

E. 結論

外国人研究者との研究打ち合わせにより(1)レーザー散乱光を用いた高感度血小板凝集能測定装置を使い血小板凝集能に及ぼす人工赤血球の影響について検討を重ね、意見交換を継続していくこと、

(2)フローサイトメーターを用いて高感度に血小板活性化を測定する技術の開発を継続し、血小板活性化に及ぼす人工赤血球の影響について検討を重ね、意見交換を継続していくこと、(3)抗血小板薬を使用した虚血性心疾患患者の凝固系、線溶系蛋白質の発現変化を共同で研究し、またドイツ人と日本人での反応の違いを比較し、人工赤血球使用時の血小板活性化を低減する戦略を共同で研究していくことを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 藤井ひとみ、藤井 聡、仲井邦彦、佐久間一郎、北畠 顕、劔物 修：赤血球代替物性能評価の方法の開発と臨床試験並びに大量出血が予測される高リスクな麻酔症例の診断と対策。人工血液 1999; 7 (1): 7-15.

3. Ogawa T, Nomura A, Komatsu H, Fujii S, Urasawa K, Okamoto H, Kitabatake A: Fibromuscular dysplasia involving coronary arteries. *Angiology* 1999; 50: 153-156

4. Sakamoto T, Woodcock-Mitchell J, Marutsuka K, Mitchell JJ, Sobel B, Fujii S: Tumor necrosis factor- α and insulin, alone and synergistically, induce plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipocytes. *Am J Physiol* 1999; 276: C1391-1397

5. Okada H, Shatos MA, Doherty JM, Sobel BE, Fujii S: Induction of urokinase type plasminogen activator from human cerebral microvascular endothelial cells by tumor necrosis factor- α . *Coronary Artery Disease* 1999; 10: 437-442

6. Goto D, Fujii S, Zaman T, Sakuma I, Gao M, Koyama T, Mitchell J, Woodcock-Mitchell J, Sobel BE, Kitabatake A. Long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats modulates coronary capillary network remodeling. *Angiogenesis* 1999; 3: 137-146

7. Togashi H, Sakuma I, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Sato H, Kitabatake A: S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycol-conjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat. *The biology of nitric oxide part 7*. Moncada S, Wilkum P, Gustaffson L and Higgs EA eds, Portland Press, London. (in press)

8. Sakuma I, Togashi H, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Sato H, Kitabatake A. Nitric oxide scavenging effects of hemoglobin injected intravenously into spontaneously diabetic rats on blood pressure and platelet aggregation. *The biology of nitric oxide part 7*. Moncada S, Wilkum P, Gustaffson L and Higgs EA eds, Portland Press, London. (in press)

9. 藤井 聡、石森直樹、綿野敬子：糖尿病性血管障害における線溶系異常の解析と特異的薬物療法の開発 代謝異常治療研究基金業績集 1999; 26: 62-66

10. 石森直樹、葛西瑞穂、綿野敬子、藤井聡、北畠 顕、岩渕 和也、小野江和則、千葉仁志：脂質代謝における骨髓由来細胞の関与—apoE ノックアウトマウスを用いた検討 リポ蛋白研究会誌 1999; 22: 27-31

11. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、坂之上淳、藤井 聡、吉岡充宏、佐藤 洋、北畠 顕：人工血液の設計とガス状メデイエーター 集中治療 1999; 5: 477-485

12. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、坂之上淳、藤井 聡、吉岡充宏、佐藤洋、北畠 顕：ヘモグロビンと一酸化窒素との相互作用を考慮したヘモグロビン系酸素運

搬体の設計 人工血液 1999; 7: 4-44

13. 藤井 聡、北島 顕 :新しい動脈硬化危険マーカーとその意義 フィブリノーゲン、vWF、PAI-1 Progress in Medicine 1999; 19: 1864-1868

14. 藤井 聡、北島 顕 :心室リモデリングと心不全への進展 臨床医 1999; 25: 1643-1648

15. 北島 顕、藤井 聡 :血栓症の大規模臨床試験 2. 心臓 a 虚血性心疾患 血栓と循環 1999; 4: 61-62

16. 藤井 聡、北島 顕 凝固系と線維素溶解系の血管医学への応用 :最近の展開血管と内皮 2000 (in press)

2. 学会発表

1. Sakamoto T, Sobel B, Fujii S: Augmentation of plasminogen activator inhibitor type-1 in adipocytes by glucose: implications for diminished fibrinolysis in obese insulin-resistant subjects. *Europ Heart J* 1999; 20: suppl 73

2. Togashi H, Sakuma I, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Sato H, Kitabatake A. S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycol-conjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica* 1999; 167 (S645): 12.

3. Sakuma I, Togashi K, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Sato H, Kitabatake A. Nitric oxide scavenging effects of hemoglobin injected intravenously into spontaneously diabetic rats on blood pressure and platelet aggregation. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1999; 167 (S645): 39.

4. Fujii S, Kaneko T, Matsumoto A, Furumoto T, Sugawara T, Okada H, Kitabatake A: Fibrinolytic system and endothelial function: a potential link between atherothrombosis and vasculopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: A164

5. Sakuma I, Togashi H, Nakai K, Fujii

S, Yoshioka M, Sato H, Kitabatake A. S-nitrosylated polyethylene glycol conjugated hemoglobin: a new oxygen carrier and nitric oxide donor. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: A177

6. Furumoto T, Saito N, Fujii S, Mikami T, Kitabatake A. Antihypertensive therapy does not improve endothelial dysfunction in patients with high plasma levels of inflammatory markers. *Hypertens Res* 2000; 23: 74

7. 藤井 聡、佐久間一郎、葛西瑞穂、北島 顕、仲井邦彦、佐藤 洋、富樫広子、吉岡充弘、藤井ひとみ、釧物 修 :血小板 GPIIb-IIIa 活性化と α 顆粒放出に対する温度とヘモグロビン系酸素運搬体の影響. 第2回北海道血栓・血小板研究会. 1999.1.29. 札幌

8. 富樫広子、仲井邦彦、佐久間一郎、藤井 聡、北島 顕、吉岡充弘 :ヘモグロビン系酸素運搬体のラット循環機能に及ぼす影響. 第72回日本薬理学会. 1999.3.23. 札幌

9. 佐久間一郎、藤井 聡、北島 顕、富樫広子、吉岡充宏、仲井邦彦、佐藤 洋 : S-ニトロソヘモグロビンの人工酸素運搬体としての機能評価. 第20回日本循環制御医学会総会. 1999.5.14. 仙台. 循環制御 20(Suppl): 51, 1999. 人工血液 7(3): 77, 1999

10. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、藤井聡、坂野上淳、田村守、吉岡充弘、佐藤洋、北島顕 : Hemoglobin 修飾体が自然発症糖尿病ラット (OLETF) の循環動態および血小板凝集能に及ぼす影響. 第6回日本血液代替物学会年次大会. 1999.9.10. 東京

11. 藤井 聡、佐久間一郎、葛西瑞穂、仲井邦彦、佐藤 洋、富樫廣子、吉岡充弘、北畠 顕：人口酸素運搬体の血小板活性化に及ぼす影響。第6回日本血液代替物学会年次大会。1999.9.10. 東京。人工血液7(3): 79, 1999

12. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、坂野上淳、藤井 聡、吉岡充弘、田村 守、佐藤 洋、北畠 顕：NO 供与能を有するhemoglobin 誘導体 s-nitroso polyethyleneglycol-conjugated hemoglobin の生体内における性質。第2回日本血管細胞生物学会。1999.9.24. 前橋

13. 仲井邦彦、佐久間一郎、安河内徹、富樫廣子、坂野上淳、藤井聡、吉岡充弘、佐

藤洋、北畠顕. NO 代謝物放出能を有する新しい酸素運搬体の開発 - S-Nitroso-PEG-Hemoglobin の作製. 第37回日本人工臓器学会総会. 1999.10.15. 名古屋

14. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：一酸化窒素供与能を有するヘモグロビン系人工酸素運搬体の開発。第13回日本ME学会秋季大会。1999.10.28. 吹田

15. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：NO 供与能を有する各種hemoglobin 誘導体の生体内における性質。第29回日本心血管作動物質学会。2000.2.5. 福岡。血管23(1): 10, 2000

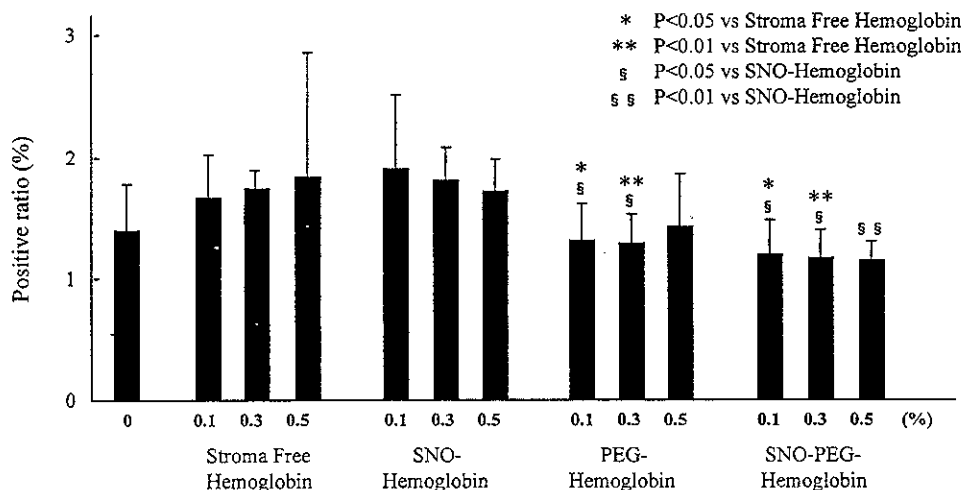


図1. 各種ヘモグロビン誘導体による血小板 IIb/IIIa 発現量の変化

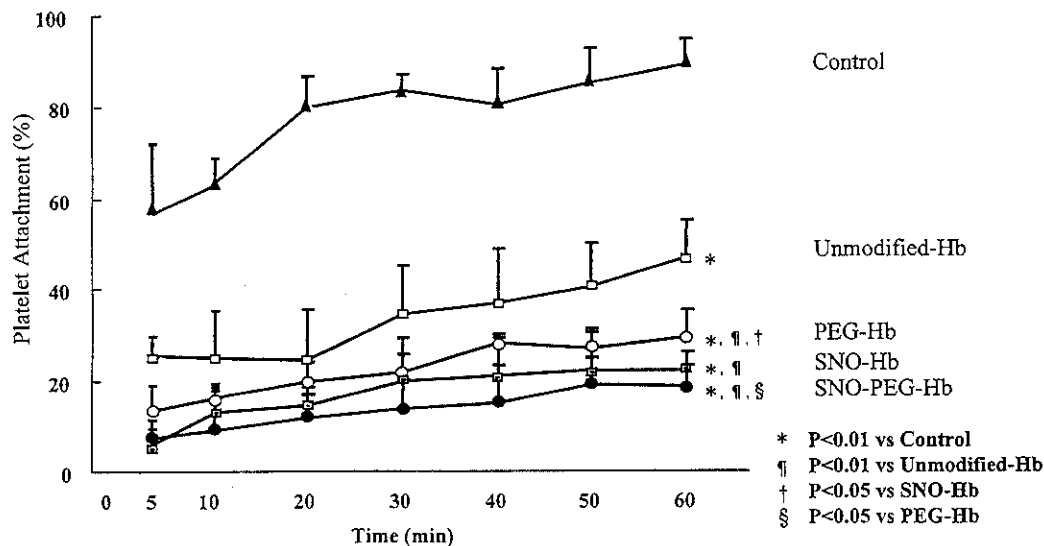


図2. ガラス板への血小板の接着に対する各種ヘモグロビン誘導体の影響

分担研究報告書

酸素運搬機能を有する人工赤血球の開発に関する研究

分担研究者 仲井邦彦 東北大学大学院医学系研究科環境保健医学助教授

研究要旨 昨年度に継続して s-ニトロソポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン (SNO-PEG-Hb) の作成を実施し、共同研究者への供給を行った。品質管理の体制を整えるべく、ロット管理、品質管理表を添付した。次ぎに基礎研究として、ヘモグロビン (Hb) によるアラキドン酸代謝を解析し、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾を行っていない Hb により極性が高い代謝物が生成すること、少なくともその代謝物は PGE 系の代謝物ではないことを確認した。ラットにて血中半減期を再評価し、Hb 自体の血中半減期は 15 時間、SNO 部分は約 4 時間と長く、SNO-PEG-Hb は緩慢に SNO を放出する性能があり、低分子 SNO 供与体とは大きく異なることが判明し、それが SNO-PEG-Hb の血管作働性の特徴の 1 つと考えられた。

A. 研究目的

セルフリーHb 修飾体を用いた酸素運搬体の開発は、欧米で臨床試験の最終段階にあるものの、一昨年 of Baxter 社の失敗を契機に、有効性ではなく安全性を中心に見直しの気運が生じ、特に生体適合性について FDA は基準を厳しくし、フェーズ 3 の臨床数を 600 例程度まで引き上げた。これまでに、Hb に起因する副作用として、血管収縮、腸管収縮、血小板活性化が確認され、さらに FDA は Hb 投与後に生ずる大量のヘム処理に関わる酸化ストレスを懸念している。このような状況の中で、我々が目的としているところの、Hb の副作用を軽減した修飾体の開発はまさに適切な戦略であったと考えられる。本年度は、その研究のレベルアップを目標に、まず定期的な SNO-PEG-Hb の供給を行うことを目標に、品質管理を実践した。次に、FDA が特に注目している酸化ストレスとヘムとの関連性を明らかにするために、独自にアラキドン酸代謝に及ぼす影響の解析を

進めた。さらに、有効性と安全性と密接な SNO-PEG-Hb の血中半減期の再評価を行い、SNO-PEG-Hb の物性の確定を実施した。

B. 研究方法

1) SNO-PEG-Hb 製造

製法は昨年度と同様である。Hb はヒト期限切れ赤血球から限外ろ過法により作成した。ただし、今年度は原料となる赤血球製剤の入手に苦勞し、多くの血液センター、特に宮城県赤十字血液センター、旭川赤十字血液センターのお世話になったことを記したい。NO 供与体として、亜硝酸およびグルタチオンより自家製造したニトロソグルタチオンまたは Dojindo 製ニトロソグルタチオンを使用した。Hb 濃度 50 μ M とし、0.1 M リン酸緩衝液 (0.5 mM EDTA) 中にて NO 供与体と室温で混合した。Hb と NO 供与体のモル比は 1 : 5-10 とした。場合によっては、メト化率を下げるためにモル比を一定のまま、希釈

して製造を行った。

蛋白質結合 NO の解析は、試料を HPLC ゲルろ過カラム (Eicompak GFC-200 または TSK-GEL SW4000XL) を用いて移動相 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5)、0.1 mM EDTA にて分離、ポストカラムにて 1.75 mM HgCl₂ を混和、ついで 1% sulfanilamide、0.1% N-naphthylethylenediamine、2%リン酸により亜硝酸を発色させ 540 nm の吸光度より定量した。

Hb への PEG 修飾は、日本油脂製サンブライト DEAC-30HS (平均分子量 2956 のアミノ基結合型修飾剤) を用い、50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) にて、Hb 濃度 0.25 mM、Hb (テトラマー) と PEG 修飾剤のモル比 1:20 で氷温下 2 時間反応させた。この PEG-Hb への NO 付加は NO 供与体としてニトロソグルタチオンを用い、室温で 10 時間反応させた。

2) Hb によるアラキドン酸代謝

上記と同様に SNO-PEG-Hb を作成し、あわせてその途中生産物である、SNO-Hb、PEG-Hb を作成した。また、作成時の Hb と SNO-SG 比を変えて、SNO 化率の異なる SNO-PEG-Hb を準備した。アラキドン酸代謝は、非細胞系にて、Hb 濃度 0.1 から 1.0 μM、pH 7.4 のリン酸系緩衝液、NADPH 有りなしの各種条件にて、適当量のラジオアイソトープ標識アラキドン酸を含む 0.1 mM のアラキドン酸と室温で 10 分間反応させ、生成物を有機溶媒抽出し、油層を回収し乾固、移動相にて再溶解し逆相液体クロマトグラフィーにて分離、ポストカラムにてシンチレーターと混和し、放射能をカウントした。解析は、添加した標識アラキドン酸の放射能を 100% とし、そのうちのどの程度が代謝物領域に回収されるかを見た。

3) SNO-PEG-Hb の物性

SNO-PEG-Hb の血中半減期を確定するため、Wistar または Brown Norway ラットを使用し、下腿動静脈にカニューレ装

着、SNO-PEG-Hb を 125 mg/kg で投与後に経時的に採血し、血漿中の SNO-PEG-Hb を上記と同様に HPLC にて分析した。

C. 研究結果

1) SNO-PEG-Hb 製造

NO 付加-NO 供与体として、ニトロソグルタチオンを NO 供与体とした場合、Hb とのモル比が 1:10 以下であれば室温で 12 時間反応させても Hb メト化は認められず、NO は Hb のシステイン残基に選択的に結合した。メト化は Hb 濃度が低いほど小さく抑えられるものの、製造効率を考慮して、メト化率 10% を基準に作成を行った。この条件で SNO 化率は 30-80% まである程度制御可能であったが、メト化率と製造規模 (具体的には Hb 濃度が規定され、それによって製造で使用するボトルのサイズが規定された) を検索し、SNO 化率 30-40% を供給試料の基準とした。試料は、最終的にろ過滅菌し、Hb 濃度 10%、生理食塩水透析後に、35 mL サイズの無菌試験管に分注し、冷凍状態で出庫した。

2) Hb によるアラキドン酸代謝

各 Hb 修飾体によるアラキドン酸代謝の典型的な結果を、Fig. 1 に示す。今回使用した移動相は、主に非極性代謝物を分解する系とし、HETE 類の分析を主として行ったが、Hb による代謝物は主により極性が高い領域、図中では保持時間がより短いフロント部分に多くの放射能が見いだされ、添加した総カウントを 100% とした場合、未修飾 Hb では極性領域に 2.77%、SNO-Hb では 2.44%、一方、PEG-Hb では 0.84%、SNO-PEG-Hb では 1.56% であった。Fig. 1 から明らかなように、Hb により極性物質が増加し、PEG 化により減少するものの、ニトロソ化では大きな変化は見られなかった。この点を確認するために、ニトロソ化率の異なる修飾物にて同様の実験を行ったが、やはり差は認められなかった。この酸化反応において

NADPH の関与を検討したが、差は見られなかった。ヒト Hb 以外にも、ウシ Hb を準備し同様に行ったが、近似的な結果であった。

Hb により生成したアラキドン酸代謝物の同定は、適当な標識された市販標準物質がないために、容易ではない。現在の所、1)生成されたアラキドン酸代謝物を抽出し、バイオアッセイにてその活性を検証する(血小板活性化作用があるかどうか)、2)代謝物の候補として、プロスタグランジン F₂ α またはその 8-iso 体をまずは念頭に置いて、酵素免疫アッセイを確立し、微量定量を試みる、の 2 点が考えられる。特に 8-iso 体については、酸素運搬体研究ではなく病態生理学的な研究分野において最近注目を浴びており、生体内で非酵素的に生成され様々な生理作用を示すことが報告されている。血小板に対する作用については必ずしも十分なデータ蓄積はないものの、若干の作用があるとする報告が見られる。この点については、すでに市販の EIA キットを用いた検討を行ったが、Hb または PEG-Hb での生成は確認されず、今のところ否定的であった。

3) SNO-PEG-Hb の物性

SNO-PEG-Hb を含むラット血漿の典型的な液クロのチャートを Fig. 2 に、その結果に基づく血中半減期の推定を Fig. 3 に示す。PEG 化された Hb 自体の血中半減期は約 15 時間、一方、SNO 体の半減期はおよそ 4 時間と推定された。従って、SNO-PEG-Hb は比較的長い半減期を有する NO の緩徐な放出キャリアーであることが判明した。

D. 考察

昨年度と同様に中規模スケールでの製造を実施し、共同実験施設にて安定な実験データを得ることが可能となった。科学としての分野での新規発見はないものの、品質管理を試行し、lot に基づく管理を一元化し実験の客観性の保証に貢献したと考

えられた。今年は特に共同実験者以外の他施設にも供給を行っており、実験体制の信頼度を上げることに寄与したものと確信する。

Hb による血小板活性化が分担研究者佐久間らの実験で確認され、その機構の解明が待たれる。Hb は NO を除去し、また NO は血小板抑制に作用する重要な因子であることから、血小板活性化には Hb による NO が重要と推測される。しかし、Hb によって活性酸素が生成し血小板を活性化する可能性も否定できない。そこで、活性酸素が生成するならばアラキドン酸代謝がまず影響を受けると考えられるため、Hb による *in vitro* アラキドン酸代謝を解析した。その結果、予想通り Hb にはアラキドン酸代謝能が確認され、興味あることに、SNO 化では抑制できないが、PEG 化により抑制される傾向が認められた。アラキドン酸代謝活性が、ニトロソ化ではなく PEG 化によって抑制された点については、研究打ち合わせでデューク大学スタムラー博士、エイベック社クリストファー博士と議論し、以下の可能性が示唆された。すなわち、ヘムには以前から peroxxygenase 活性があると考えられているが、Hb は酸化するとヘムが Hb 分子から脱落、そのヘムが peroxxygenase 活性によりアラキドン酸代謝を進め極性代謝物を生成する。一方、Hb の PEG 化によりそのアラキドン酸代謝活性は抑制されるが、クリストファー博士らの未発表データでは、Hb の PEG 化により Hb からのヘム脱落が顕著に抑制されることが見いだされているという(遊離ヘムが生体内で活性酸素を生成し、酸化ストレスを惹起するのではという FDA の質問に対する、彼らの社内実験データ)。すなわち、PEG 化は Hb のメト化を抑制は出来ないが、メト化に伴う遊離ヘムの生成を抑えることが可能とのことであった。従って、PEG 化はヘム脱落を回避し間接的にアラキドン酸代謝への関与を抑制したものと推測された。PEG

化の当初の目的は、Hb の分子量を増大し、腎系球体および血管内皮間隙からのHb分子漏出を抑制し、血中半減期を延長することにある。今回の実験は、PEG 化が Hb による血小板活性化という副作用を抑制する上でも貢献していることを示唆し、PEG 化のあらたな役割を示すものと考えられた。PEG 化の効果について、さらに慎重に検証を進める必要がある。

一方、NO は 2 価 Hb、さらに 3 価 Hb とも親和性があり、ヘムと容易に結合する。ヘムへの NO 結合により、ヘムに依存するアラキドン酸代謝活性もまた抑制されるのではないかと考えられたが、Hb のニトロソ化では効果は見られなかった。この点については、ニトロソ Hb から遊離する NO 関連物質は NO そのものとする報告もあるが、NO そのものではなく NO⁺ とする説もある。今回、ヘムの代謝活性を抑制できなかったことを考慮すると、少なくとも今回の試験管内環境では NO ではなく別の NO 関連物質として分解が進んでいるものと推測された。

今回の実験データは、アラキドン酸代謝物の構造をまだ決定していないという意味で、未だ予備的な実験データに過ぎない。しかし、Hb によってアラキドン酸代謝が進み、PEG 化によって抑制可能という実験結果は新しい事実であり、また PEG 化修飾体の新しい可能性を強く示唆する成績である。今後、継続研究によって Hb によるアラキドン酸代謝活性と、その血小板活性化との関連性を深く追求し、その意味づけを行いたい。

最後に、SNO-PEG-Hb の物性について、一般的に低分子 SNO 体の半減期は短い。例えば、試験管内における SNO 体の半減期は、SNO-アルブミンで 10 時間以上であるが、SNO-penicillamine で 14 分、SNO-cysteine で 60 分、SNO-glutathione で 2.7 時間とされており、一般的に高分子蛋白質に結合したもののほど半減期は長い。血中では金属イオンが存在し分

解も早く、さらに血管外への放出によりさらに加速されると推定される。従って、血管内投与される低分子 SNO 体のドナーとしての薬物は短寿命の作用である。さらに、このような低分子薬物は容易に血管外漏出し、いたるところで SNO を放出すると想定される。一方、今回の実験でも確認されたが、SNO-PEG-Hb の SNO 半減期は血中でも 4 時間であり、かつ Hb に PEG 化が行われており血管外漏出せず、そのために比較的長い寿命を持つことが確認された。このことは、Hb 修飾体の副作用を SNO 化により回避するという戦術を考える際に極めて有用であり、かつ緩徐な SNO 放出能をうまく利用した治療戦術が可能となり新たな酸素治療の可能性が示唆された。SNO-PEG-Hb は、PEG 化と SNO 化を同時に行った新しい Hb 修飾体である。今回の解析により、PEG 化の新しい効能としてヘムに関わる酸化ストレスの軽減作用が示唆され、また SNO 化では緩徐な SNO 放出が新たな特徴として確認された。SNO-PEG-Hb は酸素治療を目指す上で新しい基材となりうるということが確認された。

E. 結論

SNO-PEG-Hb の中規模製造に取り組み、それなりに品質管理を行った試薬の供給を実現した。基礎検討では、SNO-PEG-Hb の物性面で解析を行い、PEG 化の新しい効能としてヘムに関わる酸化ストレスの軽減作用が示唆され、また SNO 化では緩徐な SNO 放出が新たな特徴として確認された。以上から、SNO-PEG-Hb は酸素治療を目指す上で新しい基材となりうるということが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、坂野上淳、藤井聡、吉岡充弘、佐藤洋、北畠顕：人工血液の設計とガス状メディエータ。

集中治療 5(5):477-485, 1999

2. 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、北畠 顕:ヘモグロビンと一酸化窒素との相互作用を考慮したヘモグロビン系酸素運搬体の設計. 人工血液 7(2): 40-44, 1999

3. 仲井邦彦:酸素治療および赤血球代替物の安全性ならびに有効性評価基準に関するワークショップに参加して. 人工血液 7(4):112-116, 1999.

4. Sakanoue J, Tamura M, Nakai K, Sakuma I, Kitabatake A. Redox states of cerebral tissues of rats substitutes by the liposome-encapsulated hemoglobin. In Oxygen Transport to Tissues XXI. Eke A, Delpy DT. eds. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, pp27-33, 1999

5. Togashi H, Sakuma I, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A. S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycol-conjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat. In: Moncada S, Wilkum P, Gustaffson L, Higgs EA, eds. The Biology of Nitric Oxide, Part 7. Portland Press, London, 2000 (in press)

6. Sakuma I, Togashi H, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A. Nitric oxide scavenging effects of hemoglobin injected intravenously into spontaneously diabetic rats on blood pressure and platelet aggregation. In: Moncada S, Wilkum P, Gustaffson L, Higgs EA, eds. The Biology of Nitric Oxide, Part 7. Portland Press; London, 2000 (in press)

7. Sakanoue J, Tamura M, Nakai K, Sakuma I, Satoh H, Kitabatake A. Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the polyethyleneglycol-conjugated hemoglobin. In: Swartz H, Dunn J, eds. Oxygen Transport to Tissue

XXII. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000 (in press)

2. 学会発表

1. Ichiro Sakuma, Kunihiro Nakai, Hiroko Togashi, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: Effects of S-Nitroso-hemoglobin on Blood Pressure, Platelet Aggregation and Brain $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ Level. 41st Annual World Congress-ICA'99 International College of Angiology, 1999.7.8. Sapporo, Japan

2. Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Kunihiro Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: Nitric oxide scavenging effects of hemoglobin injected intravenously into spontaneously diabetic rats on blood pressure and platelet aggregation. Biology of Nitric Oxide 6th International Meeting, 1999.9.5. Stockholm, Sweden, Acta Physiologica Scandinavica 1999; 167 (S645): 39.

3. Hiroko Togashi, Ichiro Sakuma, Kunihiro Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycol-conjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat. Biology of Nitric Oxide 6th International Meeting, 1999.9.5. Stockholm, Sweden, Acta Physiologica Scandinavica 1999; 167 (S645): 12.

4. Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Kunihiro Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: S-nitrosylated polyethylene glycol-conjugated hemo-globin: a new oxygen carrier and nitric oxide donor. International Society for Heart Research the 16th Annual Meetig of the Japanese Section, 1999.12.1. Fukuoka, Japan, J Mol Cell Cariol 1999; 31: A177

5. 藤井 聡、佐久間一郎、葛西瑞穂、北畠 顕、仲井邦彦、佐藤 洋、富樫広子、

- 吉岡充弘、藤井ひとみ、釧物 修：血小板 GPIIb-IIIa 活性化と α 顆粒放出に対する温度とヘモグロビン系酸素運搬体の影響。第2回北海道血栓・血小板研究会。1999.1.29. 札幌
6. 仲井邦彦、佐久間一郎、富樫廣子、坂野上淳、田村守、吉岡充弘、佐藤洋、北畠 顕：S-nitrosohemoglobin を応用した酸素運搬体の分子設計とその生理作用。第11回代用臓器研究会。1999.2.26. 札幌
7. 富樫廣子、仲井邦彦、佐久間一郎、藤井 聡、北畠 顕、吉岡充弘：ヘモグロビン系酸素運搬体のラット循環機能に及ぼす影響。第72回日本薬理学会。1999.3.23. 札幌
8. 佐久間一郎、藤井 聡、北畠 顕、富樫廣子、吉岡充宏、仲井邦彦、佐藤 洋：S-ニトロソヘモグロビンの人工酸素運搬体としての機能評価。第20回日本循環制御医学会総会。1999.5.14. 仙台。循環制御 20(Suppl): 51, 1999
9. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井聡、坂野上淳、田村守、吉岡充弘、佐藤洋、北畠 顕：Hemoglobin 修飾体が自然発症糖尿病ラット (OLETF) の循環動態および血小板凝集能に及ぼす影響。第6回日本血液代替物学会年次大会。1999.9.10. 東京。人工血液 7(3): 77, 1999
10. 藤井 聡、佐久間一郎、葛西瑞穂、仲井邦彦、佐藤 洋、富樫廣子、吉岡充弘、北畠 顕：人口酸素運搬体の血小板活性化に及ぼす影響。第6回日本血液代替物学会年次大会。1999.9.10. 東京。人工血液 7(3): 79, 1999
11. 坂野上淳、田村 守、仲井邦彦、佐藤洋、佐久間一郎、北畠 顕：近赤外分光法を用いた脱血ショック下における polyethyleneglycol-conjugated s-nitrosohemoglobin の酸素運搬能の評価。第6回日本血液代替物学会年次大会。1999.9.11. 東京。人工血液 7(3): 79, 1999
12. 福島昭二、西尾琢也、岸本修一、竹内由和、仲井邦彦、佐久間一郎、坂野上淳、佐藤洋、北畠 顕：O/W 型パーフルオロカーボンエマルジョンの新規調整法の開発と体内動態制御。第6回日本血液代替物学会年次大会。1999.9.11. 東京。人工血液 7(3): 85, 1999
13. 仲井邦彦、佐久間一郎、富樫廣子、坂野上淳、田村守、吉岡充弘、佐藤洋、北畠 顕：S-Nitroso-Polyethyleneglycol-Hemoglobin 誘導体の開発。第6回日本血液代替物学会年次大会。1999.9.11. 東京。人工血液 7(3): 83, 1999
14. 坂野上淳、田村 守、仲井邦彦、佐藤洋、佐久間一郎、北畠 顕：近赤外分光法を用いたヘモグロビン系人工酸素運搬体の酸素運搬機能の評価。第38回日本ME学会北海道支部大会。1999.9.18. 札幌
15. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、坂野上淳、藤井 聡、吉岡充弘、田村 守、佐藤 洋、北畠 顕：NO 供与能を有する hemoglobin 誘導体 s-nitroso polyethyleneglycol-conjugated hemoglobin の生体内における性質。第2回日本血管細胞生物学会。1999.9.24. 前橋。
16. 仲井邦彦、佐久間一郎、安河内徹、富樫廣子、坂野上淳、藤井聡、吉岡充弘、佐藤洋、北畠 顕。NO 代謝物放出能を有する新しい酸素運搬体の開発 - S-Nitroso-PEG-Hemoglobin の作製。第37回日本人工臓器学会総会。1999.10.15. 名古屋
17. 福島昭二、西尾琢也、岸本修一、竹内由和、仲井邦彦、佐久間一郎、坂野上淳、佐藤洋、北畠 顕。O/W 型パーフルオロカーボンエマルジョンの新規調製法の開発と体内動態制御。第37回日本人工臓器学会総会。1999.10.15. 名古屋
18. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：一酸化窒素供与能を有するヘモグロビン系人工酸素運搬体の開発。第13回日本ME学会秋季大会。1999.10.28. 吹田
19. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤

井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：
 NO 供与能を有する各種 hemoglobin 誘
 導体の生体内における性質。第 29 回日本
 心血管作動物質学会。2000.2.5. 福岡。血
 管 23(1): 10, 2000
 20. 佐久間一郎、福島昭二、仲井邦彦、北
 畠顕。カレントコンセプト「人工酸素運搬
 体（赤血球）開発の現況」フルオロカーボ
 ンの開発。日本医工学治療学会第 14 回学
 術大会。2000.2.26. 東京。医工学治療

12(Suppl.1): 64, 2000

G. 知的所有物の取得状況

1. 特許取得

北畠 顕、佐久間一郎、仲井邦彦、安河内
 徹（出願人：北海道大学総長、日本油脂株
 式会社）一酸化窒素代謝物-ポリオキシア
 ルキレン-ヘモグロビン結合体。1999 年
 2 月国内特許申請：特願平 11-067239。
 2000 年 2 月国際特許申請中。

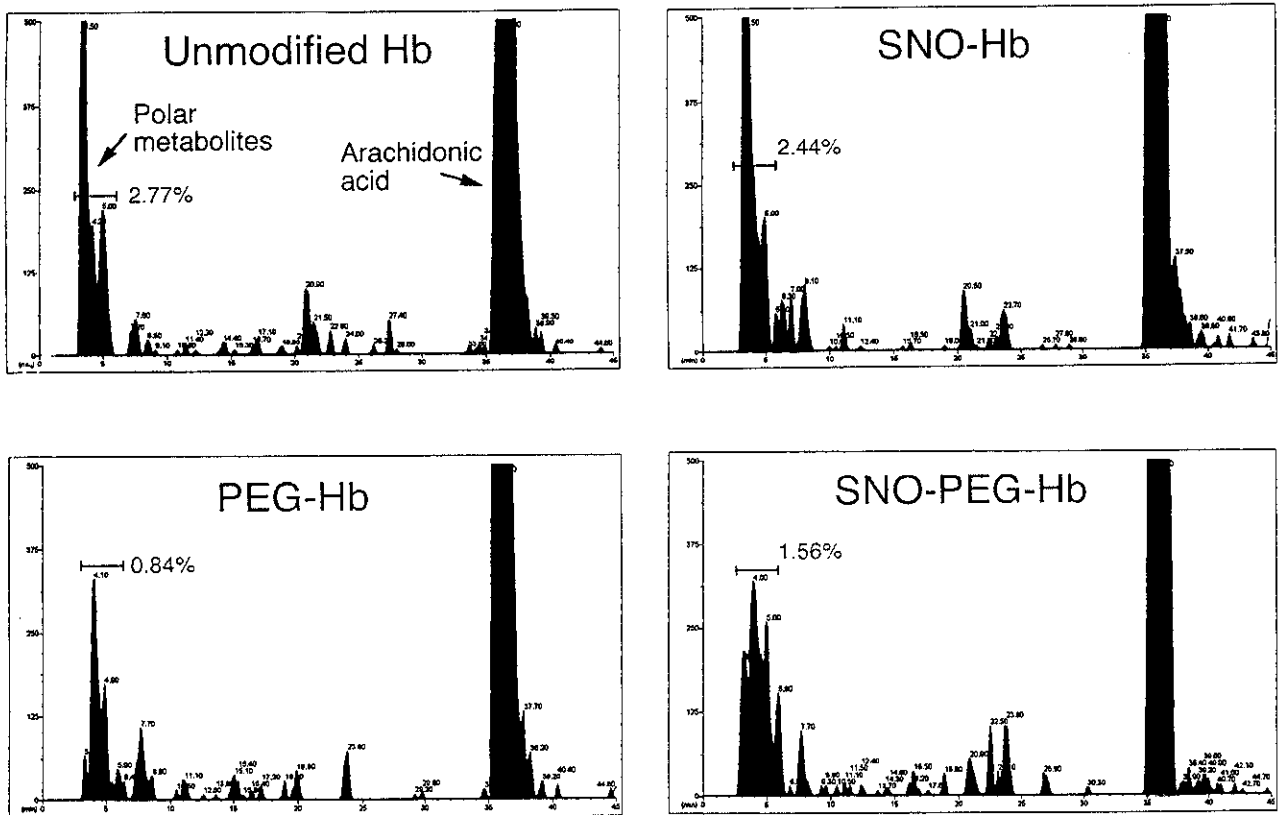


図 1. Hb、PEG-Hb、SNO-Hb、SNO-PEG-Hb によるアラキドン酸代謝。

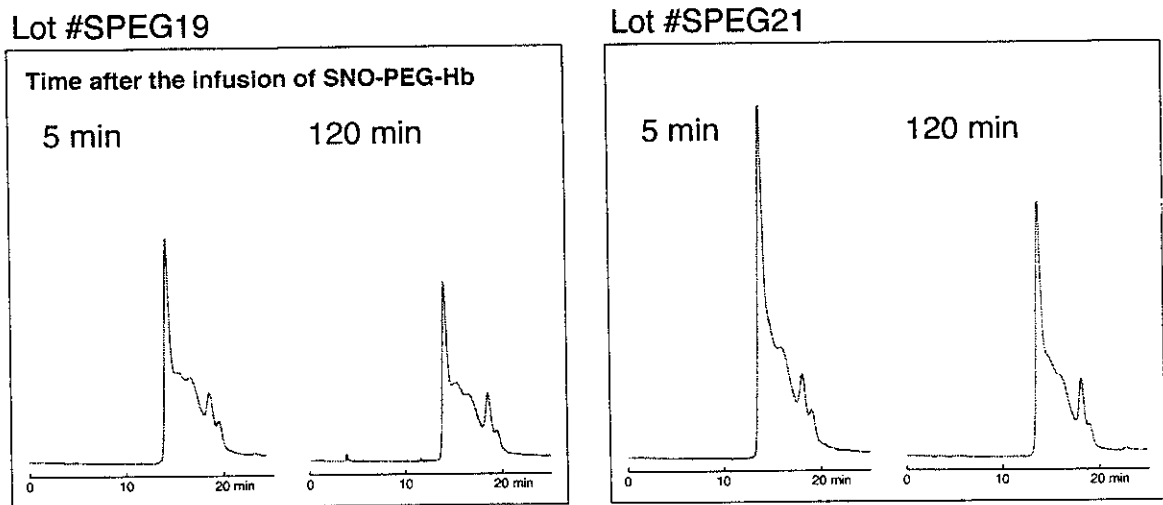


図 2. SNO-PEG-Hb 投与後の典型的な HPLC チャート. 投与量は 125 mg/kg.

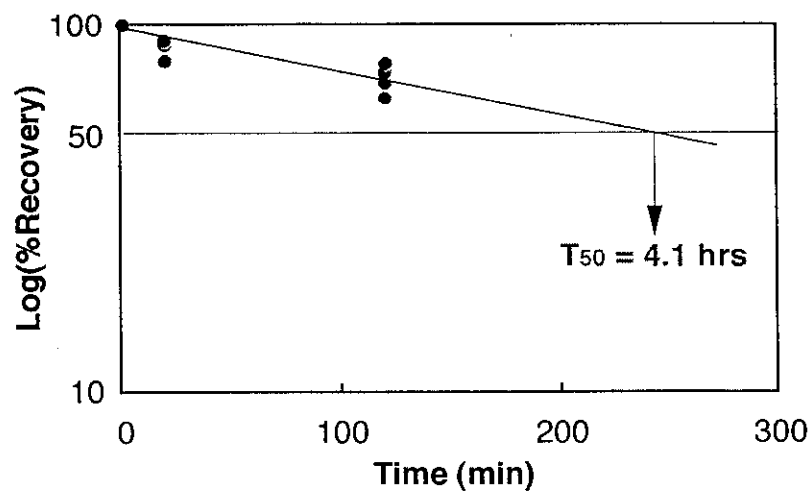


図 3. SNO-PEG-Hb ののニトロソ部分の血中半減期. なお、SNO-PEG-Hb の Hb 部分の血中半減期は 15 時間と算定される.