

新規な遺伝子検査プロトコル開発とアルコール代謝関連遺伝子多型への応用

今井美穂,^a 競 和佳,^a 坂口友唯,^a 山村美和子,^a
河井沙由梨,^b 村田成範,^{a,b} 市川 厚,^{b,c} 木下健司^{*,a,b,c}

Development of Novel Genotyping Protocol and Its Application
for Genotyping of Alcohol Metabolism-related Genes

Miho Imai,^a Madoka Kisoi,^a Yui Sakaguchi,^a Miwako Yamamura,^a
Sayuri Kawai,^b Shigenori Murata,^{a,b} Atsushi Ichikawa,^{b,c} and Kenji Kinoshita^{*,a,b,c}

^aSchool of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University; Kyuban-cho, Koshien, Nishinomiya, Hyogo 663-8179, Japan; ^bInstitute of Biosciences, Mukogawa Women's University; Kyuban-cho, Koshien, Nishinomiya, Hyogo 663-8179, Japan; and ^cBio Education Laboratory; 1-18-5 Higashinakajima, Higashiyodogawa-ku, Osaka 533-0033, Japan.

(Received February 18, 2019; Accepted May 23, 2019)

A new single nucleotide polymorphisms (SNP) genotyping method has been developed and validated using biological specimens directly as templates for TaqMan PCR without general DNA extraction and purification procedure from dried saliva samples attached on water-soluble papers. This new method can set up at ease and complete PCR analysis including data interpretation in under two hours with additional advantages of application for large-scale clinical research, diagnostics, and epidemiological studies at low cost. Specifically, SNP genotyping of alcohol metabolism-related genes *ADH1B* (rs1229984) and *ALDH2* (rs671) were demonstrated by TaqMan PCR assay using dried saliva samples in the present investigation. In this protocol, by simplifying experimental operations and improving efficiency, omitting and simplifying the time and laborious DNA purification process, it is possible to shorten the experiment time and reduce the risk of human error such as contamination. Furthermore it became possible with great cost reduction. We succeeded in dramatically improving the judgment rate and accuracy of SNP genotyping by the master mix reagent for commercial available real-time TaqMan PCR. Moreover, it becomes possible to stably introduce template DNA into the reaction system, and it will be possible to apply it to copy number variation (CNV) by TaqMan probe method. The SNP analysis process using this optimized water-soluble paper will be applied to gene polymorphism analysis of drug metabolizing enzyme gene CYP, *etc.*, to help efforts to realize personalized medicine.

Key words—genotyping; single nucleotide polymorphism; *ADH1B* and *ALDH2*; TaqMan PCR; water-soluble paper; dried saliva

緒 言

PCR を応用した single nucleotide polymorphism (SNP) タイピング法として allele specific primer-PCR (ASP-PCR),¹⁾ PCR-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP),^{2,3)} TaqMan PCR 法³⁻⁵⁾ などがある。これらの操作においてはサンプル中の PCR 阻害物質を除去するため DNA 抽出・精製のステップが不可欠である。しかし、この DNA 抽出・精製ステップは高回収率のもと迅速

性、簡便性、廉価が求められる臨床応用研究においては、操作上の大きな障害となっている。われわれは、TaqMan PCR 法を例に、血液・唾液などの液状の生体サンプルから従来のゲノム DNA 抽出・精製を行わず SNP タイピングを行う新規な遺伝子検査プロトコルについて検討を行ってきた。¹⁻⁹⁾ これまでに得られた成果は次の 3 点に要約される。①血液中の白血球細胞又は唾液中の口腔粘膜細胞を水溶紙上に固定でき、乾燥後 PCR 反応液に直接添加して TaqMan プローブ PCR 法を行うことで操作時間を短縮できる。⁴⁾ ②TaqMan プローブ法の反応液中に DNA ポリメラーゼバッファー KOD FX Neo Buffer (東洋紡社製、大阪) を添加することにより、サンプルの DNA 量が少量であっても再現性

^a武庫川女子大学薬学部健康生命薬科学科ゲノム機能解析学研究室, ^b武庫川女子大学バイオサイエンス研究所, ^c一般社団法人生命科学教育研究所

*e-mail: kenji_k@mukogawa-u.ac.jp

のよい増幅反応が得られる。⁴⁾ ③これらの改良で、細胞からゲノム DNA を抽出・精製に関するコストが削減され、アルコール脱水素酵素 *ADH1B* 及びアルデヒド脱水素酵素 *ALDH2* をコードする 2 遺伝子の SNP 判定を例に応用すると消耗材料費は 1 人あたり 500 円以下と安価である。しかし、上記の改良法の検討にもかかわらず、臨床応用研究に適用するためには、まだ解決すべき問題点が 4 点ある。例えば、①唾液中の白血球並びに口腔粘膜細胞数の個人差の解消、②水溶紙乾燥後に唾液の滴下位置の判定を容易にする方法、③水溶紙上に滴下された唾液サンプルの乾燥状態の不均質性の解決、④評価レベルの遺伝子判定率の達成などである。④のためには、①–③の解決が必須であり、種々の予備実験から、究極の課題は口腔粘膜細胞のサンプリング段階にあると判明した。

本論文は、唾液検体のサンプリング技術を新規改良することにより、簡便に採取した口腔粘膜細胞中のゲノム DNA から迅速・廉価で正確性の高い判定率で SNP タイピングを実施するプロトコルの開発と、それをアルコール代謝関連遺伝子多型の判定に応用した研究報告である。

方 法

1. 対象者 新規な SNP タイピングプロトコル開発は、インフォームド・コンセントを受け、同意を得た武庫川女子大学薬学部学生 206 名を被験者として協力を得て、採取した乾燥唾液サンプルを用いてアルコール代謝関連遺伝子 *ADH1B* 及び *ALDH2* の一塩基多型を対象として検証した。上記サンプルには ID 番号を付し、この後の実験解析では個人情報とリンクしない配慮をした。本実験は武庫川女子大学の遺伝子解析研究に関する倫理委員会の承認（承認番号：武庫川女子大学 No.15-56）を受けて実施した。

2. 実験

2-1. 材料及び機器 水溶紙（120MDP、日本製紙パピリア社製、東京）はサンオーク株式会社（東京）より、口腔ケア用マウスポンジ（小さめサイズ）はオオサキメディカル株式会社製（名古屋）より、生検トレパン（内径 2 mm）はカイインダストリーズ株式会社（関）より、それぞれ購入した。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix（QPS-101）及

び 50×ROX reference dye は東洋紡株式会社（大阪）から購入した。TaqMan Probe & Primer Mix (*ALDH2*: C_11703892_10, *ADH1B*, C_2688467_20) 及び TaqMan Copy Number Reference Assay, Human, RNase P（製品番号 4403326）はサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社（東京）から購入した。Human Genomic DNA（Human Mixed: G3041）はプロメガ社製（東京）を購入した。サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700, 7300 Real Time PCR System 及び QuantStudio™ 12K Flex real-time PCR system は Applied Biosystems 社製（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、東京）を用いた。

2-2. 水溶紙 本研究に使用した水溶紙 120MDP は、セルロース繊維をカルボキシメチル化した繊維状カルボキシメチルセルロース（carboxymethyl cellulose; CMC、以下繊維状 CMC と略す）をパルプに配合した後、アルカリ剤でアルカリ金属塩に変換した繊維状 CMC アルカリ金属塩の紙である。¹⁰⁾ 水溶紙は水中で極めて短時間内に溶けるように分散する性質を有する（Fig. 1）。

2-3. サンプリングキット DnaCapture の試作

DnaCapture は、唾液サンプリング、乾燥、サンプルパンチ、郵送、保存などの工程を考慮した構造を設計した（結果の部 1. を参照）。水溶紙 120MDP の下部にはパンチ台のプラスチック板（ポリエチレン、polyethylene; PE）を貼り付けた（Fig. 2）。DnaCapture は唾液検体の塗布前後に予想されるコンタミネーションのリスク防止と乾燥の促進のために、水溶紙面上部をカバーし、両側に約 5 mm の空間（Fig. 2、写真）を確保して三つ折り構造となるように設計し、株式会社太閤通商（西宮）に作製依頼した。サンプリングキット“DnaCapture”は、パンチ作業の自動化を考慮しての水溶紙部分を切り離しできる設計とした。

2-4. 乾燥唾液による PCR プロセス

- ① 唾液検体を塗布乾燥
- ② 水溶紙 120MDP を内径 2 mm の生検トレパンを使用してパンチ
- ③ その水溶紙片を蒸留水 100 μ L の入ったチューブに直接投入
- ④ 95°C 5 分間加熱処理したサンプルを静置
- ⑤ その上清をリアルタイム PCR 反応調製液

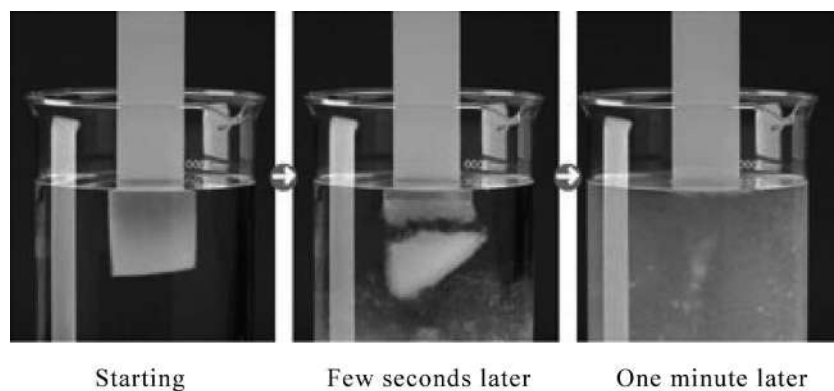


Fig. 1. Time Course of Water-soluble Paper in Water

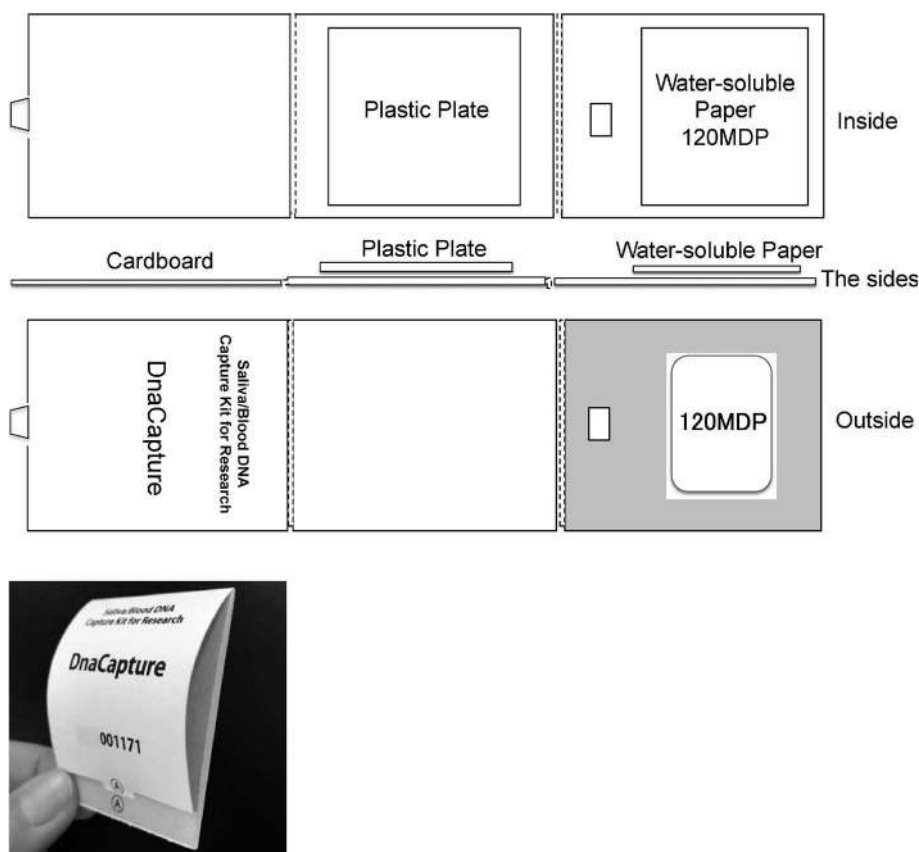
MISHIMA DISSOLVE PAPER: <http://www.papylia.com/products/kinouhin/suiyou/about.php>, cited 1 February, 2018.

Fig. 2. Design of the Homemade Sampling Kit “DnaCapture”

(各組成は 2-5. を参照) に投入し、遺伝子増幅反応を行った。

以上の操作により、通常の DNA 抽出・精製工程はすべて省略されることになる (Fig. 3)。

2-5. TaqMan PCR 法による SNP タイピング

TaqMan プローブを用いた SNP タイピングは以下の条件により実施した。反応液の組成及び反応条件は東洋紡社 (大阪) 及びサーモフィッシャーサイ

エンティフィック社 (東京) の使用説明書に準じた。TaqMan PCR 反応をサーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 で行い、7300 Real Time PCR System にてエンドポイント TaqMan アッセイ法より 206 名分のサンプリングの SNP タイピングを実施した。

SNP タイピングは以下の条件で実施した。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix 5 μ L, 50 $\times$ ROX

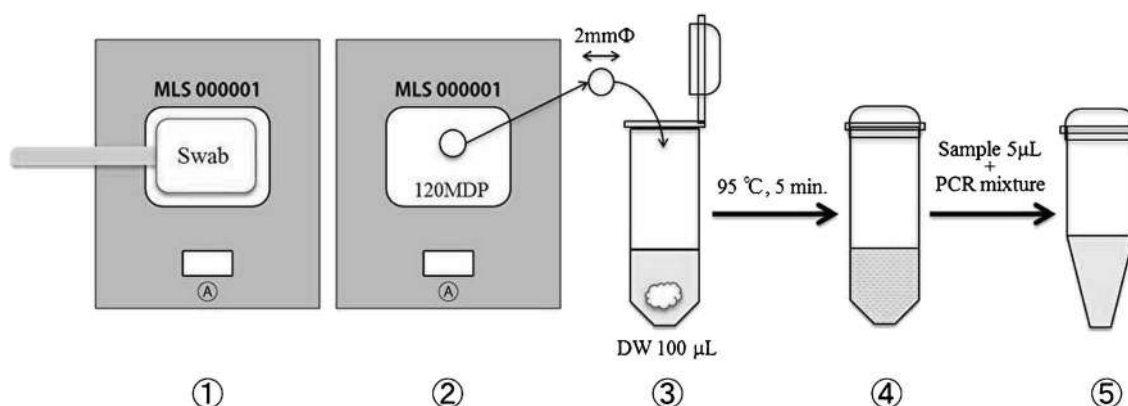


Fig. 3. Dried Saliva Sampling Process and Genetic Test Flow

reference dye $0.2 \mu\text{L}$, $20\times$ ALDH2 TaqMan Probe & ALDH2 Primer Mix (C_11703892_10) あるいは $20\times$ ADH1B TaqMan Probe & ADH1B Primer Mix (C_2688467_20) を $0.5 \mu\text{L}$, 乾燥唾液サンプル加熱処理液 $5.0 \mu\text{L}$, 合計 $10.7 \mu\text{L}$ の反応溶液とした. 反応条件は 25°C 30 秒, 95°C 1 分, 50 サイクルの熱変性 95°C 5 秒, アニールング及び伸長反応 60°C 30 秒にて実施した.

2-6. 唾液サンプル間クロスコンタミネーション

新しい生検トレパンを用意して, 学生 206 名から任意に抽出した 40 名の乾燥唾液サンプルから新たに測定用サンプルを調製した. ただし, 生検トレパンは交換又は先端の刃部分を 70% エタノール拭き取り操作は行わず連続的に使用した. SNP タイピングは前述 2-5. と同じ反応組成で 7300 Real Time PCR System を使用してリアルタイムにモニタリングした. 上記サンプリング方法が SNP 判定結果に影響を与えないことにより, クロスコンタミネーションの評価をした.

2-7. 標準曲線の作成及び乾燥唾液テンプレートの定量

市販ゲノム DNA 溶液 (Human Genomic DNA) 濃度からウェブサイト¹¹⁾を利用してゲノム DNA 溶液のコピー数を算出した. まずは, 10^6 copy/ μL のスタンダード溶液を調製した. 10^5 – 10^3 copy/ μL の溶液は段階希釈して作製した. コピー数多型の内部コントロールとなる TaqMan Copy Number Reference Assay, Human, RNase P (製品番号 4403326) を用いて QuantStudio™ 12K Flex real-time PCR system にてリアルタイムモニタリングした増幅曲線の Ct 値からスタンダード溶液の標準曲線を以下の実験条件で作成した. 反応液の組成及び

反応条件は東洋紡社 (大阪) 及びサーモフィッシャーサイエンティフィック社 (東京) の使用説明書に準じた. THUNDERBIRD Probe qPCR Mix $5 \mu\text{L}$, $50\times$ ROX reference dye $0.2 \mu\text{L}$, $20\times$ TaqMan probe & RNase P Primer Mix (4403326) を $0.5 \mu\text{L}$, スタンダード溶液 $2.0 \mu\text{L}$, 蒸留水 $2.3 \mu\text{L}$, 合計 $10.0 \mu\text{L}$ の反応溶液とした. 反応条件は 25°C 30 秒, 95°C 1 分, 50 サイクルの熱変性 95°C 15 秒, アニールング及び伸長反応 60°C 1 分にて実施した.

一方, 206 名の乾燥唾液検体をテンプレートとして使用したゲノム DNA 定量は上記反応条件でリアルタイムモニタリングを行い, SNP タイピング解析系にテンプレートとして導入されたゲノム DNA のコピー数を算出した. なお, 反応液組成は THUNDERBIRD Probe qPCR Mix $5 \mu\text{L}$, $50\times$ ROX reference dye $0.2 \mu\text{L}$, $20\times$ TaqMan probe & RNase P Primer Mix (4403326) を $0.5 \mu\text{L}$, 乾燥唾液サンプル加熱処理液 $5.0 \mu\text{L}$, 合計 $10.7 \mu\text{L}$ の反応溶液とした.

結 果

1. 唾液検体の採取法の検討とサンプリング機材の開発

本研究では, 口腔粘膜細胞のサンプリングに係わる課題のために, 唾液の均一で適容量の採取, かつ, 採取唾液中の測定可能な細胞 (ゲノム DNA) の確保並びに唾液の迅速な自然乾燥についての最適条件を検索し, それら条件を満たすサンプリング機材の開発を目的とした. その結果, 口腔粘膜細胞を含む唾液検体をポリウレタン製のスワブ (口腔ケア用マウスポンジ) を用いて採取し, そのスワブを水溶紙に直接押し当てることによって唾液

とともに口腔粘膜細胞を効率よく水溶紙に転写できることを見出した。本操作により水溶紙に塗布される唾液（水分）量もコントロールできるので唾液サンプルの量的な個人差が解消でき、さらに水溶紙乾燥後に唾液の滴下位置の判定を安定にすることができる。

次に、唾液が塗布された水溶紙の迅速な乾燥方法について検討した結果、サンプリングキットの構造を、水溶紙の両側に約 5 mm の空間 (Fig. 2, 写真) を確保して三つ折り構造となるように設計工夫することにより、自然乾燥によっても次項 2. の TaqMan PCR 解析に必要十分な結果を得ることができた。

そこで、上記の検体の採取法と乾燥法に係わる研究成果に基づいてサンプリングデバイスの開発を試みた。不特定多数の個人が簡易にサンプリングでき、唾液サンプル中のゲノム DNA 量が安定的に適量回収され、その細胞は室温条件下で乾燥保存されることを目標に検討し、最終的に、Fig. 2 に示すようなサンプリングキットが作製された。

2. エンドポイント TaqMan PCR 解析プロセス

SNP タイピング法のプロトコル開発は以下のように実施した。スワブを用いて採集した学生 206 名の唾液に含まれる口腔粘膜細胞を水溶紙に転写させる。自然乾燥並びに数日間室温保存後、水溶紙を直径 2 mm にパンチして所定の蒸留水で加熱処理したサンプルを市販のリアルタイム PCR マスターミックス THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (東洋紡社製, 大阪) に添加して、使用書に記載のプロトコルに従って反応を行い、TaqMan PCR 法で判定した。結果、非常に安定した高い判定精度の遺伝子多型解析結果が得られた。

一人の研究者が、96 穴プレートを使用して 40 名分の 2 種類 (*ADH1B* 及び *ALDH2*) の遺伝子多型解析の全工程を手作業で実施した場合、Table 1 に示すように、サンプル前処理並びに TaqMan PCR 反応液調製 (Fig. 3 ②-⑤工程) を実施にかかる時間は 1 時間以内、TaqMan PCR 反応は GeneAmp PCR System 9700 (ABI 社製, 東京) を使用して行い、PCR 増幅反応と ABI 7300 Real Time PCR System によるエンドポイント解析を合わせて 2 時間 30 分で作業は終了した。

そして、一般的なサーマルサイクラー GeneAmp

Table 1. Time Schedule for Each Process of Alcohol-related Gene Types

Sample Punching	30 min
Liquid Handling for PCR	30 min
PCR Amplification	60 min
Genotyping Data Analysis	30 min
Total Processing Time	150 min

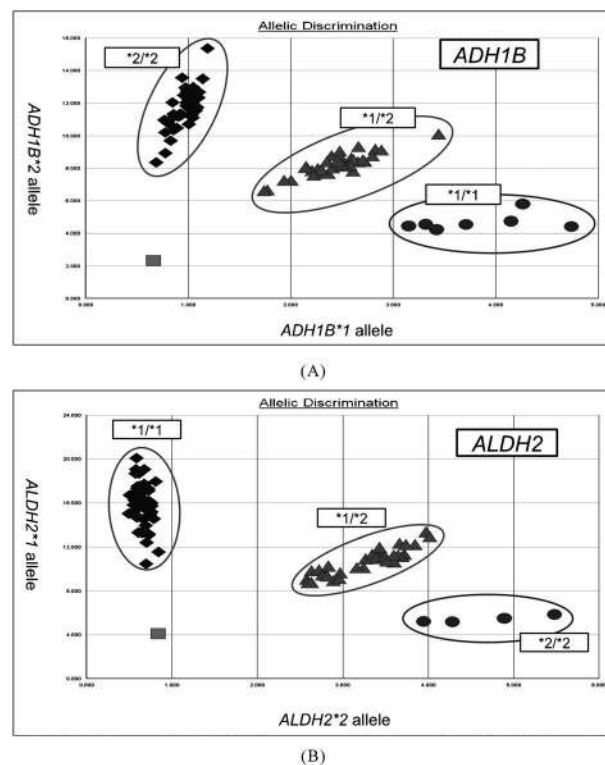


Fig. 4. Scatter Plot Analysis of TaqMan® End Point Assay (A) *ADH1B* ◆: *2/*2, ▲: *1/*2, ●: *1/*1. (B) *ALDH2* ◆: *1/*1, ▲: *1/*2, ●: *2/*2.

PCR System 9700 で TaqMan プローブを用いた遺伝子増幅を行った後、リアルタイム PCR 装置 ABI 7300 Real Time PCR System でエンドポイント解析を実施して 99% 以上の遺伝子型判定率を安定して得ることができた。そのジェノタイピング結果を Fig. 4 に示した。

3. アルコール体質 (*ADH1B* 及び *ALDH2*) の遺伝子多型解析結果 学生 206 名の遺伝子多型分布は以下の通りである。*ALDH2* 遺伝子型の各人数は *1/*1 は 99 名 (48.1%), *1/*2 は 98 名 (47.5%), *2/*2 は 9 名 (4.4%) であり、*1 と *2 のアレル頻度は 0.718 と 0.281 であった。*ADH1B* 遺伝子型の

Table 2. Phenotype Frequencies for Alcohol-related Gene Types

<i>ADH1B</i>	<i>ALDH2</i>	Type	<i>N</i>	%
<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1</i>	A	3	1.5
<i>*1/*2</i>	<i>*1/*1</i>	B	46	46.6
<i>*2/*2</i>	<i>*1/*1</i>		50	
<i>*1/*1</i>	<i>*1/*2</i>	C	4	1.9
<i>*1/*2</i>	<i>*1/*2</i>	D	41	45.6
<i>*2/*2</i>	<i>*1/*2</i>		53	
<i>*1/*1</i>	<i>*2/*2</i>	E	0	4.4
<i>*1/*2</i>	<i>*2/*2</i>		2	
<i>*2/*2</i>	<i>*2/*2</i>		7	

各人数は**1/*1*は7名(3.4%), **1/*2*は89名(43.2%), **2/*2*は110名(53.4%)であり, **1*と**2*のアレル頻度は0.250と0.750であった. *ALDH2*及び*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 (Table 2).^{10,12,13)}

4. 唾液サンプル間クロスコンタミネーションの検証 学生206名中40名の乾燥唾液サンプルを選択し, 生検トレパンの交換又は先端の刃部分の拭き取りは一切行わず, 連続的にサンプル調製を実施した. その結果, Fig. 5のように, *ADH1B*及び*ALDH2*のSNPタイピング結果は前述の結果2.のエンドポイント TaqMan PCR 解析結果と完全に一致し, 増幅曲線においても異常はみられなかった.

5. 標準曲線の作成及び乾燥唾液テンプレートの定量 武庫川女子大学学生206名の乾燥唾液サンプルを用いてコピー数多型の内部コントロールのRNase Pをリアルタイムモニタリングした増幅曲線の一部検体37名分をFig. 6(A)に示す. 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, プラトーに達する. 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, 増幅曲線が早いサイクルで立ち上がる. 本実験では, 市販ゲノムDNA溶液(Human Genomic DNA)から 10^6 copy/ μ Lのスタンダード溶液を調製し, 10^5 – 10^3 copy/ μ Lの溶液は段階希釈して作製した. 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, 約3サイクルごとに立ち上がりがずれた

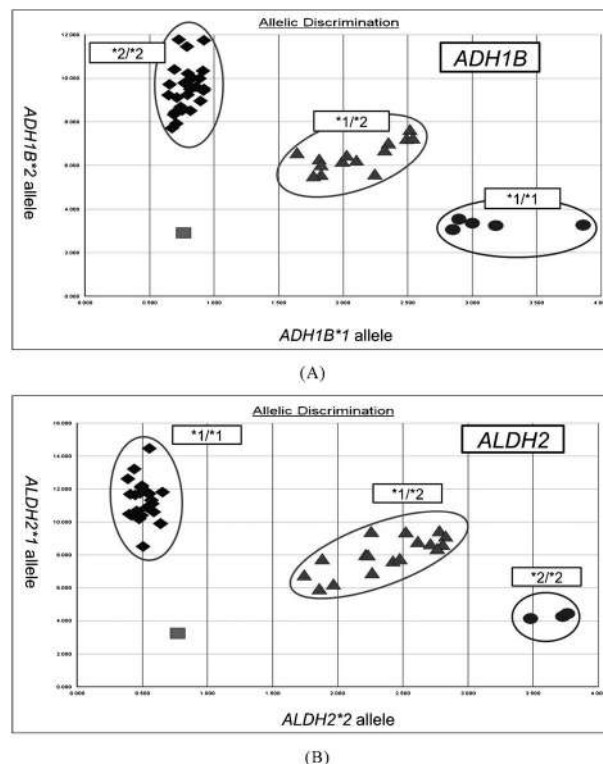


Fig. 5. Verification of Cross Contamination between Dried Saliva Samples

(A) *ADH1B* ◆: **2/*2*, ▲: **1/*2*, ●: **1/*1*, (B) *ALDH2* ◆: **1/*1*, ▲: **1/*2*, ●: **2/*2*.

増幅曲線が得られた [Fig. 6(B)]. 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市販ゲノムDNA溶液を用いたため, $2^n = 10$ を計算すると $n = 3.3$ となり, 約3.3サイクルずつずれるのは理論的に標準曲線 ($y = -3.13x + 44.07$) が得られた [Fig. 6(C)]. 本研究の乾燥唾液検体(206名)を使用した増幅曲線のCt値 (30.5 ± 1.3 サイクル) から算出されるコピー数は, ジェノタイピングで理想的な 10^4 – 10^5 コピーに分布していた.

6. アルコール体質遺伝子検査のコスト 結果2.に記述したように, 学生40名分の乾燥唾液サンプルを用いたアルコール体質遺伝子(*ADH1B*, *ALDH2*)の前処理から結果判定までの所要時間は, およそ2時間30分ある. この一連の操作に要する1名分のサンプルの測定費用を概算した. 非常勤職員1名を半日(4時間)雇用した場合の人件費を4000円と見積もると, 1検体あたりの人件費は100円となる. アルコール体質遺伝子検査に係わる

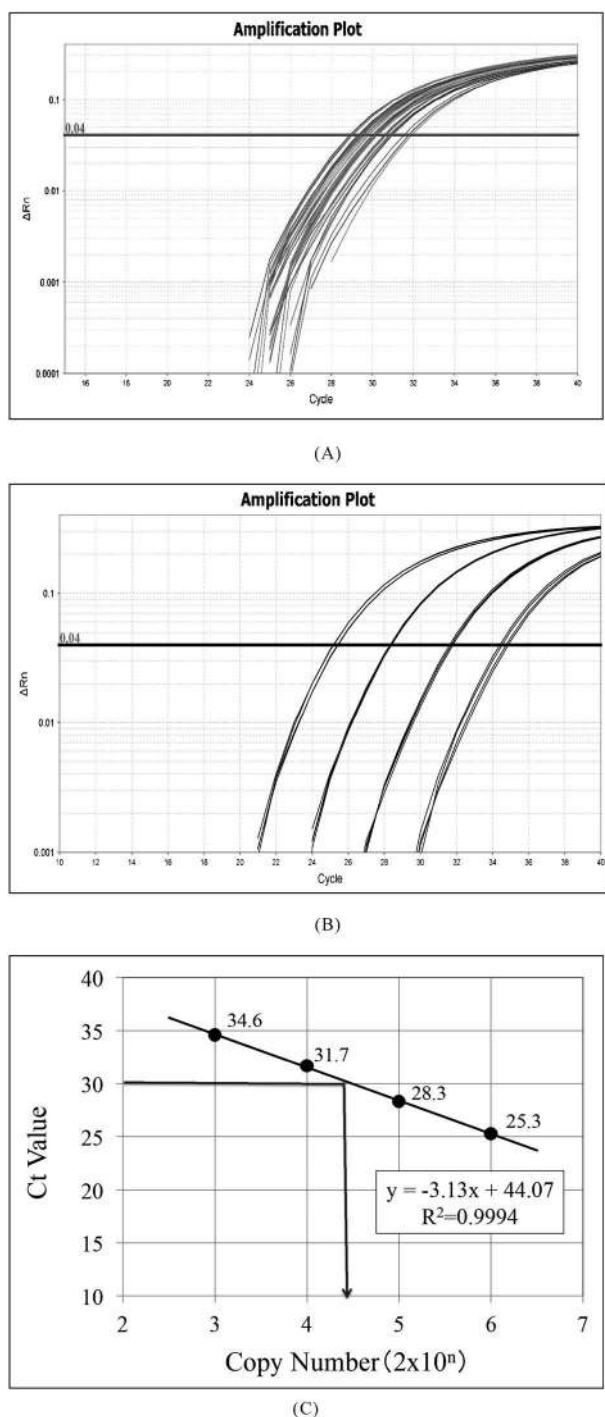


Fig. 6. Amplification Curves of *RNase P* Gene by Real-time TaqMan PCR

(A) Amplification curves for 37 dried saliva samples. (B) Amplification curves for standard genomic DNA solutions (10^3 – 10^6 copy). (C) Standard curve (10^3 – 10^6 copy).

キット一式は、サンプリングキット DnaCapture (50 円)、口腔ケアスポンジ (21 円)、説明書・封筒・宛名シール (12 円)、テキスト (20 円) 及び Fig. 7 で示した検査結果通知用のアルコール体質カード (22 円) で構成され、その費用は総額 125

円となる [Table 3 (A)]. また、1 名分の試薬等の消耗材料費は総額 219 円となる [Table 3 (B)]. (A) と (B) を合わせ、消耗材料費などの直接費用は 1 名分約 344 円となる。したがって、1 名分あたりのアルコール体質検査にかかる費用は人件費 100 円を加算すると 444 円となる。ただし、光熱水費、減価償却費及び施設費は含まない。

一般に、遺伝子検査に伴う費用は、人件費、消耗材料費 (DNA 抽出・精製, PCR), サンプル保管施設 (冷凍・冷蔵庫) の維持、機器設備 (リアルタイム PCR 装置など検査機器) の減価償却費などを考慮すると 1 検体 2000–3000 円が見積もられる。現在、Web 上や薬局店頭など医療機関を介さない direct to consumer (DTC) 型遺伝学的検査が普及している。DTC 型遺伝学的検査は、「分析的妥当性、臨床的妥当性・有用性などの科学的根拠」の面において十分に説明されていないが、アルコール体質検査の場合、5000–1 万 5000 円で DTC 型遺伝学的検査サービスを受けることができる。

本稿のエンドポイント解析法は、分子生物学関連の研究設備として常設の一般的なサーマルサイクラーで遺伝子増幅を行い、リアルタイム PCR 装置を用いてエンドポイント TaqMan アッセイ法で遺伝子判定を実施した。遺伝子検査試薬の自動分注装置など自動化を導入し、複数台のサーマルサイクラーを同時に稼働することにより、多検体処理も可能であり、更なるコストパフォーマンスを実現できる。

考 察

今回、乾燥唾液サンプルを用いた TaqMan PCR 法の遺伝子型判定率の向上を目標に、口腔粘膜細胞のサンプリング方法と器材の改良及び TaqMan PCR 反応液に添加する鋳型 DNA の前処理方法を中心に検討し、最終的に乾燥唾液サンプルを用いた TaqMan PCR 法の遺伝子型判定率を 99% にまで改良することができた。

本研究は乾燥唾液検体に対して、TaqMan プローブを応用した SNP タイピングを市販のリアルタイム PCR マスターミックスを使用書に記載のプロトコルに従って調製・実施し、一塩基多型解析の判定率及び正確性を飛躍的に向上させることに成功したものである。



Fig. 7. Alcohol Metabolism-related Genetic Cards A to E Type, and Notification of Concern with Health on Drinking for Each Genotype

(Color figure can be accessed in the online version.)

Table 3. Genetic Testing Kit and Consumable Costs

(A) Genetic test kit

Genetic test kit	Cost
Homemade sampling kit “DnaCapture”	¥50.0
Oral swab	¥21.0
Label seal, envelope, instructions etc.	¥12.0
Educational textbook for drinking	¥20.0
Alcohol metabolism-related genetic card	¥22.0
Total	¥125.0

(B) Reagents and consumable costs per person

Reagents	Cost
THUNDERBIRD qPCR Mix	¥36.0
80 × TaqMan Probe	¥111.7
Distilled water	¥0.8
Biopsy punch for 40 persons	¥12.2
Plastics	¥58.3
Total	¥219.0

本遺伝子検査システムは乾燥唾液検体だけでなく乾燥血液検体にも対応可能であるが、生殖細胞系列の薬物代謝酵素関連遺伝子多型を応用した個別化医療やアルコールなどの体質遺伝子検査を応用した遺伝子教育など健常者を対象にした場合には唾液検体

採取が適当であると考え、その理由は、唾液塗布水溶紙は使用後、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こと、さらに、乾燥唾液検体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、不特定多数の被験者からの一塩基多型解析法の検査、例えばアルコール体質遺伝子検査などを普及させるためには非常に大きなメリットとなるからである。アルコール体質遺伝子検査の場合、サンプルの保存期間は最低1年間SNP解析が可能である。⁴⁾ 本アルコール体質検査は、複数の大学の初年次教育の一環授業として実施して、未成年者飲酒禁止並びに飲酒事故防止の社会活動を展開している。さらには、全国の大学生への普及・展開並びにアルコール体質検査を通じた遺伝子検査の正しい理解を誘導するツールとして活用する。

今後、ヒトゲノム情報の生物学的意義の解明や病態研究が進み、その成果を予防、個別化医療などゲノム医療への応用展開が期待されている。遺伝子検査に関して技術と情報の両面で研究から臨床への展開が急速である。遺伝子検査の工程には、サンプリングから保存・前処理までの検査前プロセス、検査、判定結果の整理・返却の検査後プロセスの3つのプロセスがある。検査の測定精度は検体採取から検体試料の前処理までの検査前プロセスに大きく影

響される。このため、検査精度の確保には、検査プロセスとともに、検査前プロセスが適正に行われることが不可欠である。費用対効果及び検査時間の観点から、より安価で迅速性に優れた検査法があれば、より質の高いニーズに対応が可能ではないかと考えられる。唾液サンプリングから結果報告までの全検査プロセスの簡略化、クロスコンタミネーションの防止可能なプロセスを実現することができた。本研究成果は、費用対効果に優れた遺伝子検査システムの実用化を促進するとともに、遺伝子検査への理解と普及につながると考えられる。

結 言

サンプリング方法の改良により市販リアルタイム TaqMan PCR 用マスターミックス試薬をアレンジすることなく、一塩基多型解析 (SNP タイピング) の判定率及び正確性を飛躍的に向上させることに成功した。また、反応系に鋳型 DNA (10^4 – 10^5 コピー) を安定して導入することが可能になり、今後、TaqMan プローブ法によるコピー数多型解析 (copy number variation; CNV) への応用展開が可能であろう。^{14,15)} この最適化された水溶液を用いた一塩基多型解析プロセスは、薬物代謝酵素遺伝子チトクローム P450 (CYP) の遺伝子多型解析などに応用され個別化医療の実現に向けた取り組みの一助となることが期待される。¹²⁾

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Hayashida M., Iwao-Koizumi K., Murata S., Kinoshita K., *Anal. Sci.*, **25**, 1487–1489 (2009).
- 2) Hayashida M., Iwao-Koizumi K., Murata S., Yokoyama A., Kinoshita K., *Anal. Sci.*, **26**, 503–505 (2010).
- 3) Ota T., Hayashida M., Iwao-Koizumi K., Murata S., Kinoshita K., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **40**, 402–408 (2014).
- 4) Hayashida M., Ota T., Ishii M., Iwao-Koizumi K., Murata S., Kinoshita K., *Anal. Sci.*, **30**, 427–429 (2014).
- 5) Ota T., Kamada Y., Hayashida M., Iwao-Koizumi K., Murata S., Kinoshita K., *Int. J. Med. Sci.*, **12**, 78–82 (2015).
- 6) Ota T., Hayashida M., Ishii M., Iwao-Koizumi K., Murata S., Kinoshita K., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 283–285 (2014).
- 7) Murata S., Hayashida M., Ishiguro-Tanaka Y., Imazeki H., Hayashi E., Yokoyama A., Kinoshita K., *The Official Journal of Japanese Society of Laboratory Medicine*, **63**, 1253–1258 (2015).
- 8) Hayashida M., Kinoshita K., *J. Brew. Soc. Jpn.*, **109**, 2–10 (2014).
- 9) Hayashida M., Kamada Y., Ota T., Kojima S., Iwao-Koizumi K., Murata S., Kinoshita K., *Nippon Eiseigaku Zasshi*, **70**, 134–138 (2015).
- 10) Naruoka H., Ogino A., Matsumori Y., *Japan Tappi Journal*, **65**, 360–363 (2011).
- 11) URI Genomics & Sequencing Center. Calculator for determining the number of copies of a template: <https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>, cited 1 February, 2018.
- 12) Relling M. V., Evans W. E., *Nature*, **526**, 343–350 (2015).
- 13) Mizuno Y., Harada E., Morita S., Kinoshita K., Hayashida M., Shono M., Morikawa Y., Murohara T., Nakayama M., Yoshimura M., Yasue H., *Circulation*, **131**, 1665–1673 (2015).
- 14) Ramamoorthy A., Flockhart D. A., Hosono N., Kubo M., Nakamura Y., Skaar T. C., *Pharmacogenet. Genomics*, **20**, 451–454 (2010).
- 15) Hosono N., Kato M., Kiyotani K., Mushiroda T., Takata S., Sato H., Amitani H., Tsuchiya Y., Yamazaki K., Tsunoda T., Zembutsu H., Nakamura Y., Kubo M., *Clin. Chem.*, **55**, 1546–1554 (2009).