

# コイの栓球とラット血小板の凝集反応の比較とプロスタグランジン系物質の関与について

松下映夫\*<sup>1</sup>・田中竜介\*<sup>1</sup>・近藤昌和\*<sup>2</sup>・高橋幸則\*<sup>2</sup>・  
宮本美津子\*<sup>3</sup>・車谷 元\*<sup>3</sup>

## Comparison of Carp Thrombocyte and Rat Platelet Aggregation Behaviors and Possible Involvement of a Prostaglandin in the Mechanisms of Carp Thrombocyte Aggregation

Teruo Matsushita\*<sup>1</sup>, Ryusuke Tanaka\*<sup>1</sup>, Masakazu Kondo\*<sup>2</sup>,  
Yukinori Takahashi\*<sup>2</sup>, Mitsuko Miyamoto\*<sup>3</sup> and Hajimu Kurumatani\*<sup>3</sup>

Aggregation of carp (*Cyprinus carpio*) thrombocytes, in comparison with that of rat platelets, was studied by the whole blood method using an impedance aggregometer. Carp thrombocyte aggregation, much like that of rat platelets, was triggered by collagen. Adenosine 5'-diphosphoric acid (ADP) caused rat platelet aggregation but failed to induce carp thrombocyte aggregation. While arachidonic acid effectively induced rat platelet aggregation, carp thrombocytes did not respond to the addition of arachidonic acid in 3 out of 4 cases. These findings show differences in aggregation behaviors, in response to various aggregating agents, between rat platelets and carp thrombocytes. The aggregating responses of rat platelets induced by collagen and arachidonic acid were inhibited by pretreatment of blood with indomethacin, a typical cyclooxygenase inhibitor. ADP-induced platelet aggregation in rats was not inhibited by indomethacin. Involvement of a prostaglandin, such as thromboxane A<sub>2</sub>, in the mechanism of rat platelet aggregation induced by collagen and arachidonic acid is suggested by results obtained using a light transmission method. We were the first to demonstrate inhibition of collagen-induced carp thrombocyte aggregation by indomethacin. This raised the possibility of prostaglandin involvement in the mechanism of carp thrombocyte aggregation, in a manner similar to that in rat platelets. However, carp thrombocytes reportedly do not biosynthesize thromboxane A<sub>2</sub>, the prostaglandin with the most potent aggregating activity, from arachidonic acid.

### 1 緒 言

哺乳類の血小板に相当する魚類の栓球は生理的に止血に関与することが知られているが<sup>1,2)</sup>、凝集反応の分子メカニズムについては、ヒトなどの哺乳類と比較すると、あまり研究が進んでいない。哺乳類においては、コラーゲンおよびアラキドン酸などの凝集惹起剤で血小板を刺激する

と、血小板内でアラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ代謝物であるプロスタグランジン類が生成し、その中でもトロンボキサンA<sub>2</sub>が凝集を引き起こすことが知られている<sup>3)</sup>。これらの凝集は、シクロオキシゲナーゼの特異的な阻害薬であるインドメタシン<sup>4)</sup>の処置により抑制される<sup>5-11)</sup>。一方、アデノシン5'-二リン酸(ADP)刺激によっても哺乳類の血小板凝集が惹起されるが、この凝集はインドメタ

2004年1月14日受付. Received January 14, 2004.

- \* 1 水産大学校食品化学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).
- \* 2 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).
- \* 3 東レ(株)医薬研究所 (Pharmaceutical Research Laboratories, Toray Industries Inc., 1111 Tebiro, Kamakura, Kanagawa 248-8555, Japan).

シンにより抑制されず<sup>11,12)</sup>、プロスタグランジン系物質が関与しない凝集である。本研究では、魚類であるコイの凝集反応の分子メカニズムを明らかにする目的で、コラーゲン、アラキドン酸、ADPを凝集惹起剤として用い、哺乳類であるラットの血小板と同様に凝集が惹起されるか否かを比較した。また、凝集が惹起された場合には、シクロオキシゲナーゼ阻害薬のインドメタシンを用いて、その凝集メカニズムにプロスタグランジン系物質が関与しているか否かを検討した。

## 2 材料および方法

### 2.1 実験動物

コイは水産大学校小野臨湖実験実習場（山口県宇部市）より搬入し、水温25℃で飼育されたもの（体重500-1000g）を実験に供した。ラットはWistarラット（オス、10-14週齢）をセアック吉富株（福岡県築上郡）より購入し、室温23-26℃で飼育したもの（体重400-600g）を実験に供した。

### 2.2 試薬

コラーゲン（タイプI、馬の腱由来）はモリヤ産業株（東京都杉並区）より、アラキドン酸、インドメタシンおよびキナルジンは和光純薬株（大阪市中央区）より、アデノシン5'-二リン酸（ADP）およびクエン酸ナトリウムはSIGMA-ALDRICH（St. Louis, USA）より購入し実験に用いた。

### 2.3 採血

コイをキナルジン20ppmによって麻酔し尾柄部血管より注射器（10mlの注射筒、19ゲージ注射針）を用いて約9mlを採血した。なお、注射筒内には3.8%クエン酸ナトリウム含有生理食塩水（1ml）をあらかじめ加えておき、血液の凝固を防止した。

ラットをエーテル麻酔下で頸動脈にポリエチレンチューブ（内径15mm）のカニユーレを挿入し約10-15mlの血液を試験管内に採取した。試験管内に1/9容の3.8%クエン酸ナトリウム含有生理食塩水を加えて血液の凝固を防止した。

採取したコイおよびラットの血液は室温に置き、凝集能の測定は採血後3時間以内に行った。採血した血液に抗凝固剤を添加しても、採血後は血小板および栓球が自然凝集を起こし消費されていくため、時間が経過すると凝集惹起

剤による凝集反応が検出しにくくなるが、3時間内であれば比較的再現性のある凝集反応が得られるためである。

### 2.4 凝集能の測定

コイの栓球およびラット血小板凝集の測定はChrono-log社（Haverton, PA, USA）の全血凝集計（Whole blood aggregometer; 560-VS型）を用いインピーダンス法（Electrical impedance measurement）<sup>13,14)</sup>によって行った。なお、測定温度はコイおよびラットの場合にそれぞれ25および37℃で行った。

血液1000 $\mu$ lを入れたキュベットを凝集計に装着し、レコーダーの基線が安定した後に、300mM CaCl<sub>2</sub>を10 $\mu$ l添加し、約4-6分後インドメタシンまたは対照用溶媒（DMSOの最終濃度：0.1%）を1 $\mu$ l添加し約4-6分間ブレインキュベットした。その後、凝集刺激剤（10 $\mu$ l）を加えて凝集を惹起し、凝集の程度（インピーダンス（単位： $\Omega$ ）の変化）を経時的に記録し凝集曲線を得た。凝集能の値として、凝集曲線の最大凝集が得られた時点の値（最大インピーダンス）を採用した。なお、凝集惹起剤のコラーゲン、アラキドン酸、ADPは、それぞれSKF緩衝液、10%エタノール、生理食塩水に溶解して反応系に添加した。

### 2.5 統計処理

比較する群間の等分散を確認し、t-検定を実施した。

## 3 結果

### 3.1 コラーゲンによる凝集

ラットの場合、コラーゲン（1-10 $\mu$ g/ml）の添加により血小板の凝集が惹起され、その大きさは添加した濃度に依存して大きくなった（Fig. 1, Panel.A）。なお、1 $\mu$ g/mlの濃度以上で明確に凝集が惹起されたと認められる凝集曲線が得られた（Fig. 1, Panel.A）。コイにおいてもラットと同様に、コラーゲン（1-10 $\mu$ g/ml）添加により栓球の凝集が惹起された（Fig. 1, Panel.B）。なお、コイではコラーゲンの添加後、最大凝集に達するまでの時間は約20分であり、ラットの場合（約4-6分）に比べて長く、凝集反応の速度が遅いことが観察された（Fig. 1, Panel.A and Panel.B）。

なお、ラットおよびコイの場合に共通して、コラーゲンを含まない溶媒（SKF緩衝液）の反応系への添加では、血小板および栓球の凝集は惹起されなかった。

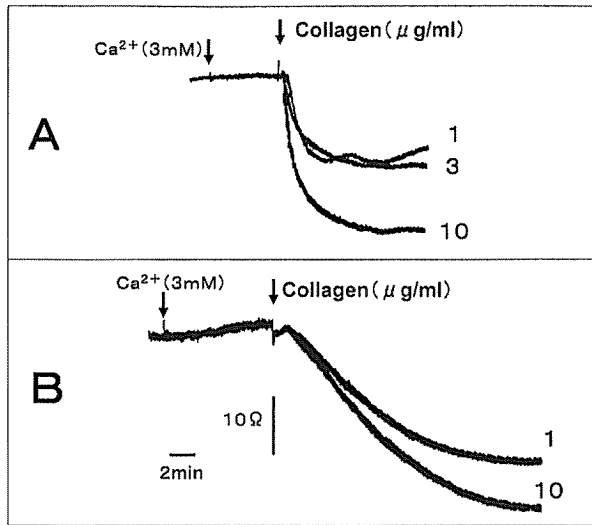


Fig. 1. Typical rat platelet (panel A) and carp thrombocyte (panel B) aggregation curves, obtained with collagen (1~10 μg/ml) induction. Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 37°C for 4-6 min and collagen (1, 3, 10 μg/ml) was then added at the time indicated. Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 25°C for 8-9 min and collagen (1, 10 μg/ml) was then added at the time indicated.

### 3.2 アラキドン酸による凝集

ラットにおいて、アラキドン酸 (30~100 μM) の添加により血小板の凝集が惹起され、その大きさは添加した濃度に依存して大きくなった (Fig. 2)。なお、30 μM の濃度以上で明確に凝集が惹起されたと認められる凝集曲線が得られた (Fig. 2)。一方、コイの場合については、アラキドン酸 (100 μM) の添加により栓球凝集が惹起される場合 (4例中1例) (Fig. 3, d) と、惹起されない場合 (4例中3例) (Fig. 3, a, b, c) が観察された。

### 3.3 ADPによる凝集

ラットにおいて、ADP (6~60 μM) の添加により血小板の凝集が惹起され、その大きさは添加した濃度に依存して大きくなった (Fig. 4, Panel.A)。なお、6 μM の濃度以上で明確に凝集が惹起されたと認められる凝集曲線が得られた (Fig. 4, Panel.A)。一方、ADP (60 μM) の添加によりコイの栓球凝集は惹起されなかった (Fig. 4, Panel.B)。その時用いたADPの濃度 (60 μM) はラットにおいて凝集が起こりはじめる濃度の10倍量の60 μM の濃度であり、十分高濃度であるにもかかわらず、コイでは全く凝集が惹起されなかった。ADPによる凝集が惹起されないことを確認した後に、同じ血液試料内にコラーゲン (10 μg/ml) を追加添加すると新たにコラーゲンによる凝集が惹起されるため、マゴイ栓球の凝集機能が失活して

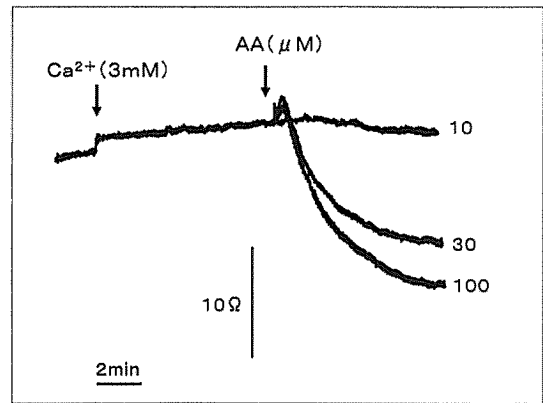


Fig. 2. Typical rat platelet aggregation curves, obtained with arachidonic acid (AA) (10~100 μM) induction. Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 37°C for 7-9 min and AA (10, 30, 100 μM) was then added at the time indicated.

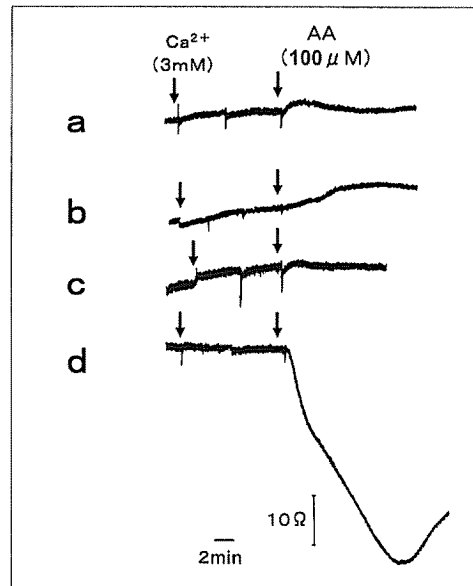


Fig. 3. Typical carp thrombocyte aggregation curves, obtained with arachidonic acid (AA) (100 μM) induction. Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 25°C for 8-10 min and AA (100 μM) was then added at the time indicated. AA failed to induce thrombocyte aggregation in 3 (a, b, c) out of 4 cases. AA induced thrombocyte aggregation in 1 (d) out of 4 cases.

いるわけではないことが確認された (Fig. 4, Panel B)。

### 3.4 凝集反応に対するインドメタシン前処置の効果

ラットにおいて、コラーゲン (1 μg/ml) による血小板凝集はインドメタシン (100 μM) の前処置により完全に抑制された (Fig. 5)。また、アラキドン酸 (30 μM) による血小板凝集はインドメタシン (30 μM) 前処置により有意に抑制された (Fig. 6)。しかしながら、ADP (6

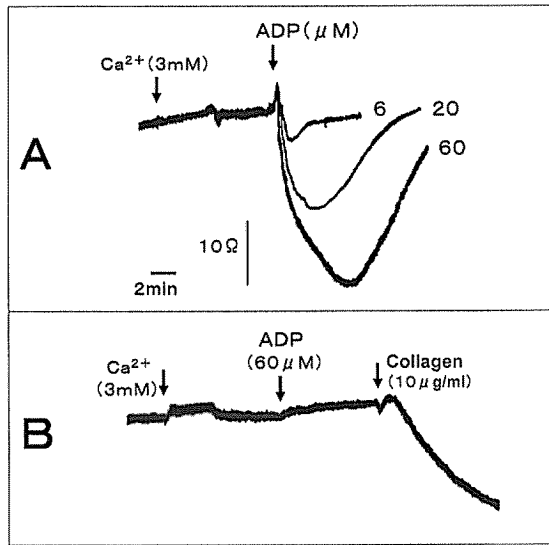


Fig. 4. Typical rat platelet (panel A) and carp thrombocyte (panel B) aggregation curves, obtained with ADP (6 ~ 60 μM) induction. Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 37°C for 8 - 9 min and ADP (6, 20, 60 μM) was then added at the time indicated. Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 25°C for 10-12 min and ADP (60 μM) was then added at the time indicated. After the failure of ADP-induced aggregation, collagen (10 μg/ml) was added to the same incubation mixture.

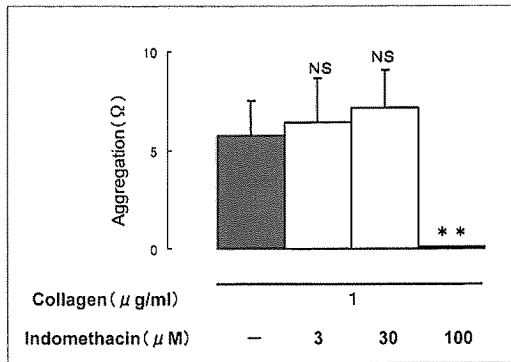


Fig. 5. Effect of indomethacin (3 ~ 100 μM) on rat platelet aggregation induced by collagen (1 μg/ml). Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 37°C for 4 - 6 min in the presence of vehicle (DMSO) or indomethacin (3, 30, 100 μM) and collagen (1 μg/ml) was then added. The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of collagen. Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation of 2 - 4 determinations, respectively. \*\*P < 0.01 vs vehicle control. NS means not significant vs vehicle control.

および20 μM)による血小板凝集はインドメタシン (30および100 μM)により抑制されなかった (Fig. 7)。

コイにおいて、コラーゲン (1 μg/ml)による栓球凝集はインドメタシン (3 ~ 10 μM)前処置により抑制され

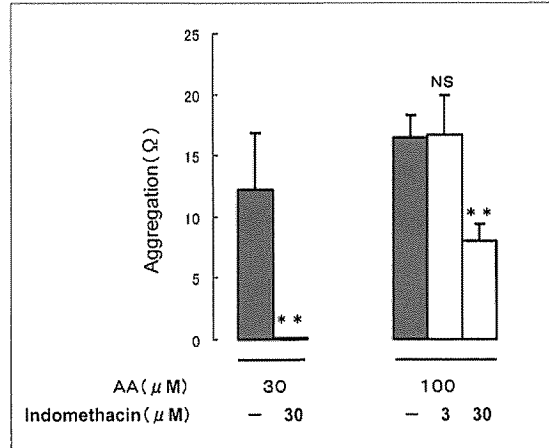


Fig. 6. Effect of indomethacin (3 ~ 30 μM) on rat platelet aggregation induced by arachidonic acid (AA) (30 ~ 100 μM). Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 37°C for 7 - 9 min in the presence of vehicle (DMSO) or indomethacin (3, 30 μM) and AA (30, 100 μM) was then added. The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of AA. Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation of 2 - 6 determinations, respectively. \*\*P < 0.01 vs vehicle control. NS means not significant vs vehicle control.

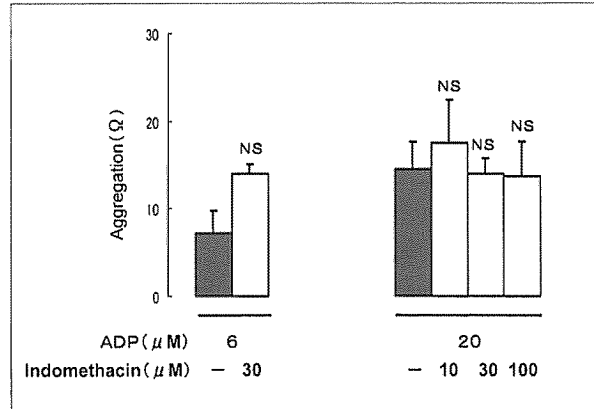


Fig. 7. Effect of indomethacin (10 ~ 100 μM) on rat platelet aggregation induced by ADP (6 ~ 20 μM). Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 37°C for 8 - 9 min in the presence of vehicle (DMSO) or indomethacin (10, 30, 100 μM) and ADP (6, 20 μM) was then added. The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of ADP. Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation of 2 - 4 determinations, respectively. NS means not significant vs vehicle control.

た (Fig. 8)。また、アラキドン酸で凝集が惹起された個体1例について、その凝集がインドメタシン (30 μM)前処置により抑制される傾向がみられたが、有意な抑制ではなかった (Fig. 9)。

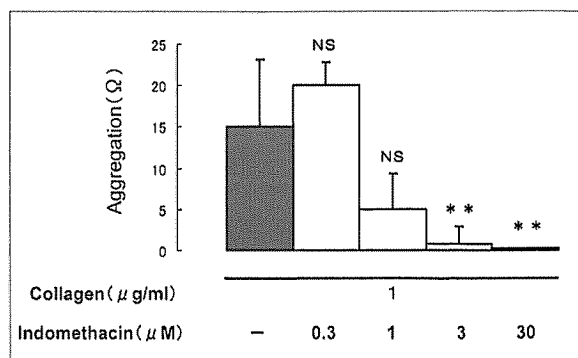


Fig. 8. Effect of indomethacin (0.3~30 μM) on carp thrombocyte aggregation induced by collagen (1 μg/ml). Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 25°C for 8 min in the presence of vehicle (DMSO) or indomethacin (0.3, 1, 3, 30 μM) and collagen (1 μg/ml) was then added. The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance induced by the addition of collagen. Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation of 2-8 determinations, respectively. \*\*P<0.01 vs vehicle control. NS means not significant vs vehicle control.

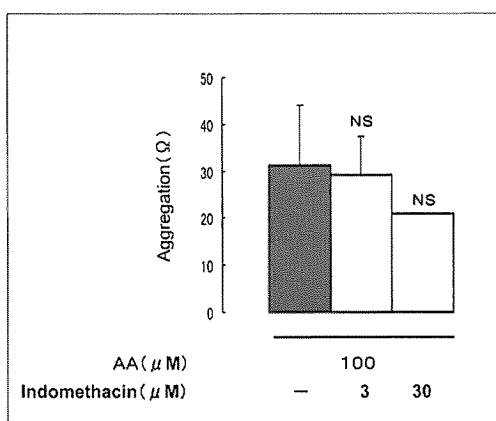


Fig. 9. Effect of indomethacin (3~30 μM) on carp thrombocyte aggregation induced by arachidonic acid (AA) (100 μM), in the case shown in Fig. 3. Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 25°C for 8-10 min in the presence of vehicle (DMSO) or indomethacin (3, 30 μM) and AA (100 μM) was then added. The extent of aggregation was expressed as the maximum impedance change induced by the addition of AA. Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation of 2-4 determinations, respectively. NS means not significant vs vehicle control.

#### 4 考 察

本研究では、魚類の栓球の凝集反応の分子メカニズムを明らかにする目的で、魚類より研究が進んでいる哺乳類の血小板と、その凝集反応を比較した。哺乳類として比較的容易に入手が可能なラットの血液を、同様に入手と採血の容易性から魚類としてコイの血液を用いた。凝集反応の測

定は「全血凝集インピーダンス法」<sup>13,14)</sup>により行なった。

通常の凝集の測定法には、試料として多血小板血漿 (PRP) や洗浄血小板を用いる「Bornの比濁法」<sup>14,15)</sup>があり、哺乳類の場合に多く用いられている。その他の凝集測定法として、試料として全血を用いる「全血凝集インピーダンス法」<sup>13,14)</sup>が報告されている。この方法は、血液に微弱電流を流して血小板 (または栓球) 凝集による白金電極間の電気抵抗の変化を測定する方法である。魚類の栓球の場合は、哺乳類の血小板と異なり血液中に存在する種々の細胞間の大きさの差が小さく、低回転速度の遠心分離のみで簡単に栓球を赤血球や白血球等から分離することはできないため、PRPに相当する多栓球血漿を哺乳類のように調製することは非常に困難であり、「Bornの比濁法」を用いることは難しい。今回の様に、哺乳類と魚類の血小板 (栓球) 凝集を、同じ条件で調製した試料を用い、同じ凝集測定法で比較しようとする場合には、「全血凝集インピーダンス法」は適した方法である。また、この方法は血液全体、即ち、全血を用いるので赤血球や白血球も反応系に共存するため、より生理的状态に近い凝集反応を観察できるという利点もある。

コラーゲン、アラキドン酸、ADPを凝集惹起剤として用いた場合、コイの栓球とラットの血小板の凝集反応の応答性の違いが観察された。コラーゲンによる凝集はコイ栓球およびラット血小板で共通に認められた。一方、アラキドン酸による凝集はラット血小板では惹起されたが、コイ栓球では大部分の個体では凝集が惹起されず、一部の個体 (4例中1例) でのみ凝集がみられた。更にADPによる凝集はラット血小板では惹起されたが、コイ栓球では全く惹起されなかった。この様にコイの栓球凝集とラットの血小板凝集の場合に凝集剤の種類により反応性が多少異なる事が明らかとなった。なお、Kayamaら<sup>16)</sup>は、本実験と条件が多少異なるが、コイの洗浄栓球とヒトの洗浄血小板を用い、顕微鏡下で凝集を観察する系で同様の結果を報告している。

本実験において、「全血凝集インピーダンス法」を用いたラット血小板のコラーゲンおよびアラキドン酸による凝集はインドメタシン前処置により抑制され、ADPによる凝集はインドメタシンで抑制されなかった。これらの結果は、PRPを用いた「Bornの比濁法」による結果<sup>5-12)</sup>と同様であり、コラーゲンおよびアラキドン酸による血小板凝集はシクロオキシゲナーゼ代謝物、即ちプロスタグランジン系物質の生合成の関与するメカニズムが関係しており、一方、ADPによる凝集はこれらが関与しないメカニズム

であることが確認された。

コイの栓球においてコラーゲンにおいてのみ明確な凝集反応が惹起されたが、この凝集はシクロオキシゲナーゼ阻害薬のインドメタシン前処置により抑制された。インドメタシンによる抑制はラットの場合よりもより低濃度からみられるので、コイ栓球の場合のほうが、抑制効果がむしろ強いと思われた。すなわち、コイにおいても哺乳類と同様に、アラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ系代謝物であるプロスタグランジン系物質、特にトロンボキサン $A_2$ が凝集に関与している可能性が示唆された。

鹿山らの報告<sup>17)</sup>では、放射性ラベル $[^{14}C]$ -アラキドン酸をコイの洗浄した栓球の細胞膜に取り込ませて、25℃、10分インキュベーションする間に $[^{14}C]$ -アラキドン酸から生成する放射性代謝物をラジオクロマトグラムで分析し、 $[^{14}C]$ -トロンボキサン $A_2$ の生成がみられないことから、コイ栓球ではアラキドン酸からトロンボキサン $A_2$ が生成しないと、コイの栓球凝集にはトロンボキサン $A_2$ が関与しないことを示唆している。本実験のインドメタシンを用いた結果からはシクロオキシゲナーゼ代謝物、即ちトロンボキサン $A_2$ などの栓球の凝集への関与が示唆されるので、鹿山らの報告<sup>17)</sup>と矛盾がみられると思われる。しかしながら、おそらく栓球の細胞膜中には、外から加えた外因性のアラキドン酸が取り込まれるプールとは別に、内因性アラキドン酸を含む他のプールが存在し、そのアラキドン酸のプールから凝集惹起剤であるコラーゲンなどの刺激によりアラキドン酸が切り出され、シクロオキシゲナーゼ酵素によりトロンボキサン $A_2$ などが生成し、その凝集に関与しているとも解釈できる。なお、少数例ではあるが、個体によってはアラキドン酸による栓球凝集が認められ、その凝集がインドメタシンで抑制される傾向がみられたことも、アラキドン酸の内因性プールと外因性プールの存在の個体差と関係しているかもしれない。また、本実験では全血を用いているため、試料中に赤血球、白血球、リンパ球などの栓球以外の血球成分が存在することから、栓球以外の血球において生成するトロンボキサン $A_2$ などのシクロオキシゲナーゼ代謝物が、直接および間接的に栓球の凝集に関与している可能性も考えられる。更なる検討が必要である。

魚類の栓球凝集に関与するシクロオキシゲナーゼ系代謝物の関与については、コイ以外の魚種の血液について、また、カルシウムイオノフォア (A23187) やphorbol myristate acetate (PMA) など他の凝集惹起剤について更に検討する予定である。

## 文 献

- 1) 魚類生理学の基礎 (会田勝美編), 恒星社厚生閣, 東京都, pp. 233-249 (2002).
- 2) E. E. Stokes and B. G. Firkin: Studies of the peripheral blood of the Port Jackson shark (*Heterodontus portus-jacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. *Br. J. Haematol.*, 20, 427-435 (1971).
- 3) M. A. Packham, M. L. Rand and R. L. Kinlough-Rathbone: Aggregation. In *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed. by P. Gresele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermynen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.338-356 (2002).
- 4) R. J. Gryglewski: Prostaglandin and thromboxane biosynthesis inhibitors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 297, S85-S88 (1977).
- 5) C. M. Leach and G. D. Thorburn: A comparison of the inhibitory effects of melatonin and indomethacin on platelet aggregation and thromboxane release. *Prostaglandins*, 20, 51-56 (1980).
- 6) M. L. Dahl, T. Puustinen and P. Uotia: Sodium salicylate interferes with inhibitory effects of aspirin and indomethacin on human platelets. *Prostaglandins Leukot. Med.*, 12, 21-28 (1983).
- 7) T. Nakano, A. Terawaki and H. Arita: Signal transduction in collagen-stimulated rat platelets is composed of three stages. *J. Biochem.*, 101, 1169-1180 (1987).
- 8) G. P. Lewis and I. S. Watts: Prostaglandin endoperoxides, thromboxane  $A_2$  and adenosine diphosphate in collagen-induced aggregation of rabbit platelets. *Br. J. Pharmacol.*, 75, 623-631 (1982).
- 9) T. Sato, S. Akiba and T. Fujii: Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate on collagen-induced signal transduction in rabbit platelet. *Thromb. Res.*, 49, 567-579 (1988).
- 10) T. Ogawa, A. Sugidachi, F. Asai and H. Koike: Involvement of platelet-derived 5-hydroxytryptamine in thromboxane  $A_2$ -induced aggregation in cat platelets. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 9, 233-240 (1998).
- 11) I. A. Silveira, L. G. Paulo, A. L. Miranda, S. O. Rocha, A. C. Freitas and E. J. Barreiro: Substituted pyrazolyldiazones: a new class of platelet aggrega-

- tion inhibitors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **24**, 947-951 (1991).
- 12) M. L. Borin, V. G. Pinelis, M. A. Ivanova, Yu. V. Kudinov, O. A. Azizova, C. M. Markov and B. I. Khodorov: Blockade of ADP-induced  $Ca^{2+}$ -signal and platelet aggregation by lipoxygenase inhibitors. *FEBS Lett.*, **257**, 345-347 (1989).
- 13) D. C. Cardinal and R. J. Flower: The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J. Pharmacol. Methods*, **3**, 135-158 (1980).
- 14) P. Thiagarajan and K. K. Wu: In vitro assay for evaluating platelet function. In *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed. by P. Gresele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermylen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.459-470 (2002).
- 15) G. V. R. Born: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, **194**, 927-929 (1984).
- 16) M. Kayama, H. Matsumoto, T. Hada, J. Hirano and T. Funada: Comparison of aggregation behaviours in human and fish blood. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 697-701 (1989).
- 17) M. Kayama, T. Sado, N. Iijima, T. Asada, M. Igarashi, T. Shiba, R. Yamaguchi and T. Hirai: The prostaglandin synthesis in carp thrombocyte. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 1911-1911 (1985).