(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6925327号
(P6925327)

(45)発行日　令和3年8月25日(2021.8.25)　(24)登録日　令和3年8月5日(2021.8.5)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 38/06	(2006.01)	A61K	38/06
A61K 9/14	(2006.01)	A61K	9/14
A61K 9/48	(2006.01)	A61K	9/48
A61K 47/22	(2006.01)	A61K	47/22
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00

請求項の数 22　(全 78 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-517684(P2018-517684)
(86)(22)出願日　平成28年6月20日(2016.6.20)
(65)公表番号　特表2018-517781(P2018-517781A)
(43)公表日　平成30年7月5日(2018.7.5)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/038381
(87)国際公開番号　WO2016/205804
(87)国際公開日　平成28年12月22日(2016.12.22)
審査請求日　令和1年6月19日(2019.6.19)
(31)優先権主張番号　62/182,229
(32)優先日　平成27年6月19日(2015.6.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　517442650
モレキュラー　ディフェンシズ　コーポレイション
アメリカ合衆国　１００００５　ニューヨーク州　ニューヨーク　ウォール　ストリート　３０　ガブリエル　デルバージニア内
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】グルタチオン製剤およびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

粉末形態の少なくとも100mgの還元型グルタチオン；および

還元型グルタチオンに対して少なくとも50重量％の量で存在する、粉末形態の少なくとも50mgの結晶性アスコルビン酸

を含み、

該還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸の各々が、約25℃以下の温度で、20％以下の相対湿度を有する気体中で平衡化されており；かつ

該平衡化された還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸が、乾燥気体中で還元型グルタチオン粒子および結晶性アスコルビン酸粒子の摩擦帯電および相互の静電的結合を有する均質な混合物を得るために、乾燥気体フラッシュ（flush）下で混合されている、

薬学的に許容されるグルタチオン製剤。

【請求項２】

少なくとも250mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも125mgの結晶性アスコルビン酸を含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項３】

少なくとも500mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも250mgの結晶性アスコルビン酸を含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項４】

還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸が、乾燥窒素フラッシュを含む乾燥気体フラッシュ下で混合された、請求項1に記載の製剤。

【請求項５】

還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸が、乾燥無酸素フラッシュを含む乾燥気体フラッシュ下で混合された、請求項1に記載の製剤。

【請求項６】

少なくとも95重量％の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸を含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項７】

少なくとも75重量％の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸を含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項８】

本質的に、カプセル中の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸からなる、請求項1に記載の製剤。

【請求項９】

本質的に、共通のカプセル中の還元型グルタチオン、結晶性アスコルビン酸、および追加の活性成分からなる、請求項1に記載の製剤。

【請求項１０】

約25℃以下の温度で、20％以下の相対湿度の空気で平衡化された粒子状形態の還元型グルタチオンを提供する工程;

約25℃以下の温度で、20％以下の相対湿度の空気で平衡化された粒子状形態の結晶性アスコルビン酸を提供する工程;

還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸の摩擦帯電を達成するために、乾燥気体フラッシュ下で、還元型グルタチオンと、結晶性アスコルビン酸粉末が還元型グルタチオンに対して少なくとも50重量％の量で存在する結晶性アスコルビン酸とのバルク量を混合する工程であって、還元型グルタチオンの粒子が結晶性アスコルビン酸の粒子と静電的に結合して中和された正味電荷を有する均質な混合物を形成する、前記工程; ならびに

該均質な混合物を無酸素乾燥気体フラッシュ下で包装する工程

を含む、薬学的グルタチオンを製剤化する方法。

【請求項１１】

前記混合物が、少なくとも100mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも50mgの結晶性アスコルビン酸を含むパッケージに包装される、請求項10に記載の方法。

【請求項１２】

前記パッケージが、単位剤形カプセルを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項１３】

前記カプセル中に、約100～500mgの還元型グルタチオンおよび約50～250mgの結晶性アスコルビン酸を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項１４】

前記カプセル中に、少なくとも500mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも250mgの結晶性アスコルビン酸を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項１５】

前記乾燥気体フラッシュが窒素フラッシュを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項１６】

前記均質な混合物が、少なくとも95重量％の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項１７】

少なくとも100mgの粒子状還元型グルタチオンおよび還元型グルタチオンに対して少なくとも50重量％の量で存在する少なくとも50mgの粒子状アスコルビン酸を、

還元型グルタチオンとアスコルビン酸との比率が約10～50重量％である、還元型グルタチオンとアスコルビン酸との静電的に結合した均質な混合物を少なくとも250mg含むよう

に適合されたカプセルで提供する工程
を含み、
該還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸の各々が、約25℃未満の温度で、20％以下の相対湿度で混合する前に平衡化されており；かつ
該平衡化された還元型グルタチオンおよびアスコルビン酸が、乾燥窒素下で包装された、還元型グルタチオンとアスコルビン酸粒子との静電的結合を伴う均質な摩擦帯電混合物を得るために、乾燥気体フラッシュ下で混合されている、
単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤を形成する方法。
【請求項１８】
前記製剤が、約250～500mgの還元型グルタチオンおよび約125～250mgの結晶性アスコルビン酸を含み、実質的に酸化剤成分を含まない、請求項17に記載の単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤を形成する方法。
【請求項１９】
前記製剤が、チオール臭気を実質的に伴わずにヒトに提供される、請求項17に記載の単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤を形成する方法。
【請求項２０】
前記製剤が、抗ウイルス剤、抗生物質剤、高血糖剤、抗酸化剤、酸化促進剤、抗毒素剤、一酸化窒素前駆体、プロスタグランジン前駆体、抗炎症剤、および免疫調節剤のうちの少なくとも1つをさらに含む、請求項17に記載の単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤を形成する方法。
【請求項２１】
還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸が、乾燥窒素フラッシュ下で混合される、請求項17に記載の単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤を形成する方法。
【請求項２２】
還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸が、乾燥無酸素フラッシュ下で混合される、請求項17に記載の単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤を形成する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、様々な疾患の治療および/または予防のためのグルタチオンの使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
遍在性のトリペプチドL-グルタチオン（GSH）（γ-グルタミル-システイニル-グリシン）は、よく知られている生物学的抗酸化物質であり、実際には高等生物にとって主要な細胞内抗酸化物質であると考えられている。酸化されると、二量体（GSSG）を形成し、これはグルタチオンレダクターゼを有する器官でリサイクルされ得る。グルタチオンは、ナトリウム依存性グルタミン酸ポンプによって膜を通じて輸送され得る。Tanuguchi, N., et al. Eds., Glutathione Centennial, Academic Press, New York (1989)。グルタチオンは、酵母細胞、植物の生命および動物を含む、自然界に広く分布している。それは、ヒトにおいて2つの異なる酵素によって同じように作られ、これはグルタチオンの性質を理解することに関連する（12）。
【０００３】
GSHは、数千の生命体にわたって、2つの酵素によって同じ様に「湾曲させられて」おり、その重要なチオールを特異的に配置させるように長い間進化してきた。比較のために、システインのチオール単独では、過度に露出していて過剰に反応し、ホモシステインのチオールではなおさらそうであり、ホモシステイン血症において内皮を破壊する高度に破壊

的な硫黄ラジカルを生成する。N-アセチルシステイン（NAC）は、経口で摂取した場合、胃の中でN-アセチルを失い、それによってヒトにおいて無制御の酸化および様々な毒性をもたらす。

【０００４】

GSHの特性は、その制御された反応性、生理学的に好ましいレドックス電位を維持する能力、全ての細胞内コンパートメントにおけるその抗酸化特性、細胞膜およびミトコンドリア上の活動的なグルタチオントランスポーターの存在、およびこれらの特性が以下の酵素によって支持されるという事実に由来する：（i）GSHを合成する酵素；（ii）GSHペルオキシダーゼおよびS-トランスフェラーゼなどの、特定の特性を増幅する酵素；および（iii）GSHレダクターゼなどの、GSHが使用された後にGSHを回復する酵素。フェロトーシスと呼ばれる過程におけるグルタチオンペルオキシダーゼ4（GPX4）の活性の損失は、脂質ベースの活性酸素種（ROS）、特に脂質ヒドロペルオキシドの蓄積をもたらす。

【０００５】

GSHは、タンパク質とDNAの合成、輸送、酵素活性、代謝、およびフリーラジカル媒介性損傷からの細胞の保護を含む、多くの重要な生物学的現象において直接的または間接的に機能する。GSHは、身体内の適切な酸化状態を維持する主要な細胞性抗酸化物質の1つである。GSHはほとんどの細胞によって合成され、食事中にも供給される。GSHは、酸化された生体分子をそれらの活性な還元型にリサイクルすることが示されている。還元型GSHおよび酸化型GSHの相互変換を制御するためのメカニズムが存在するため、例えば、生物へGSHを投与すると、還元型GSHのレベルの改変により、生物の細胞はより低いレドックス電位にシフトする傾向がある。同様に、生物を酸化ストレスまたはフリーラジカルに曝すことにより、細胞はより酸化された電位にシフトする傾向がある。特定の細胞プロセスがレドックス電位に応答することはよく知られている。還元型GSHは、ヒトの成人において、主に肝臓によって、そしてより少ない程度に骨格筋、赤血球、および白血球によって、酸化型GSSGから生じる。毎日産生される8～10グラムのグルタチオンの約80％が肝臓によるものであり、血流を介して他の組織に分配される。

【０００６】

細胞中のGSHの欠乏は、高分子の分解、脂質過酸化、毒素の蓄積、そして最終的には細胞死を引き起こす過剰のフリーラジカルをもたらす可能性がある。この細胞酸化を防止するのにGSHが重要であることから、GSHは組織に連続的に供給される。しかし、ある条件下では、GSHの正常な生理学的供給は不十分であり、分布が不十分であるかまたは局所的な酸化的要求が細胞の酸化を防止するには高すぎる。ある条件下では、GSHの産生と需要がマッチしておらず、生物レベル上、十分なレベルには至っていない。他の場合では、ある組織または生物学的プロセスは、細胞内レベルが抑制されるようにGSHを消費する。いずれの場合も、GSHの血清レベルを増加させることにより、増加した量を細胞に指向させることができる。細胞取り込みが促進された輸送系では、取り込みを促進する濃度勾配が増加する。

【０００７】

すべての栄養素と同様に、栄養素を摂食または経口摂取することは、その体内レベルを増加させるための望ましい方法であると一般に考えられる。したがって、経口GSH処置での試みが知られていた。本発明者による以前の研究は、空腹時の経口投与による有効な投与を実証している。米国特許第6,159,500号、および参照により各々が本明細書に明確に組み込まれる以下を参照されたい：第9,308,234号；第9,062,086号；第9,040,082号；第8,911,724号；第8,592,392号；第8,361,512号；第8,349,359号；第8,252,325号；第8,147,869号；第8,114,913号；第7,951,847号；第7,709,460号；RE40,849号；第7,449,546号；第7,449,451号；第7,378,387号；RE39,705号；第7,078,064号；第6,896,899号；第6,835,811号；第6,586,404号；第6,423,687号；第6,350,467号；第6,262,019号；第6,204,248号；第6,197,749号；第6,159,500号；第9,265,808号；第9,229,014号；第9,149,451号；第9,144,570号；第8,981,139号；第8,950,583号；第8,734,316号；第8,709,406号；第8,679,530号；第8,602,961号；第8,591,876号；第8,575,218号；第8,518,869号；第8,507,219号

; 第8,501,700号; 第8,435,574号; 第8,426,368号; 第8,303,949号; 第8,221,805号; 第8,217,084号; 第8,217,006号; 第8,178,516号; 第8,093,207号; 第8,067,537号; 第7,923,045号; 第7,763,649号; 第7,723,327号; 第7,691,901号; 第7,615,535号; 第7,592,449号; 第7,579,026号; 第7,521,584号; 第7,407,986号; 第7,396,659号; 第7,384,655号; 第7,375,133号; 第7,371,411号; 第7,345,091号; 第7,320,997号; 第7,317,008号; 第7,279,301号; 第7,241,461号; 第7,238,814号; 第7,179,791号; 第7,169,412号; 第7,145,025号; 第7,094,550号; 第7,049,058号; 第7,045,292号; 第6,949,382号; 第6,896,899号; 第6,764,693号; 第6,709,835号; 第6,596,762号; 第6,586,404号; 第6,511,800号; 第6,444,221号; 第6,423,687号; 第6,395,494号; 第6,350,467号; 第6,346,547号; 第6,312,734号; 第6,262,079号; 第6,251,920号; 第6,204,248号; 第6,197,789号; 第6,166,090号; 第6,159,500号; 第6,069,167号; 第5,847,007号; 第5,770,609号; 第5,595,722号; 第5,545,569号; 第5,326,757号; 第5,204,114号; 第4,859,668号; 第20160082029号; 第20150283933号; 第2014027144号; 第2014019385号; 第2014014171号; 第20130317072号; 第20120244235号; 第20110151030号; 第20110129523号; 第20100291196号; 第20090311350号; 第20090042822号; 第20080234380号; 第20070065497号; 第20070053970号; 第20070026090号; 第20070004035号; 第20060105972号; 第20060008544号; 第20060008543号; 第20050226942号; 第20050222046号; 第20050090553号; 第20040105894号; 第20040071770号; 第20030211491号; 第20030129262号; 第20020136763号; 第20020002136号; 第20140256760号; 第20140045874号; 第20120245343号; 第20160158308号; 第20160068904号; 第20150246018号; 第20150209316号; 第20150038577号; 第20150030668号; 第20140271923号; 第20140271816号; 第20140100283号; 第20130202681号; 第20130129815号; 第20120244212号; 第20120141608号; 第20120135068号; 第20120087994号; 第20120021073号; 第20110305752号; 第20110111002号; 第20110077194号; 第20100316700号; 第20100291196号; 第20100233297号; 第20100233193号; 第20100166846号; 第20100166796号; 第20090176715号; 第20090068253号; 第20070053970号; 第20060099244号; 第20050239886号; 第20050222046号; 第20050130905号; 第20050123628号; 第20040157783号; 第20040022873号; 第20020182585号; 第20020136763号; 第20010000784。www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm264131.pdfを参照されたい。

【０００８】

GSHの代謝

GSHの合成は、食事またはシステインから直接供給されるか、またはトランススルフレーション経路を介して間接的にメチオニンから供給されるシステインの利用可能性に依存する。GSH合成および代謝は、γ-グルタミン酸回路の酵素によって支配されている。GSHは、γ-グルタミルシステイニルシンテターゼ（反応1）およびGSHシンテターゼ（反応2）の連続作用によって細胞内で合成される。後者の酵素の作用は、GSHによってフィードバック阻害される。GSH（およびその酸化型GSSG）の分解は、SH含有アミノ酸、特定のジペプチド、およびGSH自体のようなアクセプターへのγ-グルタミル部分の転移を触媒するγ-グルタミルトランスペプチダーゼによって触媒される（反応3）。GSHの細胞ターンオーバーは、トランスペプチダーゼの大部分が見出される場である細胞膜を横切るGSHの形態でのその輸送に関連する。この輸送中、GSHはγ-グルタミルトランスフェラーゼ（トランスペプチダーゼとしても知られている）と相互作用して、細胞内に輸送されるγ-グルタミルアミノ酸を形成する。細胞内γ-グルタミルアミノ酸は、これらの化合物を対応するアミノ酸および5-オキソ-L-プロリンに変換するγ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ（反応4）の基質である。5-L-オキソプロリンのL-グルタミン酸へのATP依存性変換は、細胞内酵素である5-オキソ-プロリナーゼによって触媒される（反応5）。トランスペプチダーゼ反応で形成されたシステイニルグリシンは、ジペプチダーゼによって分解される（反応6）。これらの6つの反応は、GSHの合成および酵素分解を担うγ-グルタミン酸回路を構成する。

【０００９】

この回路の酵素のうちの2つは、GSHとある求電子化合物との反応によって非酵素的に、

またはGSHS-トランスフェラーゼによって形成され得るS置換GSH誘導体の代謝においても機能する（反応7）。このようなコンジュゲートのγ-グルタミル部分は、γ-グルタミルトランスペプチダーゼの作用（反応3）、γ-グルタミルアミノ酸形成によって促進される反応によって除去される。得られたS-置換システイニルグリシンは、ジペプチダーゼ（反応6A）により切断されて対応するS-置換システインを生じる。このS-置換システインは、N-アセチル化（反応8）または追加のトランスペプチド化反応を経て対応するγ-グルタミル誘導体（反応3A）を形成し得る。

【００１０】

細胞内GSHは、H_2O_2および他の過酸化物の還元を触媒するセレン含有GSHペルオキシダーゼ（反応9）によって、酸化型の二量体形態（GSSG）に変換される。GSHもまた、トランス水素化によってGSSGに変換される（反応10）。GSSGからGSHへの還元は、NADPHを用いる広範に分布する酵素GSSGレダクターゼによって仲介される（反応11）。GSHからGSSGへの細胞外変換も報告されている。全反応はO_2を必要とし、H_2O_2の生成をもたらす（反応12）。GSSGは、GSHとフリーラジカルとの反応によっても形成される。GSH依存性抗酸化系は、GSHに加えてGSHペルオキシダーゼおよびGSHレダクターゼの2つの酵素からなる。この系が作動すると、GSHはその酸化型（GSSG）と還元型（GSH）の間を循環する。

【００１１】

不飽和脂肪酸を含む脂質の過酸化の間に形成される脂質ヒドロペルオキシドは、通常のGSHペルオキシダーゼではなく、リン脂質中の過酸化脂肪酸を処理するように特異的に設計された特別な酵素によって還元される。リン脂質ヒドロペルオキシドGSHペルオキシダーゼとして知られるこの酵素は、H_2O_2および脂質ヒドロペルオキシドの両方を、対応する水酸化物（それぞれ水および脂質水酸化物）に還元することができるタンパク質である。リン脂質ヒドロペルオキシドGSHペルオキシダーゼとは対照的に、通常のGSHペルオキシダーゼは、脂質ヒドロペルオキシドに作用することができない。

【００１２】

GSHの輸送

哺乳類細胞におけるGSHの細胞内レベルは0.5～10mMの範囲である一方、μM濃度は典型的に血漿中に見られる。細胞内GSHは、通常、99％以上が還元型形態（GSH）である。正常な健康な成人のヒト肝臓は毎日8～10グラムのGSHを合成する。通常、肝臓から血漿中へのGSHのかなりの流れがある。GSHの器官間の輸送に関与する主要な器官は、循環するGSHのクリアランスのための主要器官である肝臓および腎臓である。これは、正味血漿GSHターンオーバーの50～67％を占めると推定されている。数名の研究者は、腎臓を1回通過する間に、血漿GSHの80％またはそれより多くが抽出され、糸球体濾過によって担われ得る量を大幅に超えることを見出している。濾過されたGSHは、刷子縁酵素であるγ-グルタミルトランスフェラーゼおよびシステイニルグリシンジペプチダーゼの作用によって段階的に分解されるが、GSHの残りは、基底側膜に存在する無関係のNa+依存性の系を介して輸送されるようである。肝細胞から輸送されたGSHは、延性細胞のトランスペプチダーゼと相互作用し、小管内皮によって代謝物は実質的に再吸収される。ラットでは，
肝静脈および胆汁にそれぞれ約12nmol/g/分および4nmol/g/分のGSHが現れる。

【００１３】

GSHは、還元型GSH（GSH）、酸化型GSH（GSSG）、システインを有する混合ジスルフィド（CySSG）、およびSH結合を介したタンパク質結合型（GSSPr）の4つの形態で血漿中に存在する。GSH等価物の分布は、システインのそれとは大きく異なり、生理的濃度でGSHまたはシステインのいずれかを添加した場合、迅速な再分布が起こる。ラット血漿におけるGSH等価物の分布は、70.0％がタンパク質結合型であり、残りの30％は、28.0％のGSH、9.5％のGSSG、および62.6％のシステインを有する混合ジスルフィドに配分される。システイン等価物の分布は、23％がタンパク質結合型であり、残りの77％は、5.9％のシステイン、83.1％のシスチン、および10.8％のGSHを含む混合ジスルフィドとして分布していることが見出された。血漿チオールおよびジスルフィドは平衡状態ではないが、これらの代謝の器官間期の間、これらの化合物を組織間で輸送することによって部分的に維持されてい

る定常状態にあるようである。大量のタンパク質結合型GSHおよびシステインは、GSHおよびシステインの一過性変化の分析において考慮されなければならない実質的な緩衝作用を提供する。この緩衝作用は、血漿タンパク質および細胞膜タンパク質の構造および活性に影響を与える可能性のある、一時的なチオール-ジスルフィドレドックス変化を防ぐことができる。赤血球において、GSHは、ヘモグロビンのならびに酵素および膜タンパク質の天然の構造を維持する反応に関与している。GSHは血漿中の1000倍のレベルで赤血球中に存在する。これは、赤血球のO_2処理の必然的な副産物である毒性フリーラジカルに対する主要な低分子抗酸化防御剤として機能する。

【００１４】

GSHと免疫系

チオール、特にGSHは、リンパ球機能にとって重要である。混合リンパ球反応、T細胞増殖、T細胞分化およびB細胞分化、細胞傷害性T細胞活性、ならびにナチュラルキラー細胞活性には、十分な濃度のGSHが必要である。適切なGSHレベルは、好中球における微小管重合に必要であることが示されている。腹腔内投与されたGSHは、マウスにおいて細胞傷害性Tリンパ球の活性化を増強し、食餌性GSHは、老化マウスにおけるGSHの脾臓状態を改善し、T細胞媒介免疫応答を増強することが見出された。

【００１５】

マクロファージの存在は、それらの近傍の活性化リンパ球の細胞内GSHレベルの実質的な増加を引き起こし得る。マクロファージは、強力な膜輸送系を介してシスチンを消費し、マクロファージが細胞外空間に放出する大量のシステインを生成する。マクロファージGSHレベル（したがってシステイン同等物）は、外因性GSHによって増強され得ることが実証されている。T細胞はそれ自身のシステインを産生することができず、T細胞はそれをGSH合成の律速前駆体として必要とする。分裂促進刺激をされたリンパ球における細胞内GSHレベルおよびDNA合成活性は、外因性システインによって強く増加するが、シスチンによっては増加しない。T細胞において、シスチンの膜輸送活性はシステインのものよりも10倍低い。その結果、T細胞は、健康な生理学的条件下でさえ、システイン供給のベースラインが低い。マクロファージのシステイン供給機能は、T細胞がGSH欠乏状態からGSHに富んだ状態に移行することを可能にする機構の重要な部分である。

【００１６】

T細胞の活性化のための細胞内GSH濃度の重要性は十分に確立されている。T細胞におけるGSHレベルは、GSHによる処置後に上昇することが報告されている。この増加がそのままのGSHの取り込みによるものか、または細胞外分解、分解産物の輸送、およびその後の細胞内GSH合成によるものかは不明である。GSHを10～40％減少させると、インビトロでT細胞活性化を完全に阻害することができる。細胞内GSHを枯渇させると、応答の初期段階における分裂促進刺激性の核サイズ変換を阻害することが示されている。システインおよびGSH枯渇はまた、同種異系混合リンパ球培養の後期における循環T細胞クローンおよび活性化細胞傷害性Tリンパ球前駆細胞などの活性化T細胞の機能に影響を及ぼす。IL-2依存性T細胞クローンにおけるDNA合成およびタンパク質合成、ならびに前活性化されたCTL前駆細胞の継続的な増殖および/またはそれらの細胞傷害性エフェクター細胞への機能的分化は、GSH枯渇に対する感受性が強い。

【００１７】

インビボでのマウス細胞傷害性Tリンパ球の生理活性の活性化は、後期の腹腔内（i.p.）GSHによって増大するが、応答の初期段階では増加しないことが見出された。免疫化後3日目のGSHの注射は、細胞傷害活性の5倍増加を媒介した。高齢ラットにおける脾細胞のコンカナバリンA刺激性の増殖が維持されることによって示されるように、食餌性GSHの補給は、ラットにおける免疫応答の加齢に伴う低下を回復させる可能性がある。

【００１８】

GSH状態は、酸化的損傷からの保護の主要な決定要因である。GSHは、一方でGSHペルオキシダーゼによって触媒される反応において過酸化水素および有機ヒドロペルオキシドを還元することによって作用し、他方で、酸化ストレスを誘発することができる求電子性の

生体異物中間体と結合することによって作用する。腎臓が毒素および廃棄物の排出において機能し、腎尿細管の上皮が種々の毒性化合物に曝されるためであろうが、腎尿細管の上皮細胞は、GSH濃度が高い。GSHは、細胞外培地から細胞に輸送され、腸および肺由来の単離された細胞を、t-ブチルヒドロペルオキシド、メナジオン、またはパラコート誘発毒性から実質的に保護する。単離された腎細胞はまた、GSHを輸送し、これはGSHの内因性合成を補って、酸化的損傷からの保護を可能にする。肝臓のGSH含量はまた、外因性GSHの存在下で、実際には倍増すると報告されている。これは、腸細胞および肺胞細胞について報告されているように、直接輸送に起因するか、あるいは細胞外分解、輸送、および細胞内再合成に起因する可能性がある。

【００１９】

GSHのシステイン部分の求核性の硫黄原子は、毒性求電子剤によって誘導される有害な影響から細胞を保護するための機構として働く。GSH Sコンジュゲート生合成が薬物および化学的解毒の重要なメカニズムであるという概念は十分に確立されている。基質のGSHコンジュゲーションは、一般に、GSHおよびGSH-S-トランスフェラーゼ活性の両方を必要とする。特異的であるが重複する基質特異性を有する複数のGSH-S-トランスフェラーゼの存在は、酵素系が広範囲の化合物を処理することを可能にする。

【００２０】

いくつかのクラスの化合物は、GSHコンジュゲート形成によって毒性代謝物に変換されると考えられている。ハロゲン化アルケン、ヒドロキノンおよびキノンは、GSHを有するS-コンジュゲートの形成を介して毒性代謝物を形成することが示されている。腎臓は、この経路によって代謝される化合物の主要標的器官である。腎臓への選択的毒性は、近位尿細管細胞におけるS-コンジュゲートのプロセシングにより形成される中間体を蓄積し、これらの中間体を毒性代謝物に生物活性化する能力が腎臓にあることの結果である。

【００２１】

モルヒネおよび関連化合物をラットおよびマウスへ投与すると、肝臓GSHは最大で約50％喪失する。モルヒネはモルフィノンに生体内変換されることが知られている。モルフィノンは肝毒性の高い化合物であり、モルヒネ6-デヒドロゲナーゼ活性により、マウスにおいて皮下注射によるモルヒネと比べて9倍毒性が高い。モルフィノンは、α、β-不飽和ケトンを有し、これによりGSH S-コンジュゲートを形成することができる。このコンジュゲートの形成は、細胞GSHの消失と相関する。この経路は、モルヒネの主要な解毒プロセスを表している。GSHによる前処置はマウスにおいてモルヒネ誘導性の致死を防ぐ。

【００２２】

マウス神経芽腫細胞に対するメチル水銀の有害な影響は、GSHの共投与によって大部分が防止される。GSHはメチル水銀と複合体を形成し、細胞への輸送を防ぎ、細胞の抗酸化能力を高めて細胞の損傷を防ぐ。メチル水銀は、チューブリンSHの酸化を介しておよび過酸化傷害による変化によって、細胞微小管に有害な作用を及ぼすと考えられている。GSHはまた、ニッケルやカドミウムなどの他の重金属による中毒からも保護する。

【００２３】

GSHは、腎臓の解毒における役割が知られ、かつその毒性が低いことから、シスプラチンなどの腎毒性物質による癌化学療法を受ける患者用の、全身毒性を軽減するための補助療法として検討されてきた。ある研究では、シクロホスファミドの投与の直前および後に、2500mgの2回の分割用量で、進行性の腫瘍性疾患の患者にGSHを静脈内投与した。GSHは耐容性が高く予期せぬ毒性を生じなかった。極わずかな血尿を含む膀胱の損傷がないことにより、この化合物の保護的役割が支持される。他の研究は、シスプラチンおよび/またはシクロホスファミド併用療法との静脈内GSH同時投与は、関連する腎毒性を低下させるが、これらの薬物の所望の細胞毒性効果を過度に妨げないことを示した。

【００２４】

GSHは、アルカリ性環境または酸化的環境では比較的不安定であり、胃に吸収されない。GSHは、経口投与後、吸収されるとしても十二指腸の後半部および空腸初部において吸収されると考えられている。また、経口投与されたGSHは胃で分解される傾向があり、特

に十二指腸に存在する脱硫酵素およびペプチダーゼによってアルカリ条件下で分解されると考えられていた。GSHは分解され、アミノ酸として輸送され、細胞内で再合成され得るが、GSHが分解することなく細胞内に輸送される状況もあり得る。実際、システインまたはシステイン前駆体の投与は、このプロセスを妨害し得る。

【００２５】

純粋なGSHは摩擦電気効果により静電荷を保持する薄片状の粉末を形成し、処理および製剤化を困難にする。粉末粒子はまた、エレクトレットに類似した静電分極を有し得る。GSHは強力な還元剤であるため、酸素または他の酸化剤の存在下で自己酸化が起こる。米国特許第5,204,114号は、高速装置に干渉する摩擦電気効果を減少させ、GSHを還元状態に維持する添加剤として結晶性アスコルビン酸を使用することによりGSH錠剤およびカプセルの製造方法を提供する。このGSHはよく吸収され、経口摂取後0.5時間以内に末梢血単核細胞（PBMC's）に分布する。ある結晶性アスコルビン酸は、米国特許第4,454,125号にも開示されている。この結晶形は機械用潤滑剤として有用である。アスコルビン酸には耐容性があり、抗酸化性で、GSHの正味の静電荷を減少させるという利点がある。

【００２６】

いくつかの疾患状態は、GSHレベルの低下に特異的に関連している。特定の器官における局所的な、または全身的なGSHレベルの低下は、臨床的に定義された多くの疾患および病状に関連している。これらには、HIV/AIDS、糖尿病、黄斑変性症が含まれ、これらはいずれも過度のフリーラジカル反応およびGSH不足により進行する。心不全および血管形成術後の冠動脈再狭窄を含む他の慢性疾患はまた、GSH欠損と関連し得る。

【００２７】

臨床および前臨床試験により、様々なフリーラジカル障害と不十分なGSHレベルとの間の関連が実証されている。糖尿病の合併症は、細胞酵素の糖化を促進し、それによりGSH合成経路を不活性化する高血糖発作の結果であり得る。GSHの欠乏は糖尿病を発症させ、これによりこれらの患者における白内障、高血圧、閉塞性アテローム性動脈硬化症の罹患率、感染しやすさが説明される。

【００２８】

GSHは、発がん性求電子剤とのGSH Sコンジュゲートの形成、DNAとの反応の防止、ニッケル、鉛、カドミウム、水銀、バナジウム、マンガンなどの重金属とのキレート錯体の形成によって解毒剤として機能する。GSHはまた、アヘン剤などの様々な薬物の代謝において役割を果たす。これは、シスプラチンなどの腎毒性化学療法剤による治療に対する補助療法として使用されており、ドキソルビシン誘発性心筋症を防止することが報告されている。GSHはまた、2つの強力な肝毒素であるアセトアミノフェンおよびエタノールの解毒に重要な因子でもある。

【００２９】

GSHの薬物動態

静脈内投与されたGSHの薬物動態をラットにおいて測定し、2-コンパートメントオープンモデルを用いて解釈した。予測どおり、(i)GSH、（ii）酸化型GSH/GSSG、（iii）総チオール、および（iv）GSHを差し引いた可溶性チオールの動脈血漿濃度は、50～300mmol/kgのGSHのボーラス投与後に上昇し、その後すぐに非指数関数的に減少した。用量の増加に伴って、薬物排出および血漿クリアランスの速度定数は0.84mL/分から2.44mL/分へと増加し、排出段階の半減期は52.4分から11.4分に短縮した。組織中へのGSHの見かけの分布容積および浸透度は共に、用量の増加に伴って減少した（それぞれ3.78L/Kgから1.33L/Kgへおよびk_{12}/k_{21}として6.0から0.51へ）。このデータは、GSHが急速に排出されることを示している。これは、主に、組織抽出または体積分布の増加よりも、血漿中の急速な酸化によるものである。従って、血漿GSHレベルは、狭い生理学的限界内の濃度を身体が維持することができるように迅速に調節されるようである。

【００３０】

600mg GSHの単回用量をヒツジに静脈内投与した場合、静脈血漿および肺リンパ液におけるGSHレベルは一時的に上昇した。平均濃度は、静脈血漿については約50mMであり、30

分でピークに達し、45分後にベースラインに戻った。肺リンパ液のピークレベルは15分で約100mMであり、30分後にベースラインに戻った。平均上皮内層液（ELF）レベルは不定であったが、3時間の観察期間中ベースラインを超える有意な増加を示さなかった。尿排出は急速でピークレベルは15分であった。血漿および肺リンパ液の両方において、GSHは総GSH（GSH + GSSG）の95％以上を占めた。ELFでは、ベースラインGSHの75.4％が還元型であったが、尿中では59.6％がGSHとして存在した。

【００３１】

経口摂取された還元型GSHは、ラットモデルにおいて、小腸から、特に空腸上部において、そのまま吸収される。ラットの代謝はヒトとは異なることに留意されたい。したがって、ラットの試験の結果を当てはめる前にその結果を人で確認する必要がある。ラットにおける血漿GSH濃度は、液体ボーラス（30mM）として、またはAIN-70半合成食への混合（2.5～50mg/g）のいずれかでGSHを投与した後、15mMから30mMに増加した（11）。GSH濃度は、GSH投与後90-120分で最大になり、3時間以上高いままであった。GSHのアミノ酸前駆体の投与は、血漿GSH値にほとんどまたはまったく影響を及ぼさず、GSH異化および再合成は、観察されたGSH濃度の上昇を担うものではないことを示した。L-ブチオニン-[S、R]-スルホキシイミン（BSO）およびアシビシンによるGSH合成および分解の阻害から、上昇した血漿GSHは大部分が、GSH代謝物ではなくそのままのGSHの吸収に由来することが示された。血漿タンパク質に結合したGSHもGSH投与後に増加し、遊離血漿GSHで観察されたものと同様の経時変化を示した。したがって、食餌性GSHはそのまま吸収され、血漿GSHの実質的な増加をもたらす。

【００３２】

（i）48時間絶食したラット、（ii）GSH枯渇剤で処置したマウス、および（iii）パラセタモール（肝臓GSHの枯渇、その後の肝小葉壊死を促進する薬物）で処置したマウスにおいて、経口GSHの投与は肝臓GSHレベルを上昇させた。これらの実験では、動物に1000mg/kg体重のGSHを経口挿管した。48時間絶食ラットにおける処置前の平均値は、1gの新鮮な肝臓組織当たり3.0～3.1mmolであった。処置後の平均値は、処置後2.5時間、10時間、および24時間において、それぞれ1gの新鮮な肝臓組織当たり5.8、4.2、および7.0mmolであった。マウスにGSH（100mg/kg）を経口投与し、30、45、および60分における血漿中のGSH濃度、ならびに1時間後における肝臓、腎臓、心臓、肺、脳、小腸および皮膚でのGSH濃度を測定した。血漿中のGSH濃度は、経口GSH投与から30分以内に30mMから75mMに増加し、腸管腔から血漿へのGSHの急速な流入と一致した。肺を除いてほとんどの組織で同じ時間経過にわたって対照値を上回る増加は得られなかった。GSH合成阻害剤BSOで前処置したマウスは、GSHの組織濃度が実質的に低下し、これらの動物へGSHを経口投与すると、腎臓、心臓、肺、脳、小腸、および皮膚のGSH濃度が統計的に有意に増加したが、肝臓ではそうではなかった。

【００３３】

10名の健常ヒトボランティアにおいて、血漿および尿SHに対するGSHの動態および効果を調べた。2000mg/m^2のGSHを静脈内注入した後、血漿中の総GSHの濃度は、17.5±13.4mmol/リットル（平均±SD）から823±326mmol/リットルに増加した。外因性GSHの分布体積は176±107Ml/Kgであり、排出速度定数は0.063±0.027/分であり、これは14.1±9.2分の半減期に相当した。血漿中のシステインは、注入後に8.9±3.5mmol/リットルから114±45mmol/リットルに増加した。システインの増加にもかかわらず、総システイン（シスチン）（すなわちシステイン、シスチン、および混合ジスルフィド）の血漿濃度は減少し、血漿から細胞へのシステインの取り込みが増加することが示唆された。注入後90分で、GSHおよびシステイン（シスチン）の尿中排出は、それぞれ300倍および10倍増加した。

【００３４】

正常な健康なボランティアに、GSHを経口投与して、食餌性GSHが血漿GSHレベルを上昇させることができるかどうかを決定した。結果は、試験した5人の被験者のうち4人において、GSH（15mg/kg）の経口投与により、ヒトにおける血漿GSHレベルが基礎濃度を上回って1.5～10倍上昇し、平均値は正常血漿GSHレベルの3倍であることを示した。血漿GSHは、

経口投与後1時間で最大となり、3時間後に最大値の約1/2に低下した。等量のGSHアミノ酸成分は、GSHの血漿レベルを上昇させることができなかった。血漿タンパク質に結合したGSHも遊離GSHで見られるのと同じ時間経過で増加した。

【発明の概要】

【００３５】

薬剤GSHは、安全で、安定性であり、すぐに生物学的に利用可能であって、ウイルス感染、有害化学物質への曝露、および放射線中でのGSHの連続的な消失を補う。それは濃度依存性の4つの特性を発現するのに必要な細胞内レベルを維持する。GSH療法は、（1）天然痘からの回復に必要なTH1免疫学的応答をサポートするためのGSHの利用可能性を保証し、（2）累積性の組織毒性を引き起こすNF-κBおよび炎症カスケードの活性化および過剰発現を遅らせ、（3）細胞や組織の毒性を引き起こす反応性中間体を生化学的に中和し、（4）主要ウイルスタンパク質の活性を無効にし、複製を抑制し得る。結果として、HIV感染、他のポックスウイルスおよびC型肝炎のヒトおよび動物研究の例に示されるように、GSH療法は罹患率を低下させ得る。

【００３６】

GSHの一貫して正常な細胞内濃度は、Tヘルパー1および2（Th1およびTh2）免疫応答パターンのバランスを維持するのに役立つ。GSHが連続して失われた場合、回復GSH療法はTh1を急速にアップレギュレートし、回復に必要なIFNγおよび細胞性免疫を高める一方、急性ウイルス感染中に過剰発現された場合に不都合なTh2サイトカインであるIL-4をダウンレギュレートする。回復応答に必要とされるこの有益なGSHの効果は、ポックスウイルスを含む他の危険なウイルスに対しても実証されている。

【００３７】

一貫して正常なGSHの細胞内濃度は、細胞内での高い酸化還元電位を定め、これによりNFκB、TNFα、IL-1β、接着分子、シクロオキシゲナーゼ-2、マトリックスメタロプロテイナーゼ、および炎症カスケードの活性化および過剰発現が遅れるこのメカニズムは、ポックスウイルスを含む他の危険なウイルスに対しても実証されている。そのような反応を制御するのに役立つ能力は、テロ対策におけるGSHの潜在的用途を示している。

【００３８】

生化学的中和反応：（a）そうでなければ細胞膜脂質、タンパク質、および核酸を損傷し、細胞毒性および組織毒性をもたらす、ウイルス感染中に連続的に産生される活性酸素種（ROS）および活性窒素種（RNS）をGSHが中和する。（b）GSHは、過酸化水素、生体エネルギー障害、および累積性の組織毒性を増大する過度のアポトーシスプロセスからミトコンドリアを保護する。（c）GSHの一貫して正常な細胞内濃度が、アラキドン酸の非酵素的および酵素的酸化を制御するのを助ける。さもなければ、これらは組織を破壊するほど過剰な、脂質ヒドロペルオキシド（アルコキシラジカルLO●、およびヒドロキシル●OH）からの反応性中間体をもたらす。そのような反応を制御するのに役立つ能力は、テロ対策におけるGSHの潜在的な用途を示している。

【００３９】

HIVに対して使用される場合のGSHと同様に、チオール（-SH）部分は、感染の間に合成される熱力学的に不安定なウイルスタンパク質を無効にし得る、翻訳後タンパク質修飾を行うことができる。例えば、阻害され得る天然痘タンパク質は、ウイルス複製に関与するもの、例えば、コードされたウイルスDNAトポイソメラーゼ、および宿主免疫防御の回避に関与するものを含む。

【００４０】

4つの特性は、罹患率の減少、そしておそらく天然痘感染の死亡率の減少に関連するGSHの主要な臨床薬理を構成する。薬理は他の状況にも及ぶ。4つの特性への分類は、それらが強く相互に関連しているため、不明瞭な境界を有する。

【００４１】

樹状細胞、マクロファージおよびリンパ球における高い正常GSH濃度は、ウイルス感染からの回復に必要なTh1応答パターン（例えば、IL-12、IFNγ、および特異的細胞性免疫

）を急速にアップレギュレートし、Th2応答パターン(例えば、IL-4、IL-10、および体液性免疫)をダウンレギュレートする。Th1およびTh2の応答パターンは、バランスを保ち、タイミングを合わせて、制御されなければならない。天然痘のような急性ウイルス感染を最小限に抑え、急性ウイルス感染から回復するために、宿主は以下を必要とする：IL-12、制御されたIFNγ、特異的な細胞傷害性リンパ球、一酸化窒素（●NO）の産生増加を伴う誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の発現、効率的な抗原プロセッシングおよび提示、抗原プロセッシング細胞における十分なGSH濃度、ならびにTh2応答パターンのダウンレギュレーション。これらの因子は主要なTh1応答パターンであり、樹状細胞、マクロファージ、およびリンパ球のGSH濃度に依存する。ウイルス感染からの回復はTh1サイトカインを必要とするため、十分なGSHレベルのようにTh1応答にバランスを傾けることは有益であろう。ウイルスに感染し、かつ十分なGSHがない間、Th1およびTh2応答の間の相反する性質は、Th2優勢、IL-4レベルの上昇、およびTh1応答の低下をもたらす。臨床的な結果には、感染の長期化、重症度の増加、致死の可能性が含まれる。マクロファージおよび患者は、GSH濃度が低下すると特に危険にさらされる。例えば、AIDS患者では、肺マクロファージにおけるGSH欠乏は、通常はヒトの病原体ではない日和見微生物、例えば、ニューモシスティス・カリニ（Pneumocystis carinii）の自由な成長に関与する。HIV/AIDSは、GSHの減少による致命的な結果の「モデル」である。

【００４２】

例えば、ジカウイルス（ZIKV）、デング熱ウイルス（DENV）、エボラウイルス（EV）、黄熱病ウイルス（YFV）、西ナイルウイルス（WNV）、日本脳炎（JE）、セントルイス脳炎ウイルス、オムスク出血熱（OMF）、キャサヌール森林病（KFD）、マーレーバレー脳炎ウイルス、クンジンウイルス、ロシオウイルス(Rocio virus)、ダニ媒介性脳炎、跳躍病ウイルス、ポワッサンウイルスなどの、アルボウイルスの節足動物媒介性の伝染は、血液を吸う雌がヒトの皮膚にウイルスを注入する時に開始される。フラビウイルス科の他の多くのメンバーと同様に、ZIKVはヤブカ（Aedes）の蚊に刺された後伝染する。表皮ケラチノサイト、樹状細胞、またはニューロンなどの種々の細胞タイプは、フラビウイルスの標的であることが知られている。ZIKVによる感染後、線維芽細胞、ケラチノサイト、および未成熟樹状細胞（iDC）において、時間依存的にウイルス複製が観察され、感染24時間後にはかなりのパーセンテージの感染細胞が観察された一方、すべての細胞は感染性ビリオンを産生することができた。iDCおよびマクロファージで高度に発現されているDC-SIGNが、デング熱ウイルスによる付着および感染を可能にし、それによりウイルスの伝播を促進することが長年知られている。

【００４３】

TIMファミリーは、3つの受容体、TIM-1、TIM-3およびTIM-4から構成される。TIM-1はTh2細胞および上皮細胞によって発現されるが、Th1細胞は基本的にTIM-3を発現する。TIM-4の発現は、抗原提示細胞に限定される。TIM受容体は、ホスファチジルセリン（PtdSer）依存性のアポトーシス細胞貪食除去、または先天性のおよび適応免疫応答の調節のような、様々な役割を有する。TIM-1およびTIM-4発現は、DENV、WNVまたはYFVによる感染後に高度に調節される。感染におけるTIM-1受容体の重要性は、サイレンシング技術またはブロッキング抗体を用いて実証された。TAM受容体ファミリーは、免疫応答の調節に寄与するタンパク質チロシンキナーゼであるTYRO3、AXL、およびMER受容体から構成される。AXLおよびMERは広く発現されているが、TYRO3発現は主に中枢神経系で観察される。TAM受容体は、細胞系および初代ヒト細胞の両方において、DENV、WNVおよびYFVの侵入を媒介することが最近記載されている。

【００４４】

DC-SIGN、TYRO3、および特にAXLは、ヒト皮膚細胞におけるZIKVの侵入および複製において重要な役割を果たすことが最近示された。DENV感染について報告されたものとは対照的に、TIM-1およびTIM-4受容体は、TIMおよびTAMファミリーメンバー双方の協力的役割が観察されているものの、ヒト皮膚細胞におけるZIKVの侵入において重要な役割を果たしていないようである。

【００４５】
ウイルス感染に続いて、細胞は、ウイルスの拡散を制限するために、様々な抗ウイルス応答を備え、主な防御は先天性免疫応答および適応免疫応答からなる。初期応答は、I型インターフェロン（IFN）の産生によってもたらされる。ウイルスによって発現される病原体関連分子パターン（PAMP）の早期検出は、Toll様受容体（TLR）-ファミリーまたはRIG-I様受容体などのパターン認識受容体（PRR）によって感知され、媒介される。PAMPの検出に続いて、様々なシグナル伝達経路の誘発は、IFNの直接分泌を導くだけでなく、細胞の抗ウイルス状態を誘導するために統合される数百のインターフェロン活性化遺伝子（ISG）の発現を導く。DENVおよびWNV感染は、IFN 1型の産生およびISGの発現を導くこれらのウイルスに対する宿主防御におけるRIG-I、MDA5、およびTLR3センサーの重要な役割を示す大規模な研究の対象である。同様の様式で、ヒト線維芽細胞にZIKVを感染させると、RIG-1、MDA-5、およびTLR3ならびにISG群、ISG15、OAS2およびMX1の発現が誘導される。さらに、IFN I型遺伝子上のプロモーターに結合する転写因子であるIRF7の発現レベルの増加は、ZIKV感染線維芽細胞によるIFN-αおよびIFN-βの強力な誘導を裏付けている。さらに、ある種の炎症性ケモカイン、例えばCCL5の発現もまた、ZIKVに感染すると誘導される。AIM2とIL-1βの転写産物の発現の増加によって示されるように、インフラマソーム経路もまたZIKV感染後に活性化されているようである。

【００４６】
様々な細胞プロセスは、フラビウイルスによって乗っ取られ、細胞応答を回避し、ウイルス複製を促進し得る。感染直後に、宿主は、ウイルス感染を克服するために、IFNI型応答、アポトーシスおよびオートファジーの誘導を含む急速な先天性免疫応答を確立する。WNVは、検出を回避するかIFN遺伝子転写を阻害することができる。さらに、DENVおよびCHIKVのようないくつかのアルボウイルスは、それらの自己複製および伝播を促進するためにオートファジープロセスを妨害することができる。フラビウイルスは宿主細胞膜を再編成して、それらの複製のための適切な環境を作り、膜の主な供給源を小胞体とすることが知られている。これらの再編成は、小胞体ストレス応答（UPR）の活性化をもたらし、同時に感染細胞においてオートファジー経路を過剰発現させる。オートファゴソームとして知られている二重膜小胞は、細胞質要素、タンパク質、およびオルガネラの動員を可能にし、それらの分解を可能にする。オートファジーは、病原体に対する宿主免疫において、プラスにもまたマイナスにも作用し得る。最後のメカニズムでは、ウイルスはオートファジー経路を利用して複製を容易にする。

【００４７】
ZIKVに感染した線維芽細胞におけるオートファジーの最初の証拠は、感染した線維芽細胞における特徴的なオートファゴソーム様小胞の存在によって強調された。次に、感染した線維芽細胞におけるオートファジーの誘導は、細胞質微小管関連分子であるLC3の産生を増加させる。後者は、ウイルスエンベロープタンパク質と共局在化し、自己貪食液胞がウイルス複製部位であることを示唆した。感染中のオートファゴソーム形成の阻害剤の使用はウイルスコピー数を有意に減少させるが、オートファジーの誘導因子はウイルス複製を増加させ、オートファジーがZIKV免疫回避において主要な役割を果たすことができることを示している。オートファジーはGSHによって抑制され、これはウイルス増殖サイクルにおける意義のある治療的介入を提供する。Hamel Rら、“Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions, Microbes and Infection” (2016), dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.009を参照されたい。

【００４８】
Th1/Th2応答パターンに起因する即時T細胞活動以外にも、複数のさらなる物質の誘導に対するIFNγの作用は、天然痘のような重大なウイルス感染症に関連しており、例えば、（i）IFNγは、酸素フリーラジカルおよび脂質過酸化物とNOの無駄の多い危険な反応を防止するのに十分なGSHの保護下でiNOSおよび●NOの産生を促進し；（ii）IFNγは特異的ケモカインであるMigおよびCrg-2を誘導し；（iii）強力なシステインプロテアーゼであるカテプシンSを活性化し；ならびに（iv）効率的な抗原プロセシングおよび提示のために

、構成型プロテアソームから免疫プロテアソームへの転換を引き起こす。これらの4つはIFNγ依存性であり最終的である。

【００４９】

チオールは長い間、Th1/Th2応答パターンにおいて重要であると認識されてきた。Nアセチル-L-システイン（NAC）およびGSHは、刺激された末梢血T細胞およびTヘルパー（Th）0およびTh2様T細胞クローンによるヒトIL-4産生を用量依存的に減少させた。この効果は、IL-4メッセンジャーRNA転写の減少に関連していた。IL-4誘発Igの産生も、インビトロおよびインビボでこれらのチオールによって減少することがわかった。GSHは、Th1およびTh2サイトカイン応答パターンのバランスおよび程度の鍵となる、細胞内レドックスおよび細胞生理学の他の局面の調節因子である。抗原提示細胞におけるGSH濃度は、Th1またはTh2応答パターンのどちらが優勢であるかどうかを決定することが見出された。基本的な発見は、GSHがTh1サイトカイン応答パターンをアップレギュレートし、およびTh2サイトカイン応答パターンをダウンレギュレートすることであった。細胞内GSHを枯渇させるために用いた3つの実験方法のうちの1つは、エタノールであった。GSHおよびNACは、IL-4の優先的なダウンレギュレーションによってTh1応答に有利に働く。これらのチオールが、活性化されたTh細胞によって発現されかつTh2細胞において維持されるTNF受容体スーパーファミリーに属する表面抗原であるCD30の発現をダウンレギュレートすることも見出された。GSH前駆体であるNACは、ヒト肺胞マクロファージ（AM）とインキュベートした場合、GSH/GSSG比を上昇させ、予めリポ多糖（LPS）に曝露させたAMからのIL-12分泌を増大させた。AMのIFNγへの曝露は、AM細胞におけるGSH/GSSGを増加させたので、逆のループも示された。AMのIL-4へのさらなる曝露は、AM細胞においてGSH/GSSGを減少させた。NACは、（i）インフルエンザウイルス特異的リンパ球増殖を増加させ、（ii）IFNγ産生を増加させ、および（iii）インフルエンザ特異的CD8 + CTL（細胞傷害性リンパ球）の特異的活性を増強した。高い細胞内GSH濃度を有するマクロファージは、NACまたはGSHモノエチルエステルのインビボでの適用によって作製することができ、低GSH含有量のマクロファージは、L-シスチン誘導体、マレイン酸ジエチルまたはL-ブチオニン-[S, R]-スルホキシイミンを投与することによって作製することができる。高GSHマクロファージは、IL-6およびIL-10産生の減少と共に、IL-12および●NO産生の上昇を示した。低GSHマクロファージは、IL-6およびIL-10産生の上昇を示し、●NOおよびIL-12産生を減少させた。CD4（+）CD44（-）ナイーブTh0細胞は、高GSHマクロファージの存在下でTh1細胞に分化し、低GSHマクロファージではTh2に分化した。NACはT依存性B細胞活性化をダウンレギュレートし、おそらくIL-4産生をダウンレギュレートすることによってTh1極性化を誘導した。

【００５０】

マウスIL-4を単独で発現する、研究室で構築された組換えワクシニアウイルスは、毒性が高く免疫適格マウスにおける除去が貧弱であると以前は知られていた。このIL-4毒性は、IL-4とIFNγとの同時発現によって逆転し、その場合、ウイルスクリアランスが起こり、IL-4の濃度は低かった。これは、高用量のGSHの投与が、IL-4を用いて増強されたウイルス操作されたポックスウイルスの増加した致死性を克服し得ることを示唆している。なぜならば、GSHはIL-12およびIFNγの増加と共にTh1サイトカイン産生をアップレギュレートし、IL-4の発現を低下させることができるからである。マウスIL-4の遺伝子を発現するように操作された組換えワクシニアウイルス（VV）は、対照VVと比較して、除去が劣っていた。細胞傷害性Tリンパ球は、対照VV感染と比較して、IL-4増強VVの感染中に大きく減少したが、依然として抗ウイルス抗体レベルおよびNK活性は2群間で違いがなかった。IL-4を発現するVVは、通常はウイルスを除去するように働くIL-12、IFNγおよび●NOの産生抑制を引き起こした。

【００５１】

IL-4は呼吸器合胞体ウイルス（RSV）エピトープ特異的CTLの有効性に影響を及ぼす。RSV M2タンパク質およびIL4を同時発現するように構築された組換えワクシニアウイルス（VV）による感染は、VVM2タンパク質単独と比較して、M2特異的CTL活性の低下をもたらし、これは、局所的なIL4発現が、抗原が提示された場合にインビボでの一次および記憶CD8（

+）RSV特異的CTL応答の細胞溶解活性を低下させることを実証する。ウイルス感染の時点での不十分なGSHは、上記のように、IL-4遺伝子の余分なコピーを有する操作されたウイルスと同等の結果をもたらす。低GSHは、とりわけ、年齢（ちょうど45歳以上）、アルコール、真性糖尿病、HIV感染および環境毒素への曝露などの関数として起こりうる。

【００５２】

GSHがTh1応答パターンをアップレギュレートし、これがIFNγ活性の増加をもたらすことから、IFNγの主な作用のいくつかが、本明細書に記載されている。抗原提示にもかかわらず、急性で重態のウイルス感染では、宿主の回復は、時間の経過、または以下の4つのIFNγ依存的な機能を含むTh1応答パターンの減少によってひどく損なわれる：

IFNγは、細胞のNO産生と相関して、マウスマクロファージにおいてエクトロメリアウイルス、ワクシニアウイルス、および単純ヘルペスウイルス1（HSV-1）ウイルスの複製を阻害する。IFNγはNOシンターゼを誘導する。IFNγは、ワクシニアウイルス（VV）の増殖を用量依存的様式で阻害する。VV DNA合成はブロックされ、これは反応性窒素中間体の生成の増加と相関した。

【００５３】

IFNγによるiNOSの制御されない誘導と結果としてのNOの産生増加は、より大きな酸化負荷をもたらしかつニトロソ化ストレスを引き起こす可能性がある。これはおそらく、ミクログリアにおけるグリア細胞培養物が高いGSHレベルに与える毒性に対する抵抗性のため、およびi-NOSの誘導の過程におけるミトコンドリア中のMn-SODのアップレギュレーションのためである。これにより総酸化負荷が軽減され、GSHが節約される。

【００５４】

GSHは、酸素フリーラジカルおよび脂質過酸化物とNOとの擬似的で無駄で危険な反応を防止することにより、NO生理学および抗菌特性を保護する上で重要な役割を担っている。手短に言えば、GSHは正常で有益なNO機能を最大化する。GSHはまた、フェロトーシスの遅延または防止を助けるかもしれない。

【００５５】

IFNγのさらなる機能は、特定のケモカインの誘導である。インターフェロン誘導性ケモカインは、ポックスウイルスに対する抗ウイルス効果を有する。IFNγ（Mig）およびサイトカイン応答性遺伝子（Crg-2）によって誘導されたモノカインを、C57 BL/6マウスにおけるワクシニアウイルスおよびエクトロメリアウイルス感染の過程において研究した。ケモカインは全身に誘導された。MigおよびCrg-2はウイルスクリアランスを誘導した。

【００５６】

IFNγは、B細胞および樹状細胞内のMHCクラスII関連不変鎖の完全なプロセシングにとって重要な酵素であるカテプシンSをアップレギュレートする。カテプシンSはシステインプロテアーゼであり、抗原プロセシングに必要な細胞内タンパク質分解活性を有する。

【００５７】

IFNγは、免疫プロテアソームによる構成的プロテアソームの置換を誘導し、これらの複数のプロテアーゼを、タンパク質から抗原ペプチドへの効率的な抗原プロセシングに導く。プロテアソームは、主要な組織適合性複合体クラスI分子上に提示される抗原ペプチドを産生するのを助けるための独特な方法でタンパク質を切断する。プロテアソームはペプチドのC末端を決定したが、小胞体またはサイトゾル中の特定のペプチダーゼは、伸長されたペプチドのN末端を決定した。IFNγは、ロイシンアミノペプチダーゼを誘導することによって、プロテアソーム後の抗原ペプチドのN末端のトリミングを刺激する。したがって、IFNγは、抗原ペプチドのC末端を決定するプロテアソームによる切断を促進するだけでなく、LAP（ロイシンアミノペプチダーゼ）を誘導することによって（プロテアソームとは独立に）N末端の形成を刺激することもできる。

【００５８】

IFNγは、MHCクラスI抗原のプロセシングを最適化する免疫プロテアソームを形成するために、3つのプロテアソームサブユニット（低分子量タンパク質LMP2およびLMP7、ならびに多触媒性エンドペプチダーゼ複合体様1（MECL-1））を発現する。使用したモデルで

は、B型肝炎ウイルス細胞毒性Tリンパ球エピトープの効率的な生成には免疫プロテアソームの構造的特徴が必要であることが示された。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスまたは細菌リステリア・モノサイトゲネス（Listeria monocytogenes）に対する免疫応答の際、免疫プロテアソームは、肝臓中の構成的プロテアソームを大部分置換した。単球/マクロファージ、樹状細胞、およびリンパ球などの中心的な細胞におけるGSH濃度は不安定であり、アルコール、毒素、酸化ストレス、身体的/精神的ストレス、感染、外傷、火傷、ならびに非細菌性および細菌性敗血症に応答して急速に低下する。その結果、Th1/Th2のバランスがTh2優勢にシフトし、回復が困難になる。

【００５９】

望ましい宿主防御とウイルスクリアランスとのパラメータに関してGSHおよびTh1/Th2のシフトが重要であると示されている危険なウイルスの例としては、ワクシニアウイルス、IL-4を発現する組換えVV、呼吸器合胞体ウイルス、エクトロメリア、および単純ヘルペス-1が挙げられる。

【００６０】

GSHの主な特性は、レドックス電位、すなわち還元電位対酸化電位[GSH]/[GSSG] の維持である。この比は500の範囲内である。細胞中の正常な[GSH]は5～10mMである。GSHは、細胞内の酸化還元電位の主要な決定因子であり、ヒトナチュラルキラー細胞における細胞周期の進行の制御と、感染、化学物質への曝露、ならびに他の有害な因子、例えばディーゼル排気微粒子、加齢、糖尿病、および光酸化性網膜損傷などに対する防御応答とを含む多様な細胞活動に保護的に関与している。GSH濃度がレドックスに与える影響ならびに結果としてそのようなNFκBファミリー、TNFα、サイトカイン、COX-2および接着分子などの特定のエンティティに与える影響により、用語「宿主因子」なる物質が与えられ、また、さらなる治療のための指示、例えばGSHを上昇させ同時に患者を化学毒素およびGSHに有害な他の因子から保護することも提供される。

【００６１】

生化学的進化は、安定/制御可能な範囲のpH、pO_2、浸透圧および$[Na^+]/[K^+]$に向かって進行し、よって、この過程は安定/制御可能なレドックスももたらした。GSHの濃度が高い場合、レドックスは高い。よってこれは、NFκBファミリー、酸化剤感受性転写調節因子; 炎症誘発性サイトカイン; COX-2; 接着分子; ならびに二次カスケードを引き起こすTNFαおよびIL-1βの過剰活性化を制御することができかつ遅らせることができる。GSHの有意な減少は、レドックスの減少およびNFκBファミリーおよびその他の因子の活性化になる。

【００６２】

硫黄マスタードによる; 敗血症性症候群によるGSHとレドックスに対する破壊的作用; ディーゼル排気微粒子による; 他の感染症による; ならびに他の汚染物質による破壊的作用は、戦場; 怪我、汚染、および「ブービー」トラップが軍隊や先住民を脅かすような解放された国の再建; ならびに都市のテロ攻撃に関連している。

【００６３】

産業毒素を含む化学毒素は、GSHとの化学量論的反応を受ける。チオールとのインビボ反応は、GSHの欠乏と、その結果としての細胞性酸化還元（レドックス）状態の変化、サイトカインの放出、及びTヘルパー細胞2表現型の促進をもたらす。

【００６４】

天然痘感染症は、生まれつきGSHが不十分で、IL-12およびIFNγを産生することと天然痘特異的細胞毒性リンパ球を整列させることがわずかしかできない個人の間で、より重篤であり得る。GSHが不十分であることおよびTh2表現型が優勢であることは、現在の生ワクチンによる天然痘ワクチン接種された場合の合併症のリスクが高い、一見異なっている群の間で、共通した因子を表している可能性がある。

【００６５】

ヒトにおける不十分なGSH濃度および減少したレドックス状態は45歳以上で起こり、GSH/GSSGレドックスの急激な低下は、（血漿中で）全年齢にわたって0.16mV/年の速度で年齢

に伴って起こるシステイン/シスチンレドックス状態の線形酸化と共に起こり、GSH/GSSGレドックスは45歳以前には酸化されず、その後0.7 mV/年のほぼ線形速度で酸化された。これは、システインと比較して45歳以降のGSHの酸化の4倍に相当する。チオレドキシントランスジェニックマウスにおける腹腔内常在マクロファージのGSH/GSSG比を、（i）細胞内レドックス状態の、および（ii）加齢中のTh1含有率が持続的に維持された、年齢を一致させた野生型（WT）マウスと比較した。GSH/GSSG、IFNγ、IL-10およびIL-4のこれらの測定値は、IFNγ/IL-10およびIFNγ/IL-4比として表した。WTマウスと加齢に伴いTh1含有率が持続的に維持されているトランスジェニックマウスとを比較して、GSH/GSSG、IFNγ/IL-10およびIFNγ/IL-4の比率が高いマウスの間で自己免疫疾患の発症が有利に遅延していた。

【００６６】

致死的な急性ウイルス感染症を扱う際には、T細胞応答を介した獲得免疫だけでなく、NK細胞を介した先天性免疫も考慮することが重要である。IL-2に対するNK応答はレドックス調節される。IL-2依存性細胞株NK3.3は、十分なIL-2が存在していたにもかかわらず、チオール関連化合物、L-シスチン、およびGSHを欠く培地中で、[3H]-チミジンを取り込まず、G1-S相転移も完了しなかった。

【００６７】

NFκBはウイルス感染後の全体的な細胞応答の中心である。高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）感染によって誘導される、NFκBに依存する遺伝子の幅広さを研究することができる。TNFαで刺激された細胞はNFκBを活性化し、RSV感染も同じくNFκBを活性化する。NFκBは、ケモカイン、転写調節因子、翻訳およびタンパク質分解を調節する細胞内タンパク質、ならびに分泌タンパク質のRSV誘導性発現のために必要とされる。後者の中には補体成分および成長因子調節因子が含まれる。NF-κBの作用は、ウイルス感染後の全体的な細胞応答を誘導する。酸化ストレスの炎症誘発作用の分子機構が明らかにされている。遺伝子シグナル伝達ネットワークにおける転写因子がDNAに結合するためには、DNAを巻き戻すことがアクセスを提供するために必要である。このようなアクセスのためには、DNAが巻き付いているヒストンコア上のヒストン残基のアセチル化/脱アセチル化が必要である。ヒト肺胞上皮細胞の一系統であるA549を、H_2O_2およびTNFαによる酸化ストレスに曝露した。これは、ヒストン残基の脱アセチル化を阻害する物質であるTSAの存在下または非存在下で、GSHのGSSGへの酸化およびGSHの枯渇およびDNAの巻き戻しをもたらした。脱アセチル化は可逆的過程であり、アセチルトランスフェラーゼおよび脱アセチル化酵素によって制御される。TSAは脱アセチル化酵素を阻害し、ヒストンタンパク質のアセチル化を増加させる。H_2O_2及びTNFαがNFκBおよびAP-1のDNA結合を増強した一方、TSAの添加は、AP-1およびNFκBの結合の増加、ならびにH_2O_2およびTNFαの効果を超えたIL-8放出の増加を強化した。彼らは、酸化剤であるH_2O_2および炎症誘発性メディエーターであるTNF-αが、GSHレベルの低下とAP-1およびNF-κB活性化の増加とに関連するヒストンアセチル化を誘導し、肺胞上皮細胞における炎症誘発性IL-8放出の増強を導くと結論づけた。これは、酸化ストレスの炎症誘発作用のメカニズムを示している。多面的な転写因子NFκBは、酸化ストレスによりアップレギュレートされ、抗酸化剤によりダウンレギュレートされ、細胞GSHレベルの増加はNFκBの活性化をブロックし、TNF-αの放出を阻害した。

【００６８】

酸化ストレスには、無症候性ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染から後天性免疫不全症候群（AIDS）に至る疾患進行の補因子としての役割がある。酸化ストレスは、NFκB活性化を通じたインビトロでのHIV複製の既知の活性化因子であり、これが次にHIV遺伝子発現を刺激する。TNFαもまた、同様の機構によるHIV感染の活性化に関与している。この物質に曝露された細胞のTNF媒介細胞毒性は、細胞内ヒドロキシルラジカルの生成に関連する。HIV進行における酸化ストレスの役割に有利なように、HIV感染および進行中にGSHが消費される。GSHは、T細胞免疫機能の調節において主要な役割を果たすことが知られている。酸化ストレスはまた、細胞DNA損傷の発生においても重要な役割を果たす可能性があり

、この文脈において、HIV関連悪性疾患および疾患の進行に関連し得る。酸化ストレスは、多数の免疫調節遺伝子およびヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）末端反復配列（LTR）の活性化に関与するNFκB/Rel転写因子を活性化する。抗酸化剤、リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤、および鉄キレーターを含む確立された新規化合物がNFκB活性化とTNF-αによって誘導されたHIV LTR媒介性遺伝子発現とに与える効果を調べた。種々の濃度のN-アセチルシステイン（NAC）、ピロリジンジチオカルバメート（PDTC）およびトリミドックス（TD）は、Jurkat細胞におけるTNFα誘導NFκB結合を阻害した。刺激の前にこれらの化合物で細胞を前処理すると、IκBα分解が妨げられた。そのシグナル誘導性分解の必須条件であるIκBαのリン酸化はこれらの細胞では排除され、これにより、酸化ストレスがNFκB活性化経路の必須ステップであることが示された。Jurkat細胞におけるTNFαおよびHIV-1トランスアクチベーターTatによるHIV-1 LTR媒介性遺伝子発現の相乗的誘導は、NACおよびTDの存在下で有意に抑制されたが、PDTCでは抑制されなかった。

【００６９】

免疫無防備状態の患者は、しばしばサイトメガロウイルス誘発血管病理を有する。内皮細胞における高いチオールレドックス状態は、CMVに対するバリアを提供する。ヒト免疫不全ウイルスおよび単純ヘルペスウイルス-1感染症に関して、ウイルス感染と酸化ストレスとの関係が認識されている。高い内因性チオールレドックス状態は、CMV感染に対する内皮細胞の見掛けのバリア機能に寄与し得、該酸化ストレスは、血管壁のCMV感染を促進し得る。

【００７０】

IL-18は、GSH細胞内濃度が減少したときに切除しIL-12で処置した成熟脾臓樹状細胞におけるIFNγの産生を顕著に増大させる能力を有する。マクロファージにおいても、この同じ細胞内GSH欠乏効果が見られた。

【００７１】

H．ピロリ（H．pylori）感染はNFκBおよびCOX-2を活性化し、両者はGSH、NAC、およびピロリジンジチオカルバメート、ならびにチオール抗酸化剤で阻害される。酸化剤感受性の転写因子NFκBは、胃癌細胞におけるH．pylori刺激によるCOX-2の発現において新規の役割を果たす可能性がある。

【００７２】

ケモカインは、免疫コンピテント細胞の動員による炎症反応の進行にとって重要である。チオール抗酸化剤であるNACによるラットの処置は、リポ多糖（LPS）によるNFκBの活性化を減少させ、肺洗浄液好中球数を1/6に減少させるのに十分なほど肺組織におけるサイトカイン誘導性好中球化学誘引物質mRNA発現を減少させた。TNFα誘導性マクロファージ（CXC）ケモカイン分泌は、リポ多糖誘導性マクロファージ（CC）ケモカイン分泌よりもNFκB発現に依存する。

【００７３】

皮膚内に現れる準備として真皮内の血管に接着する天然痘感染単核細胞に関与する白血球血管壁相互作用に寄与している接着分子は、レドックス調節される。IL-4のレドックス調節機構は、ヒト血管内皮細胞における単球走化性タンパク質-1（MCP-1）発現を誘導する。NACおよびピロリジンジチオカルバメート（PDTC）。IL-4は、転写因子であるsignal transducers and activators of transcription 1（STAT1）DNA結合活性のアクチベータを劇的に増加させることによってMCP-1遺伝子発現を誘導し、これはPDTCによって減弱された効果である。IL-4は、酸化ストレスを誘導することによって血管細胞接着分子-1（VCAM-1）をアップレギュレートする。PDTCまたはサリチル酸ナトリウムは、ヒト内皮細胞によって精緻化された接着分子であるP-セレクチンのIL-4誘導発現を阻害した。抗酸化剤は、ヒト表皮ケラチノサイトにおける細胞間接着分子-1（ICAM-1）発現に対する抑制効果を有する。ICAM-1は、炎症性皮膚疾患の過程でヒト表皮ケラチノサイトによって強く発現される。

【００７４】

天然痘感染単核細胞が真皮血管に接着した後、それらは内皮表面を通りかつ真皮コラー

ゲンを通って出現し、他の遊走性ヒト単球-樹状細胞および浸潤性癌細胞のように、マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）により表皮細胞で最も増大する可能性がある。これらは、亜鉛イオン含有エンドペプチダーゼであり、Ca+2依存性であり、現在21種のMMPのファミリーを構成している。これらは、tissue inhibitors of metalloproteinase（TIMP）によって阻止される。

【００７５】

ヒト単球に由来する樹状細胞（CD）は、細胞外マトリックスのインビトロモデルであるMatrigel trans-well migrationアッセイによって、移動することが見出されている。未成熟DCはIL-4/顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GC-CSF）を用いて誘導され、成熟DCは、TNFαおよび改変ワクシニアウイルスAnkra（MVA）によって誘導された。「成熟」DC（TNFαおよびMVAによって誘導された）はマトリゲルを介した移動の増加を示し、これは、マトリゲルメタロプロテアーゼ（MMP）の阻害剤によって有意に阻害された。恐らく、GSHを用いてTNFα発現を抑制することは、MMP活性を阻害する可能性がある。遺伝子シグナル伝達は、炎症性サイトカインであるIl-1およびTNFαによるMMP-9発現を導く。特定のプロテインキナーゼCアイソフォーム（PKC-ζ）は、IL-1およびTNFαによって誘導され、PKC-ζ活性をブロックすることは、IL-1またはTNFαによって誘導されるMMP-9活性および遺伝子発現を無効にした。これらの過程はNFκB依存的であることが示され、MMP-9プロモーターにおけるNFκB結合部位の変異によって完全に阻止された。

【００７６】

血管内皮細胞におけるMMP-9の発現はレドックス感受性であり、高血糖に続発する酸化ストレスは、MMP-9発現を抑制するために抗酸化剤を使用する論理的根拠を提供する。TNFαは酸化ストレスを誘発する。薬学的GSHは、この文脈において有益であり得る。

【００７７】

したがって、GSHが低下するときレドックスは減少し、このことは、NFκB活性化、ヒストン残基のアセチル化、ならびに、NFκBおよび核に移行した他の転写調節因子によるアクセスを向上させるDNA巻き戻しをもたらし、炎症誘発性サイトカイン、ケモカイン、COX-2、および二次カスケード（転写調節因子および増加したTNFαの産生が続く）の活性化および発現が続く。

【００７８】

感染の進行および累積組織毒性がGSHおよびレドックスの低下に関連するウイルス感染症の例には、HIV/AIDSおよび呼吸器合胞体ウイルス感染症が含まれる。

【００７９】

反応中間体に対するGSHの生化学的中和反応は、以下の3つのカテゴリーに分類される：それ以外の方法で細胞膜脂質、タンパク質および核酸を損傷して細胞毒性および組織毒性をもたらす活性酸素種（ROS）および活性窒素種（RNS）の解毒；GSHは、ミトコンドリア対H_2O_2、生体エネルギー不全、および累積組織毒性を増す過剰なアポトーシス過程を保護する；GSHとその随伴酵素は、アラキドン酸の過剰な、制御されない、組織破壊的酸化（脂質ヒドロペルオキシド、過酸化物、アルコキシラジカル、ヒドロキシルラジカル、イソエイコサノイドおよびエイコサノイドの分裂）を防止する。

【００８０】

宿主防御の初期の回避が可能な天然痘タンパク質などのウイルスタンパク質の違い、罹患細胞、複製過程、および宿主因子の違いに起因する、疾患における具体的な違いにもかかわらず、いくつかのウイルス感染は、細胞内GSH濃度の改善の重要性の例を提供する。ウイルスは最終的に（ｉ）ヒト免疫系；（ｉｉ）クリアランス機構；および（ｉｉｉ）炎症反応の程度の変化に遭遇する。免疫学的遭遇および微生物クリアランス機構は、一般に、ROSによる食作用、ならびにRNSによるおよびアポトーシスによるクリアランスを伴うが、TNFα、IL-4およびIFNγなどのサイトカインは、シグナル伝達経路を介して直接的および間接的にROSおよびRNSを引き起こす。例えば、IL-4は12/15リポキシゲナーゼをアップレギュレートし、GSHペルオキシダーゼをダウンレギュレートして、広範な脂質ヒドロペルオキシド由来ROSを生成する。GSHの連続的な細胞内濃度は、（ｉ）応答性免疫系細胞内で；

（ii）直接的に影響を受ける細胞で；および（iii）バイスタンダー細胞で、違いが出る可能性がある。ROS、RNS、炎症誘発性サイトカイン、およびアラキドン酸「代謝」の反応性副生成物の制御されない組み合わされた存在によって、非細菌性敗血症状態および重篤なウイルス感染症、例えば天然痘、インフルエンザ大流行などで見られる「重度の炎症反応症候群」がもたらされる。分子病理学的過程は性質上共通している。

【００８１】

ROSおよびRNSは、実質的な累積組織毒性を引き起こす。これは特に、それらが、さらなる毒性副生成物を生じる急速な連鎖反応を開始するからである。例えば、活性化された単球/マクロファージは実際に、15-リポキシゲナーゼ（ROS）を介して、および、IFNγによるiNOSの誘導（RNS）を介して、一般的に同じ時間枠内で両方を生じる。その結果、様々な複雑な相互作用が起こり、最初の一酸化窒素よりも有害であるペルオキシナイトライトなどの活性窒素種を生じる。

【００８２】

「フリーラジカル」とも呼ばれるROSが感染、その分子病理および進行における重要な因子であることが判明した初期の試験ウイルスの中には、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）があった。症状のないHIV血清陽性個体では、GSHの有意な損失が観察される。血漿中の総GSH濃度および低下したGSH濃度は、正常個体のそれの約30％（および肺上皮内層液、ELFにおいて）対照のそれの約60％であった。したがって、GSH免疫不全は、HIV感染の進行性免疫機能不全に寄与している可能性がある。HIV表面糖タンパク質、精製gp120は、単球アラキドン酸代謝産物およびインターロイキン1を誘導することができる。gp120に関する研究は、これが直接酸化によるのではなく、シグナル伝達経路を介して起こることを示している。アラキドン酸のような多価不飽和物の直接酸化は、HO_2/O_2^-と不飽和脂肪酸との反応性の研究に示されているように、活性酸素種を必要とする。病理学的過程によってフリーラジカルが生成され、これが次にアラキドン酸塩のような多価不飽和物を攻撃し、それによって、組織抗酸化剤を消費する連鎖反応を引き起こし、細胞および組織の損傷の病理学的な痕跡を残した。脂質過酸化物、または脂質過酸化生成物、または、GSHなどの組織抗酸化剤の損失は、目下「酸化ストレス」と呼ばれる制御されていない破壊的フリーラジカル反応による組織損傷の有効な指標/バイオマーカーである。

【００８３】

オゾンによるマクロファージおよび肺組織への酸化ストレスの破壊的効果の例は、天然痘の脅威に対する補助的GSH療法および療法の裏付けとしての酸化ストレスにおいて引用されたウイルス研究を理解するのに適切である。肺サーファクタントリン脂質中の不飽和脂肪酸アシル基の62.5、125および250ppbの低レベルオゾン曝露は、予想通り酸化ストレスをもたらし、かつ、壊死により誘発マクロファージ生存率を減少させるという点で生物学的に活性な産物を生じた。この損傷した酸化型リン脂質である1-パルミトイル-2-（9^1-オキソノナノイル）-グリセロホスホコリンはマクロファージの生存率を低下させただけでなく、TUNEL染色、核サイズ、および、ミトコンドリアデヒドロゲナーゼ活性の低下によって示される生存率の低下を伴うカスパーゼ-3活性化によって評価した、肺上皮様A549細胞におけるアポトーシスも誘導した。

【００８４】

HIV感染では、後に続く累積組織毒性およびAIDSへの進行に加えて、酸化ストレスおよびGSHの不足が立証されている。HIV-1感染患者の血漿中の低濃度の酸可溶性チオール（システイン）が見出される。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の発現誘導に対するGSH（GSH）、GSHエステル（GSE）およびN-アセチル-L-システイン（NAC）の影響を、HIV潜伏期間の細胞モデルである慢性的に感染した単球U1細胞株について調べた。U1細胞は、ホルボール12-ミリステート13アセテート（PMA）、TNF-α、IL-6および他の誘導物質によって増加され得る低レベルのウイルスを構成的に発現する。GSH、GSEおよびNACは、細胞毒性または細胞増殖抑制効果の非存在下で、PMA、TNF-αまたはIL-6によって媒介されるHIV発現の誘導を用量依存的様式で抑制した。これは、細胞GSHとHIV発現との間の関係を解明するのに役立ち、それによって、チオールによる治療はHIV感染の治療において価値を有すること

が示唆される。しかし、HIV/AIDSに対してチオールを採用する製薬企業の試みは、その時点でGSHがまだ生物学的に入手不可能であったため、成功しなかった。

【００８５】

HIVによって誘発されるチオール欠乏はT細胞機能不全と相関しており、したがって、一部ではN-アセチルシステイン（NAC）による治療が提唱されている。NACはGSHの前駆体であるが、肝臓での合成が必要であり、かつこれは、それ自体がフリーラジカルを生成する代謝的バーストを伴い得る。GSHは、インビボで細胞毒性リンパ球の活性化を増大させる。酸化ストレスは、疾患の進行の補因子である。末梢血単核細胞（PBMC）におけるHIV-1発現は、GSHによってブロックされるか、または実質的に減少する。この抗HIV-1効果は、HIV-1発現の有意な増加のエビデンスなしに、少なくとも35日間これらの培養物において持続する。このように、GSHによるHIV-1感染単球/マクロファージの単回のパルス曝露は、単球/マクロファージにおいて検出可能な細胞毒性を生じることなく、HIV-1 p24抗原レベルおよび逆転写酵素活性の持続的で濃度依存的な減少をもたらした。慢性的にHIV感染させた8E5はまた、GSH-ペルオキシダーゼ活性の顕著な低下を有する。8E5細胞の低GSH-ペルオキシダーゼ活性が毒性15-HPETE（15-LOOH）の不活性15-ヒドロキシ-エイコサテトラエン酸15-HETE（15-LOH）への変換を妨げたので（81）、HIV遺伝子発現は、15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸（15-HPETE）およびいくつかの他のヒドロペルオキシ脂肪酸による殺傷に対する8E5細胞の感受性を10倍高くする。補助的なGSH酵素は、過酸化物分裂[15-LOOH→15-LO●+●OH]を受けてアルコキシラジカル（LO●）およびヒドロキシルラジカル（●OH）を介してフリーラジカル連鎖反応を開始し得る、毒性15-HPETEに対する追加の防御を提供する。GSHペルオキシダーゼによる15-HETEへの先制的変換はこれを回避する。12/15リポキシゲナーゼのような脂質過酸化酵素およびGSHペルオキシダーゼのようなヒドロペルオキシ脂質減少酵素は、インターロイキン4および13によって反対に調節される。これらの2つのインターロイキンは12/15リポキシゲナーゼをアップレギュレートし、リン脂質ヒドロキソペルオキシドGSH-ペルオキシダーゼをダウンレギュレートする。

【００８６】

最終的な結果として、ROS病理を開始する可能性のある危険な脂質ヒドロペルオキシド（LOOH）が蓄積される。これは、IL-4がフリーラジカル病理を開始させる酸化促進剤であるという古い文献の知見を説明するのに役立つ。HIV gp120は複雑な役割を有し、フリーラジカル生成に関してTNFαの活性を増幅する。これは次にNFκBを活性化し、これが核に移行し、末端反復配列（LTR）上の結合部位に付着することによってHIVプロウイルスDNAを活性化させる。これはHIVの迅速な複製をもたらす。gp120タンパク質は、フリーラジカルを増加させるシグナルすなわち酸化ストレスを「伝達する」p56 lckタンパク質チロシンキナーゼを介してGSH減少に対するその効果を発揮する。

【００８７】

ウイルス性肝炎、特にC型肝炎は、一部のウイルス感染症において観察されるような重大な累積組織毒性を引き起こす酸化ストレスによって部分的に特徴付けられる。HCVの場合、ROSは一般に、例えばシグナル伝達経路を介して二次的に産生される。

【００８８】

C型肝炎ウイルスコアタンパク質は、腫瘍壊死因子（TNF）受容体1の細胞質ドメインに結合する。これは患者の罹患率に寄与するROS生成をもたらし、アポトーシスが続く場合には、さらなる肝臓壊死および死亡率に寄与する。HCVコアタンパク質は、TRADDおよびTRAF 2シグナル伝達複合体を介してc-Jun N末端キナーゼを活性化し、それによって酸化ストレスが生じる。酸化ストレスは症状のないHCV患者で見られ、酸化ストレス（炎症を伴わない）はマウスモデルで見られる。ROSとHCV疾患活動性の間には関連がある。HCV患者における脂質ヒドロペルオキシドの高い含有量を含む、HCV感染症における酸化ストレスのための非炎症性の源が存在するようである。フェリチンおよび肝臓GSHの異常は、慢性HCV患者において生じる。鉄、特に有機鉄は、脂質過酸化および他のフリーラジカル連鎖反応のための強力な触媒である。スーパーオキシドおよび一酸化窒素などの活性酸素種および活性窒素種は、炎症によっておよびインフルエンザの気道上皮細胞によって細胞外空間

に放出される。これらの分子は、インフルエンザウイルス肺炎の後に肺傷害を悪化させる可能性がある。マウス気道における細胞外スーパーオキシドジスムターゼ（EC SOD）の発現の増強は、インフルエンザ肺炎の病理学的影響を弱める可能性がある。トランスジェニック（TG）EC SODマウスにおけるマウス適合化香港インフルエンザA/68ウイルスへの非致死性一次感染の病原性効果を非TG（野生型）同腹仔と比較した。野生型マウスと比較して、EC SOD TGマウスは、IFNγ誘導の有意な鈍化によって測定されるような肺傷害と炎症の低下、気管支肺胞洗浄液中の細胞数および総タンパク質の減少、肺の亜硝酸塩/硝酸塩ニトロチロシンの低下したレベル、ならびに著しく低下した肺病理を示した。これらの結果は、肺の誘導気道および遠位気道におけるEC SODの増強が、炎症を改善することおよび酸化ストレスを減弱させることの両方によってインフルエンザ誘発肺傷害を最小限にすることを実証する。

【００８９】

一酸化窒素（●NO）は反応性フリーラジカルであり、より反応性の高いフリーラジカルであるスーパーオキシドアニオン（●O_2^-）およびヒドロキシル（●OH）よりもわずかに長い半減期（約10秒）をインビボで有する。●NOは、分子酸素と共通の溶解度特性を有し、幾分非極性である。分子酸素は、細胞膜の疎水性中間帯の非極性環境において約7倍高い可溶性を有し、膜リン脂質の脂肪酸アシル鎖の最も感受性が高い酸化可能領域、不飽和結合に●NO及びO_2を配置している。これらの非極性膜中間帯におけるラジカル反応（アルコキシLO●及び移動性●OH）は、脂質だけでなく、膜タンパク質の疎水性セグメントにも悪影響を与える。これは、酵素の不活性化および他の膜巨大分子複合体の変化をもたらし得る。スーパーオキシドおよびヒドロキシルフリーラジカルと比較して比較的非極性構造である一酸化窒素およびそのわずかに低い反応特性は、一酸化窒素が50μm/秒で拡散しかつ推定10秒のインビボでの生存率を有するので、一酸化窒素に約500μm以上の「範囲」を与える。この範囲の実際的な組織および分子の病理学的結果が、バイスタンダー細胞に対する効果であり、そのそれぞれが、組織（リンパ節、皮膚など）中で平均直径15～25μmであり、血管外遊出を経て到着したばかりの活性化単球/マクロファージを含み、痘瘡または他のウイルスを運び、他の物質の中でも、一酸化窒素、脂質ヒドロペルオキシド、およびサイトカインを合成する。

【００９０】

●NOは●O_2^-と反応し、かつ強力な酸化剤、ペルオキシナイトライト（$^-$OONO）を形成する。この反応の欠点は2つある：（i）NOの望ましい抗微生物効果が失われること、および（ii）無差別な酸化によって生物学的分子のスペクトルが損傷されること。酸化ストレスの指標/バイオマーカーとしてますます認識されている安定した酸化最終生成物は、一酸化窒素由来の酸化剤の特徴的な「分子フィンガープリント」と現在見られているニトロチロシンである。NOはまた、より直接的なニトロソ化特性を有するN_2O_3を一般的には最初に形成することによってチオールと反応し、S-ニトロソチオールを容易に形成する。タンパク質のニトロシル化またはニトロソ化は、ヒドロキシル、アミンおよび芳香族炭素のようなSH基に加えて、さらなる求核性側鎖を含み得る普及した反応である。生物学的分子中の種々の求核性中心におけるニトロシル化の反応性および機能的帰結は、GSH治療によってアクセス可能な別の介入を表す。ニトロソ化反応は、硫黄、酸素、窒素および芳香族炭素中心で維持される。チオールは反応性が最も高く、タンパク質三次構造のプレニトロソ化の減少は、プレニトロソ化の減少によってより多くの遊離チオールが曝露されたので、ポリニトロシル化をもたらした。ウシ血清アルブミン（BSA）のようないくつかのポリニトロシル化タンパク質は、血管拡張剤および抗血小板活性のような生理学的な一酸化窒素特性を示したが、酵素のニトロシル化は一般に酵素活性に悪影響を及ぼした。酵素中のチロシン残基のニトロソ化は、リン酸化依存的過程に対する潜在的な破壊をもたらす。活性中心での酵素のニトロソ化およびS-ニトロ基の形成は、活性を回復させるチオール剤によって潜在的に可逆的であることが見出されたが、他のタンパク質のニトロソ化、特にニトロチロシン形成は病原性である。単球/マクロファージによって発生する炎症反応は、アテローム性動脈硬化症血管内で研究されているが、他の場所での炎症に関するRNS病理につ

いての貴重な情報を提供する。多くの場合、基本的な分子病理学的過程は類似している。

【００９１】

病理は、白血球由来NAD（P）Hオキシダーゼ複合体から生じるスーパーオキシド過剰、および、白血球由来ミエロペルオキシダーゼによる一酸化窒素の同時消費に起因する。最終的な結果は、（i）ペルオキシナイトライトの形成によるNOの除去、および（ii）ミエロペルオキシダーゼ活性によるNOの消費というこの同時の二重作用によって、NOの生理的効果が損なわれることである。天然痘病変の場合と同じ、NAD（P）Hオキシダーゼ複合体およびミエロペルオキシダーゼ、加えて活性化された単球/マクロファージとの、活性化白血球の「混合物」は、炎症部位および感染部位に見られる。ニトロチロシンの形成は、後述するGSHの第4の特性の下で論じられかつ参照されるポックスウイルスDNAトポイソメラーゼの阻害に関して、重要な意味を有する。これらのトポイソメラーゼSH酵素のチオール反応に影響を与えるGSHに加えて、DNA骨格と3'-ホスホジエステル結合を形成するワクシニアトポイソメラーゼには重要なチロシン-274残基が存在する。NOがそれ（タンパク質ヒドロキシル（OH）、SHおよび他の部分を標的とする）を攻撃する場合、得られたニトロチロシンは、トポイソメラーゼをエンドヌクレアーゼに効果的に変換して、3'-リン酸末端生成物を有する60bp二本鎖DNAを形成する。ポックスウイルスDNAトポイソメラーゼの重要な部位内に有害なニトロチロシンを生成できるこの能力は、特に、一酸化窒素の有益な機能を妨げるペルオキシナイトライトの破壊的かつ有害な形成を防止するために十分なGSHが存在する場合には、特性番号4で論じられているように実用的であり得る。後述される仮説の1つでは、GSHが機能的ジスルフィド形成を減少させ得、トポイソメラーゼ内の鎖間および鎖内ジスルフィドを減少させ得、それによってシステインおよびTyr-274がニトロソ化反応にアクセス可能になると考えている。タンパク質のニトロソ化は、求核性側鎖、例えばSHおよびOHを含む。ニトロソ化およびグルタチオニル化は、ウイルス負荷の多くを抱える単球/マクロファージ/樹状細胞集団であり、有意な量の一酸化窒素を生成するのはこの細胞集団であるため、ポックスウイルストポイソメラーゼに対して選択的であり得る。十分なGSHの存在下で、ROSおよびRNSを短縮して、長期持続性の拡散性NO供与体であるS-ニトロソGSHの規則的形成を可能にすることができる（利用可能であり、かつポックスウイルスDNAトポイソメラーゼのTyr274のNO感受性ヒドロキシルに近接している）。さらなる詳細はGSHの特性番号4に記載されている。

【００９２】

ワクシニアウイルスのIL-4増強は、ウイルスのIFNγ-NO媒介クリアランスを抑制する。天然痘感染の罹患率および死亡率を減少させるためには、一酸化窒素の抗ウイルス性の微生物クリアランス特性の強化および保存が必要であるが、RNS媒介病理はない。十分な一貫した濃度の細胞内GSHは、さもなくばGSHを枯渇させて過剰な組織毒性を永久に悪化させる過剰なROS/RNS反応を防止するために必要なバランス、効力、および安全性を提供する。これらのマクロファージの生存率は、それらの実験条件の下で、NO放出化合物、S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン（SNAP）に曝露することによって減少する。これらのマクロファージにおいてGSH濃度が実験的に減少した場合、細胞生存率はさらに低下した。しかし、マクロファージは、チオール、NACが前処理として使用されたときに保護された。

【００９３】

GSHレベルの増加は、NO供与体S-ニトロソ-N-アセチルシステイン（SNAC）への曝露後の筋細胞CK（クレアチンキナーゼ）活性の低下を弱める。一方、筋細胞内のGSHレベルが減少すると、SNACによるクレアチンキナーゼのS-ニトロソ化が増強され、酵素活性が減少した。ペルオキシナイトライトは、ヒト静脈内皮細胞およびラット大動脈平滑筋細胞において細胞毒性作用を有する。GSHは、ニトロチロシンタンパク質酸化DNA一本鎖切断のミトコンドリア呼吸形成および核酵素ポリ（ADP-リボース）合成酵素の活性化のペルオキシナイトライト誘発型抑制を弱める。GSH濃度を実験的に低下させると、ペルオキシナイトライト誘導細胞毒性が悪化した。NOおよびROSの相乗的毒性は、ペルオキシナイトライトを形成することによって起こり、他の細胞毒性剤は抗酸化酵素による阻害を受け易い。

【００９４】

インスリン産生RINm5F細胞を、サイトカイン媒介毒性に対して遺伝子操作により作製した。カタラーゼ、GSHペルオキシダーゼおよびCu/Zn SODは、見かけ上、実験に使用したサイトカインのシグナルカスケードで生成されたROSの不活性化のために、保護的であった。GSHは、それぞれiNOSおよびNADPH-オキシダーゼを介してミクログリア中で同時に生成されるNOおよび●O_2^-からのペルオキシナイトライト形成を防止するのに、有効である。連続して一酸化窒素を生成するミクログリア細胞におけるペルオキシナイトライト形成は、かなり制限されている。しかしながら、スーパーオキシド生成酵素であるNADPH-オキシダーゼの活性化は数分以内に劇的に増加した（ペルオキシナイトライト）。したがって、スーパーオキシドはペルオキシナイトライト形成の制限因子である。アスコルビン酸ではないGSHは、ペルオキシナイトライト形成を有意に減少させた。

【００９５】

チオールレドックス状態はミトコンドリアの膜輸送系を制御する。ミトコンドリア内の3つの主要なレドックス活性因子は、修復鎖、タンパク質チオールおよびマトリックスGSHの電子輸送体である。これらは、ミトコンドリア内GSHのレドックス状態の維持に必須である、GSHレダクターゼの補因子であるNADPHの利用可能性と相互に関連している。例えば還元されたGSH内の遊離SH基は、内部ミトコンドリア膜内の全ての代謝産物キャリアの活性に不可欠であり、さもなくば、広範なチオール酸化は、以下をもたらす：輸送活性の阻害、ならびに、ミトコンドリアの内部膜電位差の散逸（ΔΨ[m]）、ミトコンドリア関連アポトーシス過程で観察される初期の潜在的に可逆的な事象、生体エネルギー不全、同じくΔΨ[m]の散逸の一部である初期の事象、ならびに、ミトコンドリア膜の透過性の増加、ミトコンドリア関連アポトーシス過程の後期事象である。

【００９６】

ミトコンドリアGSH濃度は、10mMと7mMと比較して、それぞれサイトゾル内よりも高い。ミトコンドリアは、2つの酵素（γグルタミルシステインシンターゼおよびグルタチオンシンターゼ）の欠如のためにGSHを合成することができないので、ATPおよびより低親和性の成分により刺激される、高親和性成分（Km、約60μM; Vmax、タンパク質1mgあたり約0.5nM/分）によってミトコンドリアマトリックス内に濃度勾配に対して輸送される。ミトコンドリアにおけるGSHの必要性は、スーパーオキシドアニオンに作用するMnSODによって生成されるH_2O_2を減少させるためのその触媒活性である。ミトコンドリア内で産生されるカタラーゼやミトコンドリアに輸送されるカタラーゼは存在しないため、ミトコンドリアGSHは不可欠である。すべての細胞のサイトゾル、血漿および赤血球において、スーパーオキシドジスムターゼ（CuZn SODの形態で）はカタラーゼと協働して機能し、H_2O_2の蓄積を防止する。カタラーゼまたはGSHの触媒活性がなければ、H_2O_2が蓄積し、最終的に非常に有害なヒドロキシラジカル（●OH）が生成する。その結果、戦略的細胞の生体エネルギー不全および過度のアポトーシス過程をもたらす可能性がある。GSH枯渇は、後のアポトーシス過程の進行に伴う生体エネルギー不全に関連する。GSH枯渇は、細胞が内因性酸化剤に対して緩衝する能力を低下させ、ミトコンドリア機能の継続に時間制限を設定し、それによって間接的に全ATPレベルおよび膜の完全性に間接的に影響する。

【００９７】

胸腺細胞は、ミトコンドリアΔΨ[m]の破壊、およびほぼ同時の非酸化型GSHの枯渇を示す。彼らは、これが2段階アポトーシス過程の第一段階であると考えた。ΔΨ[m]の損失は、ATP合成の減少を伴う生体エネルギー不全を表す。この状態は、後のアポトーシス過程である段階2に進むことができる。癌細胞およびおそらく微生物を運んでいる細胞の根絶などの場合、ただし細胞断片中の微生物が感染性でないかまたは急速に感染性でなくされるならば、アポトーシス過程は患者にとって有益であることがある。ワクシニアウイルス感染マクロファージ（マウス系統J774.G8）におけるアポトーシス過程には、ミトコンドリア膜電位の変化が含まれる。ワクシニアウイルス（VV）感染は、アポトーシスの誘導に必要と思われる早期遺伝子発現を示すが、後期遺伝子発現は示さない。マクロファージにおけるVVによるアポトーシスの誘導は、ミトコンドリア膜電位の低下を誘導し、Bcl-2ファミリーの抗アポトーシスメンバーであるBcl-x（L）レベルの変化に関連する。サル痘は

ヒト間で容易に伝染しないにもかかわらず、それは天然痘、ワクシニアおよび牛痘と協働して、共通の類似性を有する皮膚病変を引き起こす。下気道上皮が主な標的となったが、扁桃および下顎節にリンパ組織が関与していることから、これらのリンパ組織は早期に感染していることが示唆された。この病理は、単球細胞関連ウイルス血症を介したウイルスの広範なリンパ行性播種を示し、単核食細胞樹状細胞系はリンパ組織内の主な標的であり、かつまた、他の全身部位への侵入手段も提供した。サル痘感染の病変。すべての部位は壊死していた。選択された病変の末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介デオキシウリジン三リン酸ニックエンド標識（TUNEL）染色は、リンパ系組織および上皮組織内の細胞死が大部分においてアポトーシスに起因することを示唆した。病原性およびウイルス学的類似性（サル痘、ワクシニア、牛痘、および天然痘はオルソポックスウイルス属のメンバーであり、ヒトに感染して皮膚病変を引き起こすことができる）に基づくと、天然痘病変もまた部分的にはアポトーシス過程によって発達すると考えられる。

【００９８】

天然痘で起こると考えられている分子病理学的過程は、GSH濃度を低下させる：（a）NO産生の増加によるiNOSの誘導、（b）スーパーオキシドの生成、（c）ペルオキシナイトライトの形成、（d）ROSおよびRNSのGSHを消費する連鎖反応、（e）TNFα関連酸化ストレス、アラキドン酸酸化の増加によるCox-2の誘導、（g）感染部位および炎症部位における食作用に関与するマクロファージからの酸化的バースト、ならびに関連カスケード。細胞内GSHの損失により、天然痘感染において誘導されるアポトーシス過程のタイプには、GSH喪失およびミトコンドリアおよびサイトゾルにおけるレドックスの減少によって引き起こされるものが含まれる。Penningerは、ΔΨ[m]、ミトコンドリア透過性移行細孔（PT）、シトクロムcの放出およびアポトーシス誘導因子の放出をもたらす外側ミトコンドリア膜完全性の破壊、ならびに、GSHを含むいくつかの修飾因子の時間的側面を含む、ミトコンドリアの役割を要約した。

【００９９】

有意な量のプロカスパーゼ-3がミトコンドリアにおいて見出される。Jurkat細胞の研究は、プロカスパーゼ-3が「シャペロン」タンパク質と共にミトコンドリア内のアポトーシス前複合体に存在することを示している。GSHをブチオニンスルホキシミンにより枯渇させた他のアポトーシス研究では、アポトーシスの予防または遅延において決定的に重要なBcl-2タンパク質が分解された。この研究でGSHを細胞に添加する有益な効果は、GSHの直接的な効果ではなく、恐らくBcl-2タンパク質の分解の防止であった。Fasがヒト活性化好中球におけるアポトーシスをトリガーする場合、その後のアポトーシス過程の阻害は、外因性GSHで細胞内GSHレベルを増加させることによって達成され得る。好中球アポトーシスのためのFas誘導シグナル伝達は、レドックス感受性様式で阻害され得る。

【０１００】

1価のチオール反応性化合物は、胸腺細胞においてそれらのモデル系によって誘導されるアポトーシスを阻害し、さらに、重要なチオールは、ミトコンドリアマトリックスに局在している可能性がある。スーパーオキシドアニオンの過剰生成、内部ミトコンドリア膜の化合物の酸化、非酸化型GSHの枯渇は、様々なアポトーシスモデルに対するものであった。原形質膜上およびミトコンドリア上のGSHトランスポーターの存在は十分に詳述されており、これらは、投与されたGSHの細胞内およびミトコンドリア内分布を確実にする分子的/細胞的手段を提供する。

【０１０１】

GSHは、GSHペルオキシダーゼおよびGSH S-トランスフェラーゼを介して、アラキドン酸の酸化の制御を補助し、それによって、過度に炎症誘発性かつ不都合なほどにアポトーシス性および免疫抑制性である、脂質ヒドロペルオキシド、イソエイコサノイドおよびエイコサノイドを減少させる。用語について、エイコサノイドは、酵素によって形成されるプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエン及びリポキシンを含み、イソエイコサノイドは、フリーラジカル反応により駆動される非酵素的に形成された異性体である。GSHペルオキシダーゼおよびS-トランスフェラーゼは保護的であり、通常は脂質ヒドロペ

ルオキシドを、それらが細胞傷害を拡大する前に分解する。しかし、それらはGSHを必要とし、それは、重度の感染症の過程においていくつかの要因によって誘導される酸化ストレスによって、例えば活性化されたマクロファージによる酸化的バースト、スーパーオキシドの過剰生成、TNFα生成型酸化ストレス、アラキドン酸酸化の増加を伴うCox-2の誘導、ならびに、一酸化窒素およびニトロソ化GSHの形成の増加を伴うiNOSの誘導によって、損なわれ得る。

【０１０２】

ホスホグリセリドのグリセロール骨格のC-2は一般に、アラキドネートなどの多価不飽和脂肪酸アシル鎖にエステル化され、C-2エステルはホスホリパーゼA_2（PLA_2）による作用を受け、それによって遊離アラキドン酸を放出する。これらの多価不飽和物は、シクロオキシゲナーゼおよびリポキシゲナーゼによる自発的または酵素的な過酸化に高度に供される、なぜならそれらの不飽和（二重結合）炭素は結合していない、すなわち介在する単結合炭素によって分離されているからであり、これは、4～5個の炭素の「広がり」に亘って結合電子が分布しているためにそのC-H結合が活性化されているので、αメチレンとして分類される。従って、α-メチレン炭素からの水素の抽出は、分子酸素ラジカルによって容易に起こり、他の活性種によって即座に攻撃される炭素ラジカルが残り、最終生成物は一般に、炭素に結合したヒドロペルオキシド（-OOH）である（LOOH）。これらの脂質過酸化物は不安定であり、分裂して、他のαメチレン炭素を攻撃することができるアルコキシとヒドロキシルラジカルを生成する[LOOH→LO●+●OH]。アラキドネートおよび他の多価不飽和物の過酸化は、膜およびミセル内で起こり得、それらの分裂生成物が、膜構造を変化させかつ膜タンパク質および膜関連DNAを攻撃する細胞毒性連鎖反応を開始し得る。激しい脂質過酸化から細胞を保護する制御機構は多数存在している：例えば、固有の膜構造、通常は低レベルのPLA_2活性、親油性抗酸化剤、および、分裂前にLOOHを分解する酵素、例えばGSHペルオキシダーゼやGSH S-トランスフェラーゼ。

【０１０３】

IL-4を発現するように遺伝子操作により作製されたVV。一例において、単独のまたはIL-4と組み合わされた（vv M2/IL-4）呼吸器合胞体ウイルスエピトープ（M2）を発現する組換えVVは、除去がより困難になり、抗ウイルス性細胞毒性リンパ球応答を誘導することが著しく弱まり、感染した実験動物をより迅速に死亡させる。急性ウイルス感染におけるIL-4の過剰発現のこれらの不都合な効果は、遺伝子操作なしで起こりうる。加齢、糖尿病、化学毒素への曝露経験に起因するか、または重篤な感染症の過程の際の、細胞内GSH濃度の不足は、Th2経路に対する免疫応答パターンを歪め、不利益なアップレギュレーションおよび増加したIL-4発現をもたらす。急性ウイルス感染の際のIL-4の欠点には、脂質ヒドロペルオキシド（LOOH）の過剰形成をもたらすシクロオキシゲナーゼ（COX-2）およびリポキシゲナーゼ（5-、12-、15-）のアップレギュレーション、ならびに、LOOHを分解する保護酵素（GSHペルオキシダーゼおよびGSH S-トランスフェラーゼ）の同時ダウンレギュレーションがある。IL-4によるこの逆調節のヒト末梢単球研究は、これらの調節過程がインビボでも起こることを示している。アラキドン酸オキシゲナーゼおよびリン脂質ヒドロペルオキシドGSHペルオキシダーゼ活性を、IL-4を全身的に過剰発現するトランスジェニックマウスの様々な組織においてアッセイした。トランスジェニックマウスを近交系対照と比較した場合、肺、脾臓、腎臓および心臓においてアラキドン酸オキシゲナーゼ活性の増加が検出された。リン脂質ヒドロペルオキシドGSHペルオキシダーゼ活性は、トランスジェニック動物の肺、肝臓、および脾臓において損なわれていた。15-リポキシゲナーゼ活性に由来する15-HPETEおよびいくつかの他のヒドロペルオキシ脂肪酸は、慢性的にHIV感染したT細胞株（8E5）に対して致死的である。なぜなら、8E5 T細胞株に固有のGSHペルオキシダーゼ活性が著しく低下するからである。したがって、ウイルス遺伝子操作によって過剰発現される場合のIL-4、またはTh2に対するTヘルパー応答パターンを歪める不十分なGSH濃度は、12-および15-リポキシゲナーゼをアップレギュレートして12-および15-HPETEの産生量を増加させることによって、ヒドロペルオキシドの致死的な蓄積をもたらす可能性がある。関連するGSHペルオキシダーゼがIL-4によってダウンレギュレートされてい

るため、これらは、より毒性の低い12-および15-HETEに還元され得ない。加えて、急性炎症およびNFκB活性化の過程で、COX-2が誘導される。Cox-2の誘導は、それらのモデル系において、GSH、N-アセチルシステイン、およびピロリジンジチオカルバメート（PDTC）によって阻害することができた。

【０１０４】

細胞内濃度を効果的に補充して維持するGSH療法は、過剰に恵まれたTh2応答パターンの結果として産生されるIL-4をダウンレギュレートすることができなければならず、かつまた、45歳以上において、糖尿病患者において、化学的に曝露された際に、および、重篤な重度の感染症を有する患者においてTh2サイトカインをもたらす可能性のあるGSH機能不全を正さなければならない。GSH治療の結果には、12-および15-リポキシゲナーゼのダウンレギュレーション、GSHペルオキシダーゼのアップレギュレーション、ならびにCox-2の誘導を含むNFκBカスケードのダウンレギュレーションが含まれ得る。これらの好都合な生化学的結果は、天然痘感染に伴う細胞毒性および組織毒性の防止および低減をもたらす補助となるであろう。

【０１０５】

Th2サイトカインは、重度の感染症の際に、Th2細胞において優先的に発現されるホスホリパーゼA2（PLA2）の群の発現を促進することにおける、さらなる欠点を有する。PLA2は、細胞膜のいずれかの側の水相と膜である凝縮した脂質相との界面で界面触媒活性を行うことによって、アラキドン酸を放出する。PLA2酵素は、哺乳動物細胞において構造的に多様であり、様々な条件に対して応答する。1つの群のPLA2は、IL-1、TNFαおよびIL-6などのサイトカインによって誘導可能であることおよび、抗炎症性グルココルチコイドによって抑制されることが見出された。Th1クローンおよび細胞と比較してマウスTh2クローンおよびインビトロ分化マウスCD4 Th2細胞において選択的に発現されるPLA2の新しい群（群XII、具体的にはGXII-2 PLA2）が同定された。抗CD3刺激は、Th1細胞と比較してTh2細胞においてGXII PLA2をアップレギュレートした。この新規なPLA2群は、即時の第2シグナルの放出および下流のエイコサノイドの生成によってTh2細胞の応答性を増強すると考えられる。前述のように、GSH濃度は多数の因子によって損なわれていることからTh2応答パターンが重篤な感染症の際にアップレギュレートされる場合、Th2における特定のPLA2の触媒活性増強が累積の細胞毒性および組織毒性を促進すると考えられる。

【０１０６】

最後に、対応するLOHに還元されない脂質ヒドロペルオキシド（LOOH）は、4-ヒドロキシノネナール（HNE）を含む毒性のアポトーシス性生成物を生成する。LOOH生成物であるHNEは、有意な組織損傷およびアポトーシスを誘導した。GSHは、単球-マクロファージの特定の実験モデルにおいて、HNEの結合によるマクロファージ死を防ぎ、それによって非毒性を与え、これは、さもなくば細胞毒性および組織毒性を引き起こす反応中間体を中和するGSHのこの特性の最後の例である。GSHは、異なってはいるが、γグルタミル残基由来の両性イオンを有するGSHの綿密に配置されたチオールのおかげでGSHによって改善するための共通の能力を有する複数の経路によって生じる細胞毒性および組織毒性を、防止および低減することができる。

【０１０７】

GSH対HIVで起こるように、GSHのチオール部分は、感染の際に合成される熱力学的安定性の低いウイルスタンパク質を無効にし得る安全な翻訳後タンパク質修飾が可能である。妨害され得る天然痘タンパク質には、ウイルス複製に関与するもの、具体的には、コードされたウイルスDNAトポイソメラーゼ、および宿主免疫防御の回避に関与するものが含まれる。

【０１０８】

システイン残基およびアミノ酸配列は、構造的および機能的有用性のためにタンパク質のフォールディング立体構造を決定する主要な因子の1つである。正常細胞は、特定のタンパク質に対して必要な熱力学的安定性を有する分子内および鎖間結合のためのジスルフィドを形成するので、かなりの「努力」が費やされる。いくつかのタンパク質ジスルフィ

ドは、酵素、規則的なシグナル伝達および応答性受容体の調節を可能にするレドックス変化を受けるために、容易にアクセス可能でなければならない。さらに他のタンパク質は、迅速な代謝回転のために設計されており、交換の準備の際に容易にアンフォールディングおよび解体されなければならない。

【０１０９】

正常な宿主タンパク質のフォールディングは、最終的なフォールディング状態を安定化する、複雑で制御された相互作用によって導かれる。アミノ酸配列に加えて、[H+]およびタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（PDI）、ペプチジルプロピルイソメラーゼ（PPIアーゼ）および分子シャペロンなどの酵素を含む多数の因子が、フォールディングに影響する。PDIは、動力学的に捕捉された中間体においてジスルフィド交換を促進し、最も安定なタンパク質構成が達成されるまで、これらのジスルフィドをシャッフリングする。PDIは、このシャフリングを数千倍に高速化する。ペプチド結合がほとんど常にトランス配置であるため、PPIアーゼは、シスをトランス異性化に促進する。分子シャペロンは、タンパク質中間体の不適切な分子間相互作用を阻害し、ATPを消費して捕捉された中間体をほどく。これらのステップは、タンパク質の安定性のために必要であり、PDI、PPI、および分子シャペロンと共に多くのエネルギー資源を必要とする。

【０１１０】

熱ショックタンパク質（HSP33は、ジスルフィド結合に依存してそれ自体で非常に強力な分子シャペロンである。Hsp33は、6個のシステイン残基を有する。これらは、その化学的に還元された形態である場合には、Hsp33は非活性であり、いかなるフォールディングヘルパー活性も示さない。しかし、過酸化水素などの酸化環境下では、Hsp33が活性化し、小胞体の容易に目詰まりしたタンパク質フォールディング細胞内区画内で、捕捉されたタンパク質/ポリペプチド中間体をほどくことによって、その機能を再開する。質量分析（マトリックス支援レーザー脱離/イオン化MS、MALDI-MS）は、H_2O_2によるHsp33の活性化が、Hsp33の2つの分子内ジスルフィド結合、Cys(232)-S-S Cys(234)およびCys(265)-S-S(268)の形成を伴っていたことを実証した。システイン残基のアクセシビリティもまた強調された。例えば、6つのシステイン残基の一つであるCys(239)は、Hsp33が活性である場合に、不十分にアクセス可能であり、H_2O_2の曝露にもかかわらず還元されたままであり、したがって、化学修飾に対して非常に反応性である6番目のシステイン、Cys(141)とは反応せず、このことは、アミノ酸配列などの他の因子および他のアミノ酸/ペプチドの特性もまた、タンパク質のフォールディングに重要であることを実証する。

【０１１１】

非悪性であり感染していない真核細胞では、多くのATPを消費する「品質管理」がジスルフィドになる。対照的に、ポックスウイルスタンパク質の合成は、感染した細胞内の細胞質エンクレーブ内で進行し、タンパク質ジスルフィドの熱力学的安定性の秩序ある試験の利点をもたず、また、3つの群の「試験」タンパク質（タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、ペプチジルプロリルイソメラーゼおよび分子シャペロン）の進行中の合成を支える安定した十分なATPの供給もない。これは、細胞傷害性、特にDNAトポイソメラーゼおよび回避タンパク質を伴わずに、バリオラ（Variola）の重要なタンパク質チオールを安全に還元および/またはグルタチオン化することにおけるGSHの翻訳後選択の基礎を提供する。

【０１１２】

単核細胞/マクロファージなどのいくつかのウイルス感染宿主細胞内のレドックス環境は、一般的に低く、TNFα；NADPHオキシダーゼ；誘導されたCOX-2により過剰に産生された脂質ヒドロペルオキシド（LOOHの→LO●＋●OH）のホモリシス開裂から生じるアルコキシおよびヒドロキシルフリーラジカル；およびiNOS誘発に伴う活性窒素種（RNS）によって生成される反応性中間体の抑制下の、GSHの過剰利用に続いて生じる。HIVおよび他の感染における低GSH濃度は、感染単核細胞/マクロファージ内で合成されたウイルスタンパク質におけるジスルフィド形成および広範なタンパク質フォールディングに寄与する酸化環境を促進する。HIV複製速度は、GSHレドックスが減少すると急速になり、NFκBのレドッ

クス感受性活性化を引き起こし、これが、次に、末端反復配列（LTR）のNFκB結合部位を介して核内に統合されたHIVプロウイルスDNAを活性化する。HIVタンパク質は、この酸化的環境においてジスルフィドとして結合したシステイン残基を有すると予想される。

【０１１３】

ウイルスの末端反復配列からの転写を特異的に活性化するコードされたHIV TATタンパク質が研究され、その活性は強い還元剤によるタンパク質のプレインキュベーションによって劇的に阻害される。これらの結果は、TATのシステイン残基が分子内ジスルフィド結合の形成に関与していることを示唆する。外因性GSHは、主要エンベロープ糖タンパク質であるgp120の発現の選択的減少をもたらし、鎖内ジスルフィド結合を豊富にし、したがって、GSHなどの還元剤の効果に潜在的に感受性となると共に、慢性的に感染した細胞（マクロファージまたはリンパ球のいずれか）からのウイルス粒子のウイルス感染性の出芽および放出を強く抑制する。GSHは、ヘルペスウイルス1型（DNAウイルス）またはセンダイ（RNAウイルス）に曝露された細胞と同様に、後期のウイルス複製に干渉することができ、このことは、GSHによるウイルス複製の抑制がエンベロープ糖タンパク質の選択的阻害に関連することを示している。

【０１１４】

細胞内GSH含有量は、ヒトマクロファージにおけるHIV複製に対して効果を有する。インビトロでのHIV-1感染は、ヒトマクロファージにおける細胞内還元型GSHの有意な減少を誘導する。このような減少は、感染細胞からのウイルスの最大放出に対応する感染時に観察され、細胞の細胞傷害性に関連しなかった。マクロファージのBSO（ブチオニンスルホキシミン）による処理は、上清中のHIV収量を有意に増加させた。外因性GSHは、p24 gagタンパク質の産生およびウイルス感染性を強く抑制した。GSH抗ウイルス効果はウイルス複製の後期に起こり、特にジスルフィド結合が豊富なgp120などの特定の糖タンパク質の選択的減少に関連していた。HIV TATタンパク質およびgp120の中のジスルフィドの関与に加える。

【０１１５】

HIV-1プロテアーゼの2つの保存されたシステインは、プロテアーゼ活性の調節に関与している可能性がある。ジグルタチオン化野生型プロテアーゼ（Cys-67-SSG、Cys-95-SSG）およびモノグルチオニル化（monogluthionylated）プロテアーゼ変異体（C67A、Cys-95-SSGおよびC95A、Cys-67-SSG）は、チオールトランスフェラーゼ（グルタレドキシン）の潜在的基質である。低チオールトランスフェラーゼ濃度（5nM）では、ほぼCys-95-SSGでのみ脱グルタチオン化が起こった。実質的により多くのチオールトランスフェラーゼ（100nM）では、Cys-67-SSGは部分的に脱グルタチオン化されたが、Cys-95-SSGの還元率は20％のみであった。ジグルタチオン化プロテアーゼのチオール転移酵素による処理は、プロテアーゼ活性を回復させるだけでなく、完全に還元された形態と比較して3～5倍高い比活性を有する酵素調製物を生成した。結果は、チオールトランスフェラーゼが調節および/または維持に関与することを意味する。

【０１１６】

HIVのGp120タンパク質はまた、ウイルスのCD4+受容体への結合手段としてだけでなく、毒性サイトカイン、TNFα（フリーラジカル反応および体重減少も引き起こす）の活性を増幅する。TNFαはまた、NFκBを活性化し、次いで、HIV複製を刺激する。したがって、gp120タンパク質は、NFκBを活性化し且つHIV複製を増加させるTNFαを増強する。gp120タンパク質は、細胞のレドックス状態を変化させ、H_2O_2産生を増加させ、このことは、タンパク質中のジスルフィド形成を確実にする。gp120のこの活性は、GSHの減少および酸化されたGSSGの増加を引き起こす。gp120タンパク質は、フリーラジカル酸化ストレスを増大させるシグナルを伝達するp56 lckタンパク質チロシンキナーゼを介してこれらの作用を発揮する。これらのHIV研究では、重大なHIVジスルフィドが生化学的に還元されてHIVに害を及ぼした場合、明らかに細胞傷害性の所見はなかった。他のHIV研究では、外因性のGSHを添加し、ウイルス阻害が明白であった場合、単球/マクロファージにおける検出可能な細胞毒性を生じることなく、インビトロで、35日間、GSHの持続的な抗HIV効果について

特定の観察が行われた。

【０１１７】

トポイソメラーゼは、鎖の分離を必要とするプロセス（例えば、転写、組換えおよび複製）のために、スーパーコイル二本鎖DNAの一方または両方の鎖にニックを入れるSHタンパク質である。これは、DNA、一方または両方の鎖の切断；およびDNA切断の再連結によって達成される。多くのトポイソメラーゼが存在し、これらの酵素の発見者の一人であるJames Wangがそれらをさらに記載している。とりわけ、2つの主なカテゴリーは、1つの鎖のみを切断するタイプIトポイソメラーゼ、および両方の鎖を切断するタイプIIである。タイプIIトポイソメラーゼがDNAを切断した後（ATPが必要）、切断された各DNA鎖の5'-リン酸末端は、活性部位の特定のチロシン残基に結合することによって、酵素に付着したままである。したがって、切断されたDNAの2つの末端は、トポイソメラーゼに「固定された」ままである。さもなければ、2つの切断された末端は、自由に回転し、DNAのトポロジーおよび機能を大いに妨害する。トポイソメラーゼは、抗生物質対バクテリア、および化学療法剤対癌の標的化に成功している。抗生物質の使用に関しては、原核生物のDNAジャイレース（150）は真核生物のものよりもより感受性がある。キノロン抗生物質は強力な医薬品であり、トポイソメラーゼII（DNAジャイレース）およびトポイソメラーゼIVを特異的に阻害する。ヒト細胞と比較して、ウイルスにおける阻害剤に対するトポイソメラーゼの差異に基づく感受性の概念は、関連性がある。すべてのトポイソメラーゼの特定の脆弱性は、一時的な二本鎖切断を生成することによってDNAのトポロジーを改変する際のそれらの複雑な作用メカニズムである。トポイソメラーゼの二重機能、すなわち触媒作用および再連結は、トポイソメラーゼのサブユニット間相互作用に結合し、影響を及ぼして、「全体的」効果を達成する、システイン残基の無妨害の反応性を必要とする。

【０１１８】

これらのシステイン残基はアクセス可能であり、標的化されている。キノイド阻害剤は以下に記載される。これらのタンパク質チオールの反応性およびアクセシビリティに加えて、活性部位Tyr-274は、ウイルス含有の活性化マクロファージによって生成される一酸化窒素の標的として働くことができる。ニトロチロシンの形成は、感染した一酸化窒素生成マクロファージ内で、GSH作用によって増強することができる：（a）タンパク質ジスルフィドを還元すること、および/または遊離タンパク質チオールをグルタチオン化することにより、分子内および鎖間ジスルフィドが還元および/またはグルタチオン化され；トポイソメラーゼのサブユニットが、部分的には、触媒作用および再連結の二重作用のために鎖間のジスルフィドに依存するために、いくらかのアンフォールディングが可能になる；ならびに（b）ペルオキシナイトライト形成を防ぎ、それにより、Tyr-274のニトロソ化のための一酸化窒素の利用可能性を維持すること；ニトロソGSHは自発的に形成され、「秩序ある」一酸化窒素供与体として働く。

【０１１９】

ワクシニアDNAトポイソメラーゼの活性部位チロシンの置換は、酵素を部位特異的エンドヌクレアーゼに変換する。通常、この酵素のTyr-274は、3^1-ホスホジエステル結合を介してDNA中の特定のリン酸に結合し、VVトポイソメラーゼは、二本鎖DNAの認識部位で共有結合タンパク質-DNA中間体を形成する。ヌクレオチドは、3'-ホスホジエステル結合を介して酵素のTyr-274に連結される。グルタメート、システインまたはヒスチジンによるTyr-274の置換は、二本鎖DNAを切断する限り酵素的に活性のままであるが、3'-ホスホジエステル結合が形成されないので再連結は起こらず、Tyr-274のOHが必要である。変異置換の産物は、3'-リン酸末端を有する認識部位でのエンドヌクレアーゼ的に切断された60bpの二本鎖DNAである。ウイルスタンパク質システイン残基の生化学的還元またはそれらのグルタチオン化により、活性部位チロシン、Try-274が露出されるようになり、ニトロソ化反応に利用可能になり、ニトロチロシンを形成する可能性がある。GSHは、活性窒素種（RNS）の異常反応を減少させ、ペルオキシナイトライトが形成されにくくなるように一酸化窒素を保護して、より多くが抗ウイルスタンパク質のニトロソ化に利用可能になる。

【０１２０】

このウイルスは、iNOSの誘導の後、増加した一酸化窒素を生成する感染した活性化単核細胞/マクロファージ内に存在するため、これらの細胞内のウイルストポイソメラーゼにおいてニトロチロシンを形成する選択性の尺度があり、それによって酵素を安全に阻害する。

【０１２１】

チオールと反応するキノンを含む様々なチオール反応性化合物、ならびに3つの他の強力なチオール反応剤、N-エチルマレイミド（NEM）；ジスルフィラム；および有機ジスルフィド[2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン)]による、トポイソメラーゼIIのチオールアルキル化は、「全体的」活性を阻害する可能性がある。これらの全てがトポイソメラーゼII媒介性DNA切断を引き起こした。トポイソメラーゼはエンドヌクレアーゼとして作用した。実際、これらの剤は、全てのシステイン残基がアラニンで置換された変異型酵母TOP2（システインレスTOP2）を用いて、トポイソメラーゼのシステイン残基と逆反応した。この置換は、チオール反応性キノンによって誘導されるTOP2媒介性DNA切断を完全に廃止した。トポイソメラーゼシステイン残基は、いくつかのケースでは、HIVの以前のサブセクションに示されているように、アクセス可能なシステインをグルタチオン化することができるチオール化物質、例えばGSHにアクセス可能である。トポイソメラーゼII-DNA複合体上のチオール残基が露出され、ナフトキノンによってアルキル化され、それによって、キノンによるトポイソメラーゼIIの毒を加えた生体模倣モデルが提供された。トポイソメラーゼIIは、塩素化ビフェニル（環境汚染物質）のキノン代謝産物の反応性を決定するためのSH含有酵素のモデル系である。GSHへのこれらのキノンの結合は、トポイソメラーゼIIにおけるタンパク質SH基へのそれらの結合と平行しており、これは、PCB代謝によって生成される観察されたDNA鎖切断の可能なメカニズムである。トポイソメラーゼシステイン残基は、多数の細菌のトポイソメラーゼII（DNAジャイレース）に対するキノロン抗生物質対のようないくつかの細菌性トポイソメラーゼ阻害剤に類似したウイルストポイソメラーゼによって、おそらく大きな脆弱性を伴い、外因性GSHにアクセス可能であり感受性である可能性がある。

【０１２２】

タンパク質をその最適な構造に折り畳む分子内および鎖間ジスルフィド結合の形成は、以前に記載されたPDI、PPIアーゼ、分子シャペロン、シャペロンおよびこれらの「品質管理」タンパク質の合成のための豊富なATPのような、「品質管理」試験を通じて、正常の環境下で行われる。対照的に、ウイルスタンパク質、exHIV Tat、gp120、およびプロテアーゼは、ウイルス感染細胞の細胞内環境が活性化され、応答して、NFκB誘導されたiNOSからの一酸化窒素を含む易感染性生体エネルギー論および宿主応答により無秩序であるため、一般に、最適でない環境下で行われる。NOは、ペルオキシナイトライトを形成するように転用されない限り、ウイルスタンパク質が新生ポリペプチド鎖として形成されている場合に、比較的露出されるチロシン残基およびシステイン残基を有する付加物を形成するために利用可能である。活性化された感染単核細胞/マクロファージ内のこれらの新生鎖中にニトロチロシンおよびニトロソチオールを形成する可能性は重要であり得る。しかし、病理学的に成功したポックスウイルス（例えば、天然痘など）は、ウイルスが宿主の免疫応答を回避することを可能にするタンパク質をコードする。これらの回避タンパク質は、以下により詳細に記載されるように、病原性と相関する。それらは、それらを無効にする宿主防御因子、NFκB、TNFα、IFNγ、IL-18、樹状細胞の炎症性サイトカインカスケードの成分の大部分、補体、ケモカイン、および阻害剤と、直接および間接的に相互作用し、それによって、NK細胞を介した先天性免疫を無効にし、T細胞による免疫を獲得した。致命的なポックスウイルス感染の結果は、早期であり、「サイレント」であり、無妨害のウイルス複製であり、拡散される。宿主細胞が、バリオラ曝露の約10日後に炎症反応に反応し始めると、防御因子は、多数のビリオンによって圧倒される。患者は今や異常高熱症で寝込み、死に直面している。

【０１２３】

単核細胞-マクロファージおよびT細胞の応答において最も重症である細胞内GSHの侵食

は、回復の機会を得るために必要とされるものとは反対に、IL-12、IFNγ、および特異的な抗バリオラ細胞溶解細胞の抑制を伴う、Th0細胞を、増加したIL-4産生を含むTh2応答パターンにシフトさせる。GSHの特性、好ましいGSH製剤の性質、およびGSHトランスポーターの遍在性の存在に基づいて、GSH投与では次の反応が起こるはずである：（ビリオン構造、ウイルス複製および回避のための）ポックスタンパク質におけるアクセス可能なシステイン残基が、熱力学的に不十分なジスルフィドとして存在する場合には、減少する；および曝露されたシステイン残基は、特に新生バリオラポリペプチド鎖上で、混合ジスルフィド結合の形成を通じてグルタチオン化され得る。

【０１２４】

ポックスウイルスのゲノムは、細胞および合成レベルの両方で、宿主プロセスと相互作用する多くのタンパク質をコードし、それらのタンパク質のいくつかは走化性物質の発生を妨げ、または古典的な補体経路の活性化を妨害する。牛痘ウイルスの38kDaタンパク質は、ウイルス複製の間に誘発される走化性分子の生成を阻害する。

【０１２５】

回避タンパク質対宿主応答の様々な例：アポトーシスに対抗し、ケモカインを捕獲し、補体を補完し、インターフェロンを妨害し、およびインターロイキンを妨害する。以下は、ポックスウイルスによってコードされ、感染細胞によって産生される回避タンパク質の範囲のサンプリングを表す：エクトロメリア、ワクシニアおよび牛痘によるIL-18結合タンパク質；牛痘、エクトロメリアおよびラクダ痘によるTNF受容体、ワクシニアウイルス35-kDaタンパク質（VV-35kDa）によるCCケモカイン阻害剤；牛痘ウイルスによるNFκB阻害；ワクシニアウイルスによる、ヒトC3bおよびC6を不活性化する補体調節タンパク質；エクトロメリアによる、細胞内で逆方向シグナル伝達を誘導し、インターフェロンγ産生細胞の生成を阻止し、およびTh1応答を強く阻害するがTh2は阻害しないCD30相同体。

【０１２６】

高GSHレベルは、血小板、血管内皮細胞、マクロファージ、細胞傷害性Tリンパ球、および他の免疫系構成要素の適切な機能のために必要であることが実証されている。最近、HIV感染患者は、血漿、他の体液、およびGSH合成の欠陥に起因するようには見えないマクロファージのようなある種の細胞において、低GSHレベルを示すことが発見されている。

【０１２７】

天然痘

天然痘は、バチルス・アントラシス（Bacillus anthracis）、エルシニア・ペスティス（Yersinia pestis）、フランシセラ・ツラレンシス（Francisella tularensis）、ボツリヌストキシン、ならびにフィロ（Filo）およびエボラ（Ebola）や出血熱などのアレナウイルスと共に、クラスAバイオテロ剤に分類される。専門家は、天然痘の伝染に必要なのはほんのわずかのビリオンであると考えている。サイトカインであるインターロイキン-4（IL-4）の追加の遺伝子コピーを有する生物工学で作製された天然痘の考え方は多少不確定であるが、IL-4が過剰発現されると、それはIL-12、IFNγおよび特異的な細胞媒介性免疫を抑制し、生存および急性ウイルス感染からの回復のために、決定的な因子が必要とされる。罹患率と死亡率を低下させるように働く医薬品は、天然痘バイオテロリズム、生物兵器およびその脅威の成功した管理を補完するのに役立つだろう。安全な薬は、秩序ある「スクリーニングされた」ワクチン接種にロジスティック的妨げがある場合、「補充する（fill in）」。天然痘テロリズムに対する戦略全体において、重要なポイントは、潜在的に曝露された個体にインキュベーションの「7日間の窓」内でワクチンを送達し、投与することである。医薬品GSHは安全であり、個人が最初の曝露後7日間以内であるかどうか疑わしい場合には、「補充する」ことができる。医薬品GSHは、教育および予防接種を強化するための包括的な盾の一部として機能することができる。医薬品GSHの投与は、ワクチン接種の有効性を妨げるものではなく、以下に記載され、参照されるTh2免疫学的応答パターンに対してTh1を促進する際に、GSHの好都合な効果を考慮して助けとなるであろう。分岐した針によって与えられる天然痘ワクチンは、強力なワクシニアウイルス特異的CD8（+）CTLおよびIFNγ産生T細胞応答を誘導する。これらは、単球/マクロファージ、樹

状細胞およびBリンパ球内の正常な細胞内濃度に存在する限り、GSHが増強する応答である。「集団」内のワクチンおよび他のものの「7日間の窓」を越える人々のための医薬品ベースの罹患率の減少の中心は、組織および細胞レベルの天然痘の分子病理、進行の原因となる宿主因子、および死亡の原因を含む主要なプロセスの問題である。天然痘の細胞変性作用は死を引き起こし、このデータは、膿疱から播種された細菌性敗血症症候群が死に起因するという以前に公表された理論を支持しなかった。死は通常、病気の2週間目（最初の曝露後3～4週間）に発生し、循環免疫複合体および可溶性バリオラ抗原に関連する毒血症による結果である可能性が最も高い。高用量の医薬品GSHは、細胞内GSH濃度を補充および維持し、それによって、組織、細胞および分子レベルで天然痘の病理を阻止する、安全で積極的な能力を果たすであろう。天然痘に曝露された場合、GSHは感染の完全な発症を阻止することができ、おそらく、予防接種を受けた人に発生する天然痘に匹敵する軽度の形態（10～20年前、またはアラストリム（Alastrim）、すなわち小痘瘡）に変換する。GSHトランスポーターは、細胞膜上およびミトコンドリア内に存在し、したがって、細胞外液由来のGSHは、細胞内区画へのアクセスを有する。GSHはIFNγを増加させることができ、これは次に一酸化窒素シンターゼ（iNOS）を誘導し、ウイルス血症を消失させる強力な抗菌性●NOを増加させ；TNFα、IL-1β、COX-2および患者の「毒性」状態に寄与する他のサイトカインと共に、NFκB活性化を抑制することができるので、過剰な炎症性サイトカインに関連する毒血症を低減する。

【０１２８】

曝露から始まり、2つの早期ウイルス血症を伴う無症候性ウイルス複製、前駆症状、発疹、その後の合併症、または回復、または死への天然痘の逐次臨床的提示は、特有の段階的病因を明らかにする：ウイルス血症を伴う無妨害且つ無症候性ウイルス複製に付随して起こる、初期の宿主防御細胞反応の阻止、その後の、重度の未調節の炎症反応のカスケード、皮膚毛細血管内のバリオラ含有白血球の局在化、皮膚に感染させるための毛細血管からの白血球の血管外漏出、破壊性発疹、毒血症、可溶性バリオラ抗原を伴う循環免疫複合体、および補体活性化など。

【０１２９】

バリオラを含むポックスウイルスは、通常、DNAトポイソメラーゼなどのような複製のためのタンパク質をコードし、感染した宿主細胞によって発現される場合に、NFκB活性化、ケモカイン、サイトカイン、IFNγ、補体断片、および細胞媒介性免疫を遮断することを含む、感染を含み、根絶するための宿主免疫学的戦略を鈍らせる。さらに、兵器化され、生物学的に改変されたポックス変異体は、免疫化された宿主の免疫学的戦略を鈍らせ、以前に遭遇しなかった病気の拡大および重症度のパターンにつながり得る、付加されたコードタンパク質と共に注入され得る。

【０１３０】

GSHの投与は、この段階でバリオラの病理に安全に対抗できる、以前に詳細かつ参照されたその特性を介して防御メカニズムを提供する。GSHはTh1応答パターンをアップレギュレートすることが知られており、早期に使用した場合、IL-12、IL-18、IFNγを増加させ、特異的細胞傷害性リンパ球を増強し、NK細胞活性を増強し、レドックス感受性保護応答を増加させ得る。

【０１３１】

無症候性バリオラ感染の初期では、樹状細胞、マクロファージおよびリンパ球の多くはまだ感染しておらず、GSHに最適に応答したままである。しかし、宿主応答は、可溶性で分泌される発現ウイルスタンパク質によって阻止され得る。これらは、まだ感染していない隣接細胞に悪影響を及ぼし得る。ポックスウイルスは、サイトカイン腫瘍壊死因子、IL-1β、IFN-γ、IFN-α/βおよびケモカインの受容体の可溶性バージョンをコードする。これらの可溶性ウイルスタンパク質は、非感染細胞および感染細胞の両方に結合し、それによって、インターフェロンおよび他の宿主反応の防御的、抗ウイルス的効果を無効にすることが見出された。可溶性ウイルスタンパク質は、それらがすべての細胞表面に結合するとき受容体として働き、無妨害のウイルスへのアクセスおよび新しい非感染細胞への侵

入を確実にする。したがって、感染は、新しい細胞が感染する前でさえ、宿主細胞防御を中和する。対抗する戦略は、適時の隔離、教育、および免疫化に加えて、（a）Th1応答をアップレギュレーションすることによって、ウイルスタンパク質に対して数的に挑戦的な量の防御生体分子を発生させ、（b）NK細胞のようなレドックス感受性の防御細胞を増加させ、および（c）ウイルス回避および複製タンパク質の感受性の立体構造のジスルフィド結合を攻撃する（減少させる）安全な医薬品として、GSHを含み得る。

【０１３２】

ワクチンを安全に摂取でき、確実に7日間以内に摂取できるもののうち、天然痘ワクチンが、曝露の可能性から7日以内の緊急投与に対して非常に有効であるという事実は、感染していないか、またはおそらく初期に感染した細胞集団でさえ、十分な量のIL-12、IL-18、IFNγ、およびNK細胞を刺激する因子を迅速に産生することができ、この初期において、ウイルス回避タンパク質を克服し、感染を停止させるバリオラ特異的CTLを得ることができる。天然痘ワクチンは、強力なワクシニアウイルス特異的CD8+CTL、およびIFNγ産生T細胞応答を誘導する。これらは、GSHがTh1応答、NK細胞活性および保護レドックス感受性応答を促進することによって急速に増強されるのと同じ生化学的および細胞応答である。ポックスタンパク質は、しばしばチオールおよびジスルフィドを介して、宿主タンパク質と直接的および生化学的に反応する。タンパク質-タンパク質相互作用は、正常に、および他の病的状態で生じる。あるものは化学量論的な傾向があり、他のものはそうでない傾向がある。これは、宿主の免疫応答を定量的に増強し、ポックスウイルスタンパク質の阻止を数値的に圧倒するために、高用量のGSH治療の早期使用の根拠を提供する。Th1応答パターンのアップレギュレーションは、バリオラ感染細胞を死滅させる特異的細胞傷害性リンパ球（CTL）の発生を含む。

【０１３３】

口腔咽頭または呼吸器粘膜へのウイルスの移植後に、自然感染が起こる。感染性の用量は不明であるが、ほんの数ビリオンであると考えられている。ウイルスが所属リンパ節に移動し、増殖した後、約3日目または4日目に無症候性ウイルス血症が発生し、その後、脾臓、骨髄およびリンパ節でウイルスが増殖する。

【０１３４】

GSHは、原因となるポックスタンパク質の供給源を排除するのに役立ち、宿主に有利な、有利で非化学量論的な結果を表す。GSHは、ThyoGen and Kyowa Hakko, Co., Ltd.によって製造されるような、非毒性のものである。第1/2相試験では、増加した範囲の経口用量が、末梢血単核球（PBMC）中のGSHの安全で顕著な用量関連増加を提供した。

【０１３５】

GSHのもう1つの有用な特性は、Th1経路およびレドックス感受性保護を促進することに加えて、GSHおよびウイルスタンパク質の直接的な翻訳後修飾を含む。GSHは、濃度のレドックス電位の変化の関数として、ジスルフィド結合を還元することによって、またはシステイン残基のチオールをグルタチオン化することによって、タンパク質、細胞シグナル伝達および他の反応を調節する。これは多くのタンパク質をアンフォールディングにして、一般的に、受容体への酵素およびリガンドの結合を阻害する。タンパク質のアンフォールディングはまた、例えば、ウイルスDNAトポイソメラーゼ中の活性部位チロシンを攻撃することができる一酸化窒素を産生する活性化マクロファージ内で、ニトロチロシンに有利にニトロシル化され得る、重要なチロシン部位を露出させる可能性がある。

【０１３６】

宿主タンパク質と比較して、感染宿主細胞によって発現されるウイルスタンパク質の熱力学的安定性の低下の可能性は、より低い安定性に基づく介入的機会を提供する。特にウイルス感染における、この特性の例には、他のHIVの例の中で、グルタチオン化HIVプロテアーゼが含まれる。HIV-1プロテアーゼの2つの保存されたシステイン（Cys-67、Cys-95）は容易にグルタチオン化され、著しく低い比活性を有する酵素調製物を生じる。GSHの除去は、酵素調製物の完全な活性を回復させた。ジスルフィド結合を不活性化する例は、HIV gp120の研究である。インビトロでのGSH曝露と共にHIV-1を複製することにより、ジス

ルフィド結合が特に豊富な、gp120などの特定の糖タンパク質の選択的な減少が生じた。HIV gp120に対するGSHの効果は、以前にインビトロでのウイルス感染性の減少を示す研究において実証された。これは、エンベロープ糖タンパク質、特に、鎖内ジスルフィド結合が豊富な、主要なそのようなタンパク質、gp120の選択的な阻害によるも可能性がある。ウイルスタンパク質のこれらのGSH修飾は、細胞傷害性なしに達成される。

【０１３７】

発熱および毒血症を有する初期症候性相である二次ウイルス血症は、曝露後8～14日で発症し、転写因子のNFκBファミリーの制御の活性化と欠損を誘導する。感染に伴う酸化ストレス、マクロファージ細胞膜上のNADPH活性化、およびGSHの消費量は、ヒストンアセチル化、およびNFκB依存性の広範な遺伝子ネットワークへのアクセスを与えるDNAの巻き戻しを活性化する。一方、NFκBが活性化されており、Th1サイトカインIL-12およびIFNγ、IFNγ依存性因子、IL-18、およびTh2サイトカインIL-4を含む炎症性サイトカインの過剰産生；IL-4の過剰産生；接着分子の過剰産生；マトリックスメタロプロテイナーゼの誘導；非制御性のシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）；エイコサノイドの加速合成；誘導性一酸化窒素シンターゼ（iNOS）の活性化；NFκBの遺伝子ネットワーク内の他の因子の中のケモカインがある。非制御性のLOOH；RNSの過剰、およびTNFαにより発生したフリーラジカル反応のような、これらの反応は、GSH濃度を損なう。これは、レドックス電位のさらなる低下、および急性炎症反応のさらなる強調を導く。Th1応答パターンはさらに低下し、IL-12およびIFNγは、GSHレベルが低下するように抑制される。特異的細胞傷害性リンパ球（CTL）の発達していないことは、ダウンレギュレーションされたTh1応答パターンの一部であり、Vバリオラ感染単核細胞の無妨害の拡散をもたらす。

【０１３８】

感染した単核細胞上および活性化された内皮上の接着分子の発現は、損傷した内皮への単核細胞の接着を引き起こす。これに続いて、損傷した毛細血管を介した感染細胞の血管外漏出が起こり、真皮に血管周囲の浸潤が形成される。その後、バリオラウイルスは、皮膚細胞、特に顔の皮脂腺や「水着」領域の皮膚細胞に感染して破壊するようになる。ICAM-1などの接着分子を含むNFκBの活性化、そのカスケードに関与する、病理学的プロセスの合理的代用例がある。スプラーグ・ドーリー（Sprague-Dawley）ラットで行われた中大脳動脈閉塞（MCAO）は、定量的リアルタイムRT-PCR分析を用いて測定可能な、脳虚血における接着分子を含む炎症性遺伝子発現を生じる。虚血再灌流脳損傷は、NFκBによって調節されているいくつかの、接着分子サイトカインの発現を伴う炎症反応を開始し、したがって、炎症性カスケードの開始に関与する誘導分子は、さらなる脳損傷をもたらす二次的細胞応答に寄与し得る。

【０１３９】

重篤な感染、虚血、およびGSH枯渇によって特徴付けられる他の状態で起こるように、酸化ストレス（脂質過酸化物、活性酸素種、活性窒素種）によって損傷を受けた血管において、様々なタイプの病的変化が生じる。2つの内皮細胞の間の接合部は「タイトな舗装道路（Tight Pavement）」であり、何も漏出することはありません。血が円滑に流れるように、滑らかでこびりつかない舗装道路である。これらの内張り細胞は、血管を広く開いて非粘着に保つ分子（例えば、亜酸化窒素およびPGI_2）を能動的に産生する。GSHは、亜酸化窒素とPGI_2がその重要な機能を果たすのを助けるために必須である。さもなければ、血管は非常に狭くなり、血小板や白血球のような血液成分が血管を「妨害する」。小動脈内の接着性白血球（直径約200μm）もまた、血管を傷つける物質を放出し、いくつかは、血管外漏出によって壁を移動して、周囲の組織細胞を攻撃し得る。これは、重篤な感染、虚血および他の疾患において、GSHの減少に続いて、白血球上および内皮細胞上の接着分子の生成により生じる。これは、皮膚細胞に侵入する準備として、バリオラ含有単核細胞が皮膚毛細血管にとどまった場合に見られるプロセスの一種である。いくつかの白血球は、その表面のNADPHオキシダーゼを活性化し、様々な直接的に破壊的な活性酸素種を産生する。この効果は、内皮に大きなクレーターおよび他の超構造的な不規則性を生じさせる可能性がある。小さな動脈の内皮に対するフリーラジカル損傷を引き起こした接着性白血

球の影響は、SEMによって観察することができる。クレーター形成および内張り細胞の無効化を観察することができる。これは、重篤な感染症、虚血およびGSH欠損によって特徴付けられる他の障害において生じる。これらのようなクレーターは、接着性白血球が存在する場合にのみ見られ、単球/マクロファージによって産生されるROSおよびRNSによる直接的な浸食を表し得る。内皮細胞の無効化はおそらく、基底膜物質および血管の他の支持分子に影響を与える、マトリックスMMPの産生の増加によって引き起こされる。

【０１４０】

二次ウイルス血症は、およそ8日目に始まり、発熱と毒血症が続く。白血球に含まれるこのウイルスは、その後、真皮の小血管ならびに口腔および咽頭粘膜に局在し、続いて隣接する細胞に感染する。典型的な皮膚病変は、真皮の毛細血管の変化から始まり、拡張、内皮細胞増殖および血管周囲の単核細胞浸潤によって特徴付けられる。隣接する表皮では、細胞の網状変性が起こる。細胞が膨潤し、特有のグアルネリ体が出現する。これらは、核の近くに位置する球体であり、2～8ミクロンのサイズのウイルス基本小体の集まりからなる。膨潤した細胞は破裂して小胞を形成し、小胞の下の細胞は、水痘で起こる「バルーン変性」に似た異なるタイプの変性を受ける。

【０１４１】

MMP（コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、および他のものは、細胞外マトリクスの既知の成分を攻撃する21種の酵素のファミリーを構成する）は、炎症性サイトカインによってアップレギュレートされ、悪性腫瘍の拡散に効力を有する。皮膚毛細血管からのバリオラ感染単核細胞の血管外漏出、および表皮層への真皮のタイトなコラーゲンマトリックスを介したその後の拡散、または皮脂腺構造への浸透は、MMPによって強化されている段階である。高いGSH濃度を維持することは、MMP活性を停止させ、特に破壊的な発疹を軽減する上で重要な利益をもたらすことを助け得る。

【０１４２】

累積的な組織の毒性は、約30％～60％のワクチン接種していない死亡患者では、衰えずに進行する。生存者は激しい過程を経て回復し、一部は、皮膚に窪みの傷跡が残っている。不均衡なTh2応答パターン、およびGSHレベルの低下が主に見られる調節されていない炎症カスケードと共に、さらなる病理学的メカニズムが増幅される。一酸化窒素（●NO）の過剰産生に起因するRNSは、ROSおよび脂質過酸化物（LOOH）と組み合わせて、ペルオキシナイトライト（●NOO）などのRNSを形成する。IL-4が12-および15-リポキシゲナーゼを増強し、同時に、GSHペルオキシダーゼおよび通常LOOHを破壊する他の酵素を抑制すると、脂質過酸化が拡大する。宿主タンパク質は、制御されていないROS、RNS、アルコキシラジカル（LO●）および他の反応性中間体によって攻撃される。したがって、GSHおよび他の抗酸化防御を損なう酸化ストレスの実質的な増加が存在する。防御は、Th2応答、IL-4、過度の炎症反応、および酸化ストレスが相互に周期的に増幅するために崩壊する。

【０１４３】

この段階での細胞内GSH濃度は、おそらく非常に低いであろう。炎症性サイトカイン、TNFα、IL-1βおよびIFNγを含む、いくつかのiNOSの誘導因子が存在する。IFNγを抑制するために働く効果がある強力なTh2のプロセスが存在するため、後者のIFNγは、おそらく重要な因子ではない。他の炎症性疾患では、IFNγの産生の増加は、それがiNOSの強力な活性化因子であるため、望ましくない結果をもたらし得る。天然痘感染が即座に生命を脅かすこの段階に達する時までに、調節されていない相互作用する経路の数は、非常に複雑になっている。天然痘感染のこの複雑な後期に先行するプロセスは、GSH治療が早期に開始する場合、制御メカニズムの回復に対してより応答性を有するだろう。しかし、スクリーニングされたワクチン接種、隔離、および早期GSH療法が実施され得るように、曝露された可能性のある人々を特定するために、強力な公衆衛生対策、保健医療専門家の教育およびその他のロジスティックシステムを設置しなければならない。

【０１４４】

曝露後14日目～30日目の毒性期において、患者は典型的には、高熱、倦怠感、ならびに頭痛および背部痛を伴う虚脱を経験する。口蓋および咽頭粘膜、顔、前腕に斑状発疹が現

れ、体幹や脚に広がる。通常、病気の2週間目に起こる死亡は、循環免疫複合体および可溶性バリオラ抗原に関連する毒血症により生じる可能性が最も高い。さまざまなタイプの免疫不全を有する個体が天然の天然痘感染にどのように反応したかについての情報はほとんどない。天然痘は、適した技術が細胞媒介性免疫を測定するために利用可能になる以前に根絶された。しかし、悪性および出血性の天然痘のいくつかの場合の根底にある原因は、免疫応答の欠損に起因する可能性がある。

【０１４５】

GSHの使用における化学量論は、遅い段階で開始する場合に、関与する経路の数が非常に多いために困難である。GSHは特性を制御するが、それは、GSHペルオキシダーゼ、S-トランスフェラーゼ、およびGSHレダクターゼなどの増幅酵素に依存する。これらの酵素は、カルボニルの形成を伴う他のタンパク質と同じ酸化的なフリーラジカル損傷を受ける。ミトコンドリア酸化的リン酸化はまた、GSHレベルが低下し、細胞巨大分子の合成の障害およびアポトーシスを引き起こす場合に危険性がある。低ミトコンドリアGSHレベルが原因である場合、マクロファージおよび抗原プロセシング細胞のアポトーシスによる損失を避けることができる。インビトロでのGSH添加は、ミトコンドリア誘発性のアポトーシスの脅威を防ぐことができる。

【０１４６】

要約すると、上記の複雑な相互作用の迷路には中心的な特徴がある。それらは制御がきかなくなり、これは、かなりの程度まで、GSHから始まる限られた利用可能性を有する分子に対する要求が高まっているためである。それは、通常すべての組織で高い需要があるが、45歳を過ぎると、明らかに健康な個体でも比較的不足するようになる。GSHの不足は、たばこ、アルコール、介入性感染、糖尿病、抗炎症性コルチコステロイドなどの医薬品の使用によって悪化する。

【０１４７】

適切な処方された経口的に生物学的に利用可能なGSHの投与では、粉砕された生体分子、アポトーシス細胞断片、脂質過酸化の毒性副生成物、ミトコンドリア生物学的エネルギーの崩壊および他の進行性の回復不能な後期病理学的事象を避けなければならない。

【０１４８】

AIDS

GSHは、慢性的に感染した細胞およびインビトロで急性感染した細胞においてHIV複製を阻害することが示されている。これは、現在採用されている抗レトロウイルス薬（AZT、ddI、ddC、D4T）によって攻撃されない部位に組み込まれたHIVゲノムの発現を妨げる可能性があるため、GSH補充療法を魅力的なものにする。HIV感染時のBリンパ球によるTNF-αの過分泌、およびHIVのGP-120タンパク質によるアラキドン酸代謝の触媒作用に起因し得る、HIV感染における過度のフリーラジカル反応に対抗する利点も、GSHは有し得る。免疫系の重要な細胞型によるGSHの生理学的必要性、および細胞間GSHを取り込み、Tリンパ球と代謝的に相互作用してGSHを間接的に増加させるマクロファージの能力は、HIV/AIDSのGSH欠乏を正そうとするための更なる理由を提供する。

【０１４９】

GSHの欠乏は、HIV疾患における生存の重要な決定因子である。GSHの欠乏は、HIV疾患における生存低下と関連している（PNAS、Vol.94、pp.1967-1972（1997））。細胞のGSHレベルを上昇させるための探求は、HIV/AIDSおよび他の疾患において極めて重要であると広く認識されている。なぜなら、これらの疾患プロセスにおける細胞内GSHレベルが低い場合、障害を推進するフリーラジカル反応がますます増加するからである。HIVは、他の抗酸化物系の枯渇や、細胞オルガネラや巨大分子の破壊だけでなく、GSHの破壊をもたらす病理学的フリーラジカル反応を開始することが知られている。前臨床研究では、GSHは特有の時点でウイルスの複製を停止し、毒性フリーラジカル、プロスタグランジン、TNF-α、インターロイキン、および免疫抑制性であり筋肉消耗および神経学的症状をもたらすタンパク質の生成を特異的に阻害する。GSHレベルを回復させることは、疾患の進行を安全かつ経済的に遅らせたり停止させたりする可能性がある。

【０１５０】
哺乳類細胞では、酸化ストレス、すなわち、低下したGSHの低い細胞内レベル、および比較的高いレベルのフリーラジカルが、NFκBおよびTNF-αを含む特定のサイトカインを活性化し、これは続いてDNAのmRNAへの細胞転写を活性化し、mRNAからあるポリペプチド配列への翻訳をもたらす。抗酸化物質は、酸化物質によるNFκBの誘導を阻止することが示されている。ウイルス感染細胞では、ウイルスゲノムが転写され、RNAウイルスおよびレトロウイルスのウイルス複製に一般的に必要であるウイルスRNA産生を生じる。これらのプロセスは、細胞の比較的酸化された状態、ストレス、低いGSHレベル、または減少した細胞産物の産生から生じる状態を必要とする。細胞転写を活性化する機構は進化的に高度に保存されているため、一連の突然変異がこの過程を逃れることはなく、あるいはこの経路の突然変異した酵素および受容体遺伝子産物を有する生物が生存に適していることはないと考えられる。したがって、細胞の相対的に還元された状態（相対的に還元されたレドックス電位）を維持することにより、後期段階のウイルス複製において必要な段階であるウイルスの転写が妨げられる。

【０１５１】
ウイルス複製に対する細胞内酸化条件の増幅効果は、様々なウイルス、およびGSHを分解するウイルス産物の作用によって増強される。例えば、多数のジスルフィド結合を有し、感染した細胞の表面上に通常存在するHIV表面糖タンパク質であるGP-120は、GSHを酸化し、細胞内GSHレベルを低下させる。一方、GSHはGP-120のジスルフィド結合を減少させてその生物学的活性を減少させるかまたは排除し、結果的にそれはウイルス感染性のために必要である。したがって、GSHは、このような酸化タンパク質の産生を妨げ、一度形成されるとそれらを分解する。GSHはまた、NFκBを活性化することに関与している長命の酸化的メッセンジャーである過酸化水素の分解に関与している。NF-κB転写因子およびHIV-1の活性化に明らかに広く使用されるメッセンジャーとしての活性酸素中間体。

【０１５２】
ウイルス遺伝子産物を能動的に複製している細胞では、ウイルスの活性が低い比較的休止期の段階からウイルスの大規模な複製および細胞死を伴う活動期へと細胞のレドックス電位変化を伴って細胞が変化することを可能にする事象のカスケードが生じ得；適切なGSHレベルを維持することによって、このカスケードが妨げられる可能性がある。

【０１５３】
したがって、HIVなどの特定のウイルス感染は、GSHレベルの低下と関連しており、感染細胞における細胞内GSHレベルの増加ならびに細胞外GSHの増加によって、HIVの複製が妨げられる可能性があり、カスケード事象の遅延または停止がおこると考えられる。AIDSはまた、低下したGSSGレベルと関連しており、GSHの新規合成ならびに上記の既存のGSHの酸化へ干渉し得ることに留意されたい。

【０１５４】
最初にHIVに感染した後には、ウイルスの大規模な複製を伴う重症のインフルエンザを模擬した強力なウイルス感染がある。この急性期は、身体が十分に成功した免疫防御を獲得するにつれ、自発的に数週間以内に終わる。その後、個体は感染の外見を示さない。しかし、ウイルスは、リンパ節、リンパ結節、および様々な体腔内に見出される特別な多数の突起を有する樹状細胞のような、免疫系組織および細胞内で、潜在的に反復的に複製し続けている。この感染症はウイルスだけの問題だけはない。このウイルスは、複製に加えて、毒性レベルであるいは高レベルで、様々なフリーラジカルおよび様々なサイトカインの過剰産生を引き起こす。後者は通常発生する、通常はごくわずかな濃度で存在している多数の反応を示す生化学物質である。最終的には、外見上は無症状であるHIV感染の平均7～10年後、腐食性フリーラジカルおよび毒性レベルのサイトカインが症状を引き起こし始め、免疫系の障害が始まる。免疫抑制物質である15-HPETEや筋肉消耗を引き起こすTNF-αなどの毒性因子が生成される。ウイルス粒子の数が増加し、患者は後天性免疫不全症候群（AIDS）を発症し、AIDSは個体の死亡の前2～4年は持続する可能性がある。したがって、ウイルス感染は病気の病因の不可欠な部分であると考えられるが、AIDSは単なるウイルス

感染ではない。

【０１５５】

HIVは突然変異を起こす強力な能力を持っている。この能力は、ワクチンの作製や長期的な抗ウイルス医薬品治療剤の開発を困難にしている。多くの人々が現在の複雑な医薬品レジメンを失敗し続けているため、耐性ウイルス株の数が増加している。これは特に危険なHIVのプールであり、かなりの脅威をもたらす。これらの耐性突然変異体はまた、ワクチンを開発する際の困難を増加させる。この流行性の感染症は制御不能であり、ウイルスの数を減らすことのみを目的としている広く普及している複数の医薬品によるレジメンは、複雑すぎる、毒性が強すぎる、高価すぎる、狭すぎることが証明されている。結果として、AZT型薬剤と組み合わせたプロテアーゼ阻害剤の導入以来、そのような治療法が失敗する人の数が増えている。さらに、フリーラジカルおよびサイトカインの継続的な産生はウイルスとはほとんど無関係になり得、免疫系、胃腸管、神経系および他の多くのAIDSにおける臓器の機能不全を永続させる。公開された科学文献によれば、これらの多様な臓器系機能不全の多くは、ウイルスおよびそのフリーラジカルによって引き起こされる全身性GSH欠乏によるものである。HIV感染症ではGSHが消耗する。なぜなら、それはフリーラジカルに対する、主要で防波堤的な抗酸化物質であるからである。GSHレベルを低下させるさらなる原因は、上記のGP-120のようなHIVタンパク質における多数のジスルフィド結合の存在である。ジスルフィド結合はGSHと反応し、それを酸化する。

【０１５６】

現在のHIV/AIDS医薬品は、医薬品相乗効果という概念を有効に活用しており、１つのプロセスで２つの異なる標的が同時に阻害される。その効果は相加的なものを超えている。現在使用されている薬物は、ウイルス複製の長い経路のうち2つの非常に異なるポイントを阻害するように選択された。ウイルス複製の経路は簡単に記載することができる：ポイント＃1：ウイルスの攻撃および細胞への侵入。ウイルス性gp120タンパク質およびCD4+細胞受容体などが関与している。ポイント＃2：ウイルスはそのRNAからDNAを作る。関与する酵素は、逆転写酵素である（AZT、ddI、ddCの影響を受けやすい）。ポイント＃3：ウイルスDNAが細胞のDNAに組み込まれる。関与する酵素は、インテグラーゼである。ポイント＃4：プロウイルスDNAは長時間不活性であるが、アクチベータはHIV複製を迅速に開始する。NFκBは休眠HIV DNAのアクチベータであり、活性化が起こるにはGSHレベルが低くなければならない。ポイント＃5：ウイルス膜およびタンパク質と共にウイルスRNAが産生され、これらは組み立てられる。ウイルスプロテアーゼが関与している（GSH、プロテアーゼインヒビターの影響を受けやすい）。ポイント＃2は、ddI、ddCなどを含むAZTタイプの薬物を使用した、最も早い攻撃ポイントであった。これらは毒性があり、最終的にはウイルスはこれらの逆転写酵素阻害剤に耐性となる。ポイント＃5は後期の複製ステップであり、これはプロテアーゼ阻害剤が機能する場所である。この薬剤は、長いタンパク質鎖をちょうど適切な長さに切断してウイルスコートが核酸コアのまわりに正確に収まるようにするウイルスプロテアーゼを阻止し、異なる生物学的活性を有するタンパク質を分離する。それ自体で、プロテアーゼ阻害剤は、耐性変異株の迅速な発生を促進する。

【０１５７】

逆転写酵素阻害剤+プロテアーゼ阻害剤を組み合わせることにより、相乗作用が得られ、血漿中のウイルス粒子の量は急激に減少し、1種類の阻害剤のみを使用するのと比較すると発生する突然変異耐性ウイルス株の速度は遅くなった。薬剤を別々に使用するよりもゆっくりとしてはいるが、これらの併用療法または「カクテル」の最初の見込みは、耐性突然変異体が発生するにつれて上昇することが予測される失敗の数が増加することによって、損なわれてきている。

【０１５８】

新たな療法には、逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤のクラスにおける追加の薬物が含まれる。また、短い長さのワイヤーを長いワイヤーにスプライシングするのと同様に、酵素インテグラーゼが感染細胞のDNAにHIV DNAを組み込むポイント＃3を阻止する薬剤が開発中である。ワクチンの開発も続けられているが、HIVは動く標的のように見え

、カメレオン並に急速に変化するようであるため、見通しは悪く見える。ワクチンの開発は、ウイルスの免疫細胞親和性によってもまた損なわれる。

【０１５９】

ヒト免疫不全ウイルス感染個体は、血清中酸可溶性チオール、ならびに血漿、末梢血単球、および肺上皮内層液中のGSHレベルを低下させた。さらに、高い細胞内GSHレベルを有するCD4+およびCD8+T細胞は、HIV感染が進行するにつれて選択的に失われることが示されている。そのようなサイトカインがGSH枯渇細胞においてより効率的にHIV複製を刺激するため、炎症性サイトカイン濃度の増加した個体において特に、この欠乏はHIV複製を増強し疾患の進行を加速させる可能性がある。GSH、およびN-アセチルシステイン（NAC）などのGSH前駆体は、急性感染細胞、慢性感染細胞および正常末梢血単核細胞におけるサイトカイン刺激性HIV発現および複製を阻害することができる。

【０１６０】

GSHの枯渇はまた、アポトーシスまたはプログラムされた細胞死として知られるプロセスにも関連することに留意されたい。したがって、人為的にGSHを枯渇させる細胞内プロセスは、基礎をなすプロセス自体が致命的ではない場合であっても、細胞死に至る可能性がある。

【０１６１】

真性糖尿病

真性糖尿病は、小児型または自己免疫型（I型、IDDM）、および後期型または非インスリン依存型（II型、NIDDM）の2つの形態で見られる。前者は約30％を占め、残りは見られたケースの大部分を占めている。発症は一般にI型では突然であり、II型では潜行性である。症状には、過度の排尿、飢餓、渇きが含まれ、最初の型では体重が徐々に減る。肥満はしばしば第2の型と関連し、罹患しやすい個体の原因因子であると考えられている。血糖値はしばしば高く、尿中に頻繁に糖が漏出している。状態を治療しないでいると、被害者はアルコールを飲んでいる人に類似した悪臭のある呼気を伴うケトアシドーシスを発症することがある。未治療糖尿病の即時の医学的合併症には、神経系症状、さらには糖尿病性昏睡が含まれ得る。

【０１６２】

高血糖（非常に高い血糖値）の連続的かつ悪性な存在が原因で、糖化と呼ばれる非酵素的化学反応が生じる。糖化は細胞内で非常に頻繁に起こるので、必須酵素タンパク質の不活性化がほぼ連続して起こる。最も重要な酵素の１つである、γ-グルタミル-システイン合成酵素は、糖化され、容易に不活性化される。この酵素は、肝臓におけるGSHの生合成における重要な段階である。この特定の糖化の最終的な結果は、糖尿病患者におけるGSHの産生の欠乏である。通常、成体は24時間ごとに8～10グラムを産生し、細胞によって急速に酸化される。複数の必須機能のために身体全体に、例えばすべてのミトコンドリア内で、ATPと呼ばれる化学的エネルギーを産生するために、GSHに対する高い需要がある。脳細胞、心臓細胞、および他のものは、単に機能しないだけでなく、アポトーシスによって破壊され得る。

【０１６３】

GSHは人体の主要な抗酸化物質であり、我々が新規に合成できる唯一のものである。これは、植物および動物の両方において、最も一般的な低分子量チオールでもある。GSHがなければ、免疫系は機能できず、中枢神経系および末梢神経系は異常になり、機能を停止する。血管緊張の制御に関与する血管拡張物質である一酸化窒素の担体であるGSHに依存しているため、心臓血管系はうまく機能せず、最終的には機能しなくなる。すべての上皮細胞はGSHを必要とするようであるため、腸内層細胞は適切に機能せず、貴重な微量栄養素が失われ、栄養が損なわれ、微生物に感染の原因となる侵入口が与えられる。

【０１６４】

GSH前駆体の使用は、糖化による律速酵素の破壊によるGSH欠乏の制御を助けることができない。GSHの欠乏がより深刻になるにつれて、よく知られている糖尿病の続発症は重症度が進行する。下記の合併症は、糖尿病患者では利用可能なGSH供給が不十分であるため

、本質的にフリーラジカル損傷の暴走によるものである。

【０１６５】

還元糖は、タンパク質、脂質、および核酸中の遊離アミノ基と相互作用して、アマドリ生成物を形成し、糖化反応によって活性酸素種を生成することが知られている。糖尿病状態では、グルコースレベルが上昇し、糖化タンパク質が増加した。Cu、Zn-SODは、糖尿病状態下で糖化および不活性化され、アマドリ生成物から生成されたROSがCu、Zn-SOの部位特異的断片化を引き起こすことが示されている。ポリオール経路を介して生成されるフルクトースは、直線状形態の生理学的割合が環化形態の生理的割合よりも高いので、グルコースよりも強い糖化能力を有する。フルクトースは、リボースと同様に、膵β島細胞株においてアポトーシスを引き起こすことができる。フルクトースの存在下で、細胞内過酸化物、タンパク質カルボニル、およびマロンジアルデヒドのレベルが増加する。さらに、メチルグリオキサールおよび3-デオキシグルコソンは、アポトーシス細胞死を誘導することも示されている。2-オキソアルデヒドである3-デオキシグルコソンは、アマドリ化合物の分解によって生成される。この化合物は両方とも、高血糖の場合に上昇し、糖化反応を促進する。これらの化合物は、その高い反応性のために細胞に対して有毒であり、アルデヒドレダクターゼを含むNADPH依存性の還元活性を有する掃去系が存在する。

【０１６６】

細胞-細胞接着は、有効な免疫応答の生成において重要であり、種々の細胞表面受容体の発現に依存する。細胞間接着分子-1（ICAM-1; CD54）および血管細胞接着分子（VCAM-1; CD106）は、誘導性細胞表面糖タンパク質である。これらの表面タンパク質の発現は、サイトカイン（TNF-α、IL-1αおよびβ）、PMA、リポ多糖および酸化体などの活性化因子に応答して誘導されることが知られている。リンパ球上のICAM-1およびVCAM-1のリガンドは、それぞれLFA-1（CD11a/CD18）およびVLA-4である。特定の部位における白血球の不適切なまたは異常な滞留は、様々な自己免疫疾患および病的な炎症性疾患の発症における中心的な要素である。ウサギのアテローム性動脈硬化症の食餌モデルおよび遺伝モデルの両方において、初期泡沫細胞病変を覆う動脈内皮において、ICAM-1の限局的な発現が報告されている。冠動脈病変の進行におけるVCAM-1の役割もまた示唆されている。細胞表面分子の欠失または増加は、上皮がん細胞の動員、移動および侵襲性を決定すると考えられる。真性糖尿病の患者由来の単球は、培養中の内皮細胞への接着が増加していることが知られている。特定のレドックス感受性機構を介した活性酸素種による接着分子発現および機能の調節が報告されている。抗酸化物質は、誘発された接着分子発現および細胞-細胞接着を阻止することができる。

【０１６７】

HIV/AIDSに見られる特定の不具合に類似して、GSHレベルが低下すると免疫システムが崩壊に近づくため、糖尿病患者は感染の影響を受けやすくなる。血管拡張（弛緩）特性を効果的に発揮するために一酸化窒素（●NO）を安定化させるのに十分な量でGSHを利用できないので、末梢血管系が損なわれ、四肢への血液供給が著しく減少する。壊疽は一般的な続発状態であり、その後の切断は後年しばしば起こる結果である。

【０１６８】

末梢ニューロパシーでは、足および下肢でよく起こる感覚の喪失が生じ、その後しばしば制御不能な灼熱感またはかゆみなどの異常感覚が続く。網膜症およびネフロパシーは、後に起こる事象である。これらは、細小血管症、新血管および毛細血管の過度の出芽（budding）および成長が理由であり、新血管壁の弱さのためにしばしば出血する。この出血は網膜および腎臓に損傷を与え、失明および腎臓の活動停止を引き起こし、後者は透析が必要となる。GSH欠乏が進むにつれて、頻度の増加を伴って白内障が生じる。

【０１６９】

大型および中型の動脈は、早期には心筋梗塞を伴い、より深刻な程度で、促進された重度のアテローム性動脈硬化症の部位になる。糖尿病患者が心不全に陥ると、1年後の死亡率は非糖尿病患者よりもはるかに大きくなる。さらに、冠状動脈形成術を用いて重度のアテローム性動脈硬化症を治療する場合、糖尿病患者は、再狭窄と呼ばれる心血管の再狭窄

を起こす可能性が非常に高い。

【０１７０】

上記の合併症は、大部分がGSH欠乏および進行中のフリーラジカル反応によるものである。血糖値を低下させる毎日のインスリン注射の使用にもかかわらず、頻繁にそして最終的にこれらの続発症が起こる。大部分の糖尿病患者にとって血糖値の良好な制御は困難である。

【０１７１】

黄斑変性症

GSHは、黄斑変性症の治療に使用することができる。加齢黄斑変性症（ARMD）は、目の黄斑部における杆体および錐体の、遅い（萎縮型の）または急速な（滲出型の）破壊の開始および取り返しのつかない消失によって特徴付けられる疾患である。黄斑は網膜のおおよその中心にあり、眼のレンズがその最も強い光を集束する場所である。視覚細胞は、杆体および錐体として知られており、中枢神経系の派生および活性部分である。これらは顔や表情、読書、運転、機械や電気機器の操作、周囲の概要の認識といった明確な詳細を見るために必要な細かい視覚的識別を担い必要不可欠である。最終的に、杆体および錐体の破壊は、機能的な法的盲目をもたらす。この状態に関連する顕著な痛みはないので、通常、視力の顕著な喪失が発症の最初の警告である。これにより、後期の事象が早くも通知され得る。この病理学的プロセスにおける最初の出来事の1つは、「ドルーゼン」と呼ばれる物質の形成であると現在考えられている。

【０１７２】

ドルーゼンは、黄斑（macula lutea）または黄斑（yellow spot）において網膜の表面上に沈着した黄色の物質の斑または拡散した液滴として最初に現れる。黄斑は、レンズによって太陽光が集まる網膜の領域であり、鋭敏さのために杆体の最高密度を含む網膜の領域である。この病気では、色を検出する錐体も失われるが、盲目の原因となるのは杆体の喪失であると考えられている。ドルーゼンは化学的に分析されており、その多くがフリーラジカル反応によって過酸化された脂質の混合物で構成されることが判明した。ドルーゼンは、まずブルッフ膜の基部に少量の材料として現れる。これは細胞の第1の層を膜から押し上げる「気泡」を生成する。血管新生、新生血管の成長は、これらのチャネルに最初に現れる。

【０１７３】

この第1の層の細胞は独特である。それらは網膜色素上皮（RPE）細胞であり、この細胞は、CNSミクログリアにやや関連し、貪食機能を有する。それらはまた、本来の網膜細胞である杆体および錐体のすぐ下にある細胞の層である。RPE細胞は、杆体および錐体によって生じたデブリを消費することから、杆体および錐体の保護機能を果たすと考えられている。色素性物質が保護機能を果たすのか、食作用のみに関連するのかはまだ分かっていない。しかし、この色素は細胞小器官に濃縮されているが、過酸化脂質とメラニンから構成されていると考えられている。

【０１７４】

モデルシステムにおける事象の順序から、RPE細胞の喪失がARMD（加齢黄斑変性症）において最初に生じると考えられている。網膜黄斑の領域にRPE細胞がないと、杆体の喪失、そして最終的にはいくらかの錐体の喪失が生じる。最後に、毛細血管の出芽が始まり、後期のARMDに関連する典型的な細小血管症が見られる。RPE細胞は、その適切な機能のために大量のGSHを必要とすることもまた知られている。それを研究し得る細胞培養において、GSHレベルがこれらの細胞において著しく低下すると、これらの細胞は死滅し始める。これらの細胞の培養物に培地中のGSHが補充されると、それらは増殖する。細胞培養研究によって示されるように、網膜内およびおそらくはこれらの細胞内のGSHのより深刻な欠乏により、疾患の進行が早まるという証拠が増えている。

【０１７５】

主に太陽光に由来する「近」紫外線（UVB）および高輝度の視覚光がARMDの強力な寄与因子であると一般に信じられている。野外での仕事や日光が最も激しい赤道地域での場合

と同様に、明るい色の虹彩を持つ人々は、リスクの高い集団を構成する。喫煙のようなさらなるフリーラジカルによる傷害は、ARMDを発症するリスクを増大させる。

【０１７６】

化学療法を含むいくつかのアプローチが最近テストされているが、成功していない。現在、ARMDを治療する有効な治療法はない。レーザー療法が開発され、新生血管成長を焼灼することによって遅発性形態の疾患において生じる損傷を遅らせるために、広く使用されている。しかし、疾患が進展し始めたら、その最終的な結果は確定である。

【０１７７】

GSHは、フリーラジカル反応の直接的および間接的効果、ならびにレドックス感受性遺伝子発現の変化に対抗するように作用する。

【０１７８】

活性酸素種に関する細胞調節のためのGSHの使用

細胞間にシグナルを運ぶ多数のタイプのメッセンジャーが存在する。近年注目されているメッセンジャーの1つは、活性酸素種（ROS）を含む低分子酸化物質またはフリーラジカル作用物質である。これらのメッセンジャーは、生物学的高分子との非特異的相互作用によってしばしば作用し、その結果、構造が変化し得る。例えば、タンパク質の二次構造は、典型的には、ジスルフィド結合の形成を伴う酸化の影響を受けやすいシステイン残基によって制御される。連結を形成するこれらの結合の酸化は、タンパク質の立体配置および機能に実質的な変化をもたらし得る。

【０１７９】

したがって、O_2^-およびH_2O_2はシグナル伝達分子であり、相互作用するタンパク質とのレドックス反応を受ける能力によって転写因子および膜受容体としての多様なタンパク質の挙動を変化させ、-SH基をジスルフィド結合に変換し、例えば、酵素関連遷移金属の酸化状態を変化させることが一層明らかになってきた。シグナル伝達分子としてのO_2^-およびH_2O_2は、線維芽細胞、内皮および血管平滑筋細胞、ニューロン、卵子、精子ならびに頸動脈小体の細胞を含むいくつかのタイプの細胞によって産生される。これらの細胞型は全て、古典的な白血球NADPHオキシダーゼと同様のNAD（P）Hオキシダーゼを使用して、これらの酸化体を産生するようである。しかしながら、酸化体生成を誘発する刺激、および酸化物質が使用される目的は、細胞ごとに異なる。

【０１８０】

線維芽細胞は、N-ホルミル化ペプチドおよびインターロイキン-1などの炎症メディエーターに応答して、少量ではあるが有意な量のO_2^-を産生する。これらの細胞によって産生されたO_2^-は、シグナル伝達分子として機能することが仮定されている。光学分光法は、線維芽細胞膜が、白血球NADPHオキシダーゼのフラボチトクロムサブユニットとは異なるが、白血球タンパク質のものと非常に類似した特性を有するヘムタンパク質を含有することを示している。このヘムタンパク質は、これらの細胞によって産生されるO_2^-の供給源として提案されてきた。

【０１８１】

内皮細胞および血管平滑筋細胞は、血圧を上昇させるペプチドホルモンであるアンギオテンシンIIに応答してNAD（P）Hオキシダーゼを用いてO_2^-を産生する。この血圧の上昇は、内皮細胞によって継続的に生成されるNO●のO_2^-による消費によるものと思われる。結果として生じるNO●濃度の低下は、通常は血管樹に広く存在するNO●の血管拡張作用を減弱または排除することによって血圧を上昇させる。

【０１８２】

培養中の神経細胞は、アルツハイマー病の患者の脳に見られるアミロイド沈着に見られるアミロイドβ-ペプチド、または他のアミロイド疾患に由来する関連ペプチドに曝露されると、酸化体を産生する。このO_2^-がNADPHオキシダーゼによって産生される可能性は、白血球NADPHオキシダーゼに作用することが知られているフラビンタンパク質阻害剤もまた、この系において酸化体生成を阻害するという知見によって示唆される。酸化体の生成は、ニューロンがペプチドに対して使用する防御の一部であり、これらの酸化体はおそら

くペプチドと反応してタンパク質分解性切断に感受性になる。

【０１８３】

受精の瞬間にウニ卵の膜NADPHオキシダーゼが活性化されて大量のH_2O_2が生成される。この酸化体は、ジチロシルブリッジを形成することによって受精膜のタンパク質を架橋させ、精子が膜を通過できないようにし、それによって多精子受精を防止する。このメカニズムは他の種に共通している。

【０１８４】

O_2^-は精子の正常な機能に必要であると思われる。カルシウムイオノフォアによって刺激されると、正常な精子は3～5分、O_2バーストを生成する。スーパーオキシドジスムターゼによって多くの刺激に対するアクソソーム応答が抑制されるため、この反応で生成されるO_2^-は精子の集積に関与する。一方、刺激を伴わずにO_2^-を産生する精子は機能的に異常であり、おそらくシグナル伝達機構の破壊が一般化されているためである。

【０１８５】

頸動脈小体は、血液の酸素分圧を測定する、総頸動脈の分岐部に位置する小さな器官である。この器官はH_2O_2を連続的に産生し、免疫学的分析により、その細胞が白血球NADPHオキシダーゼの特異的サブユニットの4つ全て、またはそれらのサブユニットに非常に密接に関連するタンパク質を含むことが示された。白血球NADPHオキシダーゼと非常に類似するまたは同一の頸動脈小体NADPHオキシダーゼは、頸動脈小体の酸素測定機構の重要な構成要素であると仮定されている。

【０１８６】

したがって、調節タンパク質の構造および機能に対する制御機構としてのリン酸化に加えて、活性酸素種もまた、細胞の調節およびシグナル伝達において重要な役割を果たす可能性がある。選択的なシステインの酸化還元はまた、タンパク質翻訳後修飾のための重要な機構としても役立つ。この機構は、「レドックス調節」と呼ばれ、DNA合成、酵素活性化、遺伝子発現および細胞周期調節などの様々な細胞プロセスに関与している。

【０１８７】

チオレドキシン（TRX）は、チオール媒介レドックス活性を有し、遺伝子発現を含む細胞プロセスの調節において重要な役割を果たす多面発現性細胞因子である。TRXは、還元型または酸化型のいずれかで存在し、この活性中心ジチオールの可逆的酸化によってレドックス反応に関与する。いくつかの転写因子の活性は、特定のシステイン残基のレドックス修飾によって翻訳後に変化する。そのような因子の1つはNFκBであり、そのDNA結合活性はインビトロでのTRX処理によって変化する。AP-1のDNA結合活性は、DNA修復酵素Redox Factor-1（Ref-1）によって修飾されている。Ref-1活性は次に、TRXを含む種々のレドックス活性化合物によって修飾される。TRXは、Ref-1と直接会合させるためのPMA処理に応答して細胞質から核に移行し、DNA結合だけでなくAP-1分子の転写活性もモジュレートする。したがって、ヒトチオレドキシン（hTRX）は、それらの生物学的プロセスにおいて重要なレドックス調節因子であることが示されている。hTRXは、NFκB転写因子などの標的分子と相互作用することによって直接的に、またはレドックス因子1（Ref-1）として知られる別のレドックスタンパク質を介して間接的に機能することができる。

【０１８８】

細胞のレドックス状態は、増殖およびアポトーシスを含む細胞事象の様々な局面をモジュレートする。TRXは活性中心-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-に2つのレドックス活性ハーフシスチン残基を有する小さな（13kDa）遍在性タンパク質であり、HTLV-Iによる白血病誘発に関与する成人T細胞白血病由来因子（ADF）としても知られている。TRXによるタンパク質ジスルフィドの還元のための経路は、活性部位SHの1つによる求核攻撃によってタンパク質-タンパク質ジスルフィドを形成し、続いて、酸化されたTRXの形成を伴う還元された標的タンパク質の分子内置換を伴う。HTLV-I感染T細胞およびEpstein-Barrウイルス形質転換リンパ球の自己分泌増殖因子としての活性の他に、多くの研究が、ヒト生理学における細胞還元触媒としてのADF/TRXの重要性を示している。

【０１８９】

インビトロおよびインビボ実験は、TRXが、p50のCys 62を還元させることによって、NFκBのp50サブユニットのDNA結合および転写活性を増大させることを示した。TRXとNFκB p50由来のオリゴペプチドとの直接の物理的会合は、インビトロでのNMR研究によって明らかにされている。JunおよびFos分子のレドックス調節もまた、関与している。種々の抗酸化物質は、AP-1複合体のDNA結合およびトランス活性化能力を強く活性化する。TRXは、レドックス因子-1（Ref-1）のような他の分子を必要とするプロセスにおいて、JunおよびFosのDNA結合活性を増強する。

【０１９０】

NFκBは、多種多様な細胞およびウイルス遺伝子の発現を調節する。これらの遺伝子は、IL-2、IL-6、IL-8、GM-CSFおよびTNFなどのサイトカインであるICAM-1およびE-セレクチンなどの細胞接着分子、誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）、ならびにヒト免疫不全ウイルス（HIV）およびサイトメガロウイルスのようなウイルスを含む。NFκBは、これらの遺伝子との因果関係を介して、後天性免疫不全症候群（AIDS）、血液がん細胞転移および関節リウマチ（RA）などの現在治療困難な疾患に因果関係を有すると考えられている。NFκBによって誘導される遺伝子は細胞系の状況に応じて変化し、他の転写因子の制御下にもあるが、NFκBはこれらの遺伝子の調節に重要な役割を果たし、したがって病因に大きく寄与する。したがって、NFκBの生化学的介入は、おそらく病原性過程を妨害し、治療に有効であるはずである。

【０１９１】

NFκBは、2つのサブユニット分子、p65およびp50からなり、通常、サイトゾルにおいて、阻害分子IκBとの分子複合体として存在する。炎症誘発性サイトカイン、IL-1およびTNFなどによる細胞の刺激により、IκBが解離し、NFκBが核に移行し、標的遺伝子の発現を活性化する。したがって、NFκB自体の活性は、上流の調節機構によって調節される。上流のシグナル伝達カスケードについてはあまり知られていない。しかし、NFκB活性化カスケードには少なくとも2つの独立した段階がある：キナーゼ経路とレドックスシグナル伝達経路。これらの2つの別個の経路は、NFκB活性化カスケードに協調的に関与し、これは、微調整に加えて、何重にも安全策が講じられているNFκB活性の調節に寄与し得る。

【０１９２】

少なくとも2つの異なるタイプのキナーゼ経路が、NFκB活性化に関与することが知られている：NFκBキナーゼおよびIκBキナーゼ。NFκBキナーゼは、NFκBと会合する43kDセリンキナーゼである。このキナーゼは、NFκBの両方のサブユニットをリン酸化し、それをIκBから解離させる。IκBをリン酸化することが知られている別のキナーゼまたは複数のキナーゼがある。これらの知見と一致して、NFκBはいくつかの細胞株でリン酸化されていることが示され、IκBはTNFまたはIL-1による刺激に応答して他のものにおいてリン酸化された。ほとんどの場合、キナーゼカスケードによるNFκBの解離は、NFκB活性化の主要な段階である。

【０１９３】

しかしながら、IκBからの解離後、NFκBは、細胞還元触媒であるチオレドキシン（TRX）によるレドックス調節を経なければならない。TRXは、その活性中心ジチオールのジスルフィドへの可逆的酸化を介してレドックス反応に関与することが知られている。ヒトTRXは、NFκBの制御下にあることが現在知られているインターロイキン-2受容体のAサブユニットの誘導の原因となる因子として最初に同定されている。NFκBは還元されるまでは、標的遺伝子のκBDNA配列に結合できないことが知られている。

【０１９４】

NFκBは、標的DNAに向かって伸びるベータシート群であるベータバレルと呼ばれる新規なDNA結合構造を有するようである。ベータバレル構造の先端にヌクレオチド塩基とインターカレートするループがあり、DNAと直接接触すると考えられている。このDNA結合ループは、TRXからのプロトン供与体としてレドックス調節の標的である可能性が高いNFκBのシステイン62残基を含有する。レドックス活性のあるシステインを含むTRXの表面上のブーツ状の空洞は、p50のDNA結合ループを安定に認識することができ、プロトンを構造依存

的に供与することによって酸化されたシステインを還元する可能性が高い。したがって、TRXによるNFκBの減少は特異的であると考えられる。

【０１９５】

NFκBシグナル伝達カスケードの開始についてはあまり知られていない。しかし、N-アセチルシステイン（NAC）やα-リポ酸などの抗酸化物質による細胞の前処理はNFκBを阻止する。NACはまた、TRXの誘導を阻止することもできる。したがって、抗酸化物質の抗NFκB作用は、（1）シグナル誘発のすぐ下流のシグナル伝達を阻止すること、および（2）レドックスエフェクターであるTRXの誘導の抑制、の2つであると考えられる。GSH代謝を損なう可能性があるHIV感染症、糖尿病などの慢性疾患のない哺乳動物においては、GSH代謝を改善する他の抗酸化物質またはそれ自体が適切な抗酸化物質である化合物を投与する戦略を採用することができることに留意されたい。NACは慢性投与においてある種の神経学的毒性を有することが示されており、したがってこの化合物は不適切である可能性があることに留意されたい。一方、リポ酸は、単独でまたはGSHと組み合わせて有利な抗酸化物質であり得る。特定の投与方法に対するGSH経口投与の感受性のために、α-リポ酸を別途投与しなければならない場合がある。

【０１９６】

細胞内レドックスカスケードは、4つの電子の添加および標的タンパク質のレドックス調節による酸素の連続的な還元を含む。これらのROIの中で、過酸化水素は最も長い半減期を有し、酸化シグナルのメディエーターであると考えられている。一方、TRXのような細胞還元系は、過酸化水素の作用を妨げる。酸化シグナルの強度は、内部GSHレベルによってモジュレートされ得る。同様に、総GSH/GSSG含量は、細胞レドックスシグナル伝達の応答性に影響を及ぼし得る。従って、GSHを産生するには細胞内システインが必要であった。

【０１９７】

膜受容体および輸送体（例えば、インスリン受容体およびある種の神経伝達物質の受容体を含む）は、細胞のレドックス状態によって調節される。非常に多数の酵素もまた、細胞のレドックス状態によって調節される。機能が酸化還元によって調節されるタンパク質の部分的なリストを提供する。酵素：コラゲナーゼp21グアニンヌクレオチド結合タンパク質；タンパク質チロシンホスファターゼ；p56Lckタンパク質チロシンキナーゼ；グリコーゲンホスホリラーゼホスファターゼ；グリコーゲンシンターゼ；ホスホフルクトキナーゼ；フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ；ヘキソキナーゼ；ピルビン酸キナーゼ；グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ；3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoAレダクターゼ；セロトニンN-アセチルトランスフェラーゼ；グアニル酸シクラーゼ；中鎖脂肪アシルCoAデヒドロゲナーゼ；キサンチンデヒドロゲナーゼ；葉緑体NADP結合グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ；葉緑体NADP結合リンゴ酸デヒドロゲナーゼ；葉緑体セドヘプツロースビスホスファターゼ；フルクトースビスホスファターゼ；NADP-リンゴ酸酵素；3a-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ；大腸菌（E. coli）由来のDsbAタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ；クレアチンキナーゼ；筋小胞体Ca2 + -ATPアーゼ。転写因子：NFκB；AP-1（jun/fos）；SoxR（132,133）；SoxS；OxyR；低酸素誘導因子1；甲状腺転写因子I；グルココルチコイド受容体；Sp1。受容体：NMDA受容体；インスリン受容体；リアノジン受容体；HoxB5；c-Myb；v-Rel；p53；Isl-1。その他：エリスロポエチンRNA結合タンパク質。

【０１９８】

活性酸素種（ROS）は、様々なヒト疾患の病因に関与している。最近の証拠は、適度に高濃度では、H_2O_2のような特定の形態のROSがシグナル伝達メッセンジャーとして作用し得ることを示唆している。少なくとも2つの詳細に明らかにされた転写因子である核因子（NFκB）およびアクチベータータンパク質（AP）-1が、細胞内レドックス状態によって調節されることが確認されている。レドックス調節転写因子NFκBおよびAP-1の結合部位は、AIDS、がん、アテローム性動脈硬化症および糖尿病合併症などの疾患の病因に直接関与する多種多様な遺伝子のプロモーター領域に位置する。生化学的および臨床的研究は、

抗酸化療法が疾患の治療に有用であり得ることを示している。シグナル伝達カスケードの重要なステップは、酸化物質および抗酸化物質に感受性である。タンパク質のリン酸化やDNA上のコンセンサス部位への転写因子の結合などの細胞調節の多くの基本的事象は、生理学的な酸化体-抗酸化恒常性、特にチオール-ジスルフィドバランスによって引き起こされる。従って、内在性のグルタチオン系およびチオレドキシン系は、レドックス感受性遺伝子発現の有効な調節因子であると考えられ得る。抗酸化物質を用いてレドックスカスケードを制御することにより、例えば、造血性がん細胞転移およびAIDSのようないくつかの疾患に対する治療が可能であり得る。

【０１９９】

熱ショック（HS）応答は、HS遺伝子の転写活性化を含む、ストレスに対する普遍的な細胞応答である。H_2O_2は、熱ショック因子-1（HSF-1）の濃度依存性トランス活性化およびDNA結合活性を誘導することが示されている。しかし、DNA結合活性はHSと比較してH_2O_2では低く、したがって酸化物質によるHSFの二重調節の証拠が提供された。インビトロでのH_2O_2の効果は、SH還元物質であるジチオスレイトールおよび内因性還元剤であるチオレドキシン（TRX）によって元に戻った。さらに、TRXは、インビボで酸化されたHSFのDNA結合活性も回復させたが、HSおよびH_2O_2の両方によってインビボでそれ自体が誘導されることが判明した。したがって、H_2O_2は、HSFの活性化およびDNA結合活性に二重の効果を発揮する：一方で、H_2O_2は、HSFの核移行を促進する一方で、HSF-DNA結合を変化させ、これはDNA結合ドメイン内の重要なシステイン残基を酸化することによる可能性が最も高い。したがって、HSFは、ROSモジュレート転写因子のグループに属する。

【０２００】

哺乳動物のストレス応答は、視床下部-脳下垂体-副腎（HPA）系および交感神経系を活性化する一連の神経内分泌反応を誘発する。恒常性プラトーの維持には、脳、下垂体、副腎、および末梢組織を含む複数のレベルで生じるストレス応答システム間の協調的相互作用が必要である。グルココルチコイドは、HPA系の主な末梢エフェクターとして、ヒトのあらゆる末梢組織における恒常性状態を再確立するのに不可欠な役割を果たす。一方、適応応答は、細胞レベルでの局所宿主防御機構の一部として細胞恒常性を妨害する様々な内因性または外因性の力に対してもまた作用する。現在、還元/酸化（レドックス）反応は、転写因子、例えばAP-1およびNFκBの機能のモジュレートを含む生物学的プロセスの制御に密接に関与している。細胞は、多くの酵素の発現および調節によって細胞代謝を維持するために、活性酸素中間体（ROI）の過剰産生に対する内因性緩衝系を含む。

【０２０１】

グルココルチコイドは、グルココルチコイド受容体（GR）への結合時に、熱ショックタンパク質（HSP）の解離を促進し、核に移行するリガンド-受容体複合体は、グルココルチコイド応答要素（GRE）と呼ばれるパリンドロームDNA配列に結合する。DNAに結合した後、GRは、他の転写因子およびコアクチベーター/コリプレッサーと相互作用するかまたは相互作用しないことによって、標的遺伝子発現を示差的に調節してホルモン作用を生じさせる。GRは、中心のDNA結合ドメイン（DBD）、核局在化シグナル、リガンド結合ドメイン（LBD）、およびいくつかの転写活性化機能から主に構成されるモジュール構造を有する。ヒトGRは20個のシステイン残基を含み、DBD～LBDにわたる中央領域に集中している。各ドメインのシステイン残基は、それらのドメインの構造および機能の両方を維持するために重要であることが示されている。例えば、DBD中のSHのジスルフィドへの変換がGRのDNAセルロースへの結合を阻止し、チオールに対して高い親和性を有する金属イオンがDBD-DNA相互作用を妨げることが既に示されている。

【０２０２】

TRXシステムは、酸化ストレスに対するグルココルチコイド媒介ストレス応答のための内因性防御機構として機能する。TRXは転写プロセスに関与していると考えられている：例えば、NFκB活性化は阻害されるが、AP-1活性はTRXによって誘導される。さらに、単離されたラットのサイトゾル中のGRは、安定化され、TRXによって還元されたリガンド結合形態で維持されることが示されている。細胞オキシダーゼ、TRX、およびGRの間の機能的

相互作用は、細胞レドックス状態およびTRXレベルが、グルココルチコイドに対する細胞感受性の重要な決定因子であることを示している。したがって、TRXシステムは、例えばROIを隔離するだけでなく、ホルモンシグナルの微調整によってホメオスタシスを制御することができる。これらの現象は、例えば細胞が重度の酸化ストレスに曝されると考えられる炎症の際の根拠であると思われ、ここではグルココルチコイド作用の抑制が内因性防御機構を強化しかつ自己防御のための炎症反応のカスケードの早期終了を防止し得る。細胞TRXレベルの増加は受容体活性を回復させ、GRが標的遺伝子と効率的に連絡することを可能にする。抗炎症遺伝子の結果的な活性化および/または炎症性遺伝子の抑制は、炎症のオーバーシュートを防止し得る。このプロセスは、細胞のレドックス電位の変化および細胞内液中の還元されたGSHの濃度によってモジュレートされ得る。したがって、グルココルチコイド機能は、グルタチオン投与によってモジュレートされ得る。従って、慢性関節リウマチのような慢性炎症状態ならびに他の免疫および自己免疫疾患の治療は、グルタチオンによる治療から利益を得ることもできる。

【０２０３】

HIVのライフサイクルにおけるNFκBの役割は、潜伏感染細胞内のウイルス再活性化プロセスにおいて特に重要であり、広く受け入れられている。T細胞レセプター抗原複合体によってまたはIL-1もしくはTNFのレセプターによって誘発されるような細胞内シグナル伝達経路が活性化された後、NFκBは、HIV LTRのプロモーター領域内の標的DNAエレメントに結合することによってHIV遺伝子発現を開始する。次に、ウイルスにコードされたトランス活性化因子Tatが産生され、爆発的なウイルス複製を引き起こす。細胞転写因子NFκBによるHIV遺伝子発現の活性化経路は、概念的にはウイルストランス活性化因子による活性化に先行するので、NFκBをウイルスの潜伏性の維持およびその破綻の決定要因とみなすことは概念的である。抗酸化物質は、HIV複製を阻止することによってAIDSを治療するのに有効であり得る。

【０２０４】

NFκBが役割を果たす別の状況は、血行性のがん細胞転移である。NFκBは、血管内皮細胞の表面上にE-セレクチン（ELAM-1としても知られている）を誘導する。いくつかのがん細胞は、細胞表面上にシアリル-ルイスX抗原と呼ばれるE-セレクチンのリガンドを恒常的に発現するので、E-セレクチンの誘導は、がん細胞-内皮細胞相互作用の律速段階であると考えられる。例えば、初代ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）をIL-1またはTNFで処理すると、NFκBの核移行が観察され、続いてE-セレクチンの発現が増強される。ある研究では、HUVECと、シアリルルイスX抗原を発現する肺のヒト小細胞がん由来の腫瘍細胞株であるQG90細胞との間の細胞間相互作用が研究され、IL-1が、HUVECへのがん細胞の付着を誘導することができたことが分かった。しかし、N-アセチルシステイン、アスピリンまたはペントキシフィリンによるHUVECの前処理は、用量依存的に細胞間結合を効率的に阻止した。

【０２０５】

色素性上皮由来因子（PEDF）

癌腫のような固形腫瘍は数ミリメートルのサイズを超えて成長を続けるために血管新生を必要とすることは周知である。これは、すべての組織と同様に、酸素を必要とし、有害な代謝産物を取り除かなければならないためである。さらに、急速に増殖する腫瘍は、高い細胞複製速度のために正常組織のものを十分に上回る要求を有し得る。したがって、腫瘍と戦うのに使用されることが求められている1つの技術は、腫瘍壊死因子、エンドスタチン、アンジオスタチンおよび他の薬剤などの血管新生を遮断する医薬および薬剤の使用である。関心を呼んでいる1つの薬剤は、セリンプロテアーゼ阻害剤（セルピン）スーパー遺伝子ファミリーのタンパク質であるが、阻害剤ではなく基質の特徴を有する色素性上皮由来因子（PEDF）である。PEDFは、上に記載した黄斑の色素性RPE細胞との関連性にちなんで命名された。

【０２０６】

PEDFは、上皮細胞増殖（血管新生に必要な血管上皮細胞を含む）をブロックし、細胞分化を促進し、神経栄養性および神経保護性である強力な自己分泌および傍分泌ホルモンで

ある。その後の研究により、PEDFまたはそのアイソフォームは体内全体に広範囲に分布しているが、網膜および中枢神経系の色素性上皮細胞では比較的高濃度で分布していることが確認されている。PEDFは細胞がアポトーシスに抵抗するのを助け得る。グルタチオン枯渇はまた、分化の不全と直接関連している。PEDFは細胞外マトリックスに結合する。色素性上皮由来因子（PEDF）はグリコサミノグリカンに結合する：結合部位の分析。PEDFは、最も強力な直接的な血管新生因子として知られている。眼内では、眼の水晶体、網膜および硝子体内の血管の内殖を防止する。PEDFは、細胞分化の劇的な増強剤であり、例えば、網膜芽細胞腫細胞を正常に現れる細胞に逆変換させることが可能である。PEDFは、数々の有害な因子に対して、例えば、グルタミン酸の興奮性神経毒性に対して、神経組織を保護する。

【０２０７】

PEDFは、子宮内膜の間質細胞によって産生され、腺上皮の増殖および分化に強い影響を及ぼす。ホルモンおよび妊娠に応答して、間質細胞が脱落細胞になるとき、PEDF産生は、（ｉ）胎盤のさもなくば高度に侵襲性の栄養膜細胞の子宮壁への制御されない成長および侵入、および（ｉｉ）絨毛膜絨毛から子宮壁への制御不能な血管の内殖、を防ぐのに重要であると考えられている。

【０２０８】

PEDFは、細胞周期制御因子に直接的な影響を与えることによって、多くの異なる細胞型における細胞周期を制御する。PEDFの源、すなわち、網膜色素上皮（RPE）は、神経網膜の正常な発達および機能にとって重要であり得る。増殖因子を含む様々な生物学的に活性な分子が、RPE細胞によって合成され、分泌される。RPEは、神経網膜に先行して発生し、神経網膜に隣接しており、血液網膜障壁の一部として機能する。成長因子に加えて、栄養素および代謝物もRPEと網膜との間で交換される。例えば、RPEは、よく知られた成長因子であるPDGF、FGF、TGFα、およびTGFβを網膜に供給する。RPEによって供給されるこれらの因子および他の未知の因子が、網膜の組織化、分化および正常な機能に影響を及ぼす可能性は非常に高い。

【０２０９】

RPEによって分泌される推定分化因子の影響を研究および判定するために、ヒト胎児RPE細胞の培養物から得られた網膜抽出物および馴化培地に培養細胞が供されている。例えば、米国特許第4,996,159号は約57,000±3,000の分子量であるRPE細胞から回収された血管新生阻害剤を開示している。同様に、米国特許第1,700,691号、同第4,477,435号、および同第4,670,257号は、網膜抽出物、および細胞再生および眼の疾患の治療のためのこれらの抽出物の使用を開示している。さらに、米国特許第4,770,877号および第4,534,967号は、ウシ硝子体液の後部から精製された細胞増殖阻害剤を記載している。

【０２１０】

PEDFはヒトRPEから50kDaのタンパク質として単離されている。具体的には、PEDFは、正常な網膜芽細胞の新生物対応物であるヒトY79網膜芽腫細胞の分化を誘導することが実証されている。PEDFにより誘導される分化性変化には、神経突起の複雑な網目構造の拡張、およびニューロン特異的エノラーゼおよびニューロフィラメントタンパク質のようなニューロンマーカーの発現が含まれる。これが、RPEによるPEDFタンパク質の合成および分泌が、神経網膜の発達および分化に影響を与えると考えられている理由である。さらに、PEDFは、Y79網膜芽腫細胞のような未分化ヒト網膜細胞においてのみ高度に発現されるが、それらの分化した対応物中には存在しないか、または下方制御されている。また、PEDF mRNAは、静止状態のヒト胎児W1線維芽細胞において豊富に発現され、それらの老化対応細胞では発現されないことが報告された。

【０２１１】

PEDFのさらなる研究、ならびに網膜および中枢神経系（CNS）の炎症性、血管性、変性およびジストロフィー性疾患の治療におけるその潜在的な治療的使用の試験には、大量のPEDFを得ることが必要である。残念ながら、ヒト胎児の眼においてPEDFの存在量が低いこと、さらには、特に研究および治療用途における胎児組織の使用の制限に照らして、その

供給源組織がめったに利用できないことは、PEDFのさらなる研究を良くても困難にしている。したがって、当該因子の供給を獲得するための組換え技術が開発された。米国特許第5,840,686号を参照されたい。

【０２１２】

タンパク質のアミノ酸配列に基づいて、PEDFは、セリンプロテアーゼ阻害剤がメンバーであるセルピン遺伝子ファミリーとの広範な配列相同性を有することが見出されている。このファミリーの多くのメンバーは、タンパク質の反応部位として機能するカルボキシル末端に厳密に保存されたドメインを有する。したがって、これらのタンパク質は共通の祖先遺伝子に由来すると考えられている。しかし、発生調節はセルピン遺伝子ファミリーのメンバー間で大きく異なり、多くは古典的なプロテアーゼ阻害活性から逸脱している。Becerra SP、PEDFに関する構造機能研究。神経栄養活性を有する非阻害性セルピン。PEDFはセルピンと配列相同性を共有しているが、cDNA配列の分析は、それが保存されたドメインを欠き、したがって古典的なプロテアーゼ阻害剤として機能しない可能性があることを示す。

【０２１３】

PEDFのゲノム配列決定および分析は、4kbの5'-上流配列に加えてイントロンおよびエキソンの配列を提供している。in situハイブリダイゼーションおよび体細胞ハイブリッドパネルの分析の両方を使用し、PEDFの遺伝子の位置は17p13.1に特定されている。これはp53腫瘍抑制遺伝子に非常に近く、p53遺伝子産物の突然変異とは無関係の多数の遺伝性癌の染色体局在にも近い。したがって、PEDFは、これらの癌の主要候補遺伝子となる。

【０２１４】

PEDFは、RPE細胞によって特に高度に発現されるが、ノーザンブロット分析およびウェスタンブロット分析によって、ほとんどの組織、細胞型、腫瘍などにおいて検出可能である。それは、例えば、硝子体液および房水中で容易に検出される。PEDFの細胞内局在の重要な問題も対処されている。大部分のPEDFは分泌されているようだが、PEDFは、細胞質内の非常に特異的な細胞骨格構造だけでなく、核にも関連している。重要なことに、これは細胞の年齢および特定の細胞周期状態に応じて異なる。例えば、該タンパク質は、付着の初期段階の間に基層と相互作用する霊長類RPE細胞の仮足の先端に集中しているようである。その後、この染色は消え、特定の細胞骨格構造および核に関連してタンパク質が出現する。したがって、PEDFは、核および細胞質の両方において重要な細胞内役割を果たすようである。

【０２１５】

分裂している未分化のY-79細胞にはPEDF発現があり、静止した分化した対応物ではほとんどまたは全く発現しない。WI-38線維芽細胞におけるPEDFの合成は、若い細胞における細胞周期のG0期に限定される。さらに、古い老化細胞では、PEDFメッセンジャーRNAは存在しない。網膜では、PEDFはミュラーグリア細胞を阻害する。ミュラー細胞はアストログリアに類似しているので、PEDFは、網膜剥離、糖尿病、色素性網膜炎などの状態における神経膠症を阻止すること、ならびに網膜ニューロンの命を救うことにおいて同様に有効であろう。したがって、細胞レドックス電位を変化させ、それによってPEDF発現を変化させるためのGSHの投与は、特定の価値を有し得る。

【０２１６】

明らかに、黄斑変性において、色素沈着したRPE細胞は欠陥を有し、死滅し、黄斑内のPEDFの機能的損失をもたらす。PEDFが連続して存在しなければ、血管上皮細胞は脱分化を受けて増殖期に入り、新血管形成をもたらし、血管による硝子体の角膜の侵入を生じる。網膜細胞によって産生される阻害性PEDFの量は、酸素濃度と正の相関がある。従って、PEDFは、虚血駆動性網膜血管新生において役割を果たすと推定される。実際、PEDFの利用可能性を減らすためにRPE細胞を殺す必要はないことが研究によって示されている。PEDFの利用可能性は、細胞のレドックス電位に敏感であり、還元状態でより利用可能であり、細胞が酸化状態にあるときには利用可能性が低い。（虚血は、細胞が過剰のフリーラジカルを産生する状態と関連している。これは、抗酸化物質の枯渇、細胞死またはアポトーシス

、または有毒な代謝性廃棄物の蓄積によるものであり得る）。したがって、他のPEDF産生細胞に適用可能なこのフィードバック調節は、適切なバランスを維持し、特定の特権組織に無血管化状態または高度に制御された血管新生を維持させながら、血流が必要な場所（比較的酸化されたレドックス電位）に血管新生を誘導する。mRNAレベルはおおむね変化しないので、PEDFの酸化的制御は、翻訳レベル又は翻訳後レベルのものであると考えられる。他のクラスの生物学的に活性な薬剤は、転写修飾または感受性を介してレドックス状態に応答することが留意される。

【０２１７】

ペプチドホルモンであるPEDFを直接投与する努力は、PEDFの大量の入手が不可能であることおよびその投与が困難であることにより、困難を伴う。

【０２１８】

GSHの臨床的使用

正常な耐糖能を有する高齢の患者10人および耐糖能障害（IGT）を患う高齢者10人が、基底状態下において、および75g経口糖負荷試験および静脈内糖負荷試験の間に、10mg/分で120分間、総投与量が2時間で1,200mgのGSH注入を受けた。基礎血漿総GSHレベルは、正常群およびIGT群について本質的に同じであり、基底条件下でのGSH注入は、GSHを同様のレベルまで増加させた。この研究は、GSHがIGT患者においてグルコース誘発型インスリン分泌を有意に増強したことを実証した。インスリンのクリアランスおよび作用に影響は認められなかった。

【０２１９】

正常被験者および軽度から中等度の本態性高血圧被験者において、ならびに高血圧および非高血圧の糖尿病患者（I型およびII型の両方）において、1,844mgまたは3,688mgのGSHの静脈内ボーラスの降圧効果を研究した。1,844mgのGSHの投与は、高血圧患者および非高血圧糖尿病患者の両方において、収縮期血圧および拡張期血圧の両方を、10分以内に急速かつ有意に減少させ、これはしかしながら30分以内にベースラインに戻ったが、正常な健康被験者には影響を与えなかった。3,699mgの用量では、高血圧の被験者で血圧が低下しただけでなく、正常な被験者でもGSHによって血圧値が有意に低下した。血液透析を受けている慢性腎不全患者に静脈内投与された1,200mg/日のGSHは、調査した血液学的パラメータ（ヘマトクリット、ヘモグロビン、血球数）をベースラインと比較して有意に増加させることが判明し、これらの患者に見られる貧血を回復させることが期待できる。

【０２２０】

GSHの毒性効果

種々の投与経路によるラットおよびマウスにおけるGSHの報告されたLD_{50}を以下の表に列挙する。GSHは毒性が極めて低く、何らかの毒性効果を見るために動物が摂取しなければならないGSHが大量であるため、経口LD_{50}測定を行うことは困難である。

【０２２１】

マウスのデータは、GSHについて以下のLD_{50}を示している：経口5000mg/kg（Modern Pharmaceuticals of Japan、第IV版、東京、日本医薬療品輸出組合、1972年、93頁）；腹腔内4,020mg/kg（Modern Pharmaceuticals of Japan、第IV版、東京、日本医薬療品輸出組合、1972年、93頁）。腹腔内6,815mg/kg（毒物学（Toxicology）、62巻、205頁、1990年）。皮下5,000mg/kg（Modern Pharmaceuticals of Japan、第IV版、東京、日本医薬療品輸出組合、1972年、93頁）。静脈内2,238mg/kg（Japanese J. of Antibiotics、38巻、137頁、1985年）。筋肉内4,000mg/kg（Modern Pharmaceuticals of Japan、第III版、東京、日本医薬療品輸出組合、1968年、97頁）。GSHは、特にアスコルビン酸欠乏の場合には、毒性となり得、これらの効果は、例えば、毎日3.75 mmol/kg（毎日1,152 mg/kg）を三回に分けて投与したアスコルビン酸欠乏モルモットにおいて示され得る一方、非アスコルビン酸欠乏動物においては、この用量で毒性は見られなかったが、この用量の2倍で見られた。

【０２２２】

GSHは、一酸化窒素シグナル伝達、虚血および血管内皮の制御との相互作用を含む、循

環系の多くの局面に影響を及ぼす。

【０２２３】

癌患者における高用量経口GSHの使用

ある発表された研究では、肝細胞癌を有する8人の患者を、1日当たり5グラムの経口還元型GSHで治療した。2人の患者は、耐え難い副作用（胃腸炎および硫黄臭）によりGSHを受けた直後に離脱した。残りの患者（27～63歳、男性3人、女性3人）は、この高用量のGSHからの副作用を経験せず、119日（女性患者が腫瘍により死亡した時点）～820日を超える（この男性患者は発表時にまだ生存しており、5gの経口GSHを毎日服用していた；腫瘍は進行しておらず、全身状態は良好であった）期間にわたって5gの経口GSHを摂取し続けた。女性患者のうち2人は1年生存し、腫瘍増殖の退縮または停滞を示した。残りの2人の男性患者は、6ヶ月以内に予想通りに死亡した。

【０２２４】

HIV感染患者の経験

3グラムの還元型GSHを含む市販の栄養製剤を、民間の医師のグループによって3ヶ月間、46人のAIDS患者のグループに毎日与えた。重大なGSH関連副作用は報告されなかった。実験室試験または臨床試験からの毒性の証拠は報告されなかった。しかしながら、利益が決定的に実証されることはなかった。

【０２２５】

上記の考察から明らかなように、GSHのレベルおよび/または酸化種対還元種の比、または前記レベルまたは比に基づく二次的影響のいずれかによって影響を受ける、多種多様な病的および変性性疾患が存在する。一般に、毒性の範囲によって決定される薬学的に許容される範囲内では、GSHのレベルの上昇は健康を改善する傾向があり、低い酸化対還元比は有益であると考えられている。したがって、本発明は、だれもが老化および絶え間ない酸化傷害にさらされる健常人と、上記のような病理に罹患した人々の両方について、還元型GSHの投与を提唱する。示されるように、GSH自体が良好なバイオアベイラビリティを以て経口投与され得るので、この投与様式が好ましい。GSHの薬学的に許容される誘導体を投与するか、または他の投与経路を使用することはもちろん可能である。同様に、GSHは、単独で、または添加剤もしくは相乗的組成物と組み合わせて、または共投与剤の毒性を改善するために投与することができる。

【０２２６】

以下を実証する、GSHおよび他のSH抗酸化物質の使用を支持する文献がある：（i）安全な、即時の放射線防護；（ii）安全な、硫黄マスタードガスの迅速な不活性化；（iii）2つのヘテロ毒素のいずれかの形成が不可能になり、毒素が弱められ、それにより細胞侵入およびそれに続くサイトカインを防ぐような、炭疽の3種の外毒素の安全な即座の改変;（iv）とりわけ、痘瘡ワクチン接種、天然痘感染、火傷および外傷後の重篤な合併症で生じる、敗血症に対する迅速な保護。

【０２２７】

このように、GSHは様々な核・生物・化学物質に対して有用であり、実際にその広範囲の活性は、未知の不確定な脅威に対する「第一線」防御として特に有用である。その低い毒性はまた、警告または緊急の脅威の時に、長期間の予防的使用を可能にする。

【０２２８】

GSHは、このさもなくば難しい分子を安全、安定、かつ用量反応性薬物動態学を以て生物利用可能にする製剤（経口投与後1.5時間で80％が細胞内に吸収される）において利用可能である。非症候性HIV陽性者に関する第1相試験では、この天然産物（10グラム/24時間）の固有の安全性が、FDAの抗ウイルス剤部門のために確認された。

【０２２９】

GSHは、異常な微生物、敗血症、炭疽毒素、痘瘡ワクチン接種合併症、天然痘、遺伝的に改変されたインターロイキン4（IL-4）遺伝子のコピーを保有する天然痘、（GSHの酸化ストレス抑制に基づく；過剰なサイトカイン産生のGSH抑制、過剰なプロスタグランジン合成のGSH抑制、宿主細胞に組み込まれたプロウイルスDNAレベルでのウイルス複製のGSH

抑制、Tヘルパー1応答パターンのGSHアップレギュレーションおよびIL-4を含むTヘルパー2応答パターンのダウンレギュレーション）。敗血症は、肺癌、乳癌、前立腺癌および結腸癌のすべての癌の組み合わせよりも多くの人々を死に至らしめ、また集中治療室における並外れた費用をもたらす。天然痘のような生物兵器の微生物は、敗血症誘発の結果として殺す。GSHは、放射線学的および化学的傷害の治療、および将来の曝露に対する予防としても有用である。

【０２３０】

GSHはまた、薬学的に十分に対応されていない一般的な神経障害：アルツハイマー病およびパーキンソン病の治療にも有用である。

【０２３１】

GSHは、硫黄マスタードガスのような毒性化学物質や放射性物質を安全に中和するその性質から、有用である。また、支持文献には、GSHが、炭疽毒素、天然痘ワクチン接種合併症、天然痘感染、およびインターロイキン4（IL-4）増強天然痘および他の「外来微生物」による感染症で見られる激しい炎症の致命的な「サイトカインストーム」を食い止める能力を有することも示されている。

【０２３２】

GSHを投与するための好ましい製剤および方法は、生物保護剤GSHの身体の蓄えを直接かつ迅速に補充する。この物質の細胞内濃度は、年齢、糖尿病、喫煙、感染症および毒素への曝露および放射性組成物を含む多くの要因による侵食に対して脆弱である。保護的になるため、GSHレベルが高濃度に保たれるようにし、GSHが細胞内でその調節プロセスを実行できるようにすることが不可欠である...それは細胞内で最も重要な生化学である...生命の過程はそれなしで急速に停止する。GSHは、毒ガス、放射性物質、および致死微生物の戦時およびテロリストの散布から軍事要員および市民を保護するのに役立つ。

【０２３３】

GSHレベルは、経口投与後約30分後から、細胞内で、回復および増大し得る。これは、生存可能な曝露の大部分に対する「治療期間（window of therapy）」の十分範囲内にある。経口GSHの大きな安全係数と、回復／増大レジメン（12ヶ月間4～9グラム／日）の高い受容性が証明されたことにより、第一対応者や地上の特殊軍人の間で高いGSHレベルを前もって強化および維持することが可能になる。これらの利用可能なレジメンは、ヒトにおける正常な最高（prime）生産が24時間当たり10グラムであることから、十分であるように思われる。重大な毒性はない。

【０２３４】

薬物は、好ましくは、任意の都合の良い流体に容易に溶解可能な粉末形態の安定化された薬学的GSHとして提供される。味は穏やかで柑橘系である。粉末の保存期間は2.5年である。より高価な、カプセル化された剤形でも利用可能である。

【０２３５】

レジメンの容易さ、安全性および高い受容性は、長期的な癌のリスクのある放射線被爆者を、連続した複数年のレジメンで治療することを現実的にする。このような生存者の間の癌リスクは、放射線曝露の後遺症における主要な考慮事項の1つである。GSHは、放射線による毒性フリーラジカルを中和する即時作用の他に、Rasファミリーの癌遺伝子などの癌細胞の増殖を促進する遺伝子や、癌が増殖および拡大するために必要とする新しい血管の成長を促進する遺伝子の抑制を含む、いくつかのクラスの遺伝子の制御に役立つ必須の細胞調節因子でもある。GSHのこれらの長期的特性は、癌のリスクを低下させるのに役立つと考えられ、癌治療への相乗的アプローチを提供する可能性がある。

【０２３６】

GSHは細胞内の主要な生体保護物質である。それは、あるべきでない多くの化学物質、例えば硫黄マスタードや内在化したウランやプルトニウムなどと結合し、排泄物としてそれらを運び出す。GSHは、免疫系の生理学の不可欠な部分である；GSHが枯渇すると、これが損なわれ、感染が激化するようになる。GSHは、炭疽病や、天然痘のような強い炎症を特徴とする特定のウイルス感染症に見られる敗血症の分子病理を食い止める。GSHは、レ

ドックス電位を設定することによって、調節タンパク質および遺伝子をオンまたはオフにする。GSHは、特定の酵素（ペルオキシダーゼおよびトランスフェラーゼ）と協力して、過酸化した（酸敗した）有害な脂肪分子を分解する。このクラスの毒性物質は、炎症および免疫抑制を引き起こす。GSHは、細胞機能のためのエネルギーを効率的に産生する細胞「炉」であるミトコンドリアにおいて日常的に形成される過酸化水素（H_2O_2）を破壊する。十分なGSHが存在しないと、ミトコンドリアは「執行者」になり、SH感受性細孔（透過性遷移孔）を介してシトクロムcおよびカスパーゼを漏出させることによって、戦略細胞における予定外のアポトーシス細胞死を誘発する。ミトコンドリアを維持するこの特性は、パーキンソン病およびアルツハイマー病の治療において中心的なものである。GSHは、癌に見られる過剰な増殖因子、および血管成長因子の合成を阻害する。GSHは、炎症性障害、敗血症、感染症および癌にあるような、疾患関連遺伝子をスイッチオンする転写因子、例えばNFκBなどの活性化を食い止める。NFκBを抑制することは、硫黄マスタードガス、炭疽、敗血症、および天然痘からの炎症を抑制するのに役立つ。GSHは、組織中の残骸および微生物を除去するために不可欠な食細胞にとって重要である。マクロファージにおける高いGSHレベルは、微生物に対する局所組織防御を増強する。これは、生物兵器戦争で使用される微生物および敗血症を引き起こす微生物と戦うためにGSHを使用する根拠における要素である。

【０２３７】

応答パターンが相互に関連しているTヘルパー1（Th1）とTh2との間の生産的バランスを維持するために、マクロファージ、樹状細胞、およびB型リンパ球による抗原プロセシング中に高いGSH濃度が必要とされる。GSHはTh1をアップレギュレートし、Th2応答パターンをダウンレギュレートする。これは、天然痘免疫の生命を脅かす危険性を減少させることに関連し、IL-4増強ウイルス（例えば、IL-4増強天然痘）に対抗するのに潜在的な重要性がある。

【０２３８】

レドックス電位を設定し、脂質LOOHを分解し、ROSおよびRNSを中和するGSH特性は、NFκBファミリーの転写因子を不活性にし、核から排除するのを助ける。NFκBファミリーの転写因子は、感染した宿主細胞に組み込まれたプロウイルスDNA配列を含む、いくつかのゲノム配列のグループを活性化する（例えば、HIVプロウイルスDNAは多くの査読済み刊行物において首尾よく研究されている；他の組み込みウイルスDNA配列も、天然痘のDNA配列と同様に、NFκBの核への移行およびその後のプロウイルスDNAへの活性化-結合に対する同様の依存性を共有し得る可能性が高い。

【０２３９】

GSHは、アラキドン酸代謝およびシクロオキシゲナーゼおよびリポキシゲナーゼの生成物を制御する。これらは炎症促進性であり、DNA合成を刺激し、免疫抑制性でもある。このため、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤（例えば、Vioxx）は抗炎症剤であり、また癌リスクも低下させる。

【０２４０】

本発明の一態様は、天然痘感染症の治療方法を提供する。天然痘は20世紀に5億人を殺した恐ろしい惨劇であるが、分子病理機構が明らかにされており、高用量のGSHレジメンはこれらのメカニズムに対する障壁となる。天然痘に関与する主要な器官は皮膚であり、二次的に感染し得る多数の潰瘍化した痘瘡病変を伴う。これは体の80％～90％を覆う感染した第3度の熱傷を有する患者に部分的に類似しているが、炎症によって真皮GSHおよびマクロファージおよび白血球中のGSHの破壊が確実となる点で天然痘の方が悪い。基本的な病理は、熱傷（Burns）および敗血症（Sepsis）のそれに類似しているが、多数の循環抗原、抗原抗体複合体およびサイトカインの追加を伴う。大部分の細胞におけるGSHレベルは、重度の敗血症および熱傷では測定不可能である。GSHの損失は重大であり、熱傷および敗血症の文献によく記載されている。「サイトカインストーム」は病理のいくつかを特徴づけており、核因子κB（「NFκB」）をGSHで不活性化することによって炎症性サイトカイン産生をダウンレギュレートすることが可能である。これは、NFκBの過剰な活性化

によって特徴付けられる炎症性の状況において有効である。

【０２４１】

GSHは、身体の最も強力な抗ウイルス剤の一つであるIL-12およびインターフェロンガンマ（IFNγ）産生を含むTヘルパー1（「Th1」）応答パターンを促進するので、GSHは天然痘ウイルスの複製を妨げる可能性もある。GSHはTh1応答をアップレギュレートすることが知られており、これはTh2応答を相反的に阻害し、それにより、IFNγ産生を鈍らせて抑制の無いウイルス複製を促進し得るTh2サイトカインであるIL-4産生を阻害する。

【０２４２】

基本的に、Rx GSHによる天然痘感染の高用量治療は、過剰なNFκB活性化を鈍らせる可能性があり、これは毒性の炎症性サイトカインの産生を減少させる。また、Rx GSHはTh1応答を促進し、強力な抗ウイルス剤であるIFNγ産生をアップレギュレートすることができる。Th1パターンがアップレギュレートされる場合、IL-4はIFNγを妨害するので、IL-4の相反的ダウンレギュレーションは有用である。NFκBを介して、GSHはまた、Rx GSHがHIVのそのプロウイルスDNAからの複製を有意に阻害する様式と同様に、天然痘ウイルスの複製を妨げる抗ウイルス特性を有する可能性がある。ポックスウイルスは、げっ歯類においてIL-4遺伝子を用いて遺伝子操作され、おそらく天然痘株においても遺伝子操作されている。動物モデルでは、IL-4増強ポックスウイルスは、特定の天然のポックスウイルスに対する首尾よい免疫化にもかかわらず、致命的であることが証明されている。このような「スーパーポックス」ウイルスによる過剰なIL-4の病理学的結果の中には、IFNγの抑制がある。Rx GSHはこの分子病理を克服することができるかもしれない。

【０２４３】

本発明の別の態様は、化学物質、硫黄マスタードガス、戦争で使用されたことがあり一部のテロリスト集団の「お気に入り」と考えられている、安価で容易に調製される危険物質に対する防御に役立つよう設計された方法を提供する。従って、本発明によるGSHの経口投与は、細胞内のGSHレベルを回復させ、この化学物質から安全に保護するのを助けることができる。この毒ガスによる膨れ（blistering）は即座ではなく、その存在はその臭気が原因で明らかになる。従って、GSHを経口投与する時期がある。それは、「治療期間（window of therapy）」の十分範囲内である30分で細胞レベルを上昇させ始める。

【０２４４】

本発明のさらなる態様は、放射能の拡散に対する保護方法を提供する。これは、テロ対策だけでなく、エネルギー生成を原子力に大きく依存している米国や日本、フランスなどの国々における平時の用途にも大きな有用性を持っている。事故、汚染、廃棄物の問題に、米国および世界各地の人々は絶えずさらされている。重大な放射線被ばくの場合、GSHは、放射線被爆者の重大な懸念である癌のリスクを低下させるために、多年にわたる治療として安全に使用することができる。

【０２４５】

本発明のなおさらなる局面は、炭疽菌感染症および3つの毒素の危険な残存効果を制御するのを助ける方法を提供する。これらは3つのタンパク質であり、毒素が細胞内に浸透して細胞に莫大な量の有害なサイトカインを産生させるために、これらの特定の組み合わせが化学的に形成されなければならない。GSHは浸透性毒素の形成を阻止する能力を有し、かつ遺伝子抑制機能によりサイトカイン産生を遅らせる能力を有する。外毒素のために、患者はドキシサイクリンおよびシプロフロキサシンの適切な使用によっても死ぬことがある。GSHはこの点で助けになりうる。

【０２４６】

GSHは安全であることが証明されており、体内で生成される自然保護剤であり、体中のすべての細胞に一貫して高いレベルを提供するために、日常的に毎日経口摂取することができる。したがって、第一対応者および高リスク状態の人々を、高いGSHレベルで継続的に維持することができる。毒性はなく、高用量を使用している人々の大半が肯定的な有益な効果を報告している。GSHの健康上の利点は広い。基本的に、人々にGSHを十分に与えることに「欠点」はない。

【０２４７】
最近の文献から、GSH合成が45歳後に低下することはよく知られている。すべての年齢において、それは過剰なアルコール、食物脂肪、炭水化物、タバコ、太陽、およびエアロビクスによって破壊され得る。
【０２４８】
アルツハイマー病は、細胞が断片に分解する細胞死の一形態であるアポトーシスの過程によって、脳細胞が徐々に消失していることを表すと考えられている。このプロセスは、細胞の「発電所」であるミトコンドリア内のGSHの枯渇から始まると考えられている。いくつかの脳細胞は、エネルギー要求が高いため、細胞あたり数百個のミトコンドリアを有する。ミトコンドリアがGSHを欠乏している場合、エネルギー産生が減少し、さらにミトコンドリアはアポトーシスを惹起する高度に破壊的な生化学物質を放出する。この分野の医学者は、脳におけるGSHの効果的で安全な回復が、特に初期段階で検出され治療される場合、アルツハイマー病の進行を鈍らせる可能性があると考えている。
【０２４９】
微小血管病変もまた、認知症において詳述されており、永続的な病理学的サイクルに寄与する。動物モデルの大脳における微小循環は、H.B. Demopoulosらによって走査型電子顕微鏡を用いて初めて定義された。Rx GSHは、内皮におけるPGI2合成を維持し、血管の一酸化窒素（●NO）の望ましい生理学的特性を確保することによって、このタイプの微小血管病変に対抗する。
【０２５０】
心理測定法（患者に読み聞かせた一段落程度の文章を一字一句暗唱する能力、およびその他の標準化された短期記憶検査）と脳画像法とを組み合わせた新しい方法論は、初期のアルツハイマー病を検出し、この疾患の進行をも示すことができる。
【０２５１】
現代の神経学におけるこれらの進歩により、初期のアルツハイマー患者で、二重盲検化および無作為化されたプラセボ群および治療群を用いて、臨床試験を行うことが可能になる。2つの群を追跡し、進行速度を比較して統計学的有意差を決定することは可能であろう。GSHは、脳細胞の漸進的なアポトーシスに関連する慢性認知症に罹患している患者において、この過程に仲裁し、遅らせるかまたは停止させ、さらには何らかの機能の回復を可能にすることさえできると考えられている。進行性アポトーシスに関連する他の慢性疾患もGSHで治療することができる。同様に、GSHは、脳内および他の場所の細胞の病理学的アポトーシスをもたらす急性事象の治療または防止に有用であり得る。好ましい薬物投与形態は、安全で安定であり、よく吸収され（0.5時間で開始し、1.5時間以内に70～80％に達する）、細胞に容易に分配される。
【０２５２】
パーキンソン病は、基底核における特化された脳細胞、例えば、黒質において起こるGSH枯渇障害である。これらの細胞は、ドーパミンとして知られる強力な神経伝達物質を産生する。出発物質であるDOPA、およびドーパミン産生につながる生化学的経路は、アスコルビン酸およびGSHを含むかなりの抗酸化物質を消費するフリーラジカル反応を伴う。開始病因因子は知られていないが、支援科学（supporting science）は、障害の発症および進行がGSHの不足を伴うことを示している。本発明によれば、GSHレベルは安全に回復する。
【０２５３】
すべてのGSH治療プログラムにとって重要な点は、体内の実質的にすべての細胞、特に脳細胞が、GSHを周囲の組織液から積極的に取り込んで細胞内にポンプ輸送し、細胞内での大きな濃度上昇をもたらす、活性なGSHトランスポーターを表面膜に有することである。
【０２５４】
GSHは経口的に生物学的に利用可能であり、効率は、薬学的に安定化された還元型GSHの空腹時のボーラス投与によって増加し得る。GSHは、粘膜、特に舌下粘膜および十二指腸

の内腔および回腸の初期部分から効率的に吸収される。GSHは、薬理学的に投与され、生物の細胞内のレドックス状態を変化させ、したがって、NFκBおよびPEDFなどのレドックス依存性因子の発現を変化させることができる。従って、例えば、GSH（GSH）の生物学的利用可能な投与の結果として、組織のレドックスバランスは還元状態にシフトする。これは、フリーラジカルの産生が過剰である、代謝要求が高い、または異常に高い組織の場合に特に当てはまる。この場合、薬理学的に投与された還元型GSHの存在は、細胞のレドックスバランスを変化させる際により大きな影響を及ぼすと予想される。従って、外因性GSHの影響は、虚血の危険性があるそれらの組織の近傍に特に見られると考えられる。

【０２５５】

GSHの効果はPEDFのレベルの上昇または持続に限定されず、むしろGSHの作用は多くの異なる組織および細胞機能に及ぶ可能性があることが注目される。GSHに調節されたレドックス状態は、遺伝子誘導、転写、翻訳、翻訳後、またはレセプター媒介効果を介して様々な要因で細胞機能を制御し得ることが特に注目される。

【０２５６】

PEDFの場合、GSHの投与は、（a）血管新生を減少させ、（b）細胞の分化状態への影響力となり、かつ（c）ニューロンなどの組織の正常な機能を支持することによって、抗腫瘍療法として作用することが期待される。この点において、抗酸化剤およびフリーラジカルスカベンジャーとしてのGSHの作用は、別個で分離していると考えられていることが特に注目される。

【０２５７】

NFκBの場合、GSH投与は、HIVを含む特定のウイルス複製を活性化するカスケードを妨げることが期待される。

【０２５８】

GSHはまた、関節リウマチを含む特定の免疫および自己免疫障害を緩和し、グルココルチコイド効果を変化させることもある。

【０２５９】

ニューロン（またはそれらの前駆細胞）の移植は、特定の病状を治癒または緩和することができると考えられている。例えば、パーキンソン病では、特定の胎児脳細胞の患者への移植は、疾患に関連する特定の問題を緩和または治癒することができる。しかしながら、移植された細胞は、病的または死んだ細胞を機能的に置換するために、インサイチュで適切に分化し、分化したままでなければならない。これには、適切な増殖因子および刺激を有する細胞の微環境を作り、維持することが含まれる。還元型GSHの高濃度の維持は、例えば、アストログリアによるPEDFの分泌を促進することができ、または高レベルのPEDFを産生するように遺伝子改変（トランスフェクトされた）アストログリアを助け、神経成長因子に富む環境を提供する。

【０２６０】

虚血再灌流傷害はまた、移植において特に懸念事項であり、比較的高レベルのGSHでの細胞の前処置は、二次レドックスメッセンジャーのレベルと同様に、細胞に対するフリーラジカル損傷を減少させる可能性がある。

【０２６１】

本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に安定化されたGSH」は、実質的な環化を伴わずに還元形態に維持されるGSHをいう。この安定化は、GSHと一緒に、天然の還元型GSHを送達することができる医薬製剤を提供する1つ以上の薬剤の添加によって達成され得る。

【０２６２】

本発明はまた、GSHおよび他の薬理学的作用物質の新規な組合せ、ならびに新規の剤形および投与のための手段を含む。

【０２６３】

比較的高濃度で電荷移動錯体として提示される薬学的に安定化された還元型GSHの経口投与は、ヒトにおける細胞内GSHレベルの有意な予測可能な増加をもたらし得る。

【０２６４】
さもなくば健康なHIV感染ヒトにおいて、末梢血単核球（PBM）における細胞内GSHレベルは、安定化GSHの経口投与後に有意に増加することが見出された。これは、十分な用量の薬学的に安定化された還元型GSHの送達を確実にし、十二指腸の前で迅速に溶解するGSH製剤を提供することによって達成される。この製剤は、取り込みを促進するために、十二指腸内、すなわち空腹時に高濃度のGSHを効率的に提供するために投与される。
【０２６５】
好ましい製剤は、250mgの還元型GSHを、以下の3つの機能を果たすための少なくとも等モルのアスコルビン酸とともに含有する：調製、貯蔵中および摂取後の犠牲的非特異的抗酸化剤としての作用；GSH粉末の静電荷を減少または中和し、カプセルの高密度充填を可能にする；カプセル化装置の潤滑剤としての作用。アスコルビン酸はまた、GSH分子を薬学的に安定化させる酸性および還元性の環境を維持する。アスコルビン酸は、GSHと電荷対を形成し、細胞膜を通る浸透を促進し、γ-グルタミルおよびグリシニル残基が環状構造を取るか、または内部環状アミドを形成する傾向を減少させると考えられている。従って、アスコルビン酸塩は溶液中でGSHと複合体を形成し、線状立体配座を維持する。この線状構造は、次に、遊離のシステイニルチオール基を立体的に妨害する。この立体障害は、形成され得るフリーラジカルを安定化し、したがってGSHの生物学的活性を維持する。
【０２６６】
中性から塩基性のpHのような特定の条件下で生じることがあるGSHの環状形態は、SH部分を露出させ、より反応性にする。アルカリ性pH下では、環状アミド形成が促進され、潜在的に毒性の化合物が残る。環状GSH組成物は、GSHレダクターゼ、GSHペルオキシダーゼおよび特異的GSHトランスポータータンパク質を阻害し得る潜在的な構造類似体である。
【０２６７】
同様に、酸化条件は、ジスルフィド形成（GSSGおよびPr-S-S-G）を促進し、これはGSHのバイオアベイラビリティを低下させ、GSH投与の潜在的利益のいくつかを打ち消す可能性がある。さらに、酸化条件はまた、脱硫を促進し、毒性であるかまたは効率的GSH吸収を阻害し得るオフタルミン酸形成（または他の化合物）をもたらす。
【０２６８】
したがって、好ましい経口製剤は、好ましくは、安定化剤と混合した有効量のGSHを含み、十二指腸の後部の内腔で達成されるGSH濃度が血漿GSH濃度より高くなるような、好ましくは上皮内層細胞の細胞間濃度よりも高くなるような条件下で投与する。したがって、例えば、GSHおよびアスコルビン酸カプセルは、空腹時に摂取される。還元剤、好ましくはアスコルビン酸は、包装および保存中のGSHの酸化を防止し、さらに、吸収前に十二指腸の比較的アルカリ性な状態でGSHを安定化し得る。GSHの脱硫は、GSH摂取を阻害するGSHのセリン類似体であるオフタルミン酸の形成をもたらす。このプロトコルは、食事後にGSHカプセルを服用することを指示する先行技術の投与方法とは対照的である。GSHを食物で希釈することによって、分解酵素が希釈され、アルカリ性条件が緩衝される。しかしながら、吸収の迅速性は、少量の分解のみで高いバイオアベイラビリティを可能にする。
【０２６９】
GSHは、他の薬学的に活性な組成物と組み合わせてもよく、ここで他の組成物は、容易に酸化される組成物、抗酸化組成物、抗酸化効果を有する組成物や、抑制された総GSHレベル、抑制された還元型GSHレベル、生物中の比較的酸化された状態、制御されていないフリーラジカルまたは酸化反応、またはより還元された状態が望ましい状態と関連する病態の治療用組成物からなる、広範な群より選択される。
【０２７０】
GSHは、単独で使用することができるか、または、AIDS、HIV感染、またはレトロウイルス複製（例えば、HTLV I、HTLV-II、HTLV-IIIなど）、ヘルペスウイルス複製（例えば、単純ヘルペスI型、単純ヘルペスII型、帯状疱疹（水痘）、CMV、EBV、HHV-8、等）、狂犬病、エボラウイルス、インフルエンザウイルス、CHF、冠状動脈疾患、冠動脈再狭窄後の状態、糖尿病、黄斑変性症、および/または肝炎（毒性または感染性）の治療または緩和

のための他の既知の組成物と組み合わせて使用することができる。加えて、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病などの特定の神経学的状態も、抗酸化療法から利益を得ることができる。さらに、多数の医薬療法、特に血液脳関門を通過するものは、酸化作用に関連する副作用と関連している。タモキシフェンなどの他の薬物は、黄斑変性と関連している。したがって、GSHは、ウイルスまたは特定の細菌感染症、慢性疾患を治療するため、解毒薬、酸化および脂質過酸化障害を治療または軽減するため、および発癌および老化を含むスーパーオキシドなどの酸化剤の長期作用を減少させるために、投与することができる。

【０２７１】

アミロイド疾患（例えば、アルツハイマー病）のようなタンパク質の沈積をその病因の一部として有する疾患の場合、培地のレドックス電位の変化はタンパク質の溶解性に劇的な効果を有し得ることに留意されたい。したがって、培地がより酸化されるにつれて、タンパク質は、典型的には、ペプチドの二次構造を規定し、他の部分との架橋結合を形成し得る、より多くのジスルフィド結合を有するであろう。一方、還元型GSHの投与は還元的環境をもたらし、それに対応してより多くの遊離SH基が生じるであろう。したがって、GSHの投与は、そのような疾患の有効な治療または治療レジメンの一部を提供することが期待される。また、沈積したペプチドは、フリーラジカル反応に関与する可能性があり、これもGSH投与によって対抗されることにも留意されたい。

【０２７２】

GSHはまた、単独で使用することができるか、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、カテコールアミン毒性、他のフリーラジカル関連毒性、脳卒中や一過性虚血事象、脊髄損傷、および神経組織への他の外傷、末梢ニューロパシー、おそらくプリオンに関連する疾患、感染因子病理および炎症病理などの、フリーラジカルに関連する神経学的状態の治療のための他の治療法と組み合わせて使用することができるか、またはこれらの状態を治療するために投与される薬物のフリーラジカル関連毒性を低下させるために使用することができる。

【０２７３】

マイコプラズマ肺炎などのマイコプラズマ感染症は、これらの細胞内寄生体によって細胞内のフリーラジカル反応に起因する病理を引き起こすと考えられている。したがって、GSHは、マイコプラズマ感染症の治療のために、単独で、または抗マイコプラズマ抗生物質と組み合わせて投与することができる。GSHはまた、マイコプラズマまたはマイコプラズマ様生物またはL型細菌のような無細胞壁生物または細胞壁欠損生物によって引き起こされる病状の予防または治療において有益であり得る。

【０２７４】

GSHはまた、正常哺乳類におけるGSHレベルを増加または補足するために使用され得る。これは、例えば、虚血事象や、太陽、化学物質、または他の環境曝露に由来するフリーラジカル損傷に対する予防、および癌リスクを低減するために望ましい可能性がある。

【０２７５】

実際には、生物体内の酸化条件は一般的に望ましくないので、必要に応じて酸化条件を生成するための機構が通常は摂取された抗酸化剤を圧倒するため、GSHとの組み合わせには多くの医薬および薬物が適切である。しかし、特定の状態では、GSHの投与に注意が必要な場合がある。さらに、ある種の癌化学療法レジメンは、標的細胞を選択的に殺すために細胞のフリーラジカル消滅機構の枯渇に依存する。最後に、細胞アポトーシスまたはプログラム細胞死は、細胞（ミトコンドリア）における還元型GSHレベルの枯渇に依存し、死に至る。この機構が必要であるか生理学的に正しい場合、外因性GSHによる中断は望ましくないかもしれない。さらに、GSHは、いくつかの組成物と相互作用し、化学的部分を非特異的に還元または結合するか、または摂取後に代謝を変化させ得る。説明されない限り、これらの影響は望ましくない可能性がある。

【０２７６】

GSHは男性不妊症の治療に有効性があるかもしれない。したがって、グルタチオンは、

ミトコンドリアの欠損または欠損を改善する可能性がある。

【０２７７】

既知の抗HIV療法である3'-アジドチミジン（ジドブジン（登録商標）、AZT）は、強力な逆転写酵素阻害剤として作用する。しかしながら、この薬物は、フリーラジカルを生成し、ミトコンドリアに対して毒性であり、筋障害と関連している。したがって、GSHは、逆転写酵素阻害活性を妨げずに、毒性を低下させ、治療指数を増加させるためにAZTと併用して投与することができる。同様に、GSHは、有意なフリーラジカル関連毒性を有する他の薬物の治療指数を増加させるためにも使用され得る。

【０２７８】

AIDS、糖尿病、黄斑変性症、うっ血性心不全、血管疾患および冠状動脈再狭窄、ヘルペスウイルス感染症、毒性および感染性肝炎および狂犬病を含む、細胞内抗酸化剤レベルの低下に関連すると考えられる多くの状態がある。ある種の間質性肺疾患は、不十分なGSHレベルに起因する可能性がある。さらに、種々の癌化学療法を含む、様々な毒素および薬物療法は、フリーラジカル反応をもたらす可能性がある。したがって、GSHの投与は、GSHの便利で有効な経口製剤の使用により、これらの疾患および状態を治療する可能性を保持する。したがって、外因性GSHの投与は、生物内の還元状態を維持するのを助けるために、肝臓の産出量を補充する。上記のように、フリーラジカル反応を停止させないと、巨大分子の損傷、脂質の過酸化、および有毒化合物の生成をもたらす望ましくないカスケードが生じ得る。これらのフリーラジカル反応を阻止するには、適切なGSHレベルの維持が必要である。

【０２７９】

GSHはまた、金属と錯体を形成する能力を有する。例えば、上記のように、GSHは、ニッケル、鉛、カドミウム、水銀、バナジウム、およびマンガンとのキレート錯体を形成する。GSHはまた、血漿中の銅と循環錯体を形成する。GSHは、金属毒性を治療するために投与することができる。GSH-金属錯体が排泄され、金属負荷が減少すると考えられている。したがって、GSHは、鉄、銅、ニッケル、鉛、カドミウム、水銀、バナジウム、マンガン、コバルト、超ウラン金属、例えばプルトニウム、ウラン、ポロニウムなどに関連する毒性の治療のために投与することができる。EDTAと比較して、GSHはカルシウムをキレート化する傾向が減少しており、有意な利点を提供する。GSHのキレート化特性は、抗酸化特性とは別個であることが留意される。しかし、例えば鉄などのいくつかの金属毒性はフリーラジカル媒介性であり、したがってこれらの状態に対してGSH投与は特に有利である。

【０２８０】

高いバイオアベイラビリティをもたらすためには、粘膜、例えば十二指腸の近くに比較的高濃度の還元型GSHを経口投与のために提供することが望ましいことが判明した。したがって、従来の方法とは対照的に、GSHは空腹時に単一のボーラスとして投与することが好ましい。好ましい投与量は、約100～10,000mgのGSHであり、より好ましくは約250～3000mgのGSHである。さらに、GSH製剤は、吸収前、貯蔵中および消化管内の両方で酸化を低減させるために還元剤（抗酸化剤）、好ましくはアスコルビン酸で安定化される。結晶性アスコルビン酸の使用は、カプセル化を改善するためにGSHの静電荷を減少させ、カプセル化装置の潤滑剤として機能するという、追加の利益を有する。しかしながら、他の静電気消散方法または添加剤を使用してもよく、他の抗酸化剤を使用してもよい。好ましい剤形はカプセル、例えば、2部(two-part)のゼラチンカプセルであり、これは胃の中で迅速に溶解しつつ、空気および水分からGSHを保護する。

【０２８１】

消化管は、GSHについて特異的な促進輸送担体または能動輸送担体を有すると考えられており、これが分解することなく腸内腔からGSHを取り込むことを可能にする。このメカニズムによる取り込みは、高い濃度勾配を提供すること、およびオフタルミン酸などの輸送阻害剤の存在または生成を避けることによって最大化される。したがって、経口投与の好ましい方法は、他の殆どのチオール化合物と同様、従来の方法を用いて投与されるGSHとは異なる取り込みメカニズムを用いる。

【０２８２】
口腔粘膜は、GSHの血液への迅速かつ効率的な取り込みを可能にすることが判明した。消化管とは対照的に、口腔粘膜における促進または能動輸送メカニズムの重要性は低いと考えられている。むしろ、口腔粘膜における高濃度のGSHは、細胞を介したまたは細胞周辺のGSHの毛細血管循環へのGSHの受動輸送を可能にすると考えられている。したがって、口腔粘膜を介した吸収、例えば舌下投与を意図した組成物は、汚染物質がGSHと同様に吸収され得ることから、比較的小さな非荷電分子として、高純度であることが好ましい。したがって、組成物は、好ましくは、GSHを還元状態に維持することに役立つアスコルビン酸を含み、実質的に全てのアミンをプロトン化させることなく、グルタミン酸残基の脱プロトン化を回避するために口内にある程度の酸性環境を維持する。

【０２８３】
他の科学者の報告とは対照的に、GSHは実質的に胃内で分解されないことから、GSHの放出は胃内で希釈される必要はなく、あるいは放出を遅延させる必要はないことが判明した。事実、GSH製剤は、好ましくは胃内で放出され、溶解される。安定化剤、すなわちアスコルビン酸の添加は、消化されずにGSHが腸内の吸収部位に到達する能力をさらに改善する。膵臓からの脱硫酵素およびペプチダーゼ、ならびにpHの上昇がGSHを分解させる傾向があるので、胃を通過したら、GSHが即座に吸収されるようにすることが重要である。脱硫酵素はGSHの吸収を妨げるオフタルミン酸を産生する。したがって、実質的に希釈することなく、十二指腸内に高濃度のGSHを提供することによって、GSHは最大速度で吸収され得る。十二指腸の後半部および回腸におけるGSHの分解は吸収過程と競合する可能性があるが、本発明の方法は有意なバイオアベイラビリティを提供する。事実、研究により、経口投与されたGSHの約90％の生物学的利用能が実証されている。

【０２８４】
カプセルは、好ましくは、多数の供給源から得られる、二重0(00)サイズの標準的な二部硬質ゼラチンカプセルである。充填後、貯蔵中の酸化を低減するために、カプセルは好ましくは窒素下で保存する。カプセルは、好ましくは、結晶性アスコルビン酸を帯電防止剤および安定化剤の両方として使用する、米国特許第5,204,114号に記載の方法に従って充填される。さらに、各カプセルは、好ましくは、500mgのGSHおよび250mgの結晶性アスコルビン酸を含有する。好ましい組成物は、他の賦形剤または充填剤を含まない; しかし、他の適合性のある充填剤または賦形剤を添加してもよい。異なる量および比率のGSHおよび安定化剤を使用することができるが、標準的な二重0カプセルを充填し、かつ有効な安定性および高用量を提供するため、これらの量が好ましい。さらに、既知の高用量GSHカプセルの成分である炭酸カルシウムの添加は、この成分中に不純物が存在することがあるので避けられる。さらに、炭酸カルシウムは、胃酸を中和する塩基として作用し、これが小腸におけるGSHの分解を促進する。

【０２８５】
GSHおよびアスコルビン酸は比較的高用量で投与されるので、製剤を不安定にし、毒性作用または副作用を生じ得る、不純物、毒素または他の化学物質を除去するために、これらの成分を高度に精製することが好ましい。上述のとおり、製剤は、様々なクラスの他の医薬品を含むこともできる。

【０２８６】
GSHは、長時間にわたって有利に投与される。したがって、1セットの好ましい有用な組み合わせは、GSHと空腹時によく吸収され、かつ有害な相互作用を有さないか、または組み合わせ吸収が低下もしくは変動しない、慢性状態を処置することが意図される薬物とを含む。

【０２８７】
ある特定のクラスの薬物は、神経毒性、心筋症および他の臓器損傷を含む、多くの毒性作用を生じ得る、中枢または末梢のアドレナリン作動性またはカテコール作動性（catecholenergic）アゴニスト、または再取り込み遮断薬を含む。これらの薬物は、例えば、心臓、循環および肺の薬物、麻酔薬および向精神薬/抗精神病薬として使用される。これら

の薬物のいくつかはまた、覚醒剤、幻覚剤、および他のタイプの精神異常発現薬として、乱用の可能性がある。他のフリーラジカル開始関連薬には、ソラジン、三環系抗鬱剤、キノロン系抗生物質、ベンゾジアゼピン、アセトアミノフェンおよびアルコールが含まれる。

【０２８８】

約50mg～10gmの量のGSHと、哺乳動物においてフリーラジカル反応を開始することができる薬剤の有効量とを含む経口薬学的製剤を製造することができる。薬剤は、例えば、アドレナリン作動薬、ドーパミン作動薬、セロトニン作動薬、ヒスタミン作動薬、コリン作動薬、GABA作動薬、精神異常発現薬、キノン系薬、キノロン系剤、三環系抗鬱薬、及び/又はステロイド剤である。

【０２８９】

肝臓のGSHは、数多くの薬剤の代謝、異化および/または排泄中に消費される。肝臓のGSHの枯渇は、肝障害または中毒性肝炎をもたらし得る。このような薬剤には、例えば、アミノグリコシド系抗生物質、アセトアミノフェン、モルヒネおよび他のオピエートが含まれ得る。高コレステロール血症を処置するために使用される高用量のナイアシンはまた、中毒性肝炎と関連している。約50～10,000mgの量のGSHを含み、肝臓のGSH備蓄を消費する薬剤の有効量と併用して投与される、経口薬学的製剤を提供することができる。

【０２９０】

数多くの病態が肝障害をもたらす。この障害は、次に、GSHの肝臓蓄積量および酸化型GSHをその還元型に変換する肝臓の能力を低下させる。他の病態は、GSHの代謝障害に関連する。これらの症状には、感染性及び中毒性肝炎、肝硬変、肝原発及び転移性癌、外傷性及び医原性肝障害又は肝切除が含まれる。GSHおよび抗ウイルス剤または抗腫瘍剤を含む、薬学的製剤を提供することができる。抗ウイルス剤または抗腫瘍剤は、例えば、ヌクレオシド類似体である。

【０２９１】

GSHは分解され、システインはおそらく尿中に排泄される。したがって、非常に高用量のGSHはシステイン尿症を引き起こすことがあり、これはシステイン結石を引き起こし得る。他の長期毒性または有害作用が生じることがある。したがって、長期間にわたる約10gmを超える１日の摂取量は、医学的にモニタリングされるべきである。他方、約50mg未満の個別用量は、高レベルの吸収を生じさせ、臨床的な有益性を提供すべく、十二指腸内腔の濃度を高レベルまで上昇させるには不十分である。したがって、好ましい製剤は、50mgを超えるGSH含量を有し、1日あたり合計で約10,000mgまでの1回または複数回の用量で提供される。

【０２９２】

HIV感染の処置において、比較的高用量、すなわち1日当たり1～3グラムのGSHのボーラスの、空腹時における経口投与が2つの有益な効果を有する。第1に、HIV感染は、PBM、肺および他の組織における細胞内GSHレベルの低下と関連している。さらに、細胞内GSHレベルを増加させることにより、これらの細胞の機能が正常に戻り得ると考えられている。したがって、GSHの投与はHIV感染の影響に対処する。したがって、GSHおよびアスコルビン酸は、抗レトロウイルス剤と任意に組み合わせて経口製剤中に提供され得る。レトロウイルス感染に関与する転写機構および転写調節は、様々なタイプの間で比較的保存されていると考えられることが注目される。したがって、後期のレトロウイルス抑制が、様々なタイプのヒトレトロウイルスおよび類似動物のレトロウイルスについて期待されている。

【０２９３】

第2に、感染単球におけるGSHの細胞内レベルを正常範囲の上限まで増加させることにより、これらの細胞からのHIV産生を約35日間抑制できることがインビトロ試験で判明している。これは、NFκBおよびTNFαを含むサイトカインによる細胞性転写の活性化の妨害に関連すると考えられている。そのため、HIV感染者の感染力を低下させることができ、感染を防ぐのに役立つ。このウイルス負荷の低下はまた、体内における感染していないが感受性のある細胞を存続させ得る。

【０２９４】
本発明の方法に従って投与されるGSHは、鬱血性心不全（CHF）の処置に有効であると考えられている。CHFには、2つの不具合があると考えられている。第一に、心筋が弱くなり、心臓肥大を引き起こすことであり。第二に、末梢血管攣縮が存在し、末梢抵抗の増大を引き起こすと考えられていることである。GSHは、一酸化窒素の作用を高めるのに有効であるため、組織への血流を増加させつつ、血管収縮および末梢血管抵抗を低下させることにより、これらの患者に有益であると考えられている。ニトロソ-GSHは、血管拡張よりも、血小板凝集を防止するのに効果的であるが、それにもかかわらず、それは一酸化窒素単独よりも長い半減期を有する強力な血管拡張剤である。さらに、組織の相対的な低酸素状態はフリーラジカル媒介性細胞傷害と関連するので、GSHの存在はこの傷害を阻害するのにも役立つ。GSHは、例えば、ジギタリスグリコシド、ドーパミン、メチルドーパ、フェノキシベンザミン、ドブタミン、テルブタリン、アムリノン、イソプロテレノール、ベータ遮断薬、ベラパミル、プロプラノロール、ナドロール、チモロール、ピンドロール、アルプレノロール、オクスプレノロール、ソタロール、メトプロロール、アテノロール、アセブトロール、ベバントロール、トラモモール、ラベタロール、ジルチアゼム、ジピリダモール、ブレチリウム、フェニトイン、キニジン、クロニジン、プロカインアミド、アセカイニド、アミオダリオン、ジソピラミド、エンカイニド、フレカニド、ロルカイニド、メキシレチン、トカイニド、カプトプリル、ミノキソジル、ニフェジピン、アルブテロール、パルギリンなどのカルシウムチャネル遮断薬、ニトロプルシド、ニトログリセリン、フェントラミン、フェノキシベンザミン、ヒドラザリン、プラゾシン、トリアゾシン、トラゾリン、トリマゾシン、二硝酸イソソルビド、四硝酸エリスリチル、アスプリン、パパベリン、シクランデラート、イソキシスプリン、ナイアシン、ニコチニルアルコール、ナイリドリンを含む、血管拡張薬、フロセミド、エタクリン酸、スピロノラクトン、トリアテリン、アミロライド、チアジド、ブメタニド、カフェイン、テオフィリン、ニコチン、カプトプリル、サララシン、およびカリウム塩を含む、利尿薬などの、鬱血性心不全治療薬と共に経口投与され得る。

【０２９５】
ホモシステインのレベルの上昇が、アテローム性動脈硬化症、静脈血栓症、心臓発作および脳卒中などの血管疾患、ならびに神経管欠損症および新生組織形成において重大なリスクであると判明している。ホモシステンはフリーラジカル反応を促進する。ホモシステイン代謝に欠陥がある患者では、比較的高レベルのホモシステインが血液中に存在する。GSHは、上昇したホモシステインレベルを有する患者に投与され得る。

【０２９６】
肝細胞はフィードバック阻害経路を介して還元型GSHを産生するため、肝細胞は血漿から還元型GSHを効果的に吸収しないと考えらえる。したがって、GSH産生を抑制する、例えば毒性または感染性起源に由来する肝細胞への傷害は、細胞傷害または細胞死をもたらすであろう。事実、本発明者らは、少なくとも損傷された肝細胞の場合には、これは当てはまらないと考えている。したがって、様々なタイプの肝炎が、経口投与されたGSHで処置され得る。例えば、アルコールとアセトアミノフェンは両方とも肝毒性であり、肝細胞GSHレベルの低下をもたらす。したがって、これらの毒性はGSHで処置することができる。GSHはまた、細胞へのフリーラジカル損傷またはGSHレベルの低下をもたらす、種々の細胞または器官への他のタイプの毒性の処置に有効であり得る。肝炎はまたウイルス性病因を有することがあり、GSHの使用は、HIV感染の管理の処置におけるGSHの使用と同様の方法で有益であり得る。GSHは、ウイルス遺伝子の発現を低下させるように作用し得るとともに、活性のあるウイルス複製に起因する酸化的攻撃を低減させるように作用し得る。GSHはまた、ウイルスのジスルフィド結合を還元し、ウイルスの感染性を低下させることができる。

【０２９７】
糖尿病、特にコントロール不良の糖尿病は、様々な酵素およびタンパク質のグリコシル化をもたらし、その機能または制御を損なう可能性がある。特に、還元型GSHを産生する

酵素（例えば、GSHレダクターゼ）はグリコシル化されると機能しなくなる。したがって、糖尿病は還元型GSHレベルと関連しており、事実、糖尿病の二次症状の多くはGSH代謝異常に起因し得る。したがって、GSHは、主要な二次的病態を予防するために、糖尿病患者を補うために適用され得る。GSHおよび高血糖治療剤を含む経口薬学的製剤が、そのような処置を必要とする患者に投与され得る。

【０２９８】

GSHは、その強力な還元能のために、ジスルフィド結合を切断する。殆どの正常なタンパク質は、正常なまたは超生理学的レベルのGSHによって、大部分は変性されないと考えられている。しかしながら、オピエート受容体は正常高レベルのGSHによって失活すると考えられている。したがって、GSHの投与は、肥満および/または摂食障害、タバコ（ニコチン）およびオピエート中毒を含む他の嗜癖障害または強迫性障害の処置に有益であり得ると考えられる。

【０２９９】

GSHは、ニコチンと共に投与することができる。ニコチンの生理作用は周知である。GSHは、その血管拡張作用のために、脳血流を改善し、相乗的な脳機能向上効果をもたらす。

【０３００】

哺乳動物では、血漿中のGSHレベルは比較的低く、マイクロモル範囲にある一方、細胞内レベルは典型的にミリモル範囲にある。したがって、細胞内サイトゾルタンパク質は、細胞外タンパク質よりもはるかに高い濃度のGSHにさらされている。細胞器官である小胞体は、細胞からの輸送のためのタンパク質のプロセシングに関与している。小胞体は、サイトゾルとは別個の細胞内コンパートメントを形成し、サイトゾルと比較して比較的酸化された状態を有し、それによってタンパク質中のジスルフィド結合の形成を促進することが判明しており、これは正常活動にしばしば必要である。いくつかの病理学的状態において、細胞は、細胞からの輸送のためのタンパク質を産生するように誘導され得、病状の進行は、これらのタンパク質の産生および輸送の妨害によって中断され得る。例えば、多くのウイルス感染は、感染性に関しウイルスタンパク質の細胞産生に依拠している。これらのタンパク質の産生の中断は、感染性を妨げる。同様に、特定の状態は、存在し、機能的でなければならない特異的な細胞表面受容体を伴う。これらの両方の場合において、これらのタンパク質を産生するように誘導される細胞は、小胞体中の還元型GSHを枯渇させる。GSHを消費する細胞は、血漿からGSHを吸収する傾向があり、存在する量によって制限され得ることは注目される。したがって、一時的でさえ、血漿GSHレベルを増加させることによって、小胞体における還元条件が妨げられ、タンパク質の産生が阻害され得る。正常細胞はまた、何らかの干渉を受けることがある；しかしながら、ウイルス感染細胞、または異常に刺激された細胞では、正常な調節メカニズムが損なわれていることがあり、小胞体のレドックス状態は細胞外GSHの利用可能性によって制御され得る。これらの状態では、GSHの薬学的投与は、有意な効果を生じ得る。

【０３０１】

DNAウイルスであるヘルペスウイルスの複製は、細胞外GSHの投与によって細胞培養において阻害または低減される。ヘルペスウイルス感染は、GSHを投与することによって処置することができる。既知のヘルペスウイルスには、単純ヘルペスウイルスI、単純ヘルペスウイルスII、帯状疱疹、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、および他の多くの既知のウイルスが含まれる。

【０３０２】

RNAウイルスである、狂犬病ウイルスによる感染も、GSHの投与によって処置され得ると考えられている。標準的処置法が利用可能であり、タイムリーに投与された場合には実際に有効だが、GSHは所定の状況において有用であり得る。したがって、狂犬病ウイルス感染は、少なくとも部分的に処置され得る。狂犬病のために利用可能な処置の1つは、免疫血清である。GSHは、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、またはヒトまたは動物供給源に由来するドナー抗体などの抗体と組み合わせて非経口投与することができる。GSHは別個に投与することもできる。

【０３０３】
冠状動脈性心臓病のリスクは、高脂肪食の摂取により増加し、ビタミンEおよびビタミンCを含む抗酸化ビタミンおよびフラボノイドの摂取により減少する。高脂肪食は、酸化ストレスによって内皮機能を損ない、一酸化窒素の利用可能性が損なわれる。ビタミンCおよびビタミンEが、高脂肪食後の内皮による一酸化窒素生成に起因する血管収縮を回復させることが分かっている。GSHは、血管疾患に対する予防として投与することができる。

【０３０４】
先進治療法として抗酸化物質を利用する際、以下の原則が時間をかけて開発されてきた：異なる疾患は、異なる環境で異なるタイプのフリーラジカルを生成する。したがって、これらの種々のラジカルおよび関連化合物には、異なる特定の抗酸化剤が必要である。最も一般的な種および関連分子には、スーパーオキシド、●O_2^-；ヒドロキシル、●OH；ペルオキシ、●OOH；ペルオキシド、H_2O_2（ヒドロキシルラジカルに分裂）；アルコキシ、RO●；デルタ一重項酸素、$^1O_2$；一酸化窒素、●NO；脂質ヒドロペルオキシド、LOOH（アルコキシおよびヒドロキシルラジカルに分裂）が含まれる。Montagnier, Luc, Olivier, Rene, Pasquier, Catherine(Eds.), Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and Neurodegenerative Diseases, Marcel Dekker, NY (1998) 参照。

【０３０５】
フリーラジカルのいくつかの種の間の質的な違いに加えて、それらの形成速度は異なり、同時に制御されなければならないかもしれない異なるタイプの誘発物質も同様である。例えば、黄斑変性症では、強い太陽光やたばこの煙に、目が保護されずにさらされ続けることは、この疾患を制御するために治療薬として使用される抗酸化物質の効果を制限する。相乗的療法は、全身または特定の器官における抗酸化剤レベルを増加させることによって、並びに酸化的、フリーラジカル生成およびイオン化の影響を低減することによって、患者に提供され得る。この場合、GSH療法は、必要に応じて、紫外線遮蔽サングラス、およびタバコ禁煙計画で補われる。GSHと組み合わせるのに特に有利な抗酸化剤は、コハク酸α-トコフェロールである。

【０３０６】
フリーラジカルは、組織および細胞の異なる部分またはサブパーツ（subparts）において、異なる誘発物質を用いて生じる。例えば、脳または脊髄の外傷において、有害なフリーラジカルは、ミエリン鞘である神経線維を絶縁する、脂肪（脂質）被覆物中に存在する。非常に高用量の合成コルチコステロイド、わずか24時間で投与された5～10グラムのコハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム（MPSS）が、脳と脊髄に急速に到達し、ミエリン中に急速に拡散し、外傷誘発ラジカル、具体的には●OH、●OOH、およびRO●を中和する。GSHとグルココルチコイド剤の組み合わせを含む薬学的組成物が提供され得る。

【０３０７】
TRXは、プログラム細胞死（アポトーシス）のシグナル伝達プロセスを調節することが示されている。TRXおよび他のチオール化合物は、様々な酸化ストレスによって誘導される細胞毒性およびアポトーシスに対する保護活性を発揮する。例えば、FasおよびTNF-α依存性細胞死は、細胞内および細胞外TRXによって保護され得る。アポトーシスに関与する活性部位にシステイン残基を有する、ICE（インターロイキン1b変換酵素）ファミリープロテアーゼ（カスパーゼ）の活性はレドックスメカニズムによって制御される。例えば、カスパーゼの重要なメンバーであるカスパーゼ-3（CPP32）の活性は、ジチオスレイトールまたはTRXによって中和される酸化剤によって著しく阻害される。対照的に、ジアミドまたは過酸化水素に曝露すると、数時間後にCPP32プロテアーゼ活性の顕著な増加が観察され、これは細胞内レドックス状態が、カスパーゼの活性を制御することによってアポトーシスのシグナル伝達プロセスを高度に調節することを示唆する。NFκB、AP-1、PEBP2/AML-1、およびp53を含む多くの転写因子およびDNA結合タンパク質が、TRXによってレドックス調節される。Junji Yodoi1, Shugo Ueda, Masaya Ueno, Tetsuro Sasada, and Hiroshi Masutani, Redox control of Thioredoxin (TRX) on the cytotoxic/death signal

。

【０３０８】

スーパーオキシド（O_2^-）は、酸素が1つの電子によって還元された際に得られる化合物である。スーパーオキシドに関連する酸化剤には、H_2O_2およびアルキルペルオキシド、ヒドロキシルラジカルおよび他の反応性酸化ラジカル、酸化されたハロゲンおよびハラミン、一重項酸素およびペルオキシ亜硝酸が含まれる。これらの分子は、とりわけ、そのゲノムを突然変異させる能力による、悪性腫瘍、およびそのリポタンパク質を酸化する能力による、アテローム性動脈硬化症を含む、多数の一般的な疾患の病因に関与すると考えられている。しかしながら、酸化剤は、宿主防御のために生理学的に重要であり、正常なアポトーシス、またはプログラム細胞死、および生物学的シグナル伝達において殺微生物剤および殺寄生虫剤として作用し、その少量の遊離が、酵素および他のタンパク質の機能におけるレドックス媒介性の変化をもたらす。宿主防衛メカニズムは、薬理学的抗酸化剤が強力な酸化作用に打ち勝つことができないような強い作用によって媒介されると一般的に考えられている。一方、抗酸化剤はレドックス媒介性シグナル伝達およびアポトーシスなどの生物学的カスケードにおける初期段階の調節に重要な役割を果たすと考えられている。

【０３０９】

受理され、出版され、論文審査された文献において、体内のGSHの複数の特性が繰り返し実証されている。GSHの豊富な生理学的特性および生化学的特性は、単にGSHとして投与された場合にGSH自体が効果的に吸収されないという支配的な考え方のために、GSHの前駆体が投与された一連の広範な臨床試験に他の人々を導いた。したがって、比較的効果がなく、潜在的に有害なGSH前駆体のN-アセチルシステイン（NAC）が人気を呼んでおり、現在、同性愛者（高AIDSリスク）のコミュニティで誤用されている。さらなる考えは、GSHはリンパ球および他の細胞の膜を横断しない一方で、NACはそれをすることができるということであった。GSHは膜を越えた摂取の前に分解されると考えられたため、HIV/AIDSにおけるGSHの欠陥を、GSH自体を用いて是正しようとする考えは、見込みのない課題であった。しかしながら、GSHの前駆体は、細胞内GSHレベルを上昇できなかった。高いバイオアベイラビリティおよびGSHの細胞内レベルの上昇を達成するために、GSHの経口投与のための適切なレジメンが提供される。

【０３１０】

従前の研究では、オレンジジュースに溶解したGSHを用いてAIDS患者にGSHを投与し、GSHを摂取したが、この方法はカプセル剤または錠剤の利点を有さず、消化希釈またはGSH誘導された不純物が存在しないようにする必要性が認められなかった。

【０３１１】

GSHはまた、効果的な抗ウイルス剤であることが証明されており、現行の他の薬物であるウイルスmRNA転写の影響を受けない重要な部位でのHIV複製を妨げる。GSHは、特にNFκBおよびTNF-αなどの強力な活性化因子が存在する場合、ウイルスDNAを静止状態に保つ。GSHの抗ウイルス標的は、ウイルスが容易に突然変異することができない点にあるようである。その長い末端反復（LTR）への活性化NFκBの結合へのHIV複製の依存性は、該ウイルスの中核となるようである。

【０３１２】

経口投与されたGSHは、GSHの欠点の是正を超えて細胞レベルを安全に上昇することができる。例えば、腐食性フリーラジカルを生成する実質的に自己増殖性で強力な生化学的サイクルや、AIDSの徴候および症状に大きく関与する有毒なサイトカインを抑制するなど、多くの病理学的プロセスが、これらのより高いレベルによって阻害され得る。これらの生化学サイクルは相当量のGSHを破壊するが、それらは最終的には制御下に置かれ、十分な継続的なGSH療法で正常化され得る。典型的な例は、活性化マクロファージからの15 HPETE（15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸）なる物質の過剰生成である。15 HPETEは有害な免疫抑制物質であり、無害の良性分子への変換にGSHが必要である。マクロファージが活性化されると、正常化するのが難しいという問題がある。

【０３１３】

細胞に入ると、GSHは、NFκBの活性化を妨げることによるウイルスDNAの活性化を妨げることによって、フリーラジカルやサイトカインの産生を抑制し、リンパ球やマクロファージの機能障害を矯正し、肺やその他の器官の防御細胞を強化し、全ての主要な感染細胞型におけるHIVの複製を停止させ、ウイルス複製を促進するHIVのTAT遺伝子産物を阻害し、ウイルス外被のgp120タンパク質を分解する。これらのgp120タンパク質は、通常は感受性のCD4+細胞上に固定することを可能にするウイルスの突起であり、それによって、感染していないCD4+細胞へのウイルスの拡散を促進する。gp120タンパク質を破壊することにより、GSHは、その患者の他の細胞だけでなく、おそらく他者への感染も妨げる、見込みのある感染予防方法を提供する。

【０３１４】

典型的な抗ウイルス剤または抗レトロウイルス剤（逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤）に加えて、例えば、以下の薬物：サイクロスポリンA、サリドマイド、ペントキシフィリン、セレン、デスフェロキサミン、2L-オキソチアゾリジン、2L-オキソチアゾリジン-4-カルボキシレート、ジエチルジチオカルバメート（DDTC）、BHA、ノルジヒドログアイアレチン酸（NDGA）、グルカレート、EDTA、R-PIA、α-リポ酸、ケルセチン、タンニン酸、2'-ヒドロキシカルコン、2-ヒドロキシカルコン、フラボン、α-アンゲリカラクトン、フラキセチン、クルクミン、プロブコール、およびアーカナット（ビンロウ）と、GSHとの組み合わせなど、数多くの他の療法がAIDS患者に有益である。

【０３１５】

炎症反応は多大な酸化的破壊を伴い、多数のフリーラジカルを生じる。したがって、GSHは、炎症性疾患の治療に適用され得る。GSHは、二次応答の望ましくない側面と同様に一次損傷を有利に低減し得る。GSHは、関節炎、炎症性腸疾患などの炎症性疾患プロセスを患っている患者に投与することができる。GSHと、および鎮痛剤または抗炎症剤、例えば、オピエートアゴニスト、グルココルチコイド、またはアヘン薬、メペリジン、プロポキシフェン、ナルブフィン、ペンタゾシン、ブプレノルフィン、アスピリン、インドメタシン、ジフルニサル、アセトミノフェン、イブプロフェン、ナプロキセン、フェノプロフェン、ピロキシカム、スリンダク、トルメチン、メクロフェナメート、ゾメピラク、ペニシラミン、フェニルブタゾン、オキシフェンブタゾン、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、アザチアプリン、シクロホスファミド、レバミソール、プレドニゾン、プレドニゾロン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、およびメチルプレドニゾロンを含む非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDS）とを含む、併用薬学的療法を提供することができる。

【０３１６】

GSHは、耳下腺炎、子宮頸部異形成、アルツハイマー病、パーキンソン病、アミノキノリン毒性、ゲンタマイシン毒性、ピューロマイシン毒性、アミノグリコシド腎毒性、パラセタモール、アセトアミノフェンおよびフェナセチン毒性の処置にも有益であり得る。

【０３１７】

GSHは、記された有益な効果を提供するために必ずしも経口摂取しなくてもよい。薬物は、静脈内または非経口的に投与することができるが、舌下を含む、粘膜を通して、膣座薬または肛門座薬として、および稀な肺炎から肺保護を強化すべく肺の肺胞表面細胞への局所適用のために肺吸入器によって投与することもできる。GSHの全身投与は、リンパ節およびリンパ様組織においてGSHを集結させるために使用され得る。

【０３１８】

GSHは溶液中で不安定になる傾向がある。従って、デュアルチャンバ分配ポーチを有し、壊れやすい接続を有し、水相と乾燥GSH調製物とを混合できるようにする、薬学的投与装置が提供される。水相は、例えば、ゲル、クリームまたは泡でもよい。いずれのポーチも、上述のように、別の薬剤を含むことができる。

【０３１９】

GSH投与器具は、有効な用量のGSHを、口腔、膣、尿道または肛門腔などの到達可能な粘膜に送達するために使用することができる。例えば単位体積比当たりの高い表面積を有する脱水ゲル、マトリックスまたはポリマー中の乾燥GSH調製物が、アルミ箔バッグまたは

ポーチ中に提供される。脱水塊は、GSH、およびアスコルビン酸などの任意の安定化剤を含む。脱水塊は粘膜または外部から加えられた液体で水和され、GSHは粘膜をウイルス感染から保護するために存在する。

【０３２０】

構造的ジスルフィド結合を化学的に切断することによって、HIVのgp120タンパク質を化学的に分解するGSHの能力は、感染の伝染がある程度抑制できることを示している。gp120が分解されると、ウイルスはCD4+細胞に固定できない。患者の経口GSH治療は、処置された患者からのウイルスのgp120を分解するのに十分であり得る。安全でない性行為をした場合、GSHの粘膜への局所適用は、性交相手を保護するために役立つ可能性がある。

【０３２１】

GSHまたはニトロソ-GSHを男性尿道に入れると、別の効果が見られる。この場合、GSHまたはGSH誘導体は吸収される。GSHとの一酸化窒素との相互作用によって形成される、または直接提供されるニトロソ-GSHの血管拡張作用は、陰茎を血管拡張し、勃起をもたらす。したがって、尿道のGSHまたはニトロソ-GSH坐剤は、インポテンスを治療できる可能性がある。GSHまたはニトロソ-GSHはまた、女性の性的機能不全を処置するために使用され得る。例えばクリームまたはゲル製剤でのGSHまたはニトロソ-GSHの粘膜への直接適用は、局所的な血管拡張、潤滑および勃起組織の充血をもたらす。

【０３２２】

一酸化窒素の産生を増加させるように作用する種々の薬剤、例えば、一酸化窒素を形成するための基質、アミノ酸アルギニンの作用、血液中の一酸化窒素の安定性、または一酸化窒素の作用が、相乗的に使用することができることは注目される。同様に、中枢神経系および末梢血管系のような異なる系で作用する薬物も相乗的に使用することができる。したがって、GSHは、循環系および血管組織に対するその作用を達成するために、単独で、または組み合わせて使用することができる。

【０３２３】

GSHまたはGSH誘導体は、相乗効果をもたらすα-2受容体遮断薬であるヨヒンビンと併用することもできる。ヨヒンビンは、幾つかある作用のうち、男性の性的機能不全（例えば、インポテンス）を処置するために確立されている。アポモルヒネも、インポテンスの処置のためにGSHとの相乗効果を提供し得る。多くの場合、女性の性機能障害は、骨盤および生殖器の血管応答、特に血管拡張に関連することがあり、したがって単独で、または他の血管作用性または神経活性物質と組み合わせたGSHは、男性および女性療法の性機能不全に有益であり得ることが注目される。

【０３２４】

GSHは、液体、ゲル、クリーム、ゼリーの形態で粘膜に投与してもよく、パッドまたはスポンジに吸収される。投与は、粉末または懸濁液によって提供してもよい。

【０３２５】

完全な状態の、薬学的に安定化された、生物学的に利用可能な還元型L-GSHの効果的な送達が達成された。身体の全体的な使用のための高用量のGSHを提供することにより、いずれかの形態の疾患を有する糖尿病患者に、GSHの十分な供給が提供されうる。GSHの欠乏を正し、細胞内でのレベルを正常レベルの上位の範囲まで上げることは、糖尿病の合併症の遅延または防止に役立つ。

【０３２６】

中程度に高い用量である1～5gm/日で経口投与されるGSHは、黄斑変性の転帰に影響を及ぼし得る。RPE細胞がGSHを取り込む活性は、これらの細胞がこの障害を改善する上で重要な役割を果たす可能性があることを示している。桿体や錐体とは異なり、RPE細胞は許容される場合には分裂して自身を補充することができる。桿体と錐体の著しい損失の前に初期段階で見つけられれば、その状態は停止および遅延されうる。

【０３２７】

GSHは比較的毒性がないので、その有利な特性のために自由に使用することができる。ウイルスを不活性化するために、ウイルス汚染流体または潜在的に汚染された流体にGSH

を添加することができる。これは、例えば、重要なウイルスタンパク質の減少によって起こる。GSHは、輸血前に血液または血液成分に添加することができる。添加されたGSHは還元形態であり、より低い約100mM～500mMの濃度または溶解限度までの濃度、より好ましくは約10～50mMの濃度で添加される。全血、充填赤血球または他の形成された血液成分（白血球、血小板）へのGSHの添加は、細胞または形成された成分の貯蔵寿命および/または品質を高めるために使用されうる。

【０３２８】

レドックスバランスの変化を達成するために、またはフリーラジカル捕捉剤を作用させるために、他の薬理学的作用物質を使用してもよいことにも留意されたい。これらは、個々にまたは組み合わせて使用することができる。例えば、GSHは、他の抗酸化物質またはレドックス活性薬と共に投与することもでき；GSHの経口投与のための好ましい製剤には、アスコルビン酸（ビタミンC）が含まれる。投与のための他の許容される作用物質としては、抗酸化物質としてまたはビタミンE前駆体としてのその薬学的に許容されるエステルとして遊離状態にあるα-トコフェロールが挙げられる。さらに、α-リポ酸は、無毒であり、経口で生物学的に利用可能でありかつ有効な抗酸化物質であると考えられている。GSHは、細胞の酸化バランス、体内での偏在性、および高い治療指数の維持において中心的役割を果たすため、最も好ましい作用物質である。GSHの高い経口バイオアベイラビリティを得る際の従来の困難の1つが解決された。

【０３２９】

本発明者らは、GSHの安全で、安定した、経口的に生物学的に利用可能な製剤を開発し、臨床的試験に成功した。この成果は可能であるとは考えられていなかった。なぜならば、高密度の分子電荷は膜透過輸送を妨げ；チオール基がある程度危険にさらされ、酸化が広がると脱硫化が起こる場合があり、結果として、ミトコンドリアのGSHトランスポーターをブロックする毒性構造類似体であるオフタルミン酸が形成され；2つのアミノペプチド結合は胃酸ならびに/または胃および膵臓のプロテアーゼによって直ちに加水分解されるという一般に信じられていた見解が維持されていたからである。

【０３３０】

GSHの投与のための好ましい製剤およびプロトコルは、GSHの構造または化学的特性を変えることなく、高密度の分子電荷を消散させ；チオール基は化学的に安定化されており、製造中、貯蔵中、または1日当たり0～75mg/kgを2つの等しく分割された用量に分けた長期高用量での患者における使用中の、酸化的脱硫化の証拠はなく；アミノペプチド結合の加水分解には6N HClが必要であり、かつ18時間の間110℃の温度が必要であるため、ヒトの胃の胃酸は、アミノペプチド結合を加水分解することができず；GSH製剤は、pH1.2で23時間の酸分解に耐え；胃および十二指腸においてGSHが出会うプロテアーゼは、これらの2つのアミノペプチド結合を攻撃せず；このタイプの情報は過去においてタンパク質の初期のアミノ酸配列についての成果に役立っており、例えば、トリプシンはアルギニンおよびリジン残基のカルボキシル側を加水分解し；キモトリプシンは、チロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンの芳香族鎖のカルボキシル側に選択的であり；カルボキシペプチダーゼAは、残基が芳香族または嵩高い脂肪族側鎖を有する場合、カルボキシル末端を加水分解し；GSHは、トライツ靭帯のあたりで始まる上部空腸の短いセグメント上でトリペプチドとして完全な状態で吸収され；しかしながら、小腸内を下ると、非特異的エンドペプチダーゼがGSHを3つの成分に加水分解する。

【０３３１】

初期の臨床試験では、2週間のベースライン、薬物曝露後の追加の2週間と共に、4週間にわたって1日当たり1gm、2gmおよび3gmである3種類の用量を用いて、無症候性HIV（+）患者において末梢血単核細胞における吸収および細胞内分布の薬物動態を測定した。各患者に対し約400回のGSHアッセイを実施し、これは24時間の尿試料を含んだ。

【０３３２】

合計10,000回のGSHアッセイを行った。独立した分析は、用量反応相関を実証した。GSHはPBMC内に吸収されて分布し、これは摂取の30分後から始まり、60分で完了した。この研

究は、毒性の証拠無しで、安全かつ良好な患者受容性を実証した。

【０３３３】

HAARTの組み合わせを使い果たし、300,000コピー（HIV RNA PCR）および50個のCD4+細胞/立方ミリメートルである、高度に進行したAIDS患者に対する臨床試験。小グループは、75mg/kgを2つの等しく分割した用量で3.0年間摂取した。このレジメンに従った4人の生存期間は、GSH開始後3年間延長された。この4人とほぼ同じ時にレジメンを開始したが脱落した2人の個人は、6ヶ月以内に死亡した。示された4人の患者は、彼らのCD4+細胞数をいかなる程度でも回復させなかった。GSHのコンプライアンスは2年目と3年目の間に失敗し始めた。第I相/第II相データは、薬物投与を受けたHIV陽性者の末梢血単核細胞（PBMC）の約10,000回のGSHアッセイに基づいていた。用量反応相関が実証され、細胞内でのGSH不足の是正が明らかであった。

【０３３４】

したがって、GSHが欠乏しているか、またはGSHを消耗する疾患または状態に罹患しているヒトおよび動物に効果的な治療法を提供することが、この技術の目的である。治療法は、好ましくは、経口的に生物学的に利用可能なGSHの経口投与を含む。GSHは、好ましくは空腹時にボーラスとして投与され、高い胃内グルタチオン濃度を生じ、その後、十二指腸に送り出され、空腸に到達し、ここで効率的に吸収される。GSHは、吸収および細胞取り込みを増強するアスコルビン酸との電荷移動錯体の一部として還元型であることが好ましい。GSHは、ウイルス、細菌、寄生虫（例えば、マラリア）などの感染症、化学的毒素および薬剤毒素、放射線被ばく、糖尿病、およびGSHの抑制（生産の減少または消費の増加による）に関連する他の疾患を治療するために使用することができる。GSHは、若年レベルのGSHを回復させるために、45歳以上のヒトにも使用されうる。

【０３３５】

この技術は、パワー形態の少なくとも100mgの還元型グルタチオン；還元型グルタチオンに対して少なくとも50重量％の量で存在する、粉末形態の少なくとも50mgの結晶性アスコルビン酸を含み、該還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸の各々が、約25℃以下の温度で、約20％以下の相対湿度で平衡化されており；かつ、該平衡化された還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸が、還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸粒子の摩擦帯電および相互の静電的結合を有する均質な混合物を得るために、乾燥気体フラッシュ（flush）下で混合されている、薬学的に許容されるグルタチオン製剤を提供する。

【０３３６】

別の態様は、少なくとも100mgの粒子状還元型グルタチオン；還元型グルタチオンに対して少なくとも50重量％の量で存在する、少なくとも50mgの粒子状アスコルビン酸；還元型グルタチオンとアスコルビン酸との比率が約10～50重量％である、還元型グルタチオンとアスコルビン酸との静電的に結合した均質な混合物を少なくとも250mg含むように適合されたカプセルを含み、該還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸の各々が、約25℃未満の温度で、約20％以下の相対湿度で混合する前に平衡化されており；かつ、該平衡化された還元型グルタチオンおよびアスコルビン酸が、乾燥窒素下で包装された、還元型グルタチオンとアスコルビン酸粒子との静電的結合を伴う均質な摩擦帯電混合物を得るために、乾燥気体フラッシュ下で混合されている、単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤を提供する。

【０３３７】

さらなる態様は、以下を含む、薬学的グルタチオンを製剤化する方法を提供する：約25℃以下の温度で、約20％以下の相対湿度で平衡化された粒子状形態の還元型グルタチオンを提供する工程；約25℃以下の温度で、約20％以下の相対湿度の空気で平衡化された粒子状形態の結晶性アスコルビン酸を提供する工程;還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸の摩擦帯電を達成するために、乾燥気体フラッシュ下で、還元型グルタチオンと、結晶性アスコルビン酸粉末が還元型グルタチオンに対して少なくとも50重量％の量で存在する結晶性アスコルビン酸とのバルク量を混合する工程であって、還元型グルタチオン

の粒子が結晶性アスコルビン酸の粒子と静電的に結合して中和された正味電荷を有する均質な混合物を形成する、前記工程；ならびに、結晶性アスコルビン酸；該均質な混合物を無酸素気体フラッシュ下で包装する工程。

【０３３８】

環境条件は、約20％未満のRH（このレベルを越えるある程度の逸脱は、産物が低い水分含量に平衡する限り許容される）、25℃未満、例えば19～24℃まで一貫して除湿する生産施設のHVACシステムによって達成することができる。非常に低い温度、例えば、凍結より低い温度では、水分除去が損なわれて好ましくない。

【０３３９】

製剤は、少なくとも250mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも125mgの結晶性アスコルビン酸、例えば少なくとも500mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも250mgの結晶性アスコルビン酸を含みうる。還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸は、窒素、アルゴン、またはCO_2フラッシュ下で混合することができる。窒素が好都合であり好ましい。好ましくは、フラッシュは酸化を減少させるために無酸素（分子酸素なし）である。製剤は、少なくとも95重量％の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸を含みうる。製剤は、少なくとも75重量％の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸を含みうる。製剤は本質的に、カプセル中の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸からなることができ、特にこの態様では、貯蔵寿命を低下させる場合がある酸化剤、触媒および他の物質を除外することが好ましい。製剤はまた、本質的に、カプセル中の還元型グルタチオン、結晶性アスコルビン酸、および追加の有効成分からなることもできる。

【０３４０】

混合物は、少なくとも100mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも50mgの結晶性アスコルビン酸を含むパッケージに包装されうる。パッケージは、単位剤形カプセルを含みうる。パッケージは、カプセル中に約100～500mgの還元型グルタチオンおよび約50～250mgの結晶性アスコルビン酸を含有しうる。1つの製品パッケージ内に複数のカプセルを提供することができる。カプセルは、少なくとも500mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも250mgの結晶性アスコルビン酸を含みうる。乾燥気体フラッシュは、窒素フラッシュを含みうる。均質な混合物は、少なくとも95重量％の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸を含んでいてもよい。製剤は、酸化剤成分を実質的に含まずに提供されうる。製剤は、好ましくは、製造時または貯蔵寿命の終了前のいずれの時でも、チオール臭気を実質的に伴わずにヒトに提供される。

【０３４１】

製剤はまた、抗ウイルス剤、抗生物質剤、高血糖剤、抗酸化剤、酸化促進剤、抗毒素剤、一酸化窒素前駆体、プロスタグランジン前駆体、抗炎症剤、および免疫調節剤のうちの少なくとも1つをさらに含む。

[本発明1001]

パワー形態の少なくとも100mgの還元型グルタチオン；

還元型グルタチオンに対して少なくとも50重量％の量で存在する、粉末形態の少なくとも50mgの結晶性アスコルビン酸

を含み、

該還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸の各々が、約25℃以下の温度で、約20％以下の相対湿度で平衡化されており；かつ

該平衡化された還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸が、還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸粒子の摩擦帯電および相互の静電的結合を有する均質な混合物を得るために、乾燥気体フラッシュ（flush）下で混合されている、

薬学的に許容されるグルタチオン製剤。

[本発明1002]

少なくとも250mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも125mgの結晶性アスコルビン酸を含む、本発明1001の製剤。

[本発明1003]

少なくとも500mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも250mgの結晶性アスコルビン酸を含む、本発明1001の製剤。
[本発明1004]
還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸が窒素フラッシュ下で混合された、本発明1001の製剤。
[本発明1005]
還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸が、無酸素フラッシュ下で混合された、本発明1001の製剤。
[本発明1006]
少なくとも95重量％の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸を含む、本発明1001の製剤。
[本発明1007]
少なくとも75重量％の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸を含む、本発明1001の製剤。
[本発明1008]
本質的に、カプセル中の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸からなる、本発明1001の製剤。
[本発明1009]
本質的に、共通のカプセル中の還元型グルタチオン、結晶性アスコルビン酸、および追加の活性成分からなる、本発明1001の製剤。
[本発明1010]
約25℃以下の温度で、約20％以下の相対湿度の空気で平衡化された粒子状形態の還元型グルタチオンを提供する工程;
約25℃以下の温度で、約20％以下の相対湿度の空気で平衡化された粒子状形態の結晶性アスコルビン酸を提供する工程;
還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸の摩擦帯電を達成するために、乾燥気体フラッシュ下で、還元型グルタチオンと、結晶性アスコルビン酸粉末が還元型グルタチオンに対して少なくとも50重量％の量で存在する結晶性アスコルビン酸とのバルク量を混合する工程であって、還元型グルタチオンの粒子が結晶性アスコルビン酸の粒子と静電的に結合して中和された正味電荷を有する均質な混合物を形成する、前記工程; ならびに
該均質な混合物を無酸素気体フラッシュ下で包装する工程
を含む、薬学的グルタチオンを製剤化する方法。
[本発明1011]
前記混合物が、少なくとも100mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも50mgの結晶性アスコルビン酸を含むパッケージに包装される、本発明1010の方法。
[本発明1012]
前記パッケージが、単位剤形カプセルを含む、本発明1011の方法。
[本発明1013]
前記カプセル中に、約100～500mgの還元型グルタチオンおよび約50～250mgの結晶性アスコルビン酸を含む、本発明1012の方法。
[本発明1014]
前記カプセル中に、少なくとも500mgの還元型グルタチオンおよび少なくとも250mgの結晶性アスコルビン酸を含む、本発明1012の方法。
[本発明1015]
前記乾燥気体フラッシュが窒素フラッシュを含む、本発明1010の方法。
[本発明1016]
前記均質な混合物が、少なくとも95重量％の還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸を含む、本発明1010の方法。
[本発明1017]
少なくとも100mgの粒子状還元型グルタチオン;

還元型グルタチオンに対して少なくとも50重量％の量で存在する少なくとも50mgの粒子状アスコルビン酸；
還元型グルタチオンとアスコルビン酸との比率が約10～50重量％である、還元型グルタチオンとアスコルビン酸との静電的に結合した均質な混合物を少なくとも250mg含むように適合されたカプセル
を含み、
該還元型グルタチオンおよび結晶性アスコルビン酸の各々が、約25℃未満の温度で、約20％以下の相対湿度で混合する前に平衡化されており；かつ
該平衡化された還元型グルタチオンおよびアスコルビン酸が、乾燥窒素下で包装された、還元型グルタチオンとアスコルビン酸粒子との静電的結合を伴う均質な摩擦帯電混合物を得るために、乾燥気体フラッシュ下で混合されている、
単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤。
[本発明1018]
約250～500mgの還元型グルタチオンおよび約125～250mgの結晶性アスコルビン酸を含み、実質的に酸化剤成分を含まない、本発明1017の単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤。
[本発明1019]
チオール臭気を実質的に伴わずにヒトに提供される、本発明1017の単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤。
[本発明1020]
抗ウイルス剤、抗生物質剤、高血糖剤、抗酸化剤、酸化促進剤、抗毒素剤、一酸化窒素前駆体、プロスタグランジン前駆体、抗炎症剤、および免疫調節剤のうちの少なくとも1つをさらに含む、本発明1017の単位剤形の薬学的に許容されるグルタチオン製剤。
【発明を実施するための形態】
【０３４２】
好ましい態様の詳細な説明
実施例1　GSH-アスコルビン酸混合物の製造
本発明によるGSHの好ましい製剤は、00型ゼラチンカプセル中に、500mgの還元型L-GSH（協和発酵「Setria」（登録商標））、250mgのUSPグレードの結晶性アスコルビン酸、および0.9mg以下のNFグレードのステアリン酸マグネシウムを含有する、経口使用のためのカプセルを提供する。粉末はまた、例えば500mg～5gm、より好ましくは1パケット当たり1～3グラムを含むパケットに包装されてもよい。好ましいパケットは、好ましくは、標準的な温度および圧力条件下で少なくとも約2.5年間GSHを実質的に還元状態に維持するために、酸素不透過性バリアを形成する。例えば、金属化（例えば、アルミニウム化）されたヒートシール可能なポリマーフィルムパケットが適切であり得る。
【０３４３】
GSHは、乾燥窒素フラッシュ下でロータリーミキサー内でアスコルビン酸と混合される。調製に先立ち、GSHは、管理された68～75°F（19～24℃）の温度および約20％未満の相対湿度（RH）である湿度の条件下で保存しなければならない（これは、処理前に、原材料と平衡を保つと考えられる）。30％の高さのRHは許容されうるが、GSH原材料が処理される時に十分に低い含水量を有するように除湿によって積極的に制御されるべきであることに留意されたい。同様に、アスコルビン酸結晶も、好ましくは、低い湿度を確実にするために、処理前に低湿度で保存される。これらの乾燥条件は、混合中のグルタチオンおよびアスコルビン酸に対する高い摩擦電荷の発生を確実にし、その結果、乾燥粉末の電荷移動錯体をもたらし、これは、正味電荷の一貫した中和と、カプセル中の、均一な充填を伴う高密度の詰め込みを確実にする。さらに、GSHフレークは結晶性アスコルビン酸粒子によって密接に包囲されているので、後者は、処理中および貯蔵中の両方において、後者のための犠牲的抗酸化剤として効果的に機能する。最後に、グルタチオンの摩擦帯電は、酸化に対する増大した感受性をもたらしうる。ミキサーから酸素を排除することにより、GSHの活性酸素種フリーラジカル生成物の形成が減少し、グルタチオン二量体（GSSG）の形成

に好都合である。GSHのあらゆる酸化を避けなければならない一方で、GSSGはGSHのROS生成物よりも毒性が低く、実際、GSH投与と比較して増加した代謝負荷という代償にも関わらず、GSSGは吸収されてGSHへの肝臓における還元に利用できることが知られている。GSH酸化のROS生成物は一般に有毒であり、特に還元型GSH治療を必要とする動物またはヒトに生成物が投与される場合には避けるべきである。

【０３４４】

先行技術によれば、施設内の少なくとも湿度は非常に低いレベル（例えば、20～55％RHに維持）まで効果的に低下することはなく、その結果、粒子の摩擦帯電の不均一な発生が起こり、それにより、混合された粒子の不均一な密度、不均一なカプセル充填、成分の分離の可能性、および使用前の製造および貯蔵中の酸化からのGSHの一貫性のない保護をもたらす。GSHは、GSHの毒性の脱硫化類似体であるオフタルミン酸への非特異的酸化の影響下にあるため、アスコルビン酸結晶粒子に密接に結合していないGSHの粒子/フレークは比較的酸化しやすく、経時的に生成物を分解する可能性がある。

【０３４５】

さらに、乾燥混合物の電荷移動錯体は、摂取後および吸収中に維持されると考えられている。すなわち、カプセルが溶解するにつれて、水和により、共役対イオンとして溶液中で密接な結合を保持する、グルタチオンとアスコルビン酸との可溶性混合物が得られる。これはひいては、グルタチオンの迅速な吸収および細胞への迅速な取り込みに寄与すると考えられている。この電荷移動錯体が乾燥粉末中に存在しない場合、GSHの吸収はそれほど迅速ではなく、したがってこれは膵臓の脱硫酵素によるオフタルミン酸への酵素的脱硫化に比較的さらされやすく、その結果、吸収後のGSHの減少、毒性、取り込みの遅延をもたらす。

【０３４６】

従って、次の4つの異なる効果が達成される：より長い貯蔵寿命、薄片状GSH粉末のより均一な包装、吸収の増強、および細胞取り込みの増強。

【０３４７】

実施例2　治療レジメン

本発明によるGSHを用いたヒトの治療のための好ましいレジメンは、実施例1によるカプセル化され安定化されたGSHの、食事間（空腹時）の2回の分割用量で1日当たり1～10グラムの投与である。付属書類Bに詳述されている研究では、他のどんな投薬もされていない、CD4+細胞数が500を超えるHIV感染者（それ以外は健康な、18歳から65歳の男性）に、GSHが投与された。図1に詳述するように、臨床反応はPBM細胞内GSHレベルで見られた。したがって、2つの500mgカプセル中にカプセル化された安定化GSH 1グラムのボーラス投与の1時間後、GSHの3倍の増加が測定された。人体は大量のGSHを産生するため、個々の場合における外来GSHの影響は時には覆い隠されるか、さらには逆説的に現れることがあることに留意されたい。しかしながら、図3に示すように、統計学的分析は、対象集団に対するGSH投与の用量応答効果を示す。図2は、連続したGSH投与に対する患者の応答を示す。

【０３４８】

実施例3　IND

明確に定義されたGSH欠乏状態であるHIV感染の圧縮された第I/II相臨床試験（FDA IND＃45012）において、実施例2のプロトコルに従って投与された実施例1の組成物は、迅速かつ安全に細胞内GSHレベルを2～3倍に上昇させることを実証した。したがって、実施例2のプロトコルに従って投与された実施例1の組成物を用いることにより、経口医薬は、ある範囲の主要な障害を促進することが知られているGSHの重大な損失を治療することが示されている。第II相試験の被験者のGSHの代謝、特に薬物動態は、比較的正常であると考えられている。したがって、同じレジメンは、CHF、糖尿病、早期脳卒中もしくは他の虚血事象、毒性傷害、ウイルス感染もしくは疾患、またはフリーラジカル反応が制御されず、異常であり、もしくは病状の一因となる他の状態を含む他の状態の治療に適用されうる。

【０３４９】

実施例4　GSHとアセトアミノフェンの併用

代謝の間に肝臓でGSHを消費し、かつ過剰用量では酸化的損傷による肝臓損傷を引き起こす薬物であるアセトアミノフェンの好ましくない作用を改善するために、配合医薬が提供される。この組成物は、500mgのL-GSH、250mgの結晶性アスコルビン酸、および350mgのアセトアミノフェンを含む。

【０３５０】

実施例5　GSHおよびクロルプロマジンの併用

過剰のフリーラジカル反応に恐らく関連する遅発性ジスキネジアを含む副作用を引き起こすフェノチアジン薬物であるクロルプロマジンの好ましくない作用を改善するために、配合医薬が提供される。組成物は、500mgのL-GSH、250mgの結晶性アスコルビン酸、および200mgのクロルプロマジンを含む。

【０３５１】

実施例6　GSHおよびアミノグリコシドの併用

ネオマイシン、カナマイシン、アミカシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、シソマイシン、ネチルマイシンおよびトブラマイシン（様々な毒性と関連しうる薬物クラス）を含むがこれに限定されないアミノグリコシド薬物の好ましくない作用を改善するために、配合医薬が提供される。この損傷は、酸化的損傷または代謝中のGSH消費に関連しうる。組成物は、有効量のアミノグリコシドおよび約10～20mg/kgの量のL-GSHを含む、静脈内用製剤である。5～10mg/kgの量のアスコルビン酸を安定剤として追加してもよい。

【０３５２】

実施例6　血管疾患の予防

経口用組成物が、例えば40歳以上の男性において、血管疾患の予防のために提供される。組成物は、00型ゼラチンカプセル中に、500mgの還元型L-GSH、250mgのUSPグレードの結晶性アスコルビン酸および50mgのUSPアセチルサリチル酸（アスピリン）を含む。典型的な投与は1日2回である。好都合なことに、アセチルサリチル酸は、放出を遅延させる、カプセル中の腸溶性放出ペレットで提供してもよい。

【０３５３】

実施例7　血管疾患の予防

アルギニンは、一酸化窒素生成のための通常の出発基質である。アルギニンは通常は供給が限られているため、アルギニンの相対的不足は血管内皮機能の障害を引き起こす場合がある。

【０３５４】

血管疾患の予防のための経口製剤が提供される。この組成物は、00型ゼラチンカプセル中に、500mgの還元型L-GSH、200mgのUSPグレードの結晶性アスコルビン酸、および200mgのアルギニンを含む。

【０３５５】

実施例8　血管疾患の予防

ビタミンEの消費は、心臓発作や他の血管疾患のリスクを低減する。ビタミンEコハク酸エステル（α-トコフェロールコハク酸エステル）は乾燥粉末である。血管疾患の予防のための経口製剤が提供される。組成物は、00型ゼラチンカプセル中に、500mgの還元型L-GSH、200mgのUSPグレードのアスコルビン酸、および200mgのビタミンEコハク酸エステルを含む。

【０３５６】

実施例9　血管疾患の予防

広範な基質特異性を有する非特異的エステラーゼが血漿中に存在する。効率的な投与、高いバイオアベイラビリティ、および薬学的安定性を提供するために、有用な併用療法である作用物質間でエステルが形成される。好ましいエステルは、αトコフェロール-アスコルビン酸エステル、αトコフェロール-サリチル酸エステル、およびアスコルビル-サリチル酸エステルを含む。トコフェロールエステルは分子を還元状態に維持し、エステル開裂後の完全な抗酸化能を可能にする。

【０３５７】
これらのエステルは、単独で、または他の作用物質、例えばGSHと組み合わせて投与されうる。典型的には、これらは、炎症性疾患の予防用の1日当たり100mg当量のサリチル酸エステル、または治療用の750～1000mg/用量である有効量を送達するために投与される。トコフェロールは、100～500IU当量の量で投与される。アスコルビン酸エステルは、1000mg当量までの量で投与される。利用可能性を増大させるために、非特異的エステラーゼを、カプセル溶解後にエステルを切断するために製剤中に提供することができる。例えば、バクテリアまたはサッカロマイセス（酵母）非特異的エステラーゼ、例えば酵素または濃縮酵素調製物を含有させることができ、例えば、カプセル中に粉末としてまたはペレットとして含めることができる。

【０３５８】
実施例10　血管疾患の予防
ノルジヒドログアレチン酸は、既知のリポキシゲナーゼ阻害剤である。したがって、この組成物は、炎症過程を処置するために、または血管疾患に対する予防として使用されうる。

【０３５９】
血管疾患の予防のための経口製剤が提供される。組成物は、00型ゼラチンカプセル中に、500mgの還元型L-GSH、200mgのUSPグレードの結晶性アスコルビン酸、および100mgのノルジヒドログアレチン酸を含む。典型的な投与は1日2回である。

【０３６０】
実施例11　予防
混合された2,500mgのL-GSHおよび750mgのUSPグレードのアスコルビン酸粉末を含むGSHパケットを、1日2回、口から、それ以外は健康な成人に投与する。粉末は、舌下に吸収されるか、空腹時にボーラスとして飲み込まれるか、または水もしくはオレンジジュースなどの液体に溶解されて空腹時に飲用されうる。

【０３６１】
実施例12　予防
混合された1,000mgの還元型L-GSHおよび500mgのUSPグレードのアスコルビン酸粉末を含むGSHパケットを、1～2パケットを1日2回、口から、それ以外は健康な人間の子供に投与する。粉末は、舌下に吸収されるか、空腹時にボーラスとして飲み込まれるか、または水もしくはオレンジジュースなどの液体に溶解されて空腹時に飲用されうる。

【０３６２】
実施例13　治療
放射線もしくは放射性物質、生物兵器、化学兵器、または敗血症などに対する急性曝露を受けた個体に、GSHを、許容される場合は空腹時に経口投与、または静脈内投与する。用量は、分割用量でまたは定期的もしくは連続注入としての、1日当たり5～20グラムである。

【０３６３】
実施例14　治療
GSHは、アルツハイマー病またはパーキンソン病を含むがこれに限定されない慢性神経疾患を患う罹患患者に、空腹時に経口投与される。用量は、2回の分割用量で1日当たり2～10グラムである。

【０３６４】
本明細書に記載された好ましい態様および実施例は例示のみを目的とするものでありかつ本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではなく、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲においてのみ適正に描写されていることが理解されるべきである。本明細書における開示は、互いに両立しないことが無い限り、別々に、組み合わせて、ならびに様々な副次的組み合わせおよび並べ替えで、限定されることなく検討されることが意図される。

【０３６５】
本明細書に引用された各参考文献は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み入

れられる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
A61P 39/00	***(2006.01)***	A61P	39/00
A61P 9/00	***(2006.01)***	A61P	9/00
A61P 25/16	***(2006.01)***	A61P	25/16
A61P 25/28	***(2006.01)***	A61P	25/28
A61P 39/02	***(2006.01)***	A61P	39/02
A61P 39/06	***(2006.01)***	A61P	39/06

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 デモプーロス ハリー ビー.
アメリカ合衆国 １０５８３ ニューヨーク州 スカーズデール シカモアー ロード ２４
(72)発明者 デイビス ケビン
アメリカ合衆国 １００２３ ニューヨーク州 ニューヨーク ウエスト シックスティーエイス ストリート ３９ アパートメント ４エー

審査官 春田 由香

(56)参考文献 特表２００１－５０７６９６（ＪＰ，Ａ）
特表平０７－５０５６３０（ＪＰ，Ａ）
野村 俊之 ほか，粉体の摩擦帯電に及ぼす電荷緩和特性の影響，化学工学論文集，１９９８年，第２４巻，第４号，ｐ．５８５－５９０，DOI: 10.1252/kakoronbunshu.24.585
「世界のウェブアーカイブ｜国立国会図書館インターネット資料収集保存事業」，［online］，２０１４年 １月１３日，［２０２０年6月１７日検索］，インターネット＜URL：https://web.archive.org/web/20140113091610/http://www.ebanet.co.jp/activity/knowledge2.html＞
向河原 栄，多様なものづくりに貢献する粉体プロセスの最新動向～医薬市場，粉砕，２０１４年１２月１５日，第５８巻，ｐ．３７－４３，DOI: 10.24611/micromeritics.2015008

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３８／００－３８／５８
Ａ６１Ｋ ３１／００－３１／８０
Ａ６１Ｋ ９／００－ ９／７２
Ａ６１Ｋ ４７／００－４７／６９
Ａ６１Ｋ ４５／００－４５／０８
Ａ６１Ｋ ８／００－ ８／９９
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）