宿主における oocyst の排泄状況については明確にされていない部分が多い。また、*Cryptosporidium* は、人への感染源や種の分類についてもまだ不明な点が多く、本原虫の生物学的性状についてさらに詳細な検討が必要である。

著者らは先に、自然感染クマネズミから *Cryptosporidium* の小型種の oocyst を分離したことを報告した (Yamaura *et al.*, 1990)。今回は、この oocyst をラットに経口投与し、その OPG 値 (糞便 1g 中の oocyst 数) の推移を観察し、oocyst 排泄状況と再感染時における免疫原性について検討したので報告する。

### 材料および方法

供試動物：供試したラットは、4～12週齢の Wistar 系 SPF の雌で、実験前に蔗糖液浮遊法による糞便検査を数回行ない、oocyst 陰性であることを確認した後で coccidium-free の管理下で飼育した。

供試原虫：*Cryptosporidium* は、著者ら (Yamaura et al., 1990) が自然感染クマネズミから分離した oocyst を使用した。Oocyst は免疫抑制剤の dexamethasone phosphate (DM ; Sigma Chemical Co.) で処理したラットに感染増殖させた後に供試した。ラットから採取した oocyst の大きさは、 $5.1 \pm 0.30 \times 4.6 \pm 0.32 \mu\text{m}$  で、形態学的には小型種 *C. parvum* の oocyst と一致していた。ラットへの DM 処理は、DM の  $3 \text{ mg} / \ell$  水溶液の飲水投与で行ない、oocyst 投与の3日前から糞便内供試 oocyst の採取期間中 (約4週間) 継続した。採取した糞便は、10倍量の水で溶解し、2重の金網 (上が50メッシュ、下が100メッシュ) で濾過後、2,500回転10分間遠心分離した。Oocyst は沈渣に8倍量の2%重クロム酸カリウム液を加えて冷蔵保存し、3週間以内に供試した。

OPG 値の測定法：1日分のラットの糞便は、朝10時から午後5時の間に排泄されたものをプールして使用した。OPG 値の測定法は、松井ら (1992) に準じて行った。蓋付きの容器に糞便1gと水9mlを加えてマグネチックスターラーで30分間攪拌した。この液の一部に比重1.27の蔗糖液を加えて充分混和して最終40倍の希釈液を作製した。この0.1mlをプランクトン計算盤上に取り、24×36mmのカバーガラスを掛けて、5分間放置して oocyst をカバーガラス直下まで浮遊させた後に、300倍で鏡検してその数を数えた。

OPG 値の推移：ラットの週齢による OPG 値の推移の異同を調べる目的で、4, 8, 12週齢の3群 (各群5匹) のラットに、1匹当たり  $2.0 \times 10^6$  個の oocyst を経口投与して OPG 値を経日的に調べた。次に、投与 oocyst 数と oocyst 排泄数との関係を調べる目的で、 $2.0 \times 10^6$  個とその10倍段階希釈系列を作製して、1群5匹からなる4週齢のラットに経口投与して、各群の OPG 値の推移を調べた。非感染対照としては、同週齢からなる1群のラットを用いた。また、免疫抑制剤投与における oocyst の排泄状況を調べる目的で、1群5匹の4週齢 DM 処理ラットに  $2.0 \times 10^6$  個の oocyst を投与し、OPG 値の推移を調べた。ラットへの DM の処理は材料採取のラットと同様な方法で行ない観察期間中続けた。

腸管内発育期原虫の観察：Oocyst 感染1日目と2日目の DM 処理ラット各々2匹について小腸粘膜塗抹ギムザ染色標本を作製し、発育期原虫の観察を顕微鏡下で行なった。検出された腸管内原虫の各発育期の鑑別は、

coccidia に準じた。

再感染時の免疫原性：Oocyst 投与数と oocyst 排泄数との関係を調べたラットに対して、初感染後42日目に oocyst  $2.0 \times 10^6$  個による再投与を実施した。Oocyst 再投与ラットは、その後観察期間の20日目 (初感染62日目) まで糞便内 oocyst の排泄状況を調べて、本原虫の免疫原性について検討した。

### 成 績

#### OPG 値の推移

$2.0 \times 10^6$  個の oocyst を投与した 4, 8, 12週齢の各3群のラットにおける OPG 値の推移を Fig. 1 に示した。Oocyst の排泄は3群とも2日目から認められたが、OPG 値のピークは低く、4週齢群および8週齢群で3日間、12週齢群で2日目に  $10^4$  個台が示されたのみであった。その後 oocyst の排泄数は4週齢で6日目と10日目に、8週齢で4～5日目に、12週齢群では4～5日目に一時的に低下したが、4週齢と8週齢では14日目まで、12週齢群では9日目まで  $10^3$  個台の OPG 値を示し、3群ともほぼ同様に推移した。以後4, 8週齢群では15日目より11日間少数の oocyst 排泄が継続したが、26日目では蔗糖液浮遊法でも oocyst が検出されなくなった。12週齢群では、10日目より oocyst 排泄数が減少し patent period も17日間と他2群の24日間より短かった。

Oocyst 投与数の異なる5群 ( $10^6 \sim 10^3$  個台) の4週齢ラットにおける oocyst の排泄状況を Figs. 2, 3 に示した。全群とも2～3日目からは oocyst の排泄が認められ、OPG 値のピークは  $10^6$  個投与群で3日目、 $10^5$  個投与群で3～4日目、 $10^4$  個投与群で4～5日目で各々  $10^4$  個台が示されたが、 $10^3$  個投与群では4日目から、 $10^2$  個投与群では6日目から  $10^3$  個台が示されたのみであった。その後全群の OPG 値は、途中一時的に減少はあるものの  $10^3$  個台を13～14日目まで継続した。以後5群とも、oocyst 排泄数が少なく、OPG 値計測が不能となったが、蔗糖液浮遊法では oocyst が検出され、27～28日以降消失した。

DM 処理ラットにおける oocyst 排泄状況を Fig. 4 に示した。DM 処理ラットでは無処理ラットと同様に2日目より oocyst の排泄が認められた。しかし、DM 処理ラットの OPG 値は感染3日目より41日目まで  $10^5 \sim 10^6$  個台を持続し、無処理ラットより著しく高値であった。

Oocyst 排泄開始時までの DM 処理ラットについて小腸内の原虫を観察したところ、感染1日目では無性生殖期の merozoite や schizont のみが認められ、2日目で初めて有性生殖期の macrogametocyte (Fig. 5) や zygote が多数検出された。再感染に対する免疫原性

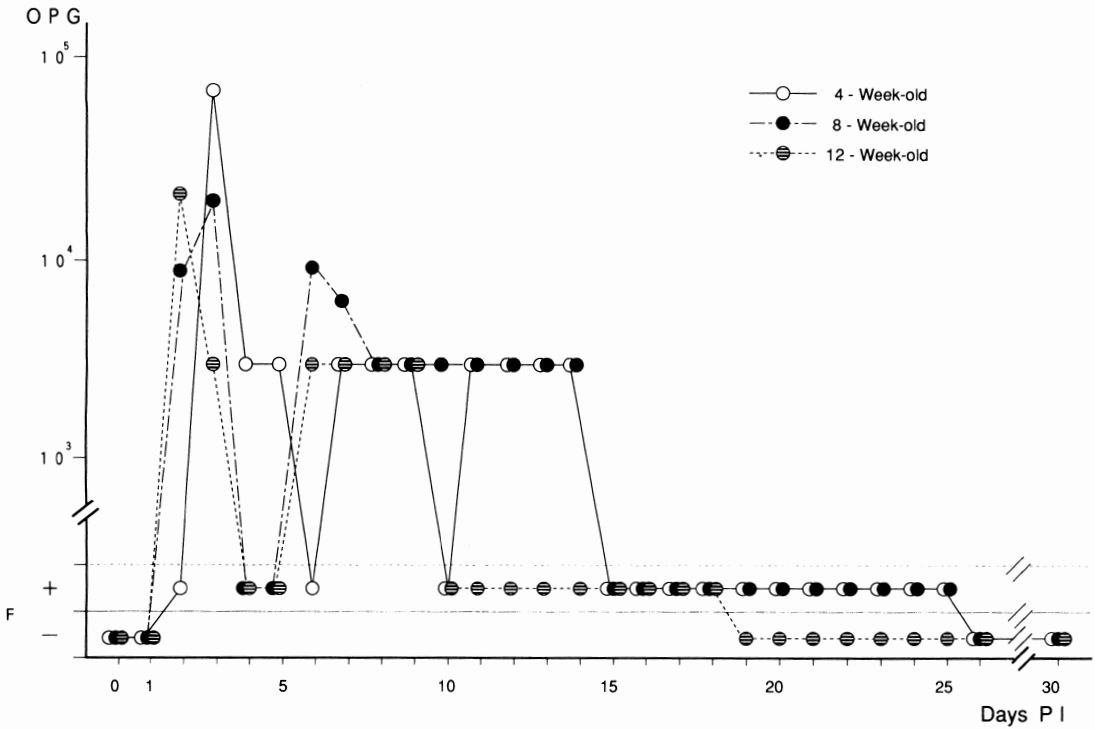


Fig. 1 Mean OPG values in rats (4-, 8- and 12-week-old rats, 5 rats/group) inoculated with  $2.0 \times 10^6$  oocysts of *Cryptosporidium* sp. from *R. rattus*.  
F: Sugar flotation method.

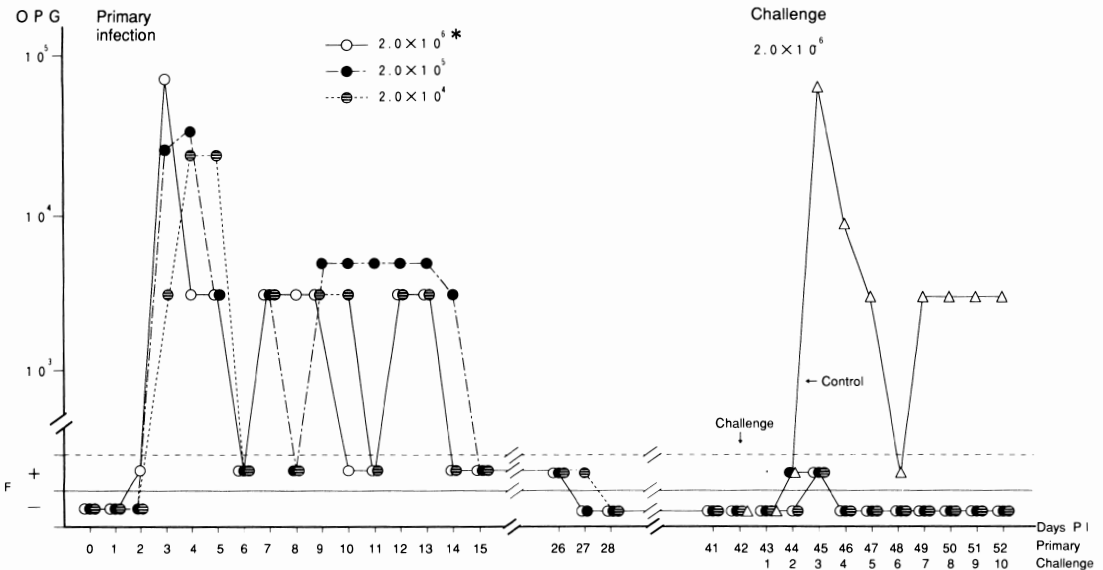


Fig. 2 Mean daily oocyst output in 4-week-old rats inoculated with  $2.0 \times 10^4 \sim 10^6$  oocysts of *Cryptosporidium* sp. from *R. rattus* after primary and challenge inoculation (5 rats/group).  
\*: Number of oocysts inoculated primarily.  
Challenge: On day 42 after primary inoculation.  
F: Sugar flotation method.

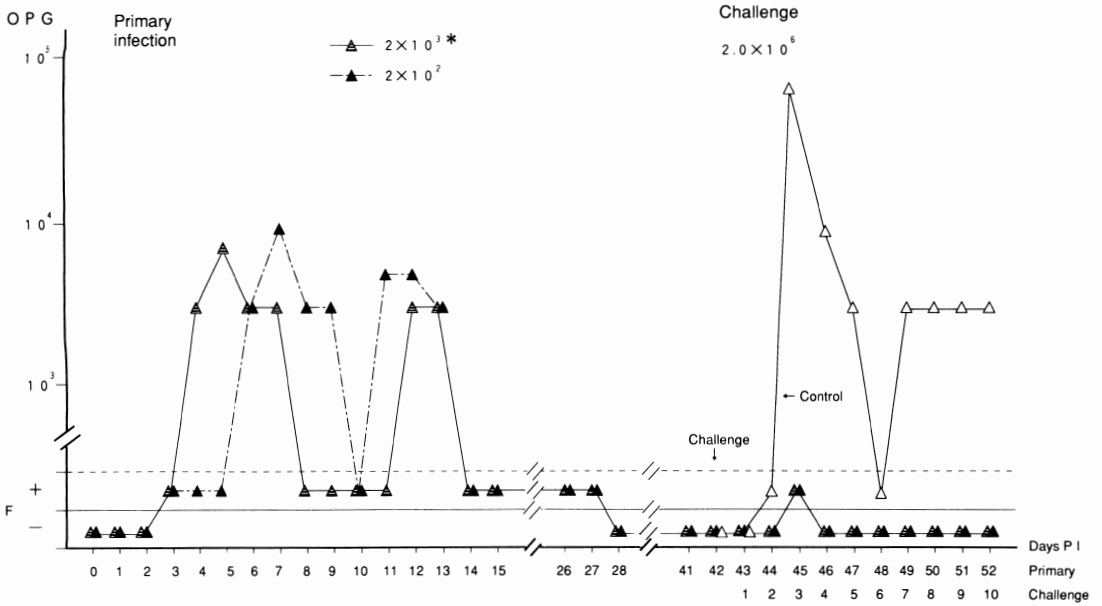


Fig. 3 Mean daily oocyst output in 4-week-old rats inoculated with  $2.0 \times 10^2 \sim 10^3$  oocysts of *Cryptosporidium* sp. from *R. rattus* after primary and challenge inoculation (5 rats/group).

\*: Number of oocysts inoculated primarily.  
 Challenge: On day 42 after primary inoculation.  
 F: Sugar flotation method.

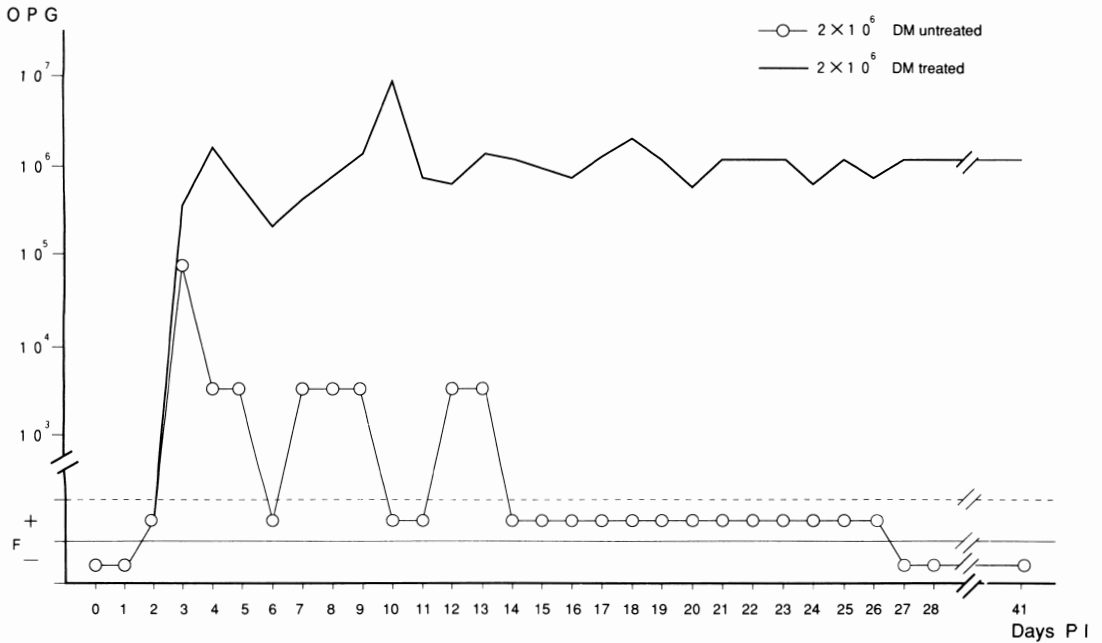


Fig. 4 Mean OPG values in DM-treated rats and untreated rats (4-week-old, 5 rats/group) inoculated with  $2.0 \times 10^6$  oocysts of *Cryptosporidium* sp. from *R. rattus*.

F: Sugar flotation method. DM: Dexamethasone.  
 DM treated: 3ppm DM solution were administered with drinking water for 45 days from 3 days before inoculation.

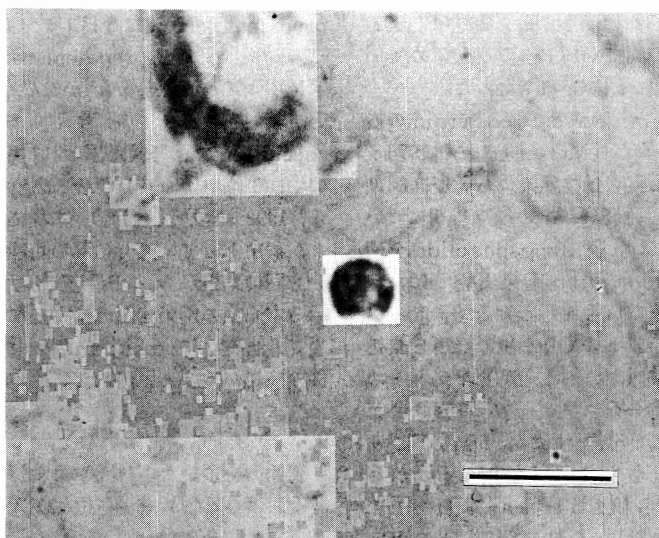


Fig. 5 A macrogametocyte of *Cryptosporidium* sp. detected in Giemsa-stained small intestine specimens in dexamethasone-treated rats 2 days after inoculation (Scale: 10  $\mu$ m).

初感染耐過ラットに、再投与を行なったところ、全群とも2~3日目に oocyst の排泄が認められた。しかし、oocyst は蔗糖液浮遊法で検出されただけで排泄数が少なく、patent period も1~2日間と短縮した。なお、再感染時の対照群では投与後2日目から oocyst を排泄し、3日目では OPG 値も $10^4$ 個台を示し、oocyst の排泄も観察終了時の20日目まで継続した (Figs. 2, 3)。

#### 考 察

Coccidia では、宿主における oocyst の排泄数は投与 oocyst 数に影響を受け (Long, 1973)、それらの OPG 値のピークは種によって一定のパターンを示すことが報告されている (Mesfin and Bellamy, 1978 ; Ito *et al.*, 1978)。これらの特性から、coccidia においては oocyst の排泄状況の観察は、宿主における感染の動態を知る上で重要とされている。

*Cryptosporidium* の oocyst の排泄状況は、Iseki *et al.* (1989), Yamaura *et al.* (1990), Asahi *et al.* (1991) らによって報告されているが、まだ明解にされていない部分が認められる。

著者らは、今回クマネズミ由来 *Cryptosporidium* 小型種の oocyst をラットに経口投与し、その OPG 値の推移を観察し、ラットの週齢と感受性、oocyst 投与数と oocyst 排泄数、再感染時における免疫原性について検討した。

人の *Cryptosporidium* 感染率は、成人より幼児に高く、本原虫による動物感染実験でも成獣より幼若動物の感受性が高いことが報告されている (Fayer and Ungar, 1986 ; Sherwood *et al.*, 1982 ; Tzipori, 1983)。著者らは、本種の oocyst を4, 8, 12週齢のラットに各々投与して OPG 値の推移を調べたところ、3群の OPG 値はほぼ同様に推移し、ラットの週齢による顕著な差は認められなかった。松井ら (1992) は、*Cryptosporidium* sp. の oocyst を3~14週齢のニワトリに投与して OPG 値の推移を観察したところ、10週齢までの各群間では顕著な差は認められなかったが、14週齢群では OPG 値の低下が認められたことを報告している。本報告では、14週齢のラットについては検討していないが、12週齢群では、他群に比べて patent period が7日間短くなったことが認められた。

Oocyst 投与数と OPG 値の関係について、松井ら (1992) は *Cryptosporidium* sp. の oocyst  $10^6 \sim 10^2$  個を投与したニワトリでは、10日までは oocyst 投与数と OPG 値との間に相関関係がみられたことを報告した。藤井ら (1991) は *Eimeria caviae* の oocyst  $10^6 \sim 10^4$  個投与群のモルモットでは OPG 値が最高を示したが、 $10^3 \sim 10^2$  個投与群では低下した事を報告している。著者らの今回の実験では、oocyst  $10^6 \sim 10^4$  個投与群では OPG 値が最高の $10^4$ 個台を示したが、 $10^3 \sim 10^2$  個投与群では $10^3$ 個台と OPG 値が低下し、藤野ら (1991) の報

告と類似した成績が認められた。しかし、藤野ら (1991) は、 $10^3$ 個と $10^2$ 個投与群の間で OPG 値の差を認めているが、本実験では顕著な差が認められなかった。

本症は、cyclophosphamide や corticosteroid の投与による免疫不全患者に多く (Meisei *et al.*, 1976 ; Mead *et al.*, 1986), また実験動物感染にも免疫抑制剤の投与が利用されている。免疫抑制剤の投与時期について、Rehg *et al.* (1987) は、cyclophosphamide を使用したラットの *Cryptosporidium* 感染実験では、感染14日前からの投与が良好な成績を示したと報告している。著者らは、DM 処理ラットの OPG 値の推移を無処理ラットのそれと比較検討した結果、無処理ラットの OPG 値は、oocyst 投与後3日目にピークの $10^4$ 個台が示され、以後はほぼ減少の傾向を示したが、DM 処理ラットでは oocyst 投与3日前からの DM 処理にもかかわらず、 $10^5 \sim 10^6$ 個台の OPG 値を3日目から41日まで持続した。Rehg *et al.* (1988) も DM 処理ラットを用いた実験で、小腸微絨毛中の原虫数が増加したことを報告しているが、本報告は OPG 値の測定による DM 処理の効果を確認したものである。

再感染時における免疫原性について検討するため、 $10^5 \sim 10^3$ 個の oocyst を投与し OPG 値が $10^4 \sim 10^3$ 個台を示した初感染耐過ラットに再投与を行なったところ、全例に oocyst 排泄が認められた。松井ら (1992) は、ニワトリにおいて初感染時 $10^5$ 個台の OPG 値を10日前後示した個体は再感染しなかったが、 $10^4$ 個台の低い OPG 値を示した群では再感染が認められたことを報告している。著者らの結果でも、松井ら (1992) の報告と同様に、初感染時における OPG 値のピークが $10^4 \sim 10^3$ 個台と低く、宿主の免疫反応が不十分であった事が再感染の原因と考えられた。しかし、今回の実験結果では、再感染後の oocyst 排泄数が対照群と比較して少数で、排泄期間も1~2日間と短かったことから、本種はかなり強い免疫原性を有することが示唆された。

本種の oocyst を DM 処理ラットに経口投与したところ、2日目以降から糞便中に oocyst の排泄が認められたので、1日目と2日目の小腸粘膜内における発育期原虫について観察した。その結果、1日目では無性生殖期の原虫のみ検出され、2日目で初めて有性生殖期の原虫が検出された。本実験の oocyst 排泄は、第1日目に有性生殖期の原虫が発見されなかったことから汚染の事実を否定することができ、また有性生殖期の原虫が2日目で初めて発見されたことは、投与 oocyst が発育して次代の oocyst が排泄されたものと考えられた。従って、本種のラットにおける prepatent period は Yamaura *et al.* (1990) のクマネズミでの報告と同様に2~3日と思われる。しかし、Iseki (1986) は、ドブネズミ由来 *Cryptosporidium* の小型種のラットにおける

prepatent period は8日であったことを報告している。この両報告間での prepatent period の大きな違いは、家鼠由来 *Cryptosporidium* の小型種が複数種あることを示唆するものと考えられた。また、一般に coccidium では好適と思われる宿主におけるピーク時の OPG 値が $10^6 \sim 10^7$ 個台と高値を示しているが (松井ら, 1992. 藤野ら, 1991), 本種では $10^4$ 個台と低く、ラットが宿主として好適ではない可能性が考えられた。

今回の結果から、OPG 値の推移の観察が宿主内における本原虫の感染状況の指標となり得ることが示されたので、他の *Cryptosporidium* についても OPG 値の推移の検討が重要と思われる。

## 謝 辞

御助力を頂いた杏林大学医学部寄生虫学教室松井利博博士および本学教職員各位に深謝致します。

## 文 献

- 1) Asahi, H., Koyama, T., Arai, H., Funakoshi, Y., Yamaura, H., Shirasaka, R. and Okutomi, K. (1991): Biological nature of *Cryptosporidium* sp. isolated from a cat. *Parasitol. Res.*, 77, 237-240.
- 2) Current, W. L., Reese, N. C., Ernst, J. V., Bailey, W. S., Heyman, M. B. and Weinstein, W. M. (1983): Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. *N. Engl. J. Med.*, 308, 1252-1257.
- 3) Dubey, J. P. and Frenkel, J. K. (1974): Immunity to feline toxoplasmosis: Modification by administration of corticosteroids. *Vet. Pathol.*, 11, 350-379.
- 4) Fayer, R. and Ungar, B. L. P. (1986) *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.*, 50, 458-483.
- 5) 藤野隆志・松井利博・森井 勤 (1991): *Eimeria caviae* の生物学的諸性状. *寄生虫誌*, 40, 368-373.
- 6) Frenkel, J. K. (1973): Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology, and immunology. In *The Coccidia*. D. M. Hammond with P. L. Long ed., University Park Press, Baltimore, Butterworths, London, 343-410.
- 7) Haberkorn, A. (1971): Zur Wirtsspezifität von *Eimeria contorta* n. sp. (Sporozoa: Eimeriidae). *Z. Parasitenk.*, 37, 303-314.
- 8) Iseki, M. (1986): Two species of

- Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. Jpn. J. Parasitol., 35, 489-509.
- 9) Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S. and Takada, S. (1989) : Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. Parasitol. Res., 75, 218-222.
  - 10) Ito, S., Tsunoda, K. and Shimura, K. (1978) : Life cycle of the large type of *Isospora bigemina* of the cat. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart., 18, 69-82.
  - 11) Long, P. L. (1973) : Pathology and pathogenicity of coccidial infections. In The Coccidia. D. M. Hammond with P. L. Long ed., University Park Press, Baltimore, Butterworths, London, 253-294.
  - 12) 松井利博・森井 勤・藤野隆志・Tadeja, S. L.・板倉智敏 (1992) : *Cryptosporidium* sp のニワトリにおけるオーシストの排泄状況と免疫原性. 寄生虫誌, 41, 24-29.
  - 13) Matsui, T., Morii, T., Ito, S., Tsunoda, T., Correa, W. M. and Fujino, T. (1981) : Cyclic transmission of the small type of *Isospora bigemina* of the dog. Jpn. J. Parasitol., 30, 179-186.
  - 14) Mead, G. M., Sweetenham, J. W., Ewins, D. L., Furlong, M. and Lowes, J. A. (1986) : Intestinal cryptosporidiosis : a complication of cancer treatment. Cancer Treat. Rep., 70, 769-770.
  - 15) Meisel, J. L., Perera, D. R., Meligro, C. and Rubin, C. E. (1976) : Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology, 70, 1156-1160.
  - 16) Mesfin, G. M. and Bellamy, J. E. C. (1978) : The life cycle of *Eimeria falciformis* var. *pragensis* (Sporozoa : Coccidia) in the mouse, *Mus musculus*. J. Parasitol., 64, 696-705.
  - 17) Rehg, J. E., Hancock, M. L. and Woodmansee, D. B. (1987) : Characterization of cyclophosphamide-rat model of cryptosporidiosis. Infect. Immun., 55, 2669-2674.
  - 18) Rehg, J. E., Hancock, M. L. and Woodmansee, D. B. (1988) : Characterization of a dexamethasone-treated rat model of cryptosporidial infection. J. Infect. Dis., 158, 1406-1407.
  - 19) Sherwood, D., Angus, K. W., Snodgrass, D. R. and Tzipori, S. (1982) : Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. Infect. Immun., 38, 471-475.
  - 20) Stockdale, P. H. G. and Cawthorn, R. J. (1981) : The coccidian *Caryospora bubonis* in the great horned owl (*Bubo virginianus*). J. Protozool., 28, 255-257.
  - 21) Tyzzer, E. E. (1910) : An extra cellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. J. Med. Res., 23, 489-509.
  - 22) Tyzzer, E. E. (1912) : *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenk., 26, 394-418.
  - 23) Tzipori, S. (1983) : Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev., 47, 84-96.
  - 24) Upton, S. J. and Current, W. L. (1985) : The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) infecting mammals. J. Parasitol. 71, 625-629.
  - 25) Ungar, B. L. P. (1991) : Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In Cryptosporidiosis of Man and Animals. J. P. Dubey, C. A. Speer and R. Fayer ed., CRC Press, Boca Raton, 59-82.
  - 26) Yamaura, H., Shirasaka, R., Asahi, H., Koyama, T., Motoki, M. and Ito, H. (1990) : Prevalence of *Cryptosporidium* infection among house rats, *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, in Tokyo, Japan and experimental cryptosporidiosis in roof rats. Jpn. J. Parasitol., 39, 439-444.

Abstract

OOCYST PRODUCTION AND IMMUNOGENICITY OF *CRYPTOSPORIDIUM* SP.  
FROM WILD RATS, *RATTUS RATTUS*, IN LABORATORY RATS

HISASHI YAMAURA, RYUKOH SHIRASAKA AND KATSUHIKO MATSUMOTO

*Department of Parasitology, Tokyo Women's Medical College,  
Kawada-cho 8-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan*

Female Wistar SPF rats were orally inoculated with the oocyst of the small race of *Cryptosporidium* (*C. parvum* type) isolated from *Rattus rattus*. The age-related difference in sensitivity in rats and the relationship between the amount of oocysts inoculated and produced were studied. In one group, oocysts were administered after initial inoculation.

When 5 rats in each of the 4, 8, and 12-week-old groups were inoculated with  $2.0 \times 10^6$  oocysts, oocyst shedding was observed 2 days later in all the groups. All of the animals showed a low peak level,  $10^4$ , in the number of oocysts per gram of feces (OPG values), 2 to 3 days post inoculation (PI). The OPG values showed approximately the same changes in these 3 age groups thereafter, showing no marked difference related to the age of the rats.

Five rats from 4-week-old group were inoculated with differing dilutions of oocysts from  $2.0 \times 10^2$  to  $2.0 \times 10^6$ . All the rats began to shed oocysts 2 to 3 days PI. In 3 groups inoculated with  $2.0 \times 10^4$  or more oocysts, the peak OPG value was  $10^4$  from days 3 to 5 PI, while in 2 groups inoculated with  $2.0 \times 10^3$  or less oocysts, the peak level was  $10^3$  from days 5 to 7 PI.

These infected rats were challenged with  $2.0 \times 10^6$  oocysts on day 42 after primary infection. Using the sugar flotation method, oocysts were detected for 1 or 2 days and then became undetectable. These results indicate that *Cryptosporidium* sp. obtained from rats has a relatively strong immunogenicity.

When 4-week-old rats treated with dexamethasone phosphate (DM) were inoculated with  $2.0 \times 10^6$  oocysts, they excreted oocysts 2 days after inoculation in a way similar to that in the untreated rats inoculated with the same number of oocysts. However, the OPG values continued marked increasing to between  $10^5$  and  $10^6$  on the 41st observation day. An enormous number of macrogametocytes and zygotes were detected in the small intestine of the DM-treated rats on day 2 PI when oocyst shedding began. The shedding of oocysts in this period was confirmed to be due to infection.