(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2005-522521

(P2005-522521A)

(43)公表日　平成17年7月28日(2005.7.28)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
A61K 31/4015	A61K	31/4015	4C084
A61K 31/4409	A61K	31/4409	4C086
A61K 33/26	A61K	33/26	
A61K 38/00	A61P	1/04	
A61K 38/44	A61P	1/16	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 59 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-585506 (P2003-585506)
(86)(22)出願日　平成15年4月15日 (2003.4.15)
(85)翻訳文提出日　平成16年12月15日 (2004.12.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/011411
(87)国際公開番号　WO2003/088748
(87)国際公開日　平成15年10月30日 (2003.10.30)
(31)優先権主張番号　60/372,762
(32)優先日　平成14年4月15日 (2002.4.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　399037715
ベス　イスラエル　デアコネス　メディカル　センター
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ボストン　ワン　デアコネス　ロード
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100108774
弁理士　橋本　一憲
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(72)発明者　バッチ　フリッツ　エイチ.
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　マンチェスター－バイ－ザ－シー　ブロッサム　レーン　８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヘムオキシゲナーゼ－１およびヘム分解産物の使用法

(57)【要約】
本発明はヘムオキシゲナーゼ-1およびヘム分解産物を用いる障害の処置に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
炎症を患うかまたは炎症の危険性がある患者を同定する段階；並びに
患者においてフェリチンを誘導すること；患者においてフェリチンを発現させること；および炎症を低減させるのに十分な量でHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、鉄、デスフェロキサミン、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン、鉄デキストラン、またはアポフェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階；
を含む、患者における炎症を低減させる方法。
【請求項２】
処置が、患者においてフェリチンを誘導することである、請求項1記載の方法。
【請求項３】
処置が、患者においてフェリチンを発現させることである、請求項1記載の方法。
【請求項４】
処置が、HO-1を含む薬学的組成物を患者に投与することである、請求項1記載の方法。
【請求項５】
処置が、ビリベルジンを含む薬学的組成物を患者に投与することである、請求項1記載の方法。
【請求項６】
薬学的組成物が約1から1000マイクロモル/kg/日の用量で患者に投与される、請求項5記載の方法。
【請求項７】
炎症が潰瘍性大腸炎に付随する、請求項6記載の方法。
【請求項８】
処置が、ビリルビンを含む薬学的組成物を患者に投与することである、請求項1記載の方法。
【請求項９】
処置が、フェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与することである、請求項1記載の方法。
【請求項１０】
処置が、デスフェロキサミン（DFO）またはサリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン（SIH）を含む薬学的組成物を患者に投与することである、請求項1記載の方法。
【請求項１１】
処置が、鉄デキストランを含む薬学的組成物を患者に投与することである、請求項1記載の方法。
【請求項１２】
処置が、アポフェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与することである、請求項1記載の方法。
【請求項１３】
フェリチンが鉄を患者に投与することにより誘導される、請求項2記載の方法。
【請求項１４】
炎症が、喘息、成人型呼吸促拍症候群、間質性肺線維症、肺塞栓症、慢性閉塞性肺疾患、原発性肺高血圧症、慢性肺気腫、うっ血性心不全、末梢血管疾患、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、虚血-再灌流傷害、心臓発作、糸球体腎炎、腎臓の炎症を伴う症状、尿生殖路の感染、ウイルス性および中毒性肝炎、肝硬変、イレウス、壊死性全腸炎、特異的および非特異的炎症性腸疾患、リウマチ性関節炎、創傷治癒不全、アルツハイマー病、パーキンソン病、移植片対宿主病、および出血性、敗血性またはアナフィラキシー性ショックからなる群より選択される症状に付随する、請求項1記載の方法。
【請求項１５】

炎症が、心臓、肺、肝臓、脾臓、脳、皮膚、および/または腎臓の炎症である、請求項1記載の方法。

【請求項１６】

炎症が、消化管に局在する炎症症状である、請求項1記載の方法。

【請求項１７】

炎症症状が、アメーバ赤痢、細菌性赤痢、住血吸虫症、カンピロバクター全腸炎、エルシニア全腸炎、ヒトギョウチュウ、放射線全腸炎、虚血性大腸炎、好酸球性胃腸炎、潰瘍性大腸炎、不定大腸炎、およびクローン病からなる群より選択される、請求項16記載の方法。

【請求項１８】

炎症症状が潰瘍性大腸炎である、請求項17記載の方法。

【請求項１９】

患者においてHO-1を誘導すること；患者においてHO-1を発現させること；および一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項２０】

患者においてHO-1を誘導し、かつ一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項２１】

（a）ドナーにおいてフェリチンを誘導すること；ドナーにおいてフェリチンを発現させること；およびHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフェロキサミン、鉄デキストラン、またはアポフェリチンを含む薬学的組成物をドナーに投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置をドナーに与える段階；

（b）ドナーから器官を得る段階；並びに

（c）器官をレシピエントに移植する段階

を含む、器官を移植する方法であって、段階（a）で与えられる処置が、レシピエントに移植した後の器官の生存または機能を増強するのに十分である、方法。

【請求項２２】

（a）ドナーの器官を提供する段階；

（b）器官においてフェリチンを誘導すること；器官においてフェリチンを発現させること；およびHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフェロキサミン、鉄デキストラン、またはアポフェリチンを含む薬学的組成物を投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を器官にエクスビボで与える段階；並びに

（c）器官をレシピエントに移植する段階

を含む、器官を移植する方法であって、段階（b）で器官に与えられる処置が、レシピエントに器官を移植した後の器官の生存または機能を増強するのに十分である、方法。

【請求項２３】

（a）ドナーの器官を提供する段階；

（b）器官をレシピエントに移植する段階；並びに

（c）段階（b）の前、間、または後に、レシピエントにおいてフェリチンを誘導すること；レシピエントにおいてフェリチンを発現させること；およびHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフェロキサミン、鉄デキストラン、またはアポフェリチンを含む薬学的組成物をレシピエントに投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置をレシピエントに与える段階

を含む、器官を移植する方法であって、段階（c）でレシピエントに与えられる処置が、レシピエントに器官を移植した後の器官の生存または機能を増強するのに十分である、方法。

【請求項２４】

ドナーにおいてHO-1を誘導すること；ドナーにおいてHO-1を発現させること；および一酸化炭素を含む薬学的組成物をドナーに投与することからなる群より選択される、少なく

とも1つの処置をドナーに与える段階をさらに含む、請求項21記載の方法。
【請求項２５】
ドナーにおいてHO-1を誘導し、かつ一酸化炭素を含む薬学的組成物をドナーに投与する段階をさらに含む、請求項21記載の方法。
【請求項２６】
器官においてHO-1を誘導すること；器官においてHO-1を発現させること；および一酸化炭素を含む薬学的組成物を器官に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階をさらに含む、請求項22記載の方法。
【請求項２７】
器官においてHO-1を誘導し、かつ一酸化炭素を含む薬学的組成物を器官に投与する段階をさらに含む、請求項22記載の方法。
【請求項２８】
レシピエントにおいてHO-1を誘導すること；レシピエントにおいてHO-1を発現させること；および一酸化炭素を含む薬学的組成物をレシピエントに投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階をさらに含む、請求項23記載の方法。
【請求項２９】
レシピエントにおいてHO-1を誘導し、かつ一酸化炭素を含む薬学的組成物をレシピエントに投与する段階をさらに含む、請求項23記載の方法。
【請求項３０】
（a）患者に血管形成術を実施する段階；および
（b）実施する段階の前、間、または後に、患者においてフェリチンを誘導すること；患者においてフェリチンを発現させること；およびHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフェロキサミン、鉄デキストラン、またはアポフェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を与える段階
を含む、患者に血管形成術を実施する方法。
【請求項３１】
患者においてHO-1を誘導すること；患者においてHO-1を発現させること；および一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階をさらに含む、請求項30記載の方法。
【請求項３２】
患者においてHO-1を誘導し、かつ一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階をさらに含む、請求項30記載の方法。
【請求項３３】
（a）患者に血管手術を実施する段階；および
（b）実施する段階の前、間、または後に、患者においてHO-1またはフェリチンを誘導すること；患者においてHO-1またはフェリチンを発現させること；およびHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフェロキサミン、鉄デキストラン、またはアポフェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を与える段階；
を含む、患者に血管手術を実施する方法。
【請求項３４】
患者においてHO-1を誘導すること；患者においてHO-1を発現させること；および一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階をさらに含む、請求項33記載の方法。
【請求項３５】
患者においてHO-1を誘導し、かつ一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階をさらに含む、請求項33記載の方法。
【請求項３６】

細胞増殖障害および/もしくは細胞分化障害を患うかまたはその危険性がある患者を同定する段階；並びに
患者においてフェリチンを誘導すること；患者においてフェリチンを発現させること；および細胞増殖障害および/または細胞分化障害を処置するのに十分な量で、HO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、鉄、デスフェロキサミン、鉄デキストラン、またはアポフェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階；
を含む、患者における細胞増殖障害および/または細胞分化障害を処置する方法。
【請求項３７】
患者においてHO-1を誘導すること；患者においてHO-1を発現させること；および一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階をさらに含む、請求項36記載の方法。
【請求項３８】
患者においてHO-1を誘導し、かつ一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階をさらに含む、請求項36記載の方法。
【請求項３９】
虚血を患うかまたは虚血の危険性がある患者を同定すること；並びに
患者においてフェリチンを誘導すること；患者においてフェリチンを発現させること；および虚血の影響を低減させるのに十分な量で、HO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、鉄、デスフェロキサミン、鉄デキストラン、またはアポフェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階；
を含む、患者における虚血の影響を低減させる方法。
【請求項４０】
患者においてHO-1を誘導すること；患者においてHO-1を発現させること；および一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与することからなる群より選択される、少なくとも1つの処置を患者に与える段階をさらに含む、請求項40記載の方法。
【請求項４１】
患者においてHO-1を誘導し、かつ一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階をさらに含む、請求項40記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
優先権の主張
本出願は米国特許法第119条（e）項の下で2002年4月15日出願の米国特許出願第60/372,762号に対する優先権を主張し、その内容は全て参照として本明細書に組み入れられる。
【０００２】
連邦政府により資金援助された研究開発
本発明は米国国立衛生研究所により賦与された助成金第HL58688号の下で政府支援を伴って為された。政府は本発明において一定の権限を有している。
【０００３】
技術分野
本発明はヘムオキシゲナーゼ-1およびヘム分解産物を用いる障害の処置に関する。
【背景技術】
【０００４】
背景
ヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）はヘムの分解の第1段階を触媒する。HO-1はb型ヘム分子のαメソ炭素架橋を酸化により切断し、等モル量のビリベルジンIXa、一酸化炭素（CO）、および遊離の鉄を生じる。続いて、ビリベルジンはビリベルジンリダクターゼによりビリルビンに変換され、そしてヘムからのFe^{2+}の放出がFe^{2+}捕捉タンパク質フェリチンの

発現を誘導し、これはFe^{2+}のFenton反応を介した遊離ラジカルの作製に関与する能力を制限することにより、抗酸化剤として作用する。

【発明の開示】

【０００５】

概要

本発明は一部、ヘムおよび/またはHO-1の分解産物の投与が炎症を軽減し、そして虚血に付随する損傷を抑制するという発見に基づいている。

【０００６】

従って、本発明は、炎症を患うかまたは炎症の危険性を有する患者を同定する段階、並びに患者においてフェリチンを誘導し；患者においてフェリチンを発現させ；そして/または炎症を低減させるのに十分量のHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、鉄、デスフェロキサミン（DFO）、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン（SIH）、鉄デキストラン、および/もしくはアポフェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与することを含む処置を患者に与える段階を含む、患者の炎症を低減させる方法を特徴とする。

【０００７】

1つの態様では、処置はビリベルジンを含む薬学的組成物を投与することである。薬学的組成物を例えば約1から1000マイクロモル/kg/日、例えば10から500μmol/kg/日、20から200μmol/kg/日、または25から100μmol/kg/日の投与量で患者に投与することができる。

【０００８】

または、あるいは加えて、処置はビリルビンを含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含むことができる。約1から約300μmol/l、例えば約10から約200μmol/l、または約50から約100μmol/lの範囲のビリルビンの血清レベルを生じるように薬学的組成物を患者に投与することができる。約1から1000mg/kg、例えば10から500mg/kg、20から200mg/kg、または25から150mg/kgの範囲内に入ることができるビリルビンの個々の投与量を投与することができる。

【０００９】

さらに、処置はアポフェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含むことができる。薬学的組成物を例えば約1から1000mg/kg、例えば10から500mg/kg、20から200mg/kg、または25から150mg/kgの投与量で患者に投与することができる。

【００１０】

処置はDFOを含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含むこともできる。薬学的組成物を例えば約0.1から1000mg/kg、例えば0.5から800mg/kg、1から600mg/kg、2から400mg/kg、または2.5から250mg/kgの投与量で患者に投与することができる。

【００１１】

さらに、処置は鉄デキストランを含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含むことができる。薬学的組成物を例えば約1から1000mg/kg、例えば10から900mg/kg、100から800mg/kg、300から700mg/kg、または400から600mg/kgの投与量で患者に投与することができる。または、遊離の鉄を、例えば鉄サプリメントの形態で患者に送達することができる。

【００１２】

処置はまたサリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン（SIH）を含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含むこともできる。薬学的組成物を例えば約0.02から100mmol/kg、例えば約0.02から10mmol/kg、例えば0.02から50mmol/kgまたは0.2から20mmol/kgの投与量で患者に経口的または非経口的に投与することができる。

【００１３】

炎症は、非限定例としては喘息、成人型呼吸促拍症候群、間質性肺線維症、肺塞栓症、慢性閉塞性肺疾患、原発性肺高血圧症、慢性肺気腫、うっ血性心不全、末梢血管疾患、脳卒中、アテローム性動脈硬化症、虚血-再灌流傷害、心臓発作、糸球体腎炎、腎臓の炎症を伴う症状、尿生殖路の感染、ウイルス性および中毒性肝炎、肝硬変、イレウス、壊死性

全腸炎、特異的および非特異的炎症性腸疾患、リウマチ性関節炎、創傷治癒不全、アルツハイマー病、パーキンソン病、移植片対宿主病、または出血性、敗血性、もしくはアナフィラキシー性ショックなどがある。

【００１４】

本発明の態様では、炎症は心臓、肺、肝臓、膵臓、関節、眼、気管支、脾臓、脳、皮膚、および/または腎臓の炎症である。炎症はまた消化管に局在する炎症症状でもよい。炎症症状は例えばアメーバ赤痢、細菌性赤痢、住血吸虫症、カンピロバクター全腸炎、エルシニア全腸炎、ヒトギョウチュウ、放射線全腸炎、虚血性大腸炎、好酸球性胃腸炎、潰瘍性大腸炎、不定大腸炎（indeterminate colitis）およびクローン病でもよい。

【００１５】

方法はさらに患者においてHO-1を誘導および/もしくは発現する段階、並びに/または一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含むことができる。

【００１６】

別の局面では、本発明は器官を移植する方法を特徴とし、この方法はHO-1またはフェリチンをドナーにおいて誘導すること；フェリチンをドナーにおいて発現させること；並びに/またはHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフェロキサミン、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン、鉄デキストラン、および/もしくはアポフェリチンを含む薬学的組成物をドナーに投与することを含む処置をドナーに与える段階；ドナーから器官を得る段階；並びに器官をレシピエントに移植する段階を含み、ここで与えられた処置はレシピエントへの移植の後に器官の生存または機能を増強するのに十分である。特定の態様では、前記方法はさらにドナーにおいてHO-1を誘導および/もしくは発現させる段階、並びに/または一酸化炭素を含む薬学的組成物をドナーに投与する段階を含む。

【００１７】

本発明はまた器官を移植する方法をも特徴とし、この方法は、ドナーの器官を提供する段階；HO-1もしくはフェリチンを器官において誘導する段階；HO-1もしくはフェリチンを器官において発現させること；並びに/またはHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフェロキサミン、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン、鉄デキストラン、および/もしくはアポフェリチンを含む薬学的組成物を投与することを含む処置をエクスビボで器官に与える段階；並びに器官をレシピエントに移植することを含み、ここで器官に与えられた処置は移植後の器官の生存または機能を増強するのに十分である。特定の態様では、方法はさらに器官においてHO-1を誘導および/もしくは発現させる段階、並びに/または一酸化炭素を含む薬学的組成物を器官に投与する段階を含む。

【００１８】

さらに、本発明は器官を移植する方法を特徴とし、この方法は、ドナーからの器官を提供する段階；器官をレシピエントに移植する段階；並びに移植段階の前、間、または後に、HO-1もしくはフェリチンをレシピエントにおいて誘導すること；HO-1もしくはフェリチンをレシピエントにおいて発現させること；および/またはHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフェロキサミン、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン、鉄デキストラン、および/もしくはアポフェリチンを含む薬学的組成物をレシピエントに投与することを含む処置をレシピエントに与えることを含み、ここでレシピエントに与えられた処置はレシピエントへの器官の移植の後に器官の生存または機能を増強するのに十分である。特定の態様では、方法はさらにレシピエントにおいてHO-1を誘導および/もしくは発現させる段階、並びに/または一酸化炭素を含む薬学的組成物をレシピエントに投与する段階を含む。

【００１９】

別の局面では、本発明は患者において血管形成術を実施する方法を提供し、この方法は、患者において血管形成術を実施する段階；並びに実施段階の前、間、または後にHO-1もしくはフェリチンを患者において誘導すること；HO-1もしくはフェリチンを患者において発現させること；並びに/またはHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフ

ェロキサミン、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン、鉄デキストラン、および/もしくはアポフェリチンを含む薬学的組成物を患者に投与することを含む処置を与える段階を含む。特定の態様では、方法はさらに患者においてHO-1を誘導および/もしくは発現させる段階、並びに/または一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含む。

【００２０】

本発明はまた患者において血管手術を実施する方法を特徴とし、この方法は患者において血管手術を実施する段階；並びに血管手術を実施する前、間、または後に、HO-1もしくはフェリチンを患者において誘導すること；フェリチンを患者において発現させること；および/またはHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、デスフェロキサミン、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン、鉄デキストラン、および/もしくはアポフェリチンを含む薬学的組成物を投与することを含む少なくとも1つの処置を患者に与える段階を含む。特定の態様では、前記方法はさらに患者においてHO-1を誘導および/もしくは発現させる段階、並びに/または一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含む。

【００２１】

さらに別の局面では、本発明は患者において細胞増殖障害および/または細胞分化障害を処置する方法を特徴とし、この方法は、細胞増殖障害および/または細胞分化障害を患うか、またはその危険性のある患者を同定する段階；並びにフェリチンを患者において誘導すること；フェリチンを患者において発現させること；および/またはHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、鉄、デスフェロキサミン、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン、鉄デキストラン、および/もしくはアポフェリチンを含む薬学的組成物を、細胞増殖および/もしくは分化障害を処置するのに十分な量で患者に投与することを含む少なくとも1つの処置を患者に与える段階を含む。特定の態様では、前記方法はさらに患者においてHO-1を誘導および/もしくは発現させる段階、並びに/または一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含む。

【００２２】

さらに別の局面では、本発明は患者において虚血の影響を低減させる方法を特徴とし、この方法は、虚血を患うかまたはその危険性のある患者を同定する段階；並びにフェリチンを患者において誘導すること；フェリチンを患者において発現させること；並びに/またはHO-1、ビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、鉄、デスフェロキサミン、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン、鉄デキストラン、および/もしくはアポフェリチンを含む薬学的組成物を、虚血の影響を低減させるのに十分な量で患者に投与することを含む、少なくとも1つの処置を患者に与える段階を含む。特定の態様では、前記方法はさらに患者においてHO-1を誘導および/もしくは発現させる段階、並びに/または一酸化炭素を含む薬学的組成物を患者に投与する段階を含む。

【００２３】

「薬学的組成物」なる用語は、患者および/または器官に投与することができる活性成分、例えばHO-1もしくはフェリチン（またはHO-1もしくはフェリチンのインデューサー）、ビリルビン、および/またはビリベルジンを含有する気体、液体または固体組成物を記載するために本明細書の全体にわたって用いられる。本発明はこれらのいずれか2つ、3つ、4つまたは5つを組み合わせて、または順々に使用することを企図する。薬学的組成物のどの形態、例えば気体、液体および/または固体が規定の適用に好ましいかは当業者には認識されよう。さらに、規定の適用のための薬学的組成物にどの活性成分を含めるべきかは当業者には認識されよう。

【００２４】

「患者」なる用語は本発明の方法による処置が提供されるヒトまたは非ヒト動物を記載するために本明細書の全体にわたって用いられる。本発明に獣医学的適用が見込まれているのは明白である。前記用語には、非限定例として、哺乳動物、例えばヒト、その他の霊長類、ブタ、げっ歯類、例えばマウスおよびラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、

ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ヒツジ、およびヤギが含まれる。

【００２５】

本明細書で用いる「有効量」および「処置するのに有効」なる用語は、意図される効果または生理学的な結果を引き起こすためのその投与の文脈で有効である量、または濃度、並びに急性または慢性投与および定期的または連続的投与を含む期間での、本明細書で記載する（複数の）薬学的組成物の投与を意味する。本明細書で用いる「処置する」または「処置」なる用語は、疾患または症状、例えば本明細書で記載する疾患または症状の影響の発症を遅延、阻止、または軽減することを記載する。

【００２６】

炎症または虚血、例えば移植関連の虚血に付随する損傷の処置または予防のための薬剤の製造におけるHO-1並びに/またはいずれかのヘムの分解産物、例えばビリルビン、ビリベルジン、フェリチン、鉄、デスフェロキサミン（DFO）、サリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン（SIH）、鉄デキストラン、および/もしくはアポフェリチンの使用もまた本発明に含まれる。炎症を患うかまたはその危険性のある患者における炎症を処置または予防するための方法において薬剤を使用することができる。器官移植の方法において、例えば炎症および虚血-再灌流傷害を低減させるために薬剤を使用することもできる。また患者に血管手術または血管形成術を実施する方法において薬剤を使用することもできる。また患者において細胞増殖障害および/または細胞分化障害を処置する方法で薬剤を使用することもできる。また患者における虚血の影響を処置または予防する方法で薬剤を使用することもできる。薬剤は本明細書に記載するいずれかの形態でよく、そして単独で、または例えばCOと組み合わせて投与することができる。

【００２７】

別に定義しないかぎり、本明細書で用いる全ての技術および科学的用語は本発明が属する当業者に一般に理解されるのと同一の意味を有している。本明細書に記載するものに類似するかまたは等しい方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、適当な方法および材料を以下に記載する。本明細書に記載する全ての刊行物、特許出願、特許、およびその他の参照文献はその全てが参照として本明細書に組み入れられる。抵触する場合は定義を含めて本明細書が支配する。加えて、材料、方法および実施例は説明のためだけであり、限定することを意図しない。

【００２８】

本発明の一つまたは複数の態様の詳細を添付の図面および以下の記載に示す。本発明のその他の特徴、目的、および利点は記載および図面から、並びに請求の範囲から明らかであろう。

【００２９】

詳細な説明

本発明は種々の疾患または症状、例えば炎症を処置するために、および/または種々の外科的手順、例えば移植手術の結果を改善するために、患者におけるいずれかまたは全てのヘム分解産物を提供、例えば投与、誘導および/または発現することを含む。任意で、ヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）を、いずれかまたは全てのヘム分解産物、例えば一酸化炭素（CO）、ビリベルジン、ビリルビン、鉄およびフェリチンの投与と組み合わせて患者に提供することができる。または、いずれかまたは全てのヘム分解産物を患者に提供する代わりにHO-1を患者に提供することができる。

【００３０】

ヘムオキシゲナーゼ-1およびヘム分解産物の使用

ヘムオキシゲナーゼ-1

患者においてHO-1を誘導または発現することにより、または外因性のHO-1を直接患者に投与することによりHO-1を患者に提供することができる。本明細書で用いる「誘導する（誘導した）」なる用語は、タンパク質、例えばHO-1またはフェリチンをコードする、患者自身の内因性（例えば非組換え）遺伝子を用いて患者の体内で前記タンパク質の生成の増加を引き起こすことを意味する。

【００３１】
当技術分野において公知のいずれかの方法により患者においてHO-1を誘導することができる。例えば、HO-1の生成を、ヘミンにより、鉄プロトポルフィリンにより、またはコバルト・プロトポルフィリンにより誘導することができる。重金属、サイトカイン、ホルモン、一酸化窒素、$COCl_2$、エンドトキシン、および熱ショックなどの種々の非ヘム物質もまたHO-1発現の強力なインデューサーである（Otterbeinら、Am.J.Physiol.Lung Cell Mol.Physiol.279：L1029-L1037（2000）；Choiら、Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.15：9-19（1996）；Maines、Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.37：517-554（1997）；およびTenhunenら、J.Lab.Clin.Med.75：410-421（1970））。HO-1はまた、過酸化水素、グルタチオン枯渇薬（depletor）、UV照射および酸素過剰症などの酸化ストレスを創り出す種々の作用物質および条件により高度に誘導される（Choiら、Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.15：9-19（1996）；Maines、Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.37：517-554（1997）；およびKeyseら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86：99-103（1989））。「HO-1のインデューサーを含む薬学的組成物」とは、患者においてHO-1を誘導することができるいずれかの作用物質、例えば本明細書で記載するいずれかの作用物質、例えばヘミン、鉄プロトポルフィリン、および/またはコバルト・プロトポルフィリンを含有する薬学的組成物を意味する。

【００３２】
本発明は、遺伝子移入により患者においてHO-1を発現することができることを企図する。本明細書で用いる「発現する（発現した）」なる用語は、体外から投与された遺伝子（例えば組換え遺伝子）を用いて患者の体内でタンパク質、例えばHO-1またはフェリチンの生成の増加を引き起こすことを意味する。いかなる免疫反応をも最小限にするために、HO-1またはフェリチンは患者と同一種（例えばヒト、マウス、ラット等）のものであるのが好ましい。構成性プロモーター（例えばサイトメガロウイルスプロモーター）または組織特異的プロモーター（例えば乳房細胞の乳清プロモーターまたは肝臓細胞のアルブミンプロモーター）により発現を駆動させることができる。HO-1またはフェリチンをコードする適当な遺伝子治療ベクター（例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、ポックス（例えばワクシニア）ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、マウスの微小ウイルス、B型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス1およびレンチウイルス）を経口的に、吸入により、または本明細書で記載する症状の処置に適当な位置での注射により患者に投与する。症状の部位への直接的な局所投与が特に好ましい。同様に、HO-1またはフェリチンをコードするプラスミドベクターを例えば裸のDNAとして、リポソーム中で、または微粒子中で投与することができる。

【００３３】
さらに、当技術分野において公知のいずれかの方法により外因性HO-1タンパク質を患者に直接投与することができる。本明細書で記載した患者におけるHO-1の誘導または発現に加えて、またはこれの代替として外因性HO-1を直接投与することができる。HO-1タンパク質をリポソーム中で、および/または融合タンパク質として、例えばTAT融合タンパク質として患者に送達することができる（例えばBecker-Hapakら、Methods 24：247-256（2001）参照）。外科的手順、例えば移植の文脈において、HO-1をドナー、レシピエントおよび/または移植される器官に誘導および/または発現および/または投与することができると考えられる。

【００３４】
ヘム分解産物

加えて、あるいはまたは、ヘム分解産物を本明細書で記載する疾患または症状を処置するために患者に投与することができる。「ヘム分解産物」には一酸化炭素、鉄、ビリベルジン、ビリルビンおよび（アポ）フェリチンなどがある。前記のいずれかを例えば薬学的組成物の活性成分として、または本明細書で記載する別の方法により患者に提供することができる。

【００３５】
ビリベルジンおよびビリルビン

「ビリベルジン」および「ビリルビン」なる用語は、ヘム分解の結果として生成される直鎖状テトラピロール化合物を意味する。

【００３６】

ビリベルジンおよび/またはビリルビンを含む薬学的組成物は、典型的には水性または固体形態で患者に投与される。本発明の方法に有用なビリベルジンおよびビリルビンをいずれかの市販の供給源、例えば医療用途または研究用途の生化学物質を供給するいずれかの供給源から入手することができる。ビリベルジンおよびビリルビンの調製、使用または保存において、化合物をできるだけ光に曝露しないことが推奨される。

【００３７】

薬学的組成物に含まれ、かつ患者に投与されるビリベルジンおよび/またはビリルビンの量は、ビリルビンおよび/またはビリベルジンの吸収、分布、不活性化および排泄速度、並びに当業者に公知のその他の因子に依存する。ビリベルジンおよび/またはビリルビンの有効量は特定の疾患または症状を処置するのに有効な量である。

【００３８】

ビリベルジンの有効量は約1から1000マイクロモル/kg/日の範囲内にあってよく、例えば少なくとも10μmol/kg/日、例えば少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、または900μmol/kg/日である。好ましい範囲には10から500μmol/kg/日、20から200μmol/kg/日、および25から100μmol/kg/日などがある。ビリベルジンは体内で急速にビリルビンに変換される（ビリベルジンリダクターゼによる）ので、本発明は1000マイクロモル/kg/日を超えるビリベルジン用量を患者に投与できることを企図する。ビリベルジンの全用量を、1回投与量として、多回投与量で（例えば1日数回）、または持続注入により投与することができる。

【００３９】

約1から約300μmol/l、例えば少なくとも約10から約200μmol/l、または約50から約100μmol/lの範囲の血清ビリルビンレベルを生じるようにビリルビンの有効量を患者に投与することができる。このような血清レベルを生じるために、約1から1000mg/kgの範囲に入りうる、例えば少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、または900mg/kgのビリルビンの個々の投与量を投与することができる。好ましい範囲には10から500mg/kg、20から200mg/kg、および25から150mg/kgなどがある。ビリルビンの全用量を1回投与量として、多回投与量で（例えば1日数回）、または持続注入により投与することができる。

【００４０】

適用に依存してこれらの範囲外のビリルビンおよび/またはビリベルジンの量を使用できることは当業者には理解されよう。ビリベルジンおよび/またはビリルビンを含む薬学的組成物の急性、亜急性、および慢性投与が本発明により企図され、これは例えば患者の疾患または症状の重篤度または持続性に依存する。症状を処置し、かつ意図される薬理学的または生物学的効果を奏するのに十分な時間（無期限を含む）、組成物を患者に送達することができる。

【００４１】

本発明はビリベルジンおよび/またはビリルビンを担体に結合できることを企図する。このような担体には、例えばアルブミンまたはシクロデキストリンなどがある。ビリベルジンおよび/またはビリルビンのこのような担体への結合は、ビリベルジンおよび/またはビリルビンの溶解性を増し、それによりビリベルジンおよび/またはビリルビンの組織での沈着を防ぐことができる。本発明は、望ましい効果を生み出すために未結合のビリベルジンおよび/またはビリルビン並びにアルブミンを個別に投与できることを企図する。

【００４２】

または、あるいは加えて、患者においてビリルビンレベルを上昇させるのが望ましいと考えられる状況では、ビリベルジンリダクターゼを患者に誘導、発現および/または投与することができることが企図される。ビリベルジンリダクターゼタンパク質を例えばリポソーム中で患者に送達することができる。さらに本発明は、遺伝子移入により患者におい

てビリベルジンリダクターゼのレベルを上昇させることができることを企図する。適当な発現調節配列に動作可能に連結されたコード化配列を伴う、ビリベルジンリダクターゼをコードする適当な遺伝子治療ベクター（例えばプラスミド、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レンチウイルス、または本明細書で記載するいずれかその他の遺伝子治療ベクター）を、経口的に、吸入により、または本明細書で記載する症状の処置に適当な位置での注射により患者に投与する。本発明の1つの態様では、ビリベルジンリダクターゼをコードするベクターを、本明細書で記載する症状に冒されている器官に投与し、そして続いてまたは同時にビリベルジンを器官に投与して、器官においてビリベルジンリダクターゼがビリベルジンを分解してビリルビンを生成するようにする。

【００４３】

鉄およびフェリチン

HO-1のヘムに対する作用による遊離の鉄の放出がアポフェリチンの誘導を刺激し、これは迅速に鉄を捕捉してフェリチンを形成する。本発明は炎症または虚血または患者の種々の疾患もしくは症状に付随する細胞増殖を処置するために、患者においてフェリチンを誘導または発現させることを含む。当技術分野において公知のいずれかの方法によりフェリチンを患者において誘導することができる。例えば患者に鉄デキストランを投与することによりフェリチンを誘導することができる。別の実例としては、患者に紫外線を曝露することにより患者におけるフェリチンレベルを上昇させることができる（Otterbeinら、Am. J.Physiol.Lung.Cell Mol.Physiol.279：L1029-L1037（2000））。

【００４４】

「フェリチンのインデューサーを含む薬学的組成物」とは、患者においてフェリチンを誘導することができるいずれかの作用物質、例えばヘム、鉄、および/または鉄デキストランを含有する薬学的組成物を意味する。典型的には、フェリチンのインデューサーを含む薬学的組成物は、水性または固体形態で患者に投与される。本発明の方法に有用なフェリチンのインデューサー、例えば鉄または鉄デキストランを、いずれかの商業用の供給源、例えば医療用途または研究用途の化学物質を供給する商業用の供給源から入手することができる。

【００４５】

フェリチンのインデューサー、例えば鉄または鉄デキストランの有効量は疾患または症状を処置するのに有効な量である。有効量の鉄デキストランを1日1回または数回投与でき、各投与量は、約1から1000mg/kgの範囲に入ることができ、例えば少なくとも2、2.5、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、300、400、500、600、700、800、または900mg/kgでよい。鉄デキストランの好ましい範囲には10から900mg/kg、100から800mg/kg、300から700mg/kg、または400から600mg/kgなどがある。市販により入手可能な鉄サプリメント、例えば鉄を含有する錠剤の1回量または多回投与量として、遊離の鉄を患者に送達することができる。

【００４６】

さらに、本発明は遺伝子移入により患者においてフェリチン、例えばH鎖フェリチンのレベルを上昇させることができることを企図する。適当な遺伝子治療ベクター（本明細書に記載される）を患者に経口的に、または本明細書に記載する症状を処置するのに適当な位置で注射もしくは移植により投与する。さらに、当技術分野において公知のいずれかの方法により外因性のフェリチンを直接患者に投与することができる。本明細書に記載するように、患者においてフェリチンを誘導または発現させるのに加えて、またはその代替として、外因性のフェリチンを直接投与することができる。フェリチンタンパク質を例えばリポソーム中で、および/または融合タンパク質として、例えばTAT融合タンパク質として患者に送達することができる（例えばBecker-Hapakら、Methods 24：247-256（2001）参照）。

【００４７】

または、あるいは加えて、その他の鉄結合分子を患者に投与して望ましい効果（例えば遊離鉄レベルを低下する）を生み出すかまたは増強することができることが企図される。

1例としては、本発明はアポフェリチンおよびいずれかの型の鉄キレーター、例えばデスフェロキサミン（DFO）またはサリチルアルデヒド・イソニコチノイル・ヒドラゾン（SIH）を患者に投与して（例えばBlahaら、Blood 91（11）：4368-4372（1998）参照）、望ましい効果を生み出すかまたは増強することができることを企図する。

【００４８】

有効量のDFOを1日1回または数回投与することができ、そして各投与量は、約0.1から1000mg/kgの範囲に入ることができ、例えば少なくとも2、2.5、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、300、400、500、600、700、800、または900mg/kgでよい。DFOの好ましい範囲には0.5から800mg/kg、1から600mg/kg、2から400mg/kg、または2.5から250mg/kgなどがある。

【００４９】

有効量のSIHを1日1回または数回投与することができ、そして各投与量は、約0.02から100mmol/kg、例えば0.02から50mmol/kg、または0.2から20mmol/kgの範囲に入ることができる。

【００５０】

有効量のアポフェリチンを1日1回または数回投与することができ、そして各投与量は、約1から1000mg/kgの範囲に入ることができ、例えば少なくとも2、2.5、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、300、400、500、600、700、800、または900mg/kgでよい。好ましい範囲には10から500mg/kg、20から200mg/kg、および25から150mg/kgなどがある。

【００５１】

前記のいずれか、例えば鉄キレート、例えばDFOまたはSIH、鉄デキストラン、およびアポフェリチンを1回投与量として、多回投与量で（1日数回投与）、または持続注入により投与することができることは当業者には認識されよう。さらに前記のいずれかを連続的に、かつ望ましい効果を生み出すのに必要な長さで投与することができる。さらに、前記のいずれかを、適用に依存して規定の範囲を超える量で投与できることは当業者に認識されよう。

【００５２】

一酸化炭素

本明細書で用いる「一酸化炭素」（または「CO」）なる用語は、その気体状態の、液状に圧縮された、または水溶液に溶解した一酸化炭素分子を記載する。本発明の使用に有効な量の一酸化炭素は、疾患または症状を処置するのに有効な量である。気体に関しては、一酸化炭素の有効量は概して約0.0000001%から約0.3重量%、例えば0.0001%から約0.25重量%の範囲に入り、好ましくは少なくとも約0.001重量%、例えば0.005重量%、0.010重量%、0.02重量%、0.025重量%、0.03重量%、0.04重量%、0.05重量%、0.06重量%、0.08重量%、0.10重量%、0.15重量%、0.20重量%、0.22重量%、または0.24重量%の一酸化炭素である。COの液体溶液に関しては、有効量は概して約0.0001%から約0.0044g CO/液体100gの範囲に入り、例えば0.0001、0.0002、0.0004、0.0006、0.0008、0.0010.0.0013、0.0014、0.0015、0.0016、0.0018、0.0020、0.0021、0.0022、0.0024、0.0026、0.0028、0.0030、0.0032、0.0035、0.0037、0.0040、または0.0042g CO/水溶液100gである。適用に依存してこれらの範囲を超える量を使用できることは当業者に理解されよう。

【００５３】

一酸化炭素組成物は気体の一酸化炭素組成物でよい。本発明の方法に有用な圧縮または加圧された気体をいずれかの商業用供給源から、圧縮された気体を貯蔵するのに適当ないずれかの型の容器で入手することができる。例えば、圧縮または加圧された気体を、医療用途の圧縮された気体、例えば酸素を供給するいずれかの供給源から入手することができる。本発明の方法において用いられる一酸化炭素などの加圧された気体を、望ましい最終組成物の全ての気体（例えばCO、He、NO、CO_2、O_2、N_2）が同一の容器に入るように提供することができる。任意で、個々の気体が入った複数の容器を用いて本発明の方法を実施することができる。例えば、一酸化炭素が入った単一の容器をその他の気体を伴うかまた

は伴わないで提供することができ、その内容物は場合によっては、その他の容器、例えば酸素、窒素、二酸化炭素、圧縮空気、またはいずれかその他の適当な気体もしくはその混合物が入った容器の内容物と混合することができる。

【００５４】

本発明に従って患者に投与される気体の一酸化炭素組成物は典型的には0重量％から約79重量％の窒素、約21重量％から約100重量％の酸素、および約0.0000001重量％から約0.3重量％（約1ppbまたは0.001ppmから約3,000ppmに相当する）の一酸化炭素を含有する。好ましくは、気体組成物中の窒素の量は約79重量％、酸素の量は約21重量％、および一酸化炭素の量は約0.0001重量％から約0.25重量％、好ましくは少なくとも約0.001重量％、例えば0.005重量％、0.010重量％、0.02重量％、0.025重量％、0.03重量％、0.04重量％、0.05重量％、0.06重量％、0.08重量％、0.10重量％、0.15重量％、0.20重量％、0.22重量％、または0.24重量％の一酸化炭素である。適用に依存して、0.3％以上（例えば1％またはそれ以上）の一酸化炭素濃度を有する気体の一酸化炭素組成物を短期間（例えば1回または数回の呼吸で）使用することができる。

【００５５】

気体の一酸化炭素組成物を用いて一酸化炭素ガスを含む雰囲気を作ることができる。例えば一酸化炭素ガスを含む加圧された気体が入った容器を提供すること、および加圧された気体を容器からチャンバーまたは空間に放出して、チャンバーまたは空間の内部に一酸化炭素ガスを含む雰囲気を形成することにより、適当なレベルの一酸化炭素ガスを含む雰囲気を作ることができる。または、気体を呼吸マスクまたは呼吸管に至る装置に放出し、それにより呼吸マスクまたは呼吸管内で一酸化炭素ガスを含む雰囲気を作り、患者が空間内で有意なレベルの一酸化炭素に曝露される唯一の人間であることを確実にすることができる。

【００５６】

当技術分野において公知のいずれかの方法を用いて、雰囲気内での一酸化炭素レベルを測定またはモニターすることができる。このような方法には電気化学的検出、ガスクロマトグラフィー、放射性同位元素計数、赤外線吸収、比色分析、および選択膜に基づく電気化学的方法（例えばSundermanら、Clin.Chem.28：2026-2032（1982）；Ingiら、Neuron 16：835-842（1996）参照）などがある。100万分の1以下のレベルの一酸化炭素を例えば、ガスクロマトグラフィーおよび放射性同位元素計数により検出することができる。さらに、中間赤外線気体センサーにより生物学的組織においてppm以下の範囲の一酸化炭素レベルを測定できることは当技術分野において公知である（例えばMorimotoら、Am.J.Physiol.Heart.Circ.Physiol.280：H482-H488（2001））。一酸化炭素センサーおよび気体検出装置は多くの商業用供給源から広く入手可能である。

【００５７】

一酸化炭素を含む薬学的組成物は液体組成物でもよい。気体を液体に溶解させるための当技術分野において公知のいずれかの方法により、液体を一酸化炭素を含む薬学的組成物にすることができる。例えば、液体をいわゆる「CO_2インキュベーター」内に置き、そして液体中で一酸化炭素の望ましい濃度に到達するまで、好ましくは二酸化炭素とバランスのとれた、一酸化炭素の連続流に曝露することができる。別の実例では、液体中で一酸化炭素の望ましい濃度に到達するまで、一酸化炭素ガスを直接液体に「バブリング」することができる。規定の水溶液に溶解できる一酸化炭素の量は温度の低下と共に増加する。さらに別の実例では、適当な液体を気体の拡散を可能にする配管に通すことができ、ここでこの配管は一酸化炭素を含む雰囲気を通る（例えば膜型人工肺のように装置を利用する）。一酸化炭素は液体中に拡散し、液体一酸化炭素組成物を作製する。

【００５８】

液体は、患者に投与するのに適した当業者に公知のいずれかの液体でよい（例えばOxford Textbook of Surgery, MorrisおよびMalt編、Oxford University Press（1994）参照）。概して、液体は水溶液である。溶液の実例にはリン酸緩衝食塩水（PBS）、Celsior（商標）、Perfadex（商標）、Collins溶液、クエン酸溶液およびウィスコンシン大学（UW

）溶液（Oxford Textbook of Surgery, MorrisおよびMalt編、Oxford University Press（1994））などがある。

【００５９】

本発明は化合物（例えばCO放出化合物、例えば光活性化可能なCO放出化合物）、例えばジマンガネーゼ・デカカルボニル、トリカルボニルジクロロルテニウム（II）二量体、および塩化メチレン（例えば400から600mg/kgの間、例えば約500mg/kgの用量で）の投与の後、COを体内に放出する化合物を本発明の方法において使用できることも企図し、カルボキシヘモグロビンおよびCO供与ヘモグロビン置換体も同様に投与できる。COガスまたは液体の用量を送達できる作用物質を利用することもできる（例えばCO放出ガム、クリーム、軟膏またはパッチ）。

【００６０】

いずれかの適当な液体を気体の拡散により規定の濃度の一酸化炭素まで飽和させることができる。または、規定のレベルの一酸化炭素を含有するように品質管理されている予め作製された溶液を使用することができる。一酸化炭素分析器に連結された気体透過性、液体非透過性膜を用いる測定により用量の正確な調節を達成することができる。溶液を望ましい有効な濃度まで飽和させ、そしてこれらのレベルを維持させることができる。

【００６１】

気体および/または液体を患者に投与する当技術分野において公知のいずれかの方法により、患者を一酸化炭素組成物で処置することができる。本発明は、液体または気体の一酸化炭素組成物の患者への全身投与（例えば吸入および/または摂取による）、並びに患者の器官、例えば消化管への組成物の局所投与を企図する。

【００６２】

気体の一酸化炭素組成物を典型的には口または鼻腔を通って肺への吸入により投与し、ここで一酸化炭素はその効果を直接奏するかまたは容易に患者の血流に吸収され得る。治療用気体組成物で利用される活性化合物（CO）の濃度は、一酸化炭素の吸収、送達、不活性化および排泄速度（概して呼吸を介する）、並びに当業者に公知のその他の因子に依存する。いずれかの特定の対象に関する、具体的な投与計画は、個体の必要性および投与を行う人または組成物の投与を管理する人の専門的な判断に従って、時間をかけて調整すべきであり、そして本明細書に示した濃度範囲は例示に過ぎず、そして主張される本発明の範囲または実施を限定することを意図するものではないことをさらに理解すべきである。例えば患者の疾患または症状の重篤度または持続性に依存して、一酸化炭素の急性、亜急性または慢性投与が本発明により企図される。症状を処置し、そして意図される薬理学的または生物学的効果を奏するのに十分な時間（無期限を含む）、患者に一酸化炭素を送達することができる。

【００６３】

一酸化炭素を含む気体の医薬組成物を患者に投与するために利用することができる方法および装置の実例には、人工呼吸器、フェースマスクおよびテント、ポータブル吸入器、静脈内人工肺（例えばHattlerら、Artif.Organs 18（11）：806-812（1994）；およびGolobら、ASAIO J.47（5）：432-437（2001））、並びに以下でさらに詳記する基準気圧（normobaric）チャンバーなどがある。

【００６４】

本発明はさらに、例えば患者への経口送達による、患者に全身送達するための一酸化炭素を含む水溶液を作製できることを企図する。

【００６５】

または、あるいは加えて、一酸化炭素組成物を患者の器官に直接適用することができる。例えば、患者に気体を吹き込むための当技術分野において公知のいずれかの方法により、一酸化炭素組成物を消化管全体の内部および/または外部に、またはそのいずれかの部分に適用することができる。例えば、気体、例えば二酸化炭素をしばしば患者の消化管および腹腔に吹き込み、エンドスコープおよびラプロスコープの各々の手順の間の試験を容易にする（例えばOxford Textbook of Surgery, MorrisおよびMalt編、Oxford Universit

y Press（1994）参照）。患者の消化管に一酸化炭素組成物を直接投与するために類似の手順を用いることができることは当業者には理解されよう。

【００６６】

水性一酸化炭素組成物を患者の器官に直接投与することもできる。液体を患者に投与するための当技術分野において公知のいずれかの方法により、組成物の水性形態を投与することができる。例えば、水性形態を経口的に、例えばカプセル化された、またはカプセル化されていない水性一酸化炭素組成物の投与量を患者に摂取させることにより投与することができる。別の実例としては、エンドスコープおよびラプロスコープの各々の手順の間に、患者の消化管および腹腔に液体、例えば生理食塩水溶液を注入することができる。液体一酸化炭素組成物を患者の器官に直接投与するために類似の手順を用いることができることは当業者には理解されよう。

【００６７】

組み合わせ治療

本発明は、本明細書に記載するいずれかの処置、例えばHO-1および/もしくはフェリチンの誘導/発現/投与、並びにCO、ビリルビン、および/もしくはビリベルジンの投与を別個に、またはいずれかの組み合わせで、外科的手順において、そして本明細書に記載する障害もしくは症状を処置するために用いることができることを企図する。さらに、本発明は、本明細書に記載する処置の任意の組み合わせを用いる任意の処置計画において、単回または多回の場合に同時に、かつ/または種々の時点で別個に、例えば疾患または症状の異なる相で処置を与えることができることを企図する。例えば、ビリルビンおよび鉄の双方、またはこれらの双方にCOを加えたもの、またはビリルビン＋フェリチン、または2つまたはそれ以上のHO-1のインデューサーを患者に投与することができる。

【００６８】

本発明の薬学的組成物での患者の処置

液体、固体および/または気体を患者に投与する当技術分野において公知のいずれかの方法により本明細書に記載する薬学的組成物で患者を処置することができる。

【００６９】

薬学的組成物の全身送達

水性および固体薬学的組成物

本発明は、水性薬学的組成物を、体内、例えば静脈内、動脈内、腹腔内、および/または皮下への注射による、患者への全身送達用に作製することができることを企図する。水性薬学的組成物を経口送達用に、例えばカプセル化された、またはカプセル化されていない形態で調製して、消化管のいずれかの部分、例えば胃または小腸で吸収させることもできる。同様に、固体薬学的組成物を患者への全身送達用に、例えば粉末または摂取可能なカプセルの形態で作製することができる。

【００７０】

水性および固体薬学的組成物は典型的には活性成分および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で用いる「薬学的に許容される」なる言語は、医薬的投与に適合する溶媒、分散培地、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張化および吸収遅延剤等を含む。補助的な活性化合物を組成物に組み込むこともできる。

【００７１】

薬学的組成物をその意図される投与経路に適合するように処方する。投与経路の実例には、非経口、例えば静脈内、皮内、皮下、経口および/または直腸投与などがある。非経口、皮内または皮下適用に用いられる溶液または懸濁液は以下の成分を含むことができる。滅菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の全身用溶媒；抗細菌剤、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；バッファー、例えば酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩および張性を調整するための作用物質、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロース。酸または塩基、例えば塩酸または水酸化ナトリウムを用いてpHを調整することができる。非経口用調製物をア

ンプル、ディスポーザブルシリンジ、またはガラスもしくはプラスチック製の多回投与用バイアルに封入することができる。

【００７２】

注射用途に適した薬学的組成物は、滅菌溶液（ここでは水溶性）または分散液および滅菌注射用溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末を含む。静脈内投与用に適した担体には生理学的食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parsippany、ニュージャージー州）またはリン酸塩緩衝食塩水（PBS）などがある。全ての場合において、組成物は無菌でなければならず、そして容易に注射可能な程度に流動性であるべきである。製造および保存条件下で安定であるべきであり、そして微生物、例えば細菌および真菌の夾雑作用に対して保護されなければならない。担体は例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、および適当なその混合物を含有する溶媒または分散培地でよい。例えばレシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により、適切な流動性を維持することができる。微生物の作用の防御は種々の抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール等により達成することができる。多くの場合、等張化剤例えば、糖、ポリアルコール、例えばマンニトールもしくはソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物に含めることができる。吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることにより、注射用組成物の吸収延長をもたらすことができる。マイクロビーズ、マイクロスフェア、またはいずれかその他の生理学的に許容される方法、例えばカプセル化を用いて活性成分の放出または吸収を遅延させることができる。

【００７３】

必要量の活性成分を適当な溶媒中に、前記で列挙した1つの成分または組み合わせた成分と共に組み込み、必要な場合続いて滅菌濾過することにより滅菌注射用溶液を調製することができる。概して、基本的な分散媒体および前記で列挙されたものから必要なその他の成分を含有する滅菌溶媒に活性化合物を組み込むことにより分散液を調製する。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥、および、予め滅菌濾過したその溶液に由来する任意の別の望ましい成分が加わった活性成分の粉末を生じる凍結乾燥である。

【００７４】

水性または固体でよい経口組成物は、概して不活性希釈剤または食用担体を含む。経口治療用投与の目的で、活性化合物を賦形剤と共に組み込み、そして錠剤、トローチ、またはカプセル、例えばゼラチンカプセルの形態で使用することができる。薬学的に適合する結合剤および/または補助材料を組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等はいずれかの以下の成分または類似の特性の化合物を含有することができる：結合剤、例えば微結晶性セルロース、トラガントガムまたはゼラチン；賦形剤、例えばデンプンまたはラクトース；崩壊剤、例えばアルギン酸、Primogel（商標）、またはコーンスターチ；滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウムまたはステロート；流動促進剤、例えばコロイド性二酸化ケイ素；甘味剤、例えばスクロースまたはサッカリン；または着香剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー。

【００７５】

経粘膜または経皮手段により全身投与を行うこともできる。経粘膜または経皮投与に関しては、透過すべき障壁に適当な浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は概して当技術分野において公知であり、例えば経粘膜投与には、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体などがある。鼻用スプレーまたは坐剤の使用により経粘膜投与を達成することができる。経皮投与には、概して当技術分野において公知であるように、活性化合物を軟膏、塗剤、ゲル、またはクリームに製剤化する。

【００７６】

化合物を坐剤（例えば慣用される坐剤基剤、例えばココアバターおよびその他のグリセリドを用いる）または直腸送達用の停留浣腸の形態で調製することもできる。

【００７７】
活性成分を、体内からの急速な排泄に対して化合物を保護する担体を用いて、例えば移植およびマイクロカプセル化送達系などの放出調節製剤に調製することができる。生体分解性、生体適合性重合体、例えばエチレンビニルアセタート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ酢酸を用いることができる。このような製剤を調製するための方法は当業者に明らかであろう。材料をAlza CorporationおよびNova Pharmaceuticals,Inc.から商業的に入手することもできる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に特異的なモノクローナル抗体で感染細胞に標的化されたリポソームを含む）を薬学的に許容される担体として用いることもできる。これらを当業者に公知の方法に従って、例えば米国特許第4,522,811号に記載されるように調製することができる。

【００７８】
投与の容易さおよび投与量の一貫性のために、投与単位形態で経口または非経口用組成物を製剤化するのが有利である。本明細書で用いる投与単位形態とは、処置する対象に単一投与量として適した物理学的に個別の単位を意味し；各々の単位は、必要とされる薬学的担体を伴って、望ましい治療効果を生み出すように算出された、所定の量の活性化合物を含有する。

【００７９】
細胞培養または実験動物において、例えばLD50（集団の50％の致死量）およびED50（集団の50％において治療的に有効である用量）を決定するための標準的な医薬的手順により、このような化合物の毒性および治療用効果を決定することができる。毒性および治療効果の間の用量比は治療指標であり、そしてLD50/ED50比として表現することができる。

【００８０】
細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータを、ヒトで使用するための用量の範囲を処方するために用いることができる。このような化合物の投与量は、毒性がほとんどまたは全くないED50を含む循環濃度の範囲内に在るのが好ましい。用いた投与量および利用した投与経路に依存して、投与量をこの範囲内で変動させることができる。本発明の方法において使用する任意の化合物については、最初に細胞培養アッセイから治療的有効量を推測することができる。細胞培養で決定される、IC50（すなわち徴候の最大阻止の50％を達成する被験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルにおいて用量を処方することができる。このような情報を用いてヒトにおいて有用な用量をさらに正確に決定することができる。例えば高速液体クロマトグラフィーにより血漿中のレベルを測定することができる。

【００８１】
気体の薬学的組成物
気体の薬学的組成物、例えば一酸化炭素を含有する薬学的組成物を口または鼻腔を通って肺に吸入することにより患者に全身送達することができる。一酸化炭素組成物を投与するための以下の方法および装置は、本明細書で記載する気体の薬学的組成物に有用な全身送達方法を説明する。

【００８２】
人工呼吸器
空気または圧縮気体の標準タンク中のその他の酸素含有気体（例えば21％ O_2、79％ N_2）と混合した医療用の一酸化炭素（濃度を変動させることができる）を購入することができる。これは非反応性であり、本発明の方法に必要な濃度は可燃性範囲（空気中10％）を十分に下回る。病院では、気体は恐らくベッドサイドに送達され、そこでブレンダーで望ましい濃度（ppm；100万分の1）まで室内空気と混合される。患者は人工呼吸器を介して気体混合物を吸入し、人工呼吸器は患者の快適性および必要性に基づいた流速に設定される。これは肺画像（すなわち呼吸速度、1回換気量等）により決定される。患者が望ましい量以上の一酸化炭素を不必要に投与されることを防ぐために、多重安全機構を送達系に設計することができる。（1）静脈血で測定することができるカルボキシヘモグロビン（COHb）、および（2）人工呼吸器の側面のポートから収集された発散された一酸化炭素を調

べることにより、患者の一酸化炭素レベルをモニターすることができる。患者の健康状態に基づいて、およびマーカーを規準にして、一酸化炭素曝露を調整することができる。必要な場合、100% O_2吸入に切り換えることにより、一酸化炭素を患者から洗い流すことができる。一酸化炭素は代謝されない；従って、吸入されても最終的にはCO_2に変換された極少しの割合を除いて発散される。一酸化炭素を任意のレベルのO_2と混合して、結果的に低酸素状態を招くことなく、一酸化炭素の治療送達を提供することもできる。

【００８３】

フェースマスクおよびテント

気体混合物を含有する一酸化炭素を前記のように調製して、フェースマスクまたはテントを用いて患者に受動吸入させることが可能である。吸入される濃度を変化させることができ、そして単純に100% O_2に切り換えることにより洗い流すことができる。吸入される一酸化炭素濃度が高くなりすぎるのを防ぐ多重安全機構を伴うマスクまたはテントでまたはその近くで一酸化炭素レベルのモニタリングを行う。

【００８４】

ポータブル吸入器

例えば病院にいないレシピエントの断続的な処置を可能にするために、圧縮された一酸化炭素をポータブル吸入器に詰め、そして定量的に吸入することができる。異なる濃度の一酸化炭素を容器に詰めることができる。装置は、オン・オフバルブおよび必要に応じ標準的な投与計画に従って患者がCOを一服するチューブが付いた、適当に希釈されたCOのできるだけ単純な小型タンク（例えば5kg未満）でよい。

【００８５】

静脈内人工肺

O_2送達およびCO_2除去のために設計された人工肺（血液中の気体交換のためのカテーテル装置）を一酸化炭素送達に用いることができる。移植される場合、カテーテルは大静脈の1つに設置され、そして全身送達用かまたは局所部位でのいずれかで規定の濃度の一酸化炭素を送達することができる。送達は、処置部位、例えば小腸の近くで短期間の、高濃度の一酸化炭素の局所送達（この高濃度は血流中で速やかに希釈される）か、または低濃度の一酸化炭素に対する比較的長期の曝露でよい（例えばHattlerら、Artif,Organs 18（11）：806-812（1994）；およびGolobら、ASAIO J.47（5）：432-437（2001））。

【００８６】

基準気圧（normobaric）チャンバー

特定の例では、患者全体を一酸化炭素に曝露することが望ましい。第三者が曝露される危険性をなくして、患者を一酸化炭素で満たした（患者を危険にさらすことのないレベルで、または許容される危険性をもたらすレベルで、または非ヒトドナーまたは脳死ドナーに関して任意の望ましいレベルで）密閉チャンバーの内部に置く。曝露の完了時にチャンバーに空気（例えば21% O_2、79% N_2）を流入させ、そして患者を曝露系から出す前に一酸化炭素の残留がないことを確認するために一酸化炭素分析器により試料を分析することができる。

【００８７】

薬学的組成物の局所送達

または、あるいは加えて、薬学的組成物を器官、組織、または処置すべき患者の身体の部分に直接適用することもできる。

【００８８】

水性および固体薬学的組成物

液体または固体を患者に投与するための公知のいずれかの方法により、水性および固体薬学的組成物を患者の器官、または処置の標的となっている患者の身体の一部に直接適用することもできる。例えば水性または固体組成物を経口的に、例えばカプセル化されたまたはカプセル化されていない投与量の水性または固体薬学的組成物を患者に摂取させることにより投与して、消化管の内部またはそのいずれかの部分を処置することができる。さらに、エンドスコープおよびラプロスコープの各々の手順の間に液体、例えば生理食塩水

溶液をしばしば患者の消化管および腹腔に注射する。類似の手順を用いて水性薬学的組成物を器官または、例えば処置すべき器官の周辺に直接投与し、それにより器官をインサイチューで水性薬学的組成物に曝露できることは当業者には理解されよう。

【００８９】

移植の文脈において、当技術分野において公知のいずれかの方法により、例えばドナーから除去する前にインサイチューで、器官を液体薬学的組成物で洗い流すことにより、インサイチューでの曝露を行うことができる（Oxford Textbook of Surgery,MorrisおよびMalt編、Oxford University Press（1994）参照）。このような曝露をさらに以下で詳細に記載する。

【００９０】

気体薬学的組成物

患者に気体を吹き込むための当技術分野において公知のいずれかの方法により、気体薬学的組成物を患者の器官に、または処置の標的となっている患者の一部に直接適用することができる。例えばエンドスコープおよびラプロスコープの各々の手順の間に気体、例えば二酸化炭素をしばしば患者の消化管および腹腔に吹き込んで、試験を容易にする（例えばOxford Textbook of Surgery,MorrisおよびMalt編、Oxford University Press（1994）参照）。類似の手順を用いて気体の薬学的組成物を消化管の内部、またはいずれかのその部分に直接投与できることは当業者には理解されよう。さらに、気体の薬学的組成物を患者の腹腔に、例えば処置すべき器官の周辺に吹き込んで、それにより気体の薬学的組成物をインサイチューで器官に曝露することができることは当業者には理解されよう。

【００９１】

外科的手順：移植

本発明は移植を受ける患者を処置するための本明細書に記載する方法の使用を企図する。器官の収集、保存および移植過程のいずれかの段階でドナー、レシピエントおよび/または器官を処置するために方法を用いることができる。例えば、器官をドナーから収集し、本発明に従って薬学的組成物でエクスビボで処置し、そしてレシピエントに移植することができる。または、あるいは加えて、器官をドナーにおいたまま、（ドナーを処置するか、または器官を処置することにより）インサイチューで処置することができる。任意で、薬学的組成物を外科的手術の前、間、および/または後に、例えば器官をレシピエントの血液で再灌流した後に薬学的組成物をレシピエントに投与することができる。ドナーからの器官の収集の過程の前または間に組成物をドナーに投与することができる。

【００９２】

「移植」なる用語は本明細書の全体にわたって、器官を患者に移動させる方法を記載する一般的な用語として用いられる。「移植」なる用語は当技術分野において、レシピエントにおいて移植された組織または細胞の機能的な完全性を維持するという意図を持つ、生存組織または細胞のドナーからレシピエントへの移動として定義される（例えばThe Merck Manual、Berkow、FletcherおよびBeers編、Merck Research Laboratories、Rahway、ニュージャージー州（1992））。用語は当技術分野において公知の全てのカテゴリーの移植を含む。移植はドナーとレシピエントとの間の部位的および遺伝学的関係により分類される。用語には、例えば自己移植（患者のある位置の細胞または組織を同一患者の同一または別の位置への除去および移動）、同種移植（同一種のメンバー間の移植）、および異種移植（異なる種のメンバー間の移植）などが含まれる。

【００９３】

本明細書で用いる「ドナー」または「ドナー患者」なる用語は、保存および/またはレシピエント患者への移植の目的のためにそこから器官または組織を得ることができる動物（ヒトまたは非ヒト）を意味する。「レシピエント」または「レシピエント患者」なる用語はそこに器官または組織を移動させることができる動物（ヒトまたは非ヒト）を意味する。

【００９４】

「器官拒絶」、「移植片拒絶」または「拒絶」なる用語は、当技術分野において公知で

あり、そして本明細書の全体にわたって、レシピエントにおける器官、組織または細胞の拒絶の過程を記載する一般的な用語として用いられる。例えば通常臨床実践で同定される3つの主要な拒絶パターン：超急性拒絶、急性拒絶および慢性拒絶が定義に含まれる（例えばOxford Textbook of Surgery, MorrisおよびMalt編、Oxford University Press（1994）参照）。

【００９５】

「器官」なる用語は本明細書全体にわたって、動物の特定の機能を有するいずれかの解剖学的部分またはメンバーを記載するための一般的な用語として用いられる。さらに器官の実質的な部分、例えば器官から得られる付着組織はこの用語の意味に含まれる。なおさらに、器官の1細胞ほどの小型の器官の部分がこの用語の意味に含まれる。このような器官には、非限定例として腎臓；肝臓；心臓；腸、例えば大腸および小腸；膵臓、例えば島；および肺などがある。さらにこの定義は骨、皮膚および血管を含む。

【００９６】

器官の薬学的組成物へのエクスビボ曝露を、気体の薬学的組成物を含む雰囲気に、液体薬学的組成物、例えば液体灌流液、保存溶液、もしくは薬学的組成物を含有する洗浄液に、またはその双方に器官を曝露することにより行うことができる。

【００９７】

例えば、一酸化炭素を含む気体薬学的組成物への器官の曝露の文脈において、適当なレベルの一酸化炭素ガスを含む雰囲気を作るのに適した任意のチャンバーまたは区域で曝露を実施することができる。このようなチャンバーには、例えば保存溶液中に器官を収容する目的で構築されたインキュベーターおよびチャンバーなどがある。適当なチャンバーは、一酸化炭素の濃度が規定の濃度および純度を達成および維持できるように、チャンバーに供給された気体のみが雰囲気内部に存在するチャンバーでよく、例えばこの場合チャンバーは密閉されている。例えば、CO_2インキュベーターを用いて器官を一酸化炭素組成物に曝露することができ、この場合一酸化炭素は気体が入った容器から連続流で供給される。

【００９８】

別の実例では、器官の水性薬学的組成物への曝露の文脈において、器官が水性薬学的組成物に完全に、または部分的に浸漬するのに十分な容量を有するいずれかのチャンバーまたは空間において曝露を実施することができる。さらに別の実例では、器官をいずれかの適当な容器内に置き、そして器官が組成物の連続流に曝露されるように、液体薬学的組成物に器官を「洗い流し」させることにより、器官を曝露することができる。

【００９９】

別の選択肢では、器官を水性薬学的組成物で灌流することができる。「灌流」なる用語は当技術分野において公知の用語であり、そして液体、例えば水性薬学的組成物が器官の血管を通過することに関する。器官をエクスビボおよびインサイチューで灌流するための方法は当技術分野において周知である。例えば連続低温機械灌流により、器官を水性薬学的組成物でエクスビボで灌流することができる（例えばOxford Textbook of Surgery, MorrisおよびMalt編、Oxford University Press（1994）参照）。薬学的水溶液を規定の時間、脈管構造に残留させることができる。任意で、器官からドナー血液を除去するために、水性薬学的組成物で灌流する前に、インサイチューまたはエクスビボ灌流で、薬学的組成物を含まない水溶液、例えばUW溶液で器官を灌流することができる。このような方法は例えば一酸化炭素を含む薬学的組成物を用いる場合、ドナーヘモグロビンによる一酸化炭素の競合を避けるために有利である。別の選択肢では、洗浄溶液そのものが薬学的組成物、例えば一酸化炭素を含む薬学的組成物であってよい。

【０１００】

さらに別の実例では、一酸化炭素を含む薬学的組成物の文脈において、器官を例えば一酸化炭素を含まない培地または溶液内に置く、例えば浸漬することができ、そしてチャンバー内に置いて、本明細書に記載する一酸化炭素含有雰囲気への曝露を介して培地または溶液から一酸化炭素組成物を作製できるようにできる。さらに別の実例では、一酸化炭素

を含まない液体に器官を浸漬することができ、そして一酸化炭素を液体中に「バブリング」することができる。

【０１０１】

器官をドナーから収集し、そして当技術分野において公知のいずれかの方法により移植することができる（例えばOxford Textbook of Surgery, MorrisおよびMalt編、Oxford University Press（1994）参照）。多くの状況、例えばドナー/レシピエントの年齢、または移植される器官の性質に依存して、移植のための器官の移植および/または収集方法を変えることができることは当業者に認識されよう。

【０１０２】

本発明は器官を薬学的組成物に曝露するための前記の方法、例えば洗浄、浸漬または灌流のいずれかまたは全てを規定の手順において、例えば単一の移植手順において用いることができる。

【０１０３】

外科的手術の手順：バルーン血管形成術および外科的手術に誘導された内膜肥厚

本発明はバルーン血管形成術を受けたか、またはそうでなければ例えば血管手術により内膜肥厚の危険性のある患者を処置するための本明細書に記載した方法の使用を企図する。手順、例えば血管形成術、バイパス手術または器官移植の後の血管傷害による内膜肥厚はこれらの治療的介在の成功を制限し続けている。「内膜肥厚」なる用語は当技術分野において公知の用語であり、そして本明細書では内膜内の細胞、例えば平滑筋細胞および/または筋線維芽細胞の増殖を意味する。内膜肥厚がいずれかの多くの因子、例えば内膜への機械的、化学的および/または免疫学的損傷により引き起こされる可能性があることは当業者には理解されよう。内膜肥厚をしばしば、例えばバルーン血管形成術または血管手術、例えば静脈移植片に関係する血管手術の後に患者において観察することができる。「血管形成術」なる用語は当技術分野において公知の用語であり、そして動脈のリモデリングに関係するいずれかの手順を意味する。このような手順には、例えばバルーン（「バルーン血管形成術」）、レーザー（「レーザー血管形成術」）、および血管形成術を実施するためのいずれかその他の様式を用いる、例えばその他の適当な装置、例えばマイクロ加工されたプローブを用いる血管形成術などがある。

【０１０４】

第一に、内膜肥厚の何らかの証拠がある前に予防的処置を始めることができるので、内膜肥厚を進行させる危険性があると考えられる個体は特に本発明の恩恵を受けることができる。「危険性のある」個体には、例えば血管形成術、例えばバルーン血管形成術を受けたか、もしくはこれから受ける患者、またはいずれかの型の内膜への機械的、化学的および/または免疫学的損傷を有しているか、もしくはこれから有する患者などがある。

【０１０５】

外科的手術の手順または血管形成術の前、間および/または後に患者を本発明の方法に従って処置することができる。さらに望む場合、本明細書に記載するように器官移植の文脈において、静脈を本明細書に記載する薬学的組成物にインサイチューでおよび/またはエクスビボで曝露することができる。気体薬学的組成物、および/または液体薬学的組成物、例えばそこに活性成分が溶解している液体灌流液、保存溶液、または洗浄溶液に静脈を曝露することができる。例えば逆行性灌流により、液体薬学的組成物を動脈部分に滴下注入でき、そして規定の時間、その部分に残存させることができる。

【０１０６】

障害および症状

本発明の方法を用いて、一つまたは複数の以下の炎症、呼吸器、心臓血管、腎臓、肝・胆管、生殖および消化管障害；ショック；または細胞増殖および/もしくは分化障害を処置するか、または虚血の影響を低減させるか、または創傷治癒を助けることができる。

【０１０７】

呼吸器障害

呼吸器症状の実例には、非限定例として喘息；急性呼吸促拍症候群（ARDS）、例えば腹

膜炎、肺炎（細菌性またはウイルス性）、または外傷により引き起こされるARDS；特発性肺疾患；間質性肺疾患、例えば間質性肺線維症（IPF）；肺塞栓症；慢性閉塞性肺疾患（COPD）；気腫；気管支炎；嚢胞性線維症；いずれかの型の肺癌；肺傷害、例えば過酸素症による肺傷害；原発性肺高血圧症（PPH）；二次性肺高血圧症；および睡眠関連障害、例えば睡眠時無呼吸症などがある。

【０１０８】

心臓血管障害

心臓血管障害には心臓血管系、例えば心臓、血管、および/または血液に関係する障害などがある。心臓血管障害は例えば動脈圧の不均衡、心臓の機能不良、または例えば血栓による血管の閉塞により引き起こされ得る。このような障害の実例には、うっ血性心不全、末梢血管疾患、肺血管血栓性疾患、例えば肺塞栓症、脳卒中、心臓への虚血-再灌流（I/R）傷害、アテローム性動脈硬化症、および心臓発作などがある。

【０１０９】

腎障害

腎臓に関連する障害には、非限定例としては糸球体傷害の病理、例えば糸球体性腎炎におけるインサイチュー免疫複合体沈着および細胞媒介の免疫；代替補体活性化経路の活性化により引き起こされる損傷；末梢細胞傷害；細胞性および可溶性メディエーターなどの糸球体傷害のメディエーターに関係する病理；急性糸球体性腎炎、例えば急性増殖性糸球体性腎炎、例えば溶連菌感染後糸球体性腎炎、および非溶連菌性急性糸球体性腎炎、急速進行性糸球体性腎炎、ネフローゼ症候群、膜性糸球体性腎炎（膜性ネフロパシー）、微小変化型疾患（リポイドネフローゼ）、巣状分節糸球体硬化症、膜性増殖性糸球体腎炎、IgAネフロパシー（Berger病）、巣状増殖性および壊死性糸球体腎炎（巣状糸球体腎炎）、および慢性糸球体性腎炎などがある。腎臓の障害には尿生殖路の感染も含まれる。

【０１１０】

肝・胆管障害

肝臓が関係する障害には、非限定例としては肝硬変および感染性障害、例えばA～E型肝炎ウイルス感染およびその他の肝炎ウイルスによる感染などのウイルス性肝炎、臨床病理症候群、急性ウイルス性肝炎、慢性ウイルス性肝炎、および劇症肝炎；並びに薬物および毒素誘起の肝臓疾患、例えばアルコール性肝臓疾患などがある。

【０１１１】

消化管障害

消化管障害には、非限定例としては（消化管、例えば大腸または小腸のいずれかの部分の）イレウス；炎症性腸疾患、例えば特異的炎症性腸疾患、例えば感染性特異的炎症性腸疾患、例えばアメーバもしくは細菌性赤痢、住血吸虫症、カンピロバクター全腸炎、エルシニア全腸炎、またはヒトギョウチュウ；非特異的炎症性腸疾患、例えば放射線全腸炎、虚血性大腸炎、または好酸球性胃腸炎；非感染性特異的腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎、不定大腸炎（indeterminate colitis）およびクローン病；壊死性全腸炎（NEC）；並びに膵炎などがある。

【０１１２】

細胞増殖障害および/または細胞分化障害

細胞増殖障害および/または細胞分化障害の実例には、非限定例としては癌、例えば癌腫、肉腫、転移性障害または造血性腫瘍性障害、例えば白血病などがある。転移性腫瘍は非限定例としては前立腺、結腸、肺、乳房および肝臓起源のものなどの多くの原発腫瘍型から生じ得る。「癌」なる用語は自立的増殖能力を有する細胞を意味する。このような細胞の例には、細胞増殖を急増させることを特徴とする異常状態または症状を有する細胞などがある。前記用語は全ての型の癌性増殖、例えば腫瘍、発癌過程、または転移組織を含むことを意味する。種々の器官系、例えば肺、乳房、胸腺、リンパ節、消化管、および尿生殖路の悪性腫瘍、並びに多くの結腸癌、腎細胞癌腫、前立腺癌および/または精巣腫瘍、肺の非小細胞癌腫、小腸の癌および食道の癌などの悪性腫瘍を含む腺癌もまた含まれる。「癌腫」なる用語は当技術分野において公知であり、呼吸系癌腫、消化管系癌腫、泌尿

生殖系癌腫、精巣癌腫、乳房癌腫、前立腺癌種、内分泌系癌腫、およびメラノーマなどの上皮または内分泌組織の悪性腫瘍を意味する。癌腫の実例には、子宮頚管、肺、前立腺、乳房、頭部および頚部、結腸並びに卵巣の組織から形成されるものなどがある。前記用語はまた、例えば癌腫組織および肉腫組織から成る悪性腫瘍を含む癌肉腫をも含む。「腺癌」とは腺組織に由来する癌腫か、またはその腫瘍細胞が認識可能な腺構造に由来する癌腫を意味する。

【０１１３】

「肉腫」なる用語は当技術分野において公知であり、間葉起源の悪性腫瘍を意味する。「造血性腫瘍性障害」なる用語は造血性起源の過形成/腫瘍性細胞に関係する疾患を含む。造血性腫瘍性障害は脊髄、リンパ節もしくは赤血球系統、またはその前駆体細胞から生じ得る。

【０１１４】

本発明の組成物および方法を用いて処置することができる癌には、とりわけ、例えば胃、結腸、直腸、肝臓、膵臓、肺、乳房、子宮頚管、子宮体、卵巣、前立腺、精巣、膀胱、腎臓、脳/中枢神経系、頭部および頚部、喉、ホジキン病、非ホジキン白血病、皮膚メラノーマ、種々の肉腫、小細胞肺癌、絨毛癌、口/咽頭、食道、喉頭、メラノーマ、並びに腎臓およびリンパ腫などがある。

【０１１５】

神経学的障害

本発明の方法を用いて神経学的障害を処置することもできる。神経学的障害には、非限定例としては脳に関係する障害、例えばアルツハイマー病などの脳皮質を患う変性疾患、並びにパーキンソニズムおよび特発性パーキンソン病（振戦麻痺）などの基底核および脳幹の変性疾患などがある。さらに前記方法を用いて疼痛傷害を処置することができる。疼痛傷害の実例には、非限定例としては、通常痛覚過敏と称される組織傷害の種々の形態、例えば炎症、感染および虚血の間に引き出される疼痛応答（例えばFields、Pain、ニューヨーク、McGraw-Hill（1987）に記載されている）；筋骨格障害に付随する疼痛、例えば関節痛；歯痛；頭痛；外科的手術に付随する疼痛；過敏性腸症候群に関連する疼痛；または胸痛などがある。発作性障害、例えばてんかんもまたこの分類に含まれる。

【０１１６】

炎症性障害

本発明の方法を用いて炎症性障害を処置することができる。「炎症性障害」および「炎症」なる用語は、局所反応および結果的に生じる形態学的変化、傷害物質の破壊または除去、並びに修復および治癒に至る応答などの、物理的、化学的または生物学的作用物質により引き起こされる傷害または異常刺激に応答して罹患した血管および隣接する組織に生じる動的複合反応（細胞学的および組織学的研究に基づいて認識することができる）から成る基本的な病理学的過程を記載するために用いられる。炎症は、場合によって、細胞免疫細胞、例えば単球/マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、および/またはリンパ球（例えばBおよびTリンパ球）の組織部分への浸潤により特徴付けられる。加えて、炎症組織はその部分に浸潤した細胞により生成されるサイトカインおよびケモカインを含有することもある。しばしば、炎症は血液凝固および血小板凝集の双方を含む血栓症に付随する。炎症なる用語は種々の型の炎症、例えば急性、慢性、アレルギー性（肥満細胞に関係する症状を含む）、変質性（変性）、萎縮性、カタル性（気道において最も頻繁である）、クループ性、線維素性化膿性、線維素性、免疫、過形成または増殖性、亜急性、漿液性および漿液線維素性などの炎症を含む。消化管または任意のその部分、腎臓（kidneys）、肝臓、心臓、皮膚、脾臓、脳、腎臓（kidney）、肺管、および肺に局在する炎症が本発明の方法により処置されるのに好ましい。ショック、例えば敗血症性ショック、任意の型の外傷により引き起こされる出血性ショック、およびアナフィラキシー性ショックが本発明の方法により処置されるのに好ましい。さらに、本発明の方法を用いて、リウマチ性関節炎、狼瘡、およびその他の炎症および/または自己免疫疾患、免疫不全に起因する（例えばHIV感染に起因する）高度な炎症状態、並びに過敏症を処置できることも企図される。

【０１１７】
創傷治癒
本発明は、HO-1およびヘム分解産物の抗炎症特性に基づいて、本明細書に記載する方法を用いて創傷治癒を促すことができることを企図する（例えば移植、裂傷（例えば手術による）または熱傷した皮膚において）。典型的にはこれらを創傷に局所適用するが（例えば創傷被覆剤、ローションまたは軟膏）、同様に全身的に送達することができる。
【０１１８】
生殖障害
本発明は、また本明細書に記載する方法を用いて特定の生殖障害、例えば性交不能および/または性感染性疾患に付随する炎症を処置または予防することもできることを企図する。さらに、本発明の方法を用いて早期子宮収縮を予防することができ、早産および月経痙攣を予防することができる。
【０１１９】
実施例
以下の実施例により本発明を一部説明するが、いかなるようにも本発明を限定すると解釈すべきでない。
【０１２０】
実施例1. 急性大腸炎
これらの実験では、急性大腸炎動物モデルにおいてCoPP、ビリベルジン、COおよびDFOを試験した。
【０１２１】
材料および方法
動物
この実施例では4から6週齢の病原体不在の雄C57BL/6マウス（Taconic；C57BL/6X129 svj株）を使用した。マウスをケージあたり4匹で1週間飼育し、そして実験前は自由に通常の研究室用飼料および飲料水を与えた。試験の開始時に全マウスの体重は22.5gから27.7gの間であった。動物実験プロトコールはBeth Israel Deaconess Medical Centerの動物管理使用委員会により再検討され、そして承認された。
【０１２２】
大腸炎の誘導
マウスに蒸留水に溶解した5%（重量/容量）デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）（分子量40,000；ICN Biomedicals Inc.、オハイオ州）を7日間与えることにより、大腸炎を誘導した。得られた症状を「DSS大腸炎」と称した。対象動物には蒸留水を自由に与えた。対照群およびCO処置群における致死率は各々10%（2/20）および14%（2/14）であった。これらの動物を統計分析から排除した。別の群では、7日間の5%DSS処置中に致死は生じなかった。
【０１２３】
実験試薬および処置プロトコール
コバルト・プロトポルフィリン（CoPPIX）、亜鉛プロトポルフィリン（ZnPPIX、Porphyrin Products、Logan、ユタ州）、およびビリベルジン二塩酸塩（ICN Biomedicals Inc.、オハイオ州）を少量の0.2M NaOHに溶解し、続いて1M HClでpHを7.4に調整し、そして0.9% NaClに希釈した。貯蔵溶液（CoPPIXおよびZnPPIX＝1mg/ml、ビリベルジン＝10mM）を等分し、そして使用時まで-70℃に維持した。光曝露はできるだけ制限した。CoPPIX（5mg/kg）、ZnPPIX（20mg/kg）、およびビリベルジン（50μmol/kg）をマウスに腹腔内投与（i.p.）し、24時間後にDSS大腸炎を誘導し、そしてその後毎日誘導した。イミダゾールバッファー中（50mM イミダゾール、220mM NaCl、pH7.4）にデスフェロキサミン（DFO）を調製した。DFOを1日2回（125mg/kg）皮下（s.c.）注射するか、またはミニ浸透圧Alzet（商標）ポンプ（Alza Corporation、Palo Alto、カリフォルニア州）により腹腔内（i.p.）注入（130mg/kg/日；ポンプ流速0.5μl/時で8日間）した（Postmaら、Exp.Parasitol. 89（3）：323-330（1998））。大腸炎誘導の24時間前にポンプを腹腔内に設置した。DSS

処置の7日目に動物を屠殺したときに、ポンプを除去し、そしてDFO適用が行われたかどうかを決定するために評価した。

【０１２４】

CO曝露チャンバー内に動物を入れることによりCOガスを体外から投与した（Otterbeinら、Nat.Med.6（4）：422-428（2000））。簡単には、曝露チャンバーに入る前に、ステンレススチールの混合シリンダー中で圧縮気体中1%（10,000ppm）濃度のCOをバランスのとれた空気（21%酸素）と混合物した。チャンバーに送達される前に混合シリンダー中のCOの流速を変動させることによりCO濃度を調節した。流速は主にO_2流により決定されるので、CO流のみを変化させて曝露チャンバーへの最終濃度を分配した。CO分析器（Interscan Corporation、Chatsworth、カリフォルニア州）を用いてチャンバー内のCOレベルを連続的に測定した。大腸炎誘導の24時間前にマウスをチャンバー内に置き、そして実験の全期間中（全部で8日間）曝露チャンバー内で飼育した。全期間CO濃度を250から400ppmの間に維持した。動物を毎日チャンバーから取り出して、体重および便を評価した。

【０１２５】

大腸炎の徴候の評価

全動物を毎日臨床的に評価した。各動物の評価には、体重の測定、潜血陽性並びに肉眼的血液の有無および便の粘稠性に関する試験が含まれる。体重減少、消化管出血（血液なし；潜在血液＝潜血＋；肉眼的血液）および便の粘稠性（正常便＝うまく形成されたペレット状；軟便＝ペースト状および半形成された便；下痢＝肛門に付着する液状便）をパーセントで点数化することにより疾患活動性指数（DAI）を算出した（表1）。

【０１２６】

（表１）疾患活動性指数（DAI）のスコア

スコア	*体重減少*	*便粘稠性*	*出血*
0	なし	正常	正常
1	0-10%		
2	10-15%	軟便	潜血＋
3	15-20%		
4	>20%	下痢	肉眼的出血

【０１２７】

動物を屠殺し、そして結腸-盲腸接合部から肛門縁までの全結腸を除去し、そして穏やかに便を清浄した。結腸の遠位部分を10%ホルムアルデヒドで固定し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで染色するためにパラフィンに包埋した。横断面を以下の0から4までのスケールで粘膜傷害の重篤度に関して盲検様式で等級分けした。0級：陰窩は無傷である；1級：陰窩の3分の1の基底部が喪失されている；2級：陰窩の3分の2の基底部が喪失されている；3級：陰窩全体が喪失されているが、表面上皮は無傷のままである；4級：陰窩および表面上皮の双方が喪失されている（びらん）。加えて、各組織断面に関する各々の傷害表面面積のパーセンテージを以下の1から4までのスケールで点数化した。1＝1%から25%；2＝26%から50%；3＝51%から75%；4＝76%から100%。2つのスコアの積が各断面に関する陰窩スコアになる。次いで全断面の平均を各動物に関して算出した。

【０１２８】

ウェスタンブロット分析

動物の遠位結腸に由来する組織試料を除去し、そして液体窒素で瞬間凍結した。凍結した組織を完全に粉砕し、そしてプロテイナーゼインヒビターを補充したRipaバッファーで均質化した。Bio-Rad Dc Protein Assay（商標）により製造者の指示書に従って（Bio-Rad、Hercules、カリフォルニア州）タンパク質濃度を決定した。Laemmliに従って、10%ポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質35μgを充填することにより変性条件下で電

気泳動を実施した。エレクトロブロッティングによりタンパク質をポリビニルジフルオリジン膜（Immobilon P（商標）；Millipore、Bedford、マサチューセッツ州）に移した。次いでヒトHO-1（StressGen、Victoria、カナダ）またはβチューブリン（Boehringer Mannheim、Mannheim、ドイツ）に対するウサギポリクローナル抗体を用いてタンパク質を検出した。HRP抱合ロバ抗ウサギIgGまたはヤギ抗マウスIgG（Pierce）およびECLアッセイ（Amersham Life Science、Arlington Heights、イリノイ州）を用いて、製造者の指示書に従ってタンパク質を可視化した。

【０１２９】

半定量的PCR

RNeasy Miniキット（Qiagen Inc.、カリフォルニア州、米国）を用いてRNAを抽出し、そしてRNA PCRキット（TaKaRa、PanVera、Madison、ウィスコンシン州、米国）を用いてcDNAに逆転写した。使用する各プライマー対に特異的な、10μM dNTP、50pgの5'-プライムおよび3'-プライムオリゴ、LA-Taqポリメラーゼ（TaKaRa）2.5単位、および$MgCl_2$を含有する反応混合物50μl中でcDNA全量2μlを増幅した。Life Technoloties（ニューヨーク州、米国）からマウスおよびヒトHO1（372bp）のプライマー

(5': TGA AGG AGG CCA CCA AGG

AGG T (配列番号:1); 3': AGG TCA CCC AGG TAG CGG GT (配列番号:2))

およびβ-アクチン（525bp）のプライマー

(5': GCC ATC CTG CGT CTG GAC CTG G(配列番号:3); 3':

TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC A (配列番号:4))

を入手した。Peltier Thermal Cycler PTC-200（MJ Research、Las Vegas、ネバダ州、米国）で、94℃で4分間の変性の後、94℃、55℃および72℃で各1分間のサイクルを各プライマー対に特異的なサイクル数で繰り返してPCR反応を実施した。臭化エチジウムで染色した1%アガロースゲルでPCR産物（10から20μl）を分析した。

【０１３０】

統計分析

未処置またはCoPP、ZnPP、ビリベルジン、COまたはDFO処置したマウスの体重減少%およびDAIスコアデータを平均±標準偏差としてまとめた。Mann-Whitney検定を用いて有意性を算出し、そして$p<0.05$として定義した。徴候の発現までの時間をKaplan-Meier生命表を用いて算出した。ログランク検定および発現までの平均時間を用いて群間差を試験し、信頼区間95%が報告された。

【０１３１】

結果

DSSは急性出血性大腸炎およびHO-1発現を誘導する。飲料水中5%DSSに曝露したC57/BL6マウスは、2および3日までに軟便および潜血陽性便の進行を伴う最初の臨床徴候を示した。5から6日までにたいていの動物が下痢および肉眼的出血を伴う出血性大腸炎の完全な構図を進展させた。対照群では、7日間の試験の終末までに2匹が死亡した（対象20匹中、10%）。これらの死亡は双方共に6日目に生じた。これらの動物を統計分析から排除した。

【０１３２】

DSS大腸炎の誘導により、時間と共にHO-1 mRNAレベルが著しく上昇した（図1A-1B）。HO-1タンパク質発現レベルの上昇も観察された（図1C）。24時間後にはHO-1タンパク質レベルのわずかな上昇が明らかになり；その後一貫して上昇し、7日には最大レベルに至った。

【０１３３】

CoPPでの処置が腸組織でのHO-1を誘導する。CoPP（5mg/kg）を毎日腹腔内投与することにより（飲料水を介して動物をDSSに曝露する24時間前に開始する）動物の結腸組織においてHO-1が誘導された。CoPP処置した動物は全7日間の実験期間にわたって腸内で一貫し

て高レベルのHO-1タンパク質を示したが、未処置の動物はHO-1レベルの緩徐な上昇を呈し、これは7日目に最大に達した（図2Aおよび2B対図1Aおよび1B）。未処置動物における7日目のHO-1レベルは、CoPP処置動物において観察されたHO-1レベルを下回った。

【０１３４】

HO-1誘導がDSS大腸炎を改善し、付随する結腸損傷を低減させる。CoPP処置によるHO-1の定常的な誘導は臨床的および形態学的に観察されるようにDSS大腸炎を改善した。7日目において、体重減少の平均全パーセントは未処置群（n＝20）と比較してCoPP処置群（n＝12）で有意に低かった（-11.8%対-22%；p＜0.001；図3A）。さらに、体重減少、便粘稠性、および腸内出血を因子とするDAIは2群間で有意な差を示した（CoPP処置で2.8、および未処置動物で3.8、p＜0.001；図3B参照）。疾患の進行の経過中に、2日目に始まる、CoPP処置および未処置群間でのDAIの有意な差が観察された（DAIの差＝0.4、p＜0.05）。CoPPにより付与された最大保護は5日目に生じた（DAIの差＝1.64、p＜0.001）。7日目の終末に向けて、差は小さくなっていった（DAIの差＝1.04、p＜0.001；図3C）。動物が徴候、例えば軟便および肉眼的腸内出血の発現を進展させるのに必要な時間は、CoPPでHO-1が誘導された群において有意に延長された（各々p＜0.02およびp＜0.005；図3Dおよび3E）。3日（95%信頼区間：2.4から3.6日）で軟便を進行させた未処置動物と比較して、CoPPで処置した動物は平均4.6日（95%信頼区間：4.1から5.1日）で軟便を進行させた。出血は、未処置動物の5.1日（95%信頼区間：4.6から5.6日）と比較して、CoPP処置動物で平均6.9日（95%信頼区間：6.3から7.4日）後に観察された。HO-1酵素活性のブロッカーである亜鉛プロトポルフィリン（ZnPP）で処置した対照群は未処置動物と比較して、DSS大腸炎の自然の経過に有意な変化を示さなかった（図2A-2B）。従って、CoPPの保護効果はこの化合物によるHO-1の特異的誘導に基づいていると思われる。

【０１３５】

組織学的には、DSS大腸炎単独を有する動物は陰窩構造の進行性の喪失を示し、これは7日までに粘液腺の完全な破壊に至った（図4A）。主にマクロファージおよび好中球およびいくつかのリンパ球から成る混合炎症性浸潤が固有層および粘膜下組織に現れた。散発的に表面上皮の陰窩膿瘍およびびらんが観察された（図4A）。対照的に、CoPP処置試料が陰窩構造の残存および無傷の上皮表面を示したが、穏やかな炎症性浸潤を伴う陰窩の基底部および粘膜筋板の間の分離の増加が同様に7日目に観察された（図4A）。結腸損傷の評価により、あまり広範でなく、重篤な粘液腺の破壊を示す未処置群と比較して、CoPP群が有意に低い陰窩スコアを有する（2.6対4.8；p＜0.05）ことが示された。病理学的変化により支持される臨床疾患活動性により、CoPP処置動物の有意に良好な経過および結果が示された。

【０１３６】

外因的に適用されたビリベルジンがDSS大腸炎を改善する。ビリベルジン/ビリルビン、鉄/フェリチン、およびCOのDSS大腸炎に対する保護効果を調査した。最初の群（n＝12）では、ビリベルジンの腹腔内注射で毎日処置することによりDSS大腸炎に対する保護が見出された。体重減少パーセント（図5A）およびDAI（図5B）は対照動物に比較して7日後に有意に低下した（体重減少パーセント：16.5%対22%；DAIスコア3.3対3.8；p＜0.01）。CoPP処置と同様に、徴候（例えば軟便および肉眼的腸内出血）の進行までの時間は有意に延長された（各々p＜0.01およびp＜0.05）（図5Dおよび5E）。未処置動物の3日（95%信頼区間：2.4から3.6日）と比較して、ビリベルジンで処置した動物は平均4.4日（95%信頼区間：4から4.9日）で軟便を進行させた。5.1日（95%信頼区間：4.6から5.6日）で出血を呈した未処置動物と比較して、ビリベルジン処置動物では平均6.2日（95%信頼区間：5.4から6.9日）後に出血を生じた。

【０１３７】

光学顕微鏡の使用によりビリベルジン処置群が温存された陰窩構造を有することが観察された（図6A）。陰窩スコアもまた未処置群と比較して有意に良好であった（3対4.8；p＜0.05；図6B）。全体では、ビリベルジンはCoPP/HO-1と同一の程度までの保護を媒介しなかったが、CoPP/HO-1とビリベルジンとの効果の差は有意に至らなかった。

【０１３８】
動物の200～400ppm（200ppm、n＝6；400ppm、n＝6）のCOへの連続曝露は、対照と比較して効果がなかった（図5A-B）。
【０１３９】
鉄キレーターであるDFOを用いて内因性フェリチンの潜在的機能を評価した。125mg/kg DFO（n＝4）の皮下注射を1日2回、動物に投与したが、保護効果を示さなかった。さらに、腹腔内に置いた浸透圧ポンプ（n＝4）をも使用した。ポンプは0.5μl/時の一定のポンプ流速で130mg/kg/日のDFOを送達した。この投与量により内因性の鉄がマウスから有効に除去されることが以前に証明されている（Postmaら、Exp. Parasitol. 89（3）：323-330（1998））が、保護効果は観察されなかった（図5A-5B）。
【０１４０】
結論
これらの結果により、例えば単独またはCOと組み合わせたCoPPまたはビリベルジンの投与によるHO-1の上方制御が、結腸の炎症、例えば大腸炎および付随する結腸損傷の処置に有用であることが示された。
【０１４１】
実施例2. 心臓移植
これらの実験では、CoPP、ビリベルジン、およびCOを心臓移植マウスモデルにおいて試験した。
【０１４２】
材料および方法
動物
雄DBA/2（H-2^{d}）、B6AF1（H-$2^{k/d,b}$）およびFVB（H-2^{q}）マウスをJackson Lab.Inc.（Bar Harbor、メイン州）から購入した。これは施設内の特定病原体不在の設備内で飼育され、適当な光サイクルを有し、水および飼料は自由に摂取できるようにし、そして6から10週齢で実験に使用した。
【０１４３】
心臓移植
DBA2/JおよびB6AF1マウスを各々ドナーおよびレシピエントとして使用した。CorryおよびRussellの手順に従って（Corryら、Transplant Proc.5（1）：733-735（1973））異所心臓移植を実施した。簡単には、肺静脈、並びに下および上大静脈の結紮の後、心臓をドナーマウスから切除した。顕微鏡下で大動脈移植片および肺動脈をレシピエントの腹部の大動脈および下大静脈に各々吻合した。以前に記載されたようなカフ技術を用いて頚部への2次心臓移植を実施した（Matsuuraら、Transplantation 51（4）：896-898（1991））。簡単には、DBA2/J（ドナー株）またはFVB（サードパーティー株）マウスのいずれかから心臓移植片を収集した。レシピエントの右頚静脈および右総頚動脈を切開し、そしてカフ（ポリエチレンまたはポリイミド）をこれらの血管に連結した。大動脈移植片および肺動脈を各々レシピエントの総頚動脈および頚静脈のカフ上で袖付けし、そして結紮した。移植片の移植後、拍動を毎日の触診によりモニターし、そして移植片の収縮の強度に従って＋1から＋4まで点数化した。移植片拒絶を拍動の停止として定義し、そして直接検査、続いて組織学的試験により確認した。
【０１４４】
細胞および培養培地
脾臓を切り刻み、続いて赤血球を浸透圧溶解することにより1次マウス白血球を単離した。さらにナイロン-ウールメッシュカラムを通過させることによりT細胞を富化し、そしてMACS Pan T細胞単離キット（Miltenyi Biotec Inc.、Auburn、カリフォルニア州）を用いて、製造者の指示書に従って精製した。フローサイトメトリーにより決定されるように、$CD3^{+}$ T細胞の純度は95％以上であった。2mMの1-グルタミン、100単位/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、および10％ウシ胎仔血清で補充したRPMI 1640培養培地（Bio Whittaker Inc.、Walkersville、メリーランド州）中でジャーカット細胞系を保

持した。マウス1次細胞培養に関しては、2-ME（50μM）もまた培地に添加した。

【０１４５】

実験試薬および処置プロトコール

コバルト・プロトポルフィリン（CoPPIX）、亜鉛プロトポルフィリン（ZnPPIX、Prophyrin Products、Logan、ユタ州）およびビリベルジン二塩酸塩（ICN Biomedicals Inc.、オハイオ州）を少量の0.2M NaOHに溶解し、続いて1M HClでpH7.4に調整し、0.9% NaClで希釈した。貯蔵溶液（CoPPIXおよびZnPPIX＝1mg/ml、ビリベルジン＝10mM）を等分し、そして使用時まで-70℃に維持した。光曝露はできる限り制限した。

【０１４６】

ドナーおよびレシピエントマウスをCoPPIX（5mg/kg/日）、ZnPPIX（5mg/kg/日）またはビリベルジン（1回投与あたり50μmol/kgの投与量で1日1、2または3回投与した）のいずれかで処置した。全ての試薬を腹腔内（i.p.）注射により投与した。ドナーマウスを2日間処置し、移植片を収集する2日前から開始した（-2日および-1日）。レシピエントマウスの処置は移植の1日前に始め、そして移植後13日まで続けた（-1日から13日）。-7日にドナー脾細胞注入（DSI）を用いる実験に関して（DSI（D-7））、レシピエント動物の処置（CoPPIXまたはZnPPIXのいずれかで）を-8日から開始し、そして6日に終えた。レシピエントはさらなる処置を受けなかった。本明細書に記載するようにDBA/2Jマウスから単離した脾臓細胞（$2x10^7$）をDSI処置に用いた。陰茎静脈を介して0.9% 生理食塩水200μlと共に細胞を注射した。

【０１４７】

ビリルビンアッセイ

ビリベルジン50μmol/kgをB6AF1マウスに腹腔内注射した。ビリベルジン注射の前ならびに15、30、60、120、240および360分後に血液を抜いた。血液試料の遠心により血清を収集し、そして全ビリルビンアッセイキット（Sigma Aldrich、St.Louis、ミズーリ州）を用いて全ビリルビンレベルを測定した。全ビリルビンの測定はキットプロトコールに従って実施し、そして各試料に関して二連で実施した。この実験を4回繰り返した。

【０１４８】

ConAおよび抗CD3モノクローナル抗体媒介増殖アッセイ

本明細書に記載した方法に従ってB6AF1脾細胞または精製されたT細胞を調製し、そして応答細胞として使用した。応答細胞（$2.5x10^5$/ウェル）をConA（1μg/ml）または抗CD3モノクローナル抗体（1μg/ml）のいずれかで刺激し、そして96ウェル丸底プレート中で培養した。精製されたT細胞（$5x10^4$/ウェル）を抗CD3モノクローナル抗体（10μg/ml）で被覆した96ウェル平底プレート中、抗CD28モノクローナル抗体（1μg/ml）の存在下で培養した。ビリベルジンを伴って（種々の濃度で）または伴わずに、37℃で48時間、5% CO_2を含む95%空気中で細胞を培養した。これに^{3}Hチミジン（1μCi/ウェル）で細胞培養の終了前に16時間、パルス標識し、そしてβカウンターを用いて^{3}Hチミジンの取り込みを測定した。これらの増殖アッセイを三連で実施して、そして3回繰り返した。

【０１４９】

混合リンパ球培養（MLC）

96ウェル丸底プレート中、照射された（25Gy、^{137}Cs）DBA/2脾細胞（$5x10^5$/ウェル）を応答細胞（$5x10^5$/ウェル）と共に、37℃で3日間、5% CO_2を伴う95%空気中で同時培養した。応答細胞として心臓のレシピエントに由来する細胞を用いる場合、同時培養の期間は、さらなるインビトロ処置を何ら施さないで3日間であった。細胞培養の終了の16時間前に^{3}Hチミジン（1μCi/ウェル）を加え、そして^{3}Hチミジンの取り込みを測定した。

【０１５０】

IL-2アッセイ

B6AF1白血球（$2.5x10^5$細胞/ウェル）を抗CD3モノクローナル抗体（1μg/ml）で刺激し、そしてビリベルジンを伴って（50または100μM）または伴わずに96ウェル丸底プレート中で培養した。48時間後に培養上澄（100μl）を収集し、使用時まで-80℃で保存した。全培養を三連で実施した。IL-2アッセイキット（Quantikine（登録商標）M、R&D System

s,Inc.）を用いる酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）により、キットの指示書に従って上澄中のIL-2レベルを測定した。各上澄試料のIL-2の測定を二連で実施した。実験を4回繰り返した。

【０１５１】

フローサイトメトリー分析（IL-2R発現）

B6AF1白血球（$5x10^5$細胞/ウェル）を抗CD3モノクローナル抗体（1μg/ml）で刺激し、そしてビリベルジンを伴って（100μM）または伴わずに96ウェル丸底プレート中で培養した。刺激後6および24時間に細胞を収集し、洗浄し、そして蛍光色素結合アイソタイプ対照モノクローナル抗体、または特異的抗CD4および/または抗CD25モノクローナル抗体（全抗体をBD Pharmingenから入手した）で染色した。刺激していない未使用の白血球を陰性対照として使用した。抗体染色の後、FACSort（商標）フローサイトメーターおよびCellQuest（商標）ソフトウェア（BD Biosciences、Palo Alto、カリフォルニア州）を用いて細胞試料を分析した。各試料に関して10,000個の$CD4^+$ T細胞が得られ、そしてそのCD25発現を試験した。実験を3回繰り返した。

【０１５２】

HO活性アッセイ

DBA/2Jマウスに処置を施さないか、またはCoPPIXもしくはZnPPIXを5mg/kgの投与量で腹腔内投与した（群あたりn＝10）。処置後1日に、動物を屠殺し、脾臓および心臓を切除し、そして組織試料を-80℃で凍結した。凍結組織試料を氷冷スクロースおよびTris HClバッファー中で均質化した。遠心後にミクロソームペレットが得られ、そして$MgCl_2$-リン酸カリウムバッファーに再懸濁した。次いで試料タンパク質をラット肝臓細胞質ゾル、ヘミン、グルコース-6-リン酸塩、グルコース-6-リン酸塩デヒドロゲナーゼおよびNADPH（Sigma-Aldrich Corporation、St.Louis、ミズーリ州）を含有する反応混合物と共に37℃で60分間インキュベートした。ジアゾ化スルファニル酸と反応させてアゾビリルビンを生じさせることにより、生成したビリルビンを分光光度計を用いて測定した。

【０１５３】

タンパク質抽出およびウェスタンブロット

DBA/2マウスにCoPPIXを5mg/kgの投与量で腹腔内投与した。未処置動物を未使用対照として提供した。処置後1、2、4、および7日に心臓および脾臓を動物から切除し、そして試料を液体窒素中で瞬間凍結した。得られた組織からタンパク質抽出物を調製し、変性条件下（10％ポリアクリルアミドゲル）で電気泳動し、そしてポリビニルジフルオリジン膜（Immobilon（商標）P、Millipore、Bedford、マサチューセッツ州）に移した。ウサギ抗ヒトHO-1ポリクローナル抗体（Stress Gen Biotechnologies Corp.、Victoria、カナダ）を用いてHO-1を検出した；ヤギ抗マウスα-アクチンモノクローナル抗体（1A4、Sigma-Aldrich Corporation）を用いてα-アクチンを検出した。西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合ロバ抗ウサギまたはヤギ抗マウスIgG2次抗体（Pierce、Rockford、イリノイ州）を用いて1次抗体を検出した。Enhanced Chemi Luminescence（ECL（商標））アッセイキット（Amersham Life Science Inc.、Arlington Heights、イリノイ州）を用いて、製造者の指示書に従って、タンパク質を可視化し、そして放射線写真の形態で保存した（Biomax（商標）MS、Eastman Kodak、Rochester、ニューヨーク州）。HO-1の発現量をα-アクチン発現で正規化し、そしてImageQuant（商標）ソフトウェア（Molecular Dynamics、Sunny Vale、カリフォルニア州）により定量化した。

【０１５４】

核タンパク質抽出および電気泳動移動度シフトアッセイ（EMSA）

ジャーカットT細胞を、10％FCSで補充したRPMI 1640中、50nM 酢酸ミリスチン酸ホルボール（PMA）および2μM イオノマイシン（双方の試薬はICN Biomedicalsより入手）と共に、100μM ビリベルジンの存在下、または不在下で培養した。刺激の0、2、および4時間後に細胞（各時点で各群につき$30x10^6$細胞）を収集し、PBSで2回洗浄し、そしてペレット化した。核および細胞質抽出を改変Shapiro法に従って調製した（Shapiroら、DNA 7（1）：47-55（1988））。Bradfordアッセイによりタンパク質濃度を決定した。以下のオリゴ

ヌクレオチド（Invitrogen、Calsbad、カリフォルニア州）をEMSAに使用した。

NFAT, (コード) 5'-GCCCACAGAGGAAAATTTGTTTCATACAG-3'(配列番号:5),

(非コード) 5'-CTGTATGAAACAAATTTTCCTCTGTCCGC-3' (配列番号:6);

および

NF-κB, (コード) 5'-AGCTTAGAGGGGACTTTCCGAGAGGA-3' (配列番号:7),

(非コード) 5'-TCCTCTCGGAAAGTC-CCCTCTAAGCT-3' (配列番号:8)

オリゴヌクレオチドを[^{32}P]ATPで放射性標識した。以前に記載されているようにEMSA反応を組み立てた（Ushevaら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93（24）：13571-13576（1996））。画像スキャナを用いてEMSA放射線写真のデジタル画像を得た。

【０１５５】

統計学

心臓移植片生存をKaplan-Meier法によりプロットし、そしてログランク検定を適用して統計学的有意性を比較した。HO-1/α-アクチンタンパク質の発現レベルを平均±標準偏差として表現する。その他のデータを平均±平均の標準誤差（平均±SEM）として表現する。一元配置ANOVAにより群間統計分析を実施し、そしてポストホック検定にFisherのPSLDを用いた。p値が＜0.05の場合、比較は統計学的に有意であると考えられた。

【０１５６】

結果

HO-1発現および酵素機能の誘導により心臓の同種移植片生存が延長される。図7A-7Cに示すように、CoPPIXの投与が成熟マウスの心臓および脾臓におけるHO-1タンパク質発現を上方制御した。CoPPIX注射の1日後にHO-1の最大発現が検出された（図7A）。CoPPIXによりHO-1酵素活性もまた有意に増強されたが、これはHO-1機能を阻止することが解っているZnPPIXの場合にはなかった（図1B）。これらのデータに基づいて、CoPPIXによる酵素的に活性なHO-1発現の誘導の心臓同種移植片拒絶に及ぼす影響を評価した。ZnPPIXを対照試薬として使用した。CoPPIXおよびZnPPIXの双方をドナーには-2日から、そしてレシピエントには-1日から移植後13日まで毎日投与した。未処置B6AF1レシピエントは11.5日の中央値生存時間（MST）でDBA/2心臓同種移植片を拒絶した（図7D）。CoPPIX投与によるHO-1発現の誘導の結果、移植片生存の有意な延長に至った（対照に対し、p＜0.005）。6個の移植片のうち2個（33.3%）が長期間、すなわち＞100日生存したが、その他の4個の拒絶移植片のMSTは18日であった。対照的に、ZnPPIXの投与の結果、未処置対照群と比較して、移植片生存の延長には至らなかった；これらの移植片はMST11日で早期に拒絶した。

【０１５７】

ビリベルジンは心臓同種移植片に対してドナー特異的耐性を誘導する。図8A-8Cに示すように、CoPPIXと同一の処置スケジュールを用いた、すなわち1日1回投与のビリベルジン（50μmol/kg）の投与により、移植片MSTが20.5日まで延長された（対照と比較した場合p＜0.01）（図8A）。外因的に投与されたビリベルジンのおよその半減期を決定するために、50μmol/kgの1回注射の後に血清ビリベルジンレベルを分析した。ビリベルジンの投与時に血清ビリベルジンレベルは速やかにピークになり、15分で最大レベルに到達し、その後4から6時間で基底レベルに戻る（図8B）。従って投与あたり50マイクロモル/kgで1日2回（12時間毎）または3回（8時間毎）のビリベルジンの投与の効果を試験した。これらの2回処置のスケジュールは移植片生存を有意に上昇し、6個のうち4個（66.7%）の移植片は100日以上生存した（双方とも対照に対しp＜0.001、図2A）。ビリベルジン処置により長期間、同種移植片を受け入れたこれらのレシピエントを、ドナー（DBA2/J）またはサードパーティー（FVB）株マウス（各株に関してn＝3）のいずれかに由来する心臓同種移植片を用いる第2セット移植でチャレンジした。図8Cに示すように、最初の移植片を宿すレシピエントはドナー株に由来する2次心臓移植片を60日間以上受け入れたが、一方サード

パーティー移植片を11日以内に拒絶した。これらのデータにより、ビリベルジン投与がMHCクラスI＋クラスII不適合マウス心臓移植において耐性を誘導できることが示唆される。

【０１５８】

HO-1発現の誘導またはビリベルジン投与がT細胞媒介同種免疫応答をインビボで抑制する。図9に示すように、異なる処置、すなわち処置なし（n＝4）、CoPPIX（n＝4）、ZnPPIX（n＝4）、またはビリベルジン（50μmol/kg/1日1回および50μmol/kg/1日3回；各群n＝4）を行った心臓同種移植片レシピエントの免疫応答を評価した。DBA/2脾細胞をフィーダー細胞として用いるインビトロ培養で、心臓移植後5日に収集したレシピエント脾細胞を応答細胞として使用した。72時間で増殖を測定した（図9）。CoPPIXによるHO-1誘導はインビボで、対照と比較して有意な様式で脾細胞の増殖を阻害したが（$p<0.05$）、ZnPPIXは阻害しなかった。ビリルビンを1日1用量投与されたレシピエントおよび1日3用量投与されたレシピエントの双方において、対照と比較してビリベルジン処置したレシピエントに由来する脾細胞の増殖は有意に抑制された（$p<0.01$）。

【０１５９】

ビリベルジンはインビトロでT細胞増殖を抑制する。ビリベルジンがインビトロでT細胞増殖に抑制効果を有しているかどうかを評価するために、ビリベルジンの存在下または不在下で、未使用B6AF1脾細胞をConA、抗CD3モノクローナル抗体または照射されたDBA/2脾細胞で刺激した。ビリベルジンは全例で白血球増殖を用量依存的な様式で抑制した（図10A-10C）。ConAまたは抗CD3モノクローナル抗体に駆動されたT細胞増殖に関して、50μMおよび100μMの濃度で、および同種抗原媒介T細胞活性化の場合には10μMで有意な抑制効果が達成された（図10C）。さらに、抗原提示細胞非依存的様式でT細胞を刺激することが示された組み合わせである抗CD3モノクローナル抗体＋抗CD28モノクローナル抗体同時刺激に応答して、精製されたB6AF1マウスT細胞（純度95%以上）もまたビリベルジンにより抑制された点で、ビリベルジンの抑制効果は直接T細胞において作用すると思われた（図10D）。

【０１６０】

ビリベルジンはT細胞のNFATおよびNF-κBの核転座の遮断によりIL-2生成を抑制する。抗CD3モノクローナル抗体刺激の後の脾細胞によるIL-2生成はインビトロでのビリベルジン処置により用量依存的な様式で有意に抑制された（図11A）。ビリベルジン処置の6または24時間後の外因性の組換えIL-2（50単位/ml）の培養ウェルへの添加により、ビリベルジンの抑制効果が打破された（図11B）。さらに、100μMの濃度のビリベルジンは、抗CD3モノクローナル抗体で刺激された脾臓$CD4^+$ T細胞のIL-2レセプターα鎖（IL-2α、CD25）の発現に影響しなかった。6時間の培養の後、未処置対照と比較した代表的な結果を示し（図11C）；類似の結果が24時間後に認められた。限定を意味しない1つの理論として、ビリベルジンは、IL-2Rα表面発現の下方制御またはIL-2に駆動される増殖に関係するシグナル発生経路の遮断によってではなく、IL-2合成に至るシグナル伝達経路に直接干渉することによりT細胞でその効果を奏することができる。

【０１６１】

IL-2転写/発現に関与する転写因子、すなわちNF-κBおよびNFATの活性化がビリベルジンにより変調されるかどうかを調べるために、ジャーカットT細胞をPMAおよびイオノマイシンの組み合わせにより刺激した。EMSAにより核抽出物のDNA結合活性を測定することにより、NF-κBおよびNFATの核転座のレベルを試験した。刺激後2および4時間に各々評価されるように、PMA＋イオノマイシン刺激によりNF-κBおよびNFAT核転座およびDNA結合の活性化が誘導された。ビリベルジンはNF-κBおよびNFATの双方のDNA結合を阻止し（図11D）、これは恐らくNFATおよびNF-κB活性化を遮断することによりその転写の阻止を介してIL-2生成が抑制されることを示唆している。

【０１６２】

CoPPによるHO-1の誘導はドナー脾細胞注入（DSI）と協働して心臓の同種移植片の長期間の受入れを達成する。移植後直ぐに（0日）DSIをB6AF1レシピエントに与える場合、未処置対照に類似して、DBA/2J心臓同種移植片は即座に拒絶された（図12A）。-2日からの

ドナーへのCoPPIX投与、およびDSI（D0）と一緒に、移植後-1から13日までのレシピエントへのCoPPIX投与によるHO-1発現の誘導は、DSI（D0）またはCoPPIX処置単独と比較した場合、有意に（p＜0.001）移植片生存を延長させた（8匹中7匹（87.5%）で100日以上の長期間生存）。逆に、ZnPPIX＋DSI（D0）は対照またはDSI（D0）単独と比較して有意な移植片延長効果はなかった。これらのデータにより、HO-1発現誘導が長期間の同種移植片生存を達成するのを助けることが示唆される。

【０１６３】

HO-1の酵素活性はドナー脾細胞注入（DSI）媒介の長期間同種移植片の受入れに必須である。心臓移植の7日前（D-7）に行ったDSI単独により50%（4/8）の同種移植片が100日以上生存した（図12B）。ドナーへの2日間（-1日および-2日）のCoPPIX投与、およびレシピエントへの-8日（DSIの1日前）から6日までのCoPPIX投与＋DSI（D-7）によるHO-1発現の誘導により、全ての心臓同種移植片（100%、7/7）が100日以上生存するのが可能になった。処置期間および投与量は本研究で用いたその他のCoPPIX処置プロトコールと同一である。重要なことは、前記したものと同一のCoPPIX処置に用いられるプロトコールの下で、HO-1酵素活性のインヒビターであるZnPPIXをドナーおよびレシピエントの双方に投与した場合、DSI（D-7）の移植片延長効果が完全に撤廃され、長期間生存した同種移植片はなかった（MST：13日）（0/9）。これらの結果はDSIに媒介される長期間の同種移植片生存に及ぼすHO-1活性の重要性を示唆している。

【０１６４】

結論

これらの結果により、CoPPIXおよび/またはビリベルジンの投与が長期間の同種移植片生存に寄与し得ることが示されている。CoPPIX投与の効果はDSIの投与に相乗すると思われ、これはDSIに加えて、例えばCoPPIXの投与による、HO-1発現を誘導する処置が同種移植片の生存性をさらに上昇させることを示唆している。

【０１６５】

実施例3. H-フェリチンの過剰発現がラット肝臓の虚血・再灌流傷害（IRI）を保護し、そして同系レシピエントへの移植時の肝細胞損傷を防御する。

フェリチン重鎖（H-フェリチン）遺伝子の発現を、治療様式で、例えば移植された器官の虚血・再灌流傷害（IRI）を抑制するために使用できる潜在的細胞保護効果に関して評価した。

【０１６６】

材料および方法

TNF-α誘導アポトーシス

1次ウシ動脈内皮細胞（BAEC）またはマウス2F-2B EC（ATCC）をβガラクトシダーゼ＋対照（pcDNA3もしくはpcDNA3/HO-1）またはpcDNA3/H-フェリチンで同時トランスフェクトした。TNF-α＋Act.Dによりアポトーシスを誘導し、そして定量した。

【０１６７】

エトポシドおよび血清剥奪により誘導されるアポトーシス

マウス2F-2B細胞をβガラクトシダーゼ＋対照（pcDNA3）またはpcDNA3/H-フェリチンで同時トランスフェクトし、そしてエトポシド（200μM、8時間）で処理するか、または血清剥奪（0.1% FCS、24時間）に供した。

【０１６８】

H-フェリチン毒性

マウス2F-2B細胞を、βガラクトシダーゼ＋漸増量のpcDNA3/H-フェリチン（0.1から200 ng/ウェル）で同時トランスフェクトした。対照としてpcDNA3およびpcDNA3/HO-1を使用した。TNF-α＋Act.DによりECアポトーシスを誘導し、そしてβガラクトシダーゼでトランスフェクトしたECのアポトーシスを定量した。

【０１６９】

冷虚血インビトロモデル

虚血（24時間、4℃、Wisconsin大学（UW）溶液（Oxford Textbook of Surgery、Morris

およびMalt編、Oxford University Press（1994））に曝露したSDラットから肝臓を収集し、同系血液でエクスビボ灌流した。肝臓を、H-フェリチンをコードする組換えアデノウイルスで形質導入し、そして対照は形質導入されていないか、またはβガラクトシダーゼで形質導入された。標準的な方法を用いて30、60、90および120分に胆汁生成を測定した。

【０１７０】

冷虚血インビボ同所移植モデル

虚血（24時間、4℃、Wisconsin大学（UW）溶液（Oxford Textbook of Surgery、MorrisおよびMalt編、Oxford University Press（1994））に曝露したSDラットから肝臓を収集し、同系血液でエクスビボ灌流した。肝臓を、H-フェリチンをコードする組換えアデノウイルスで形質導入し（対照は形質導入されていないか、またはβガラクトシダーゼで形質導入された）、そして同系レシピエントに移植した。各群10匹中8匹の動物を分析した。

【０１７１】

結果

H-フェリチンはアポトーシスを受けることから内皮細胞を保護する。対照EC（pcDNA3でトランスフェクトした）は転写インヒビターであるアクチノマイシンD（Act.D）の存在下でTNF-αへの曝露後に60から70％のアポトーシス細胞を示した（図13A-13C）。H-フェリチンの発現はTNF-α媒介のECアポトーシスを抑制した（10％アポトーシスEC）（図13A-13C）。この保護効果は1次ウシ動脈EC（BAEC）と同様に、EC系2F-2Bで観察された（図13A）。H-フェリチンの抗アポトーシス効果はその他のプロアポトーシス刺激、例えばエトポシドまたは血清剥奪でも観察された（図13B）。この効果は用量依存的であり、$3x10^5$細胞あたりpcDNA3/H-フェリチン発現ベクター1ng～100ngからの保護を示した（図13C）。TNF-α/Act.D刺激細胞およびpcDNA3/H-フェリチン＋Act.Dのみで処置した対照細胞におけるアポトーシス細胞数の増加により明確であるように、100ngを超えるpcDNA3/H-フェリチンのレベルは毒性の可能性がある（図13C）。

【０１７２】

組換えアデノウイルス媒介H-フェリチン発現はエクスビボ再灌流傷害から肝臓を保護する。長期の冷虚血（UW溶液、4℃、24時間）に曝露したラット肝臓は同系全血の1回エクスビボ再灌流で重篤な傷害の徴候を示した。傷害は再灌流後の門脈血流（0分での0.63±0.076ml/分/gから120分での1.13±0.23ml/分/gまで）および胆汁生成（0分での0.00338±0.0078ml/gから120分での0.025±0.01ml/gまで）の相対的に低い増加により、並びにALT放出の有意な増加（0分での7.2±4.9IU/lから120分での173±71IU/lまで）により明白であった（図14A）。βガラクトシダーゼ組換えアデノウイルスで形質導入した肝臓で、類似のレベルの門脈血流（0分での0.626±0.079ml/分/gから120分での1.035±0.105ml/分/gまで）および相対的に低レベルの胆汁生成（0分での0.0005±0.0002ml/gから120分での0.03±0.0085ml/gまで）、並びに有意なALT放出（0分での12.5±10.5IU/lから120分での148±92IU/lまで）があったという点で類似の結果が得られた。未処置またはβガラクトシダーゼ形質導入した群と異なって、H-フェリチン形質導入した肝臓は門脈血流（0分での0.62±0.099ml/分/gから120分での1.372±0.133ml/分/gまで）および胆汁生成（0分での0.00621±0.0029ml/gから120分での0.043±0.0088ml/gまで）で有意（$p<0.01$）に大きな上昇を示した（図14A）。さらにH-フェリチン形質導入した肝臓のALT放出は相対的に低いレベルに留まった（0分での9.3±4.5IU/lから120分での68.6±14.8IU/lまで）。再灌流の2時間で好中球媒介の酸化ストレス傷害のマーカーであるミエロペルオキシダーゼ活性が、未処置（1.35±0.227単位/g）またはβガラクトシダーゼ形質導入した（3.12±0.9単位/g）肝臓と比較して、H-フェリチン形質導入した肝臓で有意（$p<0.05$）に阻止された（0.736±0.58単位/g）。これらの結果は、H-フェリチンの過剰発現が、長期の冷虚血に関わらず肝臓をIRIから保護するという考えを支持している。標準的なSuzuki病理学的スコア化により評価されるように、H-フェリチン遺伝子で形質導入した肝臓もまた、形質導入していない（$p<0.05$）またはβガラクトシダーゼ形質導入した（$p<0.05$）肝臓と比較して、その

組織学的詳細を有意に良好に保存した。

【０１７３】

組換えアデノウイルス媒介H-フェリチン発現が同所肝臓移植の後のIRIを保護する。長期の冷虚血（UW溶液、4℃、24時間）に曝露したSDラットに由来する肝臓は、同系SDレシピエントへの移植の後、肝細胞損傷の重篤な徴候を示した。これは移植後24時間の高いASTの血清レベル（3928±1455IU/l）により明白であった。βガラクトシダーゼ組換えアデノウイルスで形質導入した肝臓移植レシピエントにおいて類似の結果が得られた（4887±500IU/l）。正反対に、H-フェリチン組換えアデノウイルスで形質導入した肝臓移植片を担持する動物では、βガラクトシダーゼ/未処置群と比較して（$p<0.05$）、AST放出（1368±550.8IU/l）が有意に阻止された。H-フェリチン形質導入された肝臓がIRIから保護されたことは、同系SDレシピエントに移植した場合、H-フェリチン形質導入された肝臓の90%までが14日より長く生存したという実証により強く支持される。正反対に、形質導入していないかまたはβガラクトシダーゼ形質導入した肝臓の40から50%のみが、同系SDレシピエントに移植した場合、14日より長く生存した（図14B）。同系レシピエントに移植されたH-フェリチンで形質導入された肝臓においてアポトーシスを受ける細胞の相対数は、同一条件で移植された形質導入していないかまたはβガラクトシダーゼ形質導入した肝臓と比較して有意に低下した（図14B）。H-フェリチン組換えアデノウイルスで形質導入した肝臓を受け取ったレシピエントにおける長期生存は、形質導入していないかまたはβガラクトシダーゼ組換えアデノウイルスで形質導入した肝臓で移植されたレシピエントと比較して有意に増強された（$p<0.001$）。この知見は、H-フェリチンの抗アポトーシス効果が、移植された肝臓においてその全体的な細胞保護機能に寄与し得るという仮説に合致する。

【０１７４】

フェリチンの細胞保護作用に関するモデル。図15に示すように、虚血および再灌流時に遊離のヘムがECにより内部移行される。ヘムに対するHO-1作用はFe^{2+}を放出し、これはFenton反応を介して過酸化水素（H_2O_2）のOH^-および$OH^{\cdot}$への変換を触媒する。これらは炎症およびアポトーシスを促進するシグナル伝達経路を誘発する。フェリチンはFe^{2+}に結合し、そしてそれがH_2O_2と反応するのを妨げ、従ってこの過程を遮断する。

【０１７５】

結論

これらの結果により、H-フェリチンの抗アポトーシス機能が実証され、例えば外因性フェリチンの投与による、またはH-フェリチン遺伝子の発現の上昇によるH-フェリチン活性の上昇を治療様式で用いることができることが示唆される。その肝臓IRIを抑制する能力により、H-フェリチン遺伝子の発現が結果的に長期の冷虚血に関わらず肝臓移植の使用を安全なものにすることができる。限定を意味しない1つの理論として、H-フェリチンの保護効果は、内皮細胞（EC）および肝細胞アポトーシスをインビボおよびインビトロで阻止するその能力に付随すると思われる。

【０１７６】

実施例4. 増強された島移植片生存性

体外から投与されたビリベルジンまたはCoPPの同系島移植を増強する能力を評価した。

【０１７７】

材料および方法

動物

6から8週齢の雄DBA/2、B6AF1およびDBA/1マウス（Jackson）を実験に使用する。マウスをケージあたり4匹で2週間飼育し、そして実験に使用する前に通常の研究室用飼料を与えた。

【０１７８】

処置プロトコール

ストレプトゾトシン（STZ、225mg/kg）を用いてレシピエントを糖尿病にした。STZ投与の5日後に、2回連続で350mg/dlを超える血糖レベルを有する動物をレシピエントとして用

いた。レシピエントの腎臓被膜の下に島（500）を移植した。

【０１７９】

試薬

コバルト・プロトポルフィリン（CoPPIX、Porphyrin Products、Logan、ユタ州）、ビリベルジン二塩酸塩およびビリルビン（ICN Biomedicals Inc.、オハイオ州）を少量の0.2M NaOHに溶解し、続いて1M HClでpH7.4に調整し、そして1xPBSで希釈した。貯蔵溶液（CoPPIX＝2mg/ml、ビリベルジン＝3.2mg/ml、ビリルビン0.5mg/ml）を等分し、そして使用時まで-70℃に維持した。光曝露はできる限り制限した。

【０１８０】

HO-1の誘導/ビリベルジン/ビリルビンの投与

ドナーに与える場合、島単離の24時間前にCoPPIX（20mg/kg）を与えてHO-1発現を誘導した。CoPP処置の後、異なる器官のHO-1発現を確認するために、処置の24時間後に組織試料を収集し、そして液体窒素中で瞬間凍結した。抗HO-1抗体を用いてHO-1発現の免疫組織化学分析を実施した。-1、1、3、5および7日にCoPPIX（20mg/kg）をレシピエントに腹腔内（i.p.）投与した。島単離の1時間前にビリベルジン（50μmol/kg）またはビリルビン（8.5μmol/kg）をドナーの腹腔内に投与した。レシピエントに関しては、ビリベルジン（50μmol/kg）またはビリルビン（8.5μmol/kg）を-1から13日まで毎日または1日2回のいずれかで腹腔内投与した。その後さらなる処置は行わなかった。

【０１８１】

グルコースレベルの測定

移植後週2回グルコースレベルを試験した。＜200mg/dlのグルコースレベルが正常血糖と考えられた。2回連続でグルコースレベルが＞300mg/dlである場合、移植片は拒絶されたと考えられた。

【０１８２】

耐性試験

腎摘出術を行うことにより長期間（100日以上）生存した島を有する多くの動物から第1移植片を除去した。元来のドナーと同系である島を、さらに処置することなく対側の腎被膜の下に移植した。これらの第2移植島もまたさらに処置することなく100日以上生存した場合、レシピエントは耐性であると考えられた。元来のドナーとクラスIまたはクラスII抗原のいずれをも共有しないサードパーティードナー（DBA/1）の島を移植することにより、抗原特異的耐性を評価した。

【０１８３】

病理学

長期間（100日以上）生存した移植片でヘマトキシンおよびエオシン（H&E）およびインスリン染色を実施した。

【０１８４】

半定量的PCR

Rneasy（商標）Miniキット（Qiagen Inc.、カリフォルニア州、米国）を用いてRNAを抽出し、そしてRNA PCRキット（TaKaRa、PanVera、Madison、ウィスコンシン州、米国）を用いてcDNAに逆転写した。使用する各プライマー対に特異的な、10μM dNTP、50pgの5'-プライムおよび3'-プライムオリゴ、LA-Taqポリメラーゼ（TaKaRa）2.5単位、および$MgCl_2$を含有する反応混合物50μl中でcDNA全量2μlを増幅した。Life Technoloties（ニューヨーク州、米国）からマウスおよびヒトHO1（372bp）のプライマー

(5': TGA AGG AGG CCA CCA AGG AGG T (配列番号:1);

3': AGG TCA CCC AGG TAG CGG GT (配列番号:2))

およびβ-アクチン（525bp）のプライマー

(5': GCC ATC CTG CGT CTG GAC CTG G (配列番号:3);

3': TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC A (配列番号:4))

を入手した。Peltier Thermal Cycler PTC-200（MJ Research、Las Vegas、ネバダ州、米国）で、94℃で4分間の変性の後、94℃、55℃および72℃で各1分間のサイクルを各プライマー対に特異的なサイクル数で繰り返してPCR反応を実施した。臭化エチジウム染色1%アガロースゲルでPCR産物（10から20μl）を分析した。

【０１８５】

結果

同種島移植におけるHO-1

CoPPをドナー動物に投与した場合、いくつかの異なる組織、例えば心臓、腎臓、膵臓、肝臓および脾臓においてHO-1発現が観察された。単離された島におけるHO-1発現を半定量的PCR分析により確認した。DBA/2（H-2^{d}）からB6AF1（H-$2^{b/a}$）マウスに島移植を行った。続いて同種移植に関してCoPPでHO-1を誘導した。ドナーにおいて島を採取する1日前から、およびレシピエントにおいて移植に関して-1、1、3、5および7日にHO-1を誘導した。このプロトコールにより概して生存の延長に至ったが、いくつかの島は移植後7日の後何ら処置を施さなかったにも関わらず長期間（100日以上）生存した。加えて、レシピエントの処置を行わずにドナーにおいてのみHO-1を誘導することにより、レシピエントの島の生存および機能の延長のみならず、偶発的な移植片の長期間生存に至った。ドナーおよびレシピエント並びにレシピエント単独の処置での生存結果をも示す（図16）。耐性試験では、同系の島（DBA/2）で移植した5匹全ての動物は第2移植片を無期限に（100日以上）受け入れたが、サードパーティー移植片（n＝3）を迅速に拒絶した。

【０１８６】

ビリベルジンまたはビリルビンの投与による同種島の長期間生存の誘導

ビリベルジンまたはビリルビンのDBA/2ドナーおよびB6AF1レシピエントへの投与により、移植後13日の後は処置を行わなかったが、66.7%から100%の長期間生存が導かれた。ビリベルジン投与後のビリルビンの半減期はわずか2.5から3.5時間であった。従って、ドナーおよびレシピエントへのビリルビンの1回用量の投与を1日2回用量の投与（12時間毎）と比較した。1回用量により島の生存の延長および50%長期間生存が導かれたが、2回用量により100%生存が導かれた。レシピエントをビリベルジンまたはビリルビンのみで処置することによっても、有意な割合の長期生存島が導かれた（図17）。ビリベルジンまたはビリルビンで処置されたいくつかの長期間生存動物において抗原特異的な耐性もまた認められた。

【０１８７】

対外から投与されたビリベルジンの移植された島を保護する能力を最小量モデル（minimal mass model）で評価した。同系島移植をDBA/2マウスで実施した。島（140）を糖尿病マウスの腎臓被膜の下に移植した。被験動物を-1から7日まで1日2回、50μmol/kgのビリベルジンで処置した。対照を溶媒のみで処置した。ビリベルジン処置動物は7.7±5.5日に正常血糖に戻った；対照群の動物は高血糖のままであった（＞52日）。

【０１８８】

結論

同系島移植片のドナーおよび/またはレシピエントをビリベルジンまたはCoPPで処置することにより移植片の生存性が増強され、糖尿病性高血糖の処置に成功する。

【０１８９】

実施例5. 新生内膜形成の阻止

CoPPまたはビリベルジンの投与の新生内膜組織の形成に及ぼす効果を評価した。

【０１９０】

材料および方法

動物

体重350から400gの成熟雄Lewisラット（LEW/CrlBR；Charles River Laboratories、Wil

mintgon、マサチューセッツ州）をバルーン傷害モデルに使用した。米国実験動物管理協会（American Association for Laboratory Animal Care）のガイドラインに従って動物を飼育し、そして研究プロトコールはBeth Israel Deaconess Medical Center、Boston、マサチューセッツ州の所内動物管理使用委員会により承認された。

【０１９１】

バルーン傷害モデル

左総頚動脈および左外頚動脈の曝露の後、外頚動脈を介して2F Fogartyカテーテル（Edwards Lifesciences LLC、Irvine、カリフォルニア州）を導入し、そして左総頚動脈に通し、2気圧まで膨張させ、そして分岐点まで戻し、次いでしぼませた。この手順を3回繰り返した。

【０１９２】

実験試薬および設計

ビリベルジン二塩酸塩（ICN Biomedicals Inc. Aurora、オハイオ州）を少量の0.2M NaOHに溶解し、続いて1M HClでpH7.4に調整し、そしてPBSで希釈した。貯蔵溶液を用時まで-70℃に維持した。光曝露はできる限り制限した。

【０１９３】

ビリベルジン局所送達

総頚動脈（CCA）の近位結紮および内頚動脈（ICA）遠位結紮の後、ポリエチレンカテーテルを頚動脈の外枝まで導入し、そしてCCAを洗い流した。PBSまたはPBSで希釈した1および0.1mM ビリベルジン50μlを注入し、そして傷害の前または直後に1時間インキュベートし、遮光した。ビリベルジンを除去し、CCAを0.9% NaClで2回洗い流し、そしてCCAおよびICAを通る血流を回復させた。

【０１９４】

ビリベルジン全身処置

ビリベルジンを50μmol/kgの用量で腹腔内注射した。第1回用量を外科的手順の3時間前に、第2回用量を外科的手順の直後に注射した。

【０１９５】

結果

組織形態計測分析

バルーン傷害の14日後に頚動脈を収集し、10%ホルマリンで固定し、そしてパラフィンに包埋するか、または2-メチルブタン中で急速凍結した。200μmの間隔で5μmの連続断面をヘマトキシリン・エオシン染色で染色した。各管の6つの断面の画像をZeiss顕微鏡（Axioskop（商標）Zeiss、Iowa City、アイオワ州）で768×512ピクセルの解像度で撮影した。手動のセグメント化により画像を分析し、各断面の内膜および中膜を透写した。デジタル画像ソフトウェア（Axio Vision（商標）、Carl Zeiss、Jena、ドイツ）により面積および直径に相当するピクセル数として面積および直径を算出した。内膜中膜比（面積、直径）および管腔の横断面面積狭小化を用いて新生内膜形成を評価した。組織形態計測分析の責任者は処置に対して盲検化された。ANOVAを用いてStatView（登録商標）ソフトウェア・バージョン5.0で各群の24個の断面を統計学的に分析した。図18に示すように、ビリベルジンを総頚動脈に1時間滴下注入するラット頚動脈の局所前処置、および2つの時点のビリベルジンでの全身処置によりバルーン傷害後の新生内膜形成（矢印）が有意に阻止される。

【０１９６】

結論

ビリベルジンまたはCoPPでの処置がバルーン傷害後の動脈傷害、例えば再狭窄を有意に低減させることができる。

【０１９７】

実施例6. 内毒素性ショック

ビリベルジンの抗炎症保護効果を内毒素性ショックの動物モデルにおいて評価した。

【０１９８】

材料および方法
処置プロトコール
内毒素（リポ多糖類/LPS；Sigma；大腸菌（E.coli）血清型0128：B7；3mg/kg、静脈内）を雄Sprague-Dawleyに投与した結果、急性非致死的炎症に至った。ラットでの亜致死的用量のLPSの結果、エアスペースにおける好中球蓄積およびタンパク質蓄積（双方共に肺炎症のマーカーである）による中程度の肺炎症に至った。炎症誘発性サイトカインTNF-αは血清において急速に増加し、60から90分までにピークに達する。これに続いてプロトタイプの抗炎症サイトカインであるIL-10が増加し、8から12時間後にピークに達する。
【０１９９】
ビリベルジンの投与
LPS投与の17時間前、1時間前、および8時間後にビリベルジン（Frontier Scientific：NaOHで可溶化した後PBSで調製）50μmol/kgを腹腔内投与した。
【０２００】
気管支肺胞洗浄
LPS投与の24時間後に気管支肺胞洗浄（BAL）を実施した。市販により入手可能なELISAキット（R&D Systems Inc.）を用いて製造者の指示書に従って血清サイトカインを測定した。標準曲線に基づく標準Bradfordアッセイにより全タンパク質を測定した。標準的な方法を用いてBALを実施した。簡単には、気管開口術を実施し、そしてPBS 8ml（およそ35ml/kg）を3回滴下注入した。洗液試料のDiffQuik（登録商標）Fixative（American Scientific Products）染色により全細胞数を決定し、そして細胞型および形態学の鑑別分析を行った。
【０２０１】
結果
ビリベルジン投与によりエアスペースにおけるLPS誘起のTNF-αのレベル（図19）並びに好中球（図20）およびタンパク質（図21）蓄積のレベルが低下した。またビリベルジン投与の結果、抗炎症性サイトカイン、IL-10の増加に至った（図22）。
【０２０２】
結論
ラットにおける内毒素投与に付随する炎症効果を低減させる能力により明らかなように、ビリベルジンは強力な抗炎症剤である。
【０２０３】
実施例7. 肝炎
肝炎のマウスモデルにおいてビリベルジンの処置の効果を評価した。
【０２０４】
材料および方法
0.3μg/マウスTNF-α（マウスTNF-α；Gibco）および250mg/kg腹腔内Dガラクトサミン（Sigma）（6から10時間以内に劇症肝炎を誘起する）を含むカクテルの腹腔内注射の16時間および1時間前にビリベルジン（50μmol/kg、腹腔内）を雄マウス（C57BL/6J）に投与した。対照マウスにはPBS溶媒を投与した。6から8時間後に心臓穿刺により血清試料を採取し、Sigma Chem.CoのALTアッセイキットにより製造者の指示書に従ってアラニン・アミノトランスフェラーゼ（ALT）に関して分析した。
【０２０５】
結果
ビリベルジンは溶媒処置した対照と比較して、血清ALTレベルを90%以上低下させた（対照の約1000IU/ml対処置動物の100IU/ml）。参考として、正常ALTレベルは20から30IU/mlである。
【０２０６】
結論
ビリベルジン処置は肝臓傷害および急性肝炎などの肝炎に付随する徴候を低減させるのに有効である。

【０２０７】
実施例8．小腸移植
小腸移植の動物モデルにおいてビリベルジンでの処置の効果を評価した。
【０２０８】
材料および方法
動物
体重200から300gの近交系雄LEW（RT1）ラットをHarlan Sprague Dawley,Inc.（Indianapolis、インディアナ州）から購入し、そしてPittsburgh大学の層流動物用施設で飼育した。動物には標準的な食餌を自由に摂取させた。
【０２０９】
小腸移植
同系Lewisラットで小腸の同所移植（SITx）を実施した。以前に記載された手順（Maraseら、Handbook of Animal Models in Transplantation Research,Carmerら編、CRC Press、Boca Raton、フロリダ州、203-213頁（1994））を用いて大静脈ドレナージを伴うSITxを行った。Treitz靭帯から回盲弁までのドナーの全小腸を、門脈および大動脈の一部と繋がった上腸間膜動脈から成る血管茎で隔離した。大動脈部分を介して移植片を冷Ringer乳酸塩溶液5mlで灌流し、そして0.5%ネオマイシン硫酸塩（Sigma、St.Louis、ミズーリ州）を含有する冷生理食塩水溶液20mlで腸管内腔を灌注した。10-0 Novafil（商標）縫合糸を用いて移植片大動脈とレシピエントの腎臓下大動脈との間、並びに移植片門脈とレシピエント大静脈との間の端側吻合を行った。冷虚血時間は1時間であった。レシピエントの全腸を除去し、そして近位および遠位腸端々吻合により腸の連続性を復元した。レシピエント動物に予防用セファマンドール・ナファートを1日20mg、術後3日間投与した。移植されたレシピエントには手術後3時間に水を与え、そして手術後24時間に食餌を与えた。
【０２１０】
SYBRグリーン・リアルタイムPCR
移植誘導前炎症性および抗炎症性遺伝子発現に及ぼすビリベルジン投与の効果を筋層抽出物においてRT-PCRにより評価した。ビリベルジン（50μmol/kg、腹腔内）をドナーおよびレシピエントの双方に術前3時間に投与した。術後4時間に正常な腸および移植した移植片から外側筋層を収集し、そして液体窒素中で瞬間凍結した。この時点で腹部切開後3から6時間の間に生じる炎症性メディエーター発現が最大範囲に入る。以前に記載されたチオシアン酸グアニジン・フェノール-クロロホルム抽出法（Eskandariら、Am.J.Clin.Pathol.75（3）：367-370（1997））を用いて全RNA抽出を行った。RNAペレットをRNA-secure再懸濁溶液（Ambion Inc.、Austin、テキサス州）に再懸濁し、続いてDNaseI（DNA-Freeキット、Ambion Inc.、Austin、テキサス州）で処理することにより夾雑している可能性のあるDNAの除去を行った。各試料からの全RNAの等量のアリコート（5μg）を分光測光法（波長250nm）により定量し、そして40ng/μlの濃度で等分した。SYBRグリーン2段階リアルタイムPCRによりピークのmRNA発現を2連で定量した。GAPDHを内因性参照として使用した。ランダムヘキサマー（PE applied Biosystems、Foster City、カリフォルニア州）およびSuper Script II（商標）（Life Technologies、Rockville、メリーランド州）を用いて、等分したRNAを第1鎖相補的DNA（cDNA）合成に供した。プライマー配列は文献から得られたか、または公開されている配列に従って設計された（表2）。SYBRグリーンPCRコア試薬（PE Applied Biosystems）を用いてPCR反応混合物を調製した。製造者により推奨される条件を用いて各試料を2連で測定した。ABI PRISM7700（商標）配列検出システム（PE Applied Biosystems、Foster City、カリフォルニア州）で、反応物を50℃で2分間インキュベートしてウラシルN'グリコシラーゼを活性化し、そして次に95℃で12分間インキュベートしてAmplitaq Gold（商標）ポリメラーゼを活性化し、続いて95℃で15秒間および60℃で1分間の40サイクルを行った。リアルタイムPCRのデータをΔR_n蛍光シグナル対サイクル数としてプロットした。任意の閾値をlog ΔR_nサイクルプロットの直線部分の中央に設定した。閾値サイクル（C_T）を、ΔR_nがこの閾値と交差する点でのサイクル数として定義した。mRNA発現の定量をGADPHに正規化し、そして比較C_T法（Schmittgenら、J.Bioch

em.Biophys.Methods 46（1-2）：69-8（2000））を用いて対照に相対して算出した。

【０２１１】

夾雑するゲノムDNAのPCR増幅を排除するために、各PCR反応にRT陰性対照（逆転写されなかったRNAを含有する試料）を含めた。各反応に関して融解曲線分析を実施して、特異的産物の増幅を確実にした。加えてプライマーをゲル電気泳動に供して、非特異的結合の不在を確認し、そしてアンプリコンが正確なサイズであることを確認した。標的cDNAのPCR増幅の効率を試験して希釈の共直線性を測定した。cDNAの連続3倍希釈を3連で実施した。相対入力コピー数に対してC_T値をプロットすることにより標準曲線を作製した。相関係数0.99で勾配-3.2±0.3の標準曲線は、対応効率が100±10％で、許容されると考えられた。

【０２１２】

（表２）プライマーの概要

プライマー	配列 5'から3'	配列番号	供給源
GAPDH	ATGGCACAGTCAAGGCTGAGA CGCTCCTGGAAGATGGTGAT	9 10	NM_017008
IL-6	GCCCTTCAGGAACAGCTATGA TGTCAACAACATCAGTCCCAAGA	11 12	M26744
IL-1β	CACCTCTAAGCAGAGCACAG GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	13 14	Li& Wang, Brain Research Protocols 2000; 5, 211-217
TNFα	GGTGATCGGTCCCAACAAGGA CACGCTGGCTCAGCCACTC	15 16	Fink ら、Nature Med 1998; 4: 1329-1333.
ICAM-1	CGTGGCGTCCATTTACACCT TTAGGGCCTCCTCCTGAGC	17 18	NM_012967
iNOS	GGAGAGATTTTTCACGACACCC CCATGCATAATTTGGACTTGCA	19 20	NM_012611
COX-2	CTCTGCGATGCTCTTCCGAG AAGGATTTGCTGCATGGCTG	21 22	AF233596
IL-10	TGCAACAGCTCAGCGCA GTCACAGCTTTCGAGAGACTGGAA	23 24	Harness ら、J. Neurol. Sci. 2001; 187,7-16.

【０２１３】

運動性研究

移植した移植片の腸運動不全の処置に及ぼすビリベルジン投与の効果をインビトロおよびインビボの双方で評価した。術後24または48時間（これは移植に誘導される運動不全がピークに達する時点であることが示されている）に組織を収集した。以前に記載されるように（Eskandariら、Am.J.Physiol.273（3Pt1）：G727-734（1997））環状筋の機械的活動性をインビトロで測定した。ラットを麻酔し、そして術後24時間に放血死させた。97％ O_2/3％ CO_2で平衡にした、予め酸化したKrebs-Ringer炭酸水素塩バッファー（KRB；137.4mM Na^+、5.9mM K^+、2.5mM Ca^{2+}、1.2mM Mg^{2+}、134mM Cl^-、15.5mM HCO_3^-、1.2mM $H_2PO_4^-$、および11.5mM グルコース）が入ったSylgaard（商標）を裏打ちした解剖皿に空腸の中央部分を固定した。腸間膜境界線に沿って腸を開き、そして細いピンセットで剥がすことにより粘膜を除去した。筋層の全層ストリップ（1×6mm）を環状筋層に平行に切断した。37℃を維持し、予め酸化したKRBで連続的に灌流した水平型人工臓器チャンバーに筋肉ストリップをマウントした。各ストリップの一端を、結紮することにより固定したポストに、そしてもう一端を等尺性力変換器（isometric force transducer）（WPI、Sarasota、フロリダ州）に付着させた。ストリップを1時間平衡にし、その後、漸増的に最大の自発的収縮を生じる長さ（L_0）まで伸ばした。30分の第2平衡期間の後、組織を漸増濃度のムスカリン性アゴニストであるベタネコール（0.3から300μM）に10分間、続いて10分間の洗浄期間に曝露することにより収縮応答曲線を作製した。収縮活性をトレースの下の面積を積分することにより算出し、ストリップの重量および長さを組織のミリメートル四方に変換することにより（1.03mg/mm^2）正規化し、そしてg/s/mm^2として報告した。

【０２１４】

腸血流の測定

腸間膜境界線に隣接した移植片空腸および回腸の漿膜表面にレーザーDopplerフローメーター（BLF 21D、Transonic Systems、Ithaca、ニューヨーク州）の平らなプローブを配置して腸微小血管血流をモニターした。SMAおよび辺縁動脈（MA）の血流をも分析した。

【０２１５】

腸血流の測定

平らなプローブを装備したレーザーDopplerフローメーター（BLF 21D、Transonic Systems、Ithaca、ニューヨーク州）を用いて6時間保存した移植片の微小血管血流を測定した。腸間膜境界線に隣接した移植片空腸および回腸の漿膜表面にプローブを配置することにより腸微小血管血流をモニターした。上腸間膜動脈（SMA）および辺縁動脈（MA）の血流をも分析した。

【０２１６】

移植片透過性

10mM HEPES、137.0mM NaCl、5.36mM KCl、4.17mM $NaHCO_3$、0.34mM Na_2HPO_4、0.44mM KH_2PO_4、0.41mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.49mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$、1.26mM $CaCl_2$、および19.45mM グルコースから成る氷冷改変Krebs-Henseleit炭酸水素塩バッファー［KHBB（pH7.4）］中で反転腸サックの調製を行った。腸部分の一端を4-0シルクで結紮した。薄いプラスチック製のロッドを用いて得られた腸サックを反転させた。5ml プラスチックシリンジのチップに溝を切り込み、そしてKHBB 1.5mlをシリンジに吸引した。4-0シルクを用いて、反転させた腸サックの開口端で溝を確保し、そしてシリンジからKHBBを注入することにより腸を穏やかに膨張させた。37℃を維持し、そしてイソチオシアン酸フルオレセイン・デキストラン（平均分子量4000Da；FD4；20mg/ml）を含有するKHBBの溶液80mlが入ったビーカーにサックを吊り下げた。95% O_2および5% CO_2を含有する混合気体を穏やかにバブリングすることにより浴液を曝気した。実験の開始時に、浴液1.0mlを除去してFD4の初期濃度を測定した。30分のインキュベーションの後、サックの長さを測定し、そして腸サック内の液体1.0mlを収集した。4℃、1,000rpmで10分間遠心することにより試料を清澄化した。続いて上澄300μlをリン酸塩緩衝食塩水3.0mlで希釈し、そしてPerkin-Elmer LS-50蛍光分光光度計（Palo Alto、カリフォルニア州）を用いて励起波長492nm（スリット幅＝10.0nm）および発光波長515nm（スリット幅＝10.0nm）で溶液の蛍光を測定した。

【０２１７】

血清メディエーターの検出

保存された腸を移植されたレシピエントから血清試料を再灌流の3および12時間後に採取し、そして評価するときまで-80℃で保存した。ラット酵素結合イムノアッセイ（ELISA）キットを用いて、製造者に記載されるように（R&D Systems,Inc.、Cambridge、マサチューセッツ州）血清IL-6を測定した。一酸化窒素の生成をモニターするために、市販により入手可能な試験キット（Cayman、Ann Arbor、ミシガン州）を用いて移植の12時間後に、NO代謝の安定した最終生成物である血清亜硝酸塩/硝酸塩レベルを測定した。このアッセイ系では、硝酸塩リダクターゼを用いて硝酸塩を亜硝酸塩に還元し、そして続いてGriess反応を用いて試料の亜硝酸濃度を測定する。

【０２１８】

データ分析

結果を平均±平均の標準誤差（SEM）として表現する。Student検定または適当な場合、分散分析（ANOVA）を用いて統計分析を行った。確率水準$p<0.05$を統計学的に有意であると考えた。

【０２１９】

結果

保存しない場合のSITx（最小傷害）

移植片の血清ビリルビンレベルおよびBVR発現

注射されたビリベルジン（BV）がビリルビンにどれほど速やかに代謝されるかを評価するために、逐次的血清ビリルビンレベルを分析した。BV処置の前には血清ビリルビンレベルは検出不能であった。BVの腹腔内注射の30分後に血清ビリルビンレベルは正常動物のレ

ベルと比較して、1.07±0.5mg/dlのピークに到達した。腹腔内注射後2時間までにビリルビンレベルは正常に戻った。

【０２２０】

環状筋収縮性

SITxおよびBVの筋肉装置に及ぼす直接効果を決定するために、インビトロ器官槽実験を用いて自発性およびベタネコール刺激性空腸環状筋収縮性に及ぼす、BV処置を伴う、および伴わないSITxの効果を調べた。腸移植片の移植後24時間（その時点にはSITxに付随する腸運動性が最大抑制されることが解っている（Schwarzら、Surgery 131：413-423（2002））に組織を収集した。

【０２２１】

BV処置された対照動物は自発性筋肉収縮活性に変化がないことを実証した。SITxの結果、自発性筋肉収縮活性の有意な低下に至るが、BV処置されたレシピエント動物に移植された移植片から収集された空腸筋肉ストリップは未処置移植片と比較して、有意に大きな自発性収縮活性を実証した。

【０２２２】

ベタネコール（0.3から300μM）の槽灌流液への添加により、環状筋収縮性の濃度依存的増加が引き出された。未処置およびBV処置動物に由来する対照筋肉は、ベタネコール（100μM）に対して類似の強い一過性および強直性収縮を呈したが、未処置の移植された腸に由来する筋肉はベタネコールに応答して、およそ51%少ない収縮性を生じた（1.7±0.4g/mm2/秒）。しかしながら、BV処置動物により生じたベタネコール刺激性筋肉収縮性は未処置移植筋肉よりも有意に改善された。これらの観察は4群の動物の各々に関して完全に統合された収縮性ベタネコール用量応答性曲線の作製の全体にわたって反映された。図25に示すように、BV治療により移植に誘導される筋肉収縮の抑制が低減され、筋肉の応答性が移植前レベルまで回復した。

【０２２３】

白血球動員

小腸筋層の細胞性炎症事象をSITx後24時間に特徴づけした。Hanker-Yates組織化学により決定されるミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性を用いて、BV処置された、および処置されていない、対照並びに移植された動物に由来する組織における多形核好中球（PMN）浸潤を定量化した。生理食塩水を投与された手術されていない対照では、MPO陽性細胞は稀であった。正常動物へのBV注射はMPO陽性細胞管外遊出を200倍視野あたり3.9±1.3細胞にまで減少させたが、生理食塩水対照と比較して有意には至らなかった。SITxはPMNの腸筋層への有意な動員を招いた。BV処置はMPO陽性細胞の平均数を有意に減少させた。

【０２２４】

分子炎症性応答

再灌流後4時間に、種々プロトタイプの炎症メディエーターのmRNAレベルを定量分析により決定した。

【０２２５】

リアルタイムRT-PCR分析により、手術していない生理食塩水対照と比較して、再灌流後4時間の移植片外側筋層抽出物中の炎症関連サイトカイン、IL-6、IL-10、TNFαおよびIL-1βに関するmRNA発現の有意な増加が示された（図23A-D）。

【０２２６】

BV処置したレシピエントラットの移植片筋層抽出物では、IL-6およびIL-1b発現の平均比較発現が、4時間で、生理食塩水処置され、移植され、そして再灌流された移植片と比較して、各々平均24%（p＝0.0099、N＝5）および30%（p＝0.0040、N＝5）まで低減された（図23Aおよび23D）。しかしながら、IL-6およびIL-1bと異なって、BV処置は移植により引き起こされたTNF-αまたはIL-10の上方制御を有意に変化しなかった（図23Bおよび23C）。手術されていない動物のBV処置もまたいずれかのサイトカインのmRNAの基底発現を変化しなかった。

【０２２７】

誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の遺伝子発現およびシクロオキシゲナーゼ（COX-2）をリアルタイムRT-PCRにより定量した。結果により、勢力のある平滑筋インヒビターである一酸化窒素およびプロスタノイドの酵素であるiNOSおよびCOX-2の双方が移植された移植片の筋層において、各々70.4倍および5.2倍有意に上方制御されたことが示された（図24A-B）。双方の酵素の平均相対mRNA発現はBV処置ラットでおよそ50％低下した（p＝0.015およびp＝0.032、各々N＝5）。手術していない対照動物のBV処置は、iNOSまたはCOX-2のmRNA発現を変化しなかった。循環炎症細胞の炎症組織への動員において重要な役割を果たす付着分子であるICAM-1遺伝子発現もまた、対照と比較して有意に6.1±3.8倍増加した。BV処置は移植片におけるICAM-1発現を30％まで有意に低減させた（p＝0.020）（図23C）。BV処置は移植片におけるMnSOD発現を同様に有意に低減させた（図23D）。

【０２２８】

腸I/R傷害の間のHO-1誘導

HO-1はヘム触媒およびBV生成を制御するので、外部から提供されたBVはBV処置されたレシピエントにおける内因性HO-1誘導に影響し得る。正常な腸では、HO-1タンパク質発現はなかった。虚血/再灌流傷害は空気処置した移植片におけるHO-1発現の漸増に随伴され、再灌流後6から24時間の間に最大レベルに到達した。BV処置は腸HO-1生成に有意な影響を及ぼさなかった。

【０２２９】

6時間保存したSITx（重篤な傷害）

BV処置後の抗酸化能力

移植片標本内の全抗酸化能力または抗酸化力を定量的に測定した。Total Antioxidant Power（登録商標）（Oxford Biomedical Research、Oxford、ミシガン州）を用いて、製造者の指示書に従って、移植片の抗酸化レベルを検出した。この手順では、試料に存在する全ての抗酸化剤の組み合わせ作用によるCu^{++}由来Cu^{+}の評価により、試料中の抗酸化レベルの評価を検出する。図27に示すように、BV処置は移植された腸の抗酸化能力を正常レベルまで上昇させた。

【０２３０】

血清炎症メディエーター

冷却保存された移植片の移植後のIL-6およびiNOS mRNAの発現低下（図23Aおよび24B）もまたタンパク質生成に反映された；生理食塩水およびBV処置対照血清IL-6濃度は低かった。移植後3時間に、移植は血清IL-6タンパク質濃度の有意な上昇を引き起こし（5131.4±3169.1pg/ml）、そして血清IL-6増加はBV処置を受けた動物において有意に低かった（1652±306.9pg/ml、p＝0.0347）。消化管運動性のレギュレーターとしての一酸化窒素の重要性のために、移植された動物の血清中の一酸化窒素代謝物の測定によりiNOSの分子発現を追跡した。生理食塩水およびBV処置対照では、平均血清亜硝酸塩/硝酸塩（NO）レベルは各々17.3±7.4および18.4±3.2μMであった。移植後12時間で、SITxは血清NO生成物の34.4±15.2μMまでの有意な上昇に至った。BV処置は移植誘導血清NOレベルを53％まで、18.2±3.9μMに有意に低下させた。

【０２３１】

移植片透過性

腸障壁機能の喪失が移植片透過性の上昇を引き起こす。4Kdフルオレセイン・イソチオシアナート・デキストランを用いる反転腸サック法により移植片透過性を決定した。未処置移植片で透過性の顕著な増加が認められた（1.44±1.0ml/cm/分）。BV処置移植片では腸透過性の増加が最小、すなわち増加の約60％阻止があり、2.82±1.3ml/cm/分になった（図26A）。

【０２３２】

血液微小循環

移植後の血流は劇的に低下する。BV投与は移植後の微小血管血流に影響を及ぼさなかった（図26B）。

【０２３３】

動物生存性

腸移植片のUW中の6時間の冷却保存により未処置レシピエントの腸機能不全が誘導された；腸I/R傷害に対する2次的な腸閉塞のために、14匹の対照動物のうち3匹がSITx後24時間以内に死亡し、そしてさらに3匹の動物がSITx後5および7日に死亡した。対照的に、全BV処置動物がSITxから順調に回復した。14日間の追跡調査で生存した全動物は、生理食塩水対照で57.1%（8/14）およびBV処置群で100%（8/8）であった（$p<0.05$）。

【０２３４】

結論

前記のデータにより、BV処置の結果、移植後の移植片腸筋層内の炎症誘発の鈍化、小腸移植片機能、およびレシピエント生存の増強に至ることが示された。

【０２３５】

別の態様

本発明をその詳細な説明と組み合わせて記載してきたが、前記の記載は説明を意図するものであり、そして添付の特許請求の範囲により定義される本発明の範囲を限定することを意図するものではないことは理解されるべきである。その他の態様、利点、および改変は特許請求の範囲の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【０２３６】

【図１Ａ】対照動物におけるDSS大腸炎の誘導後のHO-1およびβ-アクチンmRNAレベルの半定量的PCR分析の結果を示すゲルの写真である。

【図１Ｂ】対照動物におけるDSS大腸炎の誘導後のHO-1：β-アクチンmRNAレベルの比率の変化を説明する棒グラフである。X軸：日

【図１Ｃ】対照動物におけるDSS大腸炎の誘導後のHO-1タンパク質レベルの増加を示すウェスタンブロットの写真である。α-チューブリンを内部参照として使用した。

【図２Ａ】コバルト・プロトポルフィリン（CoPP）で処置した動物におけるDSS大腸炎の誘導後のHO-1およびβ-アクチンmRNAレベルの半定量的PCR分析の結果を示すゲルの写真である。

【図２Ｂ】CoPPで処置した動物における、DSS大腸炎の誘導後のHO-1：β-アクチンmRNAレベルの比率の変化を説明する棒グラフである。

【図２Ｃ】CoPPで処置した動物における、DSS大腸炎の誘導後のHO-1タンパク質レベルの増加を示すウェスタンブロットの写真である。α-チューブリンをローディング対照として使用した。

【図３Ａ】実験の7日目に観察されたDSS大腸炎に付随する体重減少に及ぼすコバルト・プロトポルフィリン処置の影響を説明する棒グラフである。NT＝処置なし；CoPP＝コバルト・プロトポルフィリン；ZnPP＝亜鉛プロトポルフィリン

【図３Ｂ】実験の7日目に観察されたDSS大腸炎疾患活動性指数（DAI）に及ぼすコバルト・プロトポルフィリン処置の影響を説明する棒グラフである。

【図３Ｃ】7日間のDSS大腸炎DAIに及ぼすコバルト・プロトポルフィリン処置の影響を説明する線グラフである。

【図３Ｄ】7日間のDSS大腸炎に付随する腸内出血に及ぼすコバルト処置の影響を説明する線グラフである。

【図３Ｅ】7日間のDSS大腸炎に付随する便の異常に及ぼすHO-1のコバルト・プロトポルフィリン誘導の影響を説明する線グラフである。

【図４Ａ】未処置対照動物（NT、左列）およびCoPP処置動物（COPP、右列）の10倍（上段）および40倍（下段）に拡大した陰窩構造の4枚の一連の顕微鏡写真である。

【図４Ｂ】陰窩スコアにより測定される、未処置対照に比較してCoPPで処置した動物における粘液腺に対する損傷の相対的な減少を説明する棒グラフである。

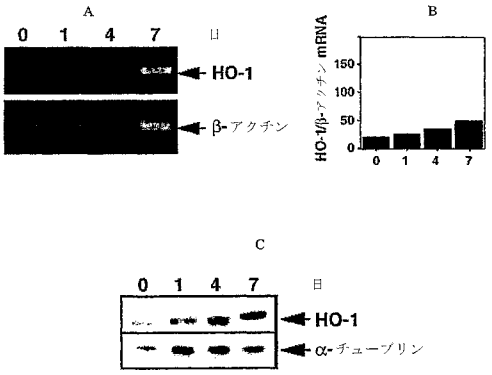
【図５Ａ】実験の7日目に観察されたDSS大腸炎に付随する体重減少に及ぼすビリベルジン、DFOまたは一酸化炭素での処置の影響を説明する棒グラフである。NT＝処置なし；CO＝一酸化炭素；DFO＝デスフェロキサミン

【図５Ｂ】実験の7日目に観察されたDSS大腸炎疾患活動性指数（DAI）に及ぼすビリベルジン、DFOまたは一酸化炭素での処置の影響を説明する棒グラフである。
【図５Ｃ】7日間のDSS大腸炎DAIに及ぼすビリベルジンでの処置の影響を説明する線グラフである。
【図５Ｄ】7日間のDSS大腸炎に付随する腸内出血に及ぼすビリベルジンでの処置の影響を説明する線グラフである。
【図５Ｅ】7日間のDSS大腸炎に付随する便の異常に及ぼすビリベルジンでの処置の影響を説明する線グラフである。
【図６Ａ】未処置対照動物（NT、左列）およびビリベルジン処置動物（右列）の10倍（上段）および40倍（下段）に拡大した陰窩構造の4枚の一連の顕微鏡写真である。
【図６Ｂ】陰窩スコアにより測定される、未処置対照に比較してビリベルジンで処置した動物における粘液腺に対する損傷の相対的な減少を説明する棒グラフである。
【図７Ａ】CoPPIX投与後0、1、2、4、および7日での脾臓（左列）および心臓（右列）におけるHO-1（上段）およびα-アクチン（下段）タンパク質発現のウェスタンブロット分析の結果を示す一連の写真である。
【図７Ｂ】CoPPIX投与後0、1、2、4、および7日でのHO-1発現レベルの増加を説明する棒グラフである。
【図７Ｃ】ビリルビンレベルに及ぼすCoPPIXまたはZnPPIXでの処置の影響を説明する棒グラフである。
【図７Ｄ】CoPPIXまたはZnPPIXで処置した動物における心臓の同種移植片の生存パーセントを説明する線グラフである。
【図８Ａ】3つの異なる投与スケジュールでビリベルジン処置した動物における心臓の同種移植片の生存パーセントを説明する線グラフである。
【図８Ｂ】ビリベルジンの投与後、経時的な血清ビリルビンレベルの上昇を説明する線グラフである。
【図８Ｃ】ドナー（DBA/2J）からの心臓の同種移植片またはサードパーティー（FVB）マウス株を用いる第2セット移植によりチャレンジしたマウスにおける生存パーセントを説明する線グラフである。
【図９】CoPPIX、ZnPPIX、またはビリベルジン（1回/日または3回/日）で処置した動物における脾細胞の増殖に及ぼす影響を説明する棒グラフである。
【図１０Ａ】ConAで刺激した脾細胞の増殖に及ぼす異なる投与量のビリベルジンの影響を説明する棒グラフである。
【図１０Ｂ】抗CD3モノクローナル抗体で刺激した脾細胞の増殖に及ぼす異なる投与量のビリベルジンの影響を説明する棒グラフである。
【図１０Ｃ】照射されたDBA/2脾細胞で刺激した脾細胞の増殖に及ぼす異なる投与量のビリベルジンの影響を説明する棒グラフである。
【図１０Ｄ】抗CD3モノクローナル抗体＋抗CD28で同時刺激した脾細胞の増殖に及ぼす異なる投与量のビリベルジンの影響を説明する棒グラフである。
【図１１Ａ】脾細胞によるIL-2分泌に及ぼす異なる投与量のビリベルジンの抑制効果を説明する棒グラフである。
【図１１Ｂ】脾細胞によるIL-2分泌に及ぼす異なる投与量のビリベルジンの抑制効果に及ぼす外因性IL-2の添加の影響を説明する棒グラフである。
【図１１Ｃ】抗CD3モノクローナル抗体または抗CD3モノクローナル抗体＋ビリベルジンで刺激した脾細胞におけるCD25発現のFACS分析の結果を示す3つのグラフのパネルである。
【図１１Ｄ】DNA結合により測定されるNF-κBまたはNFATの核転座に及ぼすビリベルジンの影響を説明する一対の写真である。
【図１２Ａ】CoPPもしくはZnPP単独（ドナーを-2日（D-2）および-1日（D-1）に処置し、レシピエントを-1日（D-1）から＋13日（D13）まで処置した）、DSI単独（レシピエントを0日（D0）に処置した）、またはCoPPもしくはZnPP（ドナーをD-2およびD-1に処置し、レシピエントをD-1からD13まで処置した）＋DSI（レシピエントをD0に処置した）で処置

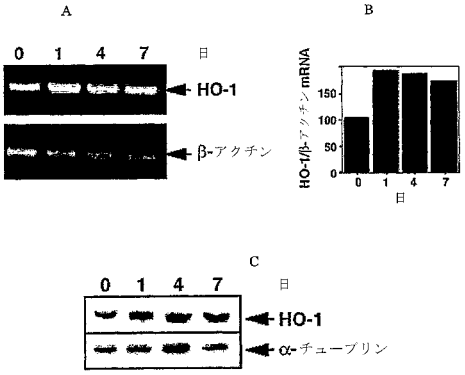
した動物における移植片生存パーセントを説明する線グラフである。
【図１２Ｂ】CoPPもしくはZnPP単独（ドナーを-2日（D-2）および-1日（D-1）に処置し、レシピエントを-8日（D-8）から＋6日（D6）まで処置した）、DST単独（レシピエントをD-7）に処置した）、またはCoPPもしくはZnPP（ドナーをD-2およびD-1に処置し、レシピエントをD-8からD6まで処置した）＋DSI（レシピエントを-7日（D-7）に処置した）で処置した動物における移植片生存パーセントを説明する線グラフである。
【図１３Ａ】βガラクトシダーゼ＋対照（pcDNA3またはpcDNA3/HO-1）またはpcDNA3/H-フェリチンで同時トランスフェクトしたBAEC（左パネル）またはマウス2F-2B EC（ATCC；右パネル）における細胞生存パーセントを説明する一対の棒グラフである。黒色の棒はTNF-αおよびAct.Dで処置したECを示す。灰色の棒はAct.Dで処置したECを表す。6つのうちの代表的な1つの実験を示す。示した全ての結果は2連のウェルの平均±SDである。
【図１３Ｂ】βガラクトシダーゼ＋対照（pcDNA3）またはpcDNA3/H-フェリチンで同時トランスフェクトしたマウス2F-2B細胞における細胞生存パーセントを説明する一対の棒グラフである。灰色の棒は未処置のECを表し、そして黒色の棒はエトポシドで処置した（200μM、8時間；左パネル）か、または血清剥脱に供した（0.1% FCS、24時間；右パネル）ECを表す。3つのうちの代表的な1つの実験を示す。示した全ての結果は2連のウェルの平均±SDである。
【図１３Ｃ】βガラクトシダーゼ＋示された漸増量のpcDNA3/H-フェリチンで同時トランスフェクトしたマウス2F-2B細胞における細胞生存パーセントを説明する棒グラフである。pcDNA3またはpcDNA3/HO-1でトランスフェクトした細胞を対照として使用した。黒色の棒はTNF-αおよびAct.Dで処置したECを示す。灰色の棒はAct.Dで処置したECを表す。3つのうちの代表的な1つの実験を示す。示した全ての結果は2連のウェルの平均±SDである。
【図１４Ａ】虚血に曝露し（24時間、4℃、UW溶液）、そして同系の血液でエクスビボ灌流したSDラットから収集した肝臓における胆汁生成を説明する棒グラフである。胆汁生成をn＝4の平均±標準偏差として示す。120分での胆汁生成は、形質導入しなかった（p＜0.001）かまたはβガラクトシダーゼで形質導入した肝臓（p＜0.02）に対して、H-フェリチンで形質導入した肝臓において有意に高かったことに留意されたい。
【図１４Ｂ】Kaplan Mayer様式でのレシピエント生存を説明する棒グラフである。対照βガラクトシダーゼまたはH-フェリチンアデノウイルスで形質導入した肝臓を同系レシピエントに移植した。群あたり10匹の動物うちの8匹を分析した。形質導入しなかったかまたはβガラクトシダーゼ組換えアデノウイルスで形質導入した肝臓で移植したレシピエントと比較して、H-フェリチン組換えアデノウイルス形質導入された肝臓を受け取ったレシピエントにおける生存の延長が著明に増強された（p＜0.001）。
【図１４Ｃ】同系レシピエントに移植した、形質導入しなかった肝臓または対照βガラクトシダーゼもしくはH-フェリチンアデノウイルスで形質導入した肝臓におけるアポトーシスの一連の顕微鏡写真である。本明細書に記載するように移植後24時間にアポトーシスを検出した。アポトーシス細胞を黒色矢印で示す。倍率は100倍（a、c、e）または400倍（b、d、f）である。
【図１５】フェリチンの細胞保護作用に関するモデルの略図である。上パネル：対照；下パネル：組換えH-フェリチンアデノウイルスで形質導入した細胞。SOD：スーパーオキシドジスムターゼ。
【図１６】ドナー、レシピエント、または双方のCoPPでの処置の島移植生存に及ぼす影響を説明する線グラフである。
【図１７】ドナーおよびレシピエントのビリルビンまたはビリベルジンでの処置の島移植生存に及ぼす影響を説明する線グラフである。
【図１８】バルーン傷害後のラット頚動脈における新生内膜形成に及ぼすビリベルジンでの前処置の影響を説明する一対の顕微鏡写真である。
【図１９】ラットにおけるLPS誘導TNF-α生成に及ぼすビリベルジン前処置の影響を説明する棒グラフである。Ctl＝対照
【図２０】LPSで処置したラットの肺における好中球蓄積に及ぼすビリベルジン前処置の

影響を説明する棒グラフである。未処置対照ラットでは、200個の細胞中の200個がマクロファージであり、好中球は存在しない。
【図２１】LPSで処置したラットの肺におけるタンパク質蓄積に及ぼすビリベルジン前処置の影響を説明する棒グラフである。正常な基底レベルは約30である。
【図２２】LPSで処置したラットにおけるIL-10レベルに及ぼすビリベルジン前処置の影響を説明する棒グラフである。
【図２３】小腸移植モデルにおけるIL-6、IL-10、TNFαおよびIL-1βの各々のレベルに及ぼすビリベルジンでの処置の影響を説明する棒グラフである。リアルタイムRT-PCR分析により、手術しなかった動物と比較して、移植後4時間の移植片筋層におけるIL-6、IL-10、TNFαおよびIL-1bのmRNA発現の有意な増加が示された。COで処置したレシピエントでは、IL-6およびIL-1bのmRNAの平均発現が有意に低下したが、IL-10またはTNF-αでは低下しなかった。NM＝正常；BV＝ビリベルジン；SITx＝小腸移植
【図２４】小腸移植モデルにおけるCOX-2；iNOS；ICAM-1、およびMnSODの各々のレベルに及ぼすビリベルジンでの処置の影響を説明する棒グラフである。iNOSおよびCOX-2遺伝子発現は移植された腸の筋層において有意に上方制御された。BV処置により移植片筋層抽出物におけるiNOS、COX-2、ICAM-1、およびMnSOD mRNAの発現が有意に低下した。
【図２５】移植された小腸における収縮性応答に及ぼす漸増用量のベタネコールでの処置の影響を説明する線グラフである。対照動物（黒三角）およびBV処置を受けて手術していない動物（黒四角）に由来する空腸環状筋ストリップはベタネコールに応答して収縮面積の用量依存的増加を示した。この活性は移植後24時間に採取した移植片筋肉において有意に低下した（白三角）。BV処置した移植された動物において有意な改善が測定された（白四角）（各々N＝5）。
【図２６】小腸移植モデルにおける透過性および血流の各々に及ぼすビリベルジンでの処置の影響を説明する棒グラフである。
【図２７】小腸移植モデルにおける抗酸化能力に及ぼすビリベルジン処置の影響を説明する線グラフである。

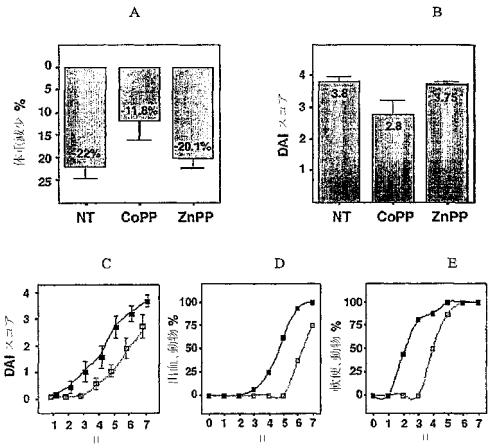
【図１】


A
0 1 4 7 日
HO-1
β-アクチン
B
HO-1/β-アクチン mRNA
C
0 1 4 7 日
HO-1
α-チューブリン

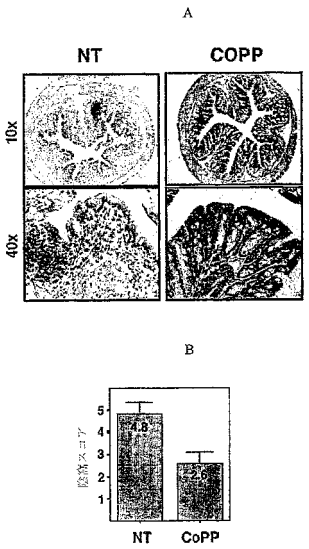
【図２】


A
0 1 4 7 日
HO-1
β-アクチン
B
HO-1/β-アクチン mRNA
日
C
0 1 4 7 日
HO-1
α-チューブリン

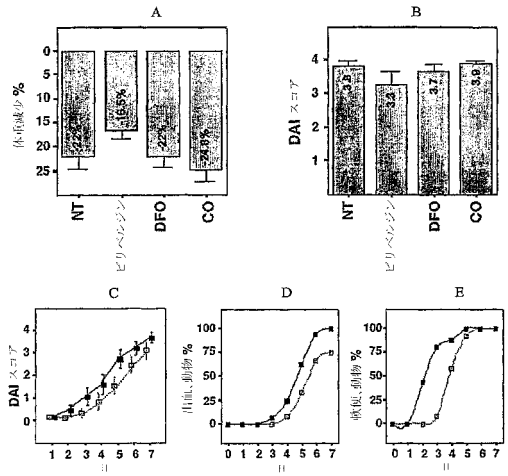
【図３】


A
体重減少 %
22%
11.8%
20.1%
NT CoPP ZnPP
B
DAI スコア
3.8
2.8
3.75
NT CoPP ZnPP
C
DAI スコア
D
出血、動物 %
E
嫉妬、動物 %
日

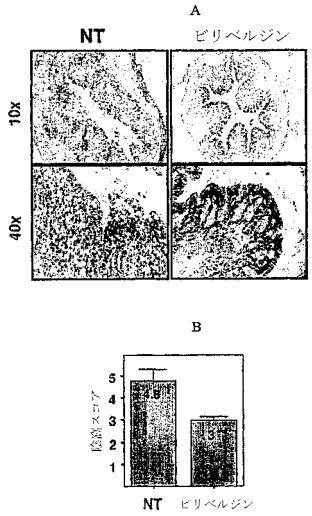
【図４】


A
NT COPP
10x
40x
B
臨床スコア
4.8
2.5
NT CoPP

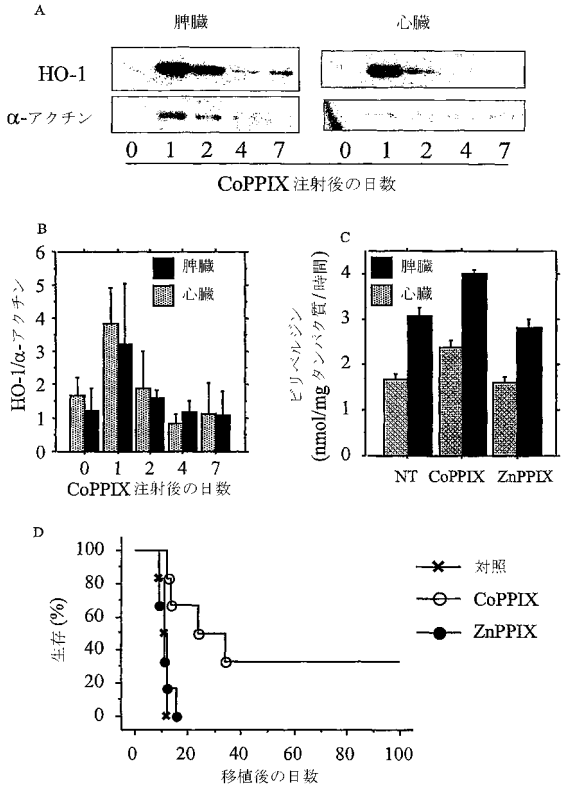
【図５】


A
体重減少 %
22%
18.5%
23%
24.0%
NT ピリベルジン DFO CO
B
DAI スコア
3.8
3.3
3.7
3.9
NT ピリベルジン DFO CO
C
DAI スコア
D
出血、動物 %
E
嫉妬、動物 %
日

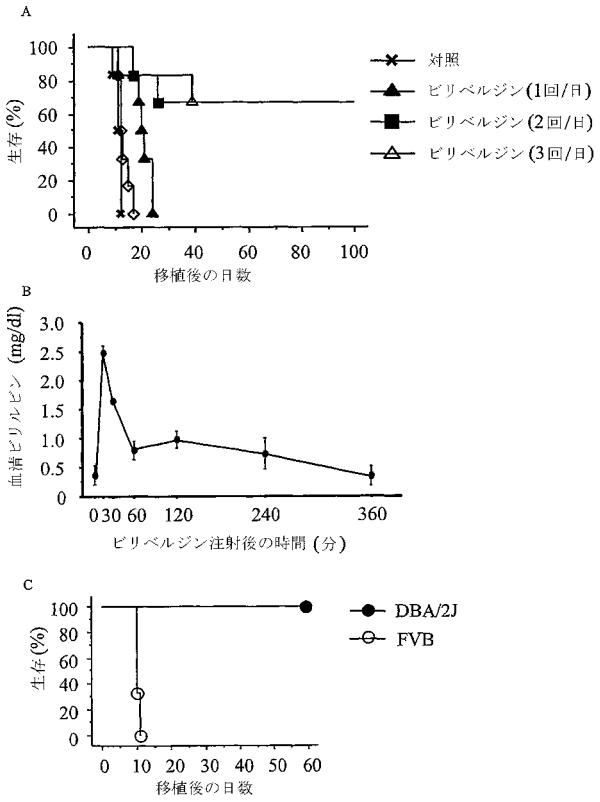
【図６】


A
NT
ビリベルジン
10x
40x
B
炎症スコア
NT
ビリベルジン

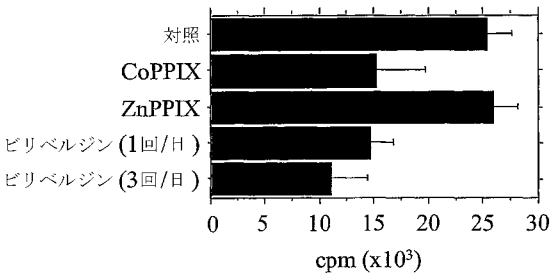
【図７】


A
脾臓
心臓
HO-1
α-アクチン
0 1 2 4 7 0 1 2 4 7
CoPPIX注射後の日数
B
HO-1/α-アクチン
脾臓
心臓
0 1 2 4 7
CoPPIX注射後の日数
C
ビリベルジン (nmol/mg タンパク質/時間)
脾臓
心臓
NT CoPPIX ZnPPIX
D
生存 (%)
対照
CoPPIX
ZnPPIX
移植後の日数

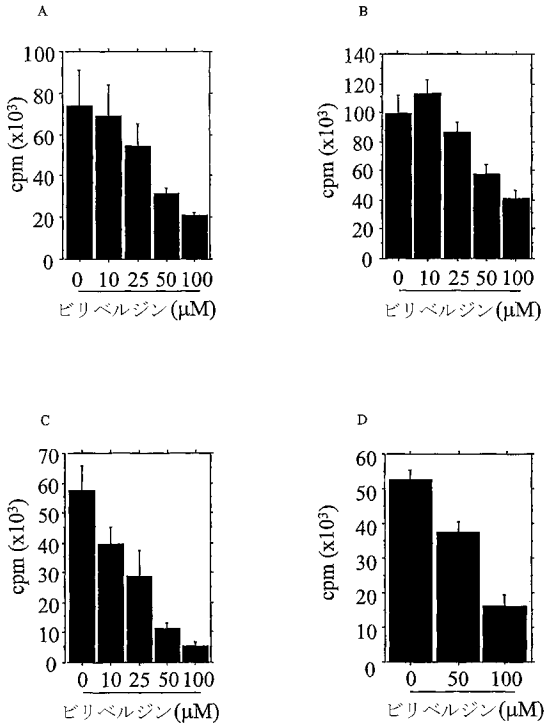
【図８】


A
生存 (%)
対照
ビリベルジン (1回/日)
ビリベルジン (2回/日)
ビリベルジン (3回/日)
移植後の日数
B
血清ビリルビン (mg/dl)
ビリベルジン注射後の時間 (分)
C
生存 (%)
DBA/2J
FVB
移植後の日数

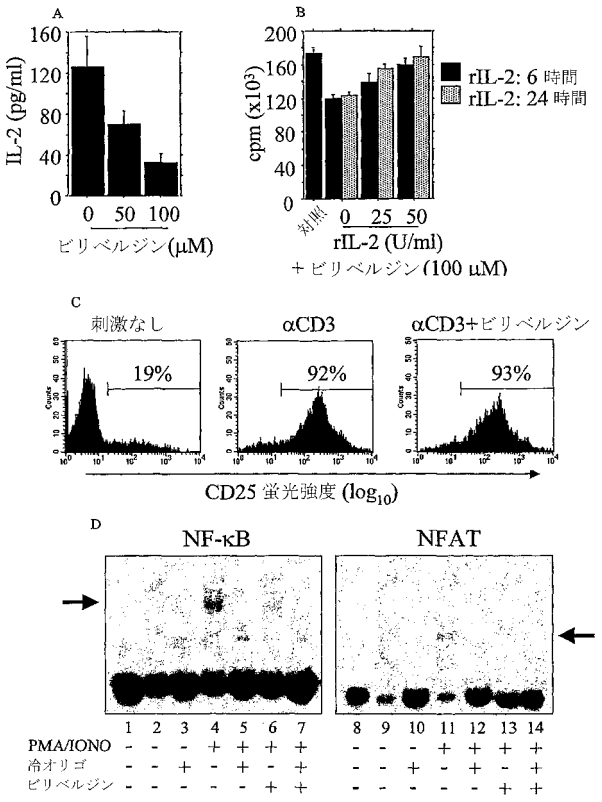
【図９】


対照
CoPPIX
ZnPPIX
ビリベルジン (1回/日)
ビリベルジン (3回/日)
cpm (x10³)

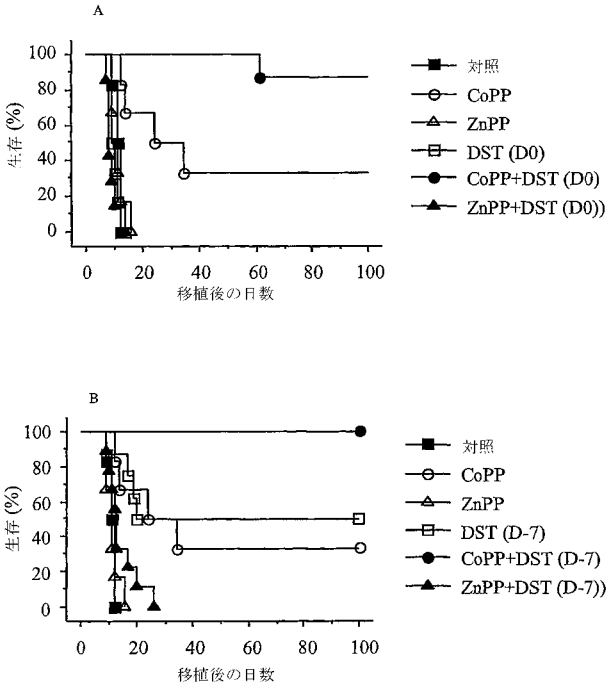
【図１０】



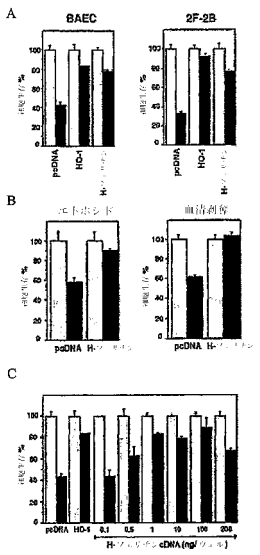
【図１１】



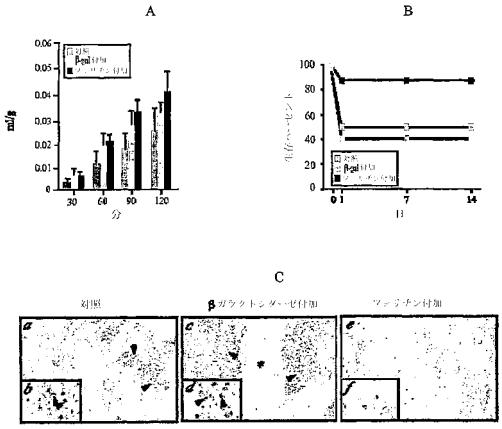
【図１２】



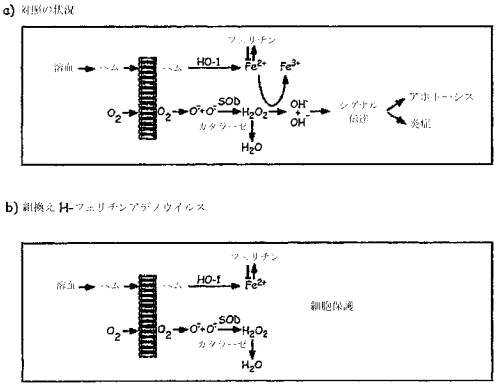
【図１３】



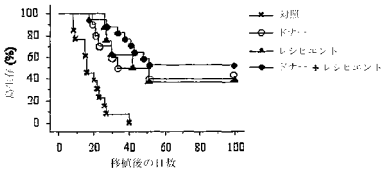
【図１４】



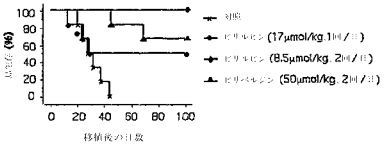
【図１５】



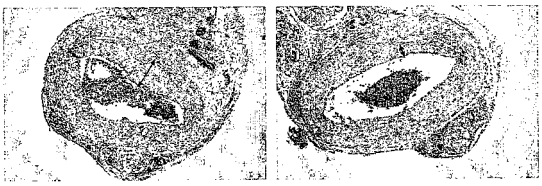
【図１６】



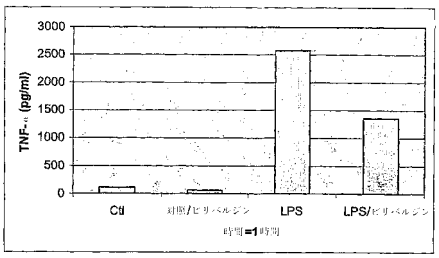
【図１７】



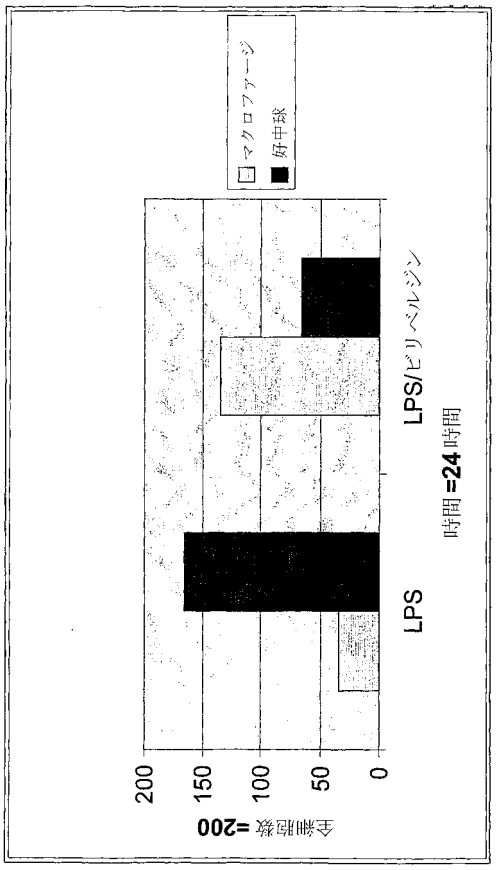
【図１８】



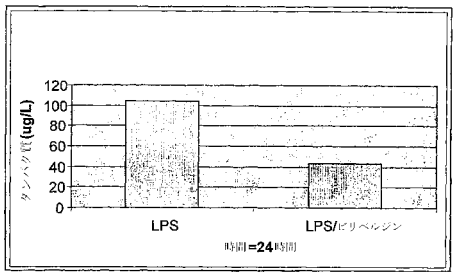
【図１９】



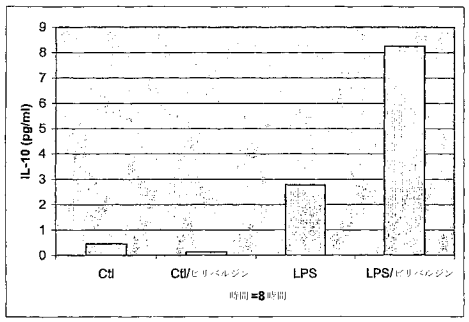
【図２０】



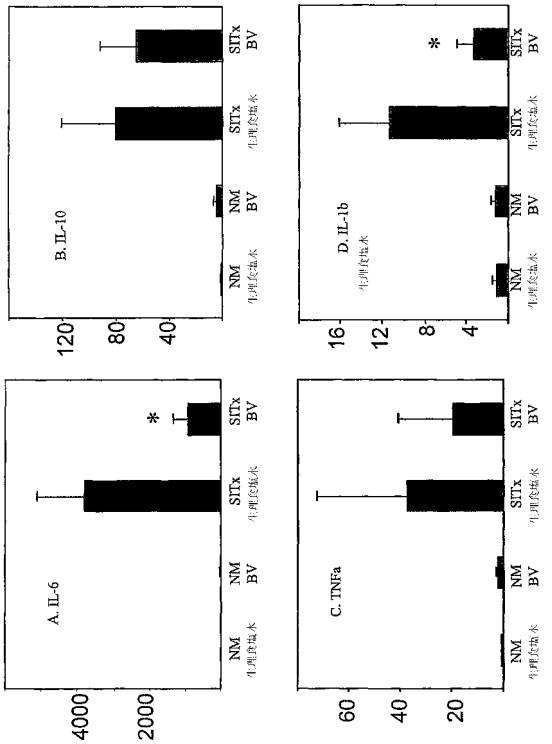
【図２１】



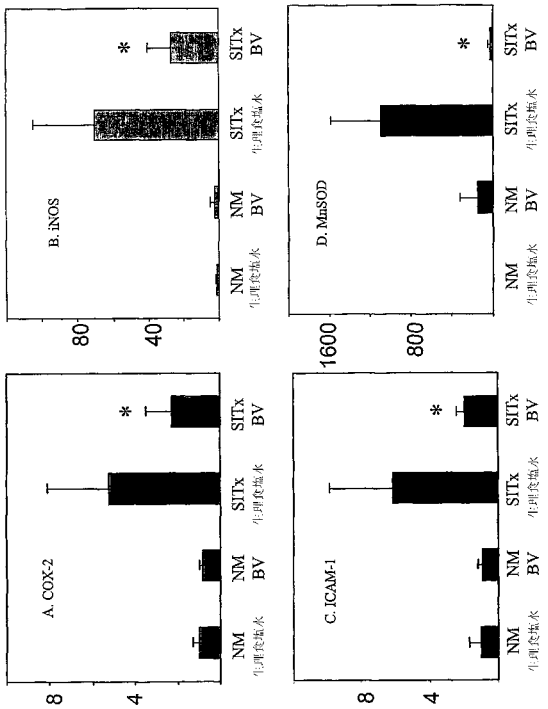
【図２２】



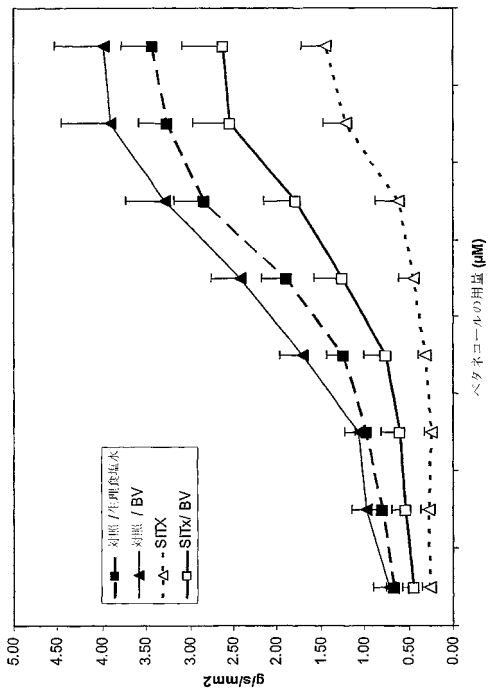
【図２３】



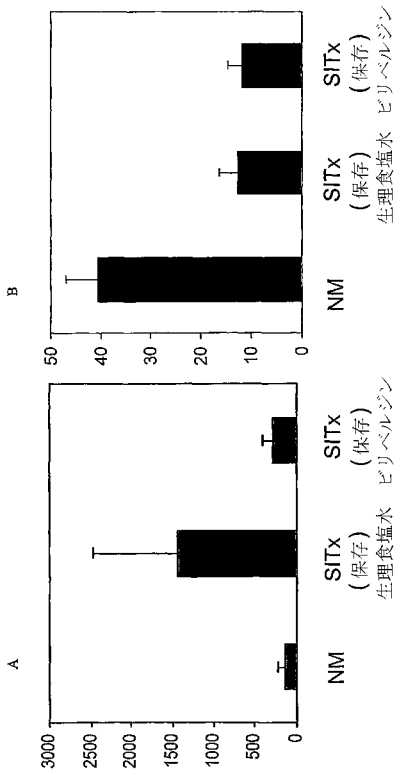
【図２４】



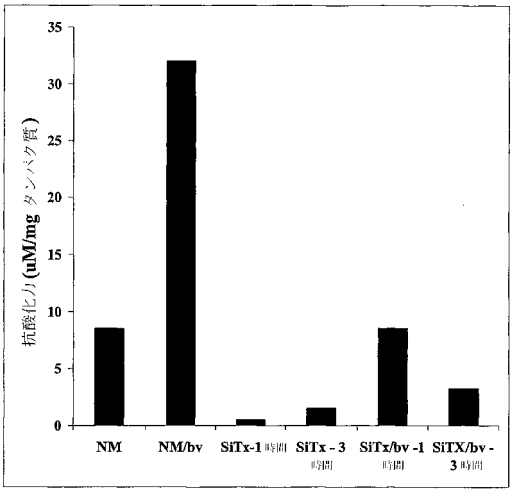
【図２５】



【図２６】


A
B
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
50
40
30
20
10
0
NM
SITx (保存) 生理食塩水
SITx (保存) ビリベルジン

【図２７】


抗酸化力 (uM/mg タンパク質)
35
30
25
20
15
10
5
0
NM
NM/bv
SiTx-1 時間
SiTx - 3 時間
SiTx/bv -1 時間
SiTX/bv - 3 時間

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/11411

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :A01N 37/18; C07K 1/00; G01N 33/53
US CL : 435/7.1; 514/2; 530/350
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/7.1; 514/2; 530/350

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
STN and WEST

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CARRAWAY ETAL, "Induction of Ferritin and Heme Oxygenase-1 by Endotoxin in the Lung", American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, volume 275, Issue 3, pages L583-L592, September 1998, see entire reference.	1-20
Y	OTTERBEIN ET AL, "Mechanism of Hemoglobin-iinduced Protection against Endotoxemia in Rats: A Ferritin-independent Pathway", American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, Volume 272, Issue 2, pages L268-L275, 1997, see the entire document.	1-20, 36-39

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
14 JULY 2003

Date of mailing of the international search report
12 AUG 2003

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
HOPE ROBINSON
Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/11411

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	Dabase Biosis, Biological Abstracts Inc., (USA), No. 2002:628846, "Heme Oxygenase-1 Systin In Organ Transplantation", Abstract, Katori et al, October 2002.	21-29
Y	Dabase Medline, US National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), No. 2001676797, "Adenovirus-mediated Heme Oxygenase-1 Gene Delivery Inhibits Injury-induced Vascular Neointima Formation", Abstract, Tulis et al., November 2001.	30-35
Y,P	Dabase Medline, US National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), No. 2002393530, "Effects of Normobari Hyperoxia in a Rat Model of Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion", Abstract, Singhal et al., July 2002.	36-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US08/11411

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 40 and 41
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 1/04	Ａ６１Ｐ 7/08	
Ａ６１Ｐ 1/16	Ａ６１Ｐ 9/04	
Ａ６１Ｐ 7/08	Ａ６１Ｐ 9/10	
Ａ６１Ｐ 9/04	Ａ６１Ｐ 9/14	
Ａ６１Ｐ 9/10	Ａ６１Ｐ 11/06	
Ａ６１Ｐ 9/14	Ａ６１Ｐ 13/12	
Ａ６１Ｐ 11/06	Ａ６１Ｐ 17/02	
Ａ６１Ｐ 13/12	Ａ６１Ｐ 19/02	
Ａ６１Ｐ 17/02	Ａ６１Ｐ 25/16	
Ａ６１Ｐ 19/02	Ａ６１Ｐ 25/28	
Ａ６１Ｐ 25/16	Ａ６１Ｐ 29/00	
Ａ６１Ｐ 25/28	Ａ６１Ｐ 29/00 １０１	
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 31/04	
Ａ６１Ｐ 31/04	Ａ６１Ｐ 31/12	
Ａ６１Ｐ 31/12	Ａ６１Ｐ 33/04	
Ａ６１Ｐ 33/04	Ａ６１Ｐ 33/10	
Ａ６１Ｐ 33/10	Ａ６１Ｐ 33/12	
Ａ６１Ｐ 33/12	Ａ６１Ｐ 37/06	
Ａ６１Ｐ 37/06	Ａ６１Ｋ 37/50	
	Ａ６１Ｋ 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ベルベラット パスカル オー.
ドイツ連邦共和国 ヘイデルバーグ ハープトシュトラッセ １７１
(72)発明者 ロブソン シモン シー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウェストン グレン ロード ２５０

Ｆターム(参考) 4C084 AA02 BA22 BA23 BA33 DC23 NA14 ZA021 ZA161 ZA361 ZA381
ZA421 ZA441 ZA451 ZA591 ZA661 ZA751 ZA811 ZA891 ZA961 ZB081
ZB111 ZB151 ZB331 ZB351 ZB381 ZB391 ZC201
4C086 AA01 AA02 BC08 BC17 EA20 HA11 MA01 NA14 ZA02 ZA16
ZA36 ZA38 ZA40 ZA45 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96 ZB08
ZB11 ZB15 ZB33 ZB35 ZB38 ZB39