

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3702330号
(P3702330)

(45) 発行日 平成17年10月5日(2005.10.5)

(24) 登録日 平成17年7月29日(2005.7.29)

(51) Int. Cl.⁷ F I
A 6 1 K 41/00 A 6 1 K 41/00
A 6 1 K 45/00 A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 37/06 A 6 1 P 37/06

請求項の数 18 (全 15 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平8-521344 (86) (22) 出願日 平成8年1月12日(1996.1.12) (65) 公表番号 特表2001-526623(P2001-526623A) (43) 公表日 平成13年12月18日(2001.12.18) (86) 国際出願番号 PCT/CA1996/000019 (87) 国際公開番号 W01996/021466 (87) 国際公開日 平成8年7月18日(1996.7.18) 審査請求日 平成11年2月10日(1999.2.10) (31) 優先権主張番号 08/371,707 (32) 優先日 平成7年1月13日(1995.1.13) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 キュー エル ティー インク. カナダ国 ブイ5ティー 4ティー5 ブ リティッシュ コロンビア州 バンクーバ ー グレイト ノーザン ウェイ 887</p> <p>(73) 特許権者 ユニバーシティ オブ ブリティッシュ コロンビア カナダ、V6T 1W5、ブリティッシュ コロンビア、バンクーバー、ヘルス サ イエンスイズ モール 2194、IRC 331</p> <p>(74) 代理人 弁理士 加藤 朝道</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移植の拒絶を防止する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原提示細胞(APC's)を含有するドナーの組織を含む同種異系移植片の拒絶を減少させることに使用するための医薬組成物であって、露光による活性化において、当該APC'sに非細胞毒性効果を及ぼす量の光感作剤を含むことを特徴とする、医薬組成物。

【請求項2】

ドナーの組織が皮膚組織又は膵島(pancreatic islets)である請求項1記載の組成物。

【請求項3】

当該光感作剤がBPDである請求項1記載の組成物。

【請求項4】

当該露光による活性化が電磁スペクトルの可視部に存する光の少なくとも幾つかの波長の光を用いる請求項1記載の組成物。

【請求項5】

当該光感作剤が0.25から1.0 μg/mLの濃度範囲の溶液の形態にある請求項1記載の組成物。

【請求項6】

当該光感作剤が標的-特異性成分を含む接合体の形態にある請求項1記載の組成物。

【請求項7】

当該標的特異性薬剤がAPC'sに特異的に結合する薬剤を含む請求項6記載の組成物。

【請求項8】

10

20

当該標的-特異性薬剤が、抗体、その断片(fragment)、又はAPC'sの表面に存するレセプターのためのレセプターリガンドである請求項6記載の組成物。

【請求項9】

当該標的-特異性薬剤が、次にAPC'sに特異的に結合する標識と結合する薬剤を含む請求項6記載の組成物。

【請求項10】

露光による活性化において抗原提示細胞(APC's)に非細胞毒性効果を及ぼす光感作剤を含み、当該APC'sを含有するドナーの組織を含む同種異系移植片の拒絶を減少させる方法に使用される医薬の製造における請求項1~9の何れか一項記載の医薬組成物の使用。

【請求項11】

前記方法が、

(1)ドナーの組織を前記組成物と接触して修飾されたドナーの組織を取得し；そして
(2)当該修飾されたドナーの組織を、ドナーの組織中の当該APC'sに細胞毒性効果なしに免疫原性を減少させるに十分な時間当該光感作剤により吸収される波長を有する光に曝すことを含む方法である、請求項10記載の使用。

【請求項12】

当該光に曝す工程の間、当該修飾されたドナーの組織が電解質溶液中に吊され(suspended)ている請求項11記載の使用。

【請求項13】

当該光に曝す工程の間、当該光の線量が約 10 J / cm^2 である請求項11に記載の使用

【請求項14】

当該光が電磁スペクトルの可視部に存する光の波長を含む請求項11に記載の使用。

【請求項15】

抗原提示細胞(APC's)に対する細胞毒性なしにドナーの組織の免疫原性を減少させることにより、当該APC'sを含有する当該ドナーの組織を含む同種異系移植片の拒絶を減少させるためのインビトロの方法であって、

(1)ドナーの組織を当該光感作剤と接触して修飾されたドナーの組織を取得し；
(2)当該修飾されたドナーの組織を、ドナーの組織中のAPC'sを消耗させるに十分な時間当該光感作剤により吸収される波長を有する光に曝すことを含む方法。

【請求項16】

請求項15記載の方法により製造され、減少した感受性の同種異系移植片拒絶を有するドナーの組織。

【請求項17】

露光による活性化において抗原提示細胞(APC's)に非細胞毒性効果を及ぼす光感作剤を含む接合体と、混合状態で当該APC'sを含有するドナーの組織を含む、同種異系移植片の拒絶を減少させるために用いる組成物。

【請求項18】

当該接合体がドナーの組織中のAPC'sに対して標的にする効果を示すことができる標的-特異性薬剤を同様に含む請求項17に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、治療において同種異系移植片を供給する方法及びレシピエント(recipient)による同種異系移植片の拒絶の防止に関する。特に、抗原提示細胞の組織を消耗させ、そこに存在する細胞の免疫原性を減少させる光力学的治療技術を使用したドナー(donor)の組織の処置に関する。

背景技術

宿主への同種異系移植片(allograft)の移植の成功は、外来性のレシピエントにより認識され拒絶反応を誘起し得る移植組織に存する抗原、拒絶を媒介するレシピエント免疫系に存する細胞、及び外来性抗原の提示又は細胞性応答の何れかを修飾する反応のような因

10

20

30

40

50

子に依存する。同種異系移植片拒絶の重要な構成成分はドナーの組織中における非-実質細胞（パッセンジャー白血球）の存在によるということが知られている。

主要組織適合性複合体（MHC）の生産物はレシピエントに対する移植組織による攻撃を媒介する際重要な役割を果たすことが同様に知られている。そのMHCは、それが多くの異なる遺伝子座を包含し、その各々は別々の細胞-表面抗原をコードし、かつその遺伝子座は広範な多型性を有するので、通常は複合体である。MHCの遺伝子座は二つのクラス、その組織の分布、発現する抗原及びその機能に基づくクラスI又はクラスIIの一つに含まれる。クラスI抗原は全ての有核細胞に存し、細胞障害性T（CD8⁺）リンパ球の第一次標的として活動する。クラスII抗原は広く組織中に分布されておらず、ヘルパーT（CD8⁻）リンパ球のための第一次標的として活動する。

10

ヒト白血球抗原（HLA）の個々の遺伝子座の多型性の形態、ヒトのMHCは、抗体により、又T-リンパ球の認識を測定する種々のインビトロの技術により認識されてきた。ドナー中の多型性のレシピエントの認識により媒介されるこれ等の応答は、インビトロで生ずる強力な拒絶反応と相関する。インビトロ及びインビボの両方の研究を用いての、移植片拒絶の細胞原理の研究により、CD4⁺及びCD8⁺リンパ球の両方が拒絶応答に関わっていることが明らかになった。

実験モデル及び医学の実務の両方において、同種異系移植片及び異種移植片の生存を延ばす試みが主としてレシピエントの免疫機構の抑制に集約されてきた。この処置は、その目的として予防的免疫抑制及び/又は移植片拒絶の処置を有する。

免疫抑制のために使用される薬剤は、細胞毒性の薬剤、代謝拮抗剤、副腎皮質ステロイド、及び抗リンパ球血清を含む。予防的免疫抑制に特に効果的に見出される非特異性免疫抑制剤（アザチオプリン、プロモクリプチン、メチルプレドニソロン [methylprednisolone]、プレドニソン [prednisone]、及びサイクロスポリンA）は、移植の臨床上の成功をかなり高めてきた。腎臓移植後のサイクロスポリンAの腎毒性は、プレドニソロンのようなステロイド又はアザチオプリンと組合せたプレドニソロンの同時投与により減少してきている。更に、腎臓は、抗-リンパ球グロブリン及びこれに続くサイクロスポリンAを用いて移植が成功してきた。他の手順は、移植前のレシピエントの全リンパ球の露光、及びこれに続く移植後の最小の免疫抑制である。拒絶に対する処置は、ステロイド、2-アミノ-6-アリール-5-置換ピリミジン、異種抗-リンパ球グロブリン、及び種々の白血球集団に対するモノクローナル抗体の使用を含んでいる。

20

30

免疫抑制剤の主な合併症は感染症である。更に、全身的な免疫抑制は好ましくない毒性作用を伴い、例えばサイクロスポリンAが腎臓移植後に使用されるときに腎毒性、及び造血幹細胞レベルの低下が起こる。免疫抑制剤は、同様に肥満、傷治癒の低下、ステロイド低血糖、ステロイド精神病、白血球減少症、消化管出血、リンパ腫、及び高血圧症に導く。これ等の合併症に鑑み、移植免疫学者は、ドナーの同種異系抗原に対する応答のみが失われるように、抗原-特異的手法における免疫応答性を抑制する方法を探究してきた。そのような特異的免疫抑制は一般的には移植される組織の抗原性又は拒絶を媒介することができる特異的細胞のどちらかを修飾することにより達成されてきた。ある事例では、抗原が免疫系に提示される様相に応じて免疫性又は耐性のどちらかが誘起される。他の抗-拒絶戦略は、移植以前のドナーの組織中に存するMHC-保持パッセンジャー白血球、例えば抗原-提示細胞（“APC's”）の除去又は減衰に向けられてきた。

40

この目的のために報告されてきた技術として、ドナーの組織を培養する時間を延長したものの（Lafferty et al., “Thyroid Allograft Immunogenicity is Reduced after a Period in Organ Culture”, *Science*, 188:259(1975)）を含む。移植前の組織培養の成長により同種異系移植を前処置することが、二つのマウスモデル系で見出されてMHC障害を越えて永久的な許容に導いた（Lafferty et al., *Transplantation*, 22:138-49(1976); Bowen et al., *Lancet*, 2:585-86(1979)）。

そのような処置が結果としてパッセンジャーリンパ球細胞の減衰になり、それ故に組織免疫性に必要な刺激細胞集団の欠如となるとの仮説がなされてきた。例えば、幾つかのドナー-レシピエントHLA適合が、例えば血管及び腎臓移植において、かつ時々輸血の前に使

50

用された。

ドナーの組織は、TGF-ベータのような成長因子で (Czarniecki等の米国特許第5,135,915号、1992年8月4日発行)、時々延長される培養時間のいくつかの組合せで (Orton,の米国特許第5,192,312号、1993年3月9日発行) 処置されてきた。

ドナーの組織は、紫外線で (Reemtsma等の米国特許第4,946,438号、1990年8月7日発行 ; 及びLau et al., " Prolongation of Rat Islet Allograft Survival by Direct Ultraviolet Irradiation of the Graft, Science, 223:607(1984))、時々マイクロカプセル化体との接合体で (Weber等の米国特許第5,227,298号、1993年7月13日発行) 処置されることもできる。他の研究者は、Cochrumによる1987年9月29日発行の米国特許第4,696,286号に教示される第一の非-細胞毒性層膜及び生体適合性半透膜状ポリマー物質の第二の外層を含む二重層のような隔膜のみを使用した。

10

ドナーの組織は、広範囲の種類物質、例えばHewitt等の1991年2月26日発行の米国特許第4,996,193号に開示されているような皮膚移植に対するサイクロスポリンの局所的適用やJones等の1981年10月13日発行の米国特許第4,294,824号に開示されているようなリンパ性ケイロンでのドナーの腎臓の灌流で処置された。皮膚移植の生存期間は、実験動物に移植する前にコルチゾン、サリドマイド、又はウレタンでインビトロの処置により延長された。皮膚に局所的に適用される薬剤の量は、通常レシピエントに全身的に薬剤を投与することによる類似の効果を達成するのに要求される量よりも少ない。ドナーの皮膚は、移植される皮膚の抗原性を減少するために移植の前にストレプトキナーゼ/ストレプトドルナーゼ、レシピエントのRNA及びDNA製剤、又はグルタルアルデヒド溶液を用いてインビトロ

20

で処置された。より高級な取組は、ドナーの組織を補体とともにMHCに生産物に対するモノクローナル抗体での処置 (Faustman et al., " Prolongation of Murine Islet Allograft Survival by Pretreatment of Islets with Antibody Directly to Ia Determinants " , Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78, :5156(1981))、又はMHCに対する抗体の免疫複合体によるドナー組織の処置 (Shizuru, J.A., et al., " Inhibition of Rat Mixed Lymphocyte Pancreatic Islet Cultures with Anti-Ia Immunotoxin " , Transplantation, 42:660(1986)) を含んでいた。可変性の結果がこれ等の方法により得られた。故に、毒性及び免疫抑制剤の大量投与の使用から生じる他の副作用を最小化する移植の手法における移植片の生存を延長する方法のための技術が必要である。

30

これ等のAPC細胞を選択的に破壊するために本発明で採用される技術は、ドナーの組織を光感作物質と接触し、続いて光に曝し、その後移植することを含む。類似の光力学的方法は、以前から腫瘍組織、アテローム斑、表皮疾患、及び血液の病原体のような組織を破壊するために第一次的に使用されてきた (Levy等、米国特許第5,283,255号1994年2月1日発行 ; 第4,883,790号1989年11月28日発行 ; 第4,920,143号1990年4月24日発行 ; 第5,095,030号1992年3月10日発行 ; 及び第5,171,749号1992年12月15日発行参照。これ等の開示はここに参考により組み込まれる。)。又、同様にDougherty等の米国特許 : 1990年6月12日発行の第4,932,934号 ; 1989年12月26日発行の第4,889,129号 ; 1991年7月2日発行の第5,028,621号 ; 1989年9月12日発行の第4,866,168号 ; 1992年9月8日発行の第4,145,863号 ; 及び1987年3月10日発行の第4,649,151号の各米国特許が参考とされ、これ等も同様に参考によりこ

40

こに組み込まれる。例えば、Dougherty等の米国特許 : 第4,866,168号は、商標「Photofrin II」の下で販売され、ヘマトポルフィリン誘導体の高凝集性-分子量部分を回収することにより取得される組成物を開示する。他の特殊な例として、Levy等、米国特許第4,883,790号は、類似の目的のために“モノヒドロベンゾポルフィリン”として指定される一群の関連化合物の使用を開示する。

更に、類似構造の多種多様な光感作物質の使用が記載されている。例えば、(1 - ヒドロキシエチル) デューテロポルフィリン、疎水性ヘマトポルフィリンエーテル、及びメチルフェオフォルビド (methylpheophorbide) から調製される化合物 (Pandey等の1991年3月26日発行の米国特許第5,002,962号) ; ピロフェオフォルビド (pyropheophorbide) 接合体

50

(Pandey等の米国特許第5,314,905号) ; バクテリオクロロフィル-誘導体 (Doughertyの米国特許 : 第5,171,741号及び5,173,504号参照) ; モノビニル及びジビニルエーテル-結合二量体 (Wardの米国特許第4,961,920号) ; ベンゾポルフィリン誘導体 (Allison等の米国特許第5,214,036号参照) ; ジベンゾポルフィリン化合物 (Dolphin等の米国特許第5,308,608号及び第5,149,708号参照) ; モノベンゾポルフィリン誘導体のようないわゆる “ 緑色 ” ポルフィリン (Jamieson等の米国特許第5,087,636号参照) ; 環外の二重結合を有するポルフィリン化合物 (Chang等の米国特許第5,064,952号参照) ; 及びポルフィマー (porphimer) ナトリウム組成物 (Clauss等の米国特許第5,244,914号参照) が参照される。全てのこれ等の特許の開示は参考により、ここに (本明細書中に) 組み込まれる。一般的に、これ等の薬剤は、最初の概算としては、光力学的治療に関するその用途において可換性

10

であるとみなされている。光力学的治療は、第一に腫瘍細胞の治療に関心があるが、追加の応用が以前から示されていた。例えば、これ等の光感作性薬剤はアテローム斑を取り除く手順や、感染した組織体を破壊するための血液及び他の体液の治療に使用され得る。しかしながら、光力学的治療は、ドナーの同種異系移植組織におけるパッセンジャー白血球を根絶するために、明らかにこれまで使用されたことがない。

生物組織体への光感作剤の投与に関する治療法と異なり、ドナーの組織が実際の移植の手術以前にインビトロで最適に処置され得ることが本発明の特に有利な点である。この方法で、例えば組織体内で標的細胞と結び付く接合体の露光の適当なレベルを確保することに伴って生じる問題が未然に除去される。

20

更に、本発明の方法は、結果として適当な宿主中では免疫的に安定で、生物学的機能を有し、移植以前に保存されることが出来る移植片ということになる。故に、本発明は、短期間の保存に使用され得る光力学的に処置された移植片のバンクの設立を可能にする。

発明の開示

本発明は動物体における移植の拒絶を最小化する方法を提供する。移植の前に、抗原-提示細胞 (APC's) を含有するドナーの組織は、光感作剤と接触されてAPC'sを消耗するに十分な時間、光感作剤により吸収される波長を有する光に曝される。この処置はケラチン生成細胞を殺さないが、それらが分泌するサイトカインと同様そのクラスI及び/又はクラスII抗原の発現を変化させ、その結果皮膚自体の免疫原性が低下する。

一つの実施態様では、光感作剤は光感作剤と標的APC's間の相互作用を増大する標的-特異性成分を含む接合体の形態にある。光感作を起こす薬剤は、同種異系移植片が光感作剤により吸収される適当な波長において露光される時、APC'sの破壊を媒介する。

30

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明における光感作剤として特に有用なBPD化合物の構造を示す。

発明の実施態様

下記に記載される本発明に従って、ドナー組織の移植以前に、それは光感作剤と接触される。“ ドナー組織 (donor tissue) ” という用語は、APC'sを含有するレシピエント以外のドナーからの如何なるタイプの移植可能な (transplantable or implantable) 組織を包含する。本発明に使用されているドナーの組織は、広範囲の種類の種類組織の何れか一つでよく、例えば生まれたての羊膜、骨髄、造血前駆体細胞、コラーゲン、及び軟骨の成長を刺激する骨蛋白のような柔らかい組織 ; 皮膚、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、甲状腺突出部、肺臓、腎臓、管状器官 (例えば、腸、血管、又は食道) のような器官 ; 及び心臓弁及び膵臓の膵島細胞又は肝臓細胞のような分離された細胞又は細胞集団のような器官の一部が含まれる。

40

管状器官は、食道、血管、又は胆管の障害を受けた部位を交換するのに使用され得る。皮膚移植片はやけどのみならず、障害を受けた腸のドレッシング (dressing) のために、又は横隔膜ヘルニアのようなある特定の欠損を閉鎖するためにも使用されることが出来る。特に好ましい実施態様では、ドナーの組織は皮膚組織又は膵島 (pancreatic islet) の細胞である。

ここで使用される “ 移植片 (graft) ” という用語は、レシピエントへの移植のためのド

50

ナーに由来する生体物質を意味する。“移植 (transplant)” という用語及びその変形体は、レシピエントへの移植片の挿入を意味するが、移植すること (Transplantation) は、同系 (syngeneic) (ドナー及びレシピエントが遺伝学的に同一である場合)、同種異系 (allogeneic) (ドナー及びレシピエントが異なる遺伝子的起源を有するが同種 (species) である場合)、又は異種系 (xenogeneic) (ドナー及びレシピエントが異なる種 (species) である場合) の何れかである。故に、典型的な筋書きでは、宿主はヒトであり、移植片は、同一又は異なる遺伝子的起源のヒト由来の同系移植片である。もう一つの筋書きでは、移植片はそれが移植されるものとは異なる種から由来するもので、これは系統的に広く分かれた種からの動物、例えばヒト宿主へ移植されているヒトの心臓を含んでいる。

10

ドナーの組織は、如何なる原料からも取得可能で、死体からでも生存するドナーからでもよい。適当なドナーの例は、実験動物、例えば犬、猫、マウス、ラット、スナネズミ、モルモット、牛、霊長目の動物、又は人間のような生きた動物を含む。ドナーは人間を含むほ乳動物が好ましい。

ヒトのドナーは、交差性の主要血液群障壁が同種異系移植片の生存を害するので、健康診断で正常で同一の主要 A B O 血液群である任意の血縁関係のドナーであることが望ましい。しかしながら、例えば O 型ドナーの腎臓を A, B、又は A B 型のレシピエントへ移植することは可能である。

“同種異系移植片 (Allograft)” という用語は、レシピエントと同じ種のドナーに起源を有するか、由来する細胞及び組織を意味する。ドナーはレシピエントと同じ種であることが好ましい。

20

ここで使用される“レシピエント (recipient)” という用語は、何れかの適合性を有する移植宿主のことを意味する。可能性のある有用なレシピエントの例は、動物、好ましくは、家畜、例えば馬、牛又は羊；家庭用ペット、例えば犬又は猫；実験動物、例えばマウス、ラット、スナネズミ又はモルモット；又は霊長目の動物、例えば類人猿又は人間のようなほ乳動物を含む。最も好ましくは、レシピエントは人間である。移植片のドナー及び宿主の両方がヒトであるときは、それ等は組織適合性を改善するように HLA クラス II 抗原のために好ましく調和する。

光感作剤

一般的に、古典的な光学的治療において有用な多種の化合物の何れか一つが本発明における使用に適している。この分野の通常の技術を有する者に知られているように、主要なクラスの公知光感作剤はポルフィリン関連化合物である。幾らかは詳細に上記した如く、これ等の薬剤は、ヘマトポルフィリン誘導體；光感作性組成物及びその活性成分フォートフリン II (Photofrin II) として市販されているトヘマトポルフィリン誘導體の高分子量画分；同様にベンゾポルフィリン-誘導體 (BPD 又は BPD's) と呼ばれているモノヒドロベンゾポルフィリンのようなポルフィリンの種々の合成誘導體；緑色ポルフィリン；及び種々の他の多環式化合物が、露光されるとき一重項酸素を発生し、故に組織を破壊すると信じられている。適当な光感作性の化合物の調製方法は上記に記載の特許やその中で引用されている刊行物に十分開示されている。好ましくは、光感作剤は BPD である。

30

原則として、何れかの光感作剤の重要な特徴は、それが光感作物質により吸収されることができる波長の光に曝される時、局在化される細胞に対する細胞毒性効果を示すというその性質にある。多くの例で細胞毒性効果は露光に際して一重項酸素の形成の結果であると信じられているが、作用の正確な態様は本発明にとって重要ではない。

40

前記 Dougherty 等の特許においてある長さ検討されたように、多くの付加的特性が効果的光感作剤と典型的に結びついている。本発明の実施において特に重要である通常的光感作物質の性質の中には、光化学作用の欠如における細胞に対する細胞毒性の相対的欠乏、及び特定の細胞と光感作物質との間での標的-特異性相互作用の欠乏における組織からの迅速な解除がある。

本発明の実際の特に重要な一般的な光感作物質の性質の中には、特定の細胞と光感作物質との間での標的-特異性相互作用がない組織からの光化学作用及び迅速な解除がない比較

50

的細胞に対する毒性がない。

本発明の光感作剤は、350nmから1200nmの間の領域の波長内にある吸収スペクトルを好ましくは有するが、この吸収スペクトルはそれ自体公知の方法で目的とする透過に合わせることができる。そして、好ましくは400nmから900nm、及び最も好ましくは600nmから800nmの間である。

本発明の光感作剤は、移植及び治療される障害の性質、ドナーの種、個々のレシピエントの医学的状態、ドナーの組織中又はレシピエントの体内中に存する如何なる他の薬剤、及び医師に知られているその他の要素を考慮して正しい医療行為に適合した方法で投与される。移植片に接触するために使用される光感作物質の治療上の有効量は、移植片の免疫原性を減少せしめてレシピエントと適合し拒絶されないようにするのに効果を有する量である。この目的のために通常の有効量は、約0.1から約10 μ g/mL、好ましくは約0.1から約2.0 μ g/mL、及び最も好ましくは約0.25から約1.0 μ g/mLの範囲に存する。

10

光感作剤は、移植片に対する免疫抑制効果を増大する免疫抑制剤の一つ又は二つ以上と結合することができる。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する光感作剤の量、移植のタイプ、移植の原因、供給部位 (site of delivery)、投与方法、投与の計画、上記に検討された他の要素、及び医師に知られているその他の要素に依存する。

典型的には、光感作剤は、室温、適切なpH値、及び目的とする純度で、一つ又は二つ以上の医学上許容される担体、即ち採用される投与量及び濃度でレシピエントに対して非毒性である担体とともに、それを混合することにより製剤化される。製剤のpH値は、特定の用途、及び光感作物質の濃度とに主として依存するが、好ましくは約3から約8のどこかの範囲である。

20

好ましくは、光感作物質は、pH値が生理学的水準に接近すると発生するようなその中の含有物への付着を防止し、かつ光感作物質の活性化を確保するために中性のpH値 (例えば、約6.5から約7.5) に維持される。従って、pH値6.5に調整された塩による緩衝液を含有するが、ウシ胎児血清 ("FBS") を含有しない電解質溶液中での製剤化が適切な実施態様である。FBSが除去される理由は、同種異系移植片の反応を憎悪させる抗原成分をそれが含むからである。移植片が処置されている容器に光感作剤が付着する場合、ヒト血清アルブミンのような適当な非抗原性成分が、処置される移植片に灌流し又は付着する光感作剤と相互作用を起こさない量で任意的に添加される。

光感作剤の製剤が局所的に適用される場合、例えば移植以前に皮膚移植片に塗布される場合、非粘性の溶液よりも寧ろゲルのような粘性のある溶液を使用するのが好ましい。ゲルは、例えば光感作剤の溶液と多糖、好ましくは水溶性多糖、例えばヒアルロン酸、澱粉、及びセルロース誘導体、例えばメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、及びカルボキシメチルセルロースのようなゲル化剤を混合することにより調製されることができる。多糖がゲル製剤中に存在する場合、通常存在する量は約1-90のゲル重量%、より好ましくは約1-20%の範囲に存する。この目的のための他の適当な多糖の例、及び多糖の溶解性の測定は、1988年5月11日発行の欧州特許 (EP) 267,015号明細書に見出され、この開示は参考によりここに組み込まれる。

30

処置される移植片がある期間保存される場合、光感作剤は、好ましくはフッ素置換化合物のエマルジョン (血液代替物として使用) 中に製剤化又は添加されて移植片に到達する高濃度の酸素を可能にする。そのようなエマルジョンは、水中界面活性剤で乳化されるフッ素置換デカリン及び/又はフッ素置換トリプロピルアミンを含む。フッ素置換化合物はレシピエントに対して最も毒性が少なくなるように選択される。

40

適当な界面活性剤はポロキサマー (poloxamer) 界面活性剤を含み、これはエチレンオキサイドとプロピレンオキサイドのブロック共重合体である一連の分子を表し、単独又は卵のレシチンのようなリン脂質と混合されている。他の例のミドリ十字社 (Green Cross) から販売、購入可能なエマルジョンは、フルオゾル-ディーエー (Fluosol-DA) 20%で、これはポロキサマー界面活性剤、プルロニック (Pluronic) F-68で乳化されたフッ素置換デカリン及びフッ素置換トリプロピルアミンを含有する。フッ素置換化合物のエマルジョン及びそのほ乳動物における効果は、Bollands et al., *J.Pharm.Pharmacol.*, 39:1021-102

50

4(1987)により十分に記載され、この開示はここに(本明細書中に)参考により組み込まれる。

治療上の投与に使用される光感作物質の製剤化は、好ましくは無菌性である。無菌性にするには、薄膜(0.2ミクロン)を通過する無菌濾過により容易に達成される。一度製剤化し無菌化にすると、光感作物質は酸化的な変成に対して安定ではない。しかしながら、例えばBPDを含有する再構成のための凍結乾燥製剤は、保存に適している。

標的系

移植片-対-宿主反応を開始するドナーの組織の機能を破壊する場合のこれ等の光感作物質の使用は、標的-特異性薬剤への光感作物質の接合体により増強される。特に、光感作物質は、(1)ドナーの組織中の抗原-提示細胞(antigen-presenting cells [APC's])を直接特異的に標的にする部分；(2)その接合体により標的にするAPC'sを標識する媒介物質を特異的に標的にする部分；又は(3)宿主の場所に対し移植するT-細胞に結合されることができる。いずれの場合も、一度ドナーの組織がその接合体との相互作用により修飾された場合、それ自体公知の方法でドナーの組織中のAPC's群の実質的な消耗を果たすようにそれは露光される。

本発明は、一般的に光力学的治療(photodynamic therapy: [“PDT”])によりドナーの組織中のAPC'sを破壊する方法と同様、同種異系のドナーの組織中のAPC'sを標的にするのに有用な、特定の光感作物質-含有接合体を提供する。本方法において有用な一つの製剤は、実質的に光感作物質及び“ホーミング剤(homing agent)”を光感作物質と結合する系により構成される。もう一つの製剤は、APC-標的系及びAPC-標的系のためのホーミング剤と結合される光感作物質の組合せを含む。どちらの製剤とも、光感作物質の薬剤をAPC'sに供給するという最終の目的は同じである。

標的にされるAPC'sは、MHC糖蛋白質生産物及びこれ等細胞がレセプターを保持するリンホカイン因子に免疫特異的な部分を含む種々異なるタイプの標的-特異性薬剤により接近(アクセス)されることができる。典型的には、MHC糖蛋白質との反応のためには、これ等の糖蛋白質に対して生じる抗体、ポリゴナル(polygonal)又はモノクローナルのどちらかが使用されることができる。

ポリクローナル抗血清は、常法により、例えば適当なほ乳動物に目的とされる抗体に対する抗原を注射し、その抗原に対する血清中の抗体のレベルを測定し、その後その力価が高いとき抗-血清を調製することにより、製造される。モノクローナル抗体の製剤は、同様に常法により、例えばKoehler及びMilsten, “Nature, Vol 256, pp. 495-497(1975), “Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity” 及びEuropean Journal of Immunol., Vol 6, pp511-519(1976) “Derivation of Specific Antibody-Producing Tissue Culture and Tumor Lines by Cell Fusion”

の方法により製造される。

この方法は、例えば、免疫化された動物からの末梢血リンパ球又は脾臓細胞を使用して、これら細胞をウイルス感染、骨髄腫との融合、又は他の簡便な手法によって不活化し、次に単離されたコロニーにより目的とする抗体の生産のためのスクリーニングを行うものである。

抗体の他に、Fab、Fab'、又はF(ab)₂フラグメントのような適当な免疫反応性のフラグメントが同様に採用されることができる。標的にするメカニズムを形成するための使用に適した多くの抗体が、既にこの分野で入手可能である。例えば、全ての抗体の代用として免疫学的反応性のフラグメントの使用が、E.L.Morgan et al., Scand. J. Immunol., Vol 10, pp. 395-402(1979), “Comparison of the Binding of Radiolabelled Human IgG and Fc Fragments to Murine Spleen Cells” 及びHans P.Kocher et al., The Journal of Immunol., Vol 122, No. 4, pp. 1190-1195(1979), “Tryptic Degradation of the CH1 and VL Regions of Ogd and IgE1” .

により記載される。

免疫反応性に加えて、標的にすることがAPC細胞表面のレセプターを標的にするレセプターリガンドを、例えばレセプターとリガンド間の輪郭線又は電荷像の相補性に基づいて使

10

20

30

40

50

用することにより成し遂げられることができる。ここで使用されるように、“レセプターリガンド (receptor ligand)” という用語は、APC細胞表面のレセプターに特異的に結合する天然又は合成の如何なる物質をも意味する。これ等のレセプターリガンドはリンホカイン因子、例えばIL-2を含む。

本発明の特定の実施態様に従って、光感作剤は、次にAPCに対して特異的である媒介物のための標的-特異性薬剤と結合される。例えば、Iaを提示するラット細胞の場合、マウス抗-ラットIa抗体は媒介物として使用されることができる。この場合、抗-マウス抗体に結合される光感作剤の接合体は、抗-ラットIa抗体を含む接合体が直接行うのと正確に同様の方法でマウス抗体で標識される細胞を標的とするはずである。

接合方法

標的系を通常の方法を用いて、直接光感作剤に接合されることができる。これは一般に知られている技術であり、前述のLevy et al.特許の実施例に記述されている。

Ig及び他のポリペプチドのようなタンパク質に対する直接共有結合は、光感作剤と例えばカルボジイミドのような脱水剤を用いる標的-特異的構成成分との間に影響されるかもしれない。接合体の活性成分は、勿論、二機能性であり、2つの活性構成成分のそれぞれに共有結合できるリンカー化合物を用いて接合されてもよい。

2つの化学的部分 (Chemical moiety) を結合する適切な技術において知られている効果的な技術は、本発明の領域に入る。リンカー部分は、その技術での共有結合又は標準の技術に用いられるものからの推測されるものが広範囲に解釈される。

代わりに、標的物を付加的な特異的薬剤により媒介することができる。例えば、下記に説明されるように、APC's特異的抗体に配向する2次抗体は直接的に光感作剤に結合されても良く、MHC-糖蛋白質標的剤を免疫接合体と標的細胞との間の架橋として用いても良い。

処理手順

本発明による、APC'sの除去又は機能減衰、又はケラチノサイトのような他の皮膚細胞の調節は、供与組織が光感作剤と直接接触することにより、光感作剤 (又は光感作剤含有接合体の標的特異的構成成分) と標的APCの間での強い結合形態を可能にする状態下、比較的素直な方法で効果的である。

適切な接触は、1又は2以上移植片の表面又は器官移植片の培養若しくは灌流と本発明の光感作剤との組み合わせを適用することを含む。処理は、一般的に少なくとも1分、好ましくは約2分から約72時間、更に好ましくは約2分から24時間行う。接触時間は、例えば製剤における光感作剤の濃度、処理される移植片及び製剤の特有の形態などの要因に依存する。灌流は幾つかの適当な方法によって行われる。例えば、ある器官は、一定の圧力を供給する装置を介して灌流することができ、又は圧力調節及びポンプと器官の間にオーバーフローの場を持った灌流ができる。代わりに、器官はシーリングドア (sealing door) を介して高压チャンバーの中に置かれてもよく、リザーバーから液体を引き出すポンプによってチャンバーに輸送された灌流液は、任意に灌流液が消費されている間、バルブによりリザーバーに戻される。

皮膚移植では、製剤を移植される皮膚の下部表面に塗布又はスプレーすることができ、その結果ドナーの下部表面とレシピエントの組織との間に光感作剤の層が生じる。しかしながら、好ましくは、全移植皮膚は光感作剤成分中に浸す。

接触処理は広範な温度において行うことができるが、かなりの変性を引き起こすような高い、若しくは移植片に有害に影響する高い温度及び光感作剤の細胞内取り込みを最小にするような温度は回避する。好ましくは、接触処理は、約50Cから約400C、より好ましくは約150Cから約370C、最も好ましくは外界温度である。

光感作剤が標的APCと適切に結合することを確実にする光感作剤を適切に分布させた後、当該処理されたドナー組織は、光感作剤によって吸収され、光感作剤によって細胞毒性特性の活性を導く波長を持った光で露光する。そのような露光は、光感作治療の技術において勿論一般的な方法である。

移植片を光感作剤に接触させ、露光した後、24-48時間の間貯蔵することができる。しかしながら、好ましくは移植進行中すぐに用いる。貯蔵耐用期間は、上記のように製剤中に

10

20

30

40

50

血液代用物（例えば、水素をフッ素で置換した化合物の乳濁液（perfluorochemical emulsion））を用いたり、又は移植片を、1985年4月9日に発行されたJP60061501に記載のように、細胞のわずかな破壊で移植片を冷凍させることができるグリセロール処理後の冷却等張剤及び抗凝固剤を含有する光感作剤の製剤で還流することにより延長させることができる。さらに、細胞壊死することなしに半永久的に組織を保存するために、移植片は、凍結温度で冷却している間、その製剤を含有する異なった液体で保存することができる。

移植前に、好ましくは、組織学的生理食塩水に浸すことにより又は他のこの目的のために適切な他の手段により、移植片を光感作剤成分が入っていないもので洗浄する。また、移植に先だて、レシピエントは、移植片の生存を助けるために、PDT処理された末梢血単核細胞を持った1又は2以上のドナー特異的血液の輸液を供されてもよい。移植手術に先だて、他の方法で全リンパ球露光をレシピエントに行ってもよい。特別な移植レシピエントに有益である他の前移植方法が本発明の方法の一部として行うことができる。

ある場合には、適当なアミノ酸又は高分子を用いたり、生理的に受けられる電荷を与えられた官能基のソース（source）を付けることにより、正又は負電荷を負わせた官能基を与えるために移植片表面を修飾することが望まれる。又、ある場合では、例えばフェニルアラニン、セリン又はリジンを表面に結合することにより、表面に疎水性又は親水性を与えることが望まれる。これら表面修飾に対して特に効果的な免疫抑制剤はグルタルアルデヒドである。

移植方法それ自身は、特に処理されるものの障害、患者の健康状態等に依存する。医師が与えられた症状に用いられる適切な方法を認識する。移植は、重要な手術後期間（最初の3ヶ月）体系的に、放射線核静脈血管造影剤のような適切な方法により、任意に観察される。移植後、適切な免疫抑制薬を用いる免疫抑制治療が、移植された移植片生存において重要なものとしてよく用いられる。

本発明の方法は、体系的にドナー、インビトロでドナー組織、又は居所的や体系的にレシピエントに投与するのと同時に、免疫抑制剤と同様な又は引き下げられた容量によって補足又は用いられることができる。ここで用いられる“免疫抑制剤”という言葉は、移植片が移植された宿主の免疫系を抑制又は遮蔽する作用がある物質を言う。これは、サイトカイン産生の抑制、自己抗原発現の下方制御又は抑制、又はMHC抗原の遮蔽する物質を含む。

そのような薬剤の例は、2-アミノ-6-アリアル-5-置換ピリミジン、アザチオプリン、プロモクリプチン、グルタルアルデハイド、MHC抗原に対する抗イディオタイプの抗体、サイクロスポリンA、1又は2以上のステロイド、及びデキサメタゾン；抗インターフェロンガンマ抗体；抗腫瘍壊死因子アルファ抗体；抗腫瘍壊死因子ベータ抗体；抗インターロイキン2抗体；抗IL-2レセプター抗体のような抗サイトカインレセプター抗体；異種の抗リンパ球グロビン；汎T抗体、好ましくはOKT-3モノクローナル抗体；CD4に対する抗体；ストレプトキナーゼ、ストレプトドルナーゼ；又は宿主からのRNA又はDNAを含む。

効果的な量は、これらの考慮により決定されるが、レシピエントによる移植片の拒絶が生じる免疫応答を抑制するのに必要な最小の量であり、より長い移植片の生存期間に達成するくらいの量である。そのような量は、好ましくは、レシピエントに対する毒性があり、レシピエントに感染に対して著しく影響を与える量よりは少ない方がよい。本発明で必要とする免疫抑制剤の量は、前処理していない移植された移植片に通常必要量よりは典型的に少なく、個々の移植を取りまく環境及び用いられる免疫抑制剤の種類に依存する。

特異な例として、1投与量あたり非経口的に投与される調剤的に影響する免疫抑制剤、サイクロスポリンAの全量は、1日あたり患者の体重に対しておよそ0.1から20mg/kgの範囲内であると、最近通常の免疫抑制治療で用いられるおよそ5から15ml/kg/dayの典型的な範囲と比較して予想される。腎移植では、通常、短期間に大量の投与量の糖質ステロイドの投与が実施され、例えばメチルプレドニゾロンは、移植組織の光感作剤前処理がない場合、1日当たり7グラム投与量3から5日間与えられ、その後20から100mgのプレドニゾロンが与えられる。本発明の前処理を行った場合、著しく低い投与量が可能である。

上記のように、これらから示唆される免疫抑制剤の量は、治療に非常に大量費やされる。

10

20

30

40

50

適切な投与量及び計画の選択における重要な要因は、即ち移植生存期間から得られる結果である。例えば、比較的高投与量は、初期では抗体媒介の移植片の破壊に起因させることができる超急性の移植拒絶の処理のためで、又は後期では移植片機能における急激な減衰に特徴づけられ、必要とされるかもしれない。

免疫抑制剤が用いられるとき、非経口、好ましくは局所の免疫抑制処理、病巣内投与を含む幾つかの適切な方法によって投与されてよい。非経口投与は、筋内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与を含む。さらに、免疫抑制剤が用いられるとき、パルス注入により特に引き下げられた投与量で、又は持続注入により適宜投与される。

次の実施例により、より明らかになるが、本発明を制限しない

実施例 1

BPD-Ra-MIg接合体の調製

図 1 に示す光感作剤BPD-MAを、暗所にて、1mg/mlから200pg/mlの濃度にリン酸緩衝食塩水で希釈し、既知含量のラット抗マウスIg (RaMIg)と混ぜ合わせる。RaMIgは、シーダーレーン研究室(Cedar Lane)から入手、又はマウス免疫グロブリンでウサギを免疫化し、抗体を免疫吸着カラムに通して精製することにより調製される。その混合物を室温にて1時間インキュベートし、生じる接合体を終夜4 下3リットルのPBSで、12-14kdよりも小さい分子量を持つ分子を透過できる膜を通して透析する。標識BPD-MAでのモデル研究は、保持された接合体がBPDを所持することを示す(10-20のAb率)。その透析からのretentateは凍らせて凍結乾燥させ、暗所に保存する。

実施例 2

当該接合体による同種異系移植組織の処理

ドナーの膵島細胞は、ラットから次のように単離した。

雄SDラット(200-250g)を腹腔内ウレタン(100mg/kg)の投与にて麻酔して正中線を通して開腹し、呼吸循環停止は双方の気胸(切除)により誘導された。近位の総胆管にカニューレ挿入し、十二指腸への挿入地点で、遠位に閉鎖した。膵臓を冷却(4°C)コラーゲン(type X I, Sigma Chemicals)溶液0.42mg (650U)/mlの濃度による逆行性法で膨張させた。インサイチュのコラーゲン膨張の後、全膵切除が遂行された。

膵は22分間37°Cの水浴中において消化された。消化された膵は、滅菌、シリコン処理したピペットでの粉碎により分散させた。粗製の組織スラリーを200ミクロンスクリーンフィルターを通して、非消化の管、血管及びリンパ節を取り除き、それぞれ比重1.065と1.031の2つの単層からなる不連続デキストラン勾配にて遠心した。低密度の島組織を単層境界から吸引し、洗浄、及び更に解剖顕微鏡下の手選により精製した。この技術を用いて、膵臓あたり、300-400の機能的及び形態学的に無傷の膵島を収穫した。

島(細胞)をインピトロで1日、25%子ウシ血清、15mM HEPES及び1%ストレプトアビジンを補ったハム(Ham)のF-12培地で培養した。即座に、培養島細胞(islet)をSelaLabから入手した商業利用のマウス抗ラットIaモノクローナル抗体(OX-6と命名)0.2ml/ml存在下1時間培養した。OX-6はMHCクラスII生産物に対して免疫特異的である。

OX-6処理島細胞の一部は、それぞれ(1) BPD:1Ab比6.5のRa-MIgG-BPD接合体;(2) BPD:1Ab比20の同接合体;(3) BPD:1Ab比6.5の無関係の抗体GA-7sIgGとのBPD接合体;(4) BPDのみにて;及び(5)培地のみで、20 下2時間暗所にて培養した。培養混合液を10Joules/cm²の400-800nmの光エネルギーに曝した。露光された培養細胞は組織学的に試験され、APC枯渇であった。

実施例 3

ドナー組織の特徴づけ

組織学的研究において、BPD:1Ab比6.5の接合体で処理した約75-100島細胞を同系のSDラット及び同種異系WFラットの腎莖膜下に移植した。同系移植も同種異系移植でも、すべてのレシピエントは喜ばしい結果であった。特に、リンパ球浸潤で完全な腺の置換が観察され、同系移植も同種異系移植も確認できる内分泌組織は観察されなかった。

APC欠失の研究において、島細胞はOX-6抗体で1次免疫染色された。当該処理された細胞をFITC標識したヤギ抗マウスIg (Jackson Laboratories)で2次染色し、蛍光顕微鏡で観察

10

20

30

40

50

した。当該接合体で処理した標品において、MHCクラスII細胞は確認されなかった。しかしながら、コントロール（無関係な抗体との接合体、BPDのみ及び培地のみ）では、FITC標識した第2次抗体がAPCをラベルし、緑色の蛍光を発していることから、これら細胞の存在が蛍光顕微鏡により検出された。

実施例 4

皮膚同種異系拒絶の阻止

最小の拒絶を示すベースラインを確立するために、9つの同系移植（ドナーとレシピエントが同じ動物）を、次に示すような標準的方法（Billingham et al., "The Technique of Free Skin Grafting in Mammals", J.Exp.Biol., 28:285-99(1951)）に従って、BALA/cマウスで行った。

移植されたマウス躯幹の皮膚は毛を剃り、除毛した。そのマウスに10TIケタミン塩酸塩、10TIキシラジン、70TI PBSの混合液を静脈注射により麻酔し、続いて適当な移植土台に置き、皮筋層を傷つけないように注意して、十分な厚さの皮膚(1cm x 1cm)を注意深く切開した。

自己の皮膚移植は移植部位に再適用し、おおよそ4滴のVetbond細胞接着剤を移植片と移植土台との間の境界に注いで固定した。移植片をペトロリアム-ジェリーガーゼスポンジに押しあて、体のまわりにくるみ"体幹ギプス(body cast)"を形成させた。

長期間同系移植の成功率、すなわち120日を越えるものは、90%以上であった。移植片の壊死が少なくとも80%存在したとき、移植拒絶は完全だと考えられている。移植生存物は日あたりの生存時間±標準偏差に置き換えた平均値として示された。

それぞれの移植片がドナーマウスからのもので、異なるレシピエントマウスの移植土台が適用されたという点を除き上記と同じ方法で、C57BL/6(ドナー、H-2^b)とBALB/c(レシピエント、H-2^d)のマウス同種異系間の皮膚移植を対照として行われた。簡単にいうと、ドナーの躯幹の皮膚は、毛を剃り、除毛し、その後十分な皮膚移植片(1cm x 1cm)を得た。レシピエントマウスは毛を剃り、20TIのケタミン塩酸塩、10TIのキシラジン及び70TI PBSの混合液の静脈注射により麻酔した。皮筋層を傷つけないように、それぞれのレシピエントの移植土台を躯幹皮膚(1cm x 1cm)を注意深い切開により調製した。移植片は同種異系の移植部位にあて、Vetbond細胞接着剤及びVetrapの包帯テープを用いてペトロリアム-ジェリーガーゼスポンジに固定し、"体幹ギプス(body cast)"を形成した。平均の生存期間は11.1日(標準偏差1.9)であった。

本発明の方法によると、レシピエントに移植された皮膚標品は最初、インビトロで1.0Tg/ml溶液の光感作剤BPDで1時間接触させた。その皮膚はウシ胎児血清(FBS)を含まない電解質溶液にて30分間懸濁し、発光ダイオード("赤")(10J/cm² at 690nm±10nm)の赤色光にさらした。この光処理後、露光された皮膚をレシピエントマウスに上記のように移植した。その動物を移植後8日にわたり観察した。同種異系移植のための平均の生存期間は、増加して18.5日(標準偏差2.1)であった。

これらの結果をそれぞれの比較と照らして下記の表1に作表する。

表1

移植の種類	試験動物数	平均生存時間(標準偏差)
同系移植	9	不定
同種異系移植	16	11.1日(1.9)
ドナー皮膚を前処理した同種異系移植	6	18.5日(2.1)

結果は、移植された組織での光感作処理の免疫調節性の効果により移植生存時間を著しく延ばすことができることを示唆した。

実験は、光感作剤BPDの濃度(0.25から1.0µg/mL)を変えて、標準、対照の同種異系移植を伴って、本発明により行われた同種異系移植と比較して繰り返された。これらの試験の

結果を下表 2 に要約する。

表 2

移植の種類 (試験動物の数)	光感作剤及び光量	平均生存時間 (標準偏差)
対照 同種異系移植 (10)	0	7.5 日(0.84)
ドナー皮膚を前処理した同種異系移植 (5)	1.0 μ g/mL BPD, 10J/cm ² LEDs	11.0 日(0.0)
ドナー皮膚を前処理した同種異系移植 (5)	0.5 μ g/mL BPD, 10J/cm ² LEDs	14.3 日(1.5)

10

光感作剤の 2 倍の増大はそれ自身は著しく移植の生存時間を延ばすことはないことが示されたので、移植された組織の光感作剤処理の免疫調節効果は、皮膚の細胞集団に対する選択的効果に依存し、光感作治療の既知の細胞毒性効果は必要ないのかもしれないと想定された。

実施例 5

移植された皮膚の組織学的な試験

生存期間を延ばす結果が得られる条件下、皮膚移植の光感作治療で処理の効果を調べるため、皮膚標本を入手し、異なる範囲の光感作剤濃度すなわち 0.25 又は 0.50 μ g/mL の BPD である点を除き、上記のように処理した。幾らかの組織は、光感作剤を入れずに、電解質溶液のみで培養し、対照とした。すべての細胞は 24 時間にわたり培養し、その後、対応する数を光に曝した。曝されたとき、露光は 10J/cm² のエネルギーレベルで赤色光であった。すべての標本はホルマリンの中に置き、組織学的試験を行った。組織は電解質溶液のみ (対照標本) 又は 0.50 μ g/mL の BPD 溶液で、露光しないで培養し、正常を示した。しかしながら、0.25 も 0.50 μ g/mL でも BPD で処理した標本は、赤色光で処理した後、次のような変化：

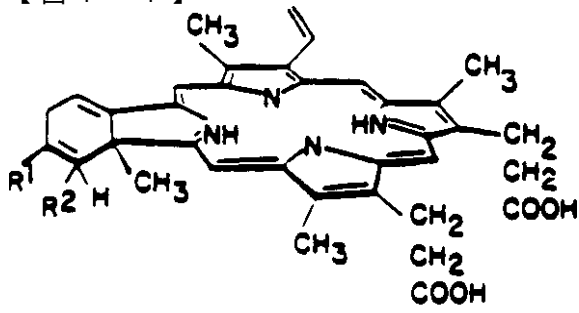
20

核の肥大化、核周囲の空胞化、上皮細胞での好酸球の増加、細胞質容積の増大、及び上皮表面のケラチノサイト間の増加した細胞間スペースを示した。これらの組織学的知見を基に、本発明の光感作処理は細胞死よりもむしろ、ある程度の細胞障害を生じることが推定された。この予期せぬ非細胞毒性効果のメカニズムは解らない。

30

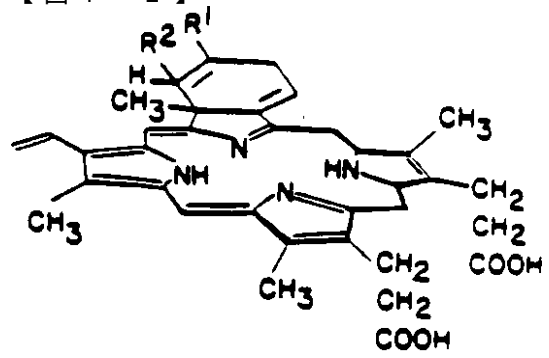
情報公開した内容の修飾及び / 又は変化は下記の発明の請求項の見地から逸脱すること無しに実施されることにより、本技術において技術化されたものがより明らかになる。

【 図 1 - 1 】



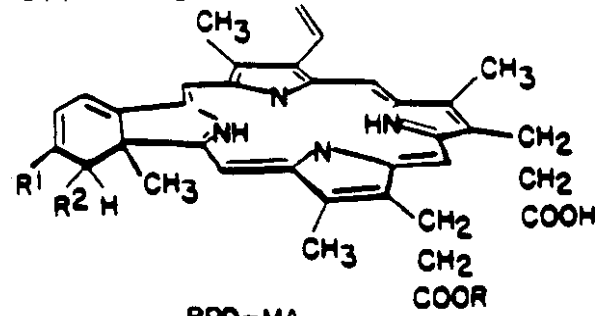
BPD-DA
FIG. 1-1

【 図 1 - 2 】



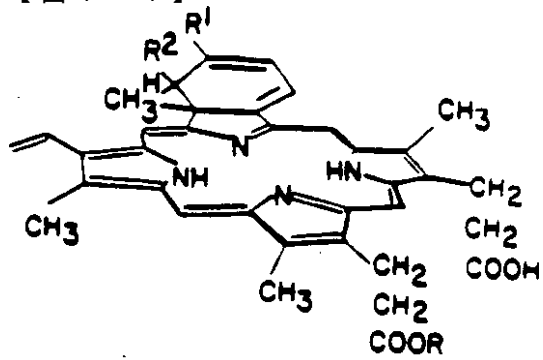
BPD-DB
FIG. 1-2

【 図 1 - 3 】



BPD-MA
FIG. 1-3

【 図 1 - 4 】



BPD-MB
FIG. 1-4

フロントページの続き

(72)発明者 オボチ、モデスタス、オヌオラ ケイ
カナダ V5Z 4K7、プリティッシュ コロンビア、バンクーバー、スパイグラス プレイス
#212-1869

(72)発明者 レビー、ジュリア
カナダ V6J 4Z3、プリティッシュ コロンビア、バンクーバー、ベニファーシング ドラ
イブ #601-1490

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 米国特許第05028594 (US, A)
特開平02-149519 (JP, A)
S.GRUNER, H. et al., Scand. J. Immunol., 21, p.267-273
S.GRUNER et al., Biomed. Biochim. Acta, Vol.5, p.649-654

(58)調査した分野(Int. Cl.⁷, DB名)
A61K 41/00
CA (STN)
MEDLINE (STN)