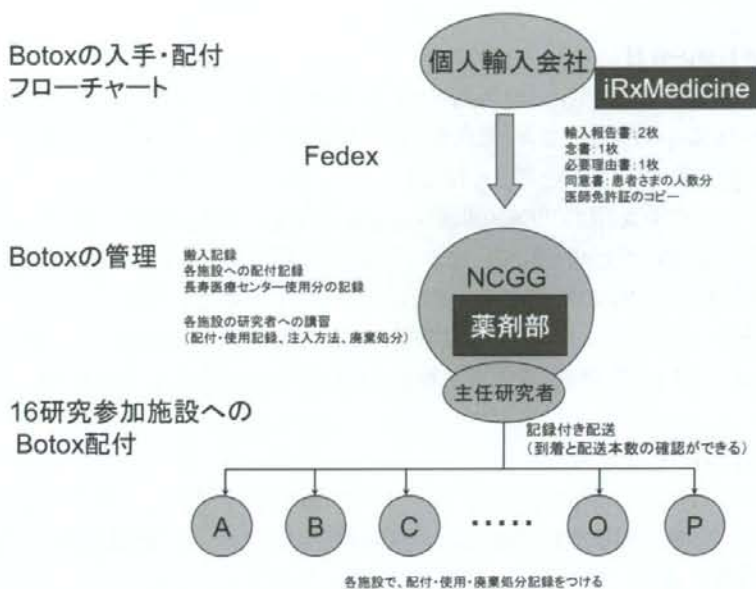


付録 1. ボトックスの入手・配付フローチャート



付録 2. ボトックスの送付・受領書

送 付 状 No. _____

送付年月日 _____

先生 _____

医薬品名	数量	発送方法
BOTOX(A型ボツトキシン毒素) 100U/1 amp	本	クール送付 クール宅配便

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原西30-3
 TEL (0562) 46-2311
 FAX (0562) 46-9329
 手続・発中医療部
 岡村 雅夫

送付先: FAX 0562-46-9329 No. _____

受 取 書

国立長寿医療センター
 手続・発中医療部
 岡村 雅夫 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型ボツトキシン毒素) 100U/1 amp	本	職名 _____ 氏名 _____ 印

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ています。日本ではボトックスは他の病気(眼瞼痙攣、片側顔面痙攣、痙性斜頸)の治療薬として正式に認可されている医薬品で、これまでにのべ5万人以上の方がボトックスによる治療を受けておられます。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箇所に変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を行います。

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。

私たちが調べ得た範囲では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でした。2000～2007年までに「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」に関して発表されている論文上での副作用は、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%)に認められました。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。他の病気でボトックスを使用した場合は、嘔気、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。全世界では、現在までに数百万例におよぶボトックスの治療が行われていますが、

2008年1月23日付けで米国の消費者団体 Public Citizen が「さまざまな疾患に対してボトックスを使用した結果 658 例の有害事象が報告され、そのうち 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」と発表しました。しかし、これまでの調査ではボトックスによる治療と死亡との因果関係がはっきりしているわけではありません。

一方、本邦においては、痙性斜頸の治験時に死亡例が 1 例報告されています。また、眼瞼痙攣 6,526 例、片側顔面痙攣 8,457 例、痙性斜頸 2,132 例における使用成績調査の結果では本剤との因果関係が完全には否定されない死亡例が 3 例報告されています。しかし、いずれの症例も情報不足等により被疑薬と死亡との因果関係は評価できておりません。この研究では、ものが飲み込みにくいといった誤嚥の可能性のある方を組み込まないようにしていますので、米国の消費者団体が指摘しているような嚥下障害・誤嚥性肺炎になる可能性は極めて低いと考えられます。

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 ヶ国以上で承認され、数百万例におよぶ治療が行われていますが、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かなくても、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。適応外でボトックスを使用するため、本研究においては、入院して行われる治療にかかる費用は研究費で

賄うか、病院が負担いたします。ただし、入院以外で受けていただく一連の検査にかかる費用は、患者さまに保険診療で負担して頂きます。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頂きます。診療に関して不適切な点があった場合には、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ります。

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歳以上の非神経因性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、または機能的尿失禁がある
 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 嚥下障害、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、研究参加医師が不適当と判断する

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ボトックス注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、ボ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、ボトックス注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	溶解後のボツリヌス毒素の量 (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：バイアルの破損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。

✕ボ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	100 ml			朝起きた時を記入
10:00	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	100 ml			どんな時に漏れがあったか、 詳細に記載する
6:00	100 ml			尿もれの程度を記載 少：下着が濡れる程度 中：下着を換える必要がある 大：スカートやズボンも換える 必要がある
8:00	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

研究要旨

本研究においてこれまでに積み上げてきた基礎データを基に、2009年1月23日より前立腺癌術後腹圧性尿失禁症例に対して、幹細胞分離装置を用いた臨床自己脂肪組織由来幹細胞治療（非培養法）を開始した。その開始にあたり、適応、臨床治療手順について検討したので報告する。

A. 研究目的

腹圧性尿失禁は、尿道括約筋機能の障害により、腹圧負荷時に尿が漏れるもので、女性においては妊娠・出産・加齢による骨盤底筋群の脆弱化や婦人科的手術による括約筋障害に起因し、本邦では約400万人の患者がいると推定されている。また、男性においては前立腺肥大症、前立腺癌の手術時の括約筋損傷により引き起こされ、女性に比べれば頻度は低いものの数万人の罹患者がいると推計されている。腹圧性尿失禁は直接生命にかかわることはまれであるが、日常生活の多くの領域で支障を及ぼし、生活の質を著しく障害する。本疾患の治療では、理学療法（骨盤底筋訓練）が初期治療として行われるが、中等症以上の例には無効である。外科的治療としては、TVT（Tension-free Vaginal Tape）手術が女性腹圧性尿失禁に対して広く行われ、良好な成績が得られているが、男性における腹圧性尿失禁に対しては本邦で行い得る有効な外科的治療がないのが現状である。低侵襲的外科的治療として、牛コラーゲン膀胱尿道注入治療が行われることがあるが、注入後数週間以内に吸収されるため1~3ヶ月以内に再発することから治療持続効果がなく、また前立腺手術後の

腹圧性尿失禁に対しては有効率自体が20%以下と不良である。さらに、牛組織由来のコラーゲンをを用いるため、伝達性海綿状脳症感の危険性が完全には否定できない欠点を有する。

本疾患は、罹患率が非常に高く、生活の質を障害するものであること、また低侵襲で治療効果の高い治療法が現存しないことから、低侵襲で、有効性の高い治療法の開発が急務である。腹圧性尿失禁に対する有望な低侵襲治療法として、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、特に自己骨格筋幹細胞から培養した myoblast と fibroblast の尿道注入治療は欧米において既に臨床応用が行われ、良好な治療成績が報告されつつある。しかし、幹細胞移植は GMP または ISO に基づいた設備や管理体制が必要であり、今後短期間に、多くの患者がどこでも受けられる治療に発展することが難しい。本研究では、細胞培養を必要としない自己脂肪組織由来幹細胞抽出方法を用いて、女性および男性腹圧性尿失禁に対する細胞治療を行い、各方法の効果と安全性を検討することを目的としている。研究を始めるにあたり、前立腺癌術後腹圧性尿失禁がよい対象であると

考えた。細胞分離装置 (Cytori Therapeutics, Inc.) を用いて、自己脂肪組織由来幹細胞を分離することにより、細胞培養法を用いることなく必要な脂肪組織由来幹細胞の移植を行うものである。

近年、脂肪組織中には骨、軟骨、脂肪、血管、平滑筋などへ分化する能力を有する細胞が多数含まれ、これらの細胞は血管内皮増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) などの血管新生を促す物質 (サイトカイン) を多く分泌することが明らかとなってきた。すでに腹圧性尿失禁症例に間葉系幹細胞 (myoblast) を尿道周囲に注入すると、尿失禁が改善することが報告されている。また間葉系幹細胞 (脂肪由来幹細胞) をラット尿道周囲に注入すると平滑筋分化することが報告されている。さらに、我々は脂肪由来幹細胞を腹圧性尿失禁ラットモデルの尿道周囲に投与により尿失禁が改善することを明らかにしていた。

ヒトにおいては脂肪組織が豊富に存在するために、比較的少量の脂肪組織採取が容易かつ安全に採取できることを利用し、本研究では、分離装置 (Cytori Therapeutics, Inc.) を用いて短時間に自己脂肪組織由来幹細胞を採取し、細胞注入治療を行うこととした。自己脂肪組織由来幹細胞採取装置を用いた cell banking については Cytori Therapeutics, Inc. が日本の薬事認可をすでに取得し装置の安全性は確保されている。また、この装置で使用している細胞分解酵素は collagenase と neural protenase の合剤であり、安全性は ISO10993 (ヨーロッパ CEMARK: 厚生労働省) で認められている。本装置を用いた自己脂肪組織由来幹細胞治療については、ヨーロッパでは循環器、日本 (九州大学) では乳房再建 (自己脂肪と採取脂肪組織由来幹細胞を混和) の臨床治療がすでに始まり (添付資料 7)、重篤な副作用は報告されておらず、さらに乳癌細胞と分離装置で採取した間質細胞を培養してもがん細胞の有意の増加はなく、が

ん細胞増殖を促進させないことが示されている。細胞の血中投与、皮下注入による重篤な合併症の危険性は極めて低いことも示され、これらの根拠を基に我々は前立腺癌術後腹圧性尿失禁症例に対して、細胞分離装置を用いた自己脂肪組織由来幹細胞治療における治療法、評価項目について検討したので報告する。

B. 臨床研究方法

治療方法

- [1] 治療は入院にて行う (3~4 日程度)。
- [2] 全身麻酔下、下腹部腹壁あるいは臀部より、脂肪吸引装置により脂肪組織 300 g を採取し、脂肪組織由来幹細胞採取装置を用いて、必要量の脂肪組織由来幹細胞を含む濃厚細胞液を精製する (約 50 ul)。
- [3] 採取した脂肪組織由来幹細胞と脂肪組織を混ぜて、10ml 液を作成し、膀胱頸部粘膜下に 2 ml x 2~5 箇所を注入し、膨隆により膀胱頸部が閉鎖するまで注入を行う。注入は、保険適応が定められている、標準的な牛コラーゲン膀胱尿道注入療法に準じ、注入用内視鏡を用いて経尿道的に行う。



評価の指標：

各群の治療前後の下記評価項目での比較を行う。

自覚的所見：治療前、治療後2週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月、21ヶ月、24ヶ月、以後6ヶ月ごとに5年間。

1) 尿失禁症状・QOLスコア (ICIQ-SF:

International Consultation Incontinence Questionnaire-Short Form)

尿失禁頻度、通常の尿失禁量、日常生活に対する影響をそれぞれスコア形式で聴取し、さらに尿失禁病因の自覚的評価のための質問4項目が設けられている。

2) 尿失禁QOLスコア (KHQ: King's Health Questionnaire)

妥当性の検証された尿失禁特異的なQOL質問票で、質問22項目が設けられている。

他覚所見：

1) 機能評価：

24時間パットテスト (治療前、治療後2週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、15ヶ月、18ヶ月、21ヶ月、24ヶ月、以後6ヶ月ごとに5年間。

尿流動態検査(尿道内圧測定、leak point pressure)

(治療前、治療後2週間、3ヶ月、6ヶ月、1年)

2) 画像評価：

膀胱鏡検査、MRI (矢状断像 脂肪強調画像) (治療前、治療後2週間、1年) 経膣または直腸的超音波検査

(治療前、治療後2週間、治療後3ヶ月、6ヶ月、1年)

3) 血液検査

血液学的検査 (治療前、治療翌日、治療

後1週間、1か月) 赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球数、血小板数

血液生化学検査 (治療前、治療翌日、治療後1週間、1か月)

総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、AST、ALT、ALP、CK、BUN、Cr、電解質 (Na、K、Cl、Ca)、CRP

(倫理面への配慮)

自己脂肪組織由来幹細胞を利用した腹圧性尿失禁治療の有用性に関する研究で名古屋大学医学部付属病院の倫理委員会(657)の承認を得た。

C. 研究の進捗状況

前立腺癌術後腹圧性尿失禁症例に対して、現在、2例に対して臨床自己脂肪組織由来幹細胞治療(非培養法)を行った。副作用なく、安全に施行でき、現時点では、経過観察は短いものの良好な結果を得ている。

D. 考察

脂肪組織は人体のなかでもっとも豊富かつ容易に幹細胞が採取できる組織であり、幹細胞の一般的な採取源である骨髄と比較すると、脂肪組織にはその100倍も幹細胞が含まれているとされている。ほとんどの幹細胞治療が数日間あるいは数週間の培養を必要とするなかで、脂肪組織からは、培養することなく必要十分量の細胞数を1回の外科処置の時間内で抽出することが可能である。これにより、医療機関や手術室の外に幹細胞を持ち出すことなく患者自身の幹細胞を採取し移植する、臨床下での“リアルタイム”治療が行える利点があるといえる。

脂肪組織には、体性幹細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞やその他さまざまな細胞型が含まれており、これらの細胞が異なる機序に

よって組織の治癒や修復において集散的に作用する可能性がある。このような機序には、損傷部位の血管再生を促進したり、細胞死する危険性のある損傷した細胞を生存させたり（抗アポトーシス）、また骨、軟骨、脂肪、骨格筋、平滑筋や心筋などのいくつかの組織型に分化する能力などがあげられる。

脂肪組織由来幹細胞の膀胱頸部粘膜内投与による治療効果は、以下に示す要因に基づいて生じる尿道閉鎖圧上昇であると考えている。

- 1) 注入細胞を含む瘤形成
- 2) 注入細胞の平滑筋への分化
- 3) 注入細胞からの高濃度 HGF 分泌
- 4) 平滑筋増殖、分化促進

E. 結論

前立腺癌術後腹圧性尿失禁症例に対して、幹細胞分離装置を用いた臨床自己脂肪組織由来幹細胞治療（非培養法）を開始した。その適応臨床治療の方法について、治療前に詳細な検討を行ったので報告した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 後藤百万、山本徳則 腎臓・膀胱微小循環と再生 unite 2008 35-36 2008
- 2) Imamura T, Yamamoto T, Ishizuka O, Gotoh M, Nishizuka O: Freeze-injured urinary bladders in mice provide a microenvironment for bone marrow-derived cells to regenerate smooth muscle layers tissue engineering. 2009, accepted

2. 学会発表

- 1) 渡辺達人、丸山彰一、松尾清一、山本徳則、後藤百万、ラット尿失禁モデルにおける低血清培養脂肪由来間葉系細胞を用

いた治療実験. 第 7 回日本再生医療学会
総会 名古屋 平成 20 年 3 月 13 日～14 日

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

研究要旨

これまでの基礎研究データを基に、2009年1月23日より前立腺癌術後腹圧性尿失禁症例に対して Cytori Therapeutics, Inc.の脂肪幹細胞分離装置を用いて、非培養法による自己脂肪組織由来幹細胞治療を開始した。幹細胞採取方法、細胞移植方法につき、さまざまな面から検討を行い、最適と考えられる治療の段取りを考案し、それに準じて行った動物実験では良好な結果が得られると確信するに至った。最終的に、「自己脂肪組織由来幹細胞を利用した腹圧性尿失禁治療の有用性に関する研究」として名古屋大学医学部附属病院の倫理委員会（657）の承認を得て治療を開始したわけである。現在、2例に行い、経過観察期間は短いが良好な結果が得られている。

A. 研究目的

これまでに行ってきた基礎研究データを基に、2009年1月23日より前立腺癌術後の腹圧性尿失禁症例に対して、幹細胞分離装置を用いた臨床自己脂肪組織由来幹細胞治療（非培養法）を開始した。今回行う治療は Cytori Therapeutics, Inc.の脂肪幹細胞分離装置を用いるため細胞培養を行う必要がない。この方法は、他の領域においても臨床試験が始められている。乳房部分切除後の変形、胸部非対称、組織欠損、痛みなどの後遺症の克服は乳ガン患者の QOL を維持する上で大変に重要な意義を有している。ヨーロッパにおいては、2008年、乳房部分切除後の Cell-Enhanced Reconstruction のための追加の臨床試験を実施された。

心臓治療に関しては前臨床研究データにおいて、脂肪組織由来幹細胞は血流欠損領域を減少させるいくつかの細胞機序により、心機能を改善させることが示唆されている。これらの細胞機序とは、血管新生（血管形成の促進）、抗アポトーシス（細胞死の防止）、新た

な心筋への分化、その他損傷部位と細胞による効果的な相互作用を含む。この中でも血管新生が心筋再生に対して一番効果的と考えられている。

腹圧性尿失禁に対しては、牛コラーゲン膀胱尿道注入法が行われてきたが、効果の持続期間が短い欠点があった。自己脂肪組織由来幹細胞を尿道周囲に注入することで、上記の機転による組織の修復・再生がおこなわれ、尿失禁が改善する可能性がある。今回、臨床脂肪由来幹細胞尿道周囲内注入方法について検討を行った。

B. 研究方法

実験1 脂肪組織由来幹細胞分離方法



図1. 脂肪組織由来幹細胞採取法

細胞外液を皮下に注入後、脂肪吸引チューブで皮下脂肪を細かく吸引する。次に、採取した脂肪組織 300g をもとに分離された細胞 260g を脂肪由来幹細胞分離装置 (Celution® 装置：図 1) に注入し、その幹細胞と混和する脂肪組織約 20g を洗浄する。この装置にはディスポーザブルセットが装着され、症例ごとに脂肪組織を処理される。脂肪由来幹細胞分離装置は脂肪基質から幹細胞を切り離す処理を行い、その際幹細胞を含む間質細胞は分離された後に洗浄、濃縮される。このリアルタイム処理は、汚染物質に接触するリスクを最小限にするために閉鎖環境で行われ、1回の外科処置の時間内で完結する。次に、移植するその幹細胞を装置からシリンジを使って採取する。

実験 2 分離した脂肪組織由来間質細胞の細胞特性解析方法

Nucleocounter (Chemometec 社製) 装置を用いて、全体の細胞をカウントし生体染色トリパンブルーで染色陽生細胞を死滅細胞として、variable cell の割合を解析する。その分離した細胞の特性を明らかにする。細胞計数装置 chemometec 社製 細胞培養 NucleoC 操作時間 1 分以内で、死細胞数、全細胞数、生存率の測定が可能である。

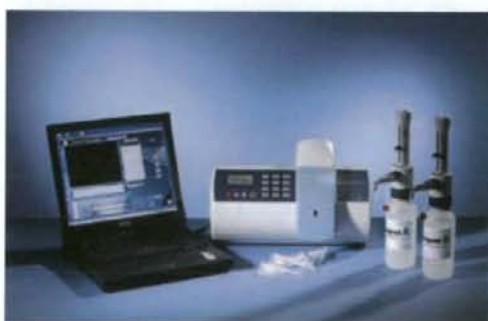


図 2. 細胞計数装置
chemometec 社製 細胞培養 NucleoC

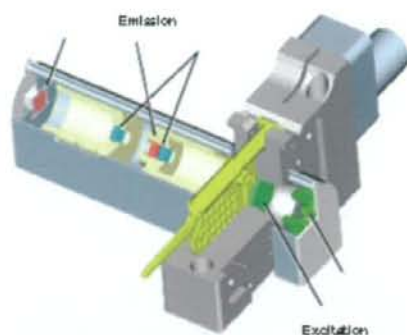


図 3. NucleoCounter TM 本体

蛍光顕微鏡+CCDカメラ搭載測定部を図3に示す。

蛍光顕微鏡と CCD カメラを内蔵しており、蛍光染色された細胞核数を約 30 秒で正確に測定する。この解析で死細胞数、全細胞数の測定が可能である。キャリブレーション、メンテナンスは不要で、廃液なし、排気なし、クリーンルームに適している。



図 4. NucleoCassette TM (専用サンプルカセット)

カセット内部には、ヨウ化プロピディウム (PI) が封入されており、サンプルの吸引と同時に細胞核の染色が行われる (図 4)。

吸引したサンプルは、測定後もカセット内に封入されたままですので、廃液が出なく、カセット使用後、そのまま廃棄できる。