

## 論文内容の要旨

.....  
学位論文題名

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.

学位申請者 林田 真梨子 ⑩

### 【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応用できておらず、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溶液の状態で使用する。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応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、薬剤師が臨床現場で使用可能な、簡便かつ安価な遺伝子解析法の開発を検討した。また、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一塩基多型（Single nucleotide polymorphism: SNP）のタイピング法の開発を行った。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>1)</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 ALDH 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>2)</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、アルコールリテラシー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関連が明白であり、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アルコールリテラシー教育、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。

本論文では、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) e)</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できる。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。

#### <濾紙を直接反応液に添加した際の PCR への影響>

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。ALDH2 遺伝子を対象とした。模擬実験系として  $1.0 \sim 1.0 \times 10^6$  コピーの ALDH2 遺伝子の一部を組み込んだプラスミドをテンプレートとし、直径 1.2 mm あるいは 2.0 mm の定性濾紙 (No.1, ADVANTEC) を反応液に添加し、PCR を行い、増幅への影響を調べた。マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA, MCE-202, Shimadzu) にて PCR 産物を確認したところ、テンプレートのみを添加したポジティブコントロールの反応液と同様に、直径 1.2 mm および 2.0 mm の定性濾紙を添加した反応液において濃度依存的な PCR 産物を確認できた。検出限界値は、直径 1.2 mm の濾紙ではポジティブコントロールと同じく  $1.0 \times 10^1$  コピーであり、直径 2.0 mm の濾紙では  $1.0 \times 10^2$  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。

#### <血液・唾液・毛髪を用いた SNP タイピング法の検討>

濾紙自体が PCR に大きな影響を与えないことが明らかとなったため、次に生体サンプルを濾紙に付着させ、その小片を直接反応液に添加し、増幅が可能か検討を行った。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舌を擦るようにして唾液を集め、スポイドで採取したのを濾紙に塗布し、室温で十分に乾燥させた。その後検体の付着した部分を直径 1.2 mm または 2.0 mm にくり抜き、反応溶液に添加し、PCR を行った。マイクロチップ電気泳動装置にて確認したところ、唾液検体のみ PCR 産物が確認できたが、目的産物以外のバンドも増幅された。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状態（クルード）であるため、未精製のまま使用するとこれらの物質が PCR 反応に影響を与えていると考えられる。そこで、これまでは通常の Taq DNA ポリメラーゼを使用していたが、クルードサンプルの阻害に強い DNA ポリメラーゼキットである KOD FX Neo (KFX-201, TOYOBO) を使用したところ、血液・唾液どちらも目的の PCR 産物が得られた。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。反応液に添加する濾紙面積の大きいほど付着した細胞数も多く、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。

次に毛髪を使用する方法として、毛根を直接反応液に挿入し、反応をかける方法を検討した。KOD FX Neo を使用して、毛根部分を反応液に挿入し毛根細胞中の DNA をテンプレートとして PCR を行った結果、血液や唾液と同様に目的の PCR 産物が得られた。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。

## 第 2 節 ASP-PCR 法への応用

第 1 節で開発した DNA 抽出不要な PCR 法を応用し、Allele Specific Primer-Polymerase Chain Reaction (ASP-PCR) 法への応用を検討した。ALDH2 および ADH1B 遺伝子の SNPs に対応したアレル特異的なプライマーを設計し、PCR の後に電気泳動にて確認したところ、遺伝子型を判定でき、ASP-PCR 法へ応用することに成功した<sup>3)</sup>。

## 第 3 節 PCR-RFLP 法への応用

次に PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) 法による SNP タイピングを検討した。この方法は、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 SNP タイピング法である。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とに分かれ、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できるため、遺伝子型を判定することができる。

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* および *Msl I* 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。

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. *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解析を行ったところ, 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 (Fig.1). ゲル電気泳動により, *ALDH2*\*1/\*1 は 296 bp と 134 bp の 2 本のバンド, *ALDH2*\*2/\*2 は 430 bp の 1 本のバンド, *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.

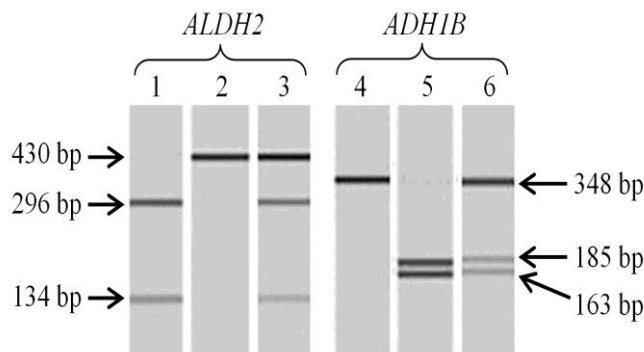


Fig.1. Genotype detection of *ALDH2* and *ADH1B* genes by PCR-RFLP method. Lane 1: *ALDH2*\*1/\*1 (296 and 134 bp), Lane 2: *ALDH2*\*2/\*2 (430 bp), Lane 3: *ALDH2*\*1/\*2 (430, 296, and 134 bp), Lane 4: *ADH1B*\*1/\*1 (348 bp), Lane 5: *ADH1B*\*2/\*2 (185 and 163 bp), Lane 6: *ADH1B*\*1/\*2 (348, 185,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

実証実験として 8 名の生体サンプルを用いて *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子の解析を行った. 8 名の被験者から第 1 節に記載の方法で血液, 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. 遺伝子解析を行った結果, 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シング法にて塩基配列を確認し, 未処理の生体サンプルを直接用いた遺伝子解析結果が間違いなく正確な結果であることを確認した.

次に, さらに検体数を増やし, 当方法にて多検体の解析が可能か検討を行った. 42 名の被験者から唾液を採取し, 遺伝子解析を行った<sup>a)</sup>. 唾液は第 1 節に記載の方法で採取し, 濾紙に添加し乾燥させたものを使用した. 結果, 42 名中 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できていなかったためであると考えられた.

以上, 生体サンプルを未処理の状態で使用し, PCR-RFLP 法において正確に SNP タイピングを行う方法を開発した.

#### 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できれば, 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. プローブの分解に伴い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, ハロゲンタンクステンランプの光が反応液に照射され, 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, 濾紙が集光を障害する可能性が考えられた. そこで, 測定の障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>4)</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.

#### <濾紙を直接反応液に添加した際の TaqMan プローブ法への影響>

濾紙そのものあるいは濾紙からの抽出物による反応への影響について, 並びに濾紙による蛍光検出の影響について検討を行った. *ADH1B* 遺伝子の一部を組み込んだプラスミド  $1.0 \sim 1.0 \times 10^7$  コピーをテンプレートとし, 直径 1.2 mm と 2.0 mm の濾紙を添加し, 増幅および測定への影響を調べた. 判定結果および増幅曲線を Fig. 2 に示した. まず, コントロールの図 Fig. 2 (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. 2 (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 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  $R_n$  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は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. 2 (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. 2 (B) および(C)に示した。判定結果の図では *ADHIB\*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 *ADHIB\*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 *ADHIB\*1/\*2* と誤判定されていた原因だと考えられた。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結果、ポジティブコントロールと同じく遺伝子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、濾紙の光路障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、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。

＜水溶紙を直接反応液に添加した際の TaqMan プローブ法への影響＞

次に、水溶紙そのものあるいは水溶紙からの抽出物による反応への影響について、並びに水溶紙による蛍光検出の影響について検討を行った。濾紙の場合と同じく、*ADHIB* 遺伝子

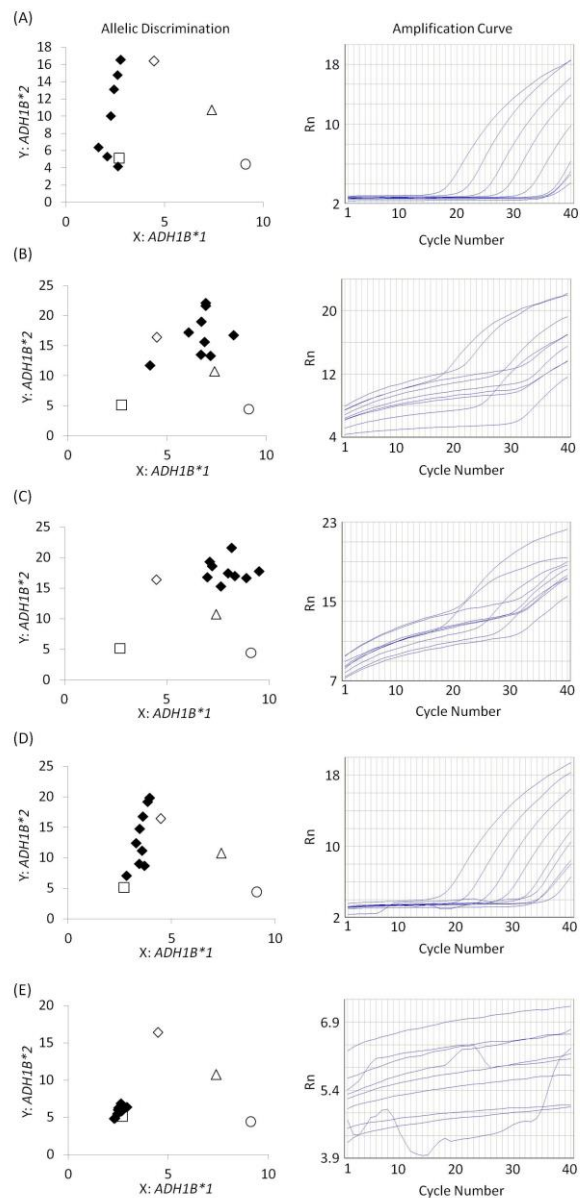


Fig. 2. Comparison the effect of filter paper and water-soluble paper on Realtime PCR genotyping *ADHIB*. (A) Control:  $1.0 \sim 1.0 \times 10^7$  copies of plasmid DNA is used as a template. (B)~(E): Filter paper or water-soluble paper is added in the same composition mixtures of the control. (B) A 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 *ADHIB\*1/\*1*, ◇: Positive control of *ADHIB\*2/\*2*, △: Positive control of *ADHIB\*1/\*2*, □: Negative control, ◆:  $1.0 \sim 1.0 \times 10^7$  copies of plasmid DNA of *ADHIB\*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.

の一部を組み込んだプラスミド  $1.0\sim 1.0\times 10^7$  コピーをテンプレートとし、直径 1.2 mm と 2.0 mm の水溶紙 (60MDP, Mishima Dissolve Paper, 日本製紙パピリア株式会社) を添加し、増幅および測定への影響を調べた。判定結果および増幅曲線を Fig. 2 (D) および(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. 2 (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. 2 (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. 2 (D))。一方直径 2.0 mm では増幅曲線は変化がなく非常に低い値のまま横ばいであった (Fig. 2 (E))。増幅への影響を調べるため、反応液をマイクロチップ電気泳動装置にて確認したところ、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。なお、直径 1.2 mm の水溶紙が利用可能であったことから、本研究では阻害物質の特定は行っていない。

#### <水溶紙を利用した TaqMan プローブ法の検討>

水溶紙が利用可能であることが明らかとなったため、プラスミドの代わりに生体サンプルを水溶紙に付着させたものを使用し、TaqMan プローブ法による解析を検討した<sup>5)</sup>。第 2 節と同様の反応条件で、プラスミドの代わりに水溶紙に付着させた血液および唾液検体の直径 1.2 mm の小片をテンプレートとし、解析を行った。その結果、唾液検体は解析可能であったが、血液検体は増幅反応が起こらず解析不可能であった。第 1 節と同様に血液サンプルではクルードな状態で使用した場合、反応阻害が強くなる考えられた。そこで、これまでの方法を a 法として、反応阻害を回避する方法 : b 法および c 法を検討した。b 法は、クルードサンプルの阻害に強い DNA ポリメラーゼバッファーである KOD FX Neo Buffer を a 法に追加し、解析を行う方法、c 法は第 1 節の方法で PCR 増幅を行い、その PCR 産物をテンプレートとして TaqMan 反応を行う 2 段階の方法である。PCR 産物のごく一部を使用すれば、血液検体の反応阻害は回避される可能性があり、また唾液検体においては採取したサンプル内の DNA 量が少量であっても明瞭な結果が得られるのではないかと考えた。PCR 産物を TaqMan 反応に持ち込む方法を PCR-TaqMan 法と称し、それに対して直接 TaqMan 反応を行

う方法を Direct-TaqMan 法と称することとする。以上、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 3 つの条件にて再度解析を行った。その結果、血液検体では b 法および c 法の条件で、唾液検体では a、b、c 法すべての条件で解析可能であり、蛍光強度の値は、a、b、c 法の順に大きくなった。(Fig. 3)。

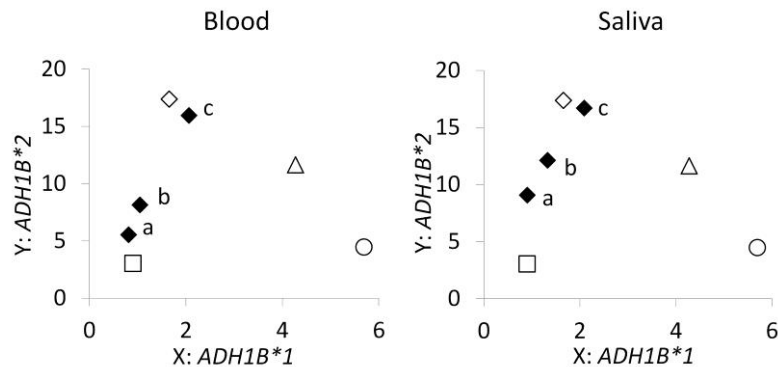


Fig. 3. Allelic discrimination plots of three different TaqMan Methods. Dried whole blood or saliva attached to a 1.2 mm diameter of water-soluble paper is used as a template. a: a result of direct-TaqMan method without KOD FX Neo Buffer, b: a result of direct-TaqMan method adding KOD FX Neo Buffer, c: a result of PCR-TaqMan method. Each symbol and X and Y-axis are represented in the same way in Fig. 2.

#### <血液・唾液・毛髪を用いた TaqMan プローブ法の正確性の検証および実証実験>

実証実験として第 2 節の PCR-RFLP 法で解析済みの 8 名の血液、唾液、毛髪サンプルを用いて、上述の a、b、c 法の 3 つの条件にて *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子の解析を行った。唾液検体は b 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。

#### 第 5 節 血液・唾液・毛髪の PCR 産物量の比較

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。血液は 7 名、唾液と毛髪はそれぞれ 10 名の被験者から検体を採取し、増幅の違いを検討した。第 1 節の方法で PCR を行い、マイクロチップ電気泳動装置で算出された PCR 産物量を確認したところ、PCR 産物量の平均値±標準偏差は血液 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、



毛髪の際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。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、毛根の細胞が十分に付いていなかったと考えられた。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。

## 【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、本研究室で開発した PCR-RFLP 法の正確性を検証した<sup>b)6)</sup>。医療センターでは血液検体から DNA 抽出を行い PCR-RFLP 法を用いて遺伝子解析を行った。一方本研究室では、濾紙に浸みこませ、乾燥させた血液検体を用いて上述の PCR-RFLP 法にて遺伝子解析を行った。その結果、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

医療センターにてアルコール依存症患者 114 名より血液および唾液検体を採取し、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い、唾液検体は本研究室にて KOD FX Neo Buffer 添加の Direct-TaqMan 法 (b 法) および PCR-TaqMan 法 (c 法) を用いて遺伝子解析を行い、結果の比較を行った<sup>9)7)</sup>。その結果、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>8)</sup>、健常者の分布<sup>9)</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>10,11)</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>9)</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>10,11)</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。

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>9)</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 36 } (52.7) [53.9]
*2/*2	*1/*1		
*1/*1	*1/*2	C	5 (4.4) [2.5]
*1/*2	*1/*2	D	8 8 } (14.0) [32.5]
*2/*2	*1/*2		
*1/*1	*2/*2	E	0 0 1 } (0.9) [7.0]
*1/*2	*2/*2		
*2/*2	*2/*2		

[ ]: frequency (%) of normal subjects<sup>9)</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.

Table 3. Comparison among our SNP typing methods.

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

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.

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

Method Type		Extraction	PCR	Electrophoresis	Time (hr)	Cost (¥)/Sample
Conventional	PCR-RFLP	○	○	○	18	637
Method	TaqMan	○	-	-	16	607
	PCR-RFLP	-	○	○	4	296
New	Direct-TaqMan (method b)	-	-	-	2	216
Method	PCR-TaqMan (method c)	-	○	-	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.

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、入院・通院患者に対し実施する場合には特に問題にならないが、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。本研究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<sup>12-14)</sup>。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>5)</sup>。

### 【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。また、近年、飲酒に関する事故は後を絶たず、特に大学生ら若者の急性アルコール中毒が社会問題化している。将来飲酒を行う若者に対し自身の遺伝子型をもとに表現形質を把握させ、アルコールリテラシー教育を行うことは非常に重要であると言える。

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

*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<sup>7)</sup>。さらに飲酒習慣をスクリーニングし評価する方法として使用されている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。1028名の健常者を対象に調査した結果、*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（AUDITスコア）との関連性を説明できることが明らかとなった。

#### 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

前節にて遺伝子型をもとに設定したA～Eの飲酒に対する体質型と飲酒習慣との関連性が明らかとなったため、この体質型を遺伝子結果として利用し、アルコールリテラシー教育へ展開した。

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>4)</sup>。唾液検体は第1章 第1節に記載の方法で採取した。PCR-TaqMan法で*ALDH2*および*ADH1B*の遺伝子解析を行い、遺伝子型より対応する表現型を判定し、「アルコール体質型」として結果を通知した。検体採取時、および結果返却時に遺伝や遺伝子に関する教育、並びにアルコールや飲酒に関する講義を行い、アルコールリテラシー教育を実施した。

本教育を行った対象者に対し調査した結果、自身の表現型を認識させるだけでなく、飲酒に対する様々な表現形質型が存在すること、また個人の表現形質に合った適正な飲酒を行うことが重要であることを理解させることができたと考えられる。また、*ALDH2* および *ADH1B* の遺伝子型は *ALDH2*\*1/\*1=2217名(54.6%)、*ALDH2*\*1/\*2=1604名(39.5%)、*ALDH2*\*2/\*2=239名(5.9%)、*ADH1B*\*1/\*1=221名(5.4%)、*ADH1B*\*1/\*2=1484名(36.6%)、*ADH1B*\*2/\*2=2355名(58.0%)であり、遺伝子頻度は既報と一致した<sup>2,17)</sup>。

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

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>18)</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。

942名の本学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。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、さらに10分間放置した後、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。その後、*ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子多型とエタノールパッチテストの陽性率との関連性を検証した。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。

*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>2,17)</sup>(Table 5)。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( $\chi^2=0.86, 0.24$ )。そのため、一般人を対象とした遺伝子タイプ分けについて今後もこの値を使うことが出来ると考えた。パッチテストの結果は *ALDH2* 遺伝子型と強く関連しており、*ALDH2*\*2 アレルを持つほど陽性率が高くなる結果であった。エタノール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、感度 85.2%、特異度 85.1%であった。一方で、*ADH1B* 遺伝子型を考慮すると、*ADH1B*\*1/\*1 の群では *ALDH2*\*2 アレルを保有した遺伝子型とパッチテスト陽性反応との間に関連性が認められなかった。つまり、*ADH1B*\*1/\*1 は *ALDH2*\*2 アレルによるパッチテスト陽性反応を抑制する効果が示唆された。そこで陽性率を酵素活性により分類したところ、ADH 低活性型 (*ADH1B*\*1/\*1) のみ感度が非常に低いことが明らかとなった (Table 6)。

Table 5 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 6. 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 activity		Sensitivity	p	Specificity	p
	active	Inactive				
	76/511 (14.9%)	367/431 (85.2%)*	85.2%		85.1%	
ADH activity						
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>15,16)</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。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>9)</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>18)</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 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、薬剤師が遺伝子解析を行う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：09-37
- b) 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



- 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 : G48
- d) 武庫川女子大学 倫理審査結果受付番号 : 09-36
- e) 武庫川女子大学 倫理審査結果受付番号 : 11-41

#### 【参考文献】

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 横山 顕. *ADH1B, ALDH2* の健康障害への影響. *Progress in Medicine*. 2013; 33(4):915-919.
- 12) 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*. 2015; 50: 39-45.
- 13) 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.
  - 14) 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.
  - 15) 吉原達也, 笹栗俊之.: ALDH2 遺伝子多型と臨床医学. *福岡医学雑誌*. 2012; 103(4): 82-90.
  - 16) 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.
  - 17) 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.
  - 18) 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 aldehyde dehydrogenase-2 and alcohol-related cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997; 6: 1105-1107.