

コア、尿失禁スコア、排尿・蓄尿症状の点数 (I-PSS)、排尿に関する困窮度 (QOLスコア) などの主観的なスコア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60～70%程度と予想される。真の有効率を65%とし、95%信頼区間を50～80%とすると、39例が必要である。経過観察中の脱落を6～11例と見積もった。

12-2 解析方法

患者背景として、性別、年齢、既往歴、尿流動態検査におけるDetrusor overactivityの有無、最大膀胱容量、コンプライアンス、Pdet/Qmax、頻度-排尿記録、頻度記録における一回排尿量、排尿回数、失禁回数、切迫感回数をあげる。

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。さらに、Washout後の膀胱容量、OABSSスコア、尿失禁スコア、排尿・蓄尿症状の点数 (I-PSS)、排尿に関する困窮度 (QOLスコア) などの主観的なスコアをベースラインとして、1ヶ月目から効果消失時までの変化を検討する。

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、また安全性も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。長寿医療センターにおける登録患者の識別番号とカルテ番号等は副院長が保存することとする。

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

試験デザイン、研究対象、治療計画、エンドポイント、目標症例数、予期される有害事象の項目に変更の必要が生じた場合には、国立長寿医療センター倫理委員会での再審査を受けることとする。

18. 試験の終了と早期中止

目標症例数が集積された時点で、登録を終了する。症例登録の遅れ、プロトコール逸脱の頻発などの理由により試験の完遂が困難と判断された場合、早期中止とすることがある。また、重篤な有害事象が観察されその原因について検討して危険と判断された場合、試験を早期に中止することがある。

19. 記録の保存

研究に参加する施設の医師は、個人識別データと症例のデータを別々管理保存する。経過観察を終了した時点で、個人識別データ以外のデータを主任研究者に送る。抜け落ちたデータの確認ができるよう、最終解析が終了するまで個人識別データは手元に保存する。

20. 研究成果の帰属と結果の公表

プロトコールを作成した研究者が学会発表、論文発表を行う権利を有するが、もっとも症例を多く登録した研究者に権利を譲ることができる。本研究への貢献度の高い研究者が共同演者、共著者となることができる。

21. 研究組織

主任研究者	岡村菊夫	国立長寿医療センター	0562-46-2311
副主任研究者	本間之夫	日本赤十字社医療センター	03-3400-1311
	後藤百万	名古屋大学医学部附属病院	052-741-2111
分担研究者	飴田 要	北海道泌尿器科記念病院	
	浪間孝重	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	
	仙石 淳	兵庫県立総合リハビリテーションセンター	
	小川隆敏	海南市民病院	
	寺井章人	倉敷中央病院	
	木元康介	総合せき損センター	
	武井実根雄	原三信病院	

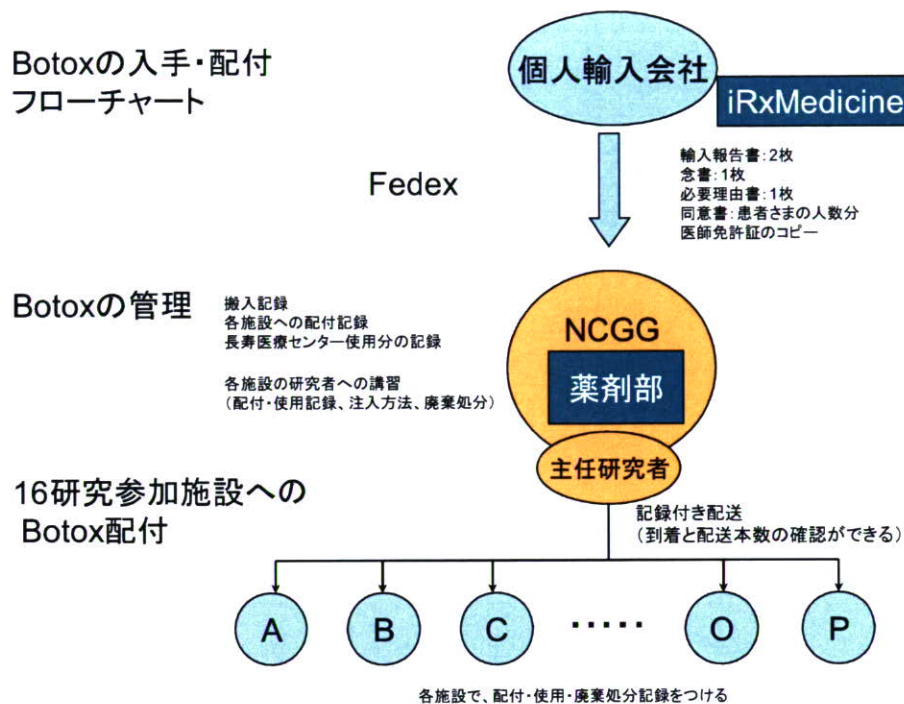
22. 文献

- 1) 本間之夫、柿崎秀宏、後藤百万、武井実根雄、山西友典、林邦彦. 排尿に関する疫学的研究. 日本排尿機能学会誌 14: 266-277, 2003.
- 2) Rapp DE, Lucioni A, Katz EE, O'Connor RC, Gerber GS, Bales GT. Use of botulinum-A toxin for the treatment of refractory

- overactive bladder symptoms: an initial experience. *Urology*. 63: 1071-1075, 2004.
- 3) Kuo HC. Urodynamic evidence of effectiveness of botulinum A toxin injection in treatment of detrusor overactivity refractory to anticholinergic agents. *Urology*. 63: 868-872, 2004.
 - 4) Smith CP, Chancellor MB. Simplified bladder botulinum-toxin delivery technique using flexible cystoscope and 10 sites of injection. *J Endourol*. 19: 880-882, 2005.
 - 5) Rajkumar GN, Small DR, Mustafa AW, Conn G. A prospective study to evaluate the safety, tolerability, efficacy and durability of response of intravesical injection of botulinum toxin type A into detrusor muscle in patients with refractory idiopathic detrusor overactivity. *BJU Int*. 96: 848-852, 2005.
 - 6) Schulte-Baukloh H, Weiss C, Stolze T, Sturzebecher B, Knispel HH. Botulinum-A toxin for treatment of overactive bladder without detrusor overactivity: urodynamic outcome and patient satisfaction. *Urology*. 66: 82-87, 2005.
 - 7) Kuo HC. Clinical effects of suburothelial injection of botulinum A toxin on patients with nonneurogenic detrusor overactivity refractory to anticholinergics. *Urology*. 66: 94-98, 2005.
 - 8) Werner M, Schmid DM, Schussler B. Efficacy of botulinum-A toxin in the treatment of detrusor overactivity incontinence: a prospective nonrandomized study. *Am J Obstet Gynecol*. 192: 1735-1740, 2005.
 - 9) Mucksavage P, Smith AL, Moy ML. The use of botulinum toxin in the treatment of refractory overactive bladder. *Ostomy Wound Manage*. 52: 28-33, 2006.
 - 10) Lucioni A, Rapp DE, Gong EM, Fedunok P, Bales GT. Intravesical botulinum type A toxin injection in patients with overactive bladder: Trigone versus trigone-sparing injection. *Can J Urol*. 13: 3291-3295, 2006.
 - 11) Hoebeke P, De Caestecker K, Vande Walle J, Dehoorne J, Raes A, Verleyen P, Van Laecke E. The effect of botulinum-A toxin in incontinent children with therapy resistant overactive

- detrusor. J Urol. 176: 328-330, 2006.
- 12) Schmid DM, Sauermann P, Werner M, Schuessler B, Blick N, Muentener M, Strebel RT, Perucchini D, Scheiner D, Schaer G, John H, Reitz A, Hauri D, Schurch B. Experience with 100 cases treated with botulinum-A toxin injections in the detrusor muscle for idiopathic overactive bladder syndrome refractory to anticholinergics. J Urol. 176: 177-185, 2006.
 - 13) Sahai A, Khan MS, Dasgupta P. Efficacy of botulinum toxin-A for treating idiopathic detrusor overactivity: results from a single center, randomized, double-blind, placebo controlled trial. J Urol. 177: 2231-2236, 2007.
 - 14) Cohen BL, Rivera R, Barboglio P, Gousse A. Safety and tolerability of sedation-free flexible cystoscopy for intradetrusor botulinum toxin-A injection. J Urol. 177: 1006-1010, 2007.
 - 15) 岡村菊夫. 高齢者排尿障害に対する患者・介護者、看護師向きの排泄ケアガイドライン作成、一般内科医向きの評価基準・治療効果判定基準の確立、普及と高度先駆的治療法の開発(H16-長寿-008). 平成 16-18 年度総合研究報告書, 2007.

付録1. ボトックスの入手・配付フローチャート



付録2. ボトックスの送付・受領書

送付状		No.
発送年月日		
先生		
医薬品名	数量	発送方法
BOTOX(A型ボツリヌス毒素) 100U/1 amp	本	ヤマト運輸 クール宅急便
上記の通り発送いたしましたので、ご査収ください。		
		国立長寿医療センター 〒474-8511 愛知県大府市森岡町源吾36-3 TEL (0562)46-2311 FAX (0562)46-8329 手術・集中医療部 岡村 菊夫
送付先: FAX 0562-46-8329		
受取書		No.
国立長寿医療センター 手術・集中医療部 岡村 菊夫 様		
下記のとおり受け取りました。		受取年月日: 平成 年 月 日
医薬品名	数量	受取者
BOTOX(A型ボツリヌス毒素) 100U/1 amp	本	職名 _____ 氏名 _____ 印

付録 3. 説明文書

非神経因性過活動膀胱に対するボトックス膀胱壁内注入療法の検討

1) 研究目的と背景

あなたがお悩みの病気は「過活動膀胱」という病気です。あなたは、標準的な治療法である抗コリン薬を内服されてきましたが、効果が低いと判断されるか、抗コリン薬の副作用により内服を継続できないと考えられます。近年、難治性過活動膀胱に対する新しい治療法としてボトックス（A型ボツリヌス毒素）の膀胱壁内注入療法が海外で報告されており、本邦でもその有効性が示唆されつつあります。ボトックスは、他の病気（眼瞼痙攣、顔面痙攣、痙性斜頸）には治療薬としてすでに用いられています。この研究では、難治性過活動膀胱に対するボトックス膀胱壁内注入療法の効果や持続期間、安全性を調べます。

2) 研究内容とその方法

麻酔をかけた後に、講習を受けた医師が膀胱鏡を用いて膀胱の30箇所（箇所）に特殊な細い針でボトックスを注射します。麻酔は、局所麻酔、仙骨ブロック、脊髄麻酔、全身麻酔のいずれかで行います。

治療効果とその持続期間を調べるために、治療前、治療後1ヶ月毎に尿失禁や排尿状態の調査質問票、排尿・量・尿失禁記録、排尿の勢いの検査、残尿測定（腹部超音波検査）を行います。また、治療前と1ヶ月後に膀胱機能検査を行います。

3) 予測される効果と副作用

尿意切迫感、切迫性尿失禁、頻尿が消失、あるいは改善する可能性があります。注入後およそ1週間で効果が発現し、一回の投与で効果は6～12ヶ月持続するとされていますが、時間が経過するとともに神経が回復して、効果が消失していくといわれています。どのくらい効果が持続するかは、本研究で確認する内容のひとつです。効果消失後、もしあなたがボトックス再注入を希望されても、再注入を行うことはできません。

膀胱壁内注入療法での重篤な副作用の報告はありませんが、膀胱の筋肉の収縮力低下により排尿困難が生じる可能性があります。2000～2007年までの論文で発表されている副作用は、非神経因性過活動膀胱に対してボトックス膀胱壁内注入を行った332例のうち、間欠導尿が必要になった症例は18例（5.4%）に、排尿困難・排尿痛・血尿などの手術に伴う一過性の症状が46例（13.8%）に、尿路感染症が29例（8.7%）に、血尿、局所痛、排尿痛などの局所症状が37例（4.3%）に認められました。他の病気でもボトックスを使用した場合は、嘔気、気分不良、頭痛、眩暈などがそれぞれ1～3%に認められています。また、まれな重篤な合併症として、呼吸困難および筋無力症

や、因果関係が不明な心筋梗塞、死亡例の報告があります。

また、ボトックスは製造工程の初期段階で、米国産のウシ由来の成分を含む生産培地（直接の原料ではなく薬剤を作るための畑にあたるもの）を用いて製造していますので、伝達性海綿状脳症の危険性が全くないとはいえません。しかし、現在までに世界 75 ケ国以上で承認され使用されていますが、伝達性海綿状脳症が発症したという報告はありません。

4) 研究不参加の際でも不利益は生じないこと

この臨床試験に参加していただくのは、あなたの意志によります。この研究に参加しただけであっても、そのことによりあなたはいかなる不利益を受けることはありません。

5) 同意の撤回

この臨床試験に参加していただくことをいったんは了承されても、あなたが後日これを撤回されも構いません。そのことによりあなたはいかなる不利益を受けることはありません。

6) プライバシーの保護

この研究は、過活動膀胱に対するボトックス膀胱壁内注入療法という新しい治療法の有効性、安全性を検討するものであり、その成績は世の中に公表していく必要のあるものです。ただし、この研究を発表する際、あなたの個人情報が発表されることは絶対にありません。

7) 費用の負担

この自主研究は厚生労働省科学研究費の助成を受けて行うものです。ボトックスは適応外薬品として使用するため、ボトックスと特殊な注入用針は研究費から購入します。治療前後に受けていただく一連の検査と麻酔、膀胱鏡手技はすべて保険診療範囲内で行われます。患者さまには、保険診療分の費用を負担して頂きます。また、治療により合併症が生じた場合には保険診療で対応させていただきます。

付録4. 同意書（国立長寿医療センター分）

非神経因性過活動膀胱に対するボトックス膀胱壁内注入療法の検討

国立長寿医療センター総長 殿

- | | |
|------------------------|-----------------------------|
| 1. 研究目的と背景 | <input type="checkbox"/> 済み |
| 2. 研究内容とその方法 | <input type="checkbox"/> 済み |
| 3. 予測される効果と副作用の説明 | <input type="checkbox"/> 済み |
| 4. 研究不参加の際でも不利益は生じないこと | <input type="checkbox"/> 済み |
| 5. 同意の撤回 | <input type="checkbox"/> 済み |
| 6. プライバシーの保護 | <input type="checkbox"/> 済み |
| 7. 費用の負担 | <input type="checkbox"/> 済み |

説明月日 平成 年 月 日
説明担当者

私は、上記について、説明を受け、十分に理解し、納得しましたので、本試験に参加し、治療・検査結果が研究目的で使用されることに同意いたします。

平成 年 月 日

住所

本人氏名（自署）

付録 5. 登録用紙

非神経因性過活動膀胱ボトックス注入療法
チェックリスト

A. 症例

施設登録番号 _____
イニシャル _____ 性別 男、女
体重 _____ kg 身長 _____ cm
生年月日 _____ 注入予定日 _____

B. チェックリスト

選択基準 以下のすべてを満たす必要がある（番号の前の□に○を入れる）

- 5-1-1 20歳以上の過活動膀胱の症例であること
- 5-1-2 本人より文書による同意の取得が可能であること
- 5-1-3 抗コリン薬による治療によっても切迫性失禁回数（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症例

除外基準 以下の項目を満たしてはいけない（番号の前の□に×を入れる）

- 5-2-1 尿路症状の原因となる明らかな神経疾患を有する
- 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 過去にA型ボツリヌス毒素による治療を受けたことのある患者
- 5-2-5 残尿量が100ml以上認められる
- 5-2-6 排尿回数排尿量チャートでの平均1回排尿量が200mlより多い
- 5-2-7 腹圧性尿失禁、または機能性尿失禁がある
- 5-2-8 活動性尿路感染、悪性腫瘍、膀胱結石がある
- 5-2-9 妊娠または授乳している、または治療開始1年以内に妊娠の可能性がある
- 5-2-10 全身性の神経筋接合部の障害がある（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）
- 5-2-11 高度の呼吸機能障害がある
- 5-2-12 精神障害または臨床試験遂行に影響のある認知機能障害を有する
- 5-2-13 その他、主任研究者、研究参加医師が不相当と判断する

同意

同意説明日：平成 年 月 日 文書同意日：平成 年 月 日

登録の可否

可

不可

付録6 調剤方法



①ポトックス注100は調製まで5℃以下の冷所で保存する。

②バイアルの蓋をはずし、ゴム栓をアルコール綿で清拭したのち十分乾燥させる。

* バイアル中にアルコールが入ると、ポツリヌス毒素の効力を低下させる可能性がある。



③日局生理食塩液をバイアルに注入し、ポトックス注100を溶解する。(調製用注射針は、18～22ゲージを使用) 溶解に必要な生理食塩液は下記のとおり。

添加する日局生理食塩液の量	溶解後のポツリヌス毒素の量 (0.1ml当たり)
1.0ml	10.0 単位
2.0ml	5.0 単位
4.0ml	2.5 単位
8.0ml	1.25 単位

注意：バイアルの陰圧が保たれていない場合は使用しないこと。
そのバイアルに0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えて失活させた後、密閉可能な廃棄袋又は箱に廃棄すること。



④ 溶解液の注入時および溶解時には、泡立てることや激しい攪拌を避ける。

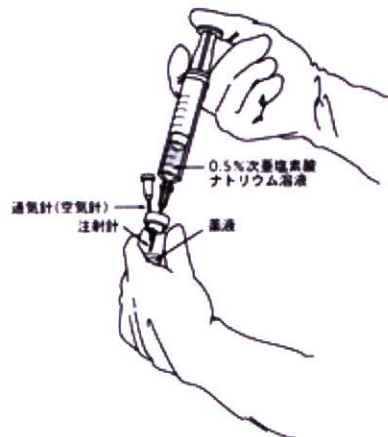
* ポツリヌス毒素は強く泡立てたり、激しく攪拌すると変性する。



⑤ 溶解後の液は無色～微黄色透明で浮遊物は認められない。

保存剤を含んでいないので、調製後は速やかに使用すること。なお、調製後は冷凍しないこと。

付録7. 廃棄方法



処置後、残った薬液は、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えて失活させる。

失活後、密閉可能な廃棄袋又は箱に廃棄する。

薬液の触れた器具等も同様に0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を加えて失活させた後、密閉可能な廃棄袋又は箱に廃棄する。

付録 8. 頻度・尿量記録用紙

様

排尿頻度・排尿量・尿失禁記録用紙

記入日： 平成____年____月____日 (____日目)

	おしっこの量 (ml)	尿もれ (少・中・大)	尿意の強さ (強・普通・弱・なし)	備考 (起床と就寝、尿もれの詳しい状況)
朝 6:00				
	200 ml		普通	起床
8:00				朝起きた時を記入
10:00	100 ml			
昼 12:00	150 ml	中くらい	強	炊事中に冷たい水を触って急にしたくなり漏れた
午後 2:00	150 ml	少		トイレにたどり着く前に漏れた
4:00				
6:00	100 ml			
8:00	100 ml			
10:00	80 ml			就寝
深夜 12:00				夜眠ろうとした時を記入
2:00	210 ml	少	強	トイレに行く前に漏れた
4:00				
合計	1090 ml			
	8 回	3 回		

付録 9. 非神経因性過活動膀胱ボトックス膀胱壁内注入療法臨床試験質問票

この1ヶ月のご自身の排尿・尿もれの状況を思い出して、該当する□に✓をいれてください。

1) 朝起きた時から寝るまでに、何回くらい尿をしましたか？

- 7 回以下
- 8～14 回
- 15 回以上

2) 夜寝てから朝起きるまでに、何回くらい尿をするために起きましたか？

- 0 回
- 1 回
- 2 回
- 3 回
- 4 回
- 5 回

3) 急に尿がしたくなり、我慢が難しいことがありましたか？

- なし
- 週に1回より少ない
- 週に1回以上
- 1日に1回くらい
- 1日2～4回
- 1日5回以上

4) どれくらいの頻度で尿がもれますか？

- なし
- おおよそ1週間に1回、あるいはそれ以下
- 1週間に2～3回
- おおよそ1日に1回
- 1日に数回
- 常に

5) 急に尿がしたくなり、我慢できずに尿をもらすことがありましたか？

- なし
- 週に1回より少ない
- 週に1回以上
- 1日に1回くらい
- 1日2~4回
- 1日5回以上

6) あなたはどれくらいの量の尿もれがあると思いますか？

- なし
- 少量
- 中等量
- 多量

7) 全体として、あなたの毎日の生活は尿もれのためにどれくらい損なわれていますか？ 0(まったくない)~10(非常に)までの数字に○をつけて下さい。

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

まったくない

非常に

8) どんなときに尿がもれますか？

(あなたにあてはまるものすべてをチェックして下さい)

- なし - 尿もれはない
- トイレにたどりつく前にもれる
- せきやくしゃみをした時にもれる
- 眠っている間にもれる
- 体を動かしている時や運動している時にもれる
- 排尿を終えて服を着た時にもれる
- 理由がわからずにもれる
- 常にもれている

9) 尿をしたあとにまだ尿が残っている感じがありましたか？

- 全くない
- 5回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合くらい
- 2回に1回の割合より多い
- ほとんどいつも

10) 尿をしてから2時間以内にもう一度しなくてはならないことがありましたか？

- 全くない
- 5回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合くらい
- 2回に1回の割合より多い
- ほとんどいつも

11) 尿をしている間に尿が何度もとぎれることがありましたか？

- 全くない
- 5回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合くらい
- 2回に1回の割合より多い
- ほとんどいつも

12) 尿を我慢するのが難しいことがありましたか？

- 全くない
- 5回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合くらい
- 2回に1回の割合より多い
- ほとんどいつも

13) 尿の勢いが弱いことがありましたか？

- 全くない
- 5回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合くらい
- 2回に1回の割合より多い
- ほとんどいつも

14) 尿をし始めるためにおなかに力を入れることがありましたか？

- 全くない
- 5回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合より少ない
- 2回に1回の割合くらい
- 2回に1回の割合より多い
- ほとんどいつも

15) 現在の排尿の状況がこのまま変わらずに続くとしたら、どう思いますか？

- とても満足
- 満足
- ほぼ満足
- なんともいえない
- やや不満
- いやだ
- とてもいやだ

16) 現在のあなたの膀胱の症状は、ボトックスの膀胱壁内注入療法を受ける直前の1週間の状態と比べて、良くなっていますか、それとも悪くなっていますか？

あなたの症状の変化にもっとも近いものをひとつだけ選んで✓をいれて下さい。

- とても良くなっている
- 良くなっている(中くらい)
- 少し良くなっている
- 変わらない
- 少し悪くなっている
- 悪くなっている(中くらい)
- とても悪くなっている

付録10. 術者による膀胱鏡所見

A) 粘膜

1. 血管新生の有無 あり、 なし

ありの場合、血管新生の程度

Grade3 (ほぼ全面)、Grade2 (半分)、Grade1 (少し)

2. 潰瘍の有無 あり、 なし

B) 筋層

肉柱形成 あり、 なし

線維化の有無 あり、 なし

膀胱鏡の写真、ビデオ、DV、DVDなどに撮影は実施できる施設で行い、膀胱鏡の写真、ビデオ、DV、DVDなどは京都市立病院の上田朋宏医師に送付する。

術者の膀胱鏡による粘膜、筋層の内視鏡所見と症状の程度、ボトックスの治療効果との関連は上田医師が別個に行うものとする。

送付先

604-8845 京都府京都市中京区壬生東高田町1-2

京都市立病院泌尿器科

上田朋宏医師

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 後藤百万 名古屋大学大学院医学系研究科病態外科学講座泌尿器科学 教授

研究要旨

近年の高齢化に伴い、高齢者（特に女性）の腹圧性尿失禁患者は増加してきている。治療法は様々あるが、治療効果が十分でない症例もある。そのような症例に対して骨髄由来幹細胞や筋芽細胞を用いた細胞治療実験がいくつか報告されており、われわれは難治性腹圧性尿失禁に対する脂肪由来間葉系細胞の移植治療の可能性に着目した。臨床実験に先だって動物実験モデルの作成が必要であると考えた。この分担研究では最適な細胞注入法の確立を目指して、すでに臨床の場で腹圧性尿失禁のコラーゲン傍尿道周囲注入療法として用いられている GAX-collagen（バードコンティジェン®）をラット膀胱に注入する実験を行った。さらに、低血清培養脂肪由来間葉系細胞のサイトカイン分泌能についても検討した。ラット膀胱壁内への注入方法は 27G 針を用いるのがよく、この注入方法では Gax-collagen は day14 から day70 まで組織内での良好な残存が確認された。また、低血清培養脂肪由来間葉系細胞は VEGF 分泌能が高いことが示唆された。

A. 研究目的

尿失禁は、腹圧性尿失禁（労作時または運動時、くしゃみまたは咳などの腹圧負荷時に尿が漏れるもの）と切迫性尿失禁（尿意切迫感を伴い不随意に尿が漏れるもの）に大別される。近年の高齢化に伴い、高齢者、特に女性における腹圧性尿失禁患者が増加してきている。治療法としては、①薬物療法、②骨盤底筋体操などの理学療法、③スリング手術等の手術療法、④コラーゲン傍尿道周囲注入療法が挙げられるが、確立された薬物療法は存在せず、高齢者では骨盤底筋体操を持続することは難しい。また、高齢者に対するスリング手術では術後の排尿困難が問題となる。コラーゲン傍尿道周囲注入療法は低侵襲であるが、①ウシ由来のコラーゲンのため安全性に問題がある、②注入したコラーゲンが数ヶ月で吸収されてしまうため効果が持続しない、③高価であるなどの問題点がある。

我々は低血清培養の脂肪由来間葉系細胞に注目し、その性状・増殖速度・サイトカイン分泌能・分化などに関する基礎的な研究を行ってきた。また、細胞が分泌するサイトカインの作用についての様々な動物実験（皮膚欠損モデルによる創傷治癒実験・急性腎不全モデルに対する細胞治療など）や脂肪への分化に関する動物実験も行ってきた。

2005年ピッツバーグ大学・トロント大学共同研究では、女性腹圧性尿失禁患者7例より骨格筋の針生検で42~247mgの筋組織を得て筋芽細胞を培養し、4週間後に18~22×10⁶個の自家筋芽細胞を尿道横紋筋内へ注入したところ、7例中4例ではほぼ尿禁制が得られたと報告されており、我々は脂肪由来間葉系細胞でも同様の治療が可能であろうと考え、腹圧性尿失禁に対して低血清培養の脂肪由来間葉系細胞を用いた応用治療に関する基礎的検討を行うこととした。

内視鏡下あるいはエコー下で行われるコラーゲン膀胱周囲注入療法は既に臨床の医療現場で実施されており、注入方法も確立している。今回の検討では、細胞治療は既存の治療法として確立している GAX-collagen (バードコンティジェン®) を用いて動物モデルとして採用したラット膀胱への最適な注入方法について検討することとした。また、何らかの傷害(物理的・化学的)が加えられた膀胱頸部の膀胱壁に脂肪由来間葉系細胞を移入することにより、細胞が VEGF を分泌して血管新生を促進し、組織の再構築も促進されるとの仮説を立て、*in vitro* での脂肪由来間葉系細胞の VEGF 分泌能をヒト腎由来線維芽細胞 (HEK293cell)・低血清培養脂肪由来間葉系細胞・高血清培養脂肪由来間葉系細胞の3つで比較検討した。

B. 研究方法

(1) F344 雌 7 週齢ラットをペントバルビタールで麻酔後、開腹し膀胱を露出した後、膀胱壁内に GAX-collagen 100 μ l を注入して、day14・28・35・42・49・56・63・70 で屠殺した。組織はホルマリン固定・パラフィン包埋し、薄切後、HE・MT 染色を行い評価した。

(2) 低血清培養 (DMEM/MCDB201+2% FBS+10ng/ml FGF-2) ヒト脂肪由来間葉系細胞・高血清培養 (DMEM/MCDB201+20% FBS) ヒト脂肪由来間葉系細胞・ヒト腎由来線維芽細胞 (HEK293cell) のサイトカイン分泌の違いについて検討した。それぞれの細胞を 25cm² フラスコにて培養し、セミコンフルエントになった時点で培養液を 5ml の DMEM+10%FBS に交換した。24 時間後に培養上清を採取し、VEGF を ELISA 法にて測定した。同時にトリプシンにて細胞を剥がし、細胞数をカウントし、10⁶ 個当たりのサイトカイン分泌量で評価した。

(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定に準じて行った。

C. 研究結果

(1) 注入針については 23G・25G・27G・29G を試したが、25G より太いと膀胱壁を貫通してしまい、29G では注入時の抵抗が高く注入困難であった。組織学的検討の結果、day14 から day70 まで GAX-collagen は壁内に残存していた (図 1・2・3・4)。また、day70 までの組織のいずれにおいても、注入した GAX-collagen の周囲に炎症を思わせる細胞浸潤を認めなかった。

図 1. GAX コラーゲン注入 14 日、28 日目

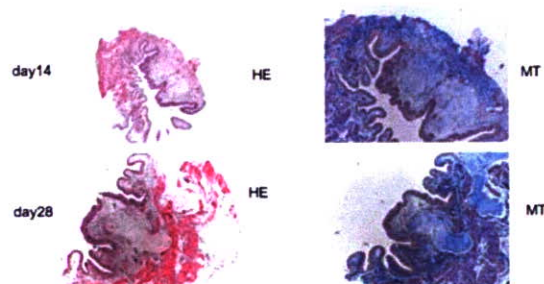


図 2. GAX コラーゲン注入 35 日、42 日目

