

# ヒト糞便中に存在するPCR阻害物質に関する研究 —阻害性の軽減および阻害物質の除去を視野に入れて—

今 西 麻樹子

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。

前年度には「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）遺伝子の増幅に対する阻害性の確認を行った。今年度は阻害物質のひとつであるアルギン酸の阻害性をその溶液の「粘度」によるものと仮定し、アルギン酸溶液をアルギン酸リアーゼで低粘度化したのちPCRを行い、阻害性軽減の有無を確認した。また、糞便中にはアルギン酸ナトリウムとして排出されることから、その阻害性を確認するとともに遺伝子増幅における阻害性の軽減、また阻害物質そのものの除去についての検討を行った。

## 【実験方法】

- (1) *Vibrio parahaemolyticus* はアルカリペプトン水で18時間培養したのち、1,500 rpm、5分間遠心後、分光光度計625nmの吸光度が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する。
- (2) 各濃度のアルギン酸にアルギン酸リアーゼ（0.01U/ $\mu$ l）を加え40℃の恒温槽で1時間インキュベートする。
- (3) *V. parahaemolyticus* 菌液 10  $\mu$ l に恒温槽で反応させた溶液 90  $\mu$ l を加え、95℃、5分間加熱したものをTemplate DNAとし、PCRを行う。
- (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) *V. parahaemolyticus* の耐熱性溶血毒（tdh）遺伝子を示す251bpのバンドの有無を確認。

## 【結果および考察】

実験結果より、アルギン酸リアーゼによるアルギン酸の阻害性の軽減が若干認められた。しかし、濃度によっては軽減が認められないため酵素量や反応時間などを検討する必要があると思われる。一方、アルギン酸ナトリウムでは阻害性が確認されなかったが、アルギン酸ナトリウムをアルギン酸に添加することによりバンドの出現を確認することができた。次年度ではこの事を踏まえ、今までに阻害を確認している物質にアルギン酸ナトリウムを添加してバンドの出現およびバンドの増強を確認していきたい。