飲酒行動を決定する遺伝要因とその健康影響

竹 下 達 也

大阪大学大学院医学系研究科社会環境医学講座 (環境医学)

Genetic Factors Which Regulate Alcohol Drinking Behavior and Their Effects on Health Status

Tatsuya TAKESHITA

Department of Social and Environmental Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka

Abstract High alcohol sensitivity common among Orientals is mainly due to genetic polymorphism in the low K_m aldehyde dehydrogenase (*ALDH2*) gene. The relation of the *ALDH2* genotype to alcohol sensitivity and drinking behavior was investigated in a Japanese occupational population. The frequency of alcohol-associated symptoms generally increased in the order of the typical homozygote, heterozygote, and atypical homozygote. Both drinking frequency and amounts of alcohol consumption were also significantly affected by the polymorphism. Polymorphism in the alcohol dehydrogenase β -subunit (*ADH2* gene) appeared to contribute to skin flushing post-alcohol exposure but not to alcohol drinking behavior. Multivariate analysis revealed that high alcohol consumption, the *ALDH2**1/*1 genotype, and high daily hassles levels significantly contribute to the prevalence of those with a high problem-drinking score in an occupational population. In the study to assess the effects of the *ALDH2* polymorphism and alcohol use on the induction of chromosome alterations in peripheral lymphocytes, we found that lymphocytes from habitual drinkers with the atypical *ALDH2* genotypes had significantly higher frequencies of sister-chromatid exchange (SCE) than those from the typical *ALDH2* genotype. We also measured acetaldehyde reversibly bound to hemoglobin (HbAA). In volunteers with the *ALDH2**1/*2 genotype, the HbAA levels increased immediately after the drink and the elevated levels persisted up to 48 h. Among male workers, HbAA levels were significantly correlated with the recent alcohol consumption levels in both the *ALDH2**1/*1 and *ALDH2**1/*2 genotypes. However, the slope was much steeper in the *ALDH2**1/*2 than in the *ALDH2**1/*1. SCE and HbAA may be utilized as a good biomarker for health problems in the atypical *ALDH2* genotype. Further extensive studies are required for evaluation of the interactive effects of genetic and environmental factors on alcohol-related health problems.

Key words: alcohol (アルコール), aldehyde dehydrogenase (アルデヒド脱水素酵素), alcohol dehydrogenase (アルコール脱水素酵素), polymorphism (多型), acetaldehyde (アセトアルデヒド)

1. はじめに

飲酒行動は、ライフスタイルの中でも喫煙や食事とともに様々な成人病の危険度に影響を与える重要な要因の一つである。日本人の成人一人あたりアルコール消費量は、8.5ℓ/年とされており、世界的にみて決して多い方ではない¹⁾。しかしながら、後述する遺伝要因によって遺伝的に多量飲酒のできない群が半数近く存在していることを考慮すると、むしろアルコール消費量は世界各国と比較してもトップクラ

スに近く²⁾、飲酒の健康影響に関する研究は重要な意義を有している。

日本人を含む東洋人はアルコール感受性に著しい個体差があり、約半数においては、飲酒時に顔面紅潮 (フラッシング)、頭痛、動悸などのアルコール過敏症状が出現する。このアルコール感受性に関する著しい人種差については、1972年にWolffによってはじめて定量的なデータが報告された³⁾。その後東洋人におけるエタノール代謝関連酵素の多型を中心に多数の研究がなされてきた。

本稿では、アルコール感受性・飲酒行動を規定する遺伝要因およびその健康影響に関するこれまでの知見を著者らの結果を中心に概説する。

2. アルコール感受性の遺伝的背景

受付 1998年12月3日 受理 1999年2月4日
Reprint requests to: Tatsuya TAKESHITA,
Department of Social and Environmental Medicine (F1),
Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka,
Suita, Osaka 565-0871, Japan
TEL: +81(6)6879-3922 FAX: +81(6)6879-3923
e-mail takesita@envi.med.osaka-u.ac.jp

Fig. 1 Pathways for the metabolism of ethanol. MEOS denotes microsomal ethanol oxidizing system.

生体内に摂取されたエタノールは、主に肝臓において、アルコール脱水素酵素(ADH)によってアセトアルデヒド(AcH)に変換され、さらにアルデヒド脱水素酵素(ALDH)によって酢酸に代謝される(Fig. 1)。細胞質に存在するADHのバイパスとして、小胞体中存在するミクロソームエタノール酸化系(MEOS)がある。その主体はチトクロームP450の中の2E1サブタイプであり、飲酒によって酵素活性が亢進することが知られている。

ALDHは、10種類が知られているが、AcHの代謝能力が最も高いのは、ミトコンドリアに局在しているALDH2である。Km値が3.4 μ Mと低いためAcHの代謝能力が高い⁴⁾。ALDH2の遺伝子は、Hsu et al.⁵⁾によりそのcDNA遺伝子配列が決定され、12番染色体の長腕末端にマッピングされている。ALDH2遺伝子の変異型アリル(ALDH2*2)は、ALDH2遺伝子のエクソン12にある487番目のアミノ酸GluをコードするGAAという塩基配列がLysをコードするAAAに変化するという点突然変異によるものである⁶⁾。ALDH2*2を1個のみ保有するヘテロ型においてもフラッシング等のアルコール高感受性を示すことから、変異型が優性に発現することが判明している^{7,8)}。通常型アリル(ALDH2*1)を2個有する通常型ホモ(ALDH2*1/*1)のみがお酒に強い、いわゆる「ノンフラッシャー」であり、残りのヘテロ型(ALDH2*1/*2)と変異型ホモ(ALDH2*2/*2)とが、いわゆる「フラッシャー」を構成している。

Harada et al.⁹⁾及びMizoi et al.¹⁰⁾は、ALDH2の変異型では、エタノール負荷後の血中AcH濃度が通常型よりも明らかに高いことを明らかにした。またアルコール依存症ではALDH2の変異型の頻度が2.3% (健康人では41%)と低いことが報告され、ALDH2の変異はアルコール依存症の発症に対して予防的に働くこと

が示された¹⁰⁾。

3. 職域集団におけるALDH2遺伝子型とアルコール感受性、飲酒行動との関連性の検討

これまで日本人のある定義された集団におけるALDH2遺伝子型とアルコール感受性、飲酒行動との関連に関して包括的に検討した報告は見当たらなかった。そこで我々は、当教室が健康管理に関わっている中規模製造業事業所従業員(男性424名、女性100名)を対象として、これらの検討を行った¹²⁻¹⁴⁾。

ALDH2遺伝子型の検討にはPCR-RFLP法を用いた。末梢白血球よりDNAを抽出し、これを鋳型としてPCR法によりエクソン12の増幅を行った¹³⁾。一方のプライマーの1箇所人工的にミスマッチをおこすことによって通常型アリルのみ制限酵素Ksp632Iの認識部位が生じる。増幅後にこの酵素で消化することにより、3つの遺伝子型が明瞭に判定された(Fig. 2)。

また自記式質問表によって、飲酒時の症状および日頃の飲酒行動、日常いらいち事等の情報を得た。質問表記入後にエタノールパッチテスト¹⁵⁾(70%エタノール液100 μ lを7分間貼付)も実施した。

ALDH2遺伝子型の頻度は男女差なく、欧米人と同

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR products of ALDH2 exon 12 (lane 2-5,10, ALDH2*1/*1; lane 6,7,9, ALDH2*1/*2; lane 1,8, ALDH2*2/*2).

Fig. 3 Relationship between the *ALDH2* genotype and flushing among the male workers. A small dose means one-quarter of a glass of beer ¹³⁾.

Fig. 4 Relationship between the *ALDH2* genotype and drinking frequency among the male workers ¹³⁾.

Fig. 5 Relationship between the *ALDH2* genotype, age and average amounts of alcohol consumption among the male workers.

じALDH2*1/*1が男55.4%, 女63.0%, ALDH2*1/*2が男37.7%, 女32.0%, ALDH2*2/*2が男6.8%, 女5.0%であった。

以下対象者数の多い男性において解析を行った。飲酒時に常に顔が赤くなる人の割合が、ALDH2*1/*2とALDH2*2/*2では80%を超えているのに対して、ALDH2*1/*1では9%であった(Fig. 3)。ビールを少量(コップに1/4杯)飲酒時に赤くなる人の割合は、ALDH2*1/*1が0.4%, ALDH2*1/*2が18.8%, ALDH2*2/*2が79.3%と、変異型アリルALDH2*2が多いほど感受性の高いことが示唆された。動悸、頭痛、眠気等の症状も同様に、ALDH2*1/*1, ALDH2*1/*2, ALDH2*2/*2の順に割合が高くなっていった¹³⁾。

これらの飲酒時症状の多くは、血中AcH濃度が高値となったために生じるものと考えられる。飲酒時の頻脈および動悸は、血中AcH濃度上昇に伴ってAdrenalinおよびNoradrenalinが分泌されるためであることが示唆されている¹⁶⁾。また飲酒時のフラッシングに関しては、抗ヒスタミン剤¹⁷⁾、アスピリン¹⁸⁾、opiate antagonistであるnalmefene¹⁹⁾がその出現を抑えることから、AcH濃度の上昇に伴うヒスタミンの分泌、プロスタグランジン系およびopiate系がフラッシングに関与しているとみられている。

以上の解析結果より、高感受性群が2つの群(中間的感受性群と高度感受性群)に分かれることが判明した。表現型とALDH2遺伝子型との比較より、低感受性群がALDH2*1/*1、中間的感受性群がALDH2*1/*2、そして高感受性群がALDH2*2/*2に対応することが明らかになった。ALDH2*1/*2とALDH2*2/*2との間の表現型の差については、集団レベルではじめて明らかにすることができた。

日頃の飲酒頻度は、アルコール感受性をよく反映しており、ほぼ毎日飲酒している者の割合は、ALDH2*1/*1が52.3%, ALDH2*1/*2は28.1%, ALDH2*2/*2は0.0%であった(Fig. 4)。飲酒頻度と1回の飲酒量から1日平均(±標準偏差)の飲酒量(純エタノール換算)を求めると、ALDH2*1/*1が最も多く28.4±22.2 ml/日、ALDH2*1/*2が13.5±16.5 ml/日、ALDH2*2/*2は1.1±3.0 ml/日であった(Fig. 5)。また、ALDH2*1/*1およびALDH2*1/*2のそれぞれの遺伝子型の中では、中高年者の方が、若年者よりも飲酒量が多くなっていた。

ALDH2がテトラマーであることを考慮すると、ALDH2*1/*2ではALDH2*1/*1にくらべて少なくとも1/16程度のALDH活性は有すると考えられる^{20,21)}。一方ALDH2*2/*2では100%変異型サブユニットで構成されているため酵素活性はゼロと考えられる。このような差が、今回みられた3つの遺伝子型の表現型の差を生んだと解釈される。

Table 1 Items and weighted scores for ALST (Alcohol Sensitivity Screening Test)
Do you have the following symptoms during alcohol consumption?

	always present	sometimes present	absent
Facial flushing	3.8	1.1	0.0
Flushing elsewhere	1.6	1.1	0.0
Palpitations	2.3	1.3	0.0

The ALST score of <3.1 and >3.1 is assigned 'typical' and 'atypical', respectively.

4. ALDH2遺伝子型のスクリーニングテスト

我々は、今回検討した飲酒後の諸症状の中で、わずか3項目の質問紙法(ALST; Table 1)によって、*ALDH2**1/*1と変異型(*ALDH2**1/*2と*ALDH2**2/*2を合わせた群)を90%弱の精度で判定し得ることを、判別分析によって見いだした(Fig. 6)²²⁾。遺伝子型解析が困難な対象集団や大きなサンプルサイズの対象集団に対する疫学的な研究においては実用価値があると考えられる。これに対して、エタノールパッチテストでは*ALDH2**1/*1が79%, *ALDH2**1/*2が84%しか正しく判定できなかった。パッチテストは飲酒経験の乏しい学校保健領域等の対象者に対しての健康教育のツールとしてその意義は大きい、その精度に関する基礎的検討も重要である。

5. ADH2遺伝子型とアルコール感受性との関連

日本人など東洋人においては、ADHを構成するサブユニット α , β , γ のうち β の変異型が、85%以

上の頻度で存在することが見いだされた²³⁾。変異型はAcHへの変換速度が速いことから、この*ADH2* (β -subunitをコードする遺伝子)の遺伝子多型がアルコール高感受性の主な原因ではないかと考えられた²³⁾。しかし常にフラッシング症状を呈する人は東洋人の約50%にすぎないことから、その後発見された上述の*ALDH2*の遺伝子型の方が有力とされるに至った。

Fig. 3のように、*ALDH2*遺伝子型と飲酒時のフラッシングの有無との関連性は、85-90%にとどまっている。一致しない部分、つまり*ALDH2**1/*1であるのに常にフラッシングが出現する群、及び*ALDH2**1/*2であるのに常にフラッシングのみられない群にはどのような因子が関連しているのだろうか。*ADH2*遺伝子型は、肝臓におけるアルコール代謝には影響を及ぼしていないとはいえ²⁴⁾、東洋人に多い変異型*ADH2*は*in vitro*では迅速にAcHを産生することが報告されている²⁵⁾。また最近*ADH2*遺伝子型がアルコール依存症やアルコール性肝障害の独立した危険因子であることが示唆されている²⁶⁻²⁹⁾。そこで我々の対象者についても*ADH2*遺伝子型を調べてみた¹⁴⁾。方法は既に報告されているPCR-RFLP法である³⁰⁾。

Fig. 7に示すように、統計学的な差はないものの、*ALDH2**1/*1で常にフラッシングが出現する者は必ず変異型の*ADH2*アレルを保有していた。一方*ALDH2**1/*2の中では、*ADH2**1/*1が他の*ADH2*遺伝子型よりも有意にフラッシングの出現率が低くなっていた。エタノールパッチテストの結果も、先ほどのビールコップに1杯でのフラッシングと全く同様の結果となり、しかも*ADH2*遺伝子型間の差が顕著であった。これらの結果は、*ADH2*遺伝子型が皮膚のフラッシングに何らかの影響を与えることを示唆している。パッチテストで*ADH2*遺伝子型の影響がより顕著であったことから、皮膚に発現している*ADH2*の役割が*ALDH2*と並んで大きい可能性が考えられる。すなわち変換速度の速い変異型*ADH2*は、皮膚局所においてAcHを多く産生してフラッシング反応を出現させる方向に働くことが考えられる。しかし我々の対象者においては*ADH2**1/*1は6.6%と少数であり、今

Males (N=424)

Females (N=100)

Fig. 6 Reliability of screening tests (ALST and ethanol patch test) for the *ALDH2* polymorphism among the male and female workers²²⁾.

Fig. 7 Effects of the *ALDH2* and *ADH2* genotypes to the results of the alcohol patch test¹⁴⁾.

回観察された $ADH2$ 遺伝子型の影響を確認するにはかなり大きな集団での調査が必要である。

一方データは示さないが、飲酒頻度や飲酒量には $ADH2$ 遺伝子型の影響はほとんどみられなかった¹⁴⁾。

6. 問題飲酒行動に関連する遺伝・環境要因の検討

アルコール依存症の危険度は、 $ALDH2$ 遺伝子型の強い影響を受ける。Harada et al.によると、依存症の者の95%が $ALDH2*1/*1$ であった³¹⁾。これら $ALDH2*1/*1$ の人が依存症に至る道筋には、様々な環境要因も加わっているはずである。

我々は上述の対象者集団に対して、日本で広く用いられている久里浜式アルコール依存症スクリーニングテスト³²⁾ (KAST)に回答してもらい、 $ALDH2$ 遺伝子型やストレスと関連を検討した³³⁾。KASTは、健康な人と依存症の人とを質問紙で高い信頼度で判別しうる。一方、日常いらいだち事の質問表にも回答してもらい、ストレスの指標とした。

KASTでは、0点以上を問題飲酒群 (2点以上を重篤問題飲酒群) としている。筆者らの調査では、この問題飲酒群の頻度が、 $ALDH2*1/*2$ では5%と低かったのに対して、 $ALDH2*1/*1$ では18%と高かった³³⁾。さらに $ALDH2*1/*1$ を年齢で2群に分けてみると、40歳未満の10%に対して40歳以上では26%と非常に高い頻度であった。

KAST得点と、日常いらいだち事との関連についてみると、Fig. 8のように、最も問題飲酒群の多い40歳以上の $ALDH2*1/*1$ においてのみ、日常いらいだち事が多いほどKAST得点の平均値が高く、両者の間に正の相関がみられた。 $ALDH2*1/*1$ 群について多重ロジスティック回帰分析を行った結果、KAST高得点に関連する要因として、飲酒量、年齢、日常いらいだち事が抽出された³³⁾。これらの結果から、問題飲酒行動の予防には、 $ALDH2*1/*1$ の中高年における適切なストレスマネジメントが重要と考えられた。

今回の検討では、KAST得点と $ADH2$ 遺伝子型との関連は見出されなかったが、Higuchi et al.は、日本人集団における調査において、両者の関連を報告して

Fig. 8 Effects of the $ALDH2$ genotype, age, and level of daily hassles on the KAST score.

いる³⁴⁾。アルコール依存症と $ADH2$ 遺伝子型との有意な関連性を示す報告は最近増加している²⁶⁻²⁹⁾。

Thomasson et al.は $ADH2$ 遺伝子型がアルコール依存症の危険因子となることを台湾の中国人において報告した²⁶⁾。また日本においても、 $ADH2$ 遺伝子型が $ALDH2$ 遺伝子型と独立にアルコール依存症の危険因子となることが示されている²⁹⁾。上に述べたように、 $ADH2$ 遺伝子型がエタノールおよびAcHの全身的な代謝に及ぼす影響はほとんどないと考えられており、 $ADH2$ 遺伝子型が依存症の危険因子となる機序は今の所不明である。

7. アルコール高感受性の習慣的飲酒者における染色体変異量の増加

姉妹染色分体交換(SCE)は、DNA損傷の指標の1つであり、発がんのバイオマーカーの一つとして注目されている。SCE頻度は、喫煙をはじめとする悪い生活習慣の影響により上昇することが報告されている³⁵⁾。

我々は、上と同じ職域集団の協力を得て、血液リンパ球のSCE頻度を測定し、 $ALDH2$ 遺伝子型および飲酒行動がこの染色体変異量に及ぼす影響を解析した³⁶⁾。Fig. 9に示すように、 $ALDH2$ の変異型でありながら習慣的に飲酒している群のみが、他の群よりもbaseline SCE頻度が有意に高いことが示された。この群は、習慣的な飲酒により、常に高濃度のAcHの内的曝露を受けている群である。AcHはin vitroの系において強力な染色体変異誘発活性を有している³⁷⁾ことから、我々はこの高濃度AcH曝露を介してbaseline SCE頻度の上昇を来したものと考えている。我々は最近、同じ職域集団において、 $ALDH2$ の変異型でありなが

Fig. 9 Baseline SCE frequency in blood lymphocytes from the subjects with the different $ALDH2$ genotypes ($ALDH2(+)$, $ALDH2*1/*1$; $ALDH2(-)$, $ALDH2*1/*2$ and $ALDH2*2/*2$)³⁶⁾.

Fig. 10 Time-dependent changes of the HbAA levels before and after drinking 0.4 ml/kg ethanol ⁴⁰⁾.

Fig. 11 Correlations of the HbAA levels with average amounts of alcohol consumption during the last two days in the *ALDH2*1/*1* ($n = 4$) and *ALDH2*1/*2* ($n = 4$) genotypes ⁴⁰⁾.

ら習慣的に飲酒している群では、多核白血球の酸化的DNA損傷量の増加を観察している³⁸⁾が、これもAcH曝露量の差を反映している可能性が考えられる。

8. アルコール高感受性者における飲酒後のAcH蛋白付加体量の増加

前節で述べたように、アルコール感受性の高い *ALDH2*1/*2* や *ALDH2*2/*2* の人が飲酒すると、AcHが体内で高濃度となるが、このAcHは動物において発癌性が証明されており³⁹⁾、ヒトにおいても発がん危険度の上昇等の慢性影響が懸念されている。

我々は、ボランティアにお酒(0.4ml/kg)を実際に飲んでもらって、赤血球ヘモグロビンに可逆的に結合したAcH付加体量(HbAA)をHPLCと蛍光検出器を用いて測定した⁴⁰⁾。HbAA量は、Peterson et al.⁴¹⁾(1987)の方法に従い、酸性の条件下でcyclohexane-1, 3-dioneと反応させて蛍光産物を生成し、HPLC、蛍光検出器(excitation, 370nm; emission, 450nm)により定量を行った。

結果は、*ALDH2*1/*2*において飲酒1時間後よりHbAAが顕著に増加し、24~48時間後まで飲酒前にくらべて高値を示した(Fig. 10)。従って検診時等の随時採血のサンプルでも飲酒量の指標として用いる可能性が高い。実際、上に述べた職域集団の協力を得て、検診時の血液サンプル中のHbAAを測定した所、*ALDH2*1/*1*、*ALDH2*1/*2*ともに過去2日間の平均飲酒量と有意な相関がみられたが、*ALDH2*1/*2*は特に良好な相関($r = 0.797$)が観察された(Fig. 11)。また回帰直線の傾きは*ALDH2*1/*2*の方が*ALDH2*1/*1*より数倍大きかった。

サンプル数を増やして解析を行った所、*ALDH2*1/*2*の中で習慣的に飲酒している者は、回帰直線による予測値よりも高値を示す傾向がみられた。HbAA量について、重回帰分析を行った結果、

*ALDH2**1/*2では、最近の飲酒量と習慣的飲酒量とともに高度に ($P<0.001$) 有意であった。一方、*ALDH2**1/*1では、最近の飲酒量とのみ相関がみられた。以上のことから*ALDH2**1/*2では、習慣的飲酒によりHbAAが蓄積することが示唆された。

最近アルコール依存症者および多量飲酒者における、食道がん発症のリスクは、*ALDH2**1/*2が*ALDH2**1/*1に比べて10倍近い関連性を示すことが報告されている^{42, 43)}。がん以外にも、飲酒誘発喘息の発症リスクとも有意な関連性を示すことが報告されてきた⁴⁴⁾。従って、これらの疾患は飲酒時のAcHへの内的曝露が疾患発症に重要な影響を与えている可能性が大きい。

以上をまとめると、HbAAはAcHへの内的曝露量の良い指標となることが示された。HbAAは、AcHが関与する上に挙げたような健康影響の指標としても期待される。

9. おわりに

*ALDH2*遺伝子型は、飲酒時のフラッシングという、我々には極めてなじみの深い現象に密接に結びついた遺伝子の変異であるが、健康行動や様々な健康問題にも関連した重要な問題である。それぞれの遺伝子型について適正な飲酒量を推定することは、健康増進の観点から重要な課題である。

今後の予防医学においては、ライフスタイル等のコントロール可能な環境要因と関連の深い様々な遺伝要因の解析に積極的に取り組み、健康事象における遺伝・環境要因の交絡影響を明らかにし、ヘルスプロモーションへの応用をはかることが重要と考えられる。

謝 辞

本研究の実施に際し、終始御指導を賜りました大阪大学大学院医学系研究科の森本兼義教授に深甚なる謝意を表します。また研究実施に御協力下さった大阪大学大学院医学系研究科社会環境医学講座環境医学教室の教室員および教室外の共同研究者の方々にも厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Anonymous. Health and Welfare Statistics in Japan. Tokyo, Health and Welfare Statistics Association, 1998.
- 2) Anonymous. Ninth special report to the U.S. Congress on alcohol and health, NIH Publication No. 97-4017. National Institute of Health, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 1997.
- 3) Wolff PH. Ethnic differences in alcohol sensitivity.

Science 1972 ; 175 : 449-50.

- 4) Agarwal DP, Goedde HW. Alcohol metabolism, alcohol intolerance, and alcoholism. Berlin : Springer-Verlag, 1990.
- 5) Hsu LC, Tani K, Fujiyoshi T, Kurachi K, Yoshida A. Cloning of cDNAs for human aldehyde dehydrogenases 1 and 2. Proc Natl Acad Sci USA 1985 ; 82 : 3771-5.
- 6) Yoshida A, Huang I, Ikawa M. Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. Proc Natl Acad Sci USA 1984 ; 81 : 248-61.
- 7) Crabb DW, Edenberg HJ, Bosron WF, Li TK. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive *ALDH2*² allele is dominant. J Clin Invest 1989 ; 83 : 314-6.
- 8) Goedde HW, Singh S, Agarwal DP, Fritze G, Stapel K, Paik YK. Genotyping of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in blood samples using allele-specific oligonucleotides: Comparison with phenotyping in hair roots. Hum Genet 1989 ; 81 : 305-7.
- 9) Harada S, Agarwal DP, Goedde HW. Aldehyde dehydrogenase deficiency as cause of facial flushing reaction to alcohol in Japanese. Lancet 1981 ; 2 : 982.
- 10) Mizoi Y, Tatsuno Y, Adachi I, et al. Alcohol sensitivity related to polymorphism of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese. Pharmacol Biochem Behav 1983 ; 18(Suppl 1) : 127-33.
- 11) Harada S, Agarwal DP, Goedde HW, Tagaki S, Ishikawa B. Possible protective role against alcoholism for aldehyde dehydrogenase deficiency in Japan. Lancet 1982 ; 2 : 827.
- 12) Takeshita T, Morimoto K, Mao X, Hashimoto T, Furuyama J. Phenotypic differences in low *K_m* aldehyde dehydrogenase in Japanese workers. Lancet 1993 ; 341 : 837-8.
- 13) Takeshita T, Morimoto K, Mao X, Hashimoto T, Furuyama J. Characterization of the three genotypes of low *K_m* aldehyde dehydrogenase in a Japanese population. Hum Genet 1994 ; 94 : 217-23.
- 14) Takeshita T, Mao XQ, Morimoto K. The contribution of polymorphism in the alcohol dehydrogenase β -subunit to alcohol sensitivity in a Japanese population. Hum Genet 1996 ; 97 : 409-13.
- 15) Muramatsu T, Higuchi S, Shigemori K, et al. Ethanol patch test. A simple and sensitive method for identifying ALDH phenotype. Alcohol Clin Exp

- Res 1989 ; 13 : 229-31.
- 16) Ijiri I. Studies on the relationship between the concentrations of blood acetaldehyde and urinary catecholamine and the symptoms after drinking alcohol. *Jpn J Stud Alcohol* 1974 ; 9 : 35-59.
 - 17) Miller NS, Goodwin DW, Jones FC, et al. Antihistamine blockade of alcohol-induced flushing in Orientals. *J Stud Alcohol* 1988 ; 49 : 16-20.
 - 18) Truitt EB, Gaynor CR, Mehl DL. Aspirin attenuation of alcohol-induced flushing and intoxication in Oriental and Occidental subjects. *Alcohol Alcoholism* 1987 ; Suppl 1 : 595-9.
 - 19) Ho SB, DeMaster EG, Shafer RB, et al. Opiate antagonist nalmefene inhibits ethanol-induced flushing in Asians: a preliminary study. *Alcohol Clin Exp Res* 1988 ; 12 : 705-12.
 - 20) Shibuya A, Yoshida A. Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese with alcohol liver diseases: A strong association of the usual Caucasian-type aldehyde dehydrogenase gene ($ALDH_2^1$) with the disease. *Am J Hum Genet* 1988 ; 43 : 744-8.
 - 21) Takeshita T, Morimoto K. Effects of genetic polymorphisms in alcohol-metabolizing enzymes on alcohol hypersensitivity and alcohol-related health problems in Orientals. *Environ Health Prev Med* 1996 ; 1 : 1-8.
 - 22) Takeshita T, Morimoto K. Development of a questionnaire method to discriminate between typical and atypical genotypes of low K_m aldehyde dehydrogenase in a Japanese population. *Alcohol Clin Exp Res* 1998 ; 22 : 1409-13.
 - 23) Stamatoyanopoulos 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 : 789-96.
 - 24) Mizoi Y, Yamamoto K, Ueno Y, Fukunaga T, Harada S. Involvement of genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenases in individual variation of alcohol metabolism. *Alcohol Alcohol* 1994 ; 29 : 707-10.
 - 25) Yin SJ, Bosron WF, Magnes LJ, Li TK. Human liver alcohol dehydrogenase: purification and kinetic characteristics of the $\beta 2\beta 2$, $\beta 2\beta 1$, and $\beta 2\gamma 1$ "Oriental" isozymes. *Biochemistry* 1984 ; 23 : 5847-53.
 - 26) Thomasson HR, Edenberg HJ, Crabb DW, et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men. *Am J Hum Genet* 1991 ; 48 : 677-81.
 - 27) Nakamura K, Suwaki H, Matsuo Y, Ichikawa Y, Miyatake R, Iwahashi K. Association between alcoholics and the genotypes of $ALDH_2$, ADH_2 , ADH_3 as well as P-4502E1. *Jpn J Alcohol Drug Dependence* 1995 ; 30 : 33-42.
 - 28) Chao Y-C, Young T-H, Tang H-S, Hsu C-T. Alcoholism and alcoholic organ damage and genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes in Chinese patients. *Hepatology* 1997 ; 25 : 112-7.
 - 29) Higuchi S, Matsushita S, Murayama M, Takagi S, Hayashida M. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and the risk for alcoholism. *Am J Psychiatry* 1995 ; 152 : 1219-21.
 - 30) Xu Y, Carr L, Bosron WF, Li TK, Edenberg HJ. Genotyping of human alcohol dehydrogenases at the ADH_2 and ADH_3 loci following DNA sequence amplification. *Genomics* 1988 ; 2 : 209-14.
 - 31) Harada S, Agarwal DP, Goedde HW. Aldehyde dehydrogenase polymorphism and alcohol metabolism in alcoholics. *Alcohol* 1985 ; 2 : 391-2.
 - 32) Saito S, Ikegami N. KAST (Kurihama Alcoholism Screening Test) and its applications. *Jpn J Stud Alcohol* 1978 ; 13 : 229-37.
 - 33) Takeshita T, Maruyama S, Morimoto K. Relevance of both daily hassles and the $ALDH_2$ genotype to problem drinking among Japanese male workers. *Alcohol Clin Exp Res* 1998 ; 22 : 115-20.
 - 34) Higuchi S, Matsushita S, Muramatsu T, Hayashida M. Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and drinking behavior in Japanese. *Alcohol Clin Exp Res* 1996 ; 20 : 493-7.
 - 35) Morimoto K. Chromosome alterations in peripheral lymphocytes as indices of lifestyle and genotoxicity. *Int Arch Occup Environ Health* 1993 ; 65 : S37-S41.
 - 36) Morimoto K, Takeshita T. Low K_m aldehyde dehydrogenase ($ALDH_2$) polymorphism, alcohol-drinking behavior, and chromosome alterations in peripheral lymphocytes. *Environ Health Perspect* 1996 ; 104(Suppl 3) : 563-7.
 - 37) Böhlke JU, Singh S, Goedde HW. Cytogenetic effects of acetaldehyde in lymphocytes of Germans and Japanese: SCE, clastogenic activity, and cell cycle delay. *Hum Genet* 1983 ; 63 : 285-9.
 - 38) Nakajima M, Takeuchi T, Takeshita T, Morimoto K. 8-Hydroxydeoxyguanosine in human leukocyte DNA and daily health practice factors: Effects of individual alcohol sensitivity. *Environ Health Perspect* 1996 ; 104 : 1336-8.
 - 39) Woutersen RA, Appelman LM, Van GHA, Feron VJ. Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III.

- Carcinogenicity study. *Toxicology* 1986 ; 41 : 213-31.
- 40) Takeshita T, Kawai T, Morimoto K. Elevated levels of hemoglobin-associated acetaldehyde related to alcohol drinking in the atypical genotype of low K_m aldehyde dehydrogenase. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 1241-3.
- 41) Peterson CM, Polizzi CM. Improved method for acetaldehyde in plasma and hemoglobin-associated acetaldehyde: results in teetotalers and alcoholics reporting for treatment. *Alcohol* 1987 ; 4 : 477-80.
- 42) Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Higuchi S, Hayashida M, Ishii H. Esophageal cancer and aldehyde dehydrogenase-2 genotypes in Japanese males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996 ; 5 : 99-102.
- 43) Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, et al. Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis* 1998 ; 19 : 1383-7.
- 44) Takao A, Shimoda T, Kohno S, Asai S, Harada S. Correlation between alcohol-induced asthma and acetaldehyde dehydrogenase-2 genotype. *J Allergy Clin Immunol* 1998 ; 101 : 576-80.