

## ジアルジアシスト

ジアルジアシスト様蛍光抗体陽性粒子のうち1,000倍の蛍光像または微分干渉像で次の(1)または(2)のいずれかが観察され、かつ(3)が確認されるものをジアルジアシストと確定した。

- (1) 特徴的な核が観察されること。
- (2) 軸索，中央小体のいずれかが確認されること。
- (3) ジアルジアシストと明らかに異なる構造が観察されないこと。

### 6)内部構造を有するクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシスト数の推定

試料ごとに、夾雑物の影響がなく、特異的な内部構造の観察されたクリプトスポリジウムオーシストあるいはジアルジアシスト数と内部構造を有さない空の蛍光抗体陽性粒子数の比を求め、その比を用いて夾雑物により内部構造の観察ができなかったクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシスト数のうち、特有の内部構造を有するオーシストまたはシスト数を推定した。この値を内部構造が観察されたオーシストあるいはシスト数に加算して、内部構造を有するオーシストおよびジアルジアシスト数である PI(Potentially Intact)オーシストまたはシスト数を以下に示した(1)式で推定した。なお、PI オーシストあるいはシストを算出するのに十分な検出データのそろわなかった、陽性率の低い地点は除外した。

$$PI = S + (B+A) \cdot S / (B+A+E+F) \quad (1)$$

PI:PI オーシストまたはシストの推定濃度(個・100<sup>l</sup>)、

S:特異的な内部構造が観察されたオーシストあるいはシストの濃度(個・100<sup>l</sup>)

B:夾雑物の影響により内部構造の有無が確認できなかった蛍光抗体陽性粒子の濃度(個・100<sup>l</sup>)、

A:内部構造を有するがクリプトスポリジウムオーシストまたはジアルジアシストに特有な物と判定されなかった蛍光抗体陽性粒子の濃度(個・100<sup>l</sup>)、

E:内部構造のない空の蛍光抗体陽性粒子の濃度(個・100<sup>l</sup>)、

F:クリプトスポリジウムオーシストまたはジアルジアシストと異なる内部構造を有する誤陽性粒子の濃度(個・100<sup>l</sup>)

### 7)水質指標項目の測定

本研究では大腸菌，大腸菌群，推定ウェルシュ菌芽胞，好気性芽胞の各濃度および濁度についても同時に測定した。試験方法はすべて上水試験方法(日本水道協会，1993)に従った。

水質指標項目用の試料は滅菌メディウム瓶(500ml)に採水し，クーラーバッグで保冷しながら研究室に持ち帰った。

**大腸菌および大腸菌群：**試料およびその段階希釈したものを特定酵素基質培地(コリラート MPN，アイデックスラボラトリーズ製)に接種し，36±1℃，24±2 時間培養後，MPN 法(10 倍希釈，5 本法)で最確数を求めた。

**推定ウェルシュ菌芽胞：**試料 15ml を滅菌した試験管に取り，恒温槽(75℃)で 10 分間加熱後直ちに氷水で冷却した。これをハンドフォード改良寒天培地に接種して 3 重層法またはメンブランフィルター法で，46±1℃，24±2 時間，嫌気培養し，直径 1～3mm の黒色集落を計数して試料の菌数を求めた。

**好気性芽胞：**試料 15ml を滅菌した試験管に取り，恒温槽(80℃)で 20 分間加熱後直ちに氷水で冷却した。これを標準寒天培地に混釈法で接種し，36±1℃，24～48 時間培養して形成した集落を計数して試料の菌数を求めた。

**濁度：**分光光度計を用いて波長 660nm での吸光度を測定し，濁度検量線を用いて求めた。

## 2.2 原虫汚染指標の検討

水質指標項目濃度と原虫濃度の関連性について単回帰および重回帰分析で評価した。単回帰および重回帰分析は蛍光抗体陽性粒子(クリプトスポリジウム様およびジアルジア様)、クリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシスト濃度(個・100 $l^{-1}$ )目的変数とし、大腸菌、大腸菌群、推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞の各濃度(MPN or cfu・100 $l^{-1}$ )および濁度(度)を説明変数とし、回帰モデルとして(2)式を用いた。

$$\log_{10} C = a_1 \cdot \log_{10}(i_1) + \dots + a_5 \cdot \log_{10}(i_5) + b \quad (2)$$

C:原虫濃度(個・100 $l^{-1}$ )

$a_n$ :回帰係数または偏回帰係数

( $a_1$ :推定ウェルシュ菌芽胞,  $a_2$ :好気性芽胞,  $a_3$ :大腸菌,  $a_4$ :大腸菌群,  $a_5$ :濁度)

$i_n$ :指標細菌濃度または濁度(cfu or MPN・100 $l^{-1}$  or 度)

( $i_1$ :推定ウェルシュ菌芽胞,  $i_2$ :好気性芽胞,  $i_3$ :大腸菌,  $i_4$ :大腸菌群,  $i_5$ :濁度)

b:定数

説明変数の選択は総当たり法で行い、F検定(有意水準1%)と自由度2重調整寄与率( $r^2$ )で評価した。F検定で有意性が認められたもののうち、自由度2重調整寄与率の最も高くなる説明変数の組合せを最適な組合せとして選択した。回帰分析は目的変数および説明変数のすべてがそろった試料のデータ組のみを用いて行った。このためデータ組数は目的変数毎に異なり、クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子では75組、クリプトスポリジウムオーシストでは65組、PIオーシストでは58組、ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子では76組、ジアルジアシストでは58組、PIシストでは54組であった。

## 3 結果

### 3.1 相模川水系の原虫汚染

#### 1)相模川水系のクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシスト汚染

相模川本川、中津川および小鮎川の3河川の11地点におけるクリプトスポリジウムおよびジアルジア汚染実態調査の結果をTable 1およびTable 2に示した。

クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子は全106試料のうち92試料(87%)から検出され、そのうち76試料(72%)がクリプトスポリジウムオーシスト陽性であった。クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子の幾何平均値(陽性試料の幾何平均値、以下同)は37個・100 $l^{-1}$ (濃度範囲1~21,000)、クリプトスポリジウムオーシストの幾何平均値は24個・100 $l^{-1}$ (濃度範囲1~11,000)であった。

ジアルジアシスト様蛍光抗体陽性粒子は106試料のうち、98試料(93%)から検出され、そのうち77試料(73%)がジアルジアシスト陽性であった。ジアルジアシスト様蛍光抗体陽性粒子の幾何平均濃度は33個・100 $l^{-1}$ (濃度範囲1~80,000)、ジアルジアシストでは13個・100 $l^{-1}$ (濃度範囲1~20,000)であった。調査した11地点すべてで少なくとも1回以上、クリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシストが検出され、調査水域はクリプトスポリジウムおよびジアルジアにより広範かつ常在的に汚染されていた。

調査はほぼ1年間にわたり毎月1回~2ヶ月に1回の頻度で行ったが、どの調査地点においても原虫の濃度変動に季節性は観察されなかった。

河川毎および採水地点ごとにその汚染状況をみると、調査した3河川のうち最も汚染レベルが高かったのは小鮎川で、クリプトスポリジウムは調査2地点の21試料すべてから検出され、クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子は幾何平均値250個・100 $l^{-1}$ (濃度範囲6~11,000)、クリプトスポリジウムオーシストは130個・100 $l^{-1}$ (濃度範囲10~11,000)であった。ジアルジアは調査2地点の21試料のうち、

蛍光抗体陽性粒子はすべての試料から、ジアルジアシストは 20 試料(95%)から検出され、幾何平均値はそれぞれ  $140 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 10~80,000)および  $24 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 2~20,000)であった(Table 1)。清川村片原橋は全調査地点のなかで最も汚染レベルが高く、クリプトスポリジウムでは蛍光抗体陽性粒子、クリプトスポリジウムオーシストともに 12 回の調査全てで検出され、幾何平均値はそれぞれ  $4,000 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 360~21,000)および  $1,900 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 190~11,000)であった。ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子はクリプトスポリジウムと同様に 12 回すべての調査で、ジアルジアシストは 11 回で検出され、幾何平均値はそれぞれ  $760 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 10~80,000)および  $260 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 5~20,000)であった(Table 2)。

相模川本川では、6 地点の 56 試料のうち、クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子は 53 試料(95%)から、クリプトスポリジウムオーシストは 41 試料(73%)から、幾何平均値  $19 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 1~400)および  $12 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 1~240)で検出された。ジアルジアでは、蛍光抗体陽性粒子はすべての試料から、ジアルジアシストは 40 試料(71%)からそれぞれ幾何平均値  $20 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 1~510)、 $7 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 1~210)で検出された(Table 1)。

寒川町宮山地点は水道原水の取水地点である相模大堰の 500m 上流にあり、ほぼ毎月 2 回の頻度で 26 回の調査を行った(Table 3)。蛍光抗体陽性粒子はクリプトスポリジウム、ジアルジアともにすべての調査で検出され、クリプトスポリジウムオーシストは 23 回、ジアルジアシストは 21 回の調査で検出された。これらのことから、本地点は両原虫による汚染を常時受けていることが明らかになった。検出された両原虫の濃度レベルはクリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子では幾何平均値  $20 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 2~260)、クリプトスポリジウムオーシストは幾何平均値  $10 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 1~180)、ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子は  $24 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 4~80)、ジアルジアシストは  $6 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 1~18)であった。

中津川は 3 地点で採水を行い、29 試料のうちクリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子は 18 試料(62%)から幾何平均値  $18 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 2~2,500)、クリプトスポリジウムオーシストは 14 試料(48%)から  $9 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 1~500)、ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子は 21 試料(72%)から  $18 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 1~320)、ジアルジアシストは 17 試料(59%)から  $8 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$ (濃度範囲 1~44)の各濃度で検出された。中津川の最上流部の愛川町半原は水道水源の取水地点であるが、全調査点の中で最も汚染レベルが低く、10 回の調査でクリプトスポリジウムオーシストは 1 回のみ(10%)、 $1 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$  でジアルジアシストは 2 回(20%)、 $2 \text{ 個} \cdot 100 \text{ l}^{-1}$  と低濃度、低頻度であった(Table 3)。

## 2)相模川水系の原虫汚染源

相模川本川は上流部の相模湖から流下するに従ってクリプトスポリジウム、ジアルジアともに減少したが、中流部の厚木市での中津川および小鮎川の三川合流地点の後(厚木市東町)で両原虫とも増加した。相模川本川の中津川および小鮎川と合流前(厚木市金田)と後(厚木市東町)の原虫濃度の幾何平均値はクリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子では約 10 倍、クリプトスポリジウムオーシストでは約 2.5 倍に増加した。また、ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子では約 4 倍、ジアルジアシストでは約 1.3 倍に増加した(Fig.2~3)。

全調査地点の中で最も汚染レベルの高かった小鮎川清川村片原橋地点の 50m 上流で飼育豚数約 7,000 頭の大規模な養豚場の排水処理施設の処理不十分な処理水が放流されていた。この放流水中の両原虫濃度はクリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子  $4,700 \text{ 個} \cdot \text{l}^{-1}$ (濃度範囲 2,400~10,000)、クリプトスポリジウムオーシスト  $2,200 \text{ 個} \cdot \text{l}^{-1}$ (濃度範囲 1,000~10,000)、ジアルジア様蛍光抗体陽性粒子  $12,000 \text{ 個} \cdot \text{l}^{-1}$ (濃度範囲 3,000~47,000)、ジアルジアシスト  $5,500 \text{ 個} \cdot \text{l}^{-1}$ (濃度範囲 1,000 および 30,000)と極めて

高濃度であった(Table 4)。

### 3)内部構造を保有しているクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシスト

Table 5 に示したように、クリプトスポリジウムでは蛍光抗体陽性粒子数を 100%とした場合に内部構造(スポロゾイト)あるいは縫合線が確認されたオーシスト数は 44%、スポロゾイトが観察されたものは 20%であったのに対して、PI オーシスト数(内部構造を有するオーシスト数の推定値)は 38%であった。また、クリプトスポリジウムオーシスト数を 100%とした場合にはスポロゾイトが観察されたものの数は 49%、PI オーシスト数は 94%であり、実際にスポロゾイトが観察できたオーシストの 2 倍となった。

同様にジアルジアでは蛍光抗体陽性粒子数を 100%としたときに特有の内部構造が観察されたジアルジアシスト数は 34%であったのに対して PI シスト数は 62%であり、クリプトスポリジウムと同様に 2 倍の開きが生じた。

### 4)指標項目

相模川水系の原虫汚染状況調査に平行して水質指標項目の測定も行った。それぞれの水質指標項目の測定値を Table 6 に示した。すべての調査地点で指標細菌が検出され、その濃度は幾何平均で大腸菌、大腸菌群はそれぞれ  $10^0 \sim 10^5$ ,  $10^2 \sim 10^6$  MPN $\cdot 100\text{m}^{\text{l}}$ , 推定ウェルシュ菌芽胞  $10^0 \sim 10^2$  cfu $\cdot 100\text{m}^{\text{l}}$ , 好気性芽胞はどの調査地点も  $10^3$  cfu $\cdot 100\text{m}^{\text{l}}$  のレベルであった。また、濁度は 1~9 度であった。

## 3.2 原虫濃度と各指標項目濃度の回帰分析

### 1)クリプトスポリジウムを目的変数とした回帰分析

クリプトスポリジウム濃度との間に単回帰分析で有意な相関が得られたのは推定ウェルシュ菌芽胞および大腸菌濃度(Fig. 4 および Fig. 5)で、大腸菌群、好気性芽胞および濁度では自由度 2 重調整寄与率が低く、有意な相関は得られなかった。クリプトスポリジウムオーシスト濃度との間に最も高い相関が認められたのは推定ウェルシュ菌芽胞であった(目的変数:クリプトスポリジウム様蛍光抗体陽性粒子,  $r^2=0.486$ ,  $p<0.01$ , 目的変数:クリプトスポリジウムオーシスト,  $r^2=0.433$ ,  $p<0.01$ )。このとき、回帰係数はほぼ 1 (蛍光抗体陽性粒子  $a_1=0.96$ , クリプトスポリジウムオーシスト  $a_1=0.89$ )であり、推定ウェルシュ菌芽胞の濃度変化はクリプトスポリジウムオーシストの濃度変化に一致した。また、大腸菌では(目的変数: 蛍光抗体陽性粒子,  $r^2=0.369$ ,  $p<0.01$ , 目的変数:クリプトスポリジウムオーシスト,  $r^2=0.363$ ,  $p<0.01$ )(Table 7)。

重回帰分析で説明変数を 2 変数とした場合、蛍光抗体陽性粒子、クリプトスポリジウムオーシスト共に寄与率が増加し、説明変数の最適な組合せとして推定ウェルシュ菌芽胞に加えて好気性芽胞が選択された(目的変数: 蛍光抗体陽性粒子,  $r^2=0.518$ ,  $p<0.01$ , 目的変数:クリプトスポリジウムオーシスト,  $r^2=0.447$ ,  $p<0.01$ )。また、3 変数とした場合でも寄与率は増加し、蛍光抗体陽性粒子では推定ウェルシュ菌芽胞に加えて好気性芽胞および大腸菌が ( $r^2=0.522$ ,  $p<0.01$ )、クリプトスポリジウムオーシストでは推定ウェルシュ菌芽胞に加えて大腸菌および大腸菌群が( $r^2=0.493$ ,  $p<0.01$ )選択された。さらに変数を増加させ、4 および 5 変数としても寄与率の増加は認められず、この 3 変数を用いたときにすべての組合せの中で最も高い自由度 2 重調整寄与率となった(Table 8)。

目的変数として PI オーシスト濃度を用いた場合でも、蛍光抗体陽性粒子およびクリプトスポリジウムオーシストとほぼ同様な結果が得られ、推定ウェルシュ菌芽胞、大腸菌および大腸菌群が選択された(Table 7~8 および Fig.4~5)。

### 2)ジアルジアを目的変数とした回帰分析

クリプトスポリジウムの場合と同様、ジアルジア濃度との間に単回帰分析で有意な相関が得られた

のは推定ウェルシュ菌芽胞および大腸菌濃度(Fig.6 および 7)で、大腸菌群、好気性芽胞および濁度では自由度2重調整寄与率が低く、有意な相関は得られなかった。ジアルジアシスト濃度との間に最も高い相関が認められたのは推定ウェルシュ菌芽胞であり(目的変数:蛍光抗体陽性粒子,  $r^2=0.660$ ,  $p<0.01$ , 目的変数:ジアルジアシスト,  $r^2=0.623$ ,  $p<0.01$ ), 回帰係数もほぼ1であった(蛍光抗体陽性粒子  $a_1=0.96$ , シスト  $a_1=0.97$ )。また、大腸菌でも相関が認められた(目的変数:蛍光抗体陽性粒子,  $r^2=0.608$ ,  $p<0.01$ , 目的変数:ジアルジアシスト,  $r^2=0.535$ ,  $p<0.01$ )(Table 7)。重回帰分析では、クリプトスポリジウムの場合と異なり、蛍光抗体陽性粒子、ジアルジアシスト共に説明変数を2変数とした場合、推定ウェルシュ菌芽胞と大腸菌が最適な説明変数の組合せとして選択された(目的変数:蛍光抗体陽性粒子,  $r^2=0.713$ ,  $p<0.01$ , 目的変数:ジアルジアシスト,  $r^2=0.642$ ,  $p<0.01$ )。この2変数が最も適した説明変数の組合せであり、説明変数を3以上としても寄与率の増加はなかった(Table 8)。

目的変数としてPIシスト濃度を用いた場合でも、蛍光抗体陽性粒子およびジアルジアシストとほぼ同様な結果が得られ、推定ウェルシュ菌芽胞および大腸菌が選択された(Table 7~8 および Fig.6~7)。

## 4 考察

### 4.1 相模川水系の原虫汚染状況

本研究では神奈川県的主要な水源の一つである相模川水系の11地点について原虫汚染状況を調査した。相模川水系では人為的な汚染源が極めて少ないと考えられる地点(中津川愛川町半原)から大きな汚染源と考えられる養豚排水処理施設放流水の流入する地点(小鮎川清川村片原橋)まで、濃度範囲、陽性率に差はあるものの、水道原水の取水地点を含む11地点すべてで少なくとも1回以上クリプトスポリジウム、ジアルジア両原虫の存在が確認された。クリプトスポリジウムオーシスト濃度は幾何平均値で24個・100 $l^1$ 、ジアルジアシスト濃度は13個・100 $l^1$ であった。

米国での報告と比較すると、米国の17州の河川、111地点の調査で57地点(51%)から平均43個・100 $l^1$ の濃度でクリプトスポリジウムが、14地点(13%)から平均4個・100 $l^1$ の濃度でジアルジアが検出され(Rose *et al.*, 1991)、ジアルジアについては今回の調査対象である相模川水系の例と比較して陽性率、濃度ともに低いものの、クリプトスポリジウムについては同レベルであった(Table 9)。

一方、わが国では各地の水道事業者が行っている単独の調査はあるものの(千葉県衛生部, 1996; 東京都, 1999)、定量的あるいは広範囲にわたって行われている調査で公表されているものは厚生省による全国調査(厚生省, 1998)および神奈川県による県内水源の調査(神奈川県衛生部, 1996, 1997)の2つのみである。

今回の結果は神奈川県での調査結果とほぼ同様の分布状況であった。厚生省の全国調査は水道水源の94水域、272地点の水5~10 $l$ について調査し、クリプトスポリジウムオーシストは8地点(陽性率2.9%)から2個・10 $l^1$ 、ジアルジアシストは24地点(8.7%)から3個・10 $l^1$ 認め、これらの報告値は今回と比較して濃度範囲、検出率ともに低い。これは全国調査では試験水量が今回と比較して低いことが原因していると考えられ、試験水量を増やすことで陽性率も増加するものと考えられる。

相模川は中流部の厚木市で中津川および養豚排水処理施設放流水を汚染源として両原虫に高度に汚染されていた小鮎川と合流する。両支川の合流の前後で原虫濃度が上昇することから、相模川の原虫汚染についてはこの2つの支川が大きく関与すると考えられた。中津川(流量:毎秒1.5 $m^3$ )および小鮎川(毎秒2 $m^3$ )は厚木市で相模川と合流し、合流地点の8km下流の寒川町宮山付近(流量:毎秒20 $m^3$ )で水道原水を取水している。時間的な河川流量や原虫濃度の変動、希釈以外の要因を考慮せずに両支川の相模川本川への流入による希釈と合流前の各河川の原虫濃度から単純に概算すると、相模川本川への流入直前の地点の原虫濃度の幾何平均値は中津川の鮎津橋地点ではクリプトスポリジウム15個・

100<sup>l</sup>, ジアルジア 7 個・100<sup>l</sup>, 小鮎川の厚木市元町地点ではそれぞれ 41 および 18 個・100<sup>l</sup> であり, 相模川寒川町宮山地点では, その流量比から 13 および 10 倍に希釈され, 中津川由来の原虫濃度はクリプトスポリジウムは 1.2 個・100<sup>l</sup>, ジアルジアは 0.5 個・100<sup>l</sup>, 小鮎川由来はそれぞれ 4.1 および 1.8 個・100<sup>l</sup> となる。この値の相模川の寒川町宮山地点の原虫濃度の幾何平均値(クリプトスポリジウムオーシスト; 10 個・100<sup>l</sup>, ジアルジア; 6 個・100<sup>l</sup>)に占める割合は中津川ではクリプトスポリジウムで 12%, ジアルジアでは 20%, 小鮎川ではより高く, それぞれ 41% および 30% であり, 寒川町宮山での原虫汚染の 50% は中津川および小鮎川によるものと推測され, 本地点の汚染に両支川が強く関与していることが推察された。

クリプトスポリジウムおよびジアルジアによる水道を介した水系感染を制御するためには, 水源に放出されている畜産排水の管理を含む総合的な対策の徹底が必要であると考えられる。

#### 4.2 内部構造を有する原虫数

本研究で用いた原虫試験方法(厚生省, 1998)では顕微鏡観察に基づいた形態観察で, 蛍光抗体染色で特有の染色像を示すクリプトスポリジウムあるいはジアルジア様蛍光抗体陽性粒子, さらに特有の内部構造(クリプトスポリジウムに関してはオーシスト壁の開口部位である縫合線も含む)が観察される粒子をクリプトスポリジウムオーシストまたはジアルジアシストと判定している。このような顕微鏡観察に基づいた試験方法では 1) 検出されたクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシストの生育活性や感染性についての情報を得ることは不可能である。2) 顕微鏡観察による分類で蛍光抗体陽性粒子に分類されたものの中には内部構造の欠落した, 生存の可能性のないオーシストを含む。3) 内部構造が観察され, オーシストあるいはシストと確定されたものには夾雑物の影響で内部構造の判別が不可能であったオーシストあるいはシストの数は含まれない。などの問題点が生じる。これらのことから顕微鏡観察に基づいた現行の試験方法では汚染レベルを過小あるいは過大に評価する可能性がある。水環境の原虫汚染レベルを公衆衛生学的な側面から適正に評価するためには人への感染性を有するオーシストあるいはシストの汚染レベルを把握することが重要であるが, 直接的にその値を測定することができない現状では何らかの方法で推測する必要がある。

そこで本研究では生育活性を有しているオーシスト, シスト数の最大値と考えられる内部構造を有しているオーシスト, シスト数(PI オーシスト数および PI シスト数)を推定した。その結果, PI オーシストおよびシスト数は現行の原虫試験方法による判断基準(厚生省, 1998)で計数したクリプトスポリジウムオーシストあるいはジアルジアシストの約 2 倍の値となった。寒川町宮山の PI オーシスト濃度は 24 個・100<sup>l</sup>, PI シスト濃度は 12 個・100<sup>l</sup> であり, これらを用いて浄水処理による除去を  $3\log_{10}$  とした場合の年間感染リスクを推定すると, (4) および (5) 式よりクリプトスポリジウムで  $10^{-31}$ , ジアルジアでは  $10^{-28}$  となる。一方, 暫定対策指針に基づく基準で判定したクリプトスポリジウムオーシストおよびジアルジアシストを基に算出した年間感染リスクはそれぞれ  $10^{-35}$  および  $10^{-30}$  となり, 暫定対策指針に基づく基準では感染リスクを  $10^{-0.4} \sim 10^{-0.2}$  低く評価し, クリプトスポリジウムおよびジアルジアの感染リスクを過小に評価することになると考えられた。

PI オーシストおよびシストは内部構造を有するオーシスト, シストの最大値であり, その値が直接的に生育活性や感染性を有するものの数を表すものではないが, *C. parvum* オーシストを河川水中に暴露させた実験で 11 日目までは脱嚢試験による評価で生育活性に影響がみられないと報告されているように(Robertson *et al.*, 1992), これらの原虫は環境中で長期にわたり生残性を保持していると考えられる。そのため, 公衆衛生上, 内部構造を有するオーシスト, シストは生育活性を有すると考える必要がある。そこでこれらの値を用いて水環境の原虫汚染レベルの評価を行うことでより適正な汚染レ

ベルの評価が可能になると考えられる。

### 4.3 原虫汚染指標の検討

原虫試験は煩雑であり、短期間に多数の試料を試験することは困難である。煩雑な原虫試験を代替あるいは補完でき、簡便に検査できる指標の導入は水環境の原虫汚染状況に関する情報のより効率的な収集を可能にすると考えられる。従来、水の微生物汚染の指標として糞便汚染指標である大腸菌群が用いられてきた。大腸菌群はコレラ、赤痢に代表されるような細菌性の水系感染症の病原細菌の汚染指標として有効に機能してきた。しかし一方で、原虫の生物学的特性から大腸菌群による指標では適正に評価できない事も指摘されており、水系の原虫汚染の代替指標として推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞、糞便性腸球菌および濁度などが候補としてあげられている(Payment and Franco, 1993 ; LeChevallier and Norton, 1995 ; Jakubowski, *et al.*, 1996 ; Medema, *et al.*, 1997 ; Venczel, *et al.*, 1997)。本研究では原虫汚染指標の代替指標としての有効性を評価するため、これらのうち糞便汚染指標である大腸菌、大腸菌群に加えて推定ウェルシュ菌芽胞、好気性芽胞および濁度の5つの指標についても調査した。大腸菌群では単回帰分析では原虫濃度との間に相関が認められず、単独で用いた場合には原虫汚染指標としては機能しないことが本研究でも認められた。一方で、原虫と類似した生物学的特性である、糞便により環境に放出され、環境中で各種の環境ストレスに耐性を有する芽胞の形態で存在し、環境中で増殖しない、という特性を有し、環境中で生物性の粒子として存在する推定ウェルシュ菌芽胞の濃度は原虫の濃度と高い相関を示し、その濃度変化も一致したことから最も有効な指標であると考えられた。また、糞便汚染の指標性の強い大腸菌についても同様に原虫汚染指標としての有効性がみられた。複数の指標を用いた場合では推定ウェルシュ菌芽胞に加えて、大腸菌、大腸菌群および好気性芽胞のいずれかの組合せが選択され、複数の指標を用いることでわずかではあるが寄与率の上昇が認められたことから複数の指標を用いることの有効性が示された。これらのことから、従来の大腸菌群のみでは原虫汚染を適正に評価することは困難であり、原虫の汚染指標としては推定ウェルシュ菌芽胞あるいは推定ウェルシュ菌芽胞を中心にした複数の指標の組合せを用いることが有効である。

原虫濃度と指標濃度の関係より、寄与率の高かった推定ウェルシュ菌芽胞または大腸菌と原虫濃度の単回帰式から原虫の年間許容感染リスク  $10^{-4}$  に相当する原水の指標濃度を求めると、凝集沈殿砂ろ過による浄水処理(原虫除去指数  $3\log_{10}$ )を想定すると推定ウェルシュ菌芽胞はクリプトスポリジウムで  $8\text{cfu}\cdot 100\text{m}^{\text{L}}$ 、ジアルジアで  $3\text{cfu}\cdot 100\text{m}^{\text{L}}$ 、同様に大腸菌ではそれぞれ 50 および  $20\text{MPN}\cdot 100\text{m}^{\text{L}}$  となる(Table 10)。ここで原虫濃度としてPI オーシストおよびシストを用いた場合には原水の指標濃度はさらに小さくなり、推定ウェルシュ菌芽胞ではそれぞれ 5 および  $2\text{cfu}\cdot 100\text{m}^{\text{L}}$ 、大腸菌では 30 および  $7\text{MPN}\cdot 100\text{m}^{\text{L}}$  となる。PI シスト数に対する指標濃度を基準として用いた場合、推定ウェルシュ菌芽胞で  $2\text{cfu}\cdot 100\text{m}^{\text{L}}$ 、大腸菌で  $7\text{MPN}\cdot 100\text{m}^{\text{L}}$  を越えるような原水を使用した場合には原虫の年間感染リスク  $10^{-4}$  を越える可能性が高くなると考えられる。

推定ウェルシュ菌芽胞、大腸菌濃度はともに容易に検査できるレベルであり、これらの指標を用いることで、水環境の原虫汚染の多寡をスクリーニング調査し、高度の原虫汚染が推測される場合に直接原虫を測定するなど、より効率的な原虫試験が可能になると考えられる。

## 5 結論

- 1) 水道水源を含む相模川の調査では 11 地点、全 106 試料のうちクリプトスポリジウムオーシストは 76(72%)試料から  $24\text{個}\cdot 100\text{m}^{\text{L}}$  の濃度で検出された。同様にジアルジアシストは 77 試料(73%)から  $13\text{個}\cdot 100\text{m}^{\text{L}}$  の濃度で検出され、相模川水系は広範かつ常在的に両原虫に汚染されていた。

- 小鮎川清川村片原橋の約 50m 上流に放流される養豚排水処理施設の放流水からは  $10^3 \sim 10^4$  個・ $l^{-1}$  もの高濃度な両原虫が検出され、相模川水系の両原虫の汚染源としての関与が強く示唆された。
- 2) 原虫汚染を代替あるいは補完する指標を検討した。推定ウェルシュ菌芽胞、大腸菌、大腸菌群、好気性芽胞および濁度の 5 つの水質指標を測定し、これらの濃度と原虫濃度との関係を単回帰および重回帰分析で評価した。単独の指標としては推定ウェルシュ菌芽胞が最も優れ、次いで大腸菌が有効で、複数の指標を用いる場合には推定ウェルシュ菌芽胞に加えて大腸菌、大腸菌群、好気性芽胞のいずれかの組合せが選択された。これらの指標を適切に用いることによって、原虫汚染の可能性の多寡をスクリーニング的に把握することがある程度可能になるものと考えられる。
  - 3) クリプトスポリジウムの蛍光抗体陽性粒子のうち、内部構造(スポロゾイト)あるいは縫合線が確認されたオーシスト数は 44%、スポロゾイトが観察されたものは 20%であったのに対して、PI オーシスト数(内部構造を有するオーシスト数の推定値)は 38%であった。また、確定されたクリプトスポリジウムオーシストのうち、スポロゾイトが観察されたものは 49%、PI オーシスト数は 94%であり、実際にスポロゾイトが観察できたオーシストの 2 倍となった。

同様にジアルジアでは、蛍光抗体陽性粒子のうち、特有の内部構造が観察されたジアルジアシスト数は 34%であったのに対して PI シスト数は 62%であり、クリプトスポリジウムと同様に 2 倍の開きが生じた。

## 引用文献

- Atherton, F., Newman, C. and Casemore, D., 1995: An outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with a water supply in UK. *Epidemiology and Infection*, 115:123-131.
- Bridgman, S.A., Robertson, R., Syed Q., Speed, N., Andrews, N. and Hunter, P.R., 1995: Outbreak of cryptosporidiosis associate with a disinfected groundwater supply. *Epidemiology and Infection*, 115:555-566.
- Dworkin, M.S., Goldman, D.P., Wells, T.G., Kobayashi, J.M. and Herwaldt, B.L., 1996: Cryptosporidiosis in Washington state: An outbreak associate with well water. *Journal of Infectious Diseases*, 174:1372-1376.
- Fox, K.R. and Lytle, D.A., 1996: Milwaukee's crypto outbreak: investigation and recommendations. *Journal of American Water Works Association*, 88(9):87-94.
- Hayes, E.B., Thomas, D.M., Thomas, R.O., Ungar, B.L.P., Word, D.M., Pinsky, P.F., Cummings, L.C., Wilson, M.A., Long, E.G., Hurwitz, E.S. and Juranek, D.D., 1989: Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *New England Journal of Medicine*, 320:1372-1376.
- Hirata, T., Kawamura, K., Sonoki, S., Hirata, K., Kaneko, M. and Taguchi, K., 1991: *Clostridium perfringens*, as an indicator microorganism for the evaluation of the effect of wastewater and sludge treatment systems. *Water Science and Technology*, 24(2): 367-372.
- Hirata, T., Kawamura, K., Yano, K., Kaneko, M., Moniwa, T., Tosa, K. and Taguchi, K., 1993: Removal efficiencies of microorganisms in wastewater treatment processes. *Water Science and Technology*, 28(7):55-61.
- Jakubowski, W., Boutros, S., Faber, W., Fayer, R., Ghiorse, W., LeChevallier, M., Rose, J., Singh, A. and Stewart, M., 1996: Environmental methods for *Cryptosporidium*. *Journal of American Water Works Association*, 88:107-121.
- Joseph, C., Hamilton, G., O'connor, M., Nicholas, S., Marshall, R., Stanwell-smith, R., Sims, R., Ndawula, E., Casemore, D., Gallagher, P. and Harnett, P., 1991: Cryptosporidiosis in the Thanet ; an outbreak associated with local drinking water. *Epidemiology and Infection*, 107:509-519.
- 神奈川県衛生部報道発表資料, 1997: クリプトスポリジウムに係る水道原水調査の結果について (平成 9 年 7 月 2 日付).
- 神奈川県衛生部報道発表資料, 1998: クリプトスポリジウムの水道水源および浄水の汚染実態調査の結果について (平成 10 年 9 月 11 日付).
- Kfir, R., Hilner, C., du Preez, M. and Bateman, B., 1995: Studies on the prevalence of *Giardia* cysts and



- Cryptosporidium* oocysts in South African water. *Water Science and Technology*, 31,(5-6):435-438.
- 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課報道発表資料, 1997: 水道水源におけるクリプトスポリジウム等の検出状況について(平成9年6月4日付).
- 厚生省生活衛生局水道環境部長通知, 1998: 水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針(平成10年6月19日改正).
- Kramer, M.H., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L. and Juranek, D.D., 1996: Waterborne disease: 1993 and 1994. *Journal of American Water Works Association*, 88(3): 66-80.
- LeChevallier, M.W. and Norton, W.D., 1995: *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished water. *Journal of American Water Works Association*, 87(9):54-68.
- LeChevallier, M.W., Norton, W.D. and Lee, R.G., 1991: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2610-2616.
- MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Schell, W.L., Blair, K.A., Addiss, D.G., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J. and Davis, J.P., 1994: The massive outbreak of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, 311:161-167.
- Medema, G.J., Bahar, M. and Schets, F.M., 1997: Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, fecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms. *Water Science and Technology*, 35(11-12):249-252.
- Moore, A.C., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L., Highsmith, A.K. and Juranek, D.D., 1994: Waterborne disease in the United States, 1991 and 1992. *Journal of American Water Works Association*, 86(2):87-99.
- Payment, P. and Franco, E., 1993: *Clostridium perfringens* and somatic colifages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:2418-2424.
- Richardson, A.J., Frankenberg, R.A., Buck, A.C., Selkon, J.B., Colbourne, J.S., Parsons, J.W. and Mayon-white, R.T., 1991: An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire, *Epidemiology and Infection*, 107:485-495.
- Roach, P.D., Olson, M.E., Whitley, G. and Wallis, P.M., 1993: Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Yukon, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:67-73.
- Robertson, L.J., Campbell, A.T. and Smith, H.V., 1992: Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3494-3500.
- Roefer, P.A., Monscivitz, J.T. and Rexing, D.J., 1996: The Las Vegas cryptosporidiosis outbreak, *Journal of American Water Works Association*, 88(9):95-106.
- Rose, J.B., Gerba, C.P. and Jakubowski, W., 1991: Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environmental Science and Technology*, 25:1393-1400.
- 埼玉県衛生部, 1997: クリプトスポリジウムによる集団下痢症—越生町集団下痢症事件—報告書 (平成9年3月).
- Smith, H.V., Patterson, W.J., Hardie, R., Greene, L.A., Benton, C., Tulloch, W., Gilmour, R.A., Girdwood, R.W.A., Sharp, J.C.M. and Forbes, G.I., 1989: An outbreak of waterborne cryptosporidiosis caused by post treatment contamination, *Epidemiology and Infection*, 103:703-715.
- Sologabriele, H. and Neumeister, S., 1996: US outbreak of Cryptosporidiosis. *Journal of American Water Works Association*, 88(9):76-86.
- Venczel, L.V., Arrowood, M., Hurd, M. and Sobsey, M.D., 1997: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4):1598-1601.

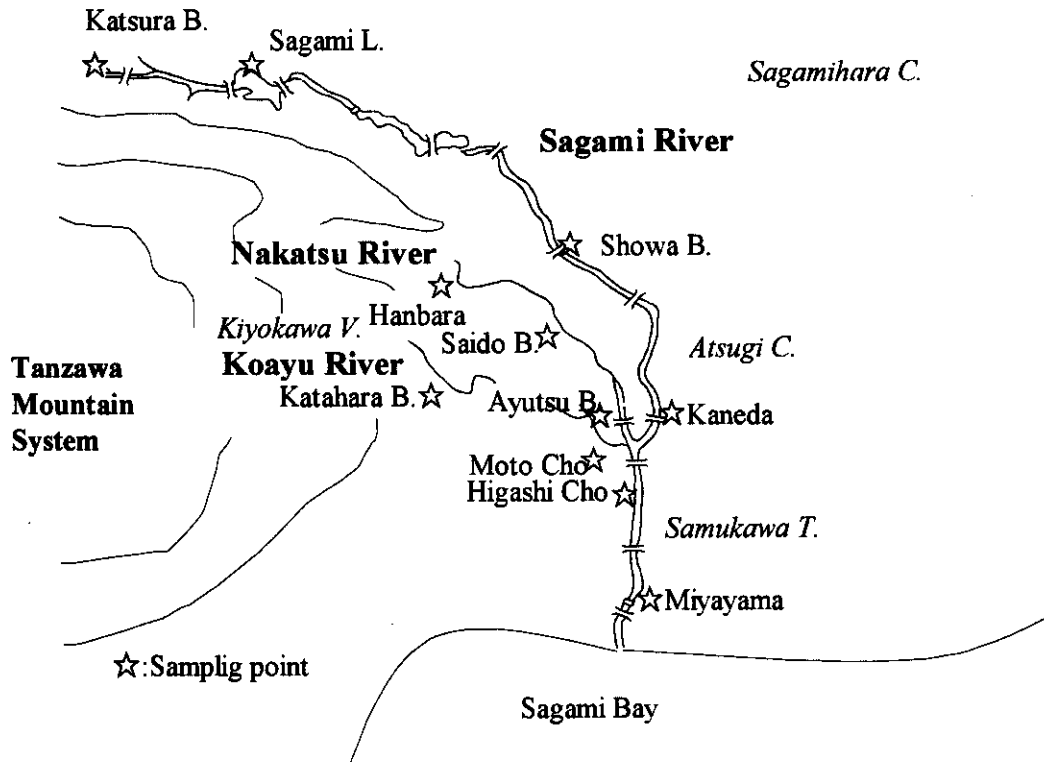


Fig. 1 Sampling sites of the Sagami River and its tributaries

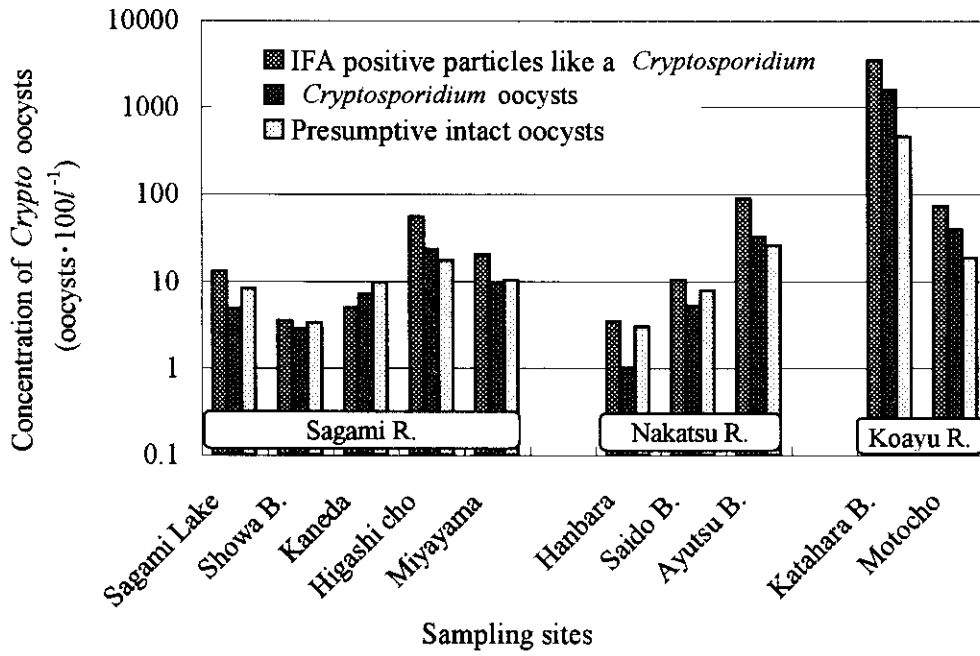


Fig. 2 Concentrations of *Cryptosporidium* oocysts in the Sagami River

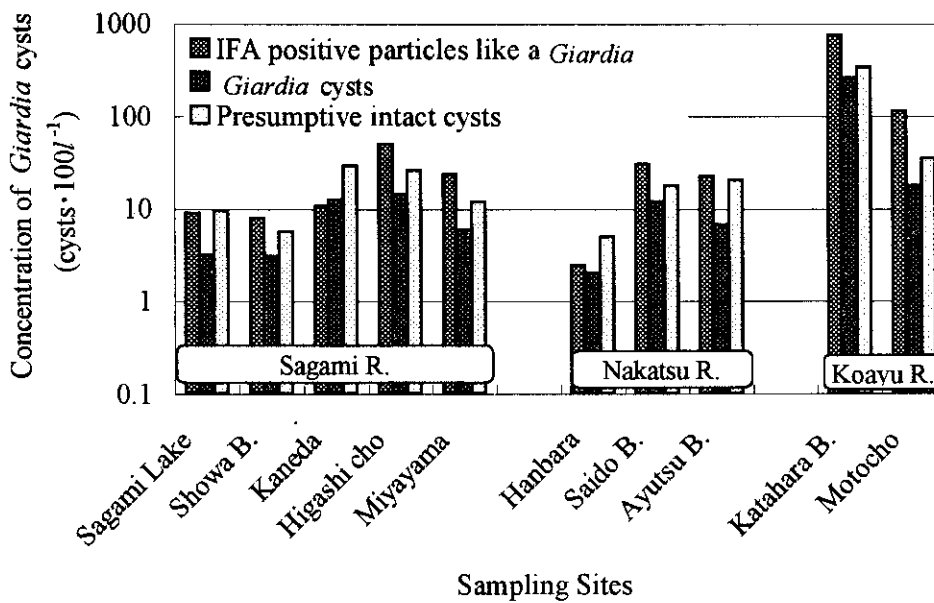


Fig. 3 Concentrations of *Giardia* cysts in the Sagami River

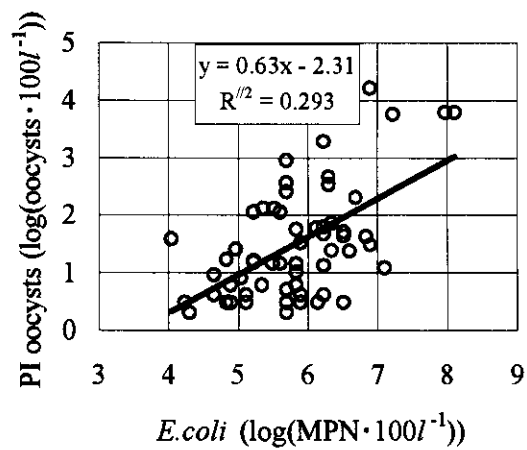
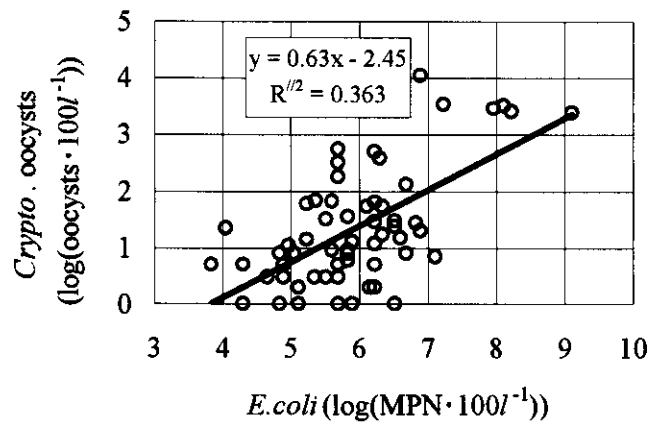
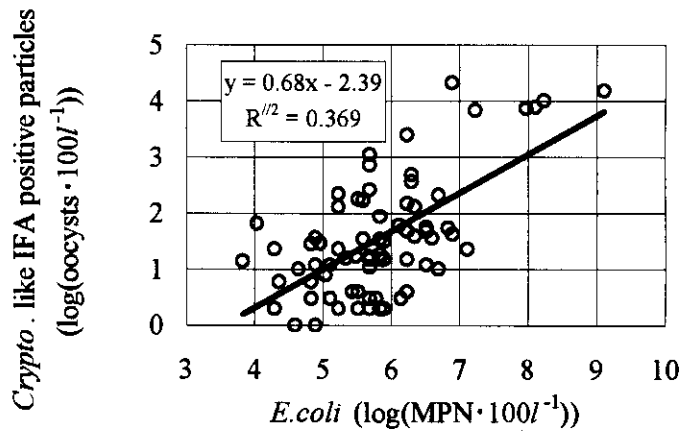
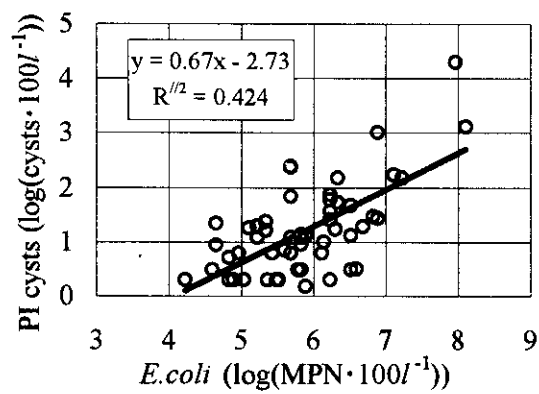
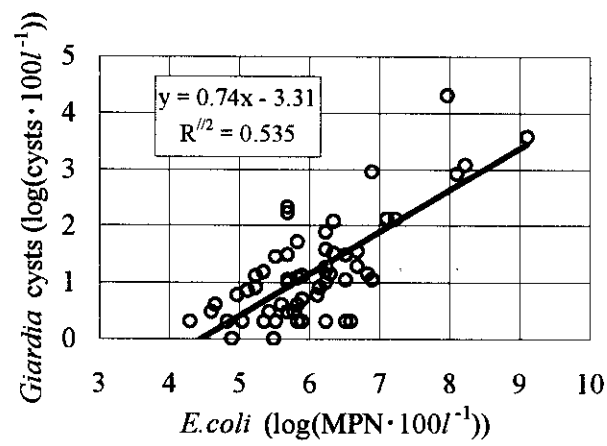
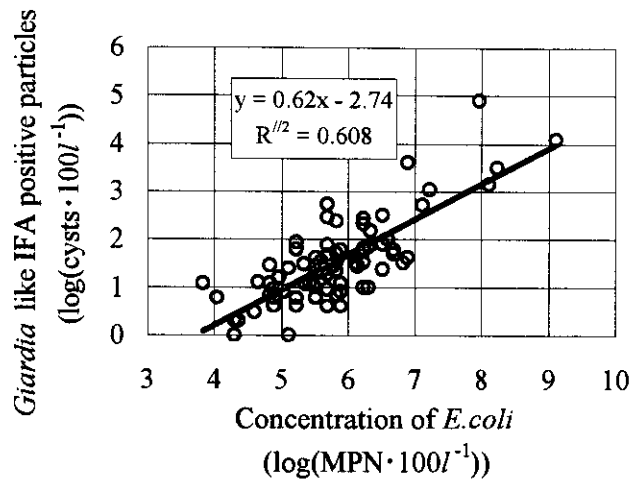


Fig. 4 Relationship between concentration of *Crypto.* oocysts and *E.coli*



**Fig. 5** Relationship between concentration of *Giardia* cysts and *E. coli*

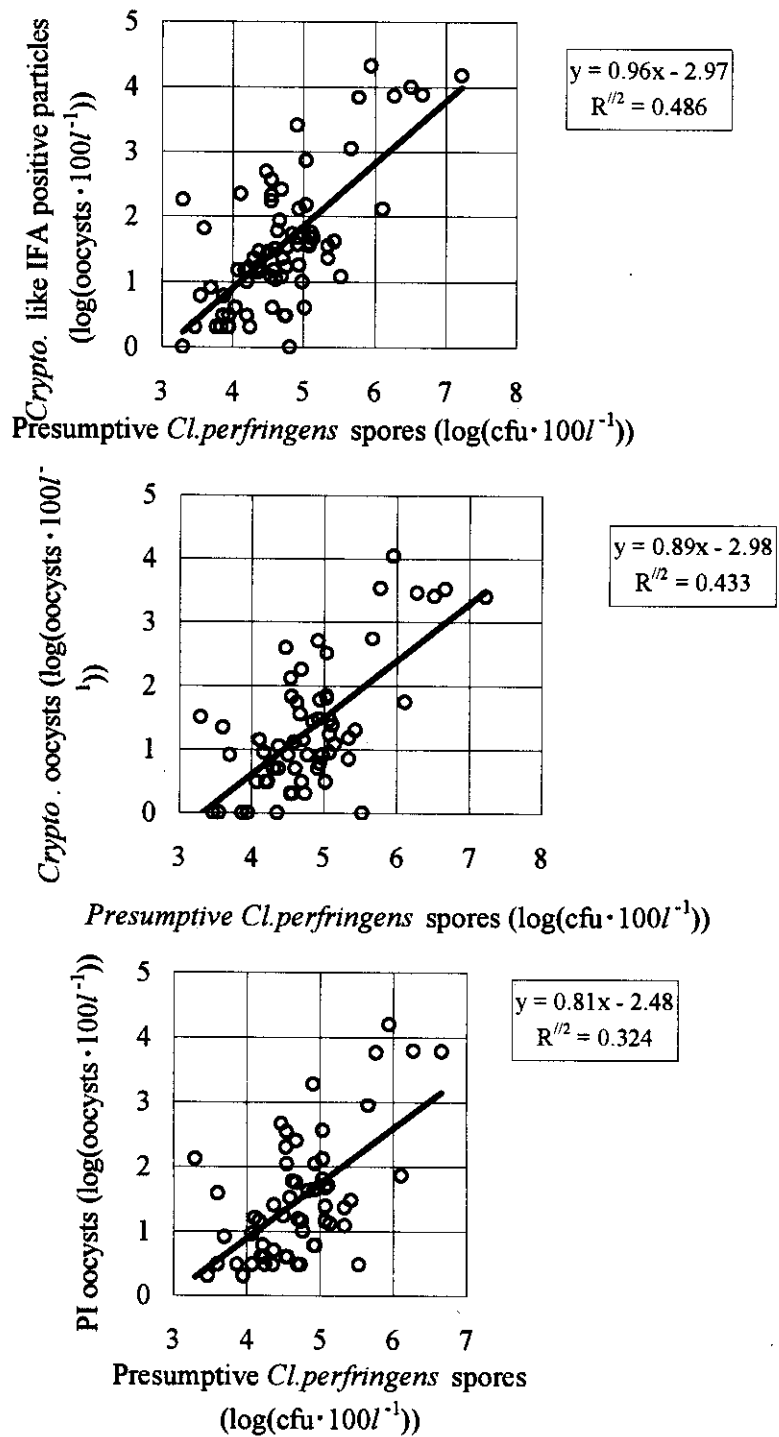


Fig. 6 Relationship between concentration of *Crypto.* oocysts and *Cl. perfringens*

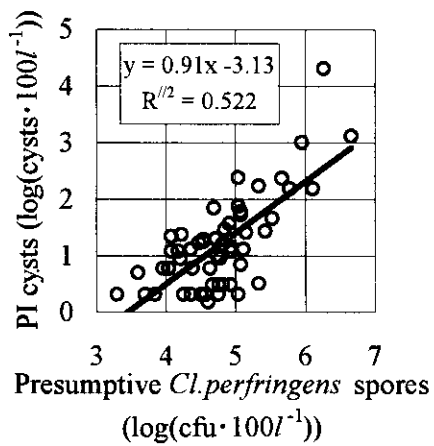
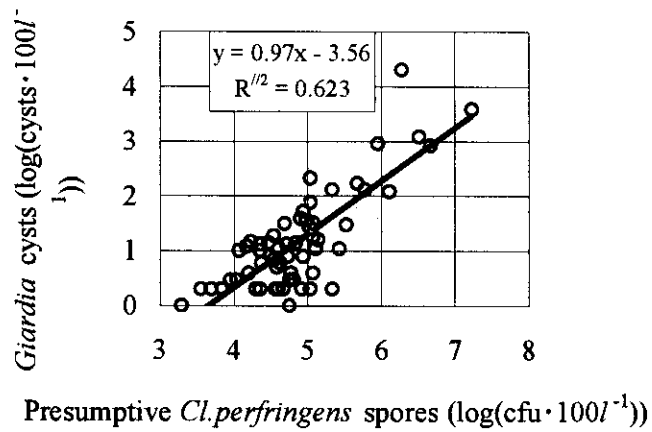
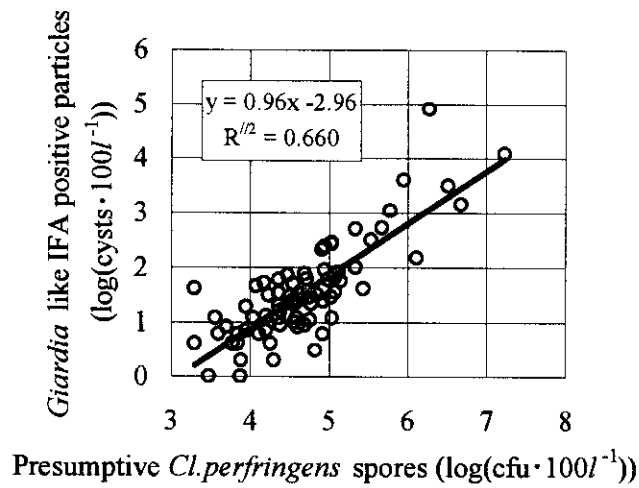


Fig. 7 Relationship between concentration of *Giardia* cysts and *Cl. perfringens*

**Table 1 Concentration of (oo)cysts in the Sagami River.**

		<i>Cryptosporidium</i>		<i>Giardia</i>	
		IFA positive particles	oocysts	IFA positive particles	cysts
		((oo))cysts or particles/100L			
Sagami River	GM	19	12	20	7
	Range	1-400	1-240	1-510	1-210
	%(n/n)	95(53/56)	73(41/56)	100(56/56)	71(40/56)
Nakatsu River	GM	18	9	18	8
	Range	2-2,500	1-500	1-320	1-44
	%(n/n)	62(18/29)	48(14/29)	72(21/29)	59(17/29)
Koayu River	GM	250	133	137	24
	Range	10-21,000	6-11,000	10-80,000	2-20,000
	%(n/n)	100(21/21)	100(21/21)	100(21/21)	95(20/21)
Total	GM	37	24	33	13
	Range	1-21,000	1-11,000	1-80,000	1-20,000
	%(n/n)	87(92/106)	72(76/106)	93(98/106)	73(77/106)

GM : Geometric mean

n/n : No. of positive samples/No. of tested samples



Table 2 Concentration of protozoa at each sampling point

Sampling sites		<i>Cryptosporidium</i>			<i>Giardia</i>		
		positive particles	Oocysts	PI oocysts	positive particles	Cysts	PI cysts
Sagami River							
Katsura B.	GM/100L	4	3		28	28	
	n	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	0/1
	Range	-	-	-	-	-	-
Sagami L.	GM/100L	13	5	10	9	3	2
	n	6/8	5/8	5/8	8/8	5/8	1/8
	Range	1-220	1-22	3-35	3-60	1-13	-
Showa B.	GM/100L	4	3	4	8	3	5
	n	7/7	4/7	5/7	7/7	5/7	4/7
	Range	1-23	1-9	2-9	1-57	1-22	2-22
Kaneda	GM/100L	5	7	10	11	12	19
	n	6/7	1/7	1/7	7/7	3/7	2/7
	Range	2-23	7	10	2-510	3-130	16-23
Higashi Cho	GM/100L	55	23	20	51	14	11
	n	7/7	7/7	7/7	7/7	6/7	4/7
	Range	14-320	5-710	1-330	9-500	2-210	1-240
Miyayama	GM/100L	21	10	24	24	6	12
	n	26/26	23/26	21/26	26/26	21/26	17/26
	Range	2-260	1-180	1-210	4-80	1-31	1-69
Nakatsu River							
Hanbara	GM/100L	3	1	3	2	2	-
	n	3/12	1/12	1/12	4/12	2/12	0/12
	Range	2-7	1	3	1-7	1-4	-
Saido B.	GM/100L	10	5	8	31	12	12
	n	10/12	8/12	5/12	12/12	11/12	6/12
	Range	2-43	1-23	3-29	4-320	2-44	2-53
Ayutsu B.	GM/100L	39	15	16	13	7	4
	n	4/5	4/5	4/5	4/5	3/5	2/5
	Range	12-110	3-68	1-95	8-32	2-14	2-28
Koayu River							
Katahara	GM/100L	4000	1900	1600	760	260	260
	n	12/12	12/12	10/12	12/12	11/12	9/12
	Range	360-21,000	210-11,000	190-13,000	10-80,000	5-20,000	5-20,000
Moto Cho	GM/100L	74	41	32	115	18	14
	n	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	7/9
	Range	10-1,100	6-550	5-330	26-540	2-190	2-71

**Table 3 Occurrence of protozoa in source water for drinking water supply**

Sampling site		<i>Cryptosporidium</i> /100L			<i>Giardia</i> /100L		
		IFA positive		PI	IFA positive		PI
		particles	Oocysts	oocysts	particles	Cysts	cysts
Miyayama (Sagami R.)	n	26/26	23/26	21/26	26/26	21/26	17/26
	GM	21	10	24	24	6	12
	Range	2~260	1~180	2~250	4~80	1~31	2~69
Hanbara (Nakatsu R.)	n	3/12	1/12	0/12	4/12	2/12	0/12
	GM	2	1	—	2	1	—
	Range	1~7	1	—	1~7	1~4	—

GM : Geometric mean

n : No. of positive samples/No. of tested samples

**Table 4 Occurrence of protozoa in treated swine wastewater**

	<i>Cryptosporidium</i> /L		<i>Giardia</i> /L	
	IFA positive		IFA positive	
	particles	Oocysts	particles	Cysts
n	3/3	3/3	3/3	2/3
GM	4,700	2,200	12,000	5,500
Range	2,400~	1,000~	3,000~	1,000~
	10,000	10,000	47,000	10,000

GM : Geometric mean

n : No. of positive samples/No. of tested samples

**Table 5** The percentage of internal structure classification

		The percentage of							
		<i>Crypto</i> oocysts	Intact Oocysts	PI oocysts	Intact oocysts	PI oocysts	<i>Giardia</i> cysts	PI cysts	PI cysts
		to IFA positive particles like a <i>Crypto</i>			to <i>Crypto</i> oocysts		particles like a <i>Giardia</i>		to <i>Giardia</i> cysts
<b>Sagami R.</b>	Katsura B.	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sagami L.	27	26	52	97	195	57	67	167
	Syouwa B.	51	36	57	70	111	23	48	210
	Kaneda	-	-	-	-	-	29	62	241
	Higashi-cho	48	23	38	48	78	25	52	208
	Miyayama	37	25	43	68	118	23	51	220
<b>Koayu R.</b>	Katahara B.	48	2	19	5	39	24	46	195
	Moto-cho	55	18	25	33	45	21	45	231
<b>Nakatsu R.</b>	Hanbara	-	-	-	-	-	80	100	125
	Saido B.	45	14	26	30	59	36	69	217
	Ayutsu B.	39	18	41	46	105	26	76	342
<b>Total</b>	Average	44	20	38	49	94	34	62	216
	SD	9	9	13	27	48	18	16	53
	Range	27-55	2-36	19-57	5-97	39-195	21-80	45-100	125-342

**Table 6** Concentration of surrogate indicators in the Sagami River and its tributaries

Sampling sites		Turbidity	<i>E.coli</i>	coliforms	<i>Cl.perfringens</i> spores*	Aerobic spores
		(unit)	(MPN·100ml <sup>-1</sup> )		(cfu·100ml <sup>-1</sup> )	
Sagami River	GM	3	300	17,000	27	3,900
	Range	1~23	7~13,000	40~2,400,000	2~270	110~23,000
	n	54/56	55/56	55/56	56/56	55/56
Nakatsu River	GM	2	240	14,000	12	1,600
	Range	1~8	2~8,800	330~490,000	0.2~3,400	27~330,000
	n	15/29	27/29	29/29	29/29	29/29
Koayu Rive	GM	6	6,100	89,000	310	3,700
	Range	1~30	170~460,000	4,500~	21~17,000	940~1,2000
	n	16/21	19/21	20/21	20/21	21/21
Total	GM	3	500	22,000	34	3,000
	Range	1~30	2~460,000	40~2,400,000	0.2~17,000	27~330,000
	n	84/106	101/106	104/106	105/106	105/106

GM : Geometric mean

n: Number of positive samples/Number of tested samples

\*: Presumptive *Cl.perfringens* spores

**Table 7 Selected regression equations**

<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
$C_i = 0.96 C_l - 2.97 (r^{1/2} = 0.486)$	$C_i = 0.96 C_l - 2.96 (r^{1/2} = 0.660)$
$C_i = 0.68 E_c - 2.39 (r^{1/2} = 0.369)$	$C_i = 0.62 E_c - 2.74 (r^{1/2} = 0.608)$
$C_c = 0.89 C_l - 2.98 (r^{1/2} = 0.433)$	$C_c = 0.97 C_l - 3.56 (r^{1/2} = 0.623)$
$C_c = 0.63 E_c - 2.45 (r^{1/2} = 0.363)$	$C_c = 0.74 E_c - 3.31 (r^{1/2} = 0.535)$
$C_p = 0.81 C_l - 2.48 (r^{1/2} = 0.324)$	$C_p = 0.91 C_l - 3.13 (r^{1/2} = 0.522)$
$C_p = 0.63 E_c - 2.31 (r^{1/2} = 0.293)$	$C_p = 0.42 E_c - 2.73 (r^{1/2} = 0.424)$

Where,

$C_i$  is the concentration of IFA positive particles like a *Crypto.* oocysts or *Giardia* cysts (particle · 100 $l^{-1}$ ),

$C_c$  is the concentration of *Cryptosporidium* oocysts or *Giardia* cysts ((oo)cysts · 100 $l^{-1}$ ),

$C_p$  is the concentration of potentially intact oocysts or cysts ((oo)cysts · 100 $l^{-1}$ ),

$C_l$  is the concentration of *Cl.perfringens* spores (cfu · 100 $l^{-1}$ )

$E_c$  is the concentration of *E.coli* (MPN · 100 $l^{-1}$ )

**Table 8 Results of multiple regression analysis**

Criterion variable	No. of explanatory variable	$r^{1/2}$	(Partial) regression coefficient for					b	P<0.01
			<i>Cl.perfringens</i> spores ( $a_1$ )	Aerobic spore ( $a_2$ )	<i>E.coli</i> ( $a_3$ )	Coliforms ( $a_4$ )	Turbidity ( $a_5$ )		
IFA positive particles ( <i>Cryptosporidium</i> ) (n=75)	2	0.518	1.01	-0.43	/	/	/	0.36	+
	3	<b>0.522</b>	<b>0.81</b>	-0.44	<b>0.22</b>	/	/	<b>-0.58</b>	+
	4	0.520	0.81	-0.37	0.32	-0.20	/	-0.14	+
	5	0.508	0.83	-0.36	0.33	-0.21	-0.12	-0.27	+
Confirmed oocysts (n=65)	2	0.447	0.94	-0.33	/	/	/	-1.04	+
	3	<b>0.493</b>	<b>0.73</b>	/	<b>0.46</b>	<b>-0.54</b>	/	<b>-0.80</b>	+
	4	0.486	0.74	-0.18	0.43	-0.47	/	-0.09	+
	5	0.471	0.76	-0.17	0.44	-0.48	-0.09	-0.17	+
PI oocysts (n=58)	2	0.338	0.88	-0.34	/	/	/	-0.58	+
	3	<b>0.393</b>	<b>0.59</b>	/	<b>0.52</b>	<b>-0.52</b>	/	<b>-0.57</b>	+
	4	0.392	0.61	-0.26	0.52	-0.44	/	0.46	+
	5	0.363	0.65	-0.19	0.50	-0.46	-0.11	0.07	+
IFA positive particles ( <i>Giardia</i> ) (n=76)	2	0.713	0.61	/	<b>0.36</b>	/	/	<b>-3.42</b>	+
	3	0.707	0.61	0.07	0.36	/	/	-3.86	+
	4	0.701	0.61	0.10	0.39	-0.07	/	-3.71	+
	5	0.694	0.63	0.10	0.40	-0.07	-0.09	-3.81	+
Confirmed cysts (n=58)	2	0.642	0.69	/	<b>0.29</b>	-	/	<b>-3.93</b>	+
	3	0.635	0.70	-0.14	0.29	/	/	-3.02	+
	4	0.622	0.70	-0.13	0.29	-0.02	/	-2.98	+
	5	0.622	0.78	-0.09	0.35	-0.08	-0.35	-3.33	+
PI cysts (n=54)	2	<b>0.519</b>	<b>0.67</b>	/	<b>0.27</b>	/	/	<b>-3.55</b>	+
	3	0.515	0.68	-0.20	0.27	/	/	-2.37	+
	4	0.507	0.72	-0.19	0.32	/	-0.26	-2.76	+
	5	0.473	0.71	-0.21	0.29	0.05	-0.23	-2.84	+

$r^{1/2}$ : Proportion doubly adjusted for the degrees of freedom

b: Constant

+: Significant

/: No data

-: Rejected