

人工赤血球研究の現況—循環系への影響の少ない 新たなヘモグロビン系人工酸素運搬体の開発—

佐久間 一郎*, 仲井 邦彦**, 富樫 廣子***
坂野上 淳****, 藤井 聡*, 吉岡 充弘***
佐藤 洋**, 北島 顯*

はじめに

輸血時の肝炎や AIDS 感染, 宗教上の理由での輸血拒否等の問題を克服する目的, また慢性的な輸血用血液不足を解消し, 緊急時などにクロスマッチの必要がなく長期間保存可能な輸血用血液を確保する目的, さらに臓器移植の際に摘出臓器に酸素を供給し, 保存時の臓器機能を可能な限り保持することを目的として, 人工赤血球・人工酸素供与体の開発が進められている^{1,2)}. なかでも, ヘモグロビン (Hb) 分子を改良した Hb 修飾体 (図 1) は, 欧米で一部のものが第三相臨床試験を終了し, 医薬品申請の段階にまで到達した (表 1).

ところが, つい最近, 出血性ショック時の代替輸血製剤としてこのタイプの Hb 修飾体のひとつを使用した際に, 死亡例が出たことから, そのタイプの Hb 修飾体の医薬品申請が取り下げられたという. 以前より, Hb 修飾体には副作用として血管収縮作用, 腸管収縮作用, 腎作用の存在が知られており, さらに血小板凝集惹起作用も懸念される. これは Hb 分子中のヘムが, 血管内皮細胞から内皮由来弛緩因子 (EDRF) として放出され, また神経終末で生成・分泌されて腸管や血管において平滑筋弛緩作用を惹起する一酸化窒素 (NO) を, その分子内に容易にトラップし, NO の作用を消去するためと考えられる³⁾. 最近, われわれ

のグループはその解決法として, Hb β 鎖の SH 基に NO を結合した S-ニトロソ Hb (SNO-Hb) の利用を試みている. この SNO-Hb には酸素供与能があるのみならず血管拡張作用を有しており, NO 消去作用を相殺して, 理想的な人工赤血球の素材となる可能性がある.

本稿では, 人工赤血球として Hb 修飾体に応用する場合の NO との関わりについて概説し, 人工赤血球の素材として SNO-Hb が有する有用性に関してわれわれのデータを紹介するとともに, 今後の新たな人工酸素供与体開発の可能性について言及したい.

人工赤血球としての無細胞性ヘモグロビン

Hb は赤血球内に高濃度 (5 mM) で存在する. この Hb を赤血球より抽出し, 膜成分 (stroma) を除いた後 (stroma-free hemoglobin : FSH), 種々の修飾を施し酸素運搬能を持つ人工赤血球として, 応用したものが無細胞性 Hb 系酸素運搬体 (Hb-Based Oxygen Carrier : HBOC) である^{1,2,4)} (図 1). Hb は α 鎖と β 鎖からなる 4 量体であり, Hb 自体を投与すると, α 鎖・ β 鎖間で解離し, 腎臓からの排泄などにより血中から急速に除去され, Hb 尿症・腎毒性を惹起する. この問題の解決策として, まず Hb 分子の α 鎖と β 鎖間に架橋を導入した分子内架橋型が合成された. また, HBOC を人工赤血球として機能させるためには, Hb の酸素親和性を低下させる必要がある (赤血球内では, 2,3-DPG が β 鎖 N 末端と結合し, Hb の酸素親和性低下に寄与している). Baxter Healthcare 社はヒト Hb α 鎖間をアスピリン誘導

*北海道大学医学部循環器内科

**東北大学大学院医学系研究科環境保健医学分野

***北海道大学大学院医学研究科機能薬理学

**** 同 電子科学研究所超分子分光

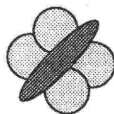
Acellular Hemoglobins



Unmodified bovine Hb
 MW: 64,500 da
 MetHb: 1.2%
 P50: 25.2 mmHg



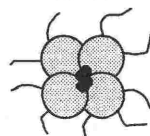
Pyridoxalated human Hb
 MW: 64,500 da
 MetHb: 1.8%
 P50: 20.3 mmHg



Haptoglobin-bovine Hb complex
 MW: >150,000 da
 MetHb: 1.0%
 P50: <1.8 mmHg



Crosslinked human Hb
 MW: 64,500 da
 MetHb: 1.5%
 P50: Not determined.

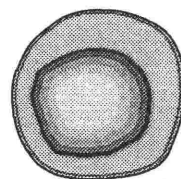


PEG-Hb (PHP, Ajinomoto)
 MW: >90,000 da
 MetHb: 9.8%
 P50: 22.6 mmHg

Cellular Hemoglobins



Liposome-Hb (NRC, Terumo)
 Size: 180-240 nm
 MetHb: 3.4%
 P50: 51.0 mmHg



Human RBC, fixed with glutaraldehyde
 Size: <8.5 μm
 MetHb: <1%
 P50: 2.6 mmHg

図1 現在開発中のヘモグロビン系酸素運搬体と赤血球

表1 人工酸素運搬体として無細胞性ヘモグロビンを用いた製品の開発進展状況

Apex Bioscience 社	PHP (味の素 PEG 修飾 Hb) を用いた敗血症患者における急性低血圧を対象とした臨床第Ⅱ相試験に成功し、第Ⅲ相を計画中
Eli Lilly 社	Somatogen 社「rHb 1.1」を用いる外科手術における臨床試験を中止
Northfield Laboratories 社	出血性ショックに対し成人血液量の60%に相当する重合 Hb「PolyHeme™」を無作為投与する臨床第Ⅲ相試験認可を EDA より取得
Somatogen 社	「Optro®」(rHb 1.1) による心臓バイパス手術の臨床第Ⅲ相試験を開始 (Baxter Healthcare 社が買収、継続中)
Baxter Healthcare 社	心臓バイパス手術における同種血輸血の回避を適応として、分子内架橋型 Hb「HemAssist™」商業化認可を欧州医薬品庁に申請するも効果が明確ではなく再申請準備中。しかし、外傷性ショックに対する応用への治験中に死亡率の増加が観察され、臨床試験を中止したとの情報がある

体により架橋形成させ、また、Somatogen 社は Asn-108 β → Lys の置換と α 鎖の 1 本化を採用してこの問題を解決している。

Hb 分子内架橋の形成により、血中滞留時間はある程度延長するが、半減期はまだ数時間であり、血中滞留時間をさらに延長するためには、Hb の分子量を大きくする必要がある。味の素は pyridoxal 5'-phosphate を 2,3-DPG 結合部位に結合し、Hb の酸素親和性を低下させた後 (pyridoxalation) に、Hb 分子に polyethyleneglycol (PEG) 鎖を結合させた (PEG 修飾型 Hb)。その結果、血中滞留時間は 10 数時間以上に延長した。また、pyridoxalation 後に Hb 分子間を重合したポリマー

を用いる試みがある (分子間架橋型 Hb)。

HBOC のもうひとつのタイプは、人工脂質のリポソームで Hb を包むリポソーム包埋型 Hb である (図 1)。この細胞性 HBOC はわが国ではテルモが開発中であり、酸素供与能に優れ、またサイズが大きく (180-240 nm)、NO 消去作用に基づく血圧上昇等の循環系の副作用もほとんどない。しかし、免疫担当細胞を活性化し、特に肝臓や脾臓でトラップされて破壊されることから、その際の免疫機能への作用と臓器障害が問題として残されている。

HBOC は米国において数多くの臨床研究が行われてきた^{1,2)}。その際、SFH 投与により、自覚

症状として腹痛、肋骨脊椎角部の疼痛、生理学的反応として除脈、血圧上昇、尿量低下、クレアチニンクリアランス低下、APTT 遅延、Hb 尿が起こることが明らかとなり^{4,6)}、その機序の解明と意義づけが研究の対象となった³⁾。当初、赤血球よりの Hb 精製の際に stroma の一部が残存し、そのなかの lysophosphatidyl choline が副作用の主因とされ⁷⁾、われわれも保存赤血球 stroma 中の lyso 体が、NO の作用を抑制する可能性を報告した⁸⁾。しかし、stroma を限りなく除去した後も血管収縮と血圧上昇が起こることから、HBOC の心血管反応は Hb 分子が NO/EDRF を消去する結果と考えられ、その機序として、われわれは以下に記述する HBOC の血管壁への侵入を想定している。

ヘモグロビンの血管収縮作用

血管内皮依存性の血管弛緩は、EDRF のほか、prostacyclin (PGI₂) と内皮由来過分極因子 (EDHF) によって制御される⁹⁾。EDHF の実体ははまだ未解明であるが¹⁰⁾、EDRF の本態は NO であることが明らかとなっている¹¹⁾。NO は heme と高い親和性を有し、従って Hb により除去・不活性化され、その結果 Hb は内皮依存性の血管弛緩を抑制し、血管収縮を惹起する¹²⁾。この仮説は、Hb による昇圧反応が EDRF 産生阻害剤である N^ω-nitro-L-arginine methylester (NAME) により再現できること¹³⁾、酸素親和性を変えず NO 親和性を抑制した組換え Hb (rHb) は血管収縮作用が小さいこと¹⁴⁾、からも支持される。

しかし、Hb による昇圧反応は極めて少量で惹起され、たとえば覚醒ラットでは分子内架橋型 Hb を 125 mg/kg 投与すれば最大昇圧反応が得られ、投与量を増加してもさらなる血圧上昇はほとんど生じない¹⁵⁾。この際の血中無細胞性 Hb 濃度は、わずか 0.16 g/dL 程であり、一方、末梢血中の赤血球 Hb の濃度は 15 g/dL である。このように極めて微量の無細胞性 Hb が血管収縮を惹起する機序として、赤血球 Hb とは異なった NO/EDRF 不活性化の存在を考える必要がある。

ウサギ大動脈標本で acetylcholine (ACh) による内皮依存性弛緩を観察すると、Hb は濃度依存性に ACh による弛緩作用を抑制する。この血管収縮作用を種々の HBOC で比較したところ¹⁶⁾、無細胞性 Hb による血管収縮反応は、その分子サ

イズ、酸素親和性の違いにもかかわらずほぼ同一の量—反応曲線を示した (図 2)。PEG 修飾型 Hb では若干右に移動し、リポソーム包埋型 Hb および赤血球では量—反応曲線はそれぞれさらに右方移動し、血管収縮活性の弱いことが示された。しかし、Hb 濃度 0.1% 以上では両 Hb 間に差が認められず、in vivo における無細胞性 Hb の強力な血管収縮作用を十分には説明できない。

そこで、各種 Hb を 30 分暴露した後、器官槽内の Hb を洗浄除去し、ACh による弛緩反応を再検討したところ、未修飾 Hb では ACh の弛緩反応が明らかに減弱し、PEG 修飾型 Hb では多少の減弱が認められたものの、リポソーム包埋型 Hb と赤血球では ACh 弛緩反応が維持された (図 3, 4 A)。未修飾 Hb による ACh 弛緩反応抑制には量—反応関係が認められ、また内皮弛緩反応性は時間と共に回復し、可逆的であった。同様な実験を、2% ウシ血清アルブミン (BSA) および平均分子量 73,000 da の 2% dextran 存在下で行った場合、両マクロ分子は Hb による ACh 弛緩反応抑制を明らかに軽減させた (図 4 B)。以上の結果から、無細胞性 Hb による ACh 弛緩反応抑制の機序として、Hb が内皮細胞層から血管標本内に侵入し、標本内部で NO を消去する可能性が示唆され、

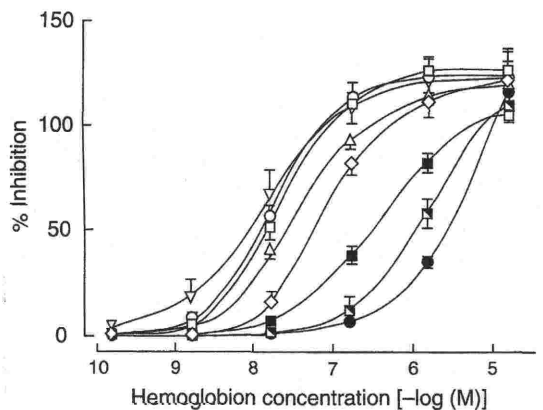


図 2 ウサギ大動脈標本におけるアセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応のヘモグロビン系酸素運搬体および赤血球による抑制。

unmodified Hb (○), pyridoxalated Hb (▽), polyethylene glycol-conjugated Hb (◇), haptoglobin-Hb complex (△), bovine Hb (□), met Hb (■), liposome Hb (■), fixed human red blood cells (●).

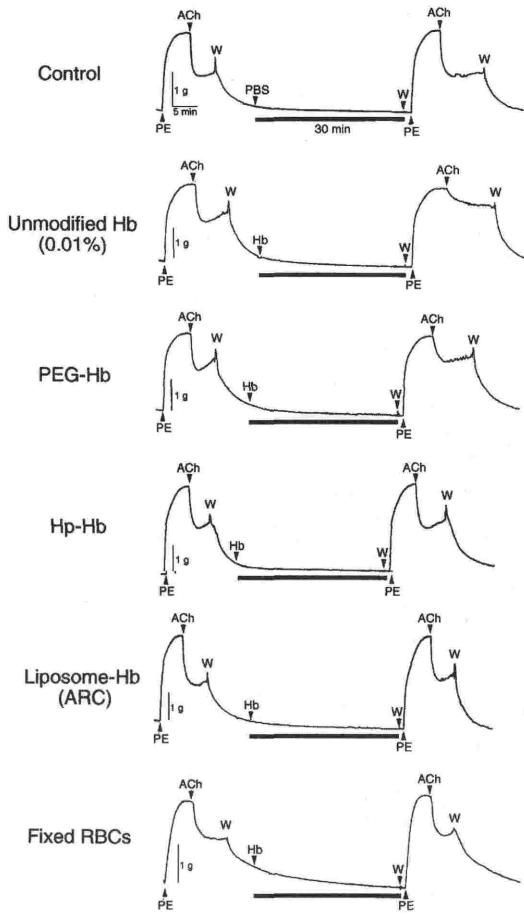


図3 ウサギ大動脈輪状標本に0.01%ヘモグロビン (Hb) 系酸素運搬体および赤血球 (RBC) を30分作用させた, 洗浄 (W) した後のアセチルコリン (ACh) による内皮依存性弛緩反応の変化. PE : phenylephrine, PEG-Hb : polyethylene glycol-conjugated Hb, Hp-Hb : haptoglobin-Hb complex.

BSA および dextran といったマクロ分子は Hb の侵入を阻害するものと推察された。

器官槽実験の欠点は, Hb が血管内皮側のみならず血管切断面および血管外側からも標本と接することである。そこでランゲルドルフ法によるラット心灌流実験を行った。大動脈より逆行性に定流灌流し, 灌流圧をモニターした。また, bradykinin (BK) を少量単回投与し, 血管内皮依存性の弛緩反応を観察した。図5に示すように, 未修飾 Hb および PEG 修飾型 Hb は灌流圧を上昇させたが, その上昇は濃度依存性で, Hb 濃度0.1% (1 mg/mL) で最大値に達した (興味あることに,

Hb 濃度0.1%は動物実験において最大血圧上昇が得られる Hb 濃度にほぼ等しい)。未修飾 Hb の灌流では, いずれの場合も血管収縮を誘導したが, リポソーム型 Hb では Hb 濃度 1% まで血管反応は観察されなかった¹⁷⁾。NAME の添加は灌流圧を上昇させるが, 未処理群および Hb 灌流群いずれの群においても, NAME 添加後の灌流圧上昇はほぼ同じ程度であった。

BK による内皮依存性弛緩反応は, 灌流圧低下の大きさ (amplitude : EDHF による弛緩を反映) と灌流圧低下が半分まで回復する時間 ($T_{1/2}$: EDRF による弛緩を反映) とに分けて解析した¹⁸⁾。本実験では各 HBOC により灌流圧変化と同様の順で $T_{1/2}$ のみが抑制され, この差は NAME 添加後には消失したことから, Hb は BK による EDRF 依存性の反応を抑制するものの, EDHF 依存性の弛緩には影響しないことがわかった。

器官槽実験と同様に, 本灌流実験でも灌流液に BSA を加えその影響を観察しところ, 灌流圧上昇の最大値は BSA の有無にかかわらず一定であったものの, BSA の濃度依存性に Hb による灌流圧上昇が遅延した。これは, BSA がマクロ分子として Hb の血管壁への侵入を抑制したためと解釈される。また, 灌流実験でも分子サイズの大きなリポソーム Hb には血管収縮作用を認めなかった。以上の実験結果は, Hb の血管収縮作用の主要部分は, Hb が内皮細胞層から血管壁内へ侵入し, NO/EDRF を不活性化することによるという仮説を強く支持するものと考えられた (図6)。

ヘモグロビン誘導体の血管内皮透過性

上記の薬理実験より, Hb が血管内皮層から血管壁へ侵入する結果, 血管収縮が惹起されると推察されたことから, HBOC の血管内皮透過性の直接比較を意図し, *in vitro* 透過性実験を行った。ウシ大動脈由来血管内皮細胞をコラーゲンフィルター上に単層培養し, 培養細胞層上に HBOC を加え, 培養細胞層下へ移動する BSA および HBOC を測定した。

その結果, Hb 分子量は BSA にほぼ等しいにもかかわらず, 未修飾 Hb の透過速度は BSA の約 2 倍であった。分子内架橋型 Hb では, 透過性は軽度ながら明らかに低下したが, BSA よりも依然として高く, Hb の高透過性は dimer への解離

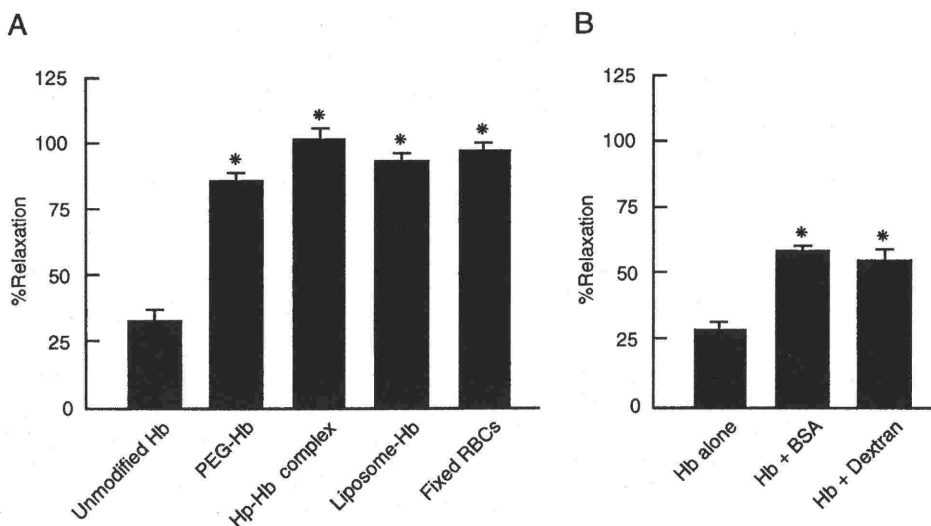


図4 ウサギ大動脈輪状標本に0.01%ヘモグロビン(Hb)系酸素運搬体および赤血球(RBC)を30分作用させた, 洗浄した後のアセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応の前値からの変化(A). ヘモグロビンの弛緩反応抑制に対するアルブミン(BSA)およびデキストラン併存の効果(B). PEG-Hb: polyethylene glycol-conjugated Hb, Hp-Hb: haptoglobin-Hb complex.

性によるものではなく, 分子形状や荷電が大きく影響するものと考えられた. 一方, Hbの分子量を増大させるPEG修飾もしくはハプトグロビンとの結合は透過性を顕著に抑制し, 小さなHb修飾体ほど血管内皮層からの透過性が高く, 血管内から漏出することが示された. なお, PEG-Hbではアミノ基修飾によるため荷電が変わると予想され, またゲルろ過HPLCを用いた検索で, より大きな分子として挙動することが報告されている¹⁹⁾.

以上の実験からも, Hbによる血管収縮作用の機序として, Hb分子が血管内皮層から血管壁に侵入することが重要であり, その程度は分子サイズに依存し, 低分子ほど血管収縮作用の強いことが示唆された(図6). 実際, 血中に投与された分子内架橋型Hbは速やかにリンパ液中に出現すると報告されており²⁰⁾, Hb程度の分子サイズに対して内皮バリアーは完全には機能しないことがうかがえる. また, 分子内架橋型Hbと未修飾Hbはほぼ同じ血管収縮作用を示し, 分子内架橋型HbをPEG修飾することにより昇圧作用は軽減するとされている²¹⁾. これらの報告は, 血管収縮活性と血管内皮透過性がよく符合することを示唆するものである. Hb分子が内皮細胞層から血

管壁に侵入する経路は明確ではないが, Hbが内皮細胞間隙の一部に入り込むことが免疫電顕による検索で既に報告されており²²⁾, 内皮細胞間の間隙から基底膜側に漏出する可能性が最も高いと考えられる. これらの事実をふまえ, 今後血中滞留時間が長く, かつNO除去に基づく血管収縮作用の少ない理想的なHBOCとして, 重合化などにより分子量を巨大化した素材の開発が進められる方向に向かうべきであろう. 表1に示すように, 分子量の小さいHBOCの治験が頓挫したものの, 分子量の大きなHBOCの治験は予定通り進められている事実は, この方針の妥当性を示唆するものと思われる.

ヘモグロビン誘導体の血小板凝集増強作用

HBOCのNO/EDRF不活性化に起因する血圧上昇は持続的であるものの, 上昇の程度は限られている. 従って, 血圧上昇を副作用とみるか, あるいは出血性ショックなどで血圧回復にむしろ有用であると考えられるかは, HBOCを投与する状況に依存すると考えられる. また, エンドトキシンショックでは誘導型NO合成酵素から産生される過剰NOにより, 著明な低血圧が生じるが, HBOCはNO不活性化により循環動態を回復させ

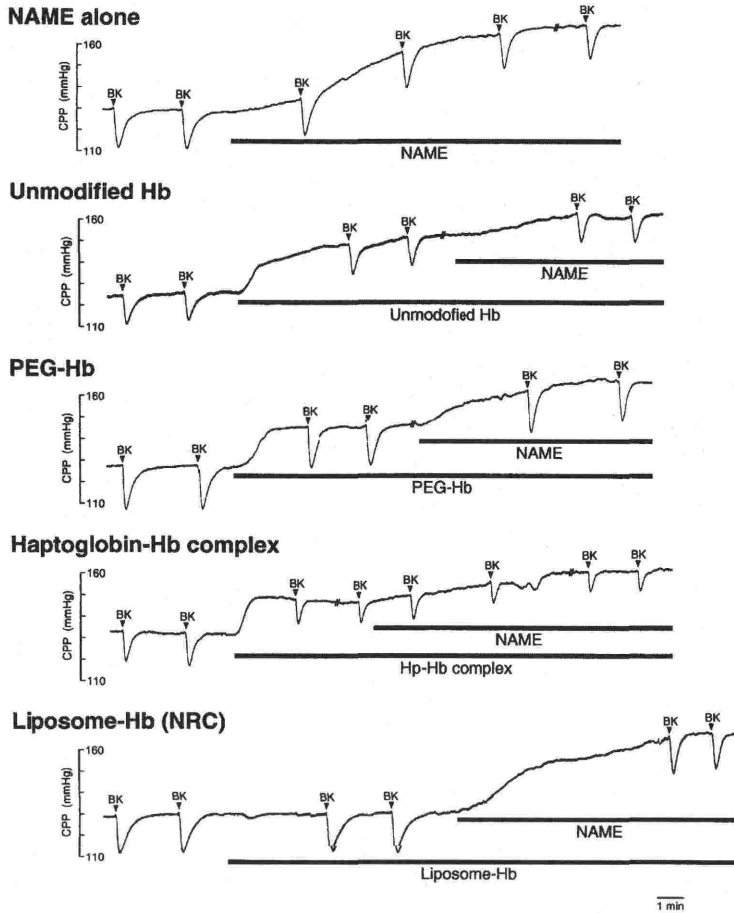


図5 ラット摘出心の冠灌流圧 (CPP) およびブラジキニン (BK) 10 pmol 投与による内皮依存性冠拡張に対する、0.1%ヘモグロビン (Hb) 系酸素運搬体および100 μ M N^ω-nitro-L-arginine methylester (NAME) の作用。PEG-Hb : polyethylene glycol-conjugated Hb.

ることが知られている。

HBOCのNO不活性化に起因する副作用として、ヒトでの臨床試験の際に報告されたものとして腹痛がある²³⁾。これは、NOが非アドレナリン・非コリン作働性 (NANC) 神経における伝達物質であり、腸管平滑筋弛緩作用を惹起するが、その作用をHBOCが抑制する結果と考えられている²⁶⁾。機能的には食道括約筋弛緩の抑制、食道蠕動性収縮の亢進、胆管収縮などが認められている。

NOは血小板のguanylate cyclaseを活性化し、細胞質内cGMP濃度を上昇させて、血小板凝集および粘着を抑制する。そのため、HBOCはNO/EDRFを不活性化する結果、血小板凝集を増強する可能性がある²⁵⁾。実際Olsenらはラット頸

動脈の内皮剥離モデルを用い、アメリカ陸軍製のcross-linked Hbを投与した場合、内皮剥離部への血小板集積の増強が起こることを報告している²⁸⁾。このようなNO/EDRFの不活性化に基づく血小板凝集の増強は、特に血小板凝集の亢進が病態に関与する動脈硬化、脳梗塞、糖尿病などを有する患者へHBOCを投与する際に問題となり、しかも血小板は流血中に浮遊しているため、前述のようにHBOCのサイズを大きくしても回避できない可能性がある。

Hbを用いるHBOCの分子設計上、これらNANC神経への作用や血小板凝集増強の問題を回避することが可能なものとして、Stamlerが提唱したS-nitroso-Hb (SNO-Hb)²⁷⁾の利用がある。

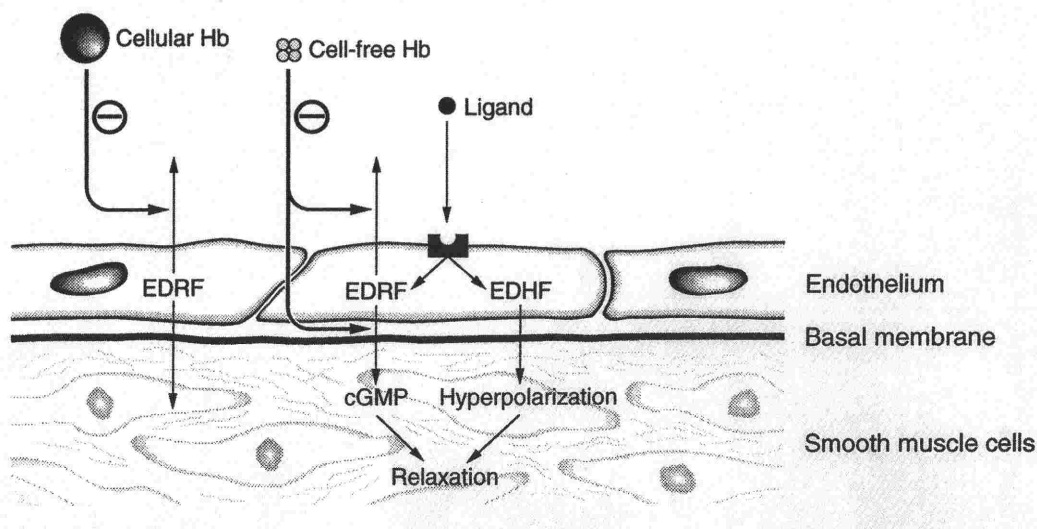


図6 血管内におけるヘモグロビン系酸素運搬体によるNO/EDRF不活化の機序。

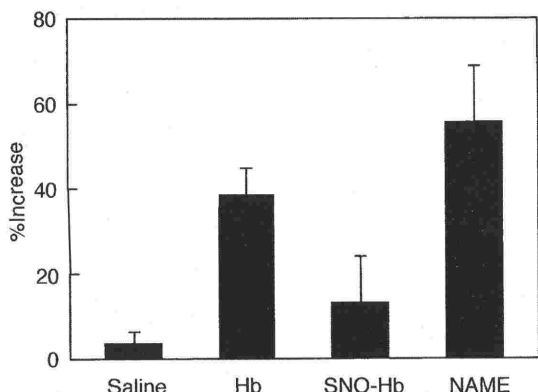


図7 ラット大腿静脈より、生理食塩水 (Saline), stroma free Hb (Hb) 125 mg/kg, S-nitroso-Hb (SNO-Hb) 125 mg/kgもしくはN^ω-nitro-L-arginine methylester (NAME) 10 mg/kgを投与した際の平均血圧の変化。SNO-Hbの純度 (SH基にNOの付いている割合) は約40%である。

SNO-Hbは、Hbのβ鎖のSH基をニトロソ化したものであり、NOを放出できるNO供与体としての性質を有する²⁸⁾。実際、SNO-Hbを合成し、ラットに投与すると血圧上昇はわずかであり(図7)、ex vivoの血小板凝集が抑制された(図8)²⁹⁾。現在、われわれは各種HBOCをS-ニトロソ化した新たな分子種を創作し、その性質・生理機能を検索している。それらはNO/EDRFを不活性化せず、血中滞留時間が長いなど、人工赤血球として

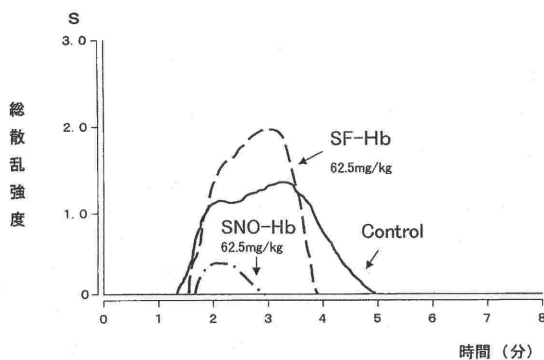


図8 ラットへstroma free Hb (SF-Hb) もしくは S-nitroso-Hb (SNO-Hb) を静注した後に採取した血小板のADP 2 μMによる凝集(レーザー散乱法により観察した小凝集)の変化。

臨床応用可能なHBOCとなる可能性がある。

今後の人工赤血球・人工酸素運搬体開発の展望

HBOCの研究は赤血球輸血代替を意図して開始され、一部は心臓手術時の体外循環を適応とし、欧州で医薬品申請する段階まで到達したものの、副作用発生により開発が頓挫した状態にある。我が国においても、人工赤血球・人工酸素運搬体については、基礎・臨床を含め共同研究が進められている。しかし、従来のHBOCではNO/EDRF不活性化に由来する血管収縮、腸管収縮さらに血小板凝集増強などの副作用が惹起され、今後

HBOC分子のさらなる改良が必要と考えられる。その方策のひとつはHBOC分子の巨大化であり、さらにS-ニトロソ化の応用が期待される。

また、本稿では言及しなかったが、人工酸素運搬体としては以前よりフルオロカーボンが候補として研究されてきた。フルオロカーボンは赤血球輸血代替には、酸素供与能が低いことと、副作用の問題から臨床応用は困難な状態となっている。しかるに臓器保存の観点から、われわれは利用可能と考えており、その基材改良を含め、現在開発を進めている。

文 献

- 1) 関口定美：人工酸素運搬体としての人工血液の開発と臨床応用。日本臨床 55：2439-2446, 1997
- 2) 岩下雄二：酸素運搬体臨床研究の現況。人工臓器 26：920-926, 1997
- 3) Loscalzo J：Nitric oxide binding, the adverse effects of cell-free hemoglobins: What makes us different from earthworms. J Lab Clin Med 129：580-583, 1997
- 4) Tsuchida E：Introduction: Overview and prospectives. In: Tsuchida E, ed. Artificial red cells. Materials, performances and clinical study as blood substitutes. John Wiley & Sons Ltd Chichester, 1995, pp. 1-20
- 5) Savitsky JP, Doczi J, Black J, et al：A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. Clin Pharmacol Ther 23：73-80, 1978
- 6) White CT, Murray AJ, Greene JR, et al：Toxicity of human hemoglobin solution infused into rabbits. J Lab Clin Med 108：121-131, 1986
- 7) Nakai K, Sekiguchi S：Quality control of stroma-free hemoglobin. In: Tsuchida E, ed. Artificial red cells, John Wiley & Sons, New York, 1995, pp. 131-149
- 8) Nakai K, Matsuda N, Ohta T, et al：Lysophosphatidylcholine, a component of stromal phospholipids, as a candidate vasoconstrictive factor present in stroma-free hemoglobin. Artif Organs 18：198-205, 1994
- 9) 佐久間一郎, 深尾充宏, 北嶋 顕：EDHFと循環調節。呼吸と循環 44：605-613, 1996
- 10) Fukao M, Hattori Y, Kanno M, et al：Evidence against a role of cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolites in endothelium-dependent hyperpolarization by acetylcholine in rat isolated mesenteric artery. Br J Pharmacol 120：439-446, 1997
- 11) 佐久間一郎：血管弛緩因子としてのNO。実験医学 9：1347-1351, 1991
- 12) Motterlini R, Vandegriff KD, Winslow RM：Hemoglobin-nitric oxide interaction and its implications. Transfusion Med Rev 10：77-84, 1996
- 13) Ulatowski JA, Nishikawa T, Matheson UB, et al：Regional blood flow alterations after bovine fumaryl β β -crosslinked hemoglobin transfusion and nitric oxide synthase inhibition. Crit Care Med 24：558-565, 1996
- 14) Eich RF, Li T, Lemon DD, et al：Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. Biochemistry 35：6976-6983, 1996
- 15) Malcolm DS, Hamilton IN, Schultz SC, et al：Characterization of the hemodynamic response to intravenous diaspirin crosslinked hemoglobin solution in rats. Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol 22：91-107, 1994
- 16) Nakai K, Ohta T, Sakuma I, et al：Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: Comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. J Cardiovasc Pharmacol 28：115-123, 1996
- 17) Nakai K, Usuba A, Ohta T, et al：Coronary vascular bed perfusion with a polyethylene glycol-modified hemoglobin-encapsulated liposome, Neo Red Cell, in rats. Artif Organs 1998 (in press).
- 18) Sakuma I, Asajima H, Fukao M, et al：Possible contribution of potassium channels to the endothelin-induced dilation of rat coronary vascular beds. J Cardiovasc Pharmacol 22 (Suppl. 8)：S232-S234, 1993
- 19) Iwashita Y：Pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP) as an oxygen carrier. Artif Organs Today 1：89-114, 1991
- 20) Bleeker WK, Van Der Plas J, Feitsma RIJ, et al：In vivo distribution and elimination of hemoglobin modified by intramolecular cross-linking with 2-nor-2-formylpyridoxal 5'-phosphate. J Lab Clin Med 113：151-161, 1989
- 21) Nolte D, Botzlar A, Pickelmann S, et al：Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: A study on safety and toxicity. J Lab Clin Med 130：314-327, 1997
- 22) Milici AJ, Bankston PW：Fetal and neonatal rat intestinal capillaries: permeability to carbon, ferritin, hemoglobin, and myoglobin. Am J Anat 165：165-186, 1982
- 23) Viele MK, Weiskopf RB, Fisher D：Recombinant human hemoglobin does not affect renal function in humans: analysis of safety and pharmacokinetics. Anesthesiology 84：848-858, 1997.
- 24) Rattan S, Rosenthal GJ, Chakder S：Human recombinant hemoglobin (rHb1.1) inhibits nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve-mediated relaxation of internal anal sphincter. J Pharmacol Exp Ther 272：1211-1216, 1995
- 25) Hogan JC, Lewis MJ, Henderson AH：In vivo EDRF activity influences platelet function. Br J Pharmacol 94：1020-1022, 1988
- 26) Olsen SB, Tang DB, Jackson MR, et al：Enhancement of platelet deposition by cross-linked hemoglobin in a rat carotid endarterectomy model. Circulation 93：327-332, 1996
- 27) Stamler JS, Jia L, Eu JP, et al：Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. Science 276：2034-2037, 1997
- 28) Pawlosky JR, Swaminathan RV, Stamler JS：Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. Circulation 97：263-267, 1998
- 29) Sakuma I, Nakai K, Togashi H, et al：Effects of cell free S-nitrosohemoglobin in vivo on blood pressure, platelet aggregation and plasma NO₂⁻/NO₃⁻: Comparison with those of cell free hemoglobin. Nitric Oxide 2：128, 1998