

【総 説】

水素分子医学の現状と展望

大澤 郁朗

東京都健康長寿医療センター研究所・老化制御研究チーム・環境老化

要約

この4年間に多様な疾患に対する水素分子 (H_2) の効果が報告されてきた。 H_2 はヒドロキシルラジカルなど毒性の高いラジカルを選択的に還元する。動物モデルにおける水素ガスの吸引は、脳、心臓、肝臓の虚血再灌流 (I/R) 障害を抑制し、心臓や小腸の移植後障害を軽減した。水素溶解点眼薬は網膜のI/R障害を抑制し、水素飽和生理食塩水の静注は心臓、小腸、腎臓のI/R障害を抑制した。さらに H_2 を高濃度に含む水 (水素水) を動物モデルに飲用させたところ、ストレスによる認知機能低下、薬物によるドパミン神経細胞の変性、シスプラチンの腎毒性、慢性移植腎症がそれぞれ改善された。水素水の臨床研究ではLDLと酸化ストレスが抑制されている。また、 H_2 を添加した腎透析の臨床研究では血圧が改善された。体内で容易に拡散し、人に対する安全性も高い H_2 は、酸化ストレスや炎症に関連する多くの疾患で新しい治療法となることが期待される。

キーワード: animal model, clinical trial, gas therapy, hydrogen molecule, oxidative stress

1. はじめに

世界規模での急速な超高齢社会化により、健康長寿の為の疾患予防と治療に関する簡便で効果的な手法の開発が喫緊の課題となっている。筆者らは、2007年に水素分子 (H_2) が毒性の高い活性酸素種/ラジカルを選択的に還元する抗酸化物質として、酸化ストレスから細胞を防御し、脳における虚血・再灌流障害を抑制することを報告した[1]。それ以降、 H_2 を用いた研究は急速に進展し、治療を目的とした医療用ガス研究の中でも最もホットな研究対象となっている。これは、生体において安全性が高く、安価でしかも容易に入手でき、多様な方法で体内に送り込むことができるという H_2 の特色による。

H_2 は常温で気体として存在する無色無味無臭のもっとも軽い可燃性ガスで、地球上にはごく微量しか存在しない。大気中の H_2 濃度は1 ppm以下である。また、酸化還元酵素であるヒドロゲナーゼを持たない高等生物において、 H_2 は生体でなんら反応することの無い不活ガスとして扱われてきた。この為、 H_2 の生体における機能を調べた研究は極めて少ないものであった。

本稿では、この4年ほどの間に60本以上の研究論文が発表され、現在も続々と新しい知見が報告されている水素分子研究の現状を紹介し、今後の研究の展望を述べる。

2. 抗酸化物質としての H_2 の特質

1) 最小気体による活性酸素種/ラジカルとの選択的反応

放射線化学の分野では、水の放射線分解過程で生じるヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) が H_2 によって還元されることが知られている[2]。これは、 $\cdot OH$ がほとんどの無機および有機化合物と非特異的に反応する性質があり、 H_2 もその例外ではない為である。 $\cdot OH$ は生体内でもFenton反応等により恒常的に発生している活性酸素種/ラジカルである。しかし、 $\cdot OH$ を効果的に無毒化する機構が生体内には無く、核酸、蛋白、脂質等あらゆる成分を変性することで、高度な細胞傷害性を示す。一方、 H_2 は*in vitro*の系でスーパーオキシド、過酸化水素、一酸化窒素等の活性の低い安定な活性酸素種/ラジカルとは反応しなかった[1]。生体には、これらを酵素反応などにより無毒化する機構が備わっている。さらにこれらの活性酸素種/ラジカルはシグナル伝達や免疫機構において必要な役割を担っている。この為、過剰な活性酸素種/ラジカルの消去は副作用を伴うことになる。実際にビタミンEなどの抗酸化サプリメントの過剰投与は人の寿命を縮める可能性が指摘されている[3]。 H_2 は、最も細胞傷害性の高い $\cdot OH$ 等の活性酸素種/ラジカルを還元するが、必要な活性酸素種/ラジカルまでも還元することが無い為安全性は高いと考えることができる (図)。

H_2 のもう一つの重要な特徴は、密度の小さな気体であり拡散速度が非常に大きい点である。高分子の間をすり抜け、細孔・薄膜等を容易に透過する。生体成分に対しては水溶性、脂溶性を問わずに拡散することから、あらゆる臓器とそれを構成する細胞の中にまで容易にしかも素早く到達することができる。従って、ミトコンドリア

連絡先: 〒173-0015

東京都板橋区栄町35-2

Tel: 03-3964-3241 ex. 3044

Fax: 03-3579-4776

E-mail: iohsawa@tmig.or.jp

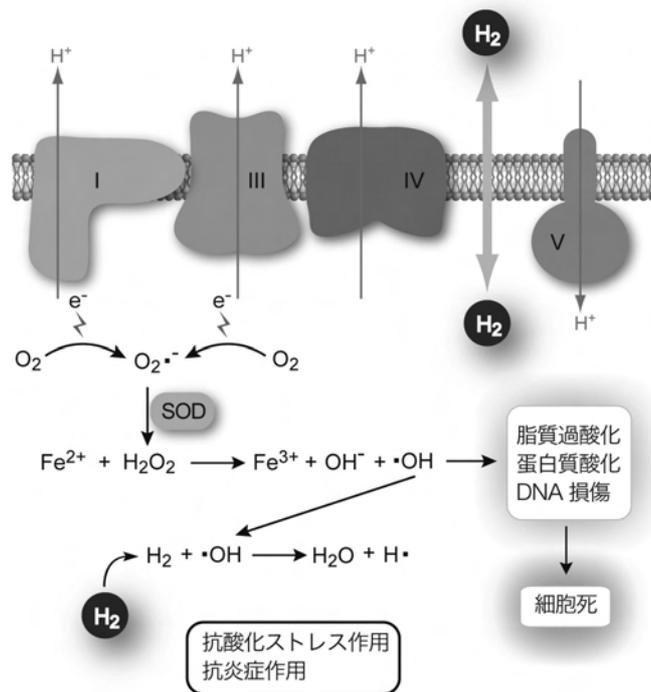


図 ラジカルスカベンジャーとしての水素分子

活性酸素種／ラジカルの主要な産生源であるミトコンドリアでは、呼吸鎖IとIIIから電子がリークし、スーパーオキシドが生じる。SODはこれを過酸化水素に変換するが、Fe²⁺やCu⁺などが存在すると過酸化水素から・OHが生じる。・OHは多様な分子と非特異的に反応し、強い細胞障害性を示す。一方、弱い還元力を持つ水素分子は最小の分子として、細胞外からオルガネラ内まで容易に拡散する。水素分子は生体内分子とほとんど反応することはないが、・OHについてはこれを還元して無毒化する。その為、水素分子によって酸化ストレスや炎症が抑制できるものと考えられる。

等の活性酸素種／ラジカルの発生源で直接作用することが可能である。

人の体内にはH₂が常に一定量存在する。未吸収の炭水化物が大腸に到達すると、腸内細菌群が直ちにこれを分解・代謝し、酸化還元酵素であるヒドロゲナーゼによってH₂が発生する為である。発生したH₂の一部は血流に乗って肺に到達し、ガス交換されることで呼吸として排出される[4]。人での呼吸ガス中に含まれるH₂濃度は個人差が大きいもののおよそ数10 ppm程度である。後述するように、この腸内細菌によるH₂が酸化ストレスを抑制する可能性が示され、さらに体内でのH₂の存在もまたH₂自体の安全性を担保するものである。一方、ビタミン類のような抗酸化物質の大半は食品として常時摂取されているのに対し、人が外部から高濃度H₂を摂取する可能性はほとんどない。従って、高濃度H₂の投与は生体における酸化ストレス防御のまったく新しい手段であると言える。

2) 酸化ストレスによる細胞死の抑制

最初に筆者らは、H₂による酸化ストレス抑制効果を細胞レベルで検証した[1]。常圧での水に対するH₂の溶解度は約0.8 mMである。通常の気体と同じくバブリング等の操作でH₂を培地に溶存させることができるが、培地中の酸素がヘンリーの法則に従って低下する為にそれぞれの溶存ガス濃度を厳密にコントロールしなければならない。また、H₂が容易に拡散する為、外気との接触を避けるように培養器をシールするなどの工夫も必要となる。

Fenton反応により発生させた・OHで神経系のモデルであるPC12細胞に傷害を与える系でも、呼吸鎖複合体IIIの阻害剤であるアンチマイシンAを投与することで生じる酸化ストレスによってPC12細胞に傷害を与える系でも、H₂はそれぞれの細胞死を抑制した[1]。効果は濃度依存的で25 μMでも有意であった。このとき、アンチマイシンA投与30分後に・OHの発生とこれに伴うミトコンドリア膜電位の低下が、また1日後に核酸の酸化損傷マーカーである8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) および脂質の過酸化を示す4-ヒドロキシノネナル (4-HNE) の蓄積がH₂により抑制された。聴覚上皮の組織片培養を用いたアンチマイシンAによる有毛細胞の酸化ストレス損傷でも同様の結果が報告されている[5]。

また、H₂は放射線による培養細胞死を抑制した[6]。放射線は、・OHなどの活性酸素種／ラジカルを発生させ、酸化ストレスにより細胞を損傷する。この時、酸化ストレス抑制系のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性とグルタチオン (GSH) の放射線による低下がH₂により抑制されていた。

3. H₂による虚血再灌流障害の抑制と臓器移植

1) 水素ガスの吸引による虚血再灌流障害抑制

H₂の医療への応用に向けた研究として、最初に成果を挙げたのは虚血再灌流障害の治療である。虚血により低酸素、低栄養状態に置かれた組織で再び血流が再開されると多様なメカニズムで活性酸素種／ラジカルが発生

する。この時生じる・OHが細胞死を誘導する中心的な役割を担っていると考えられている[7]。

筆者らは、最初にラットの軽度大脳動脈閉塞による90分間の局所的虚血と再灌流後の30分間の計120分間、麻酔ガスに1から4%の水素ガスを混合して吸引させた[1]。この時、動脈血のH₂濃度は数10μMに達する。1日後に脳をスライスして梗塞部位を調べたところ、水素ガスを吸引させることで梗塞体積が顕著に減少していた。また、1週間後の運動障害が水素ガスの吸引で改善され、梗塞部位での4-HNEと8-OHdGの蓄積を指標とした酸化ストレスの増加とミクログリアの活性化を指標とする炎症の増大のいずれもが水素ガスの吸引で抑制されていた。さらに水素ガスの吸引時間を変えることで、虚血から再灌流に切り替わる時点でH₂が存在していることが障害抑制効果を発揮する為に必要であることが判明した。再灌流直後、大量に・OHが発生する時点で、これを還元するH₂が十分に存在することで障害が抑制されるのであろう。新生児ラットの脳虚血後、ボックス内で2%水素ガスを30分から2時間に渡り吸引させる系においても、神経細胞死が抑制されて梗塞領域が縮小することが報告されている[8]。

同様に水素ガスを吸引させることで、肝臓及び心臓でも虚血再灌流障害を抑制することが可能であった。マウス肝臓の門脈三分岐を結紮することで一部を90分間虚血し、180分間再灌流後に肝臓を摘出して障害を評価する系で、1から4%の水素ガスを再灌流の10分前から摘出直前まで吸引させた。その結果、H₂の投与は肝組織の損傷と血中ALT濃度の上昇を抑制した[9]。この研究では、不活化気体のヘリウムをコントロールとして用いても効果がないことを確認している。さらにラットの心臓では、Langendorf灌流モデルで灌流液を窒素ガスおよび水素ガスによりそれぞれ飽和することで無酸素状態に40分間置き、心機能の回復を比較した。この時、水素ガスでは顕著な回復が見られた[10]。冠動脈を30分間結紮した虚血再灌流においても水素ガスの吸引は心筋の梗塞体積を抑制し、心機能が保護された。

2) 他のH₂投与方法による虚血再灌流障害抑制

高眼圧緑内障のモデルとして、眼圧を上げることで眼底の血流を止め(虚血)、再び眼圧を下げて血流を再開する(再灌流)系がある。この系で、筆者らはH₂の大きな拡散速度と浸透力を利用して、H₂を飽和させた生理食塩水(水素溶存点眼薬)の点眼を試みた[11]。ラットに点眼すると硝子体のH₂濃度が速やかに上昇して飽和の約20%に達し、H₂の眼球内への拡散が確認された。このH₂は虚血再灌流直後の網膜における・OH増大を抑制し、網膜神経細胞のアポトーシスと網膜の退縮を抑制することができた。

また、Sunらのグループは新生児ラットの脳虚血直後に5 ml/kgの水素飽和生理食塩水を腹腔内投与することで、水素ガスの吸引と同様に梗塞領域が縮小されることを報告している[12]。さらに彼らは、虚血前5から30分間に5 ml/kgの水素飽和生理食塩水を静注することで、

ラットでの虚血再灌流による心臓[13]、肺[14]、小腸[15, 16]等の障害が抑制できることを示した。他のグループからも水素飽和生理食塩水を1 ml/kg/hの速度で点滴することにより、腎臓の虚血再灌流障害がラットで抑制できることが報告されている[17]。

3) 臓器移植へのH₂の適用

臓器移植では必ず虚血再灌流のプロセスを通ることになる。そこで、Nakaoらのグループを中心にH₂の移植への適用が検討されている。最初に彼らはラットの小腸移植モデルを用いて、ドナーとレシピエントの両方に2%の水素ガスを吸引させることで移植後小腸の機能低下が抑制できることを示した[18]。この時、酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒド(MDA)の移植後小腸における蓄積が減少し、移植に伴い増加するCCL2、IL-1β、IL-6、TNF-αなどの炎症メディエーターの発現が抑制されていた。さらに心臓移植モデルでは一酸化炭素との相乗効果があることを示し、併用することで低温虚血再灌流障害を効果的に減らすことができる可能性が示された[19]。また、肺移植モデルでも2%の窒素やヘリウムには効果が無いが、2%水素ガスには組織損傷阻害効果があることが明示されている[20]。この系ではMDAや4-HNEの抑制と同時にBcl-2及びBcl-x_Lの発現が増加しており、H₂による細胞死抑制機構を考察する上で興味深い。

4. 高濃度水素水の効果

1) メタボリックシンドロームと水素水

H₂を最も簡単に投与する方法は、水素を高濃度に溶かした水(水素水)を飲用することである。摂取したH₂は体内に取り込まれ、大半は呼気ガスとして体外に排出される。人での呼気ガス中水素濃度のピークは15から30分程度で、1時間後にはほぼ元に戻る。

筆者らはその効果を調べる為、6ヶ月程度でアテローム性動脈硬化症を示すApoE欠損マウスに水素水を飲ませた[21]。アテローム動脈硬化の形成はLDLコレステロールの酸化とこれをマクロファージが取り込む傷害反応によると考えられている[22]。水素水は大動脈でのアテローム形成を抑制した。この時、4-HNEの蓄積が減少しており、水素水による酸化ストレスの抑制が示された。

Kajiyamaらは、水素水を糖尿病患者に1日900 ml、8週間連続投与し、その効果を調べた。H₂の効果を臨床レベルで調べた最初の論文である[23]。水素水の摂取は脂質、糖代謝に好影響をもたらし、インスリン抵抗性関連疾患の発症予防及び進展抑制に有益である可能性が示唆された。また、Nakaoらは水に金属マグネシウムを投入することで水素ガスを発生させ、この水素水をメタボリックシンドローム予備軍の被験者に8週間投与した[24]。その結果、尿中のSOD活性増加とチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)の低下が認められ、酸化ストレスが抑制された。

2) 水素水による脳神経機能の障害改善

身体への物理的ストレスは酸化ストレスや炎症を引き起こすことで脳の高次機能に影響を与える。実際に拘束ストレスを長期間与えたマウスは認知記憶障害を示す。このマウスに水素水を与えると記憶障害が改善された[25]。また、Satoらは、ビタミンC 欠乏老化促進マウスに水素水を飲ませた後に脳スライスを作製して低酸素/再酸素負荷を与えた[26]。スーパーオキシド量を測定したところ、水素水投与群では減少傾向が見られた。これは、水素水投与により脳での酸化ストレスが減少したためであろう。また、老化促進マウス (SAMP8) に水素水を与えると認知記憶障害と海馬神経細胞の変性が抑制されることが報告されている[27]。この系でも血清中の抗酸化活性が上昇していた。

現在までに水素水の投与によって最も顕著な改善効果を示したのは、薬物を用いたパーキンソン病のモデル動物である。パーキンソン病の発症機序には、ミトコンドリアの機能異常とそれに伴う酸化ストレスの増大が深く関与している。6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA) をラット線条体に投与した系では、水素水によってドパミン作動性神経細胞死と行動異常が抑制された[28]。驚くべきことに6-OHDAによる処置3日後から水素水を与えても顕著な行動異常の抑制が認められた。また、メチルフェニルテトラヒドロピリジン (MPTP) をマウスに投与する系においても水素水は黒質ドパミン作動性神経細胞死を顕著に抑制した[29]。この系では飽和の1/20程度の濃度の水素水を与えても効果があることが示されており、必ずしも飽和濃度の水素水を大量に摂取しなくてもH₂の生理的効果を発揮するには十分である可能性がある。

上記に加え、水素水がモルモットの騒音暴露による難聴を抑制することが報告された[30]。難聴の要因としては、酸化ストレスによる有毛細胞と聴覚神経細胞の変性が挙げられる。

3) 腎機能と水素水

シスプラチンは最も高頻度で 사용되는抗癌剤の一つであるが、副作用として高い腎毒性が知られている。シスプラチン投与マウスを10日間、1%水素ガス下で飼育すると腎機能異常による生存率の低下を抑制できたが、水素水の投与でも同様の保護効果が認められた[31]。一方で、水素水はシスプラチンの抗がん作用を阻害しなかったことから、副作用抑制に向けた水素水の臨床応用の可能性が示された。ラットでもCTを用いたシスプラチン腎毒性の評価法を用いて、水素水の保護効果が検証されている[32]。

さらに水素水は、慢性移植腎症に対してもその抑制効果が報告されている[33]。腎臓を同種移植したラットでは、蛋白尿の増加とクレアチニンクリアランスの低下が進行し予後不良となる。水素水の摂取は炎症と酸化ストレスを抑制し、腎機能が改善され、生存率が上昇した。

4) 多彩な水素水の効果

Itohらは、水素水を投与したマウスにおける受身皮膚アナフィラキシーを指標としたI型アレルギーの抑制効果について報告している[34]。さらに好塩基球細胞をH₂存在下で培養すると抗原刺激による細胞内シグナル伝達全般が低下することから、H₂による活性酸素種/ラジカルの直接的な消去以外の経路がある可能性を論じている。この他、デキストランによる大腸炎、心臓の放射線障害、虚血再灌流による心-腎連関障害についてモデル動物を使った研究が成され、水素水の投与による病態の改善が報告されている[35-37]。

5. 腸内細菌とH₂

1) 腸内細菌による水素ガスの産生

高等生物の細胞がH₂を作り出すことは無い。従って、呼気中に出現する水素ガスは全て腸内細菌に由来する。水素産生菌としては嫌気性細菌である*Eubacterium*、*Clostridium*、*Bacteroides*及び*Fusobacterium*などがある。呼気中水素ガス濃度は、腸内細菌の異常増殖といった腸の状態を反映する試験法として用いられてきた。しかし、このH₂に生理機能があるとはまったく考えられてこなかった。

Suzukiらは、糖尿病の治療薬である α -グリコシダーゼ阻害剤に高血圧と心疾患の抑制効果があることから、その作用機序を考察する過程で副作用である腸内ガスの増加に着目した[38]。実際、 α -グリコシダーゼ阻害剤を投与すると呼気中水素ガス濃度が約30 ppm増加した。これは飽和水素水300 ml飲水後の呼気に排出される水素ガスのピーク値と同じオーダーである。この為、 α -グリコシダーゼ阻害剤の作用機序にH₂が関与しているという仮説が提唱されている。こうした観点から、牛乳やターメリックの摂取が呼気中水素ガス濃度を増加させることが報告されており興味深い[39, 40]。

2) 動物モデルによる検証

Kajiyaらは、腸内細菌が産生するH₂の生理的機能を検証する為にマウスの腸内細菌を殺し、H₂を産生できる大腸菌とできない大腸菌を再び感染させ、コンカナバリンAによる肝障害を比較した[41]。すると水素を産生する大腸菌を保持するマウスの肝障害は軽度なものとなり、水素水投与により肝障害を抑制した結果と同等であった。この論文は、腸内細菌がH₂を介して酸化ストレスを防御している可能性を明示している。

6. 多様なH₂の活用法

現在、H₂の応用は様々な形で広がりを見せている。透析における尿毒症の治療補助としてH₂の投与が試みられた[42]。この研究では、透析液にH₂を拡散させ、被験者の収縮期血圧が有意に減少することが示されている。また、高濃度のH₂を含む眼の洗浄液は、角膜アルカリ外傷の抗酸化治療に効果的であることがマウスモデルで報告された[43]。

水素ガスの吸引効果については、出生時仮死による神

経損傷の治癒に2.1%の水素ガスを含む呼気の投与が効果的であることが豚を用いた実験で示されている[44]。この系では既存の抗酸化剤による有効性が低く、水素ガスによる臨床応用が期待される。さらに、Xieらは、敗血症の抑制効果を報告している[45]。この研究では、腸管穿孔モデルマウスに2%の水素ガスを吸引させることで致死率が減少した。敗血症による臓器損傷には活性化マクロファージから放出されるHMGB1の関与が知られているが、H₂は酸化ストレスと共にHMGB1の産生も抑制している。さらに彼らは、ゼイモザンによる一般的な炎症モデルにおいて水素ガスの吸引が多臓器不全による生存率の低下を抑制することを報告しており[46]、幅広い抗炎症治療に水素ガスの吸引治療が有効である可能性が示唆されており興味深い。

また、水素飽和生理食塩水の静注または腹腔内投与により、ラットのアルギニンによる急性膵炎が緩和されること、マウス腸管内皮の放射線傷害が抑制されること、βアミロイドの側脳室内投与による認知記憶障害の抑制効果などが報告されている[47-49]。

7. おわりに

H₂を医学に応用しようとした先駆的研究が1975年に報告されている。この論文では、扁平上皮がんを有するマウスを2.5%の酸素と97.5%の水素からなる8気圧のガス室に2週間入れ、がんが縮小傾向となることを示している[50]。この研究とは独立に、2001年には0.7 MPaの水素ガスを封入した8気圧のガス室に感染症による肝障害のマウスを入れる系で、抗炎症効果があることも報告されている[51]。しかし、これらの研究はほとんど注目されることは無かった。それは、どちらも高圧の水素ガスによる実験で、容易に再現できないことが一因であろう。

将来のH₂の応用としては、宇宙空間での利用が考えられる[52]。航空機乗務員では放射線による白内障やがんのリスクが高く[53, 54]、また、宇宙線のHZE粒子による中枢神経系の変性が報告されている[55]。従って、適切な放射線防御法無くして長期の宇宙空間滞在は困難である。放射線障害の主因の一つは・OHによる細胞傷害であり、H₂がラジカールスカベンジャーとして働くことで、宇宙での長期滞在が可能になるかもしれない。

現時点でのH₂を用いた研究は、本稿で紹介したように大半が動物モデルである。臨床研究とH₂の作用機序に関する分子レベルの研究はまだわずかしか無い。H₂に極めて多様な疾患治療効果があることは既に疑う余地もない。しかし、既存の治療法を上回る効果を発揮するものでなければ実用化は難しい。H₂が最も効果を発揮する疾患は何か、その為の適切な投与方法と投与量は何かを明確にしていく必要がある。そうでないと、臨床研究をしても曖昧な結果を量産することになる。また、作用機序のさらなる解明が必要である。特に水素水として投与した場合のH₂量は極めて少なく、脳等の臓器で検出することは困難である。しかし、水素水は中枢神経系で多様な疾患抑制作用を示しており、H₂による活性酸素種／ラ

ジカルの還元だけでは説明が困難である。Kawasakiらは、多能性の骨髄ストローマ細胞をH₂存在下で培養すると、酸化ストレスの減少を伴わない細胞老化の抑制が見られることを報告しており興味深い[56]。

健康長寿に向けての水素分子医学の可能性は大きいが、未解明の点が多々ある。一方で水素水は食品として容易に入手可能であり、すでに愛飲している人も多い。筆者らは、安全性も含めてさらなる研究を進めている。

引用文献

1. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13: 688-694, 2007.
2. Schwarz HA. Determination of some rate constants for the radical processes in the radiation chemistry of water. *J Phys Chem* 66: 255-262, 1962.
3. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297: 842-857, 2007.
4. Perman JA, Modler S, Barr RG et al. Fasting breath hydrogen concentration: normal values and clinical application. *Gastroenterology* 87: 1358-1363, 1984.
5. Kikkawa YS, Nakagawa T, Horie RT et al. Hydrogen protects auditory hair cells from free radicals. *Neuroreport* 20: 689-694, 2009.
6. Qian LR, li BL, Cao F et al. Hydrogen-rich PBS protects cultured human cells from ionizing radiation-induced cellular damage. *Nuclear Technology & Radiation Protection* 25: 23-29, 2010.
7. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129, 1996.
8. Cai JM, Kang ZM, Liu W et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci lett* 441: 167-172, 2008.
9. Fukuda KI, Asoh S, Ishikawa M et al. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 670-674, 2007.
10. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 30-35, 2008.
11. Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T et al. Protection of the retina by rapid diffusion of

- hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:487-492, 2010.
12. Cai JM, Kang ZM, Liu K et al. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Res* 1256: 129-137, 2009.
 13. Sun Q, Kang ZM, Cai JM et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 234: 1212-1219, 2009.
 14. Mao YF, Zheng XF, Cai JM et al. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 602-605, 2009.
 15. Zheng XF, Mao YF, Cai JM et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Free Radical Res* 43: 478-484, 2009.
 16. Chen H, Sun YP, Hu PF et al. The effects of hydrogen-rich saline on the contractile and structural changes of intestine induced by ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res*, in press. doi:10.1016/j.jss.2009.07.045
 17. Shingu C, Koga H, Hagiwara S et al. Hydrogen-rich saline solution attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *J Anesth* 24: 569-574, 2010.
 18. Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 8: 2015-2024, 2008.
 19. Nakao A, Kaczorowski DJ, Wang Y et al. Amelioration of rat cardiac cold ischemia/reperfusion injury with inhaled hydrogen or carbon monoxide, or both. *J Heart Lung Transplant* 29: 544-553, 2010.
 20. Kawamura T, Huang CS, Tochigi N et al. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation* 90: 1344-1351, 2010.
 21. Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K et al. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 1195-1198, 2008.
 22. Saremi A, Arora R. Vitamin E and cardiovascular disease. *Am J Ther* 17: e56-e65, 2010.
 23. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M et al. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 28: 137-143, 2008.
 24. Nakao A, Toyoda Y, Sharma P et al. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome-an open label pilot study. *J Clin Biochem Nutr* 46: 140-149, 2010.
 25. Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T et al. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 34: 501-508, 2009.
 26. Sato Y, Kajiyama S, Amano A et al. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 346-350, 2008.
 27. Matchett GA, Fathali N, Hasegawa Y et al. Hydrogen gas is ineffective in moderate and severe neonatal hypoxia-ischemia rat models. *Brain Res* 1259: 90-97, 2009.
 28. Fu Y, Ito M, Fujita Y et al. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 453: 81-85, 2009.
 29. Fujita K, Seike T, Yutsudo N et al. Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*. 4: e7247, 2009.
 30. Lin Y, Kashio A, Sakamoto T et al. Hydrogen in drinking water attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Neurosci Lett* 487: 12-16, 2011.
 31. Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I et al. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 64: 753-761, 2009.
 32. Kitamura A, Kobayashi S, Matsushita T et al. Experimental verification of protective effect of hydrogen-rich water against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats using dynamic contrast-enhanced CT. *Br J Radiol* 83: 509-514, 2010.
 33. Cardinal JS, Zhan J, Wang Y et al. Oral hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rats. *Kidney Int* 77: 101-109, 2010.
 34. Itoh T, Fujita Y, Ito M et al. Molecular hydro-

- gen suppresses Fc ϵ RI-mediated signal transduction and prevents degranulation of mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 389: 651-656, 2009.
35. Kajiya M, Silva MJ, Sato K et al. Hydrogen mediates suppression of colon inflammation induced by dextran sodium sulfate. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 11-15, 2009.
 36. Qian L, Cao F, Cui J et al. The potential cardioprotective effects of hydrogen in irradiated mice. *J Radiat Res (Tokyo)* 51: 741-747, 2010.
 37. Zhu WJ, Nakayama M, Mori T et al. Intake of water with high levels of dissolved hydrogen (H₂) suppresses ischemia-induced cardiorenal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Nephrol Dial Transplant*, in press. doi:10.1093/ndt/gfq727
 38. Suzuki Y, Sano M, Hayashida K et al. Are the effects of α -glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract? *FEBS Lett* 583: 2157-2159, 2009.
 39. Shimouchi A, Nose K, Yamaguchi M et al. Breath hydrogen produced by ingestion of commercial hydrogen water and milk. *Biomarker Insights* 4: 27-32, 2009.
 40. Shimouchi A, Nose K, Takaoka M et al. Effect of dietary turmeric on breath hydrogen. *Dig Dis Sci* 54: 1725-1729, 2009.
 41. Kajiya M, Sato K, Silva MJ et al. Hydrogen from intestinal bacteria is protective for Concanavalin A-induced hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 316-321, 2009.
 42. Nakayama M, Nakano H, Hamada H et al. A novel bioactive haemodialysis system using dissolved dihydrogen (H₂) produced by water electrolysis: a clinical trial. *Nephrol Dial Transplant* 25: 3026-3033, 2010.
 43. Kubota M, Shimmura S, Kubota S et al. Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press. doi:10.1167/iops.10-6167
 44. Domoki F, Oláh O, Zimmermann A et al. Hydrogen is neuroprotective and preserves cerebrovascular reactivity in asphyxiated newborn pigs. *Pediatr Res* 68: 387-392, 2010.
 45. Xie K, Yu Y, Pei Y et al. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release. *Shock* 34: 90-97, 2010.
 46. Xie K, Yu Y, Zhang Z et al. Hydrogen gas improves survival rate and organ damage in zymosan-induced generalized inflammation model. *Shock* 34: 495-501, 2010.
 47. Qian L, Cao F, Cui J et al. Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice. *Free Radical Res* 44: 275-282, 2010.
 48. Chen H, Sun YP, Li Y et al. Hydrogen-rich saline ameliorates the severity of L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 308-313, 2010.
 49. Li J, Wang C, Zhang JH et al. Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. *Brain Res* 1328: 152-161, 2010.
 50. Dole M, Wilson FR, Fife WP. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. *Science* 190: 152-154, 1975.
 51. Gharib B, Hanna S, Abdallahi OM et al. Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation. *C R Acad Sci III*, 324: 719-724, 2001.
 52. Schoenfeld MP, Ansari RR, Zakrajsek JF et al. Hydrogen therapy may reduce the risks related to radiation-induced oxidative stress in space flight. *Med Hypotheses* 76: 117-118, 2010.
 53. Jones JA, McCarten M, Manuel K et al. Cataract formation mechanisms and risk in aviation and space crews. *Aviat Space Environ Med* 78: A56-66, 2007.
 54. Barr YR, Bacal K, Jones JA et al. Breast cancer and spaceflight: risk and management. *Aviat Space Environ Med* 78: A26-37, 2007.
 55. Koike Y, Frey MA, Sahiar F et al. Effects of HZE particle on the nigrostriatal dopaminergic system in a future Mars mission. *Acta Astronaut* 56: 367-378, 2005.
 56. Kawasaki H, Guan J, Tamama K. Hydrogen gas treatment prolongs replicative lifespan of bone marrow multipotential stromal cells in vitro while preserving differentiation and paracrine potentials. *Biochem Biophys Res Commun* 397: 608-613, 2010.

Molecular Hydrogen Medicine: Current Status and Future Challenges

Ikuroh Ohsawa

Environmental Gerontology

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

In these four years, hydrogen molecule (H_2) has been shown to exert beneficial effects in animal models and clinical trials of many diseases. We have previously reported that H_2 selectively reduces hydroxyl radical and peroxynitrite without affecting other reactive oxygen species. Inhalation of hydrogen gas in rodents has been demonstrated to limit the infarct volume of the brain, heart and liver by reducing ischemia/reperfusion (I/R) injury and ameliorate heart and intestinal transplant injuries through its antioxidative actions. H_2 -loaded eye drops have also protected retinal I/R injury, intravenous infusion of hydrogen-rich saline reduced heart, intestinal and kidney I/R injury, and adding H_2 to hemodialysis solutions improved blood pressure control with reduction of inflammatory reactions in a clinical trial. Moreover, consumption of water with dissolved H_2 (hydrogen water) by rodents prevents stress-induced cognitive decline, neurotoxin-induced degeneration of dopaminergic neurons, cisplatin-induced nephrotoxicity, chronic allograft nephropathy, and immediate-type allergic reaction. Clinical trials demonstrated a decrease in low-density lipoprotein and oxidative stress after drinking hydrogen water. H_2 has the potential to easily diffuse into organs and no known toxic effects on the human body. Thus, treatment with H_2 has several potential advantages over current therapies used for oxidative stress- and inflammation-related diseases.

Key words: animal model, clinical trial, gas therapy, hydrogen molecule, oxidative stress