

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

全自動遺伝子検査装置 GENECUBE®によるアロプリノール誘導型薬疹関連特異 HLA 検出
分担研究者 新原寛之 島根大学医学部皮膚科学 講師

研究要旨

アロプリノール誘導型薬疹と *HLA-B*58:01* の関連は、2005 年台湾から報告されて以降、タイ、日本、韓国、ヨーロッパから相次いで報告され、人種を問わず見られることが明らかとなった。アロプリノールは、本邦にて重症薬疹の原因薬剤のうち比較的頻度が高い一方で、本邦における *HLA-B*58:01* の頻度は 0.6% と低い。アロプリノール誘導型薬疹の確定診断補助として HLA の特定は有用であるが、現在の HLA 検索は高価であるため用いにくい。ポストコロナ時代にあたる現在、遺伝子検査は特に感染症分野において身近なものとなり、より簡便かつ安価な検査法の開発が加速し、検査体制も整いつつある。本研究は、Qプローブ法による遺伝子検査に特化した全自動遺伝子検査装置 GENECUBE®を用いて、アロプリノール誘導型薬疹のリスク要因 *HLA-B*58:01* 検出の実用可能性を評価した。

A. 研究目的

重症薬疹の迅速な診断あるいは除外診断には、特定の HLA を同定しうる遺伝子検査が有用である。本研究では、アロプリノール誘導型薬疹疑い例に対し、簡便に施行しうる遺伝子診断法として *HLA-B*58:01* 特異的 Qプローブ法を開発し、その有用性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 検体：HLA タイプを判定済み 22 症例の凍結保存検体（抽出 DNA および血液検体）を本研究の検証に供した（表 1）。アロプリノール誘導型薬疹 8 症例は、2010 年 4 月から 2021 年 3 月に島根大学医学部附属病院にてアロプリノール誘導型薬疹と診断し、入院加療を行った症例である。

表 1. 本検証に供した検体の内訳

	アロプリノール誘導型薬疹	
	(+)	(-)
HLA-B*58:01 (+)	5	0
HLA-B*58:01 (-)	3	14

(2) 方法：Qプローブ法は、目的遺伝子と結合するとグアニンの影響で消光するが、温度上昇により Qプローブが目的遺伝子から乖離すると蛍光を発する。GENECUBE®（東洋紡、大阪）は、Qプローブ法を用いた遺伝子検出に特化した全自動遺伝子検査装置である。後述する *HLA-B*58:01* 特異的検出に用いる Qプローブ・プライマーセットをデザインし、GENECUBE®を用いた *HLA-B*58:01* 特異的 Qプローブ法を行い、その実用可能性を評価した。



全ての遺伝子検査をこの一台に



測定開始から最短短約30分で結果が得られます。
QProbeを用いた特異的な検出方法を採用。
一台で同時に複数項目の測定が可能です。

図 1A. Q プローブ法のメカニズム; 1B. GENE CUBE®の概要 (東洋紡ホームページより抜粋)

(倫理面への配慮)

島根大学医学部倫理委員会にて「Loop mediated-isothermal amplification (LAMP)法、GENECUBE®を用いた急性感染発疹症の迅速診断法の確立」の研究課題名で承認 (承認番号 4730) を得た。

C. 研究結果

(1) *HLA-B*58:01* 特異的 Q プローブ法におけるプローブ・プライマーの設計

日本人集団における代表的な *HLA-B* の配列 (99.9%をカバーする 84 配列中 54 配列) を IMGT/HLA より入手してアライメントし、ターゲットとなる SNP を選出した (図 2. rs 番号非公表)。

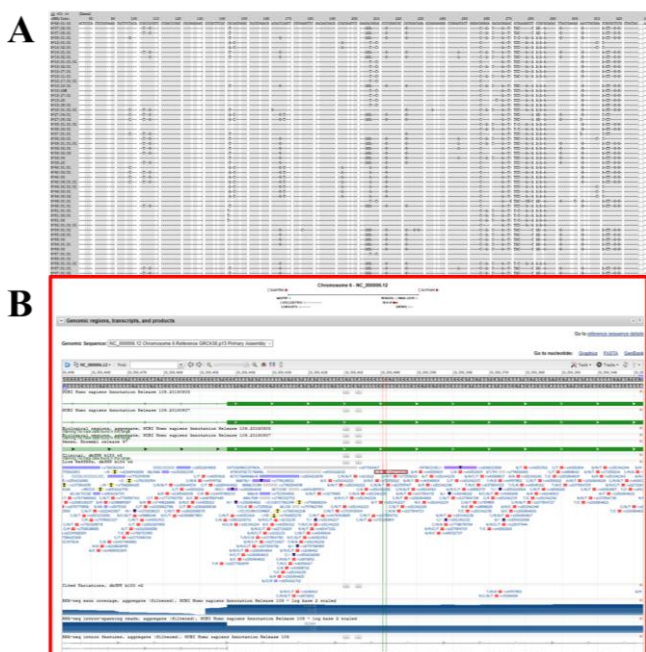


図 2A. *HLA-B* のアライメント; 2B. rs 番号の特定

さらに、選出した *HLA-B*58:01* 特有の SNP 検出に用いる Q プローブおよびプライマーを設計した (表 2)。

表 2. Q プローブおよびプライマー情報

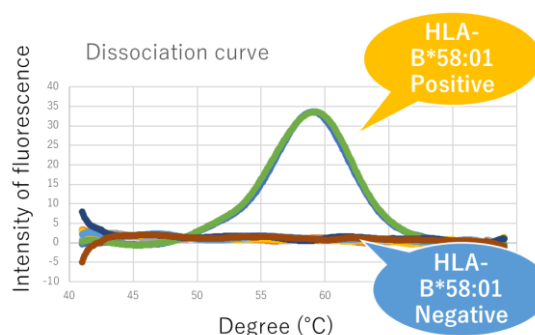
PRIMER NAME	SEQUENCE	LENGTH
HLA5801 F primer	非公表*	17 mer

HLA5801 R primer	非公表	17 mer
HLA5801 QP1	非公表 3'-BODIPY-FL	17 mer

* 論文未発表のため非公表

(2) 解析結果

*HLA-B*58:01* 特異的 Q プローブ法は 22 検体中、*HLA-B*58:01* (+)と判明していた 5 症例で検査陽性、*HLA-B*58:01*(-)と判明していた 17 症例で検査陰性を示した。その結果は、検体のタイプ (抽出 DNA 検体、凍結血



液検体) を問わず同様であった。

図 3. *HLA-B*58:01* 特異的 Q プローブ法解析結果

表 3. 解析に用いた検体の *HLA* タイプと *HLA-B*58:01* 特異的 Q プローブ法の判定結果

N	<i>HLA-B</i> type		GENECUBE 5801		
			Buffy coat	DNA conc.	Blood
1	35:0:101	40:02:01	N	5.5	N
2	15:01:01	56:01:01	N	12.3	N
3	51:01:01	54:01	N	11.2	N
4	54:01	54:01	N	12.9	N
5	44:03:01	54:01	N	13.3	N
6	52:01:01	58:01:01	P	93.2	P
7	44:03:01	46:01:01	N	98.1	N
8	35:01	52:01	N	130.5	N
9	37:01:01	55:02:01	N	68.1	N
10	59:01	58:01:01	P	179.2	P
11	59:01	67:01:01	N	39.5	N
12	40:01	40:06:01	N	59.0	N
13	51:01:01	51:01:01	N	35.0	N
14	40:02:01	51:01:01	N	47.9	N
15	40:02:01	54:01	N	84.1	N
16	15:18:01	67:01:01	N	7.2	N
17	15:01:01	35:01:01	N	61.1	N
18	52:01:01	58:01:01	P	168.2	P
19	48:01:01	58:01:01	P	84.0	P

20	35:01	52:01	N	21.4	N
21	35:01	58:01:01	P	7.7	P
22	15:18:01	40:06	N	18.0	N

D. 考察

GENECUBE®を用いた **HLA-B*58:01 特異的 Q プローブ法**は、遺伝子抽出から試薬混注、解析装置へのセットアップ、結果判明までの工程が全自動となり、かかる時間は約 40 分と、従来法と比較しても時間短縮されていた（表 4）。既存の方法と比較すると、ピペットマンを用いる煩雑な遺伝子操作を行う必要が無い点で、極めて簡便と言える。

GENECUBE®は、感染症の病原体遺伝子の検出に有用であり、特に SARS-CoV-2 の検査は既に保険適用がある。GENECUBE®自体の導入にはコストがかかるが、Q プローブやプライマーの準備だけで検査体制が整う。総合すると、GENECUBE®を保有する施設であれば、**HLA-B*58:01 特異的 Q プローブ法**は、比較的实施しやすいものと考えられた。

表 4. HLA-B*58:01 特異的 Q プローブ法の実用可能性の評価

	Typing		Specific detection		
	SSO	SBT	PCR-RFLP	Invader assay	Q-probe method
Device	Thermal cycler+Luminex™	Thermal cycler+Genetic Analyzer	Electrophoresis apparatus + incubator	Thermal cycler+Spectrofluorometer	GENECUBE™
Time of DNA extract	30 min	30 min	20 min	—	Automatic 20 min
Sample handling time	120 min	30 min	5 min	5 min	Automatic 20 min
Assay time	120 min	480 min	180 min	45 min	Automatic 20 min
Measure time	120 min	480 min	30 min	—	Automatic 20 min
Analysis time	60 min	—	20 min	1 min	Automatic 20 min
Total needed time	450 min	1020 min	255 min	51 min	40 min
Examination fee	JPY 28,000	JPY 50,000	JPY 1,000	JPY 20,000	Unknown

日経データによると、本邦では 600 万人が痛風に罹患していると推計されている。近年、痛風の第一選択薬としてフェブキソスタッド（帝人ファーマ）の有用性が取り上げられてきた。しかし 2018 年、フェブキソスタッド投与中の心血管疾患の発生をアロプリノールと比較する多施設二重盲検ランダム化試験の成果が *New England Journal* 誌に報告され、「心血管疾患による死亡」と「全ての原因による死亡」がフェブキソスタッド投与群で有意に多い事が示された（White WB, et al. *N Engl J Med.* 2018）。この研究成果を受けて、痛風治療薬の第一選

択薬についてガイドラインの改正が行われたが、続いて 2020 年には、痛風患者を対象としたフェブキソスタッドとアロプリノールの心血管イベントや死亡を比較する大規模なランダム化非盲検試験が行われ、フェブキソスタッドの非劣勢が認められている（Bardin T, et. Al. *Lancet* 2020）。このため、痛風治療薬の第一選択薬を巡っては未だに解釈が揺れる現状が存在する。

本邦における **HLA-B*58:01** のアレル保有率が 0.6%と低く、代替薬も存在することから、アロプリノール処方前に簡便な **HLA-B*58:01** 特異的遺伝子検査を行えば、**HLA-B*58:01** を保有する痛風患者でアロプリノール誘導型薬疹を防ぐことが可能となる。**HLA-B*58:01** 保有者の重症薬疹発症のオッズ比が 65 であることを鑑みると、**HLA-B*58:01** の処方前検査はアロプリノール誘導型薬疹の発症予防に極めて有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura R, Ozeki T, Hirayama N, Sekine A, Yamashita T, Mashimo Y, Mizukawa Y, Shiohara T, Watanabe H, Sueki H, Ogawa K, Asada H, Kaniwa N, Tsukagoshi E, Matsunaga K, Niihara H, Yamaguchi Y, Aihara M, Mushihiro T, Saito Y, Morita E. Association of HLA-A*11:01 with Sulfonamide-Related Severe Cutaneous Adverse Reactions in Japanese Patients. *J Invest Dermatol.* 2020 Jan 23. pii: S0022-202X(20)30040-3. doi: 10.1016/j.jid.2019.12.025
2. 白築 理恵, 千貫 祐子, 笠 芳紀, 森田 栄伸【見逃してはいけない薬疹】セフェム系抗菌薬によるアナフィラキシープリックテストと好塩基球活性化試験を施行した症例. *皮膚病診療* 42:2:P156-159

3. 森田 栄伸.【眼科医のための皮膚疾患アトラス】薬剤アレルギーと眼症状 皮膚科からの警鐘.OCULISTA 79:P52-57
2. 書籍
なし
3. 学会発表
- 1) Hiroyuki Niihara: Detection of rickettsial pathogens present in erythema multiforme by LAMP method. The 5rd Stevens-Johnson syndrome symposium, kyoto, Feb 8-9, 2020
- 2) 新原 寛之(島根大学), 河野 邦江, 東耕一郎, 越智 康之, 中川 優生, 白築理恵, 太田 征孝, 飛田 礼子, 千貫 祐子, 金子 栄, 森田 栄: 伸カルバマゼピン誘導型薬疹例における HLA-A*31:01 の LAMP による検出のまとめ: 西日本皮膚科 (0386-9784)81 巻 5 号
Page430(2019.10)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし