

Table 1 OMIM database entries for BOR and BO syndrome

	Name	OMIM	Locus	Gene
BOR1	branchio-oto-renal syndrome 1	113650	8q13.3	<i>EYA1</i>
BOR2	branchio-oto-renal syndrome 2	610896	19q13.3	<i>SIX5</i>
BOS1	branchio-otic syndrome 1	602588	8q13.3	<i>EYA1</i>
BOS2	branchio-otic syndrome 2	120502	1q31	Unknown
BOS3	branchio-otic syndrome 3	608389	14q23	<i>SIX1</i>

BO, branchio-otic; BOR, branchio-oto-renal.

different causes of hearing loss for each ear, and 12.8% of all cases involved progressive hearing loss.

Diagnosis of the cause of conductive hearing loss can be made on computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging of the temporal bone. Various findings for BOR syndrome have been uncovered on temporal bone CT. Temporal bone anomalies include cochlear hypoplasia, absent or hypoplastic semicircular canals and large vestibular aqueduct syndrome.^{6,7} Propst *et al.* reported that various characteristics of the 42 BOR patients surveyed in their study were significantly different from control patients; these were hypoplastic apical turn of the cochleae, division of the facial nerve toward the medial side of the cochleae, funnel-shaped internal auditory canals and patulous Eustachian tubes.⁸

Other otologic findings

Branchio-oto-renal patients present with various otologic anomalies (Table 2). Preauricular pits were the most frequently

Table 2 Clinical symptoms in Japanese BOR syndrome

Features	% (n = 50)
Hearing loss	92
Preauricular pit	53
Renal anomalies	40 (n = 35) [†]
Branchial fistulae	50
Pinnae deformities	38
External auditory canal stenosis	12
Preauricular tag	12
Others	
Retrognathia	2
Facial nerve paresis	3
Cleft palate	2
Bifid uvula	1
Congenital heart anomaly	1
Imperforate anus	1
Iris atrophy	1
Intracerebral hemorrhage	1

[†]Renal examinations were performed in 35 patients. BOR, branchio-oto-renal.

Table 3 Hearing loss in Japanese BOR syndrome

Side of hearing loss (%)	Type of hearing loss (%)
Bilateral 70.2 [†]	Conductive 19.1
Unilateral 25.5	Sensorineural 29.8 [†]
Unknown 4.3	Mixed 40.4 [†]
	Unknown 14.9

[†]Two patients had different causes of hearing loss on either side (sensorineural and mixed). BOR, branchio-oto-renal.

observed symptom in both the Chen *et al.* study,⁴ and the present study. Branchial fistulae, pinnae deformities, external auditory canal stenosis and preauricular tags were also frequently observed.

Renal anomalies

Renal anomalies associated with BOR syndrome include renal hypoplasia, agenesis and hydronephrosis due to ureteropelvic junction (UPJ) or vesicoureteral reflux (VUR). Renal anomalies have been observed in approximately 67% of patients with BOR syndrome.⁴ Krug *et al.* reported that in a large cohort of 140 BOR patients from 124 families, renal hypoplasia was the most frequent symptom with *EYA1* or *SIX1* mutations.⁹ In the present survey, 40% of the 35 Japanese BOR patients who were examined for renal abnormalities presented with renal anomalies, with the most frequent symptom also being renal hypoplasia (Table 4). Some of the present patients had different types of anomalies in either kidney.

In rare cases, glomerular lesions have been observed in BOR patients. Gigante *et al.* reported an adult male patient with a BOR phenotype resulting from an *EYA1* mutation who presented with focal segmental glomerulosclerosis.¹⁰ In the present study, a patient with BOR syndrome presented with membranous nephropathy resulting from an *EYA1* partial deletion. Although these glomerular findings were not presumably associated with the *EYA1* mutation, renal biopsy should be considered for all patients with proteinuria.

Renal examinations are usually not performed for BOR patients without any apparent renal symptoms. In the present study, 30% of BOR patients did not undergo any renal examination.

Table 4 Renal anomalies in Japanese BOR syndrome

Anomaly	n
Renal hypoplasia	10
Hydronephrosis	5
Renal agenesis	3
Others	
Multicystic dysplastic kidney	1
Hydroureter	1
Urethral stenosis	1
Membranous nephropathy	1
Renal malrotation	1
Nephroptosis	1
Chronic cystitis	1

BOR, branchio-oto-renal.

Other findings

Although heart disease is rare in BOR patients, mitral valve prolapse and bradycardia during anesthesia have been reported.^{11,12} Although one patient with an *EYA1* mutation had large patent ductus arteriosus, the clinical diagnosis in that case was craniofacial syndrome.¹³

Intellectual disability (ID) and psychomotor delay (PD) are not frequently observed in patients with typical BOR syndrome. ID or PD may indicate the presence of another disease or contiguous gene syndrome due to microchromosomal deletions across genes such as *EYA1* or *SALL1*.

Clinical diagnosis

Chang *et al.* developed the diagnostic criteria of BOR syndrome in 2004.^{5,14} These include major criteria such as second branchial arch anomalies, hearing loss, preauricular pits, auricular deformity and renal anomalies, and minor criteria such as external auditory canal anomalies, middle ear anomalies, inner ear anomalies, preauricular tags and other symptoms such as facial asymmetry and palate abnormalities. In patients with a family history, any single major criterion is sufficient for diagnosis of BOR syndrome. Without any family history, three major criteria or two major and two minor criteria are needed to make a confident diagnosis.

Genetic analysis

EYA1, *SIX1* and *SIX5* have been shown to be causative genes of BOR and BO syndrome (Table 1).

EYA1

EYA1 (8q13.3) is an ortholog of *Drosophila eya* (eyes absent) and acts as a protein phosphatase and transcriptional coactivator. *EYA1* is the most frequent causative gene of BOR syndrome (BOR1, OMIM 113650, BOS1, OMIM 602588) and was first reported in 1997 by Abdelhak *et al.*¹⁵ *Eya1* homozygous-deficient mice lack ears and kidneys; in addition, *Eya1* heterozygous-deficient mice present with phenotypes resembling BOR syndrome.^{16,17} Vertebrates encode four EYA proteins (EYA1–EYA4), and these proteins are involved in organ development, innate immunity, DNA damage repair, photoperiodism, angiogenesis and cancer metastasis.¹⁸ *EYA1* has three isoforms and four transcript variants resulting from alternative splicing.^{19,20} *EYA1* has 16 coding exons, and the EYA1 protein contains the eyes absent homologous region (EyaHR). Mutations are more frequently observed in the EyaHR, which is conserved across the EYA family.

Krug *et al.* recently reported that the causative gene could be identified for 42% of BOR patients, 93% of which were attributable to an *EYA1* mutation.⁹ In an East-Asian cohort, *EYA1* was also identified as the major causative gene in BOR patients.^{21–23} The types of mutations in *EYA1* associated with BOR syndrome are missense, nonsense, splice abnormalities and micro- or whole gene deletions. In the present study we were able to identify the causative gene in 21 Japanese BOR patients from 12 different families, and *EYA1* was observed in 11 of these families. *EYA1* was also therefore the major causative gene in this cohort.

SIX1

SIX1 is another causative gene of BOR syndrome (BOS3, OMIM 608389). *SIX1* (14q23.1) encodes a homeobox protein, which is similar to the *Drosophila* gene product, sine oculis. The genes in the *SIX* family all have a DNA-binding homeodomain (HD) and a protein interaction SIX domain (SD).²⁴ The HD is essential for protein-DNA binding, while the SD is involved in protein–protein interactions.²⁵ The EYA/SIX complex possesses tyrosine phosphatase activity,²⁶ and *SIX1* interacts with *EYA1* in the development of various organs.

In 2004, Ruf *et al.* first reported cases of BOR syndrome resulting from three types of *SIX1* mutation.²⁷ Kochhar *et al.* later reported five novel *SIX1* mutations identified across 247 BOR families.²⁸ The clinical phenotype of BOS3 mutations is similar to the BOR1 *EYA1* mutation, but renal anomalies are less frequent for the *SIX1* mutations.^{28,29} DFNA23 (OMIM 605192), which is non-syndromic autosomal dominant hearing loss, is also attributable to *SIX1* mutations. *SIX1* mutations in BOR syndrome occur less frequently than the *EYA1* mutation. Krug *et al.* reported that *SIX1* mutations occurred in only 2.8% of their 140 BOR patients, while the *EYA1* mutation was present in 39.3% of the patients.⁹ *SIX1* mutations in East-Asian BOR patients are also very rare.^{22,23,29}

SIX5

SIX5, which is located on 19q13.32, has been reported to be the causative gene in 5% of BOR patients (BOR2, OMIM 610896).³⁰ *SIX5* has a high degree of homology to *SIX1* and directly interacts with *EYA1*, but there have been no additional reports since on the *SIX5* mutation and one of the patients initially reported by Klug *et al.* to have a *SIX5* mutation was later confirmed to have an *EYA1* mutation instead.⁹ The role of *SIX5* in BOR syndrome is therefore still open to question and further study is essential.

Copy number variation in BOR syndrome

Brophy *et al.* recently reported that copy number variation (CNV) analysis from array-based comparative genomic hybridization (CGH) can identify the responsible lesion in BOR patients.³¹ They analyzed 35 BOR patients without any mutations in *EYA1*, *SIX1* or *SIX5* and 17 patients were identified as having significant CNV (11 chromosomal microdeletions and six microduplications). These chromosomal abnormalities may be due to non-allelic homologous recombination (NAHR). Moreover, several new causative genes were suggested in their study: *SHARPIN* (8q24.3), *FGF3* (11q13) and the *HOXA* genes.

Other loci

Although Kumar *et al.* reported in 2000 that the locus associated with ontologic and branchial manifestations was 1q31,³² which is the locus of BOS2 (OMIM 12052), it appears that this locus has since been withdrawn.⁵

Genotype–phenotype correlations

Genotype–phenotype correlations have not yet been confirmed for BOR patients. In the same consanguineous family, different

family members may present with different symptoms. ID is, however, infrequent in patients with distinctive BOR syndrome. Patients presenting with ID may have other syndromes or chromosomal microdeletions in contiguous genes including *EYAI* or *SALL1*.

Genetic analysis strategy for BOR diagnosis

The *EYAI* mutation is the most common cause of BOR syndrome, so *EYAI* direct sequencing should be performed first. In cases of *EYAI* point mutations, small deletions or insertions are not present, and multiplex ligation-dependent amplification (MLPA) analysis should be carried out. We identified 11 families with BOR syndrome resulting from an *EYAI* mutation, and in six cases the deletion of one or more exons in the *EYAI* gene was detected on MLPA analysis. We have reported that the *EYAI* partial deletion was due to replacement of the deleted region by the retrotransposon, LINE-1, as detected on MLPA analysis.³³ Patients without any *EYAI* mutations should be considered for *SIX1*, *SIX5* and array CGH analysis. For the approximately 50% of patients with BOR syndrome for which the causative gene cannot be detected, further investigations are needed to study novel candidate genes such as those proposed by Brophy *et al.*³¹

Genetic counseling

Genetic counseling is the process of empowering patients by providing them with medical information regarding their particular genetic abnormality.⁵

Approximately 90% of BOR patients have their affected parent in a Western country. BOR syndrome is inherited as an autosomal dominant disorder and *EYAI* penetrance is very high with an inherited relapse rate of 50%. When the proband is born to non-affected parents, the risk of the sibling having BOR is slightly higher than for the general population because of the possibility of germinal mosaicism. Generational progression in BOR syndrome has not been reported.

Differential diagnosis

Hearing loss is a symptom of many genetic syndromes so it may be difficult to reach a conclusive diagnosis based on this symptom alone, especially in cases of sporadic hearing loss. Genetic tests are required to distinguish BOR syndrome from other syndromes. Other syndromes that should be differentially diagnosed from BOR syndrome are as follows.

Townes–Brocks syndrome

Townes–Brocks syndrome (TBS, OMIM 107480) is an autosomal dominant disorder characterized by branchiogenic anomalies, hearing loss, congenital heart disease, preaxial polydactyly and imperforate anus. Renal anomalies are also seen. The causative gene of TBS is *SALL1* (16q12.1), which is a critical gene in renal generation in fetal development. The mechanism of *SALL1* mutations in TBS is dominant-negative based, therefore a heterozygous whole gene deletion leads to milder symptoms.

Engels *et al.* reported a family including an affected father and two daughters with a *SALL1* frameshift mutation.³⁴ These patients presented with hearing loss and pinnae deformities but

without preaxial polydactyly or an imperforate anus. These symptoms are compatible with BOR syndrome rather than TBS. This report indicates that BOR syndrome patients without any detectable *EYAI*, *SIX1*, or *SIX5* mutations may benefit from genetic analysis of *SALL1*.

Branchio-oculo-facial syndrome

Branchio-oculo-facial syndrome (BOFS, OMIM 113620) is a rare autosomal dominant disorder resulting from a *TFAP2A* mutation.^{35,36} There are phenotypic overlaps with BOR syndrome, but BOFS produces more distinctive facial features. BOFS is characterized by hearing loss, branchial anomalies and renal abnormalities. BOFS patients also have craniofacial and ocular abnormalities. Skin defects in the cervical or infra- or supra-auricle are observed in >90% of BOFS patients. Furthermore, ID is more common in BOFS than in BOR syndrome.

Oto-facio-cervical syndrome

Oto-facio-cervical syndrome (OFCS1 166780, OFCS2 615560) is an autosomal disorder characterized by facial dysmorphism, external ear malformations with hearing loss, branchial cysts or fistulae and anomalies of the vertebrate and shoulder girdle. In addition, mild ID is also seen. OFCS was first described by Fara *et al.* in an affected family.³⁷ OFCS has a similar phenotype to BOR; moreover, OFCS1 is an allelic disorder resulting from an autosomal dominant *EYAI* mutation.³⁸ OFCS2 is due to the mutation of *PAX1* in an autosomal recessive manner.³⁹ The difference between OFCS and BOR syndrome lies in the presence of ID and vertebral anomalies in OFCS patients.

CHARGE syndrome

CHARGE syndrome (OMIM 214800; coloboma, heart defects, choanal atresia, retarded growth and development, genital anomalies, and ear anomalies) has similar symptoms to BOR syndrome, including hearing loss, branchiogenic malformations and renal malformations. In addition, coloboma, mental and growth retardation, congenital heart anomalies, choanal atresia and cryptorchidism are often present. Facial asymmetry and hockey stick signs on the palms are often observed. The causative gene of CHARGE syndrome is *CHD7* (8q12.1-q12.2).⁴⁰ The less frequent developmental and growth delays observed for BOR can assist in differentiating this syndrome from CHARGE syndrome.

HDR syndrome

Hypoparathyroidism, with sensorineural deafness and renal dysplasia (HDR) syndrome is a rare autosomal dominant disorder characterized by sensorineural hearing loss, renal anomalies and hypothyroidism. HDR syndrome is due to haploinsufficiency of *GATA3* (10p14).⁴¹ Patients with HDR syndrome often present with hypocalcemia. Historical interviews and genetic tests are helpful in distinguishing this syndrome from BOR.

Management

Second branchial anomalies and preauricular anomalies

Treatment for branchial anomalies is performed for supportive or cosmetic reasons. If auricular or branchial fistulae become infected, antibiotic therapy is applied and, in cases of recurrence, they are removed.

Hearing loss

Hearing loss requires early medical intervention because of its effect on language development. There are various causes of hearing loss in BOR syndrome, so it is important to provide treatment appropriate to each. In the present surveillance, 80.1% of BOR patients found the use of a hearing aid effective. Surgical operations such as tympanoplasty, cochlear implantation and tympanic ventilation tube therapy were performed in 11 patients and were effective in seven (63.6%). Cochlear implantation may be successful for improving the hearing ability of BOR patients.⁴²

Renal anomalies

Renal anomalies are controlled in a standard manner. Patients with hydronephrosis including UPJ stenosis or VUR may need to undergo surgical therapy. Renal hypoplasia or dysplasia leads to end-stage renal failure, requiring renal replacement therapy. In the present surveillance, of the 14 BOR patients with renal symptoms, four had renal transplantation while three patients were given medical drugs. The prognosis of BOR syndrome mainly depends on the severity of the renal insufficiency.

Conclusion

Patients with BOR syndrome who receive adequate treatment can lead normal, productive lives. It is therefore essential to provide early diagnosis including the relevant genetic tests. Further studies are needed to clarify the molecular mechanisms and undiscovered causative genes of BOR syndrome.

Acknowledgments

This work was supported by a Health Labor Sciences Research Grant for the Research on Measures for Intractable Diseases (H21-nanchi-ippan-103 to K.I, H24-nanchi-ippan-041 to K. I.).

References

- 1 Melnick M, Bixler D, Nance WE, Silk K, Yune H. Familial branchio-oto-renal dysplasia: A new addition to the branchial arch syndromes. *Clin. Genet.* 1976; **9**: 25–34.
- 2 Fraser FC, Sproule JR, Halal F. Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss. *Am. J. Med. Genet.* 1980; **7**: 341–9.
- 3 Iijima K. H21 Health Labor Sciences Research Grant for the Research on Measures for Intractable Diseases; the research report. Ministry of Health, Labor and Welfare, Tokyo, 2010 (in Japanese).
- 4 Chen A, Francis M, Ni L *et al.* Phenotypic manifestations of branchio-oto-renal syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1995; **58**: 365–70.
- 5 Smith RJH. Branchiootorenal spectrum disorders. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD *et al.* (eds). *Gene Reviews*TM (Internet). University of Washington, Seattle, WA, 1999. Mar 19 [Updated 2013 Jun 20; Cited 23 February 2014.]; Available from URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1380/>.

- 6 Ostri B, Johnsen T, Bergmann I. Temporal bone findings in a family with branchio-oto-renal syndrome (BOR). *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 1991; **16**: 163–7.
- 7 Ceruti S, Stinckens C, Cremers CW, Casselman JW. Temporal bone anomalies in the branchio-oto-renal syndrome: Detailed computed tomographic and magnetic resonance imaging findings. *Otol. Neurotol.* 2002; **23**: 200–7.
- 8 Propst EJ, Blaser S, Gordon KA, Harrison RV, Papsin BC. Temporal bone findings on computed tomography imaging in branchio-oto-renal syndrome. *Laryngoscope* 2005; **115**: 1855–62.
- 9 Krug P, Moriniere V, Marlin S *et al.* Mutation screening of the EYA1, SIX1, and SIX5 genes in a large cohort of patients harboring branchio-oto-renal syndrome calls into question the pathogenic role of SIX5 mutations. *Hum. Mutat.* 2011; **32**: 183–90.
- 10 Gigante M, d'Altilia M, Montemurno E *et al.* Branchio-oto-renal syndrome (BOR) associated with focal glomerulosclerosis in a patient with a novel EYA1 splice site mutation. *BMC Nephrol.* 2013; **14**: 60.
- 11 Aycicek A, Saglam H, Kocogullari CU, Haktanir NT, Derekooy FS, Solak M. Mitral valve prolapse as a new finding in branchio-oto-renal syndrome. *Clin. Dysmorphol.* 2010; **19**: 181–4.
- 12 Taylor MH, Wilton NC. Bradycardia with sevoflurane in siblings with branchio-oto-renal syndrome. *Pediatr. Anesth.* 2007; **17**: 80–83.
- 13 Shimasaki N, Watanabe K, Hara M, Kosaki K. EYA1 mutation in a newborn female presenting with cardiofacial syndrome. *Pediatr. Cardiol.* 2004; **25**: 411–13.
- 14 Chang EH, Menezes M, Meyer NC *et al.* Branchio-oto-renal syndrome: The mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences. *Hum. Mutat.* 2004; **23**: 582–9.
- 15 Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R *et al.* A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat. Genet.* 1997; **15**: 157–64.
- 16 Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S, Maas R. Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat. Genet.* 1999; **23**: 113–17.
- 17 Musharraf A, Kruspe D, Tomasch J, Besenbeck B, Englert C, Landgraf K. BOR-syndrome-associated eya1 mutations lead to enhanced proteasomal degradation of eya1 protein. *PLoS ONE* 2014; **9**: e87407.
- 18 Tadjuidje E, Hegde RS. The eyes absent proteins in development and disease. *Cell Mol. Life Sci.* 2013; **70**: 1897–913.
- 19 Kochhar A, Fischer SM, Kimberling WJ, Smith RJ. Branchio-oto-renal syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* 2007; **143A**: 1671–8.
- 20 Orten DJ, Fischer SM, Sorensen JL *et al.* Branchio-oto-renal syndrome (BOR): novel mutations in the EYA1 gene, and a review of the mutational genetics of BOR. *Hum. Mutat.* 2008; **29**: 537–44.
- 21 Okada M, Fujimaru R, Morimoto N *et al.* EYA1 and SIX1 gene mutations in Japanese patients with branchio-oto-renal (BOR) syndrome and related conditions. *Pediatr. Nephrol.* 2006; **21**: 475–81.
- 22 Wang SH, Wu CC, Lu YC *et al.* Mutation screening of the EYA1, SIX1, and SIX5 genes in an East Asian cohort with branchio-oto-renal syndrome. *Laryngoscope* 2012; **122**: 1130–36.
- 23 Song MH, Kwon TJ, Kim HR *et al.* Mutational analysis of EYA1, SIX1 and SIX5 genes and strategies for management of hearing loss in patients with BOR/BO syndrome. *PLoS ONE* 2013; **8**: e67236.
- 24 Patrick AN, Cabrera JH, Smith AL, Chen XS, Ford HL, Zhao R. Structure-function analyses of the human SIX1-EYA2 complex reveal insights into metastasis and BOR syndrome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013; **20**: 447–53.
- 25 Ohto H, Kamada S, Tago K *et al.* Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. *Mol. Cell. Biol.* 1999; **19**: 6815–24.
- 26 Mutsuddi M, Chaffee B, Cassidy J, Silver SJ, Tootle TL, Rebay I. Using *Drosophila* to decipher how mutations associated with

- human branchio-oto-renal syndrome and optical defects compromise the protein tyrosine phosphatase and transcriptional functions of eyes absent. *Genetics* 2005; **170**: 687–95.
- 27 Ruf RG, Xu PX, Silvius D *et al.* SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004; **101**: 8090–95.
- 28 Kochhar A, Orten DJ, Sorensen JL *et al.* SIX1 mutation screening in 247 branchio-oto-renal syndrome families: A recurrent missense mutation associated with BOR. *Hum. Mutat.* 2008; **29**: 565.
- 29 Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Kitamura K. SIX1 mutation associated with enlargement of the vestibular aqueduct in a patient with branchio-oto syndrome. *Laryngoscope* 2006; **116**: 796–9.
- 30 Hoskins BE, Cramer CH, Silvius D *et al.* Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *Am. J. Hum. Mutat.* 2007; **80**: 800–4.
- 31 Brophy PD, Alasti F, Darbro BW *et al.* Genome-wide copy number variation analysis of a branchio-oto-renal syndrome cohort identifies a recombination hotspot and implicates new candidate genes. *Hum. Genet.* 2013; **132**: 1339–50.
- 32 Kumar S, Deffenbacher K, Marres HA, Cremers CW, Kimberling WJ. Genomewide search and genetic localization of a second gene associated with autosomal dominant branchio-oto-renal syndrome: Clinical and genetic implications. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; **66**: 1715–20.
- 33 Morisada N, Rendtorff ND, Nozu K *et al.* Branchio-oto-renal syndrome caused by partial EYA1 deletion due to LINE-1 insertion. *Pediatr. Nephrol.* 2010; **25**: 1343–8.
- 34 Engels S, Kohlhase J, McGaughran J. A SALL1 mutation causes a branchio-oto-renal syndrome-like phenotype. *J. Med. Genet.* 2000; **37**: 458–60.
- 35 Lin AE, Gorlin RJ, Lurie IW *et al.* Further delineation of the branchio-oculo-facial syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1995; **56**: 42–59.
- 36 Milunsky JM, Maher TA, Zhao G *et al.* TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; **82**: 1171–7.
- 37 Fara M, Chlupackova V, Hrivnakova J. Familial oto-facio cervical dysmorphism. *Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech.* 1967; **34**: 511–20.
- 38 Rickard S, Parker M, van't Hoff W *et al.* Oto-facio-cervical (OFC) syndrome is a contiguous gene deletion syndrome involving EYA1: Molecular analysis confirms allelism with BOR syndrome and further narrows the Duane syndrome critical region to 1 cM. *Hum. Genet.* 2001; **108**: 398–403.
- 39 Pohl E, Aykut A, Beleggia F *et al.* A hypofunctional PAX1 mutation causes autosomal recessively inherited otofaciocervical syndrome. *Hum. Genet.* 2013; **132**: 1311–20.
- 40 Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R *et al.* Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat. Genet.* 2004; **36**: 955–7.
- 41 Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA *et al.* GATA3 haploinsufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* 2000; **406**: 419–22.
- 42 Kameswaran M, Kumar RS, Murali S, Raghunandhan S, Karthikeyan K. Cochlear implantation in branchio-oto-renal syndrome: A surgical challenge. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2007; **59**: 280–83.

V. 資料

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金

(難治性疾患等政策研究事業 (難治性疾患政策研究事業))

「腎・泌尿器系の希少・難治性疾患群に関する診断基準・診療ガイドラインの確立」

対象疾患「診断の手引き」

「診断の手引き」作成の背景

平成 27 年 1 月 1 日施行予定の新規小児慢性特定疾患治療研究事業向けに、児童福祉法の一部改正が行われた。この法改正の趣旨の一つは、公平かつ安定的な医療費助成の制度の確立を図ることであり、これ際して小児慢性特定疾患における対象疾患の見直しと、公平な診断を行うための診断基準の確立が必要となった。

慢性腎疾患における対象疾患は、日本小児腎臓病学会等により検討され、最終的に大分類 20 疾患、細分類 46 疾患が選定された。しかし、特に本厚生労働班研究に含まれる疾患群を含む希少疾患については、小児慢性特定疾患治療研究事業の要となる診断に関する基準が定められておらず、公平かつ適正な診断に基づく申請が行われない可能性が危惧された。

そこで、日本小児腎臓病学会が中心となり、また、本研究班（「腎・泌尿器系の希少・難治性疾患群に関する診断基準・診療ガイドラインの確立」に向けた研究班）の研究事業の一部として科学的根拠に基づく「診断の手引き」の作成を行った。

ここでは、小児慢性特定疾患治療研究事業に定められた 46 疾患に含まれる、次の 8 疾患について診断の手引きを作成した。

対象疾患

- (1)先天性腎尿路奇形(CAKUT)
- (2)アルポート症候群
- (3)先天性ネフローゼ症候群
- (4)非典型的溶血性尿毒症症候群(HUS)
- (5)小児 ANCA 関連腎炎
- (6)エプスタイン症候群
- (7)ネフロン癆
- (8)腎血管性高血圧

新潟大学医歯学総合病院小児科
池住 洋平（分担研究者）

もくじ

対象疾患

(1)先天性腎尿路奇形(CAKUT)	
● 腎奇形 (大項目)	4
● 低形成腎	5
● 多嚢胞性異形成腎	7
● 閉塞性尿路疾患	9
● 膀胱尿管逆流 (下部尿路の閉塞性尿路疾患による場合を除く)	12
(2)アルポート症候群	14
(3)先天性ネフローゼ症候群	
● フィンランド型先天性ネフローゼ症候群	18
● びまん性メサンギウム硬化症	21
(4)非典型的溶血性尿毒症症候群(HUS)	22
(5)小児 ANCA 関連腎炎	
● 急速進行性糸球体腎炎 (顕微鏡的多発血管炎による)	26
● 急速進行性糸球体腎炎 (多発血管炎性肉芽腫症による)	29
(6)エプスタイン症候群	33
(7)ネフロン癆	35
(8)腎血管性高血圧	37

(1) 先天性腎尿路奇形(CAKUT)

小児慢性疾患名 (日本語)	腎奇形
小児慢性疾患名 (英語)	Renal anomaly

【概要】

小児 CKD ステージ 5 の原因疾患は先天性腎尿路奇形 (congenital anomalies of the kidney and urinary tract : CAKUT) が最も多い。CAKUT は腎尿路系の構造異常を呈するが、病初期から検尿を契機とした血尿、蛋白尿で発見されることは少ない。小児 CKD は乳幼児期に体重増加不良、多尿 (低張尿)、尿路感染症などの精査の過程で発見されることもあるが、早期診断のための画像検査と CAKUT の重症度の評価が重要と考えられている。

【診断方法】

画像検査 (超音波検査、核医学検査) により診断する。

【科学的根拠のまとめ】

CKD 診療ガイドライン 2013 より、「小児 CKD、特に先天性腎尿路奇形の診断と治療方針決定に画像検査は有用である可能性がある。」^{a)}

CKD 診療ガイドライン 2013 作成手法のまとめ

1. 慢性糸球体腎炎を含む、小児慢性腎臓病 (CKD) 診断のための臨床上の疑問を作成した。
2. その臨床上の疑問に則りキーワードを抽出し、そのキーワードを用い MEDLINE、EMBASE、Cochrane library など主要な医療系データベースを検索した。
3. 検索により見つかった研究論文を、タイトルおよび抄録で一次スクリーニングを行い、全文を取り寄せる文献が決定された。
4. 取り寄せられた論文は批判的吟味を行い、下記の表に従って根拠の確かさを決めた。
5. 臨床疑問ごとに批判的吟味を受けた研究をまとめ根拠を示した。

ただし、メタ解析/システマティックレビューは、基になった研究デザインによりエビデンス・レベルを決定した。基になる研究デザインが混在している場合には、最も低いものに合わせるとういうことをコンセンサスとした。

レベル 1	システマティックレビュー、メタアナリシス
レベル 2	ランダム化比較試験
レベル 3	非ランダム化比較試験、非比較試験 (単群の前向き介入試験)
レベル 4	コホート研究、症例対照研究、横断研究、比較観察研究、非比較観察研究
レベル 5	症例集積、症例報告、その他 (記述的研究など)
レベル 6	患者データに基づかない、専門委員会や専門家個人の意見

【参考文献】 (参考にした二次資料)

- a) 日本腎臓学会 編. CKD 診療ガイドライン 2013. 東京医学社, 東京, 2013

小児慢性疾患名 (日本語)	低形成腎
小児慢性疾患名 (英語)	Hypoplastic kidney

【概要】

腎の発生過程で、何らかの原因により生じる先天的な尿管芽の分岐異常により、組織学的には正常なネフロンを有するがネフロンの数が少ない病態を言う。異形成腎と合併することも多く、臨床的には低形成・異形成腎として一括して取り扱われることも多い。

【診断方法】

腎機能低下などの臨床所見により疑い、画像検査にて診断する。

- ①腎の大きさ（長径）が超音波検査上-2SD 以下、②核医学検査(DMSA) による腎臓痕の除外、③片側性の場合は対側腎の代償性肥大がみられることが診断となる^{a)b)}。
- 小児の腎機能評価は CKD 診療ガイドライン 2013 の基準にしたがう^{b)}。

【診断の手引き作成の背景】

臨床的特徴として、妊婦健診の際の胎児エコーにより出生前に発見される例も多いが、一方尿路感染症や成長障害を契機に指摘される症例もある。

低形成異形成腎は、欧米の研究で小児において末期腎不全の原因疾患第 1 位（34.1%）と報告されている^{a)}。最近本邦の保存期 CKD¹⁾、あるいは末期腎不全の研究²⁾でも、同様に低形成・異形成腎が主要な原疾患であることが示されている。

低形成腎では早期には濃縮力低下から低張多尿を呈しており、それを補うために多飲となっている。また夜尿や昼間遺尿の原因が多飲多尿であり、精査で画像上はじめて低形成腎が指摘される場合もある。

低形成腎は末期腎不全に至るまで尿量が保たれることが多く、高カリウム血症や溢水を呈することは末期に至るまで少ない。しかし血液データの悪化を認めてからの増悪スピードは速く、先行的移植を考慮する場合は、腎移植実施施設へのタイミングに注意が必要である。

感染症、とくに胃腸炎などの脱水が原因で、急速に腎機能低下が進行する場合がある。脱水に対して適切かつ迅速な加療は必要であるが、低張輸液の使用は低形成腎に対して注意が必要である。

低形成腎の患者は、習慣的に水分と塩分をより多く摂取することによって尿からの水とナトリウム (Na) の喪失を自然にコントロールしている。入院中の食事は普段の食事と比べ塩分量が少なくなるため血管内脱水を引き起こし、体重の減少、血圧低下、尿量低下や腎機能低下を引き起こす可能性がある。

【参考文献】

- 1) Ishikura K, Uemura O, Hamasaki Y, et al. Progression to end-stage kidney disease in Japanese children with chronic kidney disease: Results of a nationwide prospective cohort study. *Nephrol Dial Transplant* 29: 878-884, 2014

- 2) 服部元史, 佐古まゆみ, 金子徹治, 他: 2006年~2011年までの期間中に新規発生した20歳未満の小児期末期腎不全患者の実態調査報告. 日児腎誌 26:154-164, 2013

参考にした二次資料

- a) Sanna-Cherchi S, Caridi G, Weng PL, et al: Genetic approaches to human renal agenesis/hypoplasia and dysplasia. *Pediatr Nephrol* 22:1675-1684, 2007
- b) 日本腎臓学会 編. CKD 診療ガイドライン 2013. 東京医学社, 東京, 2013

小児慢性疾患名 (日本語)	多嚢胞性異形成腎
小児慢性疾患名 (英語)	Multicystic dysplastic kidney : MCDK

【概要】

異形成腎は後腎間葉組織の分化が異常で不完全なものを指し、厳密には組織像に基づいて診断される。その特徴は原始集合管とその周囲を取り巻く筋線維芽細胞の増生である。多嚢胞性異形成腎(multicystic dysplastic kidney : MCDK)は異形成腎の最重症型であり、腎臓の形態をもち、ブドウの房のような外観を呈する。嚢胞と結合組織よりなり、通常腎実質は認めないが、わずかに機能腎を認めることがある。

ほとんどは片側性で無症状である。腎盂の形成不全を基盤とするため、尿管は認められないか閉塞している。

【診断方法】

画像検査にて診断する。確定診断には組織学的に腎の異形成を確認する必要がある。

一般に、エコーでは、①大小さまざまなサイズの嚢胞がばらばらに位置する、②もっとも大きな嚢胞が中心側でない、③嚢胞間での交通が観察されない、④正常な腎実質エコーは通常観察されない、ことで診断できるが、本症と重症水腎症(腎盂尿管移行部狭窄)との鑑別が難しい場合がある。

この場合は核医学による評価が有用である。水腎症では集積があるものの、本症では集積がないことから区別できることが多い。通常静的核医学検査では患側腎は無機能で、対側腎は代償のため核種の摂取率が増加している^{a)b)}。

【診断の手引き作成の背景】

大部分の症例で経過観察が基本方針となるため、実際には臨床経過および画像検査による診断が中心となる。超音波、CT、MRIなどで嚢胞が描出され、核医学的検査で無機能腎を確認する、診断が困難となる要因は、MCDKが自然退縮傾向を示すことである。

出生前診断や水腎症、他の嚢胞性疾患との鑑別は必ずしも容易ではないが、胎児エコーの所見、出生後の経過、画像診断を組み合わせることで診断の精度は向上する。遺伝性や多発奇形症候群の所見の一つとして認められることもあるため、家族歴や全身検索も必要である^{a)}。

出生約 4,300 人に 1 人の頻度で見られる。嚢胞性腎疾患のなかでもっとも多く、また新生児期の腹部腫瘍の理由として多い疾患のひとつである。

近年の診断技術の進歩に伴い出生前診断されることが多く(80.8%)、診断時期の平均は胎生 28 週(胎生 21~35 週)である。出生後は腹部腫痛(64.2%)、尿路感染症(7.1%)をきっかけとして実施されたエコーや、圧迫症状による嘔吐や呼吸障害、その後は腹痛、血尿、高血圧などで発見される。左に多く(53.1%)、男児に多い(59.2%)。

両側 MCDK では羊水過少、特異顔貌、四肢変形、肺低形成などの Potter 症候群の特徴をもち、生存できない^{c)}。

【参考文献】（参考にした二次資料）

- a) 金子一成: 多嚢胞性異形成腎.腎と透析 54: 449-453, 2003
- b) Ismaili K, Avni FE, Alexander M, et al: Routine voiding cystourethrography is of no value in neonates with unilateral multicystic dysplastic kidney. J Pediatr 146: 759, 2005
- c) Hains DS, Bates CM, Ingraham S, Schwaderer AL: Management and etiology of the unilateral multicystic dysplastic kidney: a review. Pediatr Nephrol 24:233-241, 2009

小児慢性疾患名（日本語）	閉塞性尿路疾患	閉塞性腎症
小児慢性疾患名（英語）	Obstructive nephropathy	Obstructive nephropathy

【概要】

様々な原因による尿路通過障害によって生ずる腎機能障害を閉塞性腎症といい、閉塞性腎症を生じる上部・下部尿路の異常を閉塞性尿路疾患と定義する。

【診断方法】

画像検査により診断する。超音波断層法が最も簡便で有用であるが、原疾患の診断や閉塞の有無、閉塞部位の特定、さらに腎機能障害の評価には静脈性腎盂造影、造影 CT 検査、レノグラム、レノシンチグラフィが有用である。

閉塞の有無や程度の診断には 99mTc-MAG3 ないし 99mTc-DTPA を用いたレノシンチグラフィを、腎障害の程度の診断には 99mTc-DMSA を用いたシンチグラフィをそれぞれ行う。

【科学的根拠のまとめ】

尿路通過障害の原因を表 1 に示す。

本症は、血尿などの尿所見、側腹部痛、発熱など原疾患に付随した症状で発見される場合が多いが、症状に乏しく腎機能が高度に低下した段階で発見される場合もある。閉塞が両側性か一側性か、閉塞の程度、経過（急性、慢性）などによって病態が著しく異なる¹⁾。

表1 閉塞性腎症の原因疾患

	病変部位	
	上部尿路	下部尿路
先天性	腎盂尿管移行部閉塞 巨大尿管症	下部尿路 後部尿道弁
後天性	尿管結石 尿管腫瘍 骨盤腔ないし後腹膜腔腫瘍 後腹膜線維症	前立腺肥大症 尿道狭窄 神経因性膀胱

1. 水腎症

水腎症はよく用いられる用語であるが、病名ではなく症状であり、腎盂腎杯が拡張した状態と定義される。水腎症は尿路の器質的・機能的狭窄や閉塞により引き起こされ、腎盂以下の尿路のどの部位でも生じ得る。このため小児の水腎症を呈する鑑別疾患としては、①先天性水腎症、②巨大尿管症・尿管癖などの膀胱・尿管の先天性異常に伴う拡張、③後部尿道弁・神経因性膀胱などの下部尿路機能障害に伴う尿管拡張、④膀胱尿管逆流症に伴う腎盂尿管拡張、⑤結石や腫瘍などによる腎盂・尿管閉塞に伴う水腎症、⑥間欠性水腎症などがあげられる。

2. 巨大尿管

巨大尿管は尿管が拡張した状態と定義され、もともと尿管の機能的狭窄により尿管が拡張する

病名として報告された。病態を示す用語としては水腎水尿管になるが、現在巨大尿管症も病態が多岐なため病態を示す用語として使用されている。原因は水腎症同様にさまざまであり、上記の②③④⑤が該当する。巨大尿管に関しては小児の尿管径の正常値が明確化できないため、明確に定義は難しいが小児では5mm以上を超える正常尿管は少ないため、7~10mm以上で巨大尿管とされていることが多い。

- 臨床症状

1. 先天性水腎症

以前は腹部腫脹や腹痛などの症候性に判明したものが多かったが、現在は胎児超音波検査の施行により出生前より診断されることが多くなり、胎児期に発見される水腎症は1,000人に1人程度と報告されている。両側高度水腎症の場合、羊水過少が認められることがある。新生児から幼児期には超音波検査で診断されない場合、無症候性であり、触診上での腹部主張、血尿、尿路感染などで判明するため、胎児・新生児期の超音波検査によるスクリーニングは重要である。年長児では、腹痛・側背部痛などの腹部所見を認めることが多くなり、周期的に悪化を認める間欠性水腎症で判明することもある。

2. 原発性巨大尿管症

巨大尿管症も臨床症状はほとんど先天性水腎症と変わらないが、腎盂腎杯のみならず尿管という伸展可能な部分があるため、水腎症以上に臨床症状が乏しい。現在、胎児・新生児超音波検査での水腎水尿管症として指摘されることが多く、先天性水腎症より尿路感染で発見される頻度は高い。

- 検査

拡張の悪化・腎機能の低下をきたさないような経過観察もしくは手術決定するために行う。

1. 超音波検査

もっとも非侵襲的で病態の把握に有用である。経時的に施行することで水腎症・巨大尿管の悪化・改善を確認できる。

2. レノグラム

分腎機能低下を確認するために重要な検査である。利尿レノグラムは以前広く行われたが、閉塞状態の評価が絶対的なものではないため、経過観察を行う際の参考程度である。初回検査で分腎機能に低下を認めた場合や経過観察中に分腎機能低下した場合、手術を考慮すべきである。

3. 排尿時膀胱尿道造影(VCUG)

巨大尿管症の逆流性の鑑別、軽度水腎症における膀胱尿管逆流症による腎盂拡張の鑑別に必要であり、高度水腎症では、尿路感染コントロールや手術のプランに影響する可能性があるため、一度は評価すべきと考えられる。

4. MR ウログラフィ・経静脈的腎盂尿管造影(IVP)

狭窄部位の確認、拡張の状態、尿管ポリープなどの確認に有用である。

5. 逆行性腎盂尿管造影

狭窄部位の状態(尿管ポリープなどの確認)や狭窄部以下の尿管の状態確認に用いられる。小児では全身麻酔が必要であり手術適応のある場合に考慮されるべきである。

【参考文献】

- 1) Gulmi FA, et al: Pathophysiology of urinary tract obstruction. In: Campbell's Urology, 7th ed, p342-385, WB Saunders, Philadelphia, 1998

小児慢性疾患名（日本語） 膀胱尿管逆流（下部尿路の閉塞性尿路疾患による場合を除く）

小児慢性疾患名（英語） vesicoureteral reflux：VUR

【概要】

本症は、膀胱尿管移行部の形成不全(原発性)や下部尿路通過障害などに起因する逆流防止機構の破綻(二次性)により膀胱内の尿が尿管ないし腎盂に逆流する現象である。

【診断方法】

排尿時膀胱尿道造影(voiding cystourethrography:VCUG)で診断し、国際分類(I度：尿管までにたまる逆流、II度：腎盂まで逆流するが尿管・腎盂の拡張や腎杯の変形はない、III度：軽度の尿管・腎盂の拡張と腎杯の変形を伴う、IV度：中等度の尿管・腎盂の拡張と腎杯の鈍化を呈する、V度：高度の尿管・腎盂の拡張と尿管の屈曲・蛇行、腎杯の拡張および乳頭部の形態消失)を用いて程度を表す(図)。

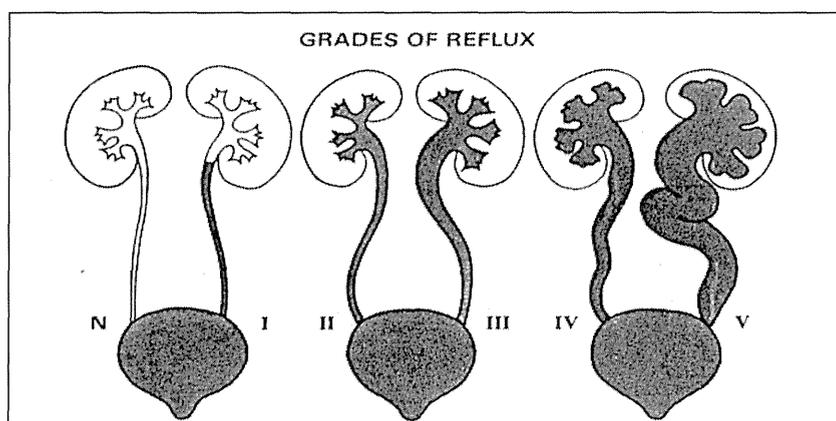


図 VUR の排尿時膀胱尿道造影による国際分類

【診断の手引き作成の背景】

VUR 自体は無症状であるが、有熱性尿路感染を契機に VUR が発見されることが圧倒的に多い。小児尿路感染症の 30-50%に VUR が存在するといわれている¹⁾。従って、特に反復する腎盂腎炎の場合には、VUR を疑う必要がある。出生前診断された水腎症の精査により VUR が診断される場合もある。小児期に反復性腎盂腎炎がありながら、VUR が診断されなかったケースや先天性逆流性腎症が高度な場合には、蛋白尿を契機にして VUR が診断されることもある。

VUR を診断する標準的な画像検査は、排尿時膀胱尿道造影法(voiding cystourethrography：VCUG)である。VUR はその程度により、grade I～Vの5段階に重症度分類される(図)。VCUGでは蓄尿時の膀胱形態、排尿時の尿道形態の詳細な観察が可能で、下部尿路機能異常や下部尿路の器質的異常の有無を鑑別する。男児の VUR では、後部尿道弁や尿道リング状狭窄などの器質的尿道異常による続発性 VUR の可能性を念頭において、VCUGの側面像により尿道を丁寧に観察する。

最近、top-down approach の概念のもとに、まずは DMSA 腎シンチグラムを用いるようになっ

てきた。すなわち、腎シンチグラムで集積欠損を認めたものにかぎ VCUG を行うという方針である。この方針では、acute DMSA defect、腎癩痕、異形成腎のいずれをも伴わない VUR 症例は、たとえ VUR があっても診断されずに経過観察されることになるが、そのような VUR のほぼ全例が自然改善するか、尿路感染症を再発しながらも腎癩痕を発生させないと報告されている^{2, 3)}。

VUR により腎盂腎炎を発症した場合、腎癩痕という形で腎障害が残る可能性がある。VUR による腎障害は逆流性腎症とよばれる。99mTc-DMSA 投与 2 時間後の腎摂取率を測定することにより、分腎機能を知ることができる。発熱を伴う尿路感染症に罹患した後は、6 カ月以上期間において測定することが重要である⁴⁾。3 カ月以内では腎癩痕には進行しない欠損像が出現するため、病変を過大評価する可能性がある。

【参考文献】

- 1) Levitt SB, Weiss RA: Vesicoureteral reflux: natural history, classification and reflux nephropathy. In: Clinical Pediatric Urology (ed by Kelalis PP, et al), p355, Saunders, Philadelphia, 1985
- 2) Hansson S, Dhamey M, Sigström O, et al: Dimercapto-succinic acid scintigraphy instead of voiding cystourethrography for infants with urinary tract infection. J Urol 172:1071-1074, 2004
- 3) Preda I, Jodal U, Sixt R, et al: Normal dimercaptosuccinic acid scintigraphy makes voiding cystourethrography unnecessary after urinary tract infection. J Pediatr 161:581-584, 2007
- 4) Jakobsson B, Berg U, Svensson L: Renal scarring after acute pyelonephritis. Arch Dis Child 70:111, 1994

(2) アルポート症候群

小児慢性疾患名 (日本語)	慢性糸球体腎炎 (Alport 症候群による)
小児慢性疾患名 (英語)	Alport syndrome : AS

【概要】

Alport症候群(AS)は1927年にAlportにより報告された進行性遺伝性腎炎で、聴力異常、眼球異常を特徴とする¹⁾。その原因遺伝子は、COL4A3、COL4A4、COL4A5遺伝子である。1990年に初めてX染色体連鎖型(X-linked Alport syndrome: XLAS)においてCOL4A5遺伝子変異が²⁾、次いで1994年に常染色体劣性型(autosomal recessive Alport syndrome: ARAS)においてCOL4A3あるいはCOL4A4遺伝子変異が同定されている³⁾。AS全体の中で、XLASが約80%、ARASが約15%を占める。残りの5%の中にCOL4A3あるいはCOL4A4遺伝子の異常から引き起こされる常染色体優性型が報告されているが、まだ議論の余地がある⁴⁾。

ASによる糸球体腎炎は糸球体基底膜(GBM)の変化を伴って進行し、数年から十数年を経て慢性腎不全に至る⁵⁾。初期症状は無症候性血尿であることが多いが、特にXLASの男性においては成人になってからほぼ例外なく腎不全に至る。XLASの女性患者の糸球体腎炎は無症候性血尿のみの症例から早期に慢性腎不全に至る症例まで多様であり、X染色体の不活化現象によると推測されている⁵⁾。

【診断方法】

臨床所見、家族歴、腎生検および遺伝子検査により総合的に診断する。

厚生労働省(難治性疾患克服研究事業)「腎・泌尿器系の希少難治性疾患群に関する調査研究」班により作成されたASの診断基準を表1に示す^{a)}。

【診断の手引き作成の背景】

ASの有病率は約1:5,000であり、学校検診などで無症候性血尿を契機に発見されることが多い。そのため、無症候性血尿の症例に対して、ASを疑って血尿の家族歴を聴取することが大事である(表2)⁶⁾。