

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-131247  
(P2009-131247A)

(43) 公開日 平成21年6月18日(2009.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 ZNAA	2G045
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B024
<b>C12N 5/06 (2006.01)</b>	C12N 5/00 E	4B063
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 5/00 B	4B065
<b>GO1N 33/50 (2006.01)</b>	GO1N 33/50 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-274887 (P2008-274887)  
 (22) 出願日 平成20年10月24日 (2008.10.24)  
 (31) 優先権主張番号 特願2007-288985 (P2007-288985)  
 (32) 優先日 平成19年11月6日 (2007.11.6)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 504147243  
 国立大学法人 岡山大学  
 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号  
 (74) 代理人 110000338  
 特許業務法人原謙三国際特許事務所  
 (72) 発明者 大守 伊織  
 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 国立  
 大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究  
 科内  
 (72) 発明者 大内田 守  
 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 国立  
 大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究  
 科内  
 Fターム(参考) 2G045 AA35 DA13

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法およびその利用、並びに熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法およびその利用

(57) 【要約】

【課題】本発明は、脳炎または脳症を発症していない者について、脳炎または脳症に罹患するリスクを判定するためのデータを取得する脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法およびその利用、並びに熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法およびその利用を提供する。

【解決手段】生体から分離した試料を用いて、電位依存性ナトリウムイオンチャネル Nav1.1を構成するサブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出する。これにより、脳炎または脳症を発症していない者について、急性および慢性を問わず、脳炎または脳症に罹患するリスクを判定するためのデータを取得することができる。また、熱性けいれん既往者がでんかんへ移行するリスクを判定するためのデータを取得することができる。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

脳炎または脳症の罹患リスクを判定するためのデータを取得する脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法であって、

生体から分離した試料を用いて、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出することを含むことを特徴とする脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法。

## 【請求項 2】

上記変異は、上記電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  の活性を変化させる変異であることを特徴とする請求項 1 に記載の脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法。

## 【請求項 3】

上記電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型をコードする遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を少なくとも検出することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法。

## 【請求項 4】

脳炎または脳症の罹患リスクを判定するための脳炎または脳症の罹患リスク判定キットであって、

(a) 電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子のエキソン領域、エキソンとイントロンとの境界領域、もしくは mRNA、またはそれらの一部を増幅できるように設計されたプライマー、

(b) 電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子の特定の遺伝子型のエキソン、エキソンとイントロンとの境界領域、もしくは mRNA、またはそれらの一部のみを特異的に検出できるように設計されたプローブ、並びに

(c) 電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子の特定の遺伝子型の翻訳産物であるポリペプチドまたはその一部のみの特異的に結合する抗体のうち、少なくとも 1 つを含むことを特徴とする脳炎または脳症の罹患リスク判定キット。

## 【請求項 5】

脳炎または脳症の治療薬剤をスクリーニングするための細胞であって、

電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を有することを特徴とする細胞。

## 【請求項 6】

脳炎または脳症の治療薬剤をスクリーニングするための細胞の製造方法であって、

電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を導入する工程を含むことを特徴とする細胞の製造方法。

## 【請求項 7】

請求項 5 に記載の細胞に、候補薬剤を投与し、

該細胞における電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  の活性が変化したか否かを判定することを含むことを特徴とする脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 8】

上記候補薬剤は、電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  に対する阻害剤もしくは作動薬、または電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子もしくはその核酸配列の一部からなるポリヌクレオチドを含む発現プラスミドベクターもしくはウイルスベクターであることを特徴とする請求項 7 に記載の脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング方法。

【請求項 9】

熱性けいれんのでんかんへの移行リスクを判定するためのデータを取得する、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法であって、

生体から分離した試料を用いて、電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出することを含むことを特徴とする、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法。

【請求項 10】

上記変異は、上記電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  の活性を変化させる変異であることを特徴とする請求項 9 に記載の熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法。

【請求項 11】

上記電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型をコードする遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を少なくとも検出することを特徴とする請求項 9 または 10 に記載の熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法。

【請求項 12】

熱性けいれんのでんかんへの移行リスクを判定するための、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定キットであって、

(a) 電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子のエキソン領域、エキソンとイントロンとの境界領域、もしくは mRNA、またはそれらの一部を増幅できるように設計されたプライマー、

(b) 電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子の特定の遺伝子型のエキソン、エキソンとイントロンとの境界領域、もしくは mRNA、またはそれらの一部のみを特異的に検出できるように設計されたプローブ、並びに

(c) 電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニット 1 型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子の特定の遺伝子型の翻訳産物であるポリペプチドまたはその一部のみ

特異的に結合する抗体のうち、少なくとも 1 つを含むことを特徴とする、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法およびその利用、並びに熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法およびその利用に関するものであり、特に、脳炎および脳症を発症していない者について、脳炎または脳症に罹患するリスクを判定するためのデータを取得する脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法およびその利用、並びに、熱性けいれんの既往者について、てんかんに罹患するリ

10

20

30

40

50

スクを判定するためのデータを取得する熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法およびその利用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

小児の脳炎および脳症には処置が遅れると、難治性で予後の悪い病態に進行するものが多い。脳炎および脳症としては、短期に病状が進行する急性脳炎および急性脳症や、長期にわたって持続する慢性脳炎の「ラスムッセン脳炎」などが挙げられる。

【0003】

急性脳炎および急性脳症は乳幼児期に多く、様々なウイルス感染や薬剤が引き金になって起きる。例えば、日本では、インフルエンザウイルス感染に伴って急性脳炎または急性脳症を引き起こすことが多い。このようなインフルエンザウイルスによって引き起こされる急性脳炎および急性脳症はインフルエンザ脳症とも呼ばれる。急性脳炎および急性脳症の原因には、インフルエンザのほか、種々のウイルス感染やアスピリン（解熱剤）、テオフィリン（気管支拡張剤）などの薬剤等がある。しかし、原因が同定できない場合も少なからず認められる。

【0004】

急性脳炎および急性脳症は、ウイルス感染を発症してから数時間～数日後に、意識障害、けいれん、異常行動（奇声をあげる、意味のわからない発言や行動など）、異常なおびえや怒り、幻覚などの精神症状などで発症する。

【0005】

医学的には、髄液にウイルスを検出できた場合を急性脳炎、ウイルスを検出できない場合を急性脳症として区別される。しかし、髄液から原因ウイルスを検出できなくても中枢神経系への感染を否定することは現状では困難である。また、両者の臨床症状が非常に類似している。そのため、実際の医療現場では急性脳炎と急性脳症とを区別して扱うよりも「急性脳炎および急性脳症」として総括して報告することが多い（非特許文献1を参照）。

【0006】

急性脳炎および急性脳症は、軽症の場合、後遺症を残すことなく回復する。しかし、重症の場合、突然のけいれんや意識障害が出現することが多い。また、後遺症としては、てんかん、知能障害、四肢麻痺などが認められる。

【0007】

さらに、重症な場合には、経過中に、播種性血管内凝固、肝機能障害、腎機能障害、横紋筋融解症など、他の重篤な合併症を伴うことが多い。このような合併症を伴う最重症例では、最終的に多臓器不全の状態に陥り死亡することがある。中には、脳症発症後1～2日で死亡に至ることもあり、死亡率は30%、後遺症も25%の患者に認められる重篤な疾患で、小児の死亡原因の第6位になっている。

【0008】

我が国では、急性脳炎および急性脳症の発症頻度は10万人に2～4人程度（0.003%）と考えられている（非特許文献2および3を参照）。具体的には、非特許文献2には、小児脳炎の発症頻度は小児10万人あたり3.3人であることが記載されている。また、非特許文献3には、急性脳炎および急性脳症の発症頻度は、100万人あたり17.7人であることが記載されている。さらに、急性脳炎および急性脳症のうち、日本人で頻度の高いインフルエンザ脳症について言えば、主に6歳以下の子供がかかり、日本では毎年100～300人前後の患者が発症している。

【0009】

急性脳炎および急性脳症の治療法として、例えば、インフルエンザ脳症では、抗インフルエンザ剤の投与、ステロイド療法、ガンマグロブリン療法、血漿交換、低体温療法などが行われている。しかし、これら治療法の効果は、いまだ十分とはいえず、治療法が確立されたといえる状況には至っていない。

【0010】

10

20

30

40

50

そのため、急性脳炎および急性脳症を診断する方法がいくつか開発されている。具体的には、インフルエンザ脳症は、日本を含む東アジアに多く欧米には少ないため、遺伝的要因の関連が考えられており、遺伝的要因に着目した診断方法がいくつか開発されている。

【0011】

例えば、特許文献1には、小児髄液中に含まれる14-3-3タンパク質のアイソフォームにおいて、  
、  
、  
、  
の順に強く検出された場合に、小児インフルエンザ脳症であると判断できることが記載されている。

【0012】

また、最近、インフルエンザ脳症への罹患を左右する遺伝子多型解析が行われており、染色体10q22に位置する特定の遺伝子の遺伝子多型がインフルエンザ脳症の発症と関連していることが報告されている。

【0013】

さらに、解熱鎮痛剤及びこれに関連する薬剤を投与したときにインフルエンザ脳症を発症するリスクを判定する方法として、例えば、特許文献2の技術が知られている。

【0014】

特許文献2に開示されるインフルエンザ脳症の発症リスクの判定方法では、まず、血管内皮細胞に、インビトロでウイルスを感染させる前後又は同時に、解熱鎮痛剤又はその候補薬剤を接触させ、あるいは、非ヒト動物に、ウイルスを感染させる前後又は同時に、解熱鎮痛剤又はその候補薬剤を投与する。次に、(1)血管内皮細胞内のウイルス増殖の程度、(2)血管内皮細胞における血管の透過性亢進の程度、又は、(3)血液脳関門における血管内皮細胞間のタイトジャンクションを構成するタンパク質の発現量を測定する。これらの結果を、解熱鎮痛剤又はその候補薬剤無添加の場合と比較することにより、解熱鎮痛剤又はその候補薬剤を投与したときに、インフルエンザ脳症を発症するリスクを判定する。

【0015】

一方、慢性脳炎としては、ラスムッセン脳炎が挙げられる。ラスムッセン脳炎は、神経細胞に対する自己免疫疾患の一つで、しばしば部分発作の重積で発症する。年余にわたり緩徐に進行する慢性脳炎で、さまざまな脳機能障害や精神症状を起こす。子供に発症することが多く、脳炎にかかった部分の脳は萎縮し難治てんかん発作を反復する。

【0016】

ラスムッセン脳炎の治療方法としては、病巣を部分的に切除しても、残された脳組織に再発するので大脳半球離断術が推奨されている。

【0017】

また、小児には約8%の高い発症率で熱性けいれんが起こる。熱性けいれんは、発熱によって起こるけいれん発作である。生後6ヶ月から5歳頃までに発症し、大多数の症例では6歳までに治癒する。積極的な治療を必要としないことが多く原則として良性的疾患である。

【0018】

しかし、1歳未満に発症する熱性けいれんの中には、6歳以降もけいれんが持続する難治てんかん患者が混在している。すなわち、熱性けいれんからてんかんへの移行が起こりうる。難治てんかん患者は何度もけいれんを繰り返し、てんかん重積など危険な状態を経験していることがしばしばである。難治てんかん患者は、程度に差があるものの、歩行に軽度の遅れがみられることがあり、有意語はみられるが文章を話すようになることはほとんどない。歩行の不安定性は持続、または進行することがある。

【0019】

このように、熱性けいれんがてんかんへ移行すると重篤な症状を呈するため、より早期にてんかん発症を予測することが患者にとって重要である。より早期にてんかん発症を予測することが可能になれば、事前に対応することができ、患者が重篤な状態になるのを防ぐことが可能である。そのためには、熱性けいれん既往者のてんかんへの移行を予測する方法の開発が必要であり、当該方法が開発されれば、てんかんへ移行する可能性が高いと

10

20

30

40

50

予測される者をできるだけ早い時期にてんかん専門医に紹介することが可能となる。

【0020】

これまでに、てんかん患者の遺伝子を検査することによっててんかんのタイプを診断する方法についてはいくつかの技術が知られている（特許文献3，4）。

【特許文献1】特開2005-292108号公報（平成17（2005）年10月20日公開）

【特許文献2】特開2007-53942号公報（平成19（2007）年3月8日公開）

【特許文献3】特表2004-512812号公報（平成16（2004）年4月30日公表）

【特許文献4】特開2002-136289号公報（平成14（2002）年5月14日公開）

【非特許文献1】小児科臨床 54，193-199（発行日：平成13年（2001）2月5日、発行所：日本小児医事出版社）

【非特許文献2】小児科臨床 57，2223-2228（発行日：平成16年（2004）11月5日、発行所：日本小児医事出版社）

【非特許文献3】医学のあゆみ 別冊 神経疾患（ver.1），432-435（発行日：平成11（1999）年11月15日、発行所：医歯薬出版株式会社）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

脳炎または脳症は、患者を死に至らしめる危険性があるため、上説したように、急性脳炎および急性脳症については、予防、診断、治療にかかる技術の開発が進められている。しかし、これらの方法は、脳炎または脳症を発症していない患者における脳炎または脳症の罹患リスクを判定する技術としては不十分である。

【0022】

具体的には、特許文献1の技術は、小児インフルエンザ脳症を発症していることを診断するものであり、小児インフルエンザ脳症を発症していない小児における小児インフルエンザ脳症の罹患リスクを判定することはできない。

【0023】

また、特許文献2の技術は、解熱鎮痛剤の中には、血管内皮細胞でウイルス増殖を引き起こすものがあるとの知見に基づくインフルエンザ脳症の発症リスクの判定方法である。つまり、特許文献2の技術は、投与した薬剤が患者に対してインフルエンザ脳症を発症させるか否かを判定するものである。そのため、急性脳炎または急性脳症を発症していない患者における急性脳炎または急性脳症の罹患リスクを判定することはできない。

【0024】

また、染色体10q22に位置する特定の遺伝子の遺伝子多型とインフルエンザ脳症の発症との関連性が知られているが、インフルエンザ脳症の罹患リスクの判定法としての有効性は十分に立証されていない。

【0025】

このように、特許文献1、および特許文献2を含め、従来技術では、急性脳炎または急性脳症を発症していない患者における急性脳炎または急性脳症の罹患リスクを判定することができない。

【0026】

一方、ラスムッセン脳炎のような慢性脳炎または慢性脳症の罹患リスクを判定する方法は、これまでになく、罹患前にその罹患リスクを評価することはできない。

【0027】

また、特許文献3，4に開示された技術は、てんかんを発症している患者の遺伝子を検査することによっててんかんのタイプを診断する方法に関するものであり、熱性けいれん既往者のてんかんへの移行を予測する方法については、これまでに知見は存在しない。

10

20

30

40

50

## 【0028】

本発明は、上記問題点に鑑みなされたものであり、その目的は、脳炎または脳症を発症していない者について、脳炎または脳症に罹患するリスクを判定するためのデータを取得する脳炎または脳症罹患リスク判定データの取得方法およびその利用を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0029】

本発明者らは、急性脳炎および急性脳症、並びに慢性脳炎および慢性脳症は、上述したように、小児が発症することが多いことから、簡便に、急性脳炎および急性脳症、並びに慢性脳炎および慢性脳症の罹患リスクを併せて判定するという従来にはない技術思想に基づき、鋭意検討した結果、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニットをコードする遺伝子群における変異が、急性および慢性を問わず、脳炎または脳症の罹患に関連していることを独自に見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、産業上有用な以下の発明を包含する。

## 【0030】

(1) 脳炎または脳症の罹患リスクを判定するためのデータを取得する脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法であって、生体から分離した試料を用いて、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニット1型、 $_1$ サブユニット、および $_2$ サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出することを含むことを特徴とする脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法。

## 【0031】

(2) 上記変異は、上記電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ の活性を変化させる変異であることを特徴とする(1)に記載の脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法。

## 【0032】

(3) 上記電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニット1型をコードする遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を少なくとも検出することを特徴とする(1)または(2)に記載の脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法。

## 【0033】

(4) 脳炎または脳症の罹患リスクを判定するための脳炎または脳症の罹患リスク判定キットであって、(a) 電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニット1型、 $_1$ サブユニット、および $_2$ サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子のエキソン領域、エキソンとイントロンとの境界領域、もしくはmRNA、またはそれらの一部を増幅できるように設計されたプライマー、(b) 電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニット1型、 $_1$ サブユニット、および $_2$ サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子の特定の遺伝子型のエキソン、エキソンとイントロンとの境界領域、もしくはmRNA、またはそれらの一部のみを特異的に検出できるように設計されたプローブ、並びに(c) 電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニット1型、 $_1$ サブユニット、および $_2$ サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子の特定の遺伝子型の翻訳産物であるポリペプチドまたはその一部のみの特異的に結合する抗体のうち、少なくとも1つを含むことを特徴とする脳炎または脳症の罹患リスク判定キット。

## 【0034】

(5) 脳炎または脳症の治療薬剤をスクリーニングするための細胞であって、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニット1型、 $_1$ サブユニット、および $_2$ サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を有することを特徴とする細胞。

10

20

30

40

50

## 【0035】

(6) 脳炎または脳症の治療薬剤をスクリーニングするための細胞の製造方法であって、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を導入する工程を含むことを特徴とする細胞の製造方法。

## 【0036】

(7) (5) に記載の細胞に、候補薬剤を投与し、該細胞における電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  の活性が変化したか否かを判定することを含むことを特徴とする脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング方法。

10

## 【0037】

(8) 上記候補薬剤は、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  に対する阻害剤もしくは作動薬、または電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子もしくはその核酸配列の一部からなるポリヌクレオチドを含む発現プラスミドベクターもしくはウイルスベクターであることを特徴とする(7) に記載の脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング方法。

## 【0038】

(9) 熱性けいれんのでんかんへの移行リスクを判定するためのデータを取得する、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法であって、生体から分離した試料を用いて、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出することを含むことを特徴とする、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法。

20

## 【0039】

(10) 上記変異は、上記電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  の活性を変化させる変異であることを特徴とする(9) に記載の熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法。

## 【0040】

(11) 上記電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型をコードする遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を少なくとも検出することを特徴とする(9) または(10) に記載の熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法。

30

## 【0041】

(12) 熱性けいれんのでんかんへの移行リスクを判定するための、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定キットであって、(a) 電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子のエキソン領域、エキソンとイントロンとの境界領域、もしくはmRNA、またはそれらの一部を増幅できるように設計されたプライマー、(b) 電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子の特定の遺伝子型のエキソン、エキソンとイントロンとの境界領域、もしくはmRNA、またはそれらの一部のみを特異的に検出できるように設計されたプローブ、並びに(c) 電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型、<sub>1</sub> サブユニット、および <sub>2</sub> サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子の特定の遺伝子型の翻訳産物であるポリペプチドまたはその一部のみの特異的に結合する抗体のうち、少なくとも1つを含むことを特徴とする、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定キット。

40

## 【発明の効果】

## 【0042】

50



本発明にかかる脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法は、以上のように、生体から分離した試料を用いて、ナトリウムイオンチャンネルのサブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出することを含んでいる。

【0043】

上記構成によれば、取得されたデータにおいて、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型、 $\alpha_1$  サブユニット、および  $\alpha_2$  サブユニットをコードする遺伝子群におけるアミノ酸変化を伴う変異の有無を検証することにより、脳炎または脳症に罹患するリスクを判定することができる。

【0044】

それゆえ、脳炎または脳症を発症していない者について、急性および慢性を問わず、脳炎または脳症に罹患するリスクを判定することができるという効果を奏する。

【0045】

本発明にかかる熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法は、以上のように、生体から分離した試料を用いて、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型、 $\alpha_1$  サブユニット、および  $\alpha_2$  サブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出することを含んでいる。

【0046】

上記構成によれば、取得されたデータにおいて、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成する サブユニット1型、 $\alpha_1$  サブユニット、および  $\alpha_2$  サブユニットをコードする遺伝子群におけるアミノ酸変化を伴う変異の有無を検証することにより、熱性けいれん既往者がでんかん患者へ移行するリスクを判定することができる。

【0047】

それゆえ、熱性けいれん既往者について、より早期にてんかん発症を予測することができる、死亡率や後遺症を低下させることができるという効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

本発明の一実施形態について説明すると以下の通りであるが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0049】

< I . 脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法 >

本発明にかかる脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法（以下、「本発明の判定データ取得方法」ともいう）は、被験者から分離した試料を用いて、該被験者が脳炎または脳症に罹患するリスクを判定するためのデータを取得するための方法である。

【0050】

なお、上記被験者は特に限定されるものではなく、脳炎または脳症に罹患している者（罹患している可能性のある者）であってもよいし、脳炎または脳症に罹患していない者（罹患している可能性がない者）であってもよい。中でも、乳幼児、または小児に適用することが好ましい。

【0051】

本明細書において、「脳炎」または「脳症」とは、様々なウイルス感染や薬剤が引き金になって起きる意識障害、けいれん、異常行動、異常なおびえや怒り、幻覚などの精神症状きたす急性脳炎または急性脳症、並びに長期にわたって持続する慢性脳炎または慢性脳症が意図される。具体的には、インフルエンザ脳症、ライ症候群、アスピリンやテオフィリンなどの薬剤でおきる脳症、および種々のウイルス感染に惹起された脳症などの急性脳炎または急性脳症、並びに、ラスマッセン脳炎等の慢性脳症または慢性脳炎を包含する。

【0052】

これらの脳炎および脳症は、疾患を引き起こす原因はそれぞれ異なるため、すべての疾患を包括的に罹患リスクを判定することは、従来不可能であった。しかし、本発明によれ

10

20

30

40

50

ば、後述する構成を備えているため、急性および慢性を問わず、あらゆる脳炎および脳症の罹患リスクを包括的に判定するためのデータを取得することができる。

【0053】

本発明の判定データ取得方法は、具体的には、生体から分離した試料を用いて、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニット1型、<sub>1</sub>サブユニット、および<sub>2</sub>サブユニットをコードする遺伝子群（以下、「ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群」ともいう）に含まれる少なくとも1つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出する工程を含んでいればよく、その他の具体的な構成は特に限定されない。

【0054】

なお、本明細書において、「アミノ酸変化を伴う変異」とは、ミスセンス変異（アミノ酸が置換する）、ナンセンス変異（アミノ酸合成が途中で止まる）、フレームシフト（塩基の挿入、欠失により、変異位置より下流のアミノ酸配列が変化し、本来の機能を有しない）、スプライシング異常（該当エキソン領域の欠失等）、少数塩基挿入または欠失（一部のアミノ酸が新生、脱落するが下流は正常アミノ酸のまま合成）、エキソン領域微小欠失（エキソンが1つもしくは複数欠損）などが意図される。

【0055】

本発明の判定データ取得方法は、具体的には、例えば、上記変異を検出するために、上記生体から分離した試料を前処理する工程等を含んでいてもよい。

【0056】

上記ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群とは、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成する各サブユニットをそれぞれコードする遺伝子からなる群が意図される。

【0057】

電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ は、サブユニット1型、<sub>1</sub>サブユニット、および<sub>2</sub>サブユニットから構成されている。<sub>1</sub>サブユニットおよび<sub>2</sub>サブユニットは、補助的なサブユニットである。

【0058】

サブユニット1型としては、NCBIアクセション番号BAC21101に登録されるポリペプチドを挙げることができる。また、サブユニット1型をコードする遺伝子としては、SCN1Aとして、NCBIアクセション番号AB093548に登録されている塩基配列（すなわち、配列番号2に示される塩基配列）からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0059】

<sub>1</sub>サブユニットとしては、NCBIアクセション番号AAA60391に登録されるポリペプチドを挙げることができる。また、<sub>1</sub>サブユニットをコードする遺伝子としては、SCN1Bとして、NCBIアクセション番号L10338に登録されている塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0060】

また、<sub>2</sub>サブユニットとしては、NCBIアクセション番号AAC26013に登録されるポリペプチドを挙げることができる。また、<sub>2</sub>サブユニットをコードする遺伝子としては、SCN2Bとして、NCBIアクセション番号AF007783に登録されている塩基配列からなるポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0061】

本発明の判定データ取得方法では、上記例示したようなナトリウムイオンチャンネルを構成する各サブユニットをコードする遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出すればよい。

【0062】

具体的には、少なくともサブユニット1型をコードする遺伝子について、上記変異を検出することが好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0063】

上記構成によれば、脳炎または脳症の罹患リスクを精度よく判定することを可能にするデータを取得することができる。

## 【0064】

また、上記変異を検出する対象遺伝子は、1つであってもよいが、複数であることが好ましい。このような構成によれば、脳炎または脳症の罹患リスクをより高精度に判定することを可能にするデータを取得することができる。

## 【0065】

上記ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群に含まれる遺伝子において検出する変異は、アミノ酸変化を伴うものであればよく、その具体的な変異は特に限定されるものではない。具体的には、変異には、ミスセンス変異（アミノ酸が置換する）、ナンセンス変異（アミノ酸合成が途中で止まる）、フレームシフト（塩基の挿入、欠失によりアミノ酸コドンのフレームがずれ、変異位置より下流のアミノ酸配列が変化し、本来の機能を有しない）、スプライシング異常（該当エキソン領域の欠失等）、少数塩基挿入または欠失（一部のアミノ酸が新生、脱落するが下流は正常アミノ酸のまま合成）、エキソン領域微小欠失（エキソンが1つもしくは複数欠損）が含まれる。また、変異は、遺伝子多型であってもよい。

10

## 【0066】

上記遺伝子における変異の位置は特に限定されるものではないが、ナトリウムイオンチャンネルの機能（換言すれば、活性）を変化させる位置における変異であることが好ましい。さらに、上記電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ の機能の変化は、特に限定されるものではなく、機能亢進であってもよいし、機能低下であってもよい。すなわち、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ の機能異常を示す変化であればよい。

20

## 【0067】

このような変異としては、具体的には、例えば、配列番号2に示される塩基配列の第1702位のシトシン（C）の変異、好ましくは第1702位のシトシン（C）のチミン（T）への置換を挙げることができる。つまり、サブユニット1型（NCBIAクセション番号BAC21101）のアミノ酸配列における第568位のアルギニン（R）の変異、好ましくは第568位のアルギニン（R）のストップコドンへの変異を挙げることができる。

30

## 【0068】

また、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第3006位のシトシン（C）の変異、好ましくは第3006位のシトシン（C）の欠失を挙げることができる。つまり、サブユニット1型（NCBIAクセション番号BAC21101）のアミノ酸配列における第1002位のアラニン（A）の変異、好ましくは、フレームシフトにより第1009位に終止コドンを生じる変異を挙げることができる。

## 【0069】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第4721位のシトシン（C）の変異、好ましくは第4721位のシトシン（C）のグアニン（G）への置換を挙げることができる。つまり、サブユニット1型（NCBIAクセション番号BAC21101）のアミノ酸配列における第1574位のセリン（S）の変異、好ましくは第1574位のセリン（S）のストップコドンへの変異を挙げることができる。

40

## 【0070】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第5020位のグアニン（G）の変異、好ましくは第5020位のグアニン（G）のシトシン（C）への置換を挙げることができる。つまり、サブユニット1型（NCBIAクセション番号BAC21101）のアミノ酸配列における第1674位のグリシン（G）の変異、好ましくは第1674位のグリシン（G）のアルギニン（R）への置換を挙げることができる。

## 【0071】

50

また、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第5726位のシトシン(C)の変異、好ましくは第5726位のシトシン(C)のチミン(T)への置換を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1909位のスレオニン(T)の変異、好ましくは第1909位のスレオニン(T)のイソロイシン(I)への置換を挙げることができる。

【0072】

電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1の機能異常にかかる変異は、上記例示的に示した変異に限定されないことはいうまでもない。

【0073】

なお、本発明の判定データ取得方法において、変異の有無を検出する対象となる遺伝子は、上記のアクセション番号に登録されている塩基配列に限定されるものではない。つまり、上記例示した遺伝子がコードするタンパク質と実質的に同質の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子について、変異の有無を検出する構成も本発明に含まれる。

10

【0074】

このような遺伝子としては、具体的には、例えば、上記のアクセション番号に登録されている塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド(遺伝子)であり、該ポリヌクレオチドの翻訳産物が電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1のサブユニットとしての機能を有する遺伝子を挙げることができる。

【0075】

また、本発明にかかる判定データ取得方法においては、同じ遺伝子から生じるアイソフォームmRNAやタンパク質を変異の有無を検出する対象としてもよい。

20

【0076】

本明細書において、「遺伝子」とは、「ポリヌクレオチド」、「核酸」または「核酸分子」と交換可能に使用されるものである。さらに、本明細書において、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズ」とは、少なくとも90%の同一性、好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97%の同一性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」の具体的な例として、例えば、ハイブリダイゼーション溶液(50%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハート液、10%硫酸デキストラン、及び20μg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む)中にて42℃で一晩インキュベーションした後、約65℃にて0.1×SSC中でフィルターを洗浄する条件を挙げることができる。また、上記ハイブリダイゼーションは、J.Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)に記載されている方法等、従来公知の方法で行うことができ、特に限定されるものではない。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなる(ハイブリダイズし難くなる)。

30

【0077】

「ポリヌクレオチド」はヌクレオチドの重合体を意味する。したがって、本明細書での用語「遺伝子」には、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAやRNA(mRNA等)が包含される。

40

【0078】

「DNA」には、例えばクローニングや化学合成技術、又はそれらの組み合わせで得られるようなcDNAやゲノムDNA等が含まれる。すなわち、DNAとは、動物のゲノム中に含まれる形態であるイントロンなどの非コード配列を含む「ゲノム」形DNAであってもよいし、また逆転写酵素やポリメラーゼを用いてmRNAを経て得られるcDNA、すなわちイントロンなどの非コード配列を含まない「転写」形DNAであってもよい。

【0079】

本発明の判定データ取得方法において、遺伝子の変異の有無を検出する方法は、特に限

50

定されるものではなく、従来公知のあらゆる方法を用いることができる。

【0080】

具体的には、例えば、PCRを利用したシーケンシング、SSCP (Single strand conformation polymorphism) などの変異検出法、リアルタイムPCRやDNAチップを用いた多型検出方法、遺伝子の各エキソンのmicro-deletionを検出する方法、mRNAの増減を検出するNorthern blot法、RT-PCR法、Real-time PCR法、およびcDNAアレイ法、並びに、タンパク質の増減を検出するウエスタンブロット法、免疫染色法、およびタンパクアレイ法等を挙げることができる。

【0081】

ここでは、(A) 生体から分離された試料に含有されるゲノムDNAを用いて変異を検出する実施形態、(B) 生体から分離された試料に含有されるmRNA (cDNA) を用いて変異を検出する実施形態、(C) 生体から分離された試料に含有されるタンパク質を用いて変異を検出する実施形態に分けて、より具体的に説明する。

10

(A) ゲノムDNAを用いる実施形態

生体から分離された試料に含有されるゲノムDNAを用いて変異を検出する実施形態では、まず、被験者から分離された試料から、従来公知の方法を用いて、ゲノムDNAを抽出する。

【0082】

被験者から分離された試料は、特に限定されるものではなく、ゲノムDNAを抽出可能なものであればよい。具体的には、例えば、血液、髄液、毛髪、各臓器、末梢リンパ球、滑膜細胞を挙げることができる。また、被験者から分離した細胞を培養し、増殖したのからゲノムDNAを抽出してもよい。

20

【0083】

また、抽出したゲノムDNAは、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法、SDA (Strand Displacement Amplification) 法、LAM (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、およびICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅して用いてもよい。

【0084】

こうして調製されたゲノムDNAを含有する試料を用いて、変異を検出する対象となる遺伝子における変異の有無を検出する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、アレル特異的オリゴヌクレオチドプローブ法、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ (Oligonucleotide Ligation Assay) 法、PCR-SSCP法、PCR-CFLP法、PCR-PHF法、インベーター法、RCA (Rolling Circle Amplification) 法、プライマーオリゴベースエクステンション (Primer Oligo Base Extension) 法等を挙げることができる。

30

【0085】

より具体的には、例えば、ゲノムDNAから、変異の有無を検出する対象となる遺伝子のエキソンを含む領域、好ましくは変異位置を含むエキソン領域、または、エキソンとイントロンとの境界領域、好ましくは変異位置を含むエキソンとイントロンとの境界領域を増幅後、得られたPCR産物をダイレクトシーケンスすることによって該遺伝子における変異の有無を検出することができる。

40

【0086】

また、ゲノムDNAを適当な制限酵素で消化し、切断されたゲノムDNA断片のサイズの違いをサザンブロッティングなどで検出することによっても、遺伝子における変異の有無を検出することができる。

【0087】

また、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群に含まれる複数の遺伝子について、変異の有無を検出する場合、マルチプレートを用いるなど、従来公知の多サンプルの

50

処理方法を上記方法と組み合わせて用いてもよい。

【0088】

また、蛍光標識したプライマーを用いて各エキソンを増幅後、ゲル電気泳動やキャピラリー電気泳動法にて各シグナルの強さを検討する方法により、エキソンの欠失を検出することも可能である。

【0089】

このように、生体から分離された試料に含有されるゲノムDNAを用いて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異を検出することにより、被験者が脳炎または脳症に罹患するリスクを判定するためのデータを取得することができる。具体的には、取得されたデータにおいて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群に変異が見出された場合には、該被験者は脳炎または脳症に罹患する可能性が高いと判定することができる。

10

【0090】

なお、変異の検出方法において使用されるプライマーおよびプローブは、常法により、DNAシンセサイザーなどにより作製することができる。

(B) mRNA (cDNA) を用いる場合

生体から分離された試料に含有されるmRNAを用いて変異を検出する実施形態では、まず、被験者から分離された試料から、従来公知の方法を用いて、mRNAを抽出する。

【0091】

上記被験者から分離された試料は、特に限定されるものではなく、mRNAを抽出可能であり、変異を検出する対象となる遺伝子を発現している、または発現している可能性があるものであればよい。

20

【0092】

具体的には、例えば、患者の末梢血白血球細胞や皮膚線維芽細胞、口腔粘膜細胞、筋細胞が好ましい。

【0093】

続いて、その抽出したmRNAから逆転写反応によってcDNAを作製する。さらに、得られたcDNAを必要に応じて、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法SDA (Strand Displacement Amplification) 法、LAM P (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法、およびICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅してもよい。

30

【0094】

こうして調製されたcDNAを含有する試料を用いて、変異を検出する対象となる遺伝子における変異の有無を検出する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、上記ゲノムDNAを用いて遺伝子の変異を検出する場合と同様の方法を用いて、変異を検出する対象となる遺伝子の変異の有無を検出することができる。

【0095】

このように、生体から分離された試料に含有されるmRNAを用いて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異を検出することにより、被験者が脳炎または脳症に罹患するリスクを判定するためのデータを取得することができる。具体的には、取得されたデータにおいて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群に変異が見出された場合には、該被験者は脳炎または脳症に罹患する可能性が高いと判定することができる。

40

(C) タンパク質を用いる場合

生体から分離された試料に含有されるタンパク質を用いて変異を検出する実施形態では、まず、被験者から分離された試料から、従来公知の方法を用いて、タンパク質を抽出する。

【0096】

50

上記被験者から分離された試料は、特に限定されるものではなく、タンパク質を抽出可能であり、変異を検出する対象となる遺伝子の翻訳産物（換言すれば、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$ ）を発現している、または発現している可能性があるものであればよい。

【0097】

こうして調製されたタンパク質を含有する試料を用いて、変異を検出する対象となる遺伝子における変異の有無を検出する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、変異を検出する対象となる遺伝子の翻訳産物（タンパク質）について、特定の変異をもつポリペプチドのみを特異的に認識する抗体を作製し、該抗体を用いたELISA法やウエスタンブロット法により変異を検出することができる。なお、本明細書において、用語「タンパク質」は、「ポリペプチド」又は「ペプチド」と交換可能に使用される。

10

【0098】

また、上記タンパク質を含有する試料から、変異を検出する対象となる遺伝子の翻訳産物（タンパク質）を単離し、直接または必要に応じ、酵素等で切断し、プロテインシーケンサーや、質量分析装置を利用して変異を検出することができる。

【0099】

さらに、上記タンパク質を含有する試料から、変異を検出する対象となる遺伝子の翻訳産物（タンパク質）を単離し、該ポリペプチドの等電点に基づいて、変異を検出することもできる。

【0100】

このように、生体から分離された試料に含有されるタンパク質を用いて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異を検出することにより、被験者が脳炎または脳症に罹患するリスクを判定するためのデータを取得することができる。具体的には、取得されたデータにおいて、変異を検出する対象となる遺伝子の翻訳産物（タンパク質）に変異が見出された場合には、該被験者は脳炎または脳症に罹患する可能性が高いと判定することができる。

20

【0101】

本発明の判定データ取得方法は、上説した構成を備えているため、該判定データ取得方法により取得したデータによれば、被験者が脳炎または脳症に罹患するリスクの可能性を事前に診断することができる。

30

【0102】

そのため、本発明の判定データ取得方法によれば、脳炎または脳症による死亡率や後遺症の成績を向上させることができる。また、家族の精神的負担や経済的負担を軽減し、さらには適切な治療を施すことによって医療費を削減することができる。

【0103】

<II. 脳炎または脳症の罹患リスク判定キット>

本発明には、本発明の判定データ取得方法を用いて、脳炎または脳症の罹患リスクを判定するためのデータを取得するために用いる脳炎または脳症の罹患リスク判定キット（以下、単に「本発明の判定キット」ともいう）も含まれる。

【0104】

本発明の判定キットは、具体的には、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニットをコードする遺伝子群（すなわち、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群）のうち、少なくとも1つの遺伝子における変異の有無を検出するための試薬を少なくとも含んでいればよく、その他の具体的な構成は特に限定されるものではない。

40

【0105】

ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異の有無を検出するための試薬としては、例えば、プライマー、プローブ、および抗体などを挙げることができる。これらの試薬は、単独で含まれてもよく、また、複数の組み合わせで含まれていてもよい。さらに、上記判定キットは、上記例示する試薬以外のその他の試薬を含んでいてもよい

50

。

## 【0106】

具体的には、ゲノムDNAを用いて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異の有無を検出するキットとしては、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群のうち、少なくとも1つの遺伝子のエキソン領域もしくはエキソンとイントロンとの境界領域、またはそれらの一部を増幅できるように設計されたプライマーや、変異型または野生型の一方のエキソン領域もしくはエキソンとイントロンとの境界領域、またはそれらの一部（換言すれば、特定の遺伝子型のエキソンもしくはエキソンとイントロンとの境界領域、またはそれらの一部）のみを特異的に検出できるように設計されたプローブを含む構成を挙げることができる。

10

## 【0107】

上記プライマーおよびプローブの配列は特に限定されるものではないが、例えば、プライマーとしては、後述の実施例で用いたプライマーを挙げることができる。ただし、本発明は、後述の実施例に限定されないことはいうまでもない。

## 【0108】

さらに、このような判定キットでは、上記プライマーやプローブに加えて、PCR法やサザンプロット法、核酸シーケンシングに用いられる試薬など、上記遺伝子における変異の有無を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせることもできる。

20

## 【0109】

なお、上記試薬は、本発明の検出方法に応じて適宜選択採用されるが、例えば、dATP、dCTP、dTTP、dGTP、DNA合成酵素等を挙げることができる。さらに、PCR法やサザンプロット法、核酸シーケンシングに用いることが可能な適当な緩衝液および洗浄液等が含まれていてもよい。

## 【0110】

また、mRNA(cDNA)または全RNAを用いて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異の有無を検出するキットとしては、上記遺伝子群のうち、少なくとも1つの遺伝子のcDNAまたはその一部の領域を増幅できるように設計されたプライマーや、変異型または野生型の一方のmRNAもしくはその一部（換言すれば、特定の遺伝子型のmRNAまたはその一部）のみを特異的に検出できるように設計されたプローブを含む構成を挙げることができる。

30

## 【0111】

さらに、このような判定キットでは、上記プライマーやプローブに加えて、RT-PCR法やノザンプロット法、核酸シーケンシングに用いられる試薬など、上記遺伝子における変異の有無を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせることもできる。

## 【0112】

なお、上記試薬は、本発明の検出方法に応じて適宜選択採用されるが、例えば、dATP、dCTP、dTTP、dGTP、DNA合成酵素等を挙げることができる。さらに、RT-PCR法やノザンプロット法、核酸シーケンシングに用いることが可能な適当な緩衝液および洗浄液等が含まれていてもよい。

40

## 【0113】

また、タンパク質レベルでナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異の有無を検出するキットとしては、例えば、該遺伝子群の翻訳産物であるポリペプチド（タンパク質）のうち、野生型または変異型のポリペプチドもしくはその一部の一方のみに特異的に結合する抗体（換言すれば、特定の遺伝子型の翻訳産物であるポリペプチドまたはその一部のみに特異的に結合する抗体）を含むキット等が挙げられる。

## 【0114】

さらに、このような判定キットでは、上記抗体に加えて、ELISA法や、ウエスタンプロット法、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ の活性測定に用いられる

50



試薬など、上記遺伝子における変異（換言すれば、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  における変異）の有無を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせて含む構成とすることもできる。

【0115】

また、本発明の判定キットは、上記例示した構成物をどのように組み合わせて含んでもよい。

【0116】

上説したような本発明の判定キットを用いることにより、被験者が脳炎または脳症に罹患するリスクを、脳炎または脳症の罹患前に判定するためのデータを取得することができる。

10

【0117】

本発明の判定キットが適用される被験者は、特に限定されるものではないが、乳幼児、または小児に適用することが好ましい。

【0118】

< I I I . 脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング細胞およびその製造方法 >

本発明によれば、培養細胞において、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を導入することにより、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  の活性が変化した細胞を製造することができる。

20

【0119】

換言すれば、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  のサブユニットをコードする遺伝子群の少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異が導入された形で、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニットをコードする遺伝子群が発現する培養細胞を製造することができる。

【0120】

このような細胞は、脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニングに好適に用いることができる。つまり、このような細胞は、治療薬剤のスクリーニング細胞といえることができる。

【0121】

したがって、本発明には、このような脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング細胞（以下、単に「スクリーニング細胞」ともいう）およびその製造方法も含まれる。

30

【0122】

本発明にかかるスクリーニング細胞は、具体的には、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群の少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を有する細胞である。

【0123】

例えば、変異型の電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を発現するように、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニットをコードする遺伝子群の少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異が導入されている細胞が挙げられる。

40

【0124】

このような細胞では、変異型の電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  が発現しており、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  の機能が変化している。この機能変化は特に限定されるものではない。

【0125】

上記遺伝子群におけるこのような変異および変異を導入する遺伝子については、< I . 脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法 > で説明した通りであるので、ここでは、詳細な説明は省略する。

【0126】

本明細書において、「治療薬剤のスクリーニング細胞」とは、ヒトの疾患に対する予防

50

法または治療法を開発するために用いられる実験用培養細胞をいい、具体的には、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サルなどの哺乳動物、およびその他の脊椎動物が挙げられる。

【0127】

本発明にかかる脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング細胞の製造方法は、上記の特性を有する細胞を製造する方法であり、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を導入する工程を含んでいればよい。

【0128】

より具体的には、以下の3つの実施形態を挙げることができる。ここでは、以下の3つの実施形態について具体的に説明するが、本発明はこれに限定されない。

10

【0129】

(1) 発現ベクター等を用いる方法

この方法では、まず、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群(サブユニット1型、 $_1$ サブユニット、および $_2$ サブユニット)のうち、少なくとも1つの遺伝子にはアミノ酸変化を伴う変異を含んでいる遺伝子群を、発現ベクター等を用いて、宿主となる培養細胞内において発現させる。これにより、本発明にかかるスクリーニング細胞を製造することができる。

【0130】

このとき、宿主となる培養細胞は電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ が発現していない細胞であることが好ましい。このような細胞によれば、内在の電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ の影響を受けない。

20

【0131】

なお、本方法において、その他の具体的な工程、材料、条件、使用装置、および使用機器等については、特に限定されるものではない。

【0132】

(2) 人為的な変異導入を用いる方法

この方法では、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を発現している培養細胞に、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群のうち、少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を導入する。これにより、本発明にかかるスクリーニング細胞を製造することができる。

30

【0133】

上記培養細胞に変異を導入する方法は、特に限定されるものではなく、従来公知の遺伝子操作技術を適宜組み合わせ用いればよい。

【0134】

(3) モデル動物を用いる方法

この方法では、まず、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニットをコードする遺伝子群に含まれる少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を有するモデル動物を作製する。次に、該モデル動物から組織を摘出し、その組織から培養細胞を作製する。これにより、本発明にかかるスクリーニング細胞を製造することができる。

40

【0135】

上記モデル動物は、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群のうち、少なくとも1つの遺伝子に変異が導入されているため、脳炎または脳症を発症する。すなわち、上記モデル動物は、脳炎または脳症を人為的に発症させた脳炎または脳症の発症モデル動物ということができる。

【0136】

本発明には、このようなモデル動物、すなわち、脳炎または脳症の発症モデル動物、およびその製造方法も含まれる。

【0137】

50

本発明にかかる脳炎または脳症の発症モデル動物は、具体的には、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群の少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を有する。該脳炎または脳症の発症モデル動物は、電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1の機能に異常があることが好ましい。

【0138】

上記遺伝子群におけるこのような変異および変異を導入する遺伝子については、< I . 脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法 > で説明した通りであるので、ここでは、詳細な説明は省略する。

【0139】

本明細書において、「モデル動物」とは、ヒトの疾患に対する予防法または治療法を開発するために用いられる実験動物をいい、具体的には、マウス、ラット、ウサギ、サル、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、イヌなどの非ヒト哺乳動物、およびその他の脊椎動物が挙げられる。

【0140】

本発明にかかる脳炎または脳症の発症モデル動物の製造方法は、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群の少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異が導入されるように、モデル動物の上記遺伝子群を操作する工程を含んでいればよく、その他の具体的な工程、材料、条件、使用装置、および使用機器等については、特に限定されるものではない。

【0141】

本明細書において、「モデル動物の遺伝子を操作する」とは、従来公知の遺伝子操作技術を用いて、モデル動物の遺伝子を操作することが意図される。具体的には、モデル動物の遺伝子を破壊したり、当該遺伝子に変異を導入したり、当該遺伝子を変異型遺伝子で置換したり、さらには、当該モデル動物に外来遺伝子を導入したり、モデル動物を交雑したりすることをすべて包含する意味である。

【0142】

本発明にかかる脳炎または脳症の発症モデル動物の製造方法によれば、電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1を構成するサブユニットをコードする遺伝子群の少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異が導入されるように、モデル動物の上記遺伝子群を操作することにより、脳炎または脳症を発症したモデル動物を製造することができる。

【0143】

< I V . 脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング方法 >

本発明にかかるスクリーニング細胞、および脳炎または脳症の発症モデル動物は、新たな脳炎または脳症の治療方法や治療薬剤の開発に用いることができる。したがって、本発明には、脳炎または脳症の治療薬の治療薬剤をスクリーニングする脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング方法（以下、単に「スクリーニング方法」ともいう）が含まれる。

【0144】

ここでは、本発明にかかるスクリーニング方法の一実施形態として、本発明にかかるスクリーニング細胞を用いる実施形態と、本発明にかかる脳炎または脳症の発症モデル動物を用いる実施形態について説明するが、本発明はこれに限定されない。

【0145】

すなわち、例えば、本発明にかかる脳炎または脳症の発症モデル動物に代えて、他の脳炎または脳症の発症モデル動物を用いる実施形態とすることもできる。

【0146】

(1) 本発明にかかるスクリーニング細胞を用いる場合

本発明にかかるスクリーニング細胞に候補薬剤を投与する工程と、該候補薬剤が投与された脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング細胞において、ナトリウムイオンチャンネルの活性が変化したかを判定する工程とを少なくとも含む。

【0147】

10

20

30

40

50

つまり、本実施形態にかかるスクリーニング方法によれば、本発明にかかるスクリーニング細胞に候補薬剤を投与し、当該候補薬剤を投与されたスクリーニング細胞におけるナトリウムイオンチャンネルの活性が変化していることを指標として、上記候補薬剤が脳炎または脳症の治療薬剤となりうるかを判定することができる。

【0148】

上記候補薬剤は、特に限定されるものではないが、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ の発現に影響を及ぼすことが期待される化合物、または電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ の活性に影響を及ぼすことが期待される化合物（例えば、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ に対する阻害剤や阻害剤の候補物質、または作動薬や作動薬の候補物質）であることが好ましい。

10

【0149】

また、上記候補薬剤は、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ を構成するサブユニットをコードする遺伝子群から選択される少なくとも1つの遺伝子もしくはその核酸配列の一部からなるポリヌクレオチドを含む発現プラスミドベクターもしくはウイルスベクターであってもよい。

【0150】

このような候補薬剤を本発明にかかるスクリーニング細胞に投与する方法は、特に限定されるものではなく、その候補薬剤の物性等に応じて、それに適した方法を従来公知のものから選択して用いればよい。

【0151】

また、該候補薬剤が投与されたスクリーニング細胞における電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v 1.1$ の活性が変化したか否かを判定する方法は特に限定されるものではなく、電気生理学的測定機器や蛍光色素観察機器などを用いて判定すればよい。

20

【0152】

(2) 本発明にかかる脳炎または脳症の発症モデル動物を用いる場合

本発明にかかる脳炎または脳症の発症モデル動物に候補薬剤を投与する工程と、該候補薬剤が投与された脳炎または脳症の発症モデル動物の脳炎または脳症が治癒または改善されたか否かを判定する工程とを含んでいけばよい。つまり、本発明にかかる脳炎または脳症の治療薬剤のスクリーニング方法によれば、脳炎または脳症の発症モデル動物に候補薬剤を投与し、当該候補薬剤を投与された脳炎または脳症の発症モデル動物において、脳炎または脳症が治癒または改善していることを指標として、上記候補薬剤が脳炎または脳症の治療薬剤となりうるかを判定することができる。

30

【0153】

上記候補薬剤は、特に限定されるものではなく、(1) 本発明にかかるスクリーニング細胞を用いる場合と同様の物質を挙げることができる。

【0154】

このような候補薬剤を本発明にかかる脳炎または脳症発症モデル動物に投与する方法は、特に限定されるものではなく、その候補薬剤の物性等に応じて、それに適した方法を従来公知のものから選択して用いればよい。

【0155】

また、該候補薬剤が投与された脳炎または脳症の発症モデル動物の脳炎または脳症が治癒または改善されたか否かを判定する方法は特に限定されるものではなく、脳炎または脳症に特徴的症状を指標に判定すればよい。

40

【0156】

< V . 熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法 >

本発明にかかる熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法は、熱性けいれん既往者である被験者から分離した試料を用いて、該被験者がでんかん患者へ移行するリスクを判定するためのデータを取得するための方法である。

【0157】

上記被験者は、熱性けいれんの既往者であれば特に限定されるものではないが、小児に

50

は約 8 % の高い確率で熱性けいれんが発症し、大多数は 6 歳までに治癒することに鑑み、生後 6 歳未満の小児であることが好ましく、1 歳未満に熱性けいれんを発症した者の中に、6 歳以降もてんかんが持続する難治性てんかん患者が含まれることが多いため、1 歳未満の小児であることが好ましい。

【 0 1 5 8 】

本明細書において、「熱性けいれん」とは、発熱によって起こるけいれん発作が意図される。例えば、感冒などのウイルス感染や細菌感染などによる 38 以上の発熱に伴って 1 - 5 分持続する全身のけいれんを挙げることができる。また、本明細書において、「てんかん」とは、発熱とは無関係に生じうる慢性的なけいれん発作が意図される。

【 0 1 5 9 】

本発明の判定データ取得方法は、具体的には、生体から分離した試料を用いて、ナトリウムイオンチャネルサブユニット遺伝子群に含まれる少なくとも 1 つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出する工程を含んでいればよく、その他の具体的な構成は特に限定されない。

【 0 1 6 0 】

本発明の判定データ取得方法は、具体的には、例えば、上記変異を検出するために、上記生体から分離した試料を前処理する工程等を含んでいてもよい。

【 0 1 6 1 】

本発明の判定データ取得方法では、上記例示したようなナトリウムイオンチャネルを構成する各サブユニットをコードする遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子について、アミノ酸変化を伴う変異の有無を検出すればよい。

【 0 1 6 2 】

具体的には、少なくとも サブユニット 1 型をコードする遺伝子について、上記変異を検出することが好ましい。

【 0 1 6 3 】

上記構成によれば、熱性けいれんのてんかんへの移行リスクを精度よく判定することを可能にするデータを取得することができる。

【 0 1 6 4 】

また、上記変異を検出する対象遺伝子は、1 つであってもよいが、複数であることが好ましい。このような構成によれば、熱性けいれんのてんかんへの移行リスクをより高精度に判定することを可能にするデータを取得することができる。

【 0 1 6 5 】

上記ナトリウムイオンチャネルサブユニット遺伝子群に含まれる遺伝子において検出する変異は、アミノ酸変化を伴うものであればよく、その具体的な変異は特に限定されるものではない。具体的には、変異には、ミスセンス変異（アミノ酸が置換する）、ナンセンス変異（アミノ酸合成が途中で止まる）、フレームシフト（塩基の挿入、欠失によりアミノ酸コドンのフレームがずれ、変異位置より下流のアミノ酸配列が変化し、本来の機能を有しない）、スプライシング異常（該当エキソン領域の欠失等）、少数塩基挿入または欠失（一部のアミノ酸が新生、脱落するが下流は正常アミノ酸のまま合成）、エキソン領域微小欠失（エキソンが 1 つもしくは複数欠損）が含まれる。また、変異は、遺伝子多型であってもよい。

【 0 1 6 6 】

上記遺伝子における変異の位置は特に限定されるものではないが、ナトリウムイオンチャネルの機能（換言すれば、活性）を変化させる位置における変異であることが好ましい。さらに、上記電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  の機能の変化は、特に限定されるものではなく、機能亢進であってもよいし、機能低下であってもよい。すなわち、電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  の機能異常を示す変化であればよい。

【 0 1 6 7 】

このような変異としては、具体的には、例えば、配列番号 2 に示される塩基配列の第 4

10

20

30

40

50

7 2 3 位のシトシン ( C ) の変異、好ましくは第 4 7 2 3 位のシトシン ( C ) がチミン ( T ) に置換された変異 ( C 4 7 2 3 T ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 5 7 5 位のアルギニン ( R ) の変異、好ましくは第 1 5 7 5 位のアルギニン ( R ) のシステイン ( C ) への変異 ( R 1 5 7 5 C ) を挙げることができる。

【 0 1 6 8 】

また、別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 4 8 4 7 位のチミン ( T ) の変異、好ましくは第 4 8 4 7 位のチミン ( T ) がシトシン ( C ) に置換された変異 ( T 4 8 4 7 C ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 6 1 6 位のイソロイシン ( I ) の変異、好ましくは第 1 6 1 6 位のイソロイシン ( I ) のスレオニン ( T ) への変異 ( I 1 6 1 6 T ) を挙げることができる。

10

【 0 1 6 9 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 5 3 0 5 位のチミン ( T ) の変異、好ましくは第 5 3 0 5 位のチミン ( T ) がシトシン ( C ) に置換された変異 ( T 5 3 0 5 C ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 7 6 9 位のチロシン ( Y ) の変異、好ましくは第 1 7 6 9 位のチロシン ( Y ) のヒスチジン ( H ) への変異 ( Y 1 7 6 9 H ) を挙げることができる。

【 0 1 7 0 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 5 5 6 7 位のチミン ( T ) の変異、好ましくは第 5 5 6 7 位のチミン ( T ) がシトシン ( C ) に置換された変異 ( T 5 5 6 7 C ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 8 5 6 位のメチオニン ( M ) の変異、好ましくは第 1 8 5 6 位のメチオニン ( M ) のスレオニン ( T ) への変異 ( M 1 8 5 6 T ) を挙げることができる。

20

【 0 1 7 1 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 4 8 8 位のグアニン ( G ) の変異、好ましくは第 4 8 8 位のグアニン ( G ) がアデニン ( A ) に置換された変異 ( G 4 8 8 A ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 6 3 位のグリシン ( G ) の変異、好ましくは第 1 6 3 位のグリシン ( G ) のグルタミン酸 ( E ) への変異 ( G 1 6 3 E ) を挙げることができる。

30

【 0 1 7 2 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 4 6 1 5 位のアデニン ( A ) の変異、好ましくは第 4 6 1 5 位のアデニン ( A ) がシトシン ( C ) に置換された変異 ( A 4 6 1 5 C ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 5 3 9 位のスレオニン ( T ) の変異、好ましくは第 1 5 3 9 位のスレオニン ( T ) のプロリン ( P ) への変異 ( T 1 5 3 9 P ) を挙げることができる。

40

【 0 1 7 3 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 4 2 8 4 位と 4 2 8 5 位との間のゲノム DNA に存在するイントロン 2 1 のうち、最後から 2 つ目の位置 ( - 2 位 ) のアデニン ( A ) の変異、好ましくはイントロン 2 1 の最後から 2 つ目の位置 ( - 2 位 ) のアデニン ( A ) がグアニン ( G ) に置換された変異 ( イントロン 2 1 a g ( - 2 ) g g ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 4 2 9 位以降のスプライシング異常、好ましくは第 1 4 2 9 位以降の欠失を挙げることができる。

【 0 1 7 4 】

配列番号 2 に示される塩基配列の第 4 2 8 4 ( エキソン 2 1 ) と 4 2 8 5 位 ( エキソン

50

22)の間のゲノムDNAに存在するイントロン21の最後から2つの塩基配列はagであり、エキソン22の始めにつながる。一般的に、イントロン21の上記agはスプライシングを受ける認識配列であるため、ここに異常があると、イントロンがまだ続いているとみなされ、その直後のエキソン(もしくはその下流)は異常なスプライシングを生じてしまい、全長蛋白ができなくなってしまう。

**【0175】**

さらに、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第3006位のシトシン(C)の変異、好ましくは第3006位のシトシン(C)の欠失(C3006del)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1002位のアラニン(A)の変異、好ましくは、フレームシフトにより第1009位に終止コドンを生じる変異(A1002fsX1009)を挙げることができる。

10

**【0176】**

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第4168位のグアニン(G)の変異、好ましくは第4168位のグアニン(G)がアデニン(A)に置換された変異(G4168A)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1390位のバリン(V)の変異、好ましくは第1390位のバリン(V)のメチオニン(M)への変異(V1390M)を挙げることができる。

**【0177】**

さらに、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第4286位から第4290位間の5塩基CCACAの変異、好ましくは第4286位から第4290位間のCCACAのATGTCへの置換を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1429位のアラニン(A)の変異、好ましくは、フレームシフトにより第1443位に終止コドンを生じる変異(A1429fsX1443)を挙げることができる。

20

**【0178】**

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第2705位のチミン(T)の変異、好ましくは第2705位のチミン(T)がグアニン(G)に置換された変異(T2705G)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第902位のフェニルアラニン(F)の変異、好ましくは第902位のフェニルアラニン(F)のシステイン(C)への変異(F902C)を挙げることができる。

30

**【0179】**

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第4721位のシトシン(C)の変異、好ましくは第4721位のシトシン(C)のグアニン(G)への置換(C4721G)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1574位のセリン(S)の変異、好ましくは第1574位のセリン(S)のストップコドンへの変異(S1574X)を挙げることができる。

40

**【0180】**

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第3829位のシトシン(C)の変異、好ましくは第3829位のシトシン(C)のチミン(T)への置換(C3829T)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1277位のグルタミン(Q)の変異、好ましくは第1277位のグルタミン(Q)のストップコドンへの変異(Q1277X)を挙げることができる。

**【0181】**

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第3867位のシトシン(C)、第3868位のチミン(T)および第3869位のチミン(T)の変異、好まし

50

くは第3867位のシトシン(C)、第3868位のチミン(T)および第3869位のチミン(T)の欠失を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1289位のフェニルアラニン(F)の変異、好ましくは第1289位のフェニルアラニン(F)欠失(F1289del)を挙げることができる。

**【0182】**

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第529位のグアニン(G)の変異、好ましくは529位のグアニン(G)がアデニン(A)に置換された変異(G529A)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第177位のグリシン(G)の変異、好ましくは第177位のグリシン(G)のアルギニン(R)への変異(G177R)を挙げることができる。

10

**【0183】**

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第3794位のチミン(T)の変異、好ましくは第3794位のチミン(T)がシトシン(C)に置換された変異(T3794C)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1265位のロイシン(L)の変異、好ましくは第1265位のロイシン(L)のプロリン(P)への変異(L1265P)を挙げることができる。

**【0184】**

20

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第2970位のグアニン(G)の変異、好ましくは第2970位のグアニン(G)がチミン(T)に置換された変異(G2970T)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第990位のロイシン(L)の変異、好ましくは第990位のロイシン(L)のフェニルアラニン(F)への変異(L990F)を挙げることができる。

**【0185】**

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第4349位のアデニン(A)の変異、好ましくは第4349位のアデニン(A)がグアニン(G)に置換された変異(A4349G)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1450位のグルタミン(Q)の変異、好ましくは第1450位のグルタミン(Q)のアルギニン(R)への変異(Q1450R)を挙げることができる。

30

**【0186】**

また、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第3245位のシトシン(C)の変異、好ましくは第3245位のシトシン(C)の欠失(C3245del)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1082位のスレオニン(T)の変異、好ましくは、フレームシフトにより第1086位に終止コドンを生じる変異を挙げることができる。

**【0187】**

40

また、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第5726位のシトシン(C)の変異、好ましくは第5726位のシトシン(C)のチミン(T)への置換(C5726T)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1909位のスレオニン(T)の変異、好ましくは第1909位のスレオニン(T)のイソロイシン(I)への置換(T1909I)を挙げることができる。

**【0188】**

また、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第2791位のシトシン(C)の変異、好ましくは第2791位のシトシン(C)のチミン(T)への置換(C2791T)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション

50



番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 9 3 1 位のアルギニン ( R ) の変異、好ましくは第 9 3 1 位のアルギニン ( R ) のシステイン ( C ) への置換 ( R 9 3 1 C ) を挙げることができる。

【 0 1 8 9 】

また、別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 2 2 1 3 位のグアニン ( G ) の変異、好ましくは第 2 2 1 3 位のグアニン ( G ) の欠失 ( G 2 2 1 3 d e l ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 7 3 8 位のトリプトファン ( W ) の変異、好ましくは、フレームシフトにより第 7 4 6 位に終止コドンを生じる変異 ( W738fsX746 ) を挙げることができる。

10

【 0 1 9 0 】

また、別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 5 6 4 0 位から第 5 6 4 5 位間の 6 塩基 A G A G A T の変異、好ましくは第 5 6 4 0 位から第 5 6 4 5 位間の 6 塩基 A G A G A T の C T A G A G T A への置換を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 8 8 0 位のグリシン ( G ) の変異、好ましくは、フレームシフトにより第 1 8 8 1 位に終止コドンを生じる変異 ( G1880fsX1881 ) を挙げることができる。

【 0 1 9 1 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 2 1 3 4 位のシトシン ( C ) の変異、好ましくは第 2 1 3 4 位のシトシン ( C ) のチミン ( T ) への置換 ( C 2 1 3 4 T ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 7 1 2 位のアルギニン ( R ) の変異、好ましくは第 7 1 2 位のアルギニン ( R ) のストップコドンへの変異 ( R 7 1 2 X ) を挙げることができる。

20

【 0 1 9 2 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 4 7 2 1 位のシトシン ( C ) の変異、好ましくは第 4 7 2 1 位のシトシン ( C ) のグアニン ( G ) への置換 ( C 4 7 2 1 G ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 5 7 4 位のセリン ( S ) の変異、好ましくは第 1 5 7 4 位のセリン ( S ) のストップコドンへの変異 ( S 1 5 7 4 X ) を挙げることができる。

30

【 0 1 9 3 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 5 0 2 0 位のグアニン ( G ) の変異、好ましくは第 5 0 2 0 位のグアニン ( G ) のシトシン ( C ) への置換 ( G 5 0 2 0 C ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 6 7 4 位のグリシン ( G ) の変異、好ましくは第 1 6 7 4 位のグリシン ( G ) のアルギニン ( R ) への置換 ( G 1 6 7 4 R ) を挙げることができる。

【 0 1 9 4 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 5 0 5 4 位のシトシン ( C ) の変異、好ましくは第 5 0 5 4 位のシトシン ( C ) のアデニン ( A ) への置換 ( C 5 0 5 4 A ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 6 8 5 位のアラニン ( A ) の変異、好ましくは第 1 6 8 5 位のアラニン ( A ) のアスパラギン酸 ( D ) への置換 ( A 1 6 8 5 D ) を挙げることができる。

40

【 0 1 9 5 】

さらに別の実施形態として、配列番号 2 に示される塩基配列の第 3 0 7 9 位のアデニン ( A ) の変異、好ましくは第 3 0 7 9 位のアデニン ( A ) のチミン ( T ) への置換 ( A 3 0 7 9 T ) を挙げることができる。つまり、サブユニット 1 型 ( N C B I アクセション番号 B A C 2 1 1 0 1 ) のアミノ酸配列における第 1 0 2 7 位のリシン ( K ) の変異、好

50

ましくは第1027位のリシン(K)のストップコドンへの変異(K1027X)を挙げることができる。

【0196】

また、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第1641位の変異、好ましくは第1641位へのアデニン(A)の挿入(1641insA)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第547位のリシン(K)の変異、好ましくは、フレームシフトにより第570位に終止コドンを生じる変異(K547fsX570)を挙げることができる。

【0197】

さらに、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第2120位のシトシン(C)の変異、好ましくは第2120位のシトシン(C)の欠失(C2120del)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第707位のプロリン(P)の変異、好ましくは、フレームシフトにより第714位に終止コドンを生じる変異(P707fsX714)を挙げることができる。

10

【0198】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第4942位のシトシン(C)の変異、好ましくは第4942位のシトシン(C)のチミン(T)への置換(C4942T)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1648位のア르기ニン(R)の変異、好ましくは第1648位のア르기ニン(R)のシステイン(C)への置換(R1648C)を挙げることができる。

20

【0199】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第1130位のグアニン(G)の変異、好ましくは第1130位のグアニン(G)のチミン(T)への置換(G1130T)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第377位のア르기ニン(R)の変異、好ましくは第377位のア르기ニン(R)のロイシン(L)への置換(R377L)を挙げることができる。

30

【0200】

また、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第1502位のグアニン(G)の変異、好ましくは第1502位のグアニン(G)の欠失(G1502del)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第501位のア르기ニン(R)の変異、好ましくは、フレームシフトにより第543位に終止コドンを生じる変異(R501fsX543)を挙げることができる。

【0201】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第2593位のシトシン(C)の変異、好ましくは第2593位のシトシン(C)のチミン(T)への置換(C2593T)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第865位のア르기ニン(R)の変異、好ましくは第865位のア르기ニン(R)のストップコドンへの変異(R865X)を挙げることができる。

40

【0202】

また、別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第1820位のシトシン(C)の変異、好ましくは第1820位のシトシン(C)の欠失(C1820del)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第607位のセリン(S)の変異、好ましくは、フレームシフトにより第622位に終止コドンを生じる変異(S607fsX622)を挙げることができる。

50

## 【0203】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第635位のチミン(T)の変異、好ましくは第635位のチミン(T)のシトシン(C)への置換(T635C)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第212位のバリン(V)の変異、好ましくは第212位のバリン(V)のアラニン(A)への置換(V212A)を挙げることができる。

## 【0204】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第3812位のグアニン(G)の変異、好ましくは第3812位のグアニン(G)のアデニン(A)への置換(G3812A)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1271位のトリプトファン(W)の変異、好ましくは第1271位のトリプトファン(W)のストップコドンへの変異(W1271X)を挙げることができる。

10

## 【0205】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第4300位のチミン(T)の変異、好ましくは第4300位のチミン(T)のシトシン(C)への置換(T4300C)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1434位のトリプトファン(W)の変異、好ましくは第1434位のトリプトファン(W)のアルギニン(R)への置換(W1434R)を挙げることができる。

20

## 【0206】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第2362位のグアニン(G)の変異、好ましくは第2362位のグアニン(G)のアデニン(A)への置換(G2362A)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第788位のグルタミン酸(E)の変異、好ましくは第788位のグルタミン酸(E)のリシン(K)への置換(E788K)を挙げることができる。

## 【0207】

さらに別の実施形態として、配列番号2に示される塩基配列の第4786位のシトシン(C)の変異、好ましくは第4786位のシトシン(C)のチミン(T)への置換(C4786T)を挙げることができる。つまり、サブユニット1型(NCBIアクセション番号BAC21101)のアミノ酸配列における第1596位のアルギニン(R)の変異、好ましくは第1596位のアルギニン(R)のシステイン(C)への置換(R1596C)を挙げることができる。

30

## 【0208】

電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ の機能異常にかかる変異は、上記例示的に示した変異に限定されないことはいうまでもない。

## 【0209】

なお、本発明の判定データ取得方法において、変異の有無を検出する対象となる遺伝子は、上記のアクセション番号に登録されている塩基配列に限定されるものではない。つまり、上記例示した遺伝子がコードするタンパク質と実質的に同質の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子について、変異の有無を検出する構成も本発明に含まれる。

40

## 【0210】

このような遺伝子としては、具体的には、例えば、上記のアクセション番号に登録されている塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド(遺伝子)であり、該ポリヌクレオチドの翻訳産物が電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ のサブユニットとしての機能を有する遺伝子を挙げることができる。

## 【0211】

50

また、本発明にかかる判定データ取得方法においては、同じ遺伝子から生じるアイソフォーム mRNA やタンパク質を変異の有無を検出する対象としてもよい。

【0212】

本発明の判定データ取得方法において、遺伝子の変異の有無を検出する方法は、特に限定されるものではなく、従来公知のあらゆる方法を用いることができる。

【0213】

具体的には、例えば、PCRを利用したシーケンシング、SSCP (Single strand conformation polymorphism) などの変異検出法、リアルタイムPCRやDNAチップを用いた多型検出方法、遺伝子の各エキソンのmicro-deletionを検出する方法、mRNAの増減を検出するNorthern blot法、RT-PCR法、Real-time PCR法、およびcDNAアレイ法、並びに、タンパク質の増減を検出するウエスタンブロット法、免疫染色法、およびタンパクアレイ法等を挙げることができる。

10

【0214】

遺伝子の変異の有無を検出する方法の実施形態としては、例えば、(A)生体から分離された試料に含有されるゲノムDNAを用いて変異を検出する実施形態、(B)生体から分離された試料に含有されるmRNA(cDNA)を用いて変異を検出する実施形態、(C)生体から分離された試料に含有されるタンパク質を用いて変異を検出する実施形態を挙げることができる。上記(A)~(C)の具体的内容については、<I.脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法>と同じである。

【0215】

生体から分離された試料に含有されるゲノムDNAを用いてナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異を検出することにより、熱性けいれんがてんかんに移行するリスクを判定するためのデータを取得することができる。具体的には、取得されたデータにおいて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群に変異が見出された場合には、熱性けいれんの既往者はてんかん患者に移行する可能性が高いと判定することができる。

20

【0216】

また、生体から分離された試料に含有されるmRNAを用いて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異を検出することにより、熱性けいれんがてんかんに移行するリスクを判定するためのデータを取得することができる。具体的には、取得されたデータにおいて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群に変異が見出された場合には、熱性けいれんの既往者はてんかん患者に移行する可能性が高いと判定することができる。

30

【0217】

さらに、生体から分離された試料に含有されるタンパク質を用いて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異を検出することにより、熱性けいれんがてんかんに移行するリスクを判定するためのデータを取得することができる。具体的には、取得されたデータにおいて、変異を検出する対象となる遺伝子の翻訳産物(タンパク質)に変異が見出された場合には、熱性けいれんの既往者はてんかん患者に移行する可能性が高いと判定することができる。

40

【0218】

本発明にかかる、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定データの取得方法は上説した構成を備えているため、該判定データ取得方法により取得したデータによれば、熱性けいれんがてんかんへ移行するリスクの可能性を事前に診断することができる。

【0219】

そのため、本発明の判定データ取得方法によれば、てんかんへ移行する可能性のある患者に対して早期に適切な処置を施すことが可能となり、死亡率や後遺症の低減のみならず、家族の精神的負担や経済的負担の軽減、さらには適切な治療を施すことによる医療費の削減に貢献することができる。

【0220】

50

( V I . 熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定キット )

本発明には、本発明の判定データ取得方法を用いて、熱性けいれんのでんかんへの移行リスクを判定するためのデータを取得するために用いる、熱性けいれんのでんかんへの移行リスク判定キット（以下、単に「てんかんへの移行リスク判定キット」ともいう）も含まれる。

【 0 2 2 1 】

てんかんへの移行リスク判定キットは、具体的には、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル  $Na_v 1.1$  を構成するサブユニットをコードする遺伝子群（すなわち、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群）のうち、少なくとも1つの遺伝子における変異の有無を検出するための試薬を少なくとも含んでいればよく、その他の具体的な構成は特に限定されるものではない。

10

【 0 2 2 2 】

ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異の有無を検出するための試薬としては、例えば、プライマー、プローブ、および抗体などを挙げることができる。これらの試薬は、単独で含まれてもよく、また、複数の組み合わせで含まれていてもよい。さらに、上記判定キットは、上記例示する試薬以外のその他の試薬を含んでいてもよい。

【 0 2 2 3 】

具体的には、ゲノム DNA を用いて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異の有無を検出するキットとしては、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群のうち、少なくとも1つの遺伝子のエキソン領域もしくはエキソンとイントロンとの境界領域、またはそれらの一部を増幅できるように設計されたプライマーや、変異型または野生型の一方のエキソン領域もしくはエキソンとイントロンとの境界領域、またはそれらの一部（換言すれば、特定の遺伝子型のエキソンもしくはエキソンとイントロンとの境界領域、またはそれらの一部）のみを特異的に検出できるように設計されたプローブを含む構成を挙げることができる。

20

【 0 2 2 4 】

上記プライマーおよびプローブの配列は特に限定されるものではないが、例えば、プライマーとしては、後述の実施例で用いたプライマーを挙げることができる。ただし、本発明は、後述の実施例に限定されないことはいうまでもない。

30

【 0 2 2 5 】

さらに、このような判定キットでは、上記プライマーやプローブに加えて、PCR法やサザンブロット法、核酸シーケンシングに用いられる試薬など、上記遺伝子における変異の有無を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせることもできる。

【 0 2 2 6 】

なお、上記試薬は、本発明の検出方法に応じて適宜選択採用されるが、例えば、dATP、dCTP、dTTP、dGTP、DNA合成酵素等を挙げることができる。さらに、PCR法やサザンブロット法、核酸シーケンシングに用いることが可能な適当な緩衝液および洗浄液等が含まれていてもよい。

40

【 0 2 2 7 】

また、mRNA ( cDNA ) または全RNAを用いて、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異の有無を検出するキットとしては、上記遺伝子群のうち、少なくとも1つの遺伝子のcDNAまたはその一部の領域を増幅できるように設計されたプライマーや、変異型または野生型の一方のmRNAもしくはその一部（換言すれば、特定の遺伝子型のmRNAまたはその一部）のみを特異的に検出できるように設計されたプローブを含む構成を挙げることができる。

【 0 2 2 8 】

さらに、このような判定キットでは、上記プライマーやプローブに加えて、RT-PCR法やノザンブロット法、核酸シーケンシングに用いられる試薬など、上記遺伝子にお

50

ける変異の有無を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせて含む構成とすることもできる。

【0229】

なお、上記試薬は、本発明の検出方法に応じて適宜選択採用されるが、例えば、dATP、dCTP、dTTP、dGTP、DNA合成酵素等を挙げることができる。さらに、RT-PCR法やノザンプロット法、核酸シーケンシングに用いることが可能な適当な緩衝液および洗浄液等が含まれていてもよい。

【0230】

また、タンパク質レベルでナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群における変異の有無を検出するキットとしては、例えば、該遺伝子群の翻訳産物であるポリペプチド（タンパク質）のうち、野生型または変異型のポリペプチドもしくはその一部の一方のみに特異的に結合する抗体（換言すれば、特定の遺伝子型の翻訳産物であるポリペプチドまたはその一部のみに特異的に結合する抗体）を含むキット等が挙げられる。

10

【0231】

さらに、このような判定キットでは、上記抗体に加えて、ELISA法や、ウエスタンプロット法、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ の活性測定に用いられる試薬など、上記遺伝子における変異（換言すれば、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ における変異）の有無を検出するために必要な試薬を1つ以上組み合わせて含む構成とすることもできる。

【0232】

また、てんかんへの移行リスク判定キットは、上記例示した構成物をどのように組み合わせて含んでいてもよい。

20

【0233】

上説したようなてんかんへの移行リスク判定キットを用いることにより、熱性けいれん既往者がてんかんに移行するリスクを、てんかんへの移行前に判定するためのデータを取得することができる。

【0234】

本発明のてんかんへの移行リスク判定キットが適用される被験者は、特に限定されるものではないが、生後6歳未満の熱性けいれん既往者に適用することが好ましく、生後1歳未満の熱性けいれん既往者に適用することがより好ましい。

30

【0235】

なお本発明は、以上説示した各構成に限定されるものではなく、特許請求の範囲に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

【実施例】

【0236】

本発明について、実施例および図1～図9に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。当業者は本発明の範囲を逸脱することなく、種々の変更、修正、および改変を行うことができる。

【0237】

〔実施例1：インフルエンザ脳症に罹患した患者における電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ の変異〕

40

小児てんかん患者について、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ のサブユニット1型をコードするSCN1A遺伝子の解析を行った。具体的には、まず、遺伝子解析の同意を得た後に末梢血を採取した。DNA抽出キット(WB kit; Nippon gene, Tokyo, Japan)を用いて患者の末梢血からゲノムDNAを抽出し、SCN1A遺伝子の全エキソン（エキソン1～26）をPCRで増幅した。

【0238】

PCRは50ng ヒトゲノムDNA、20pmol 各プライマー、0.8mM dNTPs、1x reaction buffer、1.5mM  $MgCl_2$ 、0.7ユニットのAmpliTaq GoI

50

d DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を含む 25 μl の反応液中で行った。

【 0 2 3 9 】

なお、各エキソンを増幅させるためのプライマーセットとしては、それぞれ、以下のプライマーセットを用いた。また、SCN1A 遺伝子のゲノム配列は、配列番号 1 に示す。

【 0 2 4 0 】

エキソン 1 増幅

Sense primer : 5' - tcatggcacagttcctgtatc -3' (配列番号 3)

Antisense primer : 5' - gcagtaggcaattagcagcaa -3' (配列番号 3 0)

エキソン 2 増幅

Sense primer : 5' - tggggcacttttagaaattgtg -3' (配列番号 4)

Antisense primer : 5' - tgacaaagatgcaaaatgagag -3' (配列番号 3 1)

エキソン 3 増幅

Sense primer : 5' - gcagtttgggcttttcaatg -3' (配列番号 5)

Antisense primer : 5' - tgagcattgtcctcttgctg -3' (配列番号 3 2)

エキソン 4 増幅

Sense primer : 5' - agggctacgtttcatttgtatg -3' (配列番号 6)

Antisense primer : 5' - tgtgctaaattgaaatccagag -3' (配列番号 3 3)

エキソン 5 増幅

Sense primer : 5' - cagctcttcgcactttcaga -3' (配列番号 7)

Antisense primer : 5' - tcaagcagagaaggatgctga -3' (配列番号 3 4)

エキソン 6 増幅

Sense primer : 5' - agcgttgcaaacattcttgg -3' (配列番号 8)

Antisense primer : 5' - gggatatccagcccctcaag -3' (配列番号 3 5)

エキソン 7 増幅

Sense primer : 5' - gacaaatacttgtgcctttgaatg -3' (配列番号 9)

Antisense primer : 5' - acataatctcatactttatcaaaaacc -3' (配列番号 3 6)

エキソン 8 増幅

Sense primer : 5' - gaaatggaggtgttgaaaatgc -3' (配列番号 1 0)

Antisense primer : 5' - aatccttggcatcactctgc -3' (配列番号 3 7)

エキソン 9 増幅

Sense primer : 5' - agtacagggtgctatgaccaac -3' (配列番号 1 1)

Antisense primer : 5' - tcctcatacaaccacctgctc -3' (配列番号 3 8)

エキソン 1 0 増幅

Sense primer : 5' - tctccaaaagccttcattagg -3' (配列番号 1 2)

Antisense primer : 5' - ttctaattctccccctctctcc -3' (配列番号 3 9)

エキソン 1 1 増幅

Sense primer : 5' - tcctcattctttaatccaagg -3' (配列番号 1 3)

Antisense primer : 5' - gccgttctgtagaaacactgg -3' (配列番号 4 0)

エキソン 1 2 増幅

Sense primer : 5' - gtcagaaatatctgccatcacc -3' (配列番号 1 4)

Antisense primer : 5' - gaatgcactattccaactcac -3' (配列番号 4 1)

エキソン 1 3 増幅

Sense primer : 5' - tgggctctatgtgtgtctg -3' (配列番号 1 5)

Antisense primer : 5' - ggaagcatgaaggatggtg -3' (配列番号 4 2)

エキソン 1 4 増幅

Sense primer : 5' - tacttcgcgtttccacaagg -3' (配列番号 1 6)

Antisense primer : 5' - gctatgcaagaacctgattg -3' (配列番号 4 3)

エキソン 1 5 増幅

Sense primer : 5' - atgagcctgagacggttagg -3' (配列番号 1 7)

10

20

30

40

50

Antisense primer : 5'- atacatgtgccatgctggtg -3' (配列番号 4 4)

エキソン 1 6 増幅

Sense primer : 5'- tgctgtggtgtttccttctc -3' (配列番号 1 8)

Antisense primer : 5'- tgtattcataccttcccacacc -3' (配列番号 4 5)

エキソン 1 7 増幅

Sense primer : 5'- aaaagggttagcacagacaatg -3' (配列番号 1 9)

Antisense primer : 5'- attgggcagatataatcaaagc -3' (配列番号 4 6)

エキソン 1 8 増幅

Sense primer : 5'- cacacagctgatgaatgtgc -3' (配列番号 2 0)

Antisense primer : 5'- tgaagggttacactttctgg -3' (配列番号 4 7)

エキソン 1 9 増幅

Sense primer : 5'- tctgccctcctattccaatg -3' (配列番号 2 1)

Antisense primer : 5'- gcccttgcttccagaaatg -3' (配列番号 4 8)

エキソン 2 0 増幅

Sense primer : 5'- aaaaattacatcctttacatcaaactg -3' (配列番号 2 2)

Antisense primer : 5'- ttttgcatgcatagattttcc -3' (配列番号 4 9)

エキソン 2 1 増幅

Sense primer : 5'- tgaaccttgcttttacatatcc -3' (配列番号 2 3)

Antisense primer : 5'- acccatctgggctcataaac -3' (配列番号 5 0)

エキソン 2 2 増幅

Sense primer : 5'- tgtcttggtccaaaatctgtg -3' (配列番号 2 4)

Antisense primer : 5'- ttggctgctttatgctttattcg -3' (配列番号 5 1)

エキソン 2 3 増幅

Sense primer : 5'- ccctaaaggccaatttcagg -3' (配列番号 2 5)

Antisense primer : 5'- atttggcagagaaaacactcc -3' (配列番号 5 2)

エキソン 2 4 増幅

Sense primer : 5'- gagatttgggggtgtttgtc -3' (配列番号 2 6)

Antisense primer : 5'- ggattgtaatgggggtgcttc -3' (配列番号 5 3)

エキソン 2 5 増幅

Sense primer : 5'- caaaaatcaggccaatgac -3' (配列番号 2 7)

Antisense primer : 5'- tgattgctgggatgatcttg -3' (配列番号 5 4)

エキソン 2 6 ( 1 ) 増幅

Sense primer : 5'- aggactctgaaccttaccttgg -3' (配列番号 2 8)

Antisense primer : 5'- ccatgaatcgctcttccatc -3' (配列番号 5 5)

エキソン 2 6 ( 2 ) 増幅

Sense primer : 5'- tgtgggaacccatctgttg -3' (配列番号 2 9)

Antisense primer : 5'- gtttgctgacaaggggtcac -3' (配列番号 5 6)。

#### 【 0 2 4 1 】

得られた P C R 産物を、PCR products pre-sequencing kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)を用いて精製した。続いて、Big Dye Terminator FS ready-reaction kit (Applied Biosystems)を用いて、シーケンス反応を行い、蛍光シーケンサー (ABI PRISM3100 sequencer ; Applied Biosystems)により塩基配列を決定した。

#### 【 0 2 4 2 】

その結果、表 1 に示すように、電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  のサブユニット 1 型をコードする S C N 1 A 遺伝子にアミノ酸変化をもたらす変異を有する患者 4 3 人を見いだした。

#### 【 0 2 4 3 】

10

20

30

40



【表 1】

表 1 SCN1A 遺伝子異常

患者番号	エキソン	塩基置換	アミノ酸置換	患者番号	エキソン	塩基置換	アミノ酸置換
1	25	G4723T	R1575C	23	15	G2791T	R931C
2	25	T4847C	I1616T	24	16	G2970T	L990F
3	25	T4847C	I1616T	25	16	C3006del	A1002fsX1009
4	25	T4847C	I1616T	26	16	A3079T	K1027X
5	26	T5305C	Y1769H	27	16	C3245del	T1082fsX1086
6	26	T5567C	M1856T	28	19	T3794C	L1265P
7	4	G488A	G163E	29	19	G3812A	W1271X
8	4	G529A	G177R	30	19	C3829T	Q1277X
9	5	T635C	V212A	31	19	GTT3867-3869del	F1289del
10	8	G1130T	R377L	32	イントロン 21	ag(-2)gg	スプライシング異常
11	10	G1502del	R501fsX543	33	21	G4168A	V1390M
12	10	1641insA	K547fsX570	34	22	4286-4290del (CCACA) ins (ATGTCC)	A1429fsX1443
13	11	C1702T	R568X	35	22	T4300C	W1434R
14	11	C1702T	R568X	36	23	A4349G	Q1450R
15	11	C1820del	S607fsX622	37	25	A4615C	T1539P
16	12	C2120del	P707fsX714	38	25	G4721G	S1574X
17	12	C2134T	R712X	39	26	G4942T	R1648C
18	13	G2213del	W738fsX746	40	26	G5020C	G1674R
19	13	G2362A	E788K	41	26	C5054A	A1685D
20	15	C2593T	R865X	42	26	5640-5645del (AGAGAT) ins (CTAGAGTA)	G1880fsX1881
21	15	T2705G	F902C	43	26	C5726T	T1909I
22	15	C2791T	R931C				

X; ナンセンス変異 (アミノ酸合成が停止する)

fs; フレームシフト変異 (アミノ酸の読み取りフレームがずれてしまい、結果的にアミノ酸合成が停止する)

A1002fsX1009; 1002 番目のコドンにフレームシフトが起ったため、フレームがずれて 1009 番目に終止コドンが生じて蛋白合成停止

## 【 0 2 4 4 】

これら 43 人の患者のうち、図 1 に変異の詳細を示す 5 人は、その後、急性脳炎または急性脳症を発症した。つまり、SCN1A 遺伝子に変異を有する者の急性脳炎または急性脳症の罹患率は、11.63%であった。一方、一般的な急性脳炎または急性脳症の発症頻度は、0.003%である。

## 【 0 2 4 5 】

したがって、上記の結果は、SCN1A 遺伝子に変異を有する者では、急性脳炎または急性脳症の罹患率が、3877 倍も高いことを示している。

## 【 0 2 4 6 】

なお、急性脳炎または急性脳症を発症した 5 人の臨床的特徴を表 2 に示す。

## 【 0 2 4 7 】

10

20

30

40

## 【表 2】

表 2 SCN1A 遺伝子に異常を有し、急性脳炎または急性脳症を発症した患者の臨床特徴

患者番号	SCN1A 遺伝子の異常	急性脳炎・脳症発症時年齢	原因	転帰
13	R568X	4 歳 5 ヶ月	インフルエンザ	死亡
25	A1002fsX1009	2 歳 4 ヶ月	麻疹	退行 (有意語消失)
38	S1574X	1 歳 1 ヶ月	麻疹	回復
40	G1674R	2 歳 3 ヶ月	不明	退行 (四肢麻痺)
43	T1909I	6 歳 6 ヶ月	麻疹	回復

X; ナンセンス変異 (アミノ酸合成が停止する)

fs; フレームシフト変異 (アミノ酸の読み取りフレームがずれてしまい、結果的にアミノ酸合成が停止する)

A1002fsX1009; 1002 番目のコドンにフレームシフトが起ったため、フレームがずれて 1009 番目に終止コドンが生じて蛋白合成停止

## 【0248】

また、上記 5 人の患者のうち、表 2 に示す患者番号 13 の患者の脳波の測定結果を図 2 (a) ~ (d) に示す。なお、脳波は 10 - 20 法という電極配置法で記録した。電極配置記号は頭部の部位を示すもので、一般に Fp1, Fp2 は前部極、F3, F4 は前頭部、C3, C4 は中心部、P3, P4 は頭頂部、O1, O2 は後頭部、F7, F8 は前側頭部、T3, T4 は中側頭部、T5, T6 は後側頭部、Fz は正中前頭部、Cz は正中中心部、Pz は正中頭頂部を意味する。

## 【0249】

図 2 (a) は、インフルエンザ脳症を発症して 13 時間後のけいれん重積時の脳波を示す図である。全ての電極配置記号から、棘徐波複合が連続的に認められ、脳全体の広汎な領域からけいれん発射が出現していることを示している。

## 【0250】

その後、図 2 (b) に示すように、インフルエンザ発症 38 時間後には、けいれんは収まっているが、すでに、脳波の低電位化が始まっていた。さらに、図 2 (c) に示すように、インフルエンザ発症 62 時間後の脳波では、さらに、低電位化が進行した。そして、図 2 (d) に示すように、7 日目には、脳波が平坦になって、急速な病状の進行で脳の一般的な活動停止に近い状態に至った。

## 【0251】

また、上記患者について、インフルエンザ脳症を発症して 8 日目の聴性脳幹反応を調べた。図 3 (a) ~ (c) は、それぞれ、右側を刺激したときの聴性脳幹反応の結果、左側を刺激したときの聴性脳幹反応の結果、および左右両側を刺激したときの聴性脳幹反応の結果を示す。

## 【0252】

図 3 (a) ~ (c) に示すように、いずれの刺激に対しても無反応であった。脳波所見、聴性脳幹反応所見、そして自発呼吸の消失や臨床的脳幹反応の消失など総合的に判断して、脳死状態になったと診断された。患者は、多臓器不全も合併し、インフルエンザ脳症を発症して 27 日目に死亡した。

## 【0253】

〔実施例 2 : 変異型ナトリウムイオンチャネルの機能解析〕

変異型 SCN1A 遺伝子 (C1702T) を発現させることによって、実施例 1 で見出された電位依存性ナトリウムイオンチャネル  $Na_v 1.1$  のサブユニット 1 型における変異のうち、変異型ナトリウムイオンチャネル (R568X) を作製した。コントロールとして、野生型 (正常型) SCN1A 遺伝子 を発現させることによって、野生型 (正常型) ナトリウムイオンチャネルを作製した。

## 【0254】

10

20

30

40

50

そして、該変異型ナトリウムイオンチャネルおよび野生型ナトリウムイオンチャネルについて、機能解析を行った。SCN1A遺伝子産物である電位依存性ナトリウムイオンチャネル $Na_v1.1$ のサブユニット1型は、 $\alpha_1$ サブユニットおよび $\beta_2$ サブユニットによる機能調節を受けているため、変異型プラスミドとサブユニットのSCN1B、SCN2B発現ベクターとを、トランスフェクション試薬を用いてヒト腎細胞HEK293に共発現させた。全細胞記録によるパッチクランプ法で電気生理学的特性を検討した。

#### 【0255】

ナトリウムチャネル電流の記録は、22 ~ 24 の室温で、トランスフェクション24時間 ~ 48時間に行った。パッチ電極はborosilicate glassを用い、multistage P-97 Flaming-Brown micropipette pullerで作成した。

10

#### 【0256】

細胞内液の組成は、110 mM CsF、10 mM NaF、20 mM CsCl、2 mM EGTA、10 mM HEPESとした。一方、細胞外液の組成は、145 mM NaCl、4 mM KCl、1.8 mM  $CaCl_2$ 、1 mM  $MgCl_2$ 、10 mM HEPESとした。アンプはAxopatch200B (Axon Instruments)を用いた。電気生理学的特性は、電位依存性チャネル活性化を調べ、正常型と比較検討した。データ解析にはClampfit 8.2ソフトウェアを使用した。

#### 【0257】

その結果、図4(a)に示すように、野生型ナトリウムイオンチャネルは、チャネルとしての機能を有していた。一方、変異型ナトリウムイオンチャネルは、正常型と比較して、電位の変化に伴うナトリウム電流がほとんどなく、チャネルとしての活性を有しなかった。

20

#### 【0258】

さらに、上記変異型ナトリウムチャネルおよび野生型ナトリウムチャネルについて、細胞内局在性を調べるために、蛍光タンパク質を野生型ナトリウムイオンチャネルおよび変異型ナトリウムイオンチャネルに融合させ解析した。その結果、図4(b)に示すように、野生型ナトリウムチャネルは細胞膜に局在したのに対して、変異型ナトリウムチャネルは、細胞膜に局在することなく、細胞質に留まっていた。

#### 【0259】

〔実施例3：ラスムッセン脳炎に罹患した患者における電位依存性ナトリウムイオンチャネル $Na_v1.1$ の変異〕

30

進行性の右半身麻痺と難治な部分発作を主訴に来院したラスムッセン脳炎患者について、まず、脳波を測定した。脳波電極は10 - 20法に従って配置した。その結果、図5(a)に示すように、左半球に徐波が増強し、左前頭部、左前側頭部からてんかん発射が出現していた。これは、左半球の機能が低下し、同部がてんかん焦点になっていることを意味している。

#### 【0260】

次に、上記患者について、頭部MRI画像を撮影した。その結果、図5(b)に示すように、左半球の軽度萎縮と左脳室拡大とが認められた。なお、図5(b)に示す3つの画像は、左から順に、T1強調画像(B1)、T2強調画像(B2)、FLAIR画像(B3)で、図5(c)は脳血流シンチグラフィーで、C1は初発時、C2は病状が進行したときの所見である。C1では異常所見は認められないが、C2では左半球の血流低下が新たに出現しており、機能が低下したことを示す所見である。これらの脳波および神経画像検査から、左半球の機能が低下して萎縮が進行し、てんかん焦点になっていることが明らかになった。

40

#### 【0261】

当該ラスムッセン脳炎患者の抹消血を採取後、DNAを抽出し、SCN1A遺伝子について解析した。なお、本実験は、岡山大学「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会」の承認を得て行われた。

#### 【0262】

50

DNA抽出キット(WB kit ; Nippon gene, Tokyo, Japan)を用いて患者の末梢血からゲノムDNAを抽出し、SCN1A遺伝子の全エキソンをPCRで増幅した。PCRは50 ng ヒトゲノムDNA、20 pmol 各プライマー、0.8 mM dNTPs、1×reaction buffer、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.7ユニットのAmpliAq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を含む25 μlの反応液中で行った。なお、プライマーセットには、実施例1に記載したプライマーセットを用いた。

#### 【0263】

得られたPCR産物を、PCR products pre-sequencing kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)を用いて精製した。続いて、Big Dye Terminator FS ready-reaction kit (Applied Biosystems)を用いて、シーケンス反応を行い、蛍光シーケンサー (ABI PRISM3100 sequencer ; Applied Biosystems)により塩基配列を決定した。

10

#### 【0264】

その結果、電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1のサブユニット1型をコードするSCN1A遺伝子において、アミノ酸変異をもたらす遺伝子変異が検出された。そのSCN1A遺伝子変異の配列を図5(d)に示す。この変異は、配列番号2に示される塩基配列の第4723位のヌクレオチドであるシトシン(C)がチミン(T)に置換された変異(C4723T)であった。

#### 【0265】

この変異により、電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1のサブユニット1型は、第1575位のアミノ酸残基であるアルギニン(R)がシステイン(C)に置換(R1575C)されることになる。

20

#### 【0266】

以上の結果、電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1のサブユニット1型をコードするSCN1A遺伝子における変異が、ラスマッセン脳炎の発症に関連することが分かった。

#### 【0267】

〔実施例4：変異型ナトリウムイオンチャンネルの機能解析〕

実施例3で見出された変異型SCN1A遺伝子(C4723T)を発現させることによって、変異型ナトリウムイオンチャンネル(R1575C)を作製した。コントロールとして、野生型(正常型)SCN1A遺伝子を発現させることによって、野生型(正常型)ナトリウムイオンチャンネルを作製した。

30

#### 【0268】

そして、該変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルについて、機能解析を行った。SCN1A遺伝子産物である電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1のサブユニット1型は、<sub>1</sub>サブユニットおよび<sub>2</sub>サブユニットによる機能調節を受けているため、変異型プラスミドと、<sub>1</sub>サブユニットをコードするSCN1B遺伝子および<sub>2</sub>サブユニットをコードするSCN2B遺伝子を含む発現ベクターとを、トランスフェクション試薬を用いてヒト腎細胞HEK293に共発現させた。全細胞記録によるパッチクランプ法で電気生理学的特性を検討した。

40

#### 【0269】

ナトリウムチャンネル電流の記録は、22 ~ 24 の室温で、トランスフェクション24時間 ~ 48時間に行った。パッチ電極はborosilicate glassを用い、multistage P-97 Flaming-Brown micropipette pullerで作成した。

#### 【0270】

細胞内液の組成は、110 mM CsF、10 mM NaF、20 mM CsCl、2 mM EGTA、10 mM HEPESとした。一方、細胞外液の組成は、145 mM NaCl、4 mM KCl、1.8 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM HEPESとした。アンプはAxopatch200B (Axon Instruments)を用いた。電気生理学的特性は、電位依存性チャンネル活性化を調べ、正常型と比較検討した。データ解析にはClampfit 8.2

50

ソフトウェアを使用した。

【0271】

その結果、図6(a)および(b)に示すように、野生型ナトリウムイオンチャンネルおよび変異型ナトリウムイオンチャンネルともに、チャンネルとしての機能を有しており、両者に有意差はなかった。なお、図6(a)は、野生型ナトリウムチャンネルおよび変異型ナトリウムチャンネル(R1575C)の電位の変化に伴うナトリウム電流の代表例を示す。図6(b)は、不活性化の時定数を検討した結果を示す。

【0272】

一方、-10mVの脱分極刺激を与えたとき、図6(c)に示すように、変異型ナトリウムチャンネル(R1575C)では、野生型よりも持続性ナトリウム電流が増大していた。なお、図6(c)は、-10mVの脱分極刺激を与えたときの代表的なナトリウム電流曲線を示す。

10

【0273】

さらに、持続性ナトリウム電流の大きさを野生型ナトリウムチャンネルおよび変異型ナトリウムチャンネル(R1575C)について、それぞれ7つの細胞で測定したところ、図6(d)に示すように、変異型ナトリウムチャンネル(R1575C)では、有意に持続性ナトリウム電流が大きかった。なお、図6(d)は、持続性ナトリウム電流の大きさを野生型ナトリウムチャンネルおよび変異型ナトリウムチャンネル(R1575C)について、それぞれ7つの細胞で測定し、統計学処理をした結果を示す図である。

【0274】

20

次に、チャンネルの電気生理学的特性を詳細に検討するため、電流-電圧関連(図7(a))、チャンネルの活性化(図7(b))、チャンネルの不活性化(図7(c))、およびチャンネルの不活性化からの回復(図7(d))を測定した。

【0275】

その結果、図7(a)、(b)、および(d)に示すように、電流-電圧関連、チャンネルの活性化、およびチャンネルの不活性化からの回復には、両者で有意差は認められなかった。

【0276】

これに対して、チャンネルの不活性化については、図7(c)に示すように、変異型ナトリウムイオンチャンネル(R1575C)では脱分極側に有意にシフトしていた。

30

【0277】

以上の機能解析の結果、変異型ナトリウムイオンチャンネル(R1575C)は持続性ナトリウム電流が増大し、チャンネルの不活性化が遅いという特性を持つことが明らかになった。これらのデータは、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ の機能が亢進していることを示している。つまり、上記変異を有すると、神経細胞が過剰に興奮しやすい、すなわち、けいれんを起こしやすいことを意味している。

【0278】

〔実施例5：急性脳炎または急性脳症に罹患した非てんかん患者における電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ の変異〕

実施例1では小児てんかん患者を対象として、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ のサブユニット1型をコードするSCN1A遺伝子の解析を行った。本実施例では、てんかんやけいれんの既往がない人でも、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ の変異を調べることによって脳炎または脳症の罹患リスクを判定することができるか否かについて検討した。

40

【0279】

急性脳炎または急性脳症に罹患した患者で、発症前にけいれんの既往がない13人について、電位依存性ナトリウムイオンチャンネル $Na_v1.1$ のサブユニット1型をコードするSCN1A遺伝子の解析を行った。具体的には、まず、遺伝子解析の同意を得た後に末梢血を採取した。DNA抽出キット(WB kit; Nippon gene, Tokyo, Japan)を用いて患者の末梢血からゲノムDNAを抽出し、SCN1A遺伝子の全エキソン(エキソン1~2

50

6) を PCR で増幅した。

【0280】

PCR は 50 ng ヒトゲノム DNA、20 pmol 各プライマー、0.8 mM dNTPs、1× reaction buffer、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.7 ユニットの AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を含む 25 μl の反応液中で行った。なお、各エキソンを増幅させるためのプライマーセットは、実施例 1 で用いたものと同じである。

【0281】

得られた PCR 産物を、PCR products pre-sequencing kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) を用いて精製した。続いて、Big Dye Terminator FS ready-reaction kit (Applied Biosystems) を用いて、シーケンス反応を行い、蛍光シーケンサー (ABI PRISM3100 sequencer ; Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。

【0282】

その結果、表 3 に示すように、一般の急性脳炎または急性脳症に罹患した患者 13 人中 1 名 (7.69%) に、電位依存性ナトリウムイオンチャネル Na<sub>v</sub>1.1 のサブユニット 1 型をコードする SCN1A 遺伝子にアミノ酸変化をもたらすミスセンス変異を見いだした。

【0283】

【表 3】

患者番号	発症前の痙攣の既往	脳炎・脳症発症年齢	原因	SCN1A 遺伝子の異常 (アミノ酸置換)	転帰、後遺症
1	なし	5 歳 4 ヶ月	感冒	なし	左外転神経麻痺
2	なし	2 歳 11 ヶ月	インフルエンザ	なし	回復
3	なし	1 歳 0 ヶ月	不明	なし	重度知能障害、てんかん
4	なし	6 歳 6 ヶ月	不明	なし	重度知能障害、てんかん
5	なし	詳細不明	不明	なし	詳細不明
6	なし	5 ヶ月	感冒	なし	回復
7	なし	2 歳 3 ヶ月	咽頭炎	なし	重度知能障害、てんかん
8	なし	6 歳 1 ヶ月	感冒	R1575C	中等度知能障害、てんかん
9	なし	詳細不明	不明	なし	詳細不明
10	なし	1 歳 11 ヶ月	テオフィリンの疑い	なし	てんかん
11	なし	1 歳 5 ヶ月	感冒	なし	回復
12	なし	6 歳 6 ヶ月	感冒	なし	重度知能障害、てんかん
13	なし	10 ヶ月	HHV6	なし	詳細不明

【0284】

図 8 の (a) は正常な患者の SCN1A 遺伝子解析結果を示す図であり、図 8 の (b) は、表 3 に示す番号 8 の患者における SCN1A 遺伝子解析結果を示す図である。図 8 の (b) における SCN1A 遺伝子変異は、配列番号 2 に示される塩基配列の第 4723 位のヌクレオチドであるシトシン (C) がチミン (T) に置換された変異 (C4723T) であった。

【0285】

この変異により、電位依存性ナトリウムイオンチャネル Na<sub>v</sub>1.1 のサブユニット 1 型は、第 1575 位のアミノ酸残基であるアルギニン (R) がシステイン (C) に置換 (R1575C) された。この患者は CGC (R をコード) と TGC (C をコード) との

ヘテロ接合型であった。

【0286】

以上より、てんかんやけいれんの既往がない一般の人でも、SCN1A遺伝子に変異を有する場合、急性脳炎または急性脳症に罹患する危険性が高いことが分かった。よって、本発明にかかる脳炎または脳症の罹患リスク判定データの取得方法は、てんかん患者に限らず、広く一般に、当該遺伝子の変異の検査は脳炎または脳症に罹患するリスクを判定する方法となることが明らかになった。

【0287】

〔実施例6：熱性けいれん既往者における電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1の変異〕

10

熱性けいれん既往者について、電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1のサブユニット1型をコードするSCN1A遺伝子の解析を行った。具体的には、まず、遺伝子解析の同意を得た後に抹消血を採取した。DNA抽出キット(WB kit; Nippon gene, Tokyo, Japan)を用いて患者の末梢血からゲノムDNAを抽出し、SCN1A遺伝子の全エキソン(エキソン1~26)をPCRで増幅した。

【0288】

PCRは50ng ヒトゲノムDNA、20pmol 各プライマー、0.8mM dNTPs、1x reaction buffer、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.7ユニットのAmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を含む25μlの反応液中で行った。各エキソンを増幅させるためのプライマーセットは、実施例1で用いたものと同じものを用いた。

20

【0289】

得られたPCR産物を、PCR products pre-sequencing kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)を用いて精製した。続いて、Big Dye Terminator FS ready-reaction kit (Applied Biosystems)を用いて、シークエンス反応を行い、蛍光シークエンス(ABI PRISM3100 sequencer; Applied Biosystems)により塩基配列を決定した。

【0290】

熱性けいれん既往者110人について、電位依存性ナトリウムイオンチャンネルNa<sub>v</sub>1.1のサブユニット1型をコードするSCN1Aの遺伝子変異解析を行ったところ、表4~6に示すように、そのうち46人にアミノ酸変異をもたらす遺伝子変異を検出した。一方、患者の発作の追跡調査を進めたところ、110人のうち追跡調査を行えたのは98人であった。生後96ヵ月を区切りとして、予後とSCN1A遺伝子変異の相関をKaplan Meier法にて統計解析を行った。

30

【0291】

表4~6は、追跡できた患者の最終時の年齢(追跡最終年齢)と、発作が起きた最終年齢(発作最終年齢)をまとめたものである。発作持続は6歳、すなわち96ヵ月を区切りとして、それ以上続く患者は発作最終年齢=continue、発作持続期間=96ヵ月、として記載している。96ヵ月以上発作が続くことはてんかんへ移行していることを意味している。また、表4~6には、遺伝子変異の種類として、アミノ酸に変化を生じるミスセンス変異か、アミノ酸が途中で合成停止するナンセンス変異か、該当するものに+を記した。表4の番号1の患者はSCN1Aの変異を持たず、発作は47ヵ月で止まったことを示している。

40

【0292】

【表4】

患者 番号	追跡最終 年齢		発作最終年齢 歳(y),ヶ月(m)	発作持続期間 months	SCN1A 遺伝子変異	SCN1A 変異	
	歳	ヶ月				Missense	Nonsense
1	5	7	3y11m	47	-	-	-
2	8	7	4y1m	49	-	-	-
3	8	4	3y10m	46	-	-	-
4	12	11	8y4m	96	-	-	-
5	10	5	3y0m	36	-	-	-
6	11	2	9y8m	96	-	-	-
7	6	9	3y1m	37	-	-	-
8	12	4	5y7m	67	-	-	-
9	17	9	6y2m	74	-	-	-
10	13	3	3y5m	41	-	-	-
11	18	3	13y2m	96	-	-	-
12	14	5	9y11m	96	-	-	-
13	7	8	3y2m	38	-	-	-
14	4	11	3y5m	41	-	-	-
15	6	8	2y1m	25	-	-	-
16	6	8	2y0m	24	-	-	-
17	7	4	4y11m	59	-	-	-
18	8	0	3y2m	38	-	-	-
19	8	8	4y	48	-	-	-
20	5	9	4y6m	54	-	-	-
21	28	7	17y6m	96	-	-	-
22	26	3	continue	96	-	-	-
23	7	7	3y8m	44	-	-	-
24	33	10	20y	96	-	-	-
25	15	9	8y6m	96	-	-	-
26	9	0	5y9m	69	-	-	-
27	8	9	6y8m	80	-	-	-
28	17	10	8y8m	96	-	-	-
29	13	11	9y	96	-	-	-
30	21	0	15y10m	96	-	-	-
31	6	0	1y1m	13	-	-	-
32	8	10	7y1m	85	-	-	-
33	16	10	7y8m	92	-	-	-
34	7	10	6y4m	76	-	-	-
35	9	10	7y9m	93	-	-	-
36	11	2	continue	96	-	-	-
37	19	5	continue	96	-	-	-
38	7	4	continue	96	-	-	-
39	4	0	3y0m	36	-	-	-
40	6	10	continue	96	-	-	-
41	4	6	continue	96	-	-	-
42	20	2	8y3m	99	-	-	-
43	13	5	1y5m	17	-	-	-

10

20

30

40

50



【表5】

患者 番号	追跡最終 年齢		発作最終年齢 歳(y),ヶ月(m)	発作持続期間 months	SCN1A 遺伝子 変異	SCN1A 変異	
	歳	ヶ月				Missense	Nonsense
44	9	2	7y9m	93	R1575C	+	-
45	15	4	6y10m	82	I1616T	+	-
46	8	3	7y0m	84	I1616T	+	-
47	6	10	5y0m	60	I1616T	+	-
48	15	8	continue	96	Y1769H	+	-
49	27	8	26y	96	M1856T	+	-
50	23	2	9y	96	-	-	-
51	13	1	continue	96	G163E	+	-
52	20	2	continue	96	T1539P	+	-
53	13	5	10y	96	Intron21 ag(-2)gg	-	+
54	19	1	continue	96	A1002fsX1009	-	+
55	19	6	continue	96	V1390M	+	-
56	7	10	continue	96	A1429fsX1443	-	+
57	21	0	continue	96	F902C	+	-
58	18	2	continue	96	S1574X	-	+
59	7	3	continue	96	Q1277X	-	+
60	14	2	continue	96	F1289del	+	-
61	5	8	continue	96	G177R	+	-
62	21	0	continue	96	L1265P	+	-
63	19	8	continue	96	L990F	+	-
64	10	8	continue	96	Q1450R	+	-
65	20	3	continue	96	T1082fsX1087	-	+
66	23	8	continue	96	T1909I	+	-
67	18	11	continue	96	R931C	+	-
68	16	8	continue	96	R931C	+	-
69	10	5	continue	96	W738fsX746	-	+
70	16	5	continue	96	G1880fsX1881	-	+
71	28	2	continue	96	R712X	-	+
72	26	5	continue	96	S1574X	-	+
73	10	6	continue	96	G1674R	+	-
74	29	9	continue	96	A1685D	+	-
75	18	7	continue	96	K1027X	-	+
76	18	11	continue	96	K547fsX570	-	+
77	30	5	continue	96	P707fsX714	-	+
78	21	4	continue	96	R1648C	+	-
79	28	1	continue	96	R377L	+	-
80	12	8	continue	96	R501fsX543	-	+
81	22	8	continue	96	R568X	-	+
82	4	4	dead	96	R568X	-	+
83	41	9	continue	96	R865X	-	+
84	18	3	continue	96	S607fsX622	-	+
85	3	4	continue	96	V212A	+	-
86	8	5	continue	96	W1271X	-	+

10

20

30

40

【表 6】

患者 番号	追跡最終 年齢		発作最終年齢	発作持続期間	SCN1A 遺伝子 変異	SCN1A 変異	
	歳	ヶ月	歳(y),ヶ月(m)	months		Missense	Nonsense
87	20	7	continue	96	W1434R	+	-
88	8	6	continue	96	-	-	-
89	29	3	continue	96	-	-	-
90	25	8	continue	96	-	-	-
91	8	3	continue	96	-	-	-
92	4	6	continue	96	-	-	-
93	7	6	continue	96	-	-	-
94	23	10	continue	96	-	-	-
95	27	6	continue	96	-	-	-
96	12	7	11y	96	E788K	+	-
97	11	8	continue	96	R1575C	+	-
98	8	11	continue	96	R1596C	+	-

10

## 【0295】

図9は、ミスセンス変異またはナンセンス変異のどちらか一方でも持つこと（つまり、遺伝子に変異があること）と発作持続期間との関係をKaplan Meier法（SPSS ver 12J）で解析した結果を示す図である。図9において、横軸は発作持続期間（月）を表し、縦軸は表4～6に示す98人の患者のうち、けいれん発作が持続している患者の割合を示している。また、実線はSCN1A遺伝子に変異がある患者における、発作持続期間（月）とけいれん発作が持続している患者の割合との関係を示し、点線はSCN1A遺伝子に変異がない患者における、上記関係を示している。

20

## 【0296】

Log Rank Testで、SCN1A遺伝子の変異と、けいれん発作の持続との相関の有意差検定を行ったところ、SCN1A遺伝子に変異がある患者は96カ月まで発作が持続すること（すなわち、てんかんへの移行）と非常に強い相関を示した(p=0.0001)。このように、本発明にかかる方法により、熱性けいれん患者のてんかんへの移行を高精度に予測できることが明らかとなった。

30

## 【0297】

なお本発明は、以上説示した各構成に限定されるものではなく、特許請求の範囲に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態や実施例にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態や実施例についても本発明の技術的範囲に含まれる。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0298】

以上のように、本発明では、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群のうち少なくとも1つの遺伝子におけるアミノ酸変化を伴う変異の有無を検出することにより、脳炎または脳症に罹患していない被験者についても、該被験者が脳炎または脳症の罹患リスクを判定するためのデータを取得することができる。

40

## 【0299】

また、本発明では、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群のうち少なくとも1つの遺伝子におけるアミノ酸変化を伴う変異の有無を検出することにより、熱性けいれん既往者について、てんかん患者へ移行するリスクを判定するためのデータを取得することができる。

## 【0300】

そのため、本発明は、脳炎または脳症の罹患リスク、または熱性けいれんのてんかんへ

50

の移行リスクを判定するために用いる判定キットに代表される診断医療の分野だけでなく、保健医学分野に広く利用することができる。

【0301】

また、本発明では、ナトリウムイオンチャンネルサブユニット遺伝子群のうち少なくとも1つの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を導入することにより、脳炎または脳症の発症モデル動物を製造することができる。このような脳炎または脳症の発症モデル動物は、脳炎または脳症の治療薬剤や治療方法の開発に用いることができる。それゆえ、本発明は、製薬分野をはじめ、生命科学分野の産業に広く利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0302】

【図1】図1は急性脳炎または急性脳症を発症した患者におけるSCN1A遺伝子解析結果を示す図である。

【図2】図2(a)~(d)は、インフルエンザ脳症を発症した患者における脳症発症後の脳波の経過を示す図であり、(a)~(d)はそれぞれ、インフルエンザ脳症によるけいれん重積時の脳波、インフルエンザ発症38時間後でけいれんが収まっている状態の脳波、インフルエンザ発症62時間後の脳波、およびインフルエンザ発症7日目の脳波を示す図である。

【図3】図3(a)~(c)は、それぞれ、インフルエンザ脳症を発症した患者において、右側を刺激したときの聴性脳幹反応の結果、左側を刺激したときの聴性脳幹反応の結果、および左右両側を刺激したときの聴性脳幹反応の結果を示す。

【図4】図4は、変異型SCN1A遺伝子および野生型SCN1A遺伝子の機能解析の結果を示す図であり、(a)は変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルの電位変化に伴うナトリウム電流を測定した結果を示す図であり、(b)は変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルの細胞内局在を解析した結果を示す図である。

【図5】図5(a)は、ラスムッセン脳炎患者における脳波を示す図であり、図5(b)は、ラスムッセン脳炎患者の頭部MRI画像を示す図であり、図5(c)は、ラスムッセン脳炎患者の脳血流シンチグラフィを示す図であり、図5(d)は、ラスムッセン脳炎患者におけるSCN1A遺伝子における変異配列を示す図である。

【図6】図6は、変異型SCN1A遺伝子および野生型SCN1A遺伝子の機能解析の結果を示す図であり、(a)は野生型ナトリウムイオンチャンネルおよび変異型ナトリウムイオンチャンネル(R1575C)の電位の変化に伴うナトリウム電流曲線を、(b)は変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルの不活性化の時定数 $\tau$ を、(c)は変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルに-10mVの脱分極刺激を与えたときのナトリウム電流曲線を、(d)は変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルの持続性ナトリウム電流量をそれぞれ示す図である。

【図7】図7(a)は変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルの電流-電圧曲線を、図7(b)は変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルの活性化曲線を、図7(c)は変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルの不活性化曲線を、図7(d)は変異型ナトリウムイオンチャンネルおよび野生型ナトリウムイオンチャンネルの不活性化からの回復曲線をそれぞれ示す図である。

【図8】図8の(a)は正常な患者のSCN1A遺伝子解析結果を示す図であり、図8の(b)は、表3に示す番号8の患者におけるSCN1A遺伝子解析結果を示す図である。

【図9】ミスセンス変異またはナンセンス変異のどちらか一方でも持つことと発作持続期間との関係をKaplan Meier法(SPSS ver 12 J)で解析した結果を示す図である。

。

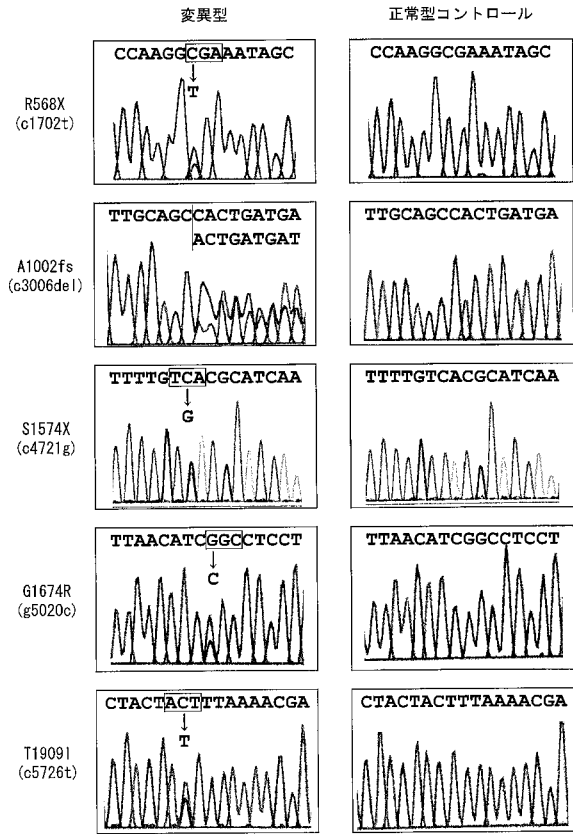
10

20

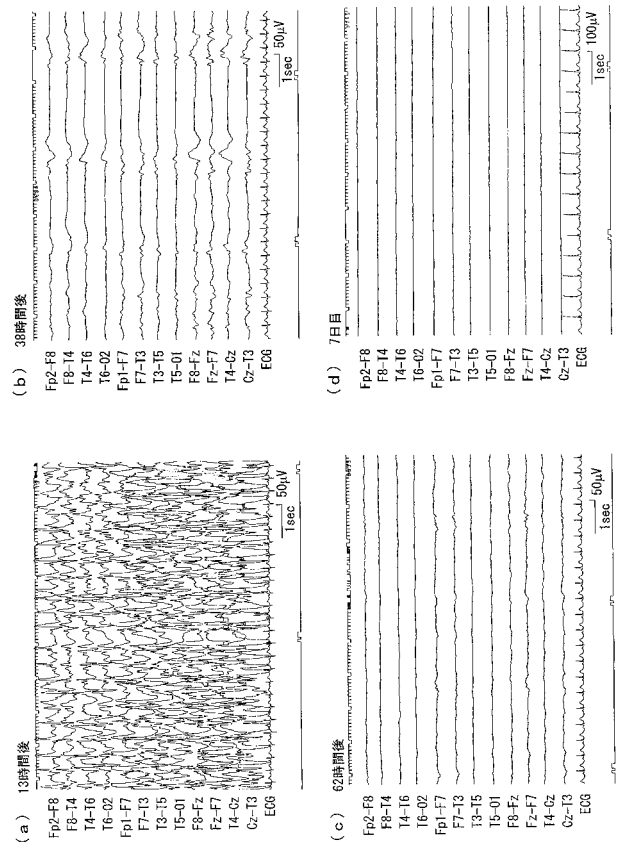
30

40

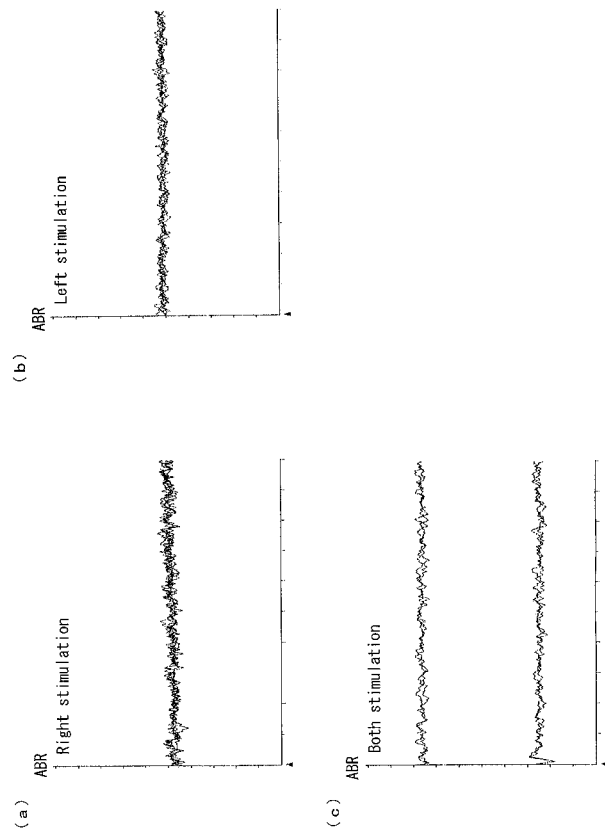
【 図 1 】



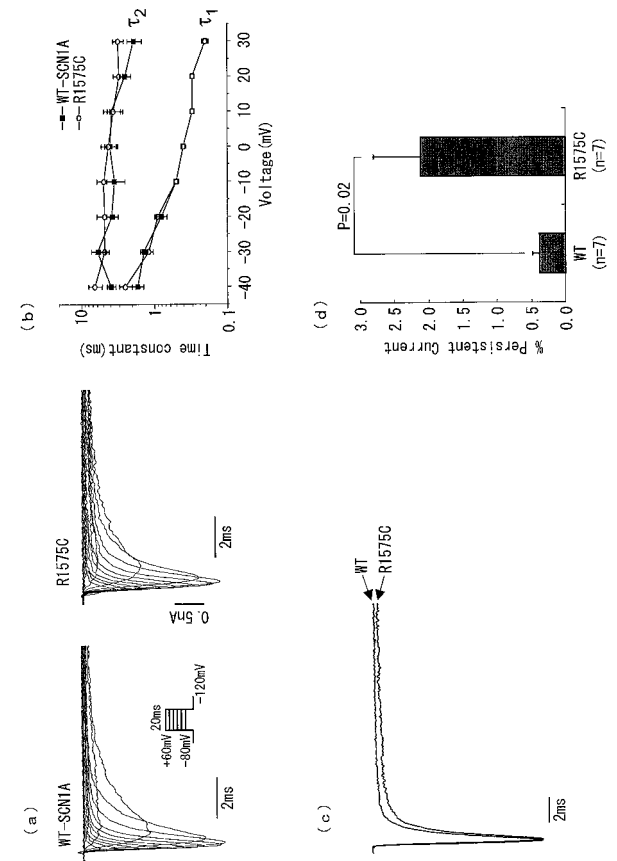
【 図 2 】



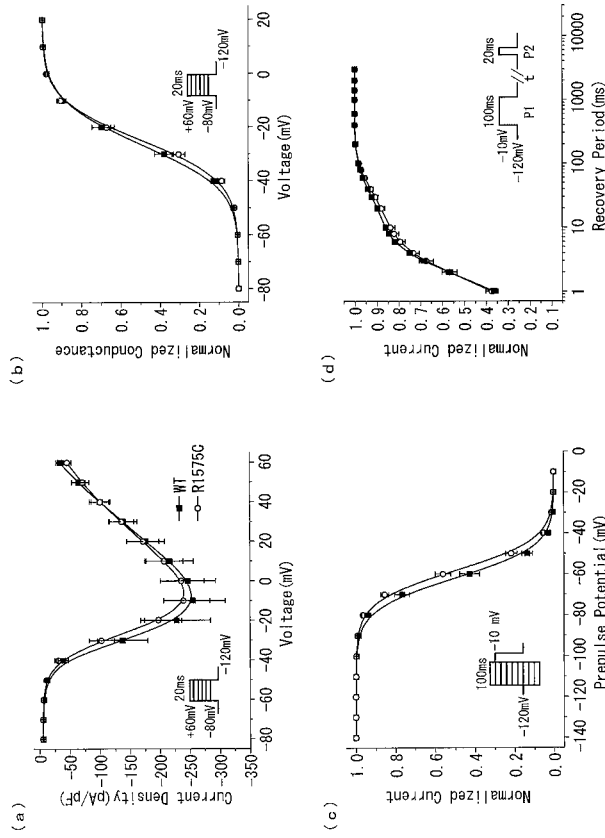
【 図 3 】



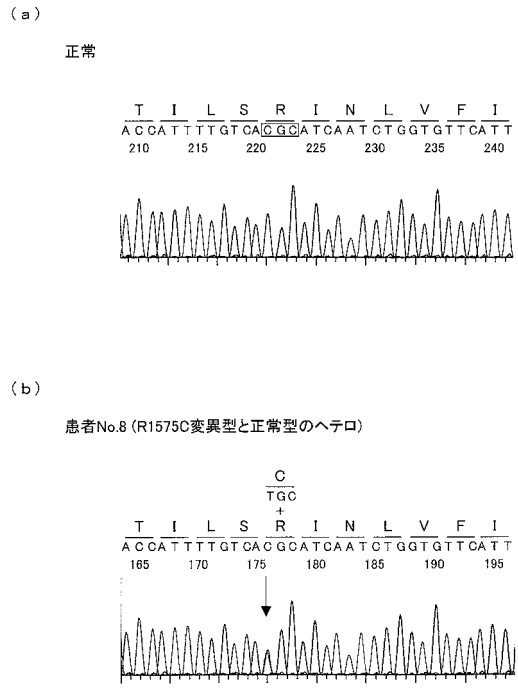
【 図 6 】



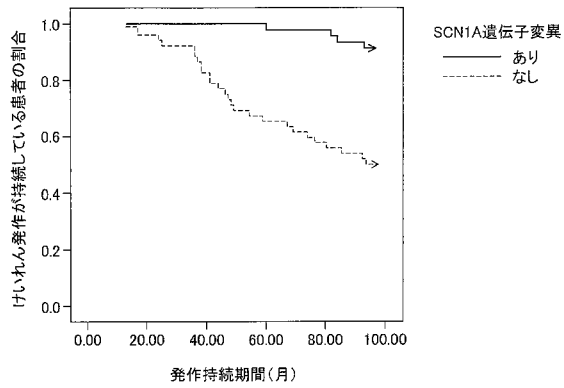
【 図 7 】



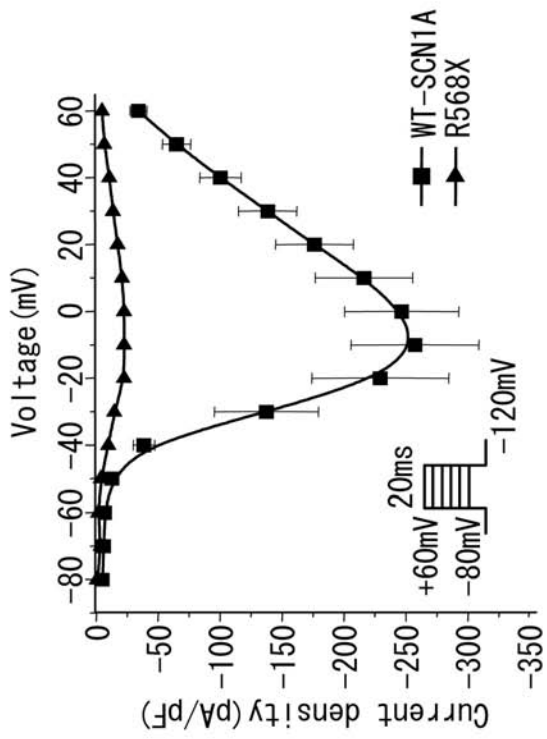
【 図 8 】



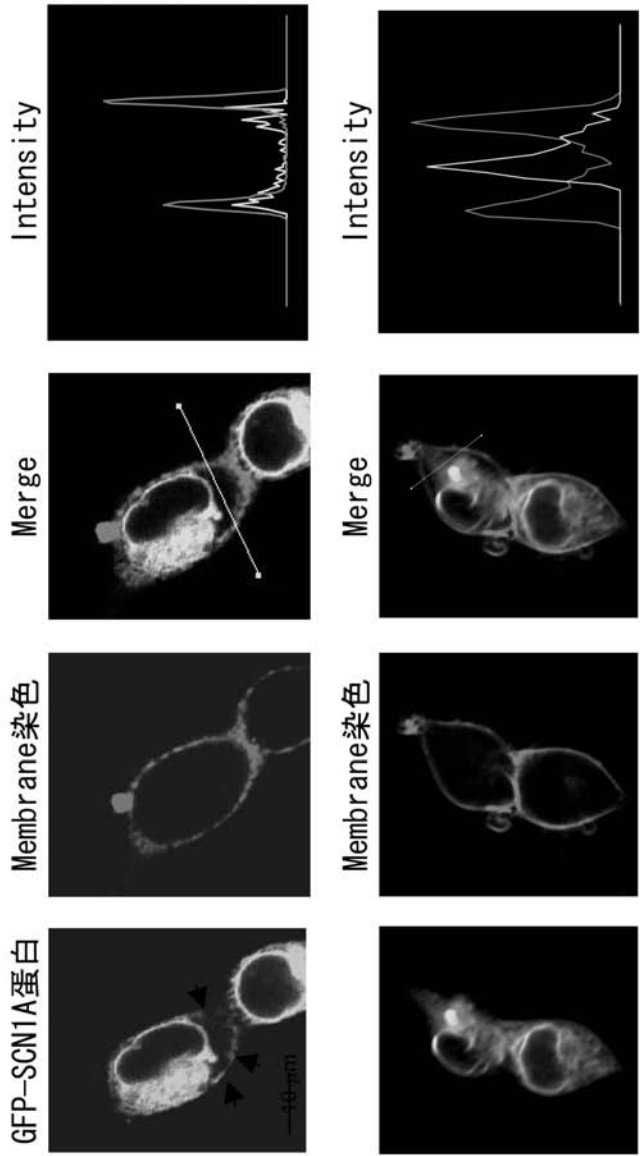
【 図 9 】



【 図 4 】



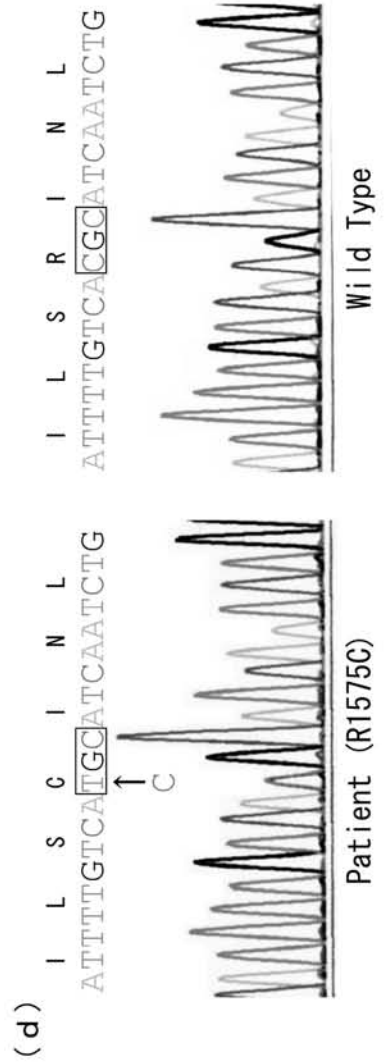
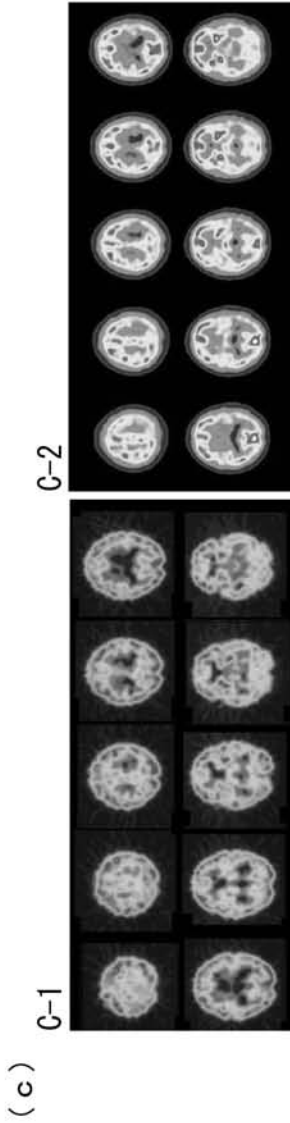
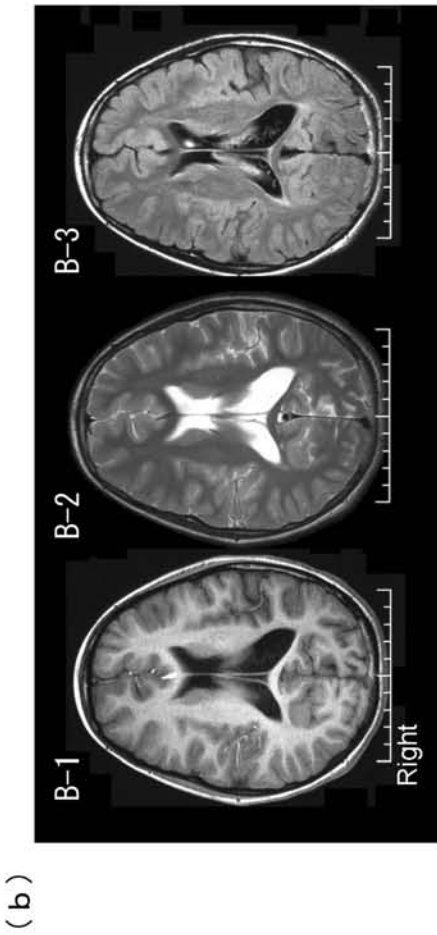
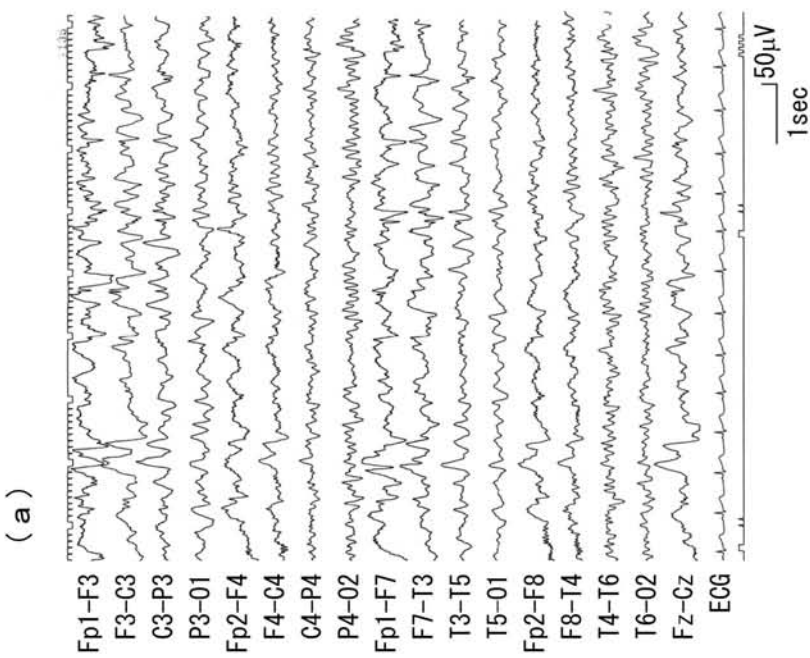
( a )



正常型

変異型 R568X

( b )



2009131247000001.app



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 33/15 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA04 CA09 CA11 CA12 CA20 HA11 HA12  
4B063 QA01 QA07 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QQ53 QR32  
QR35 QR55 QR59 QR62 QR80 QS25 QS32 QS38 QX01  
4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 CA24 CA46