

## ヒト糞便中に存在するPCR (Polymerase chain reaction) 阻害物質に関する研究

今西麻樹子、柳田潤一郎、森松 伸一

現在、微生物検査の分野では遺伝子による診断 (DNA診断) が多く用いられている。遺伝子検査においては血液・喀痰・糞便等といった様々な生体試料が検査に用いられているが、これらの試料中には遺伝子を増幅するPCR法において、目的とする細菌遺伝子の増幅を妨げる様々な阻害物質の存在が明らかにされている。しかし糞便においてはその組成が故に多くの阻害物質の存在が考えられてはいるが、いまだ詳細な確認・解明がなされていない。そのためPCR用試薬キットを販売しているメーカーは阻害物質を特定することなく、検体の前処理を行うことにより、阻害物質による影響を少なくしているのが現状である。

本研究では、糞便検体に様々な前処理を行い、接種した *Vibrio Parahaemolyticus* の耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin; tdh) 遺伝子の増幅が見られるかどうか、またPCR法におけるヒト糞便中の阻害物質の一つであると考えている食物繊維 (dietary fiber) について、その阻害性の確認を行った。

### 【方法と結果】

- (1) 各濃度に調製した *Vibrio Parahaemolyticus* を加えた糞便検体を  $95^{\circ}\text{C}$ ・5分間加熱処理した後、 $3900\text{ g}\cdot 3$ 分間遠心分離して得られた上清を Template DNA としPCRを行った。その結果、Positive Controlよりは薄いものの、経腸栄養摂取者の糞便では菌液濃度  $\text{McF}0.5 \times 10^{-3}$  まで耐熱性溶血毒 (tdh) 遺伝子の存在を示す  $251\text{bp}$  のバンドが確認された。成人および乳児の糞便では  $\text{McF}0.5$  の菌液接種ではバンドが確認されなかったため、菌液濃度を  $\text{McF}2.0$ 、 $1.0$  に調整し同様の実験を行ったがバンドは確認されなかった。
- (2) 各濃度の菌液を加えた糞便検体を  $95^{\circ}\text{C}$ ・5分間加熱処理したものを Template DNA としPCRを行った。その結果、成人および乳児の糞便では  $251\text{bp}$  のバンドが確認されなかったが、経腸栄養摂取者の糞便では  $\text{McF}0.5 \times 10^{-2}$  まで  $251\text{bp}$  のバンドが確認された。経腸栄養摂取者が摂取している半消化能栄養剤には食物繊維が含まれていないことは明らかであるので、この結果を受けて(3)を行った。
- (3) 経腸栄養摂取者の糞便に水溶性食物繊維の一つであるペクチンを各濃度で加え、 $95^{\circ}\text{C}$ ・5分間加熱処理したものを Template DNA としPCRを行った。その結果ペクチン濃度が薄まるにつれ  $251\text{bp}$  のバンドが濃く確認された。

### 【考 察】

今回行った実験ではどの条件においても成人および乳児の糞便では  $251\text{bp}$  のバンドが確認されなかった。これは糞便中の阻害物質の影響によるものであることは間違いないが、乳児の糞便は成人の糞便と違い食事摂取による食物繊維などの影響が少ないのではとの予想に反しており、また希釈や遠心を行うことにより目的とする遺伝子がPCRにより増幅されるという報告がされているので、実験(1)(2)とも菌液量と糞便懸濁液量の割合、遠心スピードや遠心時間など条件を変えて再度実験を行う予定である。また実験(3)の結果よりペクチンがPCRによる遺伝子増幅に何らかの影響を及ぼしていると推測されるので、他の種類の食物繊維 (不溶性食物繊維のセルロース等) を用いた実験を進めていきたい。