

ヒト糞便を検体としたPCR (Polymerase chain reaction) における 阻害物質の検討と感度増幅に関する研究

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のが現状である。

我々は食物繊維 (dietary fiber) を糞便中の阻害物質の一つと考え、糞便中に存在すると考えられる食物繊維について *Vibrio Parahaemolyticus* を用い、PCR法による 耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin ; tdh) 遺伝子の増幅に対する阻害性を検討した。その結果「食物繊維」と定義されている物質それぞれの主成分であるペクチン、アルギン酸、ポリデキストロース、キチンを阻害物質と確認したが、検討物質の一つであるアルギン酸ナトリウムにおいては阻害と反した結果を得た。

以上のことを踏まえ、今年度は前年度までに確認している阻害物質、また食物繊維以外に阻害物質とされている物質にアルギン酸ナトリウムを添加して、目的遺伝子のバンドの出現および増強の確認を行うとともに、その効果がアルギン酸ナトリウムによる阻害物質の抑制にあると考え、市販されている同様の働きをするPCRバッファーを用いて比較検討を行った。

ペクチンにおいてはアルギン酸ナトリウム添加により、目的遺伝子のバンド出現および増強を確認した。しかし、ポリデキストロースやヘモグロビンについてはその効果は低く、バンドの増強はほとんど認められなかった。一方、阻害物質を抑制する市販PCRバッファーを使用した場合には、ポリデキストロースやヘモグロビンについてはアルギン酸ナトリウム添加によりバンドの増強は認められたが、ペクチンにおいてはその効果が認められず、ペクチンの濃度によっては却ってバンドを確認できなくなった。また、ペクチンにおいて添加する *V. Parahaemolyticus* の菌数を減少させた場合、アルギン酸ナトリウム添加においては目的遺伝子のバンド出現および増強が認められたが、市販PCRバッファーでは認められなかった。

今後はアルギン酸ナトリウムと同様の作用があると考えられるセルロースやカルボキシメチルセルロースを用い、目的遺伝子のバンドの出現および増強の確認を行いたい。