

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

微生物検査の分野では遺伝子による診断 (DNA診断) が、血液・喀痰・糞便等といった様々な生体試料で行われており、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。しかし多くの阻害物質の存在が考えられている糞便においては、いまだ詳細な解明がなされていない。

我々は糞便中の阻害物質の一つとして食物繊維 (dietary fiber) を考えているが、今回の実験ではその食物繊維と定義されている物質それぞれの主成分について、PCR法による *Vibrio Parahaemolyticus* の耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin ; tdh) 遺伝子の増幅における阻害性の確認を行った。

【方 法】

- (1) *Vibrio Parahaemolyticus* はアルカリペプトン水で18時間培養したのち、1,500rpm、5分間遠心後、分光光度計625nmの吸光度が0.08~0.1 (McF 0.5に相当) になるようアルカリペプトン水で希釈調整したものを菌液とした。
- (2) 食物繊維 (dietary fiber) は不溶性食物繊維としてセルロースとキチンを、水溶性食物繊維としてペクチン、グルコマンナン、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースおよびポリデキストロースを滅菌蒸留水で各濃度に調整したものを使用した。
- (3) *Vibrio Parahaemolyticus* 菌液10 μ lに各濃度の食物繊維溶液90 μ lを加え、95 $^{\circ}$ C、5分間加熱したものを Template DNAとし、PCRを行った。
- (4) PCR増幅産物を3,900g、3分間遠心後、上清をエチジウムブロマイド加2%アガロースゲルで100V、40~50分間泳動。
- (5) *Vibrio Parahaemolyticus* の耐熱性血毒 (tdh) 遺伝子を示す251bpのバンドの確認。

【結果および考察】

今回の実験において、難溶性食物繊維であるキチンにおいてPCRによる遺伝子増幅に若干の阻害性が確認された。また水溶性食物繊維であるペクチン、アルギン酸、ポリデキストロースにおいては、ある濃度によって完全にPCRによる遺伝子増幅に阻害性があることが確認された。

一方、これらの阻害性は食物繊維の希釈によって減少していくことも確認された。しかし前年度の実験において本来なら増幅されているはずのバンドが、菌数を減少することにより確認できなくなるケースがみられたので、希釈以外での阻害性の軽減または阻害物質そのものの除去を今後の検討課題に加えたいと思う。