

## Oxyhemoglobin 血管攣縮作用機序の基礎的研究

藤田 雄三・新宮 正・山田 謙慈・荒木 攻  
松永 守雄・森 和夫\*・河野 輝昭\*

### Noxious Free Radicals Derived from Oxyhemoglobin as a Cause of Prolonged Vasospasm

YUHZO FUJITA, TADASHI SHINGU, KENJI YAMADA, OSAMU ARAKI,  
MORIO MATSUNAGA, KAZUO MORI\* and TERUAKI KAWANO\*

*Department of Neurosurgery, Kurashiki Chuo Hospital, Okayama 〒710*

*\*Department of Neurosurgery, Nagasaki University*

#### Summary

Oxyhemoglobin (oxyHb) is postulated as the most potent trigger of prolonged vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage, while methemoglobin (metHb) is much less potent. It is unknown whether or not oxyHb may directly act upon the vessel wall in subarachnoid hemorrhage. OxyHb may be responsible for vasoconstriction not directly but indirectly through superoxide anion radical ( $O_2^-$ ) derived from auto-oxidation of oxyHb.

Generation of  $O_2^-$  and activity of superoxide dismutase (SOD) was studied in the incubated whole blood or washed erythrocyte of human artery under the condition simulated to subarachnoid hemorrhage.

Results indicated that generation of  $O_2^-$  and activity of SOD were preserved during incubation for 8 days at 37°C. The preserved SOD activity might indicate that  $O_2^-$  does not react directly upon the vessel wall to bring about vasoconstriction. It was suggested that other noxious free radicals or active oxygen dismutated from  $O_2^-$  might participate in prolonged vasoconstriction.

The phasic changes of oxyHb on the course of auto-oxidation was analyzed with electron spin resonance (ESR). The characteristic changes of ESR signals of ferric protein compound from high to low spin corresponded to the changes from oxyHb to superoxide metHb, metHb and hemichrome during the incubation period. These changes were observed in the cerebrospinal fluid from patients who suffered from prolonged vasospasm after subarachnoid hemorrhage.

OxyHb may participate in prolonged vasoconstriction indirectly.

**Key words: vasospasm, oxyhemoglobin, superoxide anion, electron spin resonance**

#### I はじめに

総説<sup>1)</sup>によれば脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血後に見られるいわゆる late spasm の発生の引き金として oxyhemoglobin (oxyHb) がもっとも疑わしく、その他動

脈壁の損傷、血管運動神経の関与、イオン環境の変化の因子は補助的因子として作用しているものと推測されている。OxyHb が血管攣縮に関与するとすれば、どのような機序によるものかきわめて興味深い。本研究はその機序が oxyHb 直接の作用ではなく、その酸化過程に発生す

倉敷中央病院脳神経外科

\*長崎大学脳神経外科

〔連絡先：〒710 倉敷市美和1-1-1, 倉敷中央病院脳神経外科, 藤田雄三〕

1979年9月10日 受稿

る有害なラジカルの血管壁に対する作用であろうと想定し、1:クモ膜下出血に似せた *in vitro* の環境で oxyHb の自動酸化に伴って発生すると言われる superoxide anion ( $O_2^-$ )<sup>13)</sup> が検出されるかどうか、2: $O_2^-$  が直接に血管に作用しているのか、あるいは統発する他のラジカルの作用に起因するのかどうか、3:Hb の構造上の変化と  $O_2^-$  発生との関係を spectrophotometer 以外の方法でより詳細に知りうるかどうかを検討することを目的として以下の実験を行った。

## II 実 験

実験 I-1: ヒト動脈血赤血球からの  $O_2^-$  発生について ヒトおよび哺乳動物の oxyHb からの  $O_2^-$  発生についてすでに Brunori ら<sup>3)</sup>, Weber ら<sup>24)</sup> によって報告されているが、いずれも反応系から  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  を無害化する酵素 superoxide dismutase (SOD)<sup>11)</sup>, catalase<sup>16)</sup>, peroxidase<sup>16)</sup> などを除いた oxyHb あるいはその subunits<sup>19)</sup> を分離したものをを用いている。SOD, catalase を含む全血の溶血液からの  $O_2^-$  発生の有無は知られていない。

ヘパリン採血のヒト動脈血 ( $O_2$  飽和度 99%) を等張食塩水にて洗浄、遠沈 (3,000 g 15 min) を 5 回繰り返して赤血球を得た。得られた赤血球を瞬間凍結、溶解し、遠沈 (3,000 g 15 min) した後、その溶液部分を測定材料とした。5 ml の 0.4 M acetate buffer (pH 5.5) に SOD 活性を阻止するために diethyldithiocarbamate (DDC)<sup>6)</sup>  $10^{-3}M$  を添加したもの、添加しないものに溶血液 0.1 ml を加え、 $37^\circ C$ , 1.5 時間 preincubation した後、adrenaline  $10^{-7}M$  を加えて、incubation を行いながら発生する adrenochrome を 475 nm で測定した<sup>22)</sup>。Adrenochrome の産生は Fig. 1 に示すように  $O_2^-$  を介する反応で  $O_2^-$  の量に比例する。Fig. 1 はこの結果で DDC を加えると adrenochrome の産生をみる。グラフに示していないが、DDC を加えない場合に短時間ではほとんど adrenochrome の産生をみない。この結果から新鮮な動脈赤血球の溶血液から  $O_2^-$  が発生するが、SOD が活性である場合きわめて短時間 ( $2 \times 10^6 M^{-1} sec^{-1}$ )<sup>17)</sup> に dismutate されるであろうことを示している。

実験 I-2: 孵置動脈赤血球と  $O_2^-$  発生能について

実験 I-1 に用いた洗浄赤血球あるいは、全血をヒト脳脊髄液 (CSF) または生理食塩水と 1:1 に混合し、 $37^\circ C$  にて 7 日および 15 日間無菌的に孵置した。測定にはこの混合液を瞬間凍結し、含まれる赤血球を溶解溶血したものを遠沈し、溶液部分を材料として用いた。 $O_2^-$  の発生は  $O_2^-$  による 6-hydroxydopamine (6-OHDA) の quinoidal product 産生量を指標とした<sup>7)</sup>。

資料 0.5 ml を 10 ml の 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5) ( $10^{-4}M$  EDTA を含む) に加え preincubation (90 min) し、それに  $2 \times 10^{-4}M$  の 6-OHDA を加えて発生する quinoidal product を 490 nm で 60 分間経時的に測定した<sup>7)</sup>。

結果を Fig. 2 に示した。SOD 活性を阻止するために preincubation に  $10^{-3}M$  DDC を加えたものと加えないものを比較した。DDC を加えない群では quinoidal product はほとんど変化しないが、DDC を加え SOD を阻止した群では増加するもの (軽度、中等度、著しい増加) と、あまり変化のみられないものがある。この差は特に全血の場合血餅形成のためサンプリングに均一性がないためか、赤血球内の  $O_2^-$  発生能の差によるものと思われる。そこで産生される quinoidal product の量を 6-OHDA 添加後 15 分と 60 分に限ってその資料に含まれる total hemoglobin 量との相関をみたのが Fig. 3 である。DDC を加えていない群の 15 分、60 分後ともに quinoidal product 産生量と Hb 量との間に有意の逆相関があり、一方 DDC を加えた群の 60 分後では高い正の相関が認められる。Hb と quinoidal product との間にみられる逆相関は SOD が Hb と同様に赤血球細胞質中に含まれるものであるため<sup>1)</sup>、溶血とともに赤血球から放出されること、Hb 量が多ければそれだけ SOD 活性量が多いため quinoidal product が産生されるのが阻止されていることを示している。DDC を加えると正の相関がみられることは、DDC が SOD 阻害剤であるので<sup>6)</sup>、quinoidal product の産生が明らかに  $O_2^-$  に比例していること、また Hb と密接な関係を有することが明らかである。さらに長時間の孵置後にもかかわらずヒト動脈血赤血球中にはなお SOD 活性があり、 $O_2^-$  も発生していることを示している。さらに、新鮮血を同様に発生した  $O_2^-$  が速やかに  $H_2O_2$  に dismutate されていることになる。

Fig. 2 にみられるように著しく  $O_2^-$  の発生している資料が認められる。このような資料では単に溶血液量が多いことによるばかりでなく、 $O_2^-$  が発生しやすい Hb の構造上の変化を伴うことが示唆される。Fig. 4 で示すように superoxide metHb を介して  $O_2^-$  が発生すると考えられていることから、spectrophotometer のみではこの過程が十分に解明され難いと述べられている<sup>18)</sup>。OxyHb と superoxide metHb, metHb と hemichrome の構造上の差と  $O_2^-$  発生の差を検討すべく以下の実験を行った。

実験 II: 赤血球の電子スピン共鳴シグナル (ESR) の測定

測定条件: 日本電子製 JES FE1X 電子スピン共鳴装置を用い、9.15 GHz,  $3,259 \pm 2,500$  pulse,  $-195^\circ C$  の条

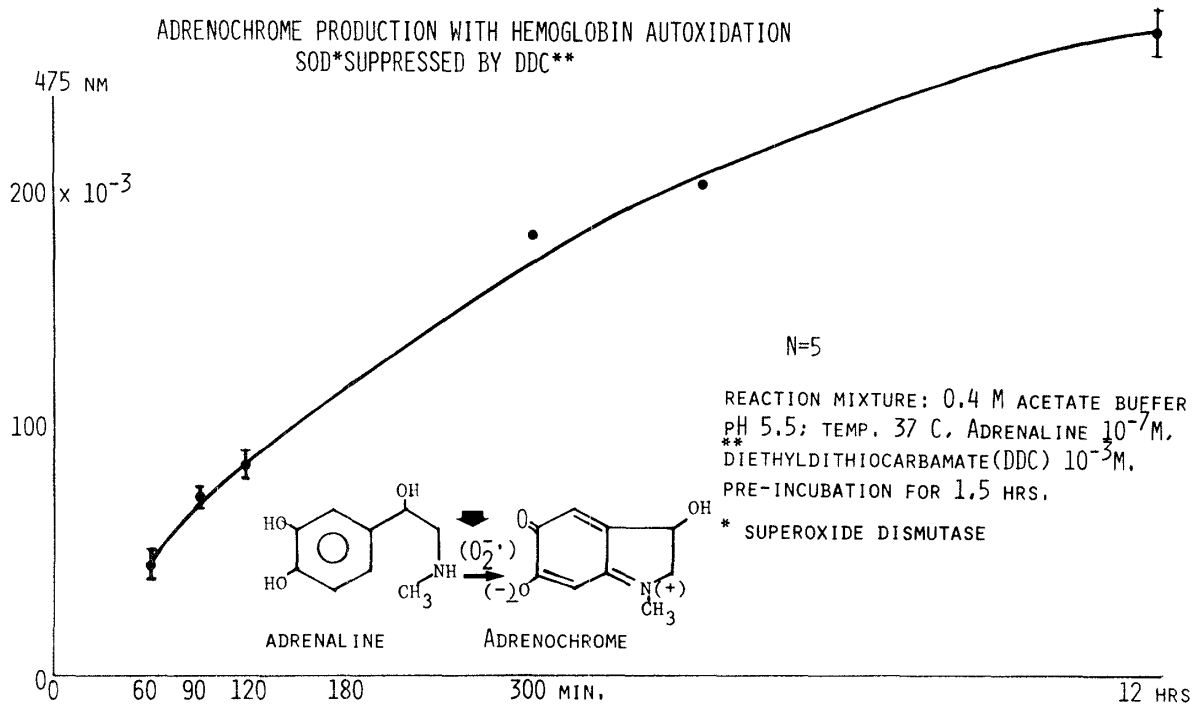


Fig. 1 Adrenochrome production from adrenaline is paralleled to the generation of superoxide anion as shown in the formula. Adrenochrome concentration is demonstrated after inhibition of superoxide dismutase (SOD) with diethyldithiocarbamate in the incubated fresh arterial blood.

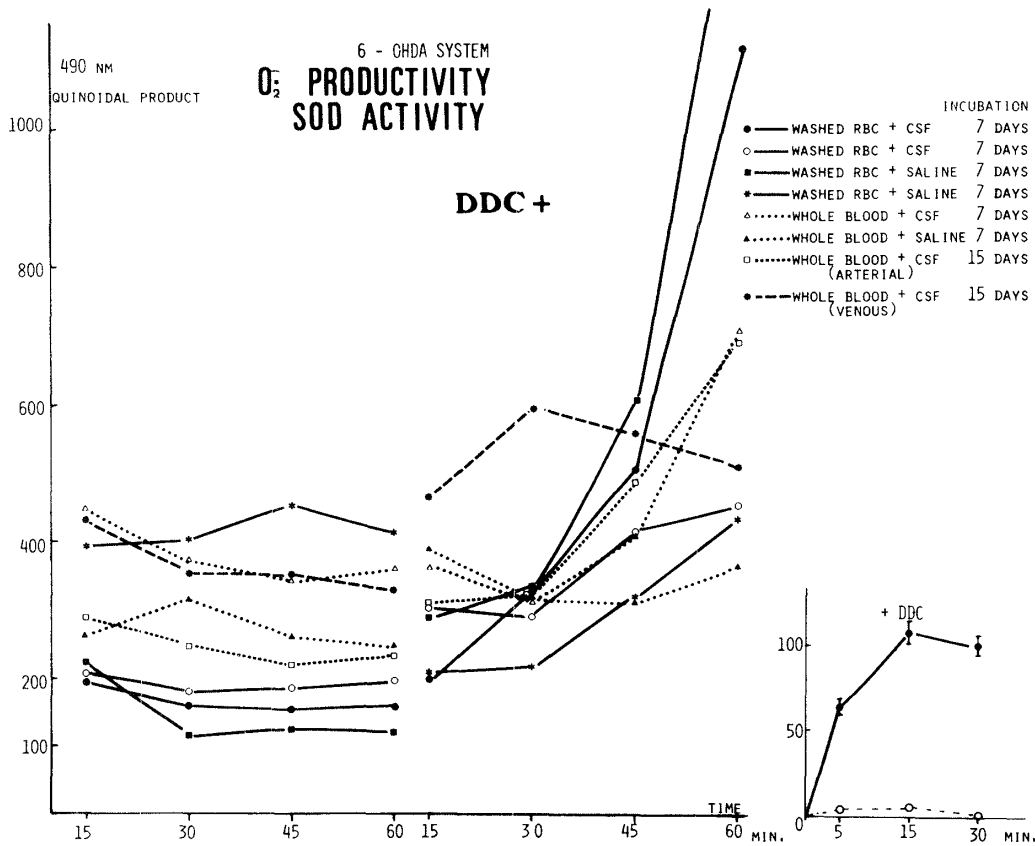


Fig. 2 Quinoidal product from 6-OHDA through superoxide anion of the incubated arterial blood with cerebrospinal fluid or saline solution for 8 or 15 days at 37°C.

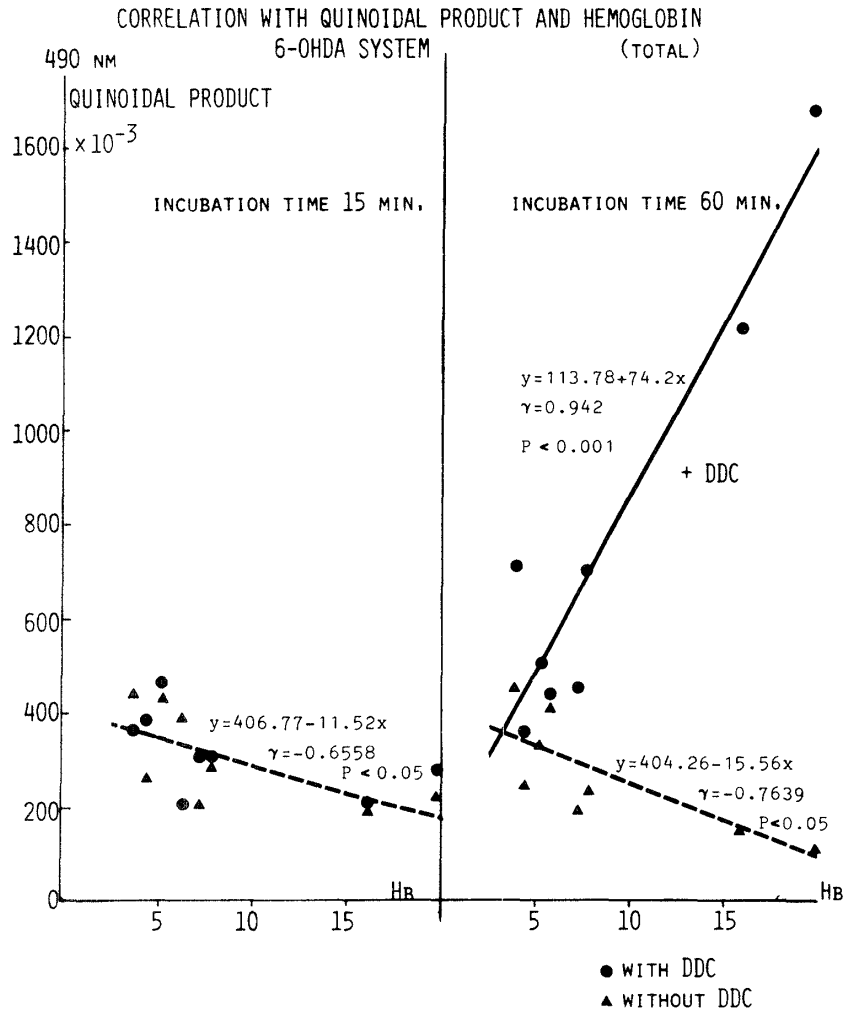


Fig. 3 Correlation curves between total hemoglobin (Hb) and quinoidal production concentration in the experiment shown in Fig. 2.

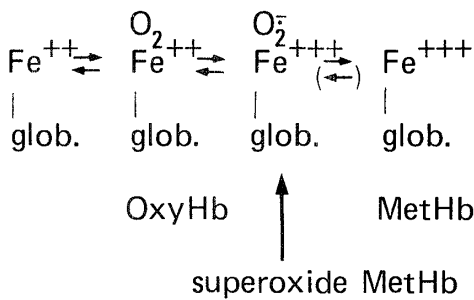


Fig. 4 Schema of superoxide anion generation through auto-oxidation of oxyhemoglobin.

件で測定した。

Fig. 5 はヒト血清、動脈血赤血球、全血、脳脊髄液の ESR シグナルである。g = 2.003 のフリーラジカル<sup>2)</sup>の近傍にシグナルを認めるが、これは種々のラジカル<sup>2)</sup>シグナルの合成されたもので、即 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 由来のフリーラジカルシグナルとはいいい難い。

血液と CSF あるいは生理食塩水との混合液の孵置後

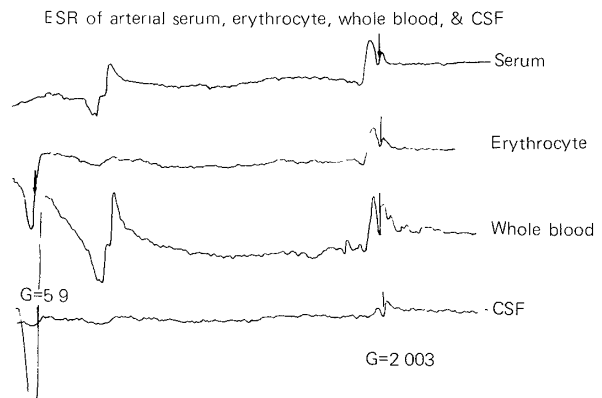


Fig. 5 Signals of electron spin resonance (ESR) of whole blood, serum, erythrocyte, and cerebrospinal fluid (non-hemorrhagic). Vertical lines indicate g values.

に発生する quinoidal product を測定したと同じ資料を用いて ESR シグナルの変化を経時的に観察したのが Fig. 6 で、g = 5.9, 2.58, 2.16, 1.82 に特徴的シグナ

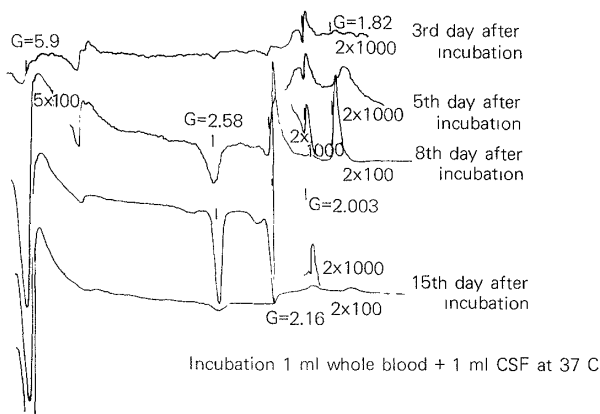


Fig. 6 ESR signals of incubated whole blood with cerebrospinal fluid for 3, 5, 8, and 15 days at 37°C.

ルを見る。OxyHb は非磁性で ESR シグナルを有しない。3 価の鉄を含む蛋白 (metHb) は常磁性で, high spin は  $g = 6$ ,  $g = 2$  に, low spin は  $g = 2.58$ ,  $2.16$ ,  $1.82$  にシグナルを有し, 後者は hemichrome あるいは metHb-OH のシグナルとされる<sup>8)19)20)</sup>。

Spectrophotometer と ESR を用いて oxyHb の subunits (oxyHb<sub>α</sub>, oxyHb<sub>β</sub>) や oxyHb A, oxyHb H の酸化の過程を分析し, oxyHb からの O<sub>2</sub> 発生は high spin から low spin に変化する時に発生すること (同時にまた spectrophotometer では superoxide metHb の特徴的スペクトルをとらえることができなかったことも) を報告している<sup>19)</sup>。Fig. 7 は 3 日間解置した同一動脈血を一度 ESR 測定し, 3, 5 時間後再々 ESR を測定したものである。ESR は -196°C 下で測定されるために, 資料は繰り返し凍結, 融解されるので赤血球は完全に崩壊, 溶血する。測定の間は室温にもどされるため oxyHb は自動酸化する。この図で示される ESR シグナルの変化は 37°C 下で長期間解置され, 溶血し, 含まれる oxyHb が酸化すると同様の变化が短時間に起こっているものと理解される。この資料のシグナルには high spin の出現, low spin の出現, 増加すなわち high/low spin 値の低下がみられる。O<sub>2</sub> の発生が high spin から low spin に変わる時に起こるとすれば, ESR シグナルのこの変化に伴って O<sub>2</sub> が発生していることになる。8 日間解置した動脈血 (Fig. 6 参照) を同様に測定しても high/low spin 比の変化はもはやみられない。Fig. 6 の最下段は 15 日間解置した資料のシグナルであるが, high/low spin 比が増加している。Rein ら<sup>21)</sup>によれば low spin の減少, high spin の増加は磷酸塩などの存在による metHb の蛋白のコンフォメーション変化によって起こるとされ, 長期の解置によって Hb の蛋白にも同様の原因による変化が起こっ

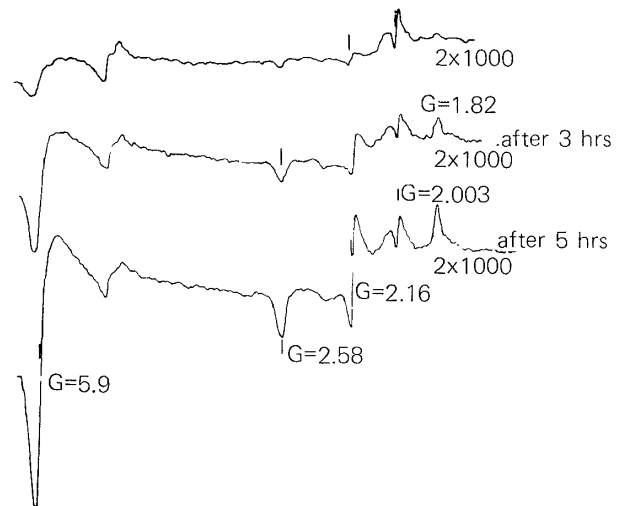


Fig. 7 ESR signals of whole blood incubated for 3 days. ESR was estimated repeatedly after freezing and lysing of the same sample.

ているものと想像される。Fig. 8 はクモ膜下出血を有する患者の CSF の ESR シグナルをみたものである。High spin と low spin が明らかに認められる発症後 2 日目と 11 日目 (CSF の採取日) の症例に脳血管撮影上血管の攣縮がみられ, high spin のみみられた発症 10 日目の症例には攣縮を認めていない。Low spin の有無が血管攣縮の有無を左右するのではなく, low spin の有無は溶血後の時間的経過を示すものと思われ, 血管攣縮の有無, あるいはその程度は血管周辺の赤血球量に依るもの, すなわち O<sub>2</sub> および続発するラジカルの量によるものと思われる。

### Ⅲ 考 案

園部ら<sup>23)</sup>は oxyHb それ自身が, 長久<sup>4)</sup>, 宮岡ら<sup>14)</sup>によれば, spectrophotometer 上 oxyHb と同一のスペクトルを有する oxyHb 様物質が脳血管に直接反応する血管攣縮物質であると述べている。一方 metHb には血管攣縮作用がないとされる<sup>13)</sup>。Hb はもっとも詳細に構造や機能の解明がなされた蛋白質の一つに数えられているが, oxyHb が deoxyhemoglobin (deoxyHb) や metHb と異なって血管反応性を有するとすれば, 3 者の一次構造が O<sub>2</sub> の有無を除いて, 特に deoxyHb, oxyHb は同一であるので, 血管に対する反応の差を酸素化に伴う立体構造の差異など高次構造の差で説明しなければならない。ヒト Hb (Hb A) の分子量は約 64,500 であり, この分子全体が反応に関与しているとは考え難いので, 血管反応に関与する部位が, ホモトロピック効果なのか, ヘテロトロピック効果なのか, いい変えればヘム部分か, グロビン部分なのか, しかもこれらのどのような高次構造によるものかまったく明らかでない。ヘム Fe が 2 価の deoxy-

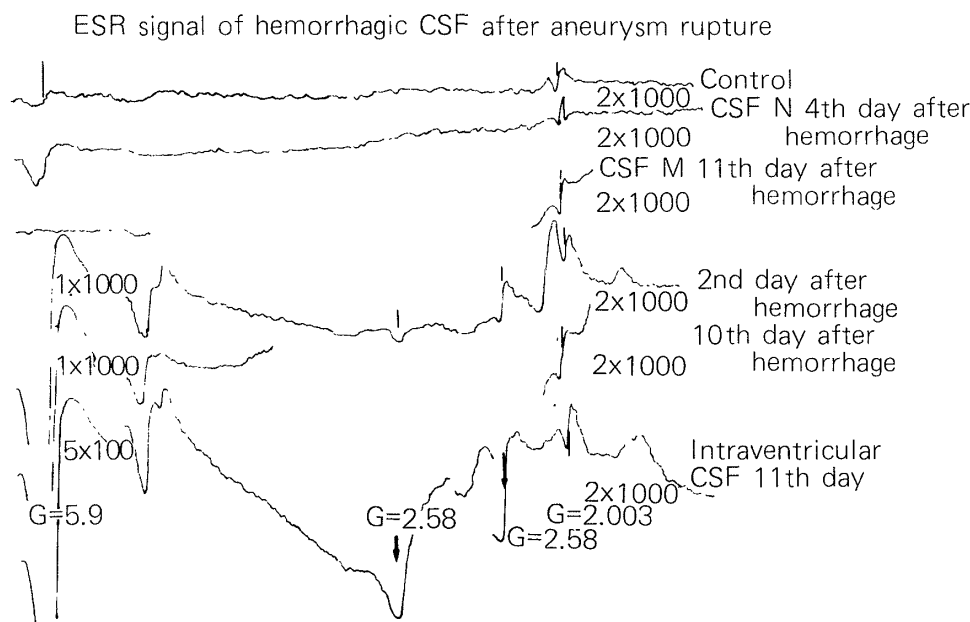


Fig. 8 ESR signals of cerebrospinal fluid from patients who had subarachnoid hemorrhage.

Hb の場合、 $O_2$  と結合する Fe はヘムポケット内部の疎水環境にあって、 $O_2$  のほかに CO, NO および低級なアルキルイソシアニドや数種のニトロソ芳香族化合物などと結合するが<sup>9)10)</sup>、oxyHb のようにすでに  $O_2$  と結合して、疎水環境にあるものがクモ膜下出血後の非生理的とはいえ、生体内環境で血管と反応することができることは考え難いことである。一方非ヘムリンガンド（ヘテロトピック効果）すなわちグロビン部分は  $H^+$ ,  $CO^-$ ,  $Cl^-$  など陰イオンおよび赤血球中の解糖中間代謝産物である 2,3-diphosphoglycerate などの低分子がグロビンの特定の部位に結合する<sup>9)10)</sup> が、クモ膜下出血の血液では oxy-Hb に限ってグロビン部分の高次構造が血管反応性を有することになる。ホルモン、substance P などのポリペプチドの作用機序、さらに分子量の大きい酵素の作用機序の解明は今日その途についたばかりであり、蛋白の高次構造と反応性といったことの解明にはきわめて興味をもたれることであるが、将来多くの困難を克服しなければならない。

OxyHb あるいは oxyHb 様物質が血管に接触して血管攣縮を惹起せしめたとしても、必ずしも oxyHb そのものが反応していない可能性もある。近年生体内におけるフリーラジカル反応、特に活性酸素 ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  など) の有害性が注目されている<sup>12)18)</sup>。OxyHb が自動酸化によって superoxide anion ( $O_2^-$ ) を発生し、metHb になるといわれている<sup>3)13)22)24)</sup>。さらにこの  $O_2^-$  から  $H_2O_2$  や、反応性の強い hydroxy radical ( $OH^\cdot$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ ) など有害なラジカルが統発することが報告されている<sup>18)</sup>。これらの活性酸素および統発する 1 つあるいは

複数のラジカルが血管を構成する物質あるいは平滑筋収縮に参与する物質と反応して収縮（みかけ上）をもたらすと想像することは、あながち困難ではない。

この報告で、クモ膜下出血血液のおかれる環境に類似させた *in vitro* の条件で  $O_2^-$  が発生していること、 $O_2^-$  の発生は CSF 中のみならず生理食塩水中の孵置赤血球でも起こっていることを明らかにした。 $O_2^-$  など有害な活性酸素やラジカルに対する防禦機構が赤血球や他の組織に存在しているが<sup>15)17)</sup>、出血血液の防禦機構の運命は明らかでない。DDC 添加の有無による  $O_2^-$  発生のは SOD 活性を示すことになる。SOD は Hb と同様に細胞質に含まれているので、溶血中の Hb 量と DDC を反応に加えずに発生する  $O_2^-$  の量とが 2 週間を越える孵置赤血球でも逆相関 ( $P < 0.05$ ) を示し、SOD が新鮮な血液と同様に活性があると考えられる。この結果は SOD が安定な酵素であることを示している。孵置動脈血を用いて得たこれらの事実はクモ膜下出血血液からも  $O_2^-$  が発生するが、活性な SOD によって dismutate され、直接に血管や周辺組織に作用している可能性が少ない。むしろ統発する活性酸素などが作用しているものと考えられる。

動脈血赤血球そのものの孵置間に起こる ESR シグナルの変化は赤血球より抽出分離された Hb A の自動酸化に伴う変化と時間的要素を除けばほぼ同一のものと考えられることから<sup>19)</sup>、ESR を用いて oxyHb を分離することなく動脈血自体のシグナル変化から oxyHb の酸化過程を論ずることができる。なお、oxyHb から  $O_2^-$  が発生することは明らかであるが、spectrophotometer や ES

Rを用いた研究によっても、oxyHbのイオン状態、ligandの性質が明らかにされていない<sup>26)</sup>。Hässbauer spectroscopyによってdeoxyHbにO<sub>2</sub>が結合するとFe<sup>++</sup>の電子がO<sub>2</sub>に移り、(charge transfer) heme Fe<sup>++</sup>がFe<sup>+++</sup>となり、O<sub>2</sub>が(・O-O<sup>-</sup>)すなわちO<sub>2</sub><sup>-</sup>となるとされる<sup>26)</sup>。

OxyHbは<sup>3</sup>O<sub>2</sub>-Fe<sup>++</sup>-globin(1)ではなくO<sub>2</sub><sup>-</sup>-Fe<sup>+++</sup>-globin(2) superoxide metHbであるとする説である<sup>26)</sup>。しかしこれに対してO<sub>2</sub>の結合がHbのFeへの単なる配位結合ではなく、グロビン部分を含めた配位がO<sub>2</sub>の結合に関与するので(1)と(2)の間になるとも言われている<sup>15)</sup>。いずれにせよ、現在の測定法によってはoxyHb-metHbの変化過程を正確にとらえ難い。このためこの変化に関与するであろう現象を単純にOxyHbによる、あるいはmetHbによらない(hemichrome≡metHbのスペクトルに似る一を除いて)とは言い難い。OxyHbを特殊な酸化剤によって酸化せしめるとirreversible hemichromeに変化することになる。これはmetHbと機能的に異なる物質であるため、metHbを用いる実験には注意を要するものと思われる。

#### Ⅳ ま と め

OxyHbが直接に脳血管に反応し収縮をもたらすとは考え難いとする立場から、oxyHbの自動酸化の過程で発生するO<sub>2</sub><sup>-</sup>およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>などの有害ラジカルの関与の可能性を検討した。このために、

1. クモ膜下出血に似た環境でのヒト動脈赤血球からのO<sub>2</sub><sup>-</sup>発生を実証した。
2. O<sub>2</sub><sup>-</sup>が直接に周辺組織、血管に反応する可能性よりも続発する他のラジカルが関与するであろうことを述べた。
3. 動脈血の自動酸化の過程をESRを用いて検討した。OxyHb→high spin Fe<sup>+++</sup>→low spin Fe<sup>+++</sup>の過程でO<sub>2</sub><sup>-</sup>が発生していると考えられた。
4. 3.から脳血管攣縮(late spasm)の発生にoxyHbが間接的には関与すると考えられた。

稿を終えるにあたり、福岡大学理学部 木本英治教授、鳥飼病院 森重福美部長の御協力に感謝いたします。

なお、本研究の要旨は第37回日本脳神経外科学会総会(熊本、1978年10月)において発表した。

#### 文 献

- 1) BANNISTER, W. H., ANASTASI, A. & BANNISTER, J. V.: Human erythrocyte superoxide dismutase

(Erythrocyte). pp 106-128, In Michelson, A. M., McCord, J. M. & Fridovich, I. (eds): Superoxide and Superoxide Dismutases. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977

- 2) BORG, D. C.: Application of electron spin resonance in biology. pp 61-147, In Pryor, W. A. (ed): Free Radicals in Biology. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1976
- 3) BRUNORI, M., FALCIONI, G., FIORETTI, E., GIARDINA, B. & ROTILIO, G.: Formation of superoxide in the autoxidation of the isolated and chains of human hemoglobin its involvement in hemichrome precipitation. *Eur J Biochem* 53: 99-104, 1975
- 4) 長久雅博: 脳血管攣縮の実験的研究—特に色素成分の攣縮成分について—。大阪市医学会雑誌24: 211-221, 1975
- 5) FRIDOVICH, I.: Chemical aspects of superoxide radical and of superoxide dismutase. pp 3-12, In Hayaishi, O. & Asada, K. (eds): Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen. Japan Scientific Societies Press, 1977
- 6) HEIKKILA, R. E. & COHEN, G.: The inactivation of copper-zinc superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate. pp367-373, In Michelson, A. M., McCord, J. M. & Fridovich, I. (eds): Superoxide and Superoxide Dismutases. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977
- 7) HEIKKILA, R. E. & CABBAT, F.: A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine. *Anal Biochem* 75: 356-362, 1976
- 8) HOLLOCHER, T. C. & BUCKLEY, L. M.: Electron spin resonance studies of native and denatured methemoglobin. PH effects. *J Biol Chem* 241: 2976-2980, 1966
- 9) 飯塚哲太郎, 森島 績: 酵素, タンパク質—金属イオンを含む系を中心として—, ヘム酵素, ヘムタンパク質, NMRの生化学への応用. 化学増刊67: 109-136, 1976
- 10) 今井清博: ヘモグロビン—化学的修飾および遺伝的修飾, ヘムタンパク質の化学. 化学増刊76: 67-90, 1978
- 11) 石井昌三, 野中利房: くも膜下出血時における脳血管攣縮—その機序について—。脳神経29: 829-840, 1977
- 12) 真杉文紀, 中村哲也: 酸素の活性化と過酸化脂質—生成と代謝の制御. 医学のあゆみ96: 429-437, 1976
- 13) MISRA, M. P. & FRIDOVICH, I.: The generation of superoxide radical from during the oxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 247: 6960-6962, 1972
- 14) 宮岡 誠, 野中利房, 渡辺 博, 千ヶ崎裕夫, 石井昌三: 脳血管攣縮の成因と治療に関する実

- 験的, 臨床的研究. 神経外科16(II): 103-114, 1976
- 15) 水野伝一, 早石 修, 吉田善一, 美濃 真, 内藤周幸, 山村秀夫, 菅原 努, 坂本登彦: 生体の酸素. 朝倉書店, 1977
- 16) OSHINO, N. & CHANCE, B.: A survey of factors involved in cellular oxygen toxicity. pp191-208, In Hayaishi, O. & Asada, K. (eds): Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen. Japan Scientific Societies Press, 1977
- 17) PICK, M., RABANI, J., YOST, F. & FRIDOVICH, I.: The catalytic mechanism of the manganese-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli* studied by pulse radiolysis. *J Am Chem Soc* 96:7329-7333, 1974
- 18) PRYOR, W. A.: The role of free radical reactions in biological systems. pp1-49, In Pryor, W. A. (ed): Free Radicals in Biology Vol. 1. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1976
- 19) RACHMILWITZ, E. A., PEISACH, J. & BLUMBERG, W. E.: Studies on the stability of oxyhemoglobin A and its constituent chains and their derivatives. *J Biol Chem* 246: 3356-3366, 1971
- 20) REIN, H. & RISTAU, O.: Der Nachweis der high-spin- und low-spin-form von Hämoproteinen mit der Electronspinresonanz. *Biochim Biophys Acta* 94: 516-524, 1965
- 21) REIN, H., RISTAU, O., JÄNIG, G. R. & JUNG, F.: On the influences of ATP on the electron paramagnetic resonance spectrum of methemoglobin. *FEBS Lett* 15: 21-23, 1971
- 22) ROTILIO, C., FIORETTI, E., FALLIONI, G. & BRUNORI, M.: Generation of superoxide radical by heme proteins and its biological relevance. pp239-244, In Michelson, A. M., McCord, J. M. & Fridovich, I. (eds): Superoxide and Superoxide Dismutases. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1977
- 23) 園部 真, 鈴木二郎: クモ膜下出血後の脳血管攣縮原因物質とその運命. 神経外科 18(II): 29-37, 1978
- 24) WEBER, B., OUDEGA, B. & VAN GELDER, B. F.: Generation of superoxide radicals during the autoxidation of mammalian oxyhemoglobin. *Biochim Biophys Acta* 302: 475-478, 1973
- 25) WEISS, J. J.: Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin. *Nature* 202: 83-84, 1964
- 26) WITTENBERG, J. B., WITTERBERG, B. A., PEISACH, J. & BLUMBERG, W. E.: On the state of the iron and the nature of the ligand in oxyhemoglobin. *Proc Natl Acad Sci* 67: 1846-1864, 1970