

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011 年 4 月 14 日(14.04.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/043365 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/067522
- (22) 国際出願日: 2010 年 10 月 6 日(06.10.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-233554 2009 年 10 月 7 日(07.10.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人武庫川学院 (EDUCATIONAL CORPORATION MUKOGAWA GAKUIN) [JP/JP]; 〒6638137 兵庫県西宮市池開町 1 3 7 番地 Hyogo (JP). ダイセル化学工業株式会社 (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒5300001 大阪府大阪市北区梅田三丁目 4 番 5 号 毎日インテシオ Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木下 健司 (KINOSHITA, Kenji) [JP/JP]; 〒6638179 兵庫県西宮市甲子園九番町 1 1 番 6 8 号 武庫川女子大学内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人深見特許事務所 (Fukami Patent Office, p.c.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島二丁目 2 番 7 号 中之島セントラルタワー Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: GENOTYPE DETERMINATION METHOD

(54) 発明の名称: 遺伝子型判定方法

[図1]

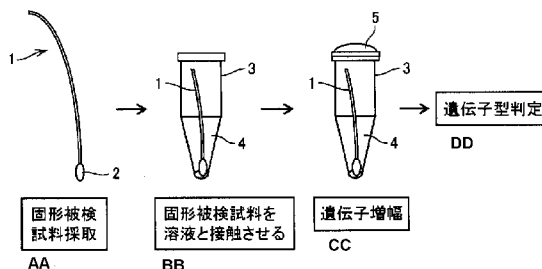


FIG. 1:
AA SOLID TEST SAMPLE IS COLLECTED
BB SOLID TEST SAMPLE IS BROUGHT INTO CONTACT WITH SOLUTION
CC GENE IS AMPLIFIED
DD GENOTYPE IS DETERMINED

(57) Abstract: Disclosed is a method for determining a genotype of a gene associated with alcohol susceptibility, which comprises the steps of: bringing a solid test sample containing the gene into direct contact with a solution comprising a buffer and a DNA polymerase and primer DNA for the amplification of the gene to carry out a method selected from a polymerase chain reaction, an LAMP method, a chain substitution amplification method, a reverse transcriptase chain substitution amplification method, a reverse transcriptase polymerase chain reaction, a reverse transcription LAMP method, an amplification method based on a nucleotide sequence, a transcription-mediated amplification method, and a rolling circle-type amplification method, thereby amplifying the gene; and determining the genotype of the gene using the amplified gene. The method enables the determination of the genotype of a gene associated with alcohol susceptibility safely, rapidly and at low cost.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2011/043365 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

アルコール感受性関連遺伝子の遺伝子型を判定する方法であって、前記遺伝子を含む固形被検試料を、バッファーとDNAポリメラーゼとを含む溶液、および前記遺伝子を増幅するためのプライマーDNAに直接接触させて、ポリメラーゼ連鎖反応、LAMP法、鎖置換増幅、逆転写酵素鎖置換増幅、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写LAMP法、核酸配列に基づく増幅、転写媒介性増幅およびローリングサークル型増幅法から選ばれる方法を施して、前記遺伝子を増幅する工程と、前記増幅された遺伝子から、当該遺伝子の遺伝子型を判定する工程とを含む、遺伝子型を判定する方法によって、安全、迅速、かつ安価にアルコールに対する感受性に関連する遺伝子の遺伝子型を判定する方法が提供できる。

明 細 書

発明の名称 : 遺伝子型判定方法

技術分野

[0001] 本発明は、アルコールに対する感受性に関連する遺伝子（アルコール感受性関連遺伝子）を含む固形被検試料から、当該固形被検試料に含まれる遺伝子の遺伝子型を判定する方法に関する。

背景技術

[0002] アルコール脱水素酵素 A D H (Alcohol Dehydrogenase) は、体内におけるアルコールからアセトアルデヒドへの分解に関与する酵素であり、複数種類が知られている。そのうち A D H 1 B (旧名 A D H 2) の遺伝子には、アルコール代謝速度が遅い低活性型と呼ばれる遺伝子型 A D H B 1 * 1 / * 1 があり、そのような遺伝子型を有する人は、飲酒後の顔面紅潮、動悸などのいわゆるフラッシング症状を呈し、アルコールの分解速度が遅いために体内にアルコールが残りやすく、アルコール依存症になりやすい体質であるといわれている。

[0003] またアルデヒド脱水素酵素 A L D H (Aldehyde Dehydrogenase) は、体内におけるアセトアルデヒドから酢酸への分解に関与する酵素の一つであり、複数種類が知られている。このうち、アセトアルデヒドの血中濃度が低い場合に作用する A L D H 2 の遺伝子にも不活性型と呼ばれる遺伝子型 A L D H 2 * 1 / * 2、A L D H 2 * 2 / * 2 とが知られており、そのような遺伝子型を有する人は、アセトアルデヒドの分解速度が遅いために飲酒で赤くなり二日酔いを起こしやすい体質であるといわれている。

[0004] 遺伝子型 A D H B 1 * 1 / * 1 については日本人の 5 % 程度、遺伝子型 A L D H 2 * 1 / * 2 については日本人のほぼ 4 0 % 程度存在することが分かっている。アルコール、アルデヒドには発癌性があり、上述した遺伝子型 A D H B 1 * 1 / * 1 や遺伝子型 A L D H 2 * 1 / * 2 を有する人は、飲酒量の増加を介して口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、食道癌、肝臓癌、乳癌、

直腸結腸癌など発癌しやすい傾向にあり、特に、遺伝子型 $ADHB1 \ast 1 / \ast 1$ と遺伝子型 $ALDH2 \ast 1 / \ast 2$ とを併せ持つ人は、その危険性は倍増するといわれている（たとえば、Akira Yokoyama et al., "Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and glutathione S-transferase M1 and drinking, smoking, and diet in Japanese men with esophageal squamous cell carcinoma", *Carcinogenesis*, Vol. 23, no. 11, (2002), pp. 1851-1859（非特許文献 1））、Akira Yokoyama et al., "Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics", *Carcinogenesis*, Vol. 22, no. 3, (2001), pp. 433-439（非特許文献 2））、Akira Yokoyama et al., "Macrocytosis, a new predictor for esophageal squamous cell carcinoma in Japanese alcoholic men", *Carcinogenesis*, Vol. 24, no. 11, (2003), pp. 1773-1778（非特許文献 3））、Takahiro Asakage et al., "Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma", *Carcinogenesis*, Vol. 28, no. 4, (2007), pp. 865-874（非特許文献 4））などを参照。）。

- [0005] また、チトクローム $CYP2E1$ (Cytochrome P450 2E1) は、第 2 のアルコール代謝経路と呼ばれる肝ミクロソーム酸化系においてアルコールの代謝に関連することが知られており、アルコール感受性の異なる 2 つの遺伝子型 $CYP2E1 \ast c1$ 、 $CYP2E1 \ast c2$ が存在することが知られている（たとえば、野村文夫「第 2 のアルコール代謝経路 Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS) とチトクローム P450 2E1 (CYP2E1)」、千葉医学、78, (2002), pp. 69-73（非特許文献 5））、山田裕一「日本人のアルコール代謝酵素の遺伝的多形と飲酒行動および飲酒による健康障害の関係」、金医大誌、30, (2005), pp. 448-455（非特許文献 6））、Yan-Mei Guo et

al., "Genetic polymorphisms in cytochrome P4502E1, alcohol and aldehyde dehydrogenases and the risk of esophageal squamous cell carcinoma in Gansu Chinese males", World J Gastroenterol, 14(9), (2008), pp.1444-1449 (非特許文献7)などを参照。)

[0006] したがって、上述したアルコール脱水素酵素A D Hの遺伝子、アルデヒド脱水素酵素A L D Hの遺伝子およびチトクロームC Y P 2 E 1の遺伝子などのアルコール感受性関連遺伝子の遺伝子型の判定は、特に、日本人の飲酒に関連する疾患や発癌のリスクの回避、また、個人の健康管理の上で重要な意義があると考えられる。

[0007] このように個体の基礎代謝、性質、疾患などの差異を生じさせる、生物の個体間での野生型とは異なる塩基配列を有する遺伝子多型 (S N P : Single Nucleotide Polymorphism) の検出は、従来よりP C R (Polymerase Chain Reaction) 法などを利用した遺伝子解析として様々な研究が進められている。たとえば特開2005-245273号公報 (特許文献1) にはアルデヒド脱水素酵素遺伝子多型について、また、特開2005-245272号公報 (特許文献2)、特開2006-75134号公報 (特許文献3) にはアルコール脱水素酵素遺伝子多型について、検出する方法がそれぞれ開示されている。しかしながら、これら特許文献1~3に開示された方法はいずれも、P C R法に利用するためのD N Aの精製などが煩雑であり、より簡便な方法が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開2005-245273号公報

特許文献2：特開2005-245272号公報

特許文献3：特開2006-75134号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Akira Yokoyama et al., "Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and glutathione S-transferase

M1 and drinking, smoking, and diet in Japanese men with esophageal squamous cell carcinoma", *Carcinogenesis*, Vol. 23, no. 11, (2002), pp. 1851-1859

非特許文献2: Akira Yokoyama et al., "Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics", *Carcinogenesis*, Vol. 22, no. 3, (2001), pp. 433-439

非特許文献3: Akira Yokoyama et al., "Macrocytosis, a new predictor for esophageal squamous cell carcinoma in Japanese alcoholic men", *Carcinogenesis*, Vol. 24, no. 11, (2003), pp. 1773-1778

非特許文献4: Takahiro Asakage et al., "Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma", *Carcinogenesis*, Vol. 28, no. 4, (2007), pp. 865-874

非特許文献5: 野村文夫「第2のアルコール代謝経路Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS) とチトクロームP450 2E1 (CYP2E1)」、*千葉医学*、78, (2002), pp. 69-73

非特許文献6: 山田裕一「日本人のアルコール代謝酵素の遺伝的多形と飲酒行動および飲酒による健康障害の関係」、*金医大誌*、30, (2005), pp. 448-455

非特許文献7: Yan-Mei Guo et al., "Genetic polymorphisms in cytochrome P4502E1, alcohol and aldehyde dehydrogenases and the risk of esophageal squamous cell carcinoma in Gansu Chinese males", *World J Gastroenterol*, 14(9), (2008), pp. 1444-1449

非特許文献8: Michael P. and Andrew L., *Nucleic Acids Research*, 19, 1151, (1991)

非特許文献9: Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D. and Loning A. S., Nucleic Acids Reserch, 25, 3957, (1997)

非特許文献10: Waleed A. A. and Peter R., J.clin. Microbiol., 39, 485-493, (2001)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、上記課題を解決するためになされたものであって、その目的とするところは、安全、迅速、かつ安価にアルコールに対する感受性に関連する遺伝子の遺伝子型を判定する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明は、アルコール感受性関連遺伝子の遺伝子型を判定する方法であって、前記遺伝子を含む固形被検試料を、バッファーとDNAポリメラーゼを含む溶液、および前記遺伝子を増幅するためのプライマーDNAに直接接触させて、ポリメラーゼ連鎖反応、LAMP法、鎖置換増幅、逆転写酵素鎖置換増幅、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写LAMP法、核酸配列に基づく増幅、転写媒介性増幅およびローリングサークル型増幅法から選ばれる方法を施して、前記遺伝子を増幅する工程と、前記増幅された遺伝子から、当該遺伝子の遺伝子型を判定する工程とを含むことを特徴とする。
- [0012] 本発明におけるアルコール感受性関連遺伝子は、アルコール脱水素酵素ADH1Bの遺伝子、アルデヒド脱水素酵素ALDH2の遺伝子およびチトクロームCYP2E1の遺伝子の少なくともいずれかの遺伝子であることが、好ましい。
- [0013] 本発明における固形試験試料は、血液を乾燥させたものであるか、毛根であるか、または、唾液を乾燥させたものであることが望ましい。
- [0014] 本発明の遺伝子型判定方法は、アルコール脱水素酵素ADH1Bの遺伝子、アルデヒド脱水素酵素ALDH2の遺伝子およびチトクロームCYP2E1の遺伝子から選ばれる少なくともいずれか2つを同時に増幅し、同時に遺伝子型を判定することが、好ましい。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、安全、迅速、かつ安価にアルコールに対する感受性に関連する遺伝子の遺伝子型を判定する方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]本発明の好ましい一例を模式的に示す図である。

[図2]アルコールが体内で分解されて体外へ排泄されるまでを模式的に示す図である。

[図3]実施例1の結果を示す電気泳動写真である。

[図4]実施例2の結果を示す電気泳動写真である。

[図5]実施例3の結果を示す電気泳動写真である。

[図6]実施例4の結果を示す電気泳動写真である。

[図7]実施例5の結果を示す電気泳動写真である。

[図8]実施例6におけるTaqman Genotyping Master Mix (Applied Biosystems社製)を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図である。

[図9]実施例6におけるTaqman Genotyping Master Mix (Applied Biosystems社製)を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である。

[図10]実施例6におけるRealtime PCR Master Mix (東洋紡績(株)製)を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図である(乾燥ろ紙唾液使用)。

[図11]実施例6におけるRealtime PCR Master Mix (東洋紡績(株)製)を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である(乾燥ろ紙唾液使用)。

[図12]実施例6におけるRealtime PCR Master Mix (東洋紡績(株)製)を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図である(乾燥ろ紙血液使用)。

[図13]実施例6におけるRealtime PCR Master Mix

（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である（乾燥ろ紙血液使用）。

[図14]実施例6におけるRNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図である（乾燥ろ紙唾液使用）。

[図15]実施例6におけるRNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である（乾燥ろ紙唾液使用）。

[図16]実施例6におけるRNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図である（乾燥ろ紙血液使用）。

[図17]実施例6におけるRNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である（乾燥ろ紙血液使用）。

発明を実施するための形態

[0017] 図1は、本発明の好ましい一例を模式的に示す図である。本発明は、アルコール感受性関連遺伝子の遺伝子型を判定する方法であって、前記遺伝子を含む固形被検試料を、バッファーとDNAポリメラーゼとを含む溶液、および前記遺伝子を増幅するためのプライマーDNAに直接接触させて、ポリメラーゼ連鎖反応、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法、鎖置換増幅、逆転写酵素鎖置換増幅、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写LAMP法、核酸配列に基づく増幅、転写媒介性増幅およびローリングサークル型増幅法から選ばれる方法を施して、前記遺伝子を増幅する工程と、前記増幅された遺伝子から、当該遺伝子の遺伝子型を判定する工程とを含む。以下、図1を参照しながら、本発明の方法について詳細に説明する。

[0018] 図1に示す例では、まず、直接固形被検試料を採取するか、または液状物を乾燥することで、検査対象から、アルコール感受性関連遺伝子を含む固形

被検試料を採取する。

[0019] 直接固形被検試料を採取する場合、検査対象の毛根、口腔粘膜および細胞組織から選ばれる固形物を、固形被検試料として直接次の工程に供する。なお、毛根は、毛髪、眉毛、鼻毛、ひげ、陰毛、腋毛を含む全ての体毛由来のものであれば特に限定されない。毛根は、根元から毛を抜くことで得られるため、比較的痛みをともなわない採取が可能であり、口腔粘膜は口中に皮膚を綿棒などで軽くこすることで痛みをともなわず採取することが可能である。また、口腔粘膜は、採取後そのまま室温に置くことで乾燥させた固形状態のものであってもよい。細胞組織については、そのまま用いられる程度に乾燥していることが好ましく、水分含有量は0%以上50%未満であることが特に好ましい。また、細胞組織については、細かく粉砕されることが好ましい。

[0020] また液状物を乾燥させることで固形被検試料を採取する場合、検査対象の鼻汁、鼻腔ぬぐい液、眼結膜ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、喀痰、糞便、血液、血清、血漿、髄液、唾液（通常、口腔粘膜が含まれる）、尿、汗、精液および細胞組織から選ばれる液状物を乾燥させることで得られる固形物を次の工程に供する。ここで、液状物に含まれる細胞組織は、水分含有量が50%以上のものを示すものとする。なお、上述した口腔粘膜も、適宜乾燥させた後に用いても良い。

[0021] ここで、液状物を乾燥させる方法としては、ろ紙に液状物をしみこませ、水分を蒸発させる方法や、自然乾燥または凍結乾燥など、公知の乾燥方法を選ぶことができる。ただし、糞便由来の固形被検試料を得るためには、糞便を植物繊維体に塗布し、植物繊維体を自然乾燥した後にシリカゲルとともに密閉し1時間以上保持することが好ましい。植物繊維体とは、紙、綿などの植物性の繊維体をいうものとする。

[0022] 液状物を乾燥させて固形被検試料とすることで、液状物にもともと含まれるプロテアーゼ、アミラーゼおよびヌクレアーゼなどの酵素活性を阻害することができ、生体組織細胞、微生物およびウイルスを完全に死滅させること

なく生命活動を休止させることができる。したがって、固形被検試料の輸送、保存などは室温で行なうことができ、より簡便となる利点がある。

[0023] 本発明の遺伝子型判定方法においては、上述した中でも、採取され得る細胞の数が一定しており、安定した量の鋳型を遺伝子型判定に供することができ、再現性に優れる観点から、固形被検試料が血液または唾液を乾燥させたものであるか、または、毛根であることが好ましく、また、上述したように根元から毛を抜くことで得られるため、比較的痛みを伴わない採取が可能であることから、固形被検試料が毛根であることが特に好ましい。なお、固形被検試料が血液を乾燥させたものである場合、従来のアルコール感受性関連遺伝子の遺伝子型の判定方法と比較すると、血液の採取量が少なくて済むという利点がある。図 1 には、検査対象から、毛根 2 を含む頭髮 1 を注意深く引き抜き、固形被検試料として採取した例が示されている。

[0024] ここで、図 2 は、アルコールが体内で分解されて体外へ排泄されるまでを模式的に示す図である。体内に摂取されたアルコールは、通常、まず、アルコール脱水素酵素 A D H、肝ミクロソーム酸化系のチトクローム C Y P 2 E 1 などによってアセトアルデヒドに分解される。アセトアルデヒドはアルデヒド脱水素酵素 (A L D H) によって酢酸に分解される。その後、酢酸は水と二酸化炭素に分解された後、体外へ排泄される。本発明における「アルコール感受性関連遺伝子」は、このようなアルコールの代謝に関連する酵素の遺伝子を指し、好ましくは、アルコール脱水素酵素 A D H 1 B の遺伝子、アルデヒド脱水素酵素 A L D H 2 の遺伝子およびチトクローム C Y P 2 E 1 の遺伝子の少なくともいずれかの遺伝子である。

[0025] 上述したように、アルコール脱水素酵素 A D H B 1 の遺伝子には、遺伝子型 A D H B 1 * 1 (配列番号 1 に示す塩基配列) と、遺伝子型 A D H B 1 * 2 (配列番号 2 に示す塩基配列) とが存在し、日本人の約 6 0 % はアルコール脱水素酵素 A D H が正常な活性 (酵素活性: 2 0 0) を有する対立遺伝子 A D H B 1 * 2 / * 2 を有し、日本人の約 3 5 % はアルコール脱水素酵素 A D H が正常な活性 (酵素活性: 1 0 0) を有する対立遺伝子 A D H B

1 * 1 / * 2 を有し、日本人の約 5 % はアルコール脱水素酵素 A D H が低い活性（酵素活性：1）を有する対立遺伝子 A D H B 1 * 1 / * 1 を有することが知られている。

[0026] また、アルデヒド脱水素酵素 A L D H 2 の遺伝子には、遺伝子型 A L D H 2 * 1（配列番号 3 に示す塩基配列）と、遺伝子型 A L D H 2 * 2（配列番号 4 に示す塩基配列）とが存在し、アルデヒド脱水素酵素 A L D H 2 が正常な活性（酵素活性：100）を有する約 56 % の日本人は対立遺伝子 A L D H 2 * 1 / * 1 を有し、アルコール脱水素酵素 A D H の活性が低い（酵素活性：6）約 40 % の日本人は対立遺伝子 A L D H 2 * 1 / * 2 を有し、アルコール脱水素酵素 A D H が不活性型である（酵素活性：0）約 4 % の日本人は対立遺伝子 A L D H 2 * 2 / * 2 を有することが知られている。

[0027] さらに、チトクローム C Y P 2 E 1 の遺伝子には、遺伝子型 C Y P 2 E 1 * c 1（配列番号 5 に示す塩基配列）と、遺伝子型 C Y P 2 E 1 * c 2（配列番号 6 に示す塩基配列）とが知られている。

[0028] なお、本発明におけるアルコール感受性関連遺伝子は、その長さとしては、通常 20 ～ 数十万塩基程度まで適用できるが、50 ～ 3000 塩基であることが好ましい。

[0029] 本発明の遺伝子型判定方法では、次に、上述したようにして採取した固形被検試料をバッファーと DNA ポリメラーゼとを含む溶液、および特定遺伝子を増幅するためのプライマー DNA に直接接触させて、ポリメラーゼ連鎖反応、LAMP 法、鎖置換増幅、逆転写酵素鎖置換増幅、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写 LAMP 法、核酸配列に基づく増幅、転写媒介性増幅およびローリングサークル型増幅法から選ばれる方法を施して、固形被検試料に含まれるアルコール感受性関連遺伝子を増幅する。

[0030] 本工程では、プレート状またはチューブ状の担体上で、上述した遺伝子を増幅することが好ましい。具体的には、まず、プレート状またはチューブ状の担体上に試薬を置く。チューブ状の担体である場合には、その内部に試薬

を投入し、プレート状の担体である場合には、その表面に試薬を置く。この試薬は、バッファーとDNAポリメラーゼとを含む溶液とプライマーDNAとを含有する。そして試薬と固形被検試料とが直接接触するように担体上に固形被検試料を配置し、公知の方法によってポリメラーゼ連鎖反応、LAMP法、鎖置換増幅、逆転写酵素鎖置換増幅、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写LAMP法、核酸配列に基づく増幅、転写媒介性増幅およびローリングサークル型増幅法から選ばれる方法で遺伝子を増幅する。なお、担体上に固形被検試料を置き、その後に担体上に試薬を置いてもよい。図1には、チューブ状の担体3の内部にPCR反応液4を投入し、さらに、担体3に固形被検試料である頭髮1を投入することで、固形被検試料をPCR反応液と接触させた後、チューブ状の担体3に蓋5をして、PCR反応を行なう例が示されている。

[0031] 本工程においては、DNAポリメラーゼはTaq DNAポリメラーゼに代表される耐熱性DNAポリメラーゼのものであれば特に制限されないが、KOD DNAポリメラーゼを用いることが好ましい。バッファーは固形被検試料中に含まれるPCR反応を阻害する物質存在下でもDNA増幅可能なものであれば、特に制限されないが、EzWay（商標）（KOMA Biotechnology）、Ampdirect（登録商標）（島津製作所）、Phusion（登録商標）Blood Direct PCR kit バッファー（New ENGLAND Bio-Labs）、KOD FX バッファー（東洋紡績）などを用いることが好ましく、KOD DNAポリメラーゼ用に開発されたKOD FX バッファー（東洋紡績）を用いることが特に好ましい。

[0032] アルコール感受性関連遺伝子を構成する核酸がDNAの場合においては、直接PCR法またはLAMP法などを行なうことができる。また、該核酸がRNA断片の場合においては、RNA鎖断片の場合は逆転写反応を行なった後、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、LAMP法、鎖置換増幅（SDA: Strand Displacement Amplification）、逆転写酵素鎖置換増幅（RT (Rev

erse Transcription)－S D A)、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(R T－P C R)、逆転写L A M P法(R T－L A M P)、核酸配列に基づく増幅(N A S B A : Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)、転写媒介性増幅(T M A : Transcription-Mediated Amplification)、ローリングサークル型増幅などの遺伝子増幅法を用いて増幅することができる。なお、P C Rなどの増幅の条件は、特異的な増幅が起こる限り特に制限されず、適宜設定することができる。なお、本発明においては、アルコール脱水素酵素A D H 1 Bの遺伝子、アルデヒド脱水素酵素A L D H 2の遺伝子およびチトクロームC Y P 2 E 1の遺伝子から選ばれる少なくともいずれか2つを同時に増幅し、同時に遺伝子型を判定するようにすることが好ましい。

[0033] 本発明においてP C R法に用いるプライマーD N Aは、アルコール感受性関連遺伝子の特異的に増幅することができるものであれば特に制限されず、また、適宜公知の方法で設計することができる。なお、簡便な手順で遺伝子型の判定が可能となることから、P C R法の中でも、対立遺伝子増幅(A S P : Allele Specific Primer)－P C R法およびP C R－R F L P(制限酵素断片長多型: Restriction Fragment Length Polymorphism)法を利用することが好ましく、そのために設計されたプライマーD N Aを用いることが好ましい。

[0034] また本発明においては、P C R法としてT a q M a n法を利用することもできる。T a q M a n法は、蛍光標識したアレル特異的オリゴヌクレオチド(T a q M a nプローブ)とT a q D N AポリメラーゼによるP C Rを利用した方法である(たとえばGenet. Anal., 14143-149(1999), J. Clin. Microbiol., 34, 2933-2936(1996)などを参照。)。目的の配列を含む領域にプライマーを設計し、T a q M a nプローブをその間に設定する。このプローブの5'末端側にリポーター蛍光色素(R)を3'末端側にクレンチャー蛍光色素(Q)をラベルする。プローブのT_m値をプライマーのT_m値より10℃位高めに設計することで、プローブが先にハイブリダイズする。そしてプライマーがハイブリダイズし、D N Aポリメラーゼの5'－3'エキ

ソヌクレアーゼ活性によって、TaqManプローブが一塩基ずつ加水分解され、レポーター蛍光色素を遊離する。この遊離したレポーター色素の強度が、PCR産物に比例することを利用している。

[0035] TaqMan法で遺伝子解析する場合には、プライマーとプローブの具体的なヌクレオチド配列は、適宜決定することができる。5'末端側のレポーター蛍光色素と3'末端側にクレンチャー蛍光色素の2種の蛍光標識物質は、互いに識別可能な組合せであればよく、そのような蛍光標識物質の組合せはそれぞれに公知のものをを用いることができる。好適な具体例として、6-FAM（登録商標）、VIC（登録商標）、およびTET（登録商標）のいずれかの組合せが挙げられる。

[0036] なお、上述したプライマーおよびプローブは、単なる一例であって、オリゴヌクレオチドプライマーであれば目的の増幅反応を支障なく行なえる限度において、他方オリゴヌクレオチドプローブであれば目的のハイブリダイゼーション反応を支障なく行なえる限度において、一部の塩基配列に欠失、置換、挿入および／または付加などの改変がされていてもよい。改変にかかる塩基数は、たとえば1～5個、好ましくは1～3個である。なお、このような改変は、原則として多型部位に対応する塩基以外の部分において行なわれる。

[0037] 多型解析用オリゴヌクレオチド（プローブ、プライマー）には、解析方法に応じて適宜DNA断片又はRNA断片が用いられる。多型解析用オリゴヌクレオチドの塩基長はそれぞれの機能が発揮される長さであればよく、プライマーとして用いられる場合の塩基長の例としては、15～30塩基長、好ましくは18～25塩基長程度である。

[0038] 増幅するポリヌクレオチドの長さは、用いられる検出方法に応じて適宜設定されるが、一般的には20～500塩基長、好ましくは20～200塩基長である。

[0039] 本発明のプライマーおよびプローブには、その配列の末端に、検出のための適当な標識が付加されたものも含むものとする。標識としては、たとえば

、R O X（登録商標）、F I T C（登録商標；フルオレセイン）、T E T（登録商標）、C y 5（登録商標）、H E X（登録商標）、N E D（（登録商標））、6 - F A M（登録商標）、R O X（登録商標）、T A M R A（登録商標）、ローダミン（r h o d a m i n）またはその誘導体などの蛍光色素、酵素、タンパク、放射性物質、ビオチン、チオールなどを挙げることができるが、これらに限定されない。蛍光色素で塩基を標識する方法は、公知の方法を用いることができる。また、市販の蛍光標識キットを使用することもできる。

[0040] 多型解析用オリゴヌクレオチド（プライマー、プローブ）の合成は、具体的には通常のホスホルアミダイト法、リン酸トリエステル法などの化学合成法によることもでき、また市販されている自動オリゴヌクレオチド合成装置（たとえば、Pharmacia LKB Gene Assembler Plus：ファルマシア社製）などを使用して合成することもできる。あるいは、custom-synthesizedされたものを用いることもできる。

[0041] ここで、本発明でいう「不溶性担体」としては、プラスチック、ガラスなどからなるチューブのほか、96穴ウェルなどを挙げることができる。チューブ状とは、中空状態のものをいい、底があるPCRチューブや、エッペンドルフチューブのような形状であってもよい。

[0042] 上述のように、担体表面にはプローブDNAが固定化されていることが特に好ましい。これは、固形被検試料中のアルコール感受性関連遺伝子をチューブ状の担体に固定したオリゴDNA（プローブDNA）を介してハイブリダイゼーションで捕捉して、RT-PCR法にて遺伝子増幅ができ、または、担体上の液相で特定遺伝子を増幅し、同時に、プレート状担体に固定した複数種のプローブDNAで多種の生物の特異的遺伝子を検出したり、遺伝子多型（SNP）を網羅的に検出できるという利点があるためである。

[0043] そして、ポリメラーゼ連鎖反応、LAMP法、鎖置換増幅、逆転写酵素鎖置換増幅、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写LAMP法、核酸配列に基づく増幅、転写媒介性増幅およびローリングサークル型増幅法から選ば

れる方法によって、アルコール感受性関連遺伝子が増幅される。

[0044] 本発明の遺伝子型判定方法では、次に、上述したようにして増幅された遺伝子から、当該遺伝子の遺伝子型を判定する。本工程における解析法は、増幅された遺伝子の検出または定量が可能なものであれば特に制限されず、DNAシーケンス法、ゲル電気泳動法、平板状のDNAチップまたはビーズによるハイブリダイゼーション、リアルタイムPCR法、およびプローブDNAを利用した伸張反応またはハイブリダイゼーションによる遺伝子検出法から選ばれるいずれかの方法が挙げられる。ゲル電気泳動法によれば、PCR増幅産物の量、およびその大きさを評価することができる。また、リアルタイムPCR法によれば、迅速にPCR増幅産物の定量を行なうことができる。リアルタイムPCR法を採用する場合、一般に増幅サイクル数1～10までは蛍光強度の変化はノイズレベルでありゼロに等しいので、それらを増幅産物ゼロのサンプルブランクと見なし、それらの標準偏差SDを算出しその10を乗じた蛍光値をスレシヨルド値とし、そのスレシヨルド値を最初に上回るPCRサイクル数をサイクルスレシヨルド値（Ct値）という。したがって、PCR反応溶液に初期のDNA鋳型量が多い程、Ct値は小さな値となり、鋳型DNA量が少ない程、Ct値は大きな値となる。また、鋳型DNA量が同じでも、その鋳型内のPCRの特定遺伝子に切断が生じている割合が多くなる程、同領域のPCR反応のCt値は大きな値となる。

[0045] 本発明によれば、アルコール感受性関連遺伝子の遺伝子型を安全、迅速、かつ安価に判定することができる。これによって、従来と比較して格段に安全、迅速、かつ安価なアルコール感受性関連遺伝子の検査システムの構築が可能となる。このような遺伝子検査システムは、未成年者飲酒防止のためのアルコール健康教育、遺伝子診断によるオーダーメイド医療普及・理解に向けた啓蒙活動、アルコールに対する安心・安全のための健康管理などに有用であると考えられる。

実施例

[0046] 以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに

限定されるものではない。

[0047] <実施例 1>

[1] PCR-RFLP法による遺伝子型の判定

以下の手順で、検査対象からそれぞれ採取した血液（全血）、唾液（口腔内細胞を含む）、毛根について、アルコール脱水素酵素ADH1Bの遺伝子およびアルデヒド脱水素酵素ALDH2の遺伝子の遺伝子多型の検出を行なった。血液および唾液については、ろ紙（アドバンテック定性ろ紙No. 2）にしみこませ、自然乾燥させて、固形被検試料として採取した。通常行なうDNAの抽出・精製する過程を省略し、この乾燥ろ紙の直径1mmのパンチ片をそのまま、チューブ状の担体内のPCR反応液に投入した。また、毛根についてはそのまま、チューブ状の担体内のPCR反応液に投入した。PCR反応液は、PCRキットKOD FX（東洋紡績（株）製）を使用して、添付のプロトコールに従って、それぞれ以下の試薬を含む25 μ L反応液を調整した。

[0048] （ADH1B遺伝子用PCR反応液）

- ・ 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX : 7.5 μ L、
- ・ dNTPs : 1.5 μ L、
- ・ プライマー1（ADH1B-F）（10 μ M） : 0.6 μ L、
- ・ プライマー2（ADH1B-R）（10 μ M） : 0.6 μ L、
- ・ KOD FX : 0.3 μ L、
- ・ DW（distilled water） : 4.5 μ L。

[0049] （ALDH2遺伝子用PCR反応液）

- ・ 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX : 7.5 μ L、
- ・ dNTPs : 1.5 μ L、
- ・ プライマー3（ALDH2-F）（10 μ M） : 0.6 μ L、
- ・ プライマー4（ALDH2-R）（10 μ M） : 0.6 μ L、
- ・ KOD FX : 0.3 μ L、
- ・ DW（distilled water） : 4.5 μ L。

[0050] なお、ADH1B遺伝子用のPCR-RFLPプライマーとしては、以下の2種類を用いた。

[0051] ・プライマー1 (ADH1B-F) : 5' - CCTTGGGGATAAAC
CTGAATCTT - 3' (配列番号7)、

・プライマー2 (ADH1B-R) : 5' - GAAATCCTGGATG
GTGAACC - 3' (配列番号8)。

[0052] またALDH2遺伝子用のPCR-RFLPプライマーとしては、以下の2種類を用いた。

[0053] ・プライマー3 (ALDH2-F) : 5' - TCAAATTACAGGG
TCAACTGCT - 3' (配列番号9)、

・プライマー4 (ALDH2-R) : 5' - GGCTGGGTCTTTA
CCCTCTC - 3' (配列番号10)。

[0054] チューブ状の担体に蓋をして、以下の増幅条件でPCR反応を行なった。
(増幅条件)

熱変性 : 95°C、5分、

98°C、10秒→60°C、30秒→74°C、45秒を40サイクル、

伸長反応 : 74°C、2分。

[0055] PCR反応後に得られたADH1B遺伝子の増幅産物は349bpであった。このADH1B遺伝子の増幅産物を以下の組成の反応液で37°C、1時間の制限酵素反応を行なった。

[0056] (ADH1B遺伝子用制限酵素反応液)

・10×NEB Buffer 4 : 2 μL、

・ADH1B遺伝子の増幅産物 : 6 μL、

・Msl 1 : 0.25 μL、

・DW (distilled water) : 11.75 μL。

[0057] またPCR反応後に得られたALDH2遺伝子の増幅産物は430bpであった。このALDH2遺伝子の増幅産物を以下の組成の反応液で37°C、1時間の制限酵素反応を行なった。

[0058] (ALDH2 遺伝子用制限酵素反応液)

- ・ $10 \times \text{NEB Buffer}$ 4 : $2 \mu\text{L}$ 、
- ・ $8 \times \text{SAM}$: 2. $5 \mu\text{L}$ 、
- ・ ALDH2 遺伝子の増幅産物 : $6 \mu\text{L}$ 、
- ・ Acu 1 : 0. $25 \mu\text{L}$ 、
- ・ DW (distilled water) : 9. $25 \mu\text{L}$ 。

[0059] 反応後のADH1B遺伝子、ALDH2遺伝子の制限酵素処理片をそれぞれアガロースゲルにアプライし、電気泳動にて増幅された遺伝子を確認した。図3は、実施例1の結果を示す電気泳動写真である。なお、図3から、189bp、160bpのADH1B遺伝子の制限酵素処理片、296bp、134bpのALDH2遺伝子の制限酵素処理片がそれぞれ得られていることが分かる。

[0060] 図3 (a) において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン1 : ADH1B * 2 / * 2 (血液)、
- ・ レーン2 : ADH1B * 2 / * 2 (唾液)、
- ・ レーン3 : ADH1B * 2 / * 2 (毛根)、
- ・ レーン4 : ALDH2 * 2 / * 2 (血液)、
- ・ レーン5 : ALDH2 * 2 / * 2 (唾液)、
- ・ レーン6 : ALDH2 * 2 / * 2 (毛根)。

[0061] 図3 (b) において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン1 : ADH1B * 2 / * 2 (血液)、
- ・ レーン2 : ADH1B * 2 / * 2 (唾液)、
- ・ レーン3 : ADH1B * 2 / * 2 (毛根)、
- ・ レーン4 : ALDH2 * 1 / * 1 (血液)、
- ・ レーン5 : ALDH2 * 1 / * 1 (唾液)、
- ・ レーン6 : ALDH2 * 1 / * 1 (毛根)。

[0062] 図3 (c) において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン1 : ADH1B * 2 / * 2 (血液)、

- ・ レーン 2 : A D H 1 B * 2 / * 2 (唾液)、
- ・ レーン 3 : A D H 1 B * 2 / * 2 (毛根)、
- ・ レーン 4 : A L D H 2 * 1 / * 2 (血液)、
- ・ レーン 5 : A L D H 2 * 1 / * 2 (唾液)、
- ・ レーン 6 : A L D H 2 * 1 / * 2 (毛根)。

[0063] 図 3 (d) において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン 1 : A D H 1 B * 1 / * 1 (血液)、
- ・ レーン 2 : A D H 1 B * 1 / * 1 (唾液)、
- ・ レーン 3 : A D H 1 B * 1 / * 1 (毛根)、
- ・ レーン 4 : A L D H 2 * 1 / * 1 (血液)、
- ・ レーン 5 : A L D H 2 * 1 / * 1 (唾液)、
- ・ レーン 6 : A L D H 2 * 1 / * 1 (毛根)。

[0064] 図 3 (e) において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン 1 : A D H 1 B * 1 / * 1 (血液)、
- ・ レーン 2 : A D H 1 B * 1 / * 1 (唾液)、
- ・ レーン 3 : A D H 1 B * 1 / * 1 (毛根)、
- ・ レーン 4 : A L D H 2 * 1 / * 2 (血液)、
- ・ レーン 5 : A L D H 2 * 1 / * 2 (唾液)、
- ・ レーン 6 : A L D H 2 * 1 / * 2 (毛根)。

[0065] 図 3 (f) において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン 1 : A D H 1 B * 1 / * 2 (血液)、
- ・ レーン 2 : A D H 1 B * 1 / * 2 (唾液)、
- ・ レーン 3 : A D H 1 B * 1 / * 2 (毛根)、
- ・ レーン 4 : A L D H 2 * 1 / * 1 (血液)、
- ・ レーン 5 : A L D H 2 * 1 / * 1 (唾液)、
- ・ レーン 6 : A L D H 2 * 1 / * 1 (毛根)。

[0066] 図 3 (g) において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン 1 : A D H 1 B * 1 / * 2 (血液)、

- ・ レーン 2 : A D H 1 B * 1 / * 2 (唾液)、
- ・ レーン 3 : A D H 1 B * 1 / * 2 (毛根)、
- ・ レーン 4 : A L D H 2 * 1 / * 2 (血液)、
- ・ レーン 5 : A L D H 2 * 1 / * 2 (唾液)、
- ・ レーン 6 : A L D H 2 * 1 / * 2 (毛根)。

[0067] <実施例 2>

実施例 1 と同様にろ紙 (アドバンテック定性ろ紙 No. 2) にしみこませ、自然乾燥させて固形被検試料として採取した血液を乾燥ろ紙の直径 1 mm のパンチ片をそのまま、チューブ状の担体内の PCR 反応液に投入した。PCR 反応液は、PCR キット KOD FX (東洋紡績 (株) 製) を使用して、添付のプロトコールに従って、それぞれ以下の試薬を含む 25 μ L 反応液を調整した。

[0068] (A D H 1 B 遺伝子用 PCR 反応液)

- ・ 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX : 10 μ L、
- ・ d N T P s : 2 μ L、
- ・ プライマー 5 (A D H 1 B - F) (10 μ M) : 0.8 μ L、
- ・ プライマー 6 (A D H 1 B - R) (10 μ M) : 0.8 μ L、
- ・ KOD FX : 0.4 μ L、
- ・ DW (distilled water) : 6 μ L。

[0069] (A L D H 2 遺伝子用 PCR 反応液)

- ・ 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX : 10 μ L、
- ・ d N T P s : 2 μ L、
- ・ プライマー 7 (A L D H 2 - F) (10 μ M) : 0.8 μ L、
- ・ プライマー 8 (A L D H 2 - R) (10 μ M) : 0.8 μ L、
- ・ KOD FX : 0.4 μ L、
- ・ DW (distilled water) : 6 μ L。

[0070] なお、A D H 1 B 遺伝子用の PCR-RFLP プライマーとしては、以下の 2 種類を用いた。

- [0071] ・プライマー5 (ADH1B-F) : 5' -GGAAGGTAGAGAA
GGGCTTTAGACTG-3' (配列番号11)、
・プライマー6 (ADH1B-R) : 5' -GTGCAAGCACTTT
CGTCTCTCATTTG-3' (配列番号12)。
- [0072] またALDH2遺伝子用のPCR-RFLPプライマーとしては、以下の
2種類を用いた。
- [0073] ・プライマー7 (ALDH2-F) : 5' -TGGGCGAGTACGG
GCTGCAGGCATAGACT-3' (配列番号13)、
・プライマー8 (ALDH2-R) : 5' -CCGGCAGGTCCTG
AACCTCTGGCAGGC-3' (配列番号14)。
- [0074] チューブ状の担体に蓋をして、以下の増幅条件で、それぞれ別個に独立し
てADH1B遺伝子、ALDH2遺伝子のPCR反応を行なった。
- [0075] (増幅条件)
熱変性 : 95°C、10分、
98°C、10秒→62°C、30秒→74°C、30秒を40サイクル、
伸長反応 : 74°C、2分。
- [0076] PCR反応後に得られたADH1B遺伝子の増幅産物は428bpであつ
た。このADH1B遺伝子の増幅産物を以下の組成の反応液で37°C、1時
間の制限酵素反応を行なった。
- [0077] (ADH1B遺伝子用制限酵素反応液)
・10×NEB Buffer 4 : 2μL、
・ADH1B遺伝子の増幅産物 : 6μL、
・MseI 1 : 0.5μL、
・DW (distilled water) : 11.5μL。
- [0078] またPCR反応後に得られたALDH2遺伝子の増幅産物は169bpで
あった。このALDH2遺伝子の増幅産物を以下の組成の反応液で37°C、
1時間の制限酵素反応を行なった。
- [0079] (ALDH2遺伝子用制限酵素反応液)

- ・ $10 \times \text{NEB Buffer}$ $4 : 2 \mu\text{L}$ 、
- ・ $8 \times \text{SAM}$: $2.5 \mu\text{L}$ 、
- ・ ALDH2 遺伝子の増幅産物 : $6 \mu\text{L}$ 、
- ・ Acu 1 : $0.5 \mu\text{L}$ 、
- ・ DW (distilled water) : $9.25 \mu\text{L}$ 。

[0080] 反応後の ADH1B 遺伝子、 ALDH2 遺伝子の制限酵素処理片をそれぞれアガロースゲルにアプライし、電気泳動にて増幅された遺伝子を確認した。なお、コントロールとして、 DW もアプライした。図 4 は、実施例 2 の結果を示す電気泳動写真である。なお、図 4 から、 217bp 、 211bp の ADH1B 遺伝子の制限酵素処理片、 48bp 、 121bp の ALDH2 遺伝子の制限酵素処理片がそれぞれ得られていることが分かる。

[0081] 図 4 (a) において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン 1 : ADH1B * 1 / * 2、
- ・ レーン 2 : ADH1B * 1 / * 1、
- ・ レーン 3 : ADH1B * 1 / * 2、
- ・ レーン 4 : DW 。

[0082] 図 4 (b) において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン 1 : ALDH2 * 1 / * 2、
- ・ レーン 2 : ALDH2 * 2 / * 2、
- ・ レーン 3 : ALDH2 * 2 / * 2、
- ・ レーン 4 : DW 。

[0083] <実施例 3>

実施例 2 と同様にして得られた ADH1B 遺伝子、 ALDH2 遺伝子の増幅産物を、以下の制限酵素反応液を用いて同時に 37°C 、1 時間の制限酵素反応を行なった。

[0084] (制限酵素反応液)

- ・ $10 \times \text{NEB Buffer}$ $4 : 2 \mu\text{L}$ 、
- ・ ADH1B 遺伝子の増幅産物 : $3 \mu\text{L}$ 、

- ・ A L D H 2 遺伝子の増幅産物 : $3 \mu\text{L}$ 、
- ・ $8 \times \text{SAM}$: $2.5 \mu\text{L}$ 、
- ・ MsI 1 : $0.5 \mu\text{L}$ 、
- ・ Acu 1 : $0.5 \mu\text{L}$ 、
- ・ DW (distilled water) : $8.5 \mu\text{L}$ 。

[0085] 反応後の A D H 1 B 遺伝子、A L D H 2 遺伝子の制限酵素処理片をそれぞれアガロースゲルにアプライし、電気泳動にて増幅された遺伝子を確認した。なお、コントロールとして、DWもアプライした。図5は、実施例3の結果を示す電気泳動写真である。

[0086] 図5において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン1 : A D H 1 B * 1 / * 2、A L D H 2 * 1 / * 2、
- ・ レーン2 : A D H 1 B * 1 / * 1、A L D H 2 * 2 / * 2、
- ・ レーン3 : A D H 1 B * 1 / * 2、A L D H 2 * 2 / * 2、
- ・ レーン4 : DW。

[0087] <実施例4>

実施例1と同様にろ紙（アドバンテック定性ろ紙No. 2）にしみこませ、自然乾燥させて固形被検試料として採取した血液を乾燥ろ紙の直径1mmのパンチ片をそのまま、チューブ状の担体内のPCR反応液に投入した。PCR反応液は、PCRキットKOD FX（東洋紡績（株）製）を使用して、添付のプロトコールに従って、以下の試薬を含む $25 \mu\text{L}$ 反応液を調整した。

[0088] (PCR反応液)

- ・ $2 \times \text{PCR Buffer for KOD FX}$: $10 \mu\text{L}$ 、
- ・ d N T P s : $2 \mu\text{L}$ 、
- ・ プライマー5 (A D H 1 B - F) ($10 \mu\text{M}$) : $0.4 \mu\text{L}$ 、
- ・ プライマー6 (A D H 1 B - R) ($10 \mu\text{M}$) : $0.4 \mu\text{L}$ 、
- ・ プライマー7 (A L D H 2 - F) ($10 \mu\text{M}$) : $0.8 \mu\text{L}$ 、
- ・ プライマー8 (A L D H 2 - R) ($10 \mu\text{M}$) : $0.8 \mu\text{L}$ 、

- ・ K O D F X : 0. 4 μ L、
- ・ DW (distilled water) : 5. 2 μ L。

[0089] チューブ状の担体に蓋をして、以下の増幅条件で、A D H 1 B 遺伝子、A L D H 2 遺伝子について同時に P C R 反応を行なった。

[0090] (増幅条件)

- 熱変性 : 9 5 °C、1 0 分、
- 9 8 °C、1 0 秒 → 6 2 °C、3 0 秒 → 7 4 °C、3 0 秒を 4 0 サイクル、
- 伸長反応 : 7 4 °C、2 分。

[0091] 得られた P C R 増幅産物を、以下の制限酵素反応液を用いて同時に 3 7 °C、1 時間の制限酵素反応を行なった。

[0092] (制限酵素反応液)

- ・ 1 0 × N E B B u f f e r 4 : 2 μ L、
- ・ P C R 増幅産物 : 6 μ L、
- ・ 8 × S A M : 2. 5 μ L、
- ・ M s I 1 : 0. 5 μ L、
- ・ A c u 1 : 0. 5 μ L、
- ・ DW (distilled water) : 8. 5 μ L。

[0093] 反応後の制限酵素処理片をそれぞれアガロースゲルにアプライし、電気泳動にて増幅された遺伝子を確認した。なお、コントロールとして、DW もアプライした。図 6 は、実施例 4 の結果を示す電気泳動写真である。

[0094] 図 6 において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・ レーン 1 : A D H 1 B * 1 / * 2、A L D H 2 * 1 / * 2、
- ・ レーン 2 : A D H 1 B * 1 / * 1、A L D H 2 * 2 / * 2、
- ・ レーン 3 : A D H 1 B * 1 / * 2、A L D H 2 * 2 / * 2、
- ・ レーン 4 : DW (distilled water) 。

[0095] <実施例 5>

実施例 1 と同様にろ紙 (アドバンテック定性ろ紙 N o. 2) にしみこませ、自然乾燥させて固形被検試料として採取した血液を乾燥ろ紙の直径 1 mm

のパンチ片をそのまま、チューブ状の担体内のPCR反応液に投入した。PCR反応液は、PCRキットKOD FX（東洋紡績（株）製）を使用して、添付のプロトコールに従って、それぞれ以下の試薬を含む25 μ L反応液を調整した。

[0096] （PCR反応液）

- ・2×PCR Buffer for KOD FX : 12.5 μ L、
- ・dNTPs : 2.5 μ L、
- ・プライマー9（CYP2E1-F）（10 μ M） : 1 μ L、
- ・プライマー10（CYP2E1-R）（10 μ M） : 1 μ L、
- ・KOD FX : 0.5 μ L、
- ・DW（distilled water） : 7.5 μ L。

[0097] なお、CYP2E1遺伝子用のPCR-RFLPプライマーとしては、以下の2種類を用いた。

- [0098] ・プライマー9（CYP2E1-F） : 5' -CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3'（配列番号15）、
- ・プライマー10（CYP2E1-R） : 5' -TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3'（配列番号16）。

[0099] チューブ状の担体に蓋をして、以下の増幅条件で、CYP2E1遺伝子のPCR反応を行なった。

[0100] （増幅条件）

- 熱変性 : 95°C、10分、
- 98°C、10秒→55°C、30秒→74°C、30秒を40サイクル、
- 伸長反応 : 74°C、2分。

[0101] PCR反応後に得られたCYP2E1遺伝子の増幅産物は410bpであった。このCYP2E1遺伝子の増幅産物を以下の組成の反応液で37°C、1時間の制限酵素反応を行なった。

[0102] （制限酵素反応液）

- ・10×NEB Buffer 4 : 2 μ L、

- ・PCR増幅産物：6 μ L、
- ・8×SAM：2.5 μ L、
- ・Pst 1：0.5 μ L、
- ・DW (distilled water)：11.5 μ L。

[0103] 反応後の制限酵素処理片をそれぞれアガロースゲルにアプライし、電気泳動にて増幅された遺伝子を確認した。図7は、実施例5の結果を示す電気泳動写真である。

[0104] 図7において、各レーンは以下の結果を示している。

- ・レーン1：CYP2E1 *c1/*c1、
- ・レーン2：CYP2E1 *c1/*c2、
- ・レーン3：CYP2E1 *c2/*c2。

[0105] <実施例6>

以下の手順で、検査対象（被検者A、B、C、D）からそれぞれ採取した唾液（口腔内細胞を含む）または血液について、アルコール脱水素酵素ADH1Bの遺伝子およびアルデヒド脱水素酵素ALDH2の遺伝子の遺伝子多型の検出をリアルタイムPCR装置ABI7300（Applied Biosystems社製）を用いてTaqMan（登録商標）法により行なった。唾液または血液については、ろ紙（アドバンテック定性ろ紙No. 2）にしみこませ、自然乾燥させて、固形被検試料として採取した。Taqman Genotyping Master Mix（Applied Biosystems社製）の場合、通常行うDNAの抽出・精製過程を省略し、この乾燥ろ紙の直径2mmのパンチ片1枚を水10 μ Lの入っているエッペンドルフチューブに投入し、90℃で10分間加熱した。その上清5 μ LをTaqMan反応液に投入した。

[0106] Realtime PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）およびRNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用した場合、乾燥ろ紙唾液または乾燥ろ紙血液加熱処理上清は以下のように調整した。乾燥ろ紙唾液または乾燥ろ紙血液の直径2mm

mのパンチ片1枚を1M ベタインを含むPCR用緩衝液10 μ Lの入っているエッペンドルフチューブに投入し、90℃で10分間加熱した。その上清5 μ LをTaqMan反応液に投入した。ここで、血液中にはPCRを阻害する物質が多く含まれており、これらを鋳型としたPCRは成功しないことが知られている。これまでに血液をサンプルとしたPCRにおいてはTaq DNA polymeraseよりもTth DNA polymeraseが有利なことや、血液中の阻害物質はHemoglobin、Lactoferrinであり、その影響を回避する添加剤としてBSAやBetaineが有用であることが報告されている。一方、抗血液凝固剤であるヘパリンもPCRを阻害することが知られている（たとえば、Michael P. and Andrew L., Nucleic Acids Reserch, 19, 1151, (1991)（非特許文献8）、Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D. and Loening A. S., Nucleic Acids Reserch, 25, 3957, (1997)（非特許文献9）、Waleed A. A. and Peter R., J.clin. Microbiol., 39, 485-493, (2001)（非特許文献10）などを参照。）。

[0107] TaqMan法による遺伝子判定には、プローブおよびプライマーセットはApplied Biosystems社のTaqMan（登録商標）SNP Genotyping Assaysキット、PCR増幅はTaqman Genotyping Master Mix（Applied Biosystems社製）、Realtime PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）またはRNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用して、それぞれ以下の試薬を含む20 μ L反応液を調整した。遺伝子型判定は、本反応の結果、添付のプロトコールに従って、検出される2色の蛍光強度により判定した。

[0108] （ADH1B遺伝子用TaqManプローブ・プライマーセット）
・TaqMan（登録商標）Drug Metabolism Genotyping Assays（Applied Biosystems社製）、

- ・ Gene Name : alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide、
- ・ TaqMan (登録商標) SNP Genotyping Assay Mix ID : C_2688467_20。

[0109] (ADH1B遺伝子用TaqMan反応液)

<Taqman Genotyping Master Mix (Applied Biosystems社製) を使用した場合>

- ・ Taqman Genotyping Master Mix : 10 μ l、
- ・ Taqman Assay Mix C_2688467_20 : 1 μ l、
- ・ 乾燥ろ紙唾液加熱処理上清 : 5 μ l、
- ・ DW (distilled water) : 4 μ l。

[0110] <Realtime PCR Master Mix (東洋紡績(株)製) を使用した場合>

- ・ Realtime PCR Master Mix : 10 μ l、
- ・ Taqman Assay Mix C_2688467_20 : 1 μ l、
- ・ 乾燥ろ紙唾液加熱処理上清 : 5 μ l、
- ・ DW (distilled water) : 4 μ l。

[0111] <Realtime PCR Master Mix (東洋紡績(株)製) を使用した場合>

- ・ Realtime PCR Master Mix : 10 μ l、
- ・ Taqman Assay Mix C_2688467_20 : 1 μ l、
- ・ 乾燥ろ紙血液加熱処理上清 : 5 μ l、
- ・ DW (distilled water) : 4 μ l。

[0112] <RNA-direct RT-PCR Master Mix (東洋紡

績（株）製）を使用した場合＞

- ・RNA-direct RT-PCR Master Mix : 10 μ l、
- ・25mM MgSO₄ : 1 μ l、
- ・Taqman Assay Mix C_2688467_20 : 1 μ l、
- ・乾燥ろ紙唾液加熱処理上清 : 5 μ l、
- ・DW (distilled water) : 3 μ l。

[0113] <RNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用した場合＞

- ・RNA-direct RT-PCR Master Mix : 10 μ l、
- ・25mM MgSO₄ : 1 μ l、
- ・Taqman Assay Mix C_2688467_20 : 1 μ l、
- ・乾燥ろ紙血液加熱処理上清 : 5 μ l、
- ・DW (distilled water) : 3 μ l。

[0114] (ALDH2遺伝子用TaqManプローブ・プライマーセット)

- ・TaqMan（登録商標）Drug Metabolism Genotyping Assays (Applied Biosystems社製)、
- ・Gene Name : aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)、
- ・TaqMan（登録商標）SNP Genotyping Assay Mix ID : C_11703892_10。

[0115] <Taqman Genotyping Master Mix（Applied Biosystems社製）を使用した場合＞

- ・Taqman Genotyping Master Mix : 10 μ l

l、

・ Taqman Assay Mix C_11703892_10 : 1

μ l、

・ 乾燥ろ紙唾液加熱処理上清 : 5 μ l、

・ DW (distilled water) : 4 μ l。

[0116] <Real time PCR Master Mix (東洋紡績 (株) 製)
) を使用した場合>

・ Real time PCR Master Mix : 10 μ l、

・ Taqman Assay Mix C_11703892_10 : 1

μ l、

・ 乾燥ろ紙唾液加熱処理上清 : 5 μ l、

・ DW (distilled water) : 4 μ l。

[0117] <Real time PCR Master Mix (東洋紡績 (株) 製)
) を使用した場合>

・ Real time PCR Master Mix : 10 μ l、

・ Taqman Assay Mix C_11703892_10 : 1

μ l、

・ 乾燥ろ紙血液加熱処理上清 : 5 μ l、

・ DW (distilled water) : 4 μ l。

[0118] <RNA-direct RT-PCR Master Mix (東洋紡績 (株) 製) を使用した場合>

・ RNA-direct RT-PCR Master Mix : 10 μ

l、

・ 25mM MgSO₄ : 1 μ l、

・ Taqman Assay Mix C_11703892_10 : 1

μ l、

・ 乾燥ろ紙唾液加熱処理上清 : 5 μ l、

・ DW (distilled water) : 3 μ l。

[0119] <RNA-direct RT-PCR Master Mix (東洋紡績(株)製)を使用した場合>

- ・RNA-direct RT-PCR Master Mix : 10 μ l、
- ・25mM MgSO₄ : 1 μ l、
- ・Taqman Assay Mix C_11703892_10 : 1 μ l、
- ・乾燥ろ紙血液加熱処理上清 : 5 μ l、
- ・DW (distilled water) : 3 μ l。

[0120] (増幅条件)

熱変性 : 95°C、10分、
95°C、15秒→60°C、1分を40サイクル。

[0121] サンプルは以下のとおりであった。

[0122] [表1]

被検者	ADH1B	ALDH2
A	*1/*2	*1/*2
B	*2/*2	*1/*1
C	*1/*1	*1/*2
D		*2/*2

[0123] ここで、図8は、Taqman Genotyping Master Mix (Applied Biosystems社製)を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図であり、図9は、Taqman Genotyping Master Mix (Applied Biosystems社製)を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である。また、図10は、Realtime PCR Master Mix (東洋紡績(株)製)を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図であり(乾燥ろ紙唾液使用)、図11は、Realtime PCR Master Mix (東洋紡績(株)製)を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である(乾燥ろ紙唾液使用)。図12は、Realtime PCR Master Mix (東

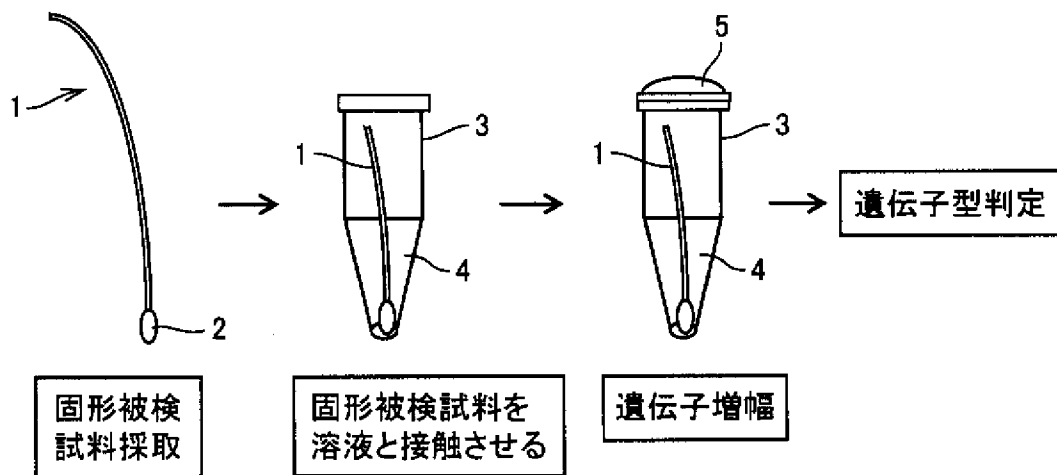
洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図であり（乾燥ろ紙血液使用）、図13は、Realtime PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である（乾燥ろ紙血液使用）。図14は、RNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図であり（乾燥ろ紙唾液使用）、図15は、RNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である（乾燥ろ紙唾液使用）。図16は、RNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるADH1Bの判定結果を示す図であり（乾燥ろ紙血液使用）、図17は、RNA-direct RT-PCR Master Mix（東洋紡績（株）製）を使用したTaqMan法によるALDH2の判定結果を示す図である（乾燥ろ紙血液使用）。

[0124] 今回開示された実施の形態および実施例はすべての点で例示であって制限的なものではないと考えられるべきである。本発明の範囲は上記した説明ではなくて請求の範囲によって示され、請求の範囲と均等の意味および範囲内でのすべての変更が含まれることが意図される。

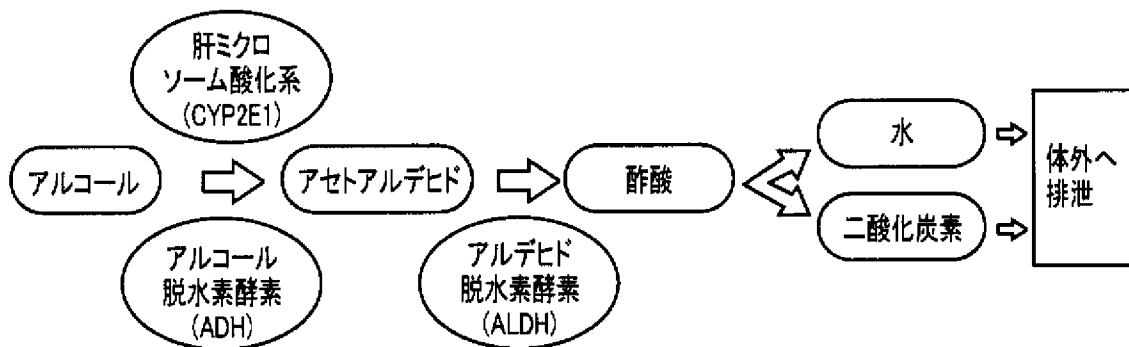
請求の範囲

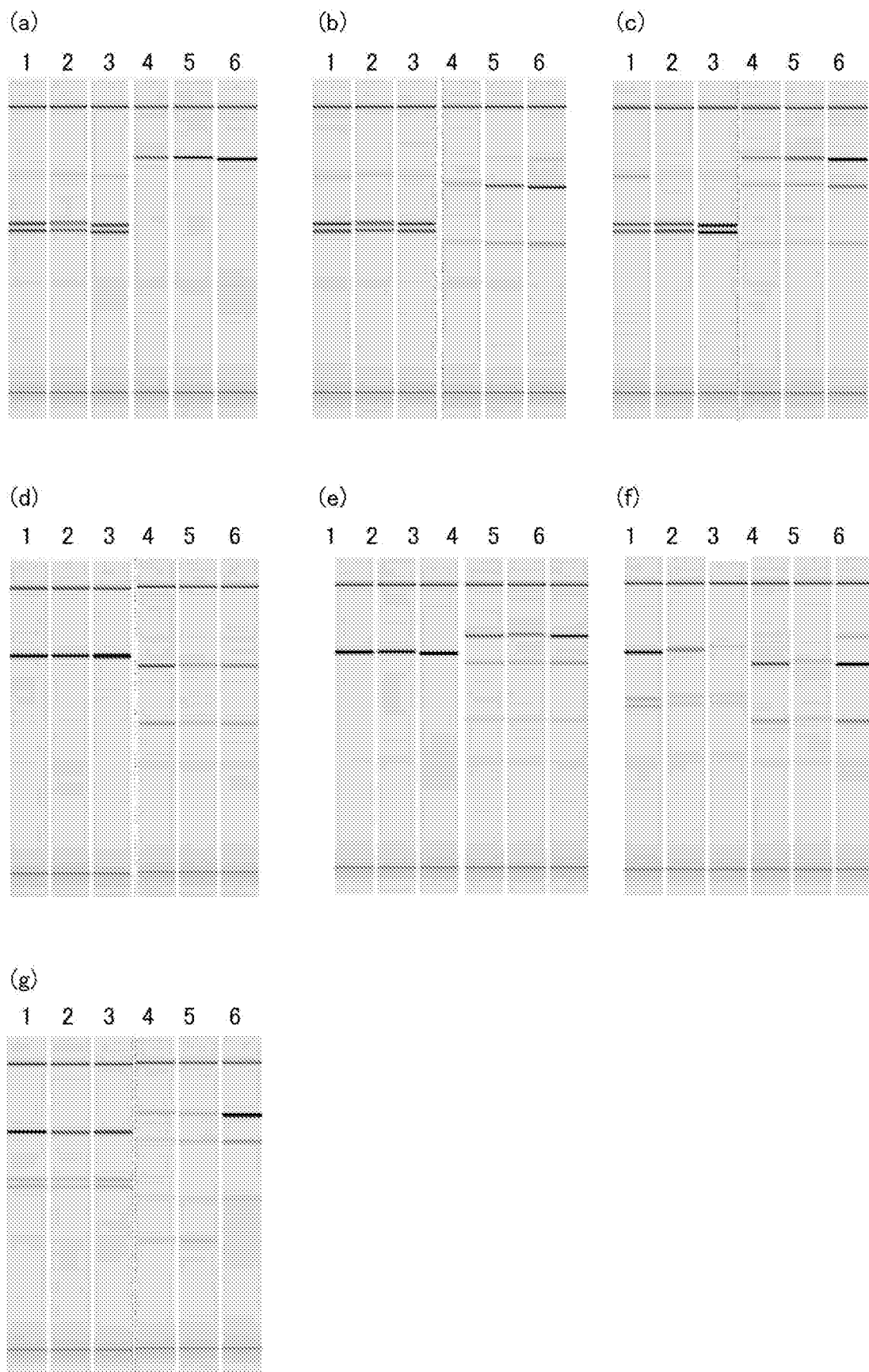
- [請求項1] アルコール感受性関連遺伝子の遺伝子型を判定する方法であって、
前記遺伝子を含む固形被検試料を、バッファーとDNAポリメラーゼとを含む溶液、および前記遺伝子を増幅するためのプライマーDNAに直接接触させて、ポリメラーゼ連鎖反応、LAMP法、鎖置換増幅、逆転写酵素鎖置換増幅、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、逆転写LAMP法、核酸配列に基づく増幅、転写媒介性増幅およびローリングサークル型増幅法から選ばれる方法を施して、前記遺伝子を増幅する工程と、
前記増幅された遺伝子から、当該遺伝子の遺伝子型を判定する工程とを含む、遺伝子型を判定する方法。
- [請求項2] 前記アルコール感受性関連遺伝子が、アルコール脱水素酵素ADH1Bの遺伝子、アルデヒド脱水素酵素ALDH2の遺伝子およびチトクロームCYP2E1の遺伝子の少なくともいずれかの遺伝子である、請求の範囲第1項に記載の方法。
- [請求項3] 前記固形試験試料が血液を乾燥させたものである、請求の範囲第1項に記載の方法。
- [請求項4] 前記固形試験試料が毛根である、請求の範囲第1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記固形試験試料が唾液を乾燥させたものである、請求の範囲第1項に記載の方法。
- [請求項6] アルコール脱水素酵素ADH1Bの遺伝子、アルデヒド脱水素酵素ALDH2の遺伝子およびチトクロームCYP2E1の遺伝子から選ばれる少なくともいずれか2つを同時に増幅し、同時に遺伝子型を判定する、請求の範囲第2項に記載の方法。

[図1]

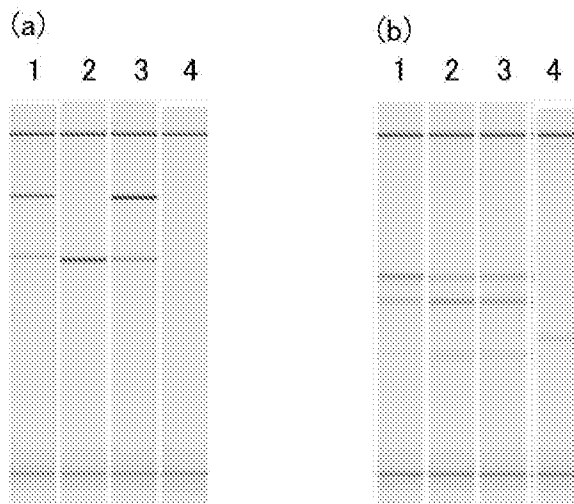


[図2]

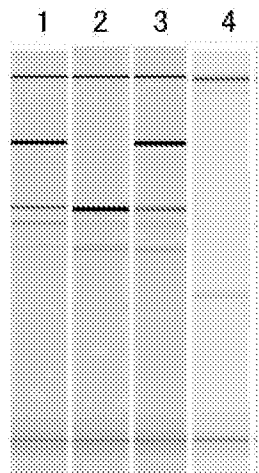




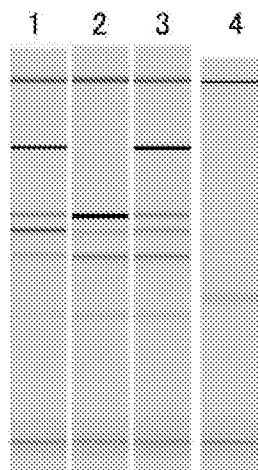
[図4]



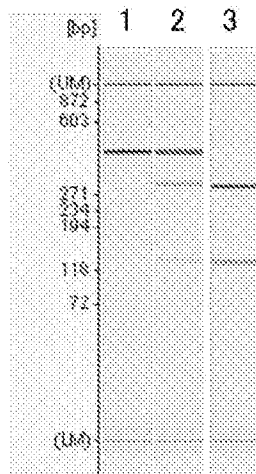
[図5]



[図6]



[図7]

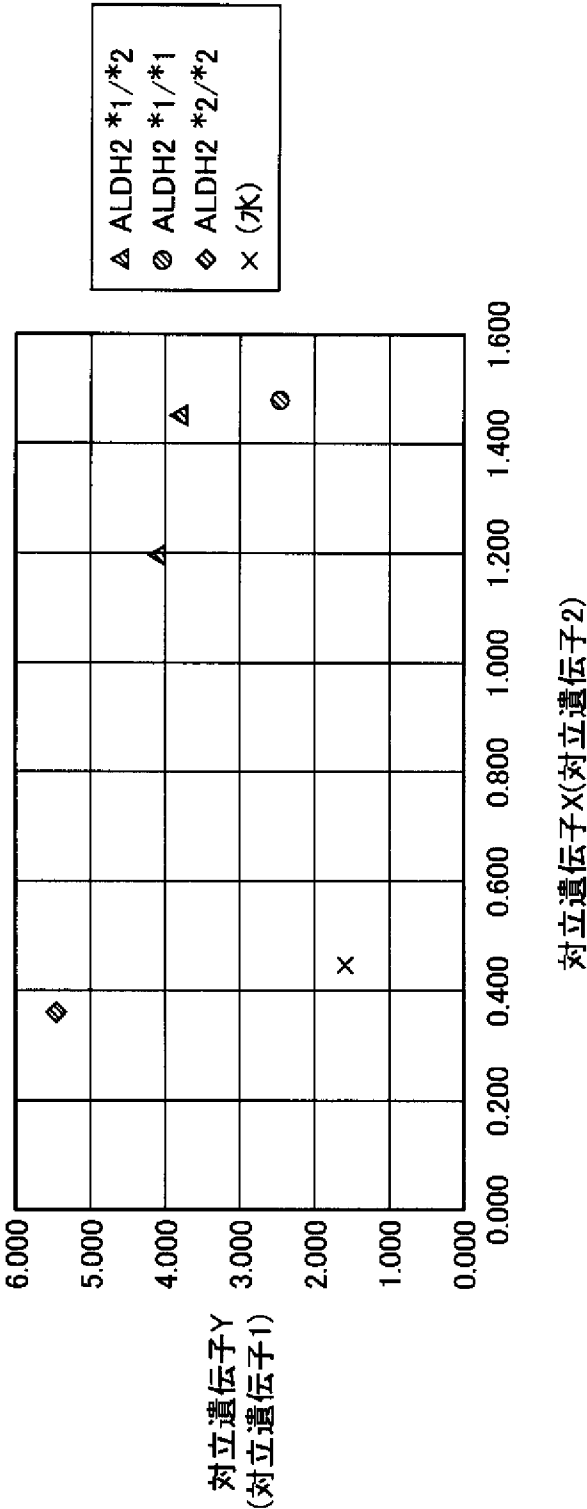


対立遺伝子Y
(対立遺伝子1)

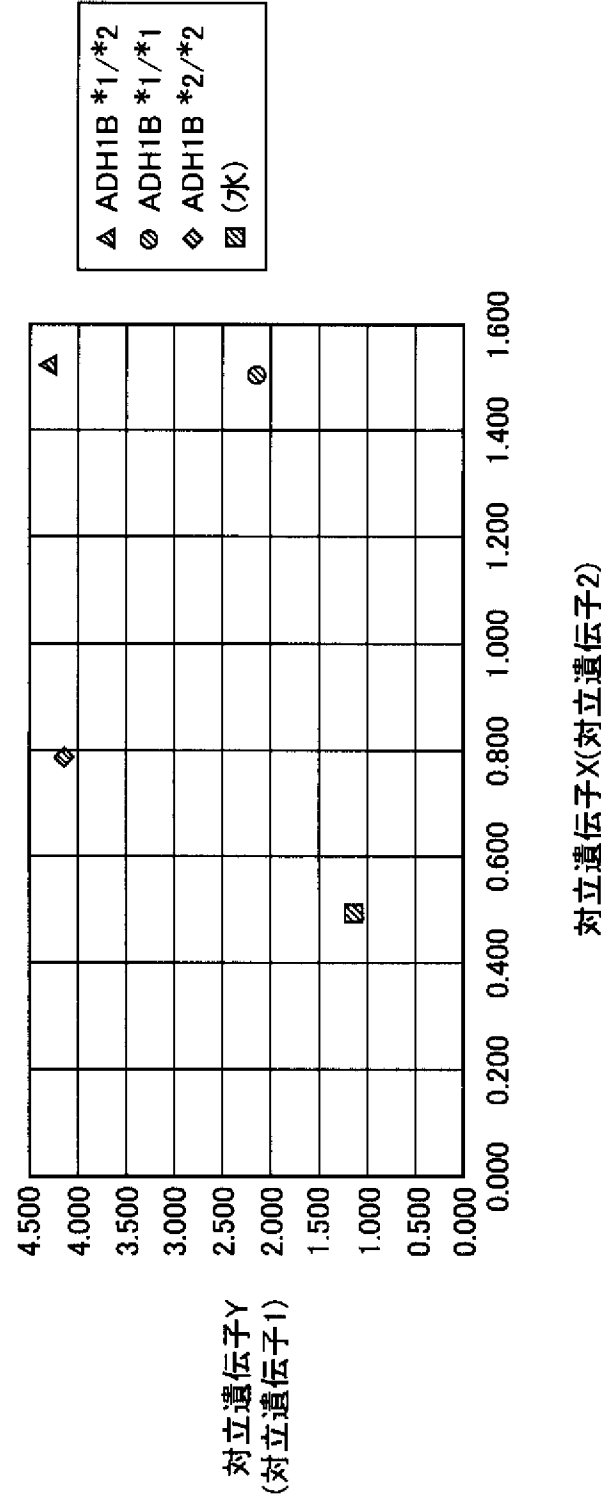
対立遺伝子X(対立遺伝子2)

△ ADH1B *1/*2
○ ADH1B *1/*1
◇ ADH1B *2/*2
× (水)

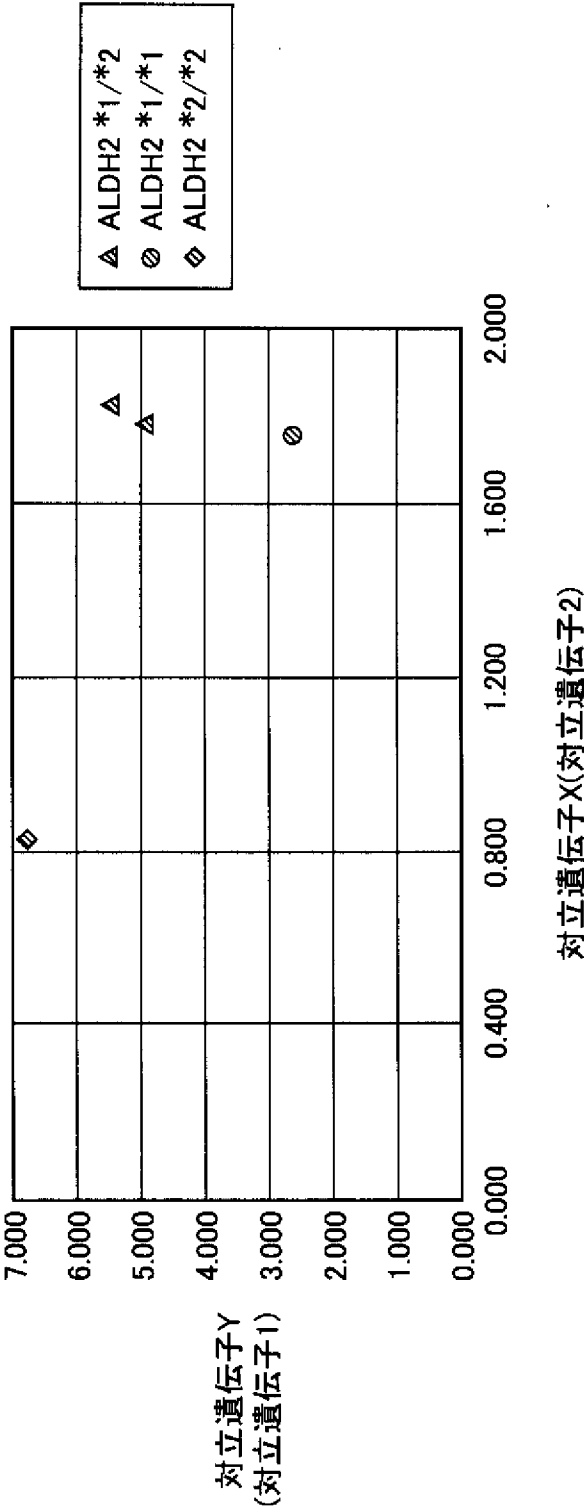
[図9]



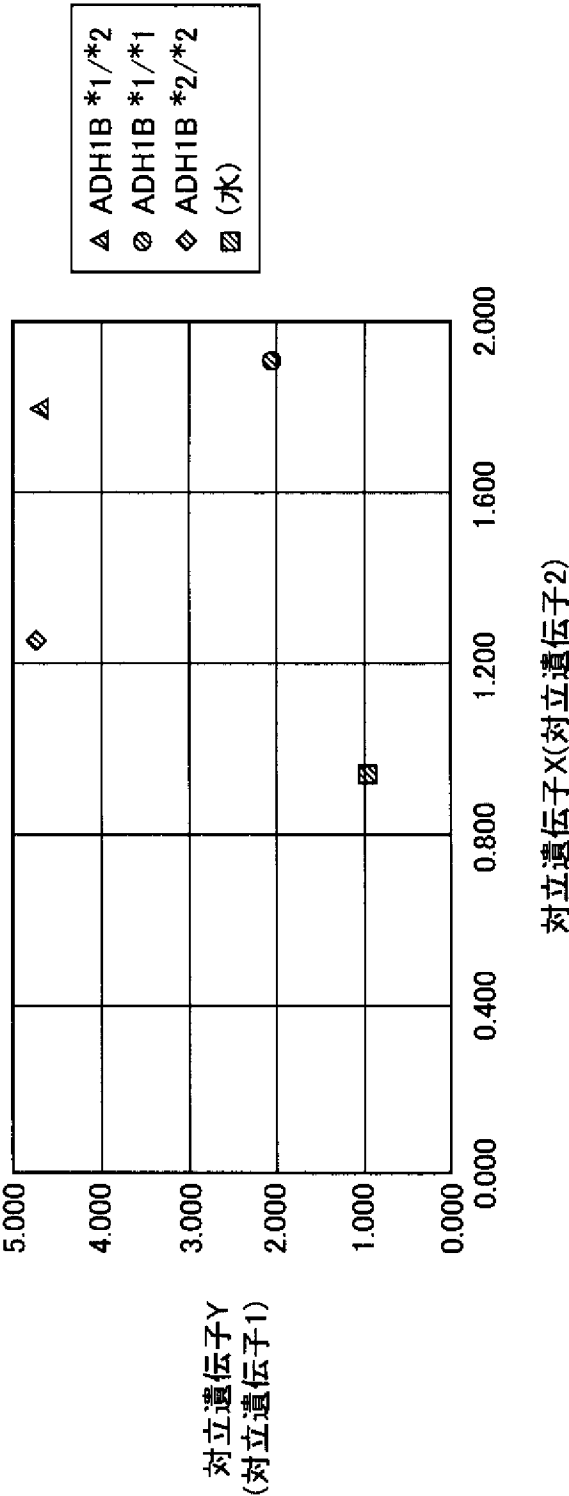
[図10]



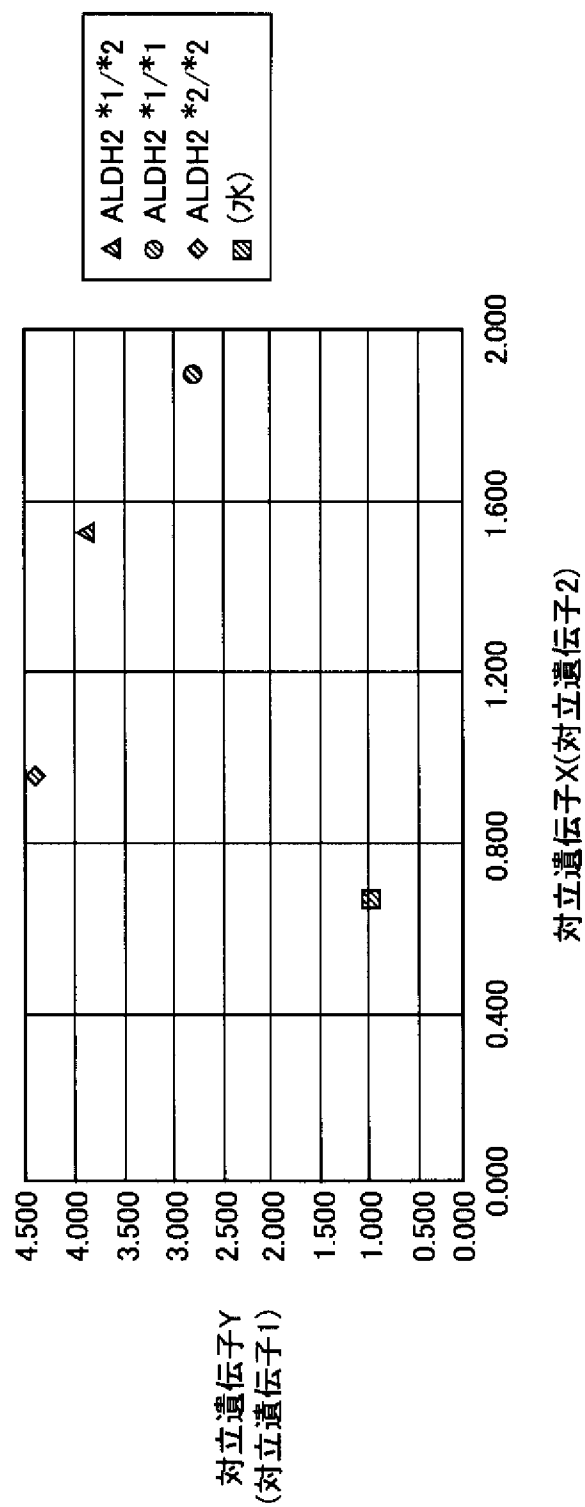
[図11]



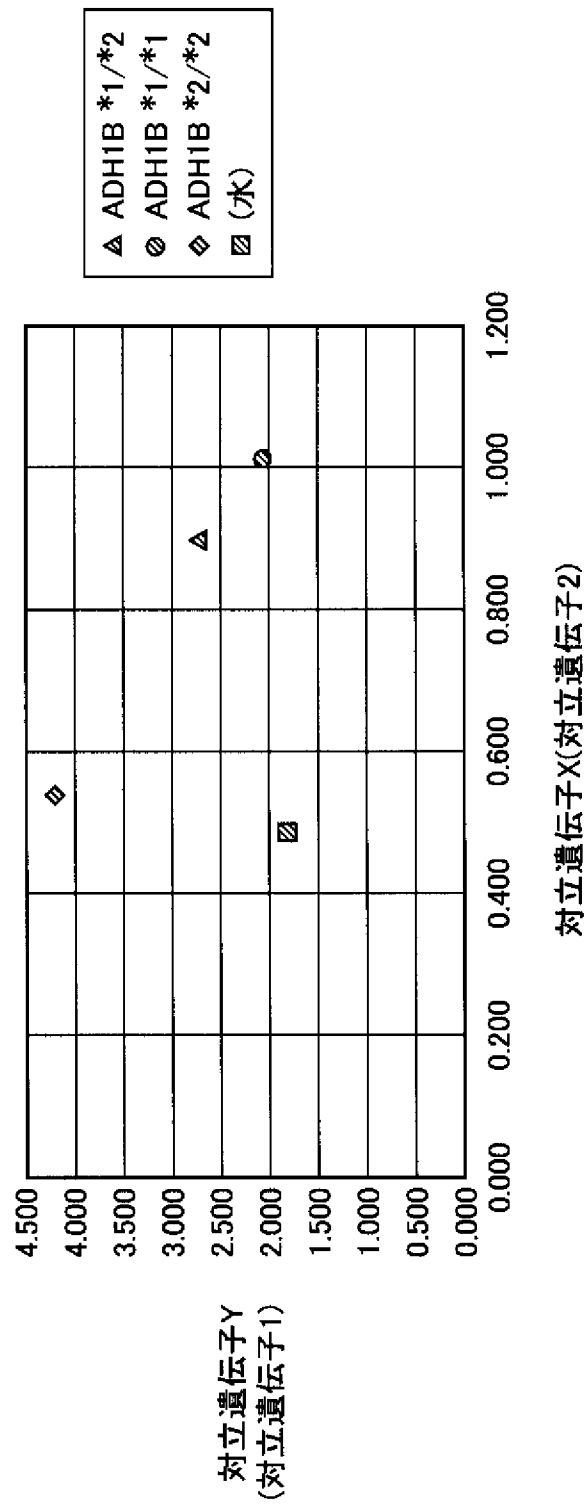
[図12]



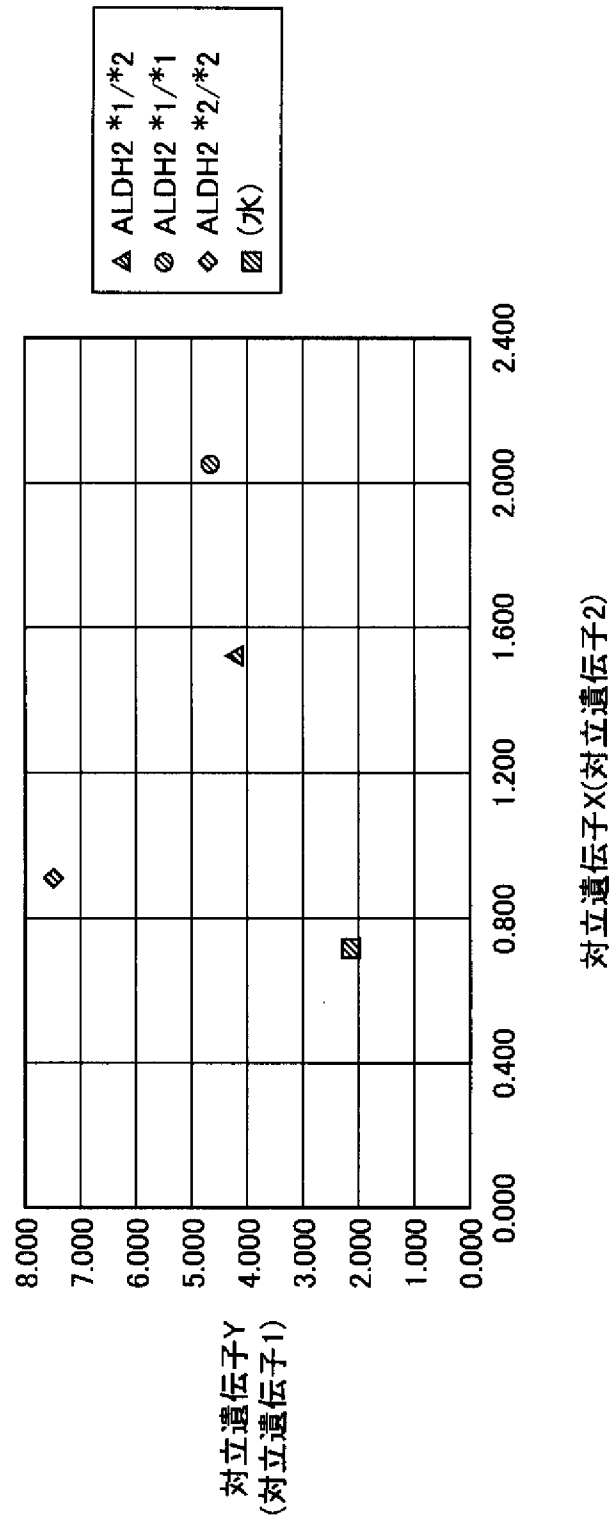
[図13]



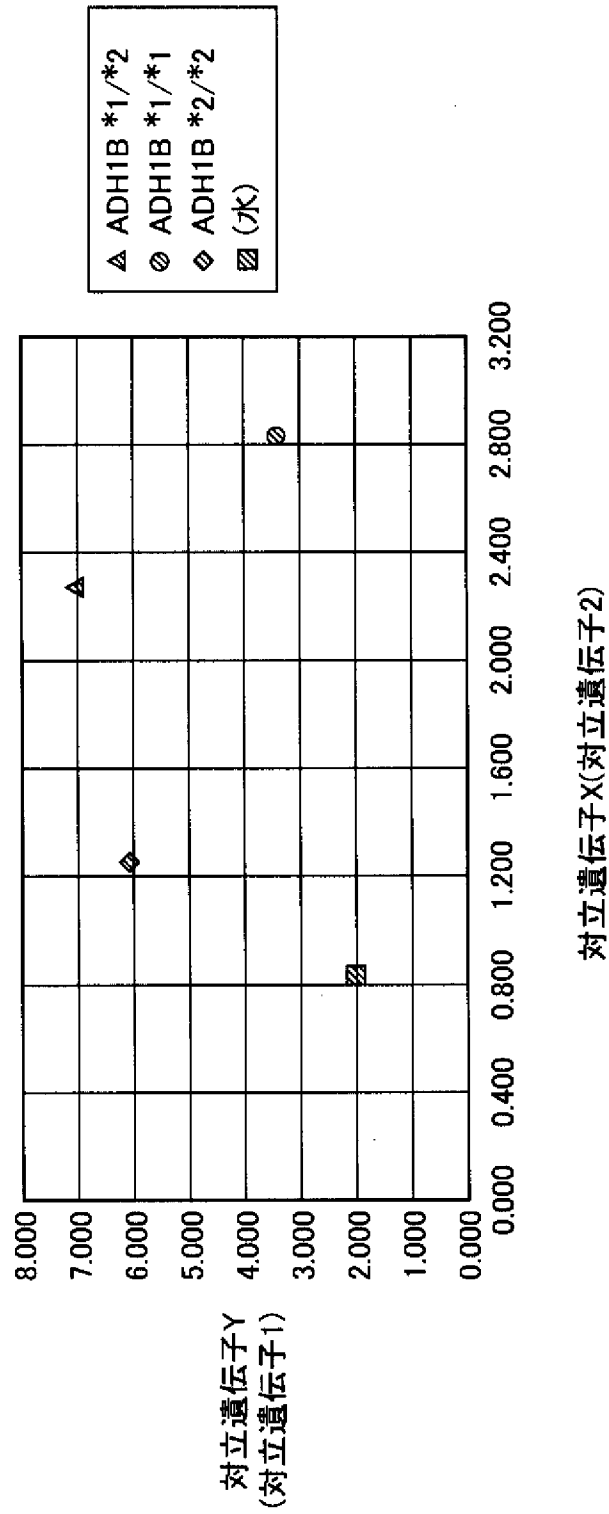
[図14]



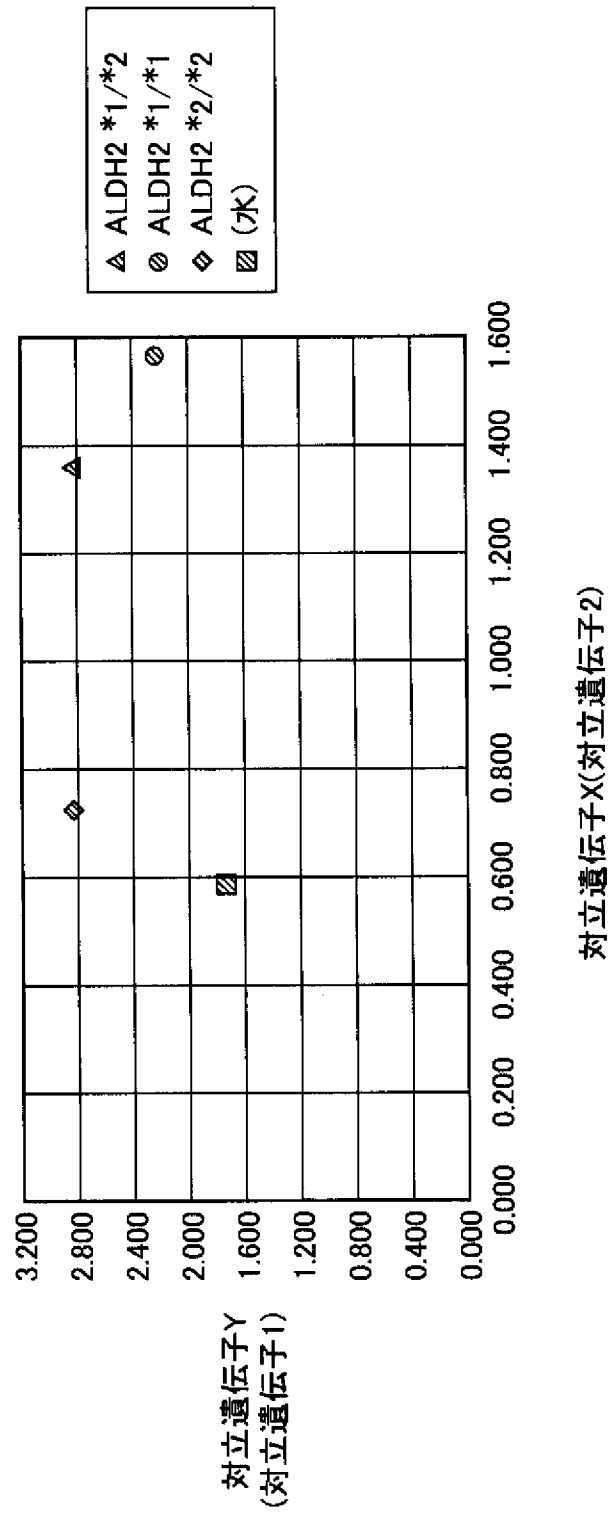
[図15]



[図16]



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/067522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), MEDLINE/CAPplus/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Kenji KINOSHITA et al., "Jinsoku·Kanben·Anka na SNP Typing-ho no Kakuritsu", Abstracts of Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, 05 March 2009 (05.03.2009), vol.129th, no.3, page 130, 27P-pm004	1-4/5, 6
X/Y	IRON, A., et al., Polymorphism of class I alcohol dehydrogenase in French, Vietnamese and Niger populations: genotyping by PCR amplification and RFLP analysis on dried blood spots. Annales de genetique, 1992, Vol.35, No.3, pp.152-156	1-3/4-6
Y	JP 2008-079604 A (Samsung Electronics Co., Ltd.), 10 April 2008 (10.04.2008), & KR 10-0818276 B1 & CN 101153335 A	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 October, 2010 (22.10.10)

Date of mailing of the international search report
02 November, 2010 (02.11.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/067522

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X/P,Y	HAYASHIDA, M., et al., Genotyping of polymorphisms in alcohol and aldehyde dehydrogenase genes by direct application of PCR-RFLP on dried blood without DNA extraction. Anal. Sci., 2010.04, Vol.26, No.4, pp.503-505	1-3, 6/4, 5
P,X/P,Y	HAYASHIDA, M., et al., Single-tube genotyping from a human hair root by direct PCR. Anal. Sci., 2009.12, Vol.25, No.12, pp.1487-1489	1, 2, 4, 6/3, 5
P,X/P,Y	Mariko HAYASHIDA et al., "Kokoritsu na Alcohol Kanjusei Kensaho no Kaihatsu", The Molecular Biology Society of Japan Nenkai Koen Yoshishu, 2009.11, vol.32, no.3, page 259, 3P-0874	1, 2, 4/3, 5, 6
P,Y	Masanori SENMA et al., "Direct PCR ni yoru Jinsoku·Kanben na DNA-gata Kanteiho no Kento", Japanese Journal of Forensic Science and Technology, 26 October 2009 (26.10.2009), vol.14, Supplement, page 46	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	木下健司 他, 迅速・簡便・安価な S N P タイピング法の確立, 日本薬学会年会要旨集, 2009.03.05, Vol.129th, No.3, p.130, 27P-pm004	1-4/ 5,6
X/ Y	IRON, A., et al., Polymorphism of class I alcohol dehydrogenase in French, Vietnamese and Niger populations: genotyping by PCR amplification and RFLP analysis on dried blood spots. Annales de genetique, 1992, Vol.35, No.3, pp.152-156	1-3/ 4-6

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 2 . 1 0 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 2 . 1 1 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐々木 大輔

4 N

3 9 6 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2008-079604 A (三星電子株式会社) 2008. 04. 10, & KR 10-0818276 B1 & CN 101153335 A	1-6
P, X/ P, Y	HAYASHIDA, M., et al., Genotyping of polymorphisms in alcohol and aldehyde dehydrogenase genes by direct application of PCR-RFLP on dried blood without DNA extraction. Anal. Sci., 2010. 04, Vol. 26, No. 4, pp. 503-505	1-3, 6/ 4, 5
P, X/ P, Y	HAYASHIDA, M., et al., Single-tube genotyping from a human hair root by direct PCR. Anal. Sci., 2009. 12, Vol. 25, No. 12, pp. 1487-1489	1, 2, 4, 6/ 3, 5
P, X/ P, Y	林田真梨子 他, 高効率なアルコール感受性検査法の開発, 日本分 子生物学会年会講演要旨集, 2009. 11, Vol. 32, No. 3, p. 259, 3P-0874	1, 2, 4/ 3, 5, 6
P, Y	扇間昌規 他, ダイレクトPCRによる迅速・簡便なDNA型鑑定法 の検討, 日本法科学技術学会誌, 2009. 10. 26, Vol. 14 Supplement, p. 46	1-6