

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450425

研究課題名(和文) T-TASを用いた犬の心房細動時における血液凝固能と抗血栓治療効果の評価

研究課題名(英文) Evaluation of blood clotting ability and anti-thrombotic treatment effect during atrial fibrillation in dogs using T-TAS

研究代表者

福島 隆治 (Fukushima, Ryuji)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10466922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：犬において心房細動(AF)の発現わずか30分後から、心房内(右心房内血)で血液性状の変化すなわち血小板機能と凝固能の亢進が認められるようになることが、全血血栓形成観測システム(T-TAS)を利用することで明らかとなった。また、この現象は、AFが持続する間も継続し、AFが停止すると1週間後には回復することも明らかとなった。しかしながら、これらの現象は、末梢(伏在静脈血)では明らかでなかった。

これらAFを呈する犬に対し、ダルテパリンならびにクロピドグレルのいずれかを投与したものの、心房内の血小板機能と凝固能の亢進を抑制することができなかった。

研究成果の概要(英文)：Application of Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS) on dogs revealed the observation of changes in property of blood within the right atrium, more specifically, the progression of hemostatic ability and anti-thrombotic effect, which were observed 30 minutes after the onset of atrial fibrillation (AF). Additionally, it became apparent that this phenomenon lasted for the duration of the AF and resolved a week after the cessation of AF. However, these phenomena could not be observed at the peripheral (saphenous veins) blood. Either, Dalteparin or Clopidogrel was administered to dogs presented with these AF, but the progression of platelet function and Coagulation factor function within the atrium could not be suppressed

研究分野：不整脈診断・治療

キーワード：心房細動 血栓形成 T-TAS 犬 高頻度心房刺激 ダルテパリン クロピドグレル

1. 研究開始当初の背景

(1) 犬において、心疾患、内分泌疾患、および血液疾患など様々な疾患で血栓症の発現が報告されており、これらの疾患（総じて以下、易血栓形成疾患とする）では、より早期での血栓形成傾向の評価が重要である。また今後、犬にも新規の抗凝固薬や抗血小板薬も使用されると思われる、その薬効の評価も必要となる。従来の血小板機能・凝固能の評価法では、血小板機能の評価として血小板数、塗抹標本における大きさ・形の評価、出血時間を用いて行い、凝固能の評価として一段法プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノーゲン、D-dimer を測定することで評価されてきた。しかし、いずれも血小板機能と凝固能を同時に測定かつ反映させるものではなかった。そのため、従来の血小板機能検査と凝固能検査では測定できない血栓形成能のモニタリングは困難で、血栓形成能そのものを評価する新しい検査系の登場が望まれていた。極近年、それに合致するものとして、全血栓形成観測システム (Total Thrombus Formation System: T-TAS) が、生体外で血液凝固と血栓形成を総合的に評価するために医療用に開発された (Hosokawa K et.al : J Thromb Haemost : 2011)。本装置ではコラーゲンコートされたマイクロ流路に全血を流し、血栓形成により上昇する流路内の圧力をセンサーで測定するというものである (図 1)。T-TAS は医療用検査機器であるため、動物の血液サンプル測定時の安定性と正確性は未だ明らかとなっていない。そこで、この測定技術に着目し、獣医療へ応用できるのではないかと考えた。

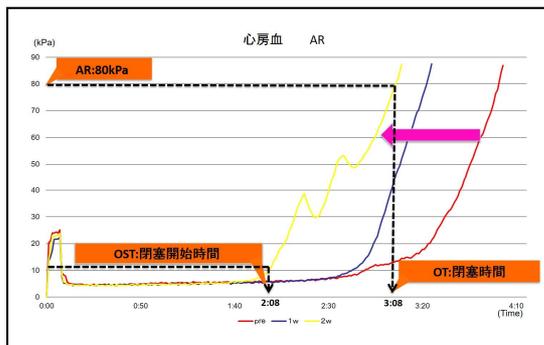


図 1 T-TAS の測定項目

(2) 一方、前述の易血栓形成疾患として、人医療ならびに獣医療において大きな関心が注がれている疾患の一つに心房細動 (Atrial fibrillation: Af) が挙げられる。心房は、血液のリザーブ機能、プースターポンプ機能、およびコンディエット機能を有しているが、心房が細動状態になるとこれらの機能は消失する。その結果、心拍出量は洞調律と比較して約 20~30%も減少することになるため、Af の患者は心不全に陥る。また、Af では心房機能の消失や続発する房室弁逆流により、

血管壁の異常、血流の鬱滞および凝固異常（これら 3 つをウィルヒョウの 3 徴という）などが引き起こされ、主に左心房内に血栓が形成される。人医療において、この生成された血栓が原因で脳梗塞を起こした場合には、1 年後の死亡率は 50%と予後は極めて悪い (Kubo M et.al : Neurology : 2006)。犬も人と同様に血栓が形成され、他臓器に梗塞するため、その場合の予後は極めて悪い。しかし、犬の Af 時あるいは Af 発現前の、どのタイミングで血栓が形成されるのかは、未だは明らかにされていない。

(3) また、残念ながら現時点において、犬の血栓症に対する適切な抗血栓 (抗凝固) 薬剤治療プロトコルが、存在しないという大きな問題もある。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、新しい検査系であるマイクロ流路を採用した全血栓形成観測システム (T-TAS) を用いて、犬の心房細動時 (Af) における血液凝固性状、ならびに血栓形成時の抗血栓治療効果を評価することを目的とする。具体的には心房細動モデルの一つである高頻度心房刺激犬を作出し、その静脈から得られた血液サンプルを利用し、T-TAS により生体外で血液凝固と血栓形成を総合的に評価する。本研究に用いる T-TAS は、人医療において血栓形成関連疾患の血液性状を評価するために開発された機器である。この測定技術を獣医療へ応用するためにまずは健常犬での測定条件を構築し、機器を改良する。

(2) この結果を受け、血栓形成がその予後に大きく関与する犬の Af を対象疾患とし、細動時の血液凝固機能の経時的变化を把握する

(3) これらの結果を受けて種々の抗血栓治療剤を用いた際の効果を評価する。最終的には、これらの 2 つの結果を総合し、臨床的に応用可能な犬の抗血栓治療のプロトコルの確立を目指す。

3. 研究の方法

人医療における検査機器である T-TAS を、犬に対して臨床利用できるように、健常ビーグル犬を対象動物として個体内差、個体間差、および時間差などについて検討を行う。T-TAS を犬に対する使用条件に改良した後に、健常犬における血栓形成時間の基準値を作成する。

次に、獣医療および人医療において血栓形成が臨床的に重要問題である Af に主眼を置き、Af の実験的モデルである高頻度心房刺激犬を、健常ビーグル犬を供試し作出する。そして、Af 時における血栓形成のプロセスを詳細に明らかにするために、細動前から細動時における血液凝固機能の経時的变化を確認

する。そして、種々の抗血栓（抗血液凝固）薬剤を Af 犬に投与し、その効果や用量用法を詳細に明らかにするとともに、最良の投薬プロトコールの作成を試みる。

4. 研究成果

(1) T-TAS の犬への応用として、同一個体における再現性の確認、採血後測定までの時間の影響の確認、個体間における再現性の確認と健常犬における血栓形成時間の基準値の作成を主に計画し、鹿児島大学の三浦准教授（研究分担者）の元で研究を行った。その結果、同一個体においての高い再現性が得られ、採血後測定時間に影響されない（静置時間 1 時間は常に必要）ことが判明し、個体間の高い再現性と基準値の決定が行えた（表 1）。このことにより、犬でも T-TAS を十分に利用可能であると結論づけた。

表 1 犬における T-TAS の各項目の基準値

N=36	PL	AR
OST	135.6 ± 48.6 sec	172.2 ± 26.4 sec
OT	283.8 ± 72.6 sec	244.2 ± 42.0 sec
AUC	406.77 ± 54.36 sec	2131.05 ± 42.09 sec

OST: 閉塞開始時間

OT: 閉塞時間

AUC: 曲線下面積

PL: 血小板機能、AR: 凝固因子機能

(2) Af モデル犬（高頻度心房刺激犬）の作成を行い、経時的に血液凝固能の変化を心房（右心房内血）と末梢（伏在静脈血）の双方で観察した。その結果、AF 発現 30 分後には血液凝固能（血小板機能と血液凝固因子機能）が亢進しはじめることが T-TAS を利用し明らかとなった（図 2 ならびに図 3）。しかし、その変化は、末梢血では認められずに心房血のみで認められること、その変化は、APTT、PT、AT および D-dimer という従来からの検査方法では検出することが出来ないこと、などが明らかとなった。

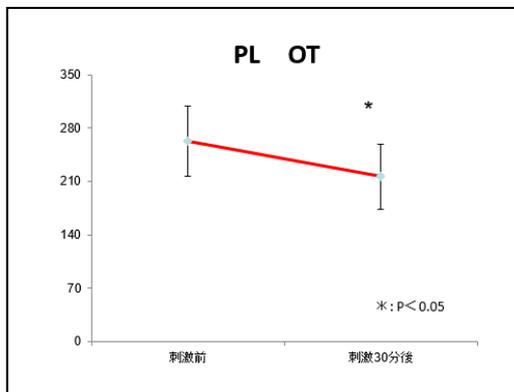


図 2 心房血における PL チップの OT

PL: 血小板機能

OT: 閉塞時間

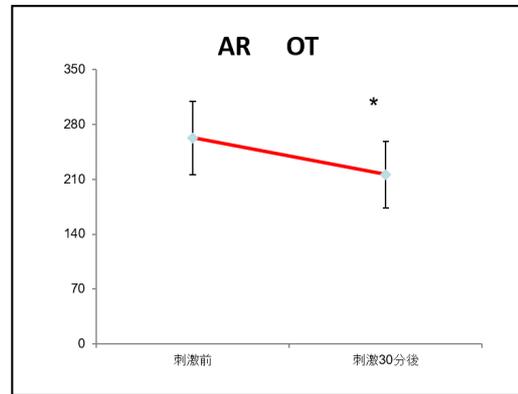


図 3 心房血における AR チップの OT

AR: 血液凝固因子機能

OT: 閉塞時間

また、同様な手法を用いて慢性 AF 時の血液性状の変化とし、AF 発現後 1, 2, および 3 週間後、そして AF 停止 1 週間後に観察した。その結果、心房細動が持続するに従い経時的に血小板機能と血液凝固能の双方が亢進していくこと、その変化は、血液凝固因子機能の亢進が血小板機能の亢進に先行すること、心房細動が停止すると約 1 週間で健常時の血液性状にほぼ回復すること、などを見いだした（図 4 ならびに図 5）。

そのため、犬の Af の発現後には速やかに抗血液凝固治療を開始すべきとの結論に至った。

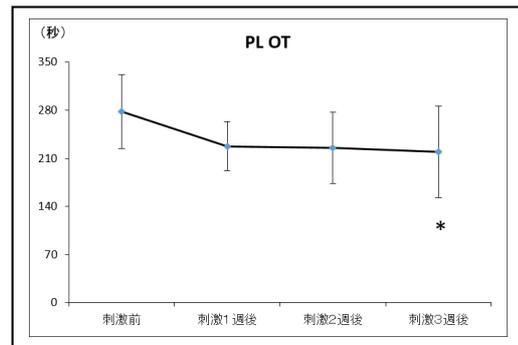


図 4 心房血における PL チップの OT

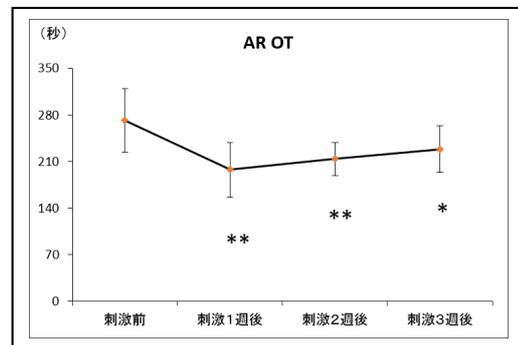


図 5 心房血における AR チップの OT

(3) これまでに犬の抗血液凝固治療（主に Af）は未確立のため有効な治療法を模索した。獣医療において抗血液凝固治療として、抗凝

固薬である低分子ヘパリン（ダルテパリン）ならびに抗血小板薬であるクロピドグレルが、臨床現場で利用されつつある。これら 2 剤を調査対象薬として選択し、AF モデル犬に対し 3 週間にわたり投与し、血液凝固能の変化を観察した。その結果、ダルテパリン投与後 1 週間目までは心房血ならびに末梢血で、血液凝固能（凝固因子系）の亢進を抑制可能な傾向であったが、2 週目以降は、心房血ならびに末梢血の双方で亢進を抑制できなかった。また、当然ながら薬理効果以外である抗血小板効果は見いだせなかった。一方、クロピドグレル投与後は、末梢血で血液凝固能（血小板機能）の亢進を抑制可能であった。しかし、心房血では血液凝固能（血小板機能）の亢進を抑制することができなかった。また、薬理効果以外である凝固因子系抑制効果は見いだせなかった。今回、両薬剤で心房血における血液凝固能（凝固因子系と血小板機能の双方）の亢進が抑制できなかった理由として、Af 状態が持続しているため心房機能の低下も維持されたことで、同部位での血液うっ滞が重度であったものと推定した。そのため、犬の Af 時の血栓予防・治療として、抗血液凝固治療にみでなく、心房機能の改善を助成した治療を併用する必要があると結論づけた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 8 件）

発表者名：岩永朋子

発表表題：外来症例の不整脈診断

学会名：発表年月日：2017 年 2 月 17 日～2017 年 2 月 19 日

発表場所：パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

発表者名：岩永朋子

発表表題：「救急医療」；循環器疾患における救急医療

学会名：第 13 回鹿児島小動物臨床フォーラム

発表年月日：2017 年 2 月 11 日～2017 年 2 月 11 日

発表場所：鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）

発表者名：岩永朋子

発表表題：房室解離と心室頻拍およびうっ血性心不全を呈した犬の 1 例

学会名：第 105 回日本獣医循環器学会

発表年月日：2016 年 12 月 2 日～2016 年 12 月 3 日

発表場所：福岡国際会議場（福岡県福岡市）

発表者名：安川洋子、山田修作、平尾大樹、橋本梨那、永里朋香、丸山征郎、三

浦直樹、岩永朋子、福島隆治

発表表題：出血傾向を全血血栓形成観測システム（T-TAS）により確認できた犬の 3 例

学会名：第 37 回動物臨床医学年次大会

発表年月日：2016 年 11 月 18 日～2016 年 11 月 20 日

発表場所：大阪国際会議場（グランキューブ大阪）（大阪府大阪市北区）

発表者名：山田修作、平尾大樹、河口貴恵、和田智樹、島田香寿美、丹野耕作、永里朋香、丸山征郎、岩永朋子、三浦直樹、福島隆治

発表表題：TAS を用いたイヌの心房細動時における急性期の血液凝固能の評価

学会名：第 103 回日本獣医循環器学会

発表年月日：2015 年 12 月 19 日～2015 年 12 月 21 日

発表場所：札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

発表者名：平尾大樹、山田修作、河口貴恵、和田智樹、島田香寿美、丹野耕作、永里朋香、丸山征郎、三浦直樹、岩永朋子、福島隆治

発表表題：全血血栓形成観測システム T-TAS を用いた心房細動モデル犬の心房血および末梢血における血栓形成能の継時的変化

学会名：第 103 回日本獣医循環器学会

発表年月日：2015 年 12 月 19 日～2015 年 12 月 21 日

発表場所：札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

発表者名：岩永朋子、福島隆治、山田修作、平尾大樹、永里朋香、丸山征郎、三浦直樹

発表表題：脾炎と肺高血圧症を併発した犬の全血血栓形成観測システムによる血小板 & 凝固能検査の可能性

学会名：第 103 回日本獣医循環器学会

発表年月日：2015 年 12 月 19 日～2015 年 12 月 21 日

発表場所：札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

発表者名：岩永朋子、福島隆治、永里朋香、丸山征郎、三浦直樹

発表表題：犬における全血血栓形成観測システムを用いた血栓凝固機能検査の検討

学会名：第 11 回日本獣医内科学アカデミ

発表年月日：2015 年 02 月 20 日～2015 年 02 月 22 日

発表場所：パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島隆治 (FUKUSHIMA, Ryuji)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：10466922

(2)研究分担者

三浦 直樹(MIURA, Naoki)
鹿児島大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号：80508036

(3)連携研究者

岩永 朋子 (IWANAGA, Tomoko)
鹿児島大学・共同獣医学部・特任助教
研究者番号：60713287

(4)研究協力者

山田 修作 (YAMADA, Shusaku)
河口 貴恵 (KAWAGUCHI, Takae)
平尾 大樹 (Hirao, Daiki)