

学位論文

アルコール代謝酵素 *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子型  
の迅速かつ正確な SNP タイピング実験法の研究  
および遺伝子検査を用いた教育への応用

High performance and straightforward SNP typing methods for alcohol  
metabolic enzyme genes, *ALDH2* and *ADH1B*,  
and appreciation for education.

2015 年

林田 真梨子

# 目次

緒言	4
第1章 生体サンプルを用いた簡便な SNP タイピング法の開発	6
第1節 DNA抽出・精製工程を除いた PCR 法の検討	6
第1項 濾紙を直接反応液に添加した際の PCR への影響	6
第2項 血液・唾液・毛髪を用いた SNP タイピング法の検討	7
第2節 ASP-PCR 法への応用	8
第3節 PCR-RFLP 法への応用	10
第4節 DNA抽出・精製工程を除いたリアルタイム PCR 法の検討	12
第1項 濾紙および水溶紙の TaqMan プローブ法への影響	13
第2項 生体サンプルを直接用いた TaqMan プローブ法の検討	15
第5節 血液・唾液・毛髪の PCR 産物量の比較	18
第2章 新規 SNP タイピング法の正確性の検証	20
第1節 新規 PCR-RFLP 法の正確性の検証	20
第2節 新規 TaqMan PCR 法の正確性の検証	20
第3節 従来法と新規 SNP タイピング法の比較	22
第3章 新規 SNP タイピング法のアルコールリテラシー教育への利用	24
第1節 アルコール体質型の設定および AUDIT スコアとの関連性	24
第2節 遺伝子検査を用いたアルコールリテラシー教育への展開	29
第3節 未成年者に対するアルコールリテラシー教育への展開	30

総括	35
生体サンプルの提供について	36
謝辞	37
参考文献	38

## 緒 言

2003 年にヒトゲノムの解読が完了したことにより、遺伝子研究は急速に活性化し、遺伝子情報の個別化医療への利用が期待されている。しかし現状としては臨床に適用できず、その原因の一つとして遺伝子解析の価格や労力が挙げられる。従来の方法では、遺伝子解析を行う際には事前に細胞から DNA を抽出し、精製を行い、DNA 溶液の状態を使用する。この前処理は労力や時間がかかり、さらにコンタミネーションのリスク増大の可能性があることから、簡便化・自動化を目的とした様々なキットが市販されている。しかしこのようなキットを使用した場合コストの問題点が挙げられ、遺伝子解析が臨床に適用できない要因のひとつと考えられる。そこで本研究では、市販の DNA 抽出キットを使用するよりも簡便かつ安価に一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) 解析を行える方法の開発を検討した。その結果、検体を濾紙に付着し、乾燥させたものの小片をそのまま反応液に添加し、SNPs 解析を行うことに成功した<sup>1)</sup>。濾紙を用いた SNPs 解析法の一部は本研究室博士課程修了の大田と共に実験可能であることを確認した。本研究ではさらに、今後の応用研究に対応可能な実験法を確立するために、詳細な反応混入物の影響評価、反応条件検討および実証実験を行った。本研究ではアルコール代謝酵素 (ALDH および ADH) の遺伝子を対象として SNP タイピング法の開発を行い、さらに他施設で遺伝子解析済みの検体を独立に解析し、本 SNP タイピング法の正確性を検証した。

アルコールは飲料であると同時に薬物でもあり、ほぼ全てのヒトが摂取することを避けて通れない物質である。アルコールの有害な使用によって引き起こされる、健康、社会、経済的問題については世界規模で認識されており、世界保健機関 (World Health Organization: WHO) においても対策の必要性が謳われている<sup>2)</sup>。アルコールは適正に使用すればむしろ健康によいとされる報告もあり<sup>3-5)</sup>、使い方が重要なこの物質について、正しい知識の普及が必要であると考えられている。アルコールは主に肝臓においてアルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase: ADH) により有害なアセトアルデヒドに分解され、さらにアルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase: ALDH) により無害な酢酸に分解される。それぞれをコードする *ADH1B* 遺伝子および *ALDH2* 遺伝子には一塩基多型が存在する。*ADH1B* の遺伝子多型は 47 番目のアルギニン (CGC) がヒスチジン (CAC) に変換されており、SNP 部位にグアニン (G) を持つものは *ADH1B*\*1 アレル、変異してアデニン (A) を持つものは *ADH1B*\*2 アレルと称される。アジアで高頻度に見られる変異型 *ADH1B*\*2 アレル保有者では、ADH の活性が上昇することによりアセトアルデヒドの生成速度が増加するため、アルコール感受性が高まる。*ALDH2* の遺伝子多型は 487 番目のグルタミン酸 (GAG) がリシン (AAG) に変換されており、SNP 部位にグアニン (G) を持つものは *ALDH2*\*1 アレル、変異してアデニン (A) を持つものは *ALDH2*\*2 アレルと称される<sup>6)</sup>。*ALDH2* においてもアジアでは変異型 *ALDH2*\*2 アレルが高頻度に見られるが、こちらは変異型保有者では *ALDH2* の活性が低

下する。それによりアセトアルデヒドの代謝が遅れるために、アルコール感受性が高まる。これらの遺伝子型により飲酒習慣が異なることが報告されている<sup>7)</sup>。

本研究ではさらに、開発した SNP タイピング法の応用として、未成年者飲酒防止並びに適正飲酒教育への活用を検討した。アルコール代謝酵素は遺伝子型と表現型の相関性が明白であり、また飲酒に対する遺伝体質は誰もが興味を持つ事柄であることから、遺伝子解析を活用した適正飲酒の教育、並びに遺伝子に関する正しい理解を啓発するツールとして最適であると考えた。

本研究では、第 1 章で DNA の抽出不要な SNP タイピング法の開発について述べる。第 2 章では、新規 SNP タイピング法の正確性の検証について、第 3 章では新規 SNP タイピング法の教育的な利用方法について報告する。なお、本研究での生体サンプルを用いた遺伝子解析については全て倫理委員会における審査<sup>a)④</sup>を経て実施した。

## 第1章 生体サンプルを用いた簡便な SNP タイピング法の開発

### 第1節 DNA 抽出・精製工程を除いた PCR 法の検討

DNA 抽出や精製を行わず、検体を直接使用する方法を検討した。検体として、血液、唾液、毛髪を用いた。血液は血液中の白血球細胞内の DNA、唾液は口腔細胞内の DNA、毛髪は皮膚の中にある毛根の一番根元の毛球部位に存在する DNA がテンプレート(鋳型)となり、遺伝子解析を行うことが出来る。血液や唾液は液体であるため、直接添加すると反応液の組成が変化してしまう。それを避けるために、細胞の濾紙への固定を考案した。濾紙へ塗布し、乾燥させた小片を直接反応液に挿入し、反応にかける方法を検討した。

#### 第1項 濾紙を直接反応液に添加した際の PCR への影響

##### 【目的】

濾紙そのものあるいは濾紙からの溶出物が PCR 反応を阻害しないかどうか検討を行った。

##### 【方法】

*ALDH2* 遺伝子を対象とし、PCR を行った。PCR 反応液に直径 1.2 mm の定性濾紙 (No.1, ADVANTEC) (以下、濾紙と称する。) を添加した群、直径 2.0 mm の濾紙を添加した群、および濾紙を添加していない群 (コントロール) の 3 群で増幅反応の比較を行った。PCR 反応液は 10×DNA ポリメラーゼバッファーを 2.5 μL (TAP-211, TOYOBO), 2 mM dNTPs を 2.5 μL, DNA ポリメラーゼ (5 U/μL) (rTaq DNA polymerase, TAP-211, TOYOBO) を 0.2 μL, 10 μM *ALDH2* primer forward および reverse を各 1.0 μL, テンプレートとして  $1.0\sim 1.0\times 10^6$  コピーの *ALDH2* 遺伝子の一部を組み込んだプラスミドを 1 μL, DW を添加し合計 25 μL とした。*ALDH2* forward primer: CAAATTACAGGGTCAACTGCTATGATG, *ALDH2* reverse primer: CCAGCAGGCTCCGAGCCACCAGC. PCR 条件は使用した DNA ポリメラーゼに適した TOYOBO 推奨の条件を採用し、反応を行った。PCR の後、, マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA, MCE-202, Shimadzu) にて PCR 産物を確認した。

##### 【結果】

コントロール群、直径 1.2 mm の濾紙添加群、直径 2.0 mm の濾紙添加群の 3 群において、すべて濃度依存的な PCR 産物を確認できた (Fig. 1)。検出限界値は、コントロール群および直径 1.2 mm の濾紙添加群で  $1.0\times 10^1$  コピーであり、直径 2.0 mm の濾紙添加群では  $1.0\times 10^2$  コピーであった。直径 2.0 mm の濾紙では増幅を阻害するが、 $1.0\times 10^2$  コピー程度の DNA が存在していれば増幅反応に問題はないことが明らかとなった。

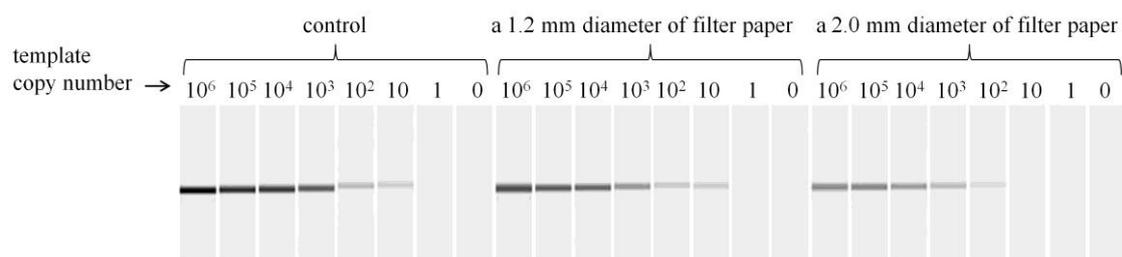


Fig. 1. PCR products of *ALDH2* gene. Control:  $1.0-1.0 \times 10^6$  copies of plasmid DNA is used as a template. A 1.2 mm and 2.0 mm diameter of filter paper are added respectively in the same composition mixtures of the control.

## 第2項 血液・唾液・毛髪を用いた SNP タイピング法の検討

### 【目的】

血液・唾液・毛髪を用いて PCR による増幅が可能か検討を行った。血液および唾液は濾紙に付着させたサンプルをテンプレートとし、毛髪は毛根のついたサンプルをテンプレートとして増幅が可能か検討を行った。

### 【方法】

- **サンプル**：血液，唾液，毛髪を使用した。血液は，血糖値測定の際などに用いられる使い捨ての採血用穿刺針で指先にキズをつけ，血液を絞り出し，濾紙に塗布した。唾液は，口腔内粘膜を集めるために舌を動かしてほほを擦るようにして唾液を集め，スポイドで採取したのち濾紙に塗布した。その後，室温で十分に乾燥させ，直径 1.2 mm または 2.0 mm にくり抜いたものを反応溶液に添加して PCR を行った。毛髪は毛根の部分を直接反応溶液に添加して PCR を行った。
- **反応条件**：*ALDH2* 遺伝子を対象遺伝子とした。通常の DNA ポリメラーゼおよびクルードサンプルの阻害に強い DNA ポリメラーゼを使用した。生体サンプルは，生体内のタンパク質や膜成分の脂質など，さまざまな物質が存在するクルードな状態であり，未精製のまま使用するとこれらの物質が PCR 反応に影響を与えることが考えられるため，クルードサンプルの阻害に強い DNA ポリメラーゼを使用し，増幅効果を比較した。  
通常 DNA ポリメラーゼを使用した反応は第 1 項と同様の条件で行った（ただしプラスミドおよび濾紙は添加せず，生体サンプルを添加した）。クルードサンプルの阻害に強い DNA ポリメラーゼを使用した反応条件は次の通り。2×KOD FX Neo バッファーを 12.5 μL (KFX-201, TOYOBO)，2 mM dNTPs を 2.5 μL，KOD FX Neo (1 U/μL) (TOYOBO) を 1.0 μL，10 μM *ALDH2* primer forward および reverse を各 1 μL，DW を添加し合計 25 μL とした。primer は第 1 項と同じものを使用した。PCR 条件は KOD FX Neo に適した TOYOBO 推奨の条件を採用し，反応を行った。
- **結果解析**：PCR 産物はマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (MCE-202, Shimazu) を用いて確認した。

## 【結果】

通常の DNA ポリメラーゼである rTaq を使用した場合は唾液検体のみ PCR 産物が確認できた。しかし唾液検体の PCR 産物は 201 bp の目的産物だけでなく、240 bp 辺りに不要なバンドも確認された。一方クルードサンプルの阻害に強い DNA ポリメラーゼである KOD FX Neo では、血液・唾液・毛髪すべて目的の PCR 産物のみが得られた (Fig. 2)。血液・唾液ともに直径 1.2 mm より 2.0 mm の方が多くの PCR 産物量を得ることができた。添加する濾紙面積の大きいほど付着した細胞数が多く、テンプレートとなる DNA 量が多く得られるためであると考えられた。KOD FX Neo ではクルードサンプルによる反応阻害の影響を受けなかったため、濾紙に付着している DNA の量に依存して増幅産物が得られたと考えられた。

以上のことから、血液と唾液は濾紙に塗布し乾燥させたもの、毛髪は毛根の部分を使用すれば、DNA の抽出・精製を行わずに直接 PCR を行えることが明らかとなった。

以上、PCR において、未処理の生体サンプルを用いる方法論を確立できた。

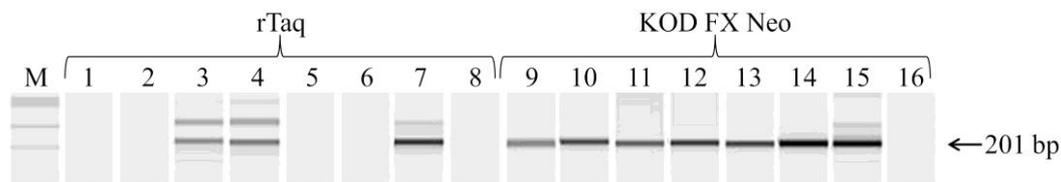


Fig. 2. PCR products of *ALDH2* gene. M: Marker; Lane 1~8: PCR products amplified by rTaq polymerase; Lane 9~16: PCR products amplified by KOD FX Neo polymerase. Templates are as follows, Lane 1,9: Dried whole blood attached to a 1.2 mm diameter of filter paper; Lane 2,10: Dried whole blood attached to a 2.0 mm diameter of filter paper; Lane 3,11: Dried saliva attached to a 1.2 mm diameter of filter paper; Lane 4,12: Dried saliva attached to a 2.0 mm diameter of filter paper; Lane 5,6,13,14: Hair; Lane 7,15: Plasmid DNA as a positive control; Lane 8,16: DW as a negative control

## 第2節 ASP-PCR 法への応用

### 【目的】

第1節で開発した、DNA抽出不要なPCR法を応用し、SNPタイピング法の開発を検討した。SNPタイピング法として、Allele Specific Primer-Polymerase Chain Reaction (ASP-PCR) 法を検討した。SNPの各アレルに対応したアレル特異的なプライマーを使用してPCRを行い、電気泳動にてPCR産物を確認できれば、そのプライマーに対応したアレルを持つと判定できる方法である。

### 【方法】

- **サンプル** : *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子の一部を組み込んだプラスミド、および DNA シーケンス法にて遺伝子型を確認済みの被験者一名の毛髪を用いて条件設定を行った。また実証実験として 25 名の本学学部生から毛髪を採取し<sup>a)</sup>、遺伝子解析を行った。
- **反応条件** : *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子を対象遺伝子とし、条件検討を行った。それぞれの遺伝子で forward プライマーを1つずつ、通常のPCR用として設計し、さらにアレル特異プライマーとして SNP 部位の配列に適合する reverse プライマーを2つずつ、次のように設計した。reverse プライマーは、3'末端から2番目が SNP 部位となるよう配置

し、さらに SNP 部位の 5'側の隣の塩基に人為的ミスマッチ配列を挿入した。一塩基のミスマッチだけではプライマーの 3'末端が鋳型鎖にある程度の頻度で結合してしまい、その瞬間にポリメラーゼが伸長反応を開始してしまうことがある。それにより SNP 部位の特異性が得られないため、SNP 部位の隣の塩基にミスマッチ塩基を挿入し、特異性を向上させた。設計した各プライマーの塩基配列は下記の通りである。ALDH2 forward primer (ALDH2-F): 5'-TCAAATTACAGGGTCAACTGCT-3', ALDH2 G-specific reverse primer (ALDH2-R-G): 5'-CACACTCACAGTTTTCACTGcA-3', ALDH2 A-specific reverse primer (ALDH2-R-A): 5'-CCCACACTCACAGTTTTCACTAtA-3' and ADH1B forward primer (ADH1B-F): 5'-GGTAGAGAAGGGCTTTAGACTGA-3', ADH1B G-specific reverse primer (ADH1B-R-G): 5'-AACCACGTGGTCATCTGTAcG-3', ADH1B A-specific reverse primer (ADH1B-R-A): 5'-AACCACGTGGTCATCTGTTtG-3'。これらのプライマーによる PCR 産物の長さは、ALDH2-G: 135 bp (ALDH2-F & ALDH2-R-G), ALDH2-A (ALDH2-F & ALDH2-R-A) : 137 bp, ADH1B-G: 228 bp (ADH1B-F & ADH1B -R-G), ADH1B-A: 228 bp (ADH1B-F & ADH1B-R-A) として、各遺伝子からの増幅産物の長さを変えて、ALDH2 遺伝子と ADH1B 遺伝子の同時検出が可能になるよう配慮した。reverse プライマーの小文字が SNP 部位に対応する塩基、アンダーバーが特異性向上のために人為的に導入した変異塩基である。1つの反応液に ALDH2 と ADH1B 遺伝子の両方のプライマーを添加し、一度に両遺伝子を解析した。PCR 反応液は 2×KOD FX バッファーを 12.5 μL (KFX-101, TOYOBO), 2 mM dNTPs を 2.5 μL, KOD FX (1 U/μL) (TOYOBO)を 0.5 μL, 10 μM G-primer セット (ALDH2-F, ALDH2-R-G, ADH1B-F, ADH1B-R-G) あるいは 10 μM A-primer セット (ALDH2-F, ALDH2-R-A, ADH1B-F, ADH1B-R-A) を 0.5 μL, DW を添加し合計 25 μL とした。PCR 条件は変性反応を 95°C5 分, 増幅反応を 98°C10 秒, 64°C30 秒, 74°C30 秒の 35 サイクル, 伸長反応を 72°C2 分とした。

- **結果解析**：PCR 産物は 3%アガロースゲルを用い、ゲル電気泳動にてバンドの確認を行い、遺伝子型を判定した。

#### 【結果】

ALDH2 および ADH1B の遺伝子型を判定することができた (Fig. 3)。左側のゲル画像が G 遺伝子, 右側のゲル画像が A 遺伝子の PCR 産物である。レーン 3~6 のポジティブコントロールが示すように、左側のみバンドが認められれば G/G, 右側のみバンドが認められれば A/A, 両方のゲルにバンドが認められれば G/A の遺伝子型であると判定できた。レーン 1 が毛髪サンプルであり、ALDH2\*1/\*2, ADH1B\*1/\*2 と判定することができた。この結果は DNA シークエンス法の結果と一致していたため、この方法は正確な遺伝子型を判定できる方法であると言える。

25 名の毛髪より遺伝子解析を行った結果、25 名中 22 名の遺伝子型が判定可能であった (Fig. 4)。3 名については ALDH2 および ADH1B 遺伝子のどちらも増幅が確認できなかったため、毛髪に付着した毛根細胞が極端に少なかったと考えられる。

以上, ASP-PCR 法への応用に成功した<sup>8)</sup>.

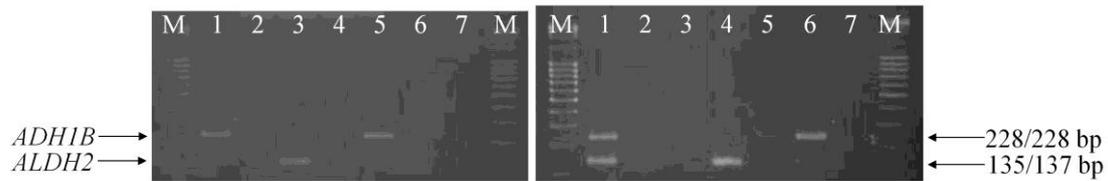


Fig. 3 Detection of *ALDH2* and *ADH1B* SNP Genotyping. Schematic representation of the PCR products generated using duplex ASP-PCR for allele [G] (left; *ALDH2*-F, *ALDH2*-R-G, *ADH1B*-F and *ADH1B*-R-G) and allele [A] (right; *ALDH2*-F, *ALDH2*-R-A, *ADH1B*-F and *ADH1B*-R-A). Lane M: 100 bp ladder. Lane 1: Human hair root sample, which has been genotyped as heterozygous for both *ALDH2* and *ADH1B* using the direct DNA sequencing method. Lanes 2 and 7: Negative control (DW). Lane 3: Positive control plasmid for *ADH1B* [G]. Lane 4: Positive control plasmid for *ADH1B* [A]. Lane 5: Positive control plasmid for *ALDH2* [G]. Lane 6: Positive control plasmid for *ALDH2* [A].

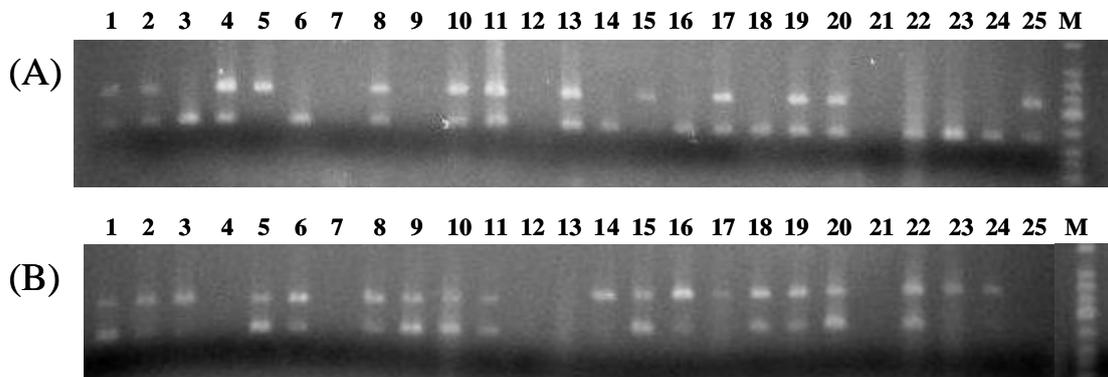


Fig. 4 Genotyping of *ALDH2* and *ADH1B* SNPs among 25 volunteers. Schematic representation of the PCR products generated using duplex ASP-PCR. (A) allele [G] for *ALDH2* and *ADH1B*. (B) allele [A] for *ALDH2* and *ADH1B*. Lane M: 100bp ladder. Lane 1 to 25: Number of 25 volunteers. Lane 7, 12 and 21: ND

### 第3節 PCR-RFLP 法への応用

#### 【目的】

別の SNP タイピング法として, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) 法を検討した. この方法では, 特異的な配列を認識し, DNA を切断する制限酵素を利用する. PCR 産物を制限酵素で処理すると, 遺伝子型によって切断されるものとされないものに分かれ, 長さの異なる産物が得られる. その産物を電気泳動にかけると長さの異なるバンドが確認出来るため, 遺伝子型を判定することが出来る. プラスミドを用いて条件設定を行い, 生体サンプルを用いて実証実験を行った.

## 【方法】

- **サンプル** : *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子の一部を組み込んだプラスミドを用いて条件設定を行った。また実証実験として、8名の被験者の生体サンプルを用いて遺伝子解析を行った。8名の被験者から第1節第2項記載の方法で血液、唾液、毛髪を採取した。さらに、10 mL のリステリンでうがいをして唾液を採取し、DNA を抽出してコントロールとした。さらに本実験法の解析率を確認するため、42名の被験者の唾液検体を用いて解析を行った<sup>b)</sup>。
- **反応条件** : *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子を対象とし、条件設定を行った。*ALDH2* および *ADH1B* の SNP 部位を認識して切断する制限酵素として、それぞれ *Acu I* (R0641S, New England BioLabs: NEB) および *Msl I* (R0571S, NEB) を採用した。さらに、制限酵素の認識部位および切断部位を含んだ領域を増幅出来るプライマーを設計した。( *ALDH2* forward primer : TCAAATTACAGGGTCAACTGCT, *ALDH2* reverse primer : GGCTGGGTCTTTACCCTCTC, *ADH1B* forward primer : CCTTGGGGATAAACTGAATCTT, *ADH1B* reverse primer : GAAATCCTGGATGGTGAACC) PCR 反応液は 2×KOD FX バッファーを 12.5 μL (KFX-101, TOYOBO) , 2 mM dNTPs を 2.5 μL, KOD FX (1 U/μL) (TOYOBO) を 0.5 μL, 10 μM *ALDH2* primer forward および reverse, あるいは 10 μM *ADH1B* primer forward および reverse を各 1 μL, DW を添加し合計 25 μL とした。PCR 条件は変性反応を 95°C5 分, 増幅反応を 98°C10 秒, 60°C30 秒, 74°C45 秒の 40 サイクル, 伸長反応を 74°C2 分とした。PCR 後, PCR 産物 6 μL を使用し *ALDH2* 遺伝子は *AcuI*, *ADH1B* 遺伝子は *MslI* 制限酵素を用いて, 20 μL の反応液を調製し 37°C1 時間の反応を行った。反応液の組成および反応条件は NEB の指示書に従った。
- **結果解析** : 反応後, マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (MCE-202, Shimazu) を用いてバンドを確認し, 以下のバンドの長さから, 遺伝子型の判定を行った。設計したプライマーから生成される PCR 産物は, *ALDH2* 遺伝子は 430 bp, *ADH1B* 遺伝子は 348 bp である。*Acu I* は *ALDH2*\*1 アレルの場合切断し, PCR 産物を 296 bp と 134 bp (296+134=430 bp) に断片化する。*Msl I* は *ADH1B*\*2 アレルの場合切断し, PCR 産物を 185 bp と 163 bp (185+163=348 bp) に断片化する。

## 【結果】

プラスミドをテンプレートとし解析を行った結果, 明瞭な結果が得られ, すべての遺伝子型の判定が可能であった。*ALDH2*\*1/\*1 は 296 bp と 134 bp の 2 本のバンド, *ALDH2*\*2/\*2 は 430 bp の 1 本バンド, *ALDH2*\*1/\*2 は 430 bp, 296 bp, 134 bp の 3 本のバンドが確認された。*ADH1B*\*1/\*1 は 348 bp の 1 本のバンド, *ADH1B* \*2/\*2 は 185 bp と 163 bp の 2 本のバンド, *ADH1B* \*1/\*2 は 348 bp, 185 bp, 163 bp の 3 本のバンドが確認された (Fig. 5) .

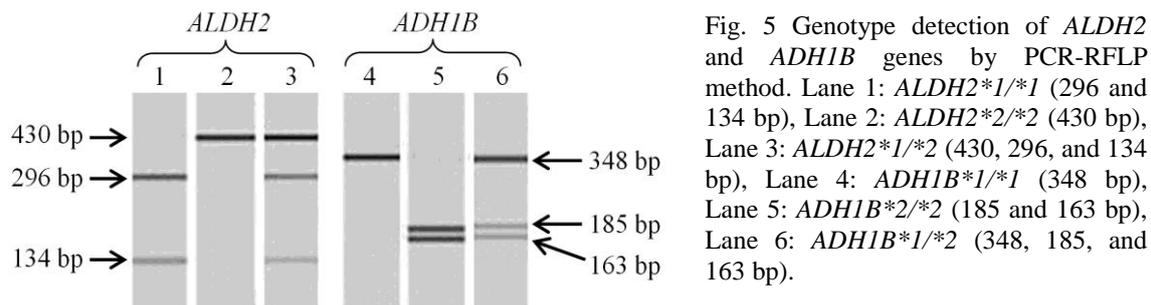


Fig. 5 Genotype detection of *ALDH2* and *ADH1B* genes by PCR-RFLP method. Lane 1: *ALDH2*\*1/\*1 (296 and 134 bp), Lane 2: *ALDH2*\*2/\*2 (430 bp), Lane 3: *ALDH2*\*1/\*2 (430, 296, and 134 bp), Lane 4: *ADH1B*\*1/\*1 (348 bp), Lane 5: *ADH1B*\*2/\*2 (185 and 163 bp), Lane 6: *ADH1B*\*1/\*2 (348, 185, and 163 bp).

生体サンプルをテンプレートとし解析を行った結果、8名全員の遺伝子型を判定することができ、すべてのサンプルにおいてコントロールと一致した結果が得られた。さらに抽出したDNAを用いてダイレクトシーケンス法にて塩基配列を確認し、結果が一致していることを確認した。すなわち、生体サンプルを直接使用しても、正確な結果を得られることが確認できた。

さらに42名の唾液検体では、42中40名の遺伝子型が判定できた。2名は明瞭な結果が得られず判定不可能であったが、これは唾液検体が適切に採取出来ていなかったためであると考えられた。

以上、DNA抽出・精製工程を除いたPCR-RFLP法への応用に成功した。

#### 第4節 DNA抽出・精製工程を除いたリアルタイムPCR法の検討

第2節でASP-PCR法、第3節でPCR-RFLP法への応用を報告したが、これらの方法ではワンステップで遺伝子型の判定までは行えず、多検体解析には時間と労力がかかる。ASP-PCR法ではPCRの後に電気泳動、PCR-RFLP法ではPCRの後に制限酵素反応と電気泳動が必要となる。これらの工程が省略でき、ワンステップで遺伝子型の判定まで行うことが出来れば、さらに解析スピードが向上し、多検体解析に適していると考えた。そこで、一度の反応で結果解析が可能なリアルタイムPCR解析法の一つであるTaqMan®プローブ法を検討した。TaqManプローブ法は、通常のPCR増幅用プライマーセットの他にもう一つ、TaqManプローブと呼ばれるオリゴヌクレオチドを使用するSNP解析法である。TaqManプローブは末端の片方を蛍光物質、もう一方は蛍光を吸収するクエンチャー物質で修飾されている。DNAポリメラーゼによる複製に伴い、鋳型DNAに特異的にハイブリダイズしたTaqManプローブは、複製酵素による5'-3'エキソヌクレアーゼ活性により分解される。すると、分解されクエンチャーから遊離した蛍光分子から蛍光が発せられ、その発色により遺伝子型が判定される。蛍光検出の際には、ハロゲンタングステンランプの光が反応液に照射され、遊離された蛍光分子を励起させることにより蛍光が発生し、その蛍光の波長のみを通すフィルターを通過してCCDカメラにより検出される。サンプル上部のCCDカメラで蛍光が検出されるため、濾紙が集光を阻害する可能性が考えられた。そこで、測定を阻害を回避するために、水溶紙（水により形状崩壊し、分散する紙）<sup>9)</sup>を新たに検討し、濾紙および

水溶紙の TaqMan プローブ法への影響について調べた。

## 第 1 項 濾紙および水溶紙の TaqMan プローブ法への影響

### 【目的】

濾紙や水溶紙そのものあるいは抽出物、および濾紙や水溶紙による蛍光検出の影響について検討を行った。

### 【方法】

- **サンプル**： $1.0 \sim 1.0 \times 10^7$  コピーの *ADH1B*\*2/\*2 遺伝子の一部を組み込んだプラスミドをテンプレートとした。
- **反応条件**：*ADH1B* を対象遺伝子とし、ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) にて、TaqMan プローブ法を用いて解析を行った。Thunderbird Probe qPCR Mix (QPS-101, TOYOBO) 10  $\mu$ L, 50 $\times$ ROX reference dye (TOYOBO) 0.4  $\mu$ L, 20 $\times$ *ADH1B* TaqMan Probe & *ADH1B* Primer Mix (C\_2688467\_20, TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays, ABI) を 1  $\mu$ L,  $1.0 \sim 1.0 \times 10^7$  コピーのプラスミドを 1  $\mu$ L, および DW を添加し合計 20  $\mu$ L の反応溶液とした。反応条件は ABI 社の推奨条件とした。50 $^{\circ}$ C 2 分, 95 $^{\circ}$ C 10 分, 40 サイクルの熱変性 95 $^{\circ}$ C 15 秒, アニーリングおよび伸長反応 60 $^{\circ}$ C 1 分を行った。

反応液に直径 1.2 mm または 2.0 mm の濾紙または水溶紙 (60MDP, Mishima Dissolve Paper, 日本製紙パピリア株式会社) を添加した群, および濾紙・水溶紙を添加していない群 (コントロール) の 5 群で増幅反応の比較を行った。

- **結果解析**: ABI Prism 7300 SDS ソフトウェアを用いて解析し, コントロール群とその他の群の判定結果および増幅曲線を比較した。また, PCR 産物の確認はマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を用いた。

### 【結果】

判定結果および増幅曲線を Fig. 6 に示した。まず, コントロールの図 Fig. 6 (A) を用いて説明する。判定結果の図では, 蛍光強度の X 値が高ければ *ADH1B*\*1/\*1 (丸形で表示), Y 値が高ければ *ADH1B*\*2/\*2 (ひし形で表示), X, Y 値のどちらも高く図中右上に位置すれば *ADH1B*\*1/\*2 (三角形で表示) と判定できる。10 倍ずつ段階希釈した *ADH1B*\*2/\*2 のプラスミドをテンプレートとしたため, X 値は低値でほぼ変化がなく, Y 値が変化した結果が得られた (Fig. 6 (A))。増幅の様子をリアルタイムモニタリングした増幅曲線を右図に示した。PCR 増幅産物量が蛍光検出できる量に達すると増幅曲線が立ち上がり始め, 指数関数的にシグナルが上昇したのち, 定常状態に達する。図では縦軸に蛍光強度 Rn をとったため, 増幅シグナルが直線的に示された。初発の DNA 量が多いほど, 増幅産物量は早く検出可能な量に達するので, 増幅曲線が速いサイクルで立ち上がる。本実験では, 段階希釈したプラスミドを使用したため, 初発 DNA 量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が得られた。今回は約 3.5 サイクルごとに立ち上がりがずれた増幅曲線が得られた。また, 検出限界値は  $10^3$  コピーであった (Fig. 6 (A))。PCR 反応では 1 サイクルごとに DNA が 2 倍ずつ増幅され, 増

幅産物は  $2^n$  ( $n$  はサイクル数) となる. 今回は 10 倍ずつ段階希釈を行ったプラスミドを用いたため,  $2^n = 10$  を計算すると  $n=3.3$  となり, 約 3.5 サイクルずつずれるのは理論的に正しい結果であったと言える.

直径 1.2 mm および 2.0 mm 濾紙の結果を Fig. 6 (B) (C)に示した. 判定結果の図では  $ADH1B*2/*2$  の位置に現れるはずだが, 直径 1.2 mm と 2.0 mm のどちらも, ほぼ全てのサンプル結果が  $ADH1B*1/*2$  の位置に現れた. また増幅曲線の図では, テンプレートの増幅が確認できたが, どの量のテンプレートも 1 サイクル目から徐々に曲線が立ち上がっており, テンプレートの増幅に由来していないと思われるベースラインの上昇が認められた. このベースラインの上昇が, 遺伝子型がすべて  $ADH1B*1/*2$  と誤判定されていた原因だと考えられた. PCR 産物を確認したところ, 濃度依存的な PCR 産物を確認することができたため, この現象は濾紙による増幅反応への影響によるものではないことが明らかとなった. そこで, 濾紙の蛍光測定への影響を調べるため, 誤判定が認められた反応液から濾紙を除去し, 最終段階の蛍光検出を再度行った. その結果, ポジティブコントロールと同じく遺伝子

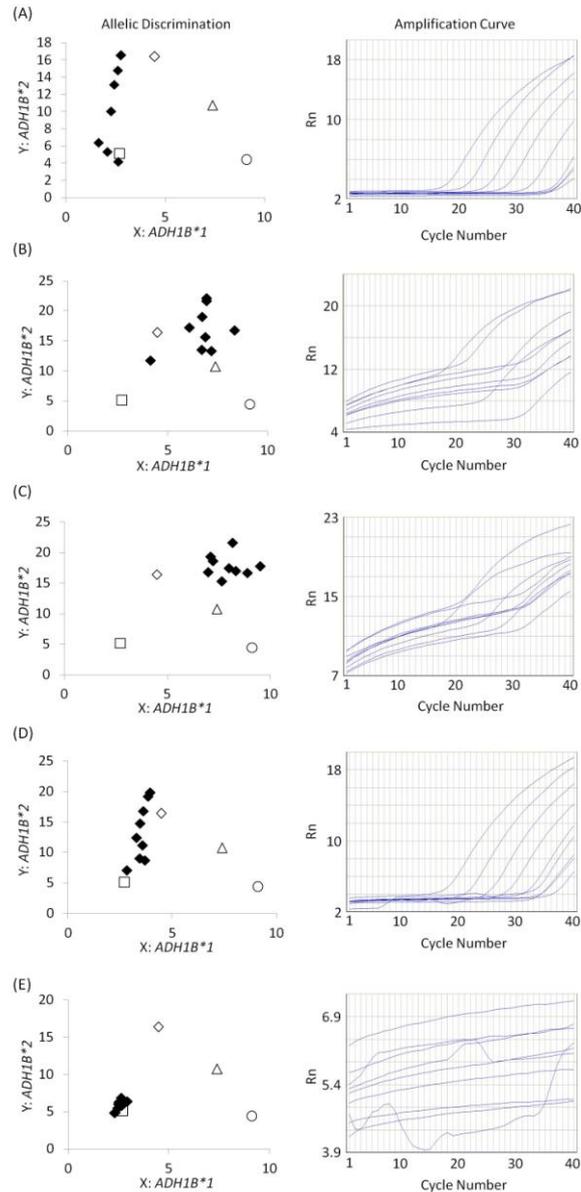


Fig. 6. Comparison the effect of filter paper and water-soluble paper on Realtime PCR genotyping *ADH1B*. (A) Control:  $1.0 \sim 1.0 \times 10^7$  copies of plasmid DNA is used as a template. (B)~(E): Filter paper or water-soluble paper is added in the same composition mixtures of the control. (B) A 1.2 mm diameter of filter paper (C) A 2.0 mm diameter of filter paper (D) A 1.2 mm diameter of water-soluble paper (E) A 2.0 mm diameter of water-soluble paper. ○: Positive control of *ADH1B\*1/\*1*, ◇: Positive control of *ADH1B\*2/\*2*, △: Positive control of *ADH1B\*1/\*2*, □: Negative control, ◆:  $1.0 \sim 1.0 \times 10^7$  copies of plasmid DNA of *ADH1B\*2/\*2*. The position of a given symbol was defined by the fluorescence reading obtained for the two fluorogenic probes. The X-axis represented the ratio of the fluorescence intensity for the allele-specific probe labeled with the VIC and ROX passive reference dye; the Y-axis represents the ratio of the fluorescence intensity for the allele-specific probe labeled with the FAM and ROX passive reference dye.

型を正しく判定することが可能であった。この結果より、この誤判定の原因は、濾紙の増幅阻害ではなく、光路阻害によるものであることが明らかとなった。以上のことから、濾紙は TaqMan 法において、増幅反応には影響を及ぼさないが、蛍光測定に影響を及ぼし、誤判定を引き起こすため、使用に適していないことが明らかとなった。

次に、水溶紙添加群の判定結果および増幅曲線を Fig. 6 (D) (E) に示した。直径 1.2 mm の判定結果の図では、コントロールと同様に、X 値は低値でほぼ変化がなく、Y 値が濃度依存的に変化した結果が得られた (Fig. 6 (D))。しかし直径 2.0 mm の判定結果の図では、結果はすべてネガティブコントロールの位置に現れ、全く反応していなかった (Fig. 6 (E))。増幅曲線の図を見ると、直径 1.2 mm では、コントロールと同様に濃度依存的に増幅し、検出限界値は  $10^3$  コピーであった (Fig. 6 (D))。一方直径 2.0 mm では増幅曲線は変化がなく横ばいであった (Fig. 6 (E))。増幅への影響を調べるため、PCR 産物を確認したところ、直径 1.2 mm の水溶紙では濃度依存的な PCR 産物が認められ、直径 2.0 mm では PCR 産物が認められなかった。この結果から、直径 1.2 mm の水溶紙は増幅反応および蛍光測定に影響を及ぼさず、利用可能であるが、直径 2.0 mm の水溶紙は増幅を阻害することが示唆された。水溶紙の溶出成分の中に増幅を阻害する成分が含まれていると考えられた。直径 1.2 mm (表面積  $1.13 \text{ mm}^2$ ) と 2.0 mm (表面積  $3.14 \text{ mm}^2$ ) では表面積が 3 倍ほど異なるため、直径 2.0 mm の水溶紙を添加した場合は阻害物質の溶出量が多くなり、増幅反応を阻害してしまったのだと考えられた。以上の結果より、水溶紙は蛍光検出には影響を及ぼさないが、増幅反応を阻害することが明らかとなった。直径 2.0 mm の水溶紙は溶出する阻害物質が多くなり、反応を阻害することから利用できないが、直径 1.2 mm の水溶紙では反応阻害が認められず、TaqMan プローブ法に利用可能であることがわかった。

## 第 2 項 生体サンプルを直接用いた TaqMan プローブ法の検討

### 【目的】

水溶紙が利用可能であることが明らかとなったため、水溶紙に検体を付着させたものをプラスミドの代わりに使用し、解析が可能か検証した。また毛髪を使用して TaqMan プローブ法にて解析が可能か検討した。

### 【方法】

#### ■ サンプル：

条件設定：被験者 1 名の血液、唾液、毛髪検体を第 1 節第 2 項記載の方法で採取した。血液および唾液検体は水溶紙に塗布し乾燥させたものの直径 1.2 mm および 2.0 mm を反応液に添加して反応を行った。毛髪はチューブの壁に沿わせ、毛根の部分を反応液に挿入して反応を行った。また毛髪の長さによる反応への影響を調べるため、1 名の被験者より毛髪を 4 本採取し、毛根から 15, 10, 6, 4 mm の位置で切断し、長さの異なる毛髪を使用した。

実証実験：第 3 節にて遺伝子型を判定済みの被験者 8 名の血液、唾液、毛髪検体を第

1 節第 2 項記載の方法で採取した。血液および唾液検体は水溶紙に塗布し乾燥させたものの直径 1.2 mm を、毛髪は毛根部を直接反応液に入れ使用した。

■ **反応条件：**

条件設定では *ADH1B* 遺伝子、実証実験では *ADH1B* および *ALDH2* 遺伝子を対象遺伝子とした。クルードサンプルの影響を考慮し、以下の a~c 法の条件を検討した。なお、直接 TaqMan 反応を行う方法を Direct-TaqMan 法、PCR 産物を TaqMan 反応に持ち込む方法を PCR-TaqMan 法と称することとする。

a 法：KOD FX Neo Buffer 未添加の Direct-TaqMan 法：前節の条件と同じ。

b 法：KOD FX Neo Buffer 添加の Direct-TaqMan 法：前節の反応組成に 2×KOD FX Neo バッファーを 2.0 μL 添加し、合計 20 μL とした。

c 法：PCR-TaqMan 法：第 3 節の PCR 条件で PCR を行ったのち、PCR 産物を 1 μL 使用して TaqMan 反応を行った。Thunderbird Probe qPCR Mix (QPS-101, TOYOBO) 5 μL, 50×ROX reference dye (TOYOBO) 0.2 μL, 20×*ADH1B* TaqMan Probe & *ADH1B* Primer Mix (C\_2688467\_20, TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays, ABI) あるいは 20×*ALDH2* TaqMan Probe & *ALDH2* Primer Mix (C\_11703892\_10, ABI) を 0.5 μL, テンプレートとして PCR 産物を 1 μL, および DW を添加し合計 10 μL の反応溶液とした。反応条件は全て前節と同様に行った。医療センター

■ **結果解析：**ABI Prism 7300 SDS ソフトウェアを用いて解析し、遺伝子型を判定した。

【結果】

唾液検体では直径 1.2 mm と 2.0 mm のどちらも a 法：KOD FX Neo Buffer 未添加の Direct-TaqMan 法, b 法：KOD FX Neo Buffer 添加の Direct-TaqMan 法, c 法：PCR-TaqMan 法のすべての方法で解析が可能であった。一方血液検体では直径 1.2 mm では b 法と c 法, 直径 2.0 mm では c 法でのみ解析が可能であった。また蛍光強度においては、いずれのサンプルも a 法, b 法, c 法の順に蛍光強度が大きくなった (Fig. 7)。

プラスミドをテンプレートとした上記の実験では、直径 2.0 mm の水溶紙は増幅反応を阻害していたが、唾液を付着させた直径 2.0 mm の水溶紙では増幅が可能であった。唾液には水分が含まれているため、水溶紙の中央に滴下すれば、そこから外側へ浸み出して行く。その過程で、ペーパークロマトグラフィーのように反応阻害物質も外側へと移動したのではないかと考えられた。反応阻害物質が外側へ移動したことにより、解析に用いた水溶紙の中央部分の阻害物質量は減少し、付着した唾液の DNA の増幅が可能であったと考えられる。この仮説を確認するため、水溶紙にイオン交換水を滴下し乾燥させたものを、プラスミドをテンプレートとした反応液に添加し、TaqMan 法を行った。結果、増幅阻害は起こらず、プラスミドの増幅が可能であった。このことから、反応阻害物質が水分によって外側へ移動したという仮説は正しいと判断できた。血液においては直径 1.2 mm では増幅が可能であったが、直径 2.0 mm では増幅が不可能であった。上記から、血液を滴下した場合も水溶紙の反応阻害物質は外側へ移動し、使用した部分の阻害物質は減少していると考えられること

から、直径 2.0 mm の血液検体において増幅が起こらなかったのは別の原因であると考えられた。直径 2.0 mm の血液検体を添加した反応溶液では血液が流出し、反応溶液が赤くなっていた。一方直径 1.2 mm の血液検体では、反応液の色は変わっておらず、血液の流出が少量であることが示唆された。よって、増幅に影響を及ぼすような血液成分が多く流出したため、増幅が阻害されたのではないかと考えられた。

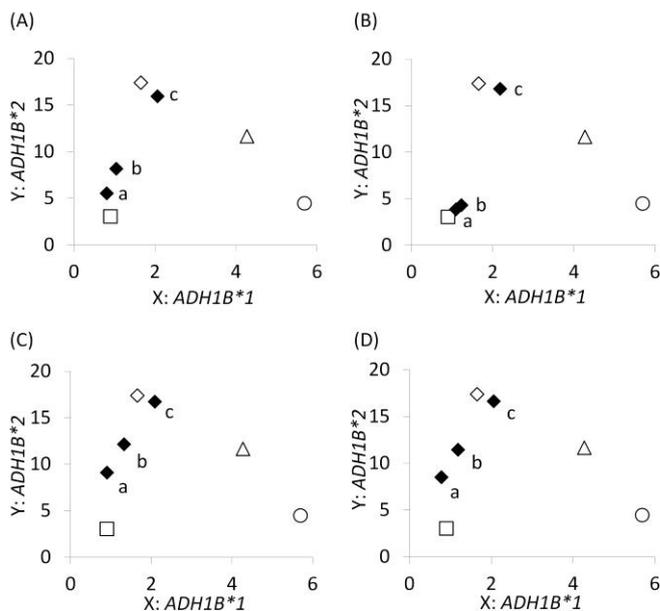


Fig. 7 Allelic discrimination plots of three different TaqMan Methods. (A) Dried whole blood attached to a 1.2 mm diameter of water-soluble paper. (B) Dried whole blood attached to a 2.0 mm diameter of water-soluble paper. (C) Dried saliva attached to a 1.2 mm diameter of water-soluble paper. (D) Dried saliva attached to a 2.0 mm diameter of water-soluble paper. a: a result of direct-TaqMan method without KOD FX Neo Buffer, b: a result of direct-TaqMan method adding KOD FX Neo Buffer, c: a result of PCR-TaqMan method. Each symbol and X and Y-axis are represented in the same way in Fig. 6.

毛髪検体を解析した結果、全ての方法で解析が可能であり、蛍光強度は血液および唾液検体と同じく a, b, c 法の順に大きくなった。

毛髪の長さが影響するかどうか検討を行った結果、15 mm < 4 mm < 6 mm < 10 mm の順に高い値が得られ、10 mm および 6 mm が解析に適していると言えた (Fig.8) . 反応液に挿入した際に、10 mm および 6 mm の毛髪はチューブの壁に沿わして挿入することが出来、反応液面の水平を維持することができた。しかし 15 mm は長すぎるため完全に壁に沿わすことが出来ず、また 4 mm は短すぎるために反応液に浮いてしまい、こちらもチューブの壁に沿わすことは出来なかった。15 mm または 4 mm を挿入した反応液の液面は、毛髪により表面張力がかかり、水平ではなかった。この状態が光路に影響を及ぼし、反応液中の蛍光色素の測定に影響を及ぼしている可能性が考えられた。以上、毛髪検体はチューブの壁に沿う適切な長さに切断すれば、TaqMan 法にて解析が可能であることが明らかとなった。

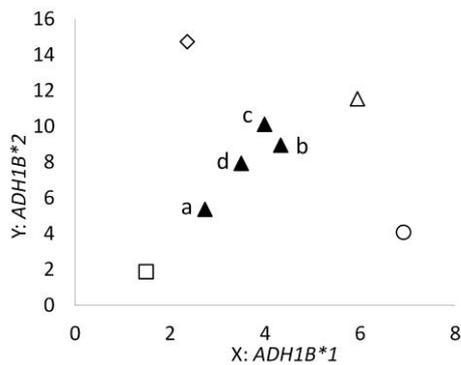


Fig. 8 Results of the *ADH1B* genotype of hair-root samples. The hair lengths from the roots were as follows: a) 15 mm, b) 10 mm, c) 6 mm, and d) 4 mm. They all were from one subject who had the \*1/\*2 type of *ADH1B*. The unmarked round, diamond and triangle marks indicate positive controls of allele \*1/\*1, \*2/\*2 and \*1/\*2, respectively. The Negative Control is indicated by a square shape. The X-axis and the Y-axis are represented in the same way as in Fig. 6.

実証実験として 8 名の生体サンプルを用いて解析を行った結果、唾液検体は b 法および c 法において、血液検体と毛髪検体は c 法において 8 名全員の遺伝子型を判定することができ、すべてのサンプルにおいて PCR-RFLP 法と同じ結果が得られた。上記以外の組み合わせでは得られた蛍光強度が低く各遺伝子群のプロットが隣接したため、誤判定の危険性が示唆された。よって、唾液検体では b 法:KOD FX Neo Buffer 添加の Direct-TaqMan 法および c 法: PCR-TaqMan 法を推奨し、血液検体と毛髪検体は c 法を推奨することとした。

以上, DNA 抽出・精製工程を除いたリアルタイム PCR 法の開発に成功した<sup>10)</sup>。

## 第 5 節 血液・唾液・毛髪の PCR 産物量の比較

### 【目的】

以上の解析において、血液・唾液・毛髪の 3 種の検体を使用したが、これらの検体の増幅効率に差があるのかどうか、PCR 法にて比較を行った。さらに、採取した唾液検体の細胞塗布量の均一性について検証した。PCR 反応には濾紙に付着した検体を直径 2.0 mm にくり抜き使用するため、このくり抜く部位による DNA 量のばらつきを調べた。

### 【方法】

- **サンプル**：血液は 7 名、唾液と毛髪はそれぞれ 10 名の被験者から第 1 節第 2 項と同様に検体を採取した。唾液検体は塗布した部分をボールペンで囲い、印を付けた。唾液を濾紙の中央に滴下した場合、外側へ水分が浸み出していく。そのため、外側は水分のみで、中央部に口腔内細胞が付着されていると考えられる。よって濾紙の中央部直径 10 mm の範囲からランダムに 5 か所くりぬき使用した。
- **反応条件**：第 1 節第 2 項の方法で PCR を行った。
- **結果解析**：マイクロチップ電気泳動装置で算出された PCR 産物量を確認した。

### 【結果】

PCR 産物量の平均値±標準偏差値は血液 130.8±13.9 ng, 唾液 133.7±24.4 ng, 毛髪 124.2±63.9 ng であり、平均値で見ると 3 種全ての検体で SNP 解析を行うのに十分な PCR 産物が得られた。しかし標準偏差が表すように、検体の種類により被験者間での個体差の程度が異なっていた。血液、唾液、毛髪の順に個体差が大きくなり、毛髪においては 10 名中 2 名のサンプルではほとんど増幅しなかった (Fig.9)。毛髪は、皮膚の中にある毛根と皮膚の

外にある毛幹に分けられ、毛根の一番根元の毛球部位に存在する細胞から溶出する DNA がテンプレートとなると考えられる。そのため毛根ごと採取しなければ、解析は難しい。また毛髪の色・染色やパーマなどにより毛髪にダメージが与えられ、毛根に付着する細胞の数が少ない人も考えられるため、そのような毛髪では解析が難しい。今回 PCR 産物がほとんど確認されなかった 2 名の毛髪は、以上の理由により毛根の細胞が少なかったと考えられる。血液検体は個体差が一番小さく、安定して一定の PCR 産物量を得ることができた。しかし採取方法が侵襲的であるため、対象者が健常者である場合には協力が得られない可能性がある。以上のことから、健常者を対象とした遺伝子検査には、唾液検体が最適であると考えた。

唾液検体の付着した濾紙をランダムに 5 か所使用し PCR を行った結果、PCR 産物量の平均値±標準偏差値は 122.8±41.7 ng であり、濾紙の中心を使用した上述の結果 133.7±24.4 ng よりも平均値が小さく、偏差値が大きくなった。この結果より、唾液検体は均一に付着されておらず、中心からずれると細胞数が減少することが明らかとなった (Fig.10)。しかし、得られた PCR 産物量の最小値は 17.7 ng であり、第 1 節の測定結果より、直径 2.0 mm の濾紙を添加した場合の  $10^3$  コピーのプラスミド DNA と同程度の PCR 産物が得られていた。第 1 節および第 4 節の結果より、PCR の検出限界値は  $10^2$  コピー、TaqMan 法の検出限界値は  $10^3$  コピーであったことから、濾紙の中央部直径 10 mm の範囲であれば、検出限界値以上の DNA 量を得られることがわかった。なお、直径 10 mm は直径 2.0 mm 切片を 25 個得られる面積であり、解析には十分な範囲であると言える。

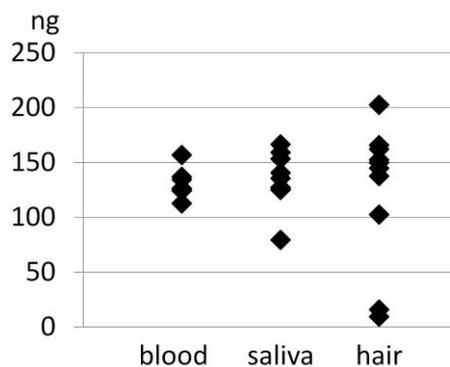


Fig. 9 Quantities of PCR products from three kinds of specimens, dried whole blood and saliva on a 2.0 mm diameter of filter paper and hair.

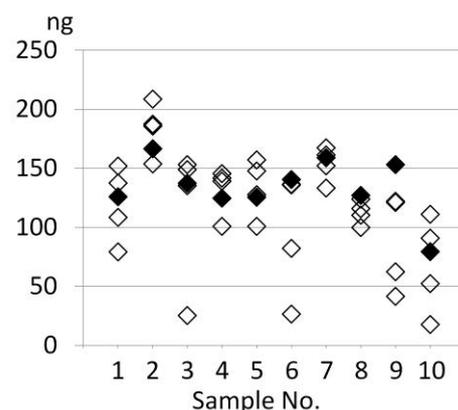


Fig.10 Quantities of PCR product from saliva of 10 people. ◆: The center spot of saliva attached filter paper. ◇: Other spots of saliva attached filter paper.

## 第2章 新規 SNP タイピング法の正確性の検証

### 第1節 新規 PCR-RFLP 法の正確性の検証

国立病院機構久里浜医療センター（以下、医療センターと略す）のアルコール依存症患者 300 名の血液検体を使用し、医療センターの遺伝子解析結果と武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学研究室の結果を比較し、開発した PCR-RFLP 法の正確性を検証した<sup>11)</sup>。

#### 【方法】

- **サンプル:** アルコール依存症患者 300 名の血液検体を使用した。医療センターでは血液検体から抽出した DNA を、本研究室では濾紙に浸みこませ、乾燥させた血液検体を用いた。
- **反応条件:** 医療センターでは既存の PCR-RFLP 法、本研究室では第1章 第3節の方法で遺伝子解析を行った。

#### 【結果】

300 検体全てにおいて両者は完全に一致し、本研究室で新規に開発した PCR-RFLP 法は正確に *ALDH2* 及び *ADH1B* 遺伝子の一塩基多型を検出できることを確認した。

### 第2節 新規 TaqMan PCR 法の正確性の検証

国立病院機構久里浜医療センターのアルコール依存症患者 114 名の血液および唾液検体を使用し、医療センターの遺伝子解析結果と本研究室の結果を比較し、開発した TaqMan PCR 法の正確性を検証した<sup>12)</sup>。

#### 【方法】

- **サンプル:** 国立病院機構久里浜医療センターで採取したアルコール依存症患者 114 名の血液および唾液検体を使用した。
- **反応条件:** 血液検体は医療センターにて DNA 抽出を行い、PCR-RFLP 法を用いて遺伝子解析を行った。唾液検体は本研究室にて KOD FX Neo Buffer 添加の Direct-TaqMan 法および PCR-TaqMan 法（第1章 第4節 第2項に記述）を用いて遺伝子解析を行った。

#### 【結果】

114 検体全てにおいて両者は完全に一致し、本研究で新規に開発した TaqMan PCR 法は正確に *ALDH2* 及び *ADH1B* 遺伝子の一塩基多型を検出できることを確認した。

本実験ではアルコール依存症患者を対象としたため、本研究で開発した SNP タイピング法を応用する意義を考察した。アルコール依存症患者 114 名の遺伝子多型分布は以下の通りであった。*ALDH2* 遺伝子型の各人数は \*1/\*1 は 92 名 (80.7%)、\*1/\*2 は 21 名 (18.4%)、\*2/\*2 は 1 名 (0.9%) であり、\*1 と \*2 のアレル頻度は 0.899 と 0.101 であった。*ADH1B* 遺伝子型の各人数は \*1/\*1 は 37 名 (32.5%)、\*1/\*2 は 32 名 (28.1%)、\*2/\*2 は 45 名 (39.5%) であり、\*1 と \*2 のアレル頻度は 0.465 と 0.535 であった (Table 1)。アルコール依存症患者の遺伝子多型分布は既報にもある通り<sup>13)</sup>、健常者の分布<sup>14)</sup>と大きく異なる結果となった。

*ALDH2* および *ADH1B* の遺伝子型より、酵素活性を想定し、A～E の 5 種類の飲酒に対する体質型を設定している<sup>15,16)</sup> (Table 2) . アルコール体質型も遺伝子多型分布と同様、アルコール依存症患者は既報の健常者の分布と大きく異なった.

本研究ではアルコール依存症患者を被験者としたため、健常者の遺伝子頻度<sup>14)</sup>と大きく異なる結果となり、アルコールに対する体質タイプ A～E の分類に於いても既報<sup>15,16)</sup>の結果を再現できた (Table 2) . 多量飲酒後にアルコールが長時間体内に残りやすい A タイプは、健常者と比較してアルコール依存症患者で非常に頻度が高かった. 同様の体質の C タイプも 2 倍程度頻度が高くなったが、アルデヒドの影響を多少受けるため、A タイプ程ではなかった. 一方でアルデヒドが溜まりやすい D タイプは、健常者と比較してアルコール依存症患者で半分以下の頻度となり、アルデヒドの代謝が最も遅い E タイプは、アルコール依存症患者では極めてまれであった. 体質タイプによるアルコール依存症と、それに付随する様々な健康障害の警鐘を目的とした遺伝子検査において、簡便で正確なツールとして非常に有用であることが明らかとなった.

Table 1 Genotype and Allele frequencies for *ALDH2* and *ADH1B* genes.

	Genotype frequency N (%)			Allele frequency	
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1	*2
<i>ALDH2</i>	92 (80.7) [54.2]	21 (18.4) [39.6]	1 (0.9) [6.2]	0.90 [0.74]	0.10 [0.26]
<i>ADH1B</i>	37 (32.5) [5.9]	32 (28.1) [35.7]	45 (39.4) [58.4]	0.46 [0.24]	0.54 [0.76]

[ ]: genotype frequency (%) and allele frequency of normal subjects<sup>6)</sup>.

Table 2 Phenotype frequencies for alcohol-related gene types.

<i>ADH1B</i>	<i>ALDH2</i>	Type	N (%)
*1/*1	*1/*1	A	32 (28.1) [4.1]
*1/*2	*1/*1	B	24
*2/*2	*1/*1		36 } (52.7) [53.9]
*1/*1	*1/*2	C	5 (4.4) [2.5]
*1/*2	*1/*2	D	8
*2/*2	*1/*2		8 } (14.0) [32.5]
*1/*1	*2/*2	E	0
*1/*2	*2/*2		0
*2/*2	*2/*2		1 } (0.9) [7.0]

[ ]: frequency (%) of normal subjects<sup>14)</sup>

### 第3節 従来法と新規 SNP タイピング法の比較

本研究にて新規に開発した SNP タイピング法を Table 3 にまとめた。Direct-TaqMan 法では唾液検体、PCR-RFLP 法および PCR-TaqMan 法では血液・唾液・毛髪全ての検体を用いて遺伝子解析が可能であった。また血液および唾液を付着させる紙については、Direct-TaqMan 法は水溶紙、その他の方法では濾紙で解析が可能となった。また精度に関して、今までの解析結果を記した。血液検体は PCR-RFLP 法で 100% の解析率を得ることができ、また唾液検体は PCR-RFLP 法で 95.2%、Direct-TaqMan 法で 96.5%、PCR-TaqMan 法で 100% の解析率となり、全ての方法において 95% 以上の解析率を得ることができた。またこれらの方法は上述のとおり正確性が実証されており、高性能な方法であると言える。

さらに、従来の SNP タイピング法と、本研究で新規に開発した方法を比較検討した (Table 4)。従来法では、DNA の抽出・精製が必要であるため、時間と費用が多くなる。一方本研究で開発した方法は、前処理の工程を必要としないため、従来法が 15~20 時間要するのに対しわずか 2~4 時間で、さらに 1/2 の費用で検査が可能であり、非常に有益な方法であると言える。

検証実験で用いた血液サンプルは被験者にとって侵襲的であり、本研究のように入院・通院患者に対して実施する場合には特に問題にならないが、個別化医療のための予防措置や遺伝子教育など健常者を対象にした場合には、唾液が適当であると考えられる。様々な遺伝子解析業者がメディアにも載るようになり唾液を使用する業者もあるが、DNA を抽出して保存することが多く、遺伝情報の利用という点で倫理的な問題が残る。本論文で使用した唾液塗布水溶紙は、数~十数回程度の使用でサンプルが尽きてしまうため、使用後は廃棄処分となり、オートクレーブ等の特殊な滅菌処理なく廃棄可能である。また DNA もある程度断片化してしまっているため、ゲノムワイドな解析はほぼ不可能である。更に乾燥唾液サンプルは、室温で安定した保存が可能であるので、通常郵便物として郵送可能であり、アルコール体質遺伝子検査を普及させるためには非常に大きなメリットとなる。サンプルの保存期間も最低一年間は SNP 解析が可能であった<sup>10)</sup>。

Table 3. Comparison among our SNP typing methods.

	Specimens			Kit	Analytical Rate	
	Blood	Saliva	Hair			
ASP-PCR	○	○	○	filter paper	22/25 (hair)	88.0%
PCR-RFLP	○	○	○	filter paper	300/300 (blood) 40/42 (saliva)	100.0% 95.2%
Direct-TaqMan (adding KOD FX Neo Buffer)	×	○	△	water soluble paper	110/114 (saliva)	96.5%
PCR-TaqMan	○	○	○	filter paper	114/114 (saliva)	100%

Table 4. Comparison between conventional SNP typing methods and our methods

	Method Type	Extraction	PCR	Electrophoresis	Time (hr)	Cost (¥)/Sample
Conventional Method	ASP-PCR	○	○	○	17	557
	PCR-RFLP	○	○	○	18	637
	TaqMan	○	-	-	16	607
New Method	PCR-RFLP	-	○	○	4	296
	Direct-TaqMan	-	-	-	2	216
	PCR-TaqMan	-	○	-	4	234

Direct-TaqMan represents the Direct-TaqMan method adding KOD FX Neo Buffer. The cost describes genotyping *ALDH2* and *ADH1B* genes for one sample.

### 第3章 新規 SNP タイピング法のアルコールリテラシー教育への利用

第1章および第2章で正確かつ簡便な SNP タイピング法を確立できたため、遺伝子検査を用いた教育への応用を検討した。アルコール代謝酵素は遺伝子型と表現型との関連が明白であり、また飲酒に対する個人差は誰もが興味を持つ事項であることから、遺伝に関する教育ツールとして最適な対象遺伝子であると考えた。ヨーロッパ人では *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子の野生型の割合が非常に高く、変異型である *ALDH2\*2* のアレル頻度は 0%、*ADH1B\*2* のアレル頻度は 5~10% であるのに対し<sup>17,18)</sup>、日本人では *ALDH2\*2* のアレル頻度は約 45%、*ADH1B\*2* のアレル頻度は 85% 以上である<sup>7,17,18)</sup>。そのため日本人には飲酒に対して弱い体質が多く存在し、日本人にとって自分の遺伝子型をもとに表原形質を把握しておくことは非常に重要であると言える。また体質に伴い、飲酒習慣も人によって異なるが、飲酒習慣の程度を測定できるものとして、AUDIT スクリーニングテストが利用されている。AUDIT は世界保健機構 (WHO) によって作成された、短時間で飲酒習慣をスクリーニングし、評価する方法である。テストは 10 項目からなり、各項目の回答に従って 0 点から 4 点の点数が付与されている。テスト全体では最低が 0 点、最高が 40 点となる。AUDIT スコアにより 4 つのリスクレベルが設定されている。1~7 点はリスク I 群で低リスク飲酒あるいは非飲酒状態、8~15 点はリスク II 群で中リスク飲酒、16 点以上はリスク III 群で高リスク飲酒、20 点以上はリスク IV 群でアルコール依存症の治療が必要な状態とみなされる<sup>19)</sup>。

そこで本研究では、アルコール代謝酵素の遺伝子解析を第1章で開発した SNP タイピング法を用いて実施し、遺伝子型から飲酒に対する表現型を想定し、アルコールリテラシーに関する教育活動を実施した。さらに飲酒に伴う表現形質が予測できる遺伝体質型判定の代替法として、エタノールパッチテストの有用性と信頼性を評価した。

#### 第1節 アルコール体質型の設定および AUDIT スコアとの関連性

##### 【方法】

*ALDH2* および *ADH1B* の遺伝子型より、酵素活性を想定し、A~E の 5 種類の飲酒に対するアルコール体質型を設定した。さらに AUDIT スクリーニングテストを用いて、設定した体質型と飲酒習慣との関連性を調査した<sup>12)</sup>。

1028 名 (男性 406 名、女性 618 名) の健常者を対象に、第1章第1節記載の方法で唾液検体を採取し、第1章第4節記載の PCR-TaqMan 法にて *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子の解析を行い、A~E の体質型に分類した<sup>b)</sup>。さらに AUDIT スクリーニングテストを実施し、体質型と飲酒習慣との関連性が見られるか調査を行った。

##### 【結果】

体質型の分類は久里浜医療センターの横山頭先生の協力のもと考案した。*ALDH2* は 4 つのサブユニットタンパクから成る酵素であり、変異型アレル *ALDH2\*2* により生成されるサブユニットタンパクが 4 つのうち 1 つでも含まれると、その *ALDH2* 酵素は活性を示すこと

ができなくなる。従って、野生型ホモ *ALDH2\*1/\*1* と比べてヘテロ *ALDH2\*1/\*2* は理論的には 1/16 の酵素活性、変異型ホモ *ALDH2\*2/\*2* は酵素活性を示さないため<sup>20)</sup>、野生型ホモ *ALDH2\*1/\*1* は活性型、ヘテロ *ALDH2\*1/\*2* は低活性型、変異型ホモ *ALDH2\*2/\*2* は不活性型、と分類できる。ADH の酵素活性は *ADH1B* 遺伝子型により異なり、変異型アレル *ADH1B\*2* を有すると野生型アレル *ADH1B\*1* に比べ酵素活性が高くなることが明らかとなっている<sup>21,22)</sup>。よって、ADH の酵素活性は *ADH1B\*1/\*1* を低活性型、*ADH1B\*1/\*2*, *\*2/\*2* を高活性型と分類できる。飲酒時の動悸や皮膚の紅潮などの不快な症状（フラッシング反応）は、アセトアルデヒドが原因で生じるため、飲酒に対する体質は、アルデヒドの分解を行う *ALDH2* の活性に大きく依存すると言える。そこで体質型は、まず *ALDH2* 遺伝子型より 3 つに分類し、さらに *ADH1B* 遺伝子型より 2 つに分類した。活性型 *ALDH2* (*ALDH2\*1/\*1*) を保有するアルデヒドの分解が速い群（A または B 型）、低活性型 *ALDH2* (*ALDH2\*1/\*2*) を保有するアルデヒドの分解が遅い群（C または D 型）、不活性型 *ALDH2* (*ALDH2\*2/\*2*) を保有するアルデヒドの分解ができない群（E 型）、と分類した。さらに前者 2 つの群を *ADH1B* 遺伝子型より分類し、低活性型 ADH (*ADH1B\*1/\*1*) を持つ群と高活性型 ADH (*ADH1B\*1/\*2* または *\*2/\*2*) を持つ群とに分け、A～E 型と設定した。つまり、A 型は活性型 *ALDH2* (*ALDH2\*1/\*1*) および低活性型 ADH (*ADH1B\*1/\*1*)、B 型は活性型 *ALDH2* (*ALDH2\*1/\*1*) および高活性型 ADH (*ADH1B\*1/\*2* または *\*2/\*2*)、C 型は低活性型 *ALDH2* (*ALDH2\*1/\*2*) および低活性型 ADH (*ADH1B\*1/\*1*)、D 型は低活性型 *ALDH2* (*ALDH2\*1/\*2*) および高活性型 ADH (*ADH1B\*1/\*2* または *\*2/\*2*)、E 型は不活性型 *ALDH2* (*ALDH2\*2/\*2*) を保有する群とした（Table 5）。

Table 5 A classification table for types from *ALDH2* and *ADH1B* genes.

ALDH2		ADH		Type
Genotype	Activity	Genotype	Activity	
<i>ALDH2*1/*1</i>	Active	<i>ADH1B*1/*1</i>	Low activity	A
		<i>ADH1B*1/*2</i>	High activity	B
		<i>ADH1B*2/*2</i>		
<i>ALDH2*1/*2</i>	Low activity	<i>ADH1B*1/*1</i>	Low activity	C
		<i>ADH1B*1/*2</i>	High activity	D
		<i>ADH1B*2/*2</i>		
<i>ALDH2*2/*2</i>	Inactive	<i>ADH1B*1/*1</i>	Low activity	E
		<i>ADH1B*1/*2</i>	High activity	
		<i>ADH1B*2/*2</i>		

*ALDH2* および *ADH1B* の遺伝子解析の結果を Table 6 に示した。男女とも、どちらの遺伝子のアレル頻度も既報<sup>7,23)</sup>と一致していた。体質型別の AUDIT スコアの平均値を Table 7 に示

した。男性においては、A型のAUDITスコアが一番高く、B～E型は順にAUDITスコアが低下しており、体質型とAUDITスコアとの関連性が示唆された。女性においては、A・B型がC・D・E型に比べAUDITスコアが高くなっていた。WHOにより設定されたリスクレベル別にAUDITスコアを分類し、各体質型のリスクレベルの割合をFig. 11に示した。最もお酒に弱いE型のスコアと比較した場合、男性ではB型の8～15点の割合およびA型の20点以上の割合が有意に多かった。また女性ではB型の8～15点の割合が有意に多かった。つまり、男性ではA型とB型において、女性ではB型においてリスクのある飲酒習慣をしている人が多いことが明らかとなった。さらにAUDITの質問1～3において、体質型別に回答の割合を比較した結果をFig. 12に示した。男性では、A型からE型の順に飲酒頻度が低くなり、また飲酒量が少なくなっていくことが明らかとなった。また問2において、通常飲酒量が「5単位以上」と答えた割合はA型で40%、B型で34%と、E型に比べ有意に大きく、さらにそのうち「10単位以上」と答えた割合はA型でA型全体の13%、B型でB型全体の1%であり、B型に比べA型において有意に大きかった。よって、多量飲酒群はA・B型で有意に多く、またA型の飲酒量は特に多いことが明らかとなった。また、問4「飲み始めると止められなかった経験」問5「普通だと思えることを飲酒していったために出来なかった経験」問8「飲酒のため前夜の出来ごとを思い出せなかった経験」において、「過去1年間で経験がある」と答えた人の割合がE型に比べA型およびB型で有意に大きかった。問8においてはまた、「1カ月に1度以上経験している」と答えた割合がB型に比べA型で有意に大きかった。以上の結果より、A型およびB型では問題飲酒群が多く、さらに飲酒による問題行動の経験数が多いことが明らかとなった。女性ではA型からE型の順ではなかったが、E型に比べA・B・D型において有意に飲酒頻度が高く、また飲酒量が多いことが明らかとなった(Fig. 12)。以上の結果より、ALDH2およびADH1B遺伝子型は飲酒習慣に影響を及ぼし、設定した体質型を用いると、体質型と飲酒習慣との関連性を説明できることが明らかとなった。

Table 6 Genotype and Allele frequencies for ALDH2 and ADH1B genes.

A) Males					
	Genotype frequency N (%)			Allele frequency	
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1	*2
ALDH2	206 (50.7)	170 (41.9)	30 (7.4)	0.72	0.28
ADH1B	27 (6.7)	152 (37.4)	227 (55.9)	0.25	0.75
B) Females					
	Genotype frequency N (%)			Allele frequency	
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1	*2
ALDH2	347 (56.1)	217 (35.1)	54 (8.7)	0.74	0.26
ADH1B	47 (7.6)	224 (36.2)	347 (56.1)	0.26	0.74

Table 7 AUDIT score averages among alcohol types.

Genotype		Type	Male		Female	
<i>ADH1B</i>	<i>ALDH2</i>		N (%)	AUDIT	N (%)	AUDIT
*1/*1	*1/*1	A	15 (3.7)	10.8	30 (4.9)	3.7
*1/*2	*1/*1	B	191 (47.0)	9.0	317 (51.3)	4.0
*2/*2	*1/*1					
*1/*1	*1/*2	C	11 (2.7)	5.5	11 (1.8)	1.6
*1/*2	*1/*2	D	159 (39.2)	5.1	206 (33.3)	2.7
*2/*2	*1/*2					
*1/*1	*2/*2	E	30 (7.4)	3.0	54 (8.7)	1.3
*1/*2	*2/*2					
*2/*2	*2/*2					

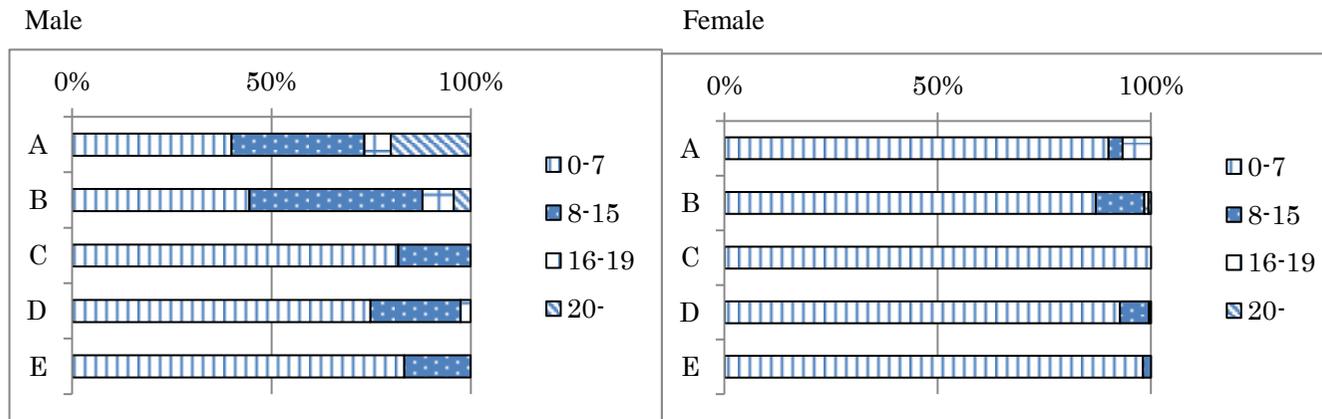
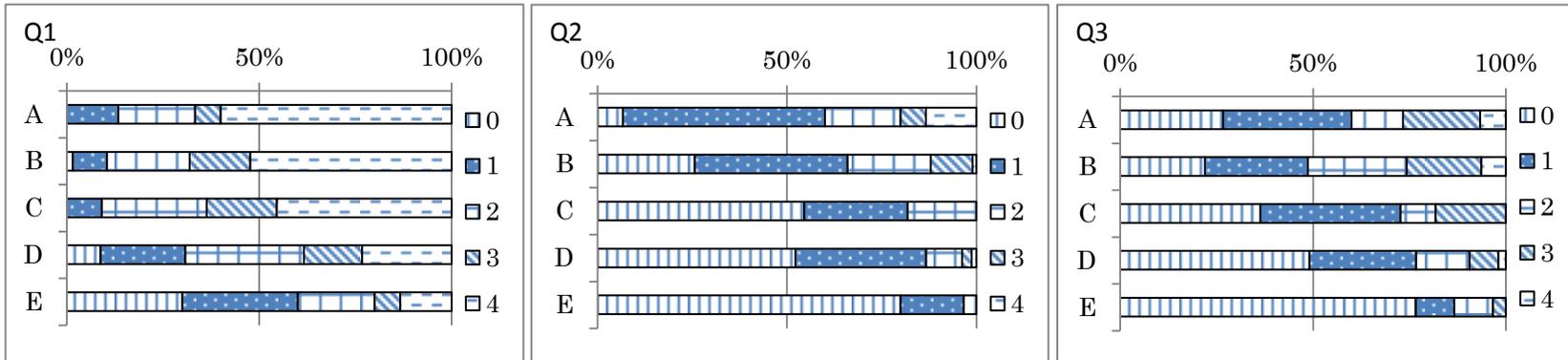


Fig. 11 Distribution of AUDIT scores of alcohol consumption among alcohol types., 0-7: Low risk drinking or abstinence, 8-15: Hazardous drinking, 16-19: Harmful drinking, 20-: Possible alcohol dependence.

Male



Female

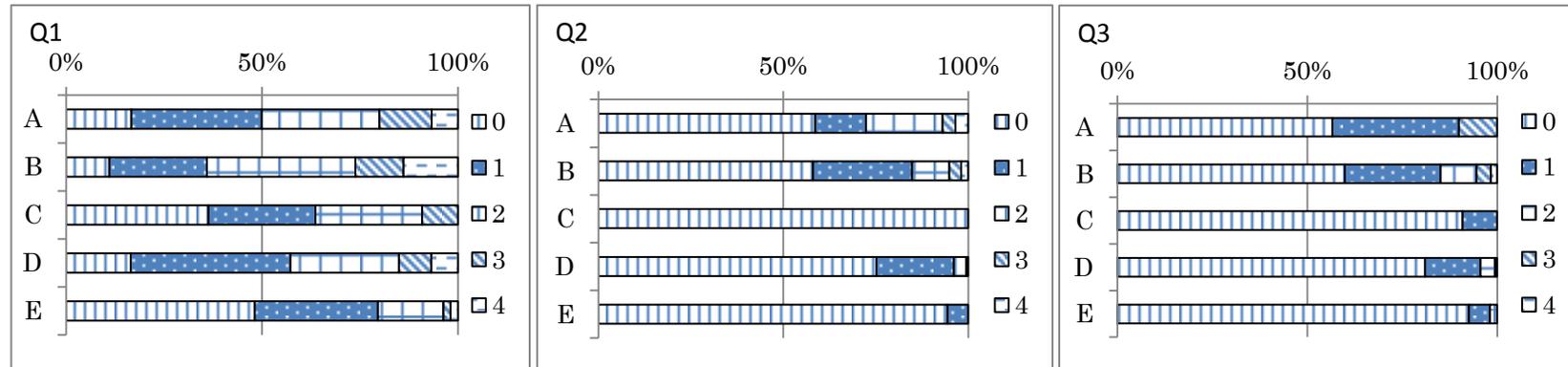


Fig. 12 Distribution of answers of AUDIT questionnaire among alcohol types., Q1: How often do you have a drink containing alcohol? 0: Never, 1: Monthly or less, 2: 2 to 4 times a month, 3: 2 to 4 times a week, 4: 4 or more times a week. Q2: How many drinks containing alcohol do you have on a typical day when you are drinking? 0: 1 or 2, 1: 3 or 4, 2: 5 or 6, 3: 7 or 9, 4: 10 or more. Q3: How often do you have six or more drinks on one occasion? 0: Never, 1: Less than monthly, 2: Monthly, 3: Weekly, 4: Daily or almost daily.

## 第2節 遺伝子検査を用いたアルコールリテラシー教育への展開

### 【方法】

*ALDH2* および *ADH1B* のアルコール体質遺伝子検査を用いて、適正飲酒の教育に利用するためのツールを新たに作成し、遺伝子教育および適正飲酒のための教育方法を検討した。

作成した教育ツールを用いて、本学学生の希望者 4115 名を対象に、*ALDH2* および *ADH1B* の遺伝子解析を用いた教育を行った<sup>a)</sup>。唾液検体は第1章第1節に記載の方法で採取し、第1章第4節記載の PCR-TaqMan 法 (c 法) で *ALDH2* および *ADH1B* の遺伝子解析を行った。

### 【結果および考察】

遺伝子解析の結果、4115 名中 4060 名が解析可能、55 名が解析不可能であった。4060 名の *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子型の割合およびアレル頻度を Table 8 に、*ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子型を組み合わせた場合の割合を Table 9 に示した。アレル頻度は既報と一致した<sup>7,23)</sup>。

Table 8 Genotype and Allele frequencies for *ALDH2* and *ADH1B* genes.

	Genotype frequency N (%)			Allele frequency	
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1	*2
<i>ALDH2</i>	2217 (54.6)	1604 (39.5)	239 (5.9)	0.74	0.26
<i>ADH1B</i>	221 (5.4)	1484 (36.6)	2355 (58.0)	0.24	0.76

Table 9 Genotype and phenotype for *ALDH2* and *ADH1B* genes.

<i>ALDH2</i>	Genotype		Phenotype			
	<i>ADH1B</i>	N	%	Type	N	%
*1/*1	*1/*1	125	3.1%	A	125	3.1%
*1/*1	*1/*2	795	19.6%	B	2092	51.5%
*1/*1	*2/*2	1297	31.9%			
*1/*2	*1/*1	82	2.0%	C	82	2.0%
*1/*2	*1/*2	614	15.1%	D	1522	37.5%
*1/*2	*2/*2	908	22.4%			
*2/*2	*1/*1	14	0.3%	E	239	5.9%
*2/*2	*1/*2	75	1.8%			
*2/*2	*2/*2	150	3.7%			

大学生らの飲酒事故が相次ぐなか、各大学が対策を進めている。本学でも当教育法を用いて、大学一年生を対象に教育を実施している。講義だけでなく遺伝子検査を利用して学生自身の飲酒に対する体質型を通知することにより、学生はより積極的に講義に参加し、適正飲酒の重要性を理解することができると考える。また、自身の表現形質だけでなく、日本人には様々な表現形質が存在し、飲酒を無理強いすることの危険性を学ばせることができた。現在、大学一年生を対象としたアルコールリテラシー教育の一環で年間 1000 件ほどの遺伝子検査を実施しているが、これほどの多検体を正確に、かつ迅速に解析可能であることから、第1章および第2章で述べた新規 SNP タイピング法の有用性は明らかである。検体を唾液としていることから健常者である大学生でも抵抗なく採取が可能であり、また濾紙（または水溶紙）に付着させたのちは常温保管で問題

ないことから、管理が容易で非常に扱いやすい。特別な機器が必要ないことから、どのような機関においても容易に利用できる解析法であると言える。

### 第3節 未成年者に対するアルコールリテラシー教育への展開

#### 【目的】

若年者の飲酒事故を防止するためには、未成年者への教育は非常に重要であり、学校薬剤師の重要な役割のひとつとも言える。しかし前節の教育法を適用するには、遺伝子検査を行うため保護者の同意が必要となり、容易に実施することができない。またアルコールを飲めない年代に対して、飲んだ結果である表現形質型やタイプを提示するのは道義的にも問題がある。そこで、遺伝体質型判定の代替法として、飲酒に対する表現形質検査の一般的な方法であるエタノールパッチテストに着目した。教育において一般的に広く使用されているエタノールパッチテストであるが、その結果の正確性は明確ではなく、遺伝子型との一致率は約 70%に留まり正確性が低いとの報告さえ存在する<sup>24)</sup>。そこでエタノールパッチテストの結果と *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子型の関連を調べ、正確性を検証し、教育において有用であるかを評価した。

#### 【方法】

942 名の本学生を対象にエタノールパッチテストおよび *ALDH2* と *ADH1B* の遺伝子解析を実施し、エタノールパッチテストの信頼性を検証した<sup>9)</sup>。検体は唾液とし、第1章 第1節と同様の方法で採取し、第1章 第4節に記載の PCR-TaqMan 法 (c 法) で解析を行った。さらにエタノールパッチテストを行い、その陽性率と、*ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子多型との関連性を検証した。エタノールパッチテストの方法としては、70%エタノール 3 滴を救急絆創膏に浸みこませ、上腕の内側に 7 分間貼付した。その後救急絆創膏をはがし、はがした直後の皮膚の紅潮の有無を確認した。さらに 10 分後、皮膚の紅潮の有無を確認した。皮膚の紅潮が認められれば陽性、認められなければ陰性と判定した。なお、皮膚の紅潮の確認は本研究室教員が行った。なお、エタノールパッチテストに対する *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子型の影響は  $\chi^2$  検定または Fisher の正確確率検定にて統計解析を行った。

#### 【結果および考察】

*ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子を解析した結果、*ALDH2* の遺伝子型の割合は *ALDH2*\*1/\*1=551 名 (54.2%)、*ALDH2*\*1/\*2=373 名 (39.6%)、*ALDH2*\*2/\*2=58 名 (6.2%) であり、\*1 と \*2 のアレル頻度は 0.74 と 0.26 であった。*ADH1B* の遺伝子型の割合は *ADH1B*\*1/\*1=56 名 (5.9%)、*ADH1B*\*1/\*2=336 名 (35.7%)、*ADH1B*\*2/\*2=550 名 (58.4%) であり、\*1 と \*2 のアレル頻度は 0.24 と 0.76 であり、両遺伝子とも既報と一致した<sup>7,23)</sup> (Table 10)。アレル頻度と個人の遺伝子型の関連性を比較するため、ハーディ・ワインベルグ平衡検定を行った結果、*ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子型のアレル頻度はハーディ・ワインベルグの法則に従っていた ( $\chi^2=0.86, 0.24$ )。

*ALDH2* および *ADH1B* の遺伝子型を組み合わせた場合の、救急絆創膏をはがした直後と 10 分後の結果を Table 11 に記す。直後 (A) と 10 分後 (B) で、各遺伝子群におけるエタノールパッチテストの陽性反応の傾向は同じであり、いずれにおいてもほぼ同じ群で有意差が認められた。*ALDH2* 遺伝子型を比較すると、*ADH1B*\*1/\*2 および *ADH1B*\*2/\*2 の群において、*ALDH2*\*2 アレルを有する場合は *ALDH2*\*1/\*1 を有する場合と比べ陽性率が有意に高値であった ( $p < 0.0001$ )。また、

*ALDH2*\*1/\*2 と \*2/\*2 間でも陽性率に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。すなわち, *ADH1B*\*1/\*1 の群以外では *ALDH2*\*2 アレルを持つほど高い陽性率が認められた。*ALDH2*\*1/\*1 の群において *ADH1B* 遺伝子型を比較すると, *ADH1B*\*2/\*2 で他の遺伝子型と比較して有意差が認められた (Table 11A  $p = 0.0183$ ; Table 11B  $p = 0.0331$ )。 *ALDH2*\*1/\*2 の群においては *ADH1B*\*1/\*1 に比べ *ADH1B*\*1/\*2 および \*2/\*2 で陽性率が有意に高値であった ( $p < 0.0001$ )。

Table 10 Comparison of allele frequencies for *ALDH2* and *ADH1B* genes between this study and previous study.

	<i>ALDH2</i>		<i>ADH1B</i>	
	*1	*2	*1	*2
This Study	0.74	0.26	0.24	0.76
Previous Study (Japanese) <sup>2,17)</sup>	0.79	0.21	0.26	0.75
Previous Study (European) <sup>15,16)</sup>	1.0	0.0	0.9~0.95	0.05~0.1

Table 11 Positive ethanol patch test results in female Japanese university students according to their combination of *ALDH2* genotype and *ADH1B* genotype.

A) Positive rates immediately after removing the patch

<i>ADH1B</i> genotype	<i>ALDH2</i> genotype		
	*1/*1	*1/*2	*2/*2
*1/*1	1/32 (3.1%)	3/23 (13.0%)	0/1 (0.0%)
*1/*2	13/164 (7.9%)	100/154 (64.9%) <sup>a**</sup>	17/18 (94.4%) <sup>ab</sup>
*2/*2	49/315 (15.6%) <sup>†</sup>	143/196 (73.0%) <sup>a**</sup>	37/39 (94.9%) <sup>ab</sup>

B) Positive rates 10 min after removing the patch

<i>ADH1B</i> genotype	<i>ALDH2</i> genotype		
	*1/*1	*1/*2	*2/*2
*1/*1	1/32 (3.1%)	2/23 (8.7%)	0/1 (0.0%)
*1/*2	19/164 (11.6%)	135/154 (87.7%) <sup>a**</sup>	18/18 (100.0%) <sup>a</sup>
*2/*2	56/315 (17.8%) <sup>*</sup>	173/196 (88.3%) <sup>a**</sup>	39/39 (100.0%) <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> Significant versus *ALDH2*\*1/\*1 in the same row ( $p < 0.0001$ )

<sup>b</sup> Significant versus *ALDH2*\*1/\*2 in the same row ( $p < 0.05$ )

<sup>\*\*</sup> Significant versus *ADH1B*\*1/\*1 in the same column ( $*p = 0.0331$ ,  $**p < 0.0001$ )

<sup>†</sup> Significant versus *ADH1B*\*1/\*2 in the same column ( $†p = 0.0183$ )

直後と 10 分後で, 有意差の認められた群はほぼ同じであったが, 10 分後の方が陽性率が高くなっていた。パッチテストの感度 (陽性反応を示した人数における実際に *ALDH2*\*1/\*2, \*2/\*2 を保有する人数の割合) および特異度 (陰性反応を示した人数における実際に *ALDH2*\*1/\*1 を保有する人数の割合) を算出したところ, 直後の結果は感度 69.6%, 特異度 87.7%, 10 分後の結果は感度 85.2%, 特異度 85.1%であった。感度, 特異度ともに高値であった 10 分後の結果をパッチテ

ストの最終結果とし、結果を ALDH2 および ADH の酵素活性をもとに分類した (Table 12)。ALDH2 では *ALDH2\*1/\*1* を活性型、*ALDH2\*1/\*2*, *\*2/\*2* を不活性型とし、ADH では *ADH1B\*1/\*1* を低活性型、*ADH1B\*1/\*2*, *\*2/\*2* を高活性型と分類した。ADH 高活性型においては、ALDH2 活性型に比べ不活性型で有意に陽性率が高く、全体の傾向と同一であった。しかし、ADH 低活性型では陽性率が非常に低く、ALDH2 活性型と不活性型で差が認められなかった。パッチテストの感度および特異度を ADH 活性型別に比較すると、感度は ADH 低活性型が高活性型より有意に低く (8.3% vs. 89.7%,  $p<0.0001$ )、特異度は ADH 低活性型が高活性型より有意に高かった (96.9% vs. 84.3%,  $p<0.05$ )。

Table 12 A results of ethanol patch test in Japanese female university students: Positive rates according to their combinations of ALDH2 activity and ADH activity and sensitivity and specificity of erythema as a marker for inactive ALDH2.

	ALDH2		Sensitivity	<i>p</i>	Specificity	<i>p</i>
	active	inactive				
ADH activity	76/511 (14.9%)	367/431 (85.2%)*	85.2%		85.1%	
Low activity	1/32 (3.1%)	2/24 (8.3%)	8.3%	] <0.0001	96.9%	] <0.05
High activity	75/479 (15.7%)	365/407 (89.7%)*	89.7%		84.3%	

Active ALDH2: *ALDH2\*1/\*1* genotype; inactive ALDH2: *ALDH2\*1/\*2* genotype and *ALDH2\*2/\*2* genotype  
 Low ADH activity: *ADH1B\*1/\*1* genotype; high ADH activity: *ADH1B\*1/\*2* genotype and *ADH1B\*2/\*2* genotype

\* Significant versus active ALDH2 in the same row ( $p<0.0001$ )

アレル頻度がハーディ・ワインベルグの法則に従っていたことから、*ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子は自然交配において均等に遺伝され、次世代においても同様の遺伝子頻度と考えることもよいことがわかった。既報のデータとも一致していることから、当データを日本人の遺伝子頻度と捉えることに大きな問題はないと言える。942 名もの多くの健常者のデータはほとんど報告がなく、当データにより *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子の正確な遺伝子頻度が明らかとなった。ヨーロッパ人では *ALDH2\*2* のアレル頻度は 0%、*ADH1B\*2* のアレル頻度は 5~10% であり<sup>17,18)</sup>、日本人のアレル頻度はヨーロッパ人と大きく異なることが明らかとなった。日本人ではヨーロッパ人に比べ、*ALDH2\*2* と *ADH1B\*2* のアレル頻度が高いため、飲酒後の不快な症状が発生する人の割合が多く存在すると考えられる。

エタノールは ADH により有害なアセトアルデヒドに分解され、さらに ALDH2 により無毒の酢酸に分解される。皮膚の紅潮はアセトアルデヒドの急峻な濃度上昇により引き起こされるため、エタノールパッチテストは皮膚の紅潮の有無をもとに ALDH2 の活性の違いを推測するツールとなっている。今回の結果より、*ALDH2* の遺伝子型に伴い皮膚の紅潮の発生頻度が異なることが明らかとなったが、*ALDH2* 遺伝子のみならず *ADH1B* 遺伝子の関与も明らかとなった。*ADH1B\*1/\*1* は ADH 低活性であるため、エタノールからアセトアルデヒドへの分解が遅く、アセトアルデヒドの急峻な増加が引き起こされないため皮膚の紅潮が発現しなかったと考えられる。

今回の結果から、パッチテストにおいて、*ADH1B* 遺伝子型は *ALDH2* 不活性型の偽陰性に関与していることがわかった。これらの結果は Takeshita ら<sup>23)</sup> が報告した男性 424 名のパッチテスト

の結果と一致していた。実際の飲酒時においても、*ADH1B* 遺伝子型は変異型ヘテロ *ALDH2\*1/\*2* 保有者のフラッシング反応に影響することが報告されている<sup>25)</sup>。さらに今回のパッチテストの結果では、不活性型 *ALDH2\*1/\*2* だけでなく活性型 *ALDH2\*1/\*1* の群においても *ADH1B* 遺伝子型の影響が認められた。活性型 *ALDH2\*1/\*1* は陽性反応が起こらないはずだが、*ALDH2\*1/\*1* 保有者で、かつ *ADH1B* 遺伝子型が *\*2/\*2* (高活性型) の保有者では *ADH1B\*1/\*1* (低活性型) 保有者に比べ陽性率が有意に高値であった。活性型 *ALDH2\*1/\*1* 保有者の *ADH1B* 遺伝子型の影響はまだ明らかとなっておらず、Takeshita ら<sup>23)</sup> の報告でもパッチテスト陽性率には有意差が認められたが、ビール飲酒時のフラッシング反応においては差が認められていない。つまり皮膚での代謝には関与が認められているが、肝代謝への影響についてはいまだ明らかとなっていない。しかし肝代謝でも *ADH1B* 遺伝子型が関与していると仮定すると、アルコール依存症患者が *ALDH2\*1/\*1* と *ADH1B\*1/\*1* を保有する人に多く認められることも頷ける。活性型 *ALDH2\*1/\*1* を保有していても *ADH1B\*2* アレルを保有していれば、紅潮反応の影響により依存性を回避できていると考えられるためである。今回は被験者の多くが未成年であるため、飲酒時の表現型を測定できなかったが、今後 *ALDH2* 活性型における *ADH1B* 遺伝子型の影響について、さらなる研究が必要と考えられる。

救急絆創膏をはがした直後と 10 分後の皮膚の紅潮については、感度と特異度のどちらも高値であった 10 分後の結果の方が判定に適切であることが明らかとなった。皮膚がすぐ赤くなる人は *ALDH2\*2/\*2* ではないかと想定していたが、今回の結果により、*ALDH2* のどの遺伝子型においても直後に皮膚の紅潮が認められる人が存在することがわかった。*ALDH2\*1/\*1* の群では割合は少ないが、*ALDH2\*1/\*2* においては直後の陽性率が約 65~75%であり、*ALDH2\*2/\*2* の反応と似ていた。このことから、皮膚の紅潮が生じる速度から *ALDH2* 遺伝子型を判定することは難しいことがわかった。パッチテストは *ALDH2* 活性型 (*ALDH2\*1/\*1*) と不活性型 (*ALDH2\*1/\*2*, *\*2/\*2*) を判別するツールとしては活用できるが、不活性型の 2 つの遺伝子型を紅潮の速度から判別することはできないことが明らかとなった。皮膚の紅潮が生じる速度とは別に、紅潮の度合い、つまり赤みの強さも人によりさまざまであったため、今後は赤みの強さと遺伝子型の関連性についても調査していく。

さらに、パッチテストの結果の違いの原因としては、アルコールの代謝経路の 1 つである Cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*) の遺伝子型の影響も考えられる。特に *ALDH2\*1/\*2* を保有し、かつ *ADH1B\*1/\*2* または *ADH1B\*2/\*2* を保有する群において、皮膚の紅潮の現れ方に違いが生じていた (Table 11)。この群では、陽性反応が認められなかった群、救急絆創膏をはがした直後に陽性反応が認められた群、直後には陽性反応が認められなかったが 10 分後に認められた群、の 3 群が一定の割合で存在した。そこで、この群 350 名のうち協力を得られた 73 名の被験者において、*CYP2E1* 遺伝子型の影響を調べた (データは割愛する)。*CYP2E1* 遺伝子には変異 *c2* アレルが日本人の約 20%の割合で存在する。その酵素の発現量は、*c1* アレルからの発現量より多く、酵素活性が高いため、アルデヒド産生能が高いことが報告されている<sup>26,27)</sup>。このため、すぐに紅潮反応が認められた群では *c2* アレルが多い、あるいは陽性反応が認められなかった群では *c1* アレルが多いのではないかと考えた。しかし、パッチテスト結果の異なる 3 群間で *CYP2E1c1* および *c2* の割合に違いは認められなかった (データは割愛する)。よってパッチテストへの反応の違いに *CYP2E1* 遺伝子型は関与していないことが示唆された。

以上の結果から、パッチテストは約 85%の正確性が得られることがわかった。さらに、約 15%の不一致において、一部 *ADH1B* 遺伝子型の関与が明らかとなった<sup>14)</sup>。既報では、50 代以上の男性 (n=239) においては、パッチテストと遺伝子型は約 70%しか一致せず、パッチテストは正確性が低いという報告がなされている<sup>24)</sup>。年齢や習慣的な飲酒に伴い、皮膚の反応が衰え、パッチテストの正確性が低下したのではないかと考えられる。本研究では被験者の多くが未成年であったため、飲酒経験がほとんどなく、また皮膚の反応性も高かったと考えられる。さらに被験者が多く (n=942)、各遺伝子型の人数が十分存在していたため、既報に比べ正確性の高い結果が得られた可能性が考えられた。

今回の結果から、若年層を対象とすれば、パッチテストは遺伝子検査から推定されるアルコール体質と約 85%の一致が得られることが明らかとなった。しかし、約 15%は不一致であるため、遺伝子検査の代替法としてパッチテストを利用することには問題があると考えた。特に大学生や高校生を対象とした飲酒に関する教育の際には、アルコールに弱いにも関わらず強いと誤認識することは危険である。今後、遺伝子型と表現型の相違を生む原因を明らかにし、より正確なテストの開発が必要である。

## 総 括

本研究では、遺伝子検査の教育への応用を目的に迅速かつ正確な SNP タイピング法の開発を行った。第 1 章では DNA 未抽出・未精製の生体サンプルを用いた SNP タイピング法の構築に成功した。生体サンプルを直接 ASP-PCR 法, PCR-RFLP 法および TaqMan PCR 法に添加し遺伝子解析を行う方法として、クルードなサンプルでの増幅効率の高い KOD FX Neo ポリメラーゼおよびバッファーを利用し、さらに定性濾紙あるいは水溶紙を利用した検査法を構築した。第 2 章では本研究にて新規に開発した SNP タイピング法の正確性を検証した。血液および唾液検体を用いて検証した結果、本検査法は抽出した DNA を用いる従来の遺伝子解析法と同一の結果を得ることができ、正確性を実証することができた。また本検査法は従来法に比べ安価で迅速な方法であり、さらに生体サンプルの管理が容易であることから、正確性のみならず汎用性の高い有益な検査法であると言える。第 3 章では新規に開発した検査法を用いたアルコールリテラシー教育への展開について報告した。ALDH2 および ADH1B 遺伝子型を解析し、飲酒に対する表現形質を判定し通知を行い、アルコールリテラシー教育へ利用した。さらに遺伝子型から想定される体質とエタノールパッチテストとの一致率を明らかにした。

本研究にて開発した SNP タイピング法はさまざまな研究に利用されている。科学警察研究所の岡村和子らは、飲酒運転による行政処分対象者のアルコール体質型との関連性の調査を行い、体質型の割合が一般人と異なることから、体質型と飲酒運転との関連性を明らかとした<sup>28)</sup>。熊本機能病院の水野雄二副院長らは冠攣縮性狭心症とアルコール代謝との関連性の調査を行い、冠攣縮性狭心症の患者では ALDH2\*2 アレルを保有する割合が健常者に比べ有意に高いことを明らかとした<sup>29)</sup>。和歌山県立医科大学医学部衛生学教室の吉益光一准教授らは、精神疾患とアルコール代謝酵素遺伝子型との関連性を調査し、D 型の被験者に比べ A 型の被験者において精神疾患のリスクが高いことを明らかとした<sup>30,31)</sup>。これらの研究は全て本研究で開発した解析法を利用したものである。当該解析法は非常に安価かつ迅速であることから、汎用性が高く、上記のような多検体解析を必要とする研究の活性化に有益であった。またこの解析法は ALDH2 および ADH1B 遺伝子のみならず、多種の SNP に応用可能であり、今後個の医療の発展に寄与できる重要な技術の一つであると考え<sup>32-35)</sup>。

以上、本研究にて新規に開発した SNP タイピング法はさまざまな研究に利用可能であり、今後遺伝子情報を用いた研究を活性化する方法論として重要な成果である。また遺伝子解析を用いた適正飲酒の教育は効果的であり、今後教育活動を進めることで個人の表現形質を認識した成人が増え、飲酒に伴う事故のない社会を実現するための遺伝子解析法および教育用ツールとして重要な研究成果である。さらに、将来薬剤師が本解析法を遺伝子解析のツールとして利用し、個別化医療の発展の一助となることを望む。

## 生体サンプルの提供について

本研究で用いた生体サンプルは、インフォームド・コンセントを行い書面で同意を得た被験者より提供していただいた。サンプルは番号を付して匿名化を行い、個人情報を保有しない状態で取り扱った。なお、本研究はヒトゲノム遺伝子解析研究の倫理指針に準拠した武庫川女子大学倫理委員会、および久里浜医療センターの遺伝子倫理委員会における審査後、承認のもとに実施した。

- a) 武庫川女子大学 倫理審査結果受付番号：09-36
- b) 武庫川女子大学 倫理審査結果受付番号：09-37
- c) 国立病院機構久里浜医療センター 遺伝子倫理委員会承認番号：G4
- d) 国立病院機構久里浜医療センター 遺伝子倫理委員会承認番号：G48
- e) 武庫川女子大学 倫理審査結果受付番号：11-41

## 謝 辞

本研究を進め、本論文をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました  
武庫川女子大学薬学部、木下健司教授、村田成範准教授に深く感謝致します。

また、本研究遂行にあたり、数々の有益な御助言、御支援を賜りました、国立病院機構  
久里浜医療センター 臨床研究部の横山顕部長、および和歌山県立医科大学医学部 公衆衛  
生学教室の竹下達也教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究に御協力くださいました、武庫川女子大学薬学部、ゲノム機能解析学研究  
室の助手の方々ならびに院生、学生、卒業生の皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり常に激励していただいた家族に心から感謝致します。

## 参考文献

- 1) Ota T.: 薬物代謝関連酵素遺伝子 *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A5* 及び *VKORC1* の高効率的な遺伝子多型解析法に関する研究. 武庫川女子大学, 博士 (薬学), 項第 124 号, 2014.
- 2) World Health Organization: Global strategy to reduce the harmful use of alcohol. 2010.
- 3) Yano K, Rhoads GG, Kagan A.: Coffee, alcohol and the risk of coronary heart disease among Japanese in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* 1997; 297: 405-409.
- 4) Marmot MG, Rose G, Shipley MJ, Thomas BJ.: Alcohol and mortality: a U-shaped curve. *Lancet.* 1981; 1: 580-583.
- 5) Iso H, Kitamura A, Shimamoto T, Sankai T, Naito Y, Sato S, Kiyama M, Iida M, Komachi Y.: Alcohol intake and the risk of cardiovascular disease in middle-aged men. *Stroke.* 1995; 26: 767-773.
- 6) Yoshida A, Huang IY, Ikawa M.: Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; 81(1): 258-261.
- 7) Takeshita T, Morimoto K, Mao X, Hashimoto T, Furuyama J.: Characterization of the three genotypes of low Km aldehyde dehydrogenase in a Japanese population. *Hum. Genet.* 1994; 94(3): 217-223.
- 8) Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K.: Single-Tube Genotyping from a Human Hair Root by Direct PCR, *Analytical Sciences*, 2009; 25: 1487-1489.
- 9) 盛岡弘康, 萩野明人, 松森泰明.: 水溶性感熱紙の開発. *紙パルプ技術協会*. 2011; 65(4): 32-35.
- 10) Hayashida M, Ota T, Ishii M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K.: Direct Detection of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) by the TaqMan PCR assay using Dried Saliva on Water-soluble Paper and Hair-roots, without DNA Extraction. *Analytical Sciences*. 2014; 30: 427-429.
- 11) Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Yokoyama A, Kinoshita K.: Genotyping of Polymorphisms in Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase Genes by Direct Application of PCR-RFLP on Dried Blood without DNA Extraction. *Analytical Sciences*. 2010; 26: 503-505.
- 12) 村田成範, 林田真梨子, 石黒裕子, 今関ひろみ, 林恵美子, 横山顕, 木下健司.: 乾燥唾液を用いたアルコール代謝関連遺伝子 *ADH1B* 及び *ALDH2* の SNP タイピング解析法の検証実験と妥当性確認. *臨床病理*. 2015; 63(11): 1253-1258.
- 13) Higuchi S, Matsushita S, Murayama M, Takagi S, Hayashida M.: Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphism and the risk for alcoholism. *Am. J. Psychiatry.* 1995; 152: 1219-1221.
- 14) 林田真梨子, 鎌田由佳, 大田智子, 児島沙由梨, 増見恭子, 村田成範, 木下健司.: 女子大

- 学生におけるエタノールパッチテストの反応性と *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子多型との関連, *日本衛生学雑誌*, 2015; 70: 134-138.
- 15) 横山 顕. 多量飲酒と消化器のがん. *アルコール健康医学協会 NEWS & REPORTS*. 2013; 19(2):2-7.
  - 16) 横山 顕. *ADH1B*, *ALDH2* の健康障害への影響. *Progress in Medicine*. 2013; 33(4):915-919.
  - 17) 吉原達也, 笹栗俊之.: *ALDH2* 遺伝子多型と臨床医学. 2012; 103(4): 82-90.
  - 18) 林田真梨子, 木下健司.: 飲酒と健康—アルコール体質検査と飲酒の功罪. *日本醸造協会誌*. 2014; 109(1): 2-10.
  - 19) World Health Organization: The Alcohol Use Disorders Identification Test: guideline for use in primary care, AUDIT, second edition. 2001.
  - 20) Enomoto N, Takase S, Yasuhara M, Takada A.: Acetaldehyde metabolism in different aldehyde dehydrogenase-2 genotypes. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 1991; 15(1): 141-144.
  - 21) Stamatoyannopoulos G, Chen SH, Fukui M.: Liver alcohol dehydrogenase in Japanese: high population frequency of atypical form and its possible role in alcohol sensitivity. *Am. J. Hum. Genet*. 1975; 27(6): 789-796.
  - 22) Suzuki Y, Fujisawa M, Ando F, Niino N, Ohsawa I, Shimokata H, Ohta S.: Alcohol dehydrogenase 2 variant is associated with cerebral infarction and lacunae. *Neurology*. 2004; 63: 1711-1713.
  - 23) Takeshita T, Mao XQ, Morimoto K.: The contribution of polymorphism in the alcohol dehydrogenase beta subunit to alcohol sensitivity in a Japanese population. *Hum. Genet*. 1996; 97: 409-413.
  - 24) Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Kumagai Y, Higuchi S, Ishii H.: Reliability of a flushing questionnaire and the ethanol patch test in screening for inactive aldehydedehydrogenase-2 and alcohol-related cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997; 6: 1105-1107.
  - 25) Luczak SE, Pandika D, Shea SH, Eng MY, Liang T, Wall TL. *ALDH2* and *ADH1B* interactions in retrospective reports of low-dose reactions and initial sensitivity to alcohol in Asian American college students. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35: 1238-1245.
  - 26) Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochromeP450III<sub>E1</sub> gene. *J Biochem* 1991; 110: 559-565.
  - 27) Watanabe J, Hayashi S, Kawajiri K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *J Biochem* 1994; 116: 321-326.
  - 28) Okamura K., Kinoshita K., Hayashida M., Kihira M., Kosuge R., Fujita G.: Preliminary results of pattern of alcohol metabolism among driving under the influence of alcohol offenders., 16<sup>th</sup>

*International Society of Addiction Medicine Annual Meeting*. 2014.

- 29) Mizuno Y, Harada E, Morita S, Kinoshita K, Hayashida M, Shono M, Morikawa Y, Murohara T, Nakayama M.: East asian variant of aldehyde dehydrogenase 2 (*ALDH2\*2*) is associated with coronary spastic angina: possible roles of reactive aldehydes and implications of alcohol flushing syndrome. *Circulation*. 2015; 131(19): 1665-1673.
- 30) Yoshimasu K, Mure K, Hashimoto M, Takemura S, Tsuno K, Hayashida M, Kinoshita K, Takeshita T, Miyashita K.: Genetic alcohol sensitivity regulated by *ALDH2* and *ADH1B* polymorphisms as indicator of mental disorders in Japanese employees. *Alcohol and Alcoholism*. 2014; 50: 39-45.
- 31) Yoshimasu K, Mure K, Hashimoto M, Takemura S, Tsuno K, Hayashida M, Kinoshita K, Takeshita T, Miyashita K.: Genetic alcohol sensitivity regulated by *ALDH2* and *ADH1B* polymorphisms is strongly associated with depression and anxiety in Japanese employees. *Drug and Alcohol Dependence*. 2015; 147: 130-136.
- 32) 林田真梨子, 小泉(岩尾)恭子, 村田成範, 木下健司, 遺伝子診断教育のための簡便な耳垢型遺伝子多型解析法. *分析化学*. 2010; 59: 613-617.
- 33) Ota T, Kamada Y, Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K.: Combination analysis in genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *CYP3A5* in the Japanese population. *Int.J.Med.Sci*. 2015; 12: 78-82.
- 34) Ota T, Hayashida M, Ishii M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K.: Long PCR-based genotyping for deleted *CYP2D6* gene without DNA extraction. *Drug Metab. and Pharmacokinet*. 2014; 29: 283-285.
- 35) Ota T, Hayashida M, Iwao-Koizumi K, Murata S, Kinoshita K.: High Performance and Straightforward Genotyping of the Cytochrome P450 2C9 (*CYP2C9*) and Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1 (*VKORC1*) Polymorphisms toward Personalized Medicine. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci*. 2014; 40: 402-408.