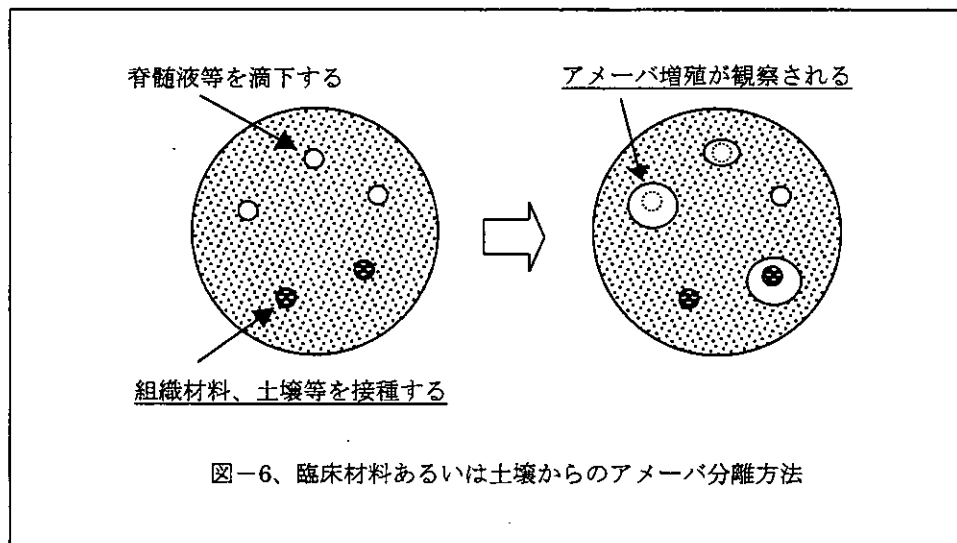


4-8、臨床材料、その他の試料の扱い

本マニュアルは環境中の水試料からのアメーバ分離を目的に考案されているが、水試料以外の材料からも大腸菌を塗布した分離用培地を用いた方法でアメーバ分離が可能である。ここでは簡略に水試料以外の臨床材料および土壌からの分離の要点について説明する。

- 1) 臨床材料に関しては、ネグレリア等による中枢神経感染とアカンソアメーバによるアメーバ性角膜炎に関連した材料が検査対象となる。病原体の存在が想定される脊髄液(リコール)、脳、体部組織等、またアメーバ性角膜炎の場合には角膜擦過物(通常生理食塩水中に浮遊)あるいはコンタクトレンズとその保存液を適切な方法で採取する。
- 2) 材料の質に応じた前処理を行う。脊髄液、角膜擦過物浮遊液およびコンタクトレンズ保存液等の液体試料は入っている容器(試験管)を冷水で5分間ほど冷やし、管内壁に接着しているアメーバを剥離させる。軽くボルテックス等で混和した後、遠心操作(1,000xg、5分間、4℃)を行う。上清は保管する。脳組織等はメス、ハサミを用いて細切し、ほぼペースト状にする。大腸菌塗布寒天培地上を準備し、脊髄液等の沈渣はプレートあたり5ヶ所ほど滴下し、ほぼ水分がなくなるまで乾燥させる。ペースト状にした組織材料は、およそ小指つめの1/2の広さを目安に、ピペットあるいはピンセット等を用いて培地上にスポット的に接種する。いずれの場合も、スポット状に接種することが重要で、アメーバはスポット部分以外の菌の塗布された部分に出てきて増殖することで、その存在が確認されるようになる(図-6)。



- 3) 土壌の場合は、土壌そのものを、上記の組織材料を接種する時と同様にピンセットあるいは小さじ等を用いて培地上に接種する。アメーバが菌塗布面に到達しやすいように接種後、蒸留水を1滴土壌に落として水分を与える。
- 4) 培養は42℃、もしくは37℃で行う。
- 5) アメーバの増殖の確認、単離の方法については、「4-6. 試料からのアメーバの分離と定量およびアメーバの単離(クローニング)」を参照する。

資料 精度管理を目的としたアメーバの定量的検出試験方法

1. 目的

アメーバ検査における技術的な精度の確認、および培地製品の品質と検査への適合性を調べることを目的とする。

2. 必要な器材等

25cm²組織培養用フラスコ、遠心管(15mlおよび50ml容量)、メスピペット、ビーカー、血球算定版、ビニールバッグ、恒温器(42℃設定可能な機種)、pHメーター、倒立または微分干渉顕微鏡、遠心器

3. 必要な試薬等

アメーバ分離用大腸菌塗布寒天培地、カジトン(Bacto-Casiton/DIFCO など)、葉酸、ビオチン、グルコース、水酸化ナトリウム、ウシ胎児血清(FCS)、PBS、滅菌蒸留水

3. アメーバ標準株

Naegleria lovaniensis (国内分離株;xxxx)、GVSC 無菌培地により培養。

4. アメーバ標準株の無菌培養

4-1. 培地の調整

カジトン(Bacto Casitone)	20g
グルコース	1g
葉酸溶液 注1)	0.2ml
ビオチン溶液 注2)	0.2ml
蒸留水	950ml

注1) 葉酸は 200mg を 100ml の蒸留水に加え、0.01N NaOH を滴下しながら溶解させる。4℃で保存する。

注2) ビオチンは 10mg を 100ml の蒸留水に溶解し、4℃で保存する。

すべての試薬、溶液を室温で溶解し、pH7.0 に調整する。オートクレーブで 5 分間滅菌し、その後は 4℃で保存する。使用に際して 56℃で 30 分間処理した非働化 FCS を 10%に添加する。

4-2. 標準株の培養と保存

- 1) 25cm²組織培養用フラスコに 5ml の GVSC 培地を入れ、30℃にて標準株を培養する。シスト形成がなく底面の 80%程度になるまで培養を続ける。
- 2) フラスコ内の培地を新鮮な培地と交換する。その際、浮遊したアメーバ、死んだアメーバ等を培地とともに除去する。
- 3) 新鮮な培地中のアメーバをフラスコごと氷上に 10 分間おく。
- 4) フラスコ底面を手で叩くようにしてアメーバを剥離する。剥離の程度は倒立顕微鏡で確認する。
- 5) 氷中に立てた 15ml の遠心管にアメーバ浮遊液を移し、4℃で 1,000xg、5 分間遠心する。
- 6) 培地(上清)を 1ml 残り除去した後、ゆっくりとピペットでアメーバを再浮遊する。
- 7) 血球算定盤を用いてアメーバ濃度を算出する。
- 8) 4℃で 1,000xg、5 分間遠心し、上清を除去した後、冷した PBS を加え 10,000 アメーバ/ml に濃度を調整する。

- 9) さらに、冷した PBS で希釈し、1000 アメーバ/ml の浮遊液を調整後、これより 2 倍希釈系列のアメーバ浮遊液を調整する。
- 10) 大腸菌塗布寒天培地に各濃度のアメーバ浮遊液を接種し、42℃で培養を行う。各試験濃度につき 2 枚の培地を使用する。
- 11) 培養 2 日まで、出現した集落の数を測定する。接種数を母数として出現率を算出する。
- 12) 出現率が 50-80%以上であることを確認する。
- 13) 標準株を保存する場合は 10%DESO を含む GVSC 中に浮遊し、液体窒素中で保存する。

2、温水環境より検出される代表的なアメーバと形態学的同定の要点

温水環境からはバイオフィルムを定着の場とする多様な自由生活性アメーバ類が分離される。H13 年度の調査ではアメーバ全般を検査対象として調べ、少なくとも 8 属のアメーバ類を検出している。ここでは、これまでの実態調査の結果を踏まえて、研究課題の主要アメーバである *Naegleria* に加えて、検出率の比較的高い *Acanthamoeba*、*Hartmannella*、*Platyamoeba*、*Vannella* および *Vexillifera* について、同定に有用なそれらの形態学的特徴と観察時に注意すべきポイントをまとめた。

全体的なポイント

- 1) アメーバ類は、たとえ遺伝的に均一なクローン集団を観察したとしても、形として同一に見えるものはないことから、実際の試料観察時には、多数のアメーバ(個体)を観察し、それらの共通的な特徴を見つけ出すこと。
- 2) アメーバの栄養体はスライドグラスに接着する前の浮遊時、また接着後の運動時、それぞれ特徴的な形態を示すことがある。一般的には接着後、活発に運動を開始した後の栄養体の形態を詳細に調べる。
- 3) アメーバによっては、シストを形成するもの、しないものがある。シスト化は同定上有用な形質となる。形態学的には、できるだけシストと栄養体の両方を調べる。シストの形態だけでは分類が難しいことがある。
- 4) 顕微鏡の型式によっては観察像に違いが生ずる。しぼり、コントラスト等を微調整しながら、運動時の形態、細胞周囲の構造を明確に捉えるようにする。透過型顕微鏡で観察する場合は、しぼりを強くし、およそのフォーカスをあわせたところで僅かに上下させるとコントラストが高くなる。

1、*Acanthamoeba* sp.

1) 形態的特徴:

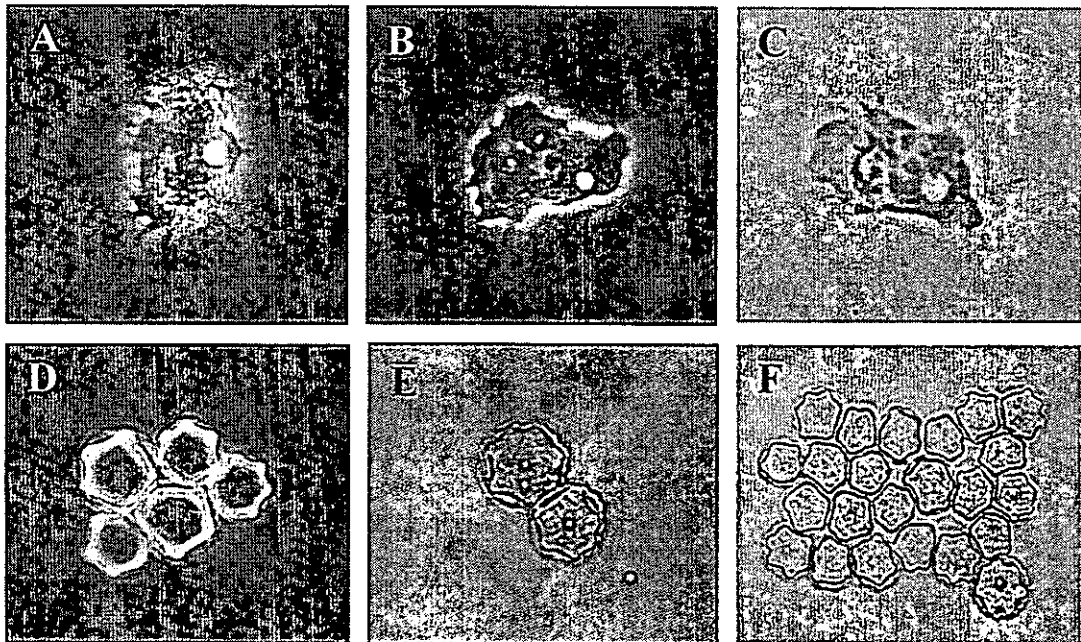
栄養体は大きさ 20~60 μm 、扁平で卵形~三角型、伸長時間も細長くなることはない。運動進行方向に仮足(擬足)を伸ばし、さらにその周囲に棘状または針状の突起(アカンソポディア)を伸ばす(写真 A-C)。シストは 10~15 μm 、2 重壁構造を有し、内外のシスト壁は共に明確に観察される(写真 D-F)。ほぼ円型から星型まで形態は多様である。

2) 観察のポイント:

Acanthamoeba の最大の特徴は、棘、針状の突起(アカンソポディア)である。ガラス面に接着するまでの浮遊時は、アメーバ全体が栗のイガのように見える。接着まで 1 時間ほどかかる場合もある。運動中にこのアカンソポディアが観察され、さらに 2 重壁構造のシストが観察されれば、形態学的に *Acanthamoeba* と同定する。

3) 紛らわしいアメーバ:

後述の *Vexillifera* はアカンソポディアに似た突起を有し、特に大型の種類の場合は *Acanthamoeba* と良く似る。*Vexillifera* はシストを形成しないので、紛らわしい場合はシストを確認すること。



Acanthamoeba 栄養体 (A-C) ならびにシスト (D-F) ;
A,B,D—位相差型顕微鏡像、C,E,F—透過型顕微鏡像
(倍率 $\times 400$ 倍、セキスイ検鏡プレートを使用)

2、*Hartmannella* sp.

1) 形態的特徴

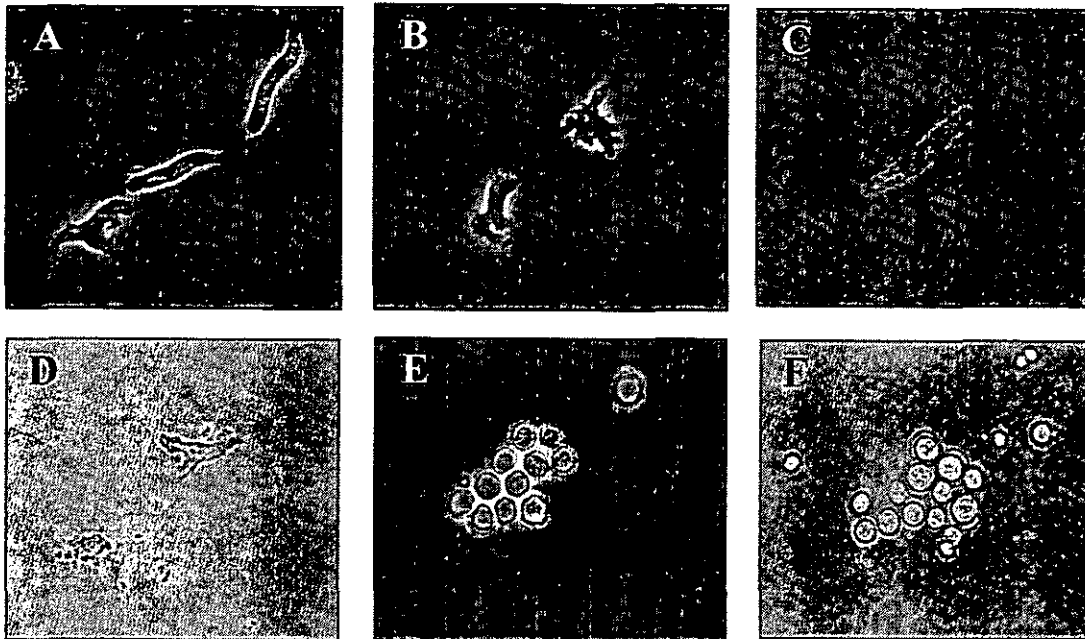
栄養体は大きさ 10~70 μm 、円筒型で、運動中の伸長時は極めて細長くなる(写真 A、C)。非運動時は多足的になる場合がある(写真 B、D)。浮遊時も短い仮足を多数伸ばした状態を示すことが多い。シストは 5~7 μm 、円型~類円型で 2 重壁構造を有する(写真 E、F)。

2) 観察のポイント

比較的ガラス面への接着が早く、直ちに伸展、運動を開始することが多い。運動途中で、体側より突出的に仮足が伸び Y 字型のようになることがあるが、直ちに1本の形態に戻って運動する。運動性は高い。一般的に体長が体幅の 5~6 倍なので、細長くまっすぐに運動しているアメーバであれば、*Hartmannella* と同定する。

3) 紛らわしいアメーバ

Naegleria は形態が *Hartmannella* と似ている。*Hartmannella* は運動が直進的で、*Naegleria* のような仮足の連続的膨出、探索的な運動は示さない点で異なる。



Hartmannella 栄養体 (A-D) ならびにシスト (E、F) ; A,B,E—位相差型顕微鏡像、C,D,F—透過型顕微鏡像
(倍率x400倍、セキスイ検鏡プレートを使用)

3、*Naegleria* sp.

1) 形態学的特徴

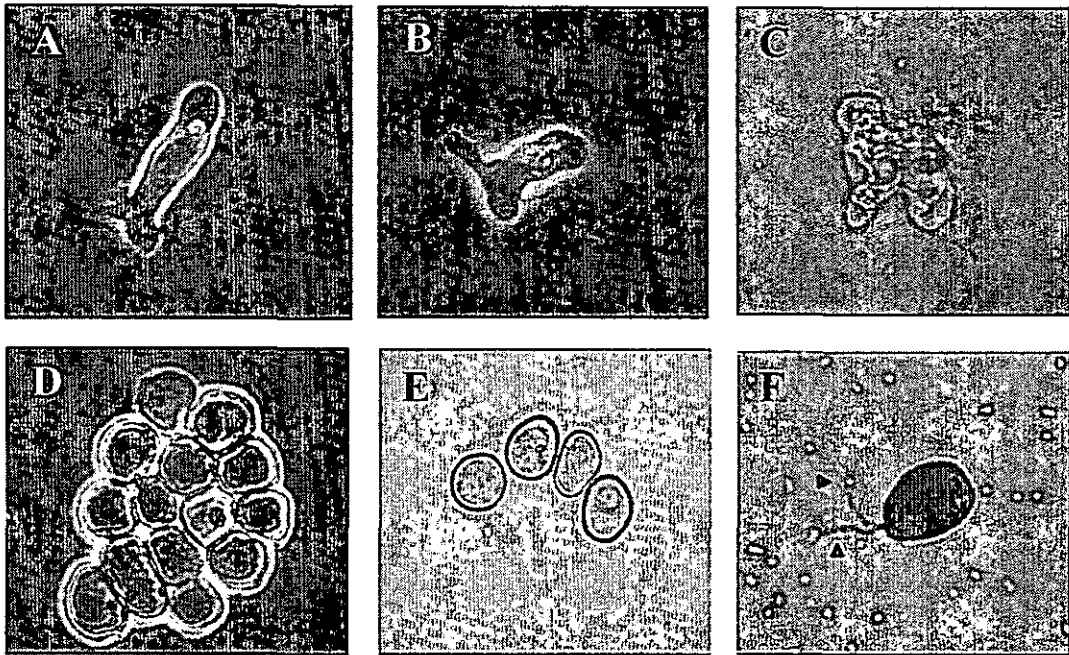
栄養体は大きさ 10~40 μm 、円筒型ではあるが仮足を連続的に突出させ、急速に体型を変化させながら運動する(写真 A-C)。シストは 10~15 μm 、2 重壁構造で、一般に円型であるが、密集してシスト形成が起こると半円形、多角型が生ずることもある(写真 D、E)。*Naegleria* には鞭毛期があり、等長の 2 鞭毛を遊出させ回転しながら水中を遊泳する(写真 F)。

2) 観察のポイント

Naegleria は接着性が高く、直ちに運動を開始する。仮足の形成は一定方向に定まらず、運動中でも突然後端部より突出するなど、探索的に見える活発な運動性を示す。鞭毛期は寒天培地上では観察されない。鞭毛期を観察するには、顕微鏡観察用に作製した標本を 2~3 時間室温におく。鞭毛形成率は株によって大きく異なる。水中を 3 次的に遊泳するのでフォーカスを上下させながら、低拡大(100~200 接眼倍)で観察する。通常、鞭毛は動きが極めて早いので肉眼的には確認しにくい。鞭毛観察はヨード染色等で固定した標本で行う(写真 F はヨード固定標本)。栄養体の運動の特徴と、遊泳する鞭毛期が観察できれば *Naegleria* と同定する。

3) 紛らわしいアメーバ

Vahlkampfia は *Naegleria* とほぼ形態が同じで、鞭毛期がないという点で *Naegleria* と区別されるものである。両者を明確かつ簡便に区別するには、分子生物学的同定を用いる。



Naegleria 栄養体 (A-C)、シスト (D、E) ならびに鞭毛期 (F) ;
A,B,D—位相差型顕微鏡像、C,E,F—透過型顕微鏡像 (倍率 \times
400 倍、セキスイ検鏡プレートを使用)

4、*Platyamoeba* sp.

1) 形態学的特徴

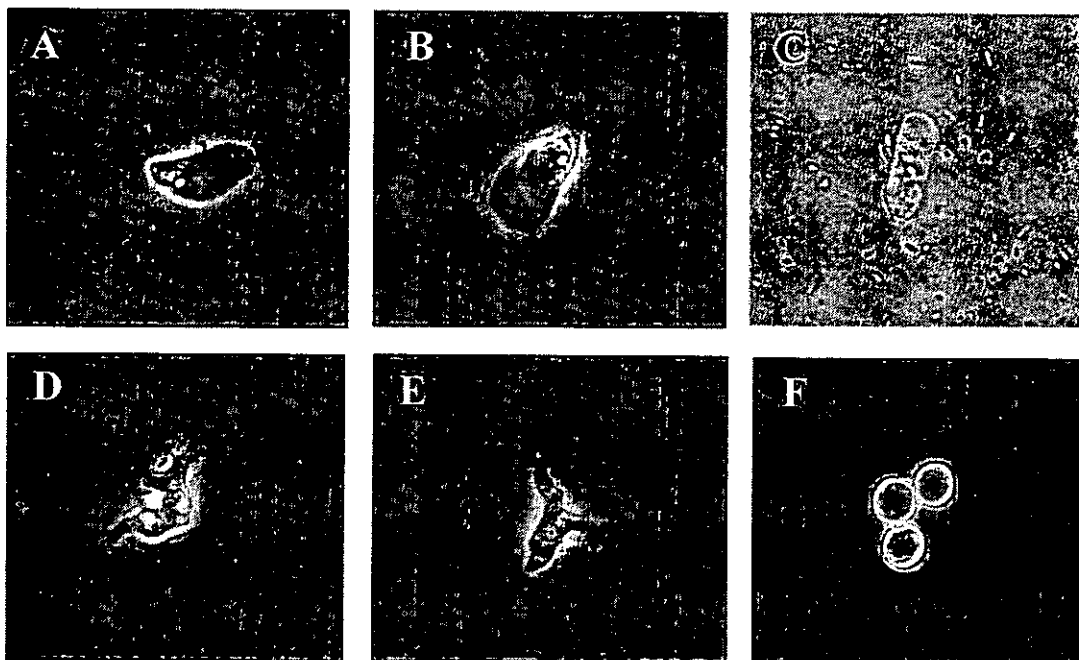
栄養体は大きさ 10~40 μm 、扁平で円型、楕円型、扇型。仮足部分が大きく体長の 1/2 程度になることが多い(写真 A-C)。浮遊時には仮足を多数伸ばし多足的な形態を示す(写真 D、E)。シストは 7~10 μm 、2重壁構造で *Hartmannella* のシストに似るが、より球型に近い。内外シスト壁の間がとても狭い(写真 F)。

2) 観察のポイント

ガラス面に接着しにくく、浮遊時の形態が長く続く場合が多い。運動性は低いが、運動を始めると仮足部分が大きく伸び、靴べらのような形で目立つ。小型で扁平なので、コントラストを強めて観察すると仮足部が強調される。

3) 紛らわしいアメーバ

後述の *Vannella* の小型タイプに似る。*Vannella* よりも *Platyamoeba* の方が一般的に言って細長い。シスト形成の有無を確認する。浮遊から接着直後あたりの形態は *Hartmannella* に似ており、区別しにくい。*Hartmannella* はガラス面への接着性が良いこと、細長い形態を示すことなどで区別する。



Platyamoeba 栄養体 (A,B,C)、浮遊型 (D,E) およびシスト (F) ; A,B,D-F 一位相差型顕微鏡像、C-透過型顕微鏡像 (倍率x400倍、セキスイ検鏡プレートを使用)

5、*Vannella* sp.

1) 形態学的特徴

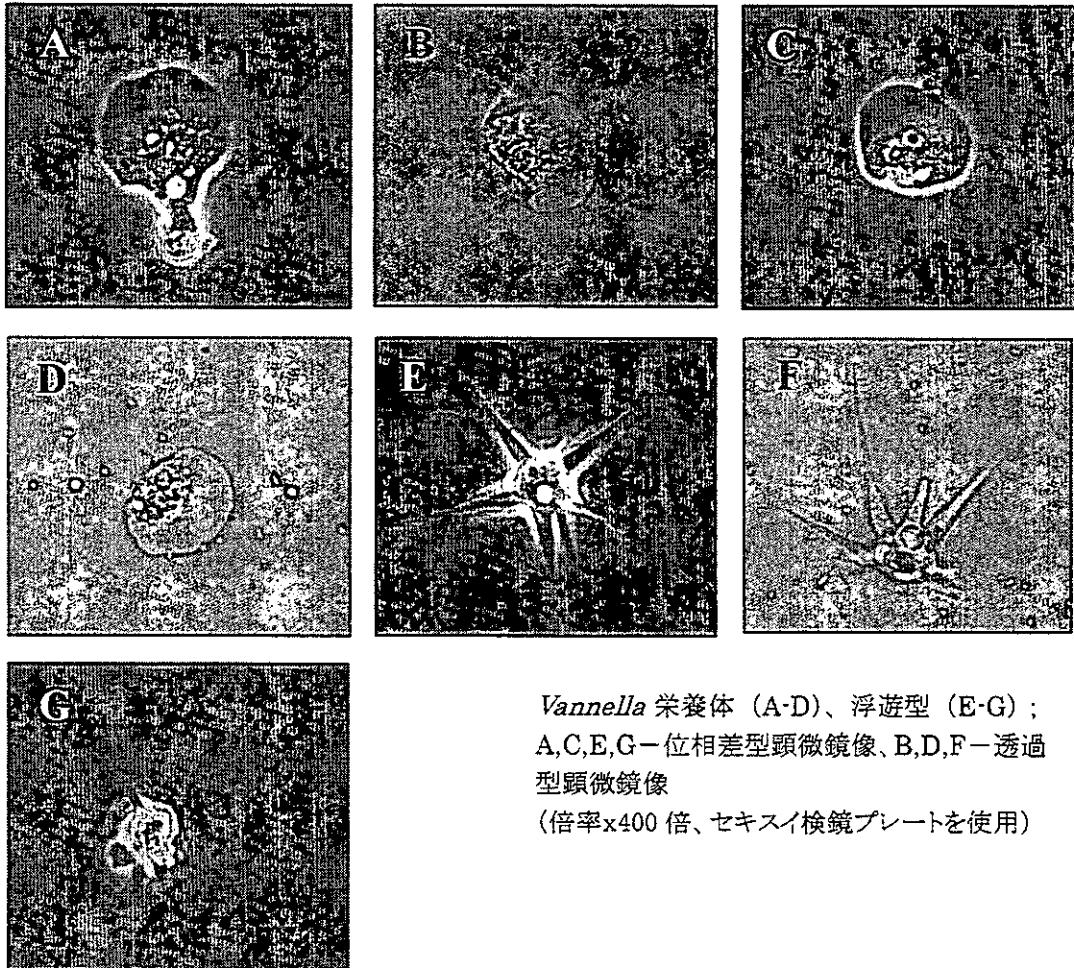
大きさ10~80 μm 、扁平、扇型が典型である。仮足部分は体長の1/2程度を占め、前進方向に幅広く伸びる(写真 A-D)。浮遊時には特徴的な形態を示す。中央の細胞より放射状に、多数の、細胞の数倍も長い仮足を伸ばす(写真 E-G)。この細長い仮足は活発に運動し、ガラス面への接着が始まると次第に体部に吸収され消失する。シストは形成しない。

2) 観察のポイント

扁平な団扇のような栄養体と細長い仮足を伸ばす浮遊型は、同一のアメーバとは思えない差がある。通常は浮遊型の方が先に観察されるので、放射状の仮足が観察されれば *Vannella* と同定する。ただし、小型の *Vannella* は浮遊型の仮足が短いものもある(写真 G)。小型のものは比較的ガラス面への接着が良いので、運動中の形態を良く観察する。接着後の *Vannella* の運動性は良く、また運動中でも特徴的な形が良く保たれている。

3) 紛らわしいアメーバ

接着して運動している栄養体は、*Platyamoeba* と良く似るので、浮遊時の形態で両者を区別する。また、*Vannella* はシストを形成しないことから、シスト形成の有無を確認する。



Vannella 栄養体 (A-D)、浮遊型 (E-G) ;
A,C,E,G—位相差型顕微鏡像、B,D,F—透過
型顕微鏡像
(倍率x400倍、セキスイ検鏡プレートを使用)

6、*Vexillifera* sp.

1) 形態学的特徴

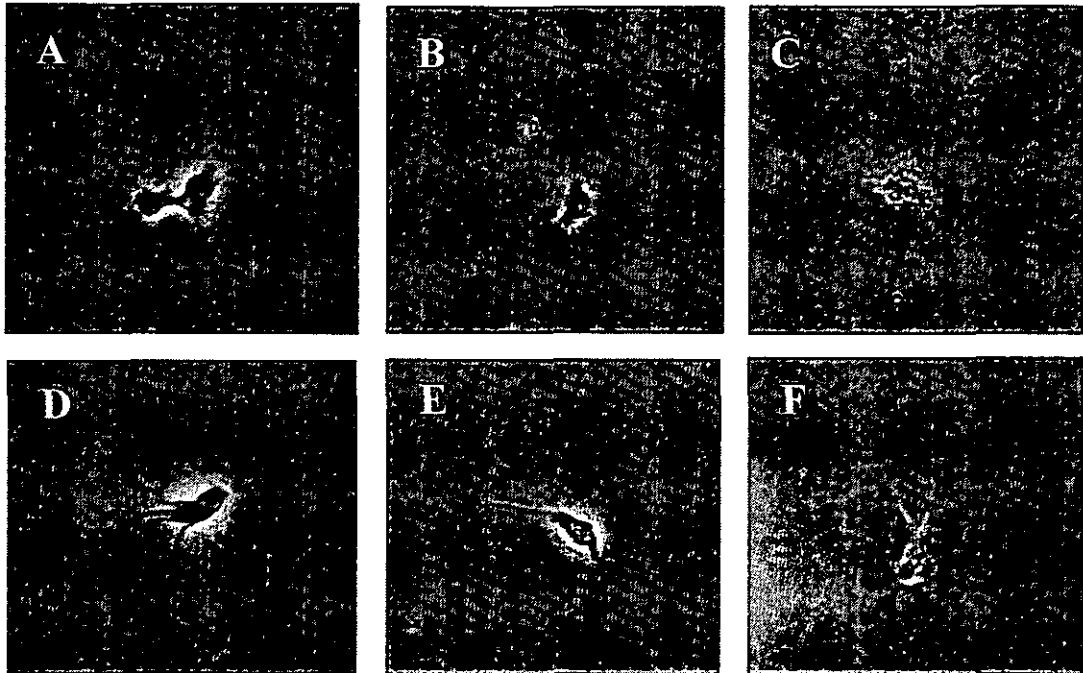
大きさ 10~40 μm 、扁平、基本的に三角型で前方に広い。仮足の前方が比較的太い先端が鈍端な棘状突起を出す(写真 A-C)。特に浮遊時にはこの棘状突起が数本にまとまり、細胞の数倍ほどの長さとなる(写真 D-F)。シストは形成しない。

2) 観察のポイント

通常、寒天プレート上では極めて小さいアメーバの集団として検出される。水に浮くと直ちに浮遊型となる。長い突起を伸縮させながら活発に動かす。一定方向に突起を揃えて伸ばすことが多い。ガラス面への接着性は株により一定していない。栄養体よりも浮遊型の特徴的な形態を良く観察する。

3) 紛らわしいアメーバ

運動している栄養体は *Acanthamoeba* と良く似るが、大きさが一般的に小さく、シスト形成を行わない点で異なる。浮遊時の形態も棘状の突起の伸ばし方が異なる。



Vexillifera 栄養体 (A-C)、浮遊型 (D-F) ; A,B,D,E—位相差型顕微鏡像、C,F—透過型顕微鏡像
(倍率x400倍、セキスイ検鏡プレートを使用)

3、ネグレリア属アメーバの PCR/RFLP による検出方法

1. 目的

病原性を有する種類を含むネグレリア属アメーバは形態学的に種間差が乏しく、また属間差についても近属の *Vahlkampfia* 属との差が少なく分類は容易ではない。これに加えて実態調査では正確・迅速かつ多量の試料を用いての同定作業が求められることから、本研究事業では PCR/RFLP 法に基づく DNA を用いたネグレリア属アメーバの分類同定が有用と考え、その方法を開発してきた。現在までに確立した方法により、国内の温水環境に *N. australiensis* 他数種類の病原性ネグレリア種と *N. lovaniensis* を始めとする多数の非病原性種が存在することが明らかとなり、その高い有用性が証明されている。ここでは検査室で利用可能な標準的な同定方法として、PCR/RFLP 同定方法の手順をまとめ、解説を行う。

2. 必要な器材

1.5ml サンプルチューブ、PCR 用チューブ (0.2 あるいは 0.5ml の専用チューブ、PCR 装置に合ったもの)、マイクロピペット、ピペットチップ (フィルター付が望ましい)、先端の鋭い柄付針等 (アガロスを切出すのに使用する)、微量高速冷却遠心機、PCR 用装置 (サーマルサイクラー、他)、加熱処理用ヒートブロック、電気泳動装置

3. 必要な試薬類

TE バッファー、TBE あるいは TAE バッファー、滅菌蒸留水、1% TritonX-100 (TE に溶解)、PCR 用 DNA ポリメラーゼ (Taq ポリメラーゼ、他) および添付試薬類 (PCR 用 X10 バッファー、dNTP、MgCl₂)、PCR 用プライマー (オーダーメイド)、制限酵素類 (専用バッファー添付)、電気泳動用 X6 バッファー、DNA サイズマーカー (低分子用)、DNA 染色液 (エチジウムブロマイド、他)

4. 材料

「1、温水試料からのネグレリア属等高温耐性アメーバ類検出法の標準化」に準じて得られたネグレリア分離株を材料とする。ネグレリア DNA の陽性試料としては *N. lovaniensis* (xxx株) から調整した試料を用いる。

5. DNA 試料の調整

- 1) アメーバが活発に増殖している集落の辺縁部 (線状に見える部分) の寒天を 5mm 角程度に切取る。
- 2) 上記寒天片を滅菌蒸留水 200 μ l を含む 1.5ml サンプルチューブ内に移す。
- 3) マイクロピペットを用いて蒸留水中で寒天表面を洗い流しながらアメーバを浮遊させる。
- 4) 10 秒間程度放置し微小な寒天片を沈殿させた後、上清を新しいサンプルチューブに移す。
- 5) 1,000xg、5 分間、4°C で遠心する。
- 6) 上清を除き、沈渣を 100 μ l の 1% Triton-X100 (TE の溶解) に再浮遊させた後、100°C で 15 分間加熱する。溶解液はそのまま抽出 DNA 試料として用いる。保存する場合は -20°C におく。

6. PCR/RFLP 解析と同定

1) 使用するプライマー

5.8S リボゾーマルRNA 遺伝子を含むITS (Internal Transcribed Spacer) 領域内の400~500bpを増幅する以下のプライマーを準備する。

Forward: 5'-GAA CCT GCG TAG GGA TCA TTT-3'

Reverse: 5'-TTT CTT TTC CTC CCC TTA TTA-3'

2) PCR 反応液調整

1 チューブ分ずつ調整するのではなく、10あるいは20 チューブ分をまとめて調整し(抽出 DNAの量は差し引いて)、その後にPCR チューブに分注する。

PCR 反応液組成

PCR バッファー	2.5 μ l	(酵素添付 10 倍希釈用)
MgCl ₂	1.5 μ l	(終濃度 1.5mM)
dNTP	2.0 μ l	(各 200mM)
TaqDNA ポリメラー	0.2 μ l	(1Unit、例 Takara <i>Ex Taq</i>)
ゼ		
滅菌蒸留水	15.3 μ l	
プライマー (20 μ M)	0.75 μ l x2	(Forward、Reverse、各 15p mol)
抽出 DNA 試料	2.0 μ l	
計	25.0	

3) PCR

以下の温度プログラムを設定し、PCR を行う。反応終了後は、PCR 産物による汚染を防ぐため室温にて冷却後、数秒間遠心してチューブ内壁、蓋の裏に付着する反応液をすべて管底に落とす。

PCR 温度プログラ

ステップ 1	94°C、5 分	
ステップ 2	94°C、30 秒	ステップ 2-4
ステップ 3	55°C、30 秒	35 回繰返し
ステップ 4	72°C、45 秒	
ステップ 5	72°C、5 分	

4) PCR 産物の電気泳動

数秒間遠心してチューブ内壁、蓋の裏に付着する反応液をすべて管底に落とす。反応液 5 μ l と 6x泳動用バッファー 1 μ l を混ぜ、2%アガロースゲルで電気始動する。バッファーは TBE あるいは TAE を用いる。ネグレリア種による増幅 DNA のサイズについては7)を参照。

5) PCR 産物の制限酵素消化

電気泳動にて DNA 増幅を確認したら、PCR 産物を制限酵素等の試薬類と合わせ、37°Cにて 3 時間消化する。制限酵素の Mse I および Nla IVは基本的にメーカーの指示に従って用いる。

PCR 産物	6 μ l (未精製)
制限酵素	0.5 μ l
10xバッファー	2 μ l (酵素添付のもの)
100xBSA	0.4 μ l (任意の使用で安定性が増す)
滅菌蒸留水	11.1 μ l
計	20 μ l

6) 制限酵素消化した試料の電気泳動

数秒間遠心してチューブ内壁、蓋の裏に付着する反応液をすべて管底に落とす。制限酵素処理した反応液 5 μ l と 6x泳動用バッファー 1 μ l を混ぜ、3%アガロースゲル、あるいは 5%ポリアクリルアミドゲルで電気始動する。バッファーは TBE あるいは TAE を用いる。

7) 温水環境より分離される代表的なネグレリア種(特に病原性種)の制限酵素 DNA 断片のサイズ

PCR 産物を Mse I あるいは Nla IVで消化、切断した時に得られる DNA 断片のサイズを、種あるいは株ごとにまとめたものを次頁の表に示す。

8) 分離株の同定

上記の制限酵素による DNA 断片サイズの表に基づき、分離株の同定を行う。正確な同定を期すには、PCR 用プライマーを用いて PCR 産物のシーケンスを調べる。DDBJ/EMBL/GenBank等のシーケンスデータベースを用いて相同性検索が可能である。

また、ITS 領域の PCR 産物を *Mse*I、*Sac*FI、*Dde*I の 3 種の制限酵素を使用して切断パターンを作製することで、*N. lovaniensis*、*N. australiensis*、*N. tihangensis*、*N. mexicana*、*N. endoi*、*N. philippinensis*、*N. laresi*、*N. pussardi*、*N. sp* PNCB-1、*N. sp* PNMA-1 等のグループに分類も可能である。

表、国内においてこれまで分離された*Naegleria*属アメーバの制限酵素切断DNA断片サイズの一覧

種/株名	PCR産物(bp)	Mse I	NlaIV
<i>N. clarki</i>	495	427, 38, 21, 9	365, 87, 43
<i>N. fowleri</i> *	452	285, 100, 37, 21, 9	410, 42
<i>Naegleria sp.</i> PNMA-1 (99.5-99.7%)	450	420, 21, 9	408, 42
<i>Naegleria sp.</i> PNMA-1 (99.5-99.8%)	448	330, 88, 21, 9	406, 42
<i>N. italica</i> *(97.7%)	435	389, 46	435
<i>N. philippinensis</i> *	408	303, 38, 37, 21, 9	366, 42
<i>N. lovaniensis</i>	406	232, 52, 51, 37, 21, 9,	364, 42
		4	
<i>Naegleria sp.</i> PNCB-1	397	327, 40, 21, 9	355, 42
<i>N. australiensis</i> *	395	327, 38, 21, 9	266, 87, 42
<i>N. tihangensis</i>	397	329, 38, 21, 9	266, 89, 42
<i>N. laresi</i> (98.4%)	457	389, 38, 21, 9	415, 42
<i>N. endoi</i>	407	303, 38, 36, 21, 9	365, 42
<i>N. jamiensoni</i>	397	327, 40, 21, 9	355, 42
<i>Naegleria sp.</i> PNML (97.9%)	465	349, 48, 38, 21, 9	423, 42
<i>Naegleria sp.</i> PNMR (99.1%)	465	349, 48, 38, 21, 9	423, 42
<i>N. mexicana</i>	407	303, 38, 36, 21, 9	365, 42
<i>N. andersoni</i> (99.7%)	400	275, 53, 42, 21, 9	358, 42
<i>Naegleria sp.</i> NC11-1	415	280, 68, 37, 21, 6	373, 42

* は病原性のある種類。

データベース上に登録されている種名、株名で表示した。

配列の一致率が100%でない場合は()にその一致率を示した。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Rieko Furushima-Shimogawara, Tokiko Asakura, Tatsuya Karasudani and Takuro Endo. Occurrence and Distribution of *Naegleria* Species in Thermal Waters in Japan. *J.Eukaryot. Microbiol.*, 514-513, 2003.
2. Mako Omura, Rieko Furushima-Shimogawara, Kenji Yagita, Shinji Izumiyama and Takuro Endo. 2D-PAGE PROTEIN PROFILES OF PATHOGENIC AND NON-PATHOGENIC *Naegleria* SPECIES. Xth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings. 115-123, 2003.
3. Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Rieko Furushima-Shimogawara, Tokiko Asakura, Mako Omura, Tatsuya Karasudani and Takuro Endo. CHARAKUTERIZATION OF THE *Naegleria* ISOLATES FROM THERMAL WATERS IN JAPAN. Xth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings. 45-53, 2003.
4. 福岡利英. 病原性自由生活アメーバ感染による髄膜脳炎の症例・診断・治療 ～PCRの有用性～ 化学療法の領域. 19(1):51-58, 2003.
5. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. レジオネラ汚染とその対策. 環境技術 32(6), 29-33, 2003.
6. 八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎. レジオネラ属菌の水系感染—宿主アメーバの果たす役割. 水環境学会誌. 26(1):14-19, 2003.
7. 河野喜美子、東 美香、齊藤信弘、鈴木 泉、倉 文明、前川純子、渡辺治雄、八木田健司、遠藤卓郎. <特集関連情報>循環式温泉入浴施設を入浴施設を発生源としたレジオネラ症集団感染事例—宮崎県 病原性微生物検出情報. 24(2), 3-5, 2003.
8. 八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎. <特集関連情報>温水環境におけるレジオネラ宿主アメーバ類. 病原性微生物検出情報. 24(2), 8-9, 2003.
9. Kenji Ygita, Rieko Furushima-Shimogawara, Shinji Izumiyama, Mako Omura, Tokiko Asakura and Takuro Endo. Use of PCR analysis for detection of free-living Amoebae *Naegleria* in the warm water aenvironment whose primer constructed from repetitive DNA sowed sequence homologies with the mitochondrial ATPase6 subunit form yeast. 6th International congress on plant Mitochondria Proceedings. 2002.
10. 原 樹、福岡利英. 遺伝子同定法の信頼性と問題点. *Clinical Parasitology*. 13(1):16-18, 2002.
11. 田栗利紹. 温水環境中に生息する病原性を有する自由生活性アメーバ類およびレジオネラ属菌の汚染調査の概要 (2001年度). 長崎県衛生公害研究所報. 47 : 2001.