

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）

## ミトコンドリア病の調査研究

(20FC1019)

令和4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後藤 雄一

国立精神・神経医療研究センター

令和5（2023）年5月

# 目 次

I. 総括研究報告	
【ミトコンドリア病】	----- 2
【レット症候群】	----- 8
II. 分担研究報告	
【ミトコンドリア病】	----- 12
【レット症候群】	----- 22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 34
IV. 主要な論文	----- 39
V. 研究班員名簿	----- 55

総括研究報告書1

ミトコンドリア病、レット症候群に関する調査研究

【ミトコンドリア病】

研究代表者 後藤 雄一 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 部長

**研究要旨** 本研究班ではミトコンドリア病の正確な診断とそれに基づく適切な治療をめざして、診断基準・重症度スケールの改定案提出、診療マニュアル改定版の作成、患者レジストリー拡充等を実施した。アウトリーチ活動については、AMED 実用化班や日本ミトコンドリア学会での患者参加行事を援助した。患者レジストリーについては、個人情報保護法に関連した倫理ガイドライン改正に沿う変更を行うとともに、登録を増加させた。診療ガイドラインの作成は、MINDS 型の診療ガイドライン策定を断念し、「ベストプラクティス」方式の「診療マニュアル2017」の改定版の作成を目指し、AMED 実用化班と協力して担当者の選定を行い、2023年6月に発行される。生殖補助医療については、科学技術・学術審議会での検討が行われ、核置換技術を用いた特定胚を用いた基礎研究が容認されたものの、臨床的な「核移植治療」は我が国では継続審議となった。疫学研究においては、過去2年間で、DPC データを活用することで、都道府県別の患者分布が実際の登録患者数と相関することを、NDC データを活用することで、本邦における有病者数を高い確度で推定できることを見だし、今後の疫学的課題の抽出を行った。

研究分担者

- (1) 井川正道 福井大学第二内科
- (2) 大竹 明 埼玉医科大学小児科
- (3) 小坂 仁 自治医科大学小児科
- (3) 高島成二 大阪大学大学院医学研究科
- (4) 藤野善久 産業医科大学 産業生体科学研究所
- (5) 松田晋哉 産業医科大学 医学部公衆衛生学
- (6) 三牧正和 帝京大学医学部小児科
- (7) 村山 圭 千葉県こども病院 代謝科
- (8) 山嵜達也 東京大学医学部耳鼻咽喉科

- (8) 西野一三 国立精神・神経医療研究センター
- (9) 中川正法 京都府立医科大学附属北部医療センター
- (10) 中村 誠 神戸大学大学院医学系研究科 外科系講座眼科学
- (11) 松村達雄 国立病院機構東京医療センター
- (12) 米田 誠 福井県立大学看護福祉学部
- (13) 秋山奈々 東京大学医学部附属病院ゲノム診療部
- (14) 味原さや香 埼玉医科大学病院小児科・ゲノム医療科

研究協力者

- (1) 太田成男 順天堂大学 大学院医学研究科
- (2) 岡崎康司 順天堂大学 難病性疾患診断・治療学
- (3) 古賀靖敏 久留米大学医学部小児科
- (4) 杉本立夏 国立精神・神経医療研究センター
- (5) 砂田芳秀 川崎医科大学神経内科
- (6) 竹下絵里 国立精神・神経医療研究センター
- (7) 田中雅嗣 東京都健康長寿医療センター

- (15) 安藤匡宏 鹿児島大学脳神経内科老年病学
- (16) 石井亜紀子 筑波大学医学医療系神経内科学
- (17) 石川 均 北里大学医療衛生学部視覚機能療法
- (18) 石田秀和 大阪大学大学院医学系研究科小児科
- (19) 泉 岳 北海道大学小児科
- (20) 市本景子 千葉県こども病院遺伝診療センター 代謝科
- (21) 伊藤玲子 国立成育医療研究センター 総合診療部総合診療科

- (22) 今澤俊之 国立病院機構千葉東病院
- (23) 岩崎直子 東京女子医科大学附属成人医学センター
- (24) 植松有里佳 東北大学病院小児科
- (25) 内野俊平 東京大学医学部附属病院小児科
- (26) 海老原知博 千葉県こども病院新生児・未熟児科
- (27) 大澤 裕 川崎医科大学脳神経内科
- (28) 岡崎敦子 順天堂大学難治性疾患診断・治療学
- (29) 尾形真規子 東京家政大学栄養学科臨床栄養学研究室
- (30) 岡本裕嗣 鹿児島大学医学部保健学科基礎理学療法学講座
- (31) 小川えりか 日本大学医学部小児科
- (32) 梶俊策 津山中央病院小児科
- (33) 木村亜紀子 兵庫医科大学眼科学講座
- (34) 久保亨 高知大学医学部老年病・循環器内科学
- (35) 齋藤貴志 国立精神・神経医療研究センター
- (36) 志村 優 千葉県こども病院代謝科
- (37) 下澤弘憲 自治医科大学小児科学
- (38) 末岡浩 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター
- (39) 鈴木康夫 手稲溪仁会病院眼科・神経眼科センター
- (40) 須藤章 社会福祉法人楡の会こどもクリニック
- (41) 武田充人 北海道大学病院小児科
- (42) 谷川健 公立八女総合病院病理診断科
- (43) 中馬秀樹 宮崎大学医学部眼科
- (44) 鶴岡智子 千葉県こども病院新生児・未熟児科
- (45) 長友太郎 福岡赤十字病院小児科
- (46) 中村誠 神戸大学大学院医学研究科眼科学分野
- (47) 樋口雄二郎 鹿児島大学脳神経内科・老年病学
- (48) 平松有 鹿児島大学脳神経内科・老年病学
- (49) 廣野恵一 富山大学医学部小児科
- (50) 藤岡正人 北里大学医学部分子遺伝学・耳鼻咽喉科
- (51) 増田正次 杏林大学医学部耳鼻咽喉科学教室
- (52) 南修司郎 国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科
- (53) 宮内彰彦 自治医科大学小児科
- (54) 八ツ賀秀一 福岡大学小児科
- (55) 山内敏正 東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科
- (56) 山上明子 井上眼科病院
- (57) 山野邊義晴 慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学
- (58) 湯地美佳 鹿児島大学脳神経内科・老年病学
- (59) 和佐野浩一郎 東海大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科

#### A. 目的

ミトコンドリアはすべての細胞内において、エネルギーを産生する小器官である。ミトコンドリアに異常があると、大量のエネルギーを必要とする神経・筋、循環器、代謝系、腎泌尿器系、血液系、視覚系、内分泌系、消化器系などに障害が起こる。なかでも、中枢神経や骨格筋の症状を主体とするミトコンドリア病が代表的な病型である。

国内においてミトコンドリア病の患者数の厳密な実態調査は行われていない。その理由は患者が多く、診療科に分散していること、診断基準が明確ではなかったことなどが挙げられる。そのもっとも大きな要因は確定診断に必要な病理、生化学、遺伝子検査の専門性が高いことにある。平成 27 年 1 月にミトコンドリア病が指定難病に認定され認定基準を制定したが、難病行政に対応した診断基準の改訂を必要としている。

また英国では、ミトコンドリア病の一部の病型で、核移植を用いた生殖補助医療の適用が本格的に試みられ (Nature 465: 82-85, 2010)、少数ながら症例報告がなされている。そのようなグローバルな研究や医療の流れに遅れをとらないような本邦での調査研究が不可欠である。

本研究班では、ミトコンドリア病の検査手段（病理検査、生化学検査、DNA 検査）の標準化と集約的診断体制の確立、本疾患に関する情報提供手段の整備等を行い、臨床病型、重症度、合併症、主な治療の内容などの標準化をめざす。特に、患者レジストリーを進め、具体的な治療に関する臨床研究や治験を進めるコーディネーター役を担うこと、また主に小児のミトコンドリア病を対象としている AMED 難治性疾患実用化研究事業の村山班と連携して診療ガイドラインを作成するとともに、市民公開講座や難病情報センター等を活用し、広報活動を行うことを目的とする。

## B. 方法

### 1) 診断治療体制の構築【後藤、大竹、村山】

ミトコンドリア病の確定診断におけるミトコンドリアDNA検査、核遺伝子パネル検査の保険収載を目指し、令和2年12月に厚労省へ提出した診断基準において、遺伝学的検査の重要性を明確化した。令和4年4月に「ミトコンドリア病の遺伝学的検査の保険収載」がなされ、これまで大学・研究所で行ってきた遺伝学的検査が厳格な精度管理を必要とする臨床検査への急激な変更が必要になった。また、指定難病と小児慢性特定疾患における病型分類、診断基準等の考え方に開きがある。この点については、小児例の成人移行の問題として検討を継続する。医療イノベーションで計画されている都道府県単位の「新・難病医療拠点病院及び難病医療地域基幹病院構想」に沿って「ミトコンドリア病に詳しい医師のネットワーク」の構築を目指す。

### 2) 「患者ケア標準書」の作成【全員】

平成28年12月に刊行した「ミトコンドリア病診療マニュアル2017」においては、現在のミトコンドリア病の診療状況をまとめた。その改訂を見据えつつ、各診療科のエキスパートの意見をまとめた「患者ケア標準書」の作成を目指す。循環器、耳鼻科などのミトコンドリア病で認められる多臓器症状に関しては、関連学会などに協力を呼びかけながら、本研究班が中心となり作成する。

### 3) 患者レジストリーの運用拡大【後藤、大竹、三牧】

すでに成人は国立精神・神経医療研究センターにおいてRemudy方式の患者レジストリーシステムを構築しており、それを拡充させる。小児は、MOバンクにおいて患者レジストリーを始めており、Leigh症候群以外は超希少な疾患が多いため、欧米の患者レジストリーとの連携が有用になる。2つのレジストリーの特徴を有効に生かし、国内だけでなく国際的な共同治験等の将来の臨床研究、治験の推進に役立てる。

### 4) ミトコンドリア病に対する生殖補助医療の検討【後藤】

欧米で始まっている胚に対する核移植は、CSTI（総合科学技術・イノベーション会議）での議論を経て本邦では時期尚早という判断になった。一方で、着床前診断や胚を用いた基礎研究への道が開かれ、これらの技術の科学性、効果や安全性、倫理問題については本研究班で議論を継続させる。

### 5) アウトリーチ活動と国際連携【全員】

疾患セミナーの企画・実行や難病情報センターからの情報発信を行う。今年度も患者会との連携、市民公開講座を開催する。

### 6) 疫学研究【後藤、松田、藤野、三牧】

平成30年度から開始した疫学研究では、DPCデータを活用して、全国の医療機関におけるミトコンドリア病の実態（特に登録患者数）を推測できた。今年度はNCDデータも活用して、各種臨床指標が抽出可能かどうかを検討する。

## C. 結果と考察

### 1) 診断治療体制の構築

平成26年10月に策定した「診断基準」では遺伝学的検査が必須になっておらず、それによる保険収載の遅れが明確になった。令和2年度に改訂打診が厚労省難病対策課からあり、遺伝学的検査のみでも確定診断できる基準に変更し、厚生科学審議会疾病対策部会指定難病検討委員会で令和3年11月から審議が継続している。審議会で示されているスケジュールに依ると、正式な告示と通知の改正は令和5年になるとされている。

一方で、乳児期、小児期に発症するミトコンドリア病は重症例が多く、「代謝病」としての性格が前面にでる傾向がある。そのため、小児慢性特定疾患の認定基準は、代謝病として分類を中心とする認定方式をとっている。小児慢性特定疾患の診断基準との整合性や臨床試験のためのミトコンドリア肝症やミトコンドリア心筋症の個別病型の診断基準作成をAMED実用化班と協議を継続した。

### 2) 「診療マニュアル」等の改定

2012年に本研究班が発行した「ミトコンドリア病パンフレット」は、冊子としても、また、電子媒体（難病情報センターの疾患紹介サイトからダウンロード可能）としても、広く一般市民に利用された。

特に治療表の進歩に重点を置いた改訂版を作成したものの、診断基準の改訂の厚労省における承認が令和4年度中には間に合わず、その確定を待って改訂第2版を発行することになっている。

また、AMED 実用化研究班（村山班）と協力して、「診療ガイドライン」の改定を行う作業を実施した。問題はミトコンドリア病にはグローバルな診断基準が明確にされていないこともあって、エビデンスとして採用できる海外論文等の研究成果が少ない。結果的に、Minds 方式のガイドラインの作成は断念し、欧米で作成されている「ベストプラクティス」方式の刊行物を目指すこととして、編集内容と担当者を選定した。そのため多くの執筆者に加わっていただくために、本研究班の協力者になっていた。

### 3) 患者レジストリーの運用拡大

患者レジストリーについては、AMED 難治性疾患実用化研究班（村山班）と連携して行うこととし、村山班では主に先天代謝異常症として小児（成人）患者レジストリーを行っており、2023年3月で約120名である。一方、国立精神・神経医療研究センターでは、筋ジストロフィーの登録事業（Remudy）を敷衍する形態で、神経症状を中心とする成人（小児）患者レジストリーを開始し、2022年3月現在で32名の登録を完了した。

4) ミトコンドリア病に対する生殖補助医療の検討  
平成28年10月に、米国ニューヨークの不妊クリニックが、「核移植治療」でミトコンドリアDNA8993変異をもち、リー脳症の母から健常な子が産まれたと発表した。この方法では、父と母（核ゲノム）に加えて別の女性（ミトコンドリアゲノム）が関わっており、「3人の親」がいる子となる。英国内でも、英国外でも倫理的問題があると議論されてきており、米国では禁止された行為であった。

日本においては、本件に関して、政府の科学技術・学術会議声明倫理・安全部会特定胚等研究専門委員会での議論が行われ、研究代表者の後藤が委員として参加した。

核移植の臨床応用は継続審議となる一方、基礎研究に

おいては核移植を含めた「ヒトは核移植胚研究」が令和3年6月に容認され、さらに、これまで余剰胚でのみ認められていた核置換を用いた研究を新規胚にも適用できるように見直しが検討され、同時に、研究に必要な対照群胚の作成の容認を含めた最終案が令和5年5月のCSTI（総合科学技術・イノベーション会議）で諮られる予定である。

### 5) アウトリーチ活動と国際連携

AMED 村山班と連携して、患者会活動（WEB 勉強会）の支援をおこなった。コロナ禍の中で、国際学会等における海外の研究者や患者との交流は困難であった。

### 6) 疫学研究

平成30年度から産業医科大学の松田晋哉教授、藤野善久教授が分担研究者として加わり、DPC データを活用した全国の医療機関におけるミトコンドリア病の診断数やその経緯、投与されている薬剤等の調査を行うことで、ミトコンドリア病の医療の実態を把握する研究を開始した。都道府県別の患者分布が実際の登録患者数と相関することがわかり、本法の有用性が確認でき、その解析結果を令和2年4月に「厚生省の指標」に報告した。さらにNBD データを用いた疫学研究を実施し、本邦における有病者数を高い確度で推定できることを見だし、令和3年4月に英文誌に報告した。令和4年度は、今後の疫学的課題の抽出を行った。

## D. 結論

本研究班の活動はAMED 難治性疾患実用化研究班（村山班）と連携しながら進めている。全国レベルの診断体制の整備、診断基準や重症度スケールの改定作業を進めた。生殖補助医療の情報収集と日本での実現可能性について議論し、対照群の胚作成を含めた核置換技術を用いた余剰胚及び新規胚を用いた基礎研究が可能となった。患者レジストリーは、種々の要因で格段の進歩はないが、グローバルな視点でレジストリーやバイオバンク（研究試料）との連動を図りながら、着実に進めてゆく必要がある。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 著書、総説

後藤雄一：ミトコンドリア病，小児科診療ガイドライン—最新の治療—(編集：加藤元博)，総合医学社，東京，pp.385-389，2023

三牧正和：ミトコンドリア病の診断フローから外れたときの考え方(生化学～遺伝子診断)，小児内科。54(4):550-553, 4月, 2022

---

#### 原著論文

Shimozawa, H., T. Sato, H. Osaka, A. Takeda, A. Miyauchi, N. Omika, Y. Yada, Y. Kono, K. Murayama, Y. Okazaki, Y. Kishita and T. Yamagata (2022). "A Case of Infantile Mitochondrial Cardiomyopathy Treated with a Combination of Low-Dose Propranolol and Cibenzoline for Left Ventricular Outflow Tract Stenosis." *Int Heart J* 63(5): 970-977.

Watanabe, C., H. Osaka, M. Watanabe, A. Miyauchi, E. F. Jimbo, T. Tokuyama, H. Uosaki, Y. Kishita, Y. Okazaki, T. Onuki, T. Ebihara, K. Aizawa, K. Murayama, A. Ohtake and T. Yamagata (2023). "Total and reduced/oxidized forms of coenzyme Q(10) in fibroblasts of patients with mitochondrial disease." *Mol Genet Metab Rep* 34: 100951.

Nishida Y, Yanagisawa S, Morita R, Shigematsu H, Shinzawa-Itoh K, Yuki H, Ogasawara S, Shimuta K, Iwamoto T, Nakabayashi C, Matsumura W, Kato H, Gopalasingam C, Nagao T, Qaqorh T, Takahashi Y, Yamazaki S, Kamiya K, Harada R, Mizuno N, Takahashi H, Akeda Y, Ohnishi M, Ishii Y, Kumasaka T, Murata T, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y, Honma T, Shigeta Y, Kubo M,

Takashima S, Shintani Y.

Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allosteric site from mitochondrial heme-copper oxidases. *Nat Commun.* 2022 Dec 8;13(1):7591

Ebihara T, Nagatomo T, Sugiyama Y, Tsuruoka T, Osone Y, Shimura M, Tajika M, Matsunaga A, Akiyama N, Ogawa-Tominaga M, Yatsuka Y, Nitta KR, Kishita Y, Fushimi T, Imai-Okazaki A, Ohtake A, Okazaki Y, Murayama K. Neonatal-onset mitochondrial disease: clinical features, molecular diagnosis and prognosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2022 May;107(3):329-334. doi: 10.1136/archdischild-2021-321633.

Okazawa H, Ikawa M, et al. Cerebral Oxidative Stress in Early Alzheimer's Disease Evaluated by <sup>64</sup>Cu-ATSM PET/MRI: A Preliminary Study. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11:1022.

Kitazaki Y, Ikawa M, et al. Regional cortical hypoperfusion and atrophy correlate with striatal dopaminergic loss in Parkinson's disease: a study using arterial spin labeling MR perfusion. *Neuroradiology*. 2023;65:569-577.

### 2. 学会発表

#### 国際学会

なし

#### 国内学会

Chika Watanabe, Hitoshi Osaka, Miyuki Watanabe, Akihiko Miyauchi, Eriko F. Jimbo, Yoshihito Kishita, Yasushi Okazaki, Kei Murayama, Akira Ohtake, Takanori Yamagata. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases November 24th, 2022, 熊本

上田菜穂子, 内野俊平, 楠木理子, 三牧正和, 西野一三, 後藤雄一:MT-CO2 遺伝子の新規バイリアントが同定された下肢筋力低下の5例. 第21回日本ミトコンドリア学会年米, 東京 (帝京大学板橋キャンパス), 2023. 3. 17 (3. 16-3. 18)

**G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



総括研究報告書 2

ミトコンドリア病、レット症候群に関する調査研究  
【レット症候群】

研究分担者 伊藤雅之 国立精神・神経医療研究センター 室長

**研究要旨**

本研究では、レット症候群（RTT）の臨床調査研究と診療支援を行なった。また、RTT の患者データベースの5年毎の追跡調査を行ない、自然暦調査を行った。

RTT の睡眠障害は日常生活に支障をきたすだけでなく、家族や介護者の生活の質にも影響する。そこで、睡眠障害の状況調査を行なった。その結果、睡眠障害は約 65%にみられた。このうち、80%以上で1日の睡眠時間は8時間以上保たれていたが、夜間の睡眠は短い傾向にあった。夜間覚醒、夜驚、不規則な睡眠が多くを占めていた。これに対して、薬剤の効果は限定的であった。夜間の睡眠障害は、患者本人だけでなく、介護者、家族の負担が大きく、今後の課題である。また、RTT 患者 24 名で便秘を有する患者の治療歴について検討した。

さらに、重症度評価法の調査と検証を行った。RTT 及びその類縁疾患の遺伝学的検査としてのマイクロアレイ染色体検査をまとめた。患者データベースに登録されている *MECP2* 変異を有する患者の協力を得て、MRI 検査によって脳内の構造的・機能的ネットワークについての検討を行い、本症に特徴的な2つのネットワーク異常を同定した。

研究分担者

- (1) 伊藤雅之 国立精神・神経医療研究センター
- (2) 松石豊次郎 久留米大学高次脳機能研究所
- (3) 黒澤健司 神奈川県立こども医療センター
- (4) 高橋悟 旭川医科大学小児科
- (5) 青天目信 大阪大学医学部附属病院小児科

研究協力者

- (1) 原 宗嗣 久留米大学小児科
- (2) 弓削康太郎 久留米大学小児科

A. 研究目的

本研究では、レット症候群（RTT）患者データベースの運用、および臨床研究を行なった。RTT の追跡調査を行い、その結果から自然暦、臨床実態を明らかにし、診断基準を検証する。

本年度は、睡眠の実態についてアンケート調査、重症度評価法の検証を行った。また、症候群患者において、便秘の状況を検討した。

さらに、RTT の遺伝学的検査は未だ保険適用外である。男児の RTT では、*MECP2* 完全欠失は致死であるが、*FOXG1* 遺伝子の微細欠失（ハプロ不全）はまれではない。網羅的ゲノム解析による本症候群の診断の留意点について検討した。

RTT の病態理解を深めるために脳内ネットワー

ク異常について臨床放射線学的に調べた。

関連学会発表および公開シンポジウム開催し、RTT の普及と啓発を行った。

B. 研究方法

RTT の臨床研究：RTT 患者データベース登録されている患者の追跡調査を行った。同一患者での症状の変化を経年的に解析し、自然暦を調べた。

RTT の患者データベースの運用：本年度も患者家族会の協力を得て、新規患者登録を行った。遺伝子診断は、当該施設の倫理委員会の承認を得て、患者あるいは保護者への十分な説明と同意を得て行った。

睡眠実態調査：レット症候群支援機構が運営するインターネット情報サイト「レッコミ」を通じて、アンケート調査を行った。

重症度評価法は文献的、及び患者調査により検証した。便秘の調査は、カルテより後方視的に、RTT 患者の便秘の有無と治療・治療効果について検討した。

マイクロアレイ染色体検査では、Agilent 社製 GenetiSure Postnatal Assay Agilent を用いて、返却データはこれまでの自施設解析と同様のデータベースを用いて検討した。

臨床放射線学的研究では、脳内の構造的および

機能的ネットワーク解析は、定量的 MRI 画像、拡散テンソル画像、安静時機能的 MRI 画像検査を行い、臨床症状の重症度 (clinical severity score) との関連について検討した。対象は、MECP2 遺伝子変異が同定された 9 例のレット症候群患者であり、同数の正常対照女性ボランティアの協力を得た。

(倫理面への配慮)

本調査及び研究は、当該施設の倫理問題等検討委員会の承認のもと行った。

### C. 結果

RTT の臨床研究：疫学調査とその解析： RTT 患者データベースに登録されている 186 例の登録者のうち 5 年を経過した登録患者について、現況調査として再度登録用紙の提供を依頼した。

RTT の患者データベースの運用：本年度は 9 名の登録を更新した。臨床遺伝学的解析では、レット症候群の臨床診断を受けた患者について遺伝子診断を行った。

睡眠実態調査：MECP2 遺伝子異常を有するレット症候群患者 120 名から回答を得た。睡眠障害は約 65% に見られた。このうち、80% 以上で 1 日の睡眠時間は 8 時間以上保たれていたが、夜間の睡眠は短い傾向にあった。夜間覚醒、夜驚、不規則な睡眠が多くを占めていた。これに対して、薬剤の効果は限定的であった。

重症度評価法を検証し、本邦の実情に合わせた改訂版を作成している。また、便秘に関する情報がある患者 18 名中、便秘を有する患者が 13 名 (72%) であった。

150 例の重度知的障害症例をスクリーニングし、1 例に MECP2 遺伝子既報告変異例の診断ができた。今年度の解析では、明らかな CNV によるレット症候群類縁疾患例は検出されなかった。

MRI を用いた機能的ネットワーク解析では、2 つの脳内ネットワーク (左右半球間の背側注意ネットワーク、視覚ネットワークと小脳ネットワーク) の機能的結合性低下を見出した。これらの機能的結合性低下は、構造的異常を反映したものと考えられた。

### D. 考察

RTT の臨床研究では、RTT の自然歴調査は、治験を行う上で重要な資料となる。

遺伝子診断システムを確立し、原因遺伝子の発見に貢献した。診療支援体制が確立してきた。しかし、遺伝子診断は高額で高度な技術を要することから、継続的な診断には経済的な支援が必要である。

レット症候群の睡眠障害は、50~80% と報告されている。今回の調査でも概ね既報告に一致してい

た。1 日の睡眠時間は確保されているものの、夜間の睡眠にさまざまな問題があることが明らかになった。夜間の睡眠障害は、患者本人だけでなく、介護者、家族の負担が大きく、今後の課題である。便秘に対して、緩下剤と浣腸を使っている患者の数はあまり変わらなかった。

FOXG1 は量的感受性が高く、欠失によるハプロ不全だけでなく、重複による triplosensitivity も高い疾患といえる。データベースを参考に既報告例と比較しながら症例の医療管理を行うことが重要である。

RTT に特徴的な構造的・機能的ネットワーク異常が同定されたことは、病態理解だけでなく、治療の参考になり得る。

### E. 結論

RTT の臨床研究では、RTT 患者データベース登録の継続と追跡調査を行なった。遺伝子診断体制を確立した。しかし、高額で高度な技術であり、継続的な診断には経済的な支援が必要である。

また、レット症候群の夜間の睡眠障害は、その内容が特殊であり、今後解決していかなければならない課題である。

マイクロアレイ染色体検査がレット症候群類縁疾患、とくに FOXG1 症候群の診断に有用であることを確認した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Hoshi M, Ishiyama M, Wada T, Hase K, Itoh M, Kikuri T, Shirakawa T. Alteration of monoaminergic systems in the caudal medulla and its possible link to diurnal increase of apnea in a mouse model of Rett syndrome. *J Oral Sci* 2023; 65 (2): 96-101. doi.org/10.2334/josnusd.22-0474.
2. Dai H, Kitami Y, Goto Y, Itoh M. 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Agonist Treatment Partially Ameliorates Rett Syndrome Phenotypes in mecp2-Null Mice by Rescuing Impairment of Neuron Transmission and the CREB/BDNF Signaling Pathway. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 14025. doi.org/10.3390/ijms232214025.
3. 伊藤雅之. Rett 症候群. 小児疾患診療のための病態生理 3. 小児内科, 「小児内科」「小児外科」共同編集委員会. 東京, 東京医学社, 385-390pp., 2022 年 12 月.
4. Yoshida S, Amamoto M, Takahashi T, Tomita I, Yuge K, Hara M, Iwama K, Matsumoto N, Matsuishi T. Perampanel markedly improved clinical seizures in a patient with a Rett-like

- phenotype and 960-kb deletion on chromosome 9q34.11 including the *STXBPI*. Clin Case Rep 2022;10:e05811.doi.org/10.1002/ccr3.5811
5. Nishimura N, Enomoto Y, Kumaki T, Murakami H, Ikeda A, Goto T, Kurosawa K. Delineation of a Phenotype Caused by a KAT6B Missense Variant Not Resembling Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson and Genitopatellar Syndromes. Mol Syndromol. 2022;13(3):221-225.
  6. 黒澤健司 顔貌の異常—顔貌でわかる主な症候群 周産期医学 2022;52:1334-1337.
  7. Takeguchi R, Kuroda M, Tanaka R, Suzuki N, Akaba Y, Tsujimura K, Itoh M, Takahashi S. Structural and functional changes in the brains of patients with Rett syndrome: A multimodal MRI study. J Neurol Sci 2022; 441: 120381
  8. Kuwayama R, Suzuki K, Nakamura J, Aizawa E, Yoshioka Y, Ikawa M, Nabatame S, Inoue KI, Shimmyo Y, Ozono K, Kinoshita T, Murakami Y. Establishment of mouse model of inherited PIGO deficiency and therapeutic potential of AAV-based gene therapy. Nat Commun 13(1):3107, 2022.
  9. Suzuki T, Ito Y, Ito T, Kidokoro H, Noritake K, Hattori A, Nabatame S, Natsume J. Quantitative Three-Dimensional Gait Evaluation in Patients With Glucose Transporter 1 Deficiency Syndrome. Pediatr Neurol 132:23-26, 2022.
  10. Kishimoto K, Nabatame S, Kagitani-Shimono K, Kato M, Tohyama J, Nakashima M, Matsumoto N, Ozono K. Ketogenic diet for focal epilepsy with SPTAN1 encephalopathy. Epileptic Disord 24(4):726-8, 2022.
  11. Saffari A, Kellner M, Jordan C, Rosengarten H, Mo A, Zhang B, Strelko O, Neuser S, Davis MY, Yoshikura N, Futamura N, Takeuchi T, Nabatame S, Ishiura H, Tsuji S, Aldeen HS, Cali E, Rocca C, Houlden H, Efthymiou S; SYNAPS Study Group, Assmann B, Yoon G, Trombetta BA, Kivisäkk P, Eichler F, Nan H, Takiyama Y, Tessa A, Santorelli FM, Sahin M, Blackstone C, Yang E, Schüle R, Ebrahimi-Fakhari D. The clinical and molecular spectrum of ZFYVE26-associated hereditary spastic paraplegia: SPG15. Brain in press.
  12. Kagitani-Shimono K, Kato H, Soeda F, Iwatani Y, Mukai M, Ogawa K, Tominaga K, Nabatame S, Taniike M. Extension of microglial activation is associated with epilepsy and cognitive dysfunction in Tuberous sclerosis complex: A TSPO-PET study. Neuroimage Clin :103288, 2022.
  13. Ogawa K, Tanigawa J, Mukai M, Tominaga K, Kagitani-Shimono K, Nabatame S, Ozono K. Epilepsy with myoclonic absence presenting with unilateral jerks: A case of 2q13 microdeletion syndrome. Seizure 106:77-9, 2023.
  14. Nabatame S, Tanigawa J, Tominaga K, Kagitani-Shimono K, Yanagihara K, Imai K, Ando T, Tsuyusaki Y, Araya N, Matsufuji M, Natsume J, Yuge K, Bratkovic D, Arai H, Okinaga T, Matsushige T, Azuma Y, Ishihara N, Miyatake S, Kato M, Matsumoto N, Okamoto N, Takahashi S, Hattori S, Ozono K. Association between cerebrospinal fluid parameters and developmental and neurological status in glucose transporter 1 deficiency syndrome J Neurol Sci 447:120597, 2023
2. 学会発表
1. 弓削康太郎、高橋知之、河原幸江、坂井勇介、佐藤貴弘、児島将康、西昭徳、松石豊次郎、山下裕史朗。レット症候群モデルマウスにおける睡眠・覚醒病態とオレキシンシグナル伝達の異常。第49回日本脳科学学会、2022年12月3日、4日、久留米
  2. 村上博昭、榎本友美、熊木達郎、黒澤健司 De novo の 3q 腕内逆位を有し、Gomez-Lopez-Hernandez 症候群を疑った男児におけるナノポア長鎖シークエンサーによる切断点解析 日本人類遺伝学会第 67 回大会 2022.12.14-17 横浜
  3. 成戸卓也、関衛順、黒田友紀子、齋藤洋子、榎本友美、黒澤健司 KMT2D 遺伝子内のエクソン欠失による歌舞伎症候群の一例 日本人類遺伝学会第 67 回大会 2022.12.14-17 横浜
  4. 竹口諒、黒田真実、田中亮介、鈴木菜生、高橋悟: Rett 症候群の構造的・機能的 MRI 画像解析, 第 64 回日本小児神経学会学術集会, 2022 年 6 月 4 日 (高崎市、Web)
  5. 橋本有観、渡辺陽和、青天目信、繁縄翔太、菅野直記、馬場達也、三好宏昌、川西邦洋、濱田悠介、吉川真紀子、徳永康行、茶山公祐. 当院で診断された GLUT1 欠損症の 3 例. 第 126 回日本小児科学会. 22.4.16
  6. 増田 奈保子, 青天目 信, 平野 翔堂, 北井 征

- 宏, 荒井 洋, 武内 俊樹, 上原 朋子, 鈴木 寿人, 小崎 健次郎, 岡本 伸彦, 大藪 恵一. 知的障害・低緊張と常同運動を認めたGNB1遺伝子病的バリエーションを認めた1例. 第126回日本小児科学会 22.4.17
7. 小川勝洋, 向井昌史, 谷河純平, 富永康仁, 下野九理子, 青天目信, 大藪恵一. バクロフェン持続髄注療法の中毒症状が疑われた歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の一例. 第92回大阪小児神経学懇話会 22.5.12
8. Shin Nabatame, Masashi Mukai, Katsuhiko Ogawa, Junpei Tanigawa, Koji Tominaga, Kuriko Shimonon-Kagitani, Toshiyuki Mano, Keiichi Ozono. Ketogenic diet introduction and modification in an adult patient with Glut1 deficiency syndrome. 第64回日本小児神経学会学術集会 22.6.2
9. 青天目信. 『てんかん診療を多職種で考える』当施設のてんかん診療における食事療法の取り組み. 第10回全国てんかんセンター協議会 23.02.10
10. 青天目信. GLUT-1欠損症治療におけるケトン食の実際. 第1回日本ケトン食療法学会 23.03.12
- G. 知的財産権の出願・登録状況なし。

治療可能なミトコンドリア病の早期診断法の開発  
～原発性 CoQ10 欠乏症～

研究分担者 小坂 仁 自治医科大学 教授

**研究要旨**

原発性 CoQ10 欠乏症は、CoQ10 生合成に関与する酵素が欠損し、CoQ10 低値をきたす疾患で、脳症、心筋症、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群、多臓器障害など多彩な臨床症状を呈する。CoQ10 補充療法により症状の進行を抑制できることから、早期診断が重要である。従来確定診断は生検筋の CoQ10 低値の証明だが侵襲性が高いため、より侵襲性の低い皮膚線維芽細胞で定量系を構築し、早期診断につなげた。また CoQ10 の酸化還元状態がミトコンドリアの代謝状態を反映するマーカーであることから合わせて、皮膚線維芽細胞で、還元型・酸化型 CoQ10 を個別に定量する系を構築し、ミトコンドリア病患者細胞で測定した。

**A. 研究目的**

CoQ10 測定系の構築：原発性 CoQ10 欠乏症は、CoQ10 生合成に関与する酵素が欠損し、CoQ10 低値をきたす疾患で、脳症、心筋症、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 (SRNS)、多臓器障害など多彩な臨床症状を呈する。CoQ10 補充療法により症状の進行を抑制できることから、早期診断が重要である。確定診断は生検筋の CoQ10 低値の証明だが侵襲性が高いため、より侵襲性の低い皮膚線維芽細胞で定量系を構築し、早期診断につなげる。

② ①の CoQ10 測定系の応用：CoQ10 の酸化還元状態がミトコンドリアの代謝状態を反映するマーカーであると報告された。CoQ10 の酸化還元状態を評価することは病態解明や治療介入の糸口となると考えられるが、これまで原発性 CoQ10 欠乏症含め、ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞で還元型・酸化型 CoQ10 に着目した報告はない。そこで、皮膚線維芽細胞で、還元型・酸化型 CoQ10 を個別に定量する系を構築し、患者細胞で測定する。

**B. 研究計画・方法（概要）**

対象は、24 例のミトコンドリア病患者皮膚線維芽細胞（原発性 CoQ10 欠乏症 5 例、呼吸鎖複合体異常症 10 例を含む）とした。サンプルから

CoQ10 を抽出し、重水素で標識した 2H9-CoQ10 を内部標準として、液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (HPLC-MS/MS) で測定した。なお還元型 CoQ10 は容易に酸化されるため、検量線の還元型 CoQ10 は酸化型 CoQ10 に還元反応を行い用事調製し、最も酸化しにくい溶媒である Ethanol を用い、さらに抗酸化剤を添加し、サンプル処理後速やかに定量した。CoQ10 実測値をクエン酸シンターゼ活性量で補正し、総（還元型+酸化型）CoQ10 値と還元型 CoQ10/総 CoQ10 比を求め、CoQ10 欠乏と細胞内 CoQ10 還元状態を評価した。

**C. 研究結果.**

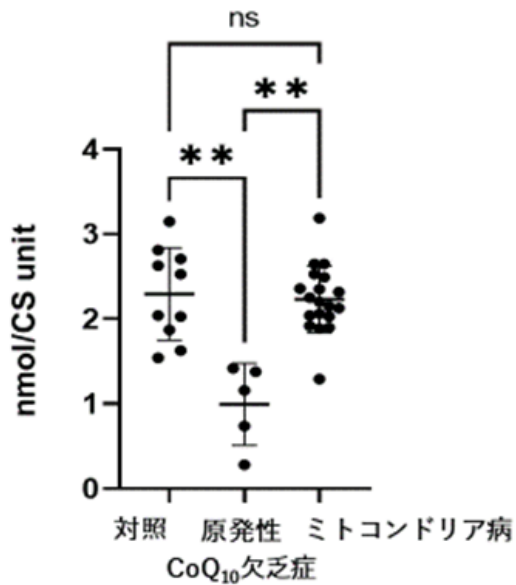


図1. 皮膚線維芽細胞の総 CoQ10 値  
6例で総 CoQ10 が低下(対照の総 CoQ10 値の 70%未満)していた。  
原発性 CoQ10 欠乏症は、全例で総 CoQ10 値が低下した。原発性 CoQ10 欠乏症以外のミトコンドリア病では、Kearns-Sayre 症候群(症例 19)を除き、総 CoQ10 値は低下していなかった。\*\* p < 0.01。

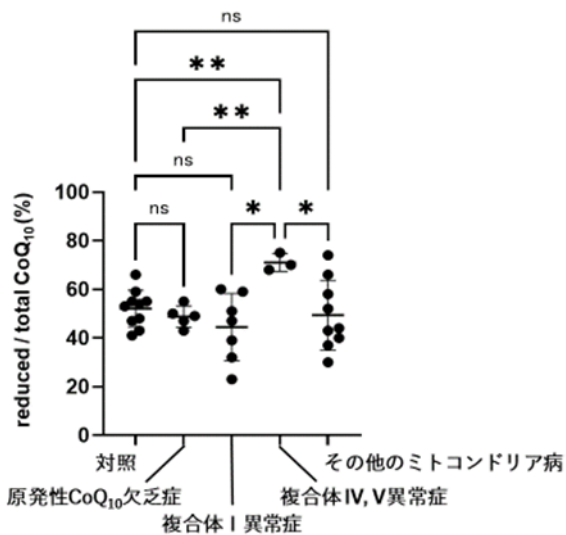


図2. 皮膚線維芽細胞の還元型 CoQ10/総 CoQ10 比の比較  
原発性 CoQ10 欠乏症では、還元型 CoQ10/総 CoQ10 比は変化がみられなかった。一方、複合体 I 異常症では、3/7例で還元型 CoQ10/総 CoQ10 比が低下(対照の<80%)し、複合体 IV、V 異常症では、全例で還元型 CoQ10/総 CoQ10 比が増加

(対照の 120%)した。\*P < 0.05、\*\*P < 0.01、NS; Not significant。

皮膚線維芽細胞の還元型・酸化型 CoQ10 の個別定量系を確立した。皮膚線維芽細胞の総 CoQ10 値は、原発性 CoQ10 欠乏症 (n=5)、原発性 CoQ10 欠乏症以外のミトコンドリア病 (n=19)、対照 (n=10) において、それぞれの  $1.00 \pm 0.19$  (nmol / CS unit、平均±標準偏差)、 $2.23 \pm 0.26$ 、 $2.30 \pm 0.24$ であった。原発性 CoQ10 欠乏症では対照より有意に低下したが (p < 0.01)、原発性 CoQ10 欠乏症以外のミトコンドリア病では低下はみられなかった (p = 0.98)。原発性 CoQ10 欠乏症は、全例で総 CoQ10 値低下(対照の総 CoQ10 値の 70%未満)がみられた。また、還元型 CoQ10/総 CoQ10 比について、原発性 CoQ10 欠乏症 (n=5)、複合体 I 異常 (n=7)、複合体 IV・V 異常 (n=3)、その他のミトコンドリア病 (n=9)、対照 (n=10) において、それぞれ  $49 \pm 7\%$  (平均±標準偏差)、 $44 \pm 7\%$ 、 $71 \pm 3\%$ 、 $49 \pm 4\%$ 、 $52 \pm 1\%$ であった。原発性 CoQ10 欠乏症では、対照と比較して比の変化がみられなかったが (p=0.95)、複合体 IV・V 異常では比は増加した (p=0.0028)。

#### D. 考察

皮膚線維芽細胞の総 CoQ10 値は、原発性 CoQ10 欠乏症の全例で有意に低下しており、構築した測定系は本症の診断に有用と考えられた。今後、国内外の疑い症例を解析し、早期診断・治療につなげる。また、今回ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞で、初めて還元型 CoQ10/総 CoQ10 比を測定した。原発性 CoQ10 欠乏症では比の変化がなかったが、複合体異常症では比が上昇または低下した。総 CoQ10 が低下しなくとも、還元型 CoQ10/総 CoQ10 比の変化を伴う病態が存在すると考えられた。さらに比の変化と呼吸鎖酵素活性との関連も示唆された。

#### E. 結論

皮膚線維芽細胞の還元型・酸化型 CoQ10 個別測定系を構築し、総 CoQ10 値と還元型 CoQ10/総 CoQ10 比の評価が可能になった。本測定法は、原発性 CoQ10 欠乏症の診断と迅速な治療に貢

献でき、さらに CoQ10 還元状態評価のバイオマーカーとしての応用や病態解析にも有用と考えられる。

## F 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shimozawa, H., T. Sato, H. Osaka, A. Takeda, A. Miyauchi, N. Omika, Y. Yada, Y. Kono, K. Murayama, Y. Okazaki, Y. Kishita and T. Yamagata (2022). "A Case of Infantile Mitochondrial Cardiomyopathy Treated with a Combination of Low-Dose Propranolol and Cibenzoline for Left Ventricular Outflow Tract Stenosis." Int Heart J **63**(5): 970-977.
- 2) Watanabe, C., H. Osaka, M. Watanabe, A. Miyauchi, E. F. Jimbo, T. Tokuyama, H. Uosaki, Y. Kishita, Y. Okazaki, T. Onuki, T. Ebihara, K. Aizawa, K. Murayama, A. Ohtake and T. Yamagata (2023). "Total and reduced/oxidized forms of coenzyme Q(10) in fibroblasts of patients with mitochondrial disease." Mol Genet Metab Rep **34**: 100951.

### 2. 学会発表

- 1) Chika Watanabe, Hitoshi Osaka, Miyuki Watanabe, Akihiko Miyauchi, Eriko F. Jimbo, Yoshihito Kishita, Yasushi Okazaki, Kei Murayama, Akira Ohtake, Takanori Yamagata  
The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases November 24th, 2022, Kumamoto

## H. 知的財産権

なし

分担研究報告書

患者レジストリーの構築

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学 教授

研究要旨

小児期を中心にミトコンドリア病レジストリ（J-MO bank）を拡張し、難病プラットフォームへの提供も継続し、今年度末現在でリー脳症を中心に147名の登録をいただいている。登録後2年以上を経過した84名に往復葉書で現状確認を行い、53名から返信をいただき、うち死亡者は2例であった。今後も難病プラットフォームへの登録数を増やし、日本発を中心に各種新規治験薬の開発にも協力して行きたい。

A. 研究目的

ミトコンドリア病の患者レジストリーを構築し、日本発を中心に各種新規治験薬の開発に協力する。

B. 研究方法

主治医と協力して登録シートに患者ご自身で記載いただき、ご自身で投函いただく。

（倫理面への配慮）

埼玉医科大学病院IRBにて承認済み承認済（病2021-094）

C. 研究結果

今年度末現在でリー脳症を中心に147名の登録をいただいている（リー脳症96名、心筋症12名、肝症5名、新生児ミトコンドリア病23名、MELAS 9名、KSS 2名、病名不明1名）。登録後2年以上を経過した84名に往復葉書で現状確認を行い、53名から返信をいただき、うち死亡者は2例であった。

D. 考察

今後も診断患者への登録票送付を加速し、一層の新規患者登録数の増加を目指す。その中で今まで以上に難病プラットフォームへの登録拡大も目指すと同時に、GENOMITを中心に国際レジストリとの協力も進め、日本発を中心に各種新規治験薬の開発にも協力して行きたい。

E. 結論

ミトコンドリア病レジストリ（J-MO Bank）への登録は順調に増加しており、今後は定期的安否の確認も継続し、より良いレジストリを目指す

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



## 患者ケア標準書の作成（循環器内科）

研究分担者 高島成二 国立大学法人大阪大学 教授

### 研究要旨

研究分担者は、脳死心臓移植を行う施設に所属し、重症心不全の病態解明、治療への応用を目的として研究を行っている。臓器の中で最もミトコンドリアが多く存在する心臓においては、ミトコンドリア病の病態が心機能不全として特異的に表れることが知られている。しかし、ミトコンドリア機能の心不全における具体的な重要性についてはまだほとんど解明されていない。本研究では心臓におけるミトコンドリア機能の解析を中心に、病態特異的に変化する新しい遺伝子の機能解析を行い、ミトコンドリア機能が関与する心疾患およびミトコンドリア病の病態解明をおこなうことにより研究代表者がすすめる患者ケア標準書の作成に協力する。

#### A. 研究目的

ミトコンドリア病は主にミトコンドリアを構成するタンパク質、特に酸化リン酸化にかかわるタンパク質の異常によって発症することが知られている。酸化リン酸化を担うタンパク質群は数十からなる複合体を形成しており、酸素を消費して体内で消費される大部分のATPを産生する。

本研究ではATP代謝とくにその調節にかかわる分子の新たな同定をすすめることにより、ミトコンドリア病を含めたエネルギー代謝心疾患の病態の解明・治療への応用を図り患者ケアの提案を行う。

#### B. 研究方法

心臓は体内で最も多くのミトコンドリアを含有する臓器であり、酸化リン酸化を担うタンパク質およびその調節蛋白質が最も多く存在する。我々はエネルギー枯渇状態に敏速に対応する調節因子を同定するため、心筋細胞を低酸素ストレスに暴露した時に一過性に誘導される因子G0s2に注目し、その発現によりミトコンドリアの重要な機能であるATP産生の速度を増加させることを明らかにした。さらに昨年、G0s2の分解を抑制する化合物のスクリーニングを行い、ミトコンドリア病治療薬としての開発を開始し

た。本年度はこのヒット化合物のリード化及び薬物動態の解析及びミトコンドリア病に対するin vitroPOCの取得を進める。

（倫理面への配慮）

本事業の分担研究者として本年度行ったのは細胞を使った生理実験、生化学実験が中心であり、ヒトおよびヒト検体、動物を使用した実験は本事業では行っていないが今後使用するときはそれぞれの倫理指針にのっとり研究を進める

#### C. 研究結果

令和3年度までの研究にてG0s2を強制発現させた細胞においては低酸素にしたときにATP産生能の低下が抑制され、細胞保護的な作用が観察された。また、G0s2の発現を上昇させる化合物同定のためのアッセイ系を組みG0s2発現を上昇させる薬物の開発を開始しヒット化合物の同定に至った。令和4年度はこの化合物のリード化を進め、その中で毒性が低く非活性のより高い化合物の同定に成功した。本薬剤は、心筋細胞の低酸素下の生存率を上昇させた。今後はin vivoでのPOC取得とさらなるリード化を進めミトコンドリア病治療薬として臨床治験を目指す。

## D. 考察

G0s2 は生体内で最も多くの ATP を産生する FoF1-ATPsynthase の活性化タンパク質として初めて同定された分子である。G0s2 の発現上昇は ATP 産生速度を、ミトコンドリア内膜の表裏でのプロトン濃度勾配が同じ条件で増加させた。この事実は、低酸素によりプロトン濃度勾配が低下した状態でも G0s2 は FoF1-ATPsynthase の ATP 産生効率を上昇させることを示唆する。G0s2 の発現を上昇させるような薬剤はミトコンドリア病を含め ATP 代謝がかかわる多くの疾患の治療薬となることが期待される。これらの研究成果を踏まえ、本事業では循環器病領域におけるミトコンドリア患者ケアの提案を代表者に今後行っていく予定である。

## E. 結論

ミトコンドリア FoF1-ATPsynthase に直接結合して ATP 産生速度を上昇させるタンパク質 G0s2 を同定し、ミトコンドリア病の創薬標的としての可能性を示した。さらに具体的な創薬開発を開始し、ヒット化合物の同定に至りリード化を進めることにより比較的薬物動態のすぐれた化合物による in vitro POC の取得に成功した。ミトコンドリア病の循環器領域における新たな患者ケアにつながると期待される。

## F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

① Nishida Y, Yanagisawa S, Morita R, Shigematsu H, Shinzawa-Itoh K, Yuki H, Ogasawara S, Shimuta K, Iwamoto T, Nakabayashi C, Matsumura W, Kato H, Gopalasingam C, Nagao T, Qaqorh T, Takahashi Y, Yamazaki S, Kamiya K, Harada R, Mizuno N, Takahashi H, Akeda Y, Ohnishi M, Ishii Y, Kumasaka T, Murata T, Muramoto K, Toshi T, Shiro Y, Honma T, Shigeta Y, Kubo M, Takashima S, Shintani Y.

Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases.

*Nat Commun.* 2022 Dec 8;13(1):7591

### 2. 学会発表 該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得  
現在のところなし
2. 実用新案登録  
現在のところなし
3. その他  
特記すべきことなし

分担研究報告書

患者ケア標準書作成と AMED 実用化研究班との連携

研究分担者 村山 圭 千葉県こども病院代謝科 部長

**研究要旨**

ミトコンドリア病は希少疾患であり、疾患を克服するためには早期診断、早期治療、新しい治療法の開発に進んで行くことが必要である。令和4年度は患者ケア標準書として2017年に出版した「ミトコンドリア病診療マニュアル2017」の改定作業をAMED実用化研究班（村山班）と共同で進め、発刊に向けた最終調整を行った。

本研究班では MELAS、CPEO/KSS、MERRF、ミトコンドリア糖尿病、Leber 病に関して、また実用化研究班では Leigh 脳症、ミトコンドリア肝症、ミトコンドリア心筋症、新生児ミトコンドリア病、ミトコンドリア腎症、ミトコンドリア難聴、ミトコンドリアニューロパチーに関して担当として、両研究班で連携しつつ診療マニュアルの策定を進めた。さらに全般的な診断や治療を含む総論部分も連携しつつ改訂作業を進め、2023年5月発刊予定となっている。

**A. 研究目的**

ミトコンドリア病は希少難病であり、その克服のためには、疾患の早期診断、早期治療、新規治療法の開発等に進んで行くことが重要である。そのために患者標準ケア書としての診療ガイドラインの策定は重要であり、本邦では AMED 実用化研究班と連携して進めていく必要がある。本研究では AMED 実用化研究班である村山班と本研究班との連携によって「ミトコンドリア病診療マニュアル2017」の改訂作業を行うことを目的とした。

**B. 研究方法および研究結果**

2022年度も新型コロナウイルスの影響によりオンライン会議を中心として臨床病型ごとに小会議を行った。また3月に face to face の会議が可能になり、直接の議論を交わしつつ診療マニュアル2017の改訂作業を進めていった。

**C. 研究結果**

診療マニュアルの改訂作業の概要

・AMED 難治性疾患実用化研究事業（村山班）と難治性疾患政策研究事業（後藤班）の連携  
・作成方法は CQ を設定、文献検索も初版に準ずる

対象

ミトコンドリア病の診断と治療に関わる医師（主に内科医、小児科医）

目的

・診断・治療の標準化  
・実臨床に役立つ情報を提供する“best practice”を目指して構成総論と各論からなる。  
総論：治療可能な疾患、代謝救急、症状・臓器別の対応法を追加（てんかん、糖尿病、眼合併症など病型横断的な症状）

各論

Leigh 脳症・ミトコンドリア肝症・ミトコンドリア心筋症・新生児ミトコンドリア病・MELAS・MERRF・CPEO/KSS・ミトコンドリア腎症・ミト

コンドリア難聴・ミトコンドリアニューロパチー(含 MNGIE)・ミトコンドリア糖尿病、Leber 病から構成される。

今年度は実際の執筆を行い、相互査読を終了し、パブリックコメントの募集まで行った。

(倫理面への配慮)

今回は患者情報を扱う場面はなかったものの、今後そうした情報が出る際には慎重にその是非を検討するようにした。

#### D. 考察

ミトコンドリア病診療マニュアル(診療ガイドライン)の策定は、診療基盤の構築を行う上で非常に重要な作業であり、ミトコンドリア病患者ケアの標準手順書として診療の質を担保していくことに寄与する。既に 2017 年に AMED 実用化研究班が主導して策定したが、その後の遺伝子型と表現型の相関など各病型において新しいエビデンスが蓄積されており、それらを改訂版に反映させていく必要がある。特にこの 3 年間で Leigh 脳症、新生児ミトコンドリア病、ミトコンドリア肝症、ミトコンドリア腎症、ミトコンドリア心筋症の分野では本邦の表現型、遺伝子型、予後などをまとめた論文発表が AMED 実用化研究班からなされており、これらを新しい診療マニュアルに反映させていくことは極めて重要である。

また、今回の診療マニュアル改訂には、Leigh 脳症、ミトコンドリア肝症、ミトコンドリア心筋症、新生児ミトコンドリア病、MELAS、MERRF、CPEO/KSS 等に加えて新たにミトコンドリア腎症、ミトコンドリア難聴、ミトコンドリアニューロパチー(含 MNGIE)、ミトコンドリア糖尿病、Leber 病も加える予定である。ミトコンドリア病の臨床病型には多様性があり、こうした多様性にも十分対応できるようなものにするのが重要である。さらに GDF15 や MELAS

に対するタウリン治療、アルギニン治療など新しいバイオマーカーや、保険収載された薬剤を記載していくことも重要である。

#### E. 結論

希少疾患であるミトコンドリア病の診療マニュアルの改訂作業を AMED 実用化研究班と連携して進めている。出版に向けて最終段階に来ており、間もなく発刊となる予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Harrer P, Schalk A, Shimura M, Baer S, Calmels N, Spitz MA, Marie-Thérèse Abi Warde, Schaefer E, Volker M Sc Kittke, Dincer Y, Wagner M, Dzinovic I, Berutti R, Sato T, Shirakawa T, Okazaki Y, Murayama K, Oexle K, Prokisch H, Mall V, Melčák I, Winkelmann J, Zech M. Recessive NUP54 Variants Underlie Early-Onset Dystonia with Striatal Lesions. *Ann Neurol.* 2023 Feb;93(2):330-335. doi: 10.1002/ana.26544.
2. Ebihara T, Nagatomo T, Sugiyama Y, Tsuruoka T, Osone Y, Shimura M, Tajika M, Matsushashi T, Ichimoto K, Matsunaga A, Akiyama N, Ogawa-Tominaga M, Yatsuka Y, Nitta KR, Kishita Y, Fushimi T, Imai-Okazaki A, Ohtake A, Okazaki Y, Murayama K. Neonatal-onset mitochondrial disease: clinical features, molecular diagnosis and prognosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* . 2022 May;107(3):329-334. doi: 10.1136/archdischild-2021-321633.
3. Yépez VA, Gusic M, Kopajtich R, Mertens C, Smith NH, Alston CL, Ban R, Beblo S, Berutti R, Blessing H, Ciara E,

- Distelmaier F, Freisinger P, Häberle J, Hayflick SJ, Hempel M, Itkis YS, Kishita Y, Klopstock T, Krylova TD, Lamperti C, Lenz D, Makowski C, Mosegaard S, Müller MF, Muñoz-Pujol G, Nadel A, Ohtake A, Okazaki Y, Procopio E, Schwarzmayr T, Smet J, Staufner C, Stenton SL, Strom TM, Terrile C, Tort F, Van Coster R, Vanlander A, Wagner M, Xu M, Fang F, Ghezzi D, Mayr JA, Piekutowska-Abramczuk D, Ribes A, Rötig A, Taylor RW, Wortmann SB, Murayama K, Meitinger T, Gagneur J, Prokisch H. Clinical implementation of RNA sequencing for Mendelian disease diagnostics. *Genome medicine*. 2022 Apr 5;14(1):38. doi: 10.1186/s13073-022-01019-9.
4. Burgin H, Sharpe AJ, Nie S, Ziemann M, Crameri JJ, Stojanovski D, Pitt J, Ohtake A, Murayama K, McKenzie M. Loss of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation protein short-chain Enoyl-CoA hydratase disrupts oxidative phosphorylation protein complex stability and function. *FEBS J*. 2022 Aug 13. doi: 10.1111/febs.16595. Online ahead of print.
5. Vogel GF, Mozer-Glassberg Y, Landau YE, Schlieben LD, Prokisch H, Feichtinger RG, Mayr JA, Brennenstuhl H, Schröter J, Pechlaner A, Alkuraya FS, Baker JJ, Barcia G, Baric I, Braverman N, Burnyte B, Christodoulou J, Ciara E, Coman D, Das AM, Darin N, Marina AD, Distelmaier F, Eklund EA, Ersoy M, Fang W, Gaignard P, Ganetzky RD, Gonzales E, Howard C, Hughes J, Konstantopoulou V, Kose M, Kerr M, Khan A, Lenz D, McFarland R, Margolis MG, Morrison K, Müller T, Murayama K, Nicastro E, Pennisi A, Peters H, Piekutowska-Abramczuk D, Rötig A, Santer R, Scaglia F, Schiff M, Shagrani M, Sharrard M, Soler-Alfonso C, Staufner C, Storey I, Stormon M, Taylor RW, Thorburn DR, Teles EL, Jian-She Wang, Weghuber D, Wortmann S. Genotypic and phenotypic spectrum of infantile liver failure due to pathogenic TRMU variants. *Genet Med*. 2022 Oct 28;S1098-3600(22)00953-4. doi: 10.1016/j.gim.2022.09.015.
6. Imasawa T, Murayama K, Sawada T, Hirose M, Takayanagi M, Nakamura K. High-risk screening for Fabry disease in hemodialysis patients in Chiba Prefecture, Japan. *Clin Exp Nephrol*. 2023 Mar;27(3):288-294. doi: 10.1007/s10157-022-02295-w.
2. 学会発表  
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

分担研究報告書

患者ケア標準書の作成（神経内科）

研究分担者 井川 正道 福井大学 講師

研究要旨

ミトコンドリア病における「患者ケア標準書」（特に脳神経内科領域における）の作成を行い、診療の標準化を図る。

A. 研究目的

ミトコンドリア病は希少疾患であり多彩で多臓器に及ぶ症状を呈するため、診療には専門的な知識や経験が必要である。診療の標準化には「患者ケア標準書」の策定が有効である。本研究では「患者ケア標準書」の作成を目的とする。

B. 研究方法

以前に刊行した「ミトコンドリア病診療マニュアル2017」を踏まえ「患者ケア標準書」の作成を行う。特に専門領域である脳神経内科領域を中心に担当する。

（倫理面への配慮）

「患者ケア標準書」の作成を目的とするため、倫理審査は不要である。

C. 研究結果

「患者ケア標準書」の作成に向けて、ミトコンドリア病の一病型であるMERRFの項目を担当し、クリニカルクエストごとに内容を策定した。現在、査読の段階であり、来年度の刊行を目指す。

D. 考察

「患者ケア標準書」の作成によって、ミトコンドリア病診療の標準化を図る。

E. 結論

引き続き「患者ケア標準書」の作成を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

井川正道. ミトコンドリア病. In: 今日の治療指針2023. 医学書院（東京）. 2023:987.

Okazawa H, Ikawa M, et al. Cerebral Oxidative Stress in Early Alzheimer's Disease Evaluated by <sup>64</sup>Cu-ATSM PET/MRI: A Preliminary Study. Antioxidants (Basel). 2022;11:1022.

Kitazaki Y, Ikawa M, et al. Regional cortical hypoperfusion and atrophy correlate with striatal dopaminergic loss in Parkinson's disease: a study using arterial spin

labeling MR perfusion.

Neuroradiology. 2023;65:569-577.

2. 学会発表

井川正道, 他. アルツハイマー病患者における酸化ストレスPETイメージング. 第21回日本ミトコンドリア学会年会. 2023年3月, 東京.

Ikawa M, et al. Regional cortical hypoperfusion and atrophy correlated with dopaminergic loss in Parkinson's disease. 第63回日本神経学会学術大会. 2022年5月, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

レット症候群の研究総括

研究分担者 伊藤雅之 国立精神・神経医療研究センター 研究員

**研究要旨**

本研究では、レット症候群（RTT）の臨床調査研究と診療支援を行なった。また、RTT の患者データベースの5年毎の追跡調査を行ない、自然暦調査を行った。

RTT の睡眠障害は日常生活に支障をきたすだけでなく、家族や介護者の生活の質にも影響する。そこで、睡眠障害の状況調査を行なった。その結果、睡眠障害は約65%にみられた。このうち、80%以上で1日の睡眠時間は8時間以上保たれていたが、夜間の睡眠は短い傾向にあった。夜間覚醒、夜驚、不規則な睡眠が多くを占めていた。これに対して、薬剤の効果は限定的であった。夜間の睡眠障害は、患者本人だけでなく、介護者、家族の負担が大きく、今後の課題である。

引き続き、公開シンポジウム等を開催し、患者及び患者家族だけでなく一般社会に向けて情報発信していく。

**A. 研究目的**

本研究では、レット症候群（RTT）患者データベースの運用、および臨床研究を行なった。

RTT の追跡調査を行い、その結果から自然暦、臨床実態を明らかにし、診断基準を検証する。また、睡眠の実態についてアンケート調査を行った。

関連学会発表および公開シンポジウム開催し、RTT の普及と啓発を行った。

**B. 研究方法**

RTT の臨床研究：RTT 患者データベース登録されている30名の登録患者の追跡調査を行った。同一患者での症状の変化を経年的に解析し、自然暦を調べた。

RTT の患者データベースの運用：本年度も患者家族会の協力を得て、新規患者登録を行った。遺伝子診断は、当該施設の倫理委員会の承認を得て、患者あるいは保護者への十分な説明と同意を得て行った。

睡眠実態調査：レット症候群支援機構が運営するインターネット情報サイト「レッコミ」を通じて、アンケート調査を行った。本調査は、国立精神・神経医療研究センターの倫理問題等検討委員会の承認のもと行った。

**C. 結果**

RTT の臨床研究：疫学調査とその解析：RTT 患者データベースに登録されている186例の登録者の

うち5年を経過した登録患者について、現況調査として再度登録用紙の提供を依頼し、回収、解析を行なった。

RTT の患者データベースの運用：研究期間中に35名の登録を更新した。臨床遺伝学的解析では、レット症候群の臨床診断を受けた患者について遺伝子診断を行った。

睡眠実態調査：MECP2 遺伝子異常を有するレット症候群患者120名から回答を得た。睡眠障害は約65%にみられた。このうち、80%以上で1日の睡眠時間は8時間以上保たれていたが、夜間の睡眠は短い傾向にあった。夜間覚醒、夜驚、不規則な睡眠が多くを占めていた。これに対して、薬剤の効果は限定的であった。

**D. 考察**

RTT の臨床研究では、RTT の自然暦調査は、治験を行う上で重要な資料となる。

遺伝子診断システムを確立し、原因遺伝子の発見に貢献した。診療支援体制が確立してきた。しかし、遺伝子診断は高額で高度な技術を要することから、継続的な診断には経済的な支援が必要である。

レット症候群の睡眠障害は、50～80%と報告されている。今回の調査でも概ね既報告に一致していた。1日の睡眠時間は確保されているものの、夜間の睡眠にさまざまな問題があることが明らかになった。夜間の睡眠障害は、患者本人だけでなく、介護者、家族

の負担が大きく、今後の課題である。

#### E. 結論

RTT の臨床研究では、RTT 患者データベース登録の継続と追跡調査を行なった。遺伝子診断体制を確立した。しかし、高額で高度な技術であり、継続的な診断には経済的な支援が必要である。

また、レット症候群の夜間の睡眠障害は、その内容が特殊であり、今後解決していかねばならない課題である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hoshi M, Ishiyama M, Wada T, Hase K, Itoh M, Kikuri T, Shirakawa T. Alteration of monoaminergic systems in the caudal medulla and its possible link to diurnal increase of apnea in a mouse model of Rett syndrome. *J Oral Sci* 2023; 65 (2): 96-101. doi.org/10.2334/josnusd.22-0474.
2. Dai H, Kitami Y, Goto Y, Itoh M. 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Agonist Treatment Partially Ameliorates Rett Syndrome Phenotypes in mecp2-Null Mice by Rescuing Impairment of Neuron Transmission and the CREB/BDNF Signaling Pathway. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 14025. doi.org/10.3390/ijms232214025.
3. Saikusa T, Kawaguchi M, Tanioka T, Nabatame S, Takahashi S, Yuge K, Nagamitsu S, Takahashi T, Yamashita Y, Kobayashi Y, Hirayama C, Kakuma T, Matsuishi T, Itoh M. Meaningful word acquisition is associated with walking ability over 10 years in Rett

syndrome. *Brain Dev* 2020; 42: 705-712.

4. Takeguchi R, Takahashi S, Kuroda M, Tanaka R, Suzuki N, Tomonoh Y, Ihara Y, Sugiyama N, Itoh M. MeCP2\_e2 partially compensates for lack of MeCP2\_e1: a male case of Rett syndrome. *Mol Genet Genomic Med* 2020;8(2):e1088.
5. Takeguchi R, Takahashi S, Akaba Y, Tanaka R, Nabatame S, Kurosawa K, Matsuishi T, Itoh M. Early diagnosis of MECP2 duplication syndrome: insights from a nationwide survey in Japan. *J Neurol Sci* 2021; 422: 117321.
6. 伊藤雅之. Rett 症候群. 小児疾患診療のための病態生理 3. 小児内科, 「小児内科」「小児外科」共同編集委員会. 東京, 東京医学社, 385-390pp., 2022 年 12 月.
7. 伊藤雅之. MECP2 Rett 症候群. 小児遺伝子疾患辞典. 小児科診療特集. vol.84 (11), 診断と治療社. 東京. 1484-1486pp, 2021.
8. 伊藤雅之. Rett 症候群. 遺伝子医学 37 巻. メディカルドゥ. 112-119pp, 東京. 2021 年 7 月.

##### 2. 学会発表

1. 伊藤雅之. レット症候群 Overview -これまでとこれから- シンポジウム 7 患者会と進める日本レット症候群研究・治療の現状. 第 63 回日本小児神経学会学術集会. 2021 年 5 月 27 日福岡.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



分担研究報告書

診断基準作成と臨床評価法の確立

研究分担者 松石豊次郎 久留米大学高次脳疾患研究所 客員教授

**研究要旨**

レット症候群の診断基準作成、臨床評価と重症度判定を策定し、国際的な比較検討ができるようにした。今後、データベースの登録数を増やし、経時的な記載をすることにより、自然歴も把握できることが期待できる。

**A. 研究目的**

レット症候群の診療支援のため、日本での患者数、症状の特徴重症度分類などの確立を目指し、国際比格、協力に役立てる。更に、データベースの登録数、経時的な登録ができると自然歴の把握にも繋がる。

**B. 研究方法**

日本小児科学会、日本小児神経学会、重症心身障害学会の協力の協力で、患者の有無と診療状況について調査を行い、レットの臨床評価、重症度分類を検討し、自然歴も明らかにする。

（倫理面への配慮）

知的な発達障害を持つ子ども達である事を十分に理解して研究を行う。

**C. 結果**

レット症候群の典型例、非典型例の診断基準、重症度判定基準の確立ができた。

**D. 考察**

レット症候群の臨床上的特徴、重症度判定が確立できると、国際比較、国際共同研究等への発展に繋がる。更に、新規治療法などが確立されると、データベースの有効活用にも繋がると思われる。

**E. 結論**

日本で不明であった3症候群の実態が明らかになってきた。発症年齢や自然歴を明らかにする事で、適切な支援体制の構築に繋がると考えられる。

**F. 健康危険情報**

該当なし。

**G. 研究発表**

1. 論文発表

1. Takeguchi R, Takahashi S, Akaba Y, Tanaka R, Nabatame S, Kurosawa K, Matsuishi T, Itoh M. Early diagnosis of MECP2 duplication syndrome: Insights from a nationwide survey in Japan. J Neurol Sci. 2021;422:117321. doi.org/ 10.1016/ j.jns. 2021.117321

2. Inoue Y, Hamano S, Hayashi M, Matsuishi T,-- Kuki I, (Japan Rare Epilepsy Syndrome Registry Group). Burden of seizures and comorbidities in patients with epilepsy: a survey based on the tertiary hospital-based epilepsy syndrome Registry in Japan Epileptic Disord 24;82-94,2021.

3. Yoshida S, Amamoto M, Takahashi T---Matsuishi T. Perampanel markedly improved clinical seizures in a patient with a Rett-like phenotype and 960-kb deletion on chromosome 9q34.11 including the *STXBPI* Clin Case Rep 10, e05811. doi.org/10.1002/ccr3.58112022

2. 学会発表

1. 弓削康太郎、高橋知之、河原幸江、坂井勇介、佐藤貴弘、児島将康、西昭徳、松石豊次郎、山下裕史朗。レット症候群モデルマウスにおける睡眠・覚醒病態とオレキシンシグナル伝達の異常。第49回日本脳科学学会、2022年12月3日、4日、久留米

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他 なし。

## レット症候群と類縁疾患の遺伝学的検査

研究分担者 黒澤健司 神奈川県立こども医療センター遺伝科 部長

### 研究要旨

レット症候群はMECP2 (Methyl-CPG-binding protein 2) 遺伝子異常を原因とする神経発達異常症である。臨床的に重度知的障害やてんかんなどが共通するFOXG1症候群とCDKL5症候群が類縁疾患として挙げられる。海外ではレット症候群の遺伝学的検査は診断の必須にないが、実際には診断確定で遺伝学的検査は極めて有用である。レット症候群の遺伝学的検査適用を視野に入れ、類縁疾患の遺伝学的検査について検討した。遺伝学的検査の保険適用、次世代シーケンス解析でのバリエーション解釈、マイクロアレイ染色体検査の活用が、これらの疾患群で重要であることが明らかになった。

### A. 研究目的

レット症候群は MECP2 (Methyl-CPG-binding protein 2) 遺伝子異常を原因とする神経発達異常症である。最近では、MECP2 遺伝子異常が、レット症候群に限定されず、発達障害という共通特徴はあるものの、幅広い症状をきたすことから MECP2 関連疾患としてまとめられつつある。具体的には、女性における MECP2 関連表現型のスペクトルは、古典的レット症候群から、臨床表現型の幅が広い（古典的レット症候群よりも軽度または重度の）レット症候群、軽度の学習障害まで多岐にわたる。いっぽう、男性におけるスペクトルは、重度の新生児脳症、錐体路徴候、パーキンソン病、大嚥丸症 (PPM-X) 症候群、重度の症候群性/非症候群性知的障害まで多岐にわたっている。現在用いられている国際的に認められた診断基準は 2010 年の Neul らによるものであるが、この基準は分子遺伝学的解析が著しく進歩する前の基準で作成されている (Ann Neurol. 2010;68:944-50)。そのため、この診断基準は、遺伝学的検査の有用性についてはあまり触れていない。今回、このような背景から、我が国においてレット症候群をはじめとする様々な神経疾患の遺伝学的検査の位置づけについて検討した。

また、さらに実際の遺伝学的検査の導入として、エクソーム解析の実臨床への応用と令和 4 年度から正式に保険収載となったマイクロアレイ染色体検査のレット症候群と類縁疾患への適用の有用性についても検討した。

### B. 研究方法

現在まで保険収載となっている遺伝学的検査適用疾患とその基準を検討した。データ収集には、これまで

の経緯がまとめられている中央社会保険医療協議会資料等を参照した。また、各指定難病における遺伝学的検査の位置づけについては、難病情報センター (<https://www.nanbyou.or.jp/>) を、小児慢性特定疾病については小児慢性特定疾病情報センター (<https://www.shouman.jp/>) を参照した。

実際の MECP2 関連疾患およびレット症候群類縁疾患の遺伝学的検査については、全エクソンの迅速診断システムの確立が重要と考え、次世代シーケンサーを用いた変異スクリーニング体制を確立した。分析は、メンデル遺伝病疾患パネル解析 TruSight One Sequence Panel (Illumina) を用いて卓上型次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) で解析を進めた。得られたデータは、当施設でのオリジナルパイプラインを用いた。variant マッピング: BWA、重複検証: Picard、variant calling と indel realignments: GATK、機能推定: ANNOVAR を組み合わせた。データの可視化は、IGV (Integrative Genomics Viewer) を用いた。参照ゲノムデータベースは、gnomAD、jMorp、1000 Genomes Project などを用いた。また、HGMD (Human Gene Mutation Database) の最新版も参考とした。日本人データベースとして Human Genetic Variation Database (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>) を参照した。さらに日本人データの不足を補うため、施設内既存データ (in-house データ) も参照する系とした。状況により、全エクソーム解析も併用した。

マイクロアレイ染色体検査は、Agilent 社製マイクロアレイシステムを使用し、解析プラットフォームは SurePrint G3 シリーズを用いた。令和 4 年度からは D006-26 染色体構造変異解析として保険収載となっ

たことから、そのプラットフォームを用いた。FISH解析で用いる BAC クローンは、CHORI 32K plate から選択し、通常法で抽出・ラベリング後、Carl Zeiss 製蛍光顕微鏡と MetaSysrwns 製 Isis で観察をおこなった。臨床症状は診療記録からまとめた。得られた結果は、hg19 に準拠した UCSC Genome Browser に従って検討した。ISCA データ、および DECIPHER データなど種々のデータベースを参照して検出された copy number variations (CNV) の意義を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝学的検査については、施設内倫理承認を得、個人情報には連結可能匿名化として解析を進めた。解析は、保護者の文書による同意を得たうえでおこなった。

### C. 研究結果

指定難病 333 疾患中、遺伝学的検査適応疾患は約 6 割 (180 疾患) 程度におよぶものの、実際に保険収載となっている疾患は約 120 疾患であることを確認した。その多くが、指定難病かつ小児慢性特定疾病であった。遺伝学的検査が保険収載とされている疾患における遺伝学的検査の位置づけは、診断基準で必須項目として挙げられていた。また、遺伝学的検査の対象となる責任遺伝子が非常に多く、遺伝的異質性が高い疾患は、保険適用が難しい傾向があった。

適用として、「分析的妥当性」は「第三者による施設認証や、標準化された手順の遵守等による分析的妥当性の確認が必要」であることや、「臨床的妥当性」は「厚生労働科学研究班による調査研究を踏まえ、厚生科学審議会疾病対策部会で決定された客観的な診断基準において、当該疾患の診断のために必須の検査として位置づけられており、臨床的妥当性は確認されている」ことが必要であることがわかった。また、「臨床的有用性」については、「厚生労働大臣が指定する指定難病の診断が可能であり、臨床的有用性は確認されている」ことがあげられていた。臨床的妥当性の重視が確認できた。

遺伝学的検査では、研究期間に102例の重度知的障害症例をスクリーニングし、1例にMECP2遺伝子既報告変異例の診断ができた。また、CDKL5遺伝子異常症では1例の診断が可能であった。今年度の解析では、明らかなCNVによるレット症候群類縁疾患例は検出されなかったが、これまでもFOXG1遺伝子欠失例などはレット症候群類似の臨床症状を呈する例としてこれまで検出している。

### D. 考察

遺伝学的検査の適用拡大は、ゲノム医療の発展にとっ

ては不可欠な要素であることから、厚生労働科学研究費による難病研究班や関連学会から多くの意見が寄せられていた。2020年度の社会保険診療報酬改定では、こうした流れを反映して新たに65疾患が保険適用となり、全部で140疾患となった。遺伝医療の充実には大きな前進といえる。今後、保険収載となる遺伝学的検査はさらに拡大が期待される。疾患ごとの遺伝的異質性やアレルの異質性を考慮すると、次世代シーケンスの希少難病遺伝学的診断への導入は避けがたい。検出精度、網羅性、コスト、労力、あらゆる面で優れていることは示されている。しかし、網羅的であるからこそ、十分注意が必要である。次世代シーケンスの遺伝学的検査として実施する際の留意事項も公表されつつある。希少難病の医療を進めるうえでそれは不可避の問題である。遺伝学的診断は、保険収載の有無に関わらず高い専門性が求められる医療である。遺伝学的検査の拡大に合わせて、検査・診断を行うためのあるべき体制を各医療機関でも整備してゆくことが重要である。

レット症候群の臨床症状は、年齢とともに変化し、早期の診断や晩期の診断は困難となることがある。今後、早期治療を視野に、こうした遺伝学的検査体制が期待される。一方、網羅的であることから、留意点も上げられ、既に網羅的遺伝学的検査については、小杉班「ゲノム医療における情報伝達プロセスに関する提言—その2:次世代シーケンサーを用いた生殖細胞系列網羅的遺伝学的検査における具体的方針(改定版)」が提出されている。基本的な対処事項は記載あるが、個別の具体的なバリエーション解釈のマニュアルとは異なる。今後、遺伝学的検査として導入する際には、施設設備、人材、報告書のありかた、バリエーション解釈の手順書、なども必要かもしれない。

### E. 結論

レット症候群の遺伝学的検査適用を視野に入れ、神経疾患の保険収載の状況を検討した。その結果、遺伝学的検査の診断基準の位置づけが明確であり、日本医学会のガイドラインを満たすことが必要と思われた。医療の均てん化のために、遺伝学的検査の診断基準における位置づけの明確化が重要と思われた。今後、レット症候群の保険適用が課題と考えられた。また、実際の網羅的解析がレット症候群および類縁疾患の診断に有用であることを確認した。

### F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nishimura N, Murakami H, Hayashi T, Sato H, Kurosawa K. Multiple craniosynostosis and facial dysmorphisms with homozygous IL11RA variant caused by maternal uniparental isodisomy of chromosome 9. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2020;60:153-155.
2. 黒澤健司 熊木達郎 遺伝情報を小児科診療に役立てよう *小児内科* 2020;5(8): 1004-1009
3. 黒澤健司 保険収載されている遺伝学的検査 *小児内科* 2022;54(2):319-324.
4. Murakami, H., Uehara, T., Enomoto, Y., Nishimura, N., Kumaki, T., Kuroda, Y., Asano, M., Aida, N., Kosaki, K., & Kurosawa, K. (2022). Persistent Hyperplastic Primary Vitreous with Microphthalmia and Coloboma in a Patient with Okur-Chung Neurodevelopmental Syndrome. *Molecular syndromology*, 13(1), 75–79.
5. Nishimura N, Enomoto Y, Kumaki T, Murakami H, Ikeda A, Goto T, Kurosawa K. Delineation of a Phenotype Caused by a KAT6B Missense Variant Not Resembling Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson and Genitopatellar Syndromes. *Mol Syndromol*. 2022 May;13(3):221-225.
6. 黒澤健司 顔貌の異常—顔貌でわかる主な症候群 *周産期医学* 2022;52:1334-1337.
7. Shono K, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Kumaki T, Masuno M, Kurosawa K. Further delineation of

SET-related intellectual disability syndrome. *Am J Med Genet A*. 2022 May;188(5):1595-1599.

8. 黒澤健司 アレイ CGH モダンメディア 2022;68:470-473.
9. Nishimura Y, Kurosawa K. Analysis of Gene-Environment Interactions Related to Developmental Disorders. *Front Pharmacol*. 2022;13:863664.

### 2. 学会発表

1. 黒澤健司 先天異常の診かたと考え方 第29回日本形成外科学会基礎学術集会 2020.10.8-9. 横浜
2. 上原健史、関衛順、榎本友美、黒澤健司 メンデル遺伝病シーケンスパネル解析により診断された TRRAP 遺伝子変異の2例. 第368回日本小児科学会神奈川県地方会 2022.2.12 横浜 ウェブ
3. 村上博昭、榎本友美、熊木達郎、黒澤健司 De novo の 3q 腕内逆位を有し、Gomez-Lopez-Hernandez 症候群を疑った男児におけるナノポア長鎖シーケンサーによる切断点解析 日本人類遺伝学会第67回大会 2022.12.14-17 横浜
4. 成戸卓也、関衛順、黒田友紀子、齋藤洋子、榎本友美、黒澤健司 KMT2D 遺伝子内のエクソン欠失による歌舞伎症候群の一例 日本人類遺伝学会第67回大会 2022.12.14-17 横浜

## H. 知的財産権

該当なし。



分担研究報告書

遺伝子診断の確立と疫学調査・解析

研究分担者 高橋 悟 旭川医科大学小児科 教授

**研究要旨**

レット症候群の遺伝子診断体制を確立し、診療支援と疫学調査を進めた。この3年間で同定された遺伝子変異は、*MECP2*変異15例、*CDKL5*変異1例、*FOXG1*変異1例であり、これらの患者はデータベースへ登録された。患者データベースに登録されている *MECP2* 変異を有する患者の協力を得て、MRI 検査によって脳内の構造的・機能的ネットワークについての検討を行い、本症に特徴的な2つのネットワーク異常を同定した。このMRI研究は、患者データベースが、レット症候群のような希少性疾患の研究のための重要なリソースとなることを実証したものである。

**A. 研究目的**

レット症候群の診療支援に向けて、遺伝子診断体制を確立し、疫学調査・解析を行うこと、また病態理解を深めるために脳内ネットワーク異常について検討することを目的とした。

**B. 研究方法**

遺伝子診断用のDNAは、末梢血白血球より抽出した。レット症候群の遺伝子診断は、*MECP2*, *CDKL5*, *FOXG1* 遺伝子について、サンガー法あるいはMLPA法にて行った。脳内の構造的および機能的ネットワーク解析は、定量的MRI画像、拡散テンソル画像、安静時機能的MRI画像検査を行い、臨床症状の重症度（clinical severity score）との関連について検討した。対象は、*MECP2* 遺伝子変異が同定された9例のレット症候群患者であり、同数の正常対照女性ボランティアの協力を得た。

（倫理面への配慮）

本研究は、旭川医科大学の倫理委員会の承認を得て、患者あるいは保護者への十分な説明と同意が得られた場合に行われた（承認番号 775, 19036）。

**C. 結果**

令和2年～4年までの3年間で、*MECP2*変異15例、*CDKL5*変異1例、*FOXG1*変異1例を同定し、患者データベースへの登録を進めた。MRIを用いた機能的ネットワーク解析では、2つの脳内ネットワーク（左右半球間の背側注意ネットワーク、視覚ネットワークと小脳ネットワーク）の機能的結合性低下

を見出した。これらの機能的結合性低下は、構造的異常を反映したものだだった。

**D. 考察**

遺伝情報が付加された患者臨床情報がデータベースとして蓄積することは、本症の長期予後を検討するための信頼性の高い研究コホートとなりうる。このような患者データベースは、病態理解および治療法開発のためにも同一の遺伝子の異常をもつ均一な患者集団での研究を可能にする。今回行った脳MRI研究により、本症に特徴的な構造的・機能的ネットワーク異常が同定されたことは、本研究の有用性を裏付けるものと考えられる（論文発表4）。

**E. 結論**

レット症候群の遺伝子診断体制を確立し、患者データベース登録をすすめ、今後の研究の重要なリソースとなることを示した。

**F. 研究発表**

1. 論文発表

1. Takeguchi R, Kuroda M, Tanaka R, Suzuki N, Akaba Y, Tsujimura K, Itoh M, Takahashi S. Structural and functional changes in the brains of patients with Rett syndrome: A multimodal MRI study. J Neurol Sci 2022; 441: 120381

2. 学会発表

1. 竹口諒, 黒田真実, 田中亮介, 鈴木菜生, 高橋悟:

Rett 症候群の構造的・機能的 MRI 画像解析, 第 64  
回日本小児神経学会学術集会, 2022 年 6 月 4 日 (高  
崎市、Web)

なし

2. 実用新案登録  
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

3. その他  
なし

分担研究報告書

レット症候群の臨床像解析と診断基準の確立

研究分担者 青天目 信 大阪大学大学院医学系研究科小児科学 講師

**研究要旨**

レット症候群は、*MECP2* 遺伝子の異常による神経疾患である。知的障害、退行、上肢の常同運動で特徴づけられる。臨床上、対処や観察の必要な症状は複数ある。そうした症状として、てんかん、便秘、心電図異常についてまとめた。

患者の治療歴について検討した。データのある患者 18 名中便秘を有した患者は 12 名(72%)で、治療薬を使っている種類は緩下剤が 11 名、浣腸が 9 名であった。

**A. 研究目的**

レット症候群は、*MECP2* 遺伝子の異常により生じる神経疾患で、乳幼児期早期に発症する急激な退行とそれに引き続く安定期、上肢の常同運動、上肢機能の退行、言語の退行、歩行障害を主徴とする疾患である。

診断基準に挙がる症状以外に、医学的な管理・観察の必要な症状は複数あり、それらの特徴の中から、てんかん、便秘、心電図異常について、臨床的特徴について後方視的にまとめた。

**B. 研究方法**

カルテより後方視的に、レット症候群患者の症状について検討した。

（倫理面への配慮）

後方視的・予備的な検討で、今後、倫理委員会で審査する予定としている。

**C. 結果**

レット症候群の患者 24 名について、年齢は 3-26 歳（中央値 11 歳）、遺伝子変異の型は、T158M 4 名、R306C、R270X、R168X が 2 名ずつ、R255X が 1 名で、他、停止コドン変異例 4 名、ミスセンス変異例 5 名、エクソン欠失例 2 名、遺伝子検査結果不明例 1 名であった。

てんかんを有する患者は 13 名(62%)で、発症年齢は 1-13 歳(中央値 4 歳)。発作型は、焦点発作が 12 名、ミオクローヌス発作が 1 名、てんかん性スパズムが 1 名であった。

抗てんかん薬で発作が消失したのは全員焦点発作例で、5 名。有効だったのは、LTG が 2 名、CBZ、LEV、TPM が 1 名であった。他の 8 名は発作が残存し、極めて難治に経過していた。残存例で有効であった薬は、

LEV、VPA、AZA、LCM であった。レット症候群のてんかんに対して、ケトン食療法や迷走神経刺激術の有効性が報告されているが、当院では導入した患者はいなかった。

発作が消失した例の遺伝子変異は、T158M 2 名、R168X、R255X、R306C が 1 名ずつであり、残存した例は、T158M が 2 名、Q83X、R133C、R306C、R306H、フレームシフトが 1 名ずつであった。

遺伝子変異とてんかん発症について、T158M や R106W では 7 割以上と高率で、R255X や R306C では 5 割程度と少なめとする報告もあれば、1 あまり大きな違いはないとする報告もあった。2,3

有効な抗てんかん薬については、一定の傾向は認めなかった

便秘に関する情報がある患者 18 名中、便秘を有する患者が 13 名(72%)であった。

浣腸は便秘のある患者では、酸化マグネシウムを内服している患者が 8 名、ポリエチレングリコール製剤を使用している患者が 3 名、乳酸菌製剤が 2 名、漢方薬が 2 名であった。浣腸を施行していたのは 9 名で、毎日施行している患者が 4 名、週数回施行している患者が 3 名であった。

心電図に関する情報のある患者は 14 名おり、心電図測定回数は 58 回であった。患者ごとの心電図測定回数は、1-7 回で、複数回測定している場合の測定間隔は 1-2 年が多く、最も長くフォローしている患者は、7 年であった。

QTc の値は、361-435 msec（平均値 400 msec、中央値 398 msec）で、QT 延長と判定される 460 msec 以上の患者はいなかった。患者ごとの検討で、QTc が単調増加している患者はいなかった。



#### D. 考察

レット症候群において、てんかん発症率は60%台という報告が多い<sup>1-3)</sup>。発症年齢は、乳児期から40代まで幅があるが、25%は3歳までに発症し、50%は4-5.9歳までに、75%が7-13.2歳までにてんかんを発症する。ただし、2歳以前のことは稀である<sup>2-3)</sup>。我々の症例でも、同様である。遺伝子変異とてんかん発症について、T158MやR106Wでは7割以上と高率で、R255XやR306Cでは5割程度と少なめとする報告もあれば<sup>1)</sup>、あまり大きな違いはないとする報告もあった<sup>2-3)</sup>。有効な抗けいれん薬については、一定の傾向は認めなかった。

レット症候群において、便秘の有症率は70-80%と言われている<sup>4-5)</sup>。便秘のコントロール法として推奨されるのは、まず緩下剤、そして経口薬で無効な場合に座薬や浣腸が推奨されている<sup>5)</sup>。本研究でも、緩下剤と浣腸を使っている患者の数はあまり変わらなかった。便秘の管理法として、一般に浣腸が良く使われるためか、内服薬よりも多く使用される傾向にあった。

当院で検討した患者には、QT延長症候群に該当する患者はいなかった。過去の報告では、レット症候群では、健常群と比較して、QT間隔が延長していることが示され、QT延長を呈している患者は、9.3-26%であった<sup>6-7)</sup>。

(参考文献)

1. Glaze DG, et al. Epilepsy and the natural history of Rett syndrome. *Neurology* 2010;74:909-12.
2. Tarquinio DC, et al. Longitudinal course of epilepsy in Rett syndrome and related disorders. *Brain* 2017;140:306-18.
3. Henriksen MW, et al. Epilepsy in classic Rett syndrome: Course and characteristics in adult age. *Epilepsy Res* 2018;145:134-9.
4. Lotan M, et al. The digestive system and nutritional considerations for individuals with Rett syndrome. *ScientificWorldJournal* 2006;6:1737-49.
5. Baikie G, et al. Gastrointestinal dysmotility in Rett syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;58:237-44.
6. Ellaway CJ, et al. Prolonged QT interval in Rett syndrome. *Arch Dis Child* 1999;80:470-2.
7. Clark BC, et al. Serial follow-up of corrected QT interval in Rett syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2020;62:833-6.

#### E. 結論

レット症候群のてんかんは、60%程度に発症し、遺伝子のバリエーションの種類と発症には対応は認めなかった。また有効な抗けいれん薬も認めなかった。便秘は、発症率は70%程度であった。多くは酸化マグネシウムや浣腸によりコントロールされていた。QT延長症候群は認めた患者はいなかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Natsume J, Ishihara N, Azuma Y, Nakata T, Takeuchi T, Tanaka M, Sakaguchi Y, Okai Y, Ito Y, Yamamoto H, Ohno A, Kidokoro H, Hattori A, Nabatame S, Kato K. Lenticular nuclei to thalamic ratio on PET is useful for diagnosis of GLUT1 deficiency syndrome. *Brain Dev* 2021;43(1):69-77.
2. Kagitani-Shimono K, Kato H, Kuwayama R, Tominaga K, Nabatame S, Kishima H, Hatazawa J, Taniike M. Clinical evaluation of neuroinflammation in child-onset focal epilepsy: a translocator protein PET study. *J Neuroinflammation* 2021;18(1):8.
3. Takeguchi R, Takahashi S, Akaba Y, Tanaka R, Nabatame S, Kurosawa K, Matsuishi T, Itoh M. Early diagnosis of MECP2 duplication syndrome: Insights from a nationwide survey in Japan. *J Neurol Sci* 2021;422:117321.
4. Tanigawa J, Nabatame S, Tominaga K, Nishimura Y, Maegaki Y, Kinoshita T, Murakami Y, Ozono K. High-dose pyridoxine treatment for inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Brain Dev* 43(6):680-7, 2021.
5. Kimizu T, Ida S, Okamoto K, Awano H, Niba ETE, Wijaya YOS, Okazaki S, Shimomura H, Lee T, Tominaga K, Nabatame S, Saito T, Hamazaki T, Sakai N, Saito K, Shintaku H, Nozu K, Takeshima Y, Iijima K, Nishio H, Shinohara M. Spinal Muscular Atrophy: Diagnosis, Incidence, and Newborn Screening in Japan. *Int J Neonatal Screen* 3(45):45, 2021.
6. Itai T, Miyatake S, Taguri M, Nozaki F, Ohta M, Osaka H, Morimoto M, Tandou T, Nohara F, Takami Y, Yoshioka F, Shimokawa S, Okuno-Yuguchi J, Motobayashi M, Takei Y, Fukuyama T, Kumada S, Miyata Y, Ogawa C, Maki Y, Togashi N, Ishikura T, Kinoshita M, Mitani Y, Kanemura Y, Omi T, Ando N, Hattori A, Saitoh S, Kitai Y, Hirai S, Arai H, Ishida F, Taniguchi H, Kitabatake Y,

- Ozono K, Nabatame S, Smigiel R, Kato M, Tanda K, Saito Y, Ishiyama A, Noguchi Y, Miura M, Nakano T, Hirano K, Honda R, Kuki I, Takanashi JI, Takeuchi A, Fukasawa T, Seiwa C, Harada A, Yachi Y, Higashiyama H, Terashima H, Kumagai T, Hada S, Abe Y, Miyagi E, Uchiyama Y, Fujita A, Imagawa E, Azuma Y, Hamanaka K, Koshimizu E, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, Saito H, Matsumoto N. Prenatal clinical manifestations in individuals with COL4A1/2 variants. *J Med Genet* 58(8):505-13, 2021.
7. Yoshitomi S, Hamano SI, Hayashi M, Sakuma H, Hirose S, Ishii A, Honda R, Ikeda A, Imai K, Jin K, Kada A, Kakita A, Kato M, Kawai K, Kawakami T, Kobayashi K, Matsuishi T, Matsuo T, Nabatame S, Okamoto N, Ito S, Okumura A, Saito A, Shiraishi H, Shirozu H, Saito T, Sugano H, Takahashi Y, Yamamoto H, Fukuyama T, Kuki I, Inoue Y. Current medico-psycho-social conditions of patients with West syndrome in Japan. *Epileptic Disord* 23(4):579-89, 2021.
  8. Kubota T, Nabatame S, Sato R, Hama M, Nishiike U, Mochizuki H, Takahashi MP, Takeshima T. Hemiplegic migraine type 2 caused by a novel variant within the P-type ATPase motif in ATP1A2 concomitant with a CACNA1A variant. *Brain Dev* 43(9):952-7, 2021.
  9. Nabatame S The anatomical and functional rationale for conducting dysphagia rehabilitation. *Pediatr Int* 24(1):e15091, 2022.
  10. Inoue Y, Hamano SI, Hayashi M, Sakuma H, Hirose S, Ishii A, Honda R, Ikeda A, Imai K, Jin K, Kada A, Kakita A, Kato M, Kawai K, Kawakami T, Kobayashi K, Matsuishi T, Matsuo T, Nabatame S, Okamoto N, Ito S, Okumura A, Saito A, Shiraishi H, Shirozu H, Saito T, Sugano H, Takahashi Y, Yamamoto H, Fukuyama T, Kuki I. Burden of seizures and comorbidities in patients with epilepsy: a survey based on the tertiary hospital-based Epilepsy Syndrome Registry in Japan. *Epileptic Disord* 24(1):82-94, 2022.
  11. Kuwayama R, Suzuki K, Nakamura J, Aizawa E, Yoshioka Y, Ikawa M, Nabatame S, Inoue KI, Shimmyo Y, Ozono K, Kinoshita T, Murakami Y. Establishment of mouse model of inherited PIGO deficiency and therapeutic potential of AAV-based gene therapy. *Nat Commun* 13(1):3107, 2022.
  12. Suzuki T, Ito Y, Ito T, Kidokoro H, Noritake K, Hattori A, Nabatame S, Natsume J. Quantitative Three-Dimensional Gait Evaluation in Patients With Glucose Transporter 1 Deficiency Syndrome. *Pediatr Neurol* 132:23-26, 2022.
  13. Kishimoto K, Nabatame S, Kagitani-Shimono K, Kato M, Tohyama J, Nakashima M, Matsumoto N, Ozono K. Ketogenic diet for focal epilepsy with SPTAN1 encephalopathy. *Epileptic Disord* 24(4):726-8, 2022.
  14. Saffari A, Kellner M, Jordan C, Rosengarten H, Mo A, Zhang B, Strelko O, Neuser S, Davis MY, Yoshikura N, Futamura N, Takeuchi T, Nabatame S, Ishiura H, Tsuji S, Aldeen HS, Cali E, Rocca C, Houlden H, Efthymiou S; SYNAPS Study Group, Assmann B, Yoon G, Trombetta BA, Kivisäkk P, Eichler F, Nan H, Takiyama Y, Tessa A, Santorelli FM, Sahin M, Blackstone C, Yang E, Schüle R, Ebrahimi-Fakhari D. The clinical and molecular spectrum of ZFYVE26-associated hereditary spastic paraplegia: SPG15. *Brain* in press.
  15. Kagitani-Shimono K, Kato H, Soeda F, Iwatani Y, Mukai M, Ogawa K, Tominaga K, Nabatame S, Taniike M. Extension of microglial activation is associated with epilepsy and cognitive dysfunction in Tuberous sclerosis complex: A TSPO-PET study. *Neuroimage Clin* :103288, 2022.
  16. Ogawa K, Tanigawa J, Mukai M, Tominaga K, Kagitani-Shimono K, Nabatame S, Ozono K. Epilepsy with myoclonic absence presenting with unilateral jerks: A case of 2q13 microdeletion syndrome. *Seizure* 106:77-9, 2023.
  17. Nabatame S, Tanigawa J, Tominaga K, Kagitani-Shimono K, Yanagihara K, Imai K, Ando T, Tsuyusaki Y, Araya N, Matsufuji M, Natsume J, Yuge K, Bratkovic D, Arai H, Okinaga T, Matsushige T, Azuma Y, Ishihara N, Miyatake S, Kato M, Matsumoto N, Okamoto N, Takahashi S, Hattori S, Ozono K. Association between cerebrospinal fluid parameters and developmental and neurological status in glucose transporter 1 deficiency syndrome *J Neurol Sci* 447:120597, 2023
2. 学会発表
    1. 6th Congress of the European Academy of Neurology : 20.04.30, 発表 The effect of

- additional antiepileptic drugs for epilepsy in glucose transporter 1 deficiency syndrome. Nabatame S, Shima M, Nakai R, Kuwayama R, Tanigawa J, Tominaga K, Kagitani-Shimono K, Ozono K
2. 第123回 日本小児科学会学術集会 : 20.4.10-12, Web開催 早期にケトン食療法を導入したグルコーストランスポーター1(GLUT1)欠損症の1例 浜野彰太, 青天目 信, 大藪恵一 日本小児科学会雑誌 124: 401, 2020
  3. 第40回 日本骨形態計測学会 : 20.6.18-20, Web開催 グルコーストランスポーター1型異常症の顎顔面口腔領域の形態的特徴について 黒坂 寛, 伊藤慎将, 村田有香, 森田千里, 下野九理子, 青天目信, 大藪恵一, 山城 隆
  4. 第62回 日本小児神経学会学術集会 : 20.08.18-20, Web開催 先天性十二指腸閉鎖を伴い, 知的障害が軽度であった先天性GPI欠損症の1女児例 白井謙太郎, 渡辺章充, 今村公俊, 堀 哲夫, 青天目信, 桑山良子, 村上良子
  5. KCNA遺伝子変異を認めたepisodic ataxia type1の1家族例 島 盛雅, 青天目 信, 中井理恵, 桑山良子, 谷河純平, 岩谷祥子, 富永康仁, 下野九理子, 久保田智哉, 高橋正紀, 大藪恵一 脳と発達 52: S222, 2020
  6. 第 68 回 日本小児神経学会近畿地方会 : 20.10.17, 大阪 焦点発作の群発およびstroke-like episodeで発症した、不完全型Sturge-Weber症候群の一例 小川勝洋, 島 盛雅, 中井理恵, 桑山良子, 谷河純平, 岩谷祥子, 富永康仁, 下野九理子, 青天目 信, 大藪恵一
  7. 第16回 日本てんかん学会近畿地方会 : 21.01.17 比較的広範囲の白質石灰化を伴った限局性皮質異形成Type IIbの一例 小川勝洋, 島 盛雅, 佐藤和明, 谷河純平, 岩谷祥子, 富永康仁, 下野九理子, 青天目 信, 押野 悟, 村山繁雄, 貴島晴彦, 大藪恵一
  8. 青天目信. 患者会と進める日本レット症候群研究・治療の現状 レット症候群の臨床的研究 ガイドブック作成から見えてきたこと. 第63回 日本小児神経学会学術集会 : 21.5.27-29, 脳と発達 2021;53:S102
  9. 谷河純平, 青天目信, 富永康仁, 西村洋子, 前垣義弘, 木下タロウ, 村上良子, 大藪恵一. 先天性glycosylphosphatidylinositol(GPI)欠損症に対するピリドキシン大量療法. 第63回 日本小児神経学会学術集会 : 21.5.27-29 脳と発達 2021;53:S297
  9. 向井昌史, 青天目 信, 小川勝洋, 谷河純平, 富永康仁, 下野久理子, 押野 悟, 貴島晴彦, 大藪恵一. 脱力発作に対して迷走神経刺激療法が著効したLennox-Gastaut症候群の1例. 第230回 大阪小児科学会. 21.06.26
  10. 小川勝洋, 向井昌史, 谷河純平, 岩谷祥子, 富永康仁, 下野久理子, 青天目 信, 大藪恵一. 新生児期からエベロリムスを導入した結節性硬化症のてんかん患者の一例. 第17回 日本てんかん学会近畿地方会 : 21.07.18
  11. 鈴木健史, 伊藤祐史, 伊藤 忠, 城所博之, 則竹耕治, 隈井すみれ, 鈴木良輔, 澤村 文, 白木杏奈, 川口将宏, 牧祐輝, 山本啓之, 中田智彦, 青天目信, 夏目 淳. グルコーストランスポーター1欠損症の歩行異常 三次元歩行解析を用いた検討. 第54回 日本てんかん学会学術集会 : 21.09.23-25
  12. Shin Nabatame. Glucose Transporter 1 Deficiency : Past Experience, Current Status, and Future Challenges. The 22nd Annual Meeting of The Infantile Seizure Society : 21.10.22-24
  13. 青天目信. 難治てんかんに対するケトン食療法. 第4回中性脂肪学会 : 21.12.04
  14. 橋本有観, 渡辺陽和, 青天目信, 繁縄翔太, 菅野直記, 馬場達也, 三好宏昌, 川西邦洋, 濱田悠介, 吉川真紀子, 徳永康行, 茶山公祐. 当院で診断されたGLUT1欠損症の3例. 第126回日本小児科学会. 22.4.16
  15. 増田 奈保子, 青天目 信, 平野 翔堂, 北井 征宏, 荒井 洋, 武内 俊樹, 上原 朋子, 鈴木 寿人, 小崎健次郎, 岡本 伸彦, 大藪 恵一. 知的障害・低緊張と常同運動を認めたGNB1遺伝子病的バリエントを認めた1例. 第126回日本小児科学会 22.4.17
  16. Shin Nabatame, Masashi Mukai, Katsuhiko Ogawa, Junpei Tanigawa, Koji Tominaga, Kuriko Shimono-Kagitani, Toshiyuki Mano, Keichi Ozono. Ketogenic diet introduction and modification in an adult patient with Glut1 deficiency syndrome. 第64回日本小児神経学会学術集会 22.6.2
  17. 青天目信. 『てんかん診療を多職種で考える』当施設のてんかん診療における食事療法の取り組み. 第10回全国てんかんセンター協議会 23.02.10
  18. 青天目信. GLUT-1欠損症治療におけるケトン食の実際. 第1回日本ケトン食療法学会 23.03.12
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
後藤雄一	ミトコンドリア病	加藤元博 (編集委員長)	小児科診療ガイドラインー最新の治療ー	総合医学社	東京	2022	385-389
井川正道	ミトコンドリア病	福井次矢, 高木誠,	今日の治療指針2023年版	医学書院	東京	2023	987
小坂仁、宮内彰彦	アポモルフィンのLeigh脳症に対する治療	柳茂、三牧正和	ミトコンドリア疾患治療の新時代	実験医学	東京	2023	152-157
三牧正和	ミトコンドリア研究と臨床の近接化を目指して	柳茂・三牧正和	ミトコンドリア疾患治療の新時代	羊土社	東京	2023	1
山唄達也	ミトコンドリア遺伝子異常と難聴.	柳茂・三牧正和	ミトコンドリア疾患治療の新時代	羊土社	東京	2023	144-150
伊藤雅之	Rett症候群	「小児内科」「小児外科」共同編集委員会	小児疾患診療のための病態生理3. 小児内科	東京医学社	東京	2022	385-390
青天目信	Lennox-Gastaut症候群	浜野晋一郎	新分類・新薬でわかる小児けいれん・てんかん診療ーClassification and Practice	中山書店	東京	2022	204-213
青天目信	てんかん	大藪恵一,他	小児科診療指針エッセンス	中外医学社	東京	2022	632-641
青天目信	慢性頭痛 (片頭痛・緊張性頭痛)	大藪恵一,他,	小児科診療指針エッセンス	中外医学社	東京	2022	697-702
青天目信	症状▶運動異常ー運動麻痺, 運動失調, 不随意運動	窪田満	外来で見つける先天代謝異常症ーシマウマ診断の勧め	中山書店	東京	2022	176-185

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitazaki Y, <u>Ikawa M</u> , Yamaguchi T, Enomoto S, Shirafuji N, Yamamura O, Tsujikawa T, Okazawa H, Kimura H, Nakamoto Y, Hamano T	Regional cortical hypoperfusion and atrophy correlate with striatal dopaminergic loss in Parkinson's disease: a study using arterial spin labeling MR perfusion	Neuroradiology.	65(3)	569-577	2023
Ueno A, <u>Ikawa M</u> , Maeda K, Tai K, Ito T, Shirafuji N, Yamamura O, Nakamoto Y, Hamano T	Persistent Severe Cerebral Edema with Neutrophil Infiltration Following Listeria Meningitis	Intern Med	61(22)	3431-3434	2022
Yamaguchi T, <u>Ikawa M</u> , Enomoto S, Shirafuji N, Yamamura O, Tsujikawa T, Okazawa H, Kimura H, Nakamoto Y, Hamano T	Arterial spin labeling imaging for the detection of cerebral blood flow asymmetry in patients with corticobasal syndrome	Neuroradiology	64(9)	1829-1837	2022
Okazawa H, <u>Ikawa M</u> , Tsujikawa T, Mori T, Makino A, Kiyono Y, Nakamoto Y, Kosaka H, Yoneda M	Cerebral Oxidative Stress in Early Alzheimer's Disease Evaluated by 64Cu-ATSM PET/MRI: A Preliminary Study	Antioxidants (Basel)	11(5)	1022	2022
Shimozawa, H., T. Sato, H. Osaka, A. Takeda, A. Miyauchi, N. Omika, Y. Yada, Y. Kono, K. Murayama, Y. Okazaki, Y. Kishita and T. Yamagata	A Case of Infantile Mitochondrial Cardiomyopathy Treated with a Combination of Low-Dose Propranolol and Cibenzoline for Left Ventricular Outflow Tract Stenosis.	Int Heart J	63(5):	970-977.	2022

Watanabe, C., H. Osaka, M. Watanabe, A. Miyauchi, E. Fujimbo, T. Tokuyama, H. Uosaki, Y. Kishita, Y. Okazaki, T. Onuki, T. Ebihara, K. Aizawa, K. Murayama, A. Ohtake and T. Yamagata	Total and reduced/oxidized forms of coenzyme Q(10) in fibroblasts of patients with mitochondrial disease	Mol Genet Metab Rep	34	100951	2022
Nishida Y, Yanagisawa S, Morita R, Shigematsu H, Shinzawa-Itoh K, Yuki H, Ogasawara S, Shimuta K, Iwamoto T, Nakabayashi C, Matsuura W, Kato H, Gopalasingam C, Nagao T, Qaqorh T, Takahashi Y, Yamazaki S, Kamiya K, Harada R, Mizuno N, Takahashi H, Akeda Y, Ohnishi M, Ishii Y, Kumasaka T, Murata T, Muramoto K, Toshiro Y, Honma T, Shigeta Y, Kubo M, Takashima S, Shintani Y.	Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allosteric form mitochondrial heme-copper oxidases.	<i>Nat Commun.</i>	13(1)	7591	2022
三牧正和	ミトコンドリア病の診断フローから外れたときの考え方 (生化学～遺伝子診断)	小児内科	54(4)	550-553	2022
三牧正和	小児期発症の神経難病～診療・治療・研究の最新情報 ミトコンドリア病	はげみ	404	15-19	2022
尾方克久、三牧正和、望月秀樹など	神経系疾患を対象とする小児～成人移行医療についての展望：現状と課題	臨床神経学	62	261-266	2022

Akinori Kashio, Chikako Yamada, Kazuo Yasuhara, Teru Kamogashira, Shinichi Someya, Tatsuya Yamasoba	Taurine, Coenzyme Q10, and Hydrogen Water Prevents Geranium Dioxide-Induced Mitochondrial Dysfunction and Associated Sensorineural Hearing Loss in mouse.	Hearing Research		doi: 10.1016/j.heares.2022.108678.	2023 Epub
Dai H, Kitami Y, Goto Y, <u>Itoh M.</u>	5-HT <sub>1A</sub> Receptor Agonist Treatment Partially Ameliorates Rett Syndrome Phenotypes in <i>mecp2</i> Null Mice by Rescuing Impairment of Neuron Transmission and the CREB/BDNF Signaling Pathway.	Int J Mol Sci	23	14025 doi.org/10.3390/ijms232214025.	2022
Takahashi S, Takeguchi R, Tanaka R, Fukuoaka M, Koike T, Otani H, Inoue K, Fukuda M, Kurahashi H, Nakamura K, Tominaga K, Matsubayashi T, <u>Itoh M</u> , Tanaka T.	CDKL5 deficiency causes epileptic seizures independent of cellular mosaicism.	J Neurol Sci	443	120498. doi.org/10.1016/j.jns.2022.120498.	2022
Hoshi M, Ishiyama M, Wada T, Hase K, <u>Itoh M</u> , Kikuri T, Shirakawa T.	Alteration of monoaminergic systems in the caudal medulla and its possible link to diurnal increase of apnea in a mouse model of Rett syndrome.	J Oral Sci	65 (2)	96-101. doi.org/10.2334/josnusd.22-0474.	2023
Nabatame S	The anatomical and functional rationale for conducting dysphagia rehabilitation.	Pediatr Int	24(1)	e15091	2022
Inoue Y, Nabatame S, Okamoto N, et al.	Burden of seizures and comorbidities in pediatric patients with epilepsy: a survey based on the tertiary hospital-based Epilepsy Syndrome Registry in Japan.	Epileptic Dis	24(1)	82-94	2022
Kuwayama R, Nabatame S, Inoue KI, Shimmyo Y, et al.	Establishment of mouse model of inherited PIGO deficiency and therapeutic potential of AAV-based gene therapy.	Nat Commun	6(13)	3107	2022



Suzuki T, Ito Y, Ito T, Kidokoro H, Noritaake K, Hattori A, Nabatame S, Natsume J.	Quantitative Three-Dimensional Gait Evaluation in Patients With Glucose Transporter 1 Deficiency Syndrome.	Pediatr Neurol	132	23-26	2022
Kishimoto K, Nabatame S, et al.	Ketogenic diet for focal epilepsy with SPOR-TAN1 encephalopathy.	Epileptic Disord	24(4)	726-728	2022
Kagitani-Shimono K, Kato H, --- Nabatame S, Taniike M.	Extension of microglial activation is associated with epilepsy and cognitive dysfunction in Tuberous sclerosis complex: A TSP-O-PET study.	Neuroimage Clin	37	103288	2023
Ogawa K, Tanigawa J, ---, Nabatame S, Ozono K.	Epilepsy with myoclonic absence presenting with unilateral jerks: A case of 2q13 microdeletion syndrome.	Seizure	106	77-79	2023
Nabatame S, Tanigawa J, et al.	Association between cerebrospinal fluid parameters and developmental and neurological status in glucose transporter 1 deficiency syndrome	J Neurol Sci	447	120597	2023
黒澤健司	保険収載されている遺伝学的検査	小児内科	54	319-324.	2022
Murakami, H., Uehara, T., Enomoto, Y. & Kurosawa, K.	Persistent Hyperplastic Primary Vitreous with Microphthalmia and Coloboma in a Patient with Okur-Chung Neurodevelopmental Syndrome.	Molecular Syndromol	13	75-79	2022
Nishimura N, Enomoto Y, Kumaki T, , Kurosawa K.	Delineation of a Phenotype a KAT6B Missense Caused by Variant Not Resembling Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson and Genitopatellar Syndrome	Molecular Syndromol	13	221-225	2022
黒澤健司	顔貌の異常—顔貌でわかる主な症候群	周産期医学	52	1334-1337	2022



# Taurine, Coenzyme Q<sub>10</sub>, and Hydrogen Water Prevents Germanium Dioxide-Induced Mitochondrial Dysfunction and Associated Sensorineural Hearing Loss in mouse <sup>☆</sup>

Akinori Kashio<sup>a</sup>, Chikako Yamada<sup>a</sup>, Kazuo Yasuhara<sup>a</sup>, Teru Kamogashira<sup>a</sup>, Shinichi Someya<sup>b</sup>, Tatsuya Yamasoba<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>b</sup> Department of Aging and Geriatric Research, University of Florida, Gainesville, Florida, United States of America

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 1 April 2022

Revised 26 November 2022

Accepted 16 December 2022

Available online 17 December 2022

### Keywords:

Germanium dioxide

Hearing loss

Mitochondrial dysfunction

Taurine

Coenzyme Q10

Hydrogen water

## ABSTRACT

Mitochondrial dysfunction has been implicated in numerous common diseases as well as aging and plays an important role in the pathogenesis of sensorineural hearing loss (SNHL). In the current study, we showed that supplementation with germanium dioxide (GeO<sub>2</sub>) in CBA/J mice resulted in SNHL due to the degeneration of the stria vascularis and spiral ganglion, which were associated with down-regulation of mitochondrial respiratory chain associated genes and up-regulation in apoptosis associated genes in the cochlea. Supplementation with taurine, coenzyme Q10, or hydrogen-rich water, attenuated the cochlear degeneration and associated SNHL induced by GeO<sub>2</sub>. These results suggest that daily supplements or consumption of antioxidants, such as taurine, coenzyme Q10, and hydrogen-rich water, may be a promising intervention to slow SNHL associated with mitochondrial dysfunction.

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Mitochondria are the primary organ generating cellular adenosine triphosphate (ATP) and play a central role in a variety of cellular processes, including calcium signaling, reactive oxygen species (ROS) generation, and apoptosis (Yamasoba et al., 2007). Based on these important roles, impairment of mitochondrial function has been implicated in numerous common diseases and conditions, such as cardiovascular disease, neurodegenerative diseases, metabolic disorders, and even in normal aging (Wang et al., 2016).

Mitochondrial dysfunction is typically associated with sensorineural hearing loss (SNHL). For example, in humans, several mutations and deletion in mitochondrial DNA (mtDNA) have been reported to cause both syndromic and non-syndromic forms of SNHL. Further, patients with age-related hearing loss (ARHL) have a significant load of acquired mtDNA mutations in their auditory tissues (Gopinath et al., 2009). In animal models, accumulation of mtDNA mutations by the mutator allele of the mitochondrial

Polγ DNA polymerase has shown ARHL acceleration (Kujoth et al., 2005). Even in acute SNHL, such as noise- and aminoglycoside-induced hearing loss, impairment of mitochondrial function has been shown to play an important role (Böttger and Schacht, 2013; Fujimoto and Yamasoba, 2019). Considering these findings, establishing a good animal model presenting mitochondrial dysfunction with hearing loss and discovering the methods for preventing the symptoms occurring in these animals seems to play an important role in overcoming many SNHL diseases as well as many other systemic diseases.

It has been demonstrated that chronic intake of germanium dioxide (GeO<sub>2</sub>) both in humans and animal models causes symptoms and pathological findings similar to those in patients with mitochondrial encephalomyopathy, which is known as mtDNA mutation disease (Higuchi et al., 1989; Takeuchi et al., 1992; Asaka et al., 1995; Kim et al., 1998; Higuchi et al., 1991; Sanai et al., 1990; Wu et al., 1992; Li et al., 2001; Lin et al., 2006). For example, the skeletal muscles from rats treated with GeO<sub>2</sub> for 23 weeks contained numerous ragged-red fibers and cytochrome-c oxidase (COX)-deficient fibers and showed reduced enzyme activities in the mitochondrial respiratory chain, such as rotenone-sensitive NADH-cytochrome-c reductase and COX (Higuchi et al., 1991). These results suggest that GeO<sub>2</sub> administration can reproduce several pathological conditions caused by mitochondrial dysfunction.

<sup>☆</sup> This article is part of the Special Issue Mitochondrial Function and Dysfunction in the Inner Ear Edited by Shinichi Someya, Anna Lysakowski, Katie Kindt, and David Raible. So, Dr. Lysakowski serve as a Guest Editor of this Special Issue.

\* Correspondence author: Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine, University of Tokyo.

E-mail address: [tyamasoba-tky@umin.ac.jp](mailto:tyamasoba-tky@umin.ac.jp) (T. Yamasoba).

tion, which may be useful in elucidating diseases associated with mitochondrial dysfunction and their treatment.

Moreover, we have previously reported that diet supplemented with 0.5% GeO<sub>2</sub> caused profound SNHL associated with degeneration of the stria vascularis and supporting cells in guinea pigs (Yamasoba et al., 2006). This result indicated that GeO<sub>2</sub> application would be also used to create SNHL animal with mitochondrial dysfunction. Although we speculated that cochlear degeneration caused by GeO<sub>2</sub> intake was associated with mitochondrial damage, mitochondrial function was not investigated in this previous study.

ROS are known to be closely related to mitochondrial dysfunction. ROS are continuously produced via normal metabolism by the electron transport chain in mitochondria. In normal status, cells effectively remove ROS by their innate ROS defense systems, such as superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione (Finkel and Holbrook, 2000; Raha and Robinson, 2000; Dereköy et al., 2004). However, uncontrolled leakage of ROS by irregular respiratory chain and/or decrease in the defense systems can lead to cellular dysfunction. It has been shown that the lack of SOD1 or glutathione peroxidase resulted in severe hearing loss or higher susceptibility to noise exposure, which causes excessive ROS production and induces damage to the outer and inner hair cells (Ohlemiller et al., 2000). These reports suggest that daily dietary intake of ROS scavengers may augment the defense system against ROS and thereby prevent cellular damage caused by mitochondrial damage or dysfunction.

In the current study, we investigated whether chronic intake of GeO<sub>2</sub> results in cochlear mitochondrial impairment and associated SNHL in CBA/J mice. Next, we investigated the effects of ROS scavengers, taurine, coenzyme Q10 (CoQ10), or hydrogen-rich water (Huxtable, 1992; Erdem et al., 2000; Qiao et al., 2015; Koh et al., 2014; Das et al., 2009; Manna et al., 2009; Alam and Hafiz, 2011; Roy and Sil, 2012; M Sikorska et al., 2014; M Sikorska et al., 2014; Sohet et al., 2009; Someya et al., 2009; Yamada et al., 2015; Ohsawa et al., 2008; Sato et al., 2008; Ohsawa et al., 2007; Hayashida et al., 2008; Yoshida et al., 2012; Fukuda et al., 2007; Nakashima-Kamimura et al., 2009; Lin et al., 2011; Fransson et al., 2021), on cochlear degeneration and SNHL induced by GeO<sub>2</sub>.

## 2. Material and methods

Female CBA/J mice were purchased from CLEA Japan (Tokyo, Japan). The experimental protocol was approved by the Committee for the Use and Care of Animals at the University of Tokyo and conformed to the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.1. Experimental protocols

#### 2.1.1. Experiment 1: development and analysis of mouse model of progressive hearing loss by chronic oral intake of GeO<sub>2</sub>

Ten 2-month-old CBA/J mice were used. Five of them were given chow containing 0.15% GeO<sub>2</sub> for 4 months. The amount of GeO<sub>2</sub> was determined from a previous report using rats (Wu et al., 1992). The remaining five animals were given the normal chow serving as control. In the preliminary experiment, auditory brainstem response (ABR) thresholds were measured at 0, 2, 3 and 4 months at 2, 4, 8, and 16 kHz (Supplemental Figure 1). Animals given GeO<sub>2</sub> showed increase of ABR thresholds and became profoundly deaf at 4 months. Therefore, histological changes and gene expression were evaluated 4 months after the start of germanium administration. The left cochlea, muscle, and kidney was fixed with 2% PFA and 2.5% glutaraldehyde, the cochlea was additionally decalcified, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were examined under transmission electron microscope. The

right cochleae were used for gene transcriptional analysis of the cochlea by DNA micro array.

Another 10 two-month-old CBA/J mice were used to confirm gene expression by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Five animals were given chow containing 0.15% GeO<sub>2</sub> and the remaining five animals were given the normal chow for 4 months. The cochleae were dissected and RNA was extracted.

#### 2.1.2. Experiment 2: prevention of GeO<sub>2</sub> –induced cochlear damage by oral intake of ROS scavengers

Two-month-old CBA/J mice that showed auditory brainstem response thresholds within the normal laboratory range were used. Forty animals were given chow containing 0.15% GeO<sub>2</sub> for 3 months and assigned to one of the four groups (*n* = 10 each) according to the content of their drinking water: 1) water without antioxidant; 2) water containing 0.3% taurine (Wako Inc., Osaka, Japan); 3) water containing 150 μM water-soluble CoQ10 (Aqua Q10L10, Nisshin Pharma Inc., Tokyo, Japan); and 4) hydrogen water (Blue Mercury, Tokyo, Japan). The hydrogen water was placed in a closed glass vessel and changed every other day, which minimized the leakage of hydrogen from the water and maintained the concentration to be greater than 0.4 mM 1 day later (Ohsawa et al., 2007), and the remaining 10 animals were fed with normal chow and water as a control. Amounts of chow that each group ate were measured to confirm that there was no difference of the eating amounts among groups. Body weight of each animal was also measured before they were euthanized.

The 3-month ABR measurement took longer than usual to obtain the ABR threshold, and several animals died during the ABR measurement due to additional anesthesia. As a result, the final numbers analyzed were 10, 7, 9, 6, and 7 animals for the control, GeO<sub>2</sub>±normal water, GeO<sub>2</sub>±taurine, GeO<sub>2</sub>±hydrogen, and GeO<sub>2</sub>±CoQ10 groups, respectively. In this experiment, the significant protective effect of the ROS scavenger on GeO<sub>2</sub> was confirmed by 3 months, so we decided to euthanize the animals at 3 months instead of 4 months to avoid further discomfort to the animals, to prevent further sample loss, and to reduce the expense of the agents.

### 2.2. Assessment of hearing function

Detailed protocols for ABR measurements have been described elsewhere (Kinoshita et al., 2013). Briefly, two examiners who were blinded to the experiment and measured ABRs with a tone burst stimulus (2, 4, 8, 16, and 32 kHz) using an ABR recording system (Neuropack Σ MEB5504, Nihon Kohden, Tokyo, Japan). Mice were anesthetized with a mixture of xylazine hydrochloride (10 mg/kg, i.m.) and ketamine hydrochloride (40 mg/kg, i.m.). Needle electrodes were placed subcutaneously at the vertex (active electrode), beneath the left pinna (reference electrode), and beneath the right ear (ground). The sound stimulus consisted of a 15-ms tone burst, with a rise-fall time of 1 ms at frequencies of 2, 4, 8, 16, and 32 kHz. The sound intensity varied in 5-dB intervals near threshold. To obtain a waveform, 1024 tone presentations given at the rate of 17/s were averaged with the Neuropack MEB-2208 evoked potential measuring system (Nihon Kohden, Tokyo, Japan). The threshold was defined as the lowest intensity level at which a clear reproducible wave V could be observed in the trace. When an ABR waveform could not be evoked, the threshold was determined to be 110 dB SPL (5 dB greater than the maximum intensity (105 dB SPL) produced by the system). ABR thresholds were measured at 2 and 6 months of age in experiment 1 and 2 and 5 months of age in experiment 2.

### 2.3. Transmission electron microscopic observation of the cochlea, kidneys, and soleus muscles in animals given GeO<sub>2</sub>

In experiment 1, animals were euthanized at the age of 6 months after the last ABR measurements. The left cochlea, muscle, and kidney were fixed with 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde, cochlea was additionally decalcified, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were examined under transmission electron microscope.

### 2.4. Histological analysis of the cochlea under light microscope

In experiment 2, the cochlear pathology was examined under light microscope. Detailed preparation and examination protocols for determining cochlear pathology have been described previously (Lin et al., 2006; Kinoshita et al., 2013). Briefly, all animals were euthanized under deep anesthesia with xylazine hydrochloride and ketamine hydrochloride at the age of 5 months. The left cochlea was immersed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline overnight at 4 °C and decalcified in 10% ethylenediaminetetraacetic acid solution. The specimens were then dehydrated through a graded alcohol series and embedded in paraffin. The embedded tissues were cut into 5- $\mu$ m thick sections parallel to the modiolus, and two sequential sections were mounted on glass slides and deparaffinized. Five sections at an interval of three slides (i.e., at an interval of approximately 30- $\mu$ m) were stained with hematoxylin and eosin and observed under a light microscope (Nikon Eclipse E800M, Tokyo, Japan, 40 $\times$  objective) to evaluate spiral ganglion cell (SGC) densities and stria vascularis degeneration in the lower-basal turn.

The number of SGCs and the area of Rosenthal's canal of the lower-basal turn were measured using Photoshop CS4 software, and SGC density (SGC number/mm<sup>2</sup>) was calculated, as previously reported (S Someya et al., 2007). In brief, the number of SGCs in each profile were counted with computer monitors. The area of the Rosenthal's canal profile was determined in each photomicrograph by outlining the margin of bony canal using 'Select' tool. The number of the pixel of the Rosenthal's canal was measured using 'Histogram' tool. The pixels were then converted to the area by calculating the number of pixels per unit area. The density of SGC was calculated for each profile of the ganglion as the number of SGCs divided by the area of Rosenthal's canal (mm<sup>2</sup>).

The area of the stria vascularis of the lower-basal turns was measured in digital photomicrographs using Photoshop CS4 software. The proportions of affected areas were also measured in digital photomicrographs. From these data, degeneration rate was calculated by the vacuolar degenerated area divided by the total area of stria vascularis.

### 2.5. Gene transcriptional analysis of the cochlea by DNA micro array

Detailed protocols for gene expression profiling analysis using Affymetrix microarray analysis have been described (Affymetrix 2004; Lee et al., 1999). Briefly, the right cochleae of the animals were used in this study. The cochleae were placed in a micro centrifuge tube, flash frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. Total RNA was extracted from the frozen cochleae by using the TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, NY). We hybridized each sample to a single Affymetrix MOE 430A Gene Chip (Affymetrix, Santa Clara, CA). Signals in each image were normalized to minimize an overall variability in hybridization intensities by a global scaling method using the Affymetrix software as described in the previous report (S Someya et al., 2007). A gene was considered "expressed" if it displayed a "present" call in at least one GeneChip based on the Affymetrix "present/absent call" algorithms. All genes considered "not expressed" were eliminated

from our analysis. To identify genes whose expression was significantly altered by GeO<sub>2</sub>, each control sample ( $n = 5$ ) was compared to each GeO<sub>2</sub> sample ( $n = 5$ ), generating a total of 25 pairwise comparisons. Gene expression change was considered significant when the P value was <0.05 and the fold change was >1.2. We then used Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) (Dennis et al., 2003) and Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) (Hosack et al., 2003) to assign identified genes to "GO (Gene Ontology): Biological Process" categories of Gene Ontology Consortium ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)). We also used EASE to determine the total number of identified genes that were assigned to each Biological Process category and the total number of genes on the array in each Biological Process category and to identify "GO: Biological Process" categories statistically associated with AHL-correlated genes by performing Fisher exact tests. The Fisher exact score represents the probability that an overrepresentation of germanium-induced hearing loss-correlated genes in a certain GO: Biological Process category occurs by chance (Hosack et al., 2003). When the Fisher Exact score is < 0.05 for a given GO: Biological Process category, this gene list is considered to be specifically associated (enriched) in the Biological Process category. Gene probe sets were considered "genes" if they had been assigned a "gene symbol" annotation by DAVID.

### 2.6. Quantitative RT-PCR

We used the same mRNA pools for both microarray and quantitative RT-PCR analyses. Detection of mRNA was performed with an Applied Biosystems Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Duplicate reactions for each primer set were run simultaneously in a 96-well plate using the TaqMan EZ RT-PCR kit.  $\beta$ -Actin was used as an internal standard. Oligonucleotide primers and MGB fluorescent probes (TaqMan Gene Expression Assays) were purchased from Applied Biosystems. Detailed protocols for analysis by qRT-PCR have been described (Someya et al., 2008). All data were reported as mean  $\pm$  SEM.

### 2.7. Statistical analysis

Sigma Stat statistical software was used and all data were expressed as mean  $\pm$  SD. ABR thresholds, HC survival rates, SGC densities, and SV thicknesses were compared among groups by one-way analysis of variance, and then pairwise comparisons were performed by using Bonferroni's test.

## 3. Results

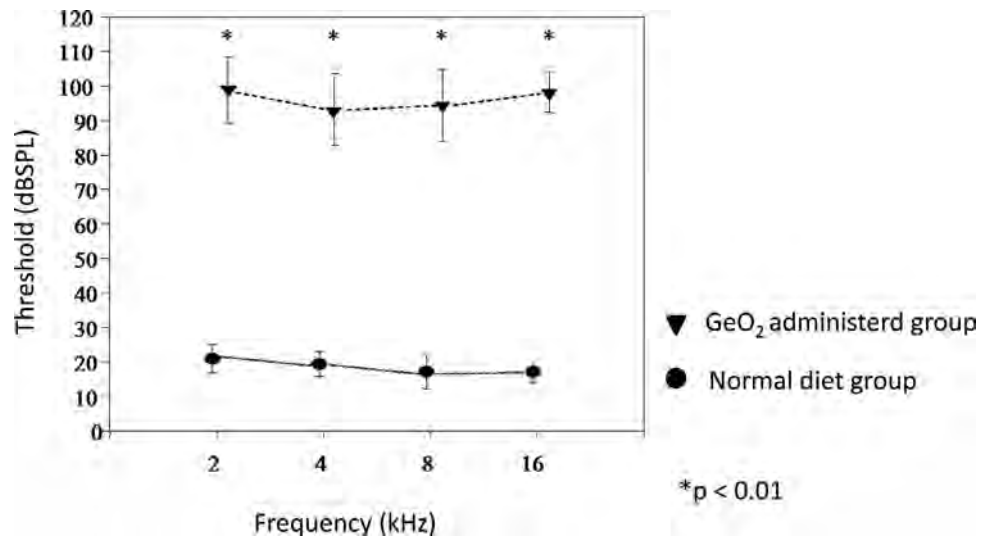
### 3.1. Auditory and histopathological findings of animals given GeO<sub>2</sub>

In experiment 1, CBA/J mice were orally given GeO<sub>2</sub>-containing chows for 4 months from the age of 2 months. The ABRs examined at 2 months of age before experiments were within the normal laboratory range in all 10 animals and did not differ between animals given chows with and without GeO<sub>2</sub>. At the age of 6 months, ABRs showed that animals given GeO<sub>2</sub>-containing chows developed profound hearing loss at all frequencies examined, while those given normal chows maintained normal ABR thresholds (Fig. 1).

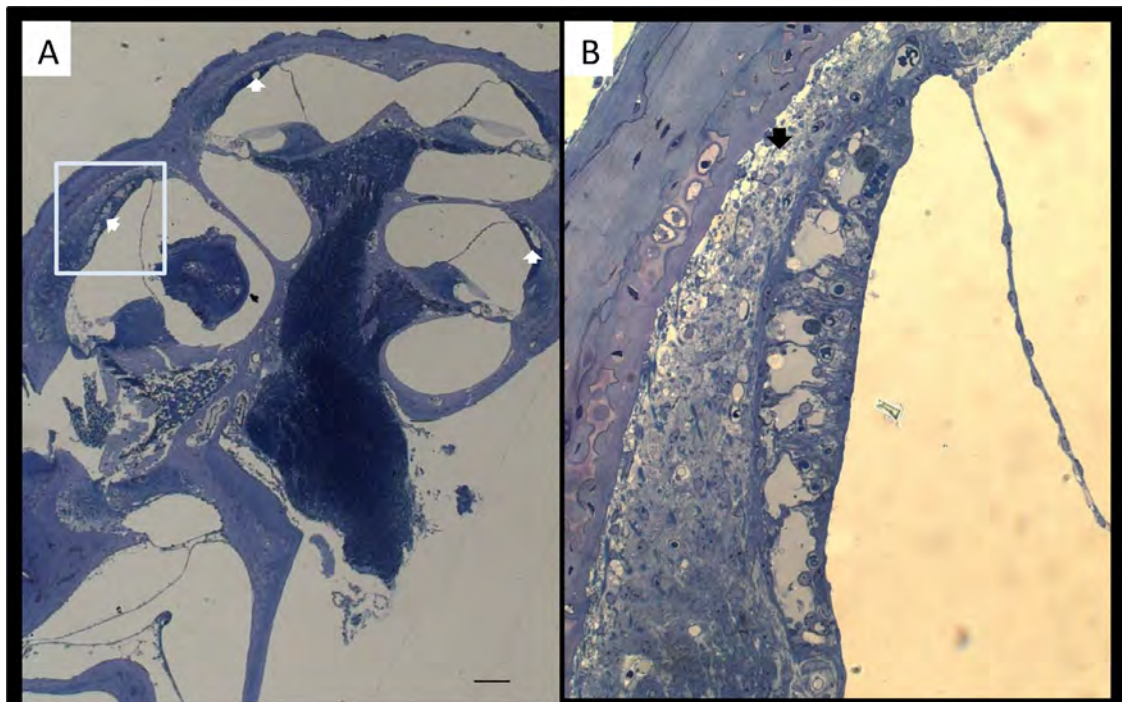
The histopathological examination showed that animals given GeO<sub>2</sub>-containing chows exhibited marked degeneration of the stria vascularis in almost all cochlear turns, more markedly in the lower turn (Fig. 2). Animals given normal chows did not develop any of such pathologies (data not shown).

Transmission electron microscope examination revealed marked vacuolar degeneration in the stria vascularis, where almost all mitochondria contained electron-dense inclusions. Similarly, the distal tubular epithelium of the kidney and the sole muscles showed





**Fig. 1.** Threshold after 4 months of GeO<sub>2</sub> treatment in CBA mice. CBA/J mice treated GeO<sub>2</sub>-containing chows for 4 months showed profound hearing loss in all frequency (triangle), while CBA mice with normal diet showed normal hearing (circle).



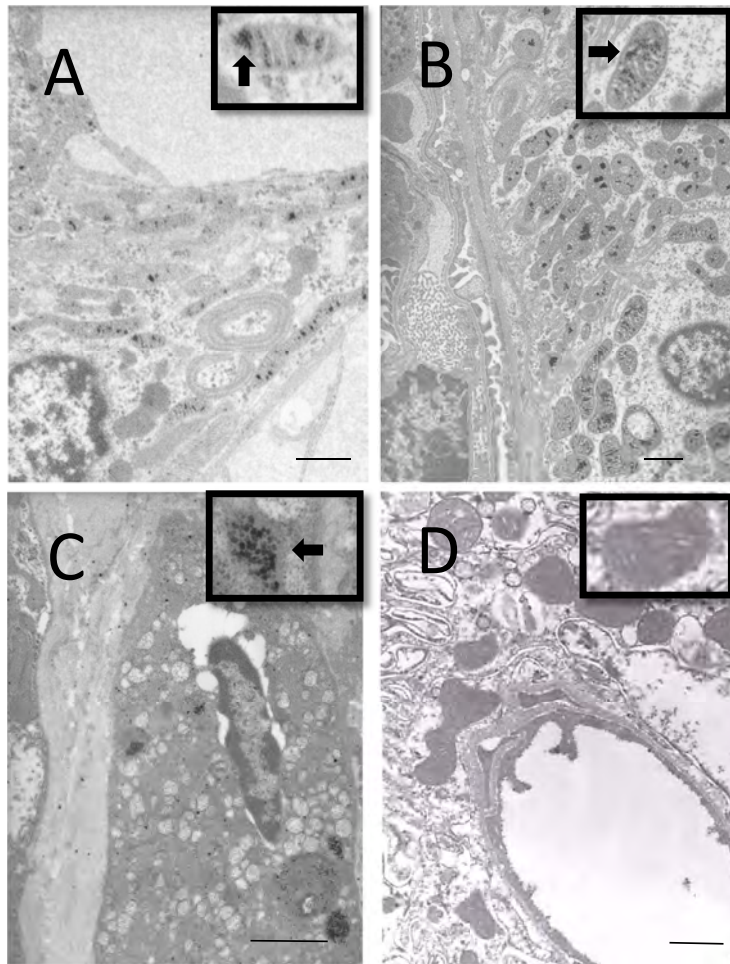
**Fig. 2.** Representative light micrographs of the cochlea after administration of GeO<sub>2</sub> for 4 months. Enlarged image of stria vascularis for captured area (B). Degeneration of the stria vascularis indicated with white arrow is seen in almost all cochlear turns, more markedly in the lower turn (A). Severe vacuolar degeneration of the stria vascularis is found in the lower basal turn (B). Bar = 100 μm in (A), 50 μm in (B).

many electron-dense deposits inside the degenerated mitochondria (Fig. 3).

### 3.2. Overview of microarray analysis

To identify genes and Biological Process categories associated with GeO<sub>2</sub>-induced hearing loss, we conducted genome-wide gene expression analysis using RNA samples isolated from the cochlear tissues of 6-month-old CBA mice (n = 5). Using Affymetrix Gene Chip, we found that 3827 gene probe sets were significantly down-regulated, and 3327 gene probe sets were significantly up-regulated in the cochlear tissues of 6-month-old mice treated with

GeO<sub>2</sub> compared to 6-month-old controls given normal chow. These significantly altered gene probe sets were further assigned to “GO: Biological Process” categories using Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (Huang da et al., 2009), which assigned a classification to 3827 of the downregulated and 3327 of the upregulated genes. A summary of the “Gene Ontology (GO): Biological Process” categories associated with germanium-induced hearing loss is shown in Table 1. The complete set of microarray data has been submitted to the GEO (Gene Expression Omnibus) repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with GEO Accession number GSE84735. The EASE analysis revealed that 16 Go: Biological Process categories, including “mitochondrion,” “mitochondrial



A: Stria vascularis of GeO<sub>2</sub> treated mouse  
 B: Kidney of GeO<sub>2</sub> treated mouse  
 C: Soleus muscle of GeO<sub>2</sub> treated mouse  
 D: Stria vascularis of non-treated mouse

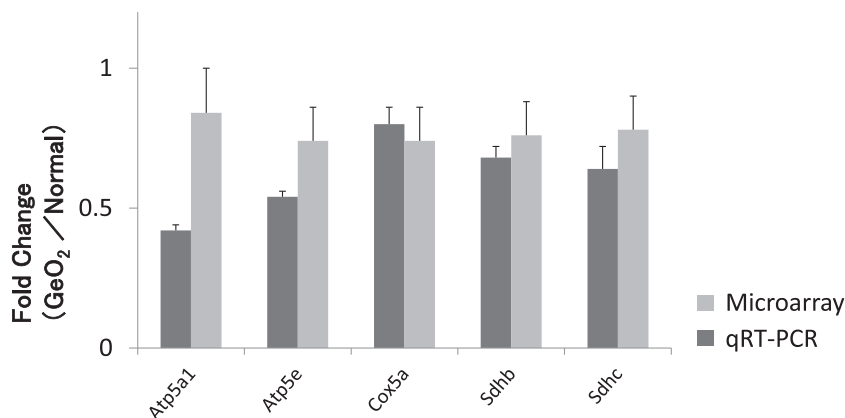
**Fig. 3.** Ultrastructural findings of the intermediate cells of stria vascularis (A), kidney (B), soleus muscle (C) of GeO<sub>2</sub> treated mice. Transmission electron microscope showed vacuolar degeneration of the stria vascularis (A). The arrow head indicates degenerated mitochondria containing electron-dense inclusion. The distal tubular epithelium of the kidney (B) and soleus muscles (C) showed many electron-dense deposits inside the degenerated mitochondria. Ultrastructural findings from a stria vascularis of non-treated mice (D). Inset: high-power view of mitochondria. and Bar = 1 μm.

**Table 1**

Summary of the “GO: Biological Process” categories associated with germanium-induced hearing loss.

Biological Process Categories	N	TN	EASE
<b>Down-regulated (3827 classified genes)</b>			
Mitochondrion	225	679	0.000
Mitochondrial membrane	81	226	0.000
Mitochondrial envelope	85	242	0.000
Mitochondrial inner membrane	76	209	0.000
Mitochondrial electron transport chain	14	27	0.000
Mitochondrial ribosome	17	39	0.000
Mitochondrial matrix	21	57	0.001
Mitochondrial lumen	21	57	0.001
NADH dehydrogenase activity	15	35	0.001
NADH dehydrogenase (Quinone) activity	15	35	0.001
NADH dehydrogenase (Ubiquinone) activity	15	35	0.001
Tricarboxylic acid cycle	10	20	0.004
Acetyl-CoA catabolism	10	21	0.005
Oxidative phosphorylation	17	51	0.010
Acetyl-CoA metabolism	12	31	0.012
ATP binding	184	99	0.049
<b>Up-regulated (3327 classified genes)</b>			
Transcription, DNA-dependent	289	1418	0.000
Regulation of transcription, DNA-dependent	283	1397	0.000
Ligase activity	71	293	0.001
Endocytosis	35	1540	0.002
Apoptosis	88	433	0.018
Programmed cell death	88	439	0.025

Column titles: N, the number of identified genes in the category; FC, fold change; TN, the total number of genes in the category on the Gene Chip; EASE, EASE test score.



**Fig. 4.** The qRT-PCR validation of microarray data. The data represent the fold change in gene expression of 6-month-old mice treated with GeO<sub>2</sub> compared to 6-month-old controls given normal chow. The qRT-PCR analyses for *Atp5a1*, *Atp5e*, *Cox5a*, *Sdhb*, and *Sdhc*. The qRT-PCR results were in agreement with the microarray findings (light gray bar) that the expression of these mitochondrial function-associated genes was significantly decreased in the cochleae of germanium-treated mice (dark gray bar).

inner membrane,” “mitochondrial electron transport chain,” “oxidative phosphorylation,” and tricarboxylic acid cycle, were significantly associated with germanium-induced mitochondrial dysfunction genes (Fisher exact score  $p < 0.05$ ), and 818 out of 1863 genes in these categories on the Gene Chip were significantly downregulated in the cochleae of germanium-applied animals (Table 1).

### 3.3. Downregulation of genes associated with germanium-induced mitochondrial dysfunction

Table 2 shows a list of down-regulated genes encoding components of the mitochondrial respiratory chain in the cochlea. Twenty-eight genes encoding components of the mitochondrial respiratory chain were found to be significantly down-regulated ( $P$  value  $< 0.05$ ) (Table 2). Of these, three genes encode for components of the “respiratory chain complex I” (NADH dehydrogenase complex), including *Ndufs2*, *Ndufs7*, and *Ndufv2*; two genes encode for components of the “respiratory chain complex II” (succinate dehydrogenase complex), including *Sdhb* and *Sdhc* genes; two genes encode for components of the “respiratory chain complex III”, including *Cyc1* and *Cyc5*; one gene encode for components of the “respiratory chain complex IV” (cytochrome c oxidase subunits), including *Cox5a*; and 11 genes encode for components of the “respiratory chain complex V” (ATP synthase subunits), including *Atp5k*, *Atp5e*, and *Atp5a1*. The analyses of qRT-PCR were conducted for *Atp5a1*, *Atp5e*, *Cox5a*, *Sdhb*, and *Sdhc*, to validate the microarray results. The qRT-PCR results were in good agreement with the microarray findings that expression of these mitochondrial function-associated genes were significantly decreased in the cochleae of GeO<sub>2</sub>-treated mice (Fig. 4). These results provide the evidence that GeO<sub>2</sub>-induced hearing loss is associated with the down-regulation of genes involved in the mitochondrial respiratory chain complexes in the cochlea of CBA/J mice.

### 3.4. Effect of antioxidants on ABR threshold shifts induced by GeO<sub>2</sub>

The total amount of weekly dietary intake and final body weights for each group is shown in supplementary Table 1.

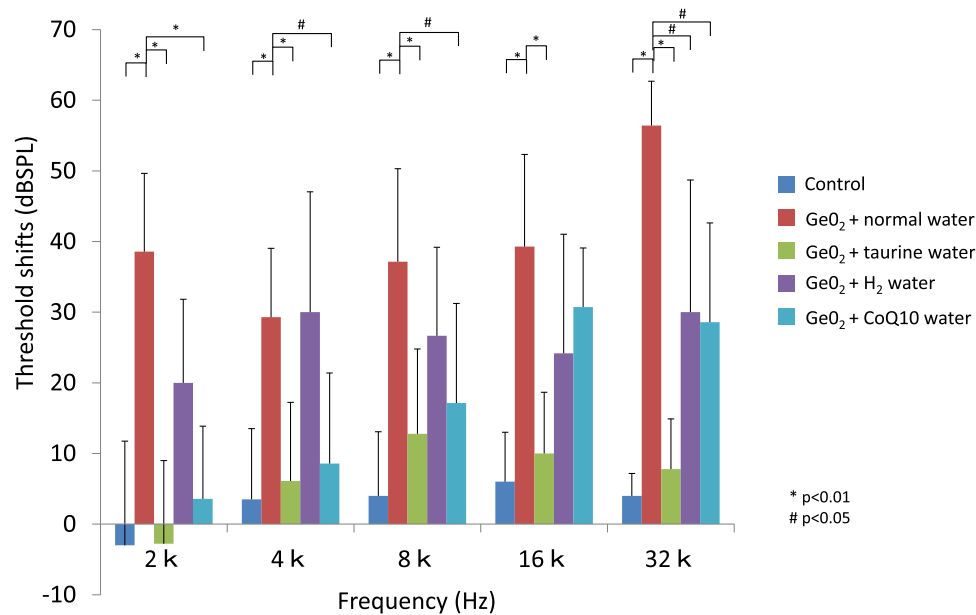
Animals given normal chow and water almost maintained ABR thresholds until 5 months of age, whereas animals given GeO<sub>2</sub>-containing chow and normal water from 2 months of age for 3 months showed approximately 30 to 50 dB threshold shifts. The difference of the threshold shifts was significantly different between controls and animals given GeO<sub>2</sub>+normal water at all frequencies (Fig. 5).

ROS scavengers all provided preventive effect against GeO<sub>2</sub>-induced hearing loss, with taurine showing the strongest effect. Animal given GeO<sub>2</sub>+taurine developed only slight threshold shifts at all frequencies. The threshold shifts in animals given GeO<sub>2</sub>+taurine were significantly different ( $p < 0.01$ ) at all frequencies compared with those given GeO<sub>2</sub>+normal water and were not significantly different at any frequencies compared with controls. CoQ10 prevented GeO<sub>2</sub>-induced threshold shifts predominantly at lower frequencies, with substantial threshold shifts at higher frequencies. Threshold shifts in animals given GeO<sub>2</sub>+CoQ10 were significantly smaller at 2, 4, and 8 kHz ( $p < 0.01$  in 2 kHz,  $p < 0.05$  in 4 and 8 kHz) compared to animals given GeO<sub>2</sub>+normal water. Hydrogen water also provided some preventive effect, but the effect was smallest among the three ROS scavengers. The threshold shifts in animals given GeO<sub>2</sub> and hydrogen water showed approximately 20–30 threshold shifts at all frequencies, which were significantly different from those in animals given GeO<sub>2</sub>+normal water only at 32 kHz ( $p < 0.05$ ). When compared among animals given GeO<sub>2</sub> and ROS scavengers, threshold shifts in animals given taurine were significantly smaller at 2, 4, and 32 kHz ( $p < 0.01$ ) compared to those given hydrogen water and significantly smaller at 16 and 32 kHz ( $p < 0.01$ ) compared with animals given CoQ10. Threshold shifts in animals given CoQ10 were significantly smaller only at 4 kHz ( $p < 0.05$ ) compared to animals given hydrogen water. These data indicated that taurine has the strongest preventive effect, followed by CoQ10 and then hydrogen water.

### 3.5. Effect of antioxidants on degeneration of the spiral ganglion and stria vascularis induced by GeO<sub>2</sub>

The average of total area of stria vascularis at the lower basal turn for all groups are shown in Supplemental Figure 2. There were no significant differences in the average of total areas of stria vascularis among groups. Mice that did not take GeO<sub>2</sub> showed nearly normal appearance of the stria vascularis and SGCs at the age of 5 months (data not shown), whereas mice administered GeO<sub>2</sub>+normal water for 3 months showed vacuolar degeneration of stria vascularis and severe degeneration of the SGCs mainly in the lower-basal and upper-basal turns in the cochlea.

The extent of degeneration in the stria vascularis and SGCs were significantly ameliorated ( $p < 0.01$ ) in animals given GeO<sub>2</sub> and one of the antioxidants when compared to those given GeO<sub>2</sub> + normal water (Figs. 6 and 7), indicative that all the antioxidants protected from GeO<sub>2</sub>-induced cochlear degeneration. The protective effect was most significant in taurine supplementation; there was no significant difference in the extent of degeneration



**Fig. 5.** ABR threshold shifts after 3 months of GeO<sub>2</sub> treatment

The control group showed almost no threshold shifts in all frequency. Animals given GeO<sub>2</sub> and water without antioxidant showed significant threshold shift in all frequency from 2 to 32 kHz. The taurine supplemented group prevented the threshold shift in all frequency in the level that was nearly the same as the control group. CoQ10 group prevented a threshold shift in most of the frequency but there was a substantial threshold shift in higher frequencies compared to control animals. Hydrogen water group had a substantial threshold shift in all frequency compared to the control group but showed some protective effect in limited frequencies compared to animals given GeO<sub>2</sub> + normal water.

either in the stria vascularis or SGCs between animals given GeO<sub>2</sub>+taurine and controls without GeO<sub>2</sub> intake. The extent of degeneration in the stria vascularis and SGCs in animals given GeO<sub>2</sub>+hydrogen water or CoQ10 was significantly smaller ( $p<0.01$ ) compared to those given GeO<sub>2</sub>+normal water, but significantly greater ( $p<0.01$ ) compared to controls without GeO<sub>2</sub> intake. When compared among animals given GeO<sub>2</sub> and one of three antioxidants, animals given taurine showed significant protective effect against the degeneration of the stria vascularis and the SGCs when compared to those given hydrogen water or CoQ10 ( $p<0.001$ ). There was no significant difference in the degeneration of either stria vascularis or the SGCs between animals given GeO<sub>2</sub>+CoQ10 and those given GeO<sub>2</sub>+hydrogen water.

#### 4. Discussion

The current study demonstrated that oral intake of 0.15% GeO<sub>2</sub> for 4 months caused profound hearing loss associated with severe degeneration of the stria vascularis and SGCs in CBA mice. Transmission electron microscopic examination revealed electron-dense inclusions in degenerated mitochondria not only in the cochlea but in the kidney and muscle. Microarray gene expression analysis of the cochlea revealed down-regulation of 16 categories, including the “mitochondrion,” “mitochondrial inner membrane,” “mitochondrial electron transport chain,” and “oxidative phosphorylation.” qRT-PCR confirmed the down-regulation of five representative genes associated with mitochondrial respiratory chain in the cochlea. These findings indicate that dietary oral administration of 0.15% GeO<sub>2</sub> in CBA mice is a promising animal model to investigate SNHL associated with mitochondrial dysfunction. We also observed that GeO<sub>2</sub>-induced SNHL and cochlear degeneration could be ameliorated by dietary intake of water containing taurine, CoQ10, or hydrogen, with taurine providing the strongest protection. These findings suggest that dietary intake of these antioxidants could be used to slow or treat SNHL and other phenotypes associated with

mitochondrial dysfunction such as mitochondrial encephalomyopathy.

As mentioned above, we have shown that dietary intake of GeO<sub>2</sub> induces SNHL in CBA mice, which could be a good model to study SNHL associated with impairment of mitochondrial function. It has been reported that topical application of mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid (3-NP) on the round window of the cochlea can cause acute SNHL; both permanent and temporary threshold shifts were observed in this model depending on the amount of 3-NP used (Hoya et al., 2004; Okamoto et al., 2005). In the permanent threshold shift model, marked degeneration was observed in type 2 fibrocytes in the spiral prominence, type 4 fibrocytes in the spiral ligament, marginal cells, and intermediate cells in the stria vascularis 3 h after 3-NP administration, indicative that SNHL caused by topical application of 3-NP is primarily mediated by cellular degeneration in the lateral wall of the cochlea. Compared to this animal model, in our mouse model, the degeneration was observed not only in the stria vascularis but the SGCs. The difference of the affected sites may be due to the different methods of drug application. 3-NP was applied acutely and topically, whereas GeO<sub>2</sub> was applied chronically and systemically.

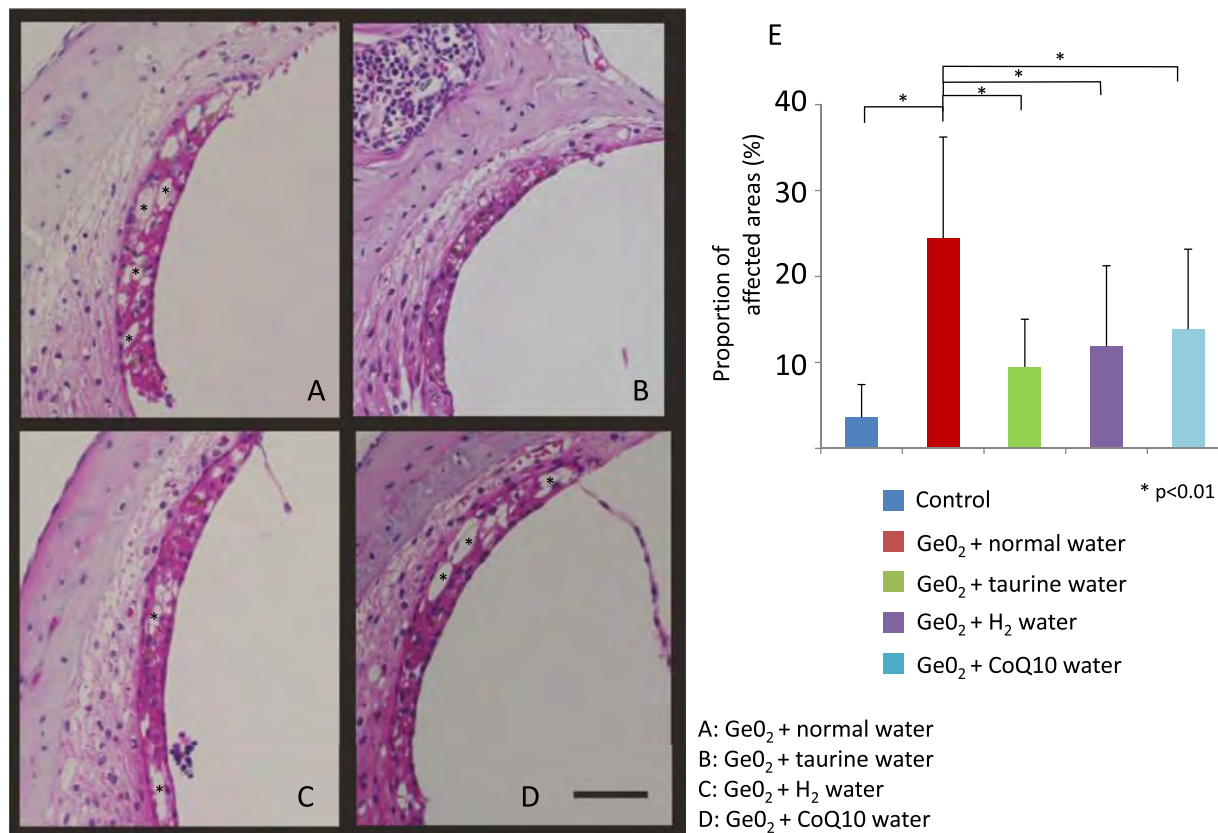
The current study revealed previously unrecognized pathways associated with GeO<sub>2</sub>-induced SNHL, such as the down-regulation of genes involved in the mitochondrial respiratory chain. The DNA microarray analysis revealed that chronic application of GeO<sub>2</sub> down-regulated 27 genes in the respiratory chain complexes I, II, III, IV and V. Someya et al. (S Someya et al., 2007) reported changes of gene expression in the cochlea of DBA/2 J mice, which show severe progressive age-related hearing loss. In their study, gene analysis revealed that the aged DBA/2 J mice showed significant down-regulation of genes encoding components of the mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III, IV, and V. Deficiency of complex IV is reported to be associated with SNHL (Horváth et al., 2005; Lamperti et al., 2012) in other reports. Gutiérrez Cortés et al. (Gutiérrez Cortés et al., 2012) also suggested that mutations of genes in complex I, III, and IV could be the cause of maternally



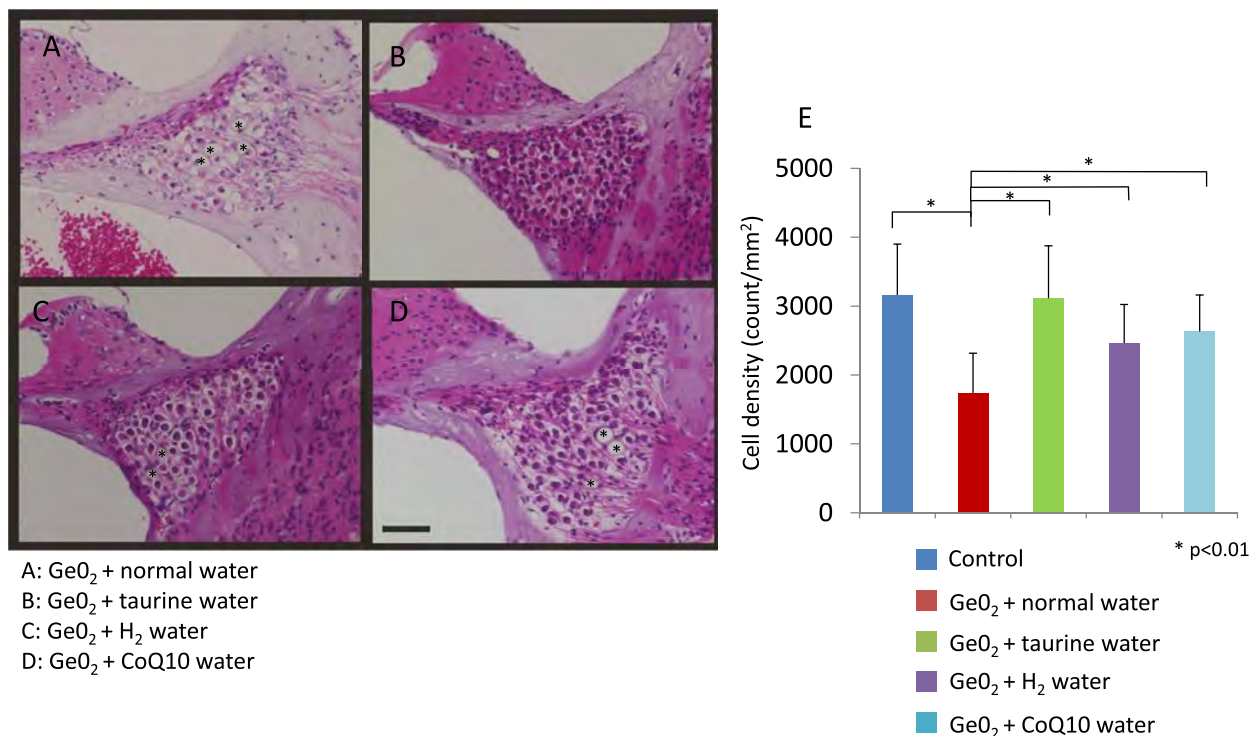
**Table 2**  
List of down-regulated genes encoding components of the mitochondrial respiratory chain in the cochlea.

Gene	Gene ID	Affy ID	P Value	FC
<b>Oxidative Phosphorylation</b>				
Atp5a1	C78762	1,420,037_at	0.011	-2.028
Atp5d	BC008273	1,423,716_s_at	0.033	-1.571
Atp5e	NM_025983	1,416,567_s_at	0.000	-1.835
Atp5g1	NM_007506	1,416,020_a_at	0.000	-1.567
Atp5g2	NM_026468	1,415,980_at	0.002	-1.727
Atp5j	NM_016755	1,416,143_at	0.008	-1.191
Atp5k	AV216686	1,434,053_x_at	0.004	-1.727
Atp5l	NM_013795	1,448,203_at	0.009	-1.593
Atp5o	NM_138,597	1,416,278_a_at	0.000	-1.563
Atp5o /// LOC432676	AV066932	1,437,164_x_at	0.005	-1.558
Atp6ap1	AI316502	1,449,622_s_at	0.000	-1.795
Cox5a	NM_007747	1,448,153_at	0.025	-1.345
Cyc1	NM_025567	1,416,604_at	0.005	-1.266
Cycs	NM_007808	1,422,483_a_at	0.007	-1.235
Ndufc2	NM_024220	1,416,366_at	0.000	-2.120
Ndufs7	BC013503	1,451,312_at	0.001	-1.458
Ndufv2	AV046532	1,438,159_x_at	0.003	-1.259
<b>Tricarboxylic acid cycle</b>				
Aco1	BB504570	1,456,728_x_at	0.003	-1.360
Aco2	AU019938	1,436,934_s_at	0.047	-1.345
Cs	AB056479	1,450,667_a_at	0.022	-1.248
Dlst	BC006702	1,423,710_at	0.005	-1.616
Idh3b	NM_130,884	1,418,886_s_at	0.001	-1.316
Idh3g	NM_008323	1,416,789_at	0.000	-1.736
Mdh2	NM_008617	1,416,478_a_at	0.000	-1.342
Polr3h	AK019868	1,424,227_at	0.000	-1.181
Sdhb	BC013509	1,418,005_at	0.000	-1.387
Sdhc	NM_025321	1,448,630_a_at	0.012	-1.537

Column titles: Gene, gene symbol; Gene ID, representative public gene ID. Affy ID, Affymetrix probe set ID; FC, fold change.



**Fig. 6.** Representative light micrographs of the stria vascularis in animals given germanium and water (A), taurine (B), hydrogen water (C), and CoQ10 (D). The extent of the degeneration is significantly attenuated in animals given one of the antioxidants compared to those given water without antioxidant. Taurine provides the strongest effect, with the extent of degeneration not being different compared to the controls without germanium treatment (E). Representative vasculoar degeneration area is marked with “\*”. Bar = 50 μm.



**Fig. 7.** Representative light micrographs of the spiral ganglion cells in animals given germanium and water (A), taurine (B), hydrogen water (C), and CoQ10 (D). The extent of the degeneration is significantly attenuated in animals given one of the antioxidants compared to those given water without an antioxidant. Taurine provides the strongest effect, with the extent of degeneration not being different compared to the controls without germanium treatment (E). Representative degenerated area are marked with “\*” Bar = 50  $\mu$ m.

inherited non-syndromic hearing loss. These results are in line with our findings that the dysfunction of mitochondrial respiratory chain complexes was closely related to SNHL. Moreover, the deficiencies of mitochondrial respiratory chain complexes have been reported to be closely related to neural degeneration. For example, Atp5a1 deficiency has been reported to cause severe neonatal encephalopathy, and Atp5e causes early onset lactic acidosis, 3-methylglutaconic aciduria, mild mental retardation, and severe peripheral neuropathy development. Both genes were confirmed to be down-regulated in the current study. Complex V deficiency mediated by other genes also has been observed in neurodegenerative diseases (Kantrow et al., 1997). Complex II deficiency also has been reported to cause neurodegenerative disorders (EA. Shoubridge, 2001; EA. Shoubridge, 2001). Although there has been no report examining the degeneration of SGCs, one of the peripheral neurons, in these deficiencies, it is speculated that mitochondrial dysfunction caused by the down-regulation of genes in complex I, III, and IV may be related to the degeneration of the SGCs.

In the current study, the up-regulation of genes involved in apoptosis was also observed. It has been reported that the defect of the respiratory chain system is associated with the induction of apoptosis (Kantrow et al., 1997). An in vivo study using Neuro-2A cells showed that treatment of GeO<sub>2</sub> to the neuron A2 cell induced the release of cytochrome c from mitochondria, loss of mitochondrial membrane potential, and translocation of the Bax, resulting in apoptosis by the mitochondrial-dependent pathway (Lin et al., 2006). Interestingly, such phenomena have also been reported by applying similar semiconductor elements, such as arsenic, indium, and gallium (Bustamante et al., 1997; Chang et al., 2003; Hu et al., 2003; Milton et al., 2004). Studies investigating the mechanism for arsenic-induced apoptosis have revealed that the apoptosis is triggered by inhibition of mitochondrial respiratory function, resulting in the induction of ROS. ROS inactivate enzymes and damage

DNA molecules by the direct chemical attack on their structure (Pelicano et al., 2003; Shen et al., 2003). Considering these, it can be assumed that the accumulation of germanium in the mitochondria would affect mitochondrial respiratory function, thereby resulting in ROS generation and induced mitochondria-mediated apoptosis of the stria vascularis and SGCs.

Taken together, these reports suggest that GeO<sub>2</sub> accumulation causes mitochondrial dysfunction, leading to the degeneration of the cochlea and subsequent progressive hearing loss via apoptotic pathway. However, the current study does not directly demonstrate a causal relationship between mitochondrial dysfunction and cochlear degeneration, which should be evaluated by future studies.

In the current study, we observed that antioxidants, such as taurine, CoQ10, and hydrogen water, attenuated GeO<sub>2</sub>-induced SNHL and degeneration of the stria vascularis and SGCs, which implies that ROS play a key role in GeO<sub>2</sub>-mediated damage in the cochlea. Those antioxidants have been proven to have powerful antioxidant effects in various fields. For example, taurine has been exhibited to protect various organs from oxidative stress caused by aluminium (Qiao et al., 2015), diabetes (Koh et al., 2014), and various drugs (Das et al., 2009; Manna et al., 2009; Alam and Hafiz, 2011; Roy and Sil, 2012). It has also been reported that administration of taurine induces a significant reduction of intracellular ROS level and recovery of mitochondria membrane potential caused by arsenic in mouse neuroblastoma N2a cells. (Chou et al., Apr). CoQ10 has been shown to protect neuronal cells from UVB- and ROS-induced damage (M Sikorska et al., 2014), brain ischemia/reperfusion, gentamicin-induced cochlear damage and hearing loss, and hepatic oxidative stress and inflammation (M Sikorska et al., 2014). In addition, supplementation of CoQ10 has been reported to show a therapeutic effect in patients with mitochondrial respiratory chain disorders (Hargreaves, 2014).

Hydrogen gas has shown protective effects from ischemia/reperfusion injuries in cerebral (Sato et al., 2008) and myocardial infarction (Hayashida et al., 2008; Yoshida et al., 2012), hepatic injury (Fukuda et al., 2007), cisplatin-induced nephrotoxicity (Nakashima-Kamimura et al., 2009), and noise-induced hearing loss (Lin et al., 2011; Fransson et al., 2021). Although these antioxidants showed protective effect in the current study, hydrogen showed weakest effect compared to other supplements. This may be explained by the limited concentration of hydrogen when given in water. The solubility of the hydrogen is limited and easily leaked from water. Although the glass bottle used minimized the leakage of hydrogen from water and the water was changed every other day to keep the hydrogen concentration above 0.4 mM, the dose may be not sufficient to achieve satisfactory effects. Another reason may be the unique mechanism of scavenging system of hydrogen, which selectively scavenges free hydroxyl radicals ( $\bullet\text{OH}$ ) (Sato et al., 2008; Ohsawa et al., 2007). Other types of free radicals may be more relevant to  $\text{GeO}_2$ -induced damage, and as a result, the effects of hydrogen may be limited.

## 5. Conclusion

Chronic dietary intake of  $\text{GeO}_2$  in CBA mice could induce SNHL due to the degeneration of stria vascularis and the SGCs, which was associated with down-regulation of mitochondrial respiratory chain associated genes and up-regulation of apoptosis-associated genes. Antioxidant supplements, such as taurine, CoQ10, and hydrogen water, could attenuate cochlear damage and SNHL induced by  $\text{GeO}_2$  intake. SNHL induced by oral intake of  $\text{GeO}_2$  can be a promising animal model to investigate SNHL associated with mitochondrial dysfunction. Daily supplements of antioxidants may be one of the solutions to prevent or slow SNHL associated with mitochondrial dysfunction.

## Author statement

Akinori Kashio: investigation and writing of the original draft preparation; Chikako Yamada: investigation; Kazuo Yasuhara: investigation; Teru Kamogashira: investigation; Shinichi Someya: investigation and analysis; Tatsuya Yamasoba: conceptualization, methodology, writing of the review and editing, supervision, and funding acquisition.

## Acknowledgment

We thank Prof. Mitsuya Suzuki, Mr. Yoshiro Mori, Ms. Atsuko Tsuyuzaki, and Ms. Yukari Kurasawa for their technical assistance in tissue preparation including transmission electron microscopy and immunostaining.

## Funding source

This study was supported by Grant Number JP20H00546, JP20K21646JP from Government of Japan Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT), and Grant Number 20FC1019 from Government of Japan Ministry of Labour and Welfare.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.heares.2022.108678.

## References

- Affymetrix, 2004. Expression Analysis Technical Manual. Affymetrix, Santa Clara, CA Version 5.
- Alam, S.S., Hafiz, N.A., 2011. Abd El-Rahim AH. Protective role of taurine against genotoxic damage in mice treated with methotrexate and tamoxfine. *Environ Toxicol Pharmacol* 31, 143–152.
- Asaka, T., Nitta, E., Makifuchi, T., Shibazaki, Y., Kitamura, Y., Ohara, H., et al., 1995. Germanium intoxication with sensory ataxia. *J Neurol Sci* 130, 220–223.
- Böttger, E.C., Schacht, J., 2013. The mitochondrion: a perpetrator of acquired hearing loss. *Hear Res* 303, 12–19.
- Bustamante, J., Dock, L., Vahter, M., Fowler, B., 1997. Orrenius S. The semiconductor elements arsenic and indium induce apoptosis in rat thymocytes. *Toxicology* 118, 129–136.
- Chang, K.L., Liao, W.T., Yu, C.L., Lan, C.C., Chang, L.W., Yu, H.S., 2003. Effects of gallium on immune stimulation and apoptosis induction in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 193, 209–217.
- Chou, C.T., Lin, H.T., Hwang, P.A., Wang, S.T., Hsieh, C.H., Hwang, D.F., 2015 Apr. Taurine resumed neuronal differentiation in arsenite-treated N2a cells through reducing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction. *Amino Acids* 47 (4), 735–744.
- Das, J., Ghosh, J., Manna, P., Sinha, M., Sil, P.C., 2009. Arsenic-induced oxidative cerebral disorders: protection by taurine. *Drug Chem Toxicol* 32, 93–102.
- Dennis Jr, G., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., et al., 2003. DAVID: database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4 (5), P3.
- Dereköy, F.S., Köken, T., Yilmaz, D., Kahraman, A., Altuntaş, A., 2004. Effects of ascorbic acid on oxidative system and transient evoked otoacoustic emissions in rabbits exposed to noise. *Laryngoscope* 114, 1775–1779.
- Erdem, A., Gündoğan, N.U., Usubütün, A., Kiliç, K., Erdem, S.R., Kara, A., et al., 2000. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant* 15, 1175–1182.
- Finkel, T.I., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Fransson, A.E., Videhult Pierre, P., Risling, M., Laurell, G.F.E., 2021. Inhalation of molecular hydrogen, a rescue treatment for noise-induced hearing loss. *Front Cell Neurosci* 15, 658662.
- Fujimoto, C., Yamasoba, T., 2019. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of hearing loss: a systematic review. *Antioxidants (Basel)* 8 (4), 109.
- Fukuda, K., Asoh, S., Ishikawa, M., Yamamoto, Y., Ohsawa, I., Ohta, S., 2007. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 670–674.
- Gopinath, B., Schneider, J., Rochtchina, E., Leeder, S.R., Mitchell, P., 2009. Association between age-related hearing loss and stroke in an older population. *Stroke* 40, 1496–1498.
- Gutiérrez Cortés, N., Pertuiset, C., Dumon, E., Börlin, M., Hebert-Chatelain, E., Pieron, D., Feldmann, D., Jonard, L., Marlin, S., Letellier, T., Rocher, C., 2012. Novel mitochondrial DNA mutations responsible for maternally inherited nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 33, 681–689.
- Hargreaves, I.P., 2014. Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease. *Int J Biochem Cell Biol* 49, 105–111.
- Hayashida, K., Sano, M., Ohsawa, I., Shinmura, K., Tamaki, K., et al., 2008. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 30–35.
- Higuchi, I., Izumo, S., Kuriyama, M., Suehara, M., Nakagawa, M., Fukunaga, H., et al., 1989. Germanium myopathy: clinical and experimental pathological studies. *Acta Neuropathol* 79, 300–304.
- Higuchi, I., Takahashi, K., Nakahara, K., Izumo, S., Nakagawa, M., Osame, M., 1991. Experimental germanium myopathy. *Acta Neuropathol* 82, 55–59.
- Horváth, R., Schoser, B.G., Müller-Höcker, J., Völpe, M., Jaksch, M., Lochmüller, H., 2005. Mutations in mtDNA-encoded cytochrome c oxidase subunit genes causing isolated myopathy or severe encephalomyopathy. *Neuromuscul Disord* 15, 851–857.
- Hosack, D.A., Dennis Jr, G., Sherman, B.T., Lane, H.C., Lempicki, R.A., 2003. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol* 4 (10), R70.
- Hoya, N., Okamoto, Y., Kamiya, K., Fujii, M., Matsunaga, T., 2004. A novel animal model of acute cochlear mitochondrial dysfunction. *Neuroreport* 15, 1597–1600.
- Hu, X.M., Hirano, T., Oka, K., 2003. Arsenic trioxide induces apoptosis in cells of MOLT-4 and its daunorubicin-resistant cell line via depletion of intracellular glutathione, disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase-3. *Cancer Chemother Pharmacol* 52, 47–58.
- Huang da, W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44–57.
- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72, 101–163.
- Kantrow, S.P., DE Taylor, Carraway, M.S., Piantadosi, C.A., 1997. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys* 345, 278–288.
- Kim, K.M., Lim, C.S., Kim, S., Kim, S.H., Park, J.H., Ahn, C., et al., 1998. Nephropathy and neuropathy induced by a germanium-containing compound. *Nephrol Dial Transplant* 13, 3218–3219.
- Kinoshita, M., Sakamoto, T., Kashio, A., Shimizu, T., Yamasoba, T., 2013. Age-related hearing loss in Mn-SOD heterozygous knockout mice. *Oxid Med Cell Longev*. Epub.
- Koh, J.H., Lee, E.S., Hyun, M., Kim, H.M., Choi, Y.J., Lee, E.Y., et al., 2014. Taurine alleviates the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetic rat model. *Int J Endocrinol*, 397307 2014.



- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., et al., 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481–484.
- Lamperti, C., Diodato, D., Lamantea, E., Carrara, F., Ghezzi, D., Mereghetti, P., et al., 2012. MELAS-like encephalomyopathy caused by a new pathogenic mutation in the mitochondrial DNA encoded cytochrome c oxidase subunit I. *Neuromuscul Disord* 22, 990–994.
- Lee, C.K., Klopp, R.G., Weindruch, R., Prolla, T.A., 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285, 1390–1393.
- Li, X., Gao, F., Chen, Q., 2001. The pathogenesis of experimental model of mitochondrial myopathy induced by germanium dioxide. *Chin Med Sci J* 16, 157–160.
- Lin, C.H., Chen, S.S., Lin, Y.C., Lee, Y.S., Chen, T.J., 2006. Germanium dioxide induces mitochondria-mediated apoptosis in Neuro-2A cells. *Neurotoxicology* 27, 1052–1063.
- Lin, Y., Kashio, A., Sakamoto, T., Suzukawa, K., Kakigi, A., Yamasoba, T., 2011. Hydrogen in drinking water attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Neurosci Lett* 487, 12–16.
- Manna, P., Sinha, M., Sil, P.C., 2009. Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. *Amino Acids* 36, 417–428.
- Milton, A.G.I., Zalewski, P.D., Ratnaike, R.N., 2004. Zinc protects against arsenic-induced apoptosis in a neuronal cell line, measured by DEVD-caspase activity. *Biometals* 17, 707–713.
- Nakashima-Kamimura, N., Mori, T., Ohsawa, I., Asoh, S., Ohta, S., 2009. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 64, 753–761.
- Ohlemiller, K.K., McFadden, S.L., Ding, D.L., Lear, P.M., Ho, Y.S., 2000. Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 1, 243–254.
- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., et al., 2007. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13, 688–694.
- Ohsawa, I., Nishimaki, K., Yamagata, K., Ishikawa, M., Ohta, S., 2008. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 1195–1198.
- Okamoto, Y., Hoya, N., Kamiya, K., Fujii, M., Ogawa, K., Matsunaga, T., 2005. Permanent threshold shift caused by acute cochlear mitochondrial dysfunction is primarily mediated by degeneration of the lateral wall of the cochlea. *Audiol Neurootol* 10, 220–233.
- Pelicano, H., Feng, L., Zhou, Y., Carew, J.S., Hileman, E.O., Plunkett, W., et al., 2003. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 278, 37832–37839.
- Qiao, M., Liu, P., Ren, X., Feng, T., Zhang, Z., 2015. Potential protection of taurine on antioxidant system and ATPase in brain and blood of rats exposed to aluminum. *Biotechnol Lett* 37, 1579–1584.
- Raha, S.I., Robinson, B.H., 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 25, 502–508.
- Roy A., Sil P.C. Pathophysiology. Tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative damage in mice erythrocytes: protection by taurine. 19, 137–48 (2012).
- Sanai, T., Oochi, N., Okuda, S., Osato, S., Kiyama, S., Komota, T., et al., 1990. Subacute nephrotoxicity of germanium dioxide in the experimental animal. *Toxicol Appl Pharmacol* 103, 345–353.
- Sato, Y., Kajiyama, S., Amano, A., Kondo, Y., Sasaki, T., Handa, S., et al., 2008. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 375, 346–350.
- Shen, Z.Y., Shen, W.Y., Chen, M.H., Shen, J., Zeng, Y., 2003. Reactive oxygen species and antioxidants in apoptosis of esophageal cancer cells induced by As2O3. *Int J Mol Med* 11, 479–484.
- Shoubridge, E.A., 2001a. Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet* 10, 2277–2284.
- Shoubridge, E.A., 2001b. Nuclear gene defects in respiratory chain disorders. *Semin Neurol* 21, 261–267.
- Sikorska, M., Lanthier, P., Miller, H., Beyers, M., Sodja, C., Zurakowski, B., et al., 2014a. Nanomicellar formulation of coenzyme Q10 (Ubisol-Q10) effectively blocks ongoing neurodegeneration in the mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model: potential use as an adjuvant treatment in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 35, 2329–2346.
- Sikorska, M., Lanthier, P., Miller, H., Beyers, M., Sodja, C., Zurakowski, B., et al., 2014b. Nanomicellar formulation of coenzyme Q10 (Ubisol-Q10) effectively blocks ongoing neurodegeneration in the mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model: potential use as an adjuvant treatment in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 35, 2329–2346.
- Soht, F.M., Neyrinck, A.M., Pachikian, B.D., de Backer, F.C., Bindels, L.B., Niklowitz, P., et al., 2009. Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice. *Biochem Pharmacol* 78, 1391–1400.
- Someya, S., Yamasoba, T., Weindruch, R., Prolla, T.A., Tanokura, M., 2007a. Caloric restriction suppresses apoptotic cell death in the mammalian cochlea and leads to prevention of presbycusis. *Neurobiol Aging* 28, 1613–1622.
- Someya, S., Yamasoba, T., Prolla, T.A., Tanokura, M., 2007b. Genes encoding mitochondrial respiratory chain components are profoundly down-regulated with aging in the cochlea of DBA/2J mice. *Brain Res* 1182, 26–33.
- Someya, S., Yamasoba, T., Kujoth, G.C., Pugh, T.D., Weindruch, R., Tanokura, M., et al., 2008. The role of mtDNA mutations in the pathogenesis of age-related hearing loss in mice carrying a mutator DNA polymerase gamma. *Neurobiol Aging* 29, 1080–1092.
- Someya, S., Xu, J., Kondo, K., Ding, D., Salvi, R.J., Yamasoba, T., et al., 2009. Age-related hearing loss in C57BL/6 J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 19432–19437.
- Takeuchi, A.I., Yoshizawa, N., Oshima, S., Kubota, T., Oshikawa, Y., Akashi, Y., et al., 1992. Nephrotoxicity of germanium compounds: report of a case and review of the literature. *Nephron* 60, 436–442.
- Wang, W., Karamanlidis, G., Tian, R., 2016. Novel targets for mitochondrial medicine. *Sci Transl Med* 8, 326rv3.
- Wu, C.M., Matsuoka, T., Takemitsu, M., Goto, Y., Nonaka, I., 1992. An experimental model of mitochondrial myopathy: germanium-induced myopathy and coenzyme Q10 administration. *Muscle Nerve* 15, 1258–1264.
- Yamada, Y., Nakamura, K., Abe, J., Hyodo, M., Haga, S., Ozaki, M., et al., 2015. Mitochondrial delivery of Coenzyme Q10 via systemic administration using a MITO-Porter prevents ischemia/reperfusion injury in the mouse liver. *J Control Release* 213, 86–95.
- Yamasoba, T., Goto, Y., Komaki, H., Mimaki, M., Sudo, A., Suzuki, M., 2006. Cochlear damage due to germanium-induced mitochondrial dysfunction in guinea pigs. *Neurosci Lett* 395, 18–22.
- Yamasoba, T., Someya, S., Yamada, C., Weindruch, R., Prolla, T.A., Tanokura, M., 2007. Role of mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in age-related hearing loss. *Hear Res* 226, 185–193.
- Yoshida, A., Asanuma, H., Sasaki, H., Sanada, S., Yamazaki, S., Asano, Y., et al., 2012. H<sub>2</sub> mediates cardioprotection via involvements of K(ATP) channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs. *Cardiovasc Drugs Ther* 26, 217–226.

## Sec.3

# ミトコンドリア病

### 1 ミトコンドリア病とは

私たちの体は何10兆個もの小さな細胞が集まって形作られています。その細胞の一つ一つの中にミトコンドリアが存在しています。ミトコンドリアは二重膜に囲まれた細胞内小器官であり、一つの細胞に数百から数千存在していると言われています。主な役割は、細胞で利用される主要なエネルギーであるアデノシン三リン酸（ATP）の産生です。取り込まれた栄養を利用して、細胞の、ひいてはその集合体である私たち生物の活動を支えるエネルギーを作り出す、いわば発電所のような役割を果たしています。そ

帝京大学医学部 小児科 主任教授

三 牧 正 和

のため、ミトコンドリアに機能障害が生じると細胞の働きが低下して、さまざまな症状が出現します。それがミトコンドリア病です。

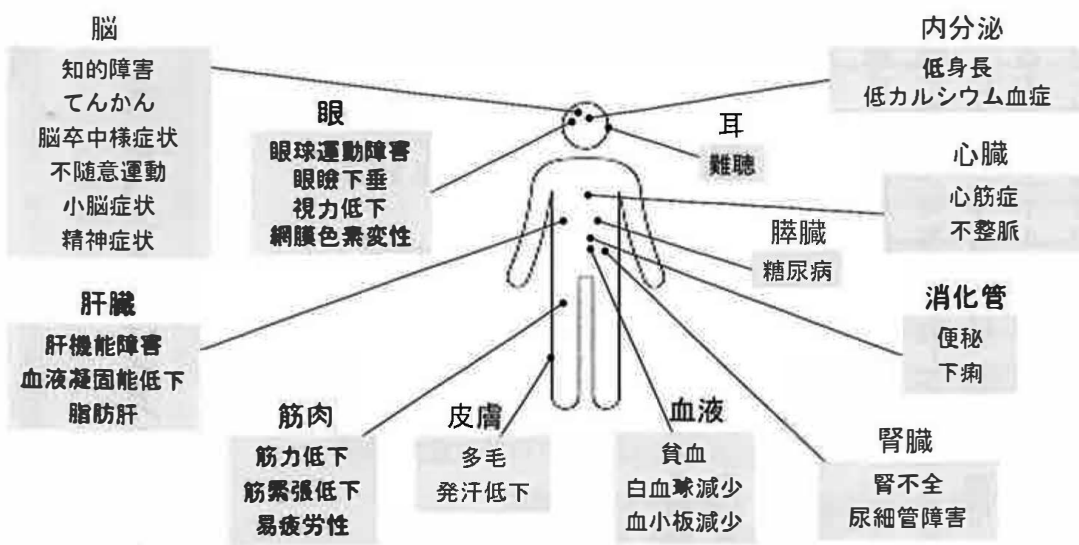
エネルギーを多く使う脳や筋肉などに症状が出やすいため、ミトコンドリア病は「ミトコンドリア脳筋症」と呼ばれることもあります。エネルギーを特にたくさん必要とする神経細胞の機能異常は、知的発達症（知的障害）、てんかん、不随意運動、小脳失調などの症状をもたらします。筋肉の症状としては、筋力低下、筋緊張低下、眼球運動障害、眼瞼下垂などが見られます。しかし、ミトコンドリアは体中のほぼ全ての細胞に存在してい

るので、ミトコンドリア病の症状は全身のあらゆる臓器・器官に現れる可能性があります。体のどの部分のミトコンドリアが障害されるかによって、個々の患者の症状は異なってきます。それぞれの臓器・器官に出やすい症状や病気を図表1に示します。

このようにさまざまな症状を呈するミトコンドリア病は、国の指定難病医療費助成制度の対象となっており、小児慢性特定疾病の一つにも定められています。指定難病として「ミトコンドリア病」と診断されるには、決められた診断基準を満たす必要があります。具体的には、筋肉、脳、心臓、肺、腎臓、脾臓、内分泌、血液、眼、耳のいずれかに、ミトコンドリア病でよく見られる症状があることが要件になります。

従来、ミトコンドリア病の患者数は非常に少ないと思われていました。しかし、近年の調査研究から、一般人口においてミトコンドリア病と診断されている患者は、以前考えられていたほど少なくないことがわかってきました。成人人口10万人あたりで、イギリスでは23人、スペインでは5・7人と報告されています。一

方、日本の正確な患者数は不明ですが、全国の入院患者の医療保険のデータベースから、平成30年度の患者数は3629人、一般人口10万人あたり2.9人と推



図表1 ミトコンドリア病の主な症状

定されています。この調査は入院患者のみを対象としていたので、実際の患者数はこれより多い可能性があると思われるです。

## 2 ミトコンドリア病の原因

ミトコンドリア病は、体の設計図である遺伝子(DNA)の変化によって引き起こされます。近年の遺伝子検査技術の進歩により、ミトコンドリア病の原因となる遺伝子の種類は極めて多いことがわかってきました。ミトコンドリアでは1500にものぼる因子(タンパクなど)が機能していると言われてます。それらのうち、実に約400種類の因子において、その設計図である遺伝子の変化がミトコンドリア病患者で報告されています。

これらの遺伝子は、ほとんどが細胞の核の中に存在しますが(核遺伝子)、核の外(細胞質)にあるミトコンドリアもその内部に独自の環状DNAであるミトコンドリアDNA(ミトコンドリア遺伝子)をもっており、その変化もミトコンドリア病を引き起こします。小児期発症

のミトコンドリア病では、70%〜85%の患者が核遺伝子の変化、残りの患者がミトコンドリア遺伝子の変化が原因であることが知られています。一方、成人になつてから発症するミトコンドリア病患者では、逆に70%〜80%程度の患者がミトコンドリア遺伝子の変化、残りの患者が核遺伝子の変化が原因であると言われて

います。

## 3 ミトコンドリア病の診断

指定難病の「ミトコンドリア病」と診断されるには、先に紹介した種々の症状に加え、検査でミトコンドリアの異常を示す所見があることが基準になります(図表2)。まず、医療機関で行われる血液や髄液検査、あるいは脳画像検査や眼底検査の異常が診断基準で示されています。体内の乳酸が高くなることも多いです。血液や脳脊髄液の乳酸値の上昇は診断の一助となります。神経症状のある患者では、脳CTやMRI検査等の画像検査を行い、大脳基底核や脳幹等のエネルギー需要度の高い部位の病変の有無を調べます。眼底に特徴的所見を認めること

があるので、眼科検査も行われます。さらに、症状に応じて各臓器の評価を行い、ミトコンドリア病に特徴的な障害をきた

- |   |
|---|
| <p>1. 臨床検査</p> <p>①血液または髄液の乳酸値が繰り返して高い、またはMRスペクトロスコピーで病変部に明らかな乳酸ピークを認める。</p> <p>②脳CTやMRIにて、大脳基底核、脳幹に両側対称性の病変等を認める。</p> <p>③眼底検査に異常を認める（急性期の視神経乳頭の発赤・腫脹、毛細血管の蛇行、網膜神経線維腫大、視神経乳頭近傍の出血のうち1つ以上の所見を認めるか、慢性期の視神経萎縮を両眼に認める）。</p> <p>2. 特殊検査</p> <p>①遺伝学的検査所見：ミトコンドリアDNAに質的、量的異常、またはミトコンドリア関連分子をコードする核遺伝子変異を認める。</p> <p>②生化学検査所見：ミトコンドリア関連酵素の活性低下、またはコエンザイムQ10などの中間代謝物の欠乏を認める。またはミトコンドリアDNAの発現異常を認める。</p> <p>③病理検査所見：骨格筋生検や培養細胞または症状のある臓器の細胞や組織で、ミトコンドリアの病理異常を認める。</p> |
|---|

図表2 ミトコンドリア病の検査所見（指定難病医療費制度 診断基準を参考に作成）

していないかチェックします。心臓を例にとれば、心電図や心エコーを行い、ミトコンドリア病で起こりうる不整脈や心筋症の有無を確認します。難聴や糖尿病も診断の手がかりになります。いかなる臓器・器官にも障害が起こりうることを念頭に、特徴的な所見がないか、丁寧な診察と検査によって評価することが大切です。

臨床的にミトコンドリア病を疑った場合には、遺伝子検査や生化学的検査などの特殊検査によって、ミトコンドリアの異常を証明します。ミトコンドリア内に存在する、エネルギーを産生するために必要な酵素の働きを評価するためには、酵素活性測定などの生化学的検査が行われます。また、症状のある臓器（筋肉や肝臓、心臓等）の組織を用いた病理学的検査によってミトコンドリア病に特徴的な所見が見られれば、診断の一助となります。そして、前述のように遺伝子の変化がミトコンドリア病の原因となるので、確定診断のためには遺伝学的検査（遺伝子検査）が大切です。原因となりうる遺伝子の数が非常に多いため、検査には時間と労力がかかりますが、近年の検査

技術の長足の進歩によって、多くの患者の遺伝子診断が可能となりました。遺伝子の変化は全ての患者で検出されるわけではありませんが、ミトコンドリア病疑いの患者の60%以上で、遺伝子検査による確定診断が可能になったと言われています。

#### 4 ミトコンドリア病の病型

ミトコンドリア病の患者の症状は多彩です。症状によってさまざまな病気に分類されます。主な病型を紹介します。

##### ①新生児ミトコンドリア病

ミトコンドリア病はあらゆる年齢で発症する可能性があります。最も早期の新生児期、すなわち出生から1カ月以内に発症するミトコンドリア病を指します。出生直後から全身状態が悪化する重症例も多く見られます。原因としては、ミトコンドリア遺伝子よりも、核遺伝子の変化が多いことが知られています。

##### ② Leigh脳症（リー脳症）

乳幼児期、多くは2歳までに発症する進行性の疾患で、脳幹及び（あるいは）大脳基底核の左右対称性の病変が特徴で

す。精神運動発達遅滞やてんかん、不随意運動、眼球運動障害や呼吸障害などの脳幹の症状が見られます。筋緊張や筋力低下といった筋肉の症状も見られます。感染症を契機にして、急激に状態が悪化することのある疾患です。患者の20%程度にミトコンドリア遺伝子異常、残りの約80%は核遺伝子異常が原因とされ、現在まで約100種類に及ぶ原因遺伝子が報告されています。

### ③脳卒中様症状を伴うミトコンドリア病 (MELAS/メラス)

あらゆる年齢で発症しうる、ミトコンドリア病のなかで最も頻度の高い疾患です。けいれんや意識障害、麻痺などを呈する脳卒中のような発作を特徴としますが、低身長、難聴、心筋症、糖尿病、腎症等多彩な症状を呈しうる症候群です。ミトコンドリア遺伝子の配列の3243番目の変化 (m.3243A>G) を有する患者が80%を占めます。

### ④慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (CPEO/シーピーイーオー)

眼球運動が麻痺する、脛が下がるなどの眼の症状が次第に進行する病気です。MELAS同様発症年齢は小児期から成

人期まで幅広く、筋力低下や糖尿病、難聴など多臓器の障害を伴うことがあります。特に心臓の伝導障害(不整脈)と眼の網膜変性を合併する場合は Kearns Sayre 症候群(カーンズ・セイヤー症候群)と呼ばれます。遺伝子検査では、多くの場合ミトコンドリア遺伝子の欠失(配列の一部が失われる状態)が見られます。欠失の原因が核遺伝子の変化にあることもあり、原因は多彩です。

### ⑤ミオクローヌスを伴うミトコンドリア病 (MERRF/マーフ)

自分の意志とは無関係に筋肉が素早く収縮するミオクローヌスが最初に見られ、続いててんかん発作や体がふらつく小脳症状が出現します。筋力低下、知能低下、低身長も合併しやすい疾患です。約80%の患者に、ミトコンドリア遺伝子の配列の8344番目の変化 (m.8344A>G) が見られます。

## 5 ミトコンドリア病の治療

これら多様な病型のあるミトコンドリア病に対する治療法は、大きく分けて二つあります。

一つは対症療法です。個々の患者で病型や臓器障害の種類や程度が異なりますので、それぞれの症状に応じた治療を行います。例えば、てんかんに対しては薬物によるコントロールを目指します。最近では新しいてんかん治療薬が増えているので、選択肢が広がっています。ミトコンドリア機能に悪影響を与えにくい薬剤を、発作症状にあわせて使用します。糖尿病に対するインスリン療法、難聴に対する補聴器や人工内耳、不整脈に対するペースメーカーなど、障害された臓器に対して適切な治療法が用いられます。薬物や医療機器の進歩によって、さまざまな治療法が可能となっているので、各臓器の症状、病気に応じて、それぞれの分野の専門医の診療を受けることが望ましいと考えます。そのため、多くの診療科をもつ病院を中心に医療が受けられる体制づくりが求められています。

もう一つの治療法は、ミトコンドリア病の原因であるミトコンドリア機能の低下を回復させる原因治療法です。ミトコンドリアに存在する酵素の働きを補助するビタミン類などが使用されていますが、ミトコンドリア病全般に対する十分



な効果は明らかにされていません。一方で、ミトコンドリア病が疑われる患者の一部には、ビタミン等が特異的に効果を発揮する疾患があるので、遺伝子診断などを用いた正確な診断が重要になります。

前述したMELASについては、アミノ酸の一種であるタウリンの内服治療が、脳卒中様発作の抑制効果をもつことが認められ、保険適応をもつ薬剤として承認されています。現在、脳卒中様発作以外の糖尿病などの症状に対する効果についても検討されており、今後の適応拡大が期待されます。

## 6 今後の課題と展望

ミトコンドリア病に対する根本的治療法はまだ十分に確立されていませんが、細胞のエネルギー産生能を高める新しい物質、抗酸化作用（異常なミトコンドリアが発する活性酸素による細胞障害を抑制する効果）をもつ薬物、ミトコンドリア遺伝子異常を減らす化合物等、さまざまな治療法開発研究が進行中です。一部の薬剤は国内外で臨床試験が始まってい

ます。特定の病型や症状をターゲットとした治療法開発も進んでくると思われ、個々の患者に合わせた診療を実現するためには、正確な診断が一層重要になると思われます。

診断においては、遺伝子診断が重要だと述べましたが、病気の原因となる遺伝子が極めて多いことが課題となっています。多数の遺伝子を一度に調べることは技術的には可能となりましたが、それに必要な費用と労力の問題があります。また、検査で遺伝子の変化が検出されなくても、ミトコンドリア病は否定できないことにも注意が必要です。遺伝子解析技術は非常に進歩していますが、遺伝子の変化の検出に至らず「ミトコンドリア病疑い」のまま診断が定まらない患者が多いことも問題です。最近、ミトコンドリア病の遺伝子検査の保険適応が認められたので、今後、検査体制の整備が進むことで、病気の原因がわかって正確な診断に至る患者が増えることが期待されます。

まだ課題の多い状況ではありますが、診断技術が進歩して以前より多くの患者の確定診断がえられるようになったこ

と、新規の治療法開発の研究が進んでいくことから、ミトコンドリア病診療は新しい時代に入っていると云えます。新しい治療法の効果を検証するためには、多くの患者に対する臨床試験が必要になります。また、多種多様なミトコンドリア病について、それぞれの疾患の臨床経過、患者の状況を知り、比較検討して治療効果を判断する必要があります。ミトコンドリア病は、患者数の多くない、いわゆる稀少疾患であるので、複数の医療機関・施設が協力して取り組まなければなりません。そこで、治療法開発の促進と、円滑な臨床試験実施を目的に、全国の患者を対象とした患者登録制度が運用されています。現在、小児期発症のミトコンドリア病を対象とした「MO Bank (<http://mo-bank.com/index.html>)」、MELAS、CPEO、MERRF等を対象としたRemudy (<http://www.remudy.jp/mitd/index.html>) が利用できます。登録を希望される方は、主治医に相談していただければと思います。登録いただいた情報から、症状や経過、治療の効果を分析することで、最適な医療につながることを期待されます。

ミトコンドリア病、レット症候群に関する調査研究班				
区 分		氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者		後藤雄一	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部	部長
研 究 分 担 者	ミ ト コ ン ド リ ア	小坂 仁	自治医科大学 小児科	教授
		大竹 明	埼玉医科大学 小児科・難病センター	教授
		高島成二	大阪大学 大学院生命機能研究科/大学院医学研究科	教授
		藤野善久	産業医科大学 産業生態科学研究所	教授
		松田晋哉	産業医科大学 医学部公衆衛生学	教授
		三牧正和	帝京大学 医学部附属病院小児科	主任教授
		村山 圭	千葉県こども病院 代謝科	部長
		山嵜達也	東京大学 医学部耳鼻咽喉科	教授
		井川正道	福井大学 学術研究院医学系部門 第二内科	講師
		レ ッ ト		伊藤雅之
岩崎裕治	東京都立東部療育センター			副院長
松石豊次郎	久留米大学 高次脳疾患研究所			客員教授
高橋 悟	旭川医科大学 医学部附属病院小児科			教授
青天目信	大阪大学 医学部附属病院小児科			講師
黒澤健司	神奈川県立こども医療センター 臨床研究所			分野長

#### 研究協力者

太田成男	順天堂大学 大学院医学研究科	教授
岡崎康司	順天堂大学大学院医学研究科 難治性疾患診断・治療学 難病の診断と治療研究センター	所長・教授
古賀靖敏	久留米大学 大学院医学研究科小児科学	教授
杉本立夏	国立精神・神経医療研究センター病院 遺伝カウンセリング室	遺伝カウンセラー
砂田芳秀	川崎医科大学 医学部神経内科	教授
末岡 浩	慶應義塾大学 医学部産婦人科	准教授
竹下絵里	国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経診療部	医員
田中雅嗣	国立医薬基盤・健康・栄養研究所 所長直轄 客員研究員	
西野一三	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第一部	部長
中川正法	京都府立医科大学附属北部医療センター	病院長
中村 誠	神戸大学医学部 大学院医学研究科眼科学	教授
松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床遺伝センター	センター長
米田 誠	福井県立大学 看護福祉学部	教授
秋山奈々	東京大学医学部附属病院 ゲノム診療部	遺伝カウンセラー
味原さや香	埼玉医科大学病院小児科・ゲノム医療科	助教
安藤匡宏	鹿児島大学脳神経内科老年病学	特任助教
石井亜紀子	筑波大学医学医療系神経内科学	講師

石川 均	北里大学医療衛生学部視覚機能療法	教授
石田秀和	大阪大学大学院医学系研究科小児科学	講師
泉 岳	北海道大学小児科	医員
市本景子	千葉県こども病院遺伝診療センター代謝科	医員
伊藤玲子	国立成育医療研究センター総合診療部総合診療科	医員
今澤俊之	独立行政法人国立病院機構千葉東病院	診療部長・腎センター長"
岩崎直子	東京女子医科大学附属成人医学センター	所長・教授
植松有里佳	東北大学病院小児科	助教
内野俊平	東京大学医学部附属病院小児科	助教
海老原知博	千葉県こども病院新生児・未熟児科	医員
大澤 裕	川崎医科大学脳神経内科	准教授
岡崎敦子	順天堂大学難治性疾患診断・治療学	准教授
尾形真規子	東京家政大学栄養学科臨床栄養学研究室	教授
岡本裕嗣	鹿児島大学医学部保健学科基礎理学療法学講座	教授
小川えりか	日本大学医学部小児科	助教
梶 俊策	津山中央病院小児科	主任部長
木村亜紀子	兵庫医科大学眼科学講座	准教授
久保 亨	高知大学医学部老年病・循環器内科学講座	講師
齋藤貴志	国立精神・神経医療研究センター病院脳神経小児科	医員
志村 優	千葉県こども病院代謝科	医員
下澤弘憲	自治医科大学小児科学	助教
末岡 浩	慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター	非常勤講師
鈴木康夫	手稲溪仁会病院眼科・神経眼科センター	センター長
須藤 章	社会福祉法人榆の会こどもクリニック	院長
武田充人	北海道大学病院小児科	講師
谷川 健	公立八女総合病院病理診断科	部長
中馬秀樹	宮崎大学医学部眼科	准教授
鶴岡智子	千葉県こども病院新生児・未熟児科	主任医長
長友太郎	福岡赤十字病院小児科	第二小児科部長
中村 誠	神戸大学大学院医学研究科外科系講座眼科学分野	教授
樋口雄二郎	鹿児島大学医歯学総合研究科脳神経内科・老年病学	助教
平松 有	鹿児島大学医歯学総合研究科脳神経内科・老年病学	医員
廣野恵一	富山大学医学部小児科	講師
藤岡正人	北里大学医学部分子遺伝学/耳鼻咽喉科	教授
増田正次	杏林大学医学部耳鼻咽喉科学教室	准教授

南修司郎	国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科	科長
宮内彰彦	自治医科大学小児科	講師
八ツ賀秀一	福岡大学小児科	講師
山内敏正	東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科	教授
山上明子	井上眼科病院	医員
山野邊義晴	慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室	医員
湯地美佳	鹿児島大学医歯学総合研究科脳神経内科・老年病学	医員
和佐野浩一郎	東海大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科	准教授
原 宗嗣	久留米大学 大学院医学研究科小児科学	教授
弓削康太郎	久留米大学 大学院医学研究科小児科学	助教

令和 5 年 4 月 25 日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立精神・神経医療研究センター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 中込 和幸

次の職員の令和 4 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 神経研究所疾病研究第二部・部長

(氏名・フリガナ) 後藤雄一 (ゴトウユウイチ)

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立精神・神経医療研究センター	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月31日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 自治医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 永井良三

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部・教授
- (氏名・フリガナ) 小坂 仁 (オサカ ヒトシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 埼玉医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 別所 正美

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) ゲノム医療科・特任教授

(氏名・フリガナ) 大竹 明 (オオタケ アキラ)

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	埼玉医科大学病院	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項) なし

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職 名 大学院医学研究科長

氏 名 熊ノ郷 淳

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院生命機能研究科・教授  
(氏名・フリガナ) 高島 成二 ・ タカシマ セイジ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



令和5年3月30日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 産業医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 尾辻 豊

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部 ・ 教授  
(氏名・フリガナ) 松田 晋哉 ・ マツダ シンヤ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	産業医科大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称： )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

■立保健医療科学院長 殿

機関名 産業医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 上田 陽一

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 産業生態科学研究所 ・ 教授

(氏名・フリガナ) 藤野善久・フジノヨシヒサ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	産業医科大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 帝京大学  
 所属研究機関長 職名 学 長  
 氏名 冲永佳史

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部・主任教授  
 (氏名・フリガナ) 三牧 正和・ミマキマサカズ

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年4月1日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 千葉県こども病院

所属研究機関長 職名 病院長

氏名 中島 弘道

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 代謝科 ・ 部長

(氏名・フリガナ) 村山 圭 ・ ムラヤマ ケイ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・ 該当する□にチェックを入れること。  
・ 分属研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月30日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人東京大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 藤井 輝夫

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費補助金の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部附属病院・教授  
(氏名・フリガナ) 山嵜 達也 ・ ヤマソバ タツヤ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東京大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人福井大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 上田 孝典

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 学術研究院医学系部門・講師  
(氏名・フリガナ) 井川 正道 (イカワ マサミチ)

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (無の場合はその理由: 別紙参照)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

(別紙)

本研究については、全学の利益相反マネジメント規則に基づき、研究者から「本研究に関する経済的な利益関係がない」旨の報告があり、利益相反マネジメント委員会の事務担当者が審査不要である旨を確認している。

令和 5年 3月28日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター  
所属研究機関長 職 名 理事長  
氏 名 中込和幸

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 神経研究所疾病研究第二部・研究員  
(氏名・フリガナ) 伊藤雅之・イトウマサユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。



令和5年3月31日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 久留米大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 内村 直尚

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業

2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 高次脳疾患研究所・客員教授

(氏名・フリガナ) 松石 豊次郎・マツイシ トヨジロウ

#### 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	久留米大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

#### その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

#### 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年3月31日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 地方独立行政法人神奈川県立病院機構  
神奈川県立こども医療センター

所属研究機関長 職名 総長

氏名 町田 治郎

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 遺伝科 部長
- (氏名・フリガナ) 黒澤 健司・クロサワ ケンジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	神奈川県立こども医療センター	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるC●Iの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるC●I委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るC●Iについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るC●Iについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。  
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和5年5月1日

国立保健医療科学院長 殿

機関名 旭川医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 西川祐司

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部医学科・准教授  
(氏名・フリガナ) 高橋 悟・タカハシ サトル

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	旭川医科大学	<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容: 旭川医科大学利益相反審査委員会での定期的な審査・報告により管理されている。)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立保健医療科学院長 殿

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職 名 大学院医学研究科長

氏 名 熊ノ郷 淳

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 難治性疾患政策研究事業
2. 研究課題名 ミトコンドリア病、レット症候群の調査研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医学系研究科小児科・講師  
(氏名・フリガナ) 青天目 信・ナバタメ シン

## 4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

## その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

## 6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関: )
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由: )
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。