

SUMMARY

Among free-living amoebae, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* spp. are known causative agents of amoebic encephalitis in humans. Immunohistochemical methods using anti-amoeba antibodies have been used for diagnostic separation of these amoebal pathogens. However, anti-amoeba antibodies are limited in practical use because they are not available commercially and are not easy to develop in house. We have used *in situ* hybridization (ISH) for diagnosis of amoebic encephalitis on histological preparations of central nervous system tissue from mice experimentally infected with the amoebae. Oligonucleotide probes (approximately 40 bp) specific to each amoeba were designed based on the sequence of the 18S ribosomal RNA gene and were used for whole-cell hybridization. The probes, which contained a biotin at the 5'-end, were detected with streptavidin-conjugated HRP or Alexa 488. Specificity and reactivity of the probes were confirmed by staining the respective amoebae prior to histological application. High-resolution ISH images of the amoeba cells with excellent contrast were consistently obtained with fluorescence light microscopy. The advantage of ISH for the detection of specific pathogens in pathological specimens might be queried because of the complexity of the stain technology. However, probes specific to pathogenic microbes can be developed easily once the DNA sequence data are available.

[目的] 自由生活性アメーバである*Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* および*Acanthamoeba* spp. はヒト中枢に感染し致死的なアメーバ性脳炎を引き起こす。国内においては*Balamuthia mandrillaris* がアメーバ性脳炎の主要な病原体であることが疫学的調査から判明しているが、これらのアメーバに関する感染実態は明らかではない。従来の一般的組織染色法、また抗アメーバ抗体を用いた免疫組織染色法は特異性および汎用性の面から確定診断法としての利用に限界が見られる。*in situ* hybridization 法 (ISH) は、より高い特異性と利便性を有し、*Acanthamoeba*の細胞レベルのDNA同定にも応用されている¹⁾。本研究ではアメーバ性脳炎の鑑別診断法としてのISHの有用性を、病理切片標本を用いて検討した。

[材料および方法] *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* および*Acanthamoeba*の18S rRNA領域の登録配列を利用して、各アメーバ特異プローブ(約40 bp)を数種類設計した。各プローブは5'側にビオチン標識を施し、PeroxidaseあるいはAlexa488標識アビジンで2次染色が可能にした。プローブの特異性を調べるための交叉反応試験には、スライドグラス上に上記3種類のアメーバ培養株およびヒトの培養細胞を塗抹した標本を用いた。また病理組織標本には上記アメーバを脳内接種した感染マウスのパラフィン脳病理切片を用いた。染色手順としては、病理組

織標本を定法に基づき脱パラフィン処理し、Proteinase K処理(37°C, 15分間)の後、プローブ(最終濃度0.01pmol)をのせハイブリダイゼーション(52°C, 2時間)、さらに保温洗浄液(10倍希釈SSC緩衝液)中に浸漬(20分間)して洗浄を行い、PeroxidaseあるいはAlexa488標識アビジンで2次染色を行った。Peroxidaseの発色反応にはGenPoint システム(DAKO)を用いた。なおPeroxidase発色標本ではヘマトキシリンによる核染色、Alexa488染色標本ではEvans Blueによりカウンター染色を行った。

[結果と考察] 塗抹標本を用いた交叉反応試験では、各アメーバプローブは高い特異性を示し、また細胞全体が染色され、いずれも使用可能と判断された。病理切片上での反応においては*N. fowleri*ではNaeg2ish, *B. mandrillaris*ではBala3ish, *Acanthamoeba*ではAcanth3ishの各特異プローブが優れた反応性を示した。PeroxidaseあるいはAlexa488いずれの場合も、アメーバの細胞全体が染色されることで周囲の組織より明確に識別することが可能であった。*Naegleria fowleri*ではGenPoint システム(DAKO)の染色特性として、細胞質全体は比較的弱く茶褐色に染色され、部分的に強く点状に染まる傾向が示された。本方法では*B. mandrillaris*と*N. fowleri*の間に交叉反応は示されなかったが、*B. mandrillaris*と*Acanthamoeba*との間では、反応条件を緩やかにすることで微弱な交叉反応が観察された。したがって、

Balamuthia を標的とした染色では、ハイブリダイズの反応条件を厳密にする必要があると考えられた。

これまで主な鑑別診断法として用いられてきた免疫抗体染色法は特異性の高い抗体を多量に要する点、また限られた検査・研究機関での診断に止まるという点で、その利用が限定的であった。これに対し、*in situ* hybridization 法は特異プローブが開発された段階で、合成によりプローブの入手が容易とな

り、また技術の普及を含めて、より有用性が高い診断法であると考えられる。

[文献]

- 1) Stohard, D. R., Hay, J., Schroeder-Diedrich, J. M., Seal, D. V. and Byers, T. J. (1999) *J. Clin. Microbiol.*, 37:2687-2693.