

血小板アラキドン酸代謝の高速液体クロマト グラフィー (HPLC) による解析

新潟大学第一内科 布施 一郎

Analysis of human platelet arachidonate metabolism by high
performance liquid chromatography (HPLC)

Ichiro FUSE

*the First Department of Internal Medicine, Niigata
University of School of Medicine*

In order to evaluate whether the arachidonic acid metabolism of the platelets from patients with platelet dysfunction is normal or not, the analysis of the metabolites via cyclo-oxygenase and lipoxygenase pathway was done, using high performance liquid chromatography (HPLC). Reversed phase HPLC for analysis of the lipoxygenase products revealed 5-HETE, 12-HETE and 15-HETE in the supernatants from normal washed human platelets induced by arachidonic acid (0.2mM). PGD₂, TXB₂ and PGE₂, which are the cyclo-oxygenase products, were also identified in the supernatants using 9-anthryl-diazomethane derivatization of prostaglandins for normal phase HPLC.

Although 5-HETE and 15-HETE were produced by the contaminated polymorphonuclear leukocytes, the metabolites of arachidonic acid could be separated well and be detected at high sensitivity.

According to these facts, the assay method using HPLC could be a useful tool for not only the detection of a series of arachidonic acid metabolites in human platelets, but also the diagnosis of the patients who show platelet function abnormality.

Key words: platelet, arachidonate metabolism, HPLC, platelet function abnormality.

血小板アラキドン酸代謝, HPLC, 血小板機能異常症

血小板は一種の分泌細胞であり、粘着・凝集、及びそれに伴う顆粒内容物の放出といった機序を介して、生体の一次止血機構の中心的な役割を果たしている。

一方、血小板は盛んな prostaglandin (以下 PG) 代謝を営んでおり、特に凝集・放出反応の際にこれらが活性化される事が明らかとなつて以来¹⁾、血小板機能発現と PG 代謝は密接な関係を有している事が示唆されて

いる。

ヒト血小板における PG 代謝は、主に血小板膜中に多量に存在するアラキドン酸を基質として、これから産生される 2-series PG (二重結合を2個有する PG) が血小板機能の発現や、その調節に重要な役割を担っているものと考えられてきた。中でも、アラキドン酸が cyclo-oxygenase によって代謝されて生ずる PG en-

Reprint requests to: Ichiro Fuse, Department of the First Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通一番町
新潟大学医学部第一内科学教室 布施 一郎

doperoxides (PGG₂, PGH₂) や、更にこれを基質として thromboxane 合成酵素により産生される thromboxane A₂ (TXA₂) は強力な血小板凝集及び血管収縮作用を持つ事²⁾より注目され、cyclo-oxygenase 阻害剤であるアスピリン (ASA) の投与で血小板機能の抑制が生ずる事³⁾や、先天性 cyclo-oxygenase 欠損症や thromboxane 合成酵素欠損症では出血傾向が出現する事⁴⁾⁵⁾などから、PG endoperoxides や TXA₂ が血小板機能発現の最も重要な mediator であると考えられてきた。

このような点から、血小板機能異常症の患者におけるアラキドン酸代謝の解明は、従来、これらの代謝物の産生能に関する検査が主として行なわれてきており、その手段として、TXA₂ の安定代謝産物である thromboxane B₂ (TXB₂) の radioimmunoassay (RIA) による測定や、cyclo-oxygenase の終末代謝産物の1つである MDA (malondialdehyde) の比色定量⁶⁾などが行なわれてきた。しかし、近年、cyclo-oxygenase によって産生される他の 2-series PG (特に PG D₂) や、アラキドン酸のもう1つの代謝酵素である lipoxygenase によって産生される水酸化脂肪酸 (12-HPETE: 12L-hydroperoxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid, 12-L-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid) が種々な形で血小板機能に影響を及ぼす事が注目されてきており、PG endoperoxides や TXA₂ のみの評価ではアラキドン酸代謝異常に基づく血小板機能異常症を見逃したり、解析しきれない可能性が考えられている。

このような観点から、種々の血小板機能異常症 (特に放出機構異常症) において、アラキドン酸代謝異常の有無を解明するためには、単に TXA₂ の産生のみならず、他の 2-series PG や lipoxygenase 系代謝産物の産生をも同時に解析する必要があるものと思われる。

以上の目的のために、著者は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による一連の血小板アラキドン酸代謝物の解析を試み、本法が血小板機能異常症においてアラキドン酸代謝異常の有無を把握する際の有効な手段である事を認めたので報告する。

I. 対象及び方法

a) 正常人及び血小板機能異常症患者血小板の作成

空腹時に 21G 針を用いて採血し、1/10容量の3.8%クエン酸ナトリウム液を混和し、170G、10分遠心の後、血小板多血漿 (PRP) を得た。これを更に 1,500G、10分

間遠心して血小板沈渣を得、tris-EDTA buffer (pH 7.3) で2回洗浄の後、Tyrode buffer に再浮遊して洗浄血小板浮遊液を得、血小板数を $20 \times 10^4/\mu\text{l}$ に調整した後、以後の実験に供した。血小板機能異常症患者の内訳は、血小板 cyclo-oxygenase 欠損症⁷⁾⁸⁾、家族性 A 23187 凝集異常症⁹⁾、SLE に伴う TPA C12-0-tetra-decanoylphorbol-13-acetate) 凝集異常症¹⁰⁾、Hermansky-Pudlak 症候群、各1例である。

b) 薬剤処置正常血小板

前述において得られた正常人洗浄血小板浮遊液に、cyclo-oxygenase 阻害剤である ASA, thromboxane 合成酵素阻害剤である OKY 1581 (小野薬品より供与)、及び 12-lipoxygenase 阻害剤である phenidone (1-phenyl-3-pyrazolidone, 半井) を、各々 1mM, 10^{-3} mg/ml, 30mM (いずれも終濃度) 加え、室温で30分間孵置して、ASA 処置正常血小板、OKY 1581 処置正常血小板、phenidone 処置正常血小板を得た。

c) 各種洗浄血小板の刺激

アラキドン酸 0.2mM (sigma, 終濃度) を上記洗浄血小板浮遊液に添加し、37°C で正確に3分間 shaking water bath に孵置した後、indomethacin 10μM を加え、直ちに氷冷して反応を止め、2,000G、10分、4°C にて遠心し、その上清を HPLC による解析の試料とした。

d) HPLC による lipoxygenase 系代謝物の解析 (図1)

上記にて得られた検体を 0.1N HCl で pH3.0 に調整し、あらかじめメタノールで活性化した C₁₈ cartridge column (Bond elute C₁₈, Analytichem International Co. Ltd.) に apply して精製した後、reverse phase HPLC を用いて lipoxygenase 系代謝産物の

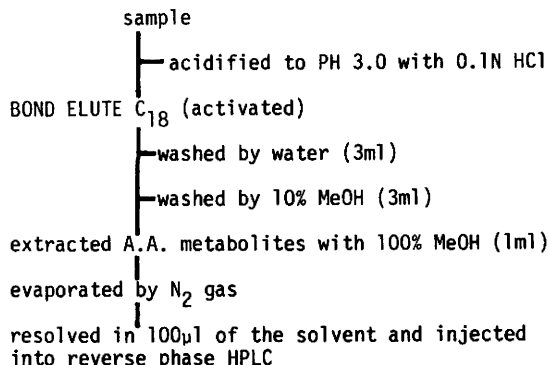


図1 HPLC による lipoxygenase 系代謝産物の解析手順

解析を行なった。用いた column は、RP-Pak (日本分光), 移動相としてはアセトニトリル/水/酢酸=60/40/0.02を用い, 検出器は UVIDEC-100-IV (日本分光)を用いて, UV 235nm で解析した。又, ポンプは BIP-II (日本分光)を使用した。

e) HPLC による cyclo-oxygenase 系代謝物の解析 (図2)

前述の reverse phase HPLC において, PG は elution time 1~4分の分画に含まれる¹¹⁾ので, この分画を fraction collector で採取し, これを sample としてアダム試薬 (9-anthryldiazomethane, フナコシ) によるラベル化を行ない¹²⁾, normal phase HPLC により解析した。すなわち, sample を前述の C₁₈ cartridge column でもう一度精製した後, あらかじめ GPC (Gel permeation chromatography) によって精製しておいたアダム試薬と 37°C, 2時間反応させてラベル化を行った。なお, この際の GPC は, column として Fine Pak GEL 101 (日本分光), 移動相として酢酸エチル, ポンプは BIP-II を用い, UVIDEC-100-IV の検出器を用いて UV350nm で行なった。アダム試薬のラベル化の後, PG と未反応のアダム試薬を GPC にて除去した後 (前述と同様の条件), ラベル化された PG を normal phase HPLC にて解析した。用いた column は PG Pak 1 (日本分光) であり, 移動相としてイソオクタン/酢酸エチル/エタノール/酢酸=80/15/5/2を, 又, ポンプは TRI ROTARIII (日本分光) を用い, 検出器は FP-210 (日本分光) を使用して, 励起波長 365nm, 蛍光波長 412nm で検出した。

なお, これらの解析の際に移動相として使用したエタ

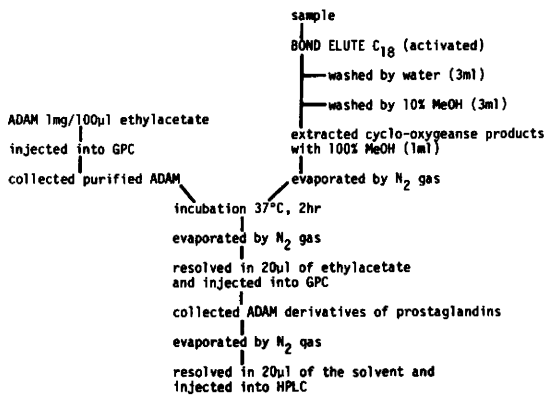


図2 HPLC による cyclo-oxygenase 系代謝物の解析手順

ノール, アセトニトリル, イソオクタンは液体クロマトグラフ用 (和光純薬) を用い, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE 標準品は小野薬品, PG D₂, 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGE₁, PGE₂, PGF_{1α}, PGF_{2α} 標準品はフナコシ社製のものを用いた。

II. 結果

a) 各種標準品によるクロマトグラム

cyclo-oxygenase 系代謝産物である7種の PG (PG D₂, TXB₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGE₁, PGE₂, PGF_{1α}, PGF_{2α}) のクロマトグラムを図3に, lipoxigenase 系代謝産物である3種の水酸化脂肪酸 (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE) のクロマトグラムを図4に示す。本法では TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} のピークがやや broad となるものの, いずれのピークも分離, 形状とも良好であり, スタンドのピークの高さより, 6-keto-PGF_{1α} 以外は 500pg 程度の定量は十分可能と思われた。

b) 正常血小板におけるアラキドン酸代謝物の解析

正常血小板におけるアラキドン酸 0.2mM 刺激時の cyclo-oxygenase 系, 及び lipoxigenase 代謝産物

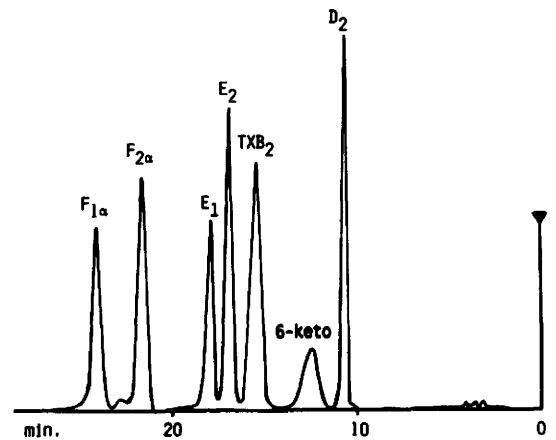


図3 Standard PG によるクロマトグラム
column: PGPak-1 (0.46cm ID×25cm)
eluent : isooctane/ethylacetate/ethanol/acetic acid = 80/15/5/2
flow rate: 1.2ml/min.
detection : ex. 365nm, em. 412nm. ×10 ×4
column temp.: 40°C
sample: standard mixture PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGE₁, PGE₂, PGF_{1α}, PGF_{2α} 2ng each

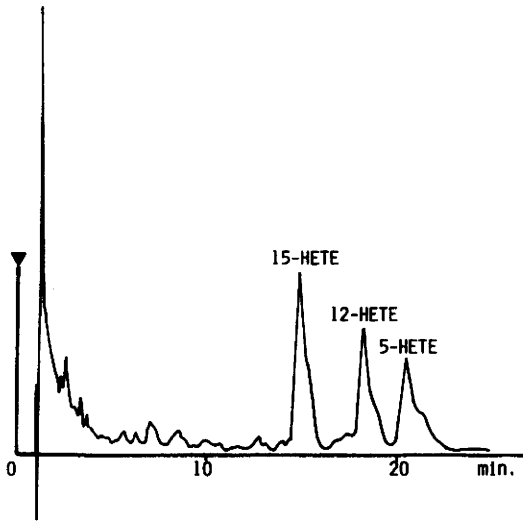


図 4 Standard HETE によるクロマトグラム
column: RP-PAK (0.46cm ID×15cm)
eluent : acetonitrile/water/acetic acid = 60/
40/0.02
flow rate: 1ml/min.
detection: UV 235nm 0.04 a.u.f.s.
sample: standard mixture 5-HETE, 12-
HETE, 15-HETE 2ng each.

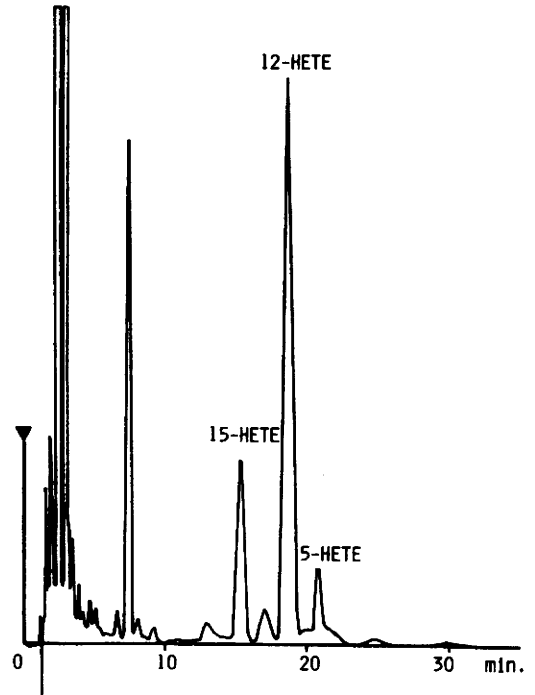


図 6 正常血小板における lipoxigenase 系
代謝産物のクロマトグラム
(HPLC の条件は図 4 と同じ)

の HPLC による代表的なクロマトグラムを図 5, 図 6 に示す. 正常血小板では, cyclo-oxygenase 系として PGD_2 , TXB_2 , $PG E_2$ が検出され, lipoxigenase 系では 15-HETE, 12-HETE, 5-HETE が検出された.

c) 薬剤処置正常血小板における cyclo-oxyge-

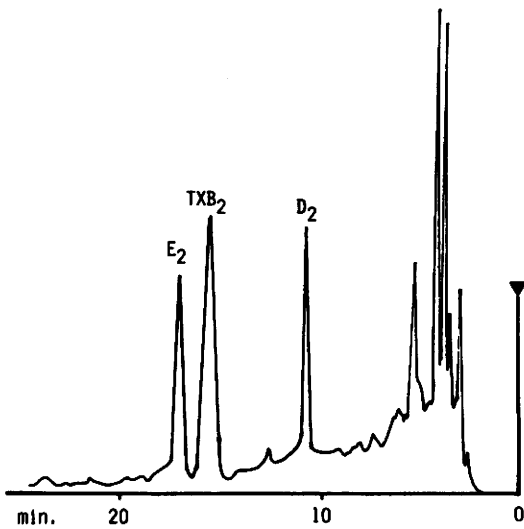


図 5 正常血小板における cyclo-oxygenase 系
代謝産物のクロマトグラム
(HPLC の条件は図 3 と同じ)

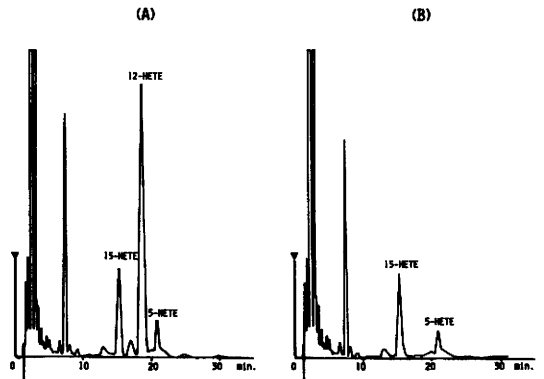


図 7 Phenidone 処置による lipoxigenase 系
代謝産物のクロマトグラム
(A) control
(B) phenidone (30mM) 処置

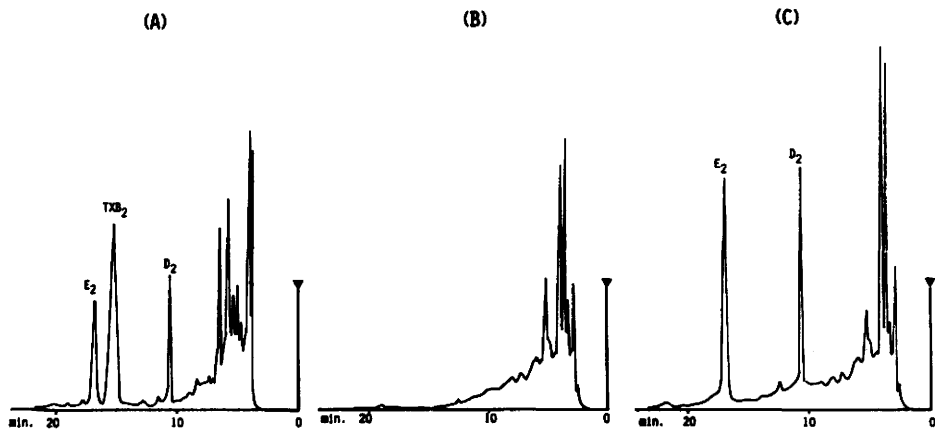


図8 ASA 及び OKY 1581 処置による cyclo-oxygenase 系代謝物のクロマトグラム

- (A) control
- (B) ASA (1mM) 処置
- (C) OKY 1581 (10^{-3} mg/ml) 処置

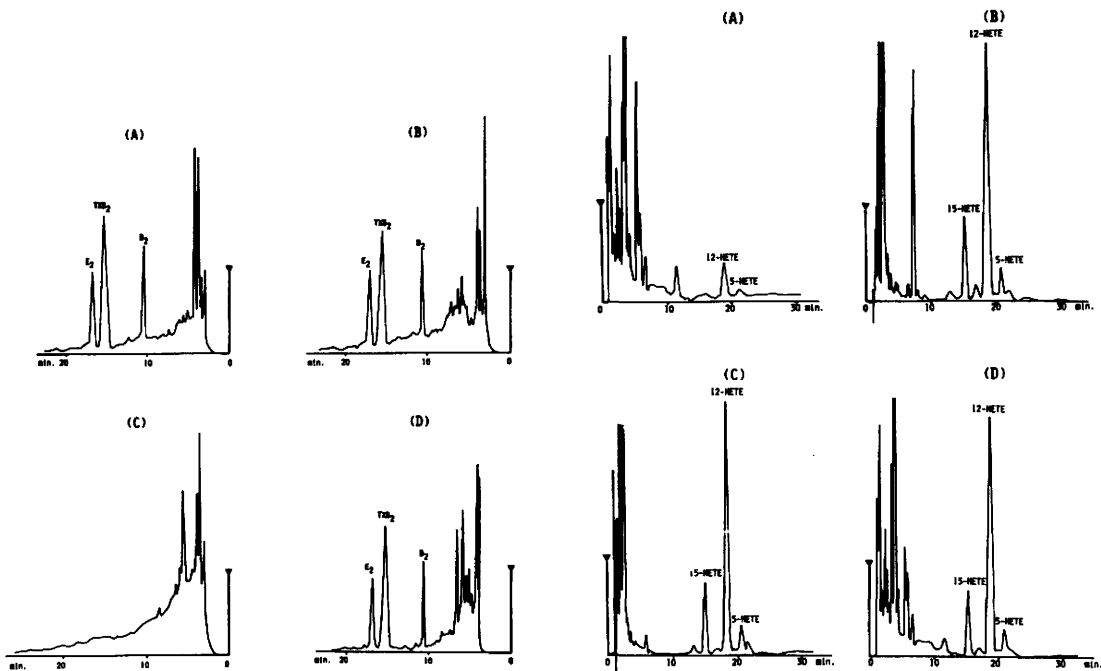


図9 各種血小板機能異常症における cyclo-oxygenase 系代謝物のクロマトグラム

- (A) A 23187 凝集異常症
- (B) Hermansky-Pudlak 症候群
- (C) 血小板 cyclo-oxygenase 欠損症
- (D) SLE に伴う TPA 凝集異常症

図10 各種血小板機能異常症における lipoxygenase 系代謝物のクロマトグラム

- (A) A 23187 凝集異常症
- (B) Hermansky-Pudlak 症候群
- (C) 血小板 cyclo-oxygenase 欠損症
- (D) SLE に伴う TPA 凝集異常症

nase, lipoxygenase 系代謝物の解析

12-lipoxygenase 阻害剤である Phenidone 処置では 12-HETE の peak は消失したが, 5-HETE, 15-HETE の peak は不変であった (図 7). cyclo-oxygenase 阻害剤である ASA 処置, 及び thromboxane 合成酵素阻害剤である OKY 1581 処置正常血小板における cyclo-oxygenase 系代謝物の解析では (図 8), 前者は PGD₂, TXB₂, PGE₂ の各 peak の消失を認めるのに反して, 後者では TXB₂ の peak のみの消失を認め, PGD₂, PGE₂ の各 peak の若干の増加を認めた.

d) 血小板機能異常症におけるアラキドン酸代謝物の解析

図 9, 図 10 は, A 23187 凝集異常症, Hermansky-Pudlak 症候群, cyclo-oxygenase 欠損症, SLE に伴う TPA 凝集異常症における cyclo-oxygenase 及び lipoxygenase 系代謝産物のクロマトグラムを示す. cyclo-oxygenase 欠損症では PGD₂, TXB₂, PGE₂ の peak を全く認めず, 又, A 23187 凝集異常症では 12-HETE, 5-HETE の peak の減少と 15-HETE の peak の消失を認めたが, 他の 2 例はほぼ正常のクロマトグラムを示した.

III. 考 案

ヒト血小板におけるアラキドン酸代謝過程には cyclo-oxygenase (PCO) を介する経路と, lipoxygenase (PLO) を介する 2 つの経路がある事が知られている^{13) 14)}. 前者は PG endo-peroxides (PGG₂, PGH₂)¹³⁾ を経て, TXA₂¹⁵⁾, PGD₂¹⁶⁾, PGE₂¹³⁾, PGF_{2α}¹³⁾ に変換され, 後者は 12-HPETE を経て 12-HETE に代謝される¹⁴⁾.

今回の著者らの HPLC を用いた検討では, PCO 系の代謝物として PGD₂, TXB₂, PGE₂ が検出され, PLO 系の代謝物としては 12-HETE が検出された. PGF_{2α} が検出されなかった点は, 洗浄血小板における PGF_{2α} 産生量が TXB₂ や 12-HETE のそれに比して 100 分の 1 以下の微量である事¹⁷⁾ によるものと思われる. 又, lipoxygenase 系代謝産物の解析で 15-HETE, 5-HETE が検出された点は, ヒト血小板には 12-lipoxygenase しか存在しない事¹⁴⁾, 及びヒト多核白血球に 5-lipoxygenase 及び 15-lipoxygenase が存在する事^{18) 19)} より, 血小板分離の過程で除去しきれなかった白血球により産生されたものと思われる.

著者の HPLC を用いた血小板アラキドン酸代謝解析

は, 12-lipoxygenase 阻害剤である phenidone 処置により 12-HETE の peak の消失がみられる事, PCO 阻害剤である ASA 処置では PGD₂, TXB₂, PGE₂ の peak の消失がみられる事, TX 合成酵素阻害剤である OKY 1581 処置では TXB₂ の peak のみの消失がみられる事より, 各アラキドン酸代謝物の分離状況は良好なものと思われた. 又, 実際の症例においても, PCO 欠損症における解析では in vitro ASA 処置正常血小板と全く同様の chromatogram が得られ, cyclo-oxygenase 代謝が正常と思われる他の血小板機能異常症では正常と同様の 2-series PG の産生がみられる事より, 本法が血小板機能異常症の診断及び病態解明に十分な武器となりうる事が示唆された. なお, A 23187 凝集異常症において 12-HETE のみならず, 5-HETE の peak の減少と, 15-HETE の peak の消失がみられた点は興味あるところであるが, 本症では血小板細胞質内の Ca⁺⁺ mobilization の異常が推定されており, 白血球にもこのような障害が及んでいる可能性があるため, 今後白血球を対象として更に検索する予定である.

いずれにせよ, 血小板においては, これら一連のアラキドン酸代謝物が産生されているにもかかわらず, 従来, 血小板機能の発現に関しては TXA₂ のみが注目されてきたきらいがある. 確かに TXA₂ は強力な血小板凝集作用及び血管収縮作用を持ち²⁾, その産生が血小板機能発現の重要な trigger となっている事は否定できないが, 血小板機能の発現には他のアラキドン酸代謝物の関与も同時に考慮する必要があるものと思われる. 例えば, PCO 系代謝物では, PGD₂ が血小板凝集抑制作用を持つ事が知られており²⁰⁾, トロロニンやコラゲン, アラキドン酸を PRP に加えると PGD₂ が速かに産生され, しかもこれは血小板凝集を抑制するに十分な量 (5.5~28.3nM) である事から²¹⁾, PGD₂ は negative feed back により血小板凝集を調節している可能性が示唆されている²²⁾. 又, 近年, PGE₂ は PGD₂ による血小板凝集抑制作用を解除する働きを持っている事も示唆されている²³⁾. 一方, PLO 系代謝物についてみると, 12-HETE の前駆物質である 12-HPETE には血小板凝集抑制作用²⁴⁾ や, PCO の阻害作用²⁴⁾, TX 合成酵素阻害作用²⁵⁾, PGI₂ 生成阻害作用²⁶⁾ 及び白血球の leukotriene 産生亢進作用²⁷⁾ などがある事が報告されており, 12-HETE は PGH₂ による血小板凝集を阻害する事も報告されている²⁸⁾.

以上の事実より, 血小板機能の発現及び調節は, これ

ら一連のアラキドン酸代謝物の相反する作用が複雑にからみ合った総和として出現しているものと考えられる。その意味からも、著者の HPLC を用いた血小板アラキドン酸代謝物の解析は、個々のアラキドン酸代謝物の産生を同時に把握する事が可能であり、各種の血小板疾患や血栓性疾患における血小板 PG 代謝の病態生理解明に有用なものと思われた。

結 語

血小板機能異常症における血小板アラキドン酸代謝の解析を目的として、PLO 系代謝物の解析を reverse phase HPLC で、PCO 系代謝物の解析をアダム試薬のラベル化により normal phase HPLC にて検討した。正常洗浄血小板浮遊液では、アラキドン酸刺激により、PCO 系として PGD₂, TXB₂, PGE₂ が、PLO 系として 12-HETE が検出され、他に混在する白血球由来の 5-HETE, 15-HETE が検出された。本法による各アラキドン酸代謝物の分離状況は良好であり、本法が血小板機能異常症のみならず、各種血栓性疾患においても、血小板 PG 代謝解明の有力な手段となりうるものと思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始適切な助言と御指導・御校閲を頂いた新潟大学第一内科、柴田 昭教授、服部 晃助教授に深謝致します。

参 考 文 献

- Smith, J.B. and Willis, A.L.: Formation and release of prostaglandins in response to thrombin. *Br. J. Pharmacol.*, **40**: 5459~5461, 1970.
- Hamberg, M., Svensson, J. and Samuelsson, B.: Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**: 2994~2998, 1975.
- Roth, G.J., Stanford, N. and Majerus, P.W.: Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**: 3073~3076, 1975.
- Malmsten, C., Hamberg, M., Svensson, J. and Samuelsson, B.: Physiological role of an endoperoxide in human platelets: Hemostatic defect due to platelet cyclo-oxygenase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**: 1446~1450, 1975.
- Mestel, F., Oetliker, O., Beck, E., Felix, R., Imbach, P. and Wagner, H.P.: Severe bleeding associated with defective thromboxane synthetase. *Lancet*, **1**: 157, 1980.
- Okuma, M., Steiner, M. and Baldini, M.: Studies on lipid peroxides in platelets. I. Method of assay and effect of storage. *J. Lab. Clin. Med.*, **75**: 283~296, 1970.
- Nakanishi, K., Ikeda, K., Hato, T., Imai, A., Kaneko, H., Murakami, A., Kuwashima, K., Kaido, H., Kondo, M., Hattori, A., Fujita, S. and Kobayashi, Y.: Platelet cyclo-oxygenase deficiency in a Japanese. *Scand. J. Haematol.*, **32**: 167~174, 1984.
- 布施一郎, 服部 晃, 高橋芳右, 長山礼三, 滝沢慎一郎, 花野政晴, 小池 正, 柴田 昭: 血小板 cyclo-oxygenase 欠損症に関する研究. *日血会誌*, **47**: 102~110, 1984.
- Hattori, A., Takahashi, H., Takahashi, M., Shibata, A. and Okuma, M.: A new familiar defect of platelet release mechanism (the intracellular Ca⁺⁺ transport defect?). *Acta Haematol. JPN.*, **44**: 173~176, 1981.
- Fuse, I., Hattori, A., Higashihara, M., Takizawa, S., Takeshige, T., Hanano, M., Nagayama, R., Koike, T., Takahashi, H. and Shibata, A.: A defect of platelet release reaction in a patient with SLE: Impaired platelet aggregation induced by phorbol ester with a normal phosphorylation of 40K protein. *Scand. J. Haematol.*, **36**: 44~54, 1986.
- Moonen, P., Klock, G. and Keirse, M.J.N.C.: An improved method for separation of thromboxane B₂ by reversed phase liquid chromatographic analysis. *Prostaglandins*, **26**: 797~803, 1983.
- Hatsumi, M., Kimata, S. and Hirose, K.: 9-anthryl diazomethane derivatives of prostaglandins for performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography*, **253**: 271~275, 1982.
- Hambera, M. and Samuelsson, B.: Prosta-

- glandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71**: 3400~3404, 1974.
- 14) Nugteren, D.H.: Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta.*, **380**: 299~307, 1975.
- 15) Tai, H.H. and Yuan, B.: Studies on the thromboxane synthetizing system in human platelet microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **531**: 286~294, 1978.
- 16) Smith, J.B., Ingerman, C.M. and Silver, M.J.: Formation of prostaglandin D₂ during endoperoxide-induced platelet aggregation. *Thromb. Res.*, **9**: 413~418, 1976.
- 17) Hamberg, M., Svensson, J. and Samuelsson, B.: Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71**: 3824~3828, 1974.
- 18) Borgeat, P. and Samuelsson, B.: Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Effect of ionophore A23187. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**: 2148~2152, 1979.
- 19) Borgeat, P. and Samuelsson, B.: Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes: Structural analysis of novel hydroxylated compounds. *J. Biol. Chem.*, **254**: 7865~7868, 1979.
- 20) Moncada, S., Vane, J.R. and Whittle, B.J.R.: Relative potency of prostacyclin, prostaglandin E₁ and D₂ as inhibitor of platelet aggregation in several species. *J. Physiol.*, **273**: 2~4, 1977.
- 21) Smith, J.B., Silver, M.J., Ingerman, C.M. and Kocsis, J.J.: Prostaglandin D₂ inhibits the aggregation of human platelets. *Thromb. Res.*, **5**: 291~299, 1974.
- 22) Oelz, O., Oelz, R., Knapp, H.R., Sweetman, B.J. and Oates, J.A.: Biosynthesis of prostaglandin D₂. I. Formation of prostaglandin D₂ by human platelets. *Prostaglandins*, **13**: 225~234, 1977.
- 23) Orchard, M.A., Waddell, K.A., Lewis, P.J. and Blair, I.A.: Thromboxane synthetase inhibition causes re-direction of prostaglandin endoperoxides to prostaglandin D₂ during collagen stimulated aggregation of human platelet rich plasma. *Thromb. Res.*, **39**: 701~710, 1985.
- 24) Siegel, M.I., McConnell, R.T., Abrahams, S.L., Porter, N.A. and Cuatrecasas, P.: Regulation of arachidonate metabolism via lipoxygenase and cyclo-oxygenase by 12-H PETE, the product of human platelet lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**: 1273~1280, 1979.
- 25) Hammerstrom, S. and Falardeau, P.: Resolution of prostaglandin endoperoxide synthetase and thromboxane synthetase of human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**: 3691~3695, 1977.
- 26) Ham, E.A., Egan, R.W., Soderman, D.D., Gale, P.H. and Kuehl, F.A.: Peroxidase-dependent deactivation of prostacyclin synthetase. *J. Biol. Chem.*, **254**: 2191~2194, 1979.
- 27) Maclouf, J., de Lacroix, B.F. and Borgeat, P.: Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy-icosatetraenoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**: 6042~6046, 1982.
- 28) Croset, M. and Lagarde, M.: Stereospecific inhibition of PGH₂-induced platelet aggregation by lipoxygenase products of icosanoic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**: 878~883, 1983.

(昭和61年7月7日受付)