

また、頭部MRI側脳室体部断面のT₂強調画像では、全体に脳実質の萎縮が著明で菲薄化が進み、脳実質は前頭葉と側頭葉にわずかに残存するのみであった。橋延髄移行部では、側脳室後角の拡大を認めるが、橋ならびに小脳虫部を含め脳幹部は比較的良好に保たれている(図1)。

ビデオ脳波同時記録 図2aは覚醒時の発作をビデオ脳波同時記録、図2bは同発作時脳波を脳波記録

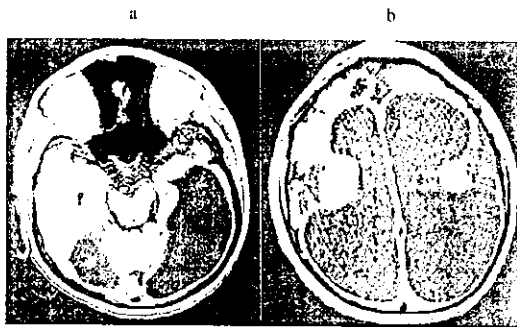


図1 頭部MRI (TIWI TR/TE = 600/12) 側脳室体部断面 (a) では、前頭葉と側頭葉がわずかに残存する。橋延髄移行部 (b) では、脳幹部は保たれている。

紙より採録したものであるが、上肢は屈曲位で筋緊張の充進を伴い、両眼を見開いて口角をつり上げて大声で笑う発作を認める。笑いは痙性で、左方向への水平性眼振を伴いながら、次第に四肢の筋緊張が解けていく。この発作時には筋電図とアーチファクトの混入が著明で、脳波所見の判読が困難であるが、発作消失後の発作間歇時には左側優位両側の前頭極部 (Fp₁) に高振幅棘波と2Hz前後の棘徐波複合を認め、さらに右中心部 (C₁) に棘波が散発している(図3a)。また、四肢の強直が軽い別の笑い発作の際には、四肢の筋緊張が解けて筋電図とアーチファクトが消失し、笑いが残っている時点で、発作前の徐波主体の背景活動と明らかに異なる、全般性の低振幅速波活動を認めた(図3b)。

II 考 察

1971年にGasconら²⁾は、笑い発作 (epileptic gelastic seizure) について詳述し、笑い発作の診断基準として、①常に同じ発作の繰り返し、②外因の欠如、③強直あるいは間代、意識消失、自動症等の他のてんかん発作症状の併発、④てんかん性の脳波異

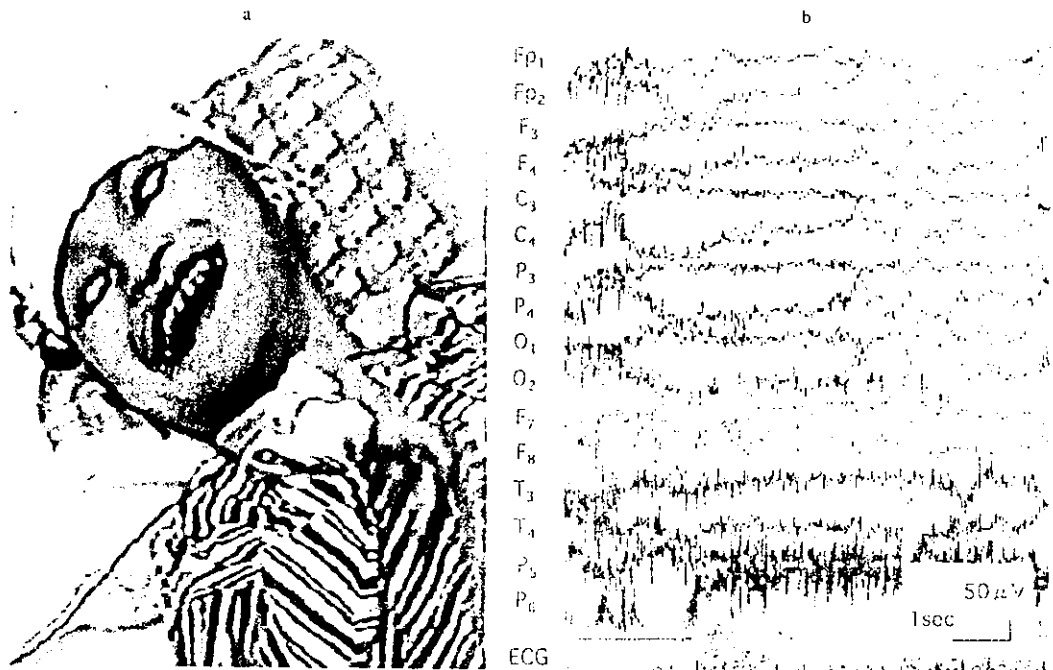


図2 発作時ビデオ脳波同時記録 aは覚醒時の発作をビデオ脳波同時記録、bは同発作時脳波を脳波記録紙より採録した。

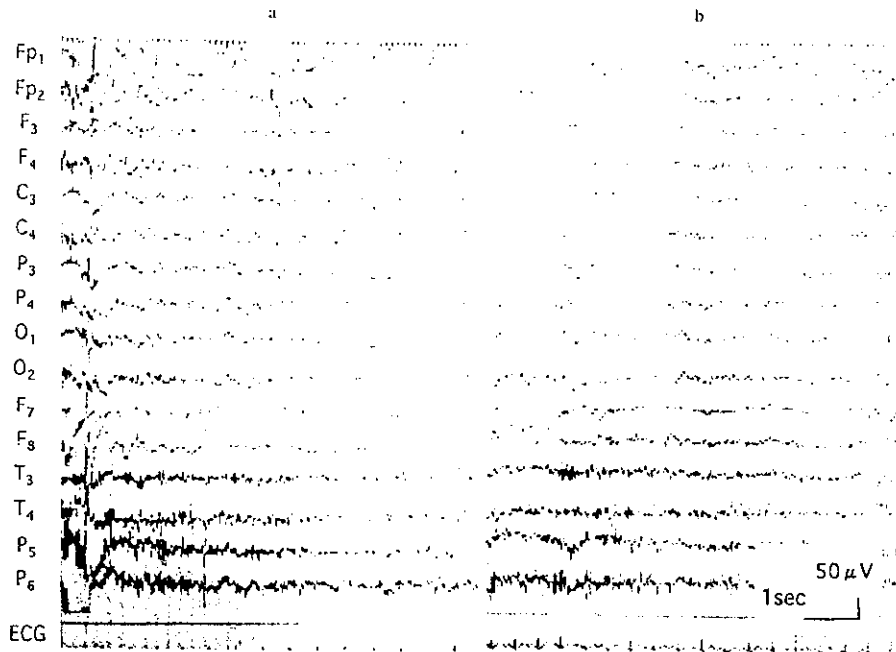


図3 発作消失後の発作間歇時脳波と四肢の筋緊張が解けた時点の発作時脳波
 aは発作消失後の発作間歇時脳波、bは四肢の筋緊張が解けた時点の発作時脳波で、ともに脳波記録紙より採録した。

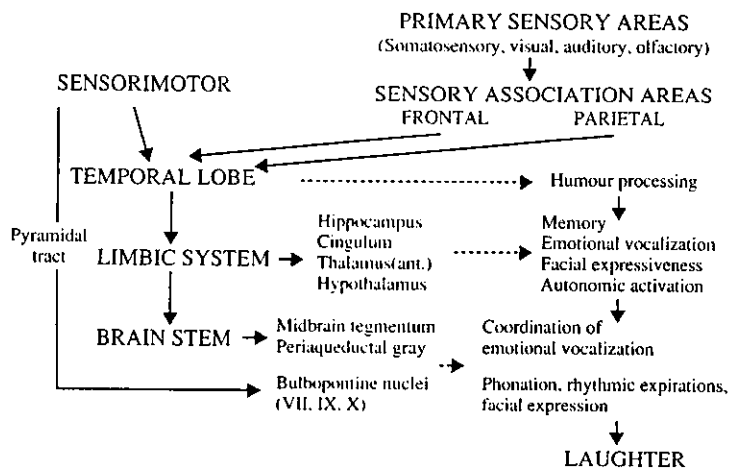


図4 笑いの発生機序仮説 (Arroyo S, et al+)

常、⑤病的な笑いの原因となる神経学的徴候の欠如の5点を挙げた。また、彼らが経験した側頭葉てんかん、前頭葉てんかんあるいは視床下部過誤腫に伴う笑い発作の症例について検討し、発作時脳波を記録できた4例では、すべて全般性低振幅速波活動を

認めたと報告している。

次いで、1976年にSherらは、2例の笑い発作症例について、発作時脳波では筋電図の混入と体動によるアーチファクトを認めるだけで、てんかん発射を認めなかったと述べている。

Arroyo ら⁴ は、笑い発作に関連し、笑い (laughter) の発生機序について考察している (図4)。すなわち、知覚運動中枢、前頭葉あるいは頭頂葉の知覚関連領域からの情報を側頭葉で楽しい出来事と感じると、これが辺縁系の海馬ならびに前帯状束において過去の楽しい出来事に関する記憶、感情的な事柄を呼び出して、視床前部で表情の表出、視床下部で自動運動を起こす。さらには、脳幹を介し、中脳周辺で感情的な事柄を統合して、橋の脳神経の働きで発声や律動的運動、表情の表出が発現する。また、辺縁系ならびに脳幹部のいずれのレベルにおいても、錐体路が笑いの調整を行っているという。

今回の症例で発作時脳波が明らかなものでは、発作前の徐波主体の背景活動と明らかに異なる全般性の低振幅速波活動を認め、これは前述の Gascon ら² の所見と一致する。

また、頭部 MRI でみると、脳全体の萎縮が著明で、実質は前頭葉ならびに側頭葉にわずかに残存していること、さらに発作時脳波で起始部位は確認できなかったが、発作間歇時脳波では前頭部に突発性発射を認めることから、本症例にみられる笑い発作は前頭葉起源で、これが何らかの機序により CLB の投与で誘発されたと考える。

この点に関し Fried ら⁵ は、難治てんかんの焦点を明らかにするために、頭蓋内硬膜下電極を左前頭葉皮質に装着した16歳の女兒において、補足運動領域前部の電気刺激により笑いを誘発できたという。また、Striano ら⁶ は、過去に経験した笑い発作の自験例9例を総括し、視床下部過誤腫ならびに結節性硬化症に伴う症候性群5例とMRIに異常を認めない潜因性群4例の臨床発作ならびに脳波所見は等しく、脳波上発作間歇時には前頭あるいは側頭領域に突発性発射を認め、発作時には全般性に電気活動の抑制を認めることが多く、さらに漸増律動を認めたという。

CLB と笑い発作の関連について、これまで国内

外で、本症例にみられた笑い発作を含む CLB による新たな発作の誘発についての報告はなく、笑い発作誘発の機序は不明であった。

以上、CLB の導入後に笑い発作が頻発し、入眠が障害された1例を報告した。笑い発作そのものも稀とされているが、Bellman ら⁷ は自験例を挙げ、これは発作として捉えられず、見逃されているためではないかという。

本症例において、CLB を中止すれば笑い発作が消失するか否かは興味深い。CLB 導入前に認められていた全身性の強直発作は完全に消失したため、両親は CLB の継続投与を希望している。

患児の写真を本文中に掲載するに当たっては、その意義を説明し、母親の許可を得た。

本論文の要旨は2001年9月、第35回日本小児神経学会関東地方会ならびに2002年9月、第9回国際小児神経学会議・第7回アジア太平洋小児神経学会議・合同会議において発表した。

文 献

- 1) Gastaut H, Low MD. Antiepileptic properties of clobazam, a 1-5 benzodiazepine, in man. *Epilepsia* 1979;20:437-46.
- 2) Gascon GG, Lombroso CT. Epileptic (gelastic) laughter. *Epilepsia* 1971;12:63-76.
- 3) Sher PK, Brown SB. Gelastic epilepsy: onset in neonatal period. *Am J Dis Child* 1976;130:1126-31.
- 4) Arroyo S, Lesser RP, Gordon B, et al. Mirth, laughter and gelastic seizures. *Brain* 1993;116:757-80.
- 5) Fried I, Wilson CL, MacDonald KA, Behnke EJ. Electric current stimulates laughter. *Nature* 1998;391:650.
- 6) Striano S, Meo R, Bilo L, et al. Gelastic epilepsy: symptomatic and cryptogenic cases. *Epilepsia* 1999;40:294-302.
- 7) Bellman M, Pathan AH, Sinclair L. A girl who laughed and fell down. *Lancet* 2000;355:2216.

本論文は平成14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。

17. ミダゾラムの使用法と注意点

皆川公夫*
Kimio Minagawa

渡邊年秀
Toshihide Watanabe

Key words: ミダゾラム, けいれん重積, けいれん群発

ミダゾラムは速効性で抗けいれん作用が強力なこと、持続静注投与が可能なこと、呼吸・循環に対する影響が少なく基準投与量の範囲内では人工呼吸管理や昇圧薬の投与を必要としないこと、通常量の持続静注期間中でも日常生活動作が可能なこと、半減期が短く主要代謝産物に生物学的活性がほとんどないため中止後の覚醒が速いことなど多くの利点を有するため、わが国においては保険適応外使用ではあるが、最近多くの施設でけいれん重積およびけいれん群発の一次治療ないしは二次治療としてミダゾラム治療が行われている¹⁻⁴⁾。

以下に、てんかんおよび種々の基礎疾患（急性脳炎、髄膜炎、急性脳症、脳血管障害、低酸素性虚血性脳症、代謝障害、熱性けいれんなど）に関連する症候性けいれんの重積、群発あるいは頻発状態に対するミダゾラム治療について、当センターにおける使用方法¹⁻³⁾を中心に紹介し、さらにその際の注意点についても記載した。

【けいれん重積および群発時の治療】

1. ミダゾラム静注治療

けいれん重積および群発時のミダゾラム静注治療方式を図に示す。

1) 1回量静注治療

ミダゾラム注射液（10 mg/2 ml）を生食水か5%糖液で希釈し（当センターでは1 mg/1 mlとすることが多い）、1回量0.15 mg/kg（0.1~0.3

mg/kg）を基準に1 mg/分の速度で静注する。ミダゾラム1回量静注治療はジアゼパム静注に比べ呼吸抑制が少ない、希釈できる、作用も強力であるなどの利点があるため、最近ではジアゼパムに代わって一次治療として用いられることが多くなっている。ミダゾラム1回量静注により速やかにけいれんが止まった場合でも、再発予防と脳の安静を保つ目的で、その後12~24時間程度はミダゾラムの持続静注を行うことが望ましい。ただし、けいれん開始後30分以内ではあるが無治療ではけいれん重積になることが予測される場合に初期治療としてミダゾラム1回量の静注を行い、速やかにけいれんが消失、以後再発の危険性がないと判断されるようなときにはそのまま経過観察としてもよいかと考える。また、いったんけいれんが消失後に再発をみた場合にはジアゼパム静注時と同様、ミダゾラム1回量静注をさらに1~2回反復することもあるが、けいれん抑制が不十分な場合にはミダゾラム1回量静注後引き続きミダゾラム持続静注治療を開始する。

2) 持続静注治療

前述のように、希釈したミダゾラム溶液を0.1~0.15 mg/kg/時で持続静注開始し、けいれん抑制が維持されるまで約10分間隔で0.05~0.1 mg/kg/時ずつ0.3 mg/kg/時まで増量していくが、治療経過によっては0.5 mg/kg/時まで増量してもよい。ちなみに、ミダゾラム持続静注治療の平均有効投与量は0.2 mg/kg/時前後である。ミダゾラム持続静注中は呼吸、循環状態をモニターするが、通常投与量の範囲では人工呼吸管理は不要である。また、脳波でもけいれんが抑制されていることを確認するが、脳波の持続的なモニターは必ずしも

* 北海道立小児総合保健センター小児科
〒047-0261 小樽市銭函1-10-1
TEL 0134-62-5511 FAX 0134-62-5517
E-mail: kimio.minagawa@pref.hokkaido.jp

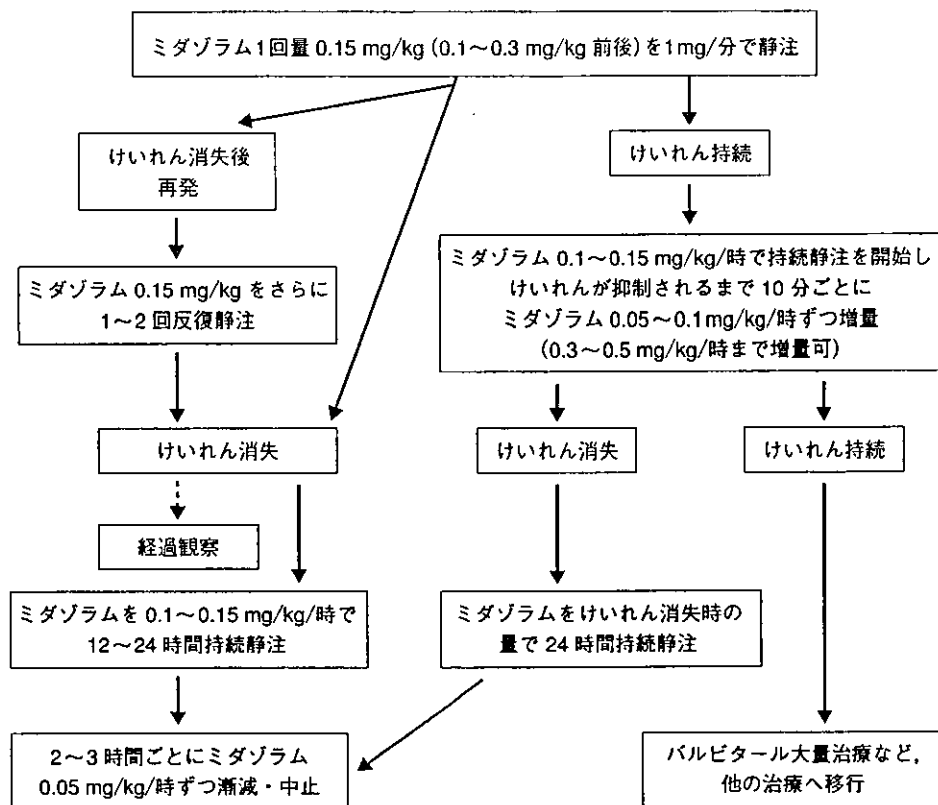


図 けいれん重積および群発時のミダゾラム静注治療方式

必要ない。ミダゾラム持続静注治療によりけいれんが抑制され、その後24時間けいれんの再発がなく全身状態が安定した後は、2~3時間ごとに0.05 mg/kg/時ずつ漸減・中止とするが、長期間持続投与した場合には反跳発作を防ぐためさらに減量速度を2~3倍遅らせることが望ましい。一方、ミダゾラム持続静注開始後もけいれん抑制が得られない場合や効果が不十分と判断した場合には基礎疾患の病態も考慮してできるだけ速やかにバルビタール大量療法など他の治療に切り替える。この際、特異な脳炎・脳症後てんかんの一群、ライ症候群をはじめとする重篤な急性脳症、テオフィリン関連けいれんに基づくけいれん重積、乳児重症ミオクロニーてんかんのけいれん重積、症候性てんかんの強直発作重積などではミダゾラム持続静注治療が無効ないしは効果が不十分な場合があることを念頭において治療すべきである。

2. 筋注、注腸、口腔粘膜投与、点鼻治療

ミダゾラムは静注以外の投与経路も利用できるという利点を有する。けいれんに対するミダゾラム1回量の筋注、注腸、点鼻⁹⁾、口腔粘膜投与による治療の報告があり、比較的速やかに効果が発現するため、静脈確保が困難な場合や家庭での初期治療として利用しようと考えられる。ミダゾラム注射液を用いた投与量は筋注0.15~0.3 mg/kg、注腸0.15~0.3 mg/kg、点鼻0.2~0.3 mg/kg、口腔粘膜投与10 mgと報告されているが、実際の臨床使用にあたってはさらに症例の蓄積と詳細な検討を要すると思われる。

【てんかん発作群発あるいは頻発時の治療】

レノックス症候群をはじめとする難治性症候性てんかんでは強直発作などのてんかん発作が群発ないし頻発し、その抑制に難渋することがある。このような場合にミダゾラム持続静注治療を長期

間継続しながら、急性発作の鎮静化に加え経口抗てんかん薬の調整による発作抑制維持をはかることが可能である。0.1~0.3 mg/kg/時のミダゾラム持続静注では日常生活動作が可能であるため長期間継続しても大きな支障がなく、きわめて有用な治療法である。さらにミダゾラム持続静注治療中にフェニトイン静注など他治療を並行して行うことも可能である。

【ミダゾラム治療にあたっての注意点】

1) 100 時間をこえる長時間持続投与時にはクリアランスが増加し、効果が減弱することがある。

2) 長期間の使用により耐性や依存性が生じることがあるので、減量は緩徐に行う。

3) ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬のフルマゼニルは覚醒遅延などのミダゾラムによる副作用出現時に投与されることがあるが、長期間ベンゾジアゼピン系薬物を投与されているてんかん患者ではけいれんを誘発させる危険性があるため禁忌とされている。

4) ミダゾラムは CYP3A4 の基質であるため、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、ケトコナゾール、ジルチアゼム、ベラパミル、シメチジンなどとの間に相互作用が生じ、ミダゾラムの血中濃度が上昇することがあるため、注意が必要である。また、フェニトインとの併用ではフェニトインの血中濃度が低下しやすいことも知られている。

5) ミダゾラム治療によりけいれんが消失したようにみえても実際にはけいれんが持続している場合があるため、脳波にてけいれんが抑制されていることを確認することが望ましい。

6) 0.3~0.5 mg/kg/時までの通常投与量の範囲内ではミダゾラム自体による呼吸抑制のために人工呼吸管理を必要とすることはないが、脳腫脹を伴う重篤な急性脳症などでは基礎疾患の病態に関連する呼吸抑制のために人工呼吸管理を要することがある。

7) 急性症候性けいれんの中では特異な脳炎・脳症後てんかんの一群とライ症候群をはじめとする重篤な急性脳症およびテオフィリン関連けいれんに基づくけいれん重積ではミダゾラム持続静注

治療が無効な場合が多く、早めにバルビタール大量療法などへ移行するほうがよい。てんかん症候群の中では乳児重症ミオクロニーてんかんのけいれん重積とレノックス症候群をはじめとする難治性症候性てんかんの強直発作重積などでは効果が限られる場合があるが、長期持続投与が可能のため比較的有用性は高いことが多い。

8) バルビタール大量療法（バルビタール昏睡治療）と同様、ミダゾラムを大量投与して脳波所見を burst suppression ないし complete suppression に至らせるミダゾラム昏睡治療の報告⁹⁾があり、最近、筆者らも特異な脳炎・脳症後てんかんの一群の 12 歳女児に対して人工呼吸管理下にミダゾラム持続静注投与量を 1 mg/kg/時まで増加させてみたが、脳波上 burst suppression や complete suppression には至らず、けいれん抑制も不十分で、バルビタール昏睡治療に匹敵するような期待した効果は得られなかった。しかし、1 mg/kg/時のミダゾラム投与量でも呼吸・循環に対する影響は比較的少なく、投与量の安全域はかなり広い印象を受けた。このようなミダゾラム大量投与により前述の報告⁹⁾のように臨床的ならびに脳波学的にバルビタール昏睡治療と同等の効果が得られるのかどうかはさらに今後の検討が必要と考える。

9) 新生児けいれんの治療にもミダゾラムが使われる場合があるが、その適応および使用基準などについては、今後の検討課題である。

文 献

- 1) 皆川公夫：乳児重症ミオクロニーてんかんを有する小児例におけるけいれん重積症に対する midazolam の使用経験。脳と発達 27：498-500, 1995
- 2) 皆川公夫：ミダゾラムによる極重積状態の治療。日本小児臨床薬理学会雑誌 10：40-43, 1997
- 3) 皆川公夫、柳内聖香：小児の極重積状態に対する midazolam 持続点滴療法の有効性。脳と発達 30：290-294, 1998
- 4) Yoshikawa H, Yamazaki S, Abe T, et al: Midazolam as a first-line agent for status epilepticus in children. Brain Dev 22：239-242, 2000
- 5) 藤田浩史、村中秀樹、丸山秀和：Midazolam 経鼻投与によるてんかん重積予防。脳と発達 33：283-284, 2001
- 6) Igartua J, Silver P, Maytal J, et al: Midazolam coma for refractory status epilepticus in children. Crit Care Med 27：1982-1985, 1999

= 原著論文 =

小児のけいれん重積およびけいれん群発に対する 8年間の midazolam 静注治療成績の検討

皆川 公夫 渡邊 年秀

要旨 けいれん重積およびけいれん群発に対して midazolam 静注治療を行った小児のてんかんおよび急性症候性けいれんの計 45 例 82 機会の成績を検討した。Midazolam 初回静注量は平均 0.173 mg/kg, 最大持続静注量は 0.191 mg/kg/hr で, 持続静注時間は 132.7 時間であった。Midazolam 治療の有効率は全体で 85.4%, てんかん群と急性症候性けいれん群では 86.4%と 82.6%, 重積例と群発例では 89.7%と 75.0%であった。無効例は急性脳症, 特異な脳炎・脳症後てんかんの一群 (AERRPS), 症候性てんかんなどであった。Midazolam に関連した副反応は喘鳴 2 機会, 軽度の呼吸抑制 1 機会のみであった。人工呼吸管理例 16 機会と死亡 2 例については midazolam 治療との関連性は認められなかった。

見出し語 midazolam, けいれん重積, けいれん群発, 小児てんかん, 急性脳症

はじめに

最近では日本でも多くの施設で小児のけいれん重積およびけいれん群発の第二次選択治療ないしは第一次選択治療として midazolam 静注治療が行われるようになった。筆者らは 1994 年から本治療法を施行し, 初期の成績についてはすでに報告したが¹⁾, 今回は当センターで行われた 8 年 3 カ月間の midazolam 治療の全成績を総括して報告する。

I 対象・方法

1994 年 4 月から 2002 年 7 月までの 8 年 3 カ月間に北海道立小児総合保健センター小児科にてけいれん重積およびけいれん群発の治療として midazolam 静注治療を施行した 45 例 82 機会を対象とした (表 1)。なお, けいれん重積は 30 分以上にわたりけいれん発作または

非けいれん性てんかん発作が持続した場合とし, けいれん群発は発作が頻繁に反復するが発作間に意識が回復する場合とした。対象のうち, てんかんは 22 例 59 機会 (けいれん重積 41 機会, けいれん群発 18 機会) で, 他は急性症候性けいれんが 23 例 23 機会 (けいれん重積 17 機会, けいれん群発 6 機会) であった。てんかん例の内訳は Lennox-Gastaut 症候群 (Lennox-Gastaut syndrome, LGS) 2 例と早期乳児てんかん性脳症 (early infantile epileptic encephalopathy with suppression burst, EIEE) 1 例を含む症候性全般てんかん (symptomatic generalized epilepsy, SGE) が 8 例 17 機会 (6 機会 1 例, 3 機会 2 例, 1 機会 5 例), 症候性局在関連てんかん (symptomatic localization-related epilepsy, SLRE) が 7 例 11 機会 (3 機会 1 例, 2 機会 2 例, 1 機会 4 例), 潜因性局在関連てんかん (cryptogenic localization-related epilepsy, CLRE) が 1 例 1 機会, 乳児重症ミオクロニーてんかん (severe myoclonic epilepsy in infancy, SME) 3 例を含む未決定てんかん (undetermined epilepsy, UE) が 5 例 29 機会 (10 機会 2 例, 6 機会 1 例, 2 機会 1 例, 1 機会 1 例), 特発性全般てんかん (idiopathic generalized epilepsy, IGE) が 1 例 1 機会であった。急性症候性けいれん例の内訳は Reye 症候群 2 例とインフルエンザ脳症 3 例を含む急性脳症が 8 例, 風疹脳炎 1 例とアデノウイルス脳炎 1 例と特異な脳炎・脳症後てんかん

北海道立小児総合保健センター小児科

連絡先 〒047-0261 小樽市銭函 1-10-1

北海道立小児総合保健センター小児科

(皆川公夫)

E-mail: kimio.minagawa@pref.hokkaido.jp

(受付日: 2003. 4. 24, 受理日: 2003. 6. 16)

の一群 (acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures, AERRPS) 1例を含む脳炎が4例, 化膿性髄膜炎が2例, 心臓手術に伴う急性低酸素性脳症が2例, 脳梗塞が1例, theophylline 関連けいれんが2例,

表1 対象45例82機会の詳細

1. てんかん	22例59機会 (けいれん重積 41機会, けいれん群発 18機会)
SGE	8例 17機会 6機会 1例 3機会 2例 (LGS 1) 1機会 5例 (LGS 1, EJEE 1)
IGE	1例 1機会
SLRE	7例 11機会 3機会 1例 2機会 2例 1機会 4例
CLRE	1例 1機会
UE	5例 29機会 10機会 2例 (SME 1) 6機会 1例 (SME 1) 2機会 1例 1機会 1例 (SME)
2. 急性症候性けいれん	23例23機会 (けいれん重積 17機会, けいれん群発 6機会)
急性脳症	8例 (Reye 症候群 2, インフルエンザ脳症 3, その他 3)
脳炎	4例 (麻疹脳炎 1, アデノウイルス脳炎 1, AERRPS 1, その他 1)
髄膜炎	2例 (PRSP 1, H.flu 1)
低酸素脳症	2例
脳梗塞	1例
Theophylline 関連けいれん	2例
熱性けいれん	3例
低ナトリウム血症	1例
発作型	
全身性強直間代発作	31機会
強直発作	19機会
ミオクロニー発作	3機会
間代発作	1機会
脱力発作	1機会
二次性全般化発作	26機会
複雑部分発作	1機会
年齢	1カ月～20歳1カ月 (平均4歳5カ月)
体重	3.0～35.0 kg (平均13.2 kg)
第二次選択治療	47機会 前治療薬: DZP 静注, DZP 坐薬, PB 筋注, PB 坐薬, Lidocaine 持続静注, Chloral hydrate 坐薬
第一次選択治療	35機会
けいれん重積	58機会 (てんかん例 41機会, 急性症候性例 17機会) 持続時間 30～720分 (平均127.3分)
けいれん群発	24機会 (てんかん例 18機会, 急性症候性例 6機会) 持続時間 1時間～3日

SGE: 症候性全般てんかん, IGE: 特発性全般てんかん,
SLRE: 症候性局在関連てんかん, CLRE: 器因性局在関連てんかん,
UE: 未決定てんかん, LGS: Lennox-Gastaut 症候群, EJEE: 早期乳児てんかん性脳症,
SME: 乳児重症ミオクロニーてんかん, AERRPS: 異なる脳炎・脳症後てんかんの一群,
PRSP: ペニシリン耐性肺炎球菌, H.flu: インフルエンザ

熱性けいれんが3例、低ナトリウム血症が1例で、全例各1機会であった。発作型は全身性强直間代発作が31機会、二次性全般化発作が26機会、強直発作が19機会、ミオクローニー発作が3機会、間代発作、脱力発作、複雑部分発作が各1機会であった。

Midazolam 治療時の年齢は1カ月から20歳1カ月(平均4歳5カ月)、体重は3kgから35kg(平均13.2kg)であった。

Midazolam 治療は diazepam (DZP) の静注、DZP 坐薬、phenobarbital (PB) の筋注、PB 坐薬、phenytoin (PHT) 静注、lidocaine 持続静注、chloral hydrate 坐薬などの治療に反応しなかった場合の第二次選択治療として行われた例が47機会、第一次選択治療として施行された例が35機会あった。

全82機会中けいれん重積は58機会(てんかん41機会、急性症候性けいれん17機会)で、midazolam 治療開始までのけいれん持続時間は30分~720分、平均127.3分であった。残り24機会(てんかん18機会、急性症候性けいれん6機会)はけいれん群発で、持続時間は1時間から3日であった。

Midazolam は最初0.15 mg/kg を基準に1回量を静注し、引き続き0.1~0.15 mg/kg/hr を基準に持続静注を開始、けいれんが消失するまで最大0.3~0.5 mg/kg/hr まで漸増した。最初の1回量投与により速やかにけいれんが消失した場合でも引き続き持続投与を行うことを原則としたが、担当医の判断により最初の1回量静注のみで持続投与を行わなかった例が3機会、持続投与へ移行する前に1回量を2回まで反復投与した例が7機会、また1回量を投与せずに最初から持続静注を開始した例が21機会(けいれん重積10機会、けいれん群発11機会)みられた。けいれんの消失後24時間にわたりけいれんの再発がなく全身状態が安定した場合はmidazolam を漸減中止した。なお、可能な限り脳波にてけいれんが消失していることを確認したが、けいれんが消失しない場合には速やかに他の治療に移行した。また、midazolam 治療中は呼吸、循環をモニターし、必要に応じて支持療法を行った。

Midazolam 治療は全例口頭にて同意を得て行った。

これらの対象について、小児のけいれん重積およびけいれん群発に対するmidazolam 静注治療の有効性および副反応などを分析、検討した。

なお、てんかん例と急性症候性けいれん例の有効率の差の有無およびけいれん重積例とけいれん群発例の有効率の差の有無については χ^2 乗検定を行って判定し、有意水準は $p < 0.05$ とした。

II 成績

Midazolam 静注治療成績を表2に示す。

Midazolam 初回量静注投与は61機会(けいれん重積48機会、けいれん群発13機会)に行われた。初回投与量(反復投与した例では合計投与量)は0.06~0.4 mg/kg、平均0.173 mg/kgで、midazolam 初回量静注後速やかにけいれんが消失したのはけいれん重積が27機会(56.3%)とけいれん群発が1機会(7.7%)の計28機会(45.9%)であった。

Midazolam 持続静注投与は79機会(けいれん重積55機会、けいれん群発24機会)に行われた。持続静注開始時の投与量は0.05~0.3 mg/kg/hr、平均0.149 mg/kg/hr、最大持続静注投与量は0.05~0.4 mg/kg/hr、平均0.191 mg/kg/hrで、持続静注時間は3.0~768時間、平均132.7時間であった。持続投与開始後にけいれんが消失したのは34機会(けいれん重積25機会、けいれん群発9機会)で、持続静注開始後最終的なけいれん消失までの時間は10~45分、平均24分であった。なお、持続静注治療中に一旦抑制されたけいれんが再発した場合でも増量などにより最終的に抑制された場合にはけいれん消失として評価した。

これらを総括すると、midazolam 初回静注投与によりけいれんが消失し持続静注投与中もけいれん抑制を維持しえた28機会および持続静注投与によりけいれんが消失した34機会の計82機会中62機会(75.6%)でけいれんの消失がえられた。このうち、けいれん重積例では58機会中52機会(89.7%)、けいれん群発例では24機会中10機会(41.7%)でけいれんが消失した。また、けいれん群発例ではmidazolam 治療によりけいれん頻度が治療前の50%以下に減少したのが8機会あった。これらけいれん消失例とけいれん頻度が50%以下に減少した例を有効として評価すると、計82機会中70機会が有効となり、midazolam 治療全体の有効率は85.4%であった。なお、けいれん重積例での有効率は89.7%、けいれん群発例での有効率は75.0%で、けいれん重積例での有効率がけいれん群発例よりやや上回ったが、統計的有意差は認められなかった。また、けいれん重積例、けいれん群発例ともmidazolam 1回量投与のみの場合に比較して引き続き持続投与を行った場合の方が明らかに有効率が高かったが、とくにけい

表2 治療成績

初回量静注投与 投与量	61 機会 (重積 48, 群発 13) 0.06 ~ 0.4 mg/kg (平均 0.173 mg/kg)
持続静注投与 開始量	79 機会 (重積 55, 群発 24) 0.05 ~ 0.3 mg/kg/hr (平均 0.149 mg/kg/hr)
最大量	0.05 ~ 0.4 mg/kg/hr (平均 0.191 mg/kg/hr)
投与時間	3.0 ~ 768 時間 (平均 132.7 時間)
1. けいれん消失 (+)	62 機会 (75.6%)
初回静注	28 機会 (重積 27, 群発 1)
持続静注	34 機会 (重積 25, 群発 9) けいれん消失までの時間 10 ~ 45 分 (平均 24 分)
2. けいれん 50%以上減少 (群発例)	8 機会 (9.8%)
有効率 (1 + 2)	全対象例 85.4% 重積例 89.7% / 群発例 75.0% てんかん例 86.4% / 急性症候性けいれん例 82.6% 第二次選択治療例 85.1% / 第一次選択治療例 85.7%
3. けいれん減少 50%未満 (群発例)	4 機会 (4.9%) 急性脳症 1 例, SGE 3 例 (LGS 1, EIEE 1)
4. 重積離脱も抑制なし (重積例)	6 機会 (7.3%) Reye 症候群 1 例, 髄膜炎 1 例, SGE 2 例 (LGS 1), SLRE 1 例 (2 機会)
5. けいれん消失 (-)	2 機会 (2.5%) SLRE 1 例, AERRPS 1 例
Midazolam 関連副反応 喘鳴	1 例 (2 機会) UE (染色体異常)
軽度呼吸抑制	1 例 (SGE)
Midazolam 非関連重篤事象 酸素投与	4 例 (SGE 1, SLRE 1, SME 1, 低ナトリウム 1)
人工呼吸管理	15 例 (16 機会) 急性脳症 5 例 (Reye 症候群 2, インフルエンザ脳症 1) 脳炎 3 例 (アデノウイルス脳炎 1, AERRPS 1) 髄膜炎 1 例 低酸素脳症 2 例 Theophylline 関連けいれん 2 例 SLRE 2 例 (3 機会)
死亡	2 例 (Reye 症候群 2)

SGE: 症候性全般てんかん, SLRE: 症候性局在関連てんかん,
LGS: Lennox-Gastaut 症候群, EIEE: 早期乳児てんかん性脳症,
SME: 乳児重症ミオクロニーてんかん, AERRPS: 特異な脳炎・脳症後てんかんの一群

れん群発例では midazolam 1 回量投与のみではけいれん消失率は 7.7%と低かったが、持続投与により有効率が 75.0%と著しく上昇した。次に、これらの成績をてんかん例と急性症候性けいれん例に分けて比較すると、てんかん例の有効率は 86.4% (59 機会中 51 機会) で有効)、急性症候性けいれん例の有効率は 82.6% (23 機会中 19 機会) で、両群間に有効率の統計学的有意差は認められなかった。また、midazolam 静注治療が第二次選択治療として行われた例での有効率は 85.1% (47 機会中 40

機会) で有効)、第一次選択治療として施行された例での有効率は 85.7% (35 機会中 30 機会) で、midazolam 治療は第二次選択治療および第一次選択治療ともに有効であった。

一方、midazolam 治療によりけいれん群発から離脱できなかった SLRE 1 例と AERRPS 1 例の 2 機会は無効と判断し、thiamylal 持続静注治療に切り替えた。また、けいれん重積例のうち midazolam 治療によりけいれん重積からは離脱できたが、完全抑制には至らなかった例が 6 機会みられたが、すべて群発

型けいれん重積例で、内訳は Reye 症候群 1 例、髄膜炎 1 例、LGS 1 例を含む SGE 2 例、SLRE 1 例 2 機会であった。さらに、けいれん群発例のうちけいれん頻度の減少が治療前の 50%未満に留まったのは 4 機会、内訳は急性脳症 1 例、脱力発作群発の LGS 1 例と EIEE 1 例を含む SGE 3 例であった。これら計 12 機会は無効と評価した。

Midazolam 治療中に midazolam に関連して生じた副反応は喘鳴が 1 例（染色体異常を伴った UE）2 機会、軽度の呼吸抑制が 1 例（SGE）1 機会の計 3 機会（3.7%）のみであった。

なお、人工呼吸管理を要した例が 15 例 16 機会あったが、内訳は Reye 症候群を含む急性脳症 5 例 5 機会、AERRPS を含む脳炎 3 例 3 機会、急性低酸素性脳症 2 例 2 機会、theophylline 関連けいれん 2 例 2 機会、SLRE 2 例 3 機会、midazolam 治療との関連性は認められなかった。また、酸素投与例が 4 例、Reye 症候群による死亡例が 2 例みられたが、これらも midazolam 治療とは無関係であった。

Ⅲ 考 察

従来からけいれん重積の治療には第一選択として DZP 静注が行われているが、DZP 治療には効果持続時間が短いことや呼吸に対する影響などの問題点がある。

Midazolam は速効性で DZP より強力な抗けいれん作用を有すること、水溶性のため持続静注投与が可能であること、呼吸循環に対する影響が少なく基準投与量の範囲では人工呼吸管理や昇圧薬の投与が不要であること、半減期が短く主要代謝産物に生物学的活性がほとんどないため投与中止後の覚醒が速いことなど多くの利点を有するため、外国では小児のけいれん重積の主として第二次選択治療薬として使用されるようになった¹⁰⁾。Midazolam は日本では 1988 年に発売され、麻酔薬、鎮静薬として主に麻酔科領域で用いられていたが、筆者らはこれら midazolam の薬理学的特性に注目し、1994 年の早期から小児のけいれん重積およびけいれん群発に対して midazolam 静注治療を開始し、初期の成績についてその有用性を報告してきた¹⁾。その後現在までに多数の midazolam 治療例が蓄積されたため、今回は midazolam の治療成績を総括して検討した。

その結果、小児のけいれん重積およびけいれん群

発に対する midazolam 静注治療の有効率は各々 89.7%と 75.0%で、全体では 85.4%と高かった。また、第二次選択治療例、第一次選択治療例とも有効率は 85.1%、85.7%と高率であった。一方、midazolam 治療に関連する副反応は 3.7%と少なくかつ軽微であった。したがって、midazolam 静注治療は小児のけいれん重積およびけいれん群発に対してきわめて有用な治療法であり、第二次選択治療のみならず、第一次選択治療としても有効と考える。

今回の検討ではてんかん例と急性症候性けいれん例との間に有効性の差はみられなかったが、Reye 症候群をはじめとする急性脳症、AERRPS、発作頻度の高い難治性てんかんに無効例が認められ、これらの疾患では予め midazolam 治療の効果が限られる可能性を念頭において治療を行う必要がある。

ちなみに、LGS では benzodiazepine 系薬物により強直発作重積が誘発されることがあることが知られており¹¹⁾、強直発作重積の治療に対する benzodiazepine 系薬物の使用は注意を要するが、今回の成績から midazolam は強直発作重積に対しても発作を増悪させることなく治療効果を期待できると考える。

けいれん重積およびけいれん群発に対する midazolam 静注治療は原則として最初 1 回量を静注後引き続き持続静注投与を行う方法が最も有効性が高いが、最初の 1 回量投与のみで持続投与を行わなかった例が少数機会みられ、midazolam 治療開始前のけいれん持続時間が比較的短く、最初の 1 回量静注により速やかにけいれんが消失し、以後全身状態が良好で基礎疾患の状況から再発の危険性がないと判断できるような場合には持続投与せずにそのまま経過観察とすることも可能かと考える。また、主としてけいれん群発の治療の際に初回量を投与せずに最初から持続静注を開始した例が比較的多くみられたが、過去の治療経過から midazolam 持続静注治療の効果が予め確認できるような例では最初の 1 回量投与なしに持続静注投与から開始することも可能である。

Midazolam 持続静注開始後けいれん消失に至るまでの時間は 10 分から 45 分であったが、最大投与量に至るまでの反応状況と基礎疾患の病態を考慮して他治療への切り替えの時期を適切に判断することが重要である。

今回の検討では midazolam 持続静注時の最大投与

量を0.3～0.5 mg/kg/hrとしたが、より高用量投与の報告⁷⁾もあり、今後midazolamの有効投与量を規定するにはけいれん抑制に対するmidazolamの有効血中濃度の検討が必要と考える。

また、今回の対象ではmidazolam持続静注時間は平均132.7時間(5.5日)と長期に及んだが、とくに10日を超えた例は8例あり、全例発作頻度が高くけいれん重積や群発をきたしやすい難治性てんかん例(SME 1機会, SGE 6機会, SLRE 1機会)であった。これらの例では持続静注期間中に経口抗てんかん薬の調整を行ったり、発熱が長引いたり、減量速度をきわめて緩徐に行ったことなどが持続投与期間の長期化の要因と思われた。

Midazolamは呼吸循環に対する影響が少なく、安全性の高い薬物であるが、今回の成績でも喘鳴が2機会と軽度の呼吸抑制が1機会のみで、midazolam治療に関連して人工呼吸管理を必要とした例はなかった。したがって、midazolam治療開始前の呼吸状態が安定していて通常量のmidazolamを投与する場合には予め気管内挿管あるいは人工呼吸管理を行う必要はない。しかし、けいれん重積自体の影響や急性脳症など基礎疾患の病態の影響により、重篤な呼吸抑制をきたし、人工呼吸管理などの支持療法が必要となることがあるので、病態を的確に把握して判断することが大切である。

Midazolamは安全に長期持続静注投与ができるという利点があるが、長期投与により依存性が生じることがあり、中止にあたっては反跳発作を防ぐため緩徐に減量することが必要である。また、midazolamは100時間を超えて長期持続投与を行うとクリアランスが増加し効果が減弱することがある⁸⁾こと、長期投与により耐性が生じることがあること、全身状態不良時には半減期が延長することがあること、midazolamはCYP3A4の基質であるため種々の薬剤との間で相互作用を生じmidazolam血中濃度が上昇することがあるなどの薬理学的特性を有するため、midazolam治療に当たってはこれらの点に注意する。

現在、日本ではけいれん重積およびけいれん群発に対するmidazolam治療は、保険適応外治療にもかかわらず多くの施設で行われており、当センターをはじめ他施設⁹⁾からもその有効性が報告されている。今後多施設共同研究によりさらに多数例での有用性を確認し、一刻も早く小児のけいれん重積およびけいれん群発に対して、midazolam静注治療が保険適応になることが望まれる。

文 献

- 1) 皆川公夫. 乳児重症ミオクロニーてんかんを有する小児例におけるけいれん重積症に対するmidazolamの使用経験. 脳と発達 1995;27:498-500.
- 2) 皆川公夫. ミダゾラムによる痙攣重積状態の治療. 日小臨薬理会誌 1997;10:40-3.
- 3) 皆川公夫, 柳内聖香. 小児の痙攣重積状態に対するmidazolam持続点滴療法の有用性. 脳と発達 1998;30:290-4.
- 4) Rivera R, Segnini M, Bahodano A, Perez V. Midazolam in the treatment of status epilepticus in children. *Crit Care Med* 1993;21:991-4.
- 5) Koul RL, Aithala GR, Chacko A, Joshi R, Elbualy MS. Continuous midazolam infusion as treatment of status epilepticus. *Arch Dis Child* 1997;76:445-8.
- 6) Igarua J, Silver P, Maytal J, Mayer S. Midazolam coma for refractory status epilepticus in children. *Crit Care Med* 1999;27:1982-5.
- 7) Singhi S, Murthy A, Singhi P, Jayashree M. Continuous midazolam versus diazepam infusion for refractory convulsive status epilepticus. *J Child Neurol* 2002;17:106-10.
- 8) Koul R, Chacko A, Javed H, Al Riyami K. Eight-year study of childhood status epilepticus: midazolam infusion in management and outcome. *J Child Neurol* 2002;17:908-10.
- 9) Perucca E, Gram L, Avanzini G, Dulac O. Antiepileptic drugs as a cause of worsening seizures. *Epilepsia* 1998;39:5-17.
- 10) Booker PD, Beechey A, Lloid-Thomas AR. Sedation for children requiring artificial ventilation using an infusion of midazolam. *Br J Anaesth* 1986;58:1104-8.
- 11) Yoshikawa H, Yamazaki S, Abe T, Oda Y. Midazolam as a first-line agent for status epilepticus in children. *Brain Dev* 2000;22:239-42.

本論文は平成14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。

Original Article

Three-year follow up of term and near-term infants treated with inhaled nitric oxide

HIROYUKI ICHIBA,¹ SATOKO MATSUNAMI,² FUMIHIDE ITOH,² TORU UEDA,²
YUKINOBU OHSASA² AND TSUNEKAZU YAMANO¹

¹Department of Pediatrics, Osaka City University Graduate School of Medicine, and ²Department of Pediatrics, Osaka City Sumiyoshi Hospital, Osaka, Japan

Abstract

Background: The present study describes the outcome at 3 years in term and near-term infants treated with inhaled nitric oxide (iNO) for persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN).

Methods: The study population consisted of 18 infants delivered at ≥ 34 weeks by best obstetric estimate who were admitted to the neonatal intensive care units with a diagnosis of PPHN.

Results: Eighteen infants (mean gestational age 38.5 ± 2.6 weeks, mean birthweight 3015 ± 587 g) were treated with iNO. The mean oxygenation index before iNO was 27.2 ± 15.2 . Responses to iNO were classified into three groups: (i) early response in eight infants; (ii) late response in two; and (iii) poor response in eight infants. Three infants died within seven postnatal days. Fifteen surviving infants were followed up to 3 years. The mean developmental scale was 98.4 ± 9.0 . One infant was diagnosed with severe neurodevelopmental disability due to cerebral palsy. Another infant was diagnosed with mild neurodevelopmental disability because of a low developmental scale. No infant showed significant hearing loss. Five infants had reactive airway disease (RAD) at 18 months, these infants required a significantly longer duration of mechanical ventilation in their neonatal period than non-RAD infants ($P = 0.02$). The frequency of survival with normal neurodevelopmental outcome was significantly higher in the early response group than the late or poor response groups ($P = 0.03$).

Conclusion: In iNO-treated PPHN, mortality and neurodevelopmental outcome were associated with response to iNO, and pulmonary outcome was associated with duration of mechanical ventilation.

Key words persistent pulmonary hypertension of the newborn, inhaled nitric oxide, follow up, prognosis.

Persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) is a neonatal respiratory disorder characterized by elevated pulmonary vascular resistance, extra-cardiac right-to-left shunting, and severe arterial hypoxemia. Persistent pulmonary hypertension of the newborn causes significant morbidity and mortality. The conventional management of PPHN has included hyperventilation, intravenous vasodilators, inotropic agents, and volume expanders. Extracorporeal membrane

oxygenation (ECMO) has been performed in infants who showed a poor response to conventional management.

Nitric oxide (NO) is an endogenous vasodilator produced in endothelial cells. Inhaled NO (iNO) is a selective pulmonary vasodilator and it does not affect systemic vascular resistance because of immediate inactivation in pulmonary blood vessels. The first reports of iNO therapy in severely hypoxic newborn infants showed dramatic improvements in oxygenation.^{1,2} In recent years, iNO therapy has reduced the requirements for ECMO in severe PPHN infants.^{3,4} Although iNO therapy is commonly used in near-term newborn infants with PPHN, there are only four follow-up reports concerning long-term outcome.^{5–8} Moreover, no report has investigated the association of neonatal clinical data with a long-term outcome. The present article describes the outcome at 3 years in PPHN infants treated with iNO.

Correspondence: Dr Hiroyuki Ichiba, Department of Pediatrics, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahimachi, Abenoku, Osaka 545-8585, Japan.

Email: h-ichiba@med.osaka-cu.ac.jp

Received 19 July 2002, revised 3 October 2002, accepted 4 October 2002.

Methods

The study population observed from 1996 to 1998 consisted of 18 infants who were delivered at ≥ 34 weeks by best obstetric estimate and admitted to the neonatal intensive care units of Osaka City University Hospital or Osaka City Sumiyoshi Hospital with a diagnosis of PPHN.

All infants were treated with iNO. Eligibility criteria included less than seven days of age, evidence of PPHN defined by echocardiography (right-to-left shunting across the patent ductus arteriosus and/or foramen ovale), presence of severe systemic hypoxemia ($\text{PaO}_2 < 80$ torr on $\text{FiO}_2 1.0$), and failure to respond to conventional intensive therapies as defined in the Japanese Neonatal Inhaled NO Therapy Study Group.⁹ Patients who had a structural cardiac anomaly were excluded.

The initial dose of iNO was 10 p.p.m. This was changed to the minimal dosage that sustained adequate oxygenation. The maximum dose was 40 p.p.m. Medical management of PPHN was performed simultaneously, and this included conventional mechanical ventilation or high frequency oscillatory ventilation, inotropic agents (dopamine and dobutamine), and volume expanders. Hyperventilation was not performed.

Responses to iNO were classified into three groups according to the reduction in oxygenation index ($\text{OI} = \text{mean airway pressure} \times \text{FiO}_2 / \text{PaO}_2 \times 100$) from baseline with iNO. An early response was defined as an OI reduction below 10 within 1 h after iNO initiation.

A late response was defined as an OI reduction below 10 within 1–24 h after iNO initiation. A poor response was defined as $\text{OI} > 10$ during 24 h after iNO initiation.

All studied infants who survived were followed up at 4 months, 10 months, 18 months, and 3 years. Neurologic and developmental evaluations were performed by pediatricians and pediatric psychologists. The Japanese standard developmental scales (Kyoto Scale of Psychological Development or Tsumori Inage Scale of Psychological Development) were used at 3 years for the developmental evaluation of the studied infants. The auditory brainstem response (ABR) was used to screen hearing of the infants at 4 and 18 months. Severe neurodevelopmental disability was defined as a developmental score < 70 or an abnormal neurological finding including hypotonia or hypertonia which impaired normal function. A mild neurodevelopmental disability was defined as a developmental score between 70 and 84, or an abnormal neurological finding that did not impair normal function. Reactive airway disease (RAD) was defined as frequent wheezing episodes that required chronic bronchodilator therapy or hospital admission.

Continuous variables were analyzed by Student's *t*-test. Categorical variables were analyzed by Fisher's exact probability test or chi-squared test. Findings associated with a value of $P < 0.05$ were considered significant.

Table 1 Response to inhaled nitric oxide according to diagnosis associated with persistent pulmonary hypertension of the newborn

Diagnosis	Response (no. cases)		
	Early	Late	Poor
Meconium aspiration syndrome	4	1	6
Pneumonia	2	0	0
Pneumothorax	1	0	0
Respiratory distress syndrome	1	0	0
Dry lung syndrome	0	1	0
Congenital diaphragmatic hernia	0	0	1
Hypoplastic lung	0	0	1

Table 2 Three-year outcome of studied infants ($n = 15$)

Outcome	No. cases (%)
Severe neurodevelopmental disability	1 (6.7)
Mild neurodevelopmental disability	1 (6.7)
Abnormal auditory brainstem response finding	0 (0.0)
Reactive airway disease at 18 months	5 (33.3)
Reactive airway disease at 3 years	2 (13.3)

Results

Eighteen infants were treated with iNO. The mean gestational age was 38.5 ± 2.6 (mean \pm SD) weeks, and mean birth weight was 3015 ± 587 g. The diagnoses associated with PPHN were meconium aspiration syndrome (MAS) in 11 infants, congenital pneumonia in two infants, and pneumothorax, respiratory distress syndrome (RDS), dry lung syndrome (DLS), congenital diaphragmatic hernia (CDH), and hypoplastic lung in one infant each. The mean OI before initiating iNO therapy was 27.2 ± 15.2 . An early response was noted in eight infants, a late response in two infants, and a poor response in eight infants. Three infants treated with extracorporeal membrane oxygenation after iNO treatment had failed died within seven postnatal days.

The responses to iNO therapy according to diagnoses associated with PPHN are shown in Table 1. All infants with congenital pneumonia, pneumothorax, RDS, and DLS showed early or late responses. In contrast, with the 11 MAS infants, four showed an early response, one showed a late response, and six showed a poor response. The infants with both CDH and hypoplastic lung showed poor response.

The 3-year outcome of the infants studied is shown in Table 2. None of the infants died during the follow-up period. Fifteen surviving infants were followed to 3 years of age. The mean \pm SD value on the Kyoto Scale of Psychological Development was 98.4 ± 9.0 ($n = 14$). One infant was diagnosed with severe neurodevelopmental disability due to cerebral palsy impairing normal motor function.

Table 3 Mean neonatal respiratory parameters in infants with reactive airway disease (RAD) versus those without RAD at 18 months

Parameter	With RAD	Without RAD	P
No. infants	5	10	
Duration of MV (days)	15.1 ± 5.2	5.8 ± 0.4	0.02
OI before iNO	19.1 ± 9.5	29.2 ± 13.6	0.13
Duration of iNO (h)	54.8 ± 10.6	43.4 ± 9.8	0.50

MV, mechanical ventilation; OI, oxygenation index; iNO, inhaled nitric oxide.

Table 4 Relationship between the response to inhaled nitric oxide (iNO) therapy and outcome

Response to iNO	Outcome (no. cases)*		
	Death	Disability	Normal
Early response	0	0	8
Late response	0	1	1
Poor response	3	1	4

* $P = 0.08$.

One infant was diagnosed with mild neurodevelopmental disability with a developmental scale of 74. No infant showed abnormal ABR findings. Five infants had RAD at 18 months, but three had a spontaneous resolution at 3 years. No significant differences were observed between the RAD and non-RAD infants in the family histories of asthma or atopic disease. Infants who had RAD at 18 months required a significantly longer duration of mechanical ventilation (MV) in their neonatal period than non-RAD infants ($P = 0.02$). No significant differences were observed between the RAD and non-RAD infants with respect to the OI before iNO therapy and the duration of iNO therapy (Table 3).

The relationship between the responses to iNO therapy and outcome is shown in Table 4. All infants with an early response survived and showed normal neurodevelopmental outcome at 3 years of age, while some infants with late or poor response died or had a neurodevelopmental disability (Table 4). The frequency of survival with normal neurodevelopmental outcome was significantly higher in the early response group than the other groups ($P = 0.03$; Table 5). Table 6 shows the relationship between the OI before iNO therapy and outcome. The outcome was not associated with the severity of PPHN before iNO therapy.

Discussion

We report the outcome at 3 years in PPHN infants treated with iNO, and, for the first time, the association of neonatal clinical data with a long-term outcome. The response to iNO

Table 5 Relationship between responses to inhaled nitric oxide (iNO) therapy and outcome

Response to iNO	Outcome (no. cases)*	
	Death or disability	Normal
Early response	0	8
Late or poor response	5	5

* $P = 0.03$.

Table 6 Relationship between the severity of persistent pulmonary hypertension of the newborn before inhaled nitric oxide (iNO) therapy and outcome

Oxygenation index before iNO	Outcome (no. cases)*		
	Death	Disability	Normal
<20	2	0	5
21-40	0	1	5
>40	1	1	3

* $P = 0.53$.

therapy varied with the etiology of PPHN. Yamaguchi *et al.* classified the pathogenesis of PPHN into two groups: vascular disease and mixed disease, where mixed disease included vascular plus interstitial, alveolar and/or airways disease.⁹ Infants with vascular disease showed a significantly better response than those with a mixed disease. In our population, three infants with poor response to iNO died in the early neonatal period; all had mixed disease.

Four studies report on the neurodevelopmental outcome of infants with PPHN treated with iNO.⁵⁻⁸ Rosenberg *et al.* reported that of 51 infants at 1 year (11.8%) and at 2 years, 12.1% had severe neurodevelopmental disability and the neurodevelopmental outcome appeared similar to that reported in ECMO populations.⁷ The mean developmental scale in the study patients was within the normal range. These results are consistent with neurodevelopmental outcome at 3 years in our population. By contrast, the national inhaled nitric oxide study group⁴ and Lipkin *et al.*⁶ report a higher incidence of neurodevelopmental disability. In the present study, the frequency of survival with normal neuro-developmental outcome was significantly higher in the early response group than the late or poor response groups.

Moreover, no significant correlation was found between OI before iNO and the outcome. These results suggest that outcome is associated with the response to iNO therapy, rather than the severity of PPHN. Poor outcome in infants with PPHN has been considered to be partially associated with hyperventilation therapy.^{10,11} This therapy causes prolonged hypocapnea that leads to intense cerebral vasoconstriction, possibly resulting in cerebral hypoxemia.¹²

However, PPHN infants treated with iNO may not require hyperventilation therapy. We did not include hyperventilation therapy. Thus, damage of the central nervous system in infants treated with iNO may be caused by the underlying disease which produces perinatal or neonatal hypoxic-ischemic insults. Infants with late or poor response are exposed to prolonged hypoxia, which can cause damage to the central nervous system.

In our population, no infants had significant sensorial hearing loss at 3 years. The prevalence of sensorial hearing loss in infants with PPHN has been reported elsewhere from 0 to 100% at 3 months to 4 years of age.¹³ Although the prevalence of sensorial hearing loss in infants receiving hyperventilation therapy is reported to be 20–100%,¹³ Marron *et al.* report a 0% incidence in infants without hyperventilation therapy.¹⁴ Hyperventilation therapy causes prolonged hypocapnea that can lead to intense cerebral vasoconstriction,¹² resulting in hypoxemia of the auditory nuclei. Sensorial hearing loss might also involve an influence of alkalosis on the sodium-potassium pump or the chemical composition of the endolymph, which has an impact on the perception of sound.¹⁴ Infants with sensorial hearing loss have not been reported in any other study of iNO therapy. Inhaled nitric oxide therapy, by making hyperventilation therapy unnecessary, may reduce the prevalence of sensorial hearing loss in infants with PPHN.

Nitric oxide is a free radical, which forms peroxynitrite or nitrogen dioxide in the setting of a high oxygen concentration. Peroxynitrite and nitrogen dioxide are associated with lung injury.¹⁵ Inhaled nitric oxide therapy, therefore, may potentially injure the neonatal lung. In our population, five of 15 (33.3%) infants had RAD at 18 months, but three infants showed spontaneous resolution by 3 years. Reactive airway disease was associated with the duration of MV, rather than the severity of PPHN or the duration of iNO therapy. Dobyns *et al.*¹⁵ found that iNO therapy for PPHN did not alter lung function during the early infancy. Moreover, lung function was not significantly different in a preterm lamb model of hyaline membrane disease between those treated with iNO and control animals.¹⁶ These results suggest that iNO therapy is not associated with lung injury and RAD in this population, and is more likely to be associated with barotrauma or volutrauma.¹⁷

In conclusion, we showed for the first time in iNO-treated PPHN that mortality and neurodevelopmental outcome are associated with the response to iNO therapy; pulmonary outcome was associated with the duration of MV, rather than the duration of iNO therapy.

References

- 1 Kinsella JP, Neish SR, Shaffer E, Abman SH. Low-dose inhalational nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; **340**: 819–20.
- 2 Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WM. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; **340**: 818–19.
- 3 Roberts JD, Fineman JR, Morin FC *et al.* Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. *N. Engl. J. Med.* 1997; **336**: 605–10.
- 4 The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Group. Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. *N. Engl. J. Med.* 1997; **336**: 597–604.
- 5 Gothberg S, Edberg KE, Tang SF *et al.* Residual pulmonary hypertension in children after treatment with inhaled nitric oxide: a follow-up study regarding cardiopulmonary and neurological symptoms. *Acta Paediatr.* 2000; **200**: 1414–19.
- 6 Lipkin PH, Davidson D, Spivak L, Straube R, Rhines J, Chang CT. I-NO/PPHN Study Group. Neurodevelopmental and medical outcomes of persistent pulmonary hypertension in term newborns treated with nitric oxide. *J. Pediatr.* 2002; **140**: 306–10.
- 7 Rosenberg AA, Kennaugh JM, Moreland SG *et al.* Longitudinal follow-up of a cohort of newborn infants treated with inhaled nitric oxide for persistent pulmonary hypertension. *J. Pediatr.* 1997; **131**: 70–75.
- 8 The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Group. Inhaled nitric oxide in term and near-term infants: neurodevelopmental follow-up of the Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group (NINOS). *J. Pediatr.* 2000; **136**: 611–17.
- 9 Yamaguchi N, Togari H, Takase M *et al.* A prospective clinical study on inhaled nitric oxide therapy for neonates in Japan. *Pediatr. Int.* 2001; **43**: 20–25.
- 10 Bifano EM, Pfannenstiel A. Duration of hyperventilation and outcome in infants with persistent pulmonary hypertension. *Pediatrics* 1988; **81**: 657–61.
- 11 Ferrara B, Johnson DE, Chang P-N, Thompson TR. Efficacy and neurologic outcome of profound hypocapnic alkalosis for the treatment of persistent pulmonary hypertension in infancy. *J. Pediatr.* 1984; **105**: 457–61.
- 12 Kusuda S, Shishida N, Miyagi N, Hirabayashi M, Kim T-J. Cerebral blood flow during treatment for pulmonary hypertension. *Arch. Dis. Child.* 1999; **80**: F30–33.
- 13 Fujikawa S, Yang L, Waffam F, Lerner M. Persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) treated with inhaled nitric oxide: preliminary hearing outcomes. *J. Am. Acad. Audiol.* 1997; **8**: 263–8.
- 14 Marron M-J, Crisafi MA, Driscoll JM *et al.* Hearing and neurodevelopmental outcome in survivors of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 1992; **90**: 392–6.
- 15 Dobyns EL, Griebel J, Kinsella JP, Abman SH, Accurso FJ. Infant lung function after inhaled nitric oxide therapy for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr. Pulmonol.* 1999; **28**: 24–30.
- 16 Riou Y, Storme L, Klosowski S *et al.* Does inhaled nitric oxide modify lung diffusing capacity and mechanics in experimental hyaline membrane disease (HMD)? *Pediatr. Res.* 1996; **39**: 348.
- 17 Swaminathan S, Quinn J, Stabile MW, Bader D, Platzker ACG, Keens TG. Long-term pulmonary sequelae of meconium aspiration syndrome. *J. Pediatr.* 1989; **114**: 356–61.

RESEARCH ARTICLE

Attenuation of ganglioside GM1 accumulation in the brain of GM1 gangliosidosis mice by neonatal intravenous gene transfer

N Takaura¹, T Yagi², M Maeda², E Nanba³, A Oshima⁴, Y Suzuki⁵, T Yamano¹ and A Tanaka¹

¹Department of Pediatrics, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan; ²Department of Neurobiology and Anatomy, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan; ³Gene Research Center, Tottori University, Yonago, Japan; ⁴Department of Pediatrics, Takagi Hospital, Saitama, Japan; and ⁵Pediatrics, Clinical Research Center, Nasu Institute for Developmental Disabilities, International University of Health and Welfare, Ohtawara, Japan

A single intravenous injection with 4×10^7 PFU of recombinant adenovirus encoding mouse β -galactosidase cDNA to newborn mice provided widespread increases of β -galactosidase activity, and attenuated the development of the disease including the brain at least for 60 days. The β -galactosidase activity showed 2–4 times as high a normal activity in the liver and lung, and 50 times in the heart. In the brain, while the activity was only 10–20% of normal, the efficacy of the treatment was distinct. At the 30th day after the injection, significant attenuation of ganglioside GM1 accumulation in the cerebrum was shown in three out of seven mice. At the 60th day after the injection, the amount of

ganglioside GM1 was above the normal range in all treated mice, which was speculated to be the result of reaccumulation. However, the values were still definitely lower in most of the treated mice than those in untreated mice. In the histopathological study, X-gal-positive cells, which showed the expression of exogenous β -galactosidase gene, were observed in the brain. It is noteworthy that neonatal administration via blood vessels provided access to the central nervous system because of the incompletely formed blood–brain barrier.

Gene Therapy (2003) 10, 1487–1493. doi:10.1038/sj.gt.3302033

Keywords: GM1 gangliosidosis; neonatal gene transfer; intravenous administration; brain gene therapy

Introduction

A number of therapeutic experiments using the murine models have been performed for various lysosomal enzyme deficiencies, such as mucopolysaccharidosis VII (MPS VII) mouse.^{1,2} For the treatment of lysosomal storage disease (LSD), the enzyme does not necessarily need to be produced within the affected cells, but can be taken up from the extracellular milieu via binding to mannose-6-phosphate receptors on the cell surface in many of the lysosomal enzymes.³ Thus, the deficient enzyme can be supplied with the administered enzyme protein or the secreted enzyme from the transplanted normal cells or genetically reconstructed cells secreting the enzyme protein. This ability of cells to internalize lysosomal enzymes and direct them to the lysosomal compartment forms the biochemical basis of the potential for the therapeutic strategies for LSD.

Enzyme replacement therapy (ERT),^{4,5} bone marrow transplantation (BMT),^{1,6,7} and gene transfer^{2,8} have been studied in animals and in humans with LSDs. ERT is clinically available for Gaucher disease⁹ and Fabry disease¹⁰ as medicine in many countries, and they are

very effective. ERTs for MPS I, II, and glycogen storage disease type II are ongoing to clinical uses. However, the effects of ERT are transient, requiring repeated administrations of the enzyme protein throughout life to maintain activity and to prevent the disease. Moreover, no effect is shown on the brain because of the blood–brain barrier. BMT is effective on the somatic involvement of LSDs.^{6,11} However, the uses of BMT are limited for the lack of appropriate donors, or morbidity associated with allogeneic transplantation. Moreover, bone and the brain are the exceptions to the effects of BMT. Gene transfer using virus vectors via blood vessels is also effective on various organs.² The transduced cells would make the enzyme protein from the transferred gene to be reconstituted, and the enzyme protein could be secreted from the cells and be delivered to uninfected cells locally or distantly. However, only direct injections of the gene into the brain or into the ventricle have been shown to be effective on the central nervous system.^{12–14} The blood–brain barrier blocks the enzyme protein-mediated correction or the gene transfer into the brain in any of these approaches. According to the previous literatures, neonatal treatments of ERT or BMT provide a more complete correction in many organs, even in the brain.^{15–17} It has been reported that neonatal gene transfer in MPS VII mouse provided sufficient effects on most tissues including the brain.^{18,19}

Correspondence: Dr A Tanaka, Department of Pediatrics, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

Received 22 November 2002; accepted 18 February 2003

We focused our studies on the treatment of the brain for GM1 gangliosidosis. GM1 gangliosidosis is a member of LSDs, which shows a progressive neurological disease in humans caused by the genetic defect of lysosomal acid β -galactosidase that hydrolyses the terminal β -galactosidic residue of ganglioside GM1 and other glycoconjugates.²⁰ The defects of the β -galactosidase activity result in an accumulation of ganglioside GM1 in various organs especially in the brain, which causes the progressive neurodegeneration. Since the gene transfer by intracranial injection is an invasive therapy for the patients, we carried out our study of treating the brain by intravenous gene transfer for the murine model of GM1 gangliosidosis. As it is speculated that protective protein/cathepsin A is needed for β -galactosidase stabilization, β -galactosidase may not be amenable to treatment by the overexpression from the exogenous gene. However, we could show that intravenous gene transfer into the brain was reliable in neonatal period and a small amount of β -galactosidase activity would be sufficient for the brain to prevent the disease progression. It is obvious that the success of the brain therapy in GM1 gangliosidosis mouse provides a promising tool for the brain treatment of LSDs in general.

Results

Enzyme activity

β -Galactosidase activity in HeLa cells and in the culture medium infected at multiplicity of infection (MOI) 40 by the recombinant adenovirus vector carrying mouse β -galactosidase cDNA were 3-5 times and 40-50 times higher than in the cells and in the medium with mock infection, respectively (data not shown).

β -Galactosidase activity in each organ obtained at the 30th and 60th days after the injection was shown in

Table 1. In treated mice, the β -galactosidase activity of the liver and the heart increased definitely in every sample, while the activity of other organs did not increase in a few samples. The maximum increase of the activity was remarkable in the liver, lung, and the heart. The activities at the 60th day were lower than those at the 30th day in most of the samples. Very large deviation values in the increased activities were seen in every organ. Figure 1 shows the activities in each organ of each mouse at the 30th day. The levels of the activity in each organ showed a similar feature among the mice, but the ratio of the increased activity in each organ was very different and did not show a parallel view among the mice. A slight increase of β -galactosidase activity in the brain was detected, and the increases in some mice were significant as shown in Table 2.

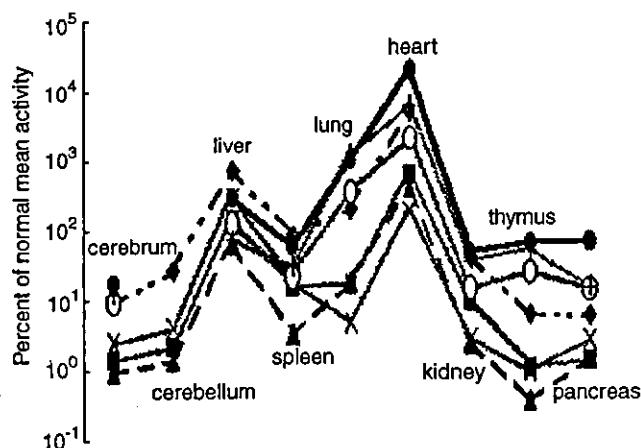


Figure 1 β -Galactosidase activity in tissue homogenates at the 30th day after treatment (n=7). The values of each organ were connected with lines individually. The activities in the organs did not show parallel increase.

Table 1 β -Galactosidase activity in each organ

Organ	Treated	Untreated	Normal
30th day	n=7	n=6	n=5
Cerebrum	0.62-11.6	2.45 ± 1.46	67.1 ± 11.1
Cerebellum	0.60-11.5	ND	45.3 ± 6.5
Liver	35.6-415	1.17 ± 0.57	48.4 ± 22.2
Spleen	4.78-129	4.27 ± 0.66	145 ± 27
Lung	3.65-965	4.45 ± 1.81	77.7 ± 14.8
Heart	57.9-1940	2.00 ± 1.12	28.6 ± 2.1
Kidney	2.72-55.8	16.6 ± 7.87	101 ± 16
Thymus	0.332-58.8	2.19 ± 0.71	93.3 ± 25.6
Pancreas	0.785-40.3	1.20 ± 0.34	52.7 ± 12.9
60th day	n=10	n=9	n=4
Cerebrum	1.83-16.1	2.53 ± 0.39	42.6 ± 16.1
Cerebellum	ND	ND	ND
Liver	22.6-201	1.33 ± 0.41	89.5 ± 12.6
Spleen	22.5-94.5	10.3 ± 4.2	221 ± 65
Lung	28.5-351	4.76 ± 2.38	75.0 ± 9.2
Heart	112-1510	1.39 ± 0.28	21.2 ± 3.2
Kidney	8.59-73.5	12.4 ± 4.2	111 ± 8
Thymus	3.04-141	3.22 ± 0.58	112 ± 28
Pancreas	0.482-17.4	1.03 ± 0.32	78.5 ± 33.0

The values were shown by the range of activity in the treated mice and by mean value ± 1SD of activity in untreated mice and in normal mice of each organ (unit: nmol/mg/h). ND, not determined.

Table 2 β -Galactosidase activity and the amount of ganglioside GM1 in the brain

Mouse no.	β -Galactosidase activity (nmol/mg/h)		Ganglioside GM1 (μ mol/g) ^a	
	Cerebrum	Cerebellum	Cerebrum	Cerebellum
30th day				
Treated 1	6.15 ^b		1.03 ^c	0.81
2	0.939		1.57	1.18
3	0.615		2.01	1.68
4	1.57		2.04	0.68
5	11.6 ^b		0.49 ^c	0.72
6	6.16 ^b		0.48 ^c	0.29 ^c
7	8.46 ^b		0.36 ^c	0.28 ^c
Untreated (n=8) ^d	3.38 \pm 2.14		1.68 \pm 0.23	1.24 \pm 0.58
Normal (n=7) ^d	67.4 \pm 19.1		0.17 \pm 0.08	0.26 \pm 0.23
60th day				
Treated 1	2.62		2.16 ^c	2.35
2	4.36 ^b		2.33	0.80 ^c
3	16.1 ^b		0.99 ^c	0.35 ^c
4	2.47		1.79 ^c	3.02
5	2.71		4.01	1.63
6	1.83		4.56	1.61
7	8.59 ^b		2.06 ^c	1.07 ^c
8	4.63 ^b		1.97 ^c	1.63
9	8.30 ^b		1.64 ^c	1.54
10	6.22 ^b		1.88 ^c	1.22 ^c
Untreated (n=12) ^d	2.65 \pm 0.45		3.22 \pm 1.00	2.19 \pm 0.94
Normal (n=6) ^d	45.8 \pm 12.2		0.32 \pm 0.07	0.20 \pm 0.04

^aShown in μ mol/g wet weight of tissue.

^bHigher activity of β -galactosidase than mean value 1SD of untreated group.

^cLower amount of ganglioside GM1 than mean value 1SD of untreated group.

^dShown in mean \pm 1SD.

Ganglioside GM1 analysis by thin-layer chromatography (TLC)

Figure 2 shows the thin-layer chromatogram of the brain extracts. The accumulation of ganglioside GM1 in the brain was almost corrected in some of the treated mice at the 30th day after the injection. The accumulation of ganglioside GM1 in the liver was corrected in every treated mouse (data not shown).

Table 2 shows the β -galactosidase activity and the amount of ganglioside GM1 of brain in each treated mouse, and the mean \pm 1SD values in untreated knock-out mice and normal control mice. At the 30th day, four (mouse nos. 1, 5, 6, and 7) out of seven mice showed higher activity of β -galactosidase and a significant decrease of ganglioside GM1 accumulation in the cerebrum. Three mice of the remaining (nos. 2, 3, and 4) did not show any increase of the β -galactosidase activity or attenuation of the disease in the brain. At the 60th day, five (mouse nos. 3, 7, 8, 9, and 10) out of 10 mice showed higher activity of β -galactosidase corresponding to the decrease of ganglioside GM1 in cerebrum. An excellent efficacy was shown in mouse no. 3, which still had a significant higher activity of β -galactosidase and a lower amount of ganglioside GM1 accumulation. The amounts of ganglioside GM1 were significantly lower in most of the treated mice than those in the untreated mice, but were definitely higher than those in normal mice.

In the liver, β -galactosidase activity showed 73–857% of the mean value of normal activity at the 30th day, which resulted in the prevention of ganglioside GM1 accumulation almost completely (data not shown). At

the 60th day, β -galactosidase activity in the liver still showed 25–225% of the normal activity, and the continuous prevention of ganglioside GM1 accumulation was observed (data not shown).

Histopathological studies

β -Galactosidase-positive cells by X-gal staining were detected in various organs (data not shown) including the brain. X-gal stainings of the brain and the liver are shown in Figures 3 and 5. Figures 4a and b show anti-GM1 ganglioside staining of the brain in treated and untreated mouse, respectively. The amount of immunoreactive materials was definitely less in the treated mouse than in the untreated mouse, indicating attenuation of ganglioside GM1 accumulation by the neonatal gene transfer. The percentages of the infected cells counted in the specimen with X-gal staining were 0–1% in the brain and 5–10% in the liver.

Discussion

A single intravenous injection of recombinant adenovirus encoding mouse β -galactosidase cDNA for newborn mice provided widespread increases of β -galactosidase activity and attenuated the development of the disease including the brain at least for 60 days.

It is noteworthy that neonatal administration via blood vessels provided access to the brain, and it is a noninvasive method. Although the activity in the treated brain was not remarkable, the accumulation of

ganglioside GM1 was attenuated definitely in three out of seven mice at the 30th day (Table 2, mouse nos. 5, 6 and 7). The efficacy was clearly confirmed by biochem-

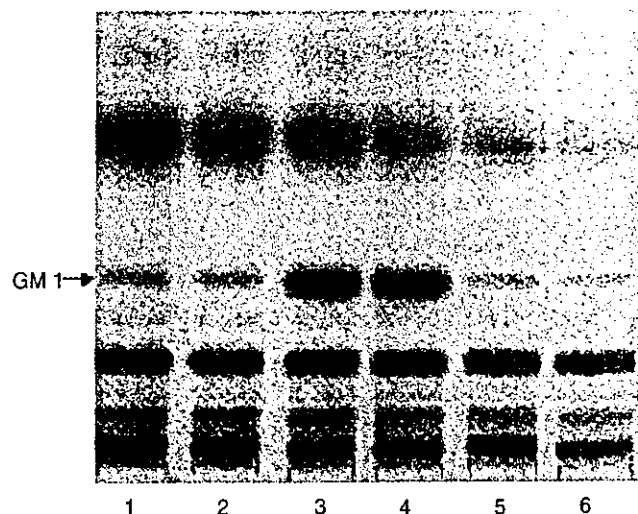


Figure 2 Thin-layer chromatography of lipids in the brain tissue extracts. Lanes 1 and 2, treated mouse; 3 and 4, untreated mouse; 5 and 6, normal mouse. Each sample was applied on two separate lanes to confirm the measurement. Each lipid extract from 4 mg in wet weight of cerebrum was applied on TLC plate. The separated lipids were visualized by resorcinol spray. The arrow indicates the band of ganglioside GM1. The pattern of TLC and the amount of ganglioside GM1 in the treated mice were similar to those of normal mouse. Each one of the two lanes from the same samples showed completely the same pattern of chromatogram and the values obtained by densitometric quantification were almost equal.

ical analysis of TLC (Figure 2) and histochemical analysis of immunostaining (Figure 4a and b). It is consistent with the clinical fact that a very slight residual catalytic activity in the patients attenuates the symptoms, and results in a mild phenotype.²⁰ At the 60th day after the treatment, the amount of ganglioside GM1 was above the normal range in all treated mice, which was speculated to be the result of reaccumulation. However, the values were still definitely lower in most of the treated mice than those in untreated mice (Table 2). The continuous activity of β -galactosidase about 15–20 nmol/mg/h (20% of normal activity) in the brain would be sufficient to prevent the disease.

A small number of cells stained with X-gal, which means the expression of β -galactosidase activity in the cells, were found in the cerebrum of the mice with good efficacy at the 30th day after treatment (Figure 3). These cells were away from the blood vessels and appeared to be neuronal cells from their shape, which leads to the speculation that adenovirus particles got into the brain through the blood-brain barrier via blood vessels and infected the cells.

The efficacy on the attenuation of ganglioside GM1 accumulation was consistent with the increase in β -galactosidase activity. Good efficacy was observed in the liver of every treated mouse, while the efficacy was varied and limited in the brain. The difference in the efficacy on the brain among the treated mice might be caused by the different efficiency of adenovirus infection, which resulted from the different permeability of the blood-brain barrier. Although the adenovirus injections were carried out at 24–48 h after birth, the maturation of

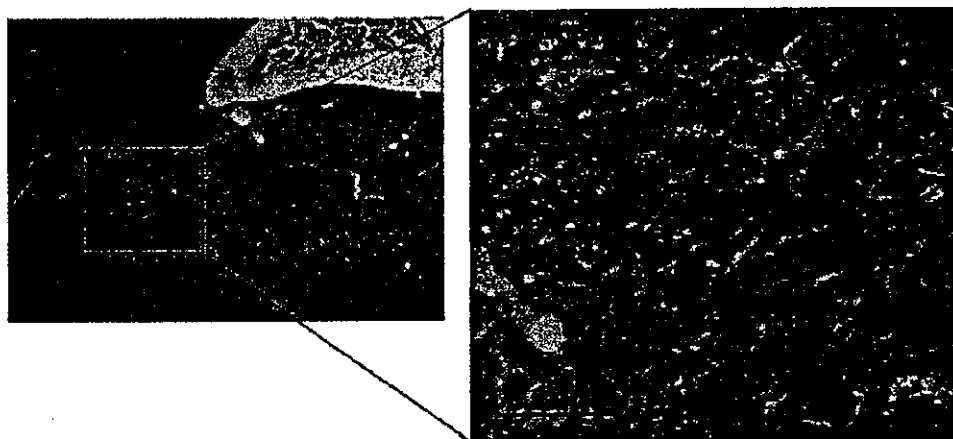


Figure 3 X-gal staining of the cerebrum in a treated mouse at the 30th day. Several positive-staining cells showing strong blue color were found. They were speculated to be neuronal cells from their shape. Scale bar=50 μ m.

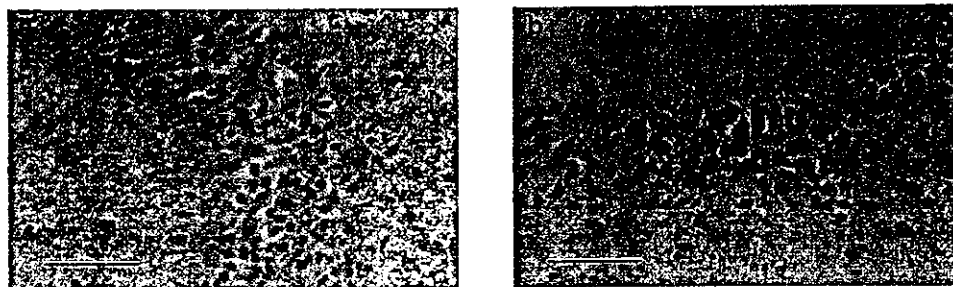


Figure 4 Antiganglioside GM1 antibody immunostaining of the cerebrum in treated (a), and in untreated (b) knockout mouse at the 30th day. The positive cells were definitely deceased in the brain of treated mouse. Scale bars=100 μ m.