(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3862094号
(P3862094)
(45)発行日　平成18年12月27日(2006.12.27)　(24)登録日　平成18年10月6日(2006.10.6)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 41/00	(2006.01)	A61K	41/00	
A61K 31/19	(2006.01)	A61K	31/19	
A61K 31/40	(2006.01)	A61K	31/40	
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00	101

請求項の数 5　(全 16 頁)

(21)出願番号	特願平6-518349
(86)(22)出願日	平成6年2月14日(1994.2.14)
(65)公表番号	特表平8-507755
(43)公表日	平成8年8月20日(1996.8.20)
(86)国際出願番号	PCT/US1994/001511
(87)国際公開番号	WO1994/017797
(87)国際公開日	平成6年8月18日(1994.8.18)
審査請求日	平成13年2月14日(2001.2.14)
(31)優先権主張番号	08/016,609
(32)優先日	平成5年2月11日(1993.2.11)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
ザ　ジェネラル　ホスピタル　コーポレーション
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ボストン　フルーツ　ストリート　５５
(74)代理人
弁理士　柳田　征史
(74)代理人
弁理士　佐久間　剛
(72)発明者　トラウナー　ケニース
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サクラメント　スピルマン　アベニュー　５７３６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】治療薬

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

光活性細胞毒性化合物またはその前駆体を含有する光化学的滑膜切除を実施するための薬剤であって、前記光活性細胞毒性化合物が、ヘマトポルフィリン誘導体であるフォトフリン、ベンゾポルフィリン誘導体、およびアミノレブリン酸の代謝産物であるプロトポルフィリンIXより成る群から選択され、前記前駆体がアミノレブリン酸であり、該化合物または前駆体が、患者の滑膜組織に蓄積し、さらに特定波長の光を照射したときに活性化して、前記滑膜組織の破壊を引き起こすことを特徴とする薬剤。

【請求項２】

前記光活性細胞毒性化合物がフォトフリンであることを特徴とする請求の範囲第１項記載の薬剤。

【請求項３】

前記光活性細胞毒性化合物がベンゾポルフィリン誘導体であることを特徴とする請求の範囲第１項記載の薬剤。

【請求項４】

前記光活性細胞毒性化合物がプロトポルフィリンIXであることを特徴とする請求の範囲第１項記載の薬剤。

【請求項５】

前記化合物の治療比が少なくとも１０であることを特徴とする請求の範囲第１項から第４項いずれか１項記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本発明は、罹病した滑膜を破壊するための光感作療法の使用に関する。

光感作療法は一般的には、実験的な癌治療の物理的療法に当てはまり、吸収された光と細胞内に保持された光活性化剤との相互作用により、選択的に癌細胞を殺すというものである。（Kessel, Photochem. Photobiol. 44: 489-493; Bottiroli et al., Photochem. Photobiol. 47: 209-214, 1988; Salet et al., Photochem. Photobiol. 53: 391-3, 1991; Gross, Photobiological Techniques(Chapter 9), Valenceno et al.eds., Plenum Press, New York, 1991; Star et al., Photochem and Photobiol, B: Biology 1: 149-167, 1987; およびJori et al.,photodynamic Therapy of Neoplastic Disease, Kessel ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1989）。光による生きた組織への化学的感作は、1900年にラーブによって最初に報告された。ヘマトポルフィリン誘導体（ＨＰＤ）が新生物形成組織に取り込まれることに関する記述は、アウラーとバンツァーによるものが最初である（Z. Krebforsch 53: 65-68, 1942）。取り込みは、後にフィッジらにより蛍光を使って確認された（Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68: 640-641, 1948）。また、リプソンらは1960年に、ＨＰＤが腫瘍に局在することを示した（JNCI 26: 1-12, 1961）。

ポルフィリン類を含む部分精製したＨＰＤ混合物は、後にさらに精製が進み、エステル類とジヘマトポリフィリン（ＤＨＥ）エステル結合物にまで精製された。現在盛んに使用されている処方は、フォトフリン（登録商標）として市販されており、ＨＰＤ／フォトフリンは、ＰＤＴ試験し使用できる光感作剤で、最初にＦＤＡの承認を得たものである。それ以来、医学の多く分野において、フォトフリンの多種多様な腫瘍に対する破壊能が広く調べられている（Dougherty et al., In Photodynamic therapy of Neoplastic Disease, Kessel ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1989）。

フォトフリンなどのヘマトポルフィリン誘導体の新生物形成疾患の治療における作用機序については詳細な記述がある。ポルフィリンに関しては、大きな分子凝集体が腫瘍の新生脈管構造体の周りに蓄積する。おそらく新生物形成組織からのリンパ液の排出が少ないことが、これらの組織からのクリアランスの時間が遅れる理由であろう。一度隔離されると、それらの分子凝集体は解離し、その疎水成分は細胞膜中にフォトフリンを分離する。細胞において光感作活性が作用する主たる場所は、細胞膜およびミトコンドリア膜と考えられている。核酸および蛋白質も光酸化により損傷を受ける(Henderson et al., Porphyrin localization and Treatment of Tumors, Doiron and Gomer eds., Liss, New York, 1984, pp. 601-612）。

光感作活性は、その波長が感光剤の吸収帯に含まれる光が感光剤を励起することにより開始する。その波長特異性は感光剤の分子構造に依存し、分子内共役の度合いが大きいほど、より長い波長での吸収が大きくなる。感光時の活性化が起こると、消耗性の光作用を生じる。酸素ラジカルによる毒性が生じる。一重項酸素は二重結合と反応し、有機過酸化物が生成する。次にこれらは、膜を劣化し破壊するフリーラジカル連鎖反応を開始させる。また、酸化的リン酸化反応の連鎖を壊し、細胞が破壊される（Jori et al., Photodynamic Therapy of Neoplastic Diseases, Kessel ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1989; and Weishaupt et al., Cancer Res 36: 2326-2329, 1976）。

光感作療法の中には、正常な組織を損傷させずに罹病した組織のみを選択的に破壊することを考慮したものもいくつかある（Kessel, Photochem. Photobiol.44: 489-493; Bottiroli et al., Photochem. Photobiol. 47: 209-214, 1988; Salet et al.,Photochem. Photobiol. 53: 391-3, 1991; Gross, Photobiological Techniques (Chapter 9), Valenceno et al.eds., Plenum Press, New York, 1991; Star et al., Photochem and Photobiol, B: Biology 1: 149-167, 1987; Jori et al., Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease, Kessel ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1989; Dougherty et al., In Photodynamic therapy of Neoplastic Disease, Kessel ed., CRC Press, Boca Raton,FL, 1989; Richelli et al., J. Photochem Photobiol. 6: 93-101, 1990; Mazierre et al. J. Photochem Photobiol. 6: 61-68, 1990; Brault, J. Photochem and Photobiol 6: 79-86,

1990; および Pottier, J. Photochem Photobiol. 6: 103-109)。感光剤は特定の周波数と量を有する光エネルギーにより活性化されるまでは無毒である。さらに感光剤の活性化は、病的組織と正常組織とでその取り込みに一時的な違いが生じた場合に起こってもよい。病的組織の選択的破壊は、組織内での時間的および位置的分布の違いの両方を利用して行ってもよい。

カーソンは米国特許第5,028,594号において、リュウマチ様関節炎に関与する造血細胞を選択的に除去する方法を記述しており、そこでは光活性細胞毒性因子を光と組み合わせて使用している。光活性化剤は糖などリガンドにより標識され、リンパ球をターゲットする。たとえば、ラットにモノエチレンジアミンモノアミドを投与するとともに光を照射すると、関節における腫瘍と炎症が軽減した。

ケネディーは米国特許第5,079,262号において、皮膚の病変と腫瘍などの組織異常を検知し、治療する方法を記述しており、そこではアミノレブリン酸（ＡＬＡ）をその光活性化を可能にする光と組み合わせて投与している。ケネディーは、さまざまなＰＤＴの応用において、プロトポルフィリンIXの代謝前駆体であるＡＬＡが使用できることを示唆している。

選択的でない毒性物質により、罹病した滑膜を破壊する試みはこれまで行われてきたが、今までに成功したものはない（Goldberg et al., Arthritis Rheum. 19: 737,1976; Mitchell et al., JBJS 55-B: 814, 1973; およびOka et al., Acta Rheum Scand 15: 35, 1969）。ごく最近は、侵襲を最少限にする手技の開発を目指し、放射性化合物を用いた滑膜切除術が行われている（Zuckerman et al., J. Orthop Res. 7: 50-60, 1989 およびSledge et al., Clin Orthop Rel Res 182: 37-40, 1984）。大きな進歩とは言えないにしても、放射性物質を利用することがその普及を妨げている。

発明の概要

本発明は、患者の関節の増殖性炎症疾患を治療するための治療薬を提供することを特徴としている。関節疾患は、光活性化細胞毒性化合物あるいはその前駆体を投与し、引き続き罹病した滑膜組織の領域に投与した物質を活性化できる波長の光を与えて治療する。この治療薬を使えば、滑膜組織は破壊される。

ＰＤＴで治療可能な関節疾患の一部を表１に示す。特に、ここで示した疾患に加えて、滑膜組織の増殖に関わるあらゆる疾患も本発明の提供する治療薬により治療可能であることは明らかである。

化合物はガイドラインに従い、その濃度が目標となる組織において、周辺組織と比較し、より高くなるように患者に投与する。同時にその濃度レベルは、目標となる組織中で適切に維持される。一般に、このように較差をつけて薬剤を局在化させるには、標準的な手技により決定された投与ガイドラインを使えば達成でき、その手技とは薬学分野でよく知られた薬剤クリアランスの経時変化の決定方法を指す。罹病した組織と周辺組織中の薬剤の比率は、２：１あるいはそれ以上であるのが望ましい。特に、化合物は関節領域に全身的あるいは局所的方法のいずれによって投与してもよい。

本発明で利用する化合物を全身的あるいは局所的に投与すると、患者の体内で化合物は周辺組織と比較して発病した組織において、より大きな量が取り込まれ、さらに、より長い時間保持された。このような特性を持つ化合物は、滑膜細胞死を誘導する光感作療法における治療指数が少なくとも５０であると定義できる。さらに、利用する化合物は、滑膜細胞死を誘導する光感作療法に対する治療比が少なくとも１０であることが望ましい。上記治療比は、罹病した組織中での化合物および光照射での毒性と、正常組織中での化合物および光照射での毒性の比として定義される。毒性は、細胞死として定義する。

関節疾患の治療に使用可能な特異的な光活性薬剤の一部を表２に示す。増殖する滑膜組織における血管新生の特性に従い、新生物形成に対する光感作療法において有用であれば、いかなる系統的な非毒性光活性化化合物およびその前駆体は一般的に、本発明の提供する治療薬に利用することができる。これは以下の例に示される。フォトフリン（ＨＰＤ、ＰＦＴおよびＰＦＩＩ）、ベンゾポルフィリン誘導体あるいはアミノレブリン酸を本発明の一部として投与する。

投与された化合物に対し適当な波長を持つ光が、この分野に習熟した者が知るさまざまな方法により照射される。これらの方法には、レーザ、非レーザあるいは広い波長域の光が含まれ、体外あるいは関節内のいずれかにおいて適当な波長の光を生成すればよい。本発明に使用される光は、適当な形の波を生成するどんな機器を使って与えてもよく、それらは光ファイバ機器、関節鏡検査機器あるいは透過型照射機器に限らない。
この光感作治療薬によれば、最少限の侵襲により罹患した滑膜組織を破壊し、また関節内の健康な組織を損傷することのない手技が提供される。
本発明のその他の特徴と効果については、以下の説明と請求の範囲の中で明らかとなる。

図の簡単な説明

まず図を簡単に説明する。

図

図１は、抗原誘導性関節炎のプロトコルに従い、最初の皮膚感作より１１週目、膝関節に抗原を与えて５週後で、光感作療法を行わなかった場合の兎の膝の骨膜組織の写真である。
図２は、抗原誘導性関節炎のプロトコルに従い、最初の皮膚感作より１１週目、膝関節に抗原を与えて５週後、フォトフリンと光による光感作療法を行って４週後の兎の膝の骨膜組織の写真である。
図３は、投与後０－８０時間の滑膜、関節軟骨、皮膚および筋肉におけるフォトフリンの分布を示すグラフである。
図４は、ＢＰＤ全身投与後のin vivoでの罹患滑膜組織におけるレーザ誘導蛍光量を示すグラフである。
図５は、プロトポルフィリンIXの前駆体であるＡＬＡの滑膜への局在性を示すグラフである。

好適な実施の形態

リューマチ様関節炎とは、増殖性のびらん性滑膜組織に特徴づけられる疾患で、それにより関節内および関節周辺の組織が破壊される。薬剤投与による治療がうまく行かない患者に対してはこれまで、切開による外科的滑膜切除あるいはより侵襲の大きい関節置換などの治療法しか残されていなかった。光感作療法による滑膜除去は、効果的でかつより侵襲の小さい新しい代替治療法を提供する。光活性化学物質を局所あるいは全身的に罹患した関節に注入する。その関節領域は、局所的に、小ゲージの皮下用注射針に通された光ファイバからの光により曝露される。または、その代わりに、体外から透過型照射装置を使って光を供給してもよい。この治療法は罹患した滑膜を破壊するため、外科手術があまり有効でない患者の多くに大きな利益をもたらす。
以下に示す実験例Ａ－Ｄは、光活性な化学物質が選択的に罹患した滑膜に局在し、そのため、これらが関節疾患の治療に有望であることを実証している。ヘマトポルフィリン類の混合物で、抗新生物質形成感作剤として最も広く使用されているフォトフリンは、この治療のためにこれまで最もよく研究されてきた。一例として、フォトフリンは抗原誘導性関節炎の治療に有効であることが実証されている。フォトフリンの生体内分布に関する研究では、全身的注入投与後２４および４８時間において、フォトフリンは選択的に滑膜に取り込まれることが報告されている。滑膜の破壊に際し顕著な副作用はないという結果が実証され、このことは光化学的滑膜除去がリュウマチ様関節炎に対する新しい効果的な治療法であることを示している（図１および２）。
フォトフリンのみが本発明を特徴づける光活性治療剤の例ではないが、その特性は他の多くの光感作化合物の局在性およびクリアランス特性の例証となる。以下に示す実験例Ａは、フォトフリンが罹患した増殖性の滑膜組織に局在することを実証している。そこではフォトフリンが罹患した滑膜の細胞を殺すことを示す。実験例ＣおよびＤでは、これは光感作化合物およびその前駆体の一般的な作用を示し、それらが罹患した滑膜との接触により惹起されることを示している。
関節に感光剤および光エネルギーの両方を投与するために、数多くの方法が可能である。関節炎を治療するのに使用されるどの光感作化合物に対しても、その使用時の最適なパラ

メータを決める際は、ここで提供する実験手技に従うのがよい。

Ｉ．活性化光の投与

皮膚での全身性の感光作用がなく、近赤外および長波長の可視光領域で活性化される新規の感光剤は、光による活性化を考慮している。これは膝での透過型照射によって行われてもよい。光ファイバを関節鏡に通し、直接観察しながら狙いを定め、化合物を活性化してもよい。光ファイバを直接小ゲージの皮下用注射針に通してもよい。光は、光ファイバやカニューレに挿入した導波路を使った機器により経皮的に導いてもよい。透過型照射は、レーザあるいは非レーザ光源を装備したさまざまな機器、たとえばライトボックスや収束光ビームなどにより行ってよい。活性化処置は、関節切開術においてなされてもよい。これらのパラメータは、最少の侵襲あるいは無侵襲の手段（透過型照射）として開発され、光感作による滑膜除去を行うために採用される。

II．光感作化合物の投与

関節へ治療用化学物質を局在的に注射する場合には、全身的投与の必要はない。局在投与にするか全身投与にするかは、所定の治療計画の中でいくつの関節を治療するかにより、部分的には決定される。

光感作療法に使用する治療薬は、薬学的あるいは獣医学的な使用に則して配合することができ、その際許容可能な希釈剤、担体あるいは賦形剤と組み合わせて使用してもよく、またその際に単位投与量を含む形にしてもよい。治療用化合物を本発明の方法に従って使用するに際しては、通常の薬学的あるいは獣医学的経験に則して行い、適切な配合物あるいは組成物を提供すればよい。

このように、この発明に使用する配合剤は非経口的に投与でき、たとえば静脈内、関節内、皮下、筋中、心室内、関節包内、脊椎内、腹腔内、局所的、鼻腔内、アエロゾル、乱切法による投与が可能である。さらに経口、頬側、直腸あるいは膣からの投与も可能である。

非経口的投与のための配合剤としては、溶液あるいは懸濁液の形がよい。経口投与の場合、錠剤あるいはカプセルの形がよい。また、鼻腔内投与の場合には、散剤、点鼻剤あるいはアエロゾルの形がよい。

この技術分野における配合剤調製法ついてはよく知られており、たとえば“Remington's Pharmaceutical Sciences”に示されている。非経口的投与のための配合としては、たとえば賦形剤として滅菌水あるいは生理的食塩水、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール類、野菜由来の油あるいは水素添加ナフタレン類、生体適合性、生体分解性のラクチドポリマー、あるいはポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレン共重合ポリマーを使用し、存在する有効成分の放出を制御してもよい。その他の有効成分を非経口的投与するためのシステムで、潜在的に有用なものには、エチレン－酢酸ビニル共重合ポリマー粒子、浸透圧ポンプ、埋入可能な輸液システム、リポソームおよび抗原結合体などが含まれる。吸入投与のための配合は、賦形剤としてたとえばラクトースが含まれてもよく、またたとえばポリオキシチレン－９－ラウリルエーテル、グリココール酸およびデオキシコール酸を含有する水溶液であってもよい。油性の溶液は点鼻剤として投与してよく、鼻腔内投与にはゲルの形でもよい。非経口的投与のための配合には、頬側投与のためのグリココール酸塩や直腸からの投与のためのメトキシサリチル酸塩あるいは膣からの投与のためのクエン酸が含まれていてもよい。

有効成分は単独で使用することも、あるいは他の活性成分と組み合わせて使用することも可能である。

本発明が提供する配合における有効成分の濃度は組織の数により変化し、また投与すべき量と投与の経路によっても変化する。

一般的にいえば、本発明の有効成分は水性の生理的緩衝溶液中に濃度0.1から１０％（w/v）の化合物を含む形で提供されればよい。通常の投与量は、一日に体重１kgあたり約0.2mgから約１gの範囲とする。好ましい投与量の範囲は、一日当たり体重１kgあたり約0.1mgから約2mgとする。望ましい投与量は、目的としている関節疾患のタイプおよび進行の程度、患者の全体的な健康の度合い、配合の構成および投与の経路により決定される。

III. 関節炎に対してＰＤＴを使用する際の診断法

Ａ．抗原誘導性関節炎を有する兎の開発

以下に述べるプロトコルは、兎において抗原誘導性関節炎を発生させるために使用してもよいものである。この方法に従って準備された兎は、関節疾患の治療に光感作療法を適用する際に、治療法を選択するのに使用できる。

プロトコル：２００mgの卵白アルブミンを計り取り、１０mlの通常の生理食塩水に溶解する。その溶液をミリポアフィルタで濾過し、濾液を滅菌したビーカに受ける。卵白アルブミン溶液を２０－３０ccの滅菌したガラス製の注射器に吸い上げる。さらに、１０mlのフロイントのアジュバントをもう一つの滅菌した注射器に取る。滅菌した金属製の三方活栓を使い、溶液を二つの注射器の間を行き来させ、溶液の粘度が高くかつ色が白くなるまで混合する。この懸濁液を滅菌したバイアルあるいは２５mlのゴム栓付エルレンマイヤーフラスコに移す。この感作溶液0.2mlをそれぞれ兎の背中に５カ所ずつ２３あるいは２５ゲージの注射針を使って注射する。感作は初期の免疫から３週間後に再び行う。

関節への免疫試験：１０mg/mlの濃度で卵白アルブミンを通常の生理食塩水に添加し、ミリポア濾過を行い、濾液を滅菌したバイアルに受ける。兎を麻酔し、その膝を剃毛する。免疫試験用の溶液を0.25ml膝関節に直接注射する。

この手技を用いれば、片側の関節に滑膜炎を４日以内に起こすことができ、それは２週間以上継続する。６ヶ月にわたり放置した動物には、軟骨のびらん、ときには骨増殖体の形成や骨膜の浸潤が見られる。

Ｂ．抗原誘導性関節炎を有する兎を使った光感作療法の動物実験：

体重３－４kgのニュージーランド白色家兎を表３に示したように３グループに分ける。すべての動物に、抗原誘導性関節炎を有する兎を作製するためのプロトコルに従い、６週間の感作期間を設定する。６０日目にすべての動物の両方の膝関節内に濃度2.5mg/mlの卵白アルブミン0.25mlを注射により投与する。この注射に当たり、ロンパンおよびケタミンによって動物を鎮静させる必要がある。注射後６日目にグループＡの２４羽の兎に対し、耳静脈より２５ゲージの注射針を使い、溶液の形の治療剤を体重１kgあたり２mgの割合で全身投与する。グループＢの１６羽の兎はコントロールとし、治療剤の投与は行わない。化合物投与後４８時間の時点において、あるいは薬物クリアランス試験が指摘するそれ以外の時点において、局所注射を行ってもよい。グループＡおよびＣの動物を再びロンパンおよびケタミンで鎮静させる。グループＡのすべての動物には両膝に、グループＣの動物には右膝のみに光活性化処理を行なう。４００－６９０nmの波長、あるいは選択した治療剤を活性化できる波長の光エネルギーを、２３ゲージの注射針に通した４００ミクロンの光ファイバを使って膝の関節腔内に導く。その代わりとして、体外から光を照射してもよい。全体で１００Ｊ／cm^2の光エネルギーあるいは投与した化合物に対し適当と思われる範囲のエネルギーを、平均出力を３－５ワットにセットしたレーザを使ってそれぞれの膝に２０分間にわたり与える。ここで、上記出力ワットおよび時間は投与する化合物に効果的な値としてもよい。グループＡから６羽、グループＢとＣから４羽ずつをそれぞれ、化合物投与後１週目、２週目、４週目および１０週目にそれぞれ屠殺する。屠殺時の包括的な観察所見を記録する。滑膜、関節軟骨、半月板および腱のサンプルを採取し、ホルマリン中で固定する。試料はパラフィン包埋、切片作製後、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色する。その試料に対し、炎症、瘢痕および壊死についての検査が顕微鏡を使って行なわれる。これについての一般的な計画を以下にまとめる。投与量、タイミング、光の波長および持続性については、それぞれの試験される治療用化合物によって個々に変化させねばならないことは分かっている。これらの一般的な周辺知識は、この分野に習熟した者に良く知られていることであり、その一部は次の論文および参考文献にまとめられている：Gomer, Photochemistry and Photobiology 54: 1093-1107, 1991; Maziere et al., J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 8: 351-360, 1991; Allison et al., Photochemistry and Photobiology 54: 709-715, 1991;Allison et al., SPIE Proc., In Press, 1991; Allison et al., Photo-chemistry and Photobiology 52: 501-507, 1990; Poon et al., J. Neurosurg.76: 679-686, 1992; Reddi et al., Br. J. Cancer 61: 407-411, 1990; Rich

ter et al., Br. J. Cancer 63: 87-93, 1990;このプロトコルは熟練者のみを対象とする。
１）活性化した感光剤が滑膜を破壊する能力を、病理学的所見とともに文書として記録を残す。
すべての実験終了日に動物から採取した滑膜のサンプルは、固定、パラフィン包埋、染色後、顕微鏡で検査する。屠殺時の包括的な観察所見を書き留めなければならない。光を照射した時点の膝の炎症の様子を臨床医学的に検査し、記録する。採取時の膝の解剖観察所見を記録する。
２）関節軟骨、半月板およびその他の膝の周辺組織に対する活性化したフォトフリンの非毒性作用を文書として記録に残す。
すべての実験終了日に動物から採取した関節軟骨、半月板、腱および筋のサンプルは、固定、パラフィン包埋、染色後、顕微鏡で検査する。採取時の包括的な観察所見を書き留める。採取時の膝の解剖観察所見を記録する。
次に述べる実験例により本発明を実証するが、これらが本発明を制限するものではない。

IV. 実験例

光化学滑膜除去に関する４つの実験例を示す。
第一の実験例Ａでは、３０羽の兎（６０の膝）に対して行なう生体内分布に関し、以下の項目を検討する。１）予備的な実験が示唆する改良を行なった後、動物モデルを再確立する。２）ヘマトポルフィリン誘導体；フォトフリン（ＰＦ）の炎症を起こした滑膜への選択的取り込みを確立させる。３）滑膜内でのフォトフリンの経時的分布を確認し、フォトフリン活性化のために続いて行なう光エネルギーの供給を最適化する。４）フォトフリンの滑膜への取り込みを定量化し、滑膜の破壊に対する有用性を想定。５）フォトフリンの関節軟骨、筋および皮膚での生体内分布についての文書を残す。
実験例Ｂでは、１２羽に対して以下の項目を検討する。１）炎症状態を治療するために光感作療法を採用することの有用性を確める。２）抗原誘導性関節炎の兎モデルを確立する。３）大規模な動物実験を進めるのに先立ち、潜在的に支障が出そうな所を確認する。４）我々の外科的処置および光エネルギーを与える経路を確立する。これらの実験は、フォトフリンを使って行なった。
第三の実験例Ｃでは、光治療剤であるＢＰＤが有効に滑膜に局在することを実証する。またこのことは、新生物形成組織中に局在する他の光感作化合物の局在性とクリアランスについても、全般的に同様な結果が得られる可能性を示すが、滑膜組織での特異的な局在性についてはまだ示されていない。
第四の実験例Ｄでは、前駆体としてアミノレブリン酸（ＡＬＡ）を投与し、滑膜中にin situ（組織内原位置）で感光剤であるプロトポルフィリンIXを生じさせてもよいことを示す。

実験例Ａ：フォトフリンの生体内分布

方法：
体重２－４kgの３０羽のニュージーランド白色家兎を、フロイントのアジュバントに懸濁した卵白アルブミンを６週間に２回注射して感作した。６週目の時点で、すべての動物の両膝の関節内に卵白アルブミン溶液を注射した。関節内注射から７日後に、２５羽に対しフォトフリン（2.0mg/kg）を静脈注射により全身投与した。動物はフォトフリン静注後、６、１２、２４、４８および７２時間の時点で屠殺し、皮膚、四頭筋、膝滑膜、関節軟骨、半月板、骨および腱の組織サンプルを得た。組織の重量を計測（Mettler AE 163型天秤）し、染料抽出までの間摂氏－９０度（Revco超低温冷凍庫）にて冷凍保存した。
染料抽出ではまず、８ccの１規定水酸化ナトリウム溶液中で組織サンプルのホモジェネートを調製（PT 10/35型ホモジェナイザ、Brinkman Instruments, Co., Westbury, NY）した。各サンプルは毎分17,000回転で２０分間遠心（Sorvall RC-5B型冷却装置付高速遠心機、DuPont Instruments）した。上清２ccに対し、蛍光分光光度計（Fluorolog ２型、Spex Industries, Inc., Edison, NJ）を使って蛍光測定を行い、濃度既知のフォトフリン標準溶液に対する測定結果およびコントロールの四頭筋からの抽出物の上清と混合したフ

ォトフリンに対する測定結果と比較した。３６６nmの励起波長および６００から７００nmの間の蛍光スペクトルを分析した。未処理の動物はコントロールとし、バックグラウンドの校正に使用した。
滑膜、関節軟骨および半月板内のフォトフリンの分布も、蛍光顕微鏡を使って検討した。注射後６、１２、２４、４８および７２時間の各時点で、組織標本を実施を施した動物およびコントロールの動物より得た。サンプルをO.C.T.培地中に入れ、摂氏－９０度で凍結した。染色していない厚さ１０ミクロンの冷凍切片をクライオスタット（Microm, Inc., Heidelberg, Germany）を使って調製し、水銀ランプ（HBO 200 W/２型、Zeiss）を装備した蛍光顕微鏡（Axiophot,Zeiss, Oberkochen, Germany）で分析した。励起波長は３００から５００nmの間であった。波長５８０nm以上の発光は、シリコン増倍管ビデオカメラ（MTI-DAGE SIT 66）により増幅され、６０画像を平均された後、ビデオスクリーンに映し出された。その画像は、デジタイジングボード（DT 2255型、Data Translation, Marlboro, MA）を装備したマッキントッシュ IIコンピュータを使ってデジタル化して記憶保存した。凍結切片は、ヘマトキシリン（Ｈ）およびエオシン（Ｅ）で染色後、同一の領域の組織標本と比較した。未処置の動物はコントロールとした。これらの結果を図３にまとめた。
結果：
光学および蛍光顕微鏡観察：屠殺時において、すべての動物に滑膜の炎症が予盾なく観察された。蛍光顕微鏡観察によれば、コントロールの動物から採取した滑膜組織のサンプルには取り込みが見られないことが示された。実験を施した動物から採取した関節軟骨および半付板のサンプルでは、フォトフリンの取り込みは見られなかった。実験を施し、フォトフリンを全身的に投与した動物から採取した滑膜サンプルは、１２、２４、４８および７２時間の時点において顕著な取り込みがあることを示した。フォトフリンの蛍光は、滑膜および炎症性の細胞への取り込みを示唆するパターンを示した。
組織抽出サンプルに対する定量的な分光分析によれば、フォトフリンは炎症を起こした滑膜に顕著に取り込まれることが実証された。注射後４８時間の時点で、この取り込みが最大となった。既知の濃度のサンプルに対する分光分析の結果と比較したところ、組織中のフォトフリンの濃度は組織１グラムあたり４マイクログラムを越えることが分かった。この投与量は新生物形成組織を治療するに当たって有効であると言われているレベルと同等である。関節軟骨、半月板および筋における蛍光のレベルは、無視できる程度のものであり、内因性のポルフィリンが示すベースラインのレベルを越えることはなかった。
結論：
この生体内分布の検討により、ヘマトポルフィリン誘導体（フォトフリン）が、リュウマチ様関節炎のモデルである抗原誘導性関節炎を起こした兎の滑膜に、選択的に取り込まれることが実証された。フォトフリンの全身投与後４８時間の時点で、炎症を起こした滑膜のみを破壊するために、膝関節に対し光による活性化を行ってよいことを指摘している。関節軟骨、半月板、筋および腱へのフォトフリンの取り込みは顕著ではないようであり、他の関節内およびその周辺組織を損傷する危険性を最小にできることを示唆している。
実験例Ｂ：関節炎治療のためにフォトフリンを使用したＰＤＴ
方法：
光化学療法による滑膜除去の実験を、抗原誘導性関節炎（ＡＩＡ）モデルである１２羽のニュージーランド白色家兎に対し、二重コントロール法により行った。６週間の感作期間の後、すべての動物の両膝に、フロイントのアジュバントに懸濁した卵白アルブミンを注射した。５日後、８羽にフォトフリンIIを体重１kgあたり２mgの割合で全身投与した。２４時間の時点で、４羽に対し両膝に関節切開を行った。それぞれの動物の右膝関節に、波長６３０nm、エネルギー１００Ｊ/cm^2のレーザ光を２０分間にわたって照射した。左膝にはレーザ光照射を行わず、コントロールとした。ＨＰＤ注射後４８時間の時点で、さらに別の４羽に対し同一の手術を行った。術後すべての動物は、それぞれのケージに戻し、自由に運動させた。第二のコントロール群である４羽には、外科的処置あるいはレーザ光処理のいずれも行わなかった。処置後一ヶ月の時点で、病理学的評価のために膝関節の滑膜

を採取し、固定、ＨおよびＥ染色を行った。
結果：
コントロール４羽のうち３羽の両膝に急性の滑膜の炎症が見られた。コントロール４羽のうち１羽は投与した抗原に反応せず、病理学的な炎症症状を示さなかった。注射後２４時間の時点で処置をした４羽のうち２羽では、関節の炎症症状は右膝においてコントロールの左膝と比べて顕著に低減することが示された。二つの膝は右と左で定性的な差異が認められた。治癒の状態は、放射線を利用した滑膜除去法による以前の検討で観察されたものと同等であった。注射後４８時間の時点で処置した動物のうち、１羽は麻酔中に死に、１羽はコントロールと比べて炎症症状の低減が見られた。これらの結果を図１および２に示す。

実験例Ｃ：ＰＤＴのためのＢＰＤの使用

体重３－４kgのニュージーランド白色家兎を前述の抗原誘導性関節炎モデル作製プロトコルに従って卵白アルブミンにより感作させた。関節注射後５－７日目に、関節に炎症が起きているのが観察された。ロンパンとケタミンで動物を鎮静させ、連続的に生理食塩水を静脈より注入した。２０ゲージの血管カテーテルを前内側の門部を通して動物の右膝内に経皮的に挿入した。レーザ誘導蛍光システムに接続した６００μｍの石英光ファイバを血管カテーテルに通し、膝関節の中まで到達させた。膝関節の前方の脂肪パッドの上にある滑膜にファイバの遠端部の先を軽く接触させる。
レーザ誘導蛍光システム。窒素パルスレーザ（VSL-337ND型、Laser Science Inc., Cambridge, MA）の出力を、ローダミン６１０色素（Exiton Chemical Co.,Dayton, OH）含有の色素レーザ（DLM 220型、Laser Science Inc., Cambridge, MA）のポンピングに使用した。波長６１０nmの励起パルスを、コアの直径が６００μｍ、焦点距離５mmのレンズの付いた溶融シリカ光ファイバ（Superguide-G, Fiberguide Industries, Stirling, NJ）に送り込む。連結、反射およびファイバ内損失を差し引いて、組織に入射するパルスエネルギーは、通常約１０μJであった。組織からの蛍光は同じ光ファイバを通して戻ってきた。ファイバからの出力は石英製のファイバ束に光学的に結合され、そのファイバ束は入力部で円形に配置されたファイバ群からなっていた。ファイバ束の出力端部では、ファイバは線形に配置され、0.1mm×2.5mmの大きさのスリット型のf/3.8、0.275mの多色分光器（Monospec 27型, Anaspec, Acton, MA）の入射口として機能した。長光路フィルタ（CS2-59型、Swift Glass Co., Elmira, NY）を石英ファイバ束の前に挿入し、レーザの散乱光を取り除いた。波長３００から８００nmの範囲の蛍光を、ＯＭＡ III型マルチチャンネルアナライザ（Princton Applied Research, Princeton, NJ）で制御された１０２４個のダイオードからなる増幅ダイオードアレイを使って記録した。増幅装置３nsecの幅のレーザパルスを中心とする１００nsecの幅のレーザパルスによりゲート制御する。このマルチチャンネルアナライザは各々の励起パスルに対する完全なスペクトルの記録を可能にする。２０のスペクトルを集積し、各々の測定に対し波長６９０nmにおけるピーク値の平均を得る。レーザは１０Hzで作用するため、各スペクトルを得るのに約２秒必要である。
蛍光のベースライン値については、注射の５および１０分前に滑膜に対して測定し、その値を記録する。図４の値は、投与量が２mg/kgであったときのものである。記録は経時的に間隔をおいて行い、３つのグループに対し５００分まで記録する。図４に、滑膜における蛍光の値を時間に対してプロットしたものを示す。

実験例Ｄ：ＰＤＴのためのＡＬＡの使用

前駆体であるδ－アミノレブリン酸（ＡＬＡ）を投与し、感光剤の合成をin situで行わせるという光感作療法。ＡＬＡはヘム生合成経路中の前駆体である。ＡＬＡ合成は非赤血球系細胞における合成の律速段階である。この律速段階が外因性のＡＬＡの細胞への添加により省けるとすると、ポルフィリンが増加することが予想される。速く増殖する細胞は遅く増殖する細胞より多くのポルフィリンを生成することが予想される（表４参照）。リューマチ様関節炎のような増殖性の疾患に、内因性のＰＳ（感光剤）の供給源としてＡＬＡを使用することは有望である。
表４は、ＰpIX合成と増殖率についての実験例を示す。これまで我々は、細胞増殖率は一

般に細胞中でのＰpIX合成に相関する可能性があることを実証してきた。図５は、抗原誘導性関節炎モデルでのＡＬＡの生体内分布を示す。白四角が示すように、注射を行わない場合には滑膜中にＡＬＡは観測されない。これとは対照的に、注射後の滑膜中では多くの量のＡＬＡが観測される。

表１

ＰＤＴにより治療してよい関節疾患

リュウマチ様関節炎

セロネガティブ脊椎関節症

強直性脊椎炎

セロネガティブリュウマチ様関節炎

乾癬性関節炎

小児リュウマチ様関節炎

ライター症候群

潰瘍性大腸炎を伴う関節炎

ウィップル病

肉芽腫性回結腸炎を伴う関節炎

ベーチェット病

全身性エリテマドーデス

シェーグレン症候群

混合結合組織病

血友病

鎌形赤血球症およびその体質

代謝性あるいは内分泌性疾患を伴う関節炎

ヘモクロマトーシスを伴う関節炎

ウィルソン病を伴う関節炎

ゴーシェ病を伴う関節炎

アルカプトン尿症－オクロノーシスを伴う関節炎

高リポ蛋白血症（II　型および IV 型）を伴う関節炎

多発性網内組織球増殖症を伴う関節炎

末端肥大症、上皮小体機能亢進症および上皮小体機能不全症を伴う関節炎

血液疾患を伴う関節炎

結晶誘導性関節炎：偽痛風およびハイドロキシアパタイト

表２

関節疾患の光感作療法に使える化合物

１．　フォトフリン

２．　合成ジポルフィリン類およびジクロリン類

３．　一連のテトラ（ヒドロキシフェニル）ポルフィリンからなるクロリン類やバクテリオクロリン類のようなハイドロポルフィリン類

４．　フタロシアニン類

５．　オルト置換テトラフェニルポルフィリン類（ピケットフェンス型ポルフィリン類）

６．　3,1-メソテトラキス（オルト- プロピオンアミドフェニル）ポルフィリン

７．　ベルジン類

８．　プルプリン類　オクタエチルプルプリンの錫および亜鉛誘導体（ＮＴ２）エチオプルプリン（ＥＴ２）

９．　クロリン類　クロリンｅ６　クロリンｅ６のモノ-1- アスパルチル誘導体

１０．ベンゾポルフィリン誘導体（ＢＰＤ）　ベンゾポルフィリン一酸塩基誘導体　ベンゾポルフィリンのテトラシアノエチレン付加物　ベンゾポルフィリンのジメチルアセチレンジカルボキシレート付加物　ディールス-アルダー付加生成物　ベンゾポルフィリンの一酸塩基環“ａ”誘導体

１１．ヘマトポルフィリン誘導体（ＨＰＤ）で見られたのと同様な局在性のパラメータで、低密度リポ蛋白が介在するするもの

１２．アルミニウムＰＣのスルホン化、たとえばスルホン化AlPc、ジスルホン化物（ $AlPcS_2$ ）、テトラスルホン化誘導体、スルホン化アルミニウムナフタロシアニンなど

１３．亜鉛フタロシアニン類

１４．アントラセンジオン類

１５．アントラピラゾール類

１６．アミノアントラキノン

１７．フェノキサジン染料

１８．フェノチアジン誘導体

１９．カルコゲンピリニウム染料　カチオン性セレンおよびテルルピリニウム誘導体

２０．環置換したカチオン性ＰＣ

２１．フェオフォルビドα

２２．ヘマトポルフィリン（ＨＰ）

２３．プロトポルフィリン

２４．５－アミノレブリン酸

表３

化合物の試験計画

グループＡ：実験、２４体の動物＋感光剤＋右膝に対し光による活性化処理、左膝には光による活性化処理は行わない

初日　－　動物を感作、皮膚注射
３０日目　－　動物を感作、皮膚注射
６０日目　－　関節に卵白アルブミン溶液を注射、滑膜炎を生成
６６日目　－　処置動物に対し、化合物を全身投与
６８日目　－　２４体全部の右膝に対し光ファイバからの光により、透過型照射によりあるいは関節切開して光を照射することにより化合物を活性化処置
７５日目　－　６羽の処置した兎を屠殺、両膝を採取
８３日目　－　６羽の処置した兎を屠殺、両膝を採取
９８日目　－　６羽の処置した兎を屠殺、両膝を採取
１４８日目－　６体の処置した動物を屠殺、両膝を採取

グループＢ：コントロール動物：感光剤非投与、右膝に光による活性化処理、左膝には光による活性化処理を行わない

初日　－　動物を感作、皮膚注射
３０日目　－　動物を感作、皮膚注射
６０日目　－　関節に卵白アルブミン溶液を注射、滑膜炎を生成
６６日目　－　すべての動物に対し、化合物を全身投与
６８日目　－　光による化合物の活性化は行わない
７５日目　－　４体の動物を屠殺
８３日目　－　４体の動物を屠殺
９８日目　－　４体の動物を屠殺
１４８日目－　４体の動物を屠殺

表４

倍加時間（ＤＴｓ）による細胞増殖率測定

細胞株	Ｄｔ（ｈ）	細胞内PpIX（４ｈ）（モル/ 細胞）
ＮＴＢ－２（ラット膀胱カルシノーマ）	１３．５	１６０
５ＰＡＭ（マウス扁平上皮細胞カルシノーマ）	１４	１６０
ＥＪ（ヒト膀胱カルシノーマ）	２３	１００
ＨＳＦ（ヒト皮膚繊維芽細胞）	２７	４０

【図１】

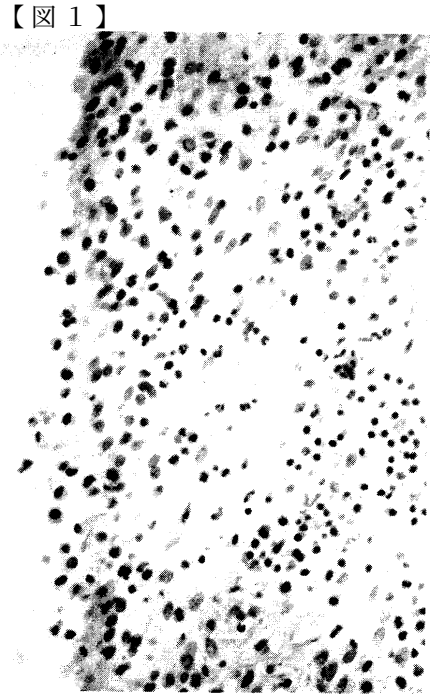

FIG. 1

【図２】

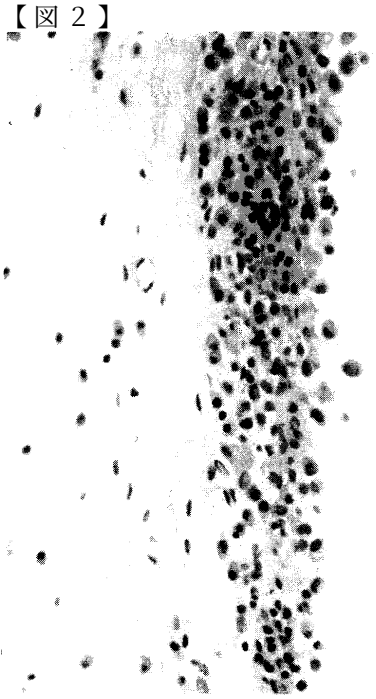

FIG. 2

【図３】

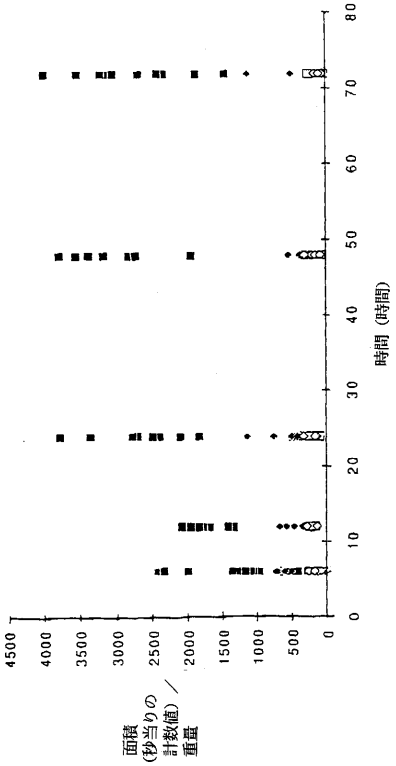

FIG. 3

【図４】

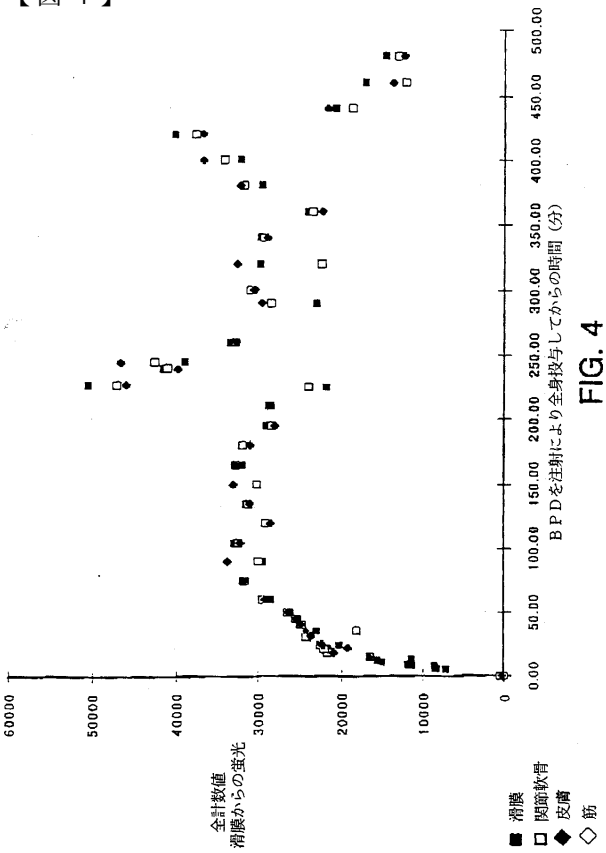

FIG. 4

【図５】

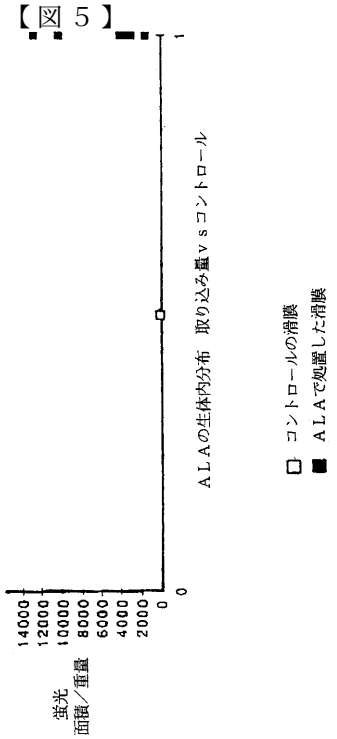

FIG. 5

フロントページの続き

(72)発明者　ハッセン　タイヤバ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　アーリントン　ヒルサイド　アベニュー　６１

審査官　八原　由美子

(56)参考文献　特表平０４－５００７７０（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０５０２８５９４（ＵＳ，Ａ）
Tauraitis VA et al., Biofizika, １９９２年, Vol.37, No.2, p.345-351
Okunaka T et al., Lasers Surg Med., １９９２年, Vol.12, No.1, p.98-103

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 41/00
A61K 31/19
A61K 31/40
A61P 29/00
CA(STN)
MEDLINE(STN)