

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

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

武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学講座

Associations between *ALDH2* and *ADH1B* Genotypes and Ethanol-Induced Cutaneous Erythema in Young Japanese Women

Mariko HAYASHIDA, Yuka KAMADA, Tomoko OTA, Sayuri KOJIMA,
Kyoko IWAO-KOIZUMI, Shigenori MURATA and Kenji KINOSHITA

School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University

Abstract **Objectives:** The purpose of this study was to identify associations between *ALDH2* and *ADH1B* genotypes and ethanol-induced cutaneous erythema and assess the accuracy of an ethanol patch test in young Japanese women.

Methods: The subjects were 942 female Japanese university students. They were given an ethanol patch test and examined for ethanol-induced cutaneous erythema both immediately after removing the patch and 10 minutes after removing the patch. A saliva sample was used to determine the *ALDH2* and *ADH1B* genotype of each subject by realtime PCR.

Results: The sensitivity and specificity of erythema immediately after removing the patch as the marker for the presence of inactive *ALDH2* were 69.6% and 87.7%, respectively, and the sensitivity and specificity of erythema 10 minutes after removing the patch were 85.2% and 85.1%, respectively. The sensitivity of erythema after 10 minutes was markedly lower in the *ADH1B**1/*1 carriers than in the *ADH1B**2 carriers (8.3% vs. 89.7%, $p<0.0001$), and the specificity was significantly higher in the *ADH1B**1/*1 carriers than in the *ADH1B**2 carriers (96.9% vs. 84.3%, $p<0.05$).

Conclusions: Overall, both sensitivity and specificity were satisfactorily high, but having the *ADH1B**1/*1 genotype prevented a positive reaction for inactive *ALDH2* and caused false-negative results. The data also suggested that having the *ADH1B**2/*2 genotype caused a positive reaction in subjects with the *ALDH2**1/*1 genotype. Despite these exceptions, the ethanol patch test has enough accuracy and can be used easily to subjects who don't drink alcohol. This is a valuable tool for improving the health literacy of younger generation subjects.

Key words: ethanol patch test (エタノールパッチテスト), SNPs, *ALDH2*, *ADH1B*

1. はじめに

日本でのアルコール消費量は戦後から現在にかけて増加し続け、それに伴い様々な飲酒問題が生じてきた。近年は女性の飲酒者が増大し、2008年に行われた全国調

査では、20代前半の年代ではついに女性が男性を上回っている(1)。日本では「21世紀における国民健康づくり運動(健康日本21)」においてアルコール対策を実施したが、興味深いことに、男性に比して女性の改善率が低くなっていた(2)。これをふまえ、2013年度より実施されている健康日本21<第2次>では、未成年者や女性に対する政策が設けられている(3)。我々はこれまで簡易な遺伝子検査法を開発し(4, 5)、未成年者や女性への適正飲酒の知識の普及を目的として、教育活動を実施してきた。しかし、中・高等学校での実施は保護者の同意を要し、また遺伝子検査に対する理解不足から学校側の

受付 2014 年 10 月 17 日, 受理 2014 年 12 月 2 日
Reprint requests to: Kenji KINOSHITA
School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University,
11-68 Koshien Kyuban, Nishinomiya, Hyogo 663-8179, Japan
TEL: +81(798)45-9982, FAX: +81(798)41-2792
E-mail: kenji_k@mukogawa-u.ac.jp

協力が得られない場合も少なからず存在した。そこで、より簡便に体質型を検査し知識の普及を可能とする方法として、エタノールパッチテストを検討した。エタノールパッチテストは教育ツールとして利用されてきたが、今回その正確性と有用性について評価を行った。

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; ADH1B) によってアセトアルデヒドに代謝され、さらにアルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase; ALDH2) によって酢酸に代謝される。ADH1B および ALDH2 には遺伝子多型が存在し、これらの遺伝子型と飲酒との関連性については多くの研究がなされてきた。ALDH2 遺伝子の変異型アレル (ALDH2*2) は酵素活性を示さず (6)、日本人の約 45% の人がこのアレルを保有している (7)。ALDH2*2 アレルを持つヒトは飲酒時の動悸や皮膚の紅潮 (フラッシング反応) などの症状が起こりやすく、習慣的な飲酒頻度が低くなることが報告されている (7)。ADH1B は変異型アレル (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おり、日本では 85% 以上の人に変異型を保有している (8)。ADH1B*2 および ALDH2*2 アレルの組み合わせは東洋人種に特有であり、これらの変異型アレルの影響によりフラッシング反応が起こりやすいと考えられる。原因物質であるアセトアルデヒドの産生が速く、分解が遅いほどフラッシング反応が起こりやすいためである。

男性におけるエタノールパッチテストと ALDH2 および ADH1B 遺伝子型との関連性は報告されているが (9)、女性での報告はない。本研究では近年注目されてきた、女性における、エタノールパッチテストと遺伝子型の関連性を検討した。

2. 方 法

被験者および検体

インフォームド・コンセントを受け、同意を得た 942 名の女子大学生を被験者とした。インフォームド・コンセントは責任著者が講義内で行い、研究への参加は成績に影響せず、参加は自由である旨を説明したうえで、書面で同意を得た。また検体は全て匿名化し、教員が個人の結果を参照できない状態とした。検体は、唾液を小さなプラスチック容器に回収し、水溶紙 (60MDP, Mishima Dissolve Paper, 日本製紙パピリア株式会社) に塗布したのち、十分に乾燥させたものを使用した。なお、この研究は武庫川女子大学の倫理委員会にて承認されたものである。(承認番号 : 09-36, 11-41, 13-30)

遺伝子解析

被験者 942 名の ALDH2 および ADH1B の遺伝子解析を行った。本研究室では唾液検体の付着した水溶紙を直接反応溶液に添加し、遺伝子解析を行うリアルタイム PCR 法を開発している (4)。今回はこの方法を応用し、より

精度を上げるために一度 PCR を行い、その後 PCR 産物 1 μ L をリアルタイム PCR 反応にかけて解析を行った。PCR およびリアルタイム PCR の条件は下記の通りである。PCR : 2 $\times$ KOD FX Neo Buffer (KFX-201, TOYOBO) を 7.5 μ L, 2 mM dNTPs を 1.5 μ L, KOD FX Neo (1 U/ μ L) (TOYOBO) を 0.3 μ L, 10 μ M ALDH2 primer を各 0.5 μ L あるいは 10 μ M ADH1B primer を各 1.2 μ L, DW を添加し、合計 15 μ L とした。ALDH2 forward primer : CAAATTACAGGGTCAACTGCTATGATG, ALDH2 reverse primer : CCA GCAGGCTCCGAGCCACCAGC, ADH1B forward primer : CCTTGGGGATAAACTGAATCTT, ADH1B reverse primer : GAAATCCTGGATGGTGAACC. この反応液に、唾液検体の付着した直径 1.2 mm の水溶紙を添加し、反応を行った。反応条件は、初めに熱変性 95°C 5 分を行い、その後 40 サイクルの熱変性 95°C 10 秒、アニーリング反応 60°C 30 秒、伸長反応 74°C 45 秒を行い、最後に伸長反応 74°C 2 分を行った。リアルタイム PCR : ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) にて、TaqMan アッセイを用いて解析を行った。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (QPS-101, TOYOBO) 5 μ L, 50 $\times$ ROX reference dye (TOYOBO) 0.2 μ L, 20 $\times$ ALDH2 TaqMan Probe & ALDH2 Primer Mix (C_11703892_10, ABI) あるいは 20 $\times$ ADH1B TaqMan Probe & ADH1B Primer Mix (C_2688467_20, TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assays, ABI) を 0.5 μ L, PCR 増幅産物 1 μ L, および DW を添加し合計 10 μ 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°C 2 分, 95°C 10 分, 40 サイクルの熱変性 95°C 15 秒, アニーリングおよび伸長反応 60°C 1 分を行った。

パッチテスト

被験者 942 名を対象に、エタノールパッチテストを実施した。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、再度皮膚の紅潮の有無を確認した。皮膚の紅潮の確認は共著者 KK, MH, TO が行った。直後と 10 分後のそれぞれの時点で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。

統計解析

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 χ^2 検定または Fisher の正確確率検定にて統計解析を行った。

3. 結 果

ALDH2 遺伝子型の各人数は *1/*1 は 511 名 (54.2%), *1/*2 は 373 名 (39.6%), *2/*2 は 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 遺伝子型の各人数は *1/*1 は 56 名 (5.9%), *1/*2 は 336 名

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>	511 (54.2)	373 (39.6)	58 (6.2)	0.74	0.26
<i>ADH1B</i>	56 (5.9)	336 (35.7)	550 (58.4)	0.24	0.76

Table 2 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%)*	17/18 (94.4%)*
*2/*2	49/315 (15.6%)*	143/196 (73.0%)*	37/39 (94.9%)*

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%)*	18/18 (100.0%)*
*2/*2	56/315 (17.8%)*	173/196 (88.3%)*	39/39 (100.0%)*

* Significant versus *ALDH2**1/*1 in the same row ($p < 0.0001$)* Significant versus *ALDH2**1/*2 in the same row ($p < 0.05$)*** Significant versus *ADH1B**1/*1 in the same column ($p = 0.0331$, $p < 0.0001$)† Significant versus *ADH1B**1/*2 in the same column ($p = 0.0183$)

(35.7%), *2/*2 は 550 名 (58.4%) であり, *1 と *2 のアレル頻度は 0.24 と 0.76 であった (Table 1)。ハーディ・ワインベルグ平衡検定の結果, *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 2 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 2A $p = 0.0183$; Table 2B $p = 0.0331$)。*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 ($p < 0.0001$)。

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 3)。すなわち, *ALDH2**1/*1 と比べて *ALDH2**1/*2 は理論的には 1/16 の酵素活性であり, *ALDH2**2/*2 は酵素活性を示さない (6) ため, *ALDH2**1/*1 を活性型, *ALDH2**1/*2, *2/*2 を不活性型とした。一方 *ADH* に関しては, *ADH1B**2 アレルを保有すると *ADH1B**1/*1 よりも酵素活性が高くなる (8, 10)。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 3 Final results of the ethanol patch test in Japanese female university students: Positive rates according to their combinations of *ALDH2* activity and *ADH1B* activity and sensitivity and specificity of erythema as a marker for inactive *ALDH2*

	<i>ALDH2</i>		Sensitivity	p	Specificity	p
	active	inactive				
<i>ADH1B</i> 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 genotypeLow *ADH1B* activity: *ADH1B**1/*1 genotype; high *ADH1B* activity: *ADH1B**1/*2 genotype and *ADH1B**2/*2 genotype* Significant versus active *ALDH2* in the same row ($p < 0.0001$)

4. 考 察

ALDH2 および *ADH1B* 遺伝子型において、遺伝子頻度は既報と一致した (7, 9)。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となった。実際の飲酒時においても、*ALDH2*2* アレルを持つほど、すなわち *ALDH2* の酵素活性が低いほど皮膚の紅潮反応が現れることが報告されている (9)。しかし、*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 (Table 2B)。陽性率を酵素活性により分類すると (Table 3)、*ADH* 低活性型 (*ADH*1*1*) のみ感度が非常に低いことが明らかとなった。以上のことから、*ADH1B*1*1* は皮膚の紅潮反応を抑制することが示唆された。皮膚の紅潮反応は、エタノール接触後、最初のアセトアルデヒド濃度の急峻な上昇により引き起こされるが、最初の上昇がゆっくりであれば引き起こされないと考えられる。*ADH1B*1*1* は変異型ホモ *ADH1B*2*2* やヘテロ *ADH1B*1*2* に比べ *ADH* の酵素活性が低いため、アセトアルデヒドの生成が比較的遅くなり、陽性反応が起こりにくいと考えられる。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 (9) 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 (11)。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 (9) 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 2)。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)。被験者には *ALDH2* および *ADH1B* 遺伝子と同様に、インフォームド・コンセントを行い同意を得た。*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 (12, 13)。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。

今回のパッチテストの結果は、感度 85.2%、特異度 85.1% であった。50 代以上の男性 ($n=239$) では、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 (14)。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。今回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い。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。今回

の結果から、若年層を対象とすれば、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。いまだ約 15% の不一致が存在するが、この検査法の簡易性から、教育には有用なツールであると言える。パッチテストでは非常に簡単に、お酒に対する個人差の存在を認識させることができる。また遺伝子型を理解できる高校生以上が対象者である場合は、飲酒に対する反応と遺伝子型との関連性について教育ができる。さらに偽陰性の原因のひとつとして *ADH1B* 遺伝子型が関与しており、*ADH1B* および *ALDH2* の遺伝子型の組み合わせにより種々の疾患へのリスクが異なること (15) も題材となる。未成年のうちに、飲酒に対する反応には個人差があり、過度な飲酒は健康被害を引き起こすことを教育することが重要である。パッチテストを教育ツールとして利用することで、適正な飲酒を行う大人が増え、適切にお酒を楽しむことのできる社会となることを望む。

謝 辞

本研究の実施に際し、終始ご指導を賜りました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および国立病院機構久里浜医療センター臨床研究部の横山頭部長に深甚なる謝意を表します。また研究実施にご協力下さった被験者 942 名、および遺伝子解析実験を担当していただいた石黒裕子さんに御礼申し上げます。本研究は、文部科学省科学研究費「次世代への遺伝子および遺伝子検査教育のための研究」(課題番号: 23501079) の補助により実施しました。

「日本医学会のガイドライン」に準拠し、利益相反なし。

文 献

- (1) 樋口 進. アルコールの有害使用を減らすための戦略について考える. 厚生労働省「たばこ・アルコール対策担当者講習会」2012; http://www.mhlw.go.jp/topics/tobacco/houkoku/dl/120329_5.pdf (2014.8.12)
- (2) 厚生労働省ホームページ; e-ヘルスネット, 健康日本 21 におけるアルコール対策 <http://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/alcohol/a-06-002.html> (2014.8.12)
- (3) 厚生労働省ホームページ; 国民の健康の増進の総合的な推進を図るための基本的な方針 http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkounippon21_01.pdf (2014.8.12)
- (4) 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. *Anal Sci* 2014;30:427–429.
- (5) 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. *Anal Sci* 2010;26:503–505.
- (6) Enomoto N, Takase S, Yasuhara M, Takada A. Acetaldehyde metabolism in different aldehyde dehydrogenase-2 genotypes. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15:141–144.
- (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;94:217–223.
- (8) Stamatoiyannopoulos 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;27:789–796.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem* 1991;110:559–565.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) Yang SJ, Yokoyama A, Yokoyama T, Huang YC, Wu SY, Shao Y, Niu J, Wang J, Liu Y, Zhou XQ, Yang CX. Relationship between genetic polymorphisms of ALDH2 and ADH1B and esophageal cancer risk: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010;16:4210–4220.