原 著

新しいPAF拮抗剤ONO-6240の血小板内 Ca^{2+} 動態におよぼす影響

松野 一彦* 方波見文雄** 角田 康弘** 松宮 英視**
 小山 稔*** 安部 圭祐*** 桜田 恵右*** 宮崎 保***

The effect of new PAF antagonist ONO-6240 on intracellular Ca^{2+} mobilization in human platelets

Kazuhiko MATSUNO*, Fumio KATABAMI**, Yasuhiro TSUNODA**
 Hidemi MATSUMIYA**, Minoru KOYAMA***, Keisuke ABE***
 Keisuke SAKURADA*** and Tamotsu MIYAZAKI***

Key words: platelet-activating factor, platelet aggregation, calcium, fura-2, aequorin

We investigated platelet-activating factor (PAF)-induced changes in cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) using three Ca^{2+} -indicators, quin 2, fura-2 and aequorin, and effects of ONO-6240, a specific PAF-antagonist, on platelet aggregation and changes in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ stimulated with PAF.

In the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} , PAF induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ as determined by three indicators. In the absence of extracellular Ca^{2+} , however, there was little or no increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ stimulated with PAF. These results suggest that PAF increases $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ mainly by influx of extracellular Ca^{2+} .

ONO-6240 inhibited PAF-induced platelet aggregation at a concentration being from 1 μM to 100 μM dose-dependently, whereas it didn't inhibit collagen-induced platelet aggregation at a concentration of 100 μM . ONO-6240 inhibited PAF-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in a dose-dependent manner as determined by these indicators, as well as platelet aggregation. These findings suggest that the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ is closely related to platelet activation evoked by PAF.

* 北海道大学医学部附属病院検査部〔〒060 札幌市北区北14条西5丁目〕, Division of Laboratory Medicine, Hokkaido University Hospital, Sapporo, Japan.

** 同 臨床検査医学, Department of Laboratory Medicine, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan.

*** 同 第三内科, The Third Department of Internal Medicine, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan. 受付: 1987.4.4. 受理: 1988.3.3.

はじめに

血小板活性化因子 (PAF) は、好塩基球、好中球、血小板などの種々の細胞に由来し、血小板の凝集や放出などの活性化をはじめとして多彩な生理活性を有するリン脂質である¹⁾が、その血小板活性化機構についてはいまだ明らかではない。従来より血小板の活性化機構の最終段階には、細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) が重要な役割を果たしていると推定されていたが、1980年に Tsien²⁾ が開発した Ca^{2+} 指示蛍光物質 quin 2 の導入により、血小板においても細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) の定量的測定が可能となり、細胞内 Ca^{2+} 動態に関する研究は飛躍的に発展してきている。我々も各種 agonist による血小板活性化と Ca^{2+} 動態³⁾、あるいは薬剤の影響⁴⁾ などについて研究をすすめている。

今回は、PAF 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の変化を、quin 2, fura-2, aequorin という異なる3種のプローブを用いて観察し、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ と血小板凝集の関連ならびに増加する Ca^{2+} の由来について検討を加え、さらに最近開発された PAF 特異的拮抗剤である ONO-6240⁵⁾ の PAF による血小板凝集および細胞内 Ca^{2+} 動態におよぼす影響について検討した。

I. 方 法

1. 試 薬

PAF は Avanti Polar-Lipids 社製を用い、洗浄血小板浮遊液 (WPS) を用いた研究では従来の検討⁶⁾より $1 \times 10^{-6}\text{M}$, PRP を用いた血小板凝集は $5 \times 10^{-8}\text{M} \sim 1 \times 10^{-7}\text{M}$ にて検討した。collagen は Horm-chemie 社製を用いた。 Ca^{2+} 動態の研究には、quin 2 acetoxymethyl ester (quin 2/AM) (同仁化学), fura-2/AM (同仁化学), chlortetracycline (Sigma), $^{45}\text{CaCl}_2$ (New England Nuclear), aequorin (Dr Blinks より供与) を用い、PAF 拮抗剤として ONO-6240 (小野薬品工業より供与) を用いた。

2. 血小板凝集

健康人より採血したクエン酸加静脈血より作成した PRP, あるいは一回洗浄後外液 Ca^{2+} 濃

度 1 mM の Hepes buffer に浮遊させた WPS を用い、dual aggregometer (Chrono-Log) により比濁法にて測定した。ONO-6240 の影響は、凝集測定前に添加し 5 分間 incubate 後測定することにより検討した。

3. 蛍光物質 quin 2, fura-2 を用いた $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の測定

quin 2 による血小板の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の測定は既に報告した方法⁷⁾によった。新しく開発された蛍光物質 fura-2⁸⁾ による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の測定は Pollock ら⁹⁾の方法に準じておこなった。すなわち、ACD 加血より作成した PRP に最終濃度 5 μM fura-2/AM を添加し、37°C で 15 分間 incubate する。その後遠心して血小板ペレットを Ca^{2+} -free Hepes buffer に再浮遊し、血小板数を $1 \sim 1.5 \times 10^8/\text{ml}$ として、外液 Ca^{2+} 濃度を調整後 assay に供した。fura-2 蛍光の測定は、日立分光蛍光光度計 650-60 を用い、励起波長 335 nm, 蛍光波長 500 nm で行ない、quin 2 法と同様の方法でキャリブレーションし、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = 224 \times \frac{F - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F}$ (nM) の式により算出した。攪拌は試薬添加時のみ行ない、持続的な stirring は行なわなかった。

4. aequorin を用いた $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の測定

血小板への aequorin の導入は Yamaguchi ら¹⁰⁾の方法に準じて行なった。すなわち、ACD 加血より PRP を作成し、5 mM EGTA, 1 μM PGE_1 を含む Ca^{2+} -free Hepes buffer で 1 回洗浄後、血小板ペレットを 1 mM ATP, 1 μM PGE_1 , 1 mM EGTA, 0.2 mg/ml aequorin を含む Ca^{2+} -free Hepes buffer に浮遊させる。1 % dimethylsulfoxide (DMSO) を 6 回加え (最終濃度 6 %), 室温で 2 分間 incubate する。1 mM ATP, 1 μM PGE_1 を含む Ca^{2+} -free Hepes buffer で希釈し遠心, 1 回洗浄後 Ca^{2+} -free Hepes buffer に再浮遊し、血小板数を $2 \times 10^8/\text{ml}$ に、外液 Ca^{2+} を調整後 assay に供する。aequorin luminescence は、Platelet ionized calcium aggregometer (Chrono-Log) を用い stirring 下で測定し、Johnson ら¹¹⁾の方法によりキャリブレーションを行なった。

5. CTC を用いた膜結合 Ca^{2+} の測定

ACD 加血より作成した PRP に最終濃度 50

μM の CTC を添加し, 37°C で 30 分間 incubate する. その後遠心し, 血小板ペレットを Ca^{2+} -free Hepes buffer に再浮遊し, 血小板数を $3 \times 10^8/\text{ml}$ に, 外液 Ca^{2+} を 1 mM に調整して assay に供した. CTC 蛍光の測定は, 励起波長 400 nm , 蛍光波長 530 nm にて行なった.

6. Ca^{2+} uptake の測定

WPS を作成後, 0.2 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ を添加し室

温で 30 分間 incubate 後, 刺激前および PAF 刺激一定時間後にシリコンオイル法を用いて遠心し, ペレットのカウントを液体シンチレーションカウンターで測定して net の uptake を求めた.

II. 結 果

1. PAF 刺激による $[\text{Ca}^{+3}] \text{cys}$ の変化

Fig. 1 PAF-induced changes in cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) in the presence or absence of extracellular Ca^{2+} . $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was measured with quin 2 method (left), fura-2 method (middle) and aequorin method (right). The data shown are representative of three similar experiments.

Fig. 2 Effect of ONO-6240 on PAF-induced Ca^{2+} uptake (left) and changes in membrane-bound Ca^{2+} (right). ONO-6240 was added in washed platelet suspension and then incubated for 5 minutes in room temperature. The results shown are representative of two separate experiments.

Fig. 3 Effect of ONO-6240 on PAF-, collagen-induced platelet aggregation. Various concentration of ONO-6240 was preincubated with platelet rich plasma for 5 minutes before measurement of PAF (1×10^{-7} M)- or collagen ($10 \mu\text{g/mL}$)-induced platelet aggregation. Each points represent the mean of four experiments carried out with platelets from different donors.

Fig. 4 Inhibition of PAF-induced increase in cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) by ONO-6240. PAF ($1 \mu\text{M}$)-induced changes in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was measured by quin 2 (left) and fura-2 (right) method in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} . ONO-6240 was preincubated with quin 2-loaded or fura-2-loaded platelet suspension for 5 minutes before fluorescent assay. The data shown are representative of three similar experiments.

外液 Ca^{2+} が 1 mM の条件下で、 $1 \mu\text{M}$ の PAF 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の変化を 3 方法により測定した。quin 2 法では、未刺激時 98.2 nM であった $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ は、PAF 刺激により増加し、刺激 50 秒後に最高値 98.2 nM となり、以後漸減した。(図 1 左) fura-2 法では、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$

は未刺激の 102.0 nM から PAF 刺激により 351.4 nM までの急速な一過性の増加を示した。(図 1 中) また aequorin 法では PAF 未刺激の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ は $4.1 \mu\text{M}$ と高く、PAF 刺激により $8.2 \mu\text{M}$ までの一過性の増加を認めた。(図 1 右) 一方、外液に 1 mM EGTA を加えて Ca^{2+}

Fig. 5 Effect of ONO-6240 on PAF-induced increase in cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) and platelet aggregation. Various concentration of ONO-6240 was preincubated with fura-2-loaded platelet suspension for 5 minutes before assay. PAF ($1 \mu M$)-induced changes in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (closed circle) were measured with fura-2 method, and platelet aggregation (open circle) was measured with fura-2-loaded platelet suspension containing $1 mM CaCl_2$. The data shown are obtained in one experiment, two others give similar results.

をキレートすると、3法とも未刺激時の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 値は低くなるとともに、PAF 刺激後の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の増加は、quin 2 法で $80.1 nM$ まで、fura-2 法で $82.9 nM$ までとごく軽微であり、aequorin 法では $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の増加は認められなかった。(図 1)

CTC を用いた膜結合 Ca^{2+} の検討では、PAF 刺激により、直後より 20 秒後位までの速やかな膜結合 Ca^{2+} の減少がみられたが(図 2 左)、thrombin 刺激時に比べ軽度であった。また、刺激 5 秒後より明らかな $^{45}Ca^{2+}$ uptake の亢進を認めた(図 2 右)。

2. ONO-6240 の PAF 凝集におよぼす影響

PRP に ONO-6240 を最終濃度 1 から $100 \mu M$ 加え 5 分間 incubate 後、PAF 凝集を測定しコントロールと比較したところ、ONO-6240 は $1 \mu M$ から濃度依存性に PAF 凝集を抑制した。しかしながら、ONO-6240 は $100 \mu M$ にても collagen 凝集は抑制しなかった(図 3)。

3. PAF 刺激による Ca^{2+} 動態におよぼす ONO-6240 の影響

PAF 刺激による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 増加におよぼす ONO-6240 の影響を quin 2 法と fura-2 法により検討した。quin 2 負荷血小板浮遊液に最終濃度 $5 \mu M$ の ONO-6240 を添加し 5 分間 incubate 後、 $1 \mu M$ PAF で刺激し $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化をみると、コントロールに比べ Ca^{2+} の増加は明らかに抑制された。また $20 \mu M$ ONO-6240 の添加では、ほぼ完全に $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の増加は抑えられた(図 4 左)。

これは fura-2 法による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の検討でもほぼ同様であり、 $5 \mu M$, $10 \mu M$ ONO-6240 は、濃度依存性に PAF 刺激による急激な Ca^{2+} の増加を抑制した(図 4 右)。

ONO-6240 を 0, 1, 5, 10, $50 \mu M$ 添加し、fura-2 法による PAF 刺激 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 増加と、同一サンプルでの PAF 凝集におよぼす ONO-6240 の影響を検討した。ONO-6240 は、 $1 \mu M$ より濃度依存性に PAF 刺激による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の増加と凝集を平行して抑制した(図 5)。

次に aequorin 法で測定される $[Ca^{2+}]_{cyt}$ への影響についても検討すると、 $1 \sim 10 \mu M$ の ONO

Fig. 6 Inhibition of PAF-induced increase in cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$). Various concentration of ONO-6240 was pre-incubated with aequorin-loaded platelet suspension containing 1 mM extracellular Ca^{2+} for 5 minutes before aequorin-luminescence assay. The data shown are representative of three similar experiments.

-6240 は PAF 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加を濃度依存性に抑制した (図 6)。

また、PAF 刺激による Ca^{2+} uptake の増加、および膜結合 Ca^{2+} の遊離は、ともに $10\mu\text{M}$ ONO-6240 の 5 分間の incubate により明らかに抑制された (図 2)。

III. 考 察

PAF の化学構造は、1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine であり、PAF-acether あるいは AGEPC などとも呼ばれる。PAF は、*in vivo* の投与で血圧下降、好中球減少や血小板減少を惹起し、*in vitro* では好中球の化学遊走や脱顆粒をおこすほか、血小板では形態変化や放出、凝集を惹起することが知られている¹²⁾。PAF による血小板活性化の生化学的な機序については、未だ十分に解明されていないが、PAF 刺激による phosphatidylinositol (PI) 回転の亢進¹³⁾、フォスファチジン酸 (PA) の蓄積¹³⁾、膜からのアラキドン酸の遊離、phosphoinositide の急速な分解¹⁴⁾、蛋白のリン酸化¹⁵⁾などが報告されている。

PAF 刺激による細胞内 Ca^{2+} 動態については、Hallam ら¹⁶⁾、Valone ら¹⁷⁾が、quin 2 を用いて PAF 刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加を報告している。我々の検討では、quin 2 法のみならず、新しい $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 測定法である fura-2 法

および aequorin 法によっても一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加を認めた。quin 2 法で捉えられる Ca^{2+} の増加に比べ、fura-2 法ではより速やかで著明な Ca^{2+} 増加が認められた。これは、quin 2 法では細胞内の quin 2 濃度が 1 mM 前後と高いため Ca^{2+} キレート効果が強く、初期の速やかな Ca^{2+} 増加が抑えられるためと考えられ、fura-2 法の方が実際の Ca^{2+} の動きを反映するものと考えている。

発光蛋白 aequorin を用いて測定される $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 値は、quin 2, fura-2 法の場合に比べ高く¹⁸⁾、また TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) 刺激では、quin 2, fura-2 法では $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 増加はみられないにもかかわらず、aequorin 法では一過性の Ca^{2+} 増加を認める¹⁹⁾などの違いがあることが知られている。この差異の理由は明らかではないが、おそらく aequorin 法では膜近傍の高濃度に局在する Ca^{2+} を測定しているのではないかと推定されている。PAF 刺激による aequorin 法で測定される $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 変化の報告はないが、今回の検討では PAF 刺激により fura-2 法と比較的類似した一過性 Ca^{2+} の増加が認められた。

外液の Ca^{2+} を EGTA でキレート除去した場合でも thrombin や thromboxane A_2 の安定なアナログである STA_2 の刺激では、外液に Ca^{2+} が存在する場合と同等あるいはそれに近い程度の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加が認められる³⁾ のに対して、PAF 刺激では 3 方法ともに Ca^{2+} 外液非存在下での $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加が著減したことから、PAF 刺激により増加する Ca^{2+} の由来は、大部分が外液からの流入によると推定される。実際、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いた flux の検討では、PAF 刺激後に迅速な Ca^{2+} の uptake を認めており、PAF による血小板活性化への Ca^{2+} 流入の重要性を示唆している、しかしながら、quin 2, fura-2 法では、外液 Ca^{2+} 非存在下でもわずかな $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加があり、また CTC 法による膜結合 Ca^{2+} も PAF 刺激により遊離を認めたことから、細胞内 Ca^{2+} の関与も否定はできない。Shukla は²⁰⁾、PAF 刺

激による inositol trisphosphate (IP_3) の産生は外液に Ca^{2+} がなくともみられ, これにより細胞内 Ca^{2+} の移動がおこって shape change が惹起され, さらに外液 Ca^{2+} の大量の流入により細胞内 Ca^{2+} の著しい増加がおこり凝集・放出が惹起されるものと推測している.

今回検討した ONO-6240 (1-O-hexadecyl-2-RS-O-ethyl-3-O-7 (thiazolioheptyl)-glyceromethane sulfonate) は, 最近開発された PAF に構造が類似した物質である⁵⁾. モルモットの PRP を用いた実験では, ONO-6240 は PAF 凝集を濃度依存性に抑制し, IC_{50} 値は $0.24\mu M$ とされている⁵⁾. 今回の健常人 PRP を用いての検討では, ONO-6240 は $1\mu M$ から PAF 凝集を抑制し, IC_{50} は約 $10\mu M$ であったが, この差には PAF の感受性に対する種属差が関係しているかもしれない. ONO-6240 は, $100\mu M$ でも collagen 凝集を抑制せず, アラキドン酸, A23187, ADP による凝集にも影響しないと考えられており⁵⁾, PAF に特異的な阻害剤と考えられる.

ONO-6240 は, $1\mu M$ から濃度依存性に PAF 刺激による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の増加を抑制した. この成績は, quin 2, fura-2, aequorin の方法の如何を問わず同様であった. また ONO-6240 は PAF 刺激による Ca^{2+} uptake と膜結合 Ca^{2+} の遊離とをともに抑制した. ONO-6240 による PAF 刺激 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 増加の抑制が, PAF 凝集の抑制と極めて良く平行した事実は, PAF による血小板凝集が $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の増加と密接に関連していることを裏づけるものと考えられる.

ONO-6240 の PAF による血小板活性化抑制の機序については必ずしも明らかではないが, ONO-6240 の PAF との構造類似性より, 血小板への PAF の結合部位を競合的に阻害しているものと推定されている. したがって, ONO-6240 の前処置によって, PAF の血小板への結合が減少し, Ca^{2+} 流入の低下および細胞内 Ca^{2+} 動員の低下により $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の増加が抑制され, ひいては凝集の抑制がもたらされるものと考えられた.

おわりに

quin 2, fura-2, aequorin 法を用いて PAF 刺激による $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化を測定し, 増加する Ca^{2+} の由来, 血小板凝集との関連について検討した. また最近開発された PAF 特異的阻害剤 ONO-6240 の PAF 凝集および PAF による細胞内 Ca^{2+} 動態に及ぼす影響を検討した. 以上の結果より, PAF による血小板凝集には, 細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度の増加が極めて密接に関連していると考えられた.

文 献

- 1) Hanahan, D.J., Demopoulos, C.A., Liehr, J. and Pinckard, R.N.: Identification of platelet-activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J. Biol. Chem.*, **255**; 5514~5516, 1980.
- 2) Tsien, R.Y.: New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis and properties phenotype structures. *Biochemistry*, **19**; 2396~2404, 1980.
- 3) 松野一彦, 角田康弘: 刺激分泌連関における細胞内カルシウム動態. 細胞工学, 別冊, **3**; 11~22, 1987.
- 4) 松野一彦, 方波見文雄, 小山 稔, 桜田恵右, 宮崎 保: TMB-8, diltiazem の血小板活性化および血小板内遊離カルシウム濃度におよぼす影響. 血液と脈管, **16**; 500~507, 1985.
- 5) Miyamoto, T., Ohno, H., Yano, T., Okada-T., Hamanaka, N. and Kawasaki, A.: ONO-6240: A new potent antagonist of platelet-activating factor. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotrien Res.*, **15**; 719~720, 1985.
- 6) 松野一彦, 方波見文雄, 小山 稔, 安倍圭祐, 小林正伸, 桜田恵右, 宮崎 保: 血小板活性化因子 (PAF) による血小板の活性化と Ca^{2+} 動態について. 日血会誌, **48**; 539, 1985.
- 7) 松野一彦, 方波見文雄, 小山 稔, 安倍圭祐, 小林正伸, 桜田恵右, 宮崎 保: quin 2 による血小板の細胞質遊離カルシウムイオン濃度の測定について. 臨床血液, **27**; 165~172, 1986.
- 8) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators

- with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem., **260**; 3440~3450. 1985.
- 9) Pollock, W.K., Kink, T.J. and Irvine, R.F.: Liberation of [^3H] arachidonic acid and changes in cytosolic free calcium in fura-2-loaded human platelets stimulated by ionomycin and collagen. Biochem. J., **235**; 869~877, 1986.
 - 10) Yamaguchi, B., Suzuki, H., Tanoue, K. and Yamazaki, H.: Simple method of aequorin loading into platelets using dimethyl sulfoxide. Thromb. Res., **44**; 165~174, 1986.
 - 11) Johnson, P.C., Ware, J.A., Cliverden, P.B., Smith, M., Dvorak, A.M. and Salzman, E. W.: Measurement of ionized calcium in blood platelets with the photoprotein aequorin. Comparison with quin 2. J. Biol. Chem., **260**; 2069~2076, 1985.
 - 12) Lynch, J.M., Lotner, G.Z., Betz, S.J. and Henson, P.M.: The release of a platelet-activating factor by stimulated rabbit neutrophils. J. Immunol., **123**; 1219~1226, 1979.
 - 13) Lapetina, E.G.: Platelet-activating factor stimulates the phosphatidylinositol cycle. Appearance of phosphatidic acid is associated with the release of serotonin in horse platelets. J. Biol. Chem., **257**; 7314~7317, 1982.
 - 14) Billah, M.M. and lapetina, E.G.: Platelet-activating factor stimulates metabolism of phosphoinositides in horse platelets: Possible relationship to Ca^{2+} mobilization during stimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**; 965~968, 1983.
 - 15) Lyons, R.M. and Shaw, J.O.: Interaction of Ca^{2+} and protein phosphorylation in the rabbit platelet release reaction. J. Clin. Invest., **65**; 242~255, 1980.
 - 16) Hallam, T.J., Sanchez, A. and Rink, T.J.: Stimulus-response coupling in human platelets. Changes evoked by platelet-activating factor in cytoplasmic free calcium monitored with the fluorescent calcium indicator quin 2. Biochem. J., **218**; 819~827, 1984.
 - 17) Valone, F.H. and Johnson, B.: Modulation of cytoplasmic free calcium in human platelets by the phospholipid platelet-activating factor 1-0-alkyl-2-acetyl-SN-glycero-3-phosphorylcholine. J. Immunol., **134**; 1120~1124, 1985.
 - 18) 松野一彦, 方波見文雄, 松宮英視, 小山 稔, 安部 圭祐, 桜田恵右, 宮崎 保: aequorin を用いた血小板の細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度測定に関する検討. 日血会誌, **49**; 369, 1986.
 - 19) Ware, J.A., Johnson, P.C., Smith, M and Salzman, E.W.: Aequorin detects increased cytoplasmic calcium in platelets stimulated with phorbol ester or diacylglycerol. Biochem. Biophys. Res. Commun., **133**; 98~104, 1985.
 - 20) Shukla, S.D. and Hanahan, D.J.: Acetylglycerol ether phosphorylcholine (AGEPC; Platelet-activating factor)-induced stimulation of rabbit platelets: Correlation between phosphatidic acid level, ^{45}Ca uptake, and [^3H] serotonin secretion. Arch. Biochem. Biophys., **232**; 458~466, 1984.

●血小板研究のトピック(PDGF)を集約する!

血小板1984—血小板放出反応—

血小板学ノ湖カンファレンス

編集 広島大学原医研内科教授 蔵本 淳, ほか専門医31氏分担執筆
B5判 183頁 図73 表26 定価4,800円(配送料弊社負担)

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京7-102026
電話 03-252-7768