

薬学実務実習 1 薬剤部

10191043 鈴木健一

目的

遺伝子変異とその表現型の連関の理解するために動物試料、およびヒト試料を用いた解析を行う。

方法

マウスの遺伝子解析

Uox または Opg 遺伝子をノックアウトしたマウスと野生型のマウスの耳片から DNA を抽出し、PCR 法によって培養する。血漿中の尿酸の濃度から Uox の変異を、リン酸の濃度から Opg の変異を判定する。その後、酵素処理をへて電気泳動により遺伝子判定を行う。

ヒトの遺伝子解析

ヒトの口腔内から細胞を取得して DNA を抽出し、PCR 法によって培養する。その後、酵素処理をへて電気泳動により遺伝子判定を行う。

結果

マウスの遺伝子解析

サンプルの血漿中の尿酸濃度を検量線によって求めた。Uox がノックアウトされた個体では尿酸値が上昇するのが、グラフおよび表からも明らかとなった。Uox がノックアウトされた PC2 と同様に尿酸値が高かったのはサンプル 4 である。

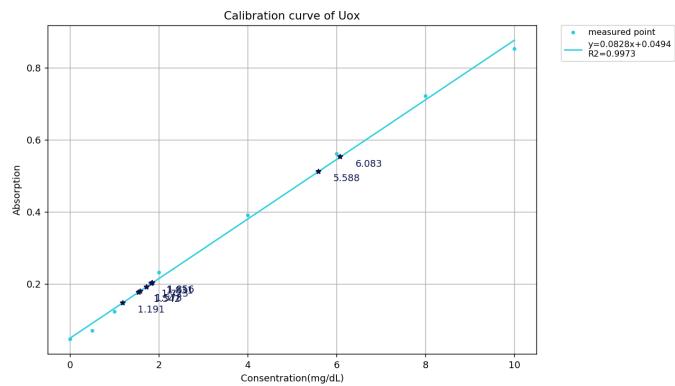


図 1 検量線 Uox

	尿酸濃度 (mg/dL)	吸光度
PC1	1.831	1.016
PC2	6.083	3.318
PC3	1.723	0.957
SP1	1.856	1.029
SP2	1.542	0.859
SP3	1.578	0.879
SP4	5.588	3.050
SP5	1.191	0.670

サンプルの血漿中のリン酸濃度を検量線によって求めた。Opg がノックアウトされた個体ではリン酸濃度が上昇するのが、グラフおよび表からも明らかとなった。Opg がノックアウトされた PC3 と同様に尿酸値が高かったのはサンプル 2 とサンプル 3 である。

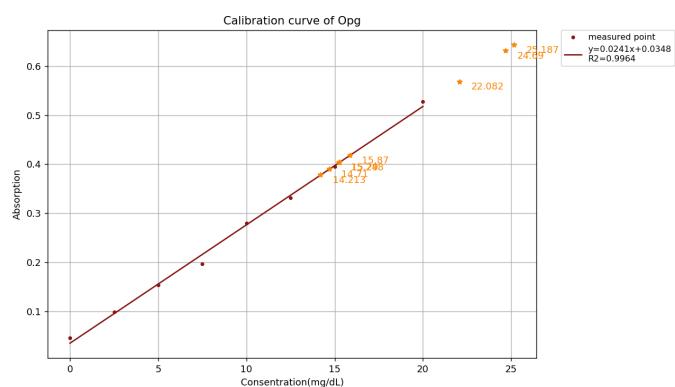


図 2 検量線 Opg

	リン酸濃度 (mg/dL)	吸光度
PC1	14.21	1.016
PC2	15.29	3.318
PC3	22.08	0.957
SP1	15.25	1.029
SP2	24.69	0.859
SP3	25.19	0.879
SP4	15.87	3.050
SP5	14.71	0.670

検量線による遺伝子判定とは別に電気泳動によっても遺伝子判定を行った。写真の上側が Uox の判定、下側が Opg の判定である。Uox が欠損したものはバンドが下にシフトする。そのような結果となったのは、コントロール 2 とサンプル 4 であった。Opg が欠損したものはバンドが上にシフトする。そのような結果となったのは、コントロール 3 とサンプル 2,3 であった。



図 3 Uox,Opg 電気泳動

以上の結果よりサンプルの遺伝子は以下のように判定された。

SP1	SP2	SP3	SP4	SP5
野生型	Opg 欠損	Opg 欠損	Uox 欠損	野生型

ヒトの遺伝子解析

Allele Specific PCR 法では野生型と変異型のプライマーをそれぞれ用意して PCR 法で DNA の增幅を行った。しかし画像からわかるように全てのコントロールで DNA が増幅されてバンドが現れてしまった

ので、Allele Specific PCR 法で遺伝子型の判定をすることはできなかった。



図 4 Allele Specific PCR

PCR-RFLP 法によって ALDH2 の遺伝子型判定を行った。画像の上側がその電気泳動の結果である。その結果クイズサンプルは Q1 と Q3 がヘテロ、Q2 が変異型のホモであると判定された。またそれ以外の匿名化済み学生サンプルについても明瞭なバンドを得ることができた。

変異導入 PCR-RFLP によって ADH1B の遺伝子判定を行なった。画像の下側がその電気泳動の結果である。画像の通り、他班のポジティブコントロールとサンプルについては明瞭なバンドが得られたが、自分の班のものについてはバンドが現れなかった。

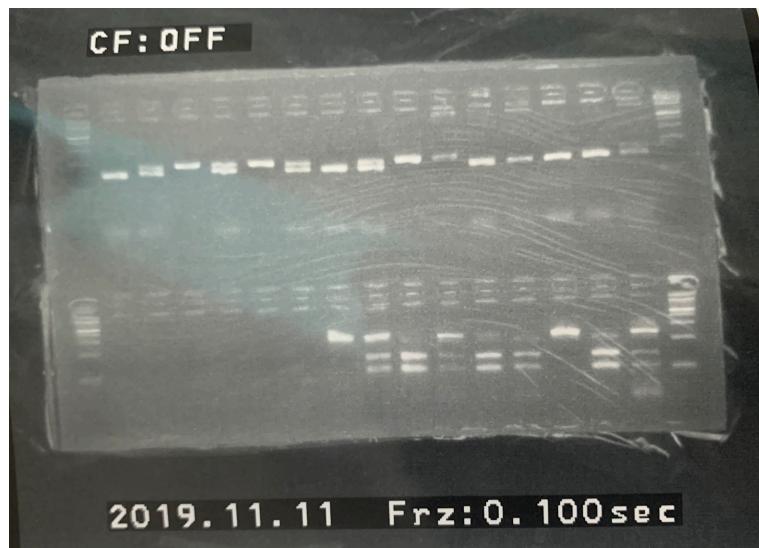


図 5 PCR-RFLP 変異導入 PCR-RFLP

考察

マウスの遺伝子解析では電気泳動による判定と検量線による判定で同じ遺伝子判定の結果を得ることができた。したがって相互の判定法の正当性が検証されたと言える。

ヒトの遺伝子解析で、Allele Specific PCR 法で遺伝子型の判定をすることはできなかったのは野生型と変異型の DNA の間には 1 塩基しか差がないため、多少 DNA 鎖が異なっていてもプライマーによって複製されてしまったからだと考えられる。

ADH1B の遺伝子判定において自分の班のサンプルのバンドが現れなかったのは PCR の作業において何らかの不手際があったからだと考えられる。他班サンプルの電気泳動は問題なかったので電気泳動の操作には問題がなく、DNA の複製の時点で失敗していたと推測できる。

課題

1.

各人種の変異型 (CYP2C19*2 と CYP2C19*3) からホモを p、ヘテロ q として $p^2, 2pq, q^2$ の割合をそれぞれ求めた。

	CYP2C19*2	CYP2C19*3	変異型ホモ	ヘテロ	野生型ホモ
Japanese	35.0	11.1	21.25	49.69	29.05
Chinese	39.9	6.1	21.16	49.68	29.16
Swedish Caucasian	23.1	0.3	5.47	35.84	58.67
Jewish Israell	15.0	1.0	2.56	26.88	70.56
Ethiopian	13.6	1.8	2.3716	26.05	71.57

2.

- (1) 受容体の野生型、ヘテロ、変異型をそれぞれ NR,IR,SR と表し、CYP2D6 の野生型、ヘテロ、変異型をそれぞれ EM,IM,PM と表す。NR-EM の患者群での奏効率が 80% になるときの薬物血漿中濃度の AUC は、NR は $p = 10$ であることから、以下のように求められる。

$$0.8 = \frac{a}{10 + a}$$
$$a = 40$$

投与された薬の AUC は患者のクリアランスに逆比例するので、一律の量で投与された薬の薬物血漿中濃度の AUC を A とすると、 A は CYP2D6 の代謝活性 t によって異なり、以下のように表される。

$$A = \frac{40}{t}$$

これをもとにそれぞれの遺伝子型における奏効率と副作用発現率を計算すると次のようになる。

受容体型	NR	NR	NR	IR	IR	IR	SR	SR	SR
CYP2D6 型	EM	IM	PM	EM	IM	PM	EM	IM	PM
奏効率	0.800	0.870	0.952	0.889	0.930	0.976	0.952	0.971	0.990
副作用発現率	0.118	0.182	0.400	0.211	0.308	0.571	0.400	0.526	0.769

- (2) アレルの頻度より受容体と CYP2D6 の型でそれぞれ異なる患者の存在比率は

$$NR : IR : SR = 0.64 : 0.32 : 0.04$$

$$EM : IM : PM = 0.25 : 0.50 : 0.25$$

よってそれぞれの遺伝子型を持つ患者の存在比率は以下のようになる。

遺伝子型	NR-EM	NR-IM	NR-PM	IR-EM	IR-IM	IR-PM	SR-EM	SR-IM	SR-PM
存在割合	0.16	0.32	0.16	0.08	0.16	0.08	0.01	0.02	0.01

求める全体での奏効率と副作用発現率は存在比率にそれぞれの割合を掛け合わせたものの和であるから、上記の表をもとに計算して、奏効率は 89.5%、副作用発現率は 27.5% となる。

- (3) 受容体の型に応じて奏効率が 80% になるように投与量を調節すると、薬物血漿中濃度の AUC は EM,IM,PM でそれぞれ 40, 20, 8.0 ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$) となる。投与量を調節したときのそれぞれの副作用発現率は 11.8% となるので全体での副作用発現率は 11.8% となる。したがって一律の量で投与した時に比べて副作用発現率が 15.7% 低下する。
- (4) t 人の遺伝子診断をしたとすると。投与量を個別化した場合での副作用発症者の数は $0.118t$ 人である。一方、一律の量で投与した場合は副作用発症者の数は $0.275t$ 人である。したがって、副作用発症例を 1 減らすには $0.118t$ と $0.275t$ の差が 1 になるような t を求めれば良い。

$$0.275t - 0.118t = 1$$

$$t = 6.369$$

したがって最低でも 7 人の遺伝子診断が必要となる。

- (5) 遺伝子診断をする目的は奏効率を高く維持したままで副作用の発現例を少なくすることである。したがって、一律の量で薬を投与した患者の群と、遺伝子検査をした上で薬を投与した患者の群の 2 サンプルから薬が効いたか、副作用があったかというデータを取得して奏効率と副作用発現率の比較を行うことで有用性を確認する必要がある。また重篤な副作用が起きた患者の数という軸での評価を行うことも有用であると思われる。

3.

自分の遺伝子の情報がわかるということで興味を持って実習に取り組むことができました。他の研究室の実習に比べて TA 人数が多く一人ひとりが熱心に指導してくださったことが印象に残っています。残念ながら自分の班は遺伝子検査が半分失敗してしまい。アルコールの遺伝子型が分からなかったことが心残りです。