

明 細 書

発明の名称：全身麻酔薬と、水素とを組み合わせるなる、医薬技術分野

[0001] 本発明は、全身麻酔薬と水素とを組み合わせるなる、医薬に関する。

背景技術

[0002] 新生児における神経障害が、長期間に渡って持続する効果を引き起こすことが危惧されている（非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3）。そのため、新生児において、正常な神経発達を変化させる可能性がある薬物（例えば、アポトーシスによる神経変性を引き起こすアルコール、フェンシクリジン、ケタミン、 N_2O 、イソフルラン、ベンゾジアゼピン、バルビツレート及び抗痙攣薬（非特許文献4））を用いる場合、慎重になるべきである。新生児における薬物による神経障害の誘発は、単回の薬物曝露でも十分に起こり得ることから、麻酔の投与においても、慎重になるべきである（非特許文献5、非特許文献6）。

[0003] 正常な神経発達は、綿密に調節された、増殖、分化、遊走及びシナプス形成をはじめとする、一連の事象である（非特許文献7）。グルタミン酸は、これらの全プロセスにおいて役割を有すると考えられており（非特許文献8）、例えば、遊走の標的領域において、高濃度のグルタミン酸は、検出に用いられるNMDA受容体に加え（非特許文献9）、神経細胞の化学誘引物質としての役割を示唆する（非特許文献10）。種々の解剖学的領域における特定のNMDA受容体サブタイプ（例えば、NR2B及びNR2D）の発見は、遊走制御の正確な性質の解明に役立ち得る（非特許文献10）。同一グループによる研究から、種が異なると、遊走制御において異なるメディエーターが使用され、GABA（ラットに関する研究）又はグルタミン酸（マウスに関する研究）のいずれかが用いられることが明らかとなっている（非特許文献11）。

[0004] シナプス形成（脳の急成長期）とは、シナプスが急速に構築される期間で

あり、高レベルのプログラム細胞死（PCD）（最大１％（非特許文献１２））を特徴とする。これには、広範な皮質視床及び視床皮質投射の形成が含まれる（非特許文献１３）。種間発生学は限りなく複雑であるが、神経発達の各段階は、同一順序で起こる傾向にあるため、比較できることがわかっている（非特許文献１４）。そのため、７日齢のラットの仔（非特許文献１５）から、０～８カ月のヒト（非特許文献１６）までのシナプス形成のピークの時期を推定することが可能である。しかしながら、NMDA受容体サブタイプの分析によれば、ヒトでは、シナプス形成の期間が、妊娠の後期（妊娠８～１０カ月）の始めから数歳までの長期に及んでいる可能性が高い（非特許文献１７）。

[0005] １９７２年に初めて提唱されたアポトーシス（非特許文献１８）は、細胞数の削減、調整、制御及び細胞の廃棄等のプロセスにおける正常な神経発達の本質的特徴である。アポトーシスは、その目的のみに用いられる細胞タンパク質による誘導、決定及び実行を含む「積極的な細胞死」と特徴付けられている（非特許文献１９）。

[0006] 未成熟な中枢神経系（CNS）におけるプログラム細胞死（PCD）は、標的由来の神経栄養因子によってコントロールされていると思われる（神経栄養仮説）。それによれば、神経細胞の生存を促進する標的細胞のシナプスに到達できなかった神経細胞は（非特許文献２０）、環境による栄養支援の中止に伴って、ニューロトロフィン及び電気刺激の両方による特殊な形の細胞自殺を開始する（非特許文献２１、非特許文献２２）。神経細胞は、その生存経路の複雑な分岐性と収束性のために、多数のリガンド及び機構が生存の維持に関与している。神経細胞のサイトゾル及びミトコンドリアは、細胞の運命を決定する、抗アポトーシス性因子（例えば、Bcl-2及びcAMP応答結合タンパク質）及びアポトーシス促進性因子（例えば、Bad、Bax及びカスパーゼファミリー）のいずれにも対応している。Bcl-2及びその関連ペプチドはCNSの発達において特に重要であると考えられている（非特許文献２３）が、これは、新生児における高レベルの発現と、Bcl-2の

実験における過剰発現が栄養支援の欠乏を覆し(非特許文献24)、さらにPCDをも完全に防ぎ得る(非特許文献25)という事実から明らかである。Bcl-2の変異体(Bcl-X_L)は、神経細胞の標的細胞のシナプス到達前の神経細胞の発達の維持において特別な役割を有している可能性がある(非特許文献26)。

[0007] 1999年、新生児ラットにおけるNMDA受容体アンタゴニストの使用によって、特定のパターンの、グリア細胞とは異なる神経変性が生じること示すデータが公開された(非特許文献27)。電子顕微鏡では、この神経変性はアポトーシス性細胞死と同一であり、背外側視床核において最も顕著であった。背外側視床核は、学習及び記憶に関与している脳の領域のひとつである(非特許文献28)。この現象は、その後、他の薬物を用いて他の脳領域において再現されている(非特許文献29)。

[0008] その後の研究によって、新生児ラットは、シナプス形成期間中、麻酔薬の有害な副作用に対して脆弱であるということが示された。前記ラットは、麻酔薬に曝露された後に、背外側及び前腹側視床核並びに頭頂葉皮質等の領域において、変質している神経細胞数が基準値の最大68倍に増加することを示した(非特許文献30)。後日、この増加の結果として、行動試験における機能的神経障害がみられた。具体的には、GABA作動性麻酔薬イソフルラン(非特許文献31)は、それ自体で、用量依存的に神経変性を生じさせ、ミダゾラムの連続添加(二重GABA作動性カクテル)、次いでN₂Oの連続添加(三重カクテル)で相乗作用的な神経変性が生じた(非特許文献30)。このプロセスは、ラットでは、麻酔薬以外の領域のGABA作動性薬剤に対する曝露、例えば、抗痙攣薬治療及び母体の薬物乱用で起こることがわかっている(非特許文献32、非特許文献33)。

[0009] 上記のように、種間の複雑さはあるが、神経発達の各段階は、同一順序で起こるため、新生児ラットに対する麻酔薬投与の影響から、ヒトへの影響をある程度推定でき、ヒトの臨床研究でも発達期の脳における麻酔薬投与によって誘発される神経毒性について、多くの知見が得られている(非特許文献

34)。しかしながら、発達期の脳における麻酔薬投与によって誘発される神経毒性の作用機序については、多くの因子が複雑に関係しており、ほとんどが未知であった。その後の研究によって、前記作用機序として、(1) アポトーシスの増加、(2) GABAニューロンへの影響、(3) 大脳皮質の臨界期 (critical period) への影響等が考えられ、GABAニューロンへの影響によって神経障害が起きたとの報告もある (非特許文献35)。前記作用機序に関するこれまでの研究では、研究手法の容易さから、アポトーシスに関心が集まっていた。

[0010] アポトーシスを引き起こす細胞内シグナル伝達経路で最も重要な分子は、カスパーゼ (caspase : Cysteine-ASPartic-acid-protease) と呼ばれるタンパク質分解酵素である。細胞内でカスパーゼ-3が活性化すると、アポトーシスが起こる。アポトーシス誘導シグナルの伝達経路には、主として、次のものがある。(1) デスレセプタを介する経路 (腫瘍壊死因子受容体 (TNFR1) や Fas/CD95 がよく知られている。)、(2) ミトコンドリアを介する経路 (呼吸における電子伝達系の構成因子の一つであるシトクロム c が、アポトーシスの実行においても重要な役割を担っている)、(3) 小胞体ストレスによる経路 (小胞体に異常なタンパク質が生成した場合等にアポトーシスのシグナルが発生する。)、(4) エフェクターを直接活性化する経路 (イニシエーターを経ずに、ストレス誘導因子が直接エフェクターを活性化する。)。

[0011] デスレセプタを介する経路では、カスパーゼ-8、カスパーゼ-10が活性化される。ミトコンドリアを介する経路では、ミトコンドリアから遊離したシトクロム c によりカスパーゼ-9が活性化される。小胞体ストレスによる経路では、カスパーゼ-12が活性化される。これらのイニシエーターカスパーゼ群が、下流のエフェクターカスパーゼ (カスパーゼ-3、カスパーゼ-6、カスパーゼ-7) を活性化する。エフェクターを直接活性化する経路では、イニシエーターカスパーゼを経ずに、直接、エフェクターカスパーゼ (カスパーゼ-3、カスパーゼ-6、カスパーゼ-7) を活性化する。こ

れらのカスパーゼは、ポリーADPリボースポリメラーゼ (poly ADP-ribose polymerase, PARP) を基質として、その分解によってアポトーシスが実行される (非特許文献36、非特許文献37)。

- [0012] 麻酔薬によって誘発されると考えられているアポトーシスについて、一般的なアポトーシスとは異なる作用機序を有する可能性もあると考えられており、その根本的なメカニズムは解明されておらず、有効な治療法も未だ確立されていない。そのため、麻酔薬による発達期の脳のアポトーシスや、その後の認知機能障害を軽減する新規治療法の開発が待たれていた。

先行技術文献

非特許文献

- [0013] 非特許文献1: Anand and Scalzo, 2000, Biol. Neonate 77(2):69-82
非特許文献2: Balduini et al., 2000, Brain Research 859:318-325
非特許文献3: Jevtovic-Todorovic et al., 2003, The Journal of Neuroscience 23(3):876-882
非特許文献4: Olney et al., 2002d, Brain Pathol 12(4):488-498
非特許文献5: Ikonomidou et al., 2001, Biochemical Pharmacology 62:401-405
非特許文献6: Young et al., Cell Death and Differentiation (2003) 10, 1148-1155
非特許文献7: Butler, 1999, TINS 22(8):332-334
非特許文献8: Ikonomidou and Lechoslaw, 2002, Lancet Neurology 1:383-386
非特許文献9: Komuro and Rakie, 1993, Science 260(5104):95-97
非特許文献10: Behar et al., 1999, The Journal of Neuroscience 19(11):4449-4461
非特許文献11: Behar et al., 2001, Cerebral Cortex 11:744-753
非特許文献12: Olney et al., 2002b, Neurobiology of Disease 9:205-219
非特許文献13: Molar and Blakemore, 1995, Trends Neurosci. 18(9):389-3

97

非特許文献14 : Clancy et al., 2001, Neuroscience 105:7-17

非特許文献15 : Olney et al., 2002a, Neurotoxicology 23(6):659-668

非特許文献16 : Ikonomidou et al., 1999, Science 238: 70-74

非特許文献17 : Dobbing and Sands, 1979, Early Hum Dev 3:79-84

非特許文献18 : Kerr et al., 1972, Br J Cancer 26(4):239-257

非特許文献19 : Sloviter, 2002, TRENDS in Pharmacological Science 23(1)
:19-24

非特許文献20 : Sherrard and Bower, 1998, Clin Exp Pharmacol Physiol 25
(7-8):487-495

非特許文献21 : Young et al., 1999, Nature Med 5:448-453

非特許文献22 : Brenneman et al., 1990, Brain Res Dev Brain Res 51(1):6
3-68

非特許文献23 : Yuan and Yanker, 2000, Nature 407:802-809

非特許文献24 : Garcia et al., 1992, Science 258(5080):302-304

非特許文献25 : Martinou et al., 1994, Neuron 13(4):1017-1030

非特許文献26 : Motoyama et al., 1995, Science 267:1506-1510

非特許文献27 : Ikonomidou et al., 1999, Science 238: 70-74

非特許文献28 : Goen et al., 2002, Behavioural Brain Research 136:329-3
37

非特許文献29 : Monti and Contestabile, 2000, European Journal of Neuro
science 12:3117-3123

非特許文献30 : V. Jevtovic-Todorovic et.al 2003 Journal of Neuroscience
23:876-882

非特許文献31 : Gyulai et al., 2001, Anesthesiology 95:585-593

非特許文献32 : Bittigau et al., 2002, PNAS 99(23):15089-15094

非特許文献33 : Farber and Olney, 2003, Developmental Brain Research 14
7:37-45

非特許文献34 : Wilder RT, et al., Anesthesiology 100: 796-804, 2009

非特許文献35 : Anesthesiology 2009; 111:1365-1371

非特許文献36 : Salveen GS, Riedl SJ 2008 Adv Exp Med Biol. 615:13-23

非特許文献37 : LA. Pradelli, M. Beneteau, JE, Ricci 2010 Cell. Mol. Life Sci. 67:1589-1597

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0014] 本発明は、脳（好ましくは、発達期）の麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減することができる全身麻酔用医薬を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0015] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、全身麻酔薬と水素とを組み合わせることで、脳（好ましくは、発達期）の麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減させることが可能であることを見出した。

- [0016] すなわち、本発明は以下の発明に関する。

[1] 全身麻酔薬と、水素を組み合わせることで、ヒト又はヒト以外の動物用医薬。

[2] 全身麻酔薬と、水素とを併用で投与されることを特徴とする、ヒト又はヒト以外の動物の全身麻酔のための医薬。

[3] 麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するために使用される前記[1]又は[2]に記載の医薬。

[4] 麻酔薬誘発性神経障害が、神経細胞アポトーシスに付随するものである前記[3]に記載の医薬。

[5] 全身麻酔薬が、水素と併用されるように用いられることを特徴とする、全身麻酔薬を含有する麻酔薬誘発性神経障害の予防及び／又は軽減用医薬。

[6] 全身麻酔薬が吸入麻酔薬又は液状の静脈麻酔薬であり、水素が水素ガスである前記[1]～[5]のいずれか1項に記載の医薬。

〔 7 〕 水素ガス濃度が、医薬中 0. 1 5 ～ 7 % (v / v) である前記〔 6 〕に記載の医薬。

〔 8 〕 胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者を対象とする前記〔 1 〕～〔 7 〕のいずれか 1 項に記載の医薬。

〔 9 〕 全身麻酔薬が、亜酸化窒素、イソフルラン、エンフルラン、メトキシフルラン、セボフルラン、デスフルラン、ジエチルエーテル、プロポフォル及びミダゾラムからなる群より選ばれた 1 種以上の麻酔薬である前記〔 1 〕～〔 8 〕のいずれか 1 項に記載の医薬。

〔 1 0 〕 麻酔薬誘発性神経障害が、神経運動障害、神経認知障害、精神認知障害又は自閉症である前記〔 3 〕、〔 5 〕～〔 9 〕のいずれか 1 項に記載の医薬。

〔 1 1 〕 麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するために、全身麻酔薬と水素とを併用する医薬の調製方法。

〔 1 2 〕 麻酔薬誘発性神経障害が、神経細胞アポトーシスに付随するものであることを特徴とする前記〔 1 1 〕に記載の調製方法。

〔 1 3 〕 全身麻酔薬が吸入麻酔薬又は液状の静脈麻酔薬であり、水素が水素ガスである前記〔 1 1 〕又は〔 1 2 〕に記載の調製方法。

〔 1 4 〕 水素ガス濃度が、医薬中 0. 1 5 ～ 7 % (v / v) である前記〔 1 3 〕に記載の調製方法。

〔 1 5 〕 医薬が、胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者を対象とする前記〔 1 1 〕～〔 1 4 〕のいずれか 1 項に記載の調製方法。

〔 1 6 〕 水素と組み合わせて用いられる全身麻酔剤製造のための全身麻酔薬の使用。

〔 1 7 〕 全身麻酔薬と水素とを組み合わせる医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用。

〔 1 8 〕 麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用。

〔 1 9 〕 麻酔薬誘発性神経障害が、神経細胞アポトーシスに付随するもので

ある前記〔18〕に記載の使用。

〔20〕全身麻酔薬が吸入麻酔薬又は液状の静脈麻酔薬であり、水素が水素ガスである前記〔16〕～〔18〕のいずれか1項に記載の使用。

〔21〕水素ガス濃度が、医薬中0.15～7%（v/v）である前記〔20〕に記載の使用。

〔22〕胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者を対象とする前記〔16〕～〔18〕のいずれか1項に記載の使用。

〔23〕全身麻酔薬が、亜酸化窒素、イソフルラン、エンフルラン、メトキシフルラン、セボフルラン、デスフルラン、ジエチルエーテル、プロポフォール及びミダゾラムからなる群より選ばれた1種以上の麻酔薬である前記〔16〕～〔18〕のいずれか1項に記載の使用。

〔24〕麻酔薬誘発性神経障害が、神経運動障害、神経認知障害、精神認知障害又は自閉症である前記〔18〕に記載の使用。

〔25〕全身麻酔薬と水素とを併用して対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減する方法。

〔26〕全身麻酔薬が吸入麻酔薬又は液状の静脈麻酔薬であり、水素が水素ガスである前記〔25〕に記載の方法。

〔27〕水素ガス濃度が、医薬中0.15～7%（v/v）である前記〔26〕に記載の方法。

〔28〕投与対象が、胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者である前記〔25〕に記載の方法。

〔29〕全身麻酔薬が、亜酸化窒素、イソフルラン、エンフルラン、メトキシフルラン、セボフルラン、デスフルラン、ジエチルエーテル、プロポフォール及びミダゾラムからなる群より選ばれた1種以上の麻酔薬である前記〔25〕に記載の方法。

〔30〕麻酔薬誘発性神経障害が、神経運動障害、神経認知障害、精神認知障害又は自閉症である前記〔25〕に記載の方法。

〔31〕麻酔薬誘発性神経障害が、神経細胞アポトーシスに付随するもので

ある前記〔25〕に記載の方法。

発明の効果

〔0017〕 本発明の医薬は、脳（好ましくは、発達期）の麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減することが可能である。また、本発明は、簡便で、副作用がなく、効率的に作用し、さらに安価であるため、例えば、産科及び小児科等の医療において有効な全身麻酔用医薬を提供することができる。

図面の簡単な説明

〔0018〕〔図1〕図1は、試験例1の結果を示す。Aは、分解PARP（アポトーシス細胞死のバイオマーカー）への抗体を使用したウェスタンブロットの結果を示す。β-アクチン反応をコントロールとして使用した。Bは、分解PARPバンドを定量化した結果を示す。図中、***は $P < 0.001$ を意味する。図中、Sevoはセボフルランを意味する。

〔図2〕図2は、試験例2のマウス脳の光学顕微鏡画像を示す。図中、Aは、キャリアガスが30%酸素であり、セボフルラン未投与のサンプル（コントロール）の結果を示し、Bは、キャリアガスが30%酸素であり、3%セボフルランに6時間曝露した後の、マウス脳の光学顕微鏡観察時の画像を示し、Cは、キャリアガスが30%酸素であり、3%セボフルラン及び1.3%水素に6時間曝露した後の、マウス脳の光学顕微鏡画像を示す。図中、茶色の点が、分解カスパーゼ3陽性の細胞の存在、すなわちアポトーシスを示す。各画像は、一つのグループにつき、8～10匹のマウスから選んだ1匹のものである。図中、スケールバーは、1mmである。

〔図3〕図3は、試験例2の免疫化学的染色により検出された分解カスパーゼ3を示す茶色の点の数をカウントした結果を示す。コントロール、セボフルラン及びセボフルラン+水素の各グループの平均値の比較は、一元配置分散分析とそれに続くニューマン-クルーズポストホックテスト（一つのグループにつき、 $n = 8 - 10$ のマウス）を用いて実施した。F値及びP値を、それぞれのパネルの下に示した。図中、コントロールと比較したとき、*は $P < 0.05$ を、**は $P < 0.01$ を、***は $P < 0.001$ を意味する。また、#

は $P < 0.05$ を、 $##$ は $P < 0.01$ を、 $###$ は $P < 0.001$ を意味する。

[図4]図4は、ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼを用いたニックエンドラベリング (TUNEL) 法の染色結果を示す。図中、Aは、キャリアガスが30%酸素であり、セボフルラン未投与のサンプル (コントロール) の結果を示し、Bは、キャリアガスが30%酸素であり、3%セボフルランに6時間曝露した後、さらに6時間経過後の、マウス脳の光学顕微鏡画像を示し、Cは、キャリアガスが30%酸素であり、3%セボフルラン及び1.3%水素に6時間曝露した後、さらに6時間経過後の、マウス脳の光学顕微鏡観察時の画像を示す。図中、茶色の点は、TUNEL陽性の細胞であり、アポトーシスを起こした細胞を示す。各画像は、一つのグループにつき、8匹のマウスから選んだ1匹のマウスのものである。図中、スケールバーは、1mmである。

[図5]図5は、発達期の脳において、セボフルランの曝露が引き起こす酸化ストレスを、水素ガスが緩和することを示す。図中、Aは、キャリアガスが30%酸素であり、セボフルラン未投与のサンプル (コントロール) の結果を示し、Bは、キャリアガスが30%酸素であり、3%セボフルランに6時間曝露した後の、マウス脳の光学顕微鏡画像を示し、Cは、キャリアガスが30%酸素であり、3%セボフルラン及び1.3%水素 (C) に6時間曝露した後の、マウス脳の蛍光顕微鏡観察時の画像を示す。図中、赤色は、4-ヒドロキシー-2-ノネナール (4-HNE) 陽性の細胞であり、酸化ストレスを受けたことを示す。図中、スケールバーは、 $100\mu\text{m}$ である。各画像は、一つのグループにつき、8匹のマウスから選んだ1匹のマウスのものである。

[図6]図6は、試験例3の結果を示す。図中、Aはオープンフィールドテストの結果を示し、BはY字型迷路試験の結果を示し、Cは恐怖条件付けテスト状況試験の結果を示し、Dは恐怖条件付けテスト音試験の結果を示す。図中、コントロールと比較したとき、 $**$ は $P < 0.01$ を、 $***$ は $P < 0.001$ を意味する。また、 $##$ は $P < 0.01$ を、 $###$ は $P < 0.001$ を意味する。

[図7]図7は、試験例3の結果を示す。図中、Aは社会性試験の結果を示し、Bは嗅覚試験の結果を示し、Cは新規物試験の結果を示す。図中、コントロールと比較したとき**は $P < 0.01$ を、#は $P < 0.05$ を意味する。また、対応する生物ターゲットと比較したとき§§§は $P < 0.001$ を意味する。

発明を実施するための形態

- [0019] 本発明の医薬は、全身麻酔薬と水素とを組み合わせる、ヒト又はヒト以外の動物用医薬である。また、本発明の医薬は、全身麻酔薬と、水素とを併用で投与される、ヒト又はヒト以外の動物の全身麻酔のための医薬である。本発明の医薬は、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するために使用することができる。本発明における全身麻酔薬は、水素と併用されるように用いられるのが好適である。本発明の医薬とは、全身麻酔薬と水素とを組み合わせるものであり、それぞれ別個に同一又は異なる投与経路から同時投与する投与形態、及びそれぞれ別個に同一又は異なる投与経路による間隔をずらした投与のいずれの投与形態も含むものである。
- [0020] 全身麻酔薬について、NMDA受容体アンタゴニストである全身麻酔薬に対する曝露が、脳発達のシナプス形成段階の間にアポトーシス性神経変性を誘発することが当技術分野において知られている。
- [0021] 麻酔薬への曝露によって、ニューロン以外のグリア細胞等のいくつかの領域でアポトーシスが増加すること（Anesthesiology 2010; 112:834-841）、及び、NMDA受容体のアップレギュレーションによってアポトーシスが発生すること（Int. J. Devl Neuroscience 27(2009)727-731）から、麻酔薬は、一般的なアポトーシスとは異なる作用機序でアポトーシスを誘発すると考えられ、その結果、神経障害を誘発すると危惧されている。
- [0022] また、GABA受容体の作動作用を有する麻酔薬は、GABAニューロンに影響を与え、興奮性ニューロン及び抑制性ニューロンのバランスを崩すことで神経障害を誘発するともいわれている（Anesthesiology 2009; 111:1365-1371）。
- [0023] 小児麻酔とアポトーシスレベルの上昇との後記する明確な関わりを前提と

して、このプロセスのバックグラウンドの機構を特定するために多数の研究が進行中である。GABA受容体とNMDA受容体両方の活性化は、神経細胞の生存シグナル伝達に影響を及ぼすことが知られている(Brunet et al., 2001, Current Opinion in Neurobiology 11:297-305; Bittigau et al., 2002, PNAS 99(23):15089-15094)。この点を考慮して、エタノール中毒にしたマウスが、このプロセスの研究のための動物モデルの基礎を形成してきた。カスパーゼ-3はアポトーシス細胞の優れたマーカーであるが、高度に分岐したデスシグナル伝達カスケードの最終エフェクターであるため、その位置からは、アポトーシスの機構への洞察がほとんど得られない。カスパーゼ-3活性化は、アポトーシスの外因性のデス受容体媒介経路と内因性のミトコンドリア媒介経路両方に共通のステップである(Green, 2000, Cell 102:1-4)。

[0024] ヤング(Young)らは、一連の適格な実験を用いて、アポトーシスの機構のうち、調査対象を単一経路に絞り込むことを考えた。二重免疫組織化学-免疫蛍光、ウェスタンブロット解析及びノックアウトマウスの組合せを用いて経路特異的成分、中でも、Bax及びシトクロムc(内因性)及びカスパーゼ-8(外因性)を明らかにした(Young et al., Cell Death and Differentiation (2003) 10, 1148-1155)。エタノールで処理した野生型マウスは、エタノール誘発性アポトーシスの特徴的なパターンを示すのに対し、同様の処理を施したホモ接合体Bax-ノックアウトマウスはアポトーシスの徴候を実質的に全く示さないことがわかった。実際、アポトーシスレベルは対照の生理学的細胞死において見られるものよりも低かった。さらに、Bax-ノックアウトマウスは、カスパーゼ-8活性化が起こらないことを実証した。これにより、麻酔誘発性アポトーシスにおいて内因性アポトーシス経路が関与していることが明らかとなった。

[0025] ミトコンドリア周辺が中心となる内因性経路は、神経細胞のサイトゾル中のアポトーシス促進性及び抗アポトーシス性メディエーターの組合せによって制御されている。発生中の神経細胞との関連では、Bcl-X_L(Bcl-2ファミリーのメンバー)は主に抗アポトーシス性であるのに対し、Bax

はアポトーシス促進性である(Yuan and Yanker, 2000, Nature 407:802-809)。ヤングらは、エタノール、二重NMDA受容体アンタゴニスト(NMDA受容体アンタゴニスト2種類の同時投与)及びGABA作動性麻酔剤は、通常不活性状態でミトコンドリア膜に保存されているBaxを、サイトゾルに放出する能力を有するという仮説を立てた。

[0026] Baxは、サイトゾル中にあると(Bcl-2によって抑制されない場合)活性な複合体の一部となり、これがミトコンドリア膜に戻り、ミトコンドリア膜を破壊することができる(Korsmeyer et al., 2002, Cell Death and Differentiation 7:1166-1173)。その後のミトコンドリア内容物(具体的には、シトクロムc-細胞エネルギー産生の通常の部分)のサイトゾルへの輸送が、極めて強力なアポトーシス促進シグナルを生じさせると考えられている。サイトゾルのシトクロムcはApaf-1及びカスパーゼ-8と複合体を形成し、次いで、これがカスパーゼ-3を活性化し、さらなるカスケードの開始をもたらし、最終的に、細胞骨格タンパク質及びDNA両方の特徴的な切断を引き起こす(Dikranian et al., 2001, Neurobiology of Disease 8:359-379)。

[0027] もちろん、上記分析から、麻酔薬がこの経路と相互作用する正確な点を同定することは不可能である。また、個々の種類の薬剤は、アポトーシスを誘発できる(例えば、イソフルラン単独(Jevtovic-Todorovic et al., 2003)及びケタミン単独(Ikonomidou et al., 1999, Science 238:70-74))。したがって、続いて起こる細胞内カスケードは下流に収束するが(Brunet et al., 2001, Current Opinion in Neurobiology 11:297-305; Bittigau et al., 2002, PNAS 99(23):15089-15094)、二重GABA作動性薬剤及びNMDA受容体アンタゴニストの使用は、2種の受容体相互作用間の潜在的な相違を区別しない。イソフルラン及び／又は亜酸化窒素が、おそらくは細胞内カルシウム輸送を混乱させることによって、細胞内Bax/Bcl-2比を調節不全にできるということは十分にあり得ることである。

[0028] 細胞内カルシウムイオン濃度が上昇すると、カルシウムイオン依存性の酵

素の活性化（N O S、P L A 2、C a M kinase等）を介したカスケード系が賦活化し、膜構成成分の脂質の障害、フリーラジカル（R O S）の産生、ミトコンドリア呼吸鎖の障害とA T P産生不全が引き起こされ、これらが引き金となって急性又は遅発性のアポトーシスが誘発され则认为るグルタミン酸－カルシウムイオン説が支持されてきた。しかしながら、この説のカスケードでは、アポトーシスの真の原因因子は不明である（麻酔、“虚血性神経細胞死の分子生物学的機序と薬物療法による脳保護”、2007、56：248-270）。

[0029] 本発明における全身麻酔薬としては、全身性の麻酔効果が得られる薬であれば、特に限定されないが、例えば、吸入麻酔薬及び静脈麻酔薬等が好適に挙げられる。

[0030] 本発明における吸入麻酔薬としては、特に限定されないが、例えば、ハロタン、イソフルラン、エンフルラン、メトキシフルラン、セボフルラン、デスフルラン等の揮発性吸入麻酔薬；エチレン、シクロプロパン、ジエチルエーテル、クロロホルム、亜酸化窒素又はキセノン等のガス性吸入麻酔薬が挙げられ、イソフルラン、エンフルラン、セボフルラン、デスフルラン等のハロゲン化エーテル系化合物又は亜酸化窒素等が好ましい。吸入麻酔薬は、注射又は静脈内注入により投与される静脈麻酔薬と組合せて使用されてもよい。

[0031] 本発明における静脈麻酔薬としては、特に限定されないが、例えば、プロポフォール、ミダゾラム、ケタミン、チレタミン、チオペンタール、メトヘキシタール又はエトミデート等が挙げられ、プロポフォール、ミダゾラム等が好ましい。

[0032] 本発明に用いる全身麻酔薬としては、上記具体例のうち、亜酸化窒素、イソフルラン、エンフルラン、メトキシフルラン、セボフルラン、デスフルラン、ジエチルエーテル、プロポフォール及びミダゾラムからなる群より選ばれた1種以上の麻酔薬がより好ましい。

上記具体例のうち、ハロタン、イソフルラン、エンフルラン、メトキシフル

ラン、セボフルラン、デスフルラン、エトミデート、チオペンタール、プロポフォール及びミダゾラム等の麻酔薬は、GABA_A受容体作用薬である。さらに、前記麻酔薬のうちのいくつか（例えば、N₂O、ケタミン及びイソフルラン等）はNMDA受容体アンタゴニストであるが、麻酔薬全てについてNMDA受容体拮抗作用が解明されているわけではない。

[0033] 全身麻酔薬の用量は、年齢、健康状態、その他の医薬との相互作用及び実施される手術の種類に応じ、患者毎に異なり、本発明の効果を達成できる範囲であれば、特に限定されないが、例えば、上記の吸入麻酔薬及び静脈麻酔薬等の全身麻酔薬の医薬中の濃度は、0.1～10%（v/v）であってもよく、0.2～8%（v/v）であってもよく、0.2～5%（v/v）であってもよい。また、麻酔の導入時と麻酔状態維持時の濃度を変えてもよい。

[0034] 本発明において、水素は、水素分子（H₂）を意味し、水素分子（H₂）であれば、特に形態は限定されず、水素ガスを用いてもよく、水素ガスを水に溶解させた水素水を用いてもよい。

[0035] 前記全身麻酔薬及び水素の適用対象としては、特に限定されないが、例えば、ヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ラット、ウサギ等の動物が挙げられる。

[0036] 本発明の医薬の適用対象の年齢等は、特に限定されないが、麻酔の影響を受けやすい時期の動物に好適に適用される。例えば、対象がヒトの場合、好ましくは胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者を対象とし、脳が発達期にあり、麻酔の影響を受けやすい点を考慮して、より好ましくは胎児、新生児、乳児、幼児、小児等であり、さらに好ましくは胎児、新生児、乳児又は3歳以下の幼児である。前記胎児とは、妊娠8週目以降出生前の子を意味する。前記新生児とは、生後28日未満の乳児を意味する。前記乳児とは、1歳未満の子供を意味する。前記幼児とは、1歳以上7歳未満を意味する。前記小児とは、7歳以上15歳未満を意味する。前記高齢者とは、65歳以上の人を意味する。

- [0037] 本発明の医薬の実施態様としては、全身麻酔薬と水素とを併用していてもよく、全身麻酔薬と水素とを予め混合しておいてもよい。
- [0038] 本発明の医薬において、全身麻酔薬の形態及び水素の形態は特に限定されないが、顕著に優れた麻酔薬誘発性神経障害の予防及び／又は軽減効果を示す点から、吸入麻酔薬又は静脈麻酔薬と、水素ガスとの組み合わせとすることが好ましい。
- [0039] 本発明の医薬において、全身麻酔薬と水素を併用する場合、全身麻酔薬と水素を使用するタイミングは特に限定されず、全身麻酔薬の前投与、同時投与又は後投与のいずれに水素を用いてよく、またいずれかを組み合わせてもよいが、対象への前処理の負担がない点から、全身麻酔薬と水素の同時投与が好ましい。ここで、「前投与」とは、全身麻酔薬を未投与状態の対象へ水素を一定時間投与することを意味する。また、「同時投与」とは、全身麻酔薬の投与開始時から投与停止時まで継続して、又は全身麻酔薬の投与開始時から投与停止時までの間に一定時間、対象へ水素を投与することを意味する。「後投与」とは、全身麻酔薬の投与停止後から、対象へ水素を一定時間投与することを意味する。なお、全身麻酔薬及び水素の投与時間は、特に限定されないが、例えば、セボフルランを、4.0%以下の濃度で、酸素及び亜酸化窒素と組み合わせて使用した場合、10分～8時間程度であってよい。
- [0040] 全身麻酔薬と水素との併用において、全身麻酔薬の形態及び水素の形態は特に限定されないが、本発明の好適な一態様では、顕著に優れた麻酔薬誘発性神経障害の予防及び／又は軽減効果を示す点から、全身麻酔薬が吸入麻酔薬又は静脈麻酔薬であり、水素が水素ガスである併用とすることが好ましい。
- [0041] 本発明の医薬において、全身麻酔薬と水素を予め混合しておく場合、混合比率は特に限定されないが、例えば、吸入麻酔薬と水素ガスとを用いる場合、医薬中の水素ガス濃度は、通常0.01～7% (v/v) であり、安全性を考慮して上限値は低いほうが好ましく、例えば、0.15～4% (v/v) であってもよく、0.18～3% (v/v) であってもよく、0.2～1

、5% (v/v) であってもよく、0.25% (v/v) 以上1% (v/v) 未満であってもよく、0.28~0.9% (v/v) であってもよい。

[0042] 本発明に用いる水素の用量は、年齢、健康状態、その他の医薬との相互作用及び実施される手術の種類に応じ、患者毎に異なり、本発明の効果を達成できる範囲であれば、特に限定されないが、医薬中の水素濃度は、通常0.01~7% (v/v) であり、安全性を考慮して上限値は低いほうが好ましく、例えば、0.15~4% (v/v) であってもよく、0.18~3% (v/v) であってもよく、0.2~1.5% (v/v) であってもよく、0.25% (v/v) 以上1% (v/v) 未満であってもよく、0.28~0.9% (v/v) であってもよい。

[0043] 本発明の好適な一態様として、吸入麻酔薬と水素ガスとを組み合わせる、ヒト又はヒト以外の動物用医薬において、特に限定されないが、医薬中の水素ガス濃度は通常0.01~7% (v/v) であり、安全性を考慮して上限値は低いほうが好ましく、例えば、0.15~4% (v/v) であってもよく、0.18~3% (v/v) であってもよく、0.2~1.5% (v/v) であってもよく、0.25% (v/v) 以上1% (v/v) 未満であってもよく、0.28~0.9% (v/v) であってもよい。

[0044] 本発明の好適な一態様として、液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを組み合わせる、ヒト又はヒト以外の動物用医薬において、特に限定されないが、医薬中のガスの水素ガス濃度は通常0.01~7% (v/v) であり、安全性を考慮して上限値は低いほうが好ましく、例えば、0.15~4% (v/v) であってもよく、0.18~3% (v/v) であってもよく、0.2~1.5% (v/v) であってもよく、0.25% (v/v) 以上1% (v/v) 未満であってもよく、0.28~0.9% (v/v) であってもよい。

[0045] 本発明の好適な一態様として、吸入麻酔薬と水素ガスとを併用して使用する場合、医薬中の水素ガス濃度は、特に限定されないが、通常0.01~7% (v/v) であり、安全性を考慮して上限値は低いほうが好ましく、例えば、0.15~4% (v/v) であってもよく、0.18~3% (v/v)

であってもよく、0.2～1.5% (v/v) であってもよく、0.25% (v/v) 以上1% (v/v) 未満であってもよく、0.28～0.9% (v/v) であってもよい。

[0046] 本発明の好適な一態様として、液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを併用して使用する場合、医薬中のガスの水素ガス濃度は、特に限定されないが、通常0.01～7% (v/v) であり、安全性を考慮して上限値は低いほうが好ましく、例えば、0.15～4% (v/v) であってもよく、0.18～3% (v/v) であってもよく、0.2～1.5% (v/v) であってもよく、0.25% (v/v) 以上1% (v/v) 未満であってもよく、0.28～0.9% (v/v) であってもよい。

[0047] 本発明の医薬には、本発明の効果を妨げない限り、酸素、窒素、亜酸化窒素等を加えていてもよい。本発明の医薬に含まれる酸素濃度は、通常、20～90% (v/v) 程度であり、20～70% (v/v) 程度が好ましく、20～50% (v/v) 程度が好ましい。窒素及び亜酸化窒素は、本発明の効果を妨げない限り、濃度は限定されない。

[0048] 本発明において、医薬のガス成分の構成成分について、上記した成分以外の残量は、全て窒素ガスであってもよく、窒素ガス以外に空気に含まれる微量成分を含有していてもよい。

[0049] 吸入麻酔薬と水素ガスとを用いた場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有する医薬、(ii) 0.1～8% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有する医薬、又は(iii) 0.1～5% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有する医薬等が挙げられる。

[0050] 液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを用いた場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (w/w) の静脈麻酔

薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有する医薬、(i i) 0.1～8% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有する医薬、又は(i i i) 0.1～5% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有する医薬等が挙げられる。

[0051] 本発明の別の好適な一態様として、静脈麻酔薬と水素水とを組み合わせる、ヒト又はヒト以外の動物用医薬において、医薬中の水素水濃度は、特に限定されない。

[0052] 本発明の別の好適な一態様では、静脈麻酔薬と水素水とを併用して使用する場合、医薬中の水素水濃度は、特に限定されない。

[0053] 本発明の医薬は、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減できる。「神経障害を予防及び／又は軽減する」とは、本発明の医薬を適用された対象（例えば、ヒトの場合、患者）と、水素の非存在下において全身麻酔薬を適用された対象とを比較した場合に、1種以上の神経障害の重篤度を低下させることを意味する。また、「神経細胞損傷を予防及び／又は軽減する」とは、本発明の医薬を適用された対象と、水素の不存在下において全身麻酔薬を適用された対象とを比較した場合に、1種以上の神経細胞の損傷の重篤度を低下させることを意味する。

[0054] 既存のデータから、発達中のヒトの脳は、子宮内及び人生の最初の1年の両方で胎児表現型から成人表現型に類似するものへと、極めて動的な変換を受けるとことが推定できる。このプロセスは、シナプスの極めて早いターンオーバー（1日に20%もの高さ(Okabe et al., 1999, Nat. Neuroscience 2:804-811)）及び高レベルのバックグラウンドアポトーシス(Hua and Smith, 2004, Nature Neuroscience 7(4):327-332)という特徴を有する。これは、標的細胞のシナプスに到達できない神経細胞が、おそらくはエネルギー効率を維持するために排除されるためである。この研究は、神経発生（シナプス形成）のこの決定的な段階の間の麻酔剤への曝露が、発達中の脳におい

てアポトーシスを引き起こすことを確認するものである。実験により、GABA作動性吸入剤（例えば、イソフルラン等）への曝露が、皮質においてアポトーシスレベルの4倍の上昇を誘発することが実証された。また、亜酸化窒素（単一の薬剤としては神経変性を示さない）は、イソフルラン誘発性アポトーシスを対照に見られるものの1.2倍に大幅に増強することによってその神経変性潜在力を示す。同様の結果が海馬から得られ、この結果では、イソフルラン及びイソフルラン-亜酸化窒素混合物がアポトーシスレベルを上昇させた（それぞれ、4倍及び7倍）。

[0055] 海馬、すなわち辺縁系の一部を形成する皮質組織の特殊化した層は、記憶形成において重要な機能を有する(Aggleton and Brown, 1999, Behav Brain Sci 22(3):425-44)。海馬の神経細胞は、シナプスの効力が、特定のパターンの神経活性によって徐々に増強される、「長期増強」(LTP)として知られる現象を示す能力を有する。このプロセスが細胞レベルでの記憶の基礎であると考えられている。一般的には、海馬の処理は、海馬と海馬傍回（海馬台）の両方で起こり、その後、脳弓に投影される。海馬及び海馬台における神経細胞損傷の広がりを見ると、高レベルの麻酔薬に曝露された新生児ラットが、成人として学習障害の徴候を示すこと(Jevtovic-Todorovic et al., 2003)は驚くことではなく、同じ研究においてLTP抑制の発見によって裏付けられている。

[0056] 本発明における麻酔薬誘発性神経障害としては、好適には、脳の麻酔薬誘発性神経障害が挙げられ、本発明の神経障害には、特に限定されないが、神経運動障害、神経認知障害、精神認知障害、知的障害、自閉症等が挙げられる。前記神経運動障害は、強度、平衡及び移動性の障害を含む。前記神経認知障害は、学習障害及び記憶障害を含む。上記の神経障害は、神経変性、神経細胞アポトーシス、神経細胞壊死等の要因によって引き起こされ则认为られており、特定の一つの要因だけでなく、複合的な要因によって引き起こされている可能性が考えられている。中でも、神経細胞アポトーシスは、前記のいずれの障害においても何らかの影響を与えているものと推察される。

前記神経変性とは、細胞収縮、辺縁趨向及び膜に封入されたアポトーシス小体の形成を伴うクロマチン凝集を意味する。

[0057] このような神経認知障害は、通常、ランド(Randt)記憶検査のショートストーリーモジュール(short-story module)[Randt C, Brown E. Administration manual: Randt Memory Test. New York: Life Sciences, 1983]、改訂ウェクスラー成人知能検査(Wechsler Adult Intelligence Scale Revised)の数唱下位検査(Digit Span subtest)と符合作業下位検査(Digit Symbol subtest)[Wechsler D. The Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised (WAIS-R). San Antonio, Tex.: Psychological Corporation, 1981.], 改訂ベントン視覚記銘検査(Benton Revised Visual Retention Test)[Benton AL, Hansher K. Multilingual aphasia examination. Iowa City: University of Iowa Press, 1978]及びトレイルメイキングテスト(Trail Making Test) (パートB) [Reitan RM. Validity of the Trail Making Test as an indicator of organic brain damage. Percept Mot Skills 1958;8:271-6]等の十分に確立された基準によって評価できる。その他の適した神経運動及び神経認知検査は、Combs D, D'Alecy L: Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: Effect of fasting and 1,3-butanediol. Stroke 1987; 18: 503-511 及びGionet T, Thomas J, Warner D, Goodlett C, Wasserman E, West J: Forebrain ischemia induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats. Stroke 1991;22:1040-1047に記載されている。

[0058] 本発明の別の態様は、全身麻酔薬と水素とを併用する、麻酔薬誘発性神経障害の予防及び／又は軽減用医薬の調製方法に関する。全身麻酔薬、水素、医薬の適用対象及び麻酔薬誘発性神経障害並びにこれらの組み合わせは、上述のとおりである。本調製方法は、全身麻酔薬と水素とを併用する工程を有してもよく、全身麻酔薬と水素とを予め混合する工程を有してもよい。

[0059] 本調製方法において、吸入麻酔薬と水素ガスとを用いる場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (v／

v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有するように、吸入麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は吸入麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程を有する医薬の調製方法、(ii) 0.1～8% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有するように、吸入麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は吸入麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程を有する医薬の調製方法、又は(iii) 0.1～5% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有するように、吸入麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は吸入麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程を有する医薬の調製方法等が挙げられる。

[0060] 本調製方法において、液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを用いた場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有するように、静脈麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は静脈麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程を有する医薬の調製方法、(ii) 0.1～8% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有するように、静脈麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は静脈麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程を有する医薬の調製方法、又は(iii) 0.1～5% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有するように、静脈麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は静脈麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程を有する医薬の調製方法等が挙げられる。

[0061] 本発明の別の態様としては、水素と組み合わせて用いられる全身麻酔剤製造のための全身麻酔薬の使用が挙げられる。前記麻酔剤には、薬効成分の安定、患者の水分補給及び電解質のバランス維持を目的として、公知の賦形剤、添加剤を加えてもよい。前記賦形剤、添加剤としては、本発明の効果を妨

げない限り、従来公知の賦形剤、添加剤を使用することができる。例えば、プロポフォールの麻酔剤の中には、ダイズ油、中鎖脂肪酸トリグリセリド、精製卵黄レシチン、濃グリセリン、オレイン酸ナトリウム等を添加してもよい。全身麻酔薬、水素及び医薬の適用対象は、上述のとおりである。

[0062] 本使用において、吸入麻酔薬と水素ガスとを用いる場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1~10% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~90% (v/v) の酸素を含有し、さらに必要に応じて添加剤を含んでいてもよい全身麻酔剤製造のための全身麻酔薬の使用、(ii) 0.1~8% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~70% (v/v) の酸素を含有し、さらに必要に応じて添加剤を含んでいてもよい全身麻酔剤製造のための全身麻酔薬の使用、又は(iii) 0.1~5% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~50% (v/v) の酸素を含有し、さらに必要に応じて添加剤を含んでいてもよい全身麻酔剤製造のための全身麻酔薬の使用等が挙げられる。

[0063] 本使用において、液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを用いた場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1~10% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~90% (v/v) の酸素を含有し、必要に応じて添加剤を含んでいてもよい全身麻酔剤製造のための全身麻酔薬の使用、(ii) 0.1~8% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~70% (v/v) の酸素を含有し、必要に応じて添加剤を含んでいてもよい全身麻酔剤製造のための全身麻酔薬の使用、又は(iii) 0.1~5% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~50% (v/v) の酸素を含有し、必要に応じて添加剤を含んでいてもよい全身麻酔剤製造のための全身麻酔薬の使用等が挙げられる。

[0064] 本発明の別の態様は、全身麻酔薬と水素とを組み合わせるなる医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用に関する。全身麻酔薬、水素及び医薬の適

用対象並びにこれらの組み合わせは、上述のとおりである。本使用の実施態様としては、全身麻酔薬と水素とを併用していてもよく、全身麻酔薬と水素とを予め混合しておいてもよい。

[0065] 本使用において、吸入麻酔薬と水素ガスとを用いる場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有する医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用、(ii) 0.1～8% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有する医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用、又は(iii) 0.1～5% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有する医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用等が挙げられる。

[0066] 本使用において、液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを用いた場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有する医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用、(ii) 0.1～8% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有する医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用、又は(iii) 0.1～5% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有する医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用等が挙げられる。

[0067] 本発明の別の態様は、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための医薬の製造における、全身麻酔薬と水素の使用に関する。全身麻酔薬、水素、医薬の適用対象、麻酔薬誘発性神経障害及び実施態様並びにこれらの組み合わせは、上述のとおりである。

[0068] 本使用において、吸入麻酔薬と水素ガスとを用いる場合の好適な実施態様

としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1~10% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~90% (v/v) の酸素を含有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための、全身麻酔薬と水素の使用、(ii) 0.1~8% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~70% (v/v) の酸素を含有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための、全身麻酔薬と水素の使用、又は(iii) 0.1~5% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~50% (v/v) の酸素を含有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための、全身麻酔薬と水素の使用等が挙げられる。

[0069] 本使用において、液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを用いた場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1~10% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~90% (v/v) の酸素を含有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための、全身麻酔薬と水素の使用、(ii) 0.1~8% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~70% (v/v) の酸素を含有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための、全身麻酔薬と水素の使用、又は(iii) 0.1~5% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15~1.5% (v/v) の水素ガス及び20~50% (v/v) の酸素を含有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための、全身麻酔薬と水素の使用等が挙げられる。

[0070] 本発明の別の態様は、神経細胞アポトーシスに付随する麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用に関する。全身麻酔薬、水素、医薬の適用対象、麻酔薬誘発性神経障害及び実施態様並びにこれらの組み合わせは、上述のとおりである。

[0071] 本使用において、吸入麻酔薬と水素ガスとを用いる場合の好適な実施態様

としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有する、神経細胞アポトーシスに付随する麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用、(ii) 0.1～8% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有する、神経細胞アポトーシスに付随する麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用、又は(iii) 0.1～5% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有する、神経細胞アポトーシスに付随する麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用等が挙げられる。

[0072] 本使用において、液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを用いた場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有する、神経細胞アポトーシスに付随する麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用、(ii) 0.1～8% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有する、神経細胞アポトーシスに付随する麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用、又は(iii) 0.1～5% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有する、神経細胞アポトーシスに付随する麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための、医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用等が挙げられる。

[0073] 本発明のさらなる別の態様は、麻酔誘発性神経細胞損傷を予防及び／又は軽減するための医薬の製造における全身麻酔薬と水素の使用に関する。全身麻酔薬、水素、医薬の適用対象、麻酔薬誘発性神経障害及び実施態様並びに

これらの組み合わせは、上述のとおりである。

[0074] 本発明の別の態様は、全身麻酔薬と水素とを併用して対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減する方法に関する。全身麻酔薬、水素及び麻酔薬誘発性神経障害並びにこれらの組み合わせは、上述のとおりである。本方法は、全身麻酔薬と水素とを併用する工程を有してもよく、全身麻酔薬と水素とを予め混合する工程を有してもよい。

[0075] 本方法において、吸入麻酔薬と水素ガスとを用いる場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有させ、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減する方法、(ii) 0.1～8% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有させ、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減する方法、又は(iii) 0.1～5% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有させ、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減する方法等が挙げられる。

[0076] 本方法において、液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを用いた場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有させ、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減する方法等、(ii) 0.1～8% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有させ、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減する方法等、又は(iii) 0.1～5% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有させ、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減する方法等が挙げられる。

[0077] 本態様において、全身麻酔薬と水素を併用するタイミングは特に限定されず、全身麻酔薬の前投与、同時投与又は後投与のいずれに水素を用いてよく、またいずれかを組み合わせてもよいが、対象への前処理の負担がない点から、全身麻酔薬と水素の同時投与が好ましい。ここで、「前投与」とは、全身麻酔薬を未投与状態の対象へ水素を一定時間投与することを意味する。また、「同時投与」とは、全身麻酔薬の投与開始時から投与停止時まで継続して、又は全身麻酔薬の投与開始時から投与停止時までの間に一定時間、対象へ水素を投与することを意味する。「後投与」とは、全身麻酔薬の投与停止後から、対象へ水素を一定時間投与することを意味する。なお、全身麻酔薬及び水素の投与時間は、特に限定されない。前記全身麻酔薬及び水素の投与対象としては、特に限定されないが、例えば、ヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ラット、ウサギ等の動物が挙げられる。

[0078] 本発明の全身麻酔薬及び水素の投与対象の年齢等は特に限定されないが、麻酔の影響を受けやすい時期の動物に好適に投与される。例えば、対象がヒトの場合、好ましくは胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者を対象とし、脳が発達期にあり、麻酔の影響を受けやすい点を考慮して、より好ましくは胎児、新生児、乳児、幼児、小児等であり、さらに好ましくは胎児、新生児、乳児又は3歳以下の幼児である。胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者の各定義は上述のとおりである。

[0079] 本発明の別の態様は、全身麻酔薬と水素とを組み合わせる医療を、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性アポトーシスを阻害する方法に関する。全身麻酔薬、水素及び医療の適用対象並びにこれらの組み合わせは、上述のとおりである。本方法は、全身麻酔薬と水素とを併用する工程を有してもよく、全身麻酔薬と水素とを予め混合する工程を有してもよい。

[0080] 本方法において、吸入麻酔薬と水素ガスとを用いる場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有するように、吸入麻酔薬と水素ガスとを併用する工

程又は吸入麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程及び前記工程で得られる医薬を、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性アポトーシスを阻害する方法、(i i) 0.1～8% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有するように、吸入麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は吸入麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程及び前記工程で得られる医薬を、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性アポトーシスを阻害する方法、又は(i i i) 0.1～5% (v/v) の吸入麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有するように、吸入麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は吸入麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程及び前記工程で得られる医薬を、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性アポトーシスを阻害する方法等が挙げられる。

- [0081] 本方法において、液状の静脈麻酔薬と水素ガスとを用いた場合の好適な実施態様としては、特に限定されないが、例えば、(i) 0.1～10% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～90% (v/v) の酸素を含有するように、静脈麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は静脈麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程及び前記工程で得られる医薬を、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性アポトーシスを阻害する方法、(i i) 0.1～8% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～70% (v/v) の酸素を含有するように、静脈麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は静脈麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程及び前記工程で得られる医薬を、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性アポトーシスを阻害する方法、又は(i i i) 0.1～5% (w/w) の静脈麻酔薬、0.15～1.5% (v/v) の水素ガス及び20～50% (v/v) の酸素を含有するように、静脈麻酔薬と水素ガスとを併用する工程又は静脈麻酔薬と水素ガスとを予め混合する工程及び前記工程で得られる医薬を、対象に投与する工程を有する、麻酔薬誘発性アポトーシスを阻害する方法等が挙げられる。

[0082] 本発明において、麻酔薬誘発性神経障害をアポトーシス及び行動試験から評価した。アポトーシスについては、(i)分解PARPの定量、(ii)活性カスパーゼ-3染色、又は(iii)TUNEL法によって評価した。

[0083] 本発明では、分解PARPの検出及び定量にウェスタンブロット分析を用いた。アポトーシスカスケードの主要な開始因子の一つは、カスパーゼの活性化と、それによるポリ（アデノシンリボース）ポリメラーゼ（PARP）の分解である。正常時はDNA修復やDNAの安定化及び他の細胞内のイベントに関与する核内酵素であるPARPは、アポトーシスカスケードにおいては、カスパーゼ-3の最終ターゲットである。アポトーシスの間に分解していく活性型カスパーゼの測定に対して、分解PARPの測定は、アポトーシスの後期ステージにおいても持続するシグナルの検出を可能とする。

[0084] 本発明では、活性カスパーゼ-3染色に、カスパーゼ-3免疫組織化学法を用いた。アポトーシスシグナル伝達カスケードの最後で、カスパーゼ-9がカスパーゼ-3（システインプロテアーゼ）を活性化するため、カスパーゼ-3はアポトーシス関与点の下流にある細胞のマーカーである。銀染色を広く平行させながら行う前記免疫組織化学法は、神経細胞アポトーシスの適したマーカーとして働き、生理学的細胞死の定量化目的と特性決定の両方にとって優れたものである(Olney et al., 2002b, Neurobiology of Disease 9:205-219)。カスパーゼ-3は細胞質酵素であるため、活性化カスパーゼ-3で染色された細胞はその全体が染色され、定量化が比較的容易である。

[0085] 本発明では、アポトーシスの初期におけるDNAの断片化を、TUNEL法によって可視化させた。DNAの断片化は、二本鎖の切断及び一本鎖の切断によって構成されている。いずれの切断タイプも、その断片のフリーの3'-OH末端を、標識ヌクレオチドを使用した酵素反応によって標識し検出することが可能である。TUNEL法は、高感度なアポトーシス検出法として用いられている。

実施例

[0086] 次に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではなく、多くの変形が本発明の技術的思想内で当分野において通常の知識を有する者により可能である。

[0087] 以下の実施例における統計分析は、グラフパッドプリズム 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) を用いて行った。それぞれのグループの平均値の比較は、一元及び二元配置分散分析によって実施し、その後それぞれについてニューマン-クルーズとボンフェローニのポストホックテストを実行した。Y 字型迷路試験において、グループ間のランダムパフォーマンスに関する行動の比較は、両側の 1 サンプル t 検定を用いて行った。P < 0.05 を統計的有意差ありとした。値は平均値の標準誤差で示した。

[0088] 全ての実験は、防衛医科大学校の動物実験のための倫理指針に従って実行し、防衛医科大学校動物実験委員会（所沢市、埼玉県、日本）によって認定された。

[0089] [実施例 1]

動物：この研究で使用した C57BL/6 マウスは、12 時間の明暗周期（照明の点灯時間は 7 時～19 時）と $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の室温の条件下で管理した。マウスは自由摂餌及び自由摂水下で飼育した。この研究で使用した全てのマウスは、同齢の同腹仔であった。

[0090] 麻酔薬及び水素処理：脳の発達期にある 6 日齢 (P6) のマウスを、母親のいるケージから移動した直後に、操作グローブの付いた多湿なチャンバーにマウスを置いた。空気、酸素（空気とは別に）、水素、セボフルランを混合して、最終的に酸素 30%、水素 1.3%、セボフルラン 3% となるように調製した麻酔薬混合ガスを前記マウスに吸入投与した。ガスの総流量は 2 L/分、麻酔薬の投与時間は 6 時間であった。酸素及び麻酔薬の分率は、ガス分析システム (Capnomac Ultima, GE Healthcare, 東京都、日本) を用いて測定した。水素ガス濃度は、企業 (Breath Lab CO., 奈良県、日本) でガスクロマトグラフィーを使用して測定した。麻酔薬に曝露中、マウスを $38 \pm 1^\circ\text{C}$ に加温したマットの上で保温した。

[0091] [実施例 2]

空気、酸素（空気とは別に）、水素及びセボフルランを混合して、最終的に酸素が 30%、水素が 0.6%、セボフルラン（3%）となるように麻酔薬混合ガスを調製した以外は実施例 1 と同様に行った。

[0092] [実施例 3]

空気、酸素（空気とは別に）、水素及びセボフルランを混合して、最終的に酸素が 30%、水素が 0.3%、セボフルラン（3%）となるように麻酔薬混合ガスを調製した以外は実施例 1 と同様に行った。

[0093] [実施例 4]

空気、酸素（空気とは別に）、水素及びデスフルランを混合して、最終的に酸素が 30%、水素が 1.3%、デスフルラン（5.7%）となるように麻酔薬混合ガスを調製した以外は実施例 1 と同様に行った。

[0094] [実施例 5]

空気、酸素（空気とは別に）及び水素を混合して、酸素が 30%、水素が 1.3%の混合ガスを麻酔薬と同時に吸入させながら、プロポフォル（100 mg/kg i.p）の腹腔内投与と同時に、併用して吸入投与した以外は実施例 1 と同様に行った。

[0095] [実施例 6]

空気、酸素（空気とは別に）、水素及びセボフルランを混合して、最終的に酸素が 30%、水素が 1.3%、セボフルラン（2%）となるように麻酔薬混合ガスを調製した以外は実施例 1 と同様に行った。

[0096] [比較例 1]

空気、酸素（空気とは別に）及びセボフルランを混合して、最終的に酸素が 30%、セボフルラン（3%）となるように麻酔薬混合ガスを調製した以外は、実施例 1 と同様に行った。

[0097] [比較例 2]

空気、酸素（空気とは別に）及びデスフルランを混合して、最終的に酸素が 30%、デスフルラン（5.7%）となるように麻酔薬混合ガスを調製し

た以外は、実施例 1 と同様に行った。

[0098] [比較例 3]

空気及び酸素（空気とは別に）を混合して、酸素が 30% の混合ガスを麻酔薬と同時吸入させながら、プロポフォール（100 mg/kg i.p.）の腹腔内投与と同時に、併用して吸入投与した以外は実施例 1 と同様に行った。

[0099] [試験例 1 - A]

タンパク質抽出物の精製：タンパク質抽出物の調製は、Kodama M. et al., *Anesthesiology*, 2011 ; 115 : 979-991 に記載したように、ウェスタンブロット法により実施した。以下に方法を簡単に記載する。マウスの前脳を速やかに取り出し、50 mM のトリス HCl、pH 7.4、150 mM の NaCl、1% の NP-40、0.5% のデオキシコール酸ナトリウム、プロテアーゼ阻害薬混合物（Complete; Roche Diagnostics, ペンツベルク, ドイツ）及び脱リン酸化酵素阻害薬（20 mM のグリセロリン酸、1 mM の Na_3VO_4 、2 mM の NaF）を含んだ、4 倍量のホモゲナイゼーションバッファ中で均質化した。続いて、ホモジネートを 15,000 g、30 分間、4℃ の条件で遠心分離した。上澄み溶液を分離し、使用時まで -80℃ で保管した。各試料のタンパク質濃度は、ビシンコニン酸タンパク質定量キット（Pierce, Rockford, IL）を用いて測定した。

[0100] ウェスタンブロット分析：ウェスタンブロット法は、Kodama M. et al., *Anesthesiology*, 2011 ; 115 : 979-991 に記載した方法で実施した。以下に方法を簡単に記載する。ホモジネートをドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動に供した。その後、タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜（Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA）に転写した。ブロットは、抗-ポリ（アデノシンリリン酸リボース）-ポリメラーゼ（抗-PARP）（ウサギポリクローナル; Cell Signaling Technology）又は抗- β -アクチン（マウスモノクローナル; Sigma, St. Louis, MO）抗体と免疫反応した。続いて、ペルオキシダーゼ複合型二次抗体を加えて、ブロットをインキュベ-

トした。タンパク質バンドは、化学発光検出器 (SuperSignal West Pico; Pierce) を用いて可視化した。分解 PARP バンドの定量は、 β -アクチンで標準化した。二元配置分散分析とそれに続くボンフェローニのポストホックテスト (一つのグループにつき、 $n = 3 - 6$ のマウス) を使用して、比較を実施した。

[0101] 前記前脳の抽出物について、分解 PARP (アポトーシス細胞死のバイオマーカー) への抗体を使用して、ウェスタンブロットによる分析を実施した。分析結果を図 1 A に示す。分解 PARP バンドの定量化の結果を図 1 B に示す。図 1 A 及び B から、酸素 30% 含有ガス又は酸素 30% 及び水素 1.3% を含有するガスの中に曝露したマウス脳の分解 PARP の免疫活性は検出下限以下であったが、酸素 30% 及びセボフルラン 3% を含有するガスに 6 時間曝露したマウス (比較例 1) では、分解 PARP の生成反応が誘導された。一方、酸素 30%、水素 1.3% 及びセボフルラン 3% を含有するガスに曝露したマウス (実施例 1) では、酸素 30% を含有するガス中のセボフルランに曝露したマウスと比較して、分解 PARP に対する免疫活性の著しい低下が観察され (すなわち、水素ガスが PARP の分解を抑制した。) 、1.3% の水素ガスが新生仔マウスのセボフルラン曝露によって引き起こされる神経細胞アポトーシスを阻害することが確認された。二元配置分散分析 (two-way ANOVA) によって、これらの有意差が確認され、水素吸入の主要な効果 ($F = 12.17$ 、 $P < 0.01$)、セボフルラン投与の主要な影響 ($F = 45.66$ 、 $P < 0.0001$)、及び相互作用 (水素投与 $\times$ セボフルラン投与; $F = 15.28$ 、 $P < 0.01$) を示した。

[0102] 比較例 1 の分解 PARP の定量値を 100% としたとき、実施例 1 ~ 3 の分解 PARP の相対的な定量値は、それぞれ、実施例 1 は約 45%、実施例 2 は約 50%、実施例 3 は約 55% 減少し、分解 PARP の定量値は有位に減少した。実施例 6 においても、実施例 1 と同様に、神経細胞アポトーシスが有意に減少した。これらのことから、本発明が、セボフルランの曝露によって引き起こされる神経細胞アポトーシスを、水素を用いない場合に比べて

、40%以上も阻害できることが示された。

[0103] [試験例1-B]

[試験例1-A]と同様にして、実施例4と比較例2について評価を行った。比較例2の分解PARPの定量値を100%としたとき、実施例4の分解PARPの相対的な定量値は、47.7%減少し、分解PARPの定量値は有位に減少した。このことから、本発明が、デスフルランの曝露によって引き起こされる神経細胞アポトーシスを45%以上も阻害することが示された。

[0104] [試験例1-C]

[試験例1-A]と同様にして、実施例4と比較例3について評価を行った。比較例3の分解PARPの定量値を100%としたとき、実施例5の分解PARPの相対的な定量値は、55.1%減少し、分解PARPの定量値は有位に減少した。このことから、本発明が、プロポフォールの曝露によって引き起こされる神経細胞アポトーシスを50%以上も阻害することが示された。

[0105] [試験例2]

病理組織学的な研究：免疫組織化学的染色は、Kodama M. et al., *Anesthesiology*, 2011 ; 115 : 979-991及びSatoh Y. et al., *J Neurosci*, 2011 ; 31 : 11953-11967に記載した方法で実施した。以下にその方法を簡単に記載する。4%のパラホルムアルデヒドを含有する0.1Mリン酸バッファーで、マウスを経心臓的に灌流した。頭蓋骨を開け、頭部を少なくとも2時間、同じバッファーに浸した。その後、脳を頭蓋骨から取り出し、パラフィン包埋した断片(5 μ m厚)を使って病理組織学的に分析した。断片は、確立された方法に従ってキシレン中でパラフィンを剥離し、グレードエタノールシリーズ(graded ethanol series)を使って水和させた。抗原賦活化処理は、抗原賦活化溶液(Antigen Unmasking Solution; Vector Laboratories, Burlingame, CA)を用い、オートクレーブで5分間加熱(121℃)することにより実施した。その後、バックグラウンドの染色を薄くするため、断片をブロッキ

グ試薬 (Protein Block, Serum-Free; Dako, Glostrup, デンマーク) で 30 分間処理した。続いて、断片を一次抗体と共に、多湿のチャンバーの中で、一晩 4℃ でインキュベートした。この研究で使用した一次抗体は、抗-活性カスパーゼ-3 (ウサギポリクローナル; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) 及び抗-4-ヒドロキシ-2-ノネナール (anti-4-HNE) (マウスモノクローナル; 日本老化制御研究所、静岡県、日本) 抗体であった。

[0106] 明視野染色のために、ペルオキシダーゼ複合型二次抗体 (Dako EnVision+ system; Dako) を加えて断片を恒温処理した。免疫反応性は、製造元のプロトコルに従い、3, 3'-ジアミノベンジン四塩化物 (DAB, Vector Laboratories) を使って検出した。最後に、断片をヘマトキシリンで対比染色した。蛍光染色では、Alexa-Fluor 546-複合型-抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies, Eugene, OR) を加えて断片をインキュベートした。

[0107] Kodama M. et al., Anesthesiology, 2011 ; 115 : 979-991 に記載したように、製造元のプロトコルに従い、in situ のアポトーシス検出キット (ApopTag; Chemicon, Temecula, CA) を用いて、ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼを用いたニックエンドラベリング (TUNEL) 法を実施した。活性を検出するために DAB を使用した。断片はヘマトキシリンで対比染色した。

[0108] 一つのグループにつき、実施例 1 及び比較例 1 と同じ条件で麻酔に暴露した 8 から 10 匹のマウスから採取したサンプルを、それぞれの試験に供した。活性カスパーゼ 3 陽性又は TUNEL 陽性の細胞の数のカウントは、処理条件を知らない試験者が実施した。

[0109] 活性カスパーゼ-3 (アポトーシス細胞死の別のバイオマーカー) に対する抗体を用いて組織学的分析を実施した (図 2)。カスパーゼ-3 の活性を調べるため、断片を免疫化学的に染色した。ウェスタンブロットによる分析で、上記で記載したように、酸素 30% 及び水素 1.3% を含有するガスに曝露されたマウスのアポトーシスが、酸素 30% を含有するガスに曝露した

マウスと同じレベルであったことが示されたことから、3つのグループに対してのみ、組織学的定量を実施した：(i)酸素30%を含有するガス（以降、コントロールと示す）、(ii)酸素30%及びセボフルラン3%を含有するガス（以降、セボフルランと示す）（比較例1）及び(iii)酸素30%、水素1.3%及びセボフルラン3%を含有するガス（以降、セボフルラン+水素と示す）（実施例1）。麻酔を6時間掛けた直後の脳のある領域を模擬コントロールとして比較した時、6時間のセボフルラン曝露（比較例1）によって、活性カスパーゼ-3陽性の細胞数の著しい増加が誘発された（図2B）。一方で、セボフルランのみの曝露と比較して、セボフルラン+水素の曝露（実施例1）では、マウスの活性カスパーゼ-3陽性の細胞の数は顕著に少なかった（図2及び図3）。図2及び図3から、セボフルランによって引き起こされる、発達期の脳における神経細胞アポトーシスを、水素ガスが緩和することが明らかである。我々はまた、TUNEL法を細胞レベルでのアポトーシス細胞死の測定法として実施した（図4）。麻酔6時間後のTUNEL染色のパターンは、活性カスパーゼ-3の染色パターンと似ていた。これらの結果から、1.3%水素は新生仔のセボフルラン曝露によって引き起こされる神経細胞アポトーシスを著しく低下させることが示された。

[0110] ヒドロキシラジカルが脂質に作用すると、脂質過酸化物となって4-HNEを産生する。そのため、4-HNEは、脂質の過酸化及び酸化ストレスのマーカーとして広く利用されている。図5は、ニューロンをセボフルランに6時間暴露した時（図5B、比較例1）、模擬コントロール（図5A）と比較して、より多くの脂質過酸化が誘発されたことを示す。一方で、セボフルラン+水素に暴露したマウス（実施例1）の脳の4-HNEの染色は（図5C）、セボフルランのみを暴露した場合（図5B）と比較して著しく減少した。これらの結果から、新生仔マウスの3%セボフルラン暴露は脳内の酸化ストレスを誘発するが、水素が酸化ストレスを減少させることが確認された。

[0111] [試験例3]

行動試験：行動研究に供したマウスは全て、実施例 1 及び比較例 1 と同じ条件で麻酔に暴露した同齢・同腹仔のオスであった。3 週齢のマウスを母親から離し、3 又は 4 匹のマウスがいるケージに収容した。所定の年齢で、それらに行動試験（麻酔薬の影響を評価するため、長期記憶障害評価のコントロールとしてのオープンフィールド試験、短期記憶障害の評価のための Y 字型迷路における自発的交替行動試験、長期記憶障害の評価のための恐怖条件付け試験、社会性試験を行った。社会性試験については、社会的相互作用試験の他、そのコントロールとして新規性試験及び嗅覚試験を行った。）を受けさせた。それぞれのマウスの動きを観察し、コンピュータ作動ビデオ追跡システム（SMART; バルセロナ、スペイン）を用いて解析した。試験では、アームを持った装置を使用し、マウスの足がアームに 4 本全て入った数をカウントした。装置はトライアル毎に掃除した。この研究で用いた装置は全て、0' Hara & Co., LTD（東京都, 日本）製のものであった。同じマウスの集団を、全ての試験に供した。

[0112] オープンフィールド試験：新しい環境に対する情動反応を、Satoh Y. et al., J Neurosci, 2011 ; 31 : 11953-11967 に記載した方法を用いて、オープンフィールド試験によって測定した。行動は 10 分間の総移動距離（メートル）で測定した。試験は 12 週齢のマウスに対して実施した。結果を図 6 A に示す。

[0113] Y 字型迷路における自発的交替行動試験：空間作業記憶を評価するため、Satoh Y. et al., J Neurosci, 2011 ; 31 : 11953-11967 に記載した方法で、Y 字型迷路試験を実施した。左右対称の亚克力製の Y 字型迷路は、120℃で分かれている 3 つのアーム（25×5 cm）からなり、高さ 15 cm の透明な壁で囲われていた。マウスをそれぞれ、Y 字型迷路の中央に置き自由に 8 分間の探索をさせ、アームへ侵入した連続回数又は総回数を記録した。交替反応（alternation）の割合は、連続する 3 回の進入が 3 つの全アームへの進入であった時の回数を、交替反応の最大可能数（アームへの総進入回数から 2 を引いた値）で除した後、100 を乗じた数である。試験は 12 週齢のマ

ウスに対して実施した。結果を図 6 B に示す。

[0114] 恐怖条件付け試験：恐怖条件付け試験を、Satomoto M. et al., *Anesthesiology* 2009;110:628-637 に記載した方法で実施した。以下に方法を簡単に記載する。マウスを特殊なケージに入れ、20 秒間 80 dB の白色雑音を聞かせた。20 秒目に 1 秒間 1 mA のフットショック (foot shock) を与え、この刺激を 1 分サイクルで 3 回繰り返した。刺激した 24 時間後にフットショックを与えたマウスをケージに戻し、マウスがフリージング (1 秒間の持続時間中に体のどの部分も動かさない状態) する時間を 5 分間計測した (恐怖条件付けテスト状況試験)。48 時間後に全く違う場所の違う形状のケージにマウスを入れ、白色雑音のみを聞かせて、マウスがフリージングする時間を 3 分間計測した (恐怖条件付けテスト音試験)。フリージング反応は、ビデオ追跡システムで記録し、恐怖記憶の指数とした。試験は 13 週齢のマウスに対して実施した。この試験に供したマウスは、その後のいずれの試験にも使用しなかった (オープンフィールド試験及び Y 字型迷路における自発的交替行動試験に使用したのと同じマウスのグループを試験に供した)。条件付けをしてから 24 時間後に、条件付けを行ったチャンバーの中にマウスを入れて、フリージングを測定した (状況による恐怖反応) 結果を図 6 C に示す。条件付けをしてから 48 時間後に、全く違う場所の違う形状のケージにマウスを入れ、白色雑音のみを聞かせて、フリージングを測定した結果を図 6 D に示す。

[0115] 社会性試験：社会性を確認するテストは、社会的相互作用試験、新規性試験、嗅覚試験の 3 つの試験を行った。

[0116] 社会的相互作用に対する能力を試験するために、Satoh Y. et al., *J Neurosci*, 2011; 31: 11953-11967 に記載した方法で、社交性試験を実施した。相互作用の標的として、生物ターゲット (ケージに入れられた成体マウス) と無生物ターゲット (ケージに入れられたダミーマウス) のどちらを優先的に選択するかについて、オープンフィールドチャンバーで試験を実施した。生物又は無生物のターゲットを円柱型のケージの中に置き、臭いを嗅ぐことはで

きるが最小限の接触しかできないようにした。円柱型のケージは、高さ 10 cm、直径は 9 cm であり、柵の間隔は 7 mm であった。直接ケージの臭いを嗅ぐ動作を、70 lux の照明条件下で 10 分間観察し点数化した。試験は 12 週齢のマウスに対して実施した（コントロール：n = 18；セボフルラン：n = 20；セボフルラン+水素：n = 19）。全ての生物ターゲットは野生型の雄性マウスを用いた。結果を図 7 A に示す。

[0117] 嗅覚試験：嗅覚試験を、Sato Y. et al., J Neurosci, 2011 ; 31 : 11953-11967 に記載した方法に、多少の変更を加えて実施した。以下に方法を簡単に記載する。マウスを、初日に新しい食べ物（ブルーベリーチーズ）の香りに慣らした。48 時間の摂食制限の後、埋められた食べ物を見つけ出すまでに要した時間を測定した：ブルーベリーチーズのかげらを、清潔なケージの中の敷藁の 2 cm 下に埋めた。試験は 12 週齢のマウスに対して実施した（社会性試験に使用したのと同じマウスのグループを試験に供した）。結果を図 7 B に示す。

[0118] 新規物試験：新規物試験を、Sato Y. et al., J Neurosci, 2011 ; 31 : 11953-11967 に記載した方法で実施した。マウスを個別に収容し、10 分間の間に無生物の新規物（小さな赤いチューブ）に関わっていた時間の合計を測定した。試験は 12 週齢のマウスに対して実施した（社会性試験及び嗅覚試験に使用したのと同じマウスのグループを試験に供した）。結果を図 7 C に示す。

[0119] 新しい環境に対する情動反応を評価するために実施したオープンフィールドテストにおける 10 分間の総移動距離については、グループ間に、統計学的な有意差は無かった（コントロール：n = 18；セボフルラン：n = 20；セボフルラン+水素：n = 19）（図 6 A）。よって、全身麻酔薬は情動反応に関して影響を与えないことが示された。

[0120] 作業記憶は、複雑な認知的作業を遂行するための、情報を一時的に保持する能力である（Saxe MD et al., Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:17501-17506、Jones MW, Curr Mol Med 2002;2:639-647）。空間作業記憶を評価する

ために実施した Y 字型迷路試験において（図 6 B）、グループ間に統計学的な有意差は観察されなかった（オープンフィールドテストに使用したのと同じマウスのグループを試験に供した）。よって、全身麻酔薬は短期記憶に影響しないことが示された。

- [0121] 新生仔のセボフルラン曝露により引き起こされる長期記憶損傷に及ぼす、水素の影響を評価するため、水素の同時投与あり（実施例 1）又はなし（比較例 1）のセボフルランに曝露したマウスに、成体となった段階で、恐怖条件付け試験を受けさせた（図 6 C 及び D）。恐怖条件付け状況試験において（図 6 C）、セボフルランに曝露したマウス（比較例 1）の、刺激を与えてから 24 時間後のフリージング（すくみ行動）は、コントロールの動物と比較して、状況学習において著しく低下し（一元配置分散分析、 $F = 7.22$ 、 $P = 0.0017$ ；コントロールとセボフルランの比較において、ニューマン-クルーズポストホックテスト、 $P < 0.01$ ）、新生仔のセボフルラン曝露が、成体における長期記憶に損傷を与えることが示された。それとは対照的に、セボフルラン+水素に曝露したマウスは（実施例 1）、セボフルランのみを投与したマウス（比較例 1）と比較して行動が改善し（セボフルランとセボフルラン+水素の比較は、ニューマン-クルーズポストホックテスト、 $P < 0.01$ ）、コントロールとほぼ同等のパフォーマンスを示した（コントロールとセボフルラン+水素の比較は、ニューマン-クルーズポストホックテスト、 $P < 0.05$ ）。また、恐怖条件付け音試験において（図 6 D）、コントロールと比較して、セボフルラン曝露のマウス（比較例 1）は、条件付けしてから 48 時間後の音試験におけるフリージングも、著しく低下した（一元配置分散分析、 $F = 12.08$ 、 $P = 0.0001$ ；コントロールとセボフルランの比較において、ニューマン-クルーズポストホックテスト、 $P < 0.001$ ）。一方で、セボフルラン+水素に曝露したマウス（実施例 1）は、セボフルランのみに曝露したマウス（比較例 1）と比較してより優秀な行動を示し（セボフルランとセボフルラン+水素の比較において、ニューマン-クルーズポストホックテスト、 $P < 0.001$ ）、コントロール

とほぼ同等のパフォーマンスをした（コントロールとセボフルラン+水素の比較において、ニューマン-クルーズポストホックテスト、 $P < 0.05$ ）。

これらの結果から、新生仔の全身麻酔薬曝露によって引き起こされる記憶障害の種類は長期記憶障害であり、かかる記憶障害を、水素が予防及び／又は軽減することが示された。

[0122] マウスは社交性を持った生物種であり、社会的相互作用挙動を示す (Kamsl er A et al., Mol Neurobiol 2004;29:167-178)。我々はこれまでに、新生仔の時にセボフルランに曝露されたマウスが、成体になった時に社会的行動欠陥を示すことを報告した (Satomoto M. et al., Anesthesiology 2009;110:628-637)。今回、新生児のセボフルラン曝露によって引き起こされる社会的行動欠陥が、水素ガスによって抑制可能か否かを調査するため、マウスの社交性試験を実施した（図7）。

[0123] 生物又は無生物をターゲットとした相互作用試験において、全てのグループは、無生物に関わるよりも相当に多くの時間を、生物との交流に費やした（*t*検定、全て $P < 0.001$ ）。しかしながら、コントロールと比較し、新生仔の時にセボフルランに曝露したマウスは（比較例1）、生物ターゲットと交流する時間が減少した。水素を同時投与されたマウスは（実施例1）、コントロールとほぼ同等の行動をし、セボフルランによって引き起こされる社会的行動欠陥が水素をセボフルランと同時投与することより予防できることが示された（図7A）。一元配置分散分析によって、これらの結果が裏付けられた（ $F = 6.12$ 、 $P = 0.004$ 、ニューマン-クルーズポストホックテスト、コントロールとセボフルランの比較では $P < 0.01$ 、コントロールとセボフルラン+水素の比較では $P < 0.05$ ）。嗅覚試験（一元配置分散分析、 $F = 0.50$ 、 $P = 0.71$ 、図7B）及び新規物試験（一元配置分散分析、 $F = 0.04$ 、 $P = 0.96$ 、図7C）において、セボフルランのみの投与（比較例1）とセボフルラン+水素投与（実施例1）のグループ間で、顕著な違いを検出できなかったことから、上記の社会的相互作用

の違いが、嗅覚の損傷、又は新規物に対する興味の喪失に起因していたとは言えない。そのため、水素は新生仔のセボフルラン曝露によって引き起こされる社会的行動欠陥を抑制し得るといえる。

産業上の利用可能性

[0124] 本発明により、全身麻酔薬と水素とを組み合わせる使用することにより、脳（例えば、発達期）の麻酔誘発性神経障害を予防及び／又は軽減することができる医薬を提供することが可能となった。さらに、本発明は、簡便で、副作用がなく、効率に作用し、さらに安価であることから、例えば、産科及び小児科医療において有効な医薬を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 全身麻酔薬と、水素を組み合わせてなる、ヒト又はヒト以外の動物用医薬。
- [請求項2] 全身麻酔薬と、水素とを併用で投与されることを特徴とする、ヒト又はヒト以外の動物の全身麻酔のための医薬。
- [請求項3] 麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するために使用される請求項1又は2に記載の医薬。
- [請求項4] 麻酔薬誘発性神経障害が、神経細胞アポトーシスに付随するものである請求項3に記載の医薬。
- [請求項5] 全身麻酔薬が、水素と併用されるように用いられることを特徴とする、全身麻酔薬を含有する麻酔薬誘発性神経障害の予防及び／又は軽減用医薬。
- [請求項6] 全身麻酔薬が吸入麻酔薬又は液状の静脈麻酔薬であり、水素が水素ガスである請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項7] 水素ガス濃度が、医薬中0.15～7% (v/v) である請求項6に記載の医薬。
- [請求項8] 胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者を対象とする請求項1～7のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項9] 全身麻酔薬が、亜酸化窒素、イソフルラン、エンフルラン、メトキシフルラン、セボフルラン、デスフルラン、ジエチルエーテル、プロポフォール及びミダゾラムからなる群より選ばれた1種以上の麻酔薬である請求項1～8のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項10] 麻酔薬誘発性神経障害が、神経運動障害、神経認知障害、精神認知障害又は自閉症である請求項3、5～9のいずれか1項に記載の医薬。
- [請求項11] 麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するために、全身麻酔薬と水素とを併用する医薬の調製方法。
- [請求項12] 麻酔薬誘発性神経障害が、神経細胞アポトーシスに付随するもので

あることを特徴とする請求項 1 1 に記載の調製方法。

[請求項13] 全身麻酔薬が吸入麻酔薬又は液状の静脈麻酔薬であり、水素が水素ガスである請求項 1 1 又は 1 2 に記載の調製方法。

[請求項14] 水素ガス濃度が、医薬中 0. 1 5 ~ 7 % (v / v) である請求項 1 3 に記載の調製方法。

[請求項15] 医薬が、胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者を対象とする請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の調製方法。

[請求項16] 水素と組み合わせて用いられる全身麻酔剤製造のための全身麻酔薬の使用。

[請求項17] 全身麻酔薬と水素とを組み合わせてなる医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用。

[請求項18] 麻酔薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減するための医薬の製造のための全身麻酔薬と水素の使用。

[請求項19] 麻酔薬誘発性神経障害が、神経細胞アポトーシスに付随するものである請求項 1 8 に記載の使用。

[請求項20] 全身麻酔薬が吸入麻酔薬又は液状の静脈麻酔薬であり、水素が水素ガスである請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

[請求項21] 水素ガス濃度が、医薬中 0. 1 5 ~ 7 % (v / v) である請求項 2 0 に記載の使用。

[請求項22] 胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者を対象とする請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

[請求項23] 全身麻酔薬が、亜酸化窒素、イソフルラン、エンフルラン、メトキシフルラン、セボフルラン、デスフルラン、ジエチルエーテル、プロポフォール及びミダゾラムからなる群より選ばれた 1 種以上の麻酔薬である請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の使用。

[請求項24] 麻酔薬誘発性神経障害が、神経運動障害、神経認知障害、精神認知障害又は自閉症である請求項 1 8 に記載の使用。

[請求項25] 全身麻酔薬と水素とを併用して対象に投与する工程を有する、麻酔

薬誘発性神経障害を予防及び／又は軽減する方法。

- [請求項26] 全身麻酔薬が吸入麻酔薬又は液状の静脈麻酔薬であり、水素が水素ガスである請求項25に記載の方法。
- [請求項27] 水素ガス濃度が、医薬中0.15～7% (v/v) である請求項26に記載の方法。
- [請求項28] 投与対象が、胎児、新生児、乳児、幼児、小児又は高齢者である請求項25に記載の方法。
- [請求項29] 全身麻酔薬が、亜酸化窒素、イソフルラン、エンフルラン、メトキシフルラン、セボフルラン、デスフルラン、ジエチルエーテル、プロポフォール及びミダゾラムからなる群より選ばれた1種以上の麻酔薬である請求項25に記載の方法。
- [請求項30] 麻酔薬誘発性神経障害が、神経運動障害、神経認知障害、精神認知障害又は自閉症である請求項25に記載の方法。
- [請求項31] 麻酔薬誘発性神経障害が、神経細胞アポトーシスに付随するものである請求項25に記載の方法。