

e. the brain, is another important factor resulting in the change of the angle. Chromosomal abnormalities, particularly trisomy 13 and trisomy 18 [22-25], are some congenital anomalies which show low-set ears. These syndromes express various symptoms including mental deficiency and small head and jaw. The abnormal development of the neurocranial structures in these cases may also affect the base of the skull, resulting in the symptoms of low-set ears as well.

## Conclusions

The results indicate that movement of all anatomical landmarks, including external and internal ears, can be explained by differential growth. Also, when the external ear is recognized as one of the facial landmarks and having a relative position to other landmarks such as the eyes and mouth, the external ears seem to move cranially.

## Abbreviations

(3D): Three-dimensional; (2D): Two-dimensional; (CS): Carnegie Stages; (Ex1): Tragus; (Ex6): Antitragus; (Int): Vestibule; (Mo): Stomodeum; (Np): Nasal pit; (Ey): Lens vesicle; (Pg): Infundibulum of diencephalons; (C1): Cranial region of the first cervical vertebra; (L<sub>EG</sub>): Distance between bilateral Ex1s; (L<sub>E</sub>): Distance between collateral Ex1 and Int; (Exm): The middle point of antitragus and tragus

## Acknowledgements

I am deeply indebted to the Executive Vice President of Kyoto University, Kohei Shiota for providing us the invaluable MR data. I also acknowledge the contribution of collaborating obstetricians and the previous members of the Congenital Anomaly Research Center, Kyoto University Graduate School of Medicine. This study was supported by the Grants #228073, #238058, #21790810 and #22591199 from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and the Japan Science and Technology (JST) institute for Bioinformatics Research and Development (BIRD).

## Author details

<sup>1</sup>Human Health Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 606-8507, Sakyo-ku Shogoin Kawahara-cyo 53, Kyoto, Japan. <sup>2</sup>Congenital Anomaly Research Center, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, 606-8507, Japan. <sup>3</sup>Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, Ibaragi, 305-8573, Japan.

## Authors' contributions

MK has made substantial contributions to conception and design, acquisition of data, and statistic analysis. SY have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content. CU has made substantial contributions to acquisition of data and maintenance of the human embryos specimen. KK have made substantial contributions to acquisition of data especially MR imaging. TT has made substantial contributions to conception and design and general supervision of the research group. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 11 August 2011 Accepted: 1 February 2012  
Published: 1 February 2012

## References

1. Drews U: Auditory and Vestibular organ. In *Color Atlas of Embryology*. Edited by: Drews U. New York: Thieme Medical Publishers; 1995:274-279.
2. Moore KL, Persaud TVN: The Eye and Ear. In *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 8 edition. Edited by: Moore KL, Persaud TVN. Philadelphia: Saunders; 2008:419-438.
3. Sadler TW: Ear. In *Langman's medical embryology*. 11 edition. Edited by: Sadler TW. Philadelphia: Walters Kluwer Health/Lippincott Williams 2010:327-334.
4. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH: Development of the Ears and Eyes. In *Larsen's human embryology*. 4 edition. Edited by: Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier; 2009:583-616.
5. Giraldez F, Fritzsche B: The molecular biology of ear development - "Twenty years are nothing". *Int J Dev Biol* 2007, 51:429-438.
6. Drews U: Head. In *Color Atlas of Embryology*. Edited by: Drews U. New York: Thieme Medical Publishers; 1995:346-357.
7. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG: The pharyngeal apparatus. In *The developing human: clinically oriented embryology*. 8 edition. Edited by: Moore KL, Persaud TVN. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2008:159-196.
8. Sadler TW, Langman J: Head and Neck. In *Langman's medical embryology*. 11 edition. Edited by: Sadler TW. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams 2010:265-292.
9. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH: Development of the pharyngeal apparatus and face. In *Larsen's human embryology*. 4 edition. Edited by: Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. Philadelphia, PA: Elsevier/Churchill Livingstone; 2009:543-582.
10. O'Rahilly R, Müller F: *Developmental stages in human embryos: including a revision of Streeter's Horizons and a survey of the Carnegie Collection* Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington; 1987.
11. Streeter GL: Development of the auricle in the human embryo. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 1922, 14:111-138.
12. Gasser RT: Evidence that some events of mammalian embryogenesis can result from differential growth, making migration unnecessary. *Anat Rec B* 2006, 289B:53-63.
13. Shiota K, Yamada S, Nakatsu-Komatsu T, Uwabe C, Kose K, Matsuda Y, Haishi T, Mizuta S, Matsuda T: Visualization of human prenatal development by magnetic resonance imaging (MRI). *Am J Med Genet A* 2007, 143A:3121-3126.
14. Nishimura H, Takano K, Tanimura T, Yasuda M: Normal and abnormal development of human embryos: first report of the analysis of 1,213 intact embryos. *Teratology* 1968, 1:281-290.
15. Yamada S, Uwabe C, Fujii S, Shiota K: Phenotypic variability in human embryonic holoprosencephaly in the Kyoto Collection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004, 70:495-508.
16. Kameda T, Yamada S, Uwabe C, Suganuma N: Digitization of clinical and epidemiological data from the Kyoto Collection of Human Embryos: maternal risk factors and embryonic malformations. *Cong Anom* .
17. Matsuda Y, Utsuzawa S, Kurimoto T, Haishi T, Yamazaki Y, Kose K, Anno I, Marutani M: Super-parallel MR microscope. *Magn Reson Med* 2003, 50:183-189.
18. Matsuda Y, Ono S, Otake Y, Handa S, Kose K, Haishi T, Yamada S, Uwabe C, Shiota K: Imaging of a large collection of human embryo using a super-parallel MR microscope. *Magn Reson Med Sci* 2007, 6:139-146.
19. Gleiberman AS, Fedtsova NG, Rosenfeld MG: Tissue interactions in the induction of anterior pituitary: role of the ventral diencephalon, mesenchyme, and notochord. *Dev Biol* 1999, 213:340-353.
20. Chai Y, Maxson RE: Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn* 2006, 235:2353-2375.
21. Gittton Y, Heude E, Vieux-Rochas M, Benouaiche L, Fontaine A, Sato T, Kurihara Y, Kurihara H, Couly G, Levi G: Evolving maps in craniofacial development. *Semin Cell Dev Biol* 2010, 21:301-308.
22. Passos-Bueno MR, Ornelas CC, Fanganiello RD: Syndromes of the first and second pharyngeal arches: A review. *Am J Med Genet A* 2009, 149A:1853-1859.
23. Hall JG: *Handbook of physical measurement*. Oxford; New York: Oxford University Press; 2007.
24. Feingold M, Bossert WH: Normal values for selected physical parameters: an aid to syndrome delineation. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1974, 10:1-16.
25. Hunter A, Frias JL, Gillesen-Kaesbach G, Hughes H, Jones KL, Wilson L: Elements of morphology: standard terminology for the ear. *Am J Med Genet A* 2009, 149A:40-60.

doi:10.1186/1746-160X-8-2

Cite this article as: Kagurasho et al: Movement of the external ear in human embryo. *Head & Face Medicine* 2012 8:2.

## Objective assessment of abnormal gait in patients with rheumatoid arthritis using a smartphone

Minoru Yamada · Tomoki Aoyama · Shuhei Mori · Shu Nishiguchi · Kazuya Okamoto · Tatsuaki Ito · Shinyo Muto · Tatsuya Ishihara · Hiroyuki Yoshitomi · Hiromu Ito

Received: 2 August 2011 / Accepted: 10 December 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** A disturbance in gait pattern is a serious problem in patients with rheumatoid arthritis (RA). The aim of the present study was to examine the utility of the smartphone gait analysis application in patients with RA. The smartphone gait analysis application was used to assess 39 patients with RA (age  $65.9 \pm 10.0$  years, disease duration  $11.9 \pm 9.4$  years) and age-matched control individuals (mean age,  $69.1 \pm 5.8$  years). For all RA patients, the following data were obtained: disease activity score (DAS) 28, modified health assessment questionnaire (mHAQ), and assessment of walking ability. Patients walked 20 m at their preferred speed, and trunk acceleration was measured using a Smartphone. After signal processing, we calculated the following gait parameters for

each measurement terminal: peak frequency (PF), auto-correlation peak (AC), and coefficient of variance (CV) of the acceleration peak intervals. The gait parameters of RA and control groups were compared to examine the comparability of the 2 groups. Criterion-related validity was determined by evaluating the correlation between gait parameters and clinical parameters using Spearman's correlation coefficient. The RA group showed significantly lower scores for the walking speed, AC, and CV than the control group. There were no significant differences in PF. PF (gait cycle) was mildly associated with gait speed ( $P < 0.05$ ). AC (gait balance) was moderately associated with the DAS, mHAQ, gait ability, and gait speed ( $P < 0.05$ ). CV (gait variability) was moderately associated with the DAS, gait ability, and gait speed ( $P < 0.05$ ). This is the first study to examine the use of a smartphone device for gait pattern measurement. The results suggest that some gait parameters recorded using the smartphone represent an acceptable assessment tool for gait in patients with RA.

M. Yamada (✉) · T. Aoyama · S. Mori · S. Nishiguchi  
Human Health Sciences, Graduate School of Medicine,  
Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin,  
Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan  
e-mail: yamada@hs.med.kyoto-u.ac.jp

K. Okamoto  
Department of Medical Informatics, Kyoto University  
Hospital, Kyoto, Japan

T. Ito · S. Muto  
NTT Cyber Solutions Laboratories, Yokosuka, Japan

T. Ishihara  
Nippon Telegraph and Telephone East  
Corporation, Sapporo, Japan

H. Yoshitomi  
Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School  
of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

H. Ito  
Department for the Control of Rheumatic Diseases, Graduate  
School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

**Keywords** Smartphone · Gait analysis · Validity · Rheumatoid arthritis

### Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) affects approximately 1% of adults and has been recognised as one of the most critical rheumatological conditions in the developed world [1], largely because of the associated joint damage, decline in functional status, and premature mortality [2]. The disease process leads to chronic and progressive inflammation involving multiple joints as well as other organ systems, and RA is associated with substantial disability and

economic losses [3], and even reduces life expectancy [4]. Treatment comprises medication to control inflammation and multidisciplinary interventions to reduce symptoms and maximise self-management [5].

RA leads to functional disability and possible changes in normal gait pattern, a common but clinically serious problem that substantially affects quality of life in RA patients [6]. Previous studies have demonstrated that RA may lead to a decreased walking speed [7], shortened stride length, and increased double-stance period [8], indicative of a limitation in lower limb function. Because of day-to-day variations in inflammatory activity and gait pattern in RA patients, self-monitoring and self-management becomes very important for controlling abnormal gait.

Recently, wireless tri-axial accelerometers have become widely used for gait analysis, because they are easy to use, are inexpensive, and do not require a laboratory environment. Several authors have performed gait assessment using such accelerometers in a clinical setting, including in patients with stroke, patients with Parkinson's disease, and older adults [9–11]. More recently, LeMoyné et al. [12] performed gait analysis experiments using a Smartphone, which demonstrated a capacity to accurately quantify gait parameters with a sufficient level of consistency. Similarly, our previous research showed that the smartphone gait analysis application has the capacity to quantify gait parameters with a degree of accuracy that is comparable to that of tri-axial accelerometers [Nishiguchi et al. unpublished observation].

The simplicity and portability of the smartphone application permits gait self-assessment by concerned individuals in a non-clinical setting. The aim of the present study was to examine the utility of the smartphone gait analysis application in patients with RA.

## Methods

### Participants

This was a cross-sectional study performed between April 2011 and May 2011 in the rheumatology outpatient clinics of Kyoto University Hospital. A total of 39 RA patients (mean age,  $65.9 \pm 10.0$  years) participated. Patients with RA defined by the American College of Rheumatology 1987 criteria were included. The patients were assessed by an experienced rheumatologist. We excluded participants based on the following exclusion criteria: other musculoskeletal disorders, cognitive disorders, Parkinson's disease, stroke, or unable to walk unassisted over 15 m using current walking aids. Twenty older individuals (mean age,  $69.1 \pm 5.8$  years) also took part in this experiment as control participants. We obtained written informed consent

from each participant in accordance with the guidelines approved by the Kyoto University Graduate School of Medicine and the Declaration of Human Rights, Helsinki, 1975.

### RA evaluation

For all patients, the following data were obtained: disease activity score (DAS) 28, modified health assessment questionnaire (mHAQ), and assessment of walking ability.

The DAS includes 4 parameters: number of joints tender to touch (out of 28 joints), number of swollen joints (out of 28 joints), C-reactive protein level, and patient-assessed disease activity using a 100-mm visual analogue scale. The DAS is generally accepted as a reliable, valid, and responsive measure of disease activity in patients with RA [13].

The mHAQ is a self-reported measure of physical function. The mHAQ is a widely used and validated tool to quantify functional disability in RA [14]. The mHAQ disability index assesses 20 daily living activities, including dressing and grooming, rising, eating, walking, hygiene, reach, grip, and community activities. The mHAQ is expressed on a scale ranging from 0 to 3 (where 0 = no functional disability and 3 = severe functional disability).

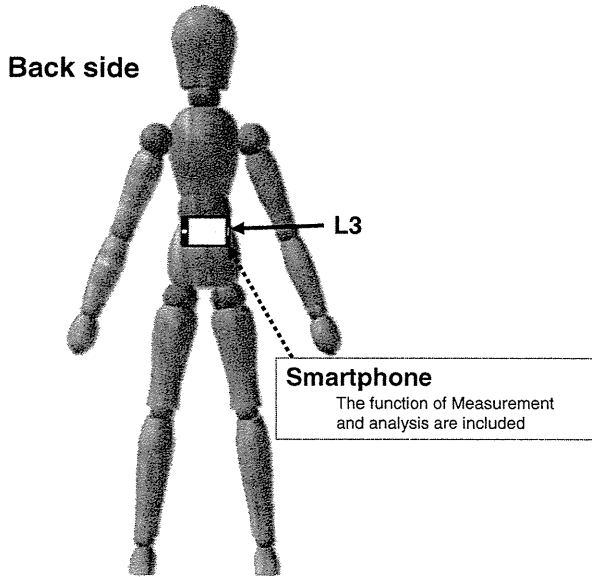
Assessment of walking ability was based on a subscale of the RA foot and ankle scale, which is expressed on a scale ranging from 0 to 20 (where 0 = unable to walk and 20 = no limitation) [15].

### Gait analysis system

The smartphone (size: 63-mm width, 119-mm height, 13.1-mm depth; weight: 139 g; Xperia SO-01B; Android 2.1; Sony Ericsson Mobile Communications Japan, Inc.) used in this study includes an acceleration sensor, a recording device, and a computer program for processing the acceleration signals. Trunk linear accelerations were measured using the smartphone while the subject walked on the walkway. The smartphone was attached to the L3 spinous process using a semi-elastic belt (Fig. 1). Before measurements, the accelerometer of the smartphone was calibrated statically against gravity. The accelerometer of the smartphone sampled at 33 Hz. The recorded signals were analysed by the application developed in the android environment.

### Gait analysis

The participants were instructed to walk on a 20-m walkway at their preferred speed. All participants wore their usual walking shoes, avoiding high heels and hard-soled shoes. The mid (10-m) walking time was measured using an electronic stopwatch.



**Fig. 1** Schematic representation of the use of the Smartphone, which was attached to the L3 spinous process, for gait assessment

Data processing

A period of steady state walking of 7.75 s was selected from the recording of each subject. This period contained about 256 acceleration measurements. We calculated the following gait parameters, according to previous studies: peak frequency (PF) [16], autocorrelation peak (AC) [16, 17], and coefficient of variance (CV) of the acceleration peak intervals [18, 19].

The PF value indicates the gait cycle, which is the time taken to take 1 step. The AC value indicates the degree of gait balance; the higher the AC value, the greater is the degree of balance. The CV value indicates the degree of gait variability, i.e., the variability in the elapsed time between the first contact of 2 consecutive footfalls. For calculating the gait parameters, we used the absolute values of the tri-axial acceleration data to decrease the influence of the measurement terminal posture. Let  $a_{t_1:t_n} = a_{t_1}, a_{t_2}, \dots, a_{t_n}$  denote the set of all acceleration absolute values acquired from time  $t_1$  to  $t_n$ , for  $t_1 \leq t_n$ . Let  $a_t$  and  $n$  denote, respectively, the acceleration absolute value at time  $t$  and the number of all acceleration absolute values acquired from time  $t_1$  to  $t_n$ .

PF  $f_p$  of acceleration data  $a_{t_1:t_n}$  was detected with high accuracy based on the PF candidate  $f'_p$ , which was detected from the smoothed acceleration data in order to decrease the influence of the high-frequency measurement noise that accompanies PF detection. First, acceleration data  $a_{t_1:t_n}$  was smoothed using a low-pass filter. Second, the PF candidate,  $f'_p$ , was detected where the power spectrum at frequency  $f'_p$

was the highest peak in the frequency space to which the smoothed acceleration data was converted by fast Fourier transformation. Finally, PF  $f_p$  was detected in the frequency space to which acceleration data  $a_{t_1:t_n}$  was converted, where the power spectrum of PF  $f_p$  had the highest peak around PF candidate  $f'_p$ . The test–retest reliability using the inter-trial correlation coefficient (ICC 1.1) was 0.906 [Nishiguchi et al. unpublished observation].

AC  $R_p$  from the autocorrelation function was detected using PF  $f_p$ . This allowed us to detect AC  $R_p$  with a high degree of accuracy, based on the hypothesis that the gait cycle is related to the time lag when AC is detected [17]. The AC detection method was as follows: first, the autocorrelation function was calculated from acceleration data  $a_{t_1:t_n}$ . The autocorrelation function is represented by the sequence of the autocorrelation coefficients  $R_{xx}(k)$  over increasing time lags  $k$ :

$$R_{xx}(k) = \frac{1}{n-k} \sum_{i=1}^{n-k} x_i x_{i+k} \tag{1}$$

Here, let  $x_t$  denote the normalised acceleration data, which are calculated by both the mean  $a_{MEAN}$  and standard deviation  $a_{SD}$  of acceleration data  $a_{t_1:t_n}$ ; that is,  $x(t) = a(t) - a_{MEAN}/a_{SD}$ . Let  $n$  denote the number of acceleration data samples in our gait analysis. Finally, AC  $R_p$  was detected as the highest peak around the lag related to gait cycle  $T$ . The test–retest reliability using the ICC 1.1 was 0.752 [Nishiguchi et al. unpublished observation].

Coefficient of variance was calculated by using the group of positive peak time candidates detected in the smoothed acceleration data; this decreases the influence of the high-frequency measurement noise that accompanies positive peak detection. Here, the positive peak indicates the acceleration data with a positive convex shape on the acceleration waveform. First, acceleration data  $a_{t_1:t_n}$  was smoothed using a low-pass filter. Second, each positive peak on the smoothed acceleration waveform was detected as a group of positive peak candidates. These measured times were extracted as a group of positive peak time candidates. Third, each positive peak of acceleration data  $a_{t_1:t_n}$  was detected where each peak was the highest around each positive peak time candidate on the acceleration waveform. The time intervals between the neighbouring positive peaks were then calculated. Finally, CV is calculated from the mean  $t_{MEAN}$  and standard deviation  $t_{SD}$  of time intervals, as follows:

$$\frac{t_{SD}}{t_{MEAN}} \tag{2}$$

The test–retest reliability using the ICC 1.1 was 0.752 [Nishiguchi et al. unpublished observation].



## Statistical analysis

Characteristics of RA and control groups were compared to examine the comparability of the 2 groups. Differences in the demographic variables and gait parameters between the 2 groups were analysed using the Student's *t* test or Chi-square test.

Criterion-related validity was determined by evaluating the correlation between gait parameters (PF, AC, and CV) and clinical parameters (DAS, mHAQ, walking ability, and walking speed) using Spearman's correlation coefficient in RA group. A multivariate analysis by means of multiple regression using a stepwise method was performed to investigate which of the gait parameters was independently associated with each clinical parameter in RA group. Data were entered and analysed using the SPSS program (Windows version 18.0, SPSS, Inc., Chicago, IL). A *P* value of <0.05 was considered statistically significant for all analyses.

## Results

Characteristics of the participants are reported in Table 1. Typical acceleration waveforms are shown in Fig. 2.

Participants in the RA and control groups were comparable and well matched with regard to their baseline characteristics. There were no significant differences in age, body weight, height, or gender (*P* > 0.05). The RA group showed significantly lower scores for the walking speed, AC, and CV than the control group. There were no significant differences in PF (Table 1).

To determine the association between gait parameters and clinical parameters, we analysed Spearman's correlation coefficients (Table 2). PF was correlated with walking speed (*r* = 0.280, *P* < 0.05). AC was correlated with the

DAS (*r* = -0.283, *P* < 0.05), mHAQ (*r* = -0.368, *P* < 0.05), and walking speed (*r* = -0.704, *P* < 0.01). CV was correlated with the DAS (*r* = 0.334, *P* < 0.05), walking ability (*r* = -0.420, *P* < 0.01), and walking speed (*r* = 0.608, *P* < 0.01). Walking speed was correlated with the mHAQ (*r* = -0.442, *P* < 0.01) and walking ability (*r* = 0.413, *P* < 0.01).

Stepwise regression analysis revealed that AC ( $\beta = -0.435$ , *P* < 0.05) was a significant and independent determinant of the DAS ( $R^2 = 0.189$ , *P* < 0.05). AC ( $\beta = -0.368$ , *P* < 0.05) was also a significant and independent determinant of the mHAQ ( $R^2 = 0.135$ , *P* < 0.05). CV ( $\beta = -0.420$ , *P* < 0.05) was a significant and independent determinant of the DAS ( $R^2 = 0.232$ , *P* < 0.01). PF ( $\beta = -0.575$ , *P* < 0.01) and AC ( $\beta = -0.410$ , *P* < 0.01) were significant and independent determinants of the DAS ( $R^2 = 0.647$ , *P* < 0.01) (Table 3).

## Discussion

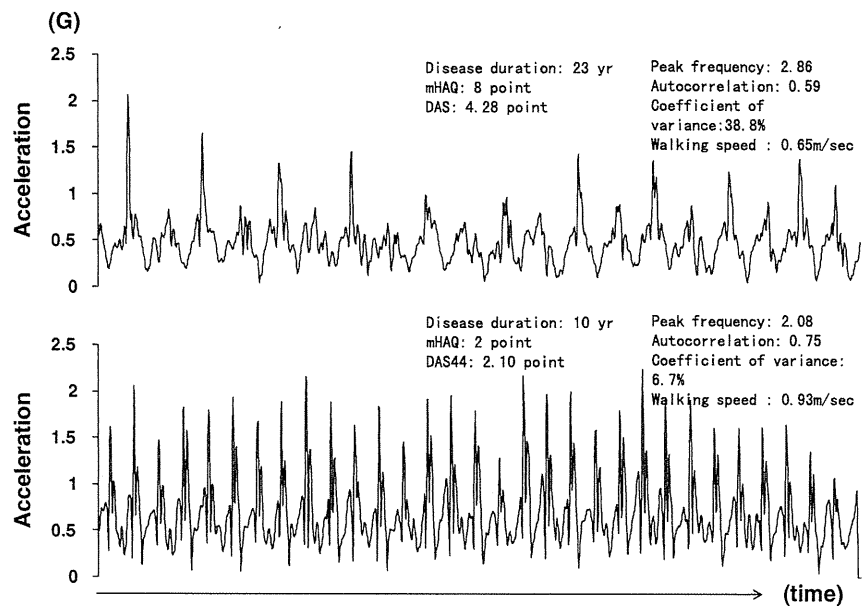
The results of the current study indicate that the RA group showed significantly lower scores for the gait parameters than the control group. Moreover, the clinical parameters were moderately associated with gait parameters recorded by a smartphone in patients with RA. We used the DAS, mHAQ, walking ability, and walking time as reference tools. The DAS index in RA patients reflects disease activity [13], and the mHAQ is often used for functional assessment in RA patients [14]. In this study, the DAS (disease activity) was associated with gait balance. The mHAQ (function) was also associated with gait balance. Further, walking ability was associated with gait variability, and walking speed was moderately associated with gait cycle and gait balance. Lelas et al. [20] found a mild correlation between kinematical measures of individual

**Table 1** Comparison of demographic characteristics and gait parameters between the groups

	RA group		Control group		<i>P</i> value
	Mean	SD	Mean	SD	
Age (years)	65.9	10.0	69.1	5.8	0.189
Height (cm)	154.3	7.3	154.6	7.5	0.775
Weight (kg)	53.5	9.5	54.4	9.5	0.807
Gender female ( <i>n</i> (%))	35 (89.7%)		15 (75.0%)		0.135
Disease duration (years)	11.9	9.4			
DAS (point)	3.2	1.4			
mHAQ (point)	3.1	3.7			
Walking ability	15.9	4.9			
Walking speed (m/s)	1.03	0.26	1.30	0.54	<0.001
Peak frequency	2.13	0.25	2.03	0.08	0.073
Autocorrelation	0.735	0.122	0.796	0.081	0.037
Coefficient of variance (%)	15.1	10.0	9.2	3.8	0.011

DAS disease activity score,  
mHAQ modified health  
assessment questionnaire

**Fig. 2** The waveform of a patient with relatively severe rheumatoid arthritis (*top panel*) is irregular (peak frequency [PF] = 2.86, autocorrelation peak [AC] = 0.59, coefficient of variance [CV] = 38.8%, walking speed = 0.65 m/s). On the other hand, the waveform of a patient with relatively slight disease (*bottom panel*) is regular (PF = 2.08, AC = 0.75, CV = 6.7%, walking speed = 0.93 m/s). *DAS* disease activity score, *mHAQ* modified health assessment questionnaire



**Table 2** Spearman’s correlation coefficients for gait parameters and clinical parameters

	DAS	mHAQ	Walking ability	Walking speed
Peak frequency	-0.193	0.075	-0.247	0.280*
Autocorrelation	-0.283*	-0.368*	0.257*	-0.704**
Coefficient of variance	0.334*	0.155	-0.420**	0.608**
Walking speed	0.194	-0.442**	0.413**	

*DAS* disease activity score, *mHAQ* modified health assessment questionnaire

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

joints and gait speed. Therefore, in systemic illnesses such as RA, it is possible that global waveform analysis is better than local waveform analysis for gait assessment. The results of the present study suggest that assessment of gait parameters using the smartphone is an acceptable method for evaluating gait in RA patients. Indeed, surprisingly, gait parameters measured by the smartphone were found to

constitute an index of disease activity and physical function in patients with RA.

Self-management is important not only for patients with RA, but also for patients with other chronic disorders [21, 22]. Pain, disability, fatigue, and self-related general health are improved by systematic self-management educational programmes [21, 22]. Fatigue, especially, is difficult to control by medication and benefits from self-management [23]. The greatest benefit is observed if self-management programmes are maintained for over 8 years [24]. Online self-management systems have been constructed [25], and self-assessed walking ability, such as that described here, may be a useful addition to self-management systems.

The smartphone gait analysis application may be used as a clinical assessment tool and may also potentially be used as a standard method of self-assessment in RA patients, due to several benefits. First, it requires a shorter time for gait assessment in a non-clinical setting compared with traditional assessment tools. Second, it can be used to assess gait patterns easily in daily life. Third, medical practitioners and patients may be able to share information

**Table 3** Multiple stepwise regression analysis for gait parameters and clinical parameters

Independent variables	DAS $R^2$ value = 0.189* Standard regression value	mHAQ $R^2$ value = 0.135* Standard regression value	Walking ability $R^2$ value = 0.232** Standard regression value	Walking speed $R^2$ value = 0.647** Standard regression value
Peak frequency				-0.575**
Autocorrelation	-0.435*	-0.368*		-0.410**
Coefficient of variance			-0.420**	

*DAS* disease activity score, *mHAQ* modified health assessment questionnaire

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

regarding the patient's condition in real time by using the mobile phone function of the Smartphone. In consequence, patients may receive timely advice from their medical practitioner.

This study had some limitations. First, although the gait parameters correlated significantly with several clinical parameters, the correlation coefficients of some clinical parameters were not high. Gait parameters were only moderately correlated with global clinical measurements. Therefore, correlation coefficients may be high only for clinical parameters that reflect the walking pattern. Second, we did not consider disease stage, class, or history, drug use, or surgical history in our analyses. Further study is required to examine whether these factors have an influence on gait parameters. Third, the current study was of a cross-sectional design. A prospective cohort study and interventional study should be conducted in the future to further evaluate the relationship between gait parameters and clinical parameters.

In conclusion, this is the first study to examine the use of a smartphone device for gait pattern measurement. The results suggest that some gait parameters detected using the smartphone represent an acceptable assessment tool for gait in patients with RA.

**Acknowledgments** We would like to thank all the volunteers for participating in the study. We would also like to acknowledge the students of the Department of Human Health Sciences at Kyoto University for assisting in the data collection.

**Conflict of interest** Tatsuaki Ito, Shinyo Muto, and Tatsuya Ishihara are employees of NTT Cyber Solutions Laboratories. All other authors have no conflicts of interest to declare.

## References

- Silman AJ (1994) Epidemiology of rheumatoid arthritis. *APMIS* 102(10):721–728
- Murphy D (1996) Lycra working splint for the rheumatoid arthritic hand with MCP ulnar deviation. *Aust J Rural Health* 4(4):217–220
- Farr JN, Going SB, Lohman TG, Rankin L et al (2008) Physical activity levels in patients with early knee osteoarthritis measured by accelerometry. *Arthritis Rheum* 59(9):1229–1236
- Myllykangas-Luosujärvi RA, Aho K, Isomäki HA (1995) Mortality in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 25(3):193–202
- Luqmani R, Hennell S, Estrach C et al (2006) British Society for Rheumatology and British Health Professionals in Rheumatology guideline for the management of rheumatoid arthritis (the first two years). *Rheumatology* 45:1167–1169
- Sakauchi M, Narushima K, Sone H et al (2001) Kinematic approach to gait analysis in patients with rheumatoid arthritis involving the knee joint. *Arthritis Rheum* 45(1):35–41
- Laroche D, Pozzo T, Ornetti P et al (2006) Effects of loss of metatarsophalangeal joint mobility on gait in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 45(4):435–440
- O'Connell PG, Lohmann Siegel K, Kepple TM (1998) Forefoot deformity, pain, and mobility in rheumatoid and nonarthritic subjects. *J Rheumatol* 25(9):1681–1686
- Bautmans I, Jansen B, Van Keymolen B et al (2011) Reliability and clinical correlates of 3D-accelerometry based gait analysis outcomes according to age and fall-risk. *Gait Posture* 33(3):366–372
- Mizuike C, Ohgi S, Morita S (2009) Analysis of stroke patient walking dynamics using a tri-axial accelerometer. *Gait Posture* 30(1):60–64
- Lowry KA, Smiley-Oyen AL, Carrel AJ et al (2009) Walking stability using harmonic ratios in Parkinson's disease. *Mov Disord* 24(2):261–267
- LeMoyné R, Mastroianni T, Cozza M et al (2010) Implementation of an iPhone as a wireless accelerometer for quantifying gait characteristics. In: Conference of the proceedings of IEEE Eng Med Biol Soc, pp 3847–3851
- Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH et al (1995) Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38(1):44–48
- Bruce B, Fries JF (2003) The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress, and documentation. *J Rheumatol* 30(1):167–178
- Niki H, Aoki H, Inokuchi S (2005) Development and reliability of a standard rating system for outcome measurement of foot and ankle disorders I: development of standard rating system. *J Orthop Sci* 10(5):457–465
- Auvinet B, Berrut G, Touzard C (2002) Reference data for normal subjects obtained with an accelerometer device. *Gait Posture* 16:124–134
- Moe-Nilssen R, Helbostad JL (2004) Estimation of gait cycle characteristics by trunk accelerometry. *J Biomech* 37:121–126
- Hausdorff JM, Rios DA, Edelberg HK (2001) Gait variability and fall risk in community-living older adults: a 1-year prospective study. *Arch Phys Med Rehabil* 82:1050–1056
- Beauchet O, Allali G, Annweiler C et al (2009) Gait variability among healthy adults: low and high stride-to-stride variability are both a reflection of gait stability. *J Gerontol* 55:702–706
- Lelas JL, Merriman GJ, Riley PO (2003) Predicting peak kinematic and kinetic parameters from gait speed. *Gait Posture* 17(2):106–112
- Barlow JH, Turner AP, Wright CC (2000) A randomized controlled study of the Arthritis Self-Management Programme in the UK. *Health Educ Res* 15(6):665–680
- Foster G, Taylor SJ, Eldridge SE et al (2007) Self-management education programmes by lay leaders for people with chronic conditions. *Cochrane Database Syst Rev* 17(4):CD005108
- Hewlett S, Ambler N, Almeida C et al (2011) Self-management of fatigue in rheumatoid arthritis: a randomised controlled trial of group cognitive-behavioural therapy. *Ann Rheum Dis* 70(6):1060–1067
- Barlow J, Turner A, Swaby L (2009) An 8-yr follow-up of arthritis self-management programme participants. *Rheumatology* 48(2):128–133
- Smarr KL, Musser DR, Shigaki CL et al (2011) Online self-management in rheumatoid arthritis: a patient-centered model application. *Telemed J E Health* 17(2):104–110

## 治療法の進歩

## 支持療法

## —輸血・成分輸血, Epo, G-CSFなど—

八尾尚幸 芦原英司 前川 平

Supportive therapies including blood transfusion and growth factors

Hisayuki Yao, Eishi Ashihara, Taira Maekawa

Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Kyoto University Hospital

## Abstract

Bone marrow suppression after intensive chemotherapies in patients with myeloid leukemia is severe, resulting in the reduction of the number of white blood cells, red blood cells, and platelets. Supportive therapies are indispensable for the management of these leukemia patients. The improvement of blood cell transfusion can decrease side effects of chemotherapies and establish the safety. But we still have notable side effects of transfusion such as TRALI(transfusion-related acute lung injury), platelet immunologic refractory state, and so on. Cytokine therapy especially with G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor) administration, changed the treatment of myeloid leukemia. G-CSF can shorten the duration of neutropenia and decrease the risk of infection. Recently the effects of Epo(erythropoietin) on chemotherapy-induced anemia have been demonstrated. We discuss here the indications of blood cell transfusion and cytokine therapies in the treatment for myeloid leukemia.

**Key words:** blood cell transfusion, TRALI, G-CSF, Epo

## はじめに

近年、骨髄移植をはじめとする造血幹細胞移植や化学療法の進歩により、骨髄性白血病の治療成績は大きく向上してきた。感染性抗原の高精度検出法の進歩や、新しい抗生物質や抗真菌剤の開発も治療成績の向上に寄与していることはいうまでもない。加えて、補充療法としての血液製剤の品質や安全性が高まり、輸血に伴う副作用は激減し、こういった補助療法も治療成績の向上を側面から支えてきた。また、顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte colony-

stimulating factor: G-CSF)の投与により化学療法後の好中球減少期間が短縮され、感染リスクが減少した<sup>1)</sup>。またG-CSFや顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: GM-CSF)などのサイトカインは造血幹細胞の末梢血への動員をもたらすことが明らかにされ、自家および同種末梢血幹細胞移植が広く行われるようになった。

本稿では支持療法を行うにあたっての適応や基準(ガイドライン)、また支持療法に伴う副作用などについて述べる。

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部

## 1. 輸血療法

### a. 赤血球輸血

濃厚赤血球の輸血はヘモグロビン(Hb)値7 g/dLを維持することが一つの目安とされているが、貧血の進行度、患者個人の症状、合併症の有無などにより異なり、原則的に貧血による症状がなければHb値7g/dL未満でも輸血は必要ではない。しかし、循環器疾患や呼吸器疾患を合併する場合には患者の臨床症状を勘案しながら、Hb値を少し高めに保つために輸血を行うことがある。濃厚赤血球製剤の輸血によるHb増加量は、投与Hb量(g)/循環血液量(dL) (循環血液量(dL) = 体重(kg) × 70 mL/kg/100) で算出され、例えば、濃厚赤血球2単位(400mL)を輸血すると、体重50kgの患者では理論的にはHbが約1.5g/dL上昇する。

### b. 血小板輸血

血小板は半減期が短いため化学療法後、造血機能が回復するまで血小板輸血をする必要がある。特に造血幹細胞移植後は骨髓が再構築するまで長期間を要するため、長期間の血小板輸血が行われる。欧米では出血傾向がない場合の血小板投与のトリガー値は1万/ $\mu$ Lとされており、Gmürらが1991年に出した論文<sup>2)</sup>とそれに続いて行われた報告<sup>3)</sup>がその根拠となっている。1万/ $\mu$ L以上2万/ $\mu$ L以下では紫斑や皮下出血などの軽微な出血症状は認めるものの、脳出血などの重症な出血はきたさないことが示されている<sup>3)</sup>。このため血小板数1万/ $\mu$ L以上あれば、致死的な出血のリスクは低く、安全性が保たれていると判断されることから、血小板数が1-2万/ $\mu$ Lを維持するように濃厚血小板を輸血する。2001年に発表されたAmerican Society of Clinical Oncology(ASCO)の血小板輸血に関するガイドラインでも、急性白血病における血小板投与のトリガー値は最低1万/ $\mu$ Lとされており、造血幹細胞移植においても同様であるとしている<sup>4)</sup>。造血機能が回復するまで定期的な血小板輸血が必要であるが、発熱や感染症が存在する場合には血小板の消費が亢進し、血小板輸血を行っているにもかかわらず十分な血小板数の増加が認

められないことがある。輸血した血小板の一部(約1/3)は脾臓に取り込まれてしまうため、脾腫がある場合にも同様である。また播種性血管内凝固(DIC)を合併し、急速な血小板減少と出血傾向を認める場合には新鮮凍結血漿(fresh frozen plasma: FFP)を投与するとともに、血小板輸血を行い血小板数5万/ $\mu$ L以上に保つ必要がある。ただし、凝固亢進したDICに関しては血小板輸血にて病態を更に悪化させる恐れがあるため、慎重な投与を必要とする。また、白血病治療中の患者が外科的処置を行わなくてはならない場合には、血小板数を確認する必要がある。通常、外科手術を安全に行うにあたり必要な血小板数は5万/ $\mu$ Lとされている。しかし、頭蓋内手術などの止血困難な術野の手術については7-10万/ $\mu$ Lに血小板数を維持しておく必要がある。通常、骨髓検査や骨髓生検では2万/ $\mu$ L以上あれば安全性は保たれると考えてよい。

### c. 新鮮凍結血漿(fresh frozen plasma: FFP)

FFPは出血に対して凝固因子や線溶因子の補充を目的として使用され、使用に際してはプロトロンビン時間(PT)や活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の延長を確認する。通常、肝障害、L-アスパラギナーゼ投与関連、および血管内播種性凝固症候群(DIC)など複合的な凝固因子の補充を主目的として投与する。FFPの予防的投与はPTのINR(international normalized ratio)が2.0以上(30%以下)で、かつ観血的処置を行う場合を除いて適応はない。観血的処置時の予防的投与の目安はPTがINR 2.0以上、APTTが各医療機関が定めている基準値の上限の2倍以上(25%以下)、フィブリノゲンが100 mg/dL以下になったときである。単なるタンパク質源としての栄養補給、創傷治癒のために投与はしてはならない。DICの場合にはPTとAPTTの延長に加えてフィブリノゲン値の低下(100mg/dL未満)も確認し、原疾患の治療と抗凝固療法に続いてFFPの投与を行う。

### d. 血漿分画成分

#### 1) アルブミン

循環血漿量を増加させる目的や治療抵抗性の

重度の浮腫を改善させる目的でアルブミン製剤の投与を行う。アルブミン製剤の投与により低タンパク血症による血漿膠質浸透圧低下を改善させることができるが、その効果は一過性のものであるため、基本的には慢性の病態による低アルブミン血症に対する適応はない。

## 2) ガンマグロブリン製剤

ガンマグロブリンはオプソニン化や補体活性化などの作用を有しており、化学療法後の骨髄抑制時期における重症感染症においては抗生剤単独投与よりもガンマグロブリン製剤と抗生剤の併用投与の方が高い治療効果があることが知られている<sup>5)</sup>。

### e. 輸血副作用

1990年代以前には輸血による感染症の発症が多く、特に輸血後肝炎が発症することは珍しくなかった。その後感染症の検査技術が格段に上がり、HCV抗体やHBc抗体などの抗体検査により、肝炎をはじめとする輸血後感染症の発症率も徐々に低下した。現在では1999年にHBV、HCV、HIVの核酸増幅検査(nucleic acid amplification test: NAT)が導入されウィンドウピリオドの短縮を可能にし、輸血後感染症の発症率を低下させた。血液型検査、不規則抗体検査、交差適合試験(クロスマッチ)などの検査が行われることで、溶血性輸血副作用がみられることは通常まれであり、報告される副作用の多くが非溶血性輸血副作用である。その内訳としてじんま疹や発熱などの輸血による軽い副作用や、重篤な副作用としてアナフィラキシー(様)反応、アナフィラキシー(様)ショック、呼吸困難、血圧低下などがある(図1)<sup>6)</sup>。それらの副作用の多くが輸血開始直後から3時間以内に集中してみられていることから、早期に副作用が発現することが多いといえる。しかし、後述する輸血関連急性肺障害(transfusion-related acute lung injury: TRALI)などは輸血後数時間経過してからみられることの多い副作用であり、輸血終了後も患者の状態を注意して観察する必要がある。

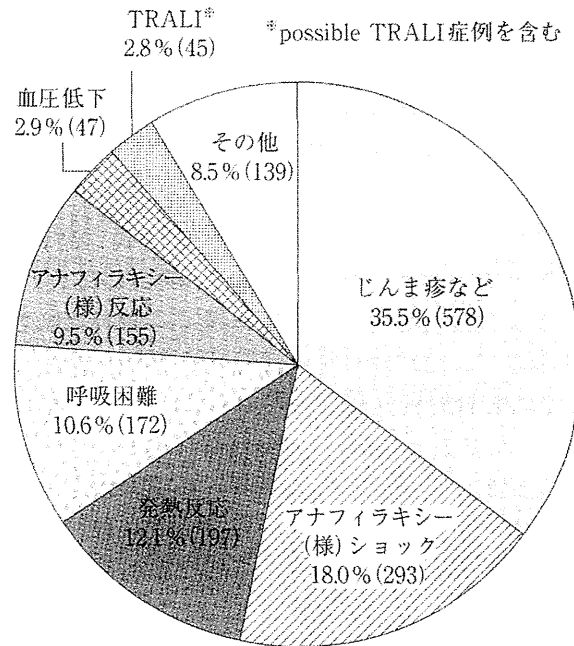


図1 非溶血性輸血副作用の内訳(文献<sup>6)</sup>より引用)

赤十字血液センターに報告された輸血による副作用のうち89.6%を非溶血性副作用が占めており、残り8.4%が感染の疑い、1.4%が溶血性副作用などである。ここでは輸血副作用の大半を占める非溶血性副作用の内訳をグラフで示す。

### 1) 輸血後移植片対宿主病(post-transfusion graft versus host disease: PT-GVHD)

輸血後移植片対宿主病(PT-GVHD)は供血者のリンパ球が受血者の組織を抗原とみなし活性化することで起こる輸血による重篤な副作用である。PT-GVHDを予防するために、輸血製剤には15-50 Gyの放射線を照射することが必要である。放射線照射を行わない場合、輸血の0.1-1.0%に発症する。放射線照射によりリンパ球による免疫反応が抑制され、照射済み血液製剤を輸血した場合、PT-GVHDは理論的には発症しない。我が国では血液製剤に放射線照射が義務づけられてから、PT-GVHDの発症はほとんどみられていない<sup>7)</sup>。しかし、2004年の厚生労働省の調査で、いまだに我が国の一部で未照射血が使用されている実態が明らかとなった。いったん発症すると致死率は99.9%であり、注意を喚起する必要がある。放射線照射を行うことで、赤血球中のカリウムイオンが細胞外に流出し、カリウムイオン濃度が上昇する。例えば、

15 Gy の放射線を照射した 400 mL 由来の濃厚赤血球 1 袋 (2 単位) に含まれる上清中の総カリウム濃度は、製造直後で平均 0.5 mEq、製造直後に照射して 1 週間保存したものでは平均 20.0 mEq となる。腎不全など血中のカリウムイオン濃度の上昇が好ましくない場合には、放射線照射直後の製剤を輸血するか、未熟児などに照射後保存したものを使用する場合は生理食塩液で洗浄する配慮が必要となる。

## 2) 輸血関連循環過負荷 (transfusion associated circulatory overload: TACO)

重症貧血を呈している患者や心機能が低下した患者に輸血を行った場合に、輸血により心負荷がかかり急性心不全を引き起こし、呼吸困難や肺水腫をきたすことがある。これは輸血関連循環過負荷 (TACO) と呼ばれる副作用で、特に心負荷の大きい赤血球輸血で見られる。心機能が低下した患者に輸血を行う場合には輸血速度を落とし、適宜利尿剤を使用する必要がある。

## 3) 輸血関連急性肺障害 (transfusion-related acute lung injury: TRALI)

TACO と臨床症状が酷似しているが、機序も治療も全く違う別の重篤な副作用に近年注目されている輸血関連急性肺障害 (TRALI) がある。輸血開始後数時間で急激な肺水腫と低酸素血症を呈する病態である (表 1)\*。TRALI 発症例の死亡率は 6-10% で、原因の一つとして抗白血球抗体 (抗 HLA 抗体や抗顆粒球抗体) が関与して引き起こされる免疫反応が指摘されている\*。TRALI を発症したケースでは血液製剤や患者血液から抗白血球抗体が検出される。TRALI は ARDS (急性呼吸窮迫症候群) や心不全による肺水腫などと病態が似ているため、誤った治療が行われることもまれではない。治療は酸素投与や人工呼吸器装着などの呼吸器管理に加えて、副腎皮質ステロイド剤の投与や血圧低下に対しては昇圧剤の投与が必要となることがある。循環血液量が過剰ではないため、利尿剤の投与は病態を悪化させる恐れがある。

## 4) 血小板輸血不応状態

DIC などの血小板の消費亢進を引き起こす病態が存在していないにもかかわらず、血小板輸

表 1 TRALI の診断基準 (文献\*より引用)

1. 急性の肺障害
  - a. 急性発症
  - b. 低酸素血症  
PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ≤ 300 mmHg または SpO<sub>2</sub> < 90% (room air) またはその他の低酸素血症の臨床症状を認める
  - c. 胸部単純レントゲン写真上で両側肺野の浸潤影を認める
  - d. 左房圧上昇 (循環過負荷) を認めない
2. 輸血以前に急性肺障害がない
3. 輸血中または輸血後 6 時間以内に発症
4. 時間的に関係のある輸血以外の急性肺障害の危険因子がない

血後に血小板数の増加が認められない場合には、免疫学的機序による血小板輸血不応状態を考慮しなくてはならない。度重なる血小板輸血により免疫学的機序による血小板輸血不応状態が引き起こされるケースがあり、その多くは血小板に存在する HLA 抗原に対して産生された抗 HLA 抗体の出現によるものである。抗 HLA 抗体による血小板輸血不応状態に対しては、患者の HLA 型と一致させた HLA 適合血小板を輸血するなどの対処法がなされるべきであるが、HLA 適合血小板は同一供血者に負担をかけるため、HLA 適合血小板を使用する場合には輸血 1 時間後と 24 時間後の補正血小板増加数 (corrected count increment: CCI) を算出し、HLA 適合血小板の有効性を評価すべきである。CCI (/ $\mu$ L) は血小板増加数 (/ $\mu$ L) × 体表面積 (m<sup>2</sup>) ÷ 輸血血小板総数 (× 10<sup>11</sup>) で求められ、輸血 1 時間後の CCI が 7,500/ $\mu$ L 未満または輸血 24 時間後の CCI が 4,500/ $\mu$ L 未満の場合には HLA 適合血小板が無効であると判断できる。HLA 適合血小板の輸血も無効である症例では血小板特異抗原であるヒト血小板抗原 (human platelet antigen: HPA) に対する抗 HPA 抗体の存在が疑われ、この場合には HLA と HPA を適合させた適合血小板の輸血を考慮する必要がある。

## 5) 鉄過剰症

赤血球製剤 2 単位には約 200 mg の鉄が含まれており、長期間赤血球製剤を輸血し続けることで、体内で鉄過剰状態となる。過剰鉄は肝臓、心臓、脾臓などに沈着しヘモクロマトーシスを

引き起こすことがある。長期間赤血球製剤の輸血を行う場合には鉄過剰症を引き起こさないよう定期的に血清フェリチンを測定し、血清フェリチン高値(血清フェリチン値1,000ng/mL以上)の場合には鉄キレート剤の投与を行う必要がある。最近、経口投与可能なキレート剤が発売されている。

#### f. 顆粒球輸血

G-CSFの投与が行われるようになり、化学療法後の好中球減少期間が短縮されたが、依然として好中球減少症における重症感染症はコントロールできておらず、顆粒球輸血について見直す必要がある。‘安全な顆粒球輸血を目指したガイドライン案の作成’によれば、高度の好中球減少症をきたした患者が難治性感染症に罹患し、G-CSFの投与により好中球減少症が改善せず、抗生物質投与による治療にも病状の改善がみられない場合に顆粒球輸血の適応があり、原則として回復可能な好中球減少症を対象とするとされている<sup>10)</sup>。分量の顆粒球を採取するためにドナーに対してG-CSFやステロイドを投与するなどの方法がとられることがあり、顆粒球の採取による負担が強いられるため、ドナーは患者の血縁者であることが望ましい。また成分採取装置を用いた顆粒球の分離で赤血球が混入し輸血後に起こる溶血反応が危惧されるため、ドナーの赤血球型はABO型が患者と一致しないし適合してはならない。輸血後GVHDを回避するという理由から輸血前に顆粒球製剤には放射線の照射を行う。

#### g. ドナーリンパ球輸注(donor leukocyte infusion: DLI)

同種骨髄移植後に白血病の再発または進行した患者に対して、移植片対白血病効果(graft-versus-leukemia effect: GVL効果)を期待し、造血幹細胞を提供したドナーから採取したリンパ球の輸注が行われる。特に慢性骨髄性白血病の慢性期の再発症例に対して有効であることが知られている。DLIでは副作用であるGVHDが大きな問題となるが、GVHDを発症する症例でDLIの効果が高いことが報告されている<sup>11)</sup>。GVHDの発症を最小限に抑え、GVL効果を得る

試みとして細胞数漸増法が行われている。輸注する細胞数が少なければGVHDの発症リスクは低いため、少ない細胞数からリンパ球輸注を開始しGVL効果が確認されるまで漸増させていく。

## 2. サイトカイン療法

### a. G-CSF

#### 1) 寛解導入療法や地固め療法での使用

化学療法後の好中球減少期間における感染症は、しばしば重症化し致死的である。好中球減少期間中の発熱性疾患は発熱性好中球減少症(febrile neutropenia: FN)と呼ばれ、38℃以上の発熱または1時間以上持続する37.5℃以上の発熱を認め、好中球数が500/ $\mu$ L未満の場合、または1,000/ $\mu$ L未満であっても500/ $\mu$ L未満に減少すると予想される場合をFNと定義している。G-CSFは化学療法後の好中球減少期間を短縮させ、FNによる病態悪化を軽減する目的で使用される。しかし骨髄性白血病細胞はG-CSF受容体を発現しており、G-CSF投与により残存する白血病細胞が増殖する恐れがあることから、化学療法終了後の好中球減少に対しては、発熱が認められなければG-CSFの投与は原則的には行わない。化学療法後、末梢血での芽球が消失し、骨髄でも芽球が減少した状態においてG-CSFの投与が保険適応となっている。また、静止期にある造血幹細胞はG-CSFにより細胞周期に入り造血を開始するが、この時に化学療法が行われると正常造血が著しく阻害されるため、原則として化学療法前後24時間はG-CSF投与は行わない。2006年、American Society of Clinical Oncology(ASCO)のG-CSF使用ガイドラインでは発熱を伴わない好中球減少(無熱性好中球減少症)に対してのG-CSFの投与は認めておらず<sup>12)</sup>。同様に日本癌治療学会によるG-CSF適正使用ガイドラインでも、発熱を伴わない好中球減少に対するG-CSFの一次的予防投与は推奨していない<sup>13)</sup>。例外として1クール目に好中球減少による重症の感染症がみられた場合にかぎり、2クール目以降の好中球減少に対して予防的にG-CSFの投与が認め



られる。

#### b. Epo (erythropoietin)

化学療法後の貧血 (chemotherapy-induced anemia: CIA) に対して Epo 製剤を投与することで貧血が改善することが報告されており<sup>14,15)</sup>、米国臨床腫瘍学会 (ASCO) と米国血液学会議 (ASH) の共同ガイドラインでは Epo 製剤の投与は CIA 治療の一つであるとしている。我が国では CIA に対する Epo 製剤の使用は保険適応がないが、米国では Hb 10mg/dL 以下の CIA には治療薬として使用されている。しかし、Epo 製剤により静脈血栓塞栓症発症リスクが高まるとの報告があり<sup>16)</sup>、また腫瘍細胞の中には Epo 反応性に増殖するものもあり使用には注意を要する。

品質は格段に向上し、赤血球や血小板などの輸血製剤による副作用は減少しており、輸血製剤が適正使用されれば十分な安全性が保証されている。今後も輸血製剤の安全性の確立のために更なる改良が続けられることだろう。また、近年ドナーリンパ球輸注や顆粒球輸血など新たなソースの提供が始まり、それに加えてサイトカインを利用した治療も盛んに行われている。サイトカインを用いて特定の細胞を刺激する治療や、様々な細胞を分離し培養増幅したものを血液疾患の治療に応用する細胞治療が今後盛んに行われると予想され、それらの新しい支持療法が骨髄性白血病の治療成績を更に向上させていくと考えられる。

### おわりに

検査技術と精製技術の向上により輸血製剤の

### 文献

- 1) Ohno R, et al: Effect of granulocyte colony-stimulating factor after intensive therapy in relapsed or refractory acute leukemia. *N Engl J Med* 323: 871-877, 1990.
- 2) Gmür J, et al: Safety of stringent prophylactic platelet transfusion policy for patients with acute leukaemia. *Lancet* 338: 1223-1226, 1991.
- 3) Rebutta P, et al: The threshold for prophylactic platelet transfusions in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 337: 1870-1875, 1997.
- 4) Charles A, et al: Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 19: 1519-1538, 2001.
- 5) Alejandria MM, et al: Intravenous immunoglobulin for treating sepsis and septic shock. *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD001090, 2001.
- 6) 輸血情報 0807-114 (日本赤十字血液センター) [http://www.jrc.or.jp/mr/info\\_pdf/0807-114.pdf](http://www.jrc.or.jp/mr/info_pdf/0807-114.pdf)
- 7) Juji T, et al: Treatment of post transfusion graft-versus host disease. *Vox Sang* 78(Suppl 2): 277-279, 2000.
- 8) Kleinmann S, et al: Towards an understanding of transfusion-related acute lung injury: Statement of a consensus panel. *Transfusion* 44: 1774-1789, 2004.
- 9) Popovsky MA: Transfusion and lung injury. *Transfus Clin Biol* 8: 272-277, 2001.
- 10) 大坂顯通ほか: 安全な顆粒球輸血を目指したガイドライン案の作成. *日輸血会誌* 50: 739-745, 2004.
- 11) 骨髄移植推進財団医療員会: 日本骨髄バンクを介したドナーリンパ球輸注の成績. [http://www.jmdp.or.jp/documents/file/04\\_medical/iryuu\\_dli.pdf](http://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/iryuu_dli.pdf)
- 12) Smith TJ, et al: 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: An evidence-based clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 24: 3187-3205, 2006.
- 13) 日本癌治療学会: G-CSF 適正使用ガイドライン. *Int J Clin Oncol* 6(Suppl): 1-24, 2001.
- 14) Ross SD, et al: Clinical benefits and risks associated with epoetin and darbepoetin in patients with chemotherapy-induced anemia: A systematic review of the literature. *Clin Ther* 28: 801-831, 2006.
- 15) Bohlius J, et al: Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal

- disease. Results of a phase III multicenter clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 97: 489-498, 2005.
- 16) Leyland-Jones B, BEST Investigators and Study Group: Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* 4: 459-460, 2003.

## 大腿骨頭無腐性壊死症に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた臨床試験：細胞調製の安全性管理体制に関して

*Clinical trial of autologous mesenchymal stem cell transplantation for osteonecrosis of femoral head: Safety monitoring system during cell processing*

### Keywords

再生医療  
細胞調製  
大腿骨頭壊死  
間葉系幹細胞

青山 朋樹<sup>1)5)</sup> 笠井 泰成<sup>2)</sup> 上田 路子<sup>1)5)</sup>  
前川 平<sup>2)3)</sup> 中村 孝志<sup>4)</sup> 戸口田淳也<sup>5)</sup>

1) 京都大学大学院 医学研究科 人間健康科学系専攻

2) 京都大学医学部附属病院 分子細胞治療センター

3) 京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部

4) 京都大学大学院 医学研究科 感覚運動系外科学講座整形外科学

5) 京都大学再生医科学研究所 組織再生応用分野

### Summary

Since November 2007 we are performing clinical trials (phase I - II) of autologous mesenchymal stem cells transplantation for osteonecrosis of femoral heads and lunates. Here we describe the preliminary results of trials, focusing on our system to monitor the effectiveness and safety of cell processing.

### はじめに

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell : MSC) は比較的調製が容易なこと、*in vitro*の実験でさまざまな細胞に分化する能力が証明されていることなどから、最も早く臨床応用が進められている組織幹細胞の1つである。我々はヒト間葉系幹細胞を用いた細胞生物学的実験、動物モデルを用いた前臨床試験、そして細胞調製施設 (Cell Processing Center : CPC) における臨床用細胞調製実験を経て、自己骨髄間質細胞由来の間葉系幹細胞を用いた臨床試験 (第 I - II 相試験) を実践している。実施している臨床試験名は「大腿骨頭無腐性壊死患者に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討」「月状骨無腐性壊死患者に対する自己骨髄間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の検討」であり、大腿骨頭無腐性壊死症および月状骨無腐性壊死症のい

Aoyama, Tomoki<sup>1)5)</sup> / Kasai, Yasunari<sup>2)</sup> / Ueda, Michiko<sup>1)5)</sup> / Maekawa, Taira<sup>2)3)</sup> / Nakamura, Takashi<sup>5)</sup> / Toguchida, Junya<sup>5)</sup>

1) Human Health Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University

2) Center for Cell and Molecular Therapy, Kyoto University Hospital

3) Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Kyoto University Hospital

4) Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

5) Department of Tissue Regeneration, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

E-mail : togjun@frontier.kyoto-u.ac.jp

いずれも病期が画像診断分類上ステージ3とこれまでに有効な治療方法が確立されていない病期を対象にしている。この難治性骨壊死疾患を対象にした臨床試験計画を、2006年9月1日から施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」を遵守して構築した。京都大学大学院医学研究科・医学部および医学部附属病院医の倫理委員会承認を受け、厚生科学審議会での審査を経て、国内初の「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に沿った臨床試験として京都大学医学部附属病院において2007年11月8日より実施している。本稿では先行している「大腿骨頭無腐性壊死症」の症例10例（予定症例数：10例）の移植手術後1年の中間解析結果をもとに、細胞調製の安全性に関わる試験経過を述べる。

### 臨床試験の概要 (図1)

試験登録後、細胞培養用の血清調製のために全血採血(400mL)を1週間以上の間隔をおいて2回実施する。次に附属病院デイ・サージェリー診療部(DSU)において腸骨より骨髓液を100mL採取し、附属病院内の細胞調製施設である分子細胞治療センター(Center for Cell and Molecular Therapy: CCMT)に搬送し、骨髓液から間葉系幹細胞を分離し、自己血清を用いて1~2週間の体外培養を行う。このCCMT内で間葉系幹細胞を目的の細胞数まで増殖し、一旦凍結する。手術日を確定させ、手術日より4日前に再

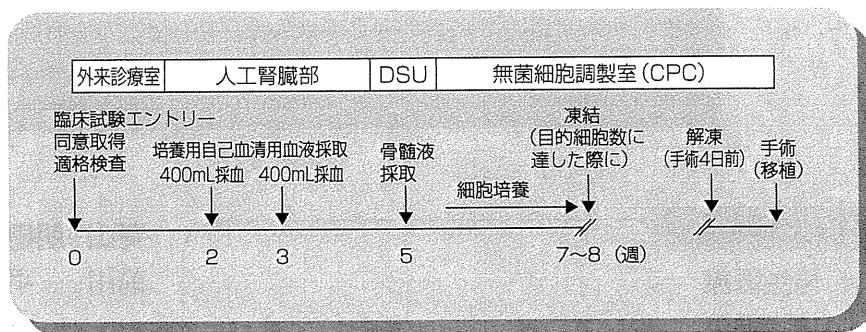


図1 臨床試験のスケジュール概要

度凍結して移植に向けて調製する(図1)。本臨床試験では手術と間葉系幹細胞の移植が同時に行われるため、手術当日に移植細胞の品質の最終確認を行い、出荷判定の後に移植を実施する。大腿骨頭内の骨壊死部を搔爬した後に人工骨(beta-tricalcium phosphate)と間葉系幹細胞を移植し、さらに腸骨よりの血管柄付骨移植を併用し、血行を再建する。

本臨床試験における細胞調製工程では製造管理責任者と品質管理責任者を個別におき、それぞれで細胞の品質評価を細胞調製の各段階で実施し、最後に品質管理責任者が出荷の可否を決定する。

### 細胞調製工程

はじめに製造管理の視点から細胞調製の工程を解説する。

#### 1. 血清の調製

細胞培養に使用する自己血清の調製を2回行う。採血当日ヘモグロビン

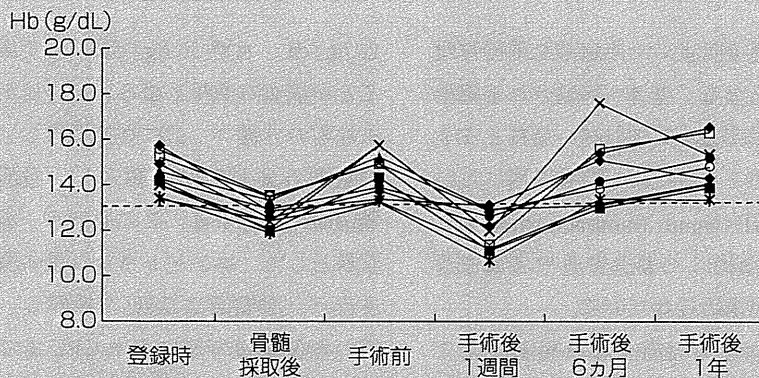
(Hemoglobin: Hb)濃度を測定し、基準値内であることを確認後、肘静脈より400mLの採血を行う。採取した血液はCCMT内にて23℃で約18時間振盪して十分に凝固させる。大型遠心分離機で採血バッグのまま3,600回転、20℃、6分間遠心分離を行う。上清を回収し、再び3,000回転、20℃、10分間遠心分離を行う。血清を採取分注後、-30℃で保存する。計2回の血清分離で採取できた血清は386.9±13.6mLであり細胞培養で使用するのに十分な量であった(表1)。1回目より2回目の採取量が多い理由は、血色素量の低下を反映しているものと考えられる(図2)。

#### 2. 骨髓液および細胞の調製

DSUにおいて全身麻酔下に腸骨より骨髓液を100mL採取しCCMT内へ搬送後、細胞調製室で間葉系幹細胞の分離を行う。我々はFicollに代表される蔗糖密度勾配遠心媒体を用いずにCateronらが報告した簡便な間葉系幹細胞分離法<sup>1)</sup>を若干改変して行って

症例	血清採取量 (mL)		
	1回目	2回目	Total
A	180	203	383
B	187	200	387
C	175	192	367
D	192	203	395
E	195	200	395
F	193	220	413
G	190	201	391
H	192	200	392
I	191	182	373
J	177	196	373
平均	187.2 ± 7.2	199.7 ± 9.6	386.9 ± 13.6

表1 調製した自己血清量



点線は基準値を示す。

図2 Hb 値の推移

いる。はじめに骨髄液に等量の培地を加え、250g、20℃、5分間遠心分離を行う。最上層の脂肪成分を除去し、上清および血球成分との境界面にあるbuffy coatを回収する。この操作を2回繰り返し、間葉系幹細胞を含

む有核細胞懸濁液とする。採取できた有核細胞数は $0.98 \sim 2.31 \times 10^9$  ( $1.79 \pm 0.51 \times 10^9$ )と個体差が大きかった(表2)。培養皿に $1.35 \times 10^5/\text{cm}^2$ 以上の濃度で播種し10%自己血清を含むglutamax添加 $\alpha$ MEM培地(Invitrogen社)

を用いて培養を行う。同時に細胞数計測用にグリッド入り60mm培養皿に同濃度で播種し同様な培養を行う。経時的に細胞数計測用培養皿の細胞数を計測することで、本培養の細胞数を概算し、目的の細胞数に達したと判断した後、動物由来およびヒト由来原料不含の細胞解離剤TrypLE Select (Invitrogen社)を使用して、細胞を剥離・回収し、細胞凍結保護液(アルブミン加CP-1, 極東製薬)を用いてプログラムフリーザーで凍結する。凍結までの培養に要した日数は $9.6 \pm 2.3$ 日であったが、1例のみ16日間要した症例があった(表2; 症例C)。しかし、解凍後の増殖は他の症例との違いはなかった。

手術4日前に大腿骨頭内の骨壊死部の体積に応じた細胞数を解凍する。解凍時の生存率は $93.6 \pm 3.7\%$ と良好であった(表2)。手術当日にTrypLE Selectで剥離・回収後、適量の自己血清に懸濁した状態で手術室に搬送する。

## 品質管理工程

次に品質管理の視点から細胞調製について解説を行う。

### 1. 細胞培養工程における品質管理

一般的に無菌医薬品を製造するためには、最終滅菌法あるいは無菌操作法が用いられるが、患者に移植される組織や細胞の培養工程では加熱滅菌やフィルターでの濾過滅菌は行うことが



症例	骨髄液 100mL 当りの有核細胞 数( $\times 10^6$ )	培養日数 (日)	凍結時総細胞数 $\times 10^7$	凍結日数 (日)	解凍細胞数 $\times 10^7$	解凍時生存率 %	出荷時総細胞数 $\times 10^7$	出荷時生存率 %
A	2.28	8	11.94	18	10.00	92.6	22.19	92
B	1.54	9	6.38	24	5.00	89.5	6.66	97.3
C	0.95	16	6.56	17	5.00	97.2	11.10	96
D	1.47	9	14.38	17	6.00	87.7	9.18	99.5
E	2.31	9	14.00	32	7.50	95.5	13.20	98
F	2.06	10	6.75	9	5.00	97.1	16.00	96
G	1.08	9	7.00	10	5.00	96.5	12.30	97.6
H	2.25	9	9.88	18	5.00	93	9.45	98
I	2.18	9	16.13	31	8.00	97.3	16.00	100
J	1.77	8	16.56	18	5.00	89.2	15.45	97
平均	$1.79 \pm 0.51$	$9.6 \pm 2.3$	$10.96 \pm 4.15$	$19.4 \pm 7.66$	$6.15 \pm 1.76$	$93.6 \pm 3.7$	$13.15 \pm 4.47$	$97.1 \pm 2.2$

表2 調製細胞数

できない。また、薬剤による消毒だけでは十分な効果が期待できず、移植の際に薬剤の残留も問題となる。したがって、患者に移植する細胞や組織の無菌性を保つためには、徹底した無菌操作法で培養工程を実施する必要がある。また、無菌性を検証する方法として無菌試験があるが、製造物の一部分を抜き取って検査を行うため、無菌性の保証については限界がある。移植される細胞や組織の品質をより高いレベルで保証し安全性を担保するには、培養工程を終えた最終段階の細胞だけを対象にして行う品質検査だけでは不十分であり、原料となる細胞などの受け入れの際や、培養中の細胞についても、必要な品質検査を繰り返し実施する必要がある。さらに、培養工程が行われるCPCの内部環境については、培養

細胞の感染防止のため厳重な維持管理が必須となる。患者へ移植される細胞には、医薬品と同等の高い品質と安全性が求められるため、培養工程においてはGMP (Good Manufacturing Practice) に準拠した製造管理や品質管理の実施が求められている。

大学などで実施される臨床研究では、主に治験薬GMP<sup>2)3)</sup>などに準拠した運用基準や施設基準が求められているが、厚生労働省の承認を得て市場に出る際には薬事法によって運用が規制されることになる。

本臨床試験においては、患者自身の血清や骨髄液を原材料として用いている。血液の採取は人工腎臓部で行われ、通常の自己血貯血の採取と同じ手順で1回に全血400mLの採取を行う。この際に採血直前の血中Hb値が男性

11.0g/dL、女性10.0g/dL以上であることが採血の条件となる。血液はテルモ社製の分離バッグに直接採取し、無菌状態のままCPCへ搬送し、血清を無菌的に分離する。この血清の一部を試料として、エンドトキシン量の測定を行う。骨髄液はDSUで採取し、専用の無菌搬送容器に入れCPCまで無菌的に搬送し、血清添加培地を用いて培養を行い、培地交換作業後に回収された培養液について、エンドトキシン量の測定および無菌試験を実施する(表3)。

## 2. 出荷判定

CPCで培養された間葉系幹細胞の出荷判定項目と、その判定基準は下記の通りである。出荷判定は製造管理責任者と品質管理責任者で行い、最終的

検査項目	実施時期(対象)						
	患者血清 1	患者血清 2	骨髄液	培地交換時	細胞凍結時	細胞解凍時	出荷時
細胞数測定			○		○		○
エンドトキシン	○	○		○	○	○	○
一般細菌				○	○	▼	▼
真菌				○	○	▼	▼
マイコプラズマ				○	○	▼	▼
グラム染色							○

▼：検査結果の判定は出荷後となる

表3 品質管理項目と実施時期(対象)

に品質管理責任者が出荷許可を行う。

- 生細胞数： $5 \times 10^7$ 個以上
- エンドトキシン量： $< 0.0078$  EU/mL
- グラム染色：陰性

また、出荷時には最終の培養液の一部を試料として無菌試験(一般細菌、真菌、マイコプラズマなど)を行う。しかし、無菌試験は培養を伴う検査であるため、試験の結果判定は細胞を患者へ移植した後になる。したがって、出荷時の無菌試験は出荷判定項目に含まれていないが、原材料の受入時や細胞培養中にサンプリングした試料を使って行われた無菌試験の結果が、出荷までに得られているものについては、それらのデータも考慮し出荷の可否を決定する。移植後、出荷時の無菌試験の結果で異常が認められた場合には、速やかに患者に対して処置を行う必要がある。

表3に品質管理の検査項目とその実施時期(対象)を示す。2008年2月22日から2009年6月19日までに出荷さ

れた10例の培養細胞については、すべての品質検査において判定基準を満たしており、いずれも移植に十分な高い品質と安全性が確認された。

また幹細胞において懸念される癌化に対して、免疫不全マウスへの皮下移植、染色体検査、p16遺伝子のメチル化否定試験<sup>4)</sup>を実施した。いずれも腫瘍形成、染色体異常(1例を除く。詳細後述)、メチル化異常は認めず、癌化を疑うことはない結果であったが、これらの検査は、いずれも移植が終了してからしか結果が明らかにならないことから、特異度、感度を含め、迅速な検査法の開発が必要であると考えられた。

### 臨床試験で生じた有害事象

我々は臨床試験の工程で生じた有害事象を軽微なものに至るまですべて京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部に報告し、データ管理を行

い、重篤な有害事象については独立モニタリング委員会に報告し、勧告を得ている。

血液検査所見で高頻度に認められた有害事象はHb値低下、ヘマトクリット(Hematocrit：Ht)値低下、C反応蛋白(C-reactive protein：CRP)値上昇、白血球数上昇、クレアチンキナーゼ(creatin kinase：CK)値上昇である。HbおよびHt値の低下は培養用血清調製のための血液採取、骨髄液採取、および手術時の出血によるものであり、CRP、白血球、CKの上昇は手術侵襲によるものと考えられた。HbおよびHt値の推移を図2および図3に示した。2回の採血(合計800mL)および骨髄液採取(100mL)後に生じたHb値、Ht値の低下は手術前には回復しており、手術準備に支障はなかった(図2、図3)。また手術中あるいは手術後に生じた出血によるHb値およびHt値の低下は1例(図2■印)を除いて移植手術後6ヵ月で基準値まで回復

し、この1例においても移植手術後1年で回復していた(図2, 図3)。

また発熱などのバイタルサインの変化、自覚症状としての創部痛、創周辺のしびれは手術侵襲によるものであり、便秘、腰痛、創周辺のかゆみは手術後安静によるもので手術後早期に改善している。

3例において特異的な有害事象が発生した。

1例目は骨髄液中の細胞に染色体異常が検出された症例である。この症例は本臨床試験の10年前に慢性骨髄性白血病のため骨髄移植を受けており、血液内科専門医を受診し精査の結果、白血病の再発などを疑う所見は認められず、白血病治療の際の骨髄移植前後に生じた染色体異常である可能性が示唆された。したがって、この染色体異常は細胞調製により生じたものではないと判断した。独立モニタリング委員会からは染色体検査結果が移植後の後追いであることから迅速な検査が必要であること、既往歴として化学療法を受けており染色体異常を有する可能性のある患者を試験対象から除外することなどが勧告された。

2例目は移植手術後1年で対側の膝関節に疼痛が発生し、精査の結果、円板状半月板の断裂と診断された症例である。入院および手術(半月板縫合術)を伴う有害事象であったことから、重篤な有害事象(serious adverse event: SAE)として報告したが、円板状半月板は先天的、発育的に生じる半月板の一形態であり、半月板障害になる危険

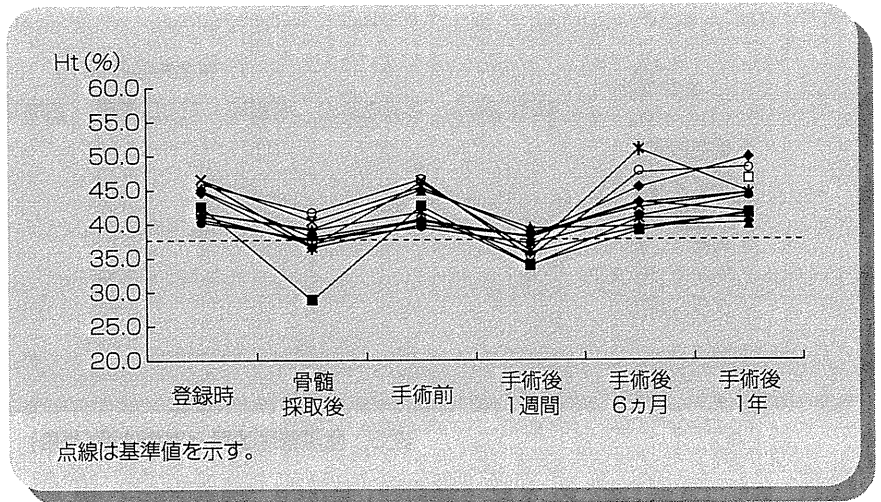


図3 Ht値の推移

率が高いこと(オッズ比4.938)、移植手術との因果関係(移植した間葉系幹細胞が体循環を経て反対側の膝関節に蓄積し、半月板障害を引き起こしたなど)は想定しにくいことより、細胞調製、細胞移植と関連性の低い有害事象と判断した。本症例は独立モニタリング委員会からは手術後の免荷の半月板障害に対する影響を検討すること、移植手術前に円板状半月板を有する患者を今後研究対象から除くことが勧告された。

3例目の有害事象は移植手術6ヵ月後に大幅な体重減少(-14.1kg)を生じた症例である。この症例は残業時間超過などの職場環境変化による原因が明らかであることと血液検査などの異常が認められないことを第三者であるクリニカルコーディネーターおよび探索医療センター検証部と確認を行い、本臨床試験との因果関係はないと判断

した。

以上のことから細胞調製との因果関係のある重篤な有害事象は発生せず、細胞調製を安全に遂行できたと考えている。

## おわりに

臨床試験を遂行するにあたって、我々は以下の項目を、段階を追って確認することが必要であると考えている。

- ①臨床試験に用いられる新規の手法や工程自体の安全性の確認
- ②新規の手法、工程を用いることによる臨床試験全体の有効性と安全性の確認
- ③臨床試験の成績の、従来の治療法に対する優位性の確認

本稿では臨床試験「大腿骨頭無腐性壊死患者に対する自己骨髄間葉系幹細