

を確認してフィルターを回収し、 -80°C 保存した。虫体からの酵素抽出はフィルターの凍結融解と超音波処理で行い、これを等電点電気泳動ゲルに載せた。ゲルには pH3~10 の 8% アクリルアミドゲルを使用し、陰極溶液には 0.04M Aspartic acid、陽極溶液には 1M NaOH を用いた。電気泳動は 14°C で行い、Prefocusing を 10W で 40 分間、Focusing を 20 W で 130 分間の定電力で行った。フィルターは、Focusing 開始約 15 分後に取り除いた。泳動終了後、5% α -naphthyl propionate (基質) / 0.1 M phosphate buffer (pH5.7) および Fast Blue salt を用いて Propionyl Esterase 酵素活性によりゲルを染色した。反応時間は染色状態に応じて 40 分から 2 時間とし、酢酸-プロパノール液中にゲルを移して反応停止および脱色を行った。

C. 研究結果

寒天平板培地上で 42°C に温度耐性を持つアメーバの検出を試みた結果、197 施設 401 温水試料から 1,996 株のアメーバが検出された。培養条件を 42°C に設定し、温水環境に順応したアメーバの分離に努めたが、*Naegleria*、*Hartmannella*、*Willaertia*、*Acanthamoeba*、*Echinamoeba*、*Platyamoeba* (属名) 等、多岐にわたるアメーバが分離された。その中で 502 株が鞭毛誘発試験により *Naegleria* 属と同定された。なお、Pelandakis らの方法に従い *Naegleria* 属検出用 PCR を行ったが、対照試料および分離株のいずれからも PCR 産物を得ることが非常に困難であった (Data not shown)。

Naegleria 属と同定された 502 株について、McLaughlin らの PCR 法により *N. fowleri* の特異塩基配列の増幅を試みたところ、陽性反応を示す分離株は検出されなかった (図 2)。陽性対照試料として *N. fowleri* KUL 株を鋳型としたが、明瞭な 300bp のバンドが検出されている。

一方、502 株から無作為抽出した 154 株についてアイソザイム解析を行ったところ、51%にあたる 78 株が *N. lovaniensis* と同定された。図 3 にアイソザイム解析の例を示す。右から 3 番目のレーンは実際に分離された *N. lovaniensis* を示している。一方、興味深いことにこれまで報告のなかった 10 種のパターンが新たに検出された。これまでの報告ではアメーバの分離に栄養培地による培養工程が含まれ分離株の一部は生育しなかったことから、分離された *Naegleria* 属アメーバの種類が限られていた。今回の調査ではこの培養工程を経ることなく、直接的に寒天平板培地よりアメーバの酵素タンパク質を抽出したために、広く温水環境中に存在する *Naegleria* 属アメーバの多様性を示すことが可能になったと考えられた。

154 株より得られたアイソザイムパターンの出現頻度を図 4 に示した。未同定のパターン A~J およびその他に含まれる試料については病原性等についての一切の情報がないことから検討を急いでいる。

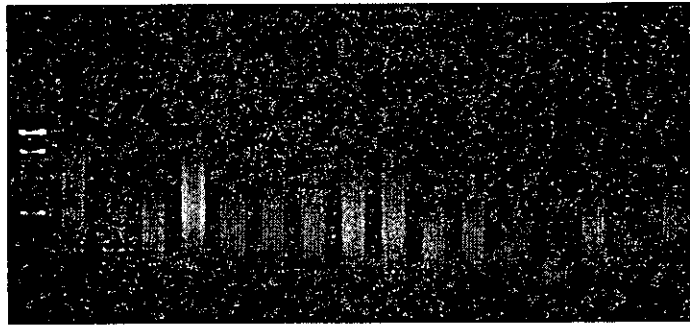


図2 *N. fowleri* 特異的 PCR の例

左より 2 レーン目および 3 レーン目に *N. fowleri* KUL 株を対照試料として用いた陽性コントロールによる 300bp のバンドがある。4 レーン目以降は実際の試料を用いた結果の一部であるが、いずれもバンドは見られなかった。どのレーンもスメアーが見られるが、寒天の混入が原因であると考えられた。1 レーン目のサイズマーカーは 100bp ラダーを使用した。

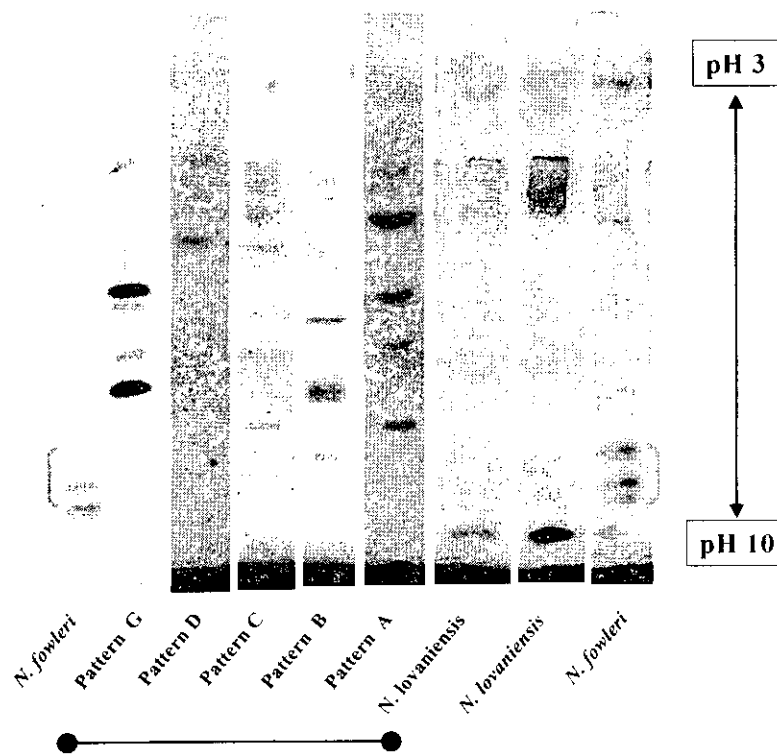


図3 アイソザイムパターン解析例

両端のレーンに *N. fowleri* の対照試料があり、カッコで示した 3 本のバンドが典型的な *N. fowleri* を示す。右から 2 番目のレーンにある *N. lovaniensis* は対照試料で、矢印で示した 1 本のバンドが典型的な *N. lovaniensis* を表す。右から 3 番目のレーンは実際の試料より検出された *N. lovaniensis* の例、Pattern A~G は実際の試料より検出された未同定の *Naegleria* 属の例を示している。

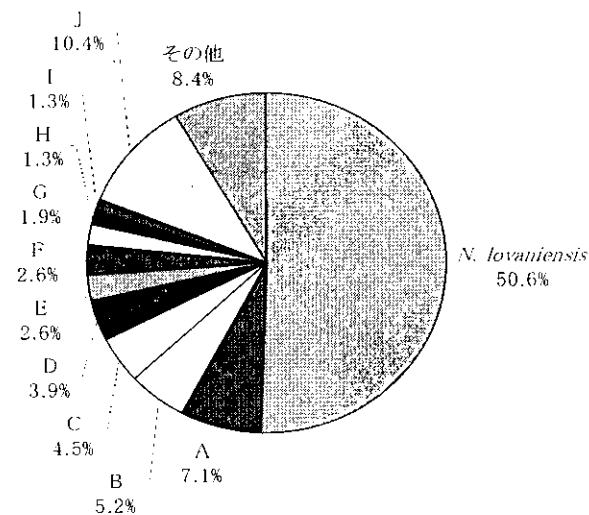


図 4 アイソザイムパターン解析により分類された分離株の割合

アイソザイムパターンに従い無作為に選択した 154 分離株をパターン別に分類した。分離株の半数は *N. lovaniensis* と同定されたが、これまでに報告されていないパターン A~J が見られた。2 株以上共通のパターンを示した場合が分類されている。その他については、パターンで分類できなかった分離株を表している。

D. 考察

温泉浴用水等温水より、病原性を有する *N. fowleri* を主目的として自由生活性アメーバの分離・同定を行った。42°C で生育可能なアメーバとして 1,996 株が分離された。形態観察によりそのうちの 502 株が *Naegleria* 属と同定された。無作為抽出により 154 株をアイソザイムパターン解析したところ、そのうちの約半数が *N. lovaniensis* と同定された。今回の調査では PCR、アイソザイムパターンのいずれからも *N. fowleri* は検出されなかった。

N. lovaniensis は *N. fowleri* と形態学的同種で、同じ環境条件において生育することから *N. fowleri* のインジケータと見なすことができる。本研究では多数の *N. lovaniensis* が同定されており、*N. fowleri* の生育可能な環境が多く存在すると考えられた。すなわち、わが国の公衆浴場、温泉施設等は、危険な状況にあるとも言える。今後の研究事業においてはこの可能性の検証に重点を置き、*N. lovaniensis* の

生息場所を精査する計画である。また、今回の調査で新たに見つかった未同定の *Naegleria* 分離株に関しては、動物への感染実験により病原性についての検討中である。

アイソザイムパターンによる同定には時間と労力を要することから、将来の全国調査の際にはより迅速な同定手法が求められることが必至である。本研究では Pelandakis らの方法に従い *Naegleria* 属検出用 PCR について検討を行ったが、良好な結果が得られなかった。今後は PCR の設計段階から見直しを行い、*Naegleria* 属の同定手法として確立したいと考えている。

E. 結論

わが国における温泉を含む温水中の病原性を有する自由生活性アメーバ類による汚染実態調査を行った。温泉浴用水を中心とした試料水よりアメーバ類の検出した結果、対象となった 307 施設のうち

197施設においてアメーバが陽性となり、アメーバの検出された施設の38.6% (76/197) から *Naegleria* 属アメーバが検出された。PCR およびアイソザイムパターン解析の結果、*N. fowleri* の検出はなかったが、多くの施設より *N. lovaniensis* が検出された。*N. lovaniensis* は *N. fowleri* と形態学的同種で、生息場所も共有するとされることから、検出された施設において *N. fowleri* の存在を精査する必要があると考えられた。また、今回の調査で新たに見つかった *Naegleria* 分離株に関しては、動物への感染実験により病原性の有無について検討する必要があると考えられた。

文献

1. Martinez AJ. Primary amoebic meningoencephalitis(PAM) or Naegleriamoebiasis. In Amphozoic amoebae human pathology. 1987. Rondanelli EG(Ed). Italy, Piccin Nuova Libraria. pp. 161-165.
2. De Jonckheere JF. Epidemiology. In Amphozoic amoebae human pathology. 1987. Rondanelli EG(Ed). Italy, Piccin Nuova Libraria. pp. 127-147.
3. 黒木俊郎、八木田健司、藪内栄子、縣邦雄、石間智生、勝部泰次、遠藤卓郎. 1998. 神奈川県下の温泉浴槽水中における *Legionella* 属菌と自由生活性アメーバ調査. 感染症学雑誌 72 : 1050-1055.
4. McLaughlin GL, Vodkin MH, Huizinga HW. 1991. Amplification of repetitive DNA for the specific detection of *Naegleria fowleri*. J Clin Microbiol 29 : 227-230.
5. Pelandakis, M., Serre S. and Pernin P. analysis of the 5.8S r RNA gene and the Internal Transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. 2000. J Eukaryot Microbiol 47 : 116-121.
6. De Jonckheere JF. 1982. Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. Ann Microbiol 133A : 319-342.
7. Polyacrylamide gels. In Isoelectric Focusing. 1982. Pharmacia Fine Chemicals. pp. 45-64.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体 *Naegleria fowleri* の疫学と病原性発現に関する研究

Naegleria fowleri 及びその近縁種 *N. lovaniensis* における蛋白組成の比較

分担研究者： 八木田健司（国立感染症研究所 寄生動物部）
遠藤 卓郎（国立感染症研究所 寄生動物部）
協力研究者： 小村 麻子（国立感染症研究所 寄生動物部）
泉山 信司（国立感染症研究所 寄生動物部）
下河原理江子（国立感染症研究所 寄生動物部）

自由生活性の小型アメーバである *Naegleria* 属アメーバは淡水環境中に広く棲息するが、*N. fowleri* など 26°C以上の温水域に生息する数種のアメーバは人や動物に対して病原性を示すことが知られている。ヒトへの感染は鼻腔粘膜に裸出する嗅神経末端から侵入して経神経的に脳へ達することが知られているが、神経系に対する親和性や組織侵入性に係る因子は不明である。本研究では *N. fowleri* を中心に環境の変化に伴う蛋白の発現、およびその調整について病原性発現との関連で解析を試みる。具体的には、非病原種でありながら *N. fowleri* と生態学的、形態学的に同種とされる *N. lovaniensis* との蛋白を比較することで *N. fowleri* の病原性に関与する蛋白の発現機構を探ろうとするものである。本年度は二次元電気泳動により *N. fowleri* と *N. lovaniensis* における蛋白の相同性を比較した。他の報告に見る一次元電気泳動 (PAGE) の解析結果と異なり、両者間での相同性は 36~39%と低いものであった。この結果の検証として、同種内での株間の差異について確認したところ *N. fowleri* KUL 株と Nf66 株との間の相同率は 71.9%と計算された。ちなみに、同一種内で共通するタンパク画分は *N. fowleri* で 228 個、*N. lovaniensis* で 246 個確認された。これらの内、88 個が *N. fowleri*、*N. lovaniensis* 両種間の共通タンパク画分として検出され、種固有のタンパク画分として、*N. fowleri* では 140 個、*N. lovaniensis* では 158 を確認した。上記で得られた 2 種間共通あるいは種固有の主要なタンパク画分について、アミノ酸配列解析を開始し、現在までに *N. fowleri* Nf66 株の 2 個のタンパク画分についてアミノ酸配列を決定した。また、N 末端ブロックが疑われる 1 個については目的タンパクのゲル内消化、ペプチドの HPLC 分画を経てアミノ酸配列解析を行う予定である。*Naegleria* 属については、タンパク情報の網羅的、基礎的なデータが乏しく、今後もさらにタンパク画分の解析を進め、データの蓄積を進める予定である。

A. 研究の目的

自由生活性の小型アメーバである *Naegleria* 属アメーバは淡水環境中に広

く棲息するが、*N. fowleri* など数種のアメーバは 26°C以上の温水環境に好んで棲息する。本原虫の生活環にはアメーバ型、

鞭毛期遊泳型と嚢子の 3 つのステージが知られている。本属のアメーバの中にあつて *N. fowleri* は強い病原性を示す。ヒトへの感染は鼻腔粘膜に裸出する嗅神経末端から侵入して経神経的に脳へ達することが知られている。神経系に対する親和性や組織侵入性に係る因子の発現機構は不明である。また、病原性発現と生活上の発育ステージとの関係も明らかとなっていない。本研究ではこれらの各ステージにおける蛋白の発現、およびその調整について病原性発現との関連で解析を試みるもので、具体的には *N. fowleri* と生態学的にも形態学的にも分類が不可能と

され、わずかに数種のアインザイムの違いが認められているに過ぎない非病原種の *N. lovaniensis* との蛋白発現を比較することで *N. fowleri* の病原性発現に係る蛋白発現調整の糸口を探ろうとするものである。本年度はこの両者のタンパクレベルでの相同性について、網羅的に把握し、両者に特徴的、あるいは共通するタンパク画分をスクリーニングすることを目的として、*N. fowleri* および *N. lovaniensis* の種特異的な二次元電気泳動のタンパク画分パターンを作成し、両者の比較を行った。

B. 研究方法

アメーバ *N. fowleri* (NF66、Kurume、KUL の 3 株)、*N. lovaniensis* (TS、Aq/9/1/45D の 2 株) を用意し、試験内での無菌培養条件の設定を行った。いずれ

のアメーバも SCGYEM 培地によく馴染み、十分な細胞数を維持することが可能となった。

[SCGYEM 培地]

Casein Base	800 .0 ml	
GY solution	1000 .0 ml	
Fetal Calf Serum (FCS)	1000 .0 ml	(56°C、30 分間非働化)

[Casein Base]

Casein (Merck No.218682)	10 .0 g
500mM Na ₂ HPO ₄	20 .0 ml
500mM K ₂ HPO ₄	10 .0 ml
Distilled water	800 .0 ml

溶解後、121°C で 15 分間オートクレーブ。

[Glucose Yeast solution]

Glucose	2 .5 g
Yeast extract	5 .0 g
Distilled water	100 .0 ml

溶解後にフィルターでろ過滅菌。

上述の培養液を用い、4 日目毎に 1 : 50 倍希釈して継代培養して得られるアメー

バの蛋白量に関する基礎データは以下の通りであった。

種 名	株 名	蛋白量 (mg/10 ⁷ cells)
<i>N. fowleri</i>	Nf66 株	1.15
<i>N. lovaniensis</i>	Aq9/1/45D 株	1.43

アメーバ培養フラスコを 10 分間氷冷してアメーバを管壁から脱落させ、遠心回収した。次いで、十分量の冷 PBS により 3 回遠心洗浄、PBS に再浮遊後、1/10 量の TCA (1g/ml) による蛋白の回収を行った。得られた沈渣を精製水で 1 回遠心洗浄した後に、サンプル buffer (Urea、TritonX-100、DTT、Pharmalyte 等) に溶解 (1mg protein/ml) した。

二次元電気泳動条件、タンパク画分検出方法及びアベレージゲル作成条件

N. fowleri および *N. lovaniensis* 両者の全タンパクにおける相同性を網羅的に比較するための蛋白抽出から泳動条件までの各工程の条件設定を行った。得られた条件を用いて、以下のアメーバ種につき二次元電気泳動を行った。また、染色法による検出タンパク画分数の変動について確認した。

供 試 検 体 : *N. fowleri* Nf66 株
KUL 株
N. lovaniensis Aq/9/1/45D 株

電気泳動条件 : タンパク量 50 μ g
1 次元目: Amersham pharmacia 社 IPG phor pH3-10、18cm イモビリンストリップ、35,000Vhr
二次元目: バイオクラフト社製縦型泳動装置 24 \times 20 \times 0.1cm
12.5%ポリアクリルアミドゲル 25mA、16hr

C. 結果および考察

各アメーバのうち *N. fowleri* Nf66 株及び、*N. lovaniensis* Aq/9/1/45D 株についてより多くのタンパク画分を得るため、銀染色でタンパク画分検出を行った。ゲル間のタンパク画分のばらつきを平均化するため、各アメーバで 5 枚のゲルを作成し、Image Master 2D Elite ver.3.0

(Amersham pharmacia 社)を用いてタンパク画分解析を行った。

銀染色時の *N. fowleri* Nf66 株の泳動像で確認したタンパク画分数は平均で 623 個、*N. lovaniensis* Aq/9/1/45D 株では 652 個であった。それぞれにつき Max Absence = 1 (5 枚のゲルのうち 4 枚以上に出現す

るタンパク画分を採用)の条件で平均化したところ、それぞれのアベレージゲルにおいて、*N. fowleri* Nf66 株で 440 個、*N. lovaniensis* Aq/9/1/45D 株では 431 個のタンパク画分を得た。これを用いて両者の比較を行った結果、相同率は 35.5%と予想に反し低い値となった。

この結果の検証として、同種内での株間の差異について確認することが必要と考えられたので、*N. fowleri* KUL 株について *N. fowleri* Nf66 株と比較を行った。KUL 株の平均タンパク画分数は 430 個で、Nf66

株との相同率は 71.9%で、同一種内における株間の差異を確認した。

また、染色法によるタンパク画分数の変動について確認するため、Coomassie Brilliant Blue 染色(以下 CBB 染色)時における各アメーバの二次元電気泳動を行った。その結果を以下に示した。

CBB 染色ではタンパク画分数は若干減少したものの、銀染色時におけるタンパク画分ごとの性質による染色むらや、色抜けが起こらず、染色状況としては均一で再現性も銀染色より良好であった。

各染色時におけるタンパク画分数	銀染色	CBB 染色
<i>N. fowleri</i>	Nf66 株	623
	KUL 株	630
<i>N. lovaniensis</i>	Aq/9/1/45 株	652
		470

種特異的なアベレージゲルの作成及び種特異的タンパク画分のスクリーニング

N. fowleri KUL 株で同種内に差異が存在することを確認したため、種内で共通するタンパク画分を正確に選出するためには、なるべく多くの株のタンパク画分情報を含んだアベレージゲルの作成が必

要と考え、以下の株で二次元電気泳動を行った。種内の各株を 1 つのゲルグループとしてアベレージゲルを作成し、両者の比較を行った。また、種特異的タンパク画分を選出した後のタンパク画分解析に有利であるため、泳動するタンパク量を 100 μ g として、CBB 染色を採用した。

供試検体：	<i>N. fowleri</i>	Nf66
		LEE
		Kurume
		KUL
		76/14/S3
	<i>N. lovaniensis</i>	Aq/9/1/45D
		TS

二次元電気泳動の結果を以下に示す。

	株	タンパク画分類	る相同率 (%)	
<i>N. fowleri</i> の ゲルグループ	<i>N. fowleri</i>	Nf66	552	-
		KUL	497	70.8
		LEE	533	67.4
		Kurume	541	73.2
		76/14/S3	481	77.3
<i>N. lovaniensis</i> の ゲルグループ	<i>N. lovaniensis</i>	Aq/9/1/45D	470	37.8
		TS	314	41.3

各種ごとに Max absence = 0(種内のすべての株に出現するタンパク画分のみ真のタンパク画分とする) の条件でアベレージゲルを作成し、両者を比較した結果、相同率は38.6%で*N. fowleri* Nf66株と *N. lovaniensis* Aq/9/1/45D 株間での銀染色時における相同率 35.5%とほぼ一致した値を示した。

タンパク画分解析

上記で得られた 2 種間共通あるいは非共通の主要なタンパク画分について、アミノ酸配列解析を開始した。二次元電気

また、各種内において株間で共通するタンパク画分は *N. fowleri* で 228 個、*N. lovaniensis* で 246 個であった。これらの内、88 個が *N. fowleri*、*N. lovaniensis* 両種間の共通タンパク画分として検出され、共通しないタンパク画分として、*N. fowleri* では 140 個、*N. lovaniensis* では 158 を確認した(図 1)。

泳動後のゲルを PVDF 膜 (ProBlott (Applied Biosystems 社製)) に以下の条件でブロッティングした。

ブロッティングバッファー組成

48mM Tris, pH9.2, 39 mM Glycine, 20% Methanol, 0.1% SDS

ブロッティング条件

タンク式ブロッティング装置(Mini Trans-Blot ,BioRad 社)

80 V , 350 mA , 2 時間

メンブレンを CBB 染色し、目的のタンパク画分を切出し、気相シーケンサー (Procise cLC494 (Applied Biosystems 社製)) のエドマン反応槽に直接挿入してアミノ

酸配列解析を行った。

その結果、現在までに *N. fowleri* Nf66 株の主要な 5 個のタンパク画分について解析を行ったが、そのうちの 2 個は二次

元電気泳同時の分離不十分、1個はN末端ブロックが疑われ、残りの2個についてアミノ酸配列が得られた(図2)。

N末端ブロックが疑われるタンパク画分については、今後新たに電気泳動し、目的タンパクのゲル内消化を行って、ペプチドをHPLCで分別した後、アミノ酸配列解析を行う予定である。また、分離

D. 結論

自由生活性の小型アメーバである *Naegleria* 属アメーバは淡水環境中に広く棲息するが、*N. fowleri* など 26°C以上の温水域に生息する数種のアメーバは人や動物に対して病原性を示すことが知られている。ヒトへの感染は鼻腔粘膜に裸出する嗅神経末端から侵入して経神経的に脳へ達することが知られているが、神経系に対する親和性や組織侵入性に係る因子は不明である。本研究では *N. fowleri* を中心に環境の変化に伴う蛋白の発現、およびその調整について病原性発現との関連で解析を試みる。具体的には、非病原種でありながら *N. fowleri* と生態学的、形態学的に同種とされる *N. lovaniensis* との蛋白を比較することで *N. fowleri* の病原性に関与する蛋白の発現機構を探ろうとするものである。本年度は二次元電気泳動により *N. fowleri* と *N. lovaniensis* における蛋白の相同性を比較した。他の報告に見る一次元電気泳動 (PAGE) の解析結果と異なり、両者間での相同性は 36~39%と低いものであった。この結果の検証として、同種内での株間の差異について確認したところ *N. fowleri* KUL 株と Nf66 株との間の相同率は 71.9%と計算された。ちな

不十分なタンパク画分については 1次元目の pH 勾配を狭くして、二次元電気泳動を行う予定である。

Naegleria 属については、タンパク情報の網羅的、基礎的なデータが乏しく、今後さらにタンパク画分の解析を進め、データの蓄積を進める予定である。

みに、同一種内で共通するタンパク画分は *N. fowleri* で 228 個、*N. lovaniensis* で 246 個確認された。これらの内、88 個が *N. fowleri*、*N. lovaniensis* 両種間の共通タンパク画分として検出され、種固有のタンパク画分として、*N. fowleri* では 140 個、*N. lovaniensis* では 158 を確認した。上記で得られた 2 種間共通あるいは種固有の主要なタンパク画分について、アミノ酸配列解析を開始し、現在までに *N. fowleri* Nf66 株の 2 個のタンパク画分についてアミノ酸配列を決定した。また、N末端ブロックが疑われる 1 個については目的タンパクのゲル内消化、ペプチドの HPLC 分画を経てアミノ酸配列解析を行う予定である。*Naegleria* 属については、タンパク情報の網羅的、基礎的なデータが乏しく、今後さらにタンパク画分の解析を進め、データの蓄積を進める予定である。

E. 学会発表

口頭発表

1. 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎 (2002) *Naegleria fowleri* と *Naegleria lovaniensis* のタンパク質の 2D-PAGE による比較 第 71 回日本寄生虫学会大会 (神奈川県 伊勢

原市、3月29-30日)

2. 小村麻子、八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎 (2001) *Naegleria fowleri* と *Naegleria lovaniensis* のタンパク質の 2D-PAGE による比較 日本原生動物学会 第34回大会 (兵庫県神戸市、11月16-18日)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
遠藤 卓郎 他	リスク評価に関する基本的な考え方	金子 光美 監訳	水と微生物 リスクとその評価	技報堂出版	東京	2001	87- 108

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Szenasi Z. 他 4 名	Epidemiology and laboratory diagnostics of legionellae.	Orv Hetil	142	1035- 1043	2001
Isumiyama S. 他 6 名	Prevalence of <i>Cryptosporidium parvum</i> infections in weaned piglets and fattening porkers in kanagawa prefecture, Japan.	Jpn.J.Infect.Dis.	54	23-26	2001
Ono K. 他 8 名	Contamination of river water by <i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts in western Japan.	Appl.Env.Microbiol.	67	3832- 3836	2001
Yagita K. 他 9 名	Molecular characterization of <i>Cryptosporidium</i> isolates obtained from human and bovine infections in Japan.	Parasitol. Res.	87	950-955	2001
Jongwutiwes S. 他 4 名	Heterogeneity in cyst morphology within isolates of <i>Acanthamoeba</i> from keratitis patients in Thailand.	Trop.Med.Int. Health	5(5)	335-340	2000
Yagita K. 他 2 名	Clustering of <i>Acanthamoeba</i> isolates from human eye infections by means of mitochondrial DNA digestion patterns.	Parasitol. Res.	85	284-289	1999
Sugita Y. 他 7 名	Primary amebic meningoencephalitis due to <i>Naegleria fowleri</i> : an autopsy case in Japan.	Pathol. Int.	49	468-470	1999
遠藤 卓郎 八木田健司	近年のレジオネラ問題	東京都予防医学協会年報	30	218-221	2001
山本 正治 他 5 名	特異抗体による切除角膜内アカンソアメーバシストの同定 -The <i>Acanthamoeba</i> cysts were identified in the cornea using specific antibody-	眼科	43(7)	939-943	2001
黒木 俊郎 他 6 名	<i>Naegleria fowleri</i> 臨床分離株のマウスへの感染実験	感染症学会誌	72(10)	1064- 1069	1998
高橋 武秀 他 3 名	「24 時間風呂」の衛生問題と行政の対応 Sanitary Problems of 24 ^h -Bath and Administrative Countermeasures for Them.	環境感染	13(2)	129-136	1998
林 森太郎 他 4 名	アメーバ性肉芽腫性脳炎の 1 剖検例	Neuropathology	17 (suppl)	203	1997