

200718052A

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

高齢者の切迫性尿失禁に対する
膀胱壁内A型ボツリヌス毒素注入療法の
多施設臨床試験と
腹圧性尿失禁に対する新規治療法の開発
(H19-長寿-一般-001)

平成 19 年度

総括・分担研究報告書

平成 20(2008)年 3 月

主任研究者 岡村 菊夫

国立長寿医療センター

目 次

I. 総括研究報告

高齢者の切迫性尿失禁に対する膀胱壁内 A 型ボツリヌス毒素注入療法の
多施設臨床試験と腹圧性尿失禁に対する新規治療法の開発

岡村 菊夫..... 1

II. 分担研究報告

1. 高齢者腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療： 高齢者切迫性尿失禁に対する
A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の多施設臨床試験

岡村 菊夫..... 8

【資料】 プロトコール

1) 神経因性排尿筋過活動に対する A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の検討
2) 非神経因性排尿筋過活動に対する A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の検討

2. 脂肪組織由来幹細胞移植ならびに内因性筋幹細胞増殖因子・薬剤の局所注入療法の
安全性検討

後藤 百万.....57

3. 高齢者腹圧性尿失禁に対する新規治療法の開発：括約筋機能再生治療：
失禁モデル作成と細胞移植法の確立

山本 徳則..... 61

4. 高齢者腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療：培養・移植系の有効性・安全性
総合評価

松尾 清一..... 66

5. 高齢者腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療：脂肪細胞の培養と幹細胞化の安
全性に関する検討

丸山 彰一..... 70

6. 高齢者腹圧性尿失禁に対する新規治療法の開発：尿道括約筋機能再生医療の安全性
検討

橋本 有弘..... 74

7. 高齢者腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療：移植用筋細胞の品質管理システ
ムの開発と筋増殖・肥大因子のスクリーニング

上住（池本） 円..... 78

8. 高齢者腹圧性尿失禁に対する括約筋機能再生治療：移植用筋細胞の安全性検定系の
開発と筋増殖・肥大因子の有効性・安全性に関する検討

宋 時栄..... 81

III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 85

研究成果の刊行物・別刷

高齢者の切迫性尿失禁に対する膀胱壁内 A 型ボツリヌストキシン注入療法の多施設臨床試験と
腹圧性尿失禁に対する新規治療法の開発

主任研究者 岡村菊夫 国立長寿医療センター 手術・集中医療部長

研究要旨

高齢者の切迫性、腹圧性尿失禁に対する新規の治療法を開発することを目的とした。切迫性尿失禁に対しては、A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入療法の有効性を臨床試験として開始するためにプロトコールを作成し、国立長寿医療センターの倫理委員会の承認を得た。腹圧性尿失禁に対しては、骨格筋幹細胞と脂肪組織由来幹細胞を用いた再生医療の開発に取り組んだ。前者では、ヒトから採取した筋組織をもとに効率的に筋幹細胞を収集できるようになった。後者では、動物モデルを作成して注入の方法、治療効果の判定法を確立した。脂肪組織由来幹細胞の筋肉への分化は認められなかったが、尿道部での膨隆は作成でき、尿もれの抵抗となっていることがわかった。

分担研究者

後藤百万 名古屋大学大学院医学系研究科
橋本有弘 国立長寿医療センター研究所
山本徳則 名古屋大学医学部附属病院
池本 円 国立長寿医療センター研究所
宋 時栄 徳島文理大学香川校
神経科学研究所
丸山彰一 名古屋大学医学部附属病院
松尾清一 名古屋大学大学院医学系研究科

じ、女性に多く見られる。高齢男性においても前立腺肥大症、前立腺癌の手術後にならぬ頻度で発生することが知られている）に対しては、骨盤底筋体操、TVT (Tension-free Vaginal Tape 手術)手術があるが、前者は継続が難しく、後者は侵襲性・術後の尿排出障害の可能性を考慮すると高齢者には行いがたい治療法となっている。コラーゲン尿道内注入療法は侵襲性が低く、短期的には有効とされているが、コラーゲンがいずれ吸収されるため再発率は極めて高い。しかし、注入物質が吸収されることもなく、その場所で膨隆（漏れに対する抵抗）となり、その上に括約筋が再生できるような注入治療であれば、有効性は極めて高くなることが予想される。尿失禁を有する高齢者が今後ますます増加することを鑑みれば、高齢者に適した低侵襲治療の開発は急がねばならない課題である。

A. 研究目的

高齢者の尿失禁には、切迫性、腹圧性、溢流性、機能性の4つのタイプが存在し、いずれのタイプの尿失禁も高齢者の QOL を大いに障害するとされている。これまでの治療法に関しては、切迫尿失禁に対しては抗コリン薬内服が最も有効な治療法として行われているが、効果が不十分な症例も多い。また、認知症悪化、堪えがたい口内乾燥、便秘などの副作用があり、内服を継続できない高齢者も多い。腹圧性尿失禁（咳・くしゃみ、重いものを持ち上げた時など腹圧が加わった時に生

昨年度までの長寿総合研究で、切迫性尿失禁に対する A 型ボツリヌストキシンの膀胱壁内注入療法は有望であると考えられた。この新たな治療法が確立できれば、抗コリン薬

をもらうための通院が不要になるとともに (Polypharmacy に対する対策にもなる)、抗コリン薬が不適切な高齢者の治療が可能となる。本研究では、A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法が多施設共同臨床試験を行い、新規治療法として確立することをひとつの目的とする。

腹圧性尿失禁に対する将来性の高い治療法として、自己骨格筋幹細胞や脂肪組織由来幹細胞を用いた再生治療が考えられる。しかし、幹細胞移植は GMP に基づいた設備や管理体制が必要とされ、多くの患者がどこでも受けられる治療になるとは考えにくい。この研究では、自己骨格筋細胞・脂肪細胞を幹細胞化させ移植する治療法だけでなく、採取した自己骨格筋や脂肪組織を体外での培養なしに移植して生着させる治療法の可能性・安全性を検討すること、また、内在性の骨格筋細胞を増殖・肥大させるようなサイトカイン(骨格筋幹細胞、脂肪組織由来幹細胞から放出)や薬剤をスクリーニングして臨床応用が可能かどうか検討することをもうひとつの目的とする。

B. 研究方法

1) 切迫性尿失禁に対する A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法

この研究は、岡村が行った。今年度は、多施設共同研究を行うための組織作り、プロトコルの作成を行った。

(倫理面への配慮)

A 型ボツリヌス毒素を用いた臨床試験であるため、作成したプロトコルは国立長寿医療センター倫理委員会の承認を受けた後、各参加施設においても倫理委員会の承認を受けることとする。

2) 自己骨格筋幹細胞を用いた再生治療

橋本が中心的役割を担い、上住(旧姓:池

本)、宋、岡村がそれぞれの役割を分担した。橋本の研究目的は自己骨格筋細胞移植による再生治療開発のための細胞供給源の確保と内在性筋細胞の増殖・肥大による治療法を開発するためのスクリーニング系確立、池本の研究目的はセルソーターを用いた移植細胞の品質管理システム(移植に適した筋細胞を識別し、移植に適した細胞のみを生きのまま分離する方法)の確立、宋の研究目的は移植細胞の安全性検定系の確立である。岡村は、これらの研究に使用されるヒト筋細胞を前立腺癌のため前立腺全摘除術を行う患者から実験材料を得た。

(倫理面への配慮)

動物およびヒト材料を用いた実験に関しては、国立長寿医療センターの動物実験倫理委員会、倫理委員会の承認を得、規定にしたがって実施した。

3) 脂肪組織由来幹細胞を用いた再生治療

山本が中心的役割を担い、丸山、松尾、後藤がそれぞれの役割を果たした。山本の研究目的は、脂肪組織由来幹細胞を用いた再生治療の有効性を確認するための動物モデルの開発とラットへの移植方法を確立することである。後藤の研究目的はラット膀胱あるいは膀胱頸部への細胞あるいは薬剤注入技術の確立を主なものとした。丸山はラット膀胱頸部に移植した脂肪組織由来間葉系細胞の経時的観察を行い、松尾は移植する細胞の調整方法と安全性の評価を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、名古屋大学医学部動物実験施設における規程に準じて行った。

C. 研究結果

1) 切迫性尿失禁に対する A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入療法

研究協力者として、全国で 14 人の泌尿器科医が協力して頂けることになった。非神経因性過活動膀胱に対する A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入療法の臨床試験のプロトコール作成には、主任研究者と本間之夫（日本赤十字医療センター）、後藤百万（名古屋大学）が関わり、脊髄損傷患者の排尿筋過活動に関するプロトコール作成には、主任研究者と副主任研究者として木元康介（総合せき損センター）、仙石 淳（兵庫県立総合リハビリテーションセンター）が関わった。でき上がった 2 つのプロトコールは、分担研究報告書に掲載した。2 つのプロトコールを国立長寿医療センター倫理委員会に提出し、承認を受けた。

2) 自己骨格筋幹細胞を用いた再生治療

事前に同意を得た前立腺癌患者 9 人（59 歳～70 歳）の前立腺全摘出術時に腹直筋あるいは錐体筋を約 1g 摘出し、2 時間以内に実験に供した。培養開始時に 100 mm ディッシュ当たり 100 以下の細胞しか認められなかったが、およそ 3 週間の培養後には同心円状の細胞塊（コロニー）の形成が認められた。得られたコロニーは、細胞の長軸が最大でも核の 3-4 倍程度のコンパクトな細胞（compact cell）と細胞の長軸が核の 10 倍以上の大きく広がった細胞（spreading cell）の二つに大別された。ほとんどのコロニーは前者から形成され、後者のコロニーが形成されることは少なかった。さらに培養を継続すると、前者は細胞融合して筋管細胞を形成するのに対し、後者は著しい増殖低下を示し、順次培養面から剥離した。compact cell が筋細胞であり、低密度培養によって、筋細胞を選択的に増殖させることができることがわかった。臨床応用を考

える場合、動物由来の蛋白質（酵素）の使用はできるだけ避けるようにしなければならない。そこで、遺伝子組み替え酵素 TrypLE Express を用いたところ、より多くのコロニーが形成されることがわかった。上住の研究では、筋組織から得た細胞懸濁液からヘキスト 33342 陽性かつ CD56 陽性の細胞画分をソーティングし、採取細胞を培養したところ、培養 4 日後には筋芽細胞と思われる紡錘形の単核細胞が観察され、培養 12 日後にはウェル全体に増殖した紡錘形の細胞が認められた。これらの細胞は、免疫染色により MyoD 陽性の筋芽細胞であることが確認できた。宋の研究では、変異 GFP 遺伝子導入不死化ヒト筋前駆細胞を cardiotoxin 注射後のマウス前脛骨筋に移植した標本の病理組織学的検索を行った。GFP 蛍光陽性筋線維が散在性に認められ、移植した細胞は筋線維への分化を遂げたと判定され、移植先に於いて正常の分化能力を保持していることが示された。H-E 染色では、移植細胞の腫瘍化、移植部での著しい炎症反応、肉芽形成などの移植に伴う病変は認められず、不死化ヒト筋前駆細胞の移植については一定の安全性が確認された。

3) 脂肪組織由来幹細胞を用いた再生治療

後藤の研究では、GAX collagen を用いて、ラット膀胱壁に注入するには 27G 針を用いるのがもっとも適切であり、その注入方法を用いると注入後 70 日まで膀胱壁内の適正な位置にコラーゲンが残存していることがわかった。また、脂肪組織由来幹細胞を高血清培地、低血清培地で培養した場合、後者で培養した方が VEGF の分泌能が高いことがわかった。山本の研究では、F344 メスラットの脊髄を切断後に両側骨盤神経を切除して、尿失禁が生じるモデルを作成した。さらに、再生のためには何らかの組織障害が必要であることから、マウスで確立されているドライアイス

法を応用してラット凍傷モデル作成法を考案した。しかし、この凍傷モデルに脂肪組織由来幹細胞移植を行ったものの、F344 メスラット膀胱に注入では 14 日まで細胞は残存していたがそれ以後の生着は確認できなかった。拒絶反応の可能性を否定するためメスヌードラット膀胱への移植も行ったが、残念ながら生着は認められなかった。丸山は、生着性を高めるために移植時に FGF とゼラチンスポンジとともに移入する実験を行った。細胞は移植後 14 日、28 日まで生着していたが、その数は時間とともに減少していた。また、脂肪組織由来幹細胞の継代培養では徐々に細胞増殖速度は減少するが、腫瘍性増殖は認めないことがわかった。松尾の研究では、細胞移入のための細胞を調整する際に不純物が混じらないか確認するために、培養皿にコーティングされているファイブロネクチンの検出を試みたが、その可能性は認められなかった。細胞移入には、27G, 29G いずれの針を用いても細胞障害は認められなかった。また、F344 メスラットの皮下脂肪から脂肪細胞懸濁液を得て、これを継代培養した後、膀胱頸部に注入して生着を確認したところ、14 日目、28 日目に異常な細胞集塊は認めないことがわかった。尿失禁モデルを用いた移植後 14 日目の検討では尿失禁を生じさせるための膀胱内圧は細胞注入群で有意に高くなった（漏れにくくなった）。

D. 考察

1) 切迫性尿失禁に対する A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入療法

切迫性尿失禁に対する A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入療法に関しては、その成因から脊髄損傷による神経因性に切迫性・反射性尿失禁を生じるもの、原因を特定できない非神経因性の切迫性尿失禁を生じるものの 2 つの病態に対して、異なるプロトコルを

作成した。1月23日付けで、米国の消費者団体である Public Citizen が「FDA のデータベース上に Botox を用いた例で死亡症例がある」ことを報道した。私どもの文献的レビューではそのような報告はなかったので、この点に関して調査したところ、死亡原因は嚥下障害、誤えん性肺炎であったが、因果関係は明らかでなかった。本邦での他疾患において使用された 16,722 例において、因果関係不明の突然死が 1 例であることが判明したが、嚥下障害の可能性は極めて低いことが判明した。また、混合診療に関しても指摘があり、入院費に関しては研究費から支払う方向で検討している。すでに、国立長寿医療センターの倫理委員会は通ってしまっているが、これらの点についてプロトコル、説明文書の一部訂正を行うこととした。

2) 自己骨格筋幹細胞を用いた再生治療

橋本の研究では、対象が高齢者であっても、ヒトから採取した筋組織の低密度培養を行うと筋細胞のみのコロニーを得ることができることがわかった。培養開始時に播種された筋幹細胞数は 100 個以下と少数であると推定されるにも関わらず、かなり多くの筋細胞コロニー数を得ることができ、ヒト繊維芽細胞の初代培養における常識である「細胞密度の低下は増殖低下をもたらす」という結論と相反することもわかった。おそらく、筋幹細胞が成長因子などを盛んに自己分泌するオートクリン細胞であることが、単一細胞からのコロニー形成（クローン成長）を可能にしているのではないかと考えられる。また、非筋細胞は培養中に死滅して排除される傾向があり、残存した場合でも形態的に筋細胞と識別可能なコロニーを形成するため容易に排除できることがわかった。さらに、ウシ由来の蛋白をなるべく用いない培養方法が望まれており、遺伝子組み替え酵素を用いたところ、10 倍の

細胞収集が可能となった点もひとつの進歩であった。

ヒトから採取した筋組織の自己移植を考えた場合、高い増殖・分化能力を有する筋幹細胞を効率良く選別する必要がある。池本は、筋幹細胞のマーカーと考えられる CD56 に対する抗体とセルソーターを用いて、効率良く筋幹細胞を分取する方式を確立した。今後、CD56 発現細胞が高い増殖・分化能力を有しているか否かを確認していくことが必要である。個々の筋細胞の増殖・分化能を反映する表面抗原 (CD56 は有力な候補分子のひとつ) を特定することができれば、セルソーターを用いて迅速に移植用細胞の品質を検定することが可能になる。さらに培養筋細胞の中から高い増殖・分化能をもった細胞集団だけを選別することができるため、自己筋細胞移植の治療効果の増大および安全性の担保に大きく貢献することが期待できる。また、不死化ヒト筋前駆細胞を NOD/Scid マウスに移植する実験において、発癌性などの異常は検出されず、正常な筋分化を遂げることが確認できた。

3) 脂肪組織由来幹細胞を用いた再生治療

脂肪組織由来幹細胞の尿道内注入療法を確立するために、まず、動物モデルを作成した。実験動物としてマウスは小さすぎ、ラットを用いることとした。ラット膀胱、膀胱頸部に細胞注入を行うための最適な方法は、27G の針を用いる方法であった。この注入方法を用いて GAX-collagen を注入したところ、GAX-collagen は注入場所に長期間残留することがわかった。移植・生着を確実にするための再生機転が働くような前処置として、ラット膀胱の凍結処置方法を確立させた。この方法を用いた脂肪組織由来幹細胞のラット膀胱移植実験では、移植後 14 日目で細胞の生存が確認できた。しかし、それ以後、生着細胞

数は減少したため、免疫系の関連も考えられたので、ヌードラットへ動物を変更したが結果は変らなかった。また、FGF やゼラチンスポンジを加えた実験も行ったが、改善は得られなかった。治療効果を確認するためのラットモデルを作成し、膀胱頸部に注入した脂肪組織由来幹細胞により尿失禁防止機構が働くかどうかを確認したところ、移植後 14 日目では leak point pressure (尿道抵抗) は上昇し、漏れにくくなっていることがわかった。この原因としては、注入された脂肪組織由来幹細胞が器質的に膨隆部を形成して抵抗となり、かつ幹細胞から多量に分泌されている HGF サイトカインが括約筋の再生に寄与した可能性が想定された。現時点では、簡便に採取可能な脂肪幹細胞治療は有用な治療法になりうると考えられる。

E. 結論

切迫性尿失禁に対する A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入療法では、非神経因性過活動膀胱に対する A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入療法と神経因性排尿筋過活動に対する A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の臨床試験を行うための組織作りとプロトコール作成を行った。2 つのプロトコールは国立長寿医療センター倫理委員会において承認を受けたが、一部変更する予定である。自己骨格筋幹細胞を用いた再生治療の研究では、1) ヒトから採取された筋組織から筋幹細胞を調整して、低密度培養を行うことにより効率的に筋細胞を培養できる、2) 遺伝子組換え酵素を用いることで、動物由来の蛋白質の使用を減らし、かつ培養効率を上げることができる、3) セルソーターを用いることにより、効率よく、幹細胞を選別回収できる、4) マウスでの変異 GFP 遺伝子導入不死化ヒト筋前駆細胞を用いた実験では、移植細胞は移植先で正常の分化能力を保持し、腫瘍化、炎症反

応、肉芽形成などは認められず、一定の安全性が確認された。脂肪組織由来幹細胞を用いた再生治療の研究では、1) 27G の針を用いたラット膀胱、膀胱頸部に細胞を注入するための方法を確立したこと、2) 移植細胞の生着を促すためのラット凍結処置方法を確立したこと、3) これらの方法を用いた脂肪組織由来幹細胞のラット膀胱移植実験で移植後 14 日目での生存が確認できたこと、4) 治療効果を確認するために作成されたラットモデルを用いて膀胱頸部に注入した脂肪組織由来幹細胞により尿失禁防止機構が働くかどうかを確認したところ、移植後 14 日目では leak point pressure は上昇し、漏れにくくなっていることがわかった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, A. and Hashimoto, N. Localized cyclic AMP-dependent protein kinase activity is required for myogenic cell fusion. *Exp. Cell Res.*, 314: 387-397 (2008).
- 2) Hashimoto, N., Kiyono, T., Wada, M. R., Umeda, R., Goto, Y., Nonaka, I, Shimizu, S., Yasumoto, S., and Inagawa-Ogashiwa, M. Osteogenic Properties of Human Myogenic Progenitor Cells. *Mech. Dev.* 125 : 257-269 (2008)
- 3) Ikemoto M, Fukada S, Uezumi A, Masuda S, Miyoshi H, Yamamoto H, Wada MR, Masubuchi N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Autologous transplantation of SM/C-2.6(+) satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by

lentiviral vector into mdx mice. *Mol Ther.* 15(12): 2178-2185, 2007

- 4) Fukada S, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells.* 25(10): 2448-2459, 2007

2. 学会発表

- 1) 日本発生生物学会第 40 回大会 日本細胞生物学会大 59 回大会 合同大会
福岡、2007 年 5 月 28 日～30 日
向敦史、栗崎知浩、佐藤智、小林俊秀、橋本有弘
「Role of microdomain molecules in myogenic cell fusion」
- 2) 日本発生生物学会第 40 回大会/日本細胞生物学会大 59 回大会 合同大会
福岡、2007 年 5 月 28 日～30 日
柳澤美智子、内山英穂、橋本有弘
「Modulation of Fate Determination in Muscle Stem Cells by Mutated ALK2 Found in a Heritable Human Disease」
- 3) 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会
横浜 (パシフィコ横浜)、2007 年 12 月 11 日～15 日
柳澤美智子、橋本有弘
「Modulation of fate determination in multipotent myogenic progenitor cells by mutated ALK2 found in a heritable human disease」
- 4) 第 5 回幹細胞シンポジウム
兵庫県淡路市 2007 年 5 月 17 日～19 日
柳澤美智子、池本円、橋本有弘
「変異 ALK2 による筋サテライト細胞分化制御機構の破綻」

5) 第8回運動器科学研究会

徳島県鳴門市 2007年8月24日～25日

橋本有弘

「筋の再生と分化の分子機構」

6) FASEB Summer Research Conference

Skeletal muscle satellite and stem cells

2007.7.14-19

Naohiro Hashimoto, Atsushi Mukai and

Si-Yong Song

“Progressive muscular dystrophy
in muscle satellite cell-deficient Mdx
mice”

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する
細胞製剤

発明者：尾崎武徳、安田香、丸山彰一、山
本徳則、後藤百万、松尾清一、北川泰雄

特許願人 名古屋大学

出願日：平成18年8月9日

(日本特許 特願2006-216234)

(国際特許 PCT/JP2007/065431)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究要旨

高齢者によく見られる切迫性、腹圧性、溢流性、機能性尿失禁のうち、切迫性尿失禁の治療として A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の有用性を検討する。そのために、今年度は、研究組織を構築するとともに多施設共同臨床試験のプロトコルを作成し、国立長寿医療センターの倫理委員会の承認を得た。多施設においても倫理委員会の承認を得つつある。来年度は臨床試験に入る予定である。

A. 研究目的

高齢者の尿失禁には切迫性、腹圧性、溢流性、機能性の 4 つのタイプがあり、どのタイプの尿失禁も高齢者の「生活の質」を大きく障害する。この研究では、切迫性尿失禁の治療として A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の有用性を検討する。

本間らによれば、本邦において過活動膀胱（尿意切迫感を主症状とし、頻尿、切迫性尿失禁を伴うことのある症候群）を有する 40 歳以上の人々は 810 万人にのぼるとされている。治療としては、抗コリン薬が治療の第一選択とされているが、十分な量の抗コリン薬によっても症状が軽快しなかったり、副作用により薬剤の継続使用ができない症例も多い。

A 型ボツリヌス毒素は末梢の神経筋接合部における神経終末内でのアセチルコリン放出抑制により神経筋伝達を阻害し、筋弛緩作用を示す薬剤ボトックスとして Allergan inc. (USA) から販売されている。本邦では、眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙攣性斜頸の治療にすでに保険適応（グラクソ・スミスクライン株式会社が本邦では販売）が通っており、臨床の場において痙攣、筋硬直を取り除く目的で使用されている。

近年、諸外国では泌尿器科領域において抗

コリン薬の効果が不十分な過活動膀胱に A 型ボツリヌス毒素の膀胱壁内注入療法の有用性が報告されている。A 型ボツリヌス毒素の致死量は 2000～3000 単位であるとされるが、これまでに報告されている尿路系への注入量は 100～300 単位であり、重篤な副作用の報告はない。平成 16～18 年度の厚生労働省科学研究（長寿総合）において、本研究の主任研究者の岡村と宮川は、それぞれ非神経因性過活動膀胱の症例に対して 100 単位の注入と神経因性過活動膀胱の症例に対して 300 単位の注入を試み、その有効率はそれぞれ 40% (2/5) と 84% (26/31) で重篤な副作用はなかったと報告した。また、その研究において、高齢者が毒素を用いた新たな治療の臨床試験に参加するのを極端に嫌ったため、今年度からの研究では若年層の患者も含め、検討することとした。その結果、有効性、安全性が示されれば、高齢者が拒絶しなくなり、治療を受けることによってよりよい QoL が期待できることになろう。

本研究では、抗コリン薬の効果が不十分であるか、副作用のため抗コリン薬の継続使用ができない非神経因性過活動膀胱と脊髄損傷による排尿筋過活動に対して、それぞれ A 型ボツリヌス毒素 100 単位と 300 単位の膀胱壁

内注入療法の検討を多施設共同研究として行うこととした。

B. 研究方法

今年度は、多施設共同研究を行うための組織作り、プロトコールの作成を行った。

(倫理面への配慮)

毒素を用いた臨床試験であるため、作成したプロトコールは国立長寿医療センター倫理委員会の承認を受けた後、各参加施設においても倫理委員会の承認を受けることとする。

C. 研究結果

非神経因性過活動膀胱に対する A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入療法の臨床試験のプロトコール作成には、主任研究者と本間之夫(日本赤十字医療センター)、後藤百万(名古屋大学)が関わり、脊髄損傷患者の神経因性排尿筋過活動に関するプロトコール作成には、主任研究者と副主任研究者として木元康介(総合せき損センター)、仙石 淳(兵庫県立総合リハビリテーションセンター)が関わった。2つの研究に参加する研究者は、主任研究者と上記4人の副主任研究者に加えて、飴田 要(北海道泌尿器科記念病院)、波間孝重(東北労災病院)、朝倉博孝(東京電力病院)、長井辰哉(豊橋市民病院)、小松和人(福井赤十字病院)、上田朋宏(京都市立病院)、夏目 修(奈良県立三室病院)、百瀬 均(星ヶ丘厚生年金病院)、小川隆敏(海南市民病院)、寺井章人(倉敷中央病院)、武井実根雄(原三信病院)の計16人である。

でき上がった2つのプロトコールは別に示す。

2つのプロトコールを国立長寿医療センター倫理委員会に提出し、承認を受けた。名古屋大学においても倫理委員会の承認を得た。

D. 考察

名古屋大学では混合診療の問題が指摘され、入院費は校費から支出されることになった。他施設でも同様な指摘があり、この研究では入院にかかる費用は研究費から支払えるように調整中である。研究班で論文を読み合わせたところでは A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入による死亡例はなかったが、2008年1月23日に米国の消費者団体 Public Citizen が「さまざまな疾患に対して A 型ボツリヌストキシン(ボトックス)を使用した後、12症例(うち1例が膀胱壁内注入)が嚥下障害、誤嚥性肺炎により死亡したとの記録が米国食品医薬品局にある」と発表した。しかし、調査の結果、A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入と死亡との因果関係は明らかでないことが判明した。本邦における眼瞼痙攣6445例、片側顔面痙攣8354例、痙攣性斜頸1923例の使用成績調査では、本剤との因果関係が完全には否定しきれない突然死が1例報告されている。この研究では、誤嚥の可能性のある患者を組み入れないようにしているため、嚥下障害、誤嚥性肺炎の可能性は極めて低いと考えられる。この点に関して、説明文書の改訂を行うこととした。

E. 結論

非神経因性過活動膀胱に対する A 型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入療法と神経因性排尿筋過活動に対する A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の臨床試験を行うための組織作りとプロトコール作成を行った。2つのプロトコールは、国立長寿医療センター倫理委員会において承認を受けた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

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

神経因性排尿筋過活動に対する
A型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の検討

厚生労働省科学研究(H19 長寿一般 001)

神経因性過活動 BTX-A 研究グループ

主任研究者： 岡村菊夫(国立長寿医療センター)

副主任研究者： 木元康介(総合せき損センター)

仙石 淳(兵庫県立総合リハビリテーションセンター)

倫理審査委員会提出版の作成日 平成19年12月11日

0. シェーマ

神経因性排尿筋過活動に対するA型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法の検討

A. 症例を見つける

主な選択基準

難治性の切迫性・反射性失禁のある脊損成人、本人より同意可能

主な除外基準

1年以内の下部尿路手術、Botox治療の既往、膀胱結石、
妊娠授乳、呼吸障害

B. washout前 (washoutの期間は14日以上とする)

適格基準チェック、尿検査(必要なら尿培養も含む)

C. washout後注入直前 (washoutの期間は14日間以上とする)

CMG、導尿尿失禁記録3日間、質問票

登録 (Fax: 0562-46-8329)



D. 注入後1ヶ月目

CMG、導尿尿失禁記録3日間、質問票

E. 注入後2,3,4,5,6,7,8,9,・・・12ヶ月 (効果消失まで1カ月毎)

導尿尿失禁記録3日間、質問票

最終観察後、
データ記載が完全であることを確認してデータセンターに送る

1. 目的

脊髄損傷患者の治療抵抗性の神経因性排尿筋過活動に対するボトックス（A型ボツリヌス毒素）膀胱壁内注入療法の有効性に関して、治療前 washout 後と1ヶ月後の切迫性尿失禁回数の変化を主要エンドポイントとして検討する。（前向き症例集積研究）

2. 背景と根拠

脊髄損傷患者の排尿筋過活動による尿失禁は難治性である¹⁾。治療としては、抗コリン薬が治療の第一選択とされているが、十分な量の抗コリン薬によっても症状が軽快しなかったり、副作用により薬剤の継続使用ができない症例も多い。

A型ボツリヌス毒素は末梢の神経筋接合部における神経終末内でのアセチルコリン放出抑制により神経筋伝達を阻害し、筋弛緩作用を示す薬剤ボトックスとして Allergan inc. (USA) から販売されている。本邦では、眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸の治療にすでに保険適応（本邦ではグラクソ・スミスクライン株式会社が販売）が通っており、臨床の場合において痙攣、筋硬直を取り除く目的で使用されている。

近年、諸外国では泌尿器科領域において抗コリン薬の効果が不十分な神経因性の排尿筋過活動に A型ボツリヌス毒素の膀胱壁内注入療法の有用性が報告されている²⁻²⁰⁾。A型ボツリヌス毒素の致死量は2000-3000単位であるとされるが、これまでに報告されている尿路系への注入量は100-300単位であり、重篤な副作用の報告はない。平成16-18年度の厚生労働省科学研究（長寿総合）において、本研究の主任研究者の岡村と宮川は、それぞれ非神経因性過活動膀胱の症例に対して100単位の注入と神経因性過活動膀胱の症例に対して300単位の注入を試み、その有効率はそれぞれ40% (2/5) と84% (26/31) で重篤な副作用はなかったと報告した²¹⁾。

本研究では、抗コリン薬の効果が不十分であるか、副作用のため抗コリン薬の継続使用ができない脊髄損傷による排尿筋過活動に対して A型ボツリヌス毒素300単位の膀胱壁内注入療法の検討を多施設共同研究として行う。

3. 薬物情報

3-1 薬剤名	米国 Allergan 社製 Botox 100
3-2 成分	A型ボツリヌス毒素
3-3 含有量	1瓶に下記成分を含む
	A型ボツリヌス毒素 100単位
	ヒト血清アルブミン 0.5mg

塩化ナトリウム 0.9mg
ウシ血清「生産培地」

3-4 管理・保管法 付録 1 に示すように、主任研究者が購入、国立長寿医療センター薬剤部に保管、研究施設での使用に際し、各施設に配送する。薬剤の受領に関しては、Fax で連絡する（付録 2）。

4. 診断基準

脊髄損傷患者において、排尿筋過活動が膀胱内圧測定により確認される。

5. 適格基準

5-1 選択基準

- 5-1-1 20 歳以上の脊髄損傷患者であること
- 5-1-2 排尿筋過活動が膀胱内圧測定により確認されていること
- 5-1-3 本人より文書による同意(付録 3, 4)の取得が可能であること
- 5-1-4 抗コリン薬による治療によっても切迫性もしくは反射性失禁回数が週 1 回以上あるか、副作用により内服の継続が不可能であること

5-2 除外基準

- 5-2-1 過去に排尿筋過活動に対して膀胱拡大術などの手術を受けたことがある
- 5-2-2 過去に A 型ボツリヌス毒素を用いた治療を受けたことがある
- 5-2-3 1 年以内に下部尿路手術の既往がある
- 5-2-4 症候性尿路感染、悪性腫瘍、膀胱結石がある
- 5-2-5 妊娠または授乳している、または治療開始後 1 年以内に妊娠の可能性がある
- 5-2-6 全身性の神経筋接合部の障害を持つ（重症筋無力症、ランバート・イートン症候群、筋萎縮性側索硬化症）
- 5-2-7 高度の呼吸機能障害のある
- 5-2-8 精神障害または臨床試験遂行に影響ある認知機能障害を有する
- 5-2-9 その他、主任研究者、研究参加医師が不相当と判断する

6. 症例の登録

研究参加施設で適格と判断された症例が発生した場合、各研究者は Fax (0562-46-8329) を用いて、以下に挙げた基本的なデータをデータセン

ターに報告して登録する（付録 5）。（施設登録番号、イニシャル、性別、体重、身長、生年月日、注入予定日、チェックリスト）

データセンターは、症例が登録された時点で施設へボトックスを郵送し、経過観察にあつては定期的に検査が行えるよう通知を行う。

7. 注入方法

7-1 麻酔方法は、各施設で選択してよい。

患者の状態に応じて、膀胱粘膜麻酔、腰椎麻酔、硬膜外麻酔（仙骨ブロックを含む）、全身麻酔、無麻酔のいずれかを選択する。自律神経過緊張反射や下肢の強い痙性がある場合には、腰椎麻酔や全身麻酔をすることが望ましい。

7-2 溶解方法

定められた溶解方法により溶解する。（付録 6）

7-3 碎石位とし、操作用膀胱鏡を尿道から膀胱へ挿入、操作孔より注入針（William 針）を挿入し、総量 300 単位のボトックスを生理食塩水 15ml に溶解し、1ヶ所につき 0.5ml を、膀胱三角部を除く 30 箇所注入する。注入は講習を受けた医師が行う。

7-4 定められた廃棄方法により廃棄する。（付録 7）

8. 有害事象の報告

8-1 有害事象の定義

有害事象とはボトックス注入時ならびに注入後に、患者に生じた異常をいう。重篤な有害事象とは生命に危険を及ぼすものをさす。

8-2 有害事象の評価と報告

有害事象に関しては、データ報告書に記載する。

8-3 予期される有害事象

ボトックスの貼付文書によると、過剰な筋弛緩作用、発疹、注射部位の異常（腫脹、疼痛など）、白血球減少、血小板減少、嘔気、頭痛、脱力感等が生じうる。重大な副作用としては、アナフィラキシー様症状、呼吸障害、嚥下障害がある。

本研究班で、Botulinum Toxin A AND overactive bladder で

PubMed を検索して論文を収集し、副作用を調査した。神経因性過活動膀胱に対してA型ボツリヌストキシン膀胱壁内注入を行った461例のうち、間欠導尿が必要だった症例は30例(6.7%)、排尿困難・排尿痛・血尿などの手術に伴う症状が6例(1.3%)、尿路感染症が12例(2.6%)、その他としててんかん発作、混乱がそれぞれ1例にみられた。

8-4 有害事象の緊急報告と対応

重篤な有害事象発生時には、研究参加医師は速やかに主任研究者に報告する。主任研究者は、グラクソ・スミスクライン株式会社に該当有害事象を報告するとともに、本研究への症例組み入れを中止し、安全性について検討する。

9. 問診、観察、検査などの報告項目とスケジュール

9-1 抗コリン薬 washout 前

washout の期間は14日以上とする

- a) 適格基準の確認
- b) 尿検査（尿沈渣を含む：尿路感染症が疑われた場合は尿培養検査）

*導尿・尿失禁記録は、来院前の3日間をつけてもらう

9-2 抗コリン薬 washout 後～BTX 注入療法直前

- a) 導尿・尿失禁記録（自己間欠導尿回数と失禁回数）3日間（付録8）
- b) 膀胱内圧測定（Detrusor overactivityの有無、最大膀胱容量、コンプライアンス）
- c) 質問票（付録9）

*導尿・尿失禁記録は、来院前の3日間をつけてもらう

9-3 治療後1ヶ月目

- a) 導尿・尿失禁記録（間欠導尿回数と失禁回数）3日間
- b) 膀胱内圧測定（Detrusor overactivityの有無、最大膀胱容量、コンプライアンス）
- c) 質問票

*導尿・尿失禁記録は、来院前の3日間をつけてもらう

9-4 治療直前と治療後 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ---- (効果消失**と判断されるまで1カ月毎)

- a) 導尿・尿失禁記録(自己間歇導尿回数と失禁回数)* 3日間
- b) 質問票

*排尿失禁記録は来院前の3日間をつけてもらう

**「効果消失」の判断は、質問票の最後の質問(5)において、「少し悪くなっている」以上と回答された時とする。

10. 目標症例数と試験期間

10-1 目標症例数 37例

10-2 試験期間 倫理委員会承認後～平成22年3月31日

11. エンドポイントの定義

主要エンドポイントは1ヶ月目の切迫性もしくは反射性尿失禁回数の変化とし、切迫性尿もしくは反射性失禁回数の50%以上減少した症例を有効例とする。切迫性もしくは反射性尿失禁の再発、膀胱容量の変化を副次エンドポイントとする。

12. 統計学的考察

12-1 目標症例数の設定根拠

有効率は49～87%程度と予想される。真の有効率を70%とし、95%信頼区間を54～86%とすると、31例が必要である。経過観察中の脱落を6例と見積もった。

12-2 解析項目方法

患者背景として、性別、年齢、既往歴、washout後のCMGにおける最大膀胱容量、コンプライアンス、導尿失禁記録における間欠導尿回数、失禁回数をあげる。

Washout後の切迫性尿失禁回数をベースラインとして、1ヶ月目の有効率を主要エンドポイントとして検討する。さらに、Kaplan-Meier法により効果消失までの期間を検討する。

治療前後の値の有意差検定には、 χ^2 乗検定、t-検定などを用いる。

12-3 中間解析

本研究は少数の前向き症例集積研究であり、安全性は高いとされているので、中間解析は行わない。

13. 症例報告書の記入と提出

症例報告書は、連結可能匿名化された短票型として FileMaker Pro Advanced を用いて作成し、プリントアウトした書面に記入して提出するか、電子媒体に書き込んで提出する。Fax、郵送、メールのいずれでもよい。

14. モニタリング

進捗状況に関しては、つねに主任研究者が登録状況を把握し、定期的に研究参加医師にプロトコールに沿った追跡ができていないか確認する。

15. 倫理的事項

「世界医師会ヘルシンキ宣言」および「臨床研究に関する倫理指針」に則り、研究を行う。プライバシーの侵害が生じないようにデータ管理には十分に注意し、研究に参加する医師が各施設での識別番号と個人情報を管理し、データ解析者には識別番号とデータを送ることで個人を識別することができない連結可能匿名化を行う。

説明文書・同意書は、主任研究者である岡村菊夫が作成し、国立長寿医療センター倫理審査委員会において承認を得ることとする。また、他施設においても倫理審査委員会での承認が必要な場合は、施設における方法に則って承認を受ける。

16. 試験の費用負担

16-1 資金源及び財政上の関係

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金 (H19 長寿一般 001) の交付を受けて行われるものである。

16-2 試験治療に関する費用

本研究においては、薬剤費と注入用針に関して研究費から支出されるが、麻酔費用、膀胱鏡手技、(入院費) に関しては保険診療内で行うものとする。

16-3 健康被害に対する保障

本研究で行われる治療により副作用が生じた場合、その治療は保険診療内で行われる。ただし、重篤な副作用が生じた場合は、担当した医師が加入している医師賠償責任保険からの保障が行われる場合がある。

17. プロトコールの改訂