

Fig. 1. Electron micrographs of CD-VLPs prepared from Vero cells infected with Osaka-1 Fr/V (a) or Osaka-2 Fr/V (b) strain. Bars represent 100 nm.

Table 1. Number of syncytium foci developed in CHO/CD46, CHO/SLAM, and Vero cells.

Virus	Strain	CHO/CD46	CHO/SLAM	Vero
Measles	Nagahata <sup>a</sup>	13	135	109
SSPE	Osaka-1 Fr/V <sup>b</sup>	0, 0	20, 25	460, 477
	Osaka-2 Fr/V <sup>b</sup>	0, 0	99, 141	58, 81
	Osaka-3 Oc/V <sup>b</sup>	0, 0	5, 4	141, 117

<sup>a</sup>Syncytium foci was counted 48 hr post-infection.

<sup>b</sup>Syncytium foci was counted 72 hr post-infection.

particles with diameters ranging from 100 to 1,000 nm. Some of the CD-VLPs from SSPE virus-infected cell cultures contained fine spikes similar to those of the authentic MV virion (Fig. 1). The titer of the CD-VLPs prepared from the Osaka-2 Fr/V strain dropped from  $3.0 \times 10^4$  PFU/ml to  $4.4 \times 10^3$  PFU/ml (approx. 85% reduction) after filtration with a 0.45- $\mu$ m filter membrane. The titer of the Nagahata strain of MV decreased similarly after filtration. This data, together with electron microscopic observation, suggested that CD-VLPs were similar in size and surface structure to the MV virion.

We first examined the cytopathogenicity in Vero cells inoculated with SSPE CD-VLPs and in cells expressing known MV receptors, CD46 and SLAM. The Nagahata strain of MV, a laboratory Vero cell-adapted strain, was

used for comparison and induced similar syncytia in size in Vero, CHO/CD46, CHO/SLAM cells (Table 1). The three SSPE CD-VLPs failed to induce CPEs in CHO/CD46 cells but were able to induce CPEs in both CHO/SLAM and Vero cells (Table 1). The number of syncytia produced in CHO/SLAM cells relative to the number in Vero cells varied among the infecting strains. The Nagahata strain induced a few more syncytia in CHO/SLAM cells than in Vero cells and very few foci in CHO/CD46 cells. The Osaka-2 CD-VLPs induced 2 to 3 times more syncytia in CHO/SLAM cells than in Vero cells. In contrast, the Osaka-1 CD-VLPs and the Osaka-3 CD-VLPs induced 20 to 25 times more syncytia in Vero cells than in CHO/SLAM cells. CHO/SLAM cells with syncytial CPE were positively stained with anti-MV N monoclonal antibody, whereas CHO/CD46 cells had no syncytial CPE and were negatively stained (data not shown). Infection of the SSPE CD-VLPs to CHO/SLAM cells was blocked by a monoclonal antibody against CD150. On the other hand, infection of the SSPE CD-VLPs to Vero cells was not blocked by a monoclonal antibody against CD46 (data not shown). These observations were consistent with the results of our previous studies using the VSV pseudotype system (53).

Table 2. Susceptibility of various cell lines to SSPE virus and measles virus

Cell lines	Expression <sup>a</sup> of		Osaka-1 Fr/V		Osaka-2 Fr/V		Osaka-3 Oc/V		Nagahata		OCU98-1P	
	CD46	CD150	Syncytium <sup>b</sup>	FA <sup>c</sup>	Syncytium	FA	Syncytium	FA	Syncytium	FA	Syncytium	FA
Vero	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+ <sup>d</sup>
B95a	+ <sup>e</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CHO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HeLa	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
293T	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
IMR-32	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
SK-N-SH	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
A172	+	-	+	+	-	+	-	+ <sup>d</sup>	+	+	-	-
U-251	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-

<sup>a</sup>Expression of CD46 and CD150 (+, positive; -, negative) was examined by flow cytometry.

<sup>b</sup>Syncytium formation (+, positive; -, negative) was observed under the inverted microscope.

<sup>c</sup>MV N protein expression (+, positive; -, negative) was detected by the immunofluorescent staining.

<sup>d</sup>B95a cell has a CD46 homologue that cannot be used as a receptor by most MVs because of the lack of SCR-1 domain (26, 39).

<sup>e</sup>Small syncytia were observed by the immunofluorescent staining.

*Infection of Different Human Cell Lines with CD-VLPs Prepared from the Three SSPE Virus Strains*

The system used here was applied to various human cell lines in order to determine other factors that may affect cell tropism. First, we rechecked the surface expression of CD46 and CD150 on these cell lines by flow cytometry (Table 2). Only B95a cells expressed CD150. In contrast, all cell lines except CHO cells expressed CD46. The CD-VLPs prepared from each of the three strains of SSPE virus-infected Vero cells were inoculated onto monolayer cultures of neural cell lines such as IMR-32, SK-N-SH, A172, and U-251, as well as onto monolayer cultures of Vero, B95a, CHO, HeLa, and 293T. As summarized in Table 2, all the SSPE CD-VLPs induced syncytial foci in most of the cell lines examined. Vero and B95a cells developed numerous large syncytia due to infection with the SSPE CD-VLPs (Fig. 2, a and b). The number of syncytial foci in HeLa, 293T, IMR-32, and SK-N-SH was less than 5% of that formed in Vero cells. In addition, the size of each syncytium in HeLa and 293T cells was much smaller than that of syncytia formed in Vero and B95a cells (Fig. 2, c and d). Syncytia formed in IMR-32 and SK-N-SH were similar in size to those formed in Vero cells (Fig. 2, e and f). Although infection of U-251 cells with the SSPE CD-VLPs was not obvious when judged by syncytium formation, clusters of infected single cells without cell fusion were demonstrated early in infection by immunofluorescent staining (Fig. 2, g). A172 cells showed different susceptibility to each of the SSPE CD-VLPs (Fig. 3). The CD-VLPs from the Osaka-1 Fr/V strain induced syncytial foci similar in size to those formed in Vero cells. The CD-VLPs from the Osaka-2 Fr/V strain did not induce syncytia but infection at the single cell level

was demonstrated by immunofluorescent staining (Fig. 3, b and e). Though processes connected neighboring MV N protein-positive cells within clusters, cell margins could be clearly distinguished. The CD-VLPs from the Osaka-3 Oc/V induced microfusion that was observable by immunofluorescent staining (Fig. 3, c and f). As predicted by the receptor usage of the strain, the Vero cell-adapted Nagahata strain induced syncytia in all the cell lines except CHO (Table 2). In contrast, an MV field isolate, the OCU98-1P strain, infected the panel of cell lines to only a very limited extent. Vero cells (though infected with the OCU98-1P strain) lacked CPEs such as syncytium formation and cell rounding. Neither the human epithelial (HeLa and 293T) nor human neural (IMR-32, SK-N-SH, A172, and U-251) cell lines were infected with the OCU98-1P strain.

**Discussion**

Because most genes of SSPE viruses, especially the M and F genes, are highly mutated and cell-free virus production is impaired, SSPE virus must be rescued from infected brain cells by cocultivation with cells permissive for MV replication. Though epithelial cell lines (such as Vero cells) have been used for virus isolation, viruses have rarely been isolated. Identification of the biological properties of SSPE viruses (such as cell tropism) will be useful for understanding the molecular mechanisms of persistent infection of the CNS with MV. Cellular tropism of MV is broad, and factors determining it could lie at various stages of the MV life cycle. Little is known about the cell tropism of the SSPE virus. Cellular receptors are important determinants of viral tropism. We employed the VSV pseudotype system to identify the

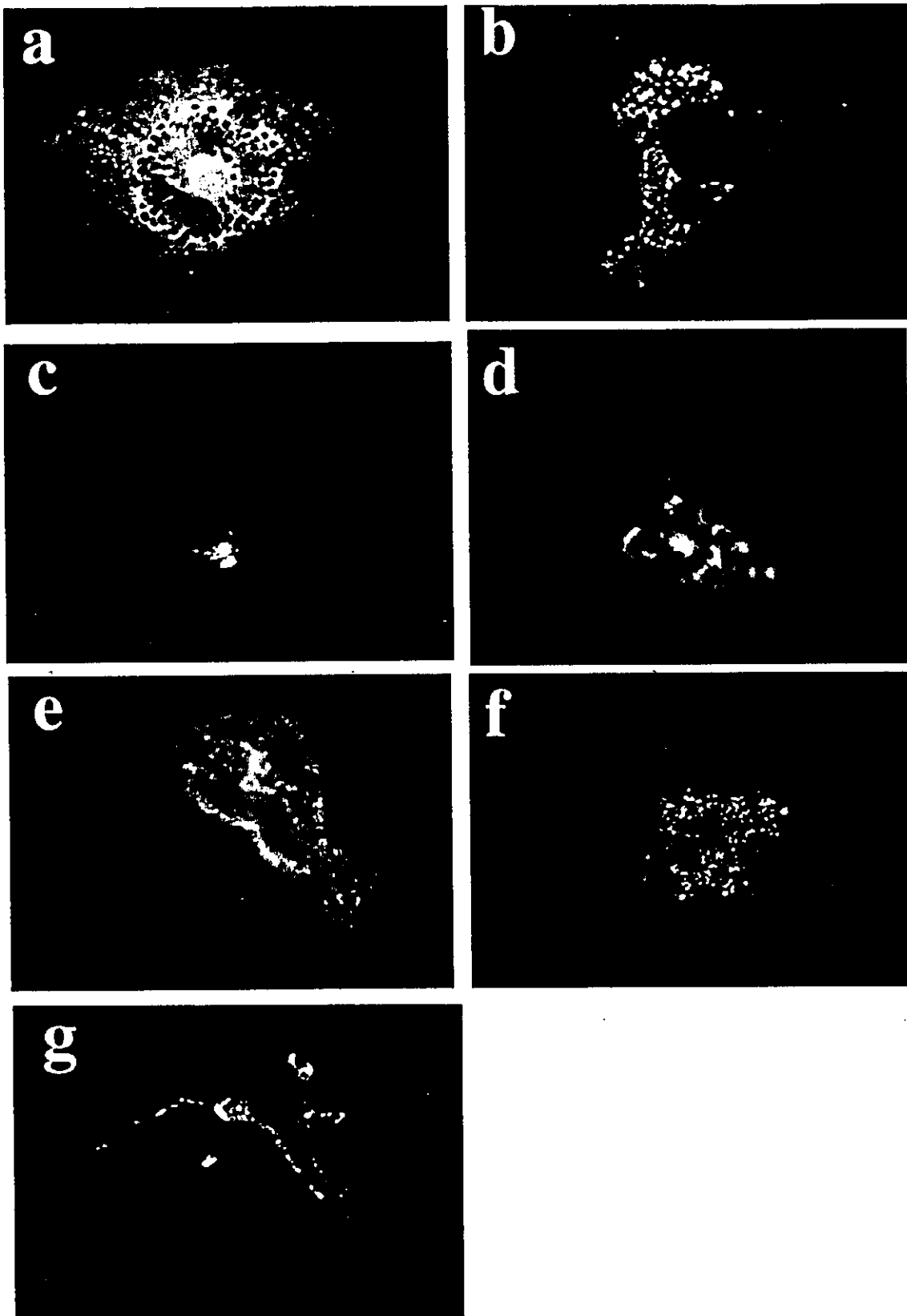


Fig. 2. Cells infected with CD-VLPs prepared from Osaka-2 Fr/V virus-infected Vero cells were evaluated by immunofluorescent staining with monoclonal anti-N antibody. Vero (a), B95a (b), HeLa (c), 293T (d), IMR-32 (e), SK-N-SH (f), and U-251 (g), cells were fixed and stained three or four days after infection. Magnifications are  $\times 65$  for (a) to (f),  $\times 130$  for (g).

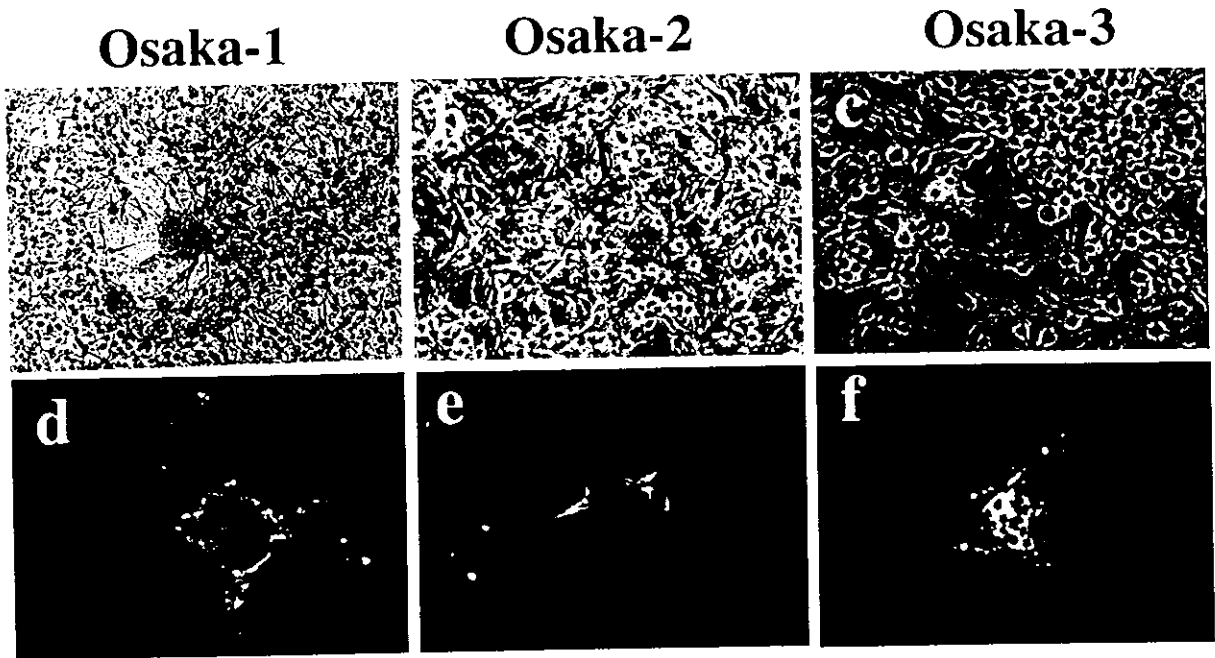


Fig. 3. A172 cells infected with CD-VLPs prepared from Vero cells infected with Osaka-1 Fr/V (a, d), Osaka-2 Fr/V (b, e), and Osaka-3 Oc/V (c, f) strains. N protein expression was examined by indirect immunofluorescent staining (d-f).

receptors used by SSPE viruses for cell entry and our results suggested entry via some previously unidentified molecule(s) on Vero, B95a, human B-lymphocytes, and some human cell lines of neural origin (53). To obtain more information about the cell tropism of SSPE virus, artificial virus-like particles obtained from cells infected with three strains of SSPE virus were tested for their ability to infect various human cell lines including cell lines of neural origin. We found that CD-VLPs from SSPE virus-infected cells were similar morphologically and could be used like ordinary MV particles to infect cells.

We first confirmed our previous observation that SSPE virus could use SLAM but not CD46 as a cell entry receptor (53). Antibody blocking experiments indicated the existence of previously unidentified receptors on Vero cells, as did our experiments that used VSV pseudotype virus displaying SSPE envelope glycoproteins (53). Receptor molecule(s) other than CD46 and CD150 for MV entry have recently been suggested by other investigators (1, 24, 56). It is unknown whether the molecule used for entry into Vero and Jarkat cells (24), human vascular endothelial cells (1), and human primary small airway epithelial cells (56) is unique to each cell line and can be used by different MV strains. If the unidentified molecule(s) for MV entry are closely related to each other, the molecule(s) must be ubiquitously distributed among various cell types and different host species. Notably, the three SSPE strains used in this study have

strong neurovirulence in 3-week-old hamsters, and this can be demonstrated by intracerebral inoculation of just a small amount of their CD-VLPs (29, unpublished observations). In contrast, the results of Niewiesk et al. (41) in transgenic rats show that CD46 expression cannot overcome the intracellular block of MV Edmonston strain replication, supporting the requirement of nonentry-supporting internal cellular factors for MV replication. One such factor might be IFN, and in fact,  $\alpha/\beta$  IFN receptor-knockout mice have been reported to be susceptible to Edmonston MV infection (38).

The ability to induce syncytia in glial cells such as A172 cells was different among SSPE virus strains. Syncytial formation was induced by the Osaka-1 CD-VLPs, and less efficiently by the Osaka-3 CD-VLPs, but not by the Osaka-2 CD-VLPs. It should be noted that the Osaka-1 and the Osaka-3 CD-VLPs induced more syncytia in Vero cells, indicating that the Osaka-1 and the Osaka-3 strains can use more efficiently an as yet unidentified receptor for syncytium formation. Binding affinity between the SSPE H glycoprotein and the receptor molecule may have some relation to the ability to induce syncytium in A172 cells. Alternatively, other viral proteins (F, M or P protein) may have been involved in this failure to induce syncytium by the Osaka-2 CD-VLPs. The infection of A172 as well as U-251 cells with the SSPE CD-VLPs at the single cell level and the failure to form syncytia is unusual for MV infection *in vitro*. We have observed a similar phenomenon (failure to form

large syncytia) in Vero cells infected with the Masusako strain, and Kouomou and Wild reported a similar finding (34). MV infection in human astrocytoma cells was described previously by Duprex et al. (18, 19). By means of an Edmonston-based recombinant virus construct that encoded green fluorescent protein, they showed that cell-to-cell spread took place through the cells' processes during early infection of GCCM cells (18) and that syncytia formed extensively in GCCM and U-251 cells (19). Although they did not consider the role of the cell receptor in the infection process, CD46 is likely to be involved in this process. Our CD46-using Nagahata strain could also infect and induce syncytia in A172 and U-251 cells. Therefore, it is possible that the failure of the SSPE CD-VLPs to induce syncytia in these cell lines is not due to a defect in the internal cellular factors of these lines, but rather, to the inability of the cellular receptor to interact with the envelope proteins of the SSPE virus. Alternatively, reduced replication efficiency might have resulted in the failure to produce viral proteins needed to induce cell fusion. Persistent infection of these A172 cells by the Osaka-2 Fr/V strain was demonstrated after 10 days by the appearance of syncytial foci in cocultures of the infected A172 and Vero/SLAM cells (unpublished data). The titer, however, decreased gradually with time, indicating the unsuitability of A172 cells for efficient growth of SSPE virus. We did not detect IFNs in the culture media of the infected A172 and U-251 cells, and anti-IFN antibodies did not affect infection (unpublished data). Therefore, other internal host factors might have been involved in the inefficient viral replication. The failure to activate NF- $\kappa$ B, type I IFN, and MHC class I in neuroblastoma cells (14, 15, 21) may account for the more efficient growth of SSPE virus in neuroblastoma than in glial cells. Further studies are needed to understand the viral and/or host cellular factors that are responsible for the strain differences in SSPE viral replication in neural cells. When the amino acid sequences of the two MV strains, IC-B and IC-V, isolated with B95a and Vero cells, respectively, were compared, H and F proteins were identical, but there were a few amino acid differences in the P, M, and accessory V and C proteins (54, 55). We have compared the amino acid sequence of viral proteins and the neurovirulence in hamsters of two Osaka-2 sibling viruses (5, 22, 29). The Vero-isolate Fr/V of the Osaka-2 strain used in this study and the B95a-isolate Fr/B of the same strain both encode an H protein of the same amino acid sequence. The F protein of the Fr/B sibling virus had only two additional changes in its amino acid sequence compared with that of the Fr/V sibling virus. Our preliminary results showed that the Osaka-2 Fr/B sibling virus did not infect IMR-32, A172, and U-251 cells. This suggests

that factors other than the entry receptor are active during Osaka-2 SSPE virus replication in neural cells. MV recombinants containing single or a combination of mutations identified from the sequence analysis of SSPE strains will provide clear evidence that virus infection of neural cells involves viral factors. Some mutations found in SSPE viruses may contribute to the neurovirulence and persistence of infection in the brain. This is supported by the fact that a recombinant MV containing the matrix gene of the Biken strain of SSPE virus replicated slowly in the brain of transgenic mice (45). Brains infected with recombinant MV containing F proteins having cytoplasmic tails (similar to the tails of F proteins of SSPE viruses) also manifested modified virus replication in the same transgenic mouse model (8). These alterations might promote virus spread and survival in the brain. Further studies to identify internal host factor(s) responsible for SSPE viral cell tropism and to identify novel molecule(s) associated with SSPE virus entry into cells are needed, thereby providing new insights into the molecular mechanism of SSPE pathogenesis.

We thank Dr. D. Tokuhara, Ms. K. Tatsuta and Ms. E. Uenaka for their technical assistance and Dr. V. ter Meulen of Universität Würzburg, Würzburg, Germany, for providing the MV monoclonal antibodies. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (No. 10670290, No. 11670779, No. 14570271, and No. 15591126) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, a Grant-in-Aid from the Osaka City University Medical Research Foundation Fund, and a grant from the Osaka Medical Research Foundation for Incurable Diseases.

## References

- 1) Andres, O., Obojes, K., Kim, K.S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. 2003. CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J. Gen. Virol.* **84**: 1189–1197.
- 2) Ayata, M. 1987. Induction of infectious cell-free particles from a non-productive subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus-infected cells by cytochalasin D treatment (in Japanese, Abstract in English). *Osaka Univ. Med. J.* **39**: 237–242.
- 3) Ayata, M., Hayashi, K., Seto, T., Murata, R., and Ogura, H. 1998. The matrix gene expression of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus (Osaka-1 strain): a comparison of two sibling viruses isolated from different lobes of an SSPE brain. *Microbiol. Immunol.* **42**: 773–780.
- 4) Ayata, M., Hirano, A., and Wong, T.C. 1989. Structural defect linked to nonrandom mutations in the matrix gene of Biken strain subacute sclerosing panencephalitis virus defined by cDNA cloning and expression of chimeric genes. *J. Virol.* **63**: 1162–1173.
- 5) Ayata, M., Kimoto, T., Hayashi, K., Seto, T., Murata, R., and Ogura, H. 1998. Nucleotide sequences of the matrix protein

- gene of subacute sclerosing panencephalitis viruses compared with local contemporary isolates from patients with acute measles. *Virus Res.* **54**: 107–115.
- 6) Baczko, K., Liebert, U.G., Billeter, M., Cattaneo, R., Budka, H., and ter Meulen, V. 1986. Expression of defective measles virus genes in brain tissues of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Virol.* **59**: 472–478.
  - 7) Burnstein, T., Jacobsen, L.B., Zeman, W., and Chen, T.T. 1974. Persistent infection of BSC-1 cells by defective measles virus derived from subacute sclerosing panencephalitis. *Infect. Immun.* **10**: 1378–1382.
  - 8) Cathomen, T., Naim, H.Y., and Cattaneo, R. 1998. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J. Virol.* **72**: 1224–1234.
  - 9) Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Baczko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. 1987. Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *EMBO J.* **6**: 681–688.
  - 10) Cattaneo, R., Schmid, A., Billeter, M.A., Sheppard, R.D., and Udem, S.A. 1988. Multiple viral mutations rather than host factors cause defective measles virus gene expression in a subacute sclerosing panencephalitis cell line. *J. Virol.* **62**: 1388–1397.
  - 11) Cattaneo, R., Schmid, A., Eschle, D., Baczko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. 1988. Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* **55**: 255–265.
  - 12) Cattaneo, R., Schmid, A., Rebmann, G., Baczko, K., ter Meulen, V., Bellini, W.J., Rozenblatt, S., and Billeter, M.A. 1986. Accumulated measles virus mutations in a case of subacute sclerosing panencephalitis: interrupted matrix protein reading frame and transcription alteration. *Virology* **154**: 97–107.
  - 13) Cattaneo, R., Schmid, A., Spielhofer, P., Kaelin, K., Baczko, K., ter Meulen, V., Pardowitz, J., Flanagan, S., Rima, B.K., Udem, S.A., and Billeter, M.A. 1989. Mutated and hypermutated genes of persistent measles viruses which caused lethal human brain diseases. *Virology* **173**: 415–425.
  - 14) Dhib-Jalbut, S.S., Xia, Q., Drew, P.D., and Swoveland, P.T. 1995. Differential up-regulation of HLA class I molecules on neuronal and glial cell lines by virus infection correlates with differential induction of IFN- $\beta$ . *J. Immunol.* **155**: 2096–2108.
  - 15) Dhib-Jalbut, S., Xia, J., Rangaviggula, H., Fang, Y.-Y., and Lee, T. 1999. Failure of measles virus to activate nuclear factor-kappa B in neuronal cells: implications on the immune response to viral infections in the central nervous system. *J. Immunol.* **162**: 4024–4029.
  - 16) Doi, Y., Sanpe, T., Nakajima, M., Okawa, S., Koto, T., Itoh, H., Sato, T., Oguchi, K., Kumanishi, T., and Tsubaki, T. 1972. Properties of a cytopathic agent isolated from a patient with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **25**: 321–333.
  - 17) Dörig, R.E., Marcilm, A., Chopram, A., and Richardson, C.D. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**: 295–305.
  - 18) Duprex, W.P., McQuaid, S., Hangartner, L., Billeter, M.A., and Rima, B.K. 1999. Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J. Virol.* **73**: 9568–9575.
  - 19) Duprex, W.P., McQuaid, S., and Rima, B.K. 2000. Measles virus-induced disruption of the glial-fibrillary-acidic protein cytoskeleton in an astrocytoma cell line (U-251). *J. Virol.* **74**: 3874–3880.
  - 20) Erlenhoefer, C., Wurzer, W.J., Löffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. 2001. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J. Virol.* **75**: 4499–4505.
  - 21) Fang, Y.-Y., Song, Z.-M., and Dhib-Jalbut, S. 2001. Mechanism of measles virus failure to activate NF- $\kappa$ B in neuronal cells. *J. Neurovirol.* **7**: 25–34.
  - 22) Furukawa, K., Ayata, M., Kimura, M., Seto, T., Matsunaga, I., Murata, R., Yamano, T., and Ogura, H. 2001. Hemadsorption expressed by cloned H genes from subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) viruses and their possible progenitor measles viruses isolated in Osaka, Japan. *Microbiol. Immunol.* **45**: 59–68.
  - 23) Goldman, G.C., Miranda, A.F., Deitch, A.D., and Tanenbaum, S.W. 1975. Action of cytochalasin D on cells of established lines. III. Zeiosis and movements at the cell surface. *J. Cell Biol.* **64**: 644–667.
  - 24) Hashimoto, K., Ono, N., Tatsuo, H., Minagawa, H., Takeda, M., Takeuchi, K., and Yanagi, Y. 2002. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* **76**: 6743–6749.
  - 25) Homma, M., Tashiro, M., Konno, H., Ohara, Y., Hino, M., and Takase, S. 1982. Isolation and characterization of subacute sclerosing panencephalitis virus (Yamagata-1 strain) from a brain autopsy. *Microbiol. Immunol.* **26**: 1195–1202.
  - 26) Hsu, E.C., Dörig, R.E., Sarangi, F., Marcil, A., Iorio, C., and Richardson, C.D. 1997. Artificial mutations and natural variations in the CD46 molecules from human and monkey cells define regions important for measles virus binding. *J. Virol.* **71**: 6144–6154.
  - 27) Hsu, E.C., Iorio, C., Sarangi, F., Khine, A.A., and Richardson, C.D. 2001. CDw150 (SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* **279**: 9–21.
  - 28) Hsu, E.C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M.S., Udem, S.A., Dillehay, D.L., Xu, W., Rota, P.A., Bellini, W.J., and Richardson, C.D. 1998. A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J. Virol.* **72**: 2905–2916.
  - 29) Ito, N., Ayata, M., Shingai, M., Furukawa, K., Seto, T., Matsunaga, I., Muraoka, M., and Ogura, H. 2002. Comparison of the neuropathogenicity of two SSPE sibling viruses of the Osaka-2 strain isolated with Vero and B95a cells. *J. Neurovirol.* **8**: 6–13.
  - 30) Iwata, K., Seya, T., Ariga, H., and Nagasawa, S. 1994. Expression of a hybrid complement regulatory protein, membrane cofactor protein decay accelerating factor on Chinese hamster ovary: comparison of its regulatory effect with those of decay accelerating factor and membrane cofac-

- tor protein. *J. Immunol.* **152**: 3436–3444.
- 31) Kimura, T., and Murakami, T. 1977. Tubular structures associated with acute nonbacterial gastroenteritis in young children. *Infect. Immun.* **17**: 157–160.
  - 32) Kobune, F., Sakata, H., and Sugiura, A. 1990. Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J. Virol.* **64**: 700–705.
  - 33) Komase, K., Haga, T., Yoshikawa, Y., Sato, T.A., and Yamanouchi, K. 1990. Molecular analysis of structural protein genes of the Yamagata-1 strain of defective subacute sclerosing panencephalitis virus. IV. Nucleotide sequence of the fusion gene. *Virus Genes* **4**: 173–181.
  - 34) Koumou, D.W., and Wild, T.F. 2002. Adaptation of wild-type measles virus to tissue culture. *J. Virol.* **76**: 1505–1509.
  - 35) Kratzsch, V., Hall, W.W., Nagashima, K., and ter Meulen, V. 1977. Biological and biochemical characterization of a latent subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus infection in tissue culture. *J. Med. Virol.* **1**: 139–154.
  - 36) Kubo, H., Iritani, N., and Seto, Y. 2003. Co-circulation of two genotypes of measles virus and mutual change of the prevailing genotypes every few years in Osaka, Japan. *J. Med. Virol.* **69**: 273–278.
  - 37) Makino, S., Sasaki, K., Nakagawa, M., Saito, M., Shinohara, Y., Gotoh, F., and Okabe, T. 1977. Isolation and biological characterization of a measles virus-like agent from the brain of an autopsied case of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Microbiol. Immunol.* **21**: 193–205.
  - 38) Mrkic, B., Pavlovic, J., Rüllicke, T., Volpe, P., Buchholz, C.J., Hourcade, D., Atkinson, J.P., Aguzzi, A., and Cattaneo, R. 1998. Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *J. Virol.* **72**: 7420–7427.
  - 39) Murakami, Y., Seya, T., Kurita, M., Fukui, A., Ueda, S., and Nagasawa, S. 1998. Molecular cloning of membrane cofactor protein (MCP; CD46) on B95a cell, an Epstein-Barr virus-transformed marmoset B cell line: B95a-MCP is susceptible to infection by the CAM, but not the Nagahata strain of the measles virus. *Biochem. J.* **330**: 1351–1359.
  - 40) Nanche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T.F., Rossi, B., Roubardin-Combe, C., and Gerlier, D. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* **67**: 6025–6032.
  - 41) Niewiesk, S., Schneider-Schaulies, J., Ohnismus, H., Jassoy, C., Schneider-Schaulies, S., Diamond, L., Logan, J.S., and ter Meulen, V. 1997. CD46 expression does not overcome the intracellular block of measles virus replication in transgenic rats. *J. Virol.* **71**: 7969–7973.
  - 42) Ning, X., Ayata, M., Kimura, M., Komase, K., Furukawa, K., Seto, T., Ito, N., Shingai, M., Matsunaga, I., Yamano, T., and Ogura, H. 2002. Alterations and diversity in the cytoplasmic tail of the fusion protein of subacute sclerosing panencephalitis virus strains isolated in Osaka, Japan. *Virus Res.* **86**: 123–131.
  - 43) Ohuchi, M., Ohuchi, R., and Homma, M. 1981. Mode of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus infection in tissue culture cells. III. Neurovirulence of cell-free SSPE viruses of Niigata-1, Kitaken-1, and Biken strains. *Microbiol. Immunol.* **25**: 887–893.
  - 44) Ogura, H., Ayata, M., Hayashi, K., Seto, T., Matsuoka, O., Hattori, H., Tanaka, K., Tanaka, K., Takano, Y., and Murata, R. 1997. Efficient isolation of subacute sclerosing panencephalitis virus from patient brains by reference to magnetic resonance and computed tomographic images. *J. Neurovirol.* **3**: 304–309.
  - 45) Patterson, J.B., Cornu, T.I., Redwine, J., Dales, S., Lewicki, H., Holz, A., Thomas, D., Billeter, M.A., and Oldstone, M.B. 2001. Evidence that the hypermutated M protein of a subacute sclerosing panencephalitis measles virus actively contributes to the chronic progressive CNS disease. *Virology* **291**: 215–225.
  - 46) Rima, B.K., Earle, J.A.P., Bacsko, K., ter Meulen, V., Liebert, U.G., Carstens, C., Carabana, J., Caballero, M., Celma, M.L., and Fernandez-Munoz, R. 1997. Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J. Gen. Virol.* **78**: 97–106.
  - 47) Schmid, A., Spielhofer, P., Cattaneo, R., Bacsko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. 1992. Subacute sclerosing panencephalitis is typically characterized by alterations in the fusion protein cytoplasmic domain of the persisting measles virus. *Virology* **188**: 910–915.
  - 48) Schneider-Schaulies, J., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. 2001. Measles virus interactions with cellular receptors: consequences for viral pathogenesis. *J. Neurovirol.* **7**: 391–399.
  - 49) Schneider-Schaulies, J., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. 2003. Measles infection of the central nervous system. *J. Neurovirol.* **9**: 247–252.
  - 50) Seto, T., Ayata, M., Hayashi, K., Furukawa, K., Murata, R., and Ogura, H. 1999. Different transcriptional expression of the matrix gene of the two sibling viruses of the subacute sclerosing panencephalitis virus (Osaka-2 strain) isolated from a biopsy specimen of patient brain. *J. Neurovirol.* **5**: 151–160.
  - 51) Seya, T., Kurita, M., Hara, T., Iwata, K., Semba, T., Hatanaka, M., Matsumoto, M., Yanagi, Y., Ueda, S., and Nagasawa, S. 1995. Blocking measles virus infection with a recombinant soluble form of, or monoclonal antibodies against, membrane cofactor protein of complement (CD46). *Immunology* **84**: 619–625.
  - 52) Shibahara, K., Hotta, H., Katayama, Y., and Homma, M. 1994. Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures. *J. Gen. Virol.* **75**: 3511–3516.
  - 53) Shingai, M., Ayata, M., Ishida, H., Matsunaga, I., Katayama, Y., Seya, T., Tatsuo, H., Yanagi, Y., and Ogura, H. 2003. Receptor use of by vesicular stomatitis virus pseudotypes with glycoproteins of defective variants of measles virus isolated from brains of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Gen. Virol.* **84**: 2133–2143.
  - 54) Takeda, M., Kato, A., Kobune, F., Sakata, H., Li, Y., Shioda, T., Sakai, Y., Asakawa, M., and Nagai, Y. 1998. Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins. *J. Virol.* **72**: 8690–8696.
  - 55) Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., and Tashiro, M. 2000. Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and Vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes* **20**: 253–257.

- 56) Takeuchi, K., Miyajima, N., Nagata, N., Takeda, M., and Tashiro, M. 2003. Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM (CD150)-independent mechanism. *Virus Res.* **94**: 11–16.
- 57) Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**: 893–897.
- 58) Ueda, S., Okuno, Y., Okuno, Y., Hamamoto, Y., and Oya, H. 1975. Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE): isolation of a defective variant of measles virus from brain obtained at autopsy. *Biken J.* **18**: 113–122.
- 59) Watanabe, M., Wang, A., Sheng, J., Gombart, A.F., Ayata, M., Ueda, S., Hirano, A., and Wong, T.C. 1995. Delayed activation of altered fusion glycoprotein in a chronic measles virus variant that causes subacute sclerosing panencephalitis. *J. Neurovirol.* **1**: 412–423. (Corrected and republished from *J. Neurovirol.* **1**: 177–188, 1995)
- 60) Xie, M., Tanaka, K., Ono, N., Minagawa, H., and Yanagi, Y. 1999. Amino acid substitutions at position 481 differently affect the ability of the measles virus hemagglutinin to induce cell fusion in monkey and marmoset cells co-expressing the fusion protein. *Arch. Virol.* **144**: 1689–1699.



原 著

## 未熟児、新生児のけいれん重積治療における リドカインの使用経験

Treatment with Lidocaine for Status Epilepticus in  
Low-Birth-Weight Infants and Neonates

山本 仁 依田 卓 村上浩史 神山紀子  
小林憲昭 宮本雄策 福田美穂

要旨：未熟児、新生児のけいれん重積に対する Lidocaine (Lid) 投与の効果の後方視的に検討した。Lid は生後 0～3 日の間に使用した。対象者は「けいれんが持続または群発した未熟児、新生児で通常の抗けいれん薬投与を含めけいれんに対して何らかの対処を必要とした者のうち、けいれんが停止せず Lid を使用した者」とした。最初に Lid (静注用キシロカイン) 2 mg/kg/dose を静注後、2～4 mg/kg/hr で持続静注した。対象者の生下時体重は 580～3,200 g、在胎週数は 25～40 週の間分布していた。9 例中 5 例 (56%) に有効であったが、うち 1 例は徐脈のため投与中止となった。有効例は、低酸素性虚血性脳症の例が多く、染色体異常や脳形成異常に伴うものには無効であった。副作用は併用薬との薬物相互作用が疑われた。未熟児、新生児のけいれん重積に対しても今後症例により Lid の使用を検討すべきと考えられた。

てんかん研究 2004 ; 22 : 96-100

**Key Words** : lidocaine, status epilepticus, low-birth-weight infant, neonate

(受付：2003年11月21日、訂正：2004年1月14日、受理：2004年1月21日)

### はじめに

Lidocaine (lid) は 1948 年に開発されて以来、局所麻酔薬、抗不整脈薬として広く使用されている。また、その臨床的抗けいれん作用は、1955 年に Bernhard らによって初めて報告された<sup>1)</sup>。それ以降、けいれん重積症、難治てんかんなどにも使用されその有効性が報告されている<sup>2)</sup>。また最近では新生児けいれんにも使用されている。しかし、

未熟児、新生児のけいれん重積に対する十分なデータは集積されていない。そこで、今回われわれは未熟児、新生児のけいれん重積に対して Lid を使用し後方視的にその効果、副作用について検討したので報告する。

### 対象および方法

対象は最近 5 年間に当院新生児集中治療室に入院し、低酸素性虚血性脳症、脳室内出血、滑脳症、

聖マリアンナ医科大学小児科

〔〒 216-8511 川崎市宮前区菅生 2-16-1〕

Hitoshi Yamamoto, Takashi Yoda, Hiroshi Murakami, Noriko Kamiyama, Noriaki Kobayashi, Yusaku Miyamoto, Miho Fukuda

Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine

Table 1 Effective Cases

Patients	Diagnosis	Maintenance dose (mg/kg/hr)	Duration of Lid therapy (days)	Blood concentrations* ( $\mu\text{g/ml}$ )	Seizure type	Adverse effects	Prognosis
M.O.	HIE Intraventricular hemorrhage	3	4	3.3	GT	None	Symptomatic partial epilepsy Developmental delay
Y.S.	HIE	3	3	3.5	GT	None	Good
F.K.	HIE Extremely low birth weight	3	3	—	GT	None	Died
K.N.	Bacterial meningitis (group B streptococcal)	2	2	5.5	GT	None	Developmental delay
R.S.	HIE Very low birth weight	4	0.125	—	FC	Bradycardia	Symptomatic partial epilepsy

HIE : hypoxic ischemic encephalopathy, GT : generalized tonic seizures, FC : focal clonic seizures, \*24hrs after Lid administration

染色体異常などに伴いけいれん重積を呈した未熟児、新生児9例とした。今回のけいれん重積症例は、生後0~3日の間に15分以上にわたり連続または群発するけいれんをみとめ通常の抗けいれん薬であるフェノバルビタール (PB)、ジアゼパム (DZP)、フェニトイン (PHT) の投与を含め、けいれんに対して何らかの対処 (人工呼吸器管理やグルコース、カルシウム投与など) を必要とした者のうちけいれんが停止せずにLidを使用した者とした。Lidの使用方法は、最初に静注用キシロカイン2mg/kg/doseを静注後、2~4mg/kg/hrで持続静注した。対象の出生時体重は580~3,200g (平均1,920g)、在胎週数は25~40週 (平均32週) の間に分布していた。またApgar scoreの平均は5.2であった。基礎疾患は、低酸素性虚血性脳症、脳室内出血、滑脳症、染色体異常などであった。発作型はVolpeの分類<sup>3)</sup>に従って判定した。

### 結 果

初回Lid投与後にけいれんが消失し、持続静注後も24時間以上再発しなかった例を有効とした。9例中5例が有効とみとめられた。そのうち4例

はLidを3~7日間持続した後減量し他の維持療法に変更できた。1例は投与開始後3時間で徐脈となり投与中止となった。中止後は再度けいれん重積となりベントバルビタール (PTB) を使用した。持続できた4例中1例は、けいれんは停止していたが日齢14に呼吸障害、循環障害が改善せず死亡した。これら5症例のまとめをTable 1に示す。Lidの維持投与量の平均は3.1mg/kg/hr、平均投与日数は4.5日であった。投与後24時間のLid血中濃度は3.3~5.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。他の明らかな副作用はみとめなかった。転帰として、てんかんを残したものが2例みとめられた。無効例はLid投与後もけいれん発作が不変だったものとした。9例中4例が無効であった。けいれん発作が悪化した例はなかった。これら無効例の内わけをTable 2に示した。無効例の基礎疾患は、脳室内出血、染色体異常、滑脳症などであった。無効例ではその後PTBを投与したものが3例、他の抗けいれん薬 (ゾニサミド) を投与したものが1例あった。

Table 2 Non Effective Cases

Patients	Diagnosis	Seizure Type	Adverse Effects	Finally Effective Drugs	Prognosis
Y.N.	Intraventricular hemorrhage	GT	None	Pentobarbital	DM
Y.W.	Intraventricular hemorrhage Very low birth weight	FC	None	Zonisamide	Symptomatic partial epilepsy, DM
S.R.	Lissencephaly Chromosome abnormality	GT	None	Pentobarbital	Symptomatic generalized epilepsy, DM
E.S.	Lissencephaly	GT	None	Pentobarbital	Symptomatic partial epilepsy, DM

HIE : hypoxic ischemic encephalopathy, GT : generalized tonic seizures, FC : focal clonic seizures, DM : developmental delay

### 考 察

Lid の小児への投与は 1980 年代より報告され、80 年代後半には新生児にも使用され有効な結果を得ている<sup>9)</sup>。しかし Lid のけいれん重積治療に関しては十分なデータが集積されていないのが現状である。

Lid は全般発作には無効で、局所性焦点を有する部分てんかんに有効であったことから大脳皮質における神経興奮抑制作用が、その抗けいれん作用発現理由の一つとして考えられている<sup>9)</sup>。またその生理機序として Na チャネルに作用して膜の興奮性を低下させるという説<sup>6)</sup>、神経細胞のミトコンドリアの代謝を低下させ、神経細胞興奮を抑え、大脳皮質の酸素消費量を減少させるという説<sup>7)</sup>などがある。また近年、欠神発作やミオクローニー発作などの全般発作にも有効との報告もある<sup>8)</sup>。しかし複雑部分発作を有する場合は、けいれんの誘発に注意すべきであると言われている。前頭葉てんかんや Lennox-Gastaut 症候群でのけいれんの悪化も経験されている。また大量投与では抑制性神経細胞が抑制され、扁桃体から広がるけいれん誘発作用をもつ<sup>9)</sup>。

今回の未熟児、新生児のけいれん重積では、有効例はほとんどが低酸素性虚血性脳症に伴うもので発作型は全般発作が主体であり、従来の報告で

の Lid の発作抑制機序はそのまま当てはまらないと考えられた。Lid の使用方法として初期のころは、1~2 mg/kg/dose の one shot 静注の方法がとられていたが、1980 年代以降は 2 mg/kg/dose iv 後に 2~4 mg/kg/hr で持続静注する方法が一般的である。今回もこの使用方法で行い大きな副作用はみられなかった。持続静注量については血中濃度と臨床効果をみながら漸減、漸増することが多い。投与量と血中濃度は、ほぼ相関するという報告が多い<sup>10)</sup>。有効血中濃度は 1~6 µg/ml の範囲で、副作用の出現は必ずしも血中濃度と相関するわけではないが、副作用の一部は 5 µg/ml を越えるものが多いといわれている。

Lid を抗けいれん薬として使用した時の副作用の出現は、過去の文献をまとめた報告によると、258 症例中 16 例にみられている<sup>11)</sup>。その内訳は、神経系では、けいれん誘発が 4 例(新生児 1、乳児 2、幼児 1)、ふらつきが 3 例、軽度眠気が 2 例、幻視幻聴が 1 例、筋トーン低下が 2 例であった。循環器系では、徐脈が 3 例(新生児 1、乳児 2)、心停止が 1 例であった。今回の使用例でも徐脈が 1 例みられた。この例は Lid とグルコン酸カルシウムを併用していたが、徐脈は Lid 中止、グルコン酸カルシウム減量後速やかに改善したため原因は薬物相互作用が疑われた。Lid では心抑制などの副作用は比較的起こりにくいといわれているが、

急速に静注した時や、肝血流を低下させるような薬剤または循環器系薬剤と併用した時に、血圧低下、不整脈等の副作用が出現しやすいのではないかと考えられる。

Lid 使用にあたっては、大量投与による血中濃度の上昇、麻酔薬や循環器系薬剤との相互作用、宿主側の心機能や肝機能に十分注意する必要があるものと思われる。Lid の副作用の報告は、過去の文献上では未熟児、新生児に限ったものではなく様々な年齢層を含んだものとなっている。前述したように過去の 258 症例のまとめでは有効率は約 80%、副作用は約 6% と報告されている<sup>13)</sup>。今回の副作用は 9 例中 1 例 (約 11%) とやや高率であった。他の薬剤との比較では最近ミダゾラムもよく新生児けいれんに使用されているがやはり未熟児、新生児に限った報告はない。平成 14 年度の後方視的多施設共同研究のまとめでは、ミダゾラムの有効率 63.5%、副作用 13.2% と報告されている<sup>14)</sup>。Lid とミダゾラムの副作用には大きな差はないと考えられる。未熟児、新生児のけいれん重積治療における Lid の位置づけは現状では、通常の抗けいれん薬 (DZP、PB、DPH など) が無効であった場合のミダゾラムを含めた選択肢の一つと考えて良いと思われる。今後は全国調査などを踏まえた小児のけいれん重積治療ガイドラインが作成されることが望ましい。今回の検討により、Lid は未熟児、新生児の低酸素虚血性脳症に伴うけいれん重積に有効で、とくにけいれん群発例では持続静注によりけいれんを継続して抑制できることがわかった。さらに、静注してから効果発現は速やか (通常、血中濃度は注入直後に最高濃度を示す<sup>15)</sup>) で効果判定が行いやすく、臨床症状の改善だけでなく、全例施行したわけではないが一部の例では脳波の改善もみとめられた。また、もうひとつの利点として、半減期が短いため副作用出現時も投与の中止により速やかに副作用が改善できると考えられた。未熟児、新生児のけいれん重積に対しても、症例を選んで使用すれば Lid は有用な薬剤と思われた。

## 結 論

未熟児、新生児のけいれん重積に対する Lid 投

与の効果の後方視的に検討した。9 例中 5 例 (56%) に有効であったが、うち 1 例は副作用 (徐脈) のため投与中止となった。有効例は、低酸素性虚血性脳症の例が多く、染色体異常や脳形成異常に伴うものには無効であった。副作用は併用薬との薬物相互作用が疑われた。

本論文の要旨は第 37 回日本てんかん学会 (2003 年 10 月、仙台) にて発表した。本研究は、厚生労働科学研究費補助金、効果的医療技術の確立推進臨床研究事業「小児のけいれん重積に対する薬物療法のエビデンスに関する臨床研究 H14-小児-004」により遂行された。

## 文 献

- 1) Bernhard CG, Bohm E, Hojberg S. A new treatment of status epilepticus : intravenous injections of a local anesthetic (lidocaine). *AMA Arch Neurol Psychiatry* 1955 ; 74 : 208-214.
- 2) 佐田佳美, 相原正男, 畠山和男, 日野原陽一, 神谷裕子, 下田智佳子, ら. 小児難治性けいれんに対する lidocaine 持続静注の有用性とその副作用. *脳と発達* 1997 ; 29 : 39-44.
- 3) Volpe JJ. Neonatal seizures. In : Volpe JJ, ed. *Neurology of the newborn*. 4th ed. Philadelphia : WB Saunders, 2000 : 178-214.
- 4) 宮田広善, 坪田 徹, 黒田英造, 竹本博行, 金沢克彦, 荻野仁志. けいれん重積症および難治性てんかんに対するリドカイン療法—新生児, 乳児を中心に—. *脳と発達* 1985 ; 17 : 203-209.
- 5) 崔 鳳春, 後藤萬美, 藤田仁志, 日野玉喜, 木村光一, 西尾朋子, ら. リドカインの抗けいれん作用. *小児科臨床* 1985 ; 38 : 2283-2289.
- 6) Evans DE, Kobrine AI, LeGrys DC, Bradley ME. Protective effect of lidocaine in acute cerebral ischemia induced by air embolism. *J Neurosurg* 1984 ; 60 : 257-263.
- 7) Haschke RH, Fink BR. Lidocaine effects on brain mitochondrial metabolism in vitro. *Anesthesiology* 1975 ; 42 : 737-740.
- 8) 金村英秋, 相原正男, 佐田佳美, 畠山和男, 日野原陽一, 神谷裕子, ら. 欠神, 失立発作群発に lidocaine 持続静注療法が著効した Doose 症候群の 1 症例. *脳と発達* 1996 ; 28 : 325-331.
- 9) Mesulam MM. Lidocaine toxicity and the limbic system. *Am J Psychiatry* 1987 ; 144 : 1623.
- 10) Kobayashi K, Ito M, Miyajima T, Fujii T, Okuno T.

- Successful management of intractable epilepsy with intravenous lidocaine and lidocaine tapes. *Pediatr Neurol* 1999 ; 21 : 476-480.
- 11) 相原正男, 山本 仁. リドカイン(lidocaine)のけいれん重積治療に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金・効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 小児のけいれん重積に対する薬物療法のエビデンスに関する研究・平成14年度総括, 分担研究報告書 2003 : 63-72.

本論文は平成 14~16 年度において、厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業・小児疾患臨床研究事業）を受け実施した研究成果である。

## 症例報告

## てんかんを合併した原発性小頭症の3例

## Three Cases of Primary Microcephaly Associated with Epilepsy

山本 仁 今井克美\* 神山紀子  
村上浩史 宮本雄策 福田美穂

要旨：てんかんを合併した原発（真）性小頭症の3例を経験した。染色体異常症、奇形症候群や先天性感染症、周産期の異常などに伴う二次性的小頭症に合併するてんかんの報告は数多くみられるが原発性小頭症に合併したてんかんのまとまった報告はない。3症例とも生下時から正常頭囲より $-3$ S.D.以下の小頭をみとめた。頭蓋の特徴としては、前頭、後頭部の低形成、前額部の sloping、尖状頭がみられ、他の脳奇形、染色体異常症、先天性感染症などが否定されたため原発性小頭症と診断した。それぞれ、生後9カ月、10カ月、1歳9カ月にてんかんを発症した。すべて症候性局在関連性てんかんであり、1例は薬物抵抗性の難治てんかんであった。発作型は複雑部分発作と二次性全般化発作を示した。全例とも精神遅滞を伴っていたが、その程度はさまざまであった。

てんかん研究 2004; 22: 201-205

Key Words : primary microcephaly, epilepsy, mental retardation

(受付：2004年6月4日、訂正：2004年7月14日、受理：2004年7月14日)

## はじめに

頭の大きさは便宜上頭囲の大きさにより判定される。頭囲の増大には脳の成長と頭蓋縫合の開存が必要であり、このどちらかに障害があると頭囲の増大は停止もしくは遅延する。増大が停止すると小頭症となっていく。小頭症は正常頭囲より $-3.0$ S.D.以下のものを総称する疾患名である。小頭症にはてんかんの合併が多いといわれるが、過去の報告例はほとんどが先天性脳奇形、染色体異常症、先天性感染症などに伴うものであり、原発性小頭症に伴うてんかんのまとまった報告はな

く、合併はまれと思われる。今回、われわれは、てんかんを合併した原発性小頭症を3例経験したので文献的考察を加えて報告する。

## 症 例

症例1：11カ月の男児

主訴：小頭、けいれん

家族歴：特記すべき事なし

妊娠・分娩歴：妊娠中より胎児エコーにて小頭を指摘されていた。在胎38週、経膈分娩にて出生し仮死は認めなかった。出生体重2,154g、身長50cm、頭囲27cm（ $-4.0$ SD）であった。

聖マリアンナ医科大学小児科

〔〒216-8511 川崎市宮前区菅生2-16-1〕

Hitoshi Yamamoto, Noriko Kamiyama, Hiroshi Murakami, Yusaku Miyamoto, Miho Fukuda

Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine

\*大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学小児発達医学講座小児科学

Katsumi Imai

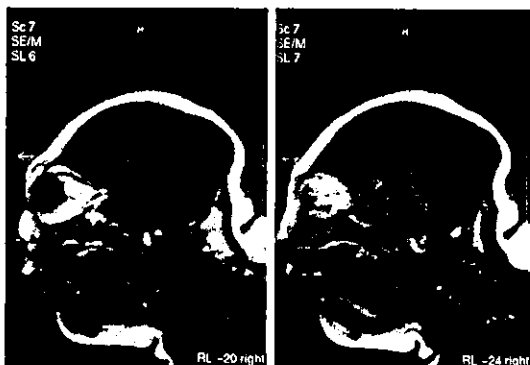


Fig. 1. Cranial MRI at the age of 2 months showed hypoplasia of cerebrum. However, cerebellum, brain stem and thalamus had almost normal formation and structures.

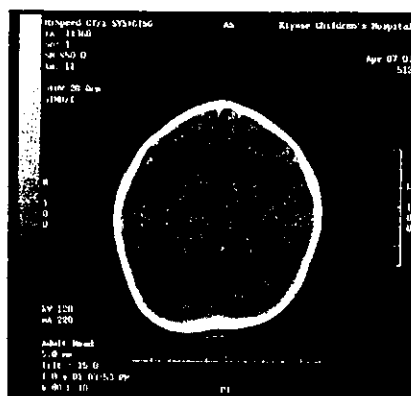


Fig. 2. Cranial CT scan at the age of 14 months showed hypoplasia of anterior portion of cerebrum. However, there were no anatomical abnormalities.

**臨床経過：**出生後、0～1日にかけて無呼吸発作をみとめたが、自然に軽快した。その後は呼吸状態を含めて全身状態は安定していた。生後1カ月時に、頭蓋の特徴、頭部MRI画像(Fig. 1)所見、染色体異常を認めないことなどから原発性小頭症と診断した。生後10カ月時に、全身の強直発作が出現してきた。11カ月になり発作は連日みとめられるようになった。脳波では、左前頭部から前側頭部に棘波をみとめた。症候性局在関連性てんかん、二次性全般化発作と診断しバルプロ酸(VPA、20 mg/kg/day)を開始した。VPA開始後発作は消失している。患児は現在、定頭をみとめず有意語もみられない発達遅滞を示している。

**症例2：**3歳10カ月の女児

**主訴：**小頭、けいれん

**家族歴：**特記すべきことなし

**妊娠・分娩歴：**妊娠中は特記すべきことなし。

在胎40週、出生体重3,036 g、経膈分娩にて出生し仮死はなかった。身長47 cm、頭囲29 cm (-3.0 SD)であった。

**臨床経過：**出生後、小頭をみとめ精査が行われた。染色体異常なく、頭蓋の特徴、頭部CT(Fig. 2)所見、先天感染の否定などから原発性小頭症と診断した。その後、1歳時と1歳2カ月時に、発熱に伴い全身の強直間代けいれんを約5分間みとめ熱性けいれんと診断されている。経過をみていた

ところ、1歳9カ月の時、無熱時に全身の強直けいれんが約2分間出現した。脳波に異常なく経過観察となったが、2歳2カ月時に再度同様の無熱性けいれんが20分以上にわたり出現した。脳波では、右前頭部に棘波をみとめ症候性局在関連性てんかん、二次性全般化発作と診断した。VPA(20 mg/kg/day)を投与し発作は抑制されている。現在3歳10カ月にて、独歩、小走り可能で有意語は4～5個みられている。DQは56と判定されている。

**症例3：**4歳10カ月の男児

**主訴：**小頭、けいれん

**家族歴：**特記すべきことなし

**妊娠・分娩歴：**在胎28週より頭が小さいことを指摘されていた。在胎39週5日、生下時体重2,344 g、身長45.6 cm、頭囲29 cm (-3.5 SD)にて出生した。

**臨床経過：**定頭3カ月、寝返り9カ月、座位11カ月としないで発達の遅れが目立ってきた。6カ月時に、他院にて頭蓋の特徴、頭部MRI所見、染色体正常および先天感染の否定などから原発性小頭症と診断された。生後9カ月時に、右側へ眼球偏位し脱力する発作をくりかえし他院にてカルバマゼピン(CBZ)投与が開始となった。1歳2

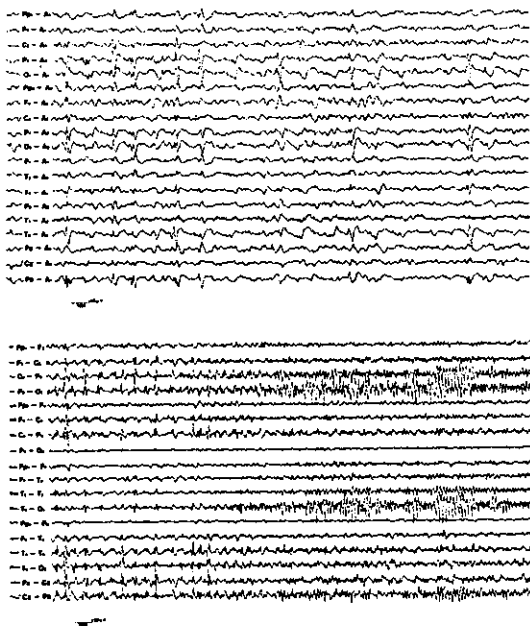


Fig. 3 EEG at the age of 12 months, asleep. Top: Interictal EEG, monopolar montage, showed sporadic spikes mainly in the posterior regions. Bottom: Ictal EEG, bipolar montage, showed posterior discharges characterized by bursts of sharp activities.

カ月時、右眼球偏位からチアノーゼとなり、その後右上下肢の間代性けいれんより全般性の間代性けいれんとなる発作が重積し他院へ入院となった。脳波では、非発作時には左後頭部および側頭部あるいは両側の後頭部に棘波をみとめ、眼球右方偏位する発作時には、頭頂から後頭部中心に鋭波をバースト状に認めた(Fig. 3)。以上より症候性局在関連性てんかん(後頭葉てんかん)、発作型は複雑部分発作および二次性全般性強直間代発作と診断され VPA ついでゾニサマイド (ZNS) が追加投与となった。しかし発作は難治であり、時に重積となることもあった。その後、CBZ、ZNS は中止しフェニトイン (PHT)、ニトラゼパム (NZP)、臭化ナトリウムが追加投与となり発作は減少していた。DQ は 46 と判定されている。4 歳 10 カ月時に当院転院となった。現在 VPA 20 mg/kg/day (血中濃度 52.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、PHT 13 mg/kg/day (同 23.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、NZP 0.3 mg/kg/day (同 24.8 ng/



Fig. 4 Cranial MRI at the age of 4 years. Microcephaly was noted. Bilateral frontal lobe was relatively small compared to the other parts. Slight macrogyria could be seen in bilateral temporoparietal region. Myelination was age-matched.

ml)、臭化ナトリウム 40 mg/kg/day 投与にて、1 回約 5 分間の同様の発作が 1 カ月に 1 回程度みられている。頭部 MRI 画像を (Fig. 4) に示す。

#### 考 察

小頭症は、正常頭囲より  $-3.0$  SD 以下のものを総称する疾患名であり有病率は 0.2% と報告されている<sup>1)</sup>。その原因はさまざまであり、小頭のもの、いいかえれば脳の発達障害に基づく精神、神経症状のみのものと、他の身体所見に異常を合併するものに分かれる。さらに内因性のもの(原発性、Paine 症候群、Alpers 症候群、Seckel 症候群など)、染色体異常によるもの(Down 症候群、13 trisomy、18 trisomy、4 p-症候群など)、外因性のもの(多発性のう胞性脳軟化症、X 線被爆、巨大細胞封入体症、先天性トキソプラズマ症、胎児性アルコール症候群など)に分かれる<sup>2)</sup>。しかし、小頭症まではいかない  $-2.0$  SD から  $-3.0$  SD 未満の頭囲の児でも精神もしくは運動発達に異常をみとめることも多く、単に頭囲のみから症状を予測することは困難であり、小頭症であるからすべて症状が重篤とは限らない。頭囲の測定に関しては、実際の臨床の間では計測部位が一定していないことがあり、計測値を比較する時に混乱を招くことがある。一般に頭囲の測定方法には次の二通りがある。すなわち、1) 外後頭結節と前頭隆起を通る周径 (OFC)、2) 外後頭結節と眉間を通る周径 (OGC) である。現在は厚生労働省による身体



発育調査では OGC に統一されているため今回も OGC を用いた<sup>9)</sup>。原発性小頭症は、常染色体劣性遺伝とされている。別名、真性小頭症とか Penrose microcephaly とか true microcephaly と呼ばれている。頭部の形態的特徴としては、神経頭蓋が顔面頭蓋に比して著しく小さく、とくに前額部の発達が悪く後方に傾斜し sloping と表現される。後頭部は平坦であり、後頭蓋窩の発達は正常であるため全体として頭頂部に向けて尖頭状をなす。今回の3症例は、特徴的な頭蓋の形、頭部 MRI 所見、染色体検査正常、先天感染の否定などから原発性小頭症と診断した。多発奇形や染色体異常に伴う小頭症のてんかん合併例の報告は散見される<sup>9)</sup>が、原発性小頭症の児に合併したてんかんのまとまった報告は我々が探したところ見当たらなかった。今回の症例を検討した結果、症例1は、症候性局在関連性てんかん（前頭葉てんかん）で発作型は二次性全般性間代発作と考えられた。発作は VPA 投与により速やかに抑制でき再発もみられないためてんかんとしては軽症例とおもわれた。しかし重度の発達遅滞を伴っているため今後の注意深い経過観察が必要である。症例2も、症候性局在関連性てんかん（前頭葉てんかん）で発作型は二次性全般性強直間代性発作と診断した。発作は VPA (15 mg/kg/day) 投与にて抑制されている。症例3は、今回の3症例の中では最も難治な発作を合併した例であり、脳波上では多焦点性に棘波を認めていたが、後頭葉てんかんと診断されている。以上のように、原発性小頭症に合併したてんかんの予後は様々であり、これがどの様な機序で表現型が分かれるかは不明である。

原発性（真性）小頭症は常染色体劣性遺伝を示し、1885年にはすでに真性小頭症（microcephaly vera）という用語が Giacomini により提唱されている<sup>9)</sup>。この疾患では、出生時すでに頭囲の低下をきたしており、一般的には重度の小頭と中等度の精神遅滞をみることが多いが、運動発達は正常に近い。脳の画像診断上は、脳回の減少が軽度認められる例がある以外は著明な構造異常を認めず、てんかんの合併はまれとされている<sup>9)</sup>。Bondらの原発性小頭症を持つ23家系51例の解析でもてんかんの合併は1例もなかったと報告されてい

る<sup>7)</sup>。最近、連鎖解析による遺伝子マッピングが進み、この疾患の遺伝子座は単一ではなく、少なくとも5つの遺伝子座が臨床的に区別できない原発性小頭症を発症しうることが明らかになった。このうち2つの遺伝子座、MCPH1 および MCPH5 については原因遺伝子が特定されている。MCPH1 は、8番染色体短腕上の原発性小頭症の遺伝子座として1998年に報告された<sup>9)</sup>。この原因遺伝子である microcephalin は、2002年に原発性小頭症の遺伝子としてはじめて同定され、このタンパク質が神経幹細胞、前駆細胞において DNA 修復に関わっている可能性も示唆されている<sup>9)</sup>。MCPH5 は、1番染色体長腕上の遺伝子座で、2000年に報告されている<sup>10)</sup>。この原因遺伝子も発見されており、ASPM と命名されている<sup>11)</sup>。そして、この遺伝子も神経幹細胞、前駆細胞の分裂、増殖に関与することが示唆されている。遺伝子異常が関与する小頭症の発生メカニズムについては、神経幹細胞や前駆細胞の分裂・増殖の障害、個々の神経幹細胞や前駆細胞による神経細胞産生の減少、神経細胞のアポトーシスの増加、神経細胞の成熟および成長の障害、グリア細胞産生の障害などがさまざまに組み合わせられて起こると考えられている<sup>9)</sup>。しかし、いまだ同定されていない遺伝子座および遺伝子も多数あると推測されており、てんかん合併のメカニズムについても、今後は細胞生物学的手法を用いた解析により解明されることが期待される。

## 文 献

- 1) Haslam RHA. Microcephaly. In: Behrman RE, ed. Nelson textbook of Pediatrics. 15<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996: 1682.
- 2) Ross JJ, Frias JL. Microcephaly. In: Bruyn GW, ed. Handbooks of clinical neurology. Vol 30, Amsterdam: North-Holland, 1977: 507-524.
- 3) 石川達也, 古山三和子, 石川美保子. 学童における頭囲, 前頭部計測点（前頭隆起, 眉間点）による相違. 小児保健研究 1987; 46: 313-314.
- 4) 西田巳香, 岡本浩之, 山崎治幸, 前馬秀昭, 上野康尚, 堀田成紀, ら. 全前脳症の3例. 周産期医学 2002; 32: 831-834.
- 5) 持田ガネシュワラン仁司. ヒト小頭症への分子遺伝

- 学的アプローチ. 実験医学 2003 ; 21 : 1368-1371.
- 6) Mochida GH, Walsh CA. Molecular genetics of human microcephaly. *Curr Opin Neurol* 2001 ; 14 : 151-156.
  - 7) Bond J, Scott S, Hampshire DJ, Springell K, Corry P, Abramowicz MJ, et al. Protein-truncating mutations in ASPN cause variable reduction in brain size. *Am J Hum Genet* 2003 ; 73 : 1170-1177.
  - 8) Jackson AP, McHale DP, Campbell DA, Jafri H, Rashid Y, Mannan J, et al. Primary autosomal recessive microcephaly (MCPH1) maps to chromosome 8p22-pter. *Am J Hum Genet* 1998 ; 63 : 541-546.
  - 9) Jackson AP, Eastwood H, Bell SM, Adu J, Toomes C, Carr IM, et al. Identification of microcephlin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *Am J Hum Genet* 2002 ; 71 : 136-142.
  - 10) Pattison L, Crow YJ, Deeble VJ, Jackson AP, Jafri H, Rashid Y, et al. A fifth locus for primary autosomal recessive microcephaly maps to chromosome 1q31. *Am J Hum Genet* 2000 ; 67 : 1578-1580.
  - 11) Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, et al. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet* 2002 ; 32 : 316-320.

## 小児難治てんかんに対する新プロトコールリボステロイド療法

聖マリアンナ医科大学小児科<sup>1)</sup>, 同 横浜市西部病院小児科<sup>2)</sup>

宮本 雄策<sup>1)</sup> 山本 仁<sup>1)</sup> 福田 美穂<sup>1)</sup>  
村上 浩史<sup>1)</sup> 神山 紀子<sup>1)</sup> 小坂橋 靖<sup>1)</sup>  
栗原八千代<sup>2)</sup> 加藤 達夫<sup>2)</sup>

### 要 旨

West 症候群において、初発の1例と ACTH 療法後に再発した2例の難治性全般てんかんの計3例に対し、従来のプロトコールを改訂したリボステロイド (LS) 療法を施行した。投与量及び回数 は 0.25mg/kg/dose の LS を、従来の計7回投与から計12回静脈内投与に増量した。効果は初発の1例では発作の消失及び脳波所見の著明な改善を認めた。再発の1例では発作の50%以上の減少及び脳波所見の改善がみられたが、再発のもう1例では発作及び発作波とも不変であった。投与中及び投与後に明らかな副作用はみられなかった。又、従来法に比べて効果判定が早く出来ると思われた。他に有効な方法がない例や、既存の療法で副作用が疑われる症例に LS 療法は有用であり、投与回数を増加した新プロトコールにおいても安全に施行出来ると考えられた。

キーワード：難治てんかん、West 症候群、リボステロイド療法、副作用、新プロトコール

### 緒 言

West 症候群は小児の難治性てんかんの代表的疾患である。現在我が国においてはその治療として、ビタミン B6 及び各種抗てんかん薬内服、合成 ACTH 療法などが主に行われている。その中で ACTH 療法は有効性は明らかなものの、大脳萎縮、重症感染症、低カリウム血症、下垂体前葉機能低下などの重大な副作用の報告がある<sup>1)</sup>。そのため、副作用を軽減する目的で投与量を減量したり、投与期間を短縮するなど投与方法を工夫する試みがなされると共に、新しい治療法を開発する試みがなされている。West 症候群に対するリボステロイド (LS) 療法は1996年山本らによって報告された<sup>2)</sup>。近年その有効性並びに副作用の少なさが注目されており、West 症候群を始めとする小児難治性てんかんに対し複数の施設で使用され始めている<sup>3)</sup>。

しかし、その適応や使用量、施行方法に関しては統一された見解はなく、一般的には山本らの投与方法がプロトコールとして用いられている。しかし最近、従来の方法では効果判定に時間がかかる事が問題視され、投与スケジュールの見直しを求める意見が出されている<sup>4)</sup>。又、以前の報告では ACTH 療法と LS 療法の比較において再発率に差を認めなかったと報告したが<sup>2)</sup>、以降の未発表例を含めた8例の LS 療法有効例のうち5例 (62.5%) で LS 投与終了後6カ月以内に発

作の再発を認めており、従来の ACTH 療法の再発率の報告 (33~56%)<sup>5)</sup> に比べると再発率が高かった (未発表自験例)。今回我々は3例の小児難治性てんかんの患児に対し、LS 療法の投与スケジュールを変更して施行したので、効果と副作用について報告する。

### 対 象

対象は5カ月の初発の West 症候群1例と12カ月と2歳1カ月の West 症候群 ACTH 療法後に発作の再発を認めた難治性てんかん2例の計3例とした。再発例の2例は ACTH 療法で、一時的に発作の減少を認めたものの、3カ月以内に発作の再発を認め、各種抗てんかん薬に抵抗性であった。また、2例とも最重度の精神運動発達遅滞を呈していた。対象3例の概要を表1に示す (表1)。

### 方 法

LS 療法に関しては保護者よりインフォームドコンセントを得た。LS はデキサメサゾンとして 0.25mg/kg/dose を最初の2週間は隔日で7回静脈内投与、次の2週間は週に2回の計4回投与、最後の1週間は週に1回の計1回投与、合計12回静脈内投与した (総投与量 3.0mg/kg)。今回の3症例に対する LS 療法は入院にて施行し、発作回数を観察すると共に、脳波検査及び頭部 MRI 検査を投与前後で施行し比較検討した。尚、有効性の判定は LS 投与終了時点において、発作頻度が75%以上減少を著効、50%~75%減少を有効、25%~50%減少を軽度有効、25%以下の減少を無効、発作の増加を増悪として評価した。

(平成15年7月29日受付) (平成16年5月13日受理)

別刷請求先：(〒216-8511) 川崎市宮前区菅生2-16-1

聖マリアンナ医科大学小児科学教室

宮本 雄策

表1 症例の概要

症例	性	月齢	発症月齢	発症時てんかん分類	主な発作	現在までの治療	発作頻度	脳波所見
1	F	5	5	潜因性 West	Epileptic spasms シリーズ形成	Vit B6 各種抗てんかん薬	5回程度/日	ヒブスアリスミア
2	F	25	5	潜因性 West	Epileptic spasms 単発	Vit B6 各種抗てんかん薬 ACTH (2クール) ケトン食 γ-glb	20回程度/日	全般性棘徐波複合 頻発
3	F	12	3	潜因性 West	Epileptic spasms 単発	Vit B6 各種抗てんかん薬 ACTH	10回程度/日	全般性棘徐波複合 頻発

表2 LS療法の効果

症例	LS療法の効果発現時期	発作	脳波所見の変化	頭部MRIの変化	他の副作用	有効性
1	2回目(3日目)より減少 4回目(1週間)より消失	消失	Focal sharp へ	なし	認めず	著効
2	4回目より減少	50%以上減少	発作波の 50%以上減少	なし	認めず	有効
3	効果なし	不変	不変	なし	認めず	無効

## 結果

### (1) 有効性の検討 (発作頻度と脳波変化)

3症例の効果, 効果発現の時期などについてのまとめを表2に示す(表2)。症例1では2回目の投与後より, 発作回数が減少し, 4回目の投与後(投与開始より1週間)より発作の消失を認めた。脳波ではヒブスアリスミアの所見は消失したが, focal sharp が残存した。症例2では4回目の投与(投与開始1週間)より, 発作回数が減少し, 最終的には50%以上発作回数が減少した。投与前脳波所見では, 全般性の棘徐波複合が頻発していたが, 投与後発作波の頻度も著明に減少した。症例3では発作回数, 脳波所見とも不変であった。LS療法が著効したと考えられる症例1の脳波所見の推移を図1, 図2に示す(図1)(図2)。症例1, 症例2において現在6カ月以上の経過観察中であるが, 症例1においては現在までいれん発作の再発は認めていない。症例2においては発作頻度はLS療法前に比べ約50%減少を維持しているが, 脳波所見は全般性の棘徐波複合であり, 発作波の出現頻度はLS療法以前と同等に戻っており今後引き続き経過観察が必要と思われる。

### (2) 頭部MRI検査

症例1では投与前のMRIは異常所見を認めず, 投与後のフォローにおいても, 同様に異常所見は認めなかった。症例2, 3においては, 投与前より軽度大脳半球の萎縮を認めたが, 投与終了後のMRIにおいて小児放射線科医の読影上, 視察上投与後萎縮の進行は認め

なかった。

### (3) その他の身体所見, 検査所見

LS投与中の体重増加, 体温変動は正常範囲であった。一般診察において浮腫や満月様顔貌は認めなかった。高血圧も出現せず, 適宜施行した一般採血において治療を要する感染症, 電解質異常は認めなかった。

## 考案

LSは大豆油を単層の卵黄レシチンで取り囲んだ構造の直径約0.2μmの脂肪微粒子に, 脂溶性の高いパルチミン酸デキサメサゾン(D-PAL)を保持させた静注用薬剤である。ラットを用いた動物実験によれば, 炎症部にD-PALが集積し, 水溶性デキサメサゾン(D-PHOS)の5~6倍の抗炎症作用を持つとされている<sup>6)</sup>。適応が認められているのは慢性関節リウマチのみであるが, 難治てんかん以外にも肺ヘモジデロシス<sup>7)</sup>や opsoclonus-polymyoclonia 症候群<sup>8)</sup>での有効例も報告されている。

山本らの報告以後, West症候群をはじめとする乳幼児期の難治てんかんに対する使用例の報告が散見する。それらは山本らの方法(デキサメサゾンとして0.25mg/kg/doseを1週間に1回を4回静脈内投与, 2週間に1回を2回投与, 最後月に1回を1回投与, 合計7回静脈内投与)(総投与量1.75mg/kg)で施行されており, その効果に関しては, 著効したとするもの<sup>3)</sup>, 一部の症例で限局した効果のみであったとするもの<sup>9)</sup>と評価が分かれている。しかしその副作用については,