

学位申請論文

低マグネシウム下のカフェイン誘発性左室拡張障害の発生 に関する実験的検討

獨協医科大学 内科学（心血管・肺）

那須野尚久

要 旨 低マグネシウム下でのカフェインの左室血行動態に対する影響をラットを用い検討した。また、 Ca^{2+} 結合蛋白質アネキシンVの細胞内の変化を検討した。6週齢ラットに低マグネシウム食（低マグネシウム群； $n=6$ ）または標準食（対照群； $n=6$ ）を1ヶ月間与え、その後、カフェイン5mg/kg/分を10分間静脈内投与し、心拍数、左室収縮期圧、左室拡張期最小圧、左室拡張末期圧、 $+dP/dt$ 、 $-dP/dt$ を調べた。その結果、血行動態パラメーターは、カフェイン投与前では対照群と低マグネシウム群との間に有意差を認めなかった。カフェイン投与により、低マグネシウム群で左室拡張期最小圧および左室拡張末期圧の有意な上昇、 $+dP/dt$ の有意な減少を認めた。また、クレアチンホスホキナーゼ活性値の有意な上昇およびアネキシンVの心筋細胞内トランスロケーションや細胞外への逸脱を認めた。以上より、低マグネシウム下では心筋の Ca^{2+} 感受性が変化し、さらにカフェインにより細胞内 Ca^{2+} の増加、心筋小胞体からの Ca^{2+} 逸脱が心筋壊死を惹起させ拡張障害に発生させる可能性が示唆された。

Key Words : 低マグネシウム, カフェイン, 拡張障害, アネキシンV

緒 言

マグネシウムやカフェインが心疾患の発生と関連することを示唆する報告は少なくない。虚血性心疾患で死亡した患者の心筋内マグネシウムは低値であること¹⁾、また、マグネシウム欠乏は突然死をおこす²⁾という報告や、さらにマグネシウム欠乏は心筋細胞の壊死量に関係し、冠動脈疾患を増加させる^{3~5)}とする報告がある。しかし、急性心筋梗塞（AMI）による死亡率やその予防と飲料水中のマグネシウム濃度との関連性は乏しいとする報告^{6,7)}もあり、マグネシウムと心疾患との因果関係は定まっていない。

一方、コーヒーまたはカフェイン消費量と心疾患との関連についても種々、議論されてきた。カフェインの過度の消費はAMIや冠動脈死の危険性を増加させる^{8~11)}とする報告があるが、カフェインの消費が冠動脈疾患の発生の危険性を増すとはいえないという反論もある^{12~14)}。

カフェインやマグネシウムが各々心筋細胞内 Ca^{2+} 動態に関連するとされているが、マグネシウムとカフェインとの相互の関係を調べた研究はこれまでのところ見当たらない。本研究は標準食あるいは低マグネシウム食飼育下のラットを用い、カフェインの左室機能、特に拡張障害に及ぼす影響を調べると共に、細胞内 Ca^{2+} 動態と密接に関連しているカルシウム結合蛋白質アネキシンVの局在変化を免疫組織学的に検討した。

実験方法

1. 実験プロトコール

体重200g前後、5~6週齢Wistar系雄性ラットを用いて実験を行った。本実験は当大学実験動物委員会の許可を得て、本学実験動物倫理規定に基づいて行われた。動物を購入後、ラットを低マグネシウム食餌（低マグネシウム群）または標準食餌（対照群）で飼育した。標準食餌、低マグネシウム食餌のマグネシウム含量は飼料100g中、各々52mg、2mgであった。両群の飲み水は脱イオン水を用いた。

1ヵ月間、12週齢まで両食餌で飼育後、ラット（各群、 $n=6$ ）を3%イソフルラン（メルク社）で吸入麻酔し、ポリエチレンチューブ（SP102, Natsume社）を気管内に

平成20年10月31日受付、平成20年12月2日受理
別刷請求先：那須野尚久

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 内科学（心血管・肺）

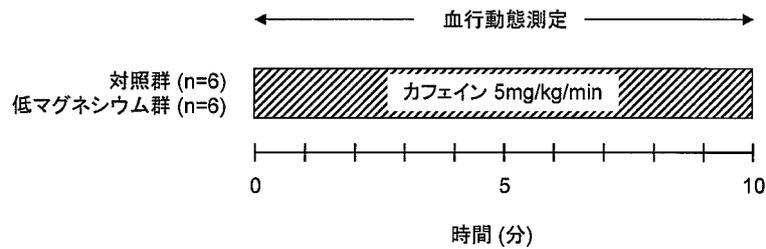


図1 実験プロトコール

表1 対照群および低マグネシウム群の体重, マグネシウム値, カルシウム値

	対照群	低マグネシウム群	p値
体重 (g)	390.5 ± 16.7	359.8 ± 22.7	ns
血清マグネシウム値 (mg/dl)	2.3 ± 1.1	0.6 ± 0.1	< 0.005
血清カルシウム値 (mg/dl)	10.8 ± 0.4	11.3 ± 0.7	ns

ns: 有意差なし

挿管し人工呼吸器 (SN-480, シナノ社) を装着, 1回換気量3ml, 60回/分で呼吸管理した. 四肢に心電図電極を装着し, 第2誘導をモニターした. 右総頸動脈から圧測定チップ付きカテーテル (2F; SPC-320, ミラー社) を左室内まで挿入した. 心電図及び圧波形は生体アンブ (P55, GRASS Inc.) でモニターし, 記録計に接続した. 右大腿静脈からポリエチレンチューブ (SP10, Natsume社) を挿入し, 持続注入器 (KDS 210, KDS) に装着し, 各溶液注入用の静脈ラインとした. 血圧, 心拍数が安定化した状態でカフェイン5mg/kg/分を10分間投与した. カフェインの溶媒として蒸留水を用いた (図1). 投与に用いたカフェイン量は, 予備実験で1, 2.5, 5, 10mg/kg/分で段階的に投与し, 対照群の血行動態を変化させる最小量で決定した. また, 両群でカフェイン投与終了後, 血液を採取し, 血清マグネシウムおよびカルシウム濃度を測定した. 又, 低マグネシウム群 (n=4) でカフェイン投与直後, 1時間後, 6時間後に血液を採取し, クレアチンホスホキナーゼ (CPK) 活性値を測定した.

2. 血行動態の測定

各群において, 血行動態が安定してからカフェインを投与した. カフェイン投与直前, 直後1分ごとに10分間, 心拍数, 左室収縮期圧, 左室拡張期最小圧, 左室拡張末期圧を測定し, ダブルプロダクト (心拍数×左室収縮期圧), 左室圧一次微分の最大陽性dP/dt (+dP/dt), 左室圧一次微分の最大陰性-dP/dt (-dP/dt) を算出した.

3. 心筋病理組織染色ならびにアネキシンV免疫組織染色

血行動態を測定後, 塩化カリウムを静脈ラインより注入し, 心停止させ, すぐに開胸し, 心臓を取り出した. 摘出した心臓は脂肪や結合組織などを除去, 10%ホルマリン溶液で48時間固定後, 心臓中央部で横断し, 再固定し, 心筋組織片を20%中性緩衝ホルマリン溶液で固定, パラフィン包埋後, 厚さ3 μ mの薄切標本を作製しヘマトキシリンエオシン染色を行った. また, 未染色標本は3%過酸化水素を含むメタノールに5分間浸し蒸留水で洗浄, ついで10mMリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後, 3%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSに30分間浸した. 3%BSA-PBSで5 μ g/mlに調整した抗ヒト心筋アネキシンVモノクローナル抗体HCA-290を一次抗体として反応させ, DAKO LSABTM 2/HRP (DAB) キット (DAKO, Japan) のビオチン標識二次抗体反応後, さらにHRP (horse radish peroxidase) 標識ストレプトアビジンを加え, 同キット付属の発色基質を加えた基質緩衝液で発色させた.

4. 統計解析

各データは平均値±標準偏差で表した. 統計ソフトはSPSS (バージョン14.0J) を用いpaired t-testで行った. p値0.05以下を有意差ありとした.

結果

対照群と低マグネシウム群の体重, 血中マグネシウムおよびカルシウム濃度を表1に示した. 両群間で体重は有意差を認めなかった. 血中マグネシウム値は, 対照群

表2 対照群および低マグネシウム群の血行動態

	対照群	低マグネシウム群	p 値
心拍数 (心拍/分)	300.7 ± 25.8	314.2 ± 26.5	ns
左室収縮期圧 (mmHg)	90.7 ± 7.0	104.5 ± 13.5	ns
ダブルプロダクト	27272.4 ± 2979.9	33077.8 ± 6465.5	ns
左室拡張期最小圧 (mmHg)	2.2 ± 1.2	2.6 ± 0.7	ns
左室拡張末期圧 (mmHg)	4.7 ± 1.8	5.7 ± 1.1	ns
+ dP/dt	5650.3 ± 843.1	6696.6 ± 1737.8	ns
- dP/dt	4015.0 ± 665.8	5106.4 ± 1332.4	ns

ns : 有意差なし

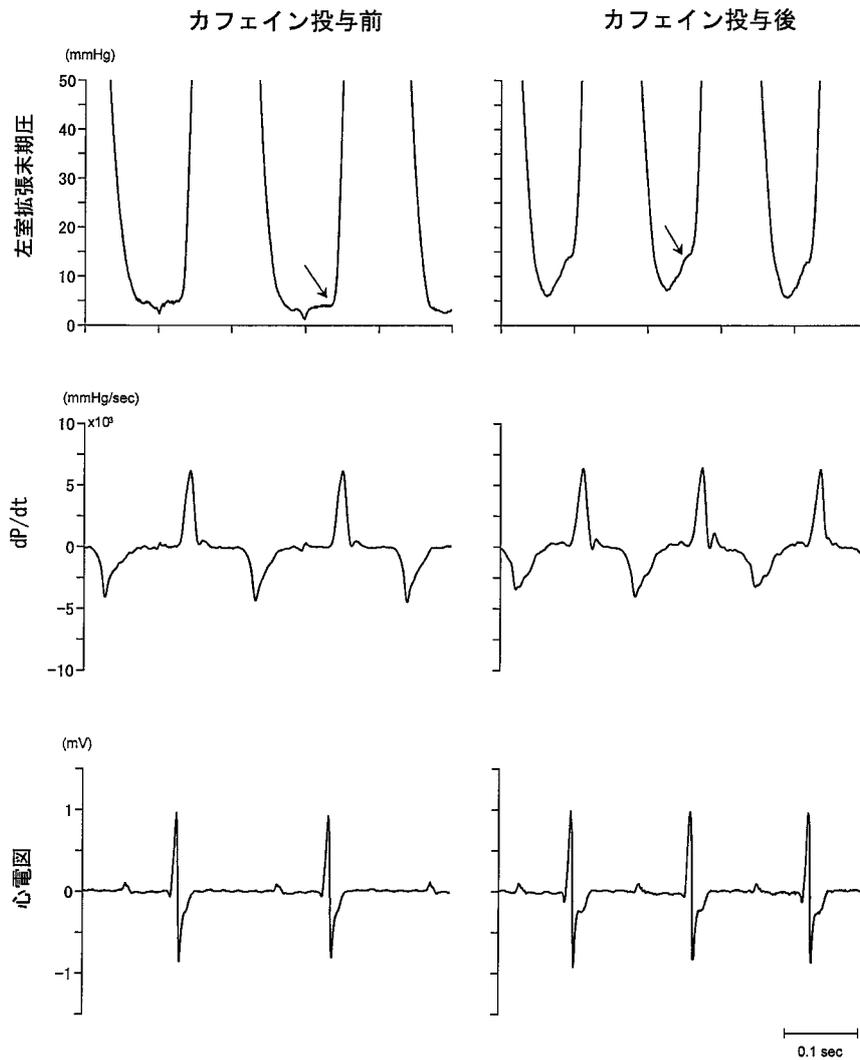


図2 対照群のカフェイン投与直前(左列)と10分後(右列)の左室圧, dP/dt, 心電図の同時記録. 矢印は心電図のR波に一致する部位で左室拡張末期圧測定位置である. カフェイン投与後左室拡張末期圧は軽度上昇した.

2.3 ± 1.1 mg/dl, 低マグネシウム群 0.6 ± 0.1 mg/dl で, 低マグネシウム群において有意に低値であった ($p < 0.005$). 血中カルシウム値では両群間で有意差を認めな

かった. 対照群, 低マグネシウム群の血行動態パラメータは両群間で有意差を認めなかった(表2).

対照群(図2)と低マグネシウム群(図3)の左室圧曲

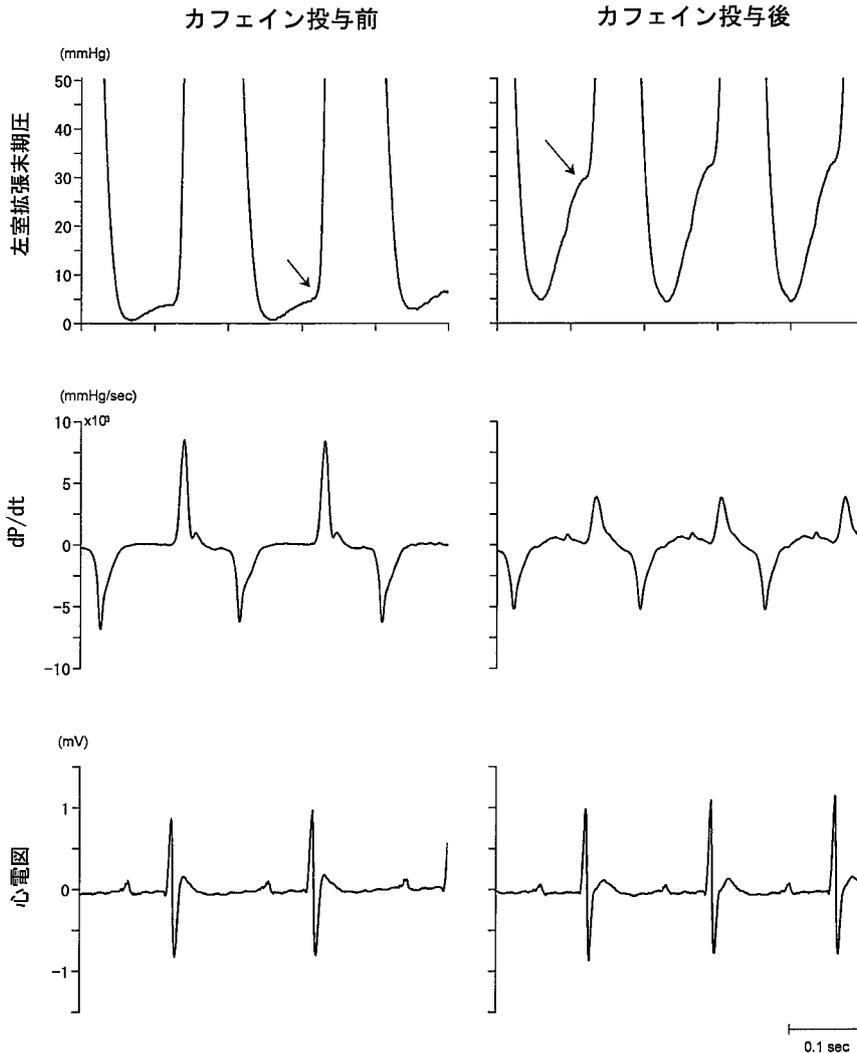


図3 低マグネシウム群のカフェイン投与直前(左列)と10分後(右列)の左室圧, dP/dt, 心電図の同時記録。矢印は心電図のR波に一致する部位で左室拡張末期圧測定位置である。カフェイン投与後左室拡張末期圧は著明に上昇した。+dP/dtは著明に減少した。

線, dP/dt, 心電図の同時記録を示す。対照群でもカフェイン投与後, 左室拡張末期圧の上昇を認めたが, 低マグネシウム群では著明な左室拡張期最小圧および左室拡張末期圧の上昇, +dP/dtの減少を認めた。図4, 5, 6はカフェイン投与後の両群の経時的な血行動態である。心拍数はカフェイン投与後, 対照群, 低マグネシウム群でともにごく軽度上昇した。左室収縮期圧は, 両群で有意な変化はなく, ダブルプロダクトでも両群ともごく軽度上昇する傾向はあったが有意差はなかった(図4)。左室拡張期最小圧は低マグネシウム群でカフェイン投与前 2.6 ± 0.7 mmHgで, 投与後上昇し, 6分後 4.5 ± 2.1 mmHg, 10分後 5.5 ± 1.5 mmHgと対照群に比べ有意に上昇した(ともに $p < 0.05$)。左室拡張末期圧も投与により, 低マグネシウム群で投与前 5.7 ± 1.1 mmHgで, 投与後上

昇し, 5分後 13.7 ± 8.2 mmHg, 10分後 26.6 ± 6.3 mmHgと有意に著明に上昇した(各々 $p < 0.05$, $p < 0.001$)(図5)。+dP/dtは低マグネシウム群では投与前 6696.6 ± 1737.8 , 投与後減少し, 7分後 5052.2 ± 1202.2 , 10分後 4034 ± 629.6 と対照群に比し有意に減少した(各々 $p < 0.01$, $p < 0.001$)。-dP/dtは両群間で有意差はなかった(図6)。

血清CPK活性値は, 対照群ではカフェイン投与で有意な変化はなかったが, 低マグネシウム群でカフェイン投与直後 146 ± 22 IU/L, 1時間後 249 ± 79 IU/Lであったが, 6時間 968 ± 594 IU/Lと有意に上昇した($p < 0.05$, 図7)。

心筋標本の病理組織学的染色においては, アネキシンVは正常対照心筋では細胞質全体に認められた(図8B)。

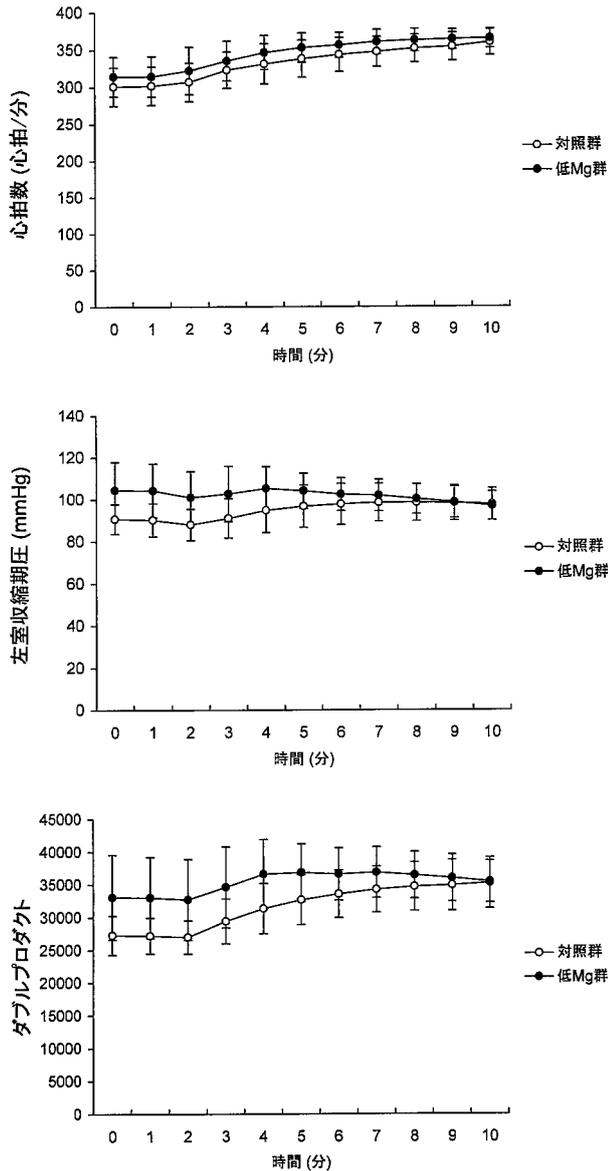


図4 対照群および低マグネシウム群の心拍数, 左室収縮期圧, ダブルプロダクトのカフェイン投与後の経時的変化。

低マグネシウム (図8C) およびカフェインのみ (図8D) では, 心筋のアネキシンV染色性はやや不均一性を認められたが, アネキシンVの細胞外への逸脱は見られなかった。低マグネシウム下でカフェインを投与すると心筋の過収縮を認め (図8E), 心筋内アネキシンVの不均一性や細胞質から間質への逸脱, 細胞膜の染色性の増加を認めた (図8F)。

考 察

マグネシウムは生体に欠かすことができない2価の金属陽イオンで, 細胞内ではカリウムに次いで2番目に多い。成人男性の生体には約20~28gのマグネシウムがあ

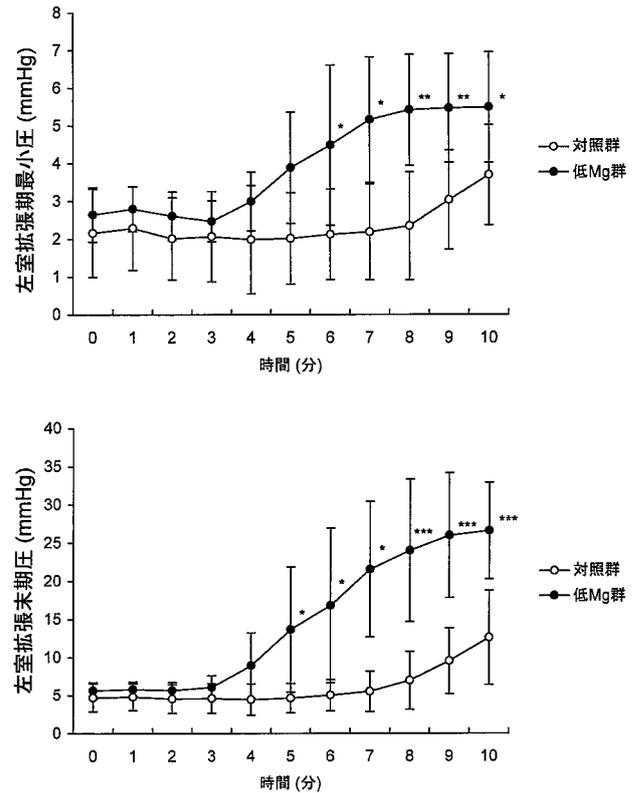


図5 対照群および低マグネシウム群の左室拡張期最小血圧, 左室拡張末期圧のカフェイン投与後の経時的変化。

低マグネシウム群では左室拡張期最小血圧, 左室拡張末期圧が著明に上昇した。* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.005$, *** ; $p < 0.001$ 。いずれもその時点における対照群と低マグネシウム群との間の比較である。

り, そのうち骨に60~65%, 筋肉に27%, 組織内に6~7%, 残り1%が細胞外液中に存在する^{15,16)}。マグネシウムはカルシウムやカリウムなど他の陽イオンと同様, 心臓代謝やホメオスタシスに重要な役割を果たしている。虚血性心疾患, 心筋症, 心不全では心筋内や血球内のマグネシウムは低下していると報告されている^{17~20)}。

本研究では, 1ヶ月間, 低マグネシウム食餌を与えたラットにカフェインを投与し左室血行動態に及ぼす影響を調べた。血清マグネシウム値は, 低マグネシウム群 0.6 ± 0.1 mg/dlで, 対照値 2.3 ± 1.1 mg/dlに比べ有意に低下していたが, 低マグネシウム食餌のみでは血行動態に標準食餌群の対照群と有意な変化を示さなかった。しかし, カフェイン投与により, 低マグネシウム群では左室拡張末期圧, 左室拡張期最小圧を有意に増加させた。これらの結果から, 低マグネシウム下のカフェインは, 左室拡張障害を起こすことを示している。

低マグネシウム下でのカフェインが何故, 拡張障害を

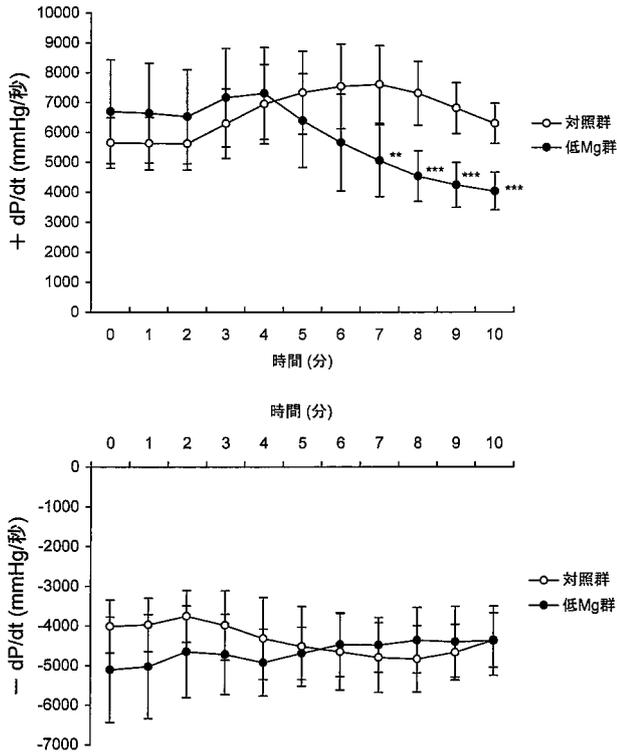


図6 対照群および低マグネシウム群の+dP/dt, -dP/dtのカフェイン投与後の経時的変化。

低マグネシウム群では+dP/dtは7分以降著明に減少した。*: $p < 0.005$, ***: $p < 0.001$ 。いずれもその時点における対照群と低マグネシウム群との間の比較である。

起こすのだろうか。すでに我々は Ca^{2+} 過負荷状態においてノルエピネフリンが拡張障害を起こす²¹⁾ことや、梗塞心においてもノルエピネフリン²²⁾や、 α 刺激薬フェニレフリンにより拡張障害が起こる²³⁾ことを報告してきた。これらはいずれも細胞内カルシウムの増加が拡張障害の一因になっていることを示唆する。カフェインはそれ自体で心筋のカルシウム感受性を高める^{24,25)}こと、また、マグネシウムは急性心不全や β アドレナリン受容体の感受性を抑制する²⁶⁾ことが知られている。低マグネシウム状態の心筋は Ca^{2+} 感受性が変化し、さらにカフェインによる細胞内 Ca^{2+} の増加、心筋小胞体からの Ca^{2+} 逸脱が心筋壊死を惹起し、拡張期 Ca^{2+} 濃度を上昇させ拡張障害を引き起こす可能性がある。今回検討していないが、低マグネシウムによる心筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a)による Ca^{2+} 摂取の低下も関与していると考えられる。

さらに、本研究において、低マグネシウム群でカフェイン投与によりアネキシンVの細胞内トランスロケーションが起こることが明らかとなった。アネキシンVは Ca^{2+} 結合蛋白質、アネキシンファミリーの1つで、心筋

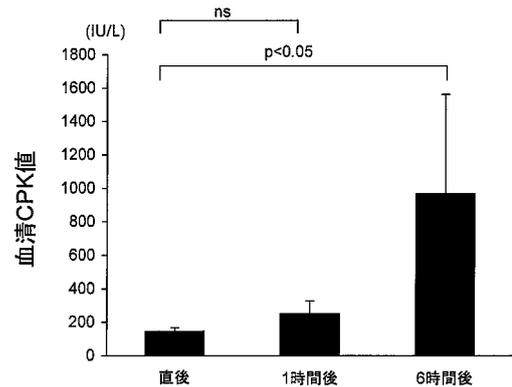


図7 低マグネシウム群におけるカフェイン投与後のCPK活性値の変化。

カフェイン投与後、6時間後有意な上昇を認めた ($p < 0.05$)。ns; 有意差なし。

内に豊富に存在する²⁷⁾。心筋内 Ca^{2+} 代謝に関与し、急性心筋梗塞や虚血では心筋内局在が変化し、血中に極めて早期に逸脱する^{27,28)}。アネキシンVは Ca^{2+} 濃度に依存し細胞膜リン脂質ホスファチジルセリンに結合する性質を有し²⁹⁾、虚血時に膜へ移動する²⁷⁾。梗塞心に対する α 受容体刺激で、アネキシンVの細胞内からの消失、細胞外への逸脱が起こる²³⁾。最近、アネキシンVと α_1 受容体刺激により活性化される δ プロテインキナーゼC (δ PKC)との相互関係が明らかになってきた。アネキシンVが δ PKCと結合することにより δ PKCの細胞内でのトランスロケーションを活性化するという³⁰⁾。また、アネキシンVが心筋細胞内 Ca^{2+} ハンドリングや心不全の進行に関与している報告がある³¹⁾。低マグネシウム下でのカフェインで拡張障害が起こること、その際にアネキシンVの細胞内トランスロケーションが起こっていることから、アネキシンVならびにその細胞内トランスロケーションも左室拡張障害の発生の1要因になっている可能性がある。

本研究ではCPK活性値は上昇し、壊死が起こることがわかった。低マグネシウム状態単独では壊死を認めなかった。Nyskaらはラットにアドレナリン類似薬効を示すエフェドリン投与下でカフェインを加えると急性出血性心筋壊死や突然死が発生することを報告している³²⁾。

本研究における低マグネシウム状態でカフェイン投与により、+dP/dtの低下を認めた。+dP/dt低下の機転として、心筋壊死の発生や、マグネシウムの欠乏下での筋小胞体における Ca^{2+} 取り込みが結果として+dP/dtの低下をもたらすことが考えられた。

以上、本研究においてマグネシウム欠乏単独では血行動態変化が無くても、カフェイン投与で有意に拡張障害

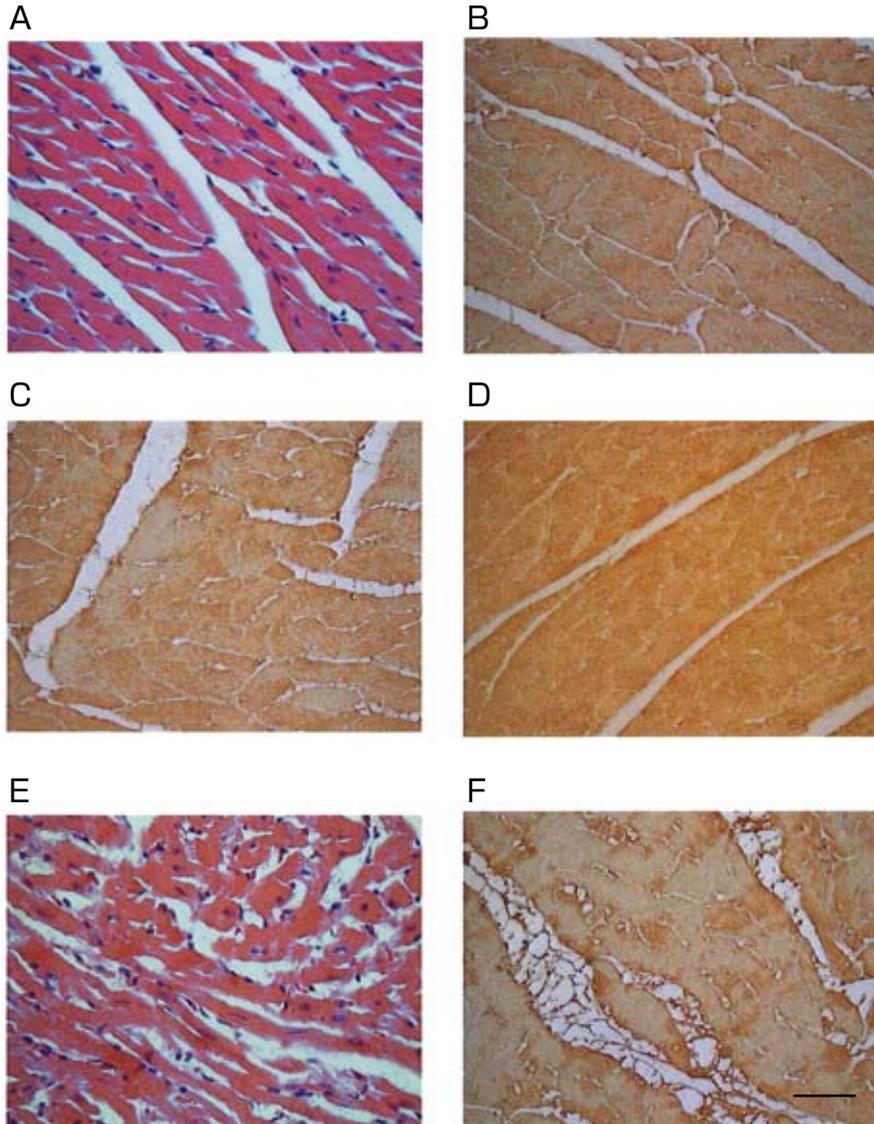


図8 心筋病理組織染色ならびにアネキシンV免疫組織染色。

A: 対照例のHE染色. B: 対照例のアネキシンV染色. アネキシンVは心筋内に均一で豊富に存在する. C: 低マグネシウム例のアネキシンV染色. D: カフェインのみ投与例のアネキシンV染色. C, Dいずれもやや散在性であるが心筋内にアネキシンVは存在し, 細胞外への逸脱はない. E, F: 低マグネシウム下にカフェイン投与例. 心筋は過収縮 (E, HE染色) している. アネキシンVは心筋内から細胞外へ著明に逸脱し, 細胞膜が濃染している (F, アネキシンV染色). 全て倍率は400倍である. スケールは50 μ mを示す.

が起こることが明らかとなった. このことは, マグネシウム低下のもとで, カフェインが拡張不全を起こすことが考えられ, 今後, 拡張障害患者の発生機転や拡張不全患者の治療に示唆を与えられよう.

結 論

1. 低マグネシウム単独では血行動態変化を認めなかったが, 低マグネシウム下カフェインは, 左室拡張期最小

圧及び左室拡張末期圧を上昇させ, 左室拡張障害を惹起させる.

2. 低マグネシウム下カフェインは, CPKを上昇させ, 心筋壊死をおこす. また, $+dP/dt$ を低下させる.
3. 低マグネシウム下カフェインは, アネキシンVの心筋細胞内トランスロケーションをおこし, アネキシンVの細胞質からの消失, 間質への逸脱を起こす.
4. 以上より, 低マグネシウムでは有意の左室機能障害を

起こさないが、カフェインにより拡張不全がおこり、その機序として、心筋Ca²⁺の感受性の変化、心筋内筋小胞体のCa²⁺遊離やCa²⁺逸脱ならびにアネキシンVのトランスロケーションが関与していることが示唆された。

謝 辞 稿を終わるにあたり、本研究のご指導を賜りました獨協医科大学心血管・肺内科学教室、金子昇教授に深甚なる謝意を表します。またご協力いただいた松田隆子准教授、心血管・肺内科研究生、篠崎誠氏、千脇史子氏、ならびに浅石理恵氏、教室員の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) Elwood PC, Sweetnam PM, Beasley WH, et al : Magnesium and calcium in the myocardium : cause of death and area differences. *Lancet* **4** : 720-722, 1980.
- 2) Fiset C, Kargacin ME, Kondo CS, et al : Hypomagnesemia : characterization of a model of sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* **27** : 1771-1776, 1996.
- 3) Bloom S : Effects of magnesium deficiency on the pathogenesis of myocardial infarction. *Magnesium* **5** : 154-164, 1986.
- 4) Jeppesen BB : Greenland, a soft-water area with a low incidence of ischemic heart disease. *Magnesium* **6** : 307-313, 1987.
- 5) Bloom S, Peric-Golia L : Geographic variation in the incidence of myocardial calcification associated with acute myocardial infarction. *Hum Pathol* **20** : 726-731, 1989.
- 6) Maheswaran R, Morris S, Falconer S, et al : Magnesium in drinking water supplies and mortality from acute myocardial infarction in north west England. *Heart* **82** : 455-460, 1999.
- 7) Rosenlund M, Berglund N, Hallqvist J, et al : Daily intake of magnesium and calcium from drinking water in relation to myocardial infarction. *Epidemiology* **16** : 570-576, 2005.
- 8) Etherton GM, Kochar MS : Coffee. Facts and controversies. *Arch Farm Med* **2** : 317-322, 1993.
- 9) Miller DJ, MacFarlane NG : Intracellular effects of free radicals and reactive oxygen species in cardiac muscle. *J Hum Hypertens* **9** : 465-473, 1995.
- 10) Happonen P, Voutilainen S, Salonen JT : Coffee drinking is dose-dependently related to the risk of acute coronary events in middle-aged men. *J Nutr* **134** : 2381-2386, 2004.
- 11) Azevedo A, Barros H : Coffee and myocardial infarction : heterogeneity of an association of in Portuguese men. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **13** : 268-273, 2006.
- 12) Grobbee DE, Rimm EB, Giovannucci E, et al : Coffee, caffeine, and cardiovascular disease in men. *N Engl J Med* **323** : 1026-1032, 1990.
- 13) Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, et al : Coffee consumption and coronary heart disease in women. A ten-year follow-up. *JAMA* **275** : 458-462, 1996.
- 14) Sudano I, Binggeli C, Spieker L, et al : Cardiovascular effects of coffee : is it a risk factor? *Prog Cardiovasc Nurs* **20** : 65-69, 2005.
- 15) Singh RB, Singh VP, Jha VK, et al : Magnesium and the heart. *Acta Cardiol* **31** : 401-409, 1976.
- 16) Chang C, Varghese PJ, Downey J, et al : Magnesium deficiency and myocardial infarct size in the dog. *J Am Coll Cardiol* **5** : 280-289, 1985.
- 17) Ryzen E, Elkayam U, Rude RK : Low blood mononuclear cell magnesium in intensive cardiac care unit patients. *Am Heart J* **111** : 475-480, 1986.
- 18) Herzog WR, Materese FJ, Atar D : Reactivity of coronary arteries in relation to serum magnesium levels in patients with ischemic heart disease - a quantitative coronary angiographic study. *Magn Res* **8** : 57-63, 1995.
- 19) Haigney MCP, Silver B, Tanglao E, et al : Noninvasive measurement of tissue magnesium and correlation with cardiac levels. *Circulation* **92** : 2190-2197, 1995.
- 20) Delva P : Magnesium and heart failure. *Mol Aspects Med* **24** : 79-105, 2003.
- 21) Kaneko N, Matsuda R, Nakajima T, et al : Norepinephrine-induced diastolic dysfunction with aortic valve opening under calcium-loading in rats. *Drug Dev Res* **67** : 511-518, 2006.
- 22) 小田和彦 : ラット梗塞心におけるノルエピネフリンの左室血行動態に及ぼす影響. *Dokkyo J Med Sci* **34** : T13-T19, 2007.
- 23) 西 悠 : α_1 受容体刺激による左室拡張障害の発生に関する検討. —ラット梗塞心による実験的検討—. *Dokkyo J Med Sci* **35** : T43-T50, 2008.
- 24) Wendt IR, Stephenson DG : Effects of caffeine on Ca-activated force production in skinned cardiac and skeletal fibers of the rat. *Pflügers Arch* **398** : 210-216, 1983.

- 25) O'Neill SC, Eisner DA : A mechanism for the effects of caffeine on Ca^{2+} release during diastole and systole in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol* **430** : 519-536, 1990.
- 26) Jin YT, Haseb N, Matsusakil T, et al : Magnesium attenuates isoproterenol-induced acute cardiac dysfunction and β -adrenergic desensitization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **202** : H593-H593, 2007.
- 27) Kaneko N, Matsuda R, Chiwaki F, et al : Purification of cardiac annexin V from the beagle dog heart and changes in its localization in the ischemic rat heart. *Heart Vessel* **9** : 148-154, 1994.
- 28) Kaneko N, Matsuda R, Hosada S, et al : Measurements of plasma annexin V by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction. *Clic Chimi Acta* **252** : 65-80, 1996.
- 29) Kaneko N, Matsuda R, Toda M, et al : Inhibition of annexin V-dependent Ca^{2+} movement in large unilamellar vesicles by K201, a new 1,4-benzothiazepine derivative. *Biochim Biophys Acta* **1330** : 1-7, 1997.
- 30) Kheifets V, Bright R, Inagaki K, et al : Protein kinase C δ (δ PKC)-annexin V interaction. A required step in PKC translocation and function. *J Biol Chem* **281** : 23218-23226, 2006
- 31) Camors E, Monceau V, Charlemagne D : Annexins and Ca^{2+} handling in the heart. *Cardiovasc Res* **65** : 793-802, 2005.
- 32) Nyska A, Murphy E, Foley JF, et al : Acute hemorrhagic myocardial necrosis and sudden death of rats exposed to a combination of ephedrine and caffeine. *Toxicol Scie* **83** : 383-396, 2005.