

分子状水素の臨床応用に向けた研究の現状について

Recent progress in clinical application of molecular hydrogen

市原正智 祖父江沙矢加 竹内環

Masatoshi ICHIHARA Sayaka SOBUE Tamaki TAKEUCHI

要 旨

分子状水素は日本医大の、太田らによって活性酸素種の中のヒドロキシラジカルを特異的に消去する新規抗酸化剤として2年ほど前にNature Medicine誌でその臨床応用の可能性について報告がされた。多くのヒト疾患の発症には活性酸素種が関与していると言われるが、分子状水素はその分子選択性と組織浸透性より既存の抗酸化剤では効果が無いとされた疾患にも治療効果が期待される。本総説では太田らのNature Medicineへの報告以降の分子状水素研究の展開について自験例も交えて報告する。生体への水素の投与には気体として吸入する方法と、水に飽和濃度まで溶かして水素水として投与する方法がある。投与の簡便さより最近の水素水としての分子状水素の投与による臨床効果の検討が多い。分子状水素の臨床応用に向けた研究は日本発の新規国産技術として期待される。分子状水素による健康維持、病気の予防・治療に向けての試みが今後加速されるものと予想される。

キーワード： 分子状水素、水素水、活性酸素、酸化ストレス

1. はじめに

ヒトの疾患の多くが酸化ストレスの乱れより生じる活性酸素種により引き起こされることが明らかにさえるなかアスコルビン酸、ビタミン E、ポリフェノールなどの抗酸化物質による疾患予防効果があるかどうかは研究者の関心が高いテーマである。しかし大規模なコントロールスタディよりこうした抗酸化物質の臨床効果はほとんど見られないとされる報告が多い¹⁾。分子状水素は日本医大の、太田らによって活性酸素種の中のヒドロキシラジカルを特異的に消去する新規抗酸化剤としてNature Medicineに報告された²⁾。彼らは循環遮断に伴う脳虚血モデルを

用いて、吸気中に2%程度水素を添加することで虚血により発生するヒドロキシラジカルが消去され脳虚血障害として観察される面積に著しい縮小を認めたと報告している。分子状水素は分子量が極めて小さいことによる組織浸透性と、ヒドロキシラジカルのみを消去するという選択性より新規抗酸化剤としてアスコルビン酸、ビタミン E では効果が得られないとされる疾患に関しても何らかの臨床効果が得られるのではないかと期待されている³⁾。本総説では太田らのNature Medicineへの報告以降の分子状水素研究の展開について自験例を交えて概説する。

II. 最近の研究紹介

生体への分子状水素の投与は第1報の太田らの報告では水素は2%の濃度で空気に混入させて吸入気体として投与された。一方その後の検討により分子状水素を飽和濃度まで溶存させた水素水投与することで、生体内への水素投与を行った場合でも同程度の効果が得られることが示されてきている。取扱の簡便さから後述の第一回水素研究会で報告された最近の研究の多くは水素水を用いたものであった。以下に最近の5つの他施設における研究成果を要約する。

1) 水素ガスをもちいた心筋梗塞ラットモデルにおける梗塞サイズの縮小効果⁴⁾

Hayashidaらはまず摘出したラット心臓を水素ガス添加または窒素添加のいずれかの環境下で虚血状態におき、その後虚血を解除した後の心機能の変化を比較した。虚血時の水素ガス環境は、再灌流時の左心機能において有意な改善が観察された。ラットに実際に2%の濃度の気体で添加された分子状水素は、心筋においても水素濃度の上昇が観察された。さらにラットの冠動脈を圧迫して心筋虚血を誘発しその後の梗塞サイズを組織学的に検討された。2%の濃度で添加された水素加空気の吸入下の条件では、水素の非添加と比較すると梗塞サイズは42%程度に縮小していたことが観察され、分子状水素による心筋梗塞サイズの縮小効果が観察された。この報告からは、心筋梗塞急性期の患者管理として吸気中に水素を混入することで心筋保護を期待する新規治療戦略が期待される。

2) 水素の吸入による小腸移植の際に移植片

に引き起こされる酸化ストレスを軽減と組織障害の抑制効果⁵⁾

臓器移植に際して臓器を摘出し移植するまでの虚血再灌流傷害の対応が極めて重要となる。小腸移植では虚血再灌流傷害により小腸の運動障害、炎症、臓器不全が度々引き起こされる。Buchholzらはドナーとレシピエントのラットに2%水素加空気または非水素加空気を処置の1時間前より吸入させて小腸の移植処置を行い、この両者と小腸移植処置を行わず空気または水素加空気の吸入のみを行ったラットの4者で比較を行った。ラットに2%水素加空気を吸入させることで、移植処置を行わない場合に類似した程度の運動性、収縮性が維持された。また炎症に関連したサイトカインの発現も、水素を吸入しないコントロール群と比較すると半分から3分の1程度の減少が見られた。さらに病理組織像でも水素投与群は正常に近い形態が維持され、多臓器不全と関連する肺の変化も水素投与群ではほとんど認められなかった。以上より移植操作中のドナーとレシピエントへの水素の投与は移植成績のさらなる改善に寄与することが予想される結果であった。

3) マウスの慢性的身体拘束ストレスにより誘発される学習能力低下に対する水素の予防効果⁶⁾

この研究では分子状水素を水に溶存させた水素水の自由摂取により水素を体内に取り込むことで、ストレスに伴い誘発される認知機能の低下が予防されることを示している。Nagataらは、マウスに長時間、身体拘束のストレスを与えると脳内で酸化ストレスのマーカーであるマロ

ンジアルデヒドなどが高まり、学習能力と記憶力の認知機能が低下することを確認した。実験期間中に水素水を自由摂取させると、酸化ストレスマーカーの上昇が抑えられ、認知機能障害の低下も抑制された。一方ストレスを与えない場合は水素水を摂取させても認知能力が高まることは無かった。さらに拘束ストレスを与えると海馬・歯状回領域の神経前駆細胞の増殖が抑えられたが、水素水を摂取させた群では増殖抑制を認めなかった。水素水の摂取により、生体内には分子状水素が十分量取り込まれその結果脳内の酸化ストレスが緩和されことで、認知機能障害およびその他の神経障害も予防することに水素水が有効である可能性を示している。

4) 水素水の投与による apolipoprotein E ノックアウトマウスにおいて生じる動脈硬化の抑制⁷⁾

この報告でも水素水を生体内への水素の供給源として用いている。apolipoprotein E ノックアウトマウスでは血清リポタンパク質の除去が障害され動脈硬化が促進される。Ohsawa らは水素水を 2～6 ヶ月投与することで Oil-Red-O 染色で示される動脈硬化病変が著明に減少することを示した。水素水の投与により動脈硬化の進行が抑制され、心筋梗塞、脳血管障害の進展が予防される可能性を示した報告である。

5) 2 型糖尿病および耐糖能異常患者における水素水の糖、脂質代謝改善効果⁸⁾

この報告では実際に水素水をヒトに投与し、一部の糖尿病患者で耐糖能の改善結果が得られた結果を示している。ヒト

を対象とした臨床研究はこの報告が第一報である。Kajiyama らは 2 型糖尿病の患者 30 名および耐糖能異常患者 6 名に対して 2 重盲検試験を行い 8 週間にわたり連日 900ml の水素水の投与を行いコントロール群と水素水投与群とを比較した。その結果 LDL コレステロールに 15.5% などの低下が観察された。また 75g GTT を行った 6 人中 4 人で結果の改善が得られたとしている。これにより水素水が糖尿病患者のインシュリン抵抗性に何らかの役割を持つと結論している。

この他にも肝虚血⁹⁾、新生児低酸素虚血¹⁰⁾、シスプラチンによる腎障害¹¹⁾などの病態の緩和に分子状水素投与が役に立つという報告があり多彩な分野での臨床効果が得られつつあるのが現状である。

III. 自験例の報告

脂肪肝は検診等で行われる腹部超音波検査で指摘されることが多い検査異常である。脂肪肝は飲酒者では多く観察されるが、非飲酒者においてもメタボリックシンドロームの増加とともに観察されることが多い。非飲酒者の脂肪肝の一部には肝硬変、肝癌まで進行するものがあり非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) として最近注目されている。NASH の病勢の進行には活性酸素種が関与するとされ、水素が活性酸素のヒドロキシラジカルを抑制するという事実よりその病勢の予防効果が期待される。二次性糖尿病を自然発症するマウスとして知られる KK Ay にメチオニン・コリン欠乏食を投与すると著明な脂肪肝が形成される。我々はこの方法で形

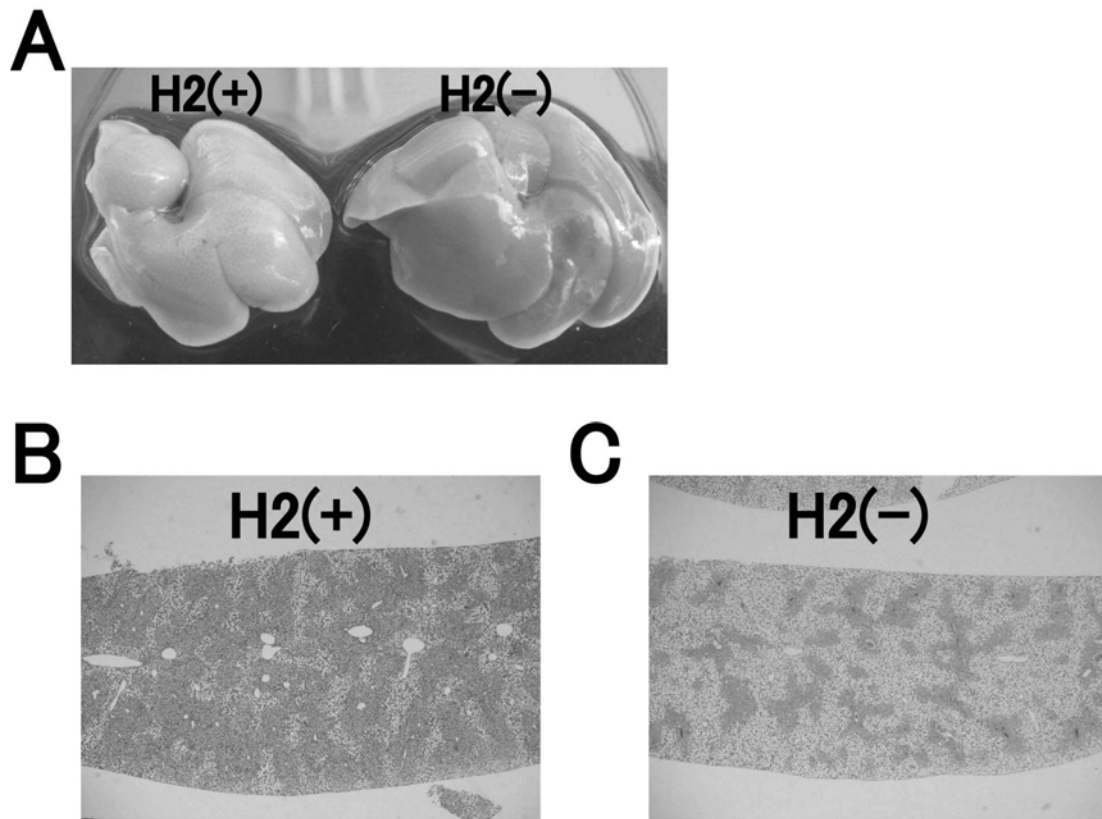


図1 脂肪肝誘発モデルにおける水素水の効果

(A) KK Ay マウスにメチオニン・コリン欠乏食を投与し脂肪肝を作成した。同時に水素水また(写真左)は脱水素水(写真右)を 40 日間投与した後の肝臓の肉眼像をしめす。脱水素水投与群(水素非投与群)では肝臓に腫大が観察された。(B) 水素水投与群(A の写真左)の組織像を示す。写真では黒く示される脂肪変性を認めない部分の面積比が有意である。(C) 脱水素水投与群(A の写真右)の組織像を示す。写真では白く示される肝細胞が脂肪変性を示した部分が大部分である。

成された脂肪肝を NASH のモデルとして、脂肪肝の形成及び炎症の進展に対する水素の影響を検討した。水素は水素水としてマウスに投与して検討した。予備的な検討では図 1 で示すように、約 1 ヶ月間の水素水投与により肝臓の腫大は抑制され、脂肪沈着に著明な軽減が見られた。

現在血液生化学的結果の評価とともに再検を行っている。また 2 ヶ月間の観察では NASH に見られる肝臓の線維化所見

は、KK Ay のモデルでは乏しい結果であったので他のモデルを用いての検討を考慮している。一方 KK Ay の本来の二次性糖尿病を自然発症に対する水素水の効果を検討した。マウスは 8 週令の KK Ay で検討したが、血糖、耐糖能、体重増加の経時的変化を約 2 ヶ月間追跡したが水素水の影響はほとんど観察が出来なかった。水素水投与前の評価では購入時点の 8 週令で既に重度の糖尿病の状態にあった。

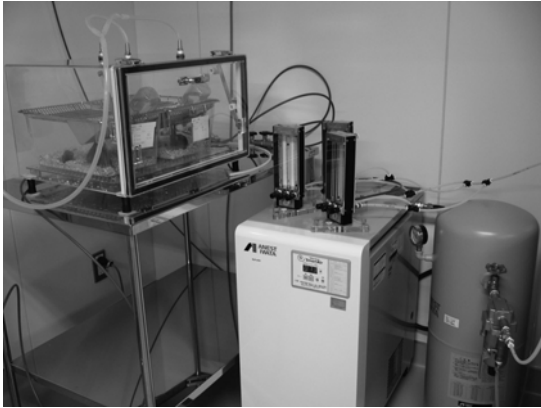


図2 吸入水素実験装置

中部大学・実験動物教育研究センターに、設置した吸入水素実験装置を示す。ガス混合用流量計で2%水素加空気を作成しアクリルチャンバーに10L/min で導入する。遺伝子改変動物を含む疾患モデル動物に対して、水素ガスの効果の検討を行っている。

活性酸素種は糖尿病の病態に関与しているとされるが、活性酸素種の傷害のみで病態が説明出来るものではない。今後週令の若いKK Ay マウスをもちいて糖尿病発症早期における水素水の影響を検討する予定である。さらに我々は2%水素加空気の環境でマウスを飼育出来るチャンバー(図2)を本学実験動物教育研究センターに設置させて頂き、吸入空気に添加した水素と水素水として投与した場合との効果の差も検討を加えている。ガスクロマトグラフィーを用いた血中濃度の検討では水素水の投与により、パルス的に短時間の動脈血中の水素濃度の上昇が得られることを確認している。おそらく対象とする疾患により、投与方法の選択が必要であると推察される。こちらも更なる検討が必要である。

一方著者は、名古屋大学医学系研究科神経遺伝情報学・大野欽司教授、岐阜国際バイオ研究所・伊藤雅史部長と共同研究を行いパーキンソン病のモデル動物に対する水素の効果について興味ある結果が得られた。パーキンソン病は黒質線状体でのドーパミン作動性ニューロンの変性が主因とされその発症に活性酸素種が関与していると推察されている。一方ドーパミン作動性ニューロンの変性の原因は、遺伝性素因もあるが多くは不明である。パーキンソン病の動物モデルとしては、ラットに黒質線状体に神経毒である6-hydroxydopamine (6-OHDA)を投与して作成する方法がある。投与された6-OHDAにより産生される活性酸素種により黒質線状体のドーパミン作動性ニューロンはアポトーシスをきたし消失する。コントロールとして脱水素水を投与した場合は、対側と比較して40%程度にドーパミン作動性ニューロンは減少した。一方水素水の前投与を行った場合は、ドーパミン作動性ニューロンは80%程度の減少に留まった(図3)。実際のパーキンソン病でも同様の病態が生じていると推定されているので、水素水にパーキンソン病の予防効果が期待される結果であった¹²⁾。これらの結果を基にパーキンソン病患者への臨床治験の計画が準備されている。

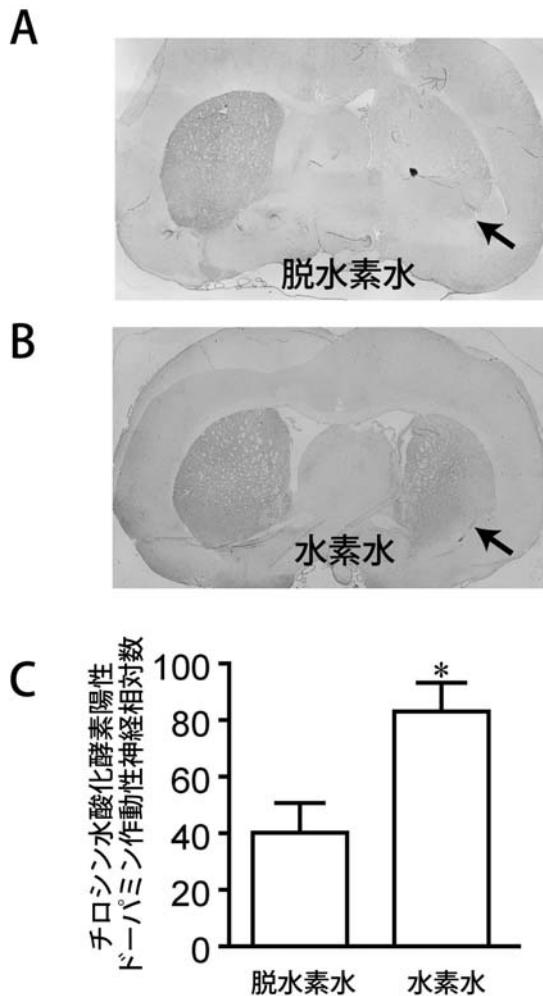


図 3 パーキンソンモデルラットにおける水素の黒質線状体保護効果

ラットの片側の黒質線状体に神経毒である6-hydroxydopamine (6-OHDA)を投与してパーキンソンモデルを作成した。チロシン水酸化酵素に対する免疫染色を行いドーパミン作動性ニューロンとその軸索を染色した。コントロールとして脱水素水を投与すると6-OHDAを投与された片側にはほとんど軸索の染色像が見られない (A: 矢印)。一方水素水を投与すると黒質のドーパミン作動性ニューロンは保護され健常側と同様の軸索の染色像が観察される (B: 矢印)。黒質でチロシン水酸化酵素陽性ドーパミン作動性ニューロン数を、健常部を100%として相対値を計測した。水素水投与下では細胞数は80%程度にとどまる一方で、コントロールとして脱水素水を投与した場合は40%程度に細胞数が減少していた(C)。

IV. おわりに

水素の臨床応用に関する研究が産声をあげて2年ほどが経過したが、これまでに得られた研究成果には目を見張るものがある。本年2月7日に日本医大太田先生主宰の第1回水素研究会が開催された。初回のみは現在水素研究を行っている研究者の情報交換の場として closed の会として企画された。京都大学、慶応大学、東北大学、神戸大学、名古屋大学などより酸化ストレス等の学会で活躍する国内の主要な研究者約40名の研究者が参加しホットな議論があった。また特許取得にも関連する未発表の研究成果がいくつ

か報告されたが、どの報告も学問的レベルは高く大変興味深いものであり早期の臨床応用が期待される発表が目立った。分子状水素の臨床応用に向けた研究は日本発の新規国産技術として期待される。水素による健康維持、病気の予防・治療に向けての試みが今後加速されるものと予想される。

参考文献

- 1) Lin J, Cook NR, Albert C, Zaharris E, Gaziano JM, Van Denburgh M, Buring JE, Manson JE. (2009) Vitamins C and E and beta carotene supplementation and cancer risk: a randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst.*, 101: 14-23.
- 2) Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med.*, 13: 688-694.
- 3) 太田成男、大澤郁郎 (2008) 水素分子による新しい概念の抗酸化治療法と予防医学実験医学, 26: 2074-2080.
- 4) Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. (2008) Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.*, 373: 30-35.
- 5) Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Billiar TR, McCurry KR, Bauer AJ, Nakao A. (2008) Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant.*, 8: 2015-2024.
- 6) Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. (2009) Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology.*, 34: 501-508.
- 7) Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. (2008) Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.*, 377: 1195-1198.
- 8) Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T. (2008) 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.
- 9) Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. (2007) Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.*, 361: 670-674.
- 10) Cai J, Kang Z, Liu WW, Luo X, Qiang S, Zhang JH, Ohta S, Sun X, Xu W, Tao H, Li R. (2008) Hydrogen therapy reduces

apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci Lett.*, 441: 167-172.

11) Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. (2009) Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.*

12) Fua Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, Suzukia Y, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.*, (in press)

————— 著 者 —————

市原 正智 (Masatoshi ICHIHARA)
中部大学生命健康科学部生命医科学科、
教授。1983年、名古屋大学医学部医学科
卒業、平成4年、名古屋大学大学院医学
研究科を修了、博士(医学、名古屋大学)。
平成11年名古屋大学助手(病理病態学講
座腫瘍病理、神経機能病理)。同大講師、
平成16年名古屋大学医学部保健学科検
査技術科学専攻基礎検査学講座助教授を
経て平成19年1月より現職。専門分野は
実験病理学。主な研究テーマは、チロシ
ンキナーゼ RET を中心としたシグナル
伝達機構と誘導遺伝子の解析など。平成
19年の本学への着任を機に、本学部の設
立趣旨に合った新規テーマとして水素の
研究をはじめている。本研究テーマは平
成20年度科学研究費補助金(新学術領域
研究、研究課題提案型)に採択された。