原著論文

アルカリ性電解水を使用した粉末培養液が筋芽細胞培養に及ぼす影響

寺山隼人[1,2)*]，清島大資[2,3)*]，田中喜典[2)]，
戸髙恵美子[3)]，坂部　貢[3,5)]，佐藤　勉[2,3,4)]
*These authors contributed equally to this work

１）千葉大学予防医学センター山田養蜂場・環境予防医学寄附研究部門
〒263-8522　千葉県千葉市稲毛区弥生町１-33千葉大学工学系総合研究棟１-７階
２）東海大学医学部医学科基礎医学系生体構造学
〒259-1143　神奈川県伊勢原市下糟屋143
３）千葉大学予防医学センター
〒263-8522千葉県千葉市稲毛区弥生町１-33千葉大学工学系総合研究棟１-７階
４）（公益財団法人）ルイ・パストゥール医学研究センター
〒606-8225 京都市左京区田中門前町103-５
５）（一般財団法人）北里環境科学センター
〒252-0329　神奈川県相模原市南区北里１-15-１

（略題：アルカリ性電解水を使用した粉末培養液が筋芽細胞培養に及ぼす影響）

和文抄録

加齢による骨格筋量や筋力の低下はサルコペニアと呼ばれ、酸化ストレスの関与が報告されている。アルカリ性電解水（AEW）は水の電気分解により生成され、弱アルカリ性を呈し、抗酸化作用が報告される水素が溶存している点で水道水と異なる。本研究では、AEWで調製した培地が筋芽細胞の細胞増殖に与える影響を検証した。マウス筋芽細胞（C２C12細胞）を５日間培養した。５日間培地交換しない群において、蒸留水、生成直後のAEW、水道水、溶存水素濃度を低下させたAEWを用いた培地の４群を作成した。生成直後のAEWを用いた群では筋芽細胞数が有意に増加し、AEWによる増殖促進効果が示唆された。しかし培養２日後に生成直後のAEWにて培地交換した群では、細胞数は増加しなかった。生成直後のAEWを用いた群で様々な酸化ストレス関連因子mRNAを調べたが、有意な変化は認められなかった。今後は網羅的な遺伝子発現を検証し、生体応用の可能性を探る予定である。

＜和文キーワード＞　アルカリ性電解水、骨格筋、水素

受付：2025年12月25日　　採用：2025年２月21日
対応責任著者
氏名：寺山隼人・清島大資
所属：東海大学医学部医学科基礎医学系生体構造学
住所：〒259-1143　神奈川県伊勢原市下糟屋143
電話：0463-93-1121
Eメールアドレス：terahaya@tokai.ac.jp・kiyoshima@tokai.ac.jp

Effect of dissolving powdered culture medium with alkaline electrolyzed water on myoblast cell proliferation

Hayato Terayama[1,2)*], Daisuke Kiyoshima[2,3)*], Yoshinori Tanaka[2)], Emiko Todaka[3)], Kou Sakabe[3,5)], Tsutomu Sato[2,3,4)]
*These authors contributed equally to this work

1）Department of Environmental Preventive Medicine（Yamada Bee Company, Inc.）, Center for Preventive Medical Sciences, Chiba University
2）Department of Anatomy, Tokai University School of Medicine
3）Center for Preventive Medical Sciences, Chiba University
4）Louis Pasteur Center for Medical Research
5）Kitasato Research Center for Environmental Science

英文抄録

Age–related declines in skeletal muscle mass and strength are termed sarcopenia, with oxidative stress implicated in this process. Alkaline electrolyzed water（AEW）is produced by water electrolysis, exhibiting weak alkalinity and containing dissolved hydrogen with antioxidant properties, distinguishing it from tap water. This study investigated the effects of AEW–prepared culture medium on myoblast proliferation. Mouse myoblasts（C 2 C12 cells）were cultured for 5 days. In experiments without medium changes, four groups were created using medium containing distilled water, freshly generated AEW, tap water, and AEW with reduced dissolved hydrogen concentration. The group using freshly generated AEW showed a significant increase in myoblast numbers, suggesting a cell proliferation–promoting effect of AEW. However, in the group where the medium was replaced with freshly generated AEW after two days of culture, cell numbers did not increase. Analysis of various oxidative stress–related factor mRNAs in the group using freshly generated AEW showed no significant changes. Future plans include verifying comprehensive gene expression and exploring potential applications in living organisms.（164 words）

<英文キーワード> Alkaline electrolyzed water, skeletal muscle, hydrogen

Corresponding authors
Daisuke Kiyoshima・Hayato Terayama
Department of Anatomy, Tokai University School of Medicine
143 Shimokasuya, Isehara–si, Kanagawa, 259–1193, Japan
Tel.: +81–463–931121
E–mail: kiyoshima@tokai.ac.jp・terahaya@tokai.ac.jp

１．はじめに

水の電気分解にて得られる水は、陽極側と陰極側で化学的特性が異なる。陽極側ではpHが酸性を呈し溶存酸素濃度が増加しているのに対し、陰極側ではpHがアルカリ性に傾き電気分解前には存在しない水素が溶存する事が特徴である。陰極側から得られる水は、アルカリ性電解水（Alkaline electrolyzed water：AEW）[1)]と呼ばれる。中でも日本産業規格（JIS T2004）に適合した家庭用電解水生成器（アルカリイオン整水器）を用いて水道水を電気分解することで陰極側に生成される弱アルカリ性（pH9～10）のアルカリ性電解水は飲用アルカリ性電解水と呼ばれ、飲用することで「胃腸症状の改善」に有効とされている[1) 2)]。

Shirahataらはヒポキサンチン–キサンチンオキシダーゼ系での無細胞系で、AEWにより、スーパーオキシドアニオンの産生量や過酸化水素の減少が促進されることを報告した[3)]。また、マウス膵β細胞に対してアロキサンで１型糖尿病を誘発するときに生じる活性酸素種をAEWで培養する事により抑制することによってアポトーシスを抑制した事が報告された[4)]。このように、AEWは抗酸化作用、抗アポトーシス作用など様々な作用が期待されている。Ohsawaらは、分子状水素（水素ガス：H_2）の投与により脳虚血障害が抑制されることを報告した[5)]。炎症・虚血疾病モデルにおいて、H_2投与により臓器障害が抑制・減弱されることが多数報告され、H_2には抗酸化・抗炎症作用があると示唆されている[6)]。したがって、現在、AEWにおける抗酸化・抗炎症作用はH_2が主役となって惹起していると考えられている。

日本の65歳以上人口は2019年に29.3％に達しており、現在の状況が続けば、2065年には、約2.6人に１人が65歳以上となると予想されている[7)]。老化仮説の１つに1956年に提唱された酸化ストレス説がある[8)]。活性酸素やフリーラジカルの発生要因は様々であるが、ミトコンドリアから産生される活性酸素が最も多いことが明らかになっている[9)]。一方、その活性酸素やフリーラジカルを除去するシステムがカタラーゼやスーパーオキシドジスムターゼなどの抗酸化酵素である。この酸化システムと抗酸化システムのバランスが崩れると酸化ストレスが生じ、身体へ様々な影響を与える。細胞に蓄積した酸化ストレスは、ミトコンドリアからの活性酸素によってアポトーシスが誘導されるというメカニズムが報告された[10)]。アポトーシスが誘導されると，個体老化を促進することにも繋がるため、酸化ストレスと老化は密接に関わっていると考えられる。実際に、培養されたヒト胎児二倍体線維芽細胞[11)]やラット脳[12)]などでは、培養期間や加齢に伴い酸化ストレス物質の一つである過酸化脂質が増加することが報告されている。

近年、高齢化社会に伴い、加齢により心身が疲れやすく弱った状態であるフレイル（虚弱）とフレイルの原因となる骨格筋量の減少および筋力が低下する症状であるサルコペニアが注目されている。サルコペニアでは日常生活動作が著しく阻害されることから、その対策は健康長寿の実現を目指す上で極めて重要な課題と言える。サルコペニアはヒトだけでなく犬や猫においても報告されている[13)]。サルコペニアの発症には加齢だけでなく、様々な原因が示唆されている中、酸化ストレスも関わっている事が報告されている[14)]。骨格筋の基底膜と筋線維の間には組織幹細胞であるサテライト細胞が存在しており、骨格筋の高い再生能力を支えている[15, 16)]。通常、サテライト細胞は増殖しない細胞周期（G０期）に維持されているが、筋肉の損傷によって筋芽細胞へと分化を開始する。筋芽細胞はさらに増殖し、細胞同士が融合することで筋管細胞に分化し、最終的に筋線維となる[15, 16)]。サルコペニアの場合、サテライト細胞の増殖や分裂能の低下により新たに作られる筋線維が減少し、筋肉量の減少や筋萎縮につながると考えられている。実際、加齢に伴ってサテライト細胞数や分裂能が減少することが分かっている[17)]。一方で、サテライト細胞を欠損させた老齢マウスでは、野生型の老齢マウスと比較して、筋萎縮の度合いに変化が見られないことが報告されている[18)]。この事からサテライト細胞以外にもサルコペニアに関わる因子があると考えられ、その一つに、筋芽細胞の増殖や分化能があげられ

る。加齢に伴う筋芽細胞の増殖や分化能の低下が、サルコペニアにおける筋肉量低下や筋萎縮に関与する可能性が示唆されている[19]。

一般に、加齢に伴う筋萎縮や再生能力の低下には、細胞内での過剰な活性酸素種の蓄積、すなわち酸化ストレスが深く関与している。本研究にて、アルカリ性電解水が持つ抗酸化作用が細胞内の環境維持に働き、筋芽細胞が増殖しやすくなるのかどうかを検証することとした。

2．材料と方法

2.1 培養実験1

マウス筋芽細胞であるC2C12細胞はATCC（American Type Culture Collection）より購入した。細胞の培養は、37℃，5％CO_2インキュベーター内で行った。培地は高グルコース型Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM 培地）の粉末をDW（Distilled Water：蒸留水）およびAEWで溶解し、牛胎児血清を10％と抗生物質を1％加えた。各溶解液は0.45μm poreサイズのフィルターで濾過し、微生物などを除去した。DWにて調製した培地で培養する群（以下DW群）とAEWにて調製した培地で培養する群（以下AEW 5 d−1群）の2群を作成し、それぞれ9ディッシュ作成した。AEWはPanasonic社製の試作器にてpH9.5で生成し、培地調製後は2群いずれもpHは7.4とした。C2C12細胞を播種し（1.5×10^2個）、5日間培養後に両群の細胞数をカウントした。培養は再現性を確かめるため、2回行った。

2.2 培養実験2

マウス筋芽細胞であるC2C12細胞はATCCより購入した。細胞の培養は、37℃，5％CO_2インキュベーター内で行った。培地はDMEM培地の粉末を水道水、水素を抜いたAEWおよびAEWで溶解し、牛胎児血清を10％と抗生物質を1％加えた。各溶解液は0.45μm pore サイズのフィルターで濾過し、微生物などを除去した。水道水にて調製した培地で培養する群（以下Normal群）、生成後に24時間放置し水素を可及的になくしたAEWにて調製した培地で培養する群（以下Control群）、生成直後のAEWにて調製した培地で培養する群（以下AEW 5 d−2群）の3群を作成し、それぞれ3ディッシュ作成した。AEWはPanasonic社製の試作器にてpH9.5で生成し、最終的に3群いずれも培地のpHは7.4とした。C2C12細胞を播種し（1.5×10^2個）、各群を5日間培養後に細胞数をカウントした。培地交換の影響や水素の長期暴露の影響を検討するため、培地交換を行わない群（Normal 5 d群、Control 5 d群およびAEW 5 d−2）と培養2日後に培地交換を行った群（Normal 2 d群、Control 2 d群およびAEW 2 d−2群）を作成し、培養は再現性を確かめるため、2回行った。

2.3 水素測定

水素測定はポータブル溶存水素計（東亜DKK株式会社DH-35A：隔膜型ポーラログラフ電極）を用いた。培地中の水素濃度はC2C12細胞を播種する直前で測定した。培養実験1はDW群およびAEW 5 d−1群において、培地調製時と5日後の水素濃度の測定を行った。培養実験2はNormal 2 d群、Control 2 d群、AEW 2 d−2群およびAEW 5 d−2群において、培地交換を行った群と培地交換を行わない群を培地調製時（Day 0）、2日後（Day 2）、5日後（Day 5）における培地中の水素濃度を測定した。水素濃度の値は原理的に水素を含まない蒸留水（DW群）や水道水（Normal群）の測定値を測定機の0値として補正後、小数点以下切り捨てた。測定範囲は0.0 ppb ～10.00 ppmであった。

2.4 Real-time reverse transcription（RT-）PCR

培養実験1において1回目と2回目のDW群およびAEW 5 d−1群の細胞はTRIzolに保存し、クロロホルム、イソプロピルアルコール、エタノールを用いてtotal RNAを抽出した。cDNA合成はcDNA合成キットHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific Inc., MA, US）を用いてマニュアルに従い、complementary DNA（cDNA）に逆転写した。合成されたcDNAはTakara

SYBR premix Ex TaqⅡを用いて、Cobas Z 480 Analyzer（Roche-diagnostics）でreverse-time reverse transcription-Polymerase Chain Reaction（PCR）を行った。プライマーは細胞増殖因子関連遺伝子であるPI３K（Phosphatidylinositol-３kinase)、Mef２a（Myocyte enhancer factor ２a)、CDK１m（Cyclin-dependent kinase １m)、酸化物質関連遺伝子であるTXNIP（Thioredoxin interacting protein)、GRP78（glucose-regulated protein, 78kDa)、OGG１（８-oxoguanine DNA glycosylase １)、抗酸化酵素関連遺伝子であるSOD１（Super oxide dismutase １)、SOD２（Super oxide dismutase ２)、SOD３（Super oxide dismutase ３)、CAT（Catalase)、GPx（Glutathione peroxidase)、Trx１（Thioredoxin １)、Trx２（Thioredoxin ２)、GR（Glutathione reductase)、HO-１（Heme Oxygenase １)、Nrf２（Nuclear factor E２-related factor ２）ミトコンドリア障害関連遺伝子であるPGC-１α（Peroxisome proliferators-activated receptor-γ co-activator-１α)、Nrf１（Nuclear factor E２-related factor １)、Drp１（Dynamin-related protein １)、アポトーシス関連遺伝子であるFas、FasL（Fas ligand)、Bax、Bcl-２、Caspase ３、オートファジー関連遺伝子であるLC３B（Microtubule associated protein light chain ３B)、p62（Sequestosome １)、Beclin-１（B-cell lymphoma-２ interacting protein １)、Atg７（Autophagy-related protein ７）を作成した。データ解析はthermal cycler dice real time system software（Takara-Bio Co., Shiga, Japan）を使用し、２ΔΔCt法を用いて行った。内部標準遺伝子はGAPDHを用いた。

２.５ 統計

統計はIBM SPSS（International Business Machines Co., NY, US）を用いて、Shapiro-Wilk検定で正規性を確認後、２群間はt検定（効果量：Cohen（d））およびMann-WhitneyのU（効果量：r）の検定を、３群間以上は一元配置分散分析（ANOVA、効果量：η^2）およびKruskal-Wallisの検定（効果量：ε^2）を行い、多重比較はTukey法およびDunn-Bonferroni法を行った。有意水準（p値）は５％未満とした。Real-time RT-PCRのデータは統計学的有意であっても、値が２倍以上１/２以下でない限り、有意な差はないと判断した。

３．結果

３.１ 培養実験１

DW群と比較しAEW５d-１群で有意に１回目（p<0.001、r=0.612）および２回目（p<0.001、r=0.764）ともに細胞数の増加がみられた（表１a)。

３.２ 培養実験２

培地交換を行わなかった場合、培養５日後のNormal５d群およびControl５d群と比較してAEW５d-２群で１回目（p<0.001、η^2=0.832：Normal５d vs AEW５d-２; p<0.001、Control５d vs AEW５d-２; p<0.001）および２回目（p<0.001、η^2=0.784：Normal vs AEW５d-２; p<0.001、Normal５d vs AEW５d-２; p<0.001）ともに有意に細胞数が増加した（表１b)。

培地交換を行った場合、１回目の培養５日後のNormal２d群、Control２d群およびAEW２d-２群の間（p<0.001、ε^2=0.602：Normal２d vs Control２d; p<0.001、AEW２d-２ vs Control２d; p=0.015）では有意な差を認めたが、２回目（p=0.125、η^2=0.159）は有意な差を認めなかった（表１c)。

表1　培養実験1および2における筋芽細胞数

a）培養実験1におけるDW群とAEW 5 d−1群の筋芽細胞数

培養回数	グループ	平均（cell/mm^2）	標準偏差
1回目	DW	79.9	35.1
	AEW5d−1	131.9*	40.6
2回目	DW	214.0	46.0
	AEW5d−1	337.6*	59.1

b）培養実験2におけるNormal 5 d群、Control 5 d群およびAEW 5 d−2群の筋芽細胞数

培養回数	グループ	平均（cell/mm^2）	標準偏差
1回目	Normal5d	114.9	26.6
	Control5d	122.0	22.5
	AEW5d−2	267.5**	35.4
2回目	Normal5d	138.0	22.9
	Control5d	166.1	28.3
	AEW5d−2	472.0**	139.3

c）培養実験2におけるNormal 2 d群、Control 2 d群およびAEW 2 d−2群の筋芽細胞数

培養回数	グループ	平均（cell/mm^2）	標準偏差
1回目	Normal2d	62.4	9.1
	Control2d	105.1***	18.0
	AEW2d−2	76.0	12.5
2回目	Normal2d	84.8	29.4
	Control2d	113.0	34.0
	AEW2d−2	110.4	26.6

*DW vs AEW 5 d−1、**Normal 5 d or Control 5 d vs AEW 5 d−2、***Normal 2 d or AEW 2 d−2 vs Control：$p<0.05$

3.3 水素測定

培養実験1において（表2a）、Day 0の平均水素濃度はAEW 5 d−1群で約20ppbであり、全群で検出限界以下であった。培養実験2において、培地交換を行わなかった場合（表2b）、Day 0の平均水素濃度はAEW 5 d−2群のみ約6 ppbの水素が検出され、全群で検出限界以下であった。培地交換を行った場合（表2c）、Day 0の平均水素濃度はAEW 2 d−2群のみ約6 ppbの水素が検出され、Day 2には全群で検出限界以下となった。なお、再度各培地に交換した後のAEW 2 d−2群では水素濃度が約8 ppbで検出されたが、Day 5では全群で再び検出限界以下となった。各実験におけるDay 0の水素濃度の違いはAEWを生成してから培養開始までの間にAEWの溶液外に放出してしまった水素量の差異によるものと推測される。

表2　培養実験1および2における培地の水素ガス濃度

a）培養実験1におけるDW群とAEW 5 d−1群の培地の水素ガス濃度

グループ	Day 0	Day 5
DW	N.D.	N.D.
AEW5d−1	20ppb	N.D.

b）培養実験2におけるNormal 5 d群、Control 5 d群およびAEW 5 d−2群の培地の水素ガス濃度

グループ	Day 0	Day 5
Normal5d	N.D.	N.D.
Control5d	N.D.	N.D.
AEW5d−2	6ppb	N.D.

c）培養実験2におけるNormal 2 d群、Control 2 d群およびAEW 2 d−2群の培地の水素ガス濃度

グループ	Day 0	Day 2	Day 2	Day 5
Normal2d	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Control2d	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AEW2d−2	6ppb	N.D.	8ppb	N.D.

*水素濃度は小数点以下を切り捨てで表す。

3.4 Real-time RT-PCR

培養実験1の1回目と2回目のDW群およびAEW 5 d−1群の抗酸化酵素（図1a）（SOD1、

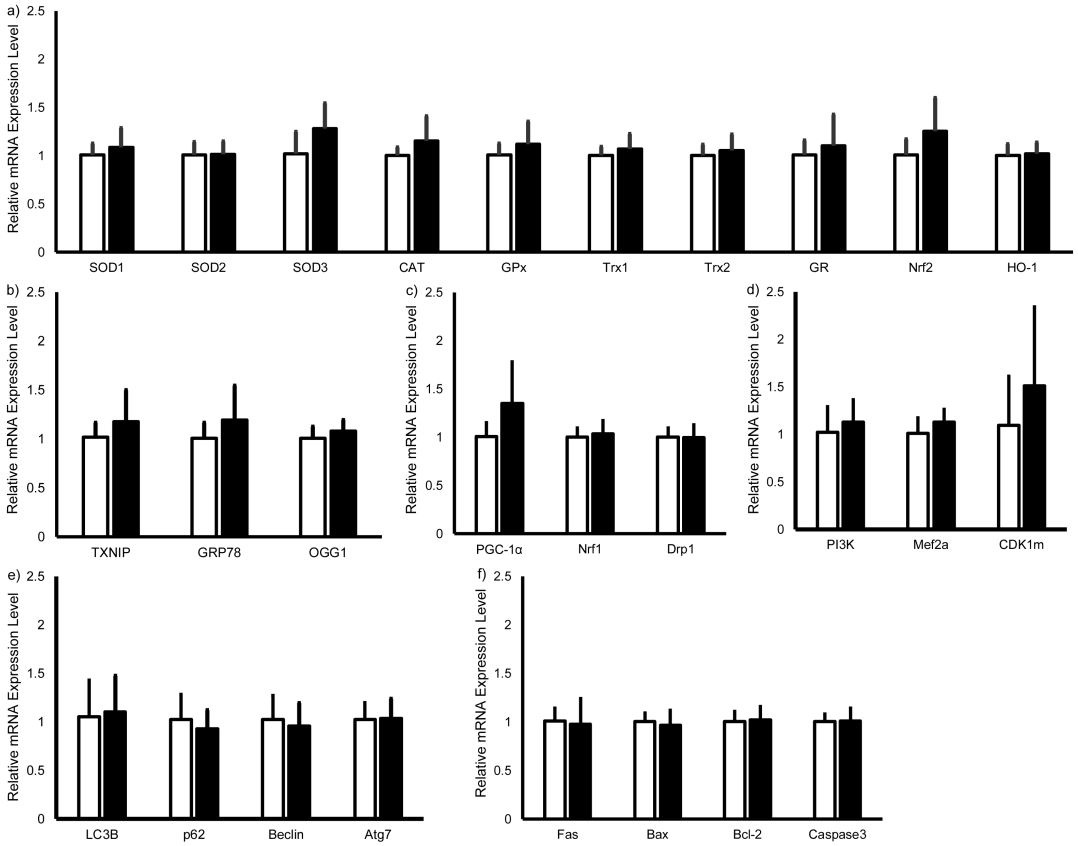

図１ 培養実験１におけるDW群（□）とAEW５d-１群（■）のmRNAの変化

SOD２、SOD３、CAT、GPx、Trx１、Trx２、GR、HO-１、Nrf２）酸化ストレス物質（図１b）（TXNIP、GRP78、OGG１）、ミトコンドリア障害（図１c）（PGC-１α、Nrf１、Drp１）、細胞増殖因子（図１d）（PI３K、Mef２a、CDK１m）、オートファジー（図１e）（LC３B、p62、Beclin-１、Atg７）、アポトーシス（図１f）（Fas、FasL、Bax、Bcl-２、Caspase３）関連mRNAの発現を比較したところ、有意差はなかった。図１のデータは２回目を使用し、効果量とp値は表３に示した。

a）培養実験１におけるDW群とAEW５d-１群の抗酸化酵素関連因子であるSOD１（Super oxide dismutase １）、SOD２（Super oxide dismutase ２）、SOD３（Super oxide dismutase ３）、CAT（Catalase）、GPx（Glutathione peroxidase）、Trx１（Thioredoxin １）、Trx２（Thioredoxin ２）、GR（Glutathione reductase）、HO-１（Heme Oxygenase １）、Nrf２（Nuclear factor E２-related factor ２）mRNAの変化

b）培養実験１におけるDW群とAEW５d-１群の酸化物質関連因子であるTXNIP（Thioredoxin interacting protein）、GRP78（glucose-regulated protein, 78kDa）、OGG１（８-oxoguanine DNA glycosylase １）mRNAの変化

c）培養実験１におけるDW群とAEW５d-１群のミトコンドリア障害関連因子であるPGC-１α（Peroxisome proliferators-activated receptor-γ co-activator-１α）、Nrf１（Nuclear factor E２-related factor １）、Drp１（Dynamin-related protein １）mRNAの変化

d）培養実験１におけるDW群とAEW５d-１群の細胞増殖因子関連因子であるPI３K（Phosphatidylinositol-３ kinase）、Mef２a（Myocyte enhancer factor ２a）、CDK１m（Cyclin-dependent kinase １m）mRNAの変化

e）培養実験1におけるDW群とAEW 5 d–1群のオートファジー関連因子であるLC 3 B（Microtubule associated protein light chain 3B）、p62（Sequestosome 1）、Beclin–1（B–cell lymphoma–2 interacting protein 1）、Atg 7（Autophagy–related protein 7）mRNAの変化

f）培養実験1におけるDW群とAEW 5 d–1群のアポトーシス関連因子であるFas、FasL（Fas ligand）、Bax、Bcl–2、Caspase 3 mRNAの変化

DW群とAEW 5 d–1群のmRNAの変化のデータは平均値±標準偏差で表す。

表3　培養実験1におけるDW群とAEW 5 d–1群のmRNAの統計結果

Gene	Significance level（p–value）	Effect size（Cohen（d）or r）
SOD1	0.144	d=0.165
SOD2	0.85	d=0.133
SOD3	0.002	d=0.244
CAT	0.024	r=0.355
GPx	0.149	r=0.231
Trx1	0.096	d=0.126
Trx2	0.28	d=0.14
GR	0.698	r=0.064
HO–1	0.925	r=0.015
Nrf2	0.007	d=0.269
TXNIP	0.063	r=0.295
GRP78	0.002	d=0.182
OGG1	0.62	r=0.081
PGC–1 α	0.002	d=0.321
Nrf1	0.369	r=0.143
Drp1	0.878	d=0.114
PI3K	0.19	r=0.296
Mef2a	0.955	d=0.152
CDK1m	0.143	r=0.338
LC3B	0.688	d=0.375
p62	0.529	r=−0.144
Beclin	0.684	r=−0.102
Atg7	0.739	r=0.076
Fas	0.661	d=0.21
Bax	0.379	d=0.124
Bcl–2	0.654	d=0.122
Caspase3	0.834	d=0.109

4．考察

本研究は様々な水を用いて培地を調製し、培地交換をせずに筋芽細胞を5日間培養した。蒸留水（DW群）、水道水（Normal 5 d群）、生成後に24時間放置し水素を可及的になくしたAEW（Control 5 d群）を使用した培地で培養した筋芽細胞数と比較し、AEW（AEW 5 d–1群、AEW 5 d–2群）を使用した筋芽細胞数の方が有意に増加した。また、2日目で培地交換を行った場合、Normal 2 d群やControl 2 d群と比較し、AEW（AEW 2 d–2群）を使用した培地で培養した筋芽細胞数で有意な差は認められなかった。しかしながら、酸化ストレス物質、抗酸化酵素、ミトコンドリア障害、アポトーシス、オートファジー、細胞増殖因子関連mRNAの発現の有意な差はなかった。

培地交換を行わない場合、Control 5 d群やNormal 5 d群と比較し、AEW 5 d群に有意な筋芽細胞数の増加が認められたため、AEWによる細胞増殖効果の可能性が示唆された。白幡らは電解還元水（AEW）がSOD様活性を有し、DNAを酸化ダメージから保護することを初めて報告した[20]。李らは、電解還元水がDNA、RNA、タンパク質の酸化ダメージから保護することを報告した[21]。花岡は、電解還元水が抗酸化物質の活性を高め、フリーラジカルや活性酸素（ROS）を除去する可能性があることを示し、過酸化水素活性は電解還元水中に生成される活性水素分子の濃度に依存する可能性がある事を示唆した[22]。水素ガスはヒドロキシラジカルと水素分子の化学的反応だけでなく、抗酸化・炎症系経路へ影響している。水素ガスの吸入、水素ガス含有水の飲水や腹腔内投与などでMAPK、MEK–1、NF–κB、caspase–3、caspase–12が抑制されていることから、水素ガスの作用は単に標的ラジカルとの化学反応により酸化ストレスを軽減することに留まらず、抗酸化系システムの増強など多面的な作用で酸化ストレスを制御している可能性も想定され、それが炎症性サイトカインの発現抑制、抗酸化系の低減抑制と繋がっている可能性がある[23]。本研究と同様に、西川らはBalb/c 3T3細胞（マウス胎児線維芽細胞）の培養（MEM培地）において、通常の培

養よりも電解還元水（AEW）を用いた方が早い日数で密集状態に達する事を報告した[24]。したがって、筋芽細胞を培養する事で発生した酸化ストレスがAEW中の水素ガスによって抑制された可能性が考えられた。

水素ガスはスーパーオキシド，過酸化水素（H_2O_2），一酸化窒素等の反応性の低いROSとは反応しない[25]。市販のMEM培地はH_2O_2が含まれているため[26]、MEMを改良し、アミノ酸やビタミン濃度を高め、グルコースなどの成分をより多く含むDMEM培地も同様にH_2O_2が含まれている可能性が考えられる。また、細胞培養においてビタミンC（アスコルビン酸）が酸化され（プロオキシダント作用）、その酸化生成物が活性酸素の発生を促し、酸化ストレスを誘導することがあり、様々な物質が酸化されると逆に酸化ストレスを誘導してしまう事もある。したがって、培地交換をした方が培養細胞にとって酸化ストレス物質を除去でき、水素ガスの供給にもなるため、より細胞増殖効果が得られると考えていたが、培地交換を行った場合、１回目はNormal２d群やAEW２d–２群と比較しControl２d群で有意差は認められたものの、２回目はすべての群で有意差は認められなかった。培地交換頻度が低い場合、hiPS細胞の短期培養において細胞品質の低下は見られず、細胞増殖率が向上したという報告がある[27]。したがって、筋芽細胞の場合、水素の細胞増殖効果やH_2O_2の除去に比べ外的な物理的ストレスの方がより細胞の増殖に悪影響を与えている可能性が考えられた。

培地交換を行わない場合、DW群とAEW５d–１群を比較したところ、酸化ストレス物質、抗酸化酵素、ミトコンドリア障害、アポトーシス、オートファジー、細胞増殖因子関連mRNAの発現の有意差はなかった。AEWはアスコルビン酸の抗酸化活性に対する増強効果があるが、AEWの電気伝導率（EC）もpHもアスコルビン酸の抗酸化活性と直線関係を示さなかった。さらに、AEWと同じpHとEC値に調整したH_2バブル水はコントロールとほぼ同じ抗酸化活性を示し、pH、EC、水素気泡はSOD活性を増強する主な要因ではなかったことが報告された[28]。また、マウスBalb/c ３T３細胞は、形質転換すると接触阻害能力を失うため、形質転換実験に広く使用され、合成された白金ナノコロイド（Pt nps）を補充した電解還元水が Balb/c ３T３細胞の形質転換を強力に抑制したが、電解還元水またはPt npsの個別によっては抑制されなかった[29]。したがって、水素以外に他の因子も細胞増殖効果へ大きく影響を与えている可能性も考えられた。今後は次世代シークエンサーを用いてトランスクリプトーム解析（網羅的遺伝子解析：RNA–seq）を行い、水素にこだわらず、他の因子についても網羅的に検討したい。

利益相反

本研究は株式会社山田養蜂場、Panasonic株式会社、一般財団法人機能水研究振興財団企画共同研究助成の補助を受けた。本稿の内容および結論に資金提供者の影響はない。

謝辞

この度は、第32回および33回日本臨床環境医学会学術集会での発表において奨励賞を頂き深謝致します。本論文は第32回および33回日本臨床環境医学会学術集会において発表した内容を一部改変致しました。本研究は東海大学研究イノベーションセンター生命科学統合支援センターの技術職員の方々、東海大学医学部医学科基礎医学系生体構造学の林省吾先生、隅山香織先生、山本将仁先生、飯島崇利先生、上田容子先生、永堀健太先生、高木美穂様、千葉大学予防医学センターの櫻井健一先生（栄養代謝医学）、山本緑先生、江口哲史先生（環境健康学）、大森百合香様（山田養蜂場・環境予防医学寄附研究部門）のご支援およびご協力によって行いました、深謝致します。なお、本研究は株式会社山田養蜂場、Panasonic株式会社、一般財団法人機能水研究振興財団企画共同研究助成の補助を受けました、この場をお借りして深謝致します。

参考文献

1）Tanaka, Y. Structure and function of alkaline ionized water apparatus. J. Funct. Water 12: 29–34. 2017（English Abstract）

2）厚生労働省　https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=81aa6906&dataType= 0 &pageNo= 1

3）Shirahata S, Kabayama S, et al. Electrolyzed reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. Biochem Biophys Res Commun 234：269–74. 1997

4）Li Y, Nishimura T, et al. Protective mechanism of reduced water against alloxan–induced pancreatic beta–cell damage：Scavenging effect against reactive oxygen species. Cytotechnology 40：139–49. 2002

5）Ohsawa I, Ishikawa M, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. Nat Med 13：688–94. 2007

6）Ohta S. Recent progress toward hydrogen medicine：potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications. Curr Pharm Des 17：2241–52. 2011

7）内閣府. 令和元年版高齢社会白書. 2019 https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/index–w.html

8）Harman D. Aging: A theory based on free radical and radication chemistry. J Gerontol 11, 298–300. 1956

9）Indo H, Devisdon M, et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. Mitochondrion 7（1－2）, 106–118. 2007

10）Majima HJ, Oberley TD, et al. Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline–induced cell death. J Biol Chem 273（14）:8217–24. 1998

11）Suzuki T, Miyazawa T, et al. Age–related accumulation of phosphatidylcholine hydroperoxide in cultured human diploid cells and its prevention by α–tocopherol. Lipids 28:, 775–778. 1993

12）Miyazawa T, Suzuki T, et al. Age–Dependent Accumulation of Phosphatidylcholine Hydroperoxide in the Brain and Liver of the Rat. Lipids 28: 789–793. 1993

13）Freeman LM. Cachexia and sarcopenia: emerging syndromes of importance in dogs and cats. J Vet Intern Med Jan–Feb;26（1）: 3 –17. 2012

14）Dickinson Jared M, Volpi Elena, et al. Exercise and Nutrition to Target Protein Synthesis Impairments in Aging Skeletal Muscle. Exercise and Sport Sciences Reviews 41（4）: 216–223. 2013

15）Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. Physiol Rev Jan 93（1）:23–67. 2013

16）町田　修一、船越　智子. 骨格筋再生と老化制御：筋サテライト細胞の役割. 基礎老化研究 40（1）: 13－17. 2016

17）García–Prat L, Sousa–Victor P, et al. Functional dysregulation of stem cells during aging : A focus on skeletal muscle stem cells. The FEBS journal 280: 4051–4062. 2013

18）Fry CS, Lee JD, et al. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity but does not contribute to sarcopenia. Nature medicine 21, 76–80. 2015

19）Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. International journal of molecular sciences 11, 1509–1526. 2010

20）Shirahata S, Kabayama S, et al. Electrolyzed–reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. Biochemical & Biophysical Research Communications 234（1）: 269.1997

21）Lee MY, Kim YK, et al. Electrolyzed–reduced water protects against oxidative damage to DNA, RNA and Protein. Applied Biochemistry and Biotechnology 135（２）: 133–144. 2006
22）Hanaoka K. Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride solutions. Journal of Applied Electrochemistry 31（12）: 1307–1313. 2001
23）中山 昌明. 電解アルカリ水（水素水）を用いた透析液（基礎・臨床）, 日本透析医学会雑誌 48 巻, 2 号, 94–98. 2015
24）Ryuhei N, Kiichiro T, et al. Electrolyzed reduced water supplemented with platinum nanoparticles suppresses promotion of two–stage cell transformation. Cytotechnology 47:97–105. 2005
25）大澤 郁朗. 老年医学の展望 水素分子の生理作用と水素水による疾患防御, 日本老年医学会雑誌 = Japanese journal of geriatrics 49（６）: 680–688. 2012.
26）Kelts J.L., Cali, J.J., Duellman, S.J. et al. Altered cytotoxicity of ROS–inducing compounds by sodium pyruvate in cell culture medium depends on the location of ROS generation. SpringerPlus 4 :269. 2015
27）小長谷 周平, 安藤 健, 他.　ヒトiPS細胞の培地交換頻度が細胞品質に与える影響, 生体医工学53Supplement 号, S237_01. 2015
28）Tongjiao Wu, Masahiro H, et al. Comparative Study of Alkaline Electrolyzed Water and Tourmaline Water in terms of their Enhancing Effect on the Antioxidant Activity of Ascorbic Acid. J. Functional Water 6 （２）: 1 –9. 2022