

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08054

研究課題名(和文) イヌにおけるDIC診断の新規検査の検討

研究課題名(英文) The evaluation of novel examination of diagnosis of Disseminated intravascular coagulation (DIC) in dogs

研究代表者

岩永 朋子 (Iwanaga, Tomoko)

鹿児島大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：60713287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：犬の新規血液凝固検査としてTotal Thrombus formation Analysis System(T-TAS)を用いて、初年度は健康コントロール群に対して、その再現性およびIn vivoおよびIn Vitroにて抗凝固薬の影響を判定した。次年度以降は周術期の出血リスクに関して、術前にAPTT, PTおよびT-TASを用いてそのリスクを評価し、周術期の実際の出血リスクを判定した。さらに、膵炎などの全身性炎症性疾患におけるDICリスクを血栓マーカーとの比較をおこなった。さらに循環器疾患における血小板凝集能に関して検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康犬に対する再現性、各血液凝固薬の効果判定では、2017年国際学会で発表し、論文投稿中である。今後は抗凝固薬の治療効果判定にT-TASを含めて評価できる可能性があると考えられる。周術期の出血リスクでは、従来の検査で検出不可能なリスクをT-TASで評価し、平成29年度日本小動物獣医学会九州地区大会にて、学会長賞を受賞した。各疾患での血液凝固異常に関して検討し、。各疾患におけるT-TASの特徴を検出した。また、他の血液凝固検査との相関を検討し、T-TASの特徴を示すことができた。これは2019年国際学会で発表し、国際誌へ掲載された。

研究成果の概要(英文)：According to the novel blood coagulation examination in dogs, we assessed the repeatability and the effect of anticoagulation drugs in vivo and in vitro using Total Thrombus formation Analysis System (T-TAS) for the healthy control dogs in the first year. Next, we assessed the risk of bleeding in the perioperative period. We compared with this bleeding risk and the phenomenon of bleeding using measurements of APTT, PT, and T-TAS. Additionally, we assessed the risk of Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of systemic inflammation diseases like pancreatitis using the marker of thrombosis. And we assessed platelet aggregation in cardiology patients.

研究分野：血栓症 敗血症 循環器

キーワード：血液凝固 血栓症 敗血症 播種性血管内凝固 全血血栓観測システム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

◆ DIC の診断の現状と早期診断の必要性：診断が複雑だが、早期診断が予後には重要である。DIC は敗血症、膵炎などの全身性炎症疾患、腫瘍性疾患などを基礎疾患として発症する。様々な要因により全身の血管内に播種性に微小血栓が生じ、臓器不全を起こすとともに線溶活性が過剰発現し、出血傾向を引き起こす。発症には様々な因子が関与しているため、診断も複雑である。現在は人のガイドラインを基に、獣医領域でもいくつかの検査を組み合わせることで診断されている。実際は血小板数、アンチトロンビン、プロトロンビン時間(以下 PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(以下 APTT)、線溶系マーカーであるフィブリノゲン/フィブリン分解産物(以下 FDP)や二次線溶マーカーである D-ダイマーの測定を行い、これらを組み合わせることで診断しなければいけないことが多い。これらの検査で4つ以上の異常があれば、DIC と診断され、2項目で DIC 前段階とされている。

現状の検査では、アンチトロンビンなどはベットサイドで行えず、線溶系マーカーは腹水などの貯留液の影響を受けるなどの問題があり、確実性が低いことも多い。しかし、ひとたび DIC に進行した場合、予後は不良のことが多く、早期診断を確実に行う事が重要である (Ralph .G et al (2012) Top Companion Anim Med)。

◆ T-TAS の測定原理と有効性：T-TAS の測定原理は生体内の血液凝固の状態を把握できる。血液凝固検査は非常に重要であるにもかかわらず、早期に確実に診断するのが難しい。これは、血液凝固には「Virchow の3徴」で示される「血管内皮細胞による抗血栓性タンパクの発現および分泌」「血小板・血液凝固・線溶系の活性化」「血流の変化」という3要素が複雑に関連し、それらを総合的に評価する必要があるからである。研究分担者である丸山と三浦は、「Virchow の3徴」を考慮して、血管を模したマイクロ流路に患者の全血を流す血栓形成観測システム (Total Thrombus Formation System:以下 T-TAS) を開発した。この T-TAS では抗凝固剤で処理をした血液をコラーゲンとトロンボプラスチンでコーティングされたマイクロ流路に一定速度で流入することで、より生体内に近い状態で血栓形成過程が再現できる。血栓形成過程による圧の上昇と時間を数値化して定量化している (Tanaka K.A et al (2011):J Thrombo Haemost) (図1:T-TAS 測定原理と測定結果)。よって、T-TAS では血液凝固の亢進(血栓性)と延長(出血傾向)の両方を測定できる。

◆ イヌでの T-TAS 測定の可能性：健康犬では基礎データの一部は検証されている。

申請者も既に T-TAS の犬への応用を検討するため、健康犬における使用例を発表し(鈴木ら 2012 年 JCVIM, 岩永ら 2015 年 JCVIM),その再現性も確認した(図2)。さらに、周術期において血液凝固異常が疑われた症例で、従来の血液凝固検査は正常であったものが、T-TAS では健康犬よりも血液凝固の延長が認められた(図3:矢印)。また、膵炎、腫瘍性疾患、血液疾患などにおいて T-TAS を測定したところ、膵炎において有意な血液凝固の延長が認められ、データを発表した(岩永ら 2015 年 JCVIM)。

以上より T-TAS は DIC の前段階をより早期に確実にとらえる可能性があり、DIC 診断に大きな貢献をもたらし、さらに、周術期の予測困難な血液凝固異常を検出できると考えた。申請者(一般内科)と研究分担者(三浦:画像診断科,高橋:腫瘍科,齋藤:麻酔科)は鹿児島大学附属動物病院で本研究を対象とする疾患を診断する機会が多く、このような背景から臨床にすぐに役立つ本装置の可能性を立案した。

2. 研究の目的

本研究は期間内に以下の研究を行い、T-TAS のイヌにおける有用性を明らかにする。

- (1) 健康犬への汎用性の確認：現在すでに取り組んでおり、健康犬において測定結果の再現性は確認され、参照範囲が設定されている。さらに犬種、年齢による相違の確認や血小板数、血液粘度度など、臨床項目や他の検査との比較検討を行う。
- (2) 健康犬に対して、抗凝固薬投与の T-TAS での評価：In vivo において抗血小板薬であるアスピリンを投与し、T-TAS を測定し、血小板のみを評価する PL チップでの変化を確認する。一方、抗凝固薬である低分子ヘパリンを In vitro にて健康犬の血液と混

図1:T-TAS 測定原理と測定結果

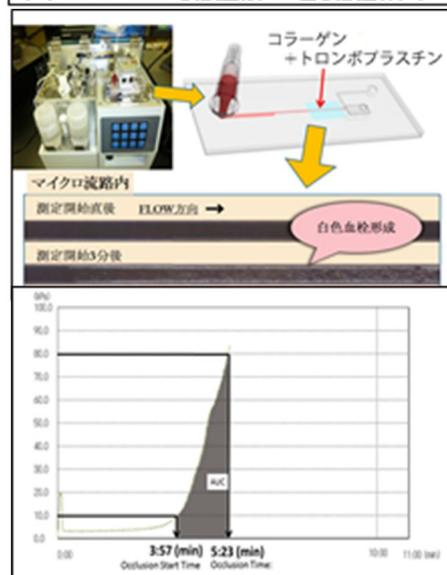


図2:健康犬における再現性(n=6)

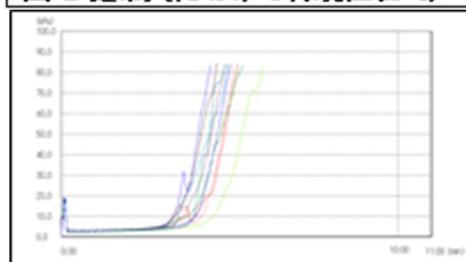
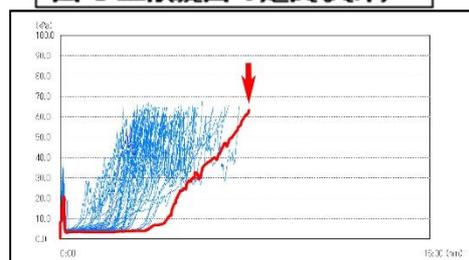


図3:血液凝固の延長(矢印)



- 合し、血小板および血液凝固因子を評価する AR チップでの変化を確認する。
- (3) DIC (DIC 前段階) 症例および循環器疾患症例における血栓性の評価: DIC 症例および DIC が危惧される症例に対して、従来のベットサイドでの検査法 (血小板数, APTT, PT, AT または D-ダイマー), トロンピンアンチトロンピン複合体 (以下 TAT) と T-TAS を測定し、比較検討を行う。
- (4) 周術期における血液凝固能評価: 周術期における血液凝固能を評価するため、手術前後での血小板数, APTT, PT, および T-TAS を測定し、術後の臨床的な血液凝固異常を検索し、比較検討する。
- これらを実行することにより、犬における「DIC および DIC 前段階の診断基準」「周術期の血液凝固能異常判定」の確立を目標とする。

3. 研究の方法

- (1) 健常犬への汎用性の確認: 鹿児島大学附属動物病院に来院したボランティア健常犬および飼育されている健常犬 (n=7) から、ヒルジン加血液および 3.8% クエン酸加血液を採取し、T-TAS で測定した。同時に EDTA 全血も採取し、全血球計算も行っている。
- (2) 健常犬に対して、抗凝固薬投与の T-TAS での評価: 健常犬に抗血小板薬であるアスピリン (パファリン配合錠 A81, エーザイ) 0.5mg/kg SID にて 2 日間投与し、投与後 6 時間後に採血をおこない、T-TAS を PL チップおよび AR チップで測定する。同時に EDTA 血をも採取し、全血球計算も行う。一方、抗凝固薬に関しては、健常犬 (n=3) から、ヒルジン加血液および 3.8% クエン酸加血液を採取し、ダルテパリンナトリウム (フラグミン, ファイザー) をそれぞれ全血液 500ul に対して、1ul を混和させて T-TAS (PL チップ, AR チップ) 測定を行う。同時に EDTA 血で全血球計算を行った。
- (3) DIC (DIC 前段階) 症例および循環器疾患症例における血栓性の評価: 鹿児島大学附属動物病院に来院した「膵炎などの全身性炎症性疾患と診断された症例および DIC と診断された症例 (n=50)」「循環器検査にて MR や不整脈などの循環器疾患と診断された症例 (n=67)」の血液を用いて、T-TAS、全血球計算、AT、D-ダイマー、TAT を測定する。
- (4) 周術期における血液凝固能評価: 疾患にかかわらず、術前に血液凝固検査として、従来のベットサイド検査として APTT、PT 測定と T-TAS を測定し、周術期の血液凝固異常として、術後の臨床的な出血の有無を比較した (n=131)。

4. 研究成果

- (1) 健常犬への汎用性の確認

健常コントロール群 (n=7) はラブラドルレトリバー 2 頭、ビーグル 3 頭、雑種犬 2 頭で、雄 3 頭 (去勢雄 2 頭)、雌 4 頭 (全て避妊雌)、年齢は 1 歳 ~ 10 歳 (中央値 2 歳、平均値 4.3 歳) であった。健常コントロール群での各パラメーターは (平均 ± SD) PL-OST=2.26 ± 0.81 秒、PL-OT=4.73 ± 1.21 秒、PL-AUC=406.77 ± 54.36 秒で、一方 AR-OST=5.02 ± 1.83 秒、AR-OT=6.04 ± 2.14 秒、AR-AUC=1955.35 ± 54.36 秒であった。それぞれの再現性 (CV) は、PL-OST=10.94%、PL-OT=15.42%、PL-AUC=6.45%、AR-OST=10.01%、AR-OT=7.65%、AR-AUC=1.57% で、良好な再現性が得られた。特に血液凝固能を全体的に評価する AUC では 10% 以下の再現性が得られた。

健常コントロールにおける測定において、犬における T-TAS 測定は再現性が認められ、測定可能であると考えられた。

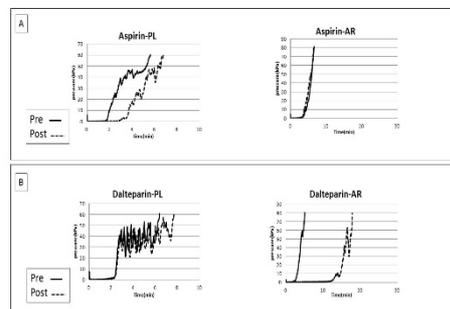
- (2) 健常犬に対して、抗凝固薬投与の T-TAS での評価

健常ビーグル犬 3 頭に対してアスピリンを投与し、その前後で T-TAS の各パラメーターを比較検討した (one-tailed t-test $p < 0.05$)。血小板機能を評価する PL チップにおいて、全例でグラフが右側へ変位し (図 4A)、投与前と投与後では PL チップの全てのパラメーターにおいて有意な変化であった ($p=0.046$ (PL-OST), $p=0.032$ (PL-OT), $p=0.043$ (PL-AUC))。一方、血小板機能と凝固因子の両方を評価する AR チップにおいては、アスピリン投与前後でグラフはほとんど変化しなかった ($p=0.158$ (AR-OST), $p=0.291$ (AR-OT), $p=0.233$ (AR-AUC))。

次に、抗凝固薬であるダルテパリンを健常犬 3 頭の血液に混和し、In vitro での T-TAS の変化を検討した。血小板および血液凝固因子を評価する AR チップにおいて、有意に右側へ変位した ($p=0.045$ (AR-OST), $p=0.023$ (AR-OT), $p=0.029$ (AR-AUC)) (図 4B)。一方、血小板機能のみを評価する PL チップにおいては PL-OST ($p=0.078$), PL-OT ($p=0.092$) では有意な変化は認めなかったが、PL-AUC において有意差が認められた ($p=0.017$)。これは、ヘパリンが血小板へも影響することによるものと考えた。

以上より、犬においても血小板機能、血液凝固因子機能を評価できていると考えた。また、今後、薬物の効果を T-TAS で測定できる可能性があると考えられた。

図 4 抗凝固薬による T-TAS グラフの変化



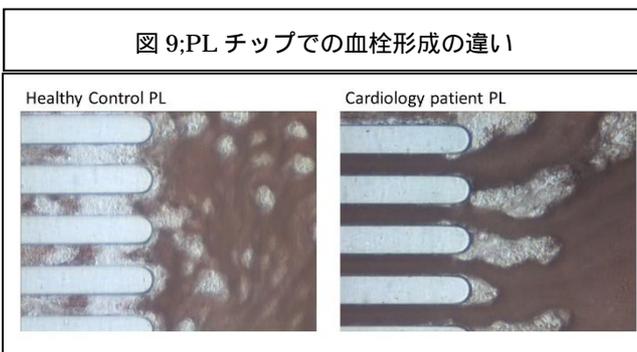
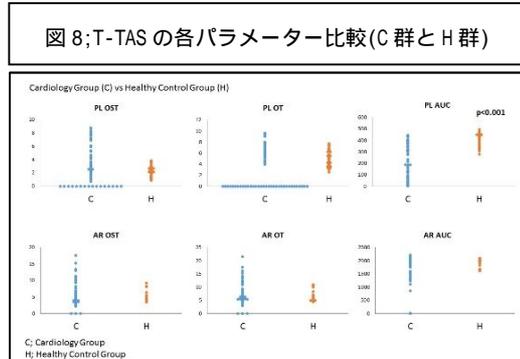
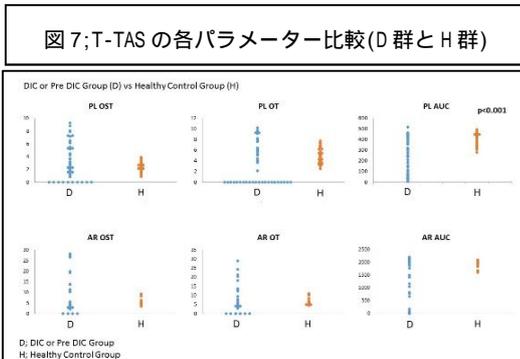
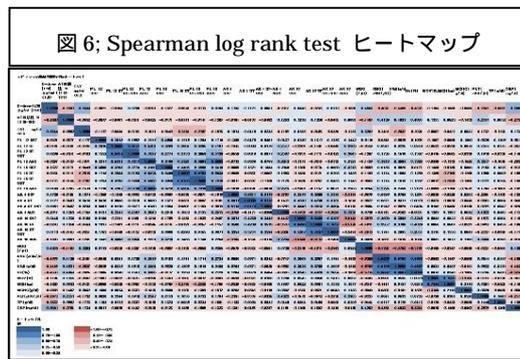
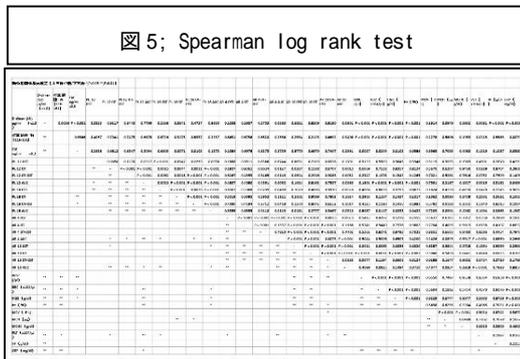
(3) DIC (またはDIC 前段階) 症例および循環器疾患症例における血栓性の評価

DIC(またはDIC 前段階)症例および循環器疾患症例において、T-TAS および全血球計算、TP、CRP、D-dimer、AT、TAT を測定した。T-TAS は各チップ2種類のシェアストレスで測定した(PL Low;12ul/min/PL Mid;18ul/min, AR Low;4ul/min/AR High;10ul/min)。

Spearman 順位相関係数を用いて、各項目の相関関係を検討した。T-TAS の各項目との比較では、TAT と PL Mid shear 閉塞時間(OT)と閉塞時間 (OT)と閉塞開始時間 (OST)との差 (OT-OST) に負の相関が認められた。白血球数と PL AUC と正の相関、AR High shear OST および OT に負の相関が認められる。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値と PL AUC、AR High shear OST および OT に正の相関が認められる。血小板数と PL Low Shear OT,AUC, PL Mid Shear OST と正の相関が、AR Low shear OST では負、AR High shear AUC では正の相関が認められる。CRP は PL Low Shear AUC と負の相関が認められた(図5,6)。これらはDIC や Pre DIC 症例における炎症性マーカー(白血球数、CRP)とT-TASでの血液凝固異常が相関している事が示唆された。また、血小板数との比較において、血小板数はT-TASの結果に影響をする可能性が示唆された。特に血小板数の上昇が血栓性に影響している可能性が示唆された。赤血球項目との相関に関しては、過去の報告にも血液希釈が影響しているという報告がある。このことから血液の粘調度は血液凝固に関連している可能性が考えられる。

次に、T-TAS の各項目に関して、各疾患群での比較を Man-Whitney U test を用いて行った。DIC または Pre DIC (D) 群と健康コントロール (H) 群との比較では、PL AUC において有意に減少していた。これは DIC における血小板数の減少が影響している可能性が示唆された(図7)。

循環器疾患においても PL AUC において有意な減少が認められた(図8)。循環器疾患においては、MR など乱流が認められる症例においては、PL チップ内において、血小板形成異常が確認された(図9)。この違いにはフォンウィルブランド因子活性などが慣用している可能性が考えられる。この影響で、PL チップでの閉塞障害または遅延が起こり、有意な減少が認められたことが示唆された。



(4) 周術期における血液凝固能評価

鹿児島大学附属動物病院で手術をする症例 131 頭において、術前に APTT,PT,T-TAS を用いて血液凝固機能の評価し、術後に臨床的な出血の有無を評価した。

131 症例のうち、T-TAS で異常が認められたものは 14 例で、そのうち PT,APTT の延長も認められたのは 4 例、PT、APTT が正常範囲内であったものは 10 例であった。T-TAS と PT、APTT の両方で異常を示した 4 例のうち、3 例で臨床症状として出血を認めた。次に T-TAS が異常で、PT、APTT が正常だった 10 例のうち、T-TAS が全く圧上昇しなかった 3 例では、術後全例で貧血や鼻出血などの臨床症状を示した。残りの 7 例では T-TAS は異常を示したが、圧上昇の遅延のみであった。これらの症例では出血の症状は認めなかった(図 10)。

以上より、PT、APTT で認められる異常は T-TAS においても検出できると考えられた。更に、PT、APTT では正常であった症例のうち、T-TAS の圧上昇がない場合は出血を呈する可能性があるが、遅延してでも圧上昇があれば、出血として症状は発現しない可能性が示唆された。

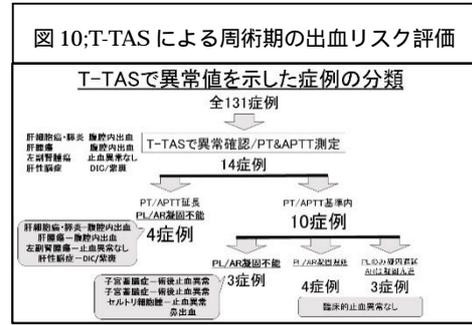


図 10:T-TAS による周術期の出血リスク評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada S, Hirao D, Miura N, Iwanaga T, Kawaguchi T, Yoshimura A, Oomori T, Nagasato T, Maruyama I, Fukushima R	4. 巻 Oct 31
2. 論文標題 Comparison between blood coagulability in the intra-atrial and peripheral regions during the acute phase after rapid atrial pacing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.18-0100.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada S, Hirao D, Miura N, Iwanaga T, Kawaguchi T, Yoshimura A, Oomori T, Nagasato T, Maruyama I, Fukushima R	4. 巻 171
2. 論文標題 Comparison of chronological changes in blood characteristics in the atrium and peripheral vessels after the development of non-valvular atrial fibrillation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thrombosis Reserch	6. 最初と最後の頁 31-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2018.09.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomoko Iwanaga, Naoki Miura, Benjamin M Brainard, Marjory B Brooks, Robert Goggs	4. 巻 -
2. 論文標題 A Novel Microchip Flow Camber (Total Thrombus Analysis System) to Assess Canine Hemostasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science, section Veterinary Experimental and Diagnosis Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fvets.2020.00307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Aritada YOSHIMURA, Takahiro OHMORI, Shusaku YAMADA, Takae KAWAGUCHI, Miori KISHIMOTO, Tomoko IWANAGA, Naoki MIURA, Ryuji FUKUSHIMA	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparison of pancreatic and renal blood flow in a canine tachycardia-induced cardiomyopathy model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 三浦直樹、岩永朋子、齋藤靖夫、高橋雅、福島隆治
2. 発表標題 全血栓形成観測システム (Total Thrombus Formation System: T-TAS)の血栓性疾患の評価
3. 学会等名 日本小動物獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩永朋子
2. 発表標題 知らなければ絶対に診断できない肺血栓塞栓症 その正体を血液検査から探る
3. 学会等名 日本小動物獣医学会卒後研修会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩永朋子
2. 発表標題 外来症例の不整脈診断
3. 学会等名 第13回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩永朋子
2. 発表標題 「救急医療」；循環器疾患における救急医療
3. 学会等名 第13回鹿児島小動物臨床フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoko Iwanaga, Shusaku Yamada, Ryuji Fukushima, Tomoka Nagasato, Ikuro Maruyama, Naoki Miura
2. 発表標題 Novel Thrombogenicity Examination of Whole Blood: Total Thrombus-formation Analysis System in Dogs
3. 学会等名 2017 American College of Veterinary Internal Medicine Forum (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 市川華帆、岩永朋子、齋藤靖生、十川英、蔵元智英、古澤悠、高橋香、須永隆文、高橋雅、福島隆治、三浦直樹
2. 発表標題 新規血液凝固能検査としての全血血栓形成観測システム (Total Thrombus Formation System: (T-TAS)の臨床使用例
3. 学会等名 日本小動物獣医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩永朋子
2. 発表標題 房室解離と心室頻拍およびうつ血性心不全を呈した犬の1例
3. 学会等名 第105回日本獣医循環器学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 安川洋子、山田修作、河口貴恵、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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第37回動物臨床医学年次大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岩永朋子
2. 発表標題 外来症例の不整脈診断
3. 学会等名 第13回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩永朋子
2. 発表標題 「救急医療」；循環器疾患における救急医療
3. 学会等名 第13回鹿児島小動物臨床フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwanaga T, Naoki M, Brainard B, Brooks MB, Goggs R
2. 発表標題 EVALUATION OF THE TOTAL-THROMBUS ANALYSIS SYSTEM (T-TAS) IN DOGS AT RISK OF BLEEDING
3. 学会等名 25th International Veterinary Emergency & Critical Care Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>血栓や止血異常など血液凝固疾患の新規診断法 http://www.rdc.kagoshima-u.ac.jp/seeds_search/upload/25-Ls-iwanaga-vet.pdf</p> <p>あらゆる病気で起こる血液凝固異常を研究して、救命率を上げる！ https://www.kagoshima-u.ac.jp/researcher/2020/04/post-18.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福島 隆治 (Fukushima Ryuji) (10466922)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	
研究分担者	齋藤 靖生 (Saitou Yasuo) (10731581)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・助教 (17701)	
研究分担者	丸山 征郎 (Maruyama Ikuro) (20082282)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授 (17701)	
研究分担者	高橋 雅 (Takahashi Masashi) (40750419)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	三浦 直樹 (Miura Naoki) (80508036)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授 (17701)	