
原 著

ヒト血小板凝集及び凝集阻害に対するプロスタグランジンの作用機序

小島 正紀

小野薬品工業㈱ 医薬情報部

青山 美佳, 森 夏子, 岸野 泰雄

徳島大学医学部栄養学科実践栄養学教室 (主任: 岸野泰雄 教授)

(平成6年11月1日受付)

Effect of prostaglandin on human platelet

Masanori Ojima

Department of Medicinal Information, Ono Pharmaceutical Company Ltd, Osaka

Mika Chikamori-Aoyama, Natsuko Mori and Yasuo Kishino

Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima

(Director : Prof. Yasuo Kishino)

SUMMARY

Based on the previous report concerning the structure-activity relationship in which inhibiting and stimulating agents for platelet aggregation were able to bind both receptors of human platelet for aggregation and its inhibition, the present experiment was performed to study on the effect of prostaglandins (PGE₁, PGI₂ and PGD₂) on the aggregation and its inhibition of human platelets.

Assuming that PGE₁ and PGD₂ have conformations for inhibition of platelet aggregation and those for aggregation, changes of cyclic AMP (cAMP) content and of ultrastructure of platelets in the presence of 2', 5'-dideoxyadenosine (DDA, an inhibitor of adenylyl cyclase), PGE₁ and PGD₂ were investigated. When treated with physiological saline, PGE₁, PGD₂ or DDA alone, aggregation of the platelets was not observed. The platelets were solitarily dispersed. Though most of the platelets showed smooth surface, some platelets showed slight, small elevation and conical depression on the surface. A few platelets possessed one or two short projection at the margin, but no long projection was observed.

The platelets treated with PGE₁ or PGD₂ in combination with DDA showed markedly elongated projections which is one of the ultrastructural characteristics of activated form of platelets, and were finally aggregated. The most platelets gathered in groups were discoid in form and others showed irregular forms. They had one or sometimes several long pseudopods. It was noted that the pseudopods protruded from the marginal region of the platelets, and were contact with pseudopods of other platelets. The long pseudopods supposed to be the elongation of the spiny and short projections described above. At first, small protrusions appeared on the entire surface of the platelets. They showed a clear

tendency to adhere to each other, formed small and larger aggregates, and resulted in more and more firm aggregation. This feature may represent the first stage of transformation for aggregation of platelets. The round protrusion became large in size and increase in number.

The present study pointed out the importance of the concomitant presence of receptors for the aggregation and its inhibition in the platelet plasma membrane.

(received November 1, 1994)

Key words : prostaglandin E_1 and PGD_2 , platelet aggregation receptor, cyclic AMP, ultrastructural analysis

プロスタグランジン I_2 (PGI_2) は血管内皮細胞より産生されるアラキドン酸の不安定な代謝産物であり、血小板凝集に対して強力な阻害作用をしめす (Moncada ら, 1976) が、一方、 PGH_2 , トロンボキサン A_2 (TXA_2) は反対の作用、すなわち血小板凝集を示す (Bhagwat ら, 1985)。このことは、生体内における血液循環での恒常性の維持に役立っているものと思われる。 PGI_2 の抗凝固作用は脳梗塞とか心筋梗塞の予防、治療に有益であり、 PGI_2 類似物質の研究が望まれる。 PGI_2 の機能は血小板表面のレセプターを介して発揮され (Schafer ら, 1979), PGI_2 類似物質もヒト血小板のレセプターに対して PGI_2 に似た作用を示すことが報告されている (Katsuyama ら, 1994)。既に著者ら (小島, 1991; Ojima, Tokuhiko, 1992) はヒト血小板凝集と凝集阻害レセプターを構造活性相関の面から検討し、PGs のうち PGI_2 , PGD_2 , PGE_1 などは血小板の凝集阻害のレセプターに結合する構造があるばかりでなく、凝集のレセプターにも結合する構造を有していることを報告した。この理論を立証する一助として、今回 PGE_1 , PGD_2 を用いて、血小板凝集阻害ばかりでなく、血小板を凝集する作用があるかどうかを検討し、形態学的変化と比較した。また、 PGE_1 とか PGI_2 はレセプターを介して cyclic AMP (cAMP) を増加させ、凝集阻害をおこすと考えられているため、adenyl cyclase の阻害剤である 2', 5'-ディデオキシアデノシン (DDA) を加え、PGs のレセプターを介する cAMP の増加を抑制した条件下で、血小板がどのような超微構造的変化を示すか走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

実験材料並びに方法

試薬

PGE_1 , PGD_2 は小野薬品工業(大阪)より入手した。

DDA は Pharmacia (Uppsala, Sweden), ポリ-L-リジンは Sigma (St. Louis, USA) より入手した。 PGE_1 , PGD_2 は 12 mM になるようにエタノールで溶解し、生理食塩水 (生食水) で希釈した。DDA は生食水で希釈した。ポリ-L-リジンは phosphate-buffered saline に溶解した。

血小板の調整

薬剤を 1 カ月間服用していない健康者から採血した血液 9 容に 3.8% クエン酸ソーダ 1 容を加え混合した。多血小板血漿浮遊液 (PRP) は 1,500 rpm, 10 分間の遠心分離により得た。乏血小板血漿 (PPP) は 3,000 rpm, 30 分間の遠心分離より得た。血小板数は $25 \times 10^4/\mu\text{l}$ になるように PRP を PPP で希釈調整した (Ojima, Fujita, 1976)。

cAMP の測定

PG による血小板 cAMP の測定は、PRP, 0.5 ml に生食水または DDA, 0.05 ml を加え 37°C, 5 分間インキュベートした後、 PGE_1 または PGD_2 を 0.05 ml 加え 20 分間、インキュベートした。DDA の最終濃度は 0.5 mM, PGE_1 と PGD_2 の最終濃度は 0.1 μM , 1.0 μM 及び 10 μM で行なった。cAMP の測定はラジオイムノアッセイ DCC 法で行なった (孫ら, 1985)。EDTA 処理した PRP 中に存在する cAMP をサクシニル化し、サクシニル化された cAMP を ^{125}I -サクシニル cAMP チロシンメチルエステル抗血清とで競合させた。競合反応の結果、抗体に結合しなかった ^{125}I -サクシニル cAMP をあらかじめデキストランでコーティングした活性炭に吸着させて除き、上清の放射活性の測定から PRP 中の cAMP 量を算出した (孫ら, 1985)。

走査型電子顕微鏡

検索材料は上記の実験で得た資料を下記の処理を行ない観察した。すなわち、それぞれ PRP, 1 ml を氷

冷した1%グルタルアルデヒド固定液(0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4) 20 ml に, 滴下しつつ振盪した. 同一固定液中にある PRP を時々攪拌し, 1 時間後に 4°C で保存した. 固定した PRP を室温で 1,500 rpm, 10 分間遠心し, 血小板ベレットを 300 μ l の同一固定液でそれぞれ懸濁させた. 懸濁液を 0.1% ポリ-L-リジンであらかじめコートしたガラス小片(約 5 mm 角)上に 1~2 滴載せた. 5 分後ガラス小片上に付着した血小板をリン酸緩衝液で 1 時間洗浄し, 1% 緩衝四酸化オスmiumによる後固定を 4°C で 1 時間行なった. さらに, アセトンによる脱水, 酢酸イソアミルによる置換, 液体二酸化炭素により臨界点乾燥機(日立, HCP-2 型)で乾燥させた後, 金-パラジウムでコーティングを行い, 走査型電子顕微鏡(日立, S-800)で観察した.

結 果

ヒト血小板において, PGE₁ と PGD₂ との 37°C, 20 分間のインキュベーションで, それぞれについて 0.1 μ M, 1 μ M 及び 10 μ M の濃度でみると, 各濃度に比例して cAMP 量は増加した. 10 μ M PGE₁ および 10 μ M PGD₂ は生食水(対照)に比し, それぞれ cAMP

量を 5.6 倍と 7.2 倍に増加させた. cAMP の産生は, 10 μ M PGE₁ に 0.5 mM DDA を併用することによって, 74% 阻害されたが, 10 μ M PGD₂ に 0.5 mM DDA を併用すると, 81% 阻害された(Table 1). 形態学的に生食水(対照), 10 μ M PGE₁, 10 μ M PGD₂ 又は 0.5 mM DDA を単独で 37°C, 20 分間インキュベートすると対照と同様, 血小板の大部分はほぼ球形で, 表面は比較的平滑であり, 時には僅かな隆起や陥凹をもつものがみられた. 極く少数の血小板には 2~3 の短い突起を認めた(Figs. 1~4). 10 μ M PGE₁ に 0.5 mM DDA を併用すると, ほとんどの血小板は対照群でみられた突起がさらに伸長し, あるものは細長い偽足様の突起となり, 隣接する血小板の突起または平滑な表面に接着し, 互いに接近して凝集した(Fig. 5). このように突起を出し合い, 凝集し始めると血小板は扁平状または木の葉状に変形するものが多くみられた. 一部に陥凹部のみられるものもあったが, 多くの血小板は変形するために表面構造は不定形となった. 10 μ M PGD₂ に 0.5 mM DDA の併用でも血小板の凝集が観察された(Fig. 6). 37°C, 5 分間のインキュベーションでも PGE₁ と DDA 併用および PGD₂ と DDA 併用においても, 血小板偽足の発達と血小板凝集が前者と

Table 1 Effects of PGE₁, PGD₂ and DDA on cAMP level in human platelets

Treatment	cAMP (pmol/ml)	n
Saline	12.0 \pm 0.68	6
PGE ₁ 0.1 μ M	15.0 \pm 1.53	3
PGE ₁ 1 μ M	25.7 \pm 12.2	3
PGE ₁ 10 μ M	67.0 \pm 7.93***	4
PGD ₂ 0.1 μ M	25.0 \pm 5.86*	3
PGD ₂ 1 μ M	53.0 \pm 15.1*	3
PGD ₂ 10 μ M	86.8 \pm 23.4**	4
DDA 0.5 mM	13.3 \pm 0.33	3
PGE ₁ 10 μ M, DDA 0.5 mM	17.3 \pm 1.76*	3
PGD ₂ 10 μ M, DDA 0.5 mM	16.3 \pm 1.20**	3

All results are presented as mean \pm S. E.. Statistical analysis (saline versus PGs or DDA) was made by Student's *t*-test.

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

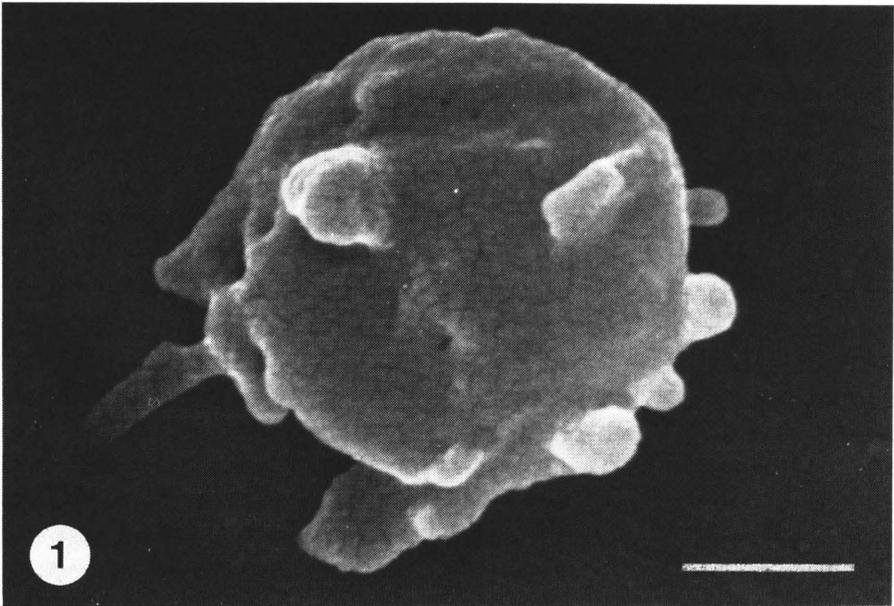


Fig. 1 One of the human platelets treated with saline for 20 minutes. The majority of them show relatively smooth surface. Some platelets have short processes and conical depression on the surface. Bar: 1 μm

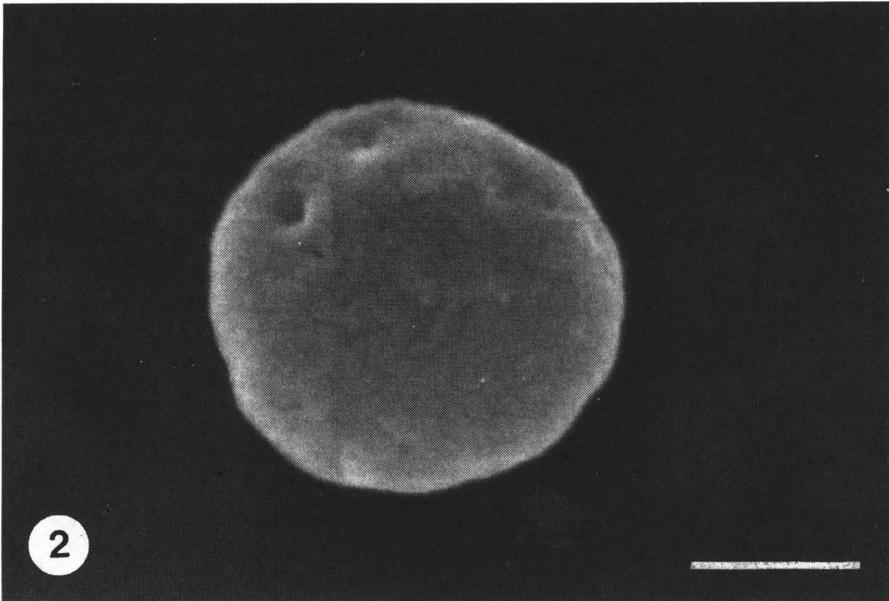


Fig. 2 One of the human platelets treated with 10 μM PGE₁ for 20 minutes. The majority of the platelets have smooth surface, and some show conical depression on the surface. Bar: 1 μm

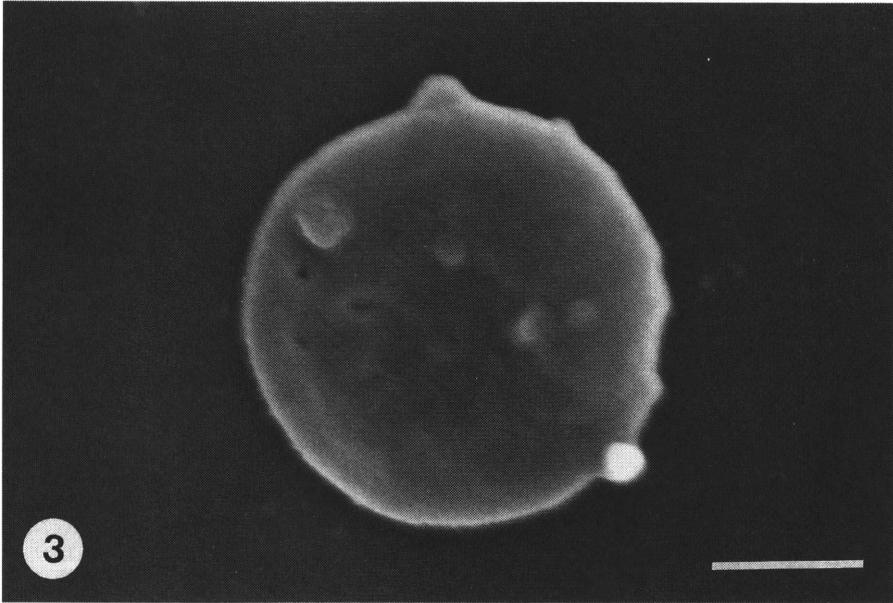


Fig. 3 One of the human platelets treated with $10 \mu\text{M}$ PGD_2 for 20 minutes. Though most of the platelets have smooth surface, some platelets show small elevation and conical depression in their plasma membrane. Bar: $1 \mu\text{m}$

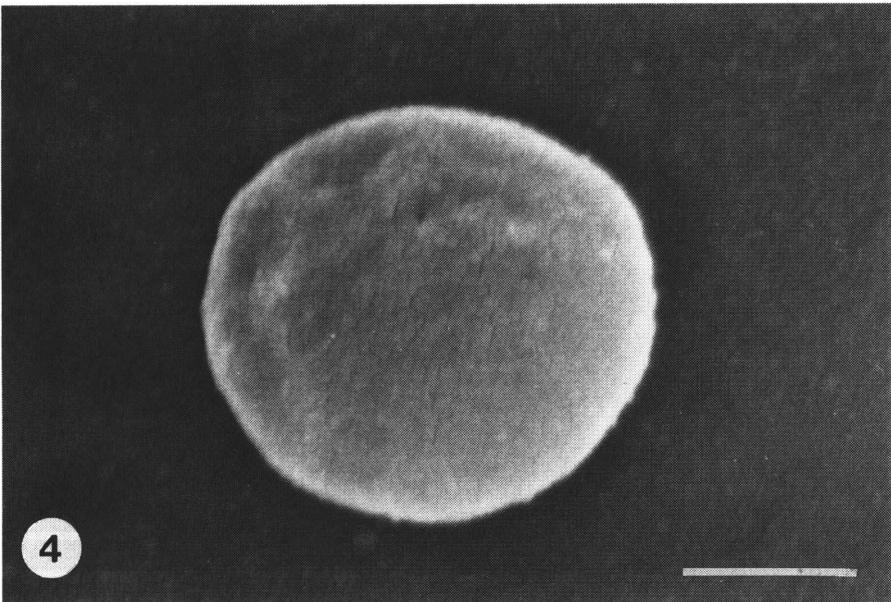


Fig. 4 One of the human platelets treated with 0.5mM DDA alone for 20 minutes. Conical depressions are seen on the surface of the platelet. Bar: $1 \mu\text{m}$

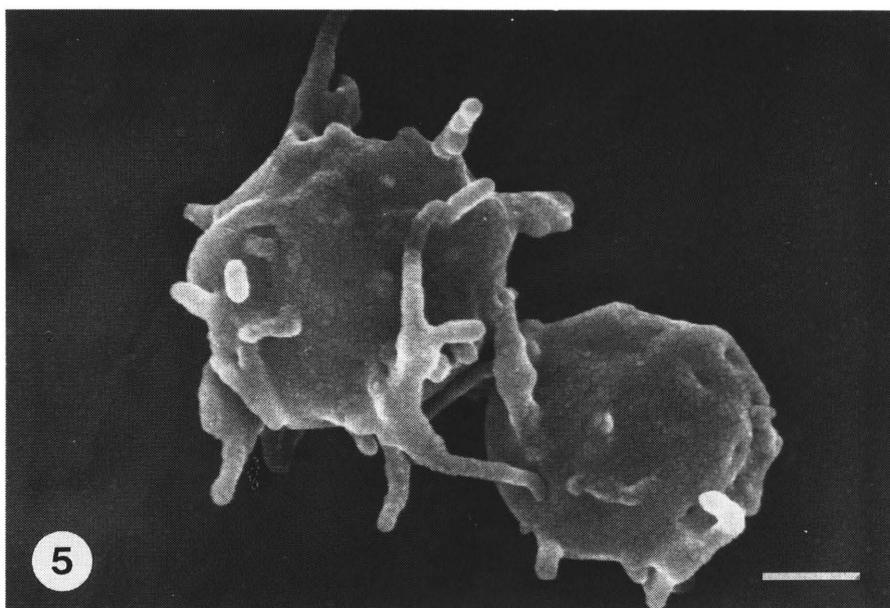


Fig. 5 Human platelets treated with $10 \mu\text{M}$ PGE_1 and 0.5 mM DDA together for 20 minutes. Several pseudopodia or filopodia are seen. Spherical platelets are contact with each other with the pseudopods. Conical depressions are also seen on the surface of the platelets. Bar : $1 \mu\text{m}$

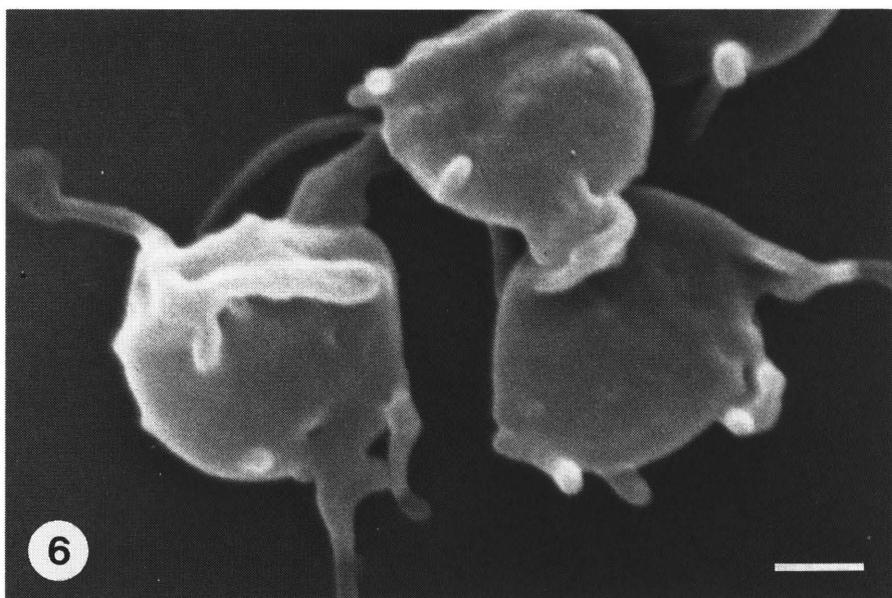


Fig. 6 Human platelets treated with $10 \mu\text{M}$ PGD_2 and 0.5 mM DDA together for 20 minutes. Many pseudopods originating from the platelet surface are seen. Spherical platelets are contact with each other with the pseudopods. Some platelets are irregular in shape. Bar : $1 \mu\text{m}$

同様に観察された。

考 察

著者らはすでに PGE₁、PGD₂ 等の血小板凝集およびその阻害作用に関するコンフォメーションについて構造活性相関の方法により求め、その鋳型のレセプターの特徴を報告してきた(小島, 1991; Ojima, Tokuhira, 1992)。その PG 分子のコンフォメーションは、従来知られているような PG 分子の結晶構造における PG 分子同志の分子間水素結合の形 (Speak, 1977; DeTitta ら, 1980; Stezowski ら, 1983) をとっておらず、大部分は PG 分子の α 側鎖のカルボン酸と 5 員環や ω 側鎖にある OH 基との間で分子内水素結合をしているものであった。最近、溶液状態でのコンフォメーションは、結晶構造の分子間水素結合のものとは異なっており、たとえば、PGI₂ 誘導体のカルバサイクリンでは α 側鎖の C₁ 位カルボン酸と 5 員環の C₁₁ 位 OH 基と、TXA₂ 誘導体の U-46619 では C₁ 位カルボン酸と ω 側鎖の C₁₅ 位 OH 基と、PGD₂ では C₁ 位カルボン酸と 5 員環の C₉ 位 OH 基及び C₁₅ 位 OH 基と、さらに PGE₂ では C₁ 位カルボン酸と C₁₁ 位 OH 基及び C₁₅ 位 OH 基とが分子内水素結合をしている。PGE₂ 及び PGD₂ は PGI₂ と TXA₂ のコンフォメーションを合わせもっていることが Fourier 変換赤外分光分析により明らかにされた (Takasuka ら, 1994)。それらは著者らがすでに予想していたコンフォメーションと一致している (小島, 1991; Ojima, Tokuhira, 1992)。

血小板凝集阻害レセプターは PGI₂、PGE₁、PGD₂、アデノシン、イソプロテレノール等が結合することによって活性化され、続いて adenylyl cyclase を刺激する GTP 結合蛋白 (Gs 蛋白) が活性化され、その結果、Gs 蛋白は adenylyl cyclase を活性化し、cAMP の増加によって血小板凝集を阻害すると考えられている (Schafer ら, 1979; Ashby, 1989; Hourani, Cusack, 1991)。一方、血小板凝集レセプターは TXA₂、PGH₂、アドレナリン、platelet activating factor (PAF)、adenosine diphosphate (ADP) 等が結合することによって活性化され、活性化した凝集レセプターは adenylyl cyclase を阻害する GTP 結合蛋白 (Gi 蛋白) を活性化し、Gi 蛋白は adenylyl cyclase を阻害し、cAMP を低下させ、結果として血小板を凝集させることになる (Hourani, Cusack, 1991)。PGE₁ とアドレナリン- β -アゴニストとの比較で、分子上の原子荷電と側鎖に共通点が多いために、PGE₁ はアドレナリン

- β -アゴニストと同じように cAMP を増加させ、同じような薬理作用を示すことがすでに Hoyland, Kier (1971) により報告されている。

また血小板凝集には血小板アクトミオンが重要な役割をしていることが指摘されている (日高ら, 1980; 小島ら, 1972)。そのために Beckett (1963) が報告した構造活性相関から求めたアセチルコリン平滑筋収縮レセプターのモデルを参考にして、著者らは同じ方法で血小板凝集剤である TXA₂、PGH₂ のコンフォメーションから、血小板凝集レセプターについて模式的に推察し、すでに報告した (小島, 1991; Ojima, Tokuhira, 1992)。著者ら (Ojima, Fujita, 1976) の行なった凝集阻害実験では、PGE₁ は 1 μ M 以上の濃度でヒト血小板の ADP、トロンビン、コラーゲン等による凝集を完全に阻害した。Ashby (1989) は PGI₂ の血小板凝集阻害作用は強力であると述べ、cAMP の動的变化でみると低濃度 (0.03 μ M) の PGI₂ は cAMP を増加させ、短時間 (2 分間) では cAMP の低下はみられない。しかし高濃度 (30 μ M) の PGI₂ では、cAMP の上昇は軽度になり、さらにこの cAMP の上昇は上昇後短時間で低下する。PGE₁ が cAMP を上昇させるためには PGI₂ に比して高濃度 (0.3 μ M 以上) が必要である。また PGE₁ では高濃度でも低濃度でも上昇後 cAMP は短時間で低下してくる。また高濃度の PGI₂ では、PGE₁ にみられる cAMP 濃度の時間的变化と近似してくる。この現象をふまえて Ashby (1989) はレセプター-G 蛋白-adenylyl cyclase の一連の生化学的反応から PGE₁ と PGI₂ は血小板凝集阻害のレセプター及び血小板凝集のレセプターにも結合し、その際 PGE₁ と PGI₂ は凝集阻害のレセプターに同程度に結合しているものの、血小板凝集レセプターには PGE₁ の方が PGI₂ よりも強く結合していると報告している。最近、Ashby のグループ (Kunapuli ら, 1994) は、赤白血病細胞で adenylyl cyclase を阻害するヒト TXA₂ レセプターと相同性を多くもっている EP₃ レセプター (PGE レセプターの 1 種) の存在を明らかにし、そのレセプターには PGE₁、PGE₂ および PGI₂ 誘導体の iloprost が結合していると報告している。赤白血病細胞の receptor radioligand binding assay によって、PGI₂ には親和性の高いレセプターと親和性の低いレセプターの 2 種類があり、前者が adenylyl cyclase を刺激するレセプターであり、後者が adenylyl cyclase を阻害するレセプターであると Murray ら (1989) は報告している。構造上からも溶液状態では、PGI₂ と TXA₂ のコンフォメーションは異なっており、

PGE₂ は両者のコンフォメーションをとれる物質になっていることが明らかにされている (Takasuka ら, 1994). 著者らも以前に同じ結論を報告した (小島, 1991; Ojima, Tokuhiko, 1992).

以上の様な考察から, PGE₁ が血小板凝集阻害レセプターばかりでなく血小板凝集レセプターにも結合する構造をもっている物質であると仮定するならば, PGE₁ には血小板凝集阻害作用ばかりでなく血小板凝集作用も見られてよいものと考えられる. それらの考え方に基づいて, 従来知られている PGE₁ の血小板凝集阻害作用のみならず, 血小板凝集作用を生じうる可能性のあることを今回の実験で確かめた. そのために, 反応時間は PGE₁ が cAMP を上昇させ, ピークに達した後 cAMP が低下してくる状態での 20 分を中心に設定し検索した. PGE₁ 添加後 20 分の時点で対照群の cAMP 量は 12.0 pmol/ml であるが, 0.1 μM PGE₁ 添加群, 1 μM PGE₁ 添加群, 10 μM PGE₁ 添加群はそれぞれの濃度に比例して cAMP 量を増加させ, 10 μM PGE₁ 群では 67.0 pmol/ml にまで増加した (Table 1). しかし, これら 10 μM PGE₁ に adenylyl cyclase 阻害剤である DDA (0.5 mM) を併用した場合には 10 μM PGE₁ 添加群に比べて cAMP 量の増加が有意に抑制された (Table 1). それと平行して, PGE₁ 単独群では血小板凝集が観察されないが, DDA 添加で adenylyl cyclase を阻害した際に血小板凝集が生じうるかどうかを, 走査型電子顕微鏡によって比較検討した. その結果, 10 μM PGE₁ 群, 0.5 mM DDA 群ではいずれも対照群と同様, 血小板凝集はみられず, 個々の血小板はほぼ正常でその表面は平滑であり, ごく少数の血小板の表面に 2~3 の短い突起が認められたにすぎなかった (Figs. 1, 2, 4). それに反し, 10 μM PGE₁ に 0.5 mM DDA を併用すると, 個々の血小板表面に数個の細長い偽足突起が伸びると同時に, 隣接する他の血小板とも突起同志または血小板表面とも接触又は接着し, その際には血小板は変形し, 表面構造も不整となった (Fig. 5). このように血小板凝集の機構として, 血小板膜上のレセプターにはじまり, adenylyl cyclase による cAMP 産生など細胞内反応に変換する過程, 続いて細胞内アクチン系を中心とした収縮蛋白質の生化学的変化が生じる. その際, 形質膜直下に輪状に走るこれら収縮タンパク質の配列が中央部に向かって収縮し, その一部が偽足突起に入り込み血小板の形態の変化としてあらわれる (服部, 1970). これは原則的には ADP による凝集に類似している (White, 1968). さらに時間が経過すると, これ

らの偽足突起が互いに密着し, 偽足内のアクチンフィラメントの収縮によって血小板同志の凝集塊が密着して強固なものとなる (Clarke, 1969). 今回用いた血小板凝集に関する薬剤が血小板の表面に形態の変化をもたらしたことは注目される. 凝集前にみられる血小板表面の陥凹部について Behuke (1967), David-Ferreira (1964) は細胞内の小胞体系と連結する surface connecting system の開口部と解釈し, これを通じて外界の血漿成分が入り込むことも可能であると述べている. 偽足が伸びはじめると, この陥凹部は認められなくなった. このことは Hattori ら (1969) によっても報告されている. また, megakaryocytic leukemia 細胞は PGE₁ 単独によって細胞内 Ca 濃度が増加し, 細胞表面に突起が出現するという報告もあり, PGE₁ によって活性化されるレセプターが血小板形成の初期から存在していると想像される (Nagano ら, 1993).

PGD₂ は PGE₁ の 1.9 倍の凝集を阻害する能力があり (小島, 1991; Ojima, Tokuhiko, 1992), PGD₂ 単独では形態学的にも血小板の凝集はみられない (Fig. 3). しかし, さらに 0.5 mM DDA を併用すると血小板の偽足突起の進展とともに, 血小板凝集が認められた (Fig. 6). これらの凝集所見は 20 分間のインキュベーションでなくても, 5 分間のインキュベーションにおいても既に観察された. PGE₁, PGD₂ の血小板凝集阻害に関して, それぞれのレセプターを紹介する見解はすでに Hourani, Cusack (1991) 及び Schafer ら (1979) により報告されているが, 今回の実験のように PGE₁ または PGD₂ に DDA を併用することで, cAMP 産生を阻止し, 血小板凝集をみたという報告はない. 今回 PGE₁, PGD₂ に DDA を併用することで血小板の凝集をみたのは, PGE₁ または PGD₂ が血小板凝集阻害のレセプターに結合しても adenylyl cyclase 阻害剤の DDA があるために cAMP は産生されず, 血小板凝集阻害の反応へと進行せずに血小板凝集レセプターに結合した反応のみが進行したためであると考えられる. 一方, PGE₁ または PGD₂ の単独投与では血小板凝集と凝集阻害のレセプターに結合するが, その両者のレセプターからの反応が進行し, cAMP は抑制と増加の反応の合計として産生される. DDA 併用の場合と異なり cAMP 量は増加するために (Table 1), 血小板凝集はおこらず凝集阻害 (Ojima, Fujita, 1976) になったと考えられる. ヒスタミン H₁ や H₂, アデノシン A₁ や A₂ 作用あるいはアドレナリン α, β 作用などのように, オータコイドや低分子生体内物質は相反する薬理作用を 1 分子で持っていることが多

い(高柳, 小池, 1986). 低分子の PGE₁ と PGD₂ も相反する薬理作用を1分子でもっていると考えられる. 今回の結果は PGE₁ が既に明らかにされている血小板凝集阻害ばかりでなく, すでに報告されているように(小島, 1991; Ojima, Tokuhiko, 1992), PGE₁ 分子の中に, 1つは血小板の凝集阻害レセプターに結合できる構造と, もう1つは血小板凝集レセプターに結合できる構造の2つが入っていることを一部証明したことになる. また, この結果は Ashby (1989) の cAMP についての解析や Murray ら (1989) の receptor ligand binding assay の解析及び Takasuka ら (1994) のコンフォメーションの光学解析とも一致した.

結 論

PGE₁ および PGD₂ は1分子中に血小板凝集阻害のレセプターに結合する構造と血小板凝集のレセプターに結合する構造とがあり, また, 構造活性相関性から, adenylyl cyclase 阻害剤 DDA を併用することによって血小板凝集がおこるという推定にたち, その影響を観察した. その結果, PGE₁ および PGD₂ は血小板凝集阻害ばかりでなく, 血小板凝集の作用をも有している物質であることを確認した.

文 献

- Ashby, B. (1989): Model of prostaglandin-regulated cyclic AMP metabolism in intact platelets: examination of time-dependent effects on adenylyl cyclase and phosphodiesterase activities. *Mol. Pharmacol.*, 36, 866-873
- Beckett, A. H. (1963): Stereospecificity in the reaction of cholineesterase and the cholinergic receptor. *Ann. New York Acad. Sci.*, 144, 675-688
- Behuke, O. (1967): Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet. *Anat. Rec.*, 158, 121-137
- Bhagwat, S. S., Hamann, P. R., Still, W. C., Bunting, S. and Fitzpatrick, F. A. (1985): Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂. *Nature*, 315, 511-513
- Clarke, J. A. (1969): Surface ultrastructure of platelets and thrombocytes. *Nature*, 223, 401
- David-Ferreira, J. F. (1964): The blood platelet: electron microscopic studies. *Int. Rev. Cytol.*, 17, 99-148
- DeTitta, G. T., Langs, D. A., Edmonds, J. W. and Duax, W. L. (1980): Prostaglandin acids PGE₂ and PGF_{2β}: crystallographic studies of conformational transmission and receptor recognition. *Acta Cryst.*, B36, 638-645
- 服部 晃(1970): 血小板の電子顕微鏡像. 血液と脈管, 1, 667-703
- Hattori, A., Tokunaga, J., Fujita, T. and Matsuoka, M. (1969): Scanning electron microscopic observations on human blood platelets and their alterations induced by thrombin. *Arch. Histol. Jap.*, 31, 37-54
- 日高弘義・西川政勝・東 洋(1980): 血小板の収縮性. 医学のあゆみ, 114, 640-645
- Hourani, S. M. O. and Cusack, N. J. (1991): Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacol. Rev.*, 43, 243-298
- Hoyland, J. R. and Kier, L. B. (1971): Preferred conformation of prostaglandin E₁. *J. Med. Chem.*, 15, 84-86
- Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Namba, T., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. (1994): Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett.*, 344, 74-78
- Kunapuli, S. P., Mao, G. F., Bastepe, M., Liu-Chen, L., Shuixing, L., Cheung, P. P., Deriel, J. K. and Ashby, B. (1994): Cloning and expression of prostaglandin E receptor EP₃ subtype from human erythroleukaemia cells. *Biochem. J.*, 298, 263-267
- Moncada, S., Gryglewski, R. J., Bunting, S. and Vane, J. R. (1976): A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. *Prostaglandins*, 12, 715-737
- Murray, R., Furci, L. and FitzGerald, G. A. (1989): Induction of prostacyclin receptor

- expression in human erythroleukemia cells. *FEBS Lett.*, 255, 172-174
- 17 Nagano, T., Kishimoto, Y., Kimura, T., Ryo, R. and Sato, T. (1993): Ultrastructural analysis of human megakaryocytic leukemia cell line (CMK11-5) following prostaglandin E_1 stimulation. *Int. J. Hematol.*, 58, 197-202
- 18 小島正紀・杉山正康・三木純子・榊婦美子(1972): 血小板と凝集. *血液と脈管*, 2, 1657-1663
- 19 Ojima, M. and Fujita, K. (1976): Inhibition of platelet aggregation and white thrombus by prostaglandin analogue ONO-747. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, 2, 781-785
- 20 小島正紀(1991): プロスタグランジン・リセプターに対する構造活性相関からのアプローチ. *炎症*, 11, 217-224
- 21 Ojima, M. and Tokuhiko, T. (1992): Hypothesis for the receptors of human blood platelet aggregation and its inhibition by structure—activity relationship. *Prostaglandins Leukotriens Essent. Fatty Acids*, 47, 69-76
- 22 Schafer, A. I., Cooper, B., O'Hara, D. and Handin, R. I. (1979): Identification of platelet receptors for prostaglandin I_2 and prostaglandin D_2 . *J. Biol. Chem.*, 254, 2914-2917
- 23 孫 孝義・古川洋太郎・弓田 慈・三浦 良・吉永 馨・山根良太(1985): 血漿 cyclic AMP 測定の基礎的検討と腎原性 cyclic AMP 測定の臨床応用. *日内分泌会誌*, 61, 912-923
- 24 Speak, A. L. (1977): The crystal and molecular structure of prostaglandin E_1 . *Acta Cryst.*, B33, 816-824
- 25 Stezowski, J. J., Flohé, L. and Böhlke, H. (1983): The crystal structure of CG4305, a biologically active prostacyclin analogue with exceptional chemical and metabolic stability. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 22, 1315-1316
- 26 Takasuka, M., Kishi, M. and Yamakawa, M. (1994): FTIR spectral study of intramolecular hydrogen bonding in thromboxane A_2 receptor agonist (U-46619), prostaglandin (PG) E_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, prostacyclin receptor agonist (carbacyclin), and their related compounds in dilute CCl_4 solution: structure—activity relationship. *J. Med. Chem.*, 37, 47-56
- 27 高柳一成・小池勝夫(1986): 薬物受容体—細胞膜にあるレセプターの基礎知識—(高柳一成編), 南山堂, 東京, 85-114
- 28 White, J. G. (1968): Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate. *Blood*, 31, 604-607