

図 1 けいれん重積および群発時のミダゾラム静注治療方式

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。なお、いったんけいれんが消失後に再発をみた場合には、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。また、けいれん群発の場合には 1 回量静注後引き続き持続静注を行う。

2) 持続静注治療

ミダゾラム 1 回量静注後けいれん重積から脱した場合は、ミダゾラム溶液を 0.1~0.15 mg/kg/hr で 12~24 時間持続静注を行う。けいれん重積から完全には脱却できていない場合やけいれん群発時には、けいれん抑制が維持されるまでミダゾラム

を 0.05~0.1 mg/kg/hr ずつ 0.3 mg/kg/hr まで増量していくが、治療経過によっては最大 0.5 mg/kg/hr まで増量してもよい。増量速度は重積時には急速に、群発時には比較的緩徐とする。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/hr 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/hr 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、基礎疾患も考慮してできるだけ速やかに（重積ではミダゾラム治

療開始後 30 分を限度とする) パルビタール大量療法など他の治療に切り替える。ミダゾラムはパルビタールにみられる脳圧低下など脳保護作用を有さないため脳圧亢進や脳腫脹を伴う重篤な急性脳症では効果が限られる。また、筆者らの経験からは特異な脳炎・脳症後てんかんの一群にも有効性は低いと思われる。乳児重症ミオクロニーてんかんのけいれん重積や難治性症候性てんかんの強直発作重積などでは効果が不十分な場合がありうるが、症例によっては有効な場合もある。なお、テオフィリン関連けいれんに対するミダゾラムの有効性については未だ充分には検討されていない。したがって、このような基礎疾患や病態によってミダゾラムの有効性に差があることをあらかじめ念頭において治療することが重要である。

2. 筋注, 注腸, 頬粘膜投与, 経鼻投与

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¹¹⁾, 頬粘膜投与¹²⁾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。とくに, けいれん出現初期の対応としてミダゾラムの経鼻投与と頬粘膜投与は有用性が高く, 現在普及している DZP 坐薬にとってかわる治療法として期待される。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, 経鼻投与 0.2~0.3 mg/kg, 頬粘膜投与 0.3 mg/kg 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。

III. てんかん発作頻発時の治療

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/hr 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, 非常に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 (PHT) 静注など他治療を並行して行うことも可能である。

IV. ミダゾラム治療の注意点と問題点

1) 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。

2) 長期持続投与によりクリアランスの増加や耐性のため効果が減弱することがある。

3) 基準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く, 脳圧亢進や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多い。

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) 長期間の持続投与により依存性が生じることがあるので, 反跳発作を防ぐため減量は緩徐に行う。

6) 長期持続投与により排泄相半減期が延長し, 投与中止後の覚醒に長時間を要することがある。

7) 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。

8) 重篤な急性脳症, 特異な脳炎・脳症後てんかんの一群などミダゾラム治療が無効ないしは効果が限られる病態をあらかじめ念頭に入れて治療を行うが, 今後さらに基礎疾患や病態によるミダ

ゾラムの有効性の差についての検討が必要である。

9) 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¹³⁾があり, 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/hr 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/hr 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¹³⁾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。

10) 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。

V. 小児のけいれん重積および群発に対する治療方式 (私案)

小児のけいれん重積および群発に対する治療方式に関して, 各種薬剤の薬物動態学的特性および安全性などを考慮した私案を図2に示す。今後これらの治療法の有効性, 安全性の比較検討が必要である。

まとめ

ミダゾラム静注治療は臨床効果, 安全性, 薬物動態の面からも非常に優れた小児のけいれん重積, 群発の治療法であり, 一刻も早く保険適応となることが望まれる。

本研究の一部は, 平成15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) を受け実施した。

1) First step

ミダゾラム1回量0.15 mg/kg (0.1~0.3 mg/kg) を1 mg/min で静注

ミダゾラム0.1~0.15 mg/kg/hr で持続静注開始し, けいれんが抑制されるまで0.05~0.1 mg/kg/hr ずつ0.3 mg/kg/hr まで増量
(平均0.2 mg/kg/hr, 最大0.5 mg/kg/hr まで増量可)

病態によっては

フェニトイン15~20 mg/kg ゆっくり静注→維持量

あるいは

リドカン2 mg/kg 静注→2~4 mg/kg/hr 持続静注

2) Second step

ペントバルビタール3~5 mg/kg 静注→1~5 mg/kg/hr 持続静注

あるいは

チオペンタール5 mg/kg 静注→2~10 mg/kg/hr 持続静注

あるいは

チアミラール3~5 mg/kg 静注→2~5 mg/kg/hr 持続静注

3) 他治療法

イソフルレン吸入

プロポホル静注→持続静注

非経静脈的フェノバルビタール大量療法

図2 小児のけいれん重積, 群発に対する治療方式 (私案)

文献

- 1) Galvin GM, Jelinek GA: Midazolam: an effective intravenous agent for seizure control. Arch Emerg Med 4: 169-172, 1987
- 2) Rivera R, Segnini M, Baltodano A, et al: Midazolam in the treatment of status epilepticus in children. Crit Care Med 21: 991-994, 1993
- 3) Koul RL, Aithala GR, Chacko A, et al: Continuous midazolam infusion as treatment of status epilepticus. Arch Dis Child 76: 445-448, 1997
- 4) 皆川公夫: 乳児重症ミオクロー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
- 5) 皆川公夫: ミダゾラムによる痙攣重延状態の治療. 日本臨床薬理学会雑誌 10: 40-43, 1997
- 6) 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 30 : 290-294, 1998
- 7) 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
 - 8) 浜野晋一郎, 田中 学, 望月美佳, 他 : 小児けいれん重積症に対する midazolam 治療の臨床的検討. 脳と発達 35 : 304-309, 2003
 - 9) 皆川公夫, 渡邊年秀 : 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. 脳と発達 35 : 484-490, 2003
 - 10) 皆川公夫, 渡邊年秀 : けいれんの診療 : ミダゾラムの使用法と注意点. 小児内科 35 : 177-179, 2003
 - 11) 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
 - 12) Kutlu NO, Dogrul M, Yakinci C, et al : Buccal midazolam for treatment of prolonged seizures in children. Brain Dev 25 : 275-278, 2003
 - 13) Igartua J, Silver P, Maytal J, et al : Midazolam coma for refractory status epilepticus in children. Crit Care Med 27 : 1982-1985, 1999
- 本論文は平成 14~15 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) を受け実施した研究成果である。

小児のけいれん重積状態治療における midazolam の有用性

Effectiveness of Midazolam in the Treatment of Status Epilepticus in Children

皆 川 公 夫¹⁾

要旨：小児のけいれん重積状態の治療には、けいれん抑制作用の速効性、強力性、安全性および持続性のすべてを兼ね備えた治療法が理想的である。日本で現在第一次治療に選択されている diazepam は呼吸抑制や血圧低下など安全性に一部問題があり、さらに効果持続時間が短い。また、phenytoin も速効性に劣り、血管刺激性が強く静脈から漏れると壊死を生じやすく、不整脈がおこりうるなど安全性に劣る。このように、従来から行われているけいれん重積状態の主要治療薬には種々の問題点があり、理想的な治療方式とはなっていない。Midazolam はけいれんに対する保険適応はないが、速効性、強力性、安全性に優れ、さらに持続静注により安定した効果を長時間維持持続させることが可能であり、けいれん重積状態に対する臨床効果も優れており、小児のけいれん重積状態の主要治療薬として第一次治療、第二次治療に利用できると考える。

てんかん研究 2005 ; 23 : 2-13

Key Words : status epilepticus, midazolam, first-line treatment, epilepsy, children

(受付：2004年7月12日、訂正：2004年9月17日、受理：2004年9月28日)

1. はじめに

けいれん重積状態は一般的にはけいれんが30分以上持続する(連続型)か、または短い発作でも反復しその間意識の回復がない(群発型)ものと定義されるが、できるだけ早期からの治療が重要視されている。したがって、このような緊急事態に対する第一次治療は非常に重要であり、できるだけ速やかに(速効性)、かつ安全に(安全性)、けいれんを完全抑制すること(強力性)が必要である。さらに、群発型などけいれんの再発が起りやすい場合も多く、けいれん重積状態から脱した後も短時間以内にけいれんの再発が起こらない

ように長時間けいれん抑制状態を維持持続すること(持続性)が望まれる。

従来から日本ではけいれん重積状態に対して第一次治療は diazepam 静注、第二次治療に phenytoin 静注が行われ、これらが無効な場合には第三次治療として barbiturates の静注あるいは持続静注が行われてきたが、さらに、最近では barbiturates 静注の前にけいれんに対する保険適応はないが lidocaine や midazolam の持続静注が行われることが多くなった²⁾。現在第一次治療に選択されている diazepam の1回量静注治療は速効性と強力性に優れるが、呼吸抑制など安全性に一部問題があり、急速静注時や phenobarbital など

1) 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]

Kimio Minagawa

Department of Pediatrics, Hokkaido Children's Hospital and Medical Center

barbiturates が先行投与されている場合にはさらにその危険性が増加する²⁾。また、効果持続時間が短いため 2~3 回反復静注投与する場合もあるが、漸次効果は減弱し³⁾、長時間のけいれん抑制効果を維持することができないなど、安全性と持続性に問題がある。第二次治療の phenytoin については 1 回量静注後効果発現まで 15~30 分と速効性に劣り、血管刺激性が強く静脈から漏れると壊死を生じやすく、また不整脈など心毒性があり、安全性に問題がある。持続性に関しては、効果維持時間が 12 時間前後と比較的長い、希釈性が悪く持続静注ができないため数日間に及ぶ安定した効果を維持することは難しい。このように、わが国において従来から行われているけいれん重積状態の第一次治療および第二次治療には安全性と効果持続性に問題があり、とくに有効性の判定に 30 分以上かかる場合があるなど、理想的な治療方式とはなっていないと思われる。Tasker⁴⁾は diazepam の反復静注や phenytoin あるいは phenobarbital の静注を行うプロトコールでは時間がかかりすぎるとして、midazolam を中心としたプロトコールを提唱している。

一方、諸外国においては、第一次治療は lorazepam 静注、第二次治療に fosphenytoin 静注、治療抵抗性の第三次治療には phenobarbital 静注あるいは他の barbiturates の持続静注が行われることが多い⁵⁻⁸⁾。Lorazepam は diazepam 同様、速効性と強力性に優れ、さらに diazepam より半減期が長く効果が約 12~24 時間維持されるので持続性も比較的良好であるため、diazepam より好んで使用されている。Fosphenytoin は水溶性で血管刺激性が少なく静注速度も速くできるため、phenytoin より安全性と速効性に優れる。しかし、わが国では lorazepam 静注製剤、fosphenytoin 静注製剤、phenobarbital 静注製剤は導入されていないため、これらを使用することはできない。ちなみに、phenobarbital 静注製剤は現在日本で開発中であり、その後新生児けいれんに対する治療が計画されている。

したがって、現在日本において使用できる静注用抗けいれん薬である diazepam、phenytoin、barbiturates、およびけいれんに対する使用は保険適

応外となるが、最近主として第二次治療として使用されるようになった lidocaine と midazolam について、けいれん抑制作用の速効性、強力性、安全性、持続性を評価し、小児のけいれん重積状態治療における最適の治療方法を検討することを試みた。

Midazolam は 1975 年にアメリカで開発され、1982 年にスイスで承認、発売された imidazobenzodiazepine 系薬剤で、日本では 1988 年から発売されている。Midazolam は現在、麻酔前投薬、全身麻酔の導入および維持、集中治療における人工呼吸中の鎮静に対して適応を有し、けいれん重積状態に対する保険適応は承認されていないが、けいれん重積状態治療薬として必要なけいれん抑制作用の速効性、強力性、安全性を兼ね備え、さらに持続性については、半減期は短い持続静注治療により長時間安定した効果を維持持続できるので、薬理学的にきわめて優れた薬剤である。欧米ではけいれん重積状態の治療に lorazepam 静注や fosphenytoin 静注が使用でき、敢えて midazolam を第一次治療に用いる必要がないためか、主にこれらに反応しない治療抵抗性のけいれん重積状態に対して midazolam などの静脈麻酔剤を使用しており、臨床的にもけいれん重積状態における midazolam 静注治療の有効性と安全性が広く認められてきている⁹⁻¹³⁾。著者らは 1994 年の早期から多数の小児のけいれん重積状態に対して midazolam 静注治療を行い、その有効性および安全性を報告してきた¹⁴⁻¹⁷⁾。最近では日本でも midazolam 静注治療が普及し¹⁸⁻²⁰⁾、現在厚生労働省科学研究費補助金に基づく「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(主任研究者:大澤真木子教授)」の中でも midazolam の有効性に関する多施設共同研究が行われている²⁰⁾。

本稿では、(1) Midazolam の薬理学的特性、(2) 現在けいれん重積状態に使用されている主要治療薬剤と midazolam の薬理学的特性に関する比較、(3) 小児のけいれん重積状態に対する新たな治療方式の私案、(4) 小児のけいれん重積状態に対する midazolam の使用方法について解説する。

2. Midazolam の薬理学的特性^{31,21-24)}

1) 注射液の性状

Midazolam は酸性で水溶性となるため、midazolam 注射液 (ドルミカム[®]) は pH 2.8~3.8 の塩酸水溶液 (Midazolam 10 mg を含有、2 ml) としてゐる。したがって、5% 糖液や生食水で希釈でき、持続静注投与が可能である。さらに propylene glycol を含有していないため、静脈への刺激が少ない。しかし、pH が高くなると沈殿や白濁を生じるため、thiopental 注射液などのアルカリ性注射液や lidocaine 注射液との配合を避ける。また、とくに新生児には有害とされる sodium benzoate や benzyl alcohol も含まれてゐない。

2) 作用機序^{21,23)}

Midazolam は benzodiazepine 受容体に働き、benzodiazepine 受容体と GABA 受容体との相互作用により GABA 受容体での GABA 親和性が増し、間接的に GABA の作用を増強するため、けいれん抑制作用を発揮するとされているが、midazolam は diazepam の約 2 倍の benzodiazepine 受容体への親和性を有するため、diazepam より抗けいれん作用が強力である²⁵⁾。

3) 脳血管関門通過性^{21,22)}

Midazolam 注射液は水溶性であるが、体内の生理的 pH では脂溶性となり、容易に脳血管関門を通過するため、抗けいれん作用は速効性である。

4) Bioavailability^{21,22)}

Midazolam は筋注でも 90% 以上吸収され、効果発現も 10 分以内と速いため、静脈ラインが確保しにくい時には一時的に筋注で代用できる。さらに、midazolam は注腸、点鼻、頬粘膜投与でも吸収が良く、速効性のため、家庭での一次治療などに応用できる可能性がある。しかし、経口投与では肝臓と腸での初回通過効果を受け、小児での吸収率は 27% と不良である。

5) 体内分布^{21,22)}

成人における midazolam の分布容積 (Vd) の報告は 1.0~3.1 l/kg、0.95~6.6 l/kg と大きく、女性、老人、肥満などで高値となる傾向がある。小児の Vd 値の報告はみられない。

6) 蛋白結合率^{21,22)}

Midazolam の蛋白結合率は約 97% で、ほとんどがアルブミンと結合し、遊離型は 2.5~4% である。

7) 代謝^{21,22)}

Midazolam は hepatic microsome oxidation を受ける。6 カ月未満の乳児では肝臓機能が未熟なため代謝が遅く、半減期が延長する。Midazolam は CYP3A4 の基質であるため、他剤との相互作用を認めることがある。

Midazolam の代謝産物は 1-hydroxymethyl midazolam が 60~70% であり、他には 4-hydroxy-midazolam が 5% 未満で、dihydroxy-midazolam がごくわずかである。主要代謝産物の 1-hydroxymethyl midazolam は半減期が約 1 時間と短く、生物学的活性がほとんどなく、肝臓でグルクロン酸抱合を受け水溶性となって容易に排泄されるため、長期持続投与時にも蓄積による影響を受けない。

8) 排泄^{21,22)}

Midazolam は主に腎臓から排泄される。主たる尿中排泄型は 1-hydroxymethyl midazolam のグルクロン酸抱合型で 66.1~87.8%、他には 4-hydroxy-midazolam と dihydroxy-midazolam のグルクロン酸抱合型がごく少量排泄され、intact midazolam の尿中排泄は 0.03% 未満である。

9) 半減期^{21,22)}

Midazolam 静注時の排泄相半減期 ($t_{1/2\beta}$) の報告値は、成人で 1.7~2.6 時間、1.8~6.4 時間 (平均 3 時間)、小児では 1 歳以上が 0.8~1.8 時間、6 カ月~15 歳が 1.4~4.0 時間であり、小児では成人と同等ないしはやや短い。このように midazolam は半減期が短いため、1 回量静注後のけいれん抑制効果の持続が短く、長時間効果を維持させるためには持続静注投与が必要となる。新生児では肝臓機能が未熟なため半減期が長く、在胎 26~42 週の新児の報告値は 6.5~12.0 時間である。また、重症全身疾患時には肝機能や腎機能の低下により半減期が延長する。一方、半減期が短いため midazolam 投与中止後の覚醒は約 4 時間と速い。

10) Clearance^{21,22)}

Midazolam の plasma clearance の報告値は、成

人では4.2~9.0 ml/min/kg、6.4~11.0 ml/min/kg、小児では1歳以上が4.7~19.7 ml/min/kg、6カ月~15歳が3.2~15.4 ml/min/kgである。この小児の値はdiazepamの15倍である。肝疾患、腎不全、心不全などではclearanceが低下し、蓄積するため、投与量を減らすなどの調整が必要となる。

小児では100時間をこえる長時間持続静注時にはclearanceが増加し²⁶⁾、効果が減弱することがあり、途中で増量を必要とすることがある。

11) 血中濃度^{21,22)}

Midazolamの臨床効果と血中濃度の間には直接的な関係は証明されていないが、血中濃度と鎮静効果の間には相関関係が報告されている。報告²⁷⁾では100 ng/ml以上では50%以上の確率で鎮静、200 ng/ml以上では50%以上の確率で入眠、最大鎮静効果は229 ng/mlであった。

けいれん抑制効果とmidazolam血中濃度との関係は十分検討されておらず、けいれん抑制に対する有効血中濃度も確立されていないが、200~500 ng/mlとの報告がみられる²⁸⁾。

12) 相互作用^{21,22)}

MidazolamはCYP3A4の基質であるため、CYP3A4の活性を抑制する薬剤との併用でmidazolamの代謝とclearanceが低下し、midazolamの血中濃度が上昇する。このような薬剤として、erythromycin、clarithromycin、ketoconazole、diltiazem、verapamil、cimetidineが知られている。また、phenytoinはmidazolamとの併用で血中濃度が上昇しにくくなるとの報告もみられる²⁸⁾。

13) Withdrawal symptom^{21,22)}

長期持続静注投与後の急激な中止により、けいれん、興奮、幻覚、異常行動、発熱、嘔吐、頻脈などの症状が生じるので、緩徐に減量、中止を心がけることが必要である。

14) 副作用^{21,22)}

小児におけるmidazolam静注時の副作用として、酸素飽和度低下4.6%、無呼吸2.8%、血圧低下2.7%、逆説反応2.0%、吃逆1.2%、けいれん様動作1.1%、眼振1.1%が報告されているが²¹⁾、このうち呼吸、循環系の副作用は併用中枢神経抑制薬剤の影響によると思われる。

また、midazolam治療に関する多数の報告から

も、midazolamは呼吸、循環に対する影響が少なく、midazolam自体による呼吸抑制はほとんどみられないので、midazolam治療に先立って人工呼吸管理を開始する必要はないと考える^{9~17,29,30)}。

Midazolam過量投与による過剰鎮静時などにはbenzodiazepine拮抗剤であるflumazenilが有効である。flumazenilは最初0.01 mg/kgを静注し、その後効果がえられるまで0.01 mg/kgずつ漸増するが(平均0.017 mg/kg、最大0.05 mg/kg)、効果は10分以内に出現する³¹⁾。しかし、けいれんを誘発させることがあり、日本ではbenzodiazepine系薬剤を長期投与されているてんかん患者では禁忌とされている。

15) けいれん重積状態治療のmidazolam投与量

けいれん重積状態の治療に用いるmidazolam1回静注投与量と持続静注投与量に関しては、0.15 mg/kgと0.138 mg/kg/hr⁹⁾、0.02~0.38 mg/kgと0.06~0.38 mg/kg/hr³²⁾、0.15 mg/kgと0.12 mg/kg/hr¹³⁾などの報告がある。著者らは通常1回静注投与量を0.15 mg/kg前後、持続静注投与量は平均0.2 mg/kg/hrで最大0.5 mg/kg/hrとしている^{29,30)}。なお、1 mg/kg/hr以上の大量投与を行うmidazolam昏睡治療の報告³³⁾があるが、その有効性についての十分な追試はなされていない。

3. Midazolamと他主要治療薬剤との薬理学的特性に関する比較³⁴⁾

けいれん重積状態の治療にはけいれん抑制作用の速効性、強力性、安全性および持続性をすべて兼ね備えた治療が必要である。

けいれん治療に対する保険適応の有無を度外視し、現在日本でけいれん重積状態に対して静注で使用されている主要治療薬剤のdiazepam、phenytoin、lidocaine、barbiturates (pentobarbital、thiopental、thiamylal)について、けいれん抑制作用の速効性、強力性、安全性および持続性の4特性に関してmidazolamとの比較を行った。

1) 速効性

Midazolamとdiazepamは脂溶性のため、脳血管関門を速やかに通過し、きわめて速効性である^{21,22)}。ちなみに、lorazepamはこれらより幾分脂

溶性が悪いため多少速効性に劣る²⁹⁾。また、lidocaine も容易に脳血管閉門を通過するため速効性である³⁵⁾。Barbiturates も速効性であるが³⁶⁾、phenytoin は静注後効果発現まで 15~30 分かかり⁶⁾、速効性に劣る。したがって、midazolam、diazepam、lidocaine、barbiturates は速効性に優れ、けいれん重積状態の第一次治療に適している。しかし、phenytoin は群発型けいれん重積状態をはじめ類発性や群発性けいれんの治療で 15~30 分の猶予が許されるような場合および diazepam によるけいれん抑制後 12 時間程度の再発予防目的としての使用は有用であるが、とくに連続型けいれん重積状態の治療には不向きである。

2) 強力性

Midazolam、diazepam、phenytoin、lidocaine、barbiturates とともに強力な抗けいれん作用を有するが、とくに脳波を complete suppression ないしは burst suppression に至らしめる barbiturates の大量療法はきわめて強力で、脳保護作用も併有する。したがって、Reye 症候群やインフルエンザ脳症など脳浮腫を伴う重篤な急性脳症によるけいれん重積状態では脳圧降下など脳保護作用も併せ持つ barbiturates 昏睡療法が有効と思われる⁸⁾。また、特異な脳炎・脳症後てんかんの一群と theophylline 関連けいれん³⁷⁾には他治療が無効で、barbiturates 持続静注治療が導入されることが多い^{29,30,37)}。Midazolam は強力なけいれん抑制作用を有し、benzodiazepine 受容体への親和性は diazepam の約 2 倍で、薬理的には diazepam より 3~4 倍強力といわれている²⁹⁾。Midazolam は最初 1 回量を静注後引き続き持続静注を開始し、けいれんが確実に抑制されるまで漸増するが、midazolam は投与量の安全域が広いいため増量過程でけいれん重積状態から脱する確率が高い。Barbiturates との効果比較では同等との報告もみられるが^{10,38)}、臨床的にこれらの有効率を厳密に比較検討した報告は見あたらない。したがって、けいれん重積状態の原因が明らかになるまではまず midazolam のような安全性の高い薬剤による第一次治療を行い、原因が前述の重篤な急性脳症や特異な脳炎・脳症後てんかんの一群あるいは theophylline 関連けいれんと判明した時点で、早めに

集中管理のもとに barbiturates 持続静注治療が導入されるべきであると考え。ちなみに、midazolam 大量持続投与による midazolam 昏睡療法の報告³⁹⁾があるが、特異な脳炎・脳症後てんかんの一群の 1 例に対して 1 mg/kg/hr の midazolam 大量持続投与を行った筆者らの経験では脳波を burst suppression や complete suppression に至らすことができず、その有効性を確認できなかった。臨床的に diazepam と midazolam の持続静注治療効果を比較した報告ではけいれん抑制効果に有意な差は認めないとするもの³⁹⁾もあるが、メタ分析では diazepam は midazolam および pentobarbital、thiopental の barbiturates 静注治療より効果が劣ると報告されており¹⁰⁾、第一次治療薬としては従来の diazepam よりむしろ midazolam の方がふさわしいと考える。なお、胃腸炎に伴うけいれんでは diazepam が無効で、lidocaine が有効なことが多く³⁵⁾、原因疾患や病態によって治療薬の有効性に差があると思われる。

3) 安全性

Diazepam は軽度の呼吸抑制や血圧低下をきたすことがあり、とくに急速静注時や barbiturates 先行投与時には注意を要する²⁾。また、diazepam 注射液は希釈性が悪く、希釈すると結晶が析出するため、通常原液のまま静注するが、注射液には propylene glycol が添加されており血管刺激性が強く²⁾、浸透圧による腎障害の危険も知られている⁴⁰⁾。また、diazepam 注射液には sodium benzoate と benzyl alcohol も添加されており、新生児では benzoate がビリルビンと蛋白結合において競合し遊離ビリルビンが増加して核黄疸の危険が生じる⁴²⁾。また、新生児に大量の benzyl alcohol が摂取されると gasping syndrome や floppy baby syndrome などがおこることも知られており^{13,40)}、とくに新生児に対する安全性に問題がある。また、diazepam の反復投与あるいは持続投与時には、生物学的活性を有する主要代謝産物の N-desmethyldiazepam の蓄積による影響も出現する²⁹⁾。現在日本で第一次治療に選択されている diazepam には安全性においてこれらの問題点がある。これに対して、midazolam は呼吸、循環に対する影響は非常に少なく、安全性が高い。した

がって、急性脳症などの基礎疾患や重症心身障害児に伴う呼吸障害など患者自身による影響を別にすれば、midazolam の 1 回量静注および持続静注治療とも人工呼吸管理や昇圧剤は不要であり^{17,29,30)}、一般病棟での管理が十分可能である。また、midazolam は酸性で水溶性となるため塩酸水溶液である注射液は水溶性で希釈性が良好である²¹⁾。さらに、日本の midazolam 注射液には propylene glycol, sodium benzoate, benzyl alcohol とも含まれていないため、血管刺激性がなく、新生児にも安全性が高い。また、midazolam の主要代謝産物である 1-hydroxymethyl midazolam には生物学的活性がほとんどなく^{21,22)}、その半減期も短いため、長期持続投与時でも蓄積による影響を受けない。さらに、半減期が短いため投与中止後の回復が速いなど、安全性にはきわめて優れており、midazolam 治療は第一次治療としても非常に適した治療法であると考えられる。一方、midazolam の長期間持続投与に伴う問題としては、依存性²¹⁾、耐性²²⁾、clearance の増加²²⁾、排泄相半減期の延長²²⁾などが生じることがあるが、予めこれらの点に対応できるよう配慮することが必要である。また、midazolam 使用時には種々の薬剤との相互作用^{21,22)}にも留意が必要である。Phenytoin は循環系への影響があるため心電図モニターが必要であるが、呼吸抑制は少ない。希釈性が悪くかつ血管刺激性が非常に強いため、生食水で希釈し緩徐に静注後生食水でフラッシュするが、血管痛が非常に強く、誤って動脈に注入した場合や血管から漏れると皮膚や血管の壊死をおこしやすいので十分な注意が必要である⁶⁾。Lidocaine は一般的に呼吸抑制は少ないが、血圧低下や心伝導障害など循環への影響があり、心電図モニターが必要である。また、主として大量投与時ではあるが、けいれんを誘発することが知られている³⁵⁾。さらに、Lidocaine の主要代謝産物である methylethylglycinexylidide および glycinexylidide は生物学的活性を有するため、持続投与時にはこれらが蓄積し、副作用の増強につながる可能性がある³⁵⁾。一方、lidocaine 注射液の希釈性は良好で、血管刺激性も少ない。また、覚醒度が保たれ、意識状態の評価に支障を来さないことが多い。Barbi-

turates^{6,36)}は呼吸、循環に対する影響が強く、1 回量静注時でも呼吸抑制や血圧低下などの緊急事態に対応できる体制で行う必要があり、大量持続静注時にはあらかじめ人工呼吸管理下におき、昇圧剤を投与し、厳密に呼吸、循環、および脳波のモニターを行うため、ICU 管理が必要となる。また、長期持続静注投与中は腸管麻痺や易感染性なども高率に発生するなど安全性には問題点が多い。さらに、長期間持続投与後は減量時に再発しやすく、中止から覚醒まで長時間を要するなどの不利な点も多い。また、希釈性が悪く、結晶が析出しやすいため、乳糖を含まない溶液で希釈して投与するが、血管刺激性が強く、血管炎をおこしやすいので、中心静脈投与が望ましい。このように、barbiturates 治療は安全性には大きな問題があるため、第一次治療には不向きである。

したがって、安全性からは midazolam が最も優れており、次に lidocaine、diazepam で、phenytoin と barbiturates は問題が多いと考える。

4) 持続性

Midazolam は半減期が短いため、1 回量静注ではけいれん抑制効果の持続は 3~4 時間と短い^{21,22)}。しかし、希釈性が良好で持続静注投与が可能のため、1 回量静注後引き続き midazolam の持続静注治療を行うことにより長期間安定したけいれん抑制効果を維持できる。Midazolam と同様、lidocaine と barbiturates も 1 回量静注投与では効果の持続性は短い、持続静注投与により長時間効果を維持できる。とくに、群発型のけいれん重積状態や脳炎・脳症などでは長時間安定したけいれん抑制効果を維持することが必要であり、持続静注治療が最適である。Diazepam は希釈性が悪いため、通常は原液の 1 回量投与を行うが、けいれん抑制効果の持続は約 20 分と短い。このため、再発に対して 2~3 回反復投与することがあるが、漸次効果が減弱する³⁾。したがって、群発型など再発が起こりやすい場合や脳炎・脳症には不向きである。なお、diazepam 注射液を大量の溶液で希釈して持続静注投与した報告がみられる³⁹⁾が、前述の安全性の面からも diazepam の持続静注治療は日本では普及していない。Phenytoin は 1 回量静注後のけいれん抑制効果の持続は 8~12 時

間⁶⁾と比較的長いため、短時間以内の再発は予防できる。しかし、希釈性が悪く持続静注投与ができないため、さらに長時間効果を持続させるためには血中濃度を測定しながら追加投与量を決め1回量静注を反復するが、数日間に及ぶ安定した効果を維持することは難しい。したがって、長期間の安定したけいれん抑制効果を維持する必要があるような病態には不向きである。

5) 4特性のまとめ

前述したけいれん抑制作用の速効性、強力性、安全性、持続性の4項目に関する各治療薬の評価をまとめて以下に示す。

(1) 速効性：Diazepam、midazolam、lidocaine、barbituratesとも速効性に優れるが、phenytoinは劣る。

(2) 強力性：Barbiturates、midazolam、diazepam、lidocaine、phenytoinとも強力であるが、原因疾患によって有効薬剤に差を認める。

(3) 安全性：Midazolamが最も安全性が高い。Diazepam、phenytoin、lidocaineはいくつかの問題点を有し、barbiturates治療は集中管理を要する。

(4) 持続性：Phenytoinは比較的効果持続時間が長い、diazepamは持続が短い。Midazolam、lidocaine、barbituratesはいずれも半減期が短い、1回量静注では効果持続は短い、持続静注投与を行うことにより長期間安定した効果を維持持続できる。

すなわち、midazolamは持続静注治療法を行うことにより、これら4特性がすべて満たされ、midazolam持続静注治療はけいれん重積状態に対する治療法として非常に有望な選択肢となる可能性が示唆された。

4. 小児のけいれん重積状態治療方式の私案

けいれん重積の第一次治療として、諸外国ではlorazepam静注、日本ではdiazepam静注が行われている。これらの薬剤は軽度の呼吸抑制や血圧低下には注意が必要であるが、速効性と強力性に非常に優れている。Lorazepamは比較的効果が長く持続するが、diazepamは効果の持続が短く、これらの治療に抵抗性の場合には第二次、第三次治

療として安定した効果の維持持続が期待できる持続静注治療が選択されることが多い。しかし、従来から行われていたbarbituratesの持続静注治療はきわめて強力ではあるが、人工呼吸管理や昇圧剤投与など集中管理を要するため多くの場合最終手段として選択される。これに対して、midazolamは持続静注治療においても呼吸・循環に対する影響が非常に少ないため人工呼吸管理や昇圧剤の投与が不要であり、一般病棟での管理が十分可能である。さらに、けいれんに対する保険適応はないが、けいれん抑制作用に関しては速効性と強力性にも非常に優れているため、第二次治療、第三次治療としてだけではなく、むしろ第一次治療としてmidazolam持続静注治療を選択する意義は十分あると考える。これによって、多くの場合は第二次治療、第三次治療が不要になることが期待される。実際、著者ら¹⁷⁾とYoshikawaら¹⁸⁾はmidazolamを第一次治療に選択した場合でも有効率が高かったことを報告したが、さらにmidazolam持続静注治療の導入後、lidocaineとbarbituratesの使用頻度が激減したことを経験している。なお、原因疾患や病態によってはlidocaineやphenytoinが第一選択薬となる場合もありうる。第一次治療のmidazolamが無効な場合あるいはlidocaineやphenytoinが無効な場合には、全身管理のもとにbarbiturates持続静注治療を行う。とくに、原因疾患がReye症候群やインフルエンザ脳症などの重篤な急性脳症や特異な脳炎・脳症後てんかんの一群およびtheophylline関連けいれんと診断された場合には早めにbarbiturates持続静注治療を導入することが望ましい。

第一次治療：

- (1) Diazepam 1回量静注 (Barbiturate 先行投与時、急速静注時は呼吸抑制に注意) あるいは Midazolam 1回量静注 → Midazolam 持続静注
- (2) 原因疾患によっては、lidocaine 1回量静注 → 持続静注 (とくに胃腸炎に伴うけいれんに有効) または phenytoin 1回量静注 → (反復静注)

第二次治療：

Barbiturates 1回量静注 → 持続静注 (重篤な

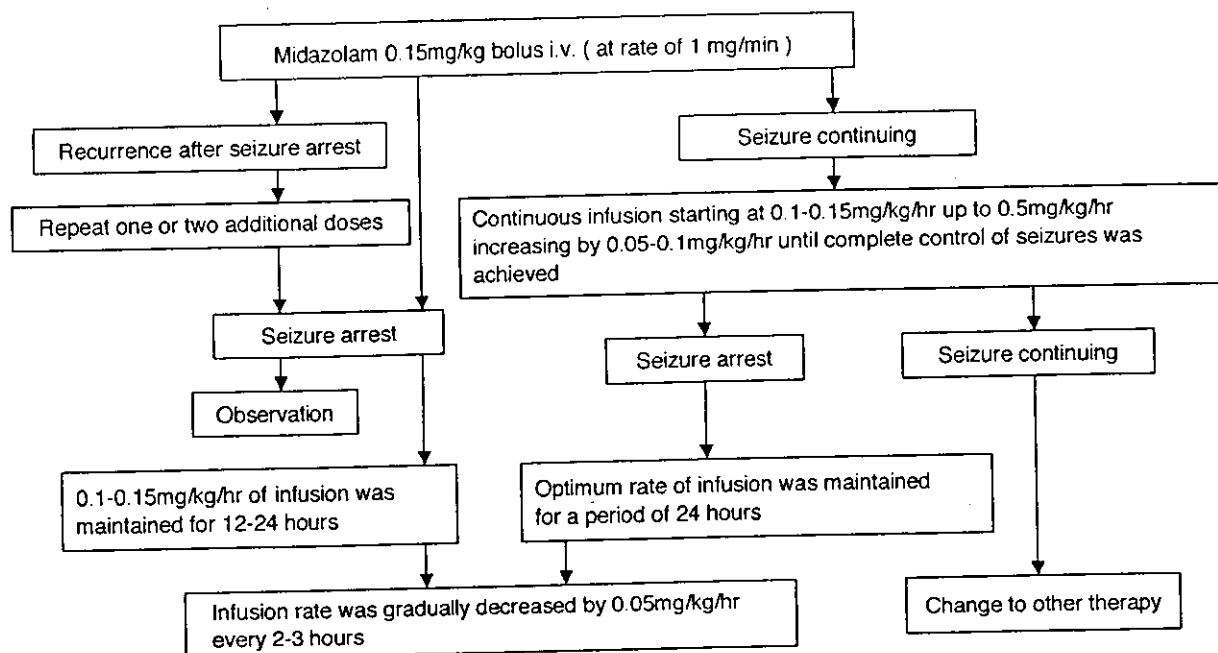


Fig. 1 Protocol of midazolam treatment for status epilepticus

急性脳症、特異な脳炎・脳症後てんかんの一群、theophylline 関連けいれんの場合は早めに導入)

5. Midazolam 使用方法

1) けいれん重積状態およびけいれん群発時の治療

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）に関連する急性症候性けいれんの重積、群発に対する midazolam 治療について、当センターにおける使用方法^{29,30)}を中心に紹介する。

(1) Midazolam 静注治療

けいれん重積状態およびけいれん群発時の midazolam 静注治療方式を Fig. 1 に示す。

a. 1 回量静注治療（第一次治療として施行する場合）：Midazolam 注射液（10 mg/2 ml）を生食水か 5% 糖液で希釈し（1 mg/1 ml が便利）、1 回量 0.15 mg/kg（0.1~0.3 mg/kg）を基準に 1 mg/min の速度で静注する。Midazolam 1 回量静注により速やかに重積状態から脱した場合でも、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 midazolam を 0.1~0.15 mg/kg/hr で持続静注

することが望ましい。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状態になることが予測される場合に初期治療として midazolam 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時にはそのまま経過観察としてもよい。なお、一旦けいれんが消失後に再発をみた場合には midazolam 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引き続き midazolam 持続静注治療を開始する。また、けいれん群発の場合には引き続き持続静注を行う。

b. 持続静注治療：Midazolam 1 回量静注に引き続き midazolam を 0.1~0.15 mg/kg/hr で持続静注を開始する。けいれん重積状態あるいはけいれん群発状態から完全に脱却できるまで midazolam を 0.05~0.1 mg/kg/hr ずつ 0.3 mg/kg/hr まで増量していくが、治療経過によっては最大 0.5 mg/kg/hr まで増量してもよい。増量速度は重積時には急速に、群発時には比較的緩徐とする。ちなみに、midazolam 持続静注治療の平均有効投与量は 0.2 mg/kg/hr 前後である。midazolam 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必要ない。Midazolam 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時間毎に0.05 mg/kg/hr 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、midazolam 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原因疾患も考慮してできるだけ速やかに（けいれん重積状態ではmidazolam 治療開始後30分を限度とする）barbiturates 大量療法など他の治療に切り替える。Midazolam はbarbiturates にみられる脳圧降下など脳保護作用を有さないため脳圧亢進や脳腫脹を伴う重篤な急性脳症では効果が限られる。また、著者らの経験からは特異な脳炎・脳症後てんかんの一群にも有効性は低いと思われる。乳児重症ミオクロニーてんかんのけいれん重積状態や難治性症候性てんかんの強直発作重積状態などでは効果が不十分な場合がありうるが、症例によっては有効な場合もある。なお、theophylline 関連けいれんに対するmidazolam の有効性については未だ充分には検討されていない。したがって、このような原因疾患や病態によってmidazolam の有効性に差があることをあらかじめ念頭において治療することが重要である。

(2) 筋注、注腸、頬粘膜投与、経鼻投与

Midazolam は静注以外の投与経路として、筋注、注腸、経鼻、経頬粘膜投与が利用でき、いずれも速効性かつ強力なけいれん抑制効果を与えることができる。したがって、医療機関においても静脈確保に時間がかかるような場合には応急的にはmidazolam の筋注^{45,46)}、経鼻^{47~50)}、頬粘膜投与^{50~52)}が有用である。Midazolam 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、経鼻投与0.2~0.3 mg/kg、頬粘膜投与0.3 mg/kg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。

2) てんかん発作頻発時の治療^{29,30)}

Lennox-Gastaut 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midazolam 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/hr のmidazolam 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、非常に有用な治療法である。さらにmidazolam 持続静注治療中にphenytoin 静注など他治療を平行して行うことも可能である。

6. Midazolam 治療の今後の問題点

Midazolam 治療の今後の問題点として、1回量静注時と持続静注時の至適投与量や最大投与量などの至適投与設計を行うために、有効血中濃度、薬物動態パラメーターの検索が必要である。また、原因疾患や病態によるmidazolam の有効性の差についての検討も必要である。さらに、新生児けいれんの治療にもmidazolam 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。

7. 結 語

諸外国では小児のけいれん重積状態に対する第一次治療および第二次治療として使用されているlorazepam 静注製剤とfosphenytoin 静注製剤が日本には導入されていないため、今後これらの薬剤が日本にも導入されるよう働きかけることが必要である。また、現在日本で使用できる薬剤としてはmidazolam 持続静注治療が薬理学的および臨床的にも非常に優れた治療法であり、けいれん重積の第一次治療ならびに第二次治療薬となりうる事が示唆され、midazolam がけいれんに対する保険適応となるようさらに臨床研究を進めることも重要であると考えられる。

本論文は、平成16年度において厚生労働省科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)を受け、作成した。

文 献

- 1) 須貝研司. 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: けいれん重積症治療ガイドライン案と作成における課題に関する研究. 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) 平成 14 年度研究報告書, 2003 : 91-93.
- 2) Prensley AL, Raff MC, Moore MJ, Schwab RS. Intravenous diazepam in the treatment of prolonged seizure activity. *N Engl J Med* 1967 ; 276 : 779-784.
- 3) Walker MC, Sander JW. Benzodiazepines in status epilepticus. In : Trimble MR, Hindmarch I, eds. *Benzodiazepines*. Petersfield and Philadelphia : Wrightson Biomedical Publishing, 2000 : 73-85.
- 4) Tasker RC. Emergency treatment of acute seizures and status epilepticus. *Arch Dis Child* 1998 ; 79 : 78-83.
- 5) Treiman DM. Status epilepticus. In : Wyllie E, ed. *The treatment of epilepsy : principles and practice*. 3rd ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001 : 681-697.
- 6) Alldredge BK. General Principles : Treatment of status epilepticus. In : Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Perucca E, eds. *Antiepileptic drugs*. 5th ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2002 : 160-168.
- 7) Classen J, Hirsch LJ, Mayer SA. Treatment of status epilepticus : a survey of neurologists. *J Neurol Sci* 2003 ; 211 : 37-41.
- 8) Walker MC, Shorvon SD. Emergency treatment of seizures and status epilepticus. In : Shorvon SD, Perucca E, Fish DR, Dodson WE, eds. *The treatment of epilepsy*. 2nd ed. Massachusetts : Blackwell Science, 2004 : 227-243.
- 9) Rivera R, Segnini M, Baltodano A, Perez V. Midazolam in the treatment of status epilepticus in children. *Crit Care Med* 1993 ; 21 : 991-994.
- 10) Holmes GL, Riviiello JJ. Midazolam and pentobarbital for refractory status epilepticus. *Pediatr Neurol* 1999 ; 20 : 259-264.
- 11) Gilbert DL, Gartside PS, Glauser TA. Efficacy and mortality in treatment of refractory generalized convulsive status epilepticus in children : a meta-analysis. *J Child Neurol* 1999 ; 14 : 602-609.
- 12) Lohr Jr A, Werneck LC. Comparative non-randomized study with midazolam versus thiopental in children with refractory status epilepticus. *Arq Neuropsiquiatr* 2000 ; 58 : 282-287.
- 13) 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 : 908-910.
- 14) 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.
- 15) 皆川公夫. ミダゾラムによる痙攣重延状態の治療. *日本小児臨床薬理学会雑誌* 1997 ; 10 : 40-43.
- 16) 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 : 290-294.
- 17) 皆川公夫, 渡邊年秀. 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. *脳と発達* 2003 ; 35 : 484-490.
- 18) Yoshikawa H, Yamazaki S, Abe T, Oda Y. Midazolam as a first-line agent for status epilepticus in children. *Brain Dev* 2000 ; 22 : 239-242.
- 19) 浜野晋一郎, 田中 学, 望月美佳, 杉山延喜, 衛藤義勝. 小児けいれん重積症に対する midazolam 治療の臨床的検討. *脳と発達* 2003 ; 35 : 304-309.
- 20) 大澤真木子, 林 北見, 皆川公夫, 吉川秀人, 浜野晋一郎, 三浦寿男, ら. 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: けいれん重積症, 発作類発状態におけるミダゾラム静注の有用性について (後方視的多施設共同研究) : 第 1 編 けいれん重積症に対する効果と治療上の問題. 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) 平成 15 年度研究報告書, 2004 : 45-51.
- 21) Versed Product Information. Nutley, New Jersey : Roche Laboratories, 1997.
- 22) Blumer JL. Clinical pharmacology of midazolam in infants and children. *Clin Pharmacokinet* 1998 ; 35 : 37-47.
- 23) Macdonald RL. Benzodiazepines : Mechanisms of action. In : Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Perucca E, eds. *Antiepileptic drugs*. 5th ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2002 : 179-186.
- 24) 皆川公夫. 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: 小児のけいれん重積に対するミダゾラム治療の薬理学的検討 (総論). 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) 平成 14 年度研究報告書, 2003 : 25-31.
- 25) Raines A, Henderson TR, Swinyard EA, Dretchen KL. Comparison of midazolam and diazepam by the intramuscular route for the control of seizures in a mouse model of status epilepticus. *Epilepsia* 1990 ; 31 : 313-317.
- 26) Booker PD, Beechey A, Lloyd-Thomas AR. Sedation

- for children requiring artificial ventilation using an infusion of midazolam. *Br J Anaesth* 1986 ; 58 : 1104-1108.
- 27) Tolia V, Brennan S, Aravind MK, Kauffman RE. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of midazolam in children during esophagogastroduodenoscopy. *J Pediatr* 1991 ; 119 : 467-471.
- 28) 松倉 誠. 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：小児のけいれん重積に対するミダゾラム治療の薬理学的検討（各論：血中濃度，相互作用）. 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）平成 14 年度研究報告書，2003 : 32-34.
- 29) 皆川公夫，渡邊年秀. 特集 けいれん・意識障害ハンドブック；けいれんの診療：ミダゾラムの使用法と注意点. *小児内科* 2003 ; 35 : 177-179.
- 30) 皆川公夫. 特集 小児のくすり Update. けいれん重積に対するミダゾラムの使用法（適応外）. *小児内科* 2004 ; 36 : 800-804.
- 31) Shannon M, Albers G, Burkhart K, Liebelt E, Kelly M, McCubbin MM, et al. Safety and efficacy of flumazenil in the reversal of benzodiazepine-induced conscious sedation. *J Pediatr* 1997 ; 131 : 582-586.
- 32) Kumar A, Bleck TP. Intravenous midazolam for the treatment of refractory status epilepticus. *Crit Care Med* 1992 ; 20 : 483-488.
- 33) Igartua J, Silver P, Maytal J, Mayer S. Midazolam coma for refractory status epilepticus in children. *Crit Care Med* 1999 ; 27 : 1982-1985.
- 34) 皆川公夫. 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：臨床薬理学的評価に基づくけいれん重積・けいれん群発治療選択薬順位の検討. 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）平成 15 年度研究報告書，2004 : 21-30.
- 35) 相原正男，山本 仁. 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：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）平成 14 年度研究報告書，2003 : 63-72.
- 36) 須貝研司. 特集 けいれん・意識障害ハンドブック；けいれんの診療：静注用バルビタール剤の使用法と注意点. *小児内科* 2003 ; 35 : 184-186.
- 37) 吉川秀人. 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：Theophylline 関連痙攣に対する初期治療法. 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）平成 15 年度研究報告書，2004 : 39-44.
- 38) Classen J, Hirsch LJ, Emerson RG, Mayer SA. Treatment of refractory status epilepticus with pentobarbital, propofol, or midazolam : a systemic review. *Epilepsia* 2002 ; 43 : 146-153.
- 39) Singhi S, Murthy A, Singhi P, Jayashree M. Continuous midazolam versus diazepam infusion for refractory convulsive status epilepticus. *J Child Neurol* 2002 ; 17 : 106-110.
- 40) Yaucher NE, Fish JT, Smith HW, Wells JA. Propylene glycol-associated renal toxicity from lorazepam infusion. *Pharmacotherapy* 2003 ; 23 : 1094-1099.
- 41) Hayman M, Seidl EC, Ali M, Malik K. Acute tubular necrosis associated with propylene glycol from concomitant administration of intravenous lorazepam and trimethoprim - sulfamethoxazole . *Pharmacotherapy* 2003 ; 23 : 1190-1194.
- 42) Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. 4th ed. Philadelphia : Saunders, 2001 : 178-214.
- 43) Gershank J, Boecler B, Ensley H, McCloskey S, George W. The gasping syndrome and benzyl alcohol poisoning. *N Engl J Med* 1982 ; 307 : 1384-1388.
- 44) Brown WJK, Buist NR, Gipson HT, Huston RK, Kenaway NG. Fatal benzyl alcohol poisoning in a neonatal intensive care unit (letter). *Lancet* 1982 ; 1 : 1250.
- 45) Chamberlain JM, Altieri MA, Futterman C, Young GM, Ochsenschlager DW, Waisman Y. A prospective, randomized study comparing intramuscular midazolam with intravenous diazepam for the treatment of seizures in children. *Pediatr Emerg Care* 1997 ; 13 : 92-94.
- 46) Towne AR, DeLorenzo RJ. Use of intramuscular midazolam for status epilepticus. *J Emerg Med* 1999 ; 17 : 323-328.
- 47) Lahat E, Goldman M, Barr J, Bistrizter T, Berkovitch M. Comparison of intranasal midazolam with intravenous diazepam for treating febrile seizures in children. *BMJ* 2000 ; 321 : 83-86.
- 48) Kutlu NO, Yakinci C, Dogrul M, Durmaz Y. Intranasal midazolam for prolonged convulsive seizures. *Brain Dev* 2000 ; 22 : 359-361.
- 49) Fisgin T, Gurer Y, Tezic T, Senbil N, Zorlu P, Okuyaz C, et al. Effects of intranasal midazolam and rectal diazepam on acute convulsions in childrens : prospective randomized study. *J Child Neurol* 2002 ; 17 : 123-126.
- 50) Wilson MT, Macleod S, O' Regan ME. Nasal/buccal midazolam use in the community. *Arch Dis Child* 2004 ; 89 : 50-51.
- 51) Scott RC, Besag FM, Neville BG. Buccal midazolam and rectal diazepam for treatment of prolonged sei-

zures in childhood and adolescence : a randomized trial. *Lancet* 1999 ; 353 : 623-626.

zolam for treatment of prolonged seizures in children. *Brain Dev* 2003 ; 25 : 275-278.

52) Kutlu NO, Dogrul M, Yakinci C, Soylyu H. Buccal mida-

Summary

Effectiveness of Midazolam in the Treatment of Status Epilepticus in Children

Kimio Minagawa¹⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Hokkaido Children's Hospital and Medical Center

Status epilepticus in children is a medical emergency that requires prompt intervention. Diazepam is most commonly administered initially, whereas phenytoin is the anticonvulsant most used subsequently, in Japan. Intravenous diazepam is often associated with respiratory depression and hypotension and duration of its anticonvulsive effect is very brief. During intravenous infusion of phenytoin, cardiopulmonary depression can occur as well as venous complications and appearance of its anticonvulsive action is slow.

Midazolam has many clinical and pharmacological advantages compared with other antiepileptic agents. It acts more rapidly and it is safer and more effective.

Midazolam should be considered as an initial treatment for status epilepticus in children.

J. Jpn. Epil. Soc. 2005 ; 23 : 2-13

(received : July 12, 2004, revised : September 17, 2004, accepted : September 28, 2004)

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。

In Vivo Studies of Phenylalanine Hydroxylase by Phenylalanine Breath Test: Diagnosis of Tetrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency

YOSHIYUKI OKANO, YUTAKA HASE, MIE KAWAJIRI, YASUAKI NISHI, KOJI INUI, NORIO SAKAI, YOKO TANAKA, KAZUHIKO TAKATORI, MASAHIRO KAJIWARA, AND TSUNEKAZU YAMANO

Department of Pediatrics [Y.O., M.K., Y.N., T.Y.], Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka 545-8585, Japan; Nishinari Ward Public Health and Welfare Center [Y.H.], Osaka 557-8501, Japan; Department of Developmental Medicine (Pediatrics) [K.I., N.S.], Osaka University Graduate School of Medicine, Suita 565-0871, Japan; Department of Pediatrics [Y.T.], Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital, Ichikawa 272-8513, Japan; and Department of Medicinal Chemistry [K.T., M.K.], Meiji Pharmaceutical University, Kiyose 204-8588, Japan

ABSTRACT

Tetrahydrobiopterin (BH₄)-responsive phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency is characterized by reduction of blood phenylalanine level after a BH₄-loading test. Most cases of BH₄-responsive PAH deficiency include mild phenylketonuria (PKU) or mild hyperphenylalaninemia (HPA), but not all patients with mild PKU respond to BH₄. We performed the phenylalanine breath test as reliable method to determine the BH₄ responsiveness. Phenylalanine breath test quantitatively measures the conversion of L-[1-¹³C] phenylalanine to ¹³CO₂ and is a noninvasive and rapid test. Twenty Japanese patients with HPA were examined with a dose of 10 mg/kg of ¹³C-phenylalanine with or without a dose of 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ of BH₄ for 3 d. The phenylalanine breath test [cumulative recovery rate (CRR)] could distinguish control subjects (15.4 ± 1.5%); heterozygotes (10.3 ± 1.0%); and mild HPA (2.74%), mild PKU (1.13 ± 0.14%), and classical PKU patients (0.29 ± 0.14%). The genotypes in mild PKU cases were compound heterozygotes with mild (L52S, R241C, R408Q) and severe mutations, whereas a

mild HPA case was homozygote of R241C. CRR correlated inversely with pretreatment phenylalanine levels, indicating the gene dosage effects on PKU. BH₄ loading increased CRR from 1.13 ± 0.14 to 2.95 ± 1.14% (2.6-fold) in mild PKU and from 2.74 to 7.22% (2.6-fold) in mild HPA. A CRR of 5 to 6% reflected maintenance of appropriate serum phenylalanine level. The phenylalanine breath test is useful for the diagnosis of BH₄-responsive PAH deficiency and determination of the optimal dosage of BH₄ without increasing blood phenylalanine level. (*Pediatr Res* 56: 714-719, 2004)

Abbreviations

BH₄, tetrahydrobiopterin,
CRR, cumulative recovery rate,
HPA, hyperphenylalaninemia,
PAH, phenylalanine hydroxylase,
PKU, phenylketonuria,
PTPS, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disorder caused by deficiency of hepatic phenylalanine hydroxylase (PAH; EC 1.14.16.1). The disease causes mental retardation unless the affected child is maintained on a strict low-

phenylalanine diet (1). Newborn mass screening for PKU is performed worldwide, and patients with a wide spectrum of clinical severity have been identified with almost 100% probability. The incidence of PKU in Japan is 1/120,000 (2) and is much lower than in whites (1/10,000) (3) and Chinese (1/18,000) (4). PKU is a heterogeneous metabolic disorder at both clinical and genetic levels.

The diagnosis of PKU is based on the presence of high concentration of phenylalanine in the serum and lack of deficiency of tetrahydrobiopterin (BH₄), rather than by measuring hepatic PAH activity. The clinical severity of PAH deficiency is also determined mainly by serum phenylalanine level, al-

Received November 17, 2003; accepted May 24, 2004.

Correspondence: Yoshiyuki Okano, M.D., Department of Pediatrics, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan; e-mail: okano@med.osaka-cu.ac.jp

This study was supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and by fund from Suyama Research Foundation.

DOI: 10.1203/01.PDR.0000141520.06524.51

though blood phenylalanine concentration is influenced by the dietary protein intake. For an appropriate diet therapy influenced by the social environments and personal situations, it is important to determine directly the clinical severity of PKU and PAH activity. As a representative autosomal recessive inherited disease, it is important to investigate how both alleles of the PKU gene influence PAH activity and how they give rise to clinical symptoms. We reported in 1991 that the clinical phenotype of PKU patients correlated with the genotype, which was the average of *in vitro* PAH activity of both mutations (5). However, subsequent studies reported that the clinical phenotype in several cases of PKU did not correspond with the genotype (6,7). The metabolism of phenylalanine in the human body not only reflects PAH protein but also is influenced by many factors, such as absorption and excretion of phenylalanine and the regulation of transcription and/or translation on PAH gene.

Various methods are available for *in vivo* measurement of PAH activity. ^2H -tyrosine in blood is measured after administration of ^2H -phenylalanine using gas chromatography mass spectrometry. The results of analysis using this method correlated with hepatic PAH activity and clinical phenotype (8–10). However, this method requires the use of a large amount of phenylalanine as a loading dose (10–200 mg/kg) and frequent blood sampling. Treacy *et al.* (11) described the phenylalanine breath test, a rapid noninvasive test for measurement of the actual phenylalanine tolerance. The test is based on quantitative measurement of the conversion of L-[1- ^{13}C] phenylalanine to $^{13}\text{CO}_2$ through tyrosine by PAH. The phenylalanine breath test provides information on the whole-body phenylalanine oxidative capacity, as an index of *in vivo* PAH activity.

Recently, BH_4 -responsive PAH deficiency was characterized by a decrease of blood phenylalanine after a BH_4 loading test (12) and patients with this deficiency have been treated with long-term BH_4 (13–17). Most patients of BH_4 -responsive PAH deficiency have mild PKU and mild hyperphenylalaninemia (HPA), but not all patients with mild PKU respond to BH_4 . In fact, even patients with similar mild mutations exhibit different response to BH_4 (12,17). Using the phenylalanine breath test, Muntau *et al.* (17) reported recently that BH_4 increases PAH activity in patients with BH_4 -responsive PAH deficiency. The present study was designed to determine whether phenylalanine oxidation capacity is consistent with the clinical phenotype and genotype and whether determination of this parameter is useful for the diagnosis of BH_4 -responsive PAH deficiency.

METHODS

Subjects. The subjects of this study were 20 Japanese patients (11 male individuals, aged 1–23 y) who were confirmed to have PAH deficiency on the basis of clinical and biochemical evaluation at the participating institutions. The patients, except for an adult patient with mild and another with classical PKU, were on phenylalanine-free milk and low-protein food ranging from insufficient to sufficient. Serum phenylalanine levels measured before the breath test in the two untreated patients with mild and classical PKU were 0.97 and 1.45 mM,

respectively. The mean serum phenylalanine concentrations were 0.31 ± 0.14 mM (\pm SD; range: 0.11–0.46 mM) in six treated patients with mild PKU and HPA and 0.43 ± 0.28 mM (range: 0.068–0.95 mM) in 12 treated patients with classical PKU. Two patients with 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase (PTPS) deficiency were diagnosed by analysis of urinary pteridine, biopterin loading test, and measurement of PTPS activity and treated with BH_4 , 5-hydroxytryptophan, L-dopa, and carbidopa. The criterion for classical PKU is serum phenylalanine concentration of ≥ 1.2 mM before initiation of a phenylalanine-restricted diet or in the absence of dietary restrictions later in life. The serum phenylalanine concentrations in mild PKU and mild HPA were 0.6–1.2 mM and <0.6 mM, respectively without phenylalanine-restricted diet. Serum phenylalanine was measured using ion-exchange chromatography.

Phenylalanine breath test. For phenylalanine breath test, 99% enriched L-[1- ^{13}C] phenylalanine was administered orally at a dose of 10 mg/kg and a maximum of 200 mg after overnight fast. Breath samples were collected into aluminum bags at 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, and 120 min. 6R- BH_4 (Suntory Co., Tokyo, Japan) was administered orally at a dose of 10 mg/kg with a maximum of 200 mg, divided into two doses per day at -2 and -1 d and another dose of 10 mg/kg, with maximum of 200 mg, 3 h before the breath test, as shown in Figure 1. The breath test was repeated twice in seven patients (two classical PKU and five mild PKU), before and after BH_4 . The administered ^{13}C -phenylalanine is metabolized by PAH and is exhaled as $^{13}\text{CO}_2$, $^{12}\text{CO}_2$ (m/z 44) and $^{13}\text{CO}_2$ (m/z 45) were measured using gas chromatograph/mass spectrometer (Breath MAT Plus; Finnigan MAT, Bremen, Germany) (18). Results of the $^{13}\text{CO}_2$ breath tests were expressed as ^{13}CO excess permillage ($\Delta^{13}\text{C}$, ‰) and cumulative recovery ratio (CRR; %) (11). The $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) was expressed as the ratio of $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$. The CRR was expressed as the ratio of total amounts of $^{13}\text{CO}_2$ (moles) in expiration during 120 min to administered dose of ^{13}C -phenylalanine. Total CO_2 production speed is calculated from the body surface area ($5 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) (19), and the body surface area (BSA; in m^2) is calculated by the formula [$\text{body weight (kg)}^{0.5378} \times \text{height (cm)}^{0.3964} \times 0.024265$] (20). Serum phenylalanine was measured before administration of L-[1- ^{13}C] phenylalanine and 1 h after administration using Hitachi automatic amino acid analyzer L8800 (Hitachi Co., Hitachinaka, Japan).

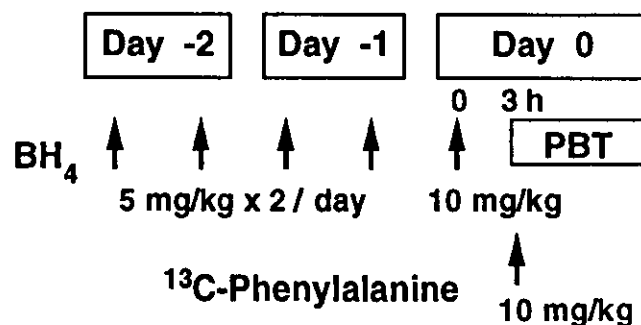


Figure 1. Time schedule of ^{13}C -phenylalanine ingestion and BH_4 dosing. PBT, phenylalanine breath test.

DNA analysis. PAH mutations were determined by using denaturing gradient gel electrophoresis and DNA sequencing, as described previously (21,22). Genomic DNA was isolated from lymphocytes or EBV transformed lymphoblasts. Thirteen exons and flanking intronic regions of the PAH gene were amplified by PCR with GC-clamped primers according to Guldberg *et al.* (23). The target exons with mutations were amplified from genomic DNA by PCR with biotinylated primers and were purified to single-strand DNA using magnetic beads coated with streptavidin M280 (Dyna, Oslo, Norway). The purified single-stranded DNA was sequenced by the dye terminator method using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, CT).

Statistical analysis and ethical issues. All data were expressed as mean \pm SD unless otherwise stated. Differences between groups were examined for statistical significance using the *t* test. A *p* < 0.05 denoted the presence of a statistically significant difference. Statistical analyses were performed using the Statview program version 4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

All protocols described in the above studies were approved by the institutional review boards of Osaka City University Graduate School of Medicine, and informed consent for the breath test and genetic analysis was obtained from all patients or their parents.

RESULTS

Identification of genotype. Table 1 shows the results of genetic analysis of 13 patients with classical PKU, six patients with mild PKU, and one patient with mild HPA. A total of 18 mutations were identified in 40 PKU alleles of the 20 patients, except for one allele. Four mutations of A202V (GCT \rightarrow GTT), R252P (CGG \rightarrow CCG), Q301H (CAG \rightarrow CAT), and D415H (GAC \rightarrow CAC) have not been reported. The genotypes

in mild PKU cases were from compound heterozygotes with mild (L52S, R241C, R408Q) and severe mutations, whereas in the mild HPA case, it was homozygote of mild mutation (R241C/R241C). In this study, we could not find cases with discordance between genotype and clinical phenotype.

Serum phenylalanine concentration. We also examined the influence of ^{13}C -phenylalanine loading (10 mg/kg; maximum 200 mg) on serum phenylalanine concentration. No large increase was noted in serum phenylalanine concentration before and after administration of ^{13}C -phenylalanine in both classical PKU and mild PKU/HPA patients (an increase from a predosing value of 0.51 ± 0.39 to 0.62 ± 0.38 mM at 1 h after phenylalanine dosing and from 0.41 ± 0.29 to 0.44 ± 0.26 mM, respectively).

$^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ratio in breath test. Figure 2 shows the changes in $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ratio ($\Delta^{13}\text{C}$) in expired air. The peak level of $\Delta^{13}\text{C}$ in the control occurring between 20 and 30 min after dosing (42.3 ± 10.4 ; range: 28.7–53.4‰) was significantly higher than that of the heterozygotes at the same time interval (27.2 ± 6.0 ; 21.1–32.5‰; *p* < 0.05). These results indicated that the administered ^{13}C -phenylalanine dose reached the liver at 20–30 min after dosing, where it was mainly metabolized to tyrosine, *p*-hydroxyphenylpyruvate, and homogentisic acid in the liver with a first-pass effect. Patients with mild HPA showed a small peak of $\Delta^{13}\text{C}$ at 45 min, reflecting the residual PAH activity. Low PAH activity was observed in classical PKU and mild PKU, and no peaks were noted for $\Delta^{13}\text{C}$. After BH_4 loading, mild PKU showed a peak $\Delta^{13}\text{C}$ level of 8.87 ± 8.99 ‰ (range: 3.83–21.62‰) at 20–30 min. Mild HPA showed a peak $\Delta^{13}\text{C}$ (24.45‰) at 20–30 min, a pattern similar to that noted in heterozygotes. BH_4 loading markedly improved phenylalanine oxidation in mild PKU and mild HPA.

Table 1. Genotypes and in vitro PAH activity in 20 patients with PAH deficiency

Genotype	n	%	PAH activity (%)
Severe type			
R413P	12	30	0 ⁽²⁹⁾
IVS4nt-1	3	7.5	0
R111X	2	5	0
Del5&6	2	5	0
T278I	2	5	1 ⁽²²⁾
Y77X	1	2.5	0
A202V	1	2.5	ND
E6nt-96a>g	1	2.5	0
R243Q	1	2.5	10 ⁽³⁰⁾
R252P	1	2.5	ND
R261X	1	2.5	0
IVS10nt-14	1	2.5	0
Q301H	1	2.5	ND
D415H	1	2.5	ND
L430P	1	2.5	ND
Mild type			
R241C	6	15	25 ⁽²⁵⁾
L52S	1	2.5	27 ⁽¹⁹⁾
R408Q	1	2.5	55 ⁽²⁶⁾
Total	39/40	97.5	

ND, not determined.

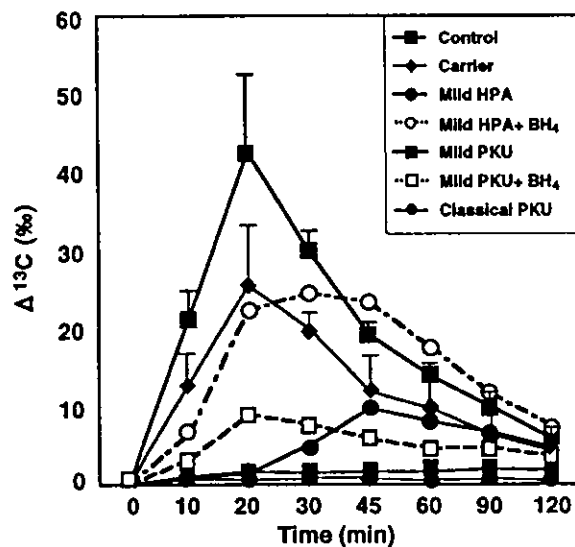


Figure 2. Time course of $^{13}\text{CO}_2$ excretion during phenylalanine breath test in control subjects, heterozygotes, and patients with PAH deficiency. $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) values during 120 min after ingestion of ^{13}C -phenylalanine are expressed as solid lines without BH_4 dosing and as dashed lines with BH_4 dosing. Data of the control and heterozygotes are expressed as mean \pm SD, whereas those of patients with PAH deficiency are expressed as mean values.

DNA analysis. PAH mutations were determined by using denaturing gradient gel electrophoresis and DNA sequencing, as described previously (21,22). Genomic DNA was isolated from lymphocytes or EBV transformed lymphoblasts. Thirteen exons and flanking intronic regions of the PAH gene were amplified by PCR with GC-clamped primers according to Guldborg *et al.* (23). The target exons with mutations were amplified from genomic DNA by PCR with biotinylated primers and were purified to single-strand DNA using magnetic beads coated with streptavidin M280 (DynaL, Oslo, Norway). The purified single-stranded DNA was sequenced by the dye terminator method using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, CT).

Statistical analysis and ethical issues. All data were expressed as mean \pm SD unless otherwise stated. Differences between groups were examined for statistical significance using the *t* test. A *p* < 0.05 denoted the presence of a statistically significant difference. Statistical analyses were performed using the Statview program version 4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

All protocols described in the above studies were approved by the institutional review boards of Osaka City University Graduate School of Medicine, and informed consent for the breath test and genetic analysis was obtained from all patients or their parents.

RESULTS

Identification of genotype. Table 1 shows the results of genetic analysis of 13 patients with classical PKU, six patients with mild PKU, and one patient with mild HPA. A total of 18 mutations were identified in 40 PKU alleles of the 20 patients, except for one allele. Four mutations of A202V (GCT \rightarrow GTT), R252P (CGG \rightarrow CCG), Q301H (CAG \rightarrow CAT), and D415H (GAC \rightarrow CAC) have not been reported. The genotypes

in mild PKU cases were from compound heterozygotes with mild (L52S, R241C, R408Q) and severe mutations, whereas in the mild HPA case, it was homozygote of mild mutation (R241C/R241C). In this study, we could not find cases with discordance between genotype and clinical phenotype.

Serum phenylalanine concentration. We also examined the influence of ^{13}C -phenylalanine loading (10 mg/kg; maximum 200 mg) on serum phenylalanine concentration. No large increase was noted in serum phenylalanine concentration before and after administration of ^{13}C -phenylalanine in both classical PKU and mild PKU/HPA patients (an increase from a predosing value of 0.51 ± 0.39 to 0.62 ± 0.38 mM at 1 h after phenylalanine dosing and from 0.41 ± 0.29 to 0.44 ± 0.26 mM, respectively).

$^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ratio in breath test. Figure 2 shows the changes in $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ratio ($\Delta^{13}\text{C}$) in expired air. The peak level of $\Delta^{13}\text{C}$ in the control occurring between 20 and 30 min after dosing (42.3 ± 10.4 ; range: 28.7–53.4‰) was significantly higher than that of the heterozygotes at the same time interval (27.2 ± 6.0 ; 21.1–32.5‰; *p* < 0.05). These results indicated that the administered ^{13}C -phenylalanine dose reached the liver at 20–30 min after dosing, where it was mainly metabolized to tyrosine, *p*-hydroxyphenylpyruvate, and homogentisic acid in the liver with a first-pass effect. Patients with mild HPA showed a small peak of $\Delta^{13}\text{C}$ at 45 min, reflecting the residual PAH activity. Low PAH activity was observed in classical PKU and mild PKU, and no peaks were noted for $\Delta^{13}\text{C}$. After BH_4 loading, mild PKU showed a peak $\Delta^{13}\text{C}$ level of 8.87 ± 8.99 ‰ (range: 3.83–21.62‰) at 20–30 min. Mild HPA showed a peak $\Delta^{13}\text{C}$ (24.45‰) at 20–30 min, a pattern similar to that noted in heterozygotes. BH_4 loading markedly improved phenylalanine oxidation in mild PKU and mild HPA.

Table 1. Genotypes and in vitro PAH activity in 20 patients with PAH deficiency

Genotype	n	%	PAH activity (%)
Severe type			
R413P	12	30	0 ⁽²⁹⁾
IVS4nt-1	3	7.5	0
R111X	2	5	0
Del5&6	2	5	0
T278I	2	5	1 ⁽²²⁾
Y77X	1	2.5	0
A202V	1	2.5	ND
E6nt-96a>g	1	2.5	0
R243Q	1	2.5	10 ⁽³⁰⁾
R252P	1	2.5	ND
R261X	1	2.5	0
IVS10nt-14	1	2.5	0
Q301H	1	2.5	ND
D415H	1	2.5	ND
L430P	1	2.5	ND
Mild type			
R241C	6	15	25 ⁽²⁵⁾
L52S	1	2.5	27 ⁽¹⁹⁾
R408Q	1	2.5	55 ⁽²⁶⁾
Total	39/40	97.5	

ND, not determined.

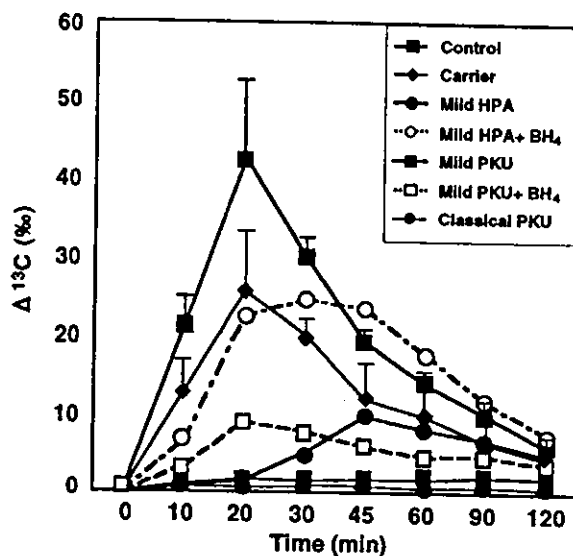


Figure 2. Time course of $^{13}\text{CO}_2$ excretion during phenylalanine breath test in control subjects, heterozygotes, and patients with PAH deficiency. $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) values during 120 min after ingestion of ^{13}C -phenylalanine are expressed as solid lines without BH_4 dosing and as dashed lines with BH_4 dosing. Data of the control and heterozygotes are expressed as mean \pm SD, whereas those of patients with PAH deficiency are expressed as mean values.