

[原著] 血小板 calmodulin 量と血小板機能および 血小板年齢

遠 藤 伸 行*

(昭和63年10月13日受付, 平成元年1月18日受理)

要 旨

感受性の良い radioimmunoassay が開発され多種細胞組織から Calmodulin が測定できるようになって来た。しかし血小板 Calmodulin に関する報告は少ない。各種の62人の血液疾患症例, すなわち23人の自己免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP, SLE), 8人の MDS, 7人の急性白血病 (治療後回復期), 5人の再生不良性貧血, 4人の血栓症, 3人の脾機能亢進症, 12人の血友病および von Willebrand 病ないし血管拡張症症例において RIA Kit を用いて血小板 Calmodulin 量を測定した。Calmodulin 量は ITP, SLE, 再生不良性貧血, 血栓症, 急性白血病, 脾機能亢進症において高い値を示した。特に ITP では治療反応群は初診時未治療もしくは治療無反応群に比べて低い値を示した。血小板凝集能と Calmodulin 量には相関がみられなかった。しかし Calmodulin 量と血小板容積との間には正の相関が見られた。血小板寿命の短い症例での Calmodulin 量は高く, 血小板年齢と Calmodulin 量との間には負の相関が見られた。

Key words: 血小板 calmodulin, 血小板寿命, 血小板年齢

略語一覧:

緒 言

血小板は外部の刺激により活性化され, 細胞内のエネルギー代謝の変化に伴って, 形態変化, 顆粒内成分の放出・凝集, それに続く血餅退縮を引き起こし, 一連の止血機構に重要な役割を果たしている。さらにカルシウムイオンは骨格筋収縮反応時に細胞内情報伝達物質として重要であることが知られているが, 血小板活性化にも大きく関与しているとされている。カルシウムイオン研究の進歩に伴いカルシウム受容蛋白である Calmodulin (CaM) は筋組織以外からも発見され^{1,2)}, 1981年には垣内らによって血小板 CaM の均一精製化がなされている³⁾。非骨格筋細胞である血小板内での CaM は筋細胞と同様のアクトミオシンの収縮機構に関与している。その血小板アクトミオシンの収縮機構にはミオシンL鎖

(Myosin light chain, MLC) のリン酸化が必要^{4,5)}で, その際に働く酵素であるカルシウム依存性 MLC kinase^{6,7)} が CaM をカルシウム受容蛋白としカルシウム調節を司っているとされている。このように CaM は血小板においても活性化作用を来す重要な物質であるにもかかわらず, 各種疾患の血小板における CaM 量測定の報告は見られていない。一方体内流血中の血小板にもその生体寿命がありその病態により血小板回転は異なるとされている。本研究は RIA Kit を用いて血液疾患の血小板 CaM 量を測定し, 血小板凝集能, 血小板寿命 (回転) との関連について検討した。

材料および方法

1. 対象:

当科で診療した自己免疫性血小板減少性紫斑病23例

* 千葉大学医学部第2内科学教室

Nobuyuki ENDOH: Studies of Platelet Calmodulin Level, Platelet Function and Platelet Age in Patients with Hematologic Disease.

The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University Chiba, 280.

Received October 13, 1988. Accepted January 18, 1989.

[特発性血小板減少性紫斑病: idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) 15例, 全身性エリテマトーデス: systemic lupus erythematosus (SLE) 8例], 骨髄増殖性疾患: myeloproliferative disorder (MPD) 8例, 急性白血病: acute leukemia (AL) 7例, 再生不良性貧血: aplastic anemia (AA) 5例, 血栓症〔深部静脈血栓症: deep vein thrombosis (DVT)・播種性血管内凝固症候群: disseminated intra-vascular coagulation (DIC)〕4例, 脾機能亢進症3例, 血友病・von Willebrand 病 (vWD)・血管拡張症12例, 計62例を対象とした。また血液学的所見に異常を認めない正常人13例をコントロールとした。

2. 血小板 CaM 測定:

Chafforleas⁹⁾ らの方法に準じ測定した。すなわち3.15%クエン酸ナトリウム1容, 全血9容の割合で採血し, 600~1000rpm 10分間の遠心で得られた Platelet Rich Plasma (PRP) を更に3000rpm 10秒で遠心し赤血球や他の細胞成分が混入しない上清の PRP を使用した。その PRP に 77mM EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) を加え3000rpm 10分で遠心し血小板 pellet を作成, その pellet を15v/v% ACD (Acid citrate dextrose)・A加 Tris・EDTA buffer (10mM Tris・HCl, 1mM EDTA・2Na, 0.15M NaCl, pH 7.3) で2回洗浄した後, 10mM Imidazol (半井化学薬品), 1mM EGTA [ethylene-bis(oxyethylenenitrile) tetra acetic acid] (和光純薬), 11mM MgCl₂ (和光純薬), 0.15M NaCl (和光純薬), 1mM 2-Mercaptoethanol (Sigma, USA) を含む buffer (pH 7.55) で, 血小板浮遊液 ($1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ /ml) を作成し, 4°C で tapered tissue grinder (WHEATON, USA) にて homogenize した後, 100°C 10分で加熱し, 4°C 10,000rpm 30分遠心して得られた上清を-20°C で保存し試料とした。試料の CaM 測定は CaM [¹²⁵I] RIA Kit (New England Nuclear, Boston, Catalog No. NEK-018) を用い, 得られた検量線より血小板 10^3 個当り (fg/ 10^3 plt) の CaM 量を換算した (図1)。

3. 血小板凝集能:

Born の方法⁹⁾に従い, Collagen (二光バイオサイエンス, collagen reagent horm, No. 10500), Epinephrine (1-アドレナリン d-重酒石酸, 第一化学), ADP (Sigma No. A 0127) を凝集惹起物質とし各終濃度を0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0 μ g(μ M)/ml に調整し NKK Hema tracer (二光バイオサイエンス, Model PAT-2A) を用い10分間における最大凝集率 (maximal aggregation rate: MAR) を観察した。

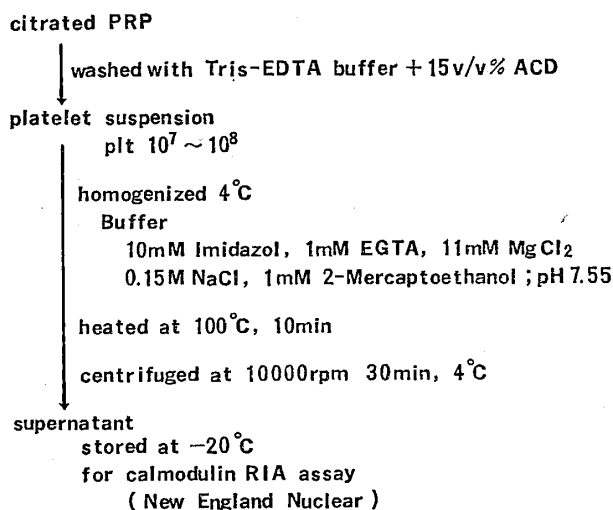


図1. 血小板 calmodulin 試料作製法

4. 血小板寿命測定:

Stuart ら¹⁰⁾ の血小板の持つ過酸化脂質産生能を利用した malondialdehyde (MDA) 測定法を用いた。すなわち単位血小板当りの MDA の産生量を知っており, アスピリン (ASA) 500mg を1回経口投与した後, 経時的に採血し, 血小板の MDA 産生量が ASA 投与前の産生量にまで回復するに要した時間をもって血小板寿命とした。

5. 血小板平均容積測定:

自動血球計数器 (COULTER S-Puls, USA) により血小板平均容積 (Mean Platelet Volume, MPV) を測定した。

結 果

1. 各疾患別血小板 10^3 個当りの血小板 CaM 量:

ITP 16.72 ± 12.4 (*: $p < 0.005$), SLE 13.08 ± 6.5 (**: $p < 0.01$), MPD 12.58 ± 5.87 (*), AL 14.75 ± 5.3 (*), AA 13.3 ± 2.64 (*), DVT・DIC 20.6 ± 12.4 (*), Hypersplenism 19.14 ± 5.5 (*) と正常人 (6.23 ± 3.13 fg/ 10^3 plt) に比し有意に高値を示したが, 血友病および von Willebrand 病ならびに血管拡張症では正常人と同様で有意差を認めなかった (図2)。

2. ITP 症例の病期変化における血小板 CaM の変動:

ITP 症例を診断時末治療群 (*DX/non) と治療反応群 (**: Responder) に分け血小板数当りの CaM 含量を比較すると, DX/non 群では 24.95 ± 14.22 fg/ 10^3 plt であるのに対し, Responder 群は 9.518 ± 2.816 fg/ 10^3 plt ($p < 0.01$) であり治療反応時には血小板 CaM 量は有意に低下した (図3)。

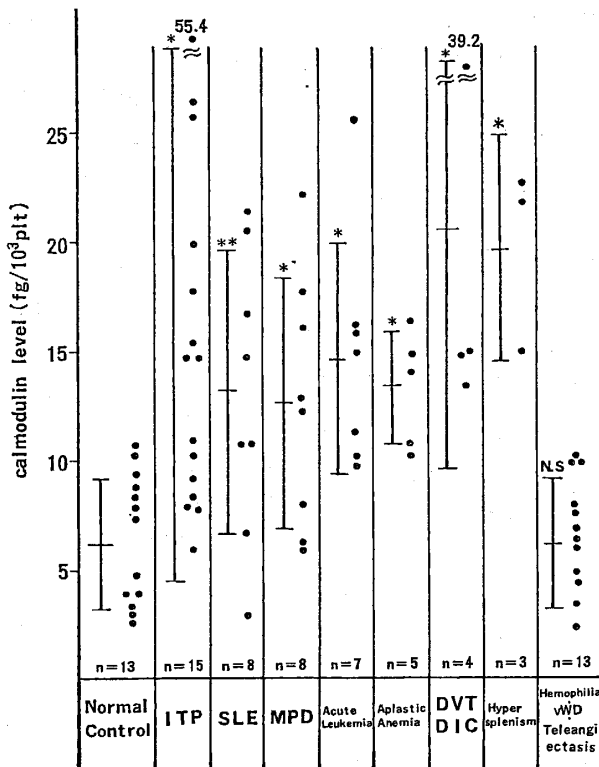


図 2. 疾患別における血小板 10^3 個当りの血小板 calmodulin (* $p<0.005$, ** $p<0.01$, NS: Not Significant)

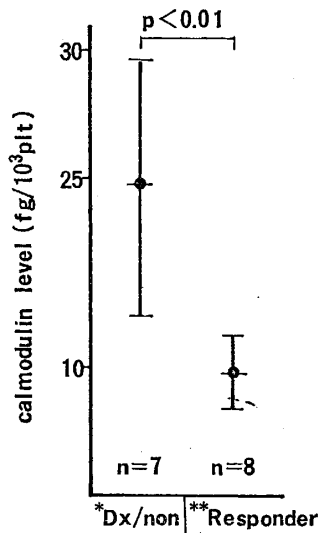


図 3. ITP の病期における血小板 calmodulin の変化(*Dx/non: 診断時もしくは治療無反応時, **Responder: 治療反応時)

3. 血小板凝集能と血小板 CaM 量との関係:

Collagen $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$, Epinephrin $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$, ADP $\leq 0.5\mu\text{M/ml}$ の濃度で 10 分間の最大凝集率 (MAR) が 50% 以上の Hyperaggregability 群 ($n=39$, *) と collagen $\geq 3.0\mu\text{g/ml}$, Epinephrin $\geq 3.0\mu\text{g/ml}$, ADP $\geq 3.0\mu\text{M/ml}$

ml の凝集惹起物質濃度で MAR が 50% を得られなかった Hypoaggregability 群 ($n=17$, **) の血小板 CaM 量を比較すると, Hyperaggregability 群 $9.634 \pm 7.185 \text{ fg}/10^3 \text{ plt}$ に対し Hypoaggregability 群は $8.234 \pm 4.265 \text{ fg}/10^3 \text{ plt}$ であり, 両者に有意な相関は見られなかった (図 4)。

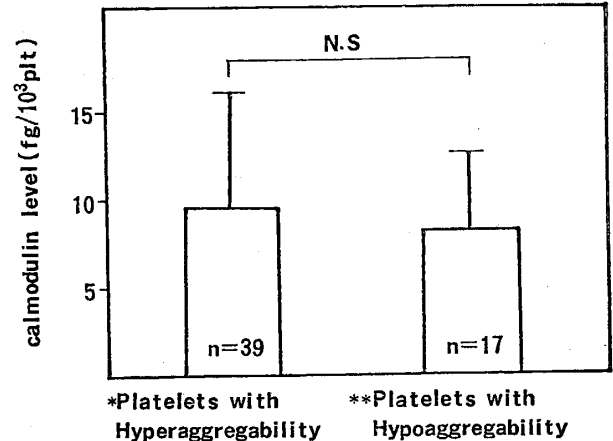


図 4. 血小板凝集能と calmodulin の関係 [*Hyperaggregability: 低濃度の凝集惹起物質 (collagen $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$, epinephrine $\leq 0.5\mu\text{g/ml}$, ADP $\leq 0.5\mu\text{M/ml}$) で MAR が 50% 以下のもの, **Hypoaggregability: 高濃度の凝集惹起物質 (collagen $\geq 3.0\mu\text{g/ml}$, epinephrine $\geq 3.0\mu\text{g/ml}$, ADP $\geq 3.0\mu\text{M/ml}$) で MAR が 50% 以上のもの] MAR: Maximal Aggregation Rate (10 分間における最大凝集率) N. S: Not significant

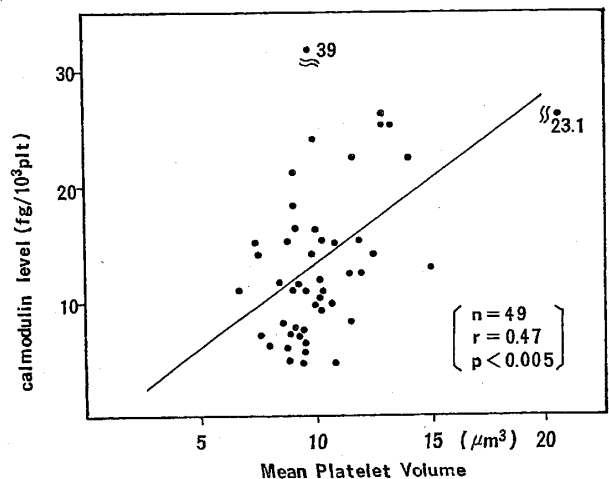


図 5. 血小板平均容積 (Mean Platelet Volume) と calmodulin の関係

4. 血小板平均容積 (MPV) と血小板 CaM 量: Coulter counter で測定し得た MPV と血小板 CaM 量との関係は $r=0.47$ ($p<0.05$) で正の相関が認めら

れ、MPV の増加と共に血小板 CaM 量も増加した (図 5)。

5. 血小板寿命 (platelet life-span) と血小板 CaM 量:

血小板寿命測定者について血小板 CaM 量との関連を見ると、血小板 10^3 個当りの CaM 量では血小板寿命短縮例ほど高い傾向を示し、 $y = -2.6x + 30.7$ 相関係数 $r = -0.788$ の負の直線が得られ、血小板寿命と CaM 量の間には有意な負の相関が認められた (図 6)。

6. ITP 症例の臨床経過における血小板 CaM の変化:

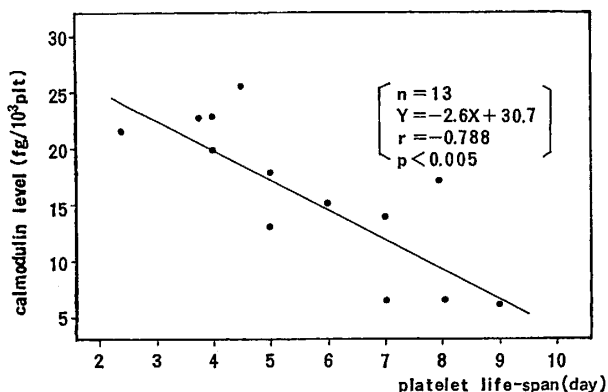


図 6. 血小板寿命と血小板 10^3 個当りの血小板 calmodulin 量

症例; 54歳, 女性, 出血斑, 貧血を主訴に入院。初診時血小板数は $23,000/\text{mm}^3$ であった。Prednisolone (Prednine) 50mg/日で治療開始するも反応なく出血斑の増悪が見られるため、 γ -globulin 大量療法施行後、摘脾術を施行した。摘脾前の血小板寿命は 3.8 日、血小板 CaM は $22.73\text{fg}/10^3\text{plt}$ であった。摘脾後血小板の増加は一過性であったため Vinca-alkaloid [(Vincristine, Vinblastine): V-a] の緩速静注投与¹¹⁾を開始した。V-a 投与 6 週後には血小板は $10 \times 10^4/\text{mm}^3$ を越え出血斑も消失した。同時期の血小板寿命は 7 日、血小板 CaM は $13.76\text{fg}/10^3\text{plt}$ で Predonine 無反応時比で血小板寿命の延長化、血小板 CaM の減少が認められた。その後 V-a の投与間隔は延び血小板数の減少は見られないため Predonine は減量後中止された。血小板数は Predonine 中止後も $10 \times 10^4/\text{mm}^3$ 以上を維持されるようになり V-a 投与は 4~5 週間に 1 回となった。そして血小板寿命は 9 日と正常化し、血小板 CaM も $6.386\text{fg}/10^3\text{plt}$ と正常域の値になった (図 7)。以上より血小板数や血小板寿命と同様に血小板 CaM は臨床経過の指標となりうることを示唆された。

考 按

正常状態では骨髓巨核球から産生された血小板は約

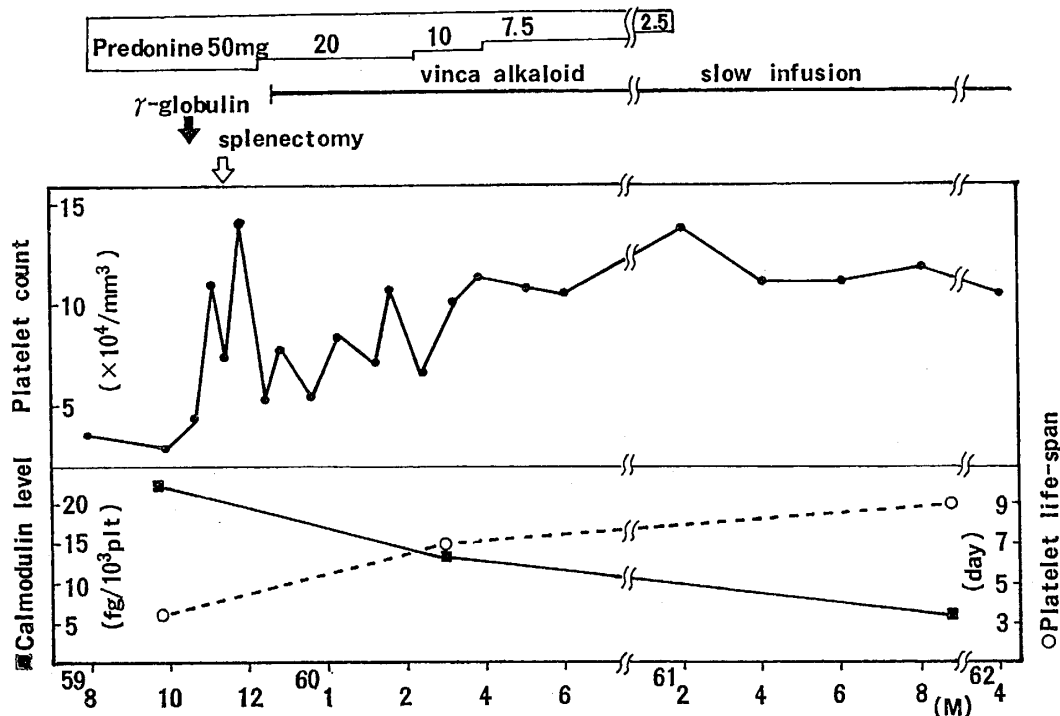


図 7. ITP 症例の臨床経過 [血小板数 (●), 板寿命 (○), 血小板 calmodulin (■) の変化] Vinca-alkaloid 緩速静注投与: vincristin (VCR) $0.02\text{mg}/\text{kg}$ もしくは vinblastine (VLB) $0.1\text{mg}/\text{kg}$ を 500ml の等張液に溶解し遮光しながら 6 時間かけて 1~2 週おきに交互に点滴静注した

7～9日の寿命で崩壊される。そして巨核球からは常時血小板が産生され骨髓での産生と末梢血中での崩壊がバランス良く保たれ末梢血中での血小板数は正常量を示す。ITPあるいはITPを伴うSLEなどの血小板減少症、血栓症(DVT・DIC)等の疾患では血小板寿命は著明に短縮し、巨核球からの有効血小板産生量を示す血小板回転は亢進する¹²⁾。すなわちこれらの疾患では末梢の血小板崩壊が亢進し代償的には骨髓における血小板産生が増加(血小板回転の亢進)しているが崩壊が産生を上回っているために血小板寿命は短縮し、末梢血での血小板数は著減する。脾機能亢進症も血小板寿命の短縮と血小板回転の亢進を来し、脾臓内へ血小板プールに基因して血小板減少を来すが、脾臓内での血小板消費なども加わり、血栓症と同じ血小板回転を示す。またITPなどでは血小板数と血小板寿命との間に正の直線関係が成立し正の相関が^{13,14)}認められるとされており、Branehög¹⁵⁾らは末梢血小板数が50,000以上なら血小板回転は正常上限であるが、血小板数が40,000～50,000以下であれば血小板回転は亢進すると報告している。一方血小板形態については、Murphy¹²⁾らが各種の血小板減少症の血小板を計測し、ITPでは大型であると述べ、Garg¹⁷⁾らも156例の血小板減少症あるいは非血小板減少症の検索でITP, drug induced thrombocytopenia, DIC, SLEでは大型化であると認めている。またBranehög¹⁸⁾はITP 23人について血小板寿命と末梢血小板の直径を調べ、血小板寿命と血小板の大きさには負の相関があると報告している。

血小板内のCaMは垣内³⁾らによって均一精製化されているが、血小板寿命および大きさとの関連についての報告はされていない。1982年Monzon¹⁹⁾らは赤血球CaM含量を測定し、網状赤血球の数に比例し、若い赤血球がCaMを多く含んでいると報告している。本研究は血小板においてCaMを測定し、ITP, SLE, 血栓症(DVT, DIC)など血小板寿命が短縮し、大型で幼若血小板が多数見られる疾患で有意に血小板CaM含量が高値を示すことを認めた。さらに治療との関連を見ると、治療前もしくは治療に反応しない時期のITPでは治療に反応し血小板数が正常化しつつあるITPに比べ血小板CaM量より高い値を示した。1症例につき血小板数、血小板寿命、血小板CaM(図7)の経時的変化を観察したところ、治療に反応し血小板数の回復が見られ血小板寿命も正常化しつつある時期では血小板CaMは治療無反応時に比べ低下しており、血小板数、血小板寿命が正常域にある時期では血小板CaMは正常人と同値を示した。また血小板平均容積(MPV)と血

小板CaM量について関連を見ると、両者の間に正の相関を認め大型のいわゆる新生(幼若)血小板により多くのCaMが含まれるという結果をえた。このことはMonzonらが報告した様に若い細胞により多くのCaMが含まれるということと矛盾しない。再生不良性貧血の血小板寿命は正常で血小板回転は減少しているが、正常人に比し血小板CaM含量が増えていることは、いずれの症例も何らかの治療を受け、ある程度の血小板産生能が回復し、血小板回転が亢進傾向にあったためと思われる。急性白血病も病期によって血小板回転は異なってくる。つまり急性期の病的細胞が著増している時期では血小板産生能は高くなり血小板回転は亢進してくる。本研究の観察し得た急性白血病では急性期の病的細胞が多い時期の血小板CaMは正常人と同じレベルにあり、治療回復期にある時期ではいずれも有意に高値を示した。以上より血小板CaMはその疾患の病期に大きく関連があると考えられ、特に骨髓での血小板産生能に左右されることが示唆された。

血小板年齢と機能との関係についてHirsch²⁰⁾は粘着能に関して、Karparkin²¹⁾らは凝集能について検討し、幼若血小板と老熟血小板の2つにおいて差があるかを述べている。そこでは老熟血小板が幼若血小板に比べ粘着能も凝集能も低下しているとされているが、本研究では凝集能と血小板CaMの間に有意な相関を認めなかった。西川²²⁾らはCaMと直接結合し、その生物活性を阻害するCalmodulin interacting agents²³⁻²⁶⁾として、W-7[N-(6-aminohexyl-5-chloro-L-naphthalensulfonamid)]²⁷⁾を用い、血小板凝集やMyosin light chain(Ca²⁺存在下で分子量20000dalton, MLC)のカルシウム依存性リン酸化反応の変化を検討し、W-7投与によりEpinephrine, Collagen, ADP, Ristocetinなどの凝集惹起物質による血小板凝集は抑制され、さらに血小板MLCのカルシウム依存性リン酸化反応はW-7濃度依存性に抑制されることを報告している。血小板は非筋細胞にもかかわらず、actomyosin系収縮蛋白質を豊富に含まれており、MLCのリン酸化反応が血小板の放出・凝集反応との深い関わりを持つとされている。その反応に際してMLCを特異的にリン酸化する酵素のMLCK(Myosin light chain kinase)は $10^{-6} \sim 10^{-5}$ モルカルシウムイオン存在下にCaMにより活性化され、血小板myosinはMLCのリン酸化によりはじめてactinとの特異的結合性を得、顆粒の胞体中央部への偏在化、そしてopen canalicular systemを介する放出に至る。したがってCaMのMLCK活性化作用を阻害することで放出・凝集にまで至る血小板活性化は抑えられるこ

とになるが、現在のところ何 μg の濃度の量の CaM で血小板活性化が惹起され、何 μg の濃度の量の CaM を阻害すれば血小板活性化を抑制できるかの具体的な知見は得れていない。本研究での血小板凝集能を施行した者について CaM 量との関連を見たところ、血小板凝集の強さと CaM 量との間には有意な相関は認められなかったことから、血小板活性化には血小板内の CaM の量とは関係なく、血小板の外部からの刺激後のカルシウムイオンの上昇、ならびにそのカルシウムイオン存在下において CaM の MLC リン酸化作用が重要であるということが示唆された。それは血小板凝集が欠如し出血傾向の状態にあり血小板数の減少を来していた血小板無力症の 1 例での血小板 CaM 量が高値を示した（データ上 1 例のため削除）ことでも充分裏づけられると思われる。とともに、いまだ十分な治療法が確立されていない出血傾向患者のより良い治療解決の糸口になると思われる。

結 語

1) 血小板 Calmodulin を測定し、ITP, SLE, 急性白血病、再生不良性貧血、血栓症、脾機能亢進症の各群で上昇が見られた。

2) 血小板数回復時の ITP は血小板減少時の ITP に比べて血小板 Calmodulin は低い値を示した。

3) 血小板 Calmodulin 量と血小板凝集能との間には相関が見られなかった。

4) 血小板 Calmodulin 量と血小板平均容積の間には正の相関が認められた。

5) 血小板寿命の短縮している症例での血小板 Calmodulin 量は血小板年齢と関係があると示唆された。

稿を終わるにあたり、本研究に関し多大な御指導御鞭撻を賜りました千葉大学医学部内科学第 2 講座吉田尚教授に深甚なる謝意を表します。併せて終始新しく御指導下さいました、千葉大学医学部内科学第 2 講座の王伯銘博士に心より感謝致します。また、種々の御指導ご協力を頂きました千葉大学医学部附属病院輸血部講師浅井隆善博士、国立柏病院内科医長伊藤国明博士、および千葉大学医学部第二内科学講座血液研究室の諸先生に心から感謝致します。なお本論文は審査学位論文である。

SUMMARY

There have been numerous studies of Calmodulin (CaM) in various cells and tissue since a sensitive radioimmunoassay (RIA) was developed. Only few investigations on platelet calmodulin level were reported. In the present study, calmodulin levels in platelets from 62 patients

with hematologic disease, including 23 patients with autoimmune thrombocytopenic purpura (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: ITP, Systemic Lupus Erythematosus: SLE), eight with myeloproliferative disorders, seven with acute leukemia in their recovery phases, five with aplastic anemia, four with thrombosis, three with hypersplenism and twelve with hemophilia, von Willebrand disease and teleangiectasis, was measured by RIA. The platelet calmodulin level was increased in patients with ITP, SLE, aplastic anemia, thrombosis, acute leukemia, hypersplenism. The patients with ITP who had responded to the therapy had decreased platelet calmodulin level, compared with those at initial diagnosis or those failed to respond to therapy. It was found that the platelet calmodulin level was correlate with mean platelet volume, but there was no relationship between the level of platelet calmodulin and platelet aggregability.

The level of platelet calmodulin increased with shortening platelet life-span, indicating that the platelet calmodulin level inversely correlated with platelet age.

文 献

- 1) Kakiuchi S and Yamaaki R: Stimulation of the activity of cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase by calcium ion. *Proc Jpn Acad* 46: 387-392, 1970.
- 2) Ckeung WY: Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 38(3): 533-538, 1970.
- 3) Kakiuchi, S Sobue K, Yamazaki R, Kambayashi J, Sakon M and Kosai G: Lack of tissue specificity of calmodulin: a rapid and high yield purification method. *FEBS Lett* 126: 203-207, 1981.
- 4) Adelstein RS, Conti MA and Anderson W Jr: Phosphorylation of human platelet myosin. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3115-3119, 1973.
- 5) Adelstein RS and Conti MA: Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature* 256: 597-598, 1975.
- 6) Dabrowska R and Harshorne DJ: A Ca^{2+} and modulator-dependent myosin light chain kinase from non-muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 85: 1352-1359, 1978.
- 7) Hathaway DR and Adelstein RS: Human platelet myosin light chain kinase require the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1653-1657, 1979.
- 8) Chaforleas JG, Dedman JR, Munjaal RP,

- and Means AR: Development of a sensitive radioimmunoassay. *J Biol Chem* 254(20): 10262-10267, 1976.
- 9) Born GVR: Aggregation of blood platelet by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194: 927-929, 1962.
 - 10) Stuart MJ, Murphy S and Oski FA: A simple nonradioisotope technic for the determination of platelet life-span. *N Engl J Med* 292: 1310-1313, 1975.
 - 11) 遠藤伸行, 王 伯銘, 脇田 久, 中村博敏, 杉浦ゆり, 浅井隆善, 伊藤国明, 吉田 尚: 難治性 ITP に対する Vinca-Alkaloid 緩速静注療法の試み. *臨床血液* 28(2): 194-198, 1987.
 - 12) Harker LA and Hinch CA: Thrombokinetics in man. *J Clin Invest* 48: 963-974, 1969.
 - 13) Baldini M: Idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 274(22): 1245-1251, 1966.
 - 14) Aster RH and Keen WR: Site of platelet destruction in idiopathic thrombocytopenia. *Brit J Haemat* 16: 61-73, 1969.
 - 15) Branehög I, Kutti J and Weinfeld A: Platelet survival and platelet production in ITP. *Brit J Haemt* 27: 127-142, 1974.
 - 16) Murphy S, Oski FA, Naiman JL, Lusch CJ, Goidberg S and Gardner FH: Platelet size and kinetics in hereditary and acquired thrombocytopenia. *N Engl J Med* 286(10): 499-504, 1972.
 - 17) Garg SK, Laekner H and Karpatkin S: The increased percentage in megathrombocytes in various clinical disorder. *Ann Internal Med* 77: 361-369, 1972.
 - 18) Branehög I, Kutti J, Ridell B, Smolin B and Weinfeld A: The relation of thrombokinetics to bone marrow megakaryocytes in ITP. *Blood* 45(4): 551-561, 1975.
 - 19) Monzon CM, Penniston JT, Fairbanks VF and Burgert EO: Erythrocytic calmodulin correlates with red cell age. *Brit J Haemt* 51(2): 261-264, 1982.
 - 20) Hirsh J, Glynn MF and Mustard JF: The effect of platelet age on platelet adherence to collagen. *J Clin Invest* 47: 466-473, 1968.
 - 21) Karpatkin S: Heterogeneity of human platelet. *J Clin Invest* 48: 1083-1087, 1969.
 - 22) 西川政勝, 佐々木泰治, 生川早智子, 日高弘義: 血小板凝集におけるカルシウム依存性リン酸化反応の役割について. *血液と脈管* 11: 379-383, 1980.
 - 23) Levin RM and Weiss B: Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of brain. *Mol Pharmacol* 12: 581-589, 1976.
 - 24) Hidaka H, Yamaki T, Totsuka T and Asano M: Selective inhibitors of Ca^{2+} -binding modulator or phosphodiesterase produce vascular relaxation and inhibit actin-myosin interaction. *Mol Pharmacol* 15: 49-59, 1979.
 - 25) Hidaka H, Asano M, Iwadare S, Matsumoto I, Totsuka T and Aoki N: A novel vascular relaxing agent, N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamid which affects vascular smooth muscle actomyosin. *J Pharmacol Exp Ther* 207: 8-15, 1978.
 - 26) Hidaka H, Naka M and Yamaki T: Effect of novel specific myosin light chain kinase inhibitors on Ca^{2+} -activated Mg^{2+} -ATPase of chicken gizzard actomyosin. *Biophys Res Commun* 90: 694-699, 1979.
 - 27) Hidaka H, Yamaki T, Naka M, Tanaka T, Hayashi H and Kobayashi R: Ca^{2+} -regulated modulator protein interacting agent inhibit smooth muscle Ca^{2+} -stimulated protein kinase and ATPase. *Mol Pharmacol* 17: 66-72, 1980.