

高頻度心房刺激犬を用いた
血液凝固能と抗血栓治療に関する研究

2018年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(東京農工大学)

山 田 修 作

高頻度心房刺激犬を用いた
血液凝固能と抗血栓治療に関する研究

山 田 修 作

目次

序論

1. 緒言..... 1- 6
2. 図表..... 7- 8

第1章 健常対照群における T-TAS の応用

1. 緒言.....10
2. 方法.....11- 13
 - 1) ガイドラインの遵守
 - 2) 供試動物
 - 3) Afモデル犬の作成
 - 4) 実験プロトコール
 - 5) 検査
3. 結果.....13- 14
4. 臨床応用.....14- 18
5. 考察.....19- 20
6. 小括.....21
7. 図表.....22- 29

第2章 高頻度心房刺激犬を用いた心房機能の評価

1. 緒言.....31
2. 方法.....32- 35
 - 1) ガイドラインの遵守
 - 2) 供試動物
 - 3) Afモデル犬の作成
 - 4) 実験プロトコール
 - 5) 検査
3. 結果.....35- 36
4. 考察.....37- 39
5. 小括.....40
6. 図表.....41- 66

第3章 高頻度心房刺激犬を用いた血液凝固能の評価

1) -慢性期 (Af 開始 1, 2, 3 週間後)における血液凝固能の評価-	
1. 緒言	68
2. 方法	69 – 73
1) ガイドラインの遵守	
2) 供試動物	
3) Af モデル犬の作成	
4) 実験プロトコール	
5) 検査	
3. 結果	73 – 75
4. 考察	75 – 78
5. 小括	79
6. 図表	80 – 89
2) -急性期 (Af 開始 30 分後)における血液凝固能の評価-	
1. 緒言	91
2. 方法	92 – 93
1) ガイドラインの遵守	
2) 供試動物	
3) Af モデル犬の作成	
4) 実験プロトコール	
5) 検査	
3. 結果	94
4. 考察	95 – 96
5. 小括	97
6. 図表	98 – 105

第4章 高頻度心房刺激犬を用いた抗血栓治療の評価

1) -抗凝固薬 (ダルテパリン)による抗血栓治療の評価-	
1. 緒言	107
2. 方法	108 – 110
1) ガイドラインの遵守	
2) 供試動物	
3) Af モデル犬の作成	
4) 投与薬剤	

5)	実験プロトコール	
6)	検査	
3.	結果	111 – 112
4.	考察	112 – 114
5.	小括	115
6.	図表	116 – 127
2)	-抗血小板薬（クロピドグレル）による抗血栓治療の評価-	
1.	緒言	129
2.	方法	130 – 132
1)	ガイドラインの遵守	
2)	供試動物	
3)	Afモデル犬の作成	
4)	投与薬剤	
5)	実験プロトコール	
6)	検査	
3.	結果	132 – 134
4.	考察	134 – 136
5.	小括	137
6.	図表	138 – 149
第5章	総括	150 – 155
	謝辞	156
	参考文献	157 – 171

序論

1. 緒言

「血栓症」とは、心腔内や血管内腔に凝血塊が形成される疾患であり、これらの凝血塊が動脈あるいは静脈に塞栓することで血流が減少あるいは途絶し、各種臓器が機能不全に陥る病態である(1)。近年、獣医領域の臨床現場において血栓症を診断する機会が増えてきている。その背景には、各施設での超音波やCT・MRI検査などの画像診断装置の導入の増加や新規の凝固系検査の登場が大きく貢献していると考えられる。また、血栓症の多くは基礎疾患が原因で形成されるため、血栓症になりうる疾患の診断も重要である。

医療において、凝固系および血栓が直接関与する疾患である心筋梗塞や脳卒中・脳梗塞は、日本人の死因において上位を占めると言われている(2)。このうち、心房細動(Af)は心原性脳塞栓症の原因の45%を占めるとGreerらは述べている(3)が、70%を占めるとの報告もあり(4)、Afによる血栓塞栓による脳梗塞は、最も注意すべき合併症として認識されている。また、心疾患に起因した血栓が原因で脳梗塞を起こした場合の1年生存率は、約50%と予後は非常に悪い(5)。そのため、抗不整脈薬による治療とともに抗凝固薬あるいは抗血小板薬による血栓形成予防を行うことが重要であり、すでに一般的である。Af患者における血栓の生成部位は、心房内であることが知られているが(6,7)、心房内での血液性状の変化はこれまでに明らかにされていない。加えてAfの発現後、どのタイミングで血液性状の変化が生じるかも明確にされていない。

一方、犬においても、腫瘍、感染性心内膜炎、副腎皮質機能亢進症、免疫介在性溶血性貧血、蛋白漏出性腎症または蛋白漏出性腸症の際に血栓塞栓症が認められる(8~12)。しかしながら、犬におけるAfによる血栓塞栓症の発生報告は少なく(13,14)、未だ議論の余地があると考えられており、Afによる血栓形成に関する研究は不十分である。

獣医学領域における血小板機能・凝固能の評価法は、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プロトロンビン時間(PT: Active partial thromboplastin time)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT: Active partial thromboplastin time)、フィブリノーゲン濃度(Fibrinogen)

Fibrinogen)、D-ダイマー (D-dimer) および抗凝固因子 (ATIII:Antithrombin) を測定することで評価されてきた (15~19)。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、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。

近年、全血血栓形成観測システム (Total Thrombus-formation Analysis System : T-TAS) という機器が、より生体内に近い条件下で血小板機能と凝固因子機能を測定することを目的として医療用に開発された (20~23)。これにより、血流下での血栓形成を数値的・視覚的により詳細に評価することが可能となっている。

本研究は、従来からの PT、APTT、Fibn などの血液凝固検査と新規血栓止血検査機器である T-TAS を用いて、実験的に作成された Af モデルの犬における心房内および末梢における血液性状の経時的変化を比較評価し、血栓形成リスクの把握や種々の抗血栓治療剤を用いた際の薬剤効果評価することを目的とした。

1-1. 血液凝固検査と細胞基盤型凝固反応機序の概要

血液凝固系は組織障害が生じた際に、止血と組織修復などの生体防御機能を担っている。従来からの凝固系経路は 1960 年代よりカスケード仮説に基づくモデルが提唱され、広く受け入れられている (24, 25)。このモデルは、組織因子 (TF) と第Ⅶ因子により開始する外因系経路と第Ⅻ因子により開始される内因系経路、また両者が合流する共通経路からなり生理的な止血機能は外因系反応が担う (図 0-a)。この凝固カスケードは臨床検査で観察される凝固反応をよく反映しており、外因系経路の評価には PT、内因系経路には APTT、そして共通経路としては PT、APTT、Fibn が測定され、出血性素因の同定や抗血栓薬の薬効の評価に広く用いられている。獣医療においても、従来の血栓形成の評価法として、これら凝固因子に血小板機能の評価として血小板数や塗抹標本における大きさ・形の評価などを組み合わせることでスクリーニング検査として臨床現場において一般的に用いられている (15~19)。

上述した各種凝固系の項目は、凝固カスケード全体の一部における反応がどの程度生じているかを評価するためには有用であると考えられる。しかし、これらの評価は、試験管内での反応をつなぎ合わせたものにすぎない。実際の生体反応下での止血と出血は、多くの共通因子により制御されているため、凝固全体における相互反応を見る必要があることが指摘されていた。

近年、医療および獣医療において、これらを説明する有用な凝固反応モデルが提唱されている。これは凝固反応が TF を保持する細胞膜上で始まり、活性化血小板膜上でトロンビン生成が進行するという Hoffman らが提唱した細胞基盤型凝固反応機序 (The cell-based model of coagulation) である (26, 27)。この凝固反応では、開始期、増幅期、増大期の 3 相からなる凝固反応で説明されている。開始期では、第VII因子による微量のトロンビンの産生がきっかけとなり、その後、血小板や活性化凝固因子からなるテンナーゼ (Xase) を形成する。それにより、活性化血小板膜上でのプロトロンビナーゼ複合体を形成しトロンビンが形成される (増幅期)。それにより、Xase およびプロトロンビナーゼ複合体の形成が瞬時に繰り返され、ついには膨大なトロンビンが産生される (トロンビンバースト) (増大期)。その結果、フィブリノーゲンはフィブリンに変換され血栓が形成されるという機序である (図 0-b)。この機序では、血栓形成時には、血液の凝固成分全体が複雑に相互的に反応し合うという機序であり、これは本実験の測定に使用した、全血を用いて測定する T-TAS 検査の測定原理と合致するものと考えられる。つまり、凝固状態を評価するためには、従来の内因系や外因系の因子など個々の因子を測定するよりも、全血を用いた、血小板機能と凝固機能を合わせた総合的な評価が必要であると考えられ、T-TAS はこの機序を反映した検査機器であると考えられる。

本研究では、新しい検査機器である T-TAS を犬用に臨床応用させ、Afモデル犬の細動時の血液凝固機能の経時的变化を把握するとともに、種々の抗血栓治療剤を用いた際の薬剤効果を評価することを目的としている。

以上、目的を達成するために、本研究では以下の構成で研究を進めた。

第1章 健常対照群における T-TAS の応用

人医療における検査機器である T-TAS を、健常対照群である健常ビーグル犬を用いて、個体内差、個体間差、および採血後の静置時間の影響、健常犬における血栓形成時間の参考値を作成した。

第2章 高頻度心房刺激犬を用いた心房機能の評価

Af モデル犬である高頻度心房刺激犬に対して、心エコー検査を行うことにより、Af 開始 1, 2, 3 週間後における、被験動物の心房におけるうっ血と心房機能の継時的変化を検討した。

第3章 高頻度心房刺激犬を用いた血液凝固能の評価

1) - 慢性期 (Af 開始 1, 2, 3 週間後)における血液凝固能の評価 -

Af モデル犬である高頻度心房刺激犬を利用し、Af 開始 1, 2, 3 週間後における、被験動物の血液凝固性状の継時的変化を T-TAS を用いて検討した。

2) - 急性期 (Af 開始 30 分後)における血液凝固能の評価 -

Af モデル犬である高頻度心房刺激犬を利用し、急性期として Af 開始 30 分後における、被験動物の血液凝固性状の継時的変化を T-TAS を用いて検討した。

第4章 高頻度心房刺激犬を用いた抗血栓治療の評価

1) - 抗凝固薬 (ダルテパリン) による抗血栓治療の評価 -

第 3 章において、高頻度心房刺激によって心房内の血液凝固能が継時的に亢進することが明らかとなった。それを受けて、抗凝固薬であるダルテパリンが、高頻度心房刺激犬に対し、心房内および末梢血にどのように影響するかを検討した。

2) - 抗血小板薬 (クロピドグレル) による抗血栓治療の評価 -

第3章において、高頻度心房刺激によって心房内の血液凝固能が継時的に亢進することが明らかとなった。それを受けて、抗血小板薬であるクロピドグレルが、高頻度心房刺激犬に対し、心房内および末梢血にどのように影響するかを検討した。

2. 図表

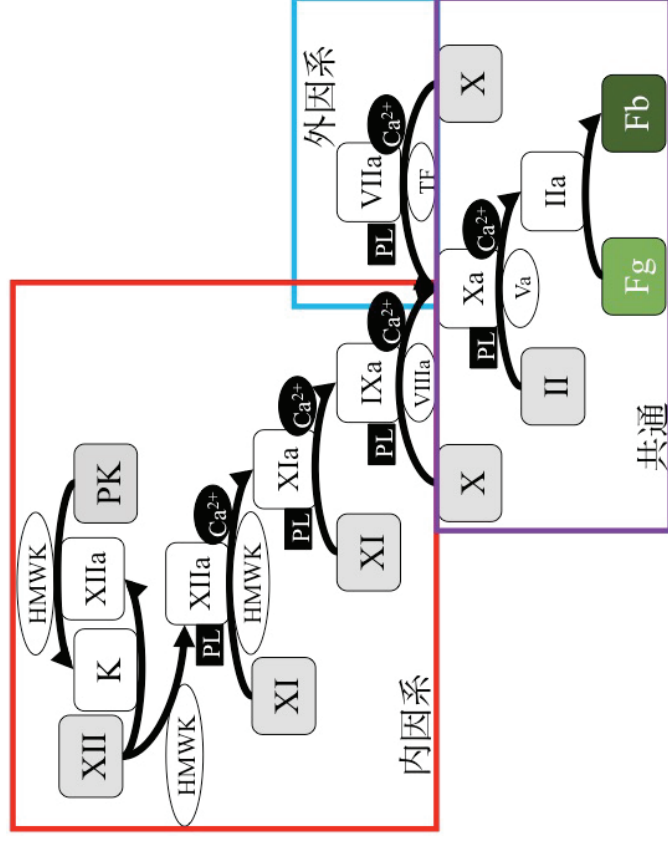


図0-a. 従来のフィブリン形成のカスケードモデル

Smith, S.A. (2009). J. Vet. Emerg. Crit. Care. 19, 3~10.より改変引用

このモデルは、凝固系を各々独立した経路（外因性および内因性）に分け、そのどちらの経路からでも第 Xa 因子の生成をもたらすことが可能なモデルである。共通経路は、トロンビンの生成および、その後のフィブリンノーゲンのフィブリンへの転換を生じ、強固なフィブリン塊が生成される。酵素および酵素複合体の活性化には多くのカルシウム (Ca^{2+}) を必要とし、膜表面 (PL) に結合することが必要である。

PK: プレカリクレイン、**HMWK:** 高分子キニノーゲン、**Fg:** フィブリンノーゲン、**Fb:** フィブリン、**PL:** 膜表面、 **Ca^{2+} :** カルシウム。

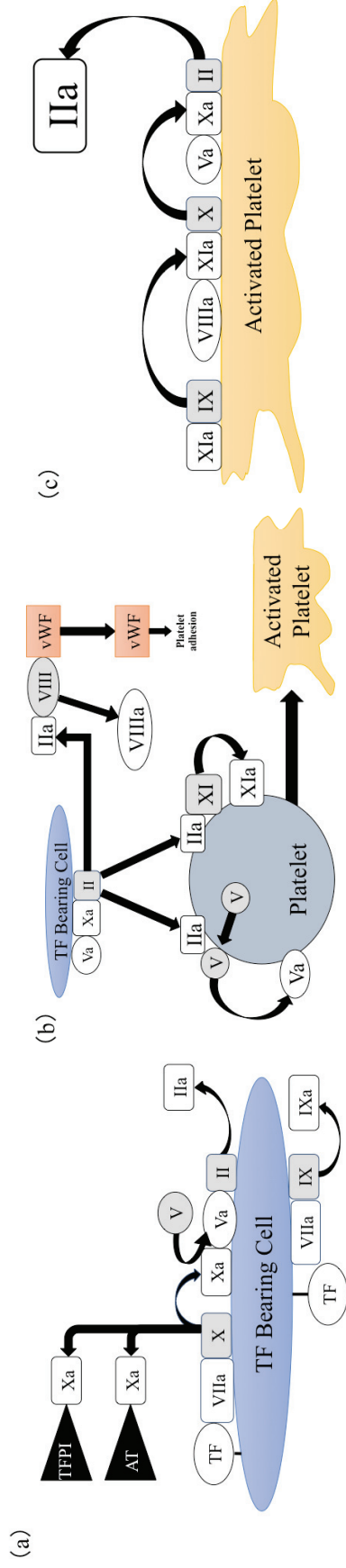


図 0-b. 細胞基盤型凝固反応機序 (The cell-based model of coagulation) Smith, S.A. (2009). J. Vet. Emerg. Crit. Care. 19, 3~10. より改変引用

この凝固反応では、(a) 開始期、(b) 増幅期、(c) 増大期の 3 相からなる凝固反応で説明されている。(a) 開始期。この段階では、血管内皮細胞や単球などに何らかの物理的・化学的凝固刺激が加わると、細胞表面に組織因子 (TF) が発現する。これに血流中の活性化凝固第VII因子 (VIIa 因子) が結合することにより、きわめて微量のトロンビンの放出が産生される。(b) 増幅期。開始期で産生された初期トロンビンは近傍の血小板や凝固因子を活性化し、フォンウィレブラント因子 (vWF) を放出し、活性化された Va、VIIIa および XIa の生成をもたらす。(c) 増大期。第 3 段階では、初期段階で生成された様々な酵素が、活性化血小板の凝固促進膜表面に集合したテンナーゼ (Xase) を形成し、血小板表面に Xa が生成される。Xa 因子も血小板膜のリン脂質上で Va とプロトロンビナーゼ複合体を形成する。この Xase およびプロトロンビナーゼ複合体の形成が瞬時に繰り返され、膨大なトロンビンが血小板上に直接産生される (トロンビンバースト)。

第1章 健常対照群における T-TAS の応用

1. 緒言

血栓形成過程は、血液中の血小板、凝固因子、線溶系因子およびそれらの抑制因子だけでなく、血流や血管壁の状態が複雑に作用し合って進行する極めて複合的な反応であると考えられている (26, 27)。血流下における血栓形成では、血小板膜表面の複数の受容体とコラーゲンが相互に作用し、その結果、産生、放出される液性アゴニストによる刺激によって血小板が活性化する。また、血流速度が速い高ずり応力の条件下においても血小板は活性化される (28)。活性化された血小板の膜表面では、連続した凝固因子による凝固反応の進行が引き起こされ、その結果、フィブリンを主体とした血栓が形成される (26, 27)。このように血栓形成に対し、凝固因子や線溶系因子および血小板は、相互に増幅あるいは制御し合いつつ複雑に関与している。血流はこれら血栓形成に関与する因子の活性に大きな影響を与えることが知られている (23)。

しかしながら、血小板機能および凝固検査は、非血流下において、非生理的濃度における単一の反応を測定するものであった。その中で、全血血栓形成観測システム (Total Thrombus-formation Analysis System : T-TAS) は、より生体内に近い血流下の条件下で血小板機能と凝固因子機能を測定する機器として医療用に開発され、注目されている。そして、今まで評価できなかった血栓形成能の評価が T-TAS では評価できる可能性も示唆されている (20~23)。

第1章では、この人医療に開発された検査機器である T-TAS を、犬に対して臨床利用できるか否かを、健常対照群として、健常ビーグル犬を用いて、個体内差、個体間差、および採血後の静置時間の影響などについて検討を行った。また、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参考値を作成した。なお、本実験は、鹿児島大学共同獣医学科の研究室と共に共同で実験を実施した。

2. 方法

2-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規定に準拠し遂行した。(承認番号: 第 27-39 号)

2-2. 供試動物

本研究に先立ち、身体検査、心臓超音波検査、完全血球計算、血液化学検査および心電図検査を行い、心臓に問題がないと診断した実験用ビーグル犬 16 頭を供試した。性別は雄および雌それぞれ 8 頭ずつ、年齢は 1~5 歳齢 (中央値: 2 歳齢)、体重は 9.0~12.5 kg (中央値: 10.8 kg) であった。食餌は成犬用健康維持食 (Eukanuba Adult maintenance: 株式会社アイムスジャパン、東京) を $1.8 \times [70 \times (\text{体重 kg})^{0.75}] \text{ kcal}$ となるように給餌し、飲水は自由飲水とした。

2-3. 検査項目

2-3-1. 同一個体における再現性の確認

健常対照群における健常犬の同一個体における再現性を見るため、6 頭の健常犬 (ビーグル種) の同一個体に対して 2~4 回の測定を行い、その変動係数 (CV) を測定し評価した。採血は 1 日目と 2 日目の 2 回にわたり実施した。

2-3-2. 採血後測定までの時間の影響の確認

健常犬 5 頭を使用し、それぞれの同一血液サンプルに対し、時間をおいて測定した際の数値変化について検討した。ヒトにおいては採血後 1~3 時間の間に測定を行うようにされており、本実験においても採血後 1~3 時間の間で測定値にどの程度の誤差が生じるかを評価した。

2-3-3. 個体間の再現性の評価と参考値の作成

健常対照群の健常犬における個体間の再現性の評価を行うと同時に T-TAS における 2 種類の専用チップである AR チップと PL チップにおける各々の参考値を作成した。PL の測定には、健常犬 16 頭を用いて計 48 回の測定を実施し、AR の測定には、健常犬 16 頭を用いて計 48 回の測定を実施した。これにより、健常犬における PL と AR の参考値を作成した。

2-4. 測定方法

2-4-1. 採血方法

前述の健常犬を使用し、頸静脈より 22 針を用いて採血したものをサンプルとした。T-TAS に使用した全血は、AR チップでは、全血 2.7 ml を 3.8%クエン酸採血管（3.8%クエン酸 0.3 ml）に分注したクエン酸抗凝固全血、PL チップでは、全血 3 ml をヒルジン採血管に分注したヒルジン抗凝固全血（ヒルジン濃度 15 $\mu\text{g/ml}$ ）をそれぞれ使用した。

2-4-2. T-TAS による測定

T-TAS は全血を用い、血流ストレス存在下で血栓形成を数値的・視覚的に評価する総合的検査システムである。T-TAS には 2 種類の専用マイクロチップ、AR チップと PL チップが存在する。AR チップは、凝固能および血小板機能を総合的に評価するチップであり、PL チップは、血小板機能を評価するチップである。AR チップには、豚の臍由来の Type I -A コラーゲン(Type I-A collagen)とウサギ由来のトロンボプラスチン(rabbit tissue Thromboplastin)がチップ内に塗布されている。このチップ内に流速 10 $\mu\text{l/min}$ 、シエアストレス 600 s^{-1} の速さで、クエン酸ナトリウム処理した全血にカルシウムイオンを添加した血液検体を流すことで、血小板と血液凝固能の相互作用により血栓形成が促進し、最終的にフィブリンに富む血小板からなる混合血栓が形成され、流路を閉塞し圧力が上昇する（図 1-a）。一方、PL チップには、コラーゲンのみが塗布されており、チ

チップ内に流速 18 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、シヤアストレス 1000 s^{-1} の速さでヒルジン処理（クエン酸塩なし）した全血を流すことで、血小板は、フィブリノーゲンやフォン・ヴィレブランド因子（vWF）を介した粘着と凝集により血小板に特有な血栓形成され、流路内を閉塞し圧力が上昇する（図 1-b）。これらチップ内の圧上昇を連続的に測定することで凝固状態を評価することができる（図 1-c, 図 1-d）（20～22）。

チップ内の内圧が基線より+10 kPa に到達した時点を開塞開始時間（Time to 10 kPa 以下 T_{10} ）、PL チップでは基線より+ 60 kPa、AR チップでは+ 80 kPa の時点を開塞時間（Occlusion Time 以下 OT）として、それらの時間および圧上昇曲線の下部領域面積（Area Under the flow pressure Curve 以下 AUC）を計測した。

2-5. 統計解析

測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。各時点における計測値が正規分布しているかどうかを確認するための正規確率プロットを作成し、シャピロ・ウィルク検定およびコルモゴロフ・スミルノフ検定を用いて、分布の正規性の検定を行った。

データが正規分布する場合は、母平均の差の検定を行い、Student t-test によって群内での比較を行った。正規分布しない場合には、母平均の差の検定を行い、Wilcoxon signed-rank test によって群内の比較を行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意であると判断した。

3. 結果

3-1. 同一個体における再現性の確認

図 1-e に健常犬における AR の OT の一例に示した。また、これら健常犬 16 頭における PL と AR の変動係数（CV）は、1.57～15.77%の範囲であった。特に、AUC での変動係数が低く（AR: 1.57%, 2.97%, PL: 6.45%, 6.97%）、信頼性が高いものと考えら

れた（表 1-a）。

3-2. 採血後測定までの時間の影響の確認

同一サンプルにおいて、採血後 2 時間および 3 時間後での測定では、それぞれの値において有意差は認められなかった。そのため、採血後の測定時間に関しては、3 時間以内であれば大きな影響はないこと（静置時間 1 時間は常に必要）が確認できた（表 1-b）。

3-3. 個体間の再現性の評価

個体間には差が認められたが、健常対照群の各犬における個体間の AR と PL の OT において大多数の犬において、180 秒から 360 秒の間であった（図 1-f）。また、T-TAS を犬に対する血管内の血流の流速下の条件に改良した後に、健常犬における血栓形成時間の参考値を作成した（表 1-c）。

4. 臨床応用

以上より、T-TAS 検査における血液検体の取り扱い方法や健常犬における参考値を得ることができた。これらの結果を受けて、臨床現場において血液凝固異常の症例に遭遇する機会があったため、臨床での T-TAS の応用が可能か否かを評価する目的として、T-TAS と PT、APTT、Fibn 等の凝固検査を用いて、その症例における血液凝固機能を測定した。以下に示す症例 1 は肝臓腫瘍病変の症例、症例 2 は採血時の止血異常を呈していた症例である。それぞれの症例に対し T-TAS を用いて測定した。

【臨床例 1】

雑種（ミニチュア・ダックスフンド × チワワ）、雄、10 歳齢。

【経過】近医にて血尿および超音波検査にて肝臓腫瘍が認められたため、精査を目的に東京農工大学動物医療センターに来院した。初診時の意識レベルは正常で、身体検査では凝固異常を疑う所見は認められなかった。

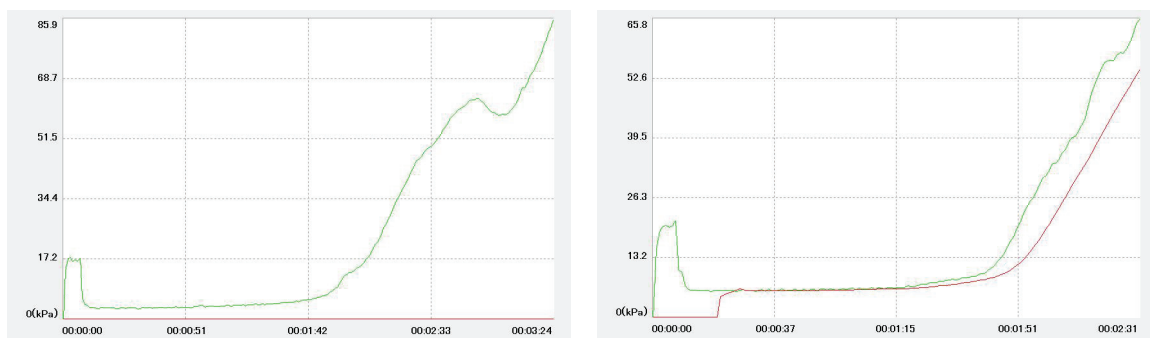
【画像検査】X 線検査では肝臓の腫大が認められ、超音波検査では肝臓の外側左葉に 10.3 cm×10.1 cm、外側右葉に 9.6 cm×14.9 cm の低エコー性の巨大な腫瘍が認められた。また、前立腺肥大も認められたため、血尿に関しては前立腺肥大が原因である可能性が疑われた。

【血液検査】全血球計算値、血液化学検査では特異的な異常所見は認められなかった。血液凝固検査（PT, APTT, Fibn）においても異常値は検出されなかった。

表. 凝固検査 () 内は参考値

PT	7.3	sec	(7.4-8.8)
	100	%	(>35%)
APTT	25.8	sec	(12.0-28.8)
Fibn	271	mg/dL	(150-350)

【T-TAS 検査 (左図: AR チップ、右図: PL チップ)】



AR: T₁₀ (121 sec)、OT (204 sec)、AUC (2199.4) と短縮傾向が、PL: T₁₀ (111 sec)、OT (151 sec)、AUC (480.4) と短縮が認められた。

【考察】本症例では、PT、APTT、Fibn 等の凝固検査では特異的な異常所見が認められ

なかったにも関わらず、T-TAS 検査（特に PL）におい参考値よりも短縮した値が認められた。本症例においては、肝臓腫瘍中の産生する因子による血管内皮細胞の障害や炎症細胞から産生される因子により、主に血小板が粘着・凝集することで、局所における血液凝固反応が亢進し血栓傾向に傾いたのではないかと考えられた。

【臨床例 2】

パピヨン、去勢雄、9 歳齢。

【経過】近医から尿道結石および精巣腫瘍の手術希望とのことで東京農工大学動物医療センターを紹介受診。また、甲状腺機能低下症のためチラーヂンを投与されていた。近医にて BUN、Cre の上昇が認められたため、点滴治療を行い腎数値の低下（BUN:37.1 mg/dl、Cre:1.2 mg/dl）を確認し紹介受診した。診察室での採血時には、止血異常が認められたため、各種凝固検査を実施した。

【血液検査】全血球計算値、血液化学検査および凝固検査は以下の通りであった。

表. 全血球計算値、血液化学検査

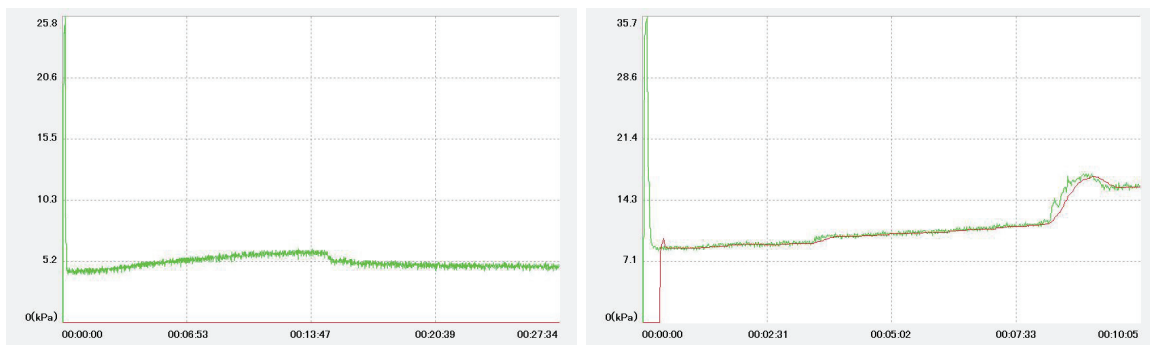
WBC	6700	/ μ L	ALB	2.0	g/dL
RBC	422	$10^4/\mu$ L	Glu	376	mg/dL
HGB	10.2	g/dl	GPT	145	U/L
Ht	29.1	%	ALP	398	U/L
MCV	69	fL	T-Bill	0.4	mg/dL
MCH	24.2	Pg	Na	146	mEq/L
MCHC	35.1	g/dL	K	5.0	mEq/L
PLT	13.0	$10^4/\mu$ L	Cl	114	mEq/L

表. 凝固検査 () 内は参考値

PT	7.2	sec	(7.4-8.8)
	100	%	(>35%)
APTT	13.2	sec	(12.0-28.8)
Fibn	459	mg/dL	(150-350)

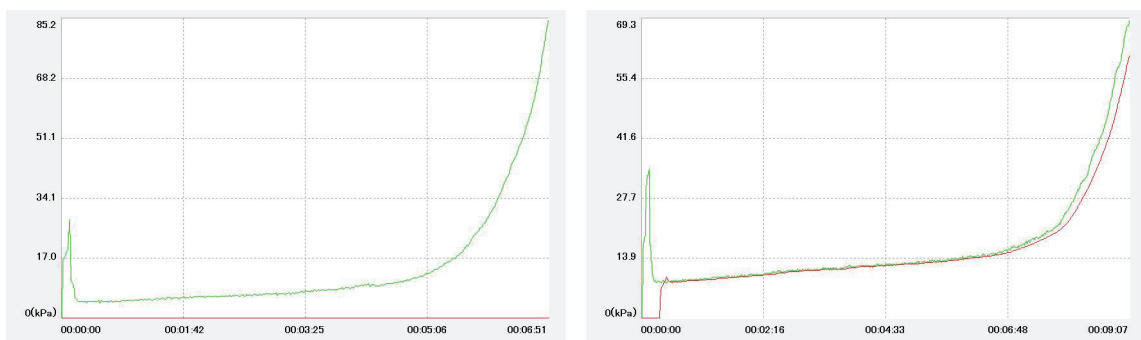
血液検査にて、(大球性大色素性)貧血および血小板減少症が認められたが、凝固検査では特異的な異常所見が認められなかった。本症例は、尿道結石および精巣腫瘍の手術予定であり、採血時に止血異常も認められたため、追加検査として T-TAS 検査を実施した。

【輸血前の T-TAS 検査 (左図: AR チップ、右図: PL チップ)】



T-TAS 検査において、AR: 測定不能 (延長)、PL:測定不能 (延長) と双方とも延長のため測定不能であった。延長した原因は特定できなかったが、手術の事前処置として供血犬から約 200ml の全血輸血を行った。

【輸血後の T-TAS 検査 (左図: AR チップ、右図: PL チップ)】



AR: T₁₀ (323 sec)、OT (381 sec)、AUC (1916.5) と延長が PL: T₁₀ (440 sec)、OT (547 sec)、AUC (131.9) と延長が認められたが、測定可能な範囲にまで改善した。

【考察】本症例では、輸血前の PT、APTT、Fibn 等の凝固検査では特異的な異常所見が認められなかったにも関わらず、T-TAS 検査において測定値限界以上の延長が認められ凝固不全が疑われた。本症例においては、出血時間 (BMBT) やフォン・ヴィレブランド因子 (vWF) 等を測定していないため、血液凝固・線溶系の異常を完全には除外できていない。また、輸血後の PL および AR では延長が認められたが、測定可能な範囲にまで改善していた。新鮮な全血輸血を行うことで、貧血の改善と同時に血小板および凝固因子の補填ができたことが T-TAS 検査を行うことで確認することが出来た。

5. 考察

本研究使用した T-TAS は、血流下における止血・血栓形成プロセスを数值的・視覚的な評価を可能にした総合的血栓止血検査システムである。T-TAS には 2 種類の専用マイクロチップ、AR チップと PL チップが存在する。

AR チップ内では、コーティングされたコラーゲンおよび組織因子によって、血小板の粘着・凝集反応と外因系凝固の活性化が同時に開始される。次いで、血小板と血液凝固の相互作用による活性化により血栓形成が促進され、最終的に活性化血小板とフィブリンを主成分とする混合白色血栓が形成される。血流下での白色血栓形成では、活性化凝固因子は常に血流による希釈を受け、血栓形成の場を離れると同時に、非活性化状態の凝固因子が常に血流によって血栓形成の場に補充される。ここでの凝固活性化の場は白色血栓の表層という面であり、血栓表面における凝固カスケードと血小板の活性化が白色血栓の二次元的・三次元的な成長を促す。そのため、活性化凝固因子が血流下における凝固反応において重要な役割を果たすと考えられる (20~23)。

一方、PL チップでは、測定開始後、血小板は即時にチップ内のコラーゲンに対して粘着および凝集反応を開始し、多数の小凝集塊を形成する。これら小凝集塊は崩壊と再形成を繰り返しながら徐々に成長し、最終的に強固な血小板血栓が形成されてチップ内のキャピラリーは閉塞に至る。この一連のプロセスは、ずり応力速度依存的に促進される。さらに圧力波形は小血小板血栓の質的・量的特徴をよく反映する。すなわち、圧上昇開始は血栓形成の開始や成長を反映するのに対し、最大圧力は、血小板血栓の強度や安定性を反映すると考えられている (20~23)。

今回、健常ビーグル犬を健常対照群として、T-TAS における、個体内差、個体間差、および採血後の静置時間の影響などについて検討を行った。その結果、同一個体内での PL と AR の変動係数は、1.57 - 15.77 % の範囲であり、特に、AUC での変動係数が低く (AR: 1.57 %, 2.97 %, PL: 6.45 %, 6.97 %) 信頼性が高いものと考えられた。また、採血後の静置時間の影響に関しては、採血後 3 時間以内であれば、測定値に影響は生じないことが判明した。各個体間における AR および PL の OT は、大多数の犬において 180

秒から 360 秒の間であり、16 頭から得られた T-TAS の AR と PL のそれぞれの参考値を導き出した。

また、今回、臨床現場で血液凝固に異常が生じると考えられる症例（症例 1 は肝臓腫瘍、症例 2 は採血時における止血異常）に遭遇したため、臨床応用が可能か否かを評価するため、これらの症例に対し T-TAS を測定した。症例 1 は、止血異常等の身体的な凝固異常は認められず、PT、APTT、Fibn の凝固検査においても特異的な異常所見が認められなかった。血栓傾向の症例では、稟告および身体検査などの外貌には、その異常所見を呈することは少なく、さらに、PT、APTT、Fibn の凝固検査では、血液凝固亢進状態の病態を捉えることが困難であるとされている。しかし本症例では、T-TAS の AR と PL において、短縮傾向、つまり血液凝固亢進を示唆する値の推移が認められた。これは、本症例において肝臓腫瘍の存在が認められたため、この腫瘍病変による血管内皮細胞の障害や炎症細胞から産生されるアデノシン二リン酸（ADP）や組織因子（TF）の放出により、血小板の凝集や凝固活性が亢進することで、局所における血液凝固反応が亢進し血栓傾向に傾いたのではないかと推察された。

症例 2 では、採血時に止血異常も認められたため、凝固検査を測定した。本症例では、フォン・ヴィレブランド因子（vWF）等を測定していないため、血液凝固・線溶系の異常を完全には除外できていないが、輸血前の T-TAS において、AR および PL 共に測定範囲を超えた重度の延長を示した。その後の輸血後の測定では、AR および PL の延長が認められたが、測定可能な範囲にまで改善していた。このことにより新鮮な全血輸血を行うことで、貧血の改善と同時に血小板と凝固因子の補填ができたことが T-TAS 検査を行うことで確認することが出来た。獣医領域において、血液凝固異常の症例、特に血栓傾向の症例では、その異常所見を各種検査で捉えることは難しいとされているが、本研究で使用した T-TAS 検査で、その異常を捉えられたことは、臨床現場における T-TAS の有用性を示す有意義なものであったと考えられる。以上より、T-TAS は、犬においても利用可能であると結論付けた。

6. 小括

健常対照群における健常犬 16 頭を用いた T-TAS 検査を実施し、個体内差、個体間差、および採血後の静置時間の影響などについて検討を行った。その結果、同一個体内での PL と AR の変動係数 (CV) は低く、信頼性が高いものと考えられた。また、採血後の静置時間の影響に関しては、差採血後 3 時間以内であれば、測定値に影響は生じないことが判明した。各個体間における AR および PL の OT は、大多数の犬において 180 秒から 360 秒の間であり、16 頭から得られた T-TAS の AR と PL のそれぞれの参考値を導き出した。

血液凝固の異常を疑う臨床犬において、T-TAS を測定した結果、症例 1 では、身体検査や凝固検査で捉えられなかった血栓傾向を、T-TAS で捉えることが可能であった。症例 2 では凝固因子と血小板が減少している症例であり、全血輸血を行うことで、それら因子が補填されたことを、T-TAS を行うことで評価、確認することができた。ことから、T-TAS は、臨床犬においても利用可能であると結論付けた。

7. 図表

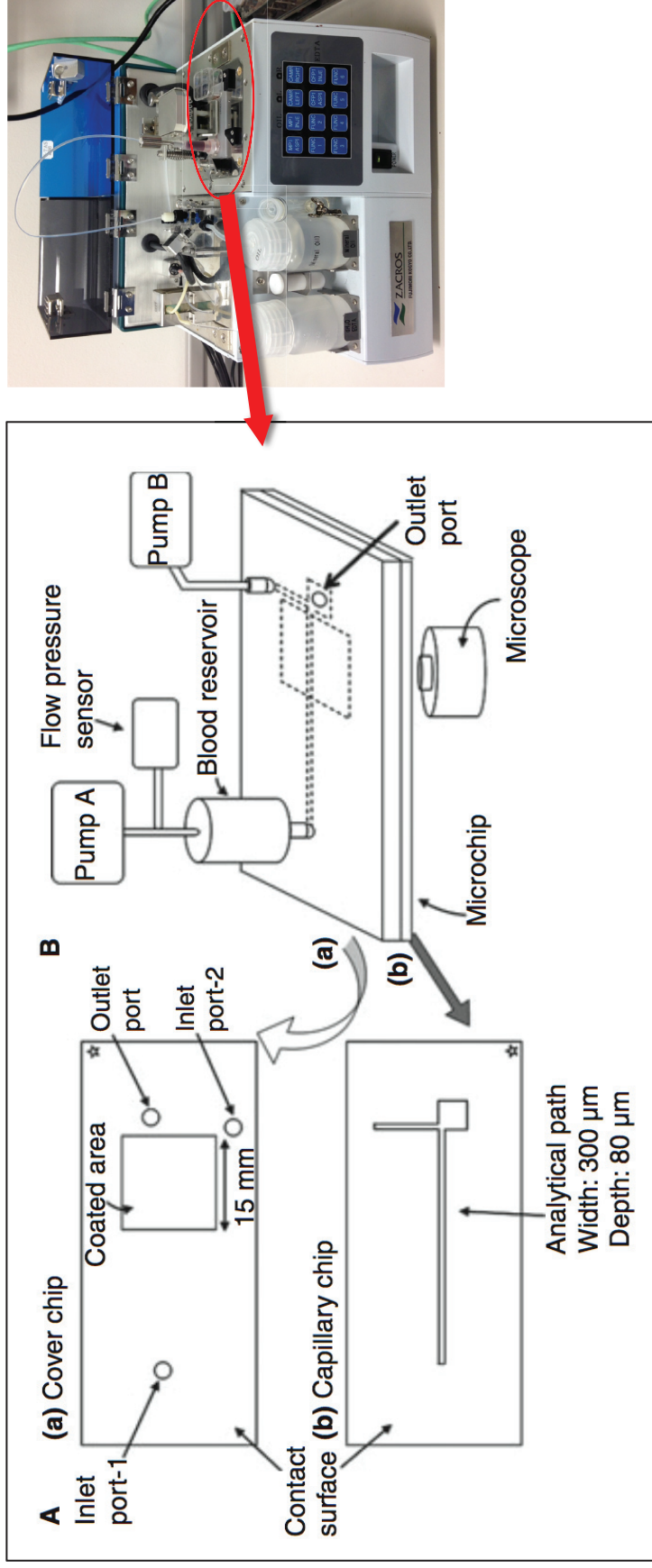


図 1-a. T-TAS の模式図 (AR chip)

A) AR チップでは、チップ内にコラーゲンと組織因子が塗布されている(a)。このチップ内に全血を流すことで、血小板と血液凝固能の相互作用により血栓形成が促進し、最終的にフィブリンに富む血小板からなる混合血栓が形成され、流路を閉塞し圧力が上昇する (b)。

B) チップ内における血栓形成プロセスは、マイクロスコブによってリアルタイムに可視化されると共に、チップ内の圧力変化の連続的測定により得られる圧力波形によって解析することが可能である。 Hosokawa, K. (2012). *Microvasc. Res.* 83, 154～161.より 改変引用

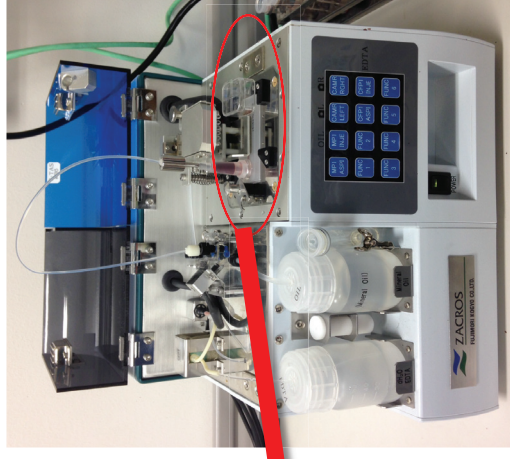
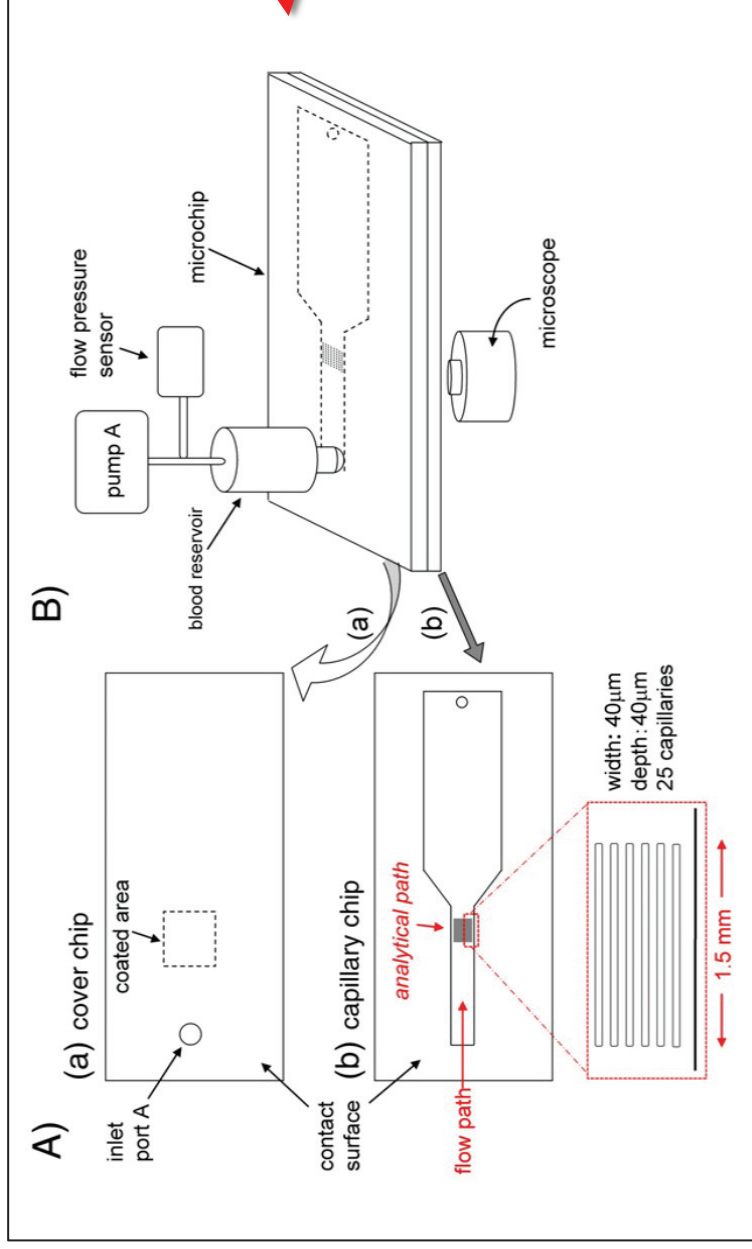


図 1-b. T-TAS の模式図 (PL chip)

A) PL チップでは、チップ内にコラーゲンが塗布されている(a)。このチップ内に全血を流すことで、血小板の凝集により血栓形成が促進し、最終的に血小板に特有の血小板血栓が形成され、流路を閉塞し圧力が上昇する (b)。B) チップ内における血栓形成プロセスは、マイクロチップによってリアルタイムに可視化されると共に、チップ内の圧力変化の連続的測定により得られる圧力波形によって解析することが解析することが可能である。 Hosokawa, K. (2012). *Microvasc. Res.* 83, 154~161. より改変引用

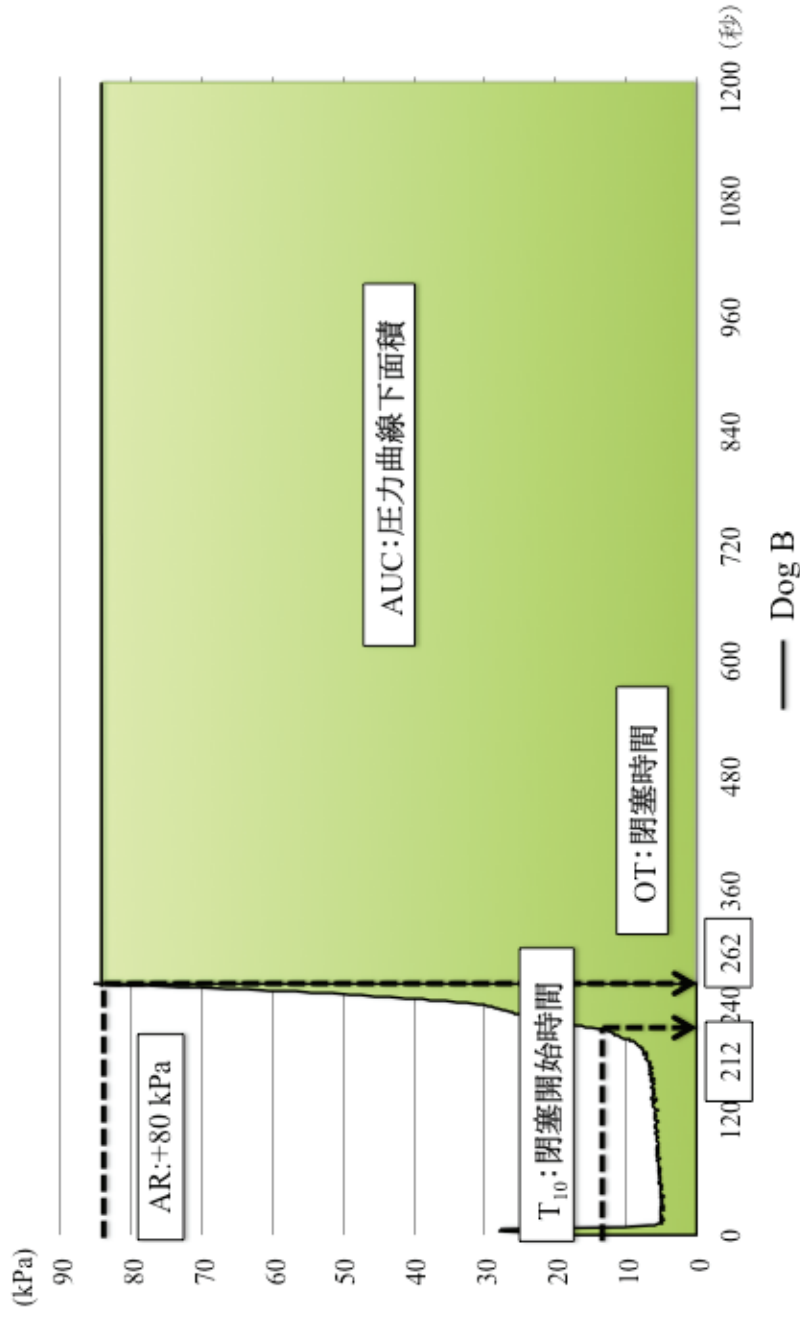


図 1-c. T-TAS 検査における圧上昇曲線図 (心房血をサンプルとした AR の 1 例)
 AR チップは血小板と凝固機能を評価するチップであり、内圧が+10 kPa に到達した時点を閉塞開始時間 (T_{10})、+80 kPa の時点を閉塞時間 (OT) として、測定開始から 20 分までの圧上昇曲線の下部領域面積 (AUC) を計測した。
 T_{10} : 閉塞開始時間、OT : +80 kPa の時点を閉塞時間、AUC : 圧上昇曲線の下部領域面積。本図では T_{10} が 172 秒、OT が 252 秒として示されている。

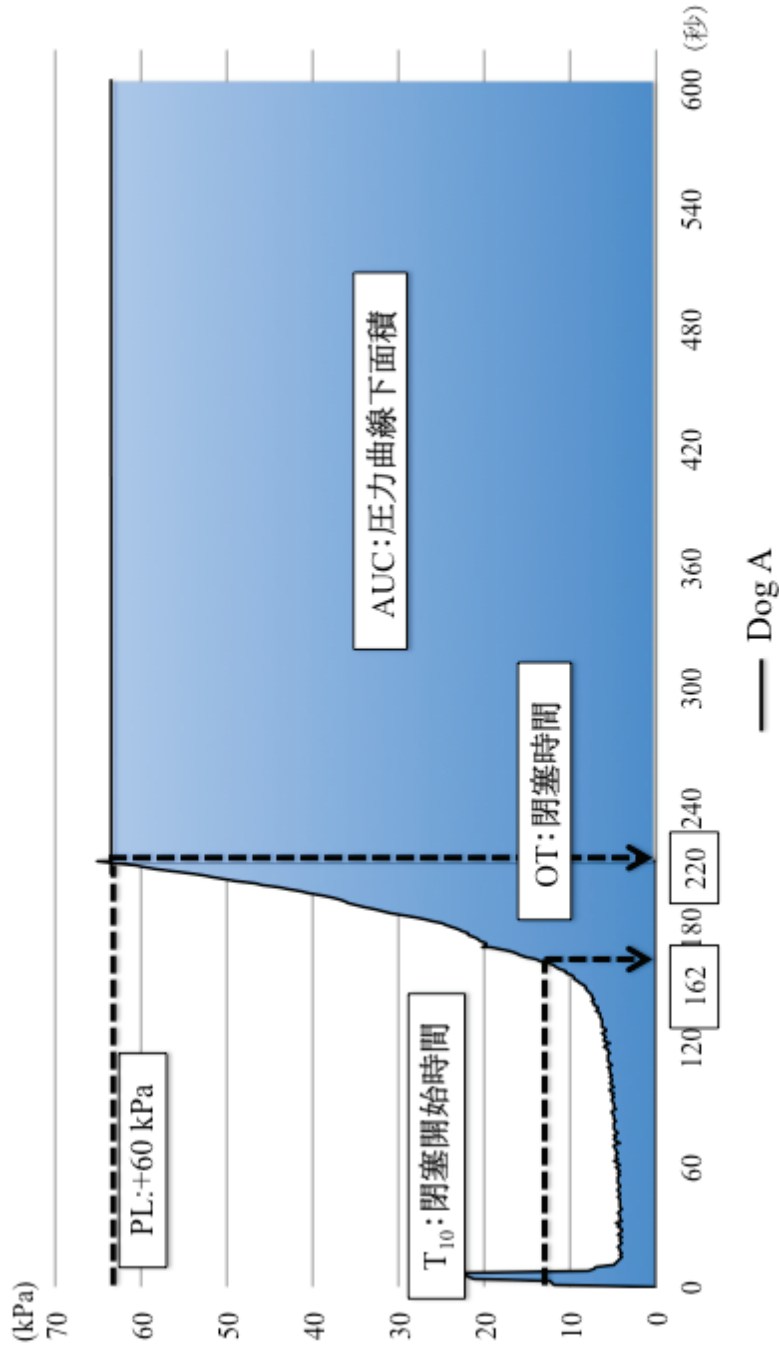
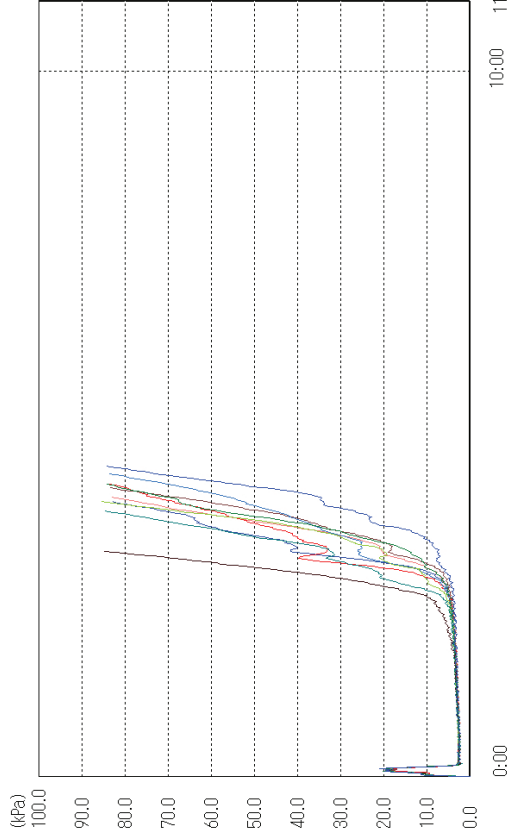


図 1-d. T-TAS 検査における圧上昇曲線図 (心房血をサンプルとした PL の 1 例)
 PL チップは血小板機能を評価するチップであり、内圧が+10 kPa に到達した時点を閉塞開始時間 (T₁₀)、+60 kPa の時点を閉塞時間 (OT) として、測定開始から 10 分までの圧上昇曲線の下部領域面積 (AUC) を計測した。
 T₁₀: 閉塞開始時間、OT: +60kPa の時点を閉塞時間、AUC: 圧上昇曲線の下部領域面積。本図では T₁₀ が 162 秒、OT が 220 秒として示されている。



変動係数 (CV)		1 日目	2 日目
AR	T ₁₀ (%)	10.01	15.77
	OT (%)	7.65	10.75
	AUC (%)	1.57	2.97
PL	T ₁₀ (%)	8.69	11.63
	OT (%)	13.58	11.91
	AUC (%)	6.45	6.97

左図 1-e. 健康犬における AR の OT の一例

右表 1-a. 健康犬における 1 日目と 2 日目での AR と PL の変動係数 (CV) (n=16) 健康犬における PL と AR の変動係数 (CV) は、1.57 - 15.77 % の範囲であった。特に、AUC での変動係数が低いことが示された (AR: 1.57 %, 2.97 %, PL: 6.45 %, 6.97 %)。

T₁₀:閉塞開始時間、OT:閉塞時間、AUC: 圧上昇曲線の下部領域面積、PL: 血小板機能を評価するチップ、AR: 血小板と凝固機能を評価するチップ。

	測定までの時間	T ₁₀ (sec)	OT(sec)	AUC
	全体	172.2±26.4	244.2±42.0	2130.05±42.09
AR	1～2 時間	168.0±23.4	246.0±52.8	2132.30±45.28
	2～3 時間	171.0±24.0	241.8±28.8	2131.48±33.13
	全体	135.6±48.6	283.8±72.6	406.77±54.36
PL	1～2 時間	146.4±47.4	296.4±67.8	395.91±55.12
	2～3 時間	111.6±40.8	254.4±75.0	431.73±43.23

表 1-b. 採血後 1 時間から 3 時間までの T-TAS 値の変化 (n=16)
 採血後 1～3 時間の間までの 1 時間毎の T₁₀、OT、AUC の値。各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。採血後 1 時間と採血後 3 時間までの測定値では値の誤差は少なく影響がないことが示された。

T₁₀:閉塞開始時間、OT:閉塞時間、AUC: 圧上昇曲線の下部領域面積、PL: 血小板機能を評価するチップ, AR: 血小板と凝固機能を評価するチップ

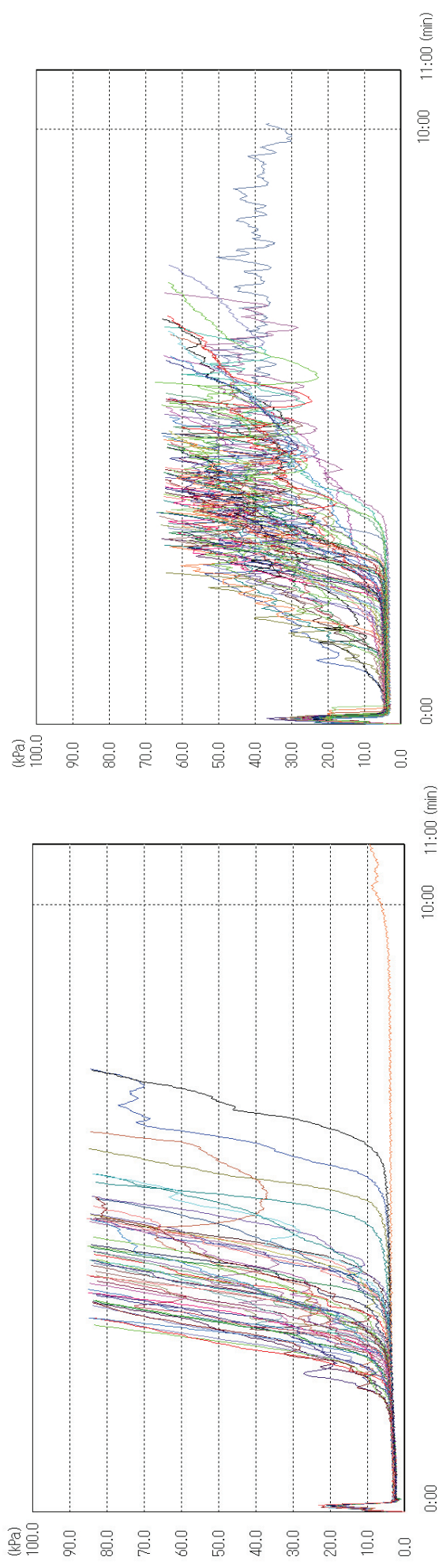


図 1-f. 健常対照群の各犬における個体間の再現性 (左図:AR チップ、右図:PL チップ)
 個体間には一部、測定値 (OT) に差が認められた個体も存在したが、大多数の犬において AR および PL の OT は、180 秒から 360 秒の間であった (健常犬 16 例での個体差の例)。

OT: 閉塞時間、PL: 血小板機能を評価するチップ, AR: 血小板と凝固機能を評価するチップ。

	AR	PL
T ₁₀ (sec)	183.8±39.8	167.6±51.7
OT(sec)	250.1±49.2	269.0±46.6
AUC	2125.8±50.3	395.8±45.5

表 1-c 健常犬における T-TAS の参考値 (n=16)

健常対照群として、健常犬における T-TAS の参考値を求めた。各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

T₁₀: 閉塞開始時間、OT: 閉塞時間の下部領域面積、PL: 血小板機能を評価するチップ, AR: 血小板と凝固機能を評価するチップ。

第2章 高頻度心房刺激犬を用いた心房機能の評価

1. 緒言

人医療において、心房細動 (Af) 時には、左房内に生じた血栓が脳に塞栓することにより脳梗塞を引き起こされることが知られている。血栓症の発症要因である Virchow の 3 要因、すなわち 1) 血流の変化、2) 血管壁の性状変化、および 3) 血液成分の変化が従来から提唱されている (30-32)。医学での Af 発現時には、これら Virchow の 3 要因のうち、主にうっ血と血液性状の変化が大きく関与していると考えられている (33)。これは、心房が細動状態に陥ると、心房の収縮機能の減弱および消失が生じ、さらに細動が継続することで心房が拡大し、血流のうっ滞が生じることが原因であると考えられている (34~36)。

心房機能には、肺静脈からの血液を受け取るリザーバー機能、心室へ受動的に流入させる導管機能、心室へと能動的に拍出するブースター機能の 3 つの機能が存在する (37, 38)。Af 発現時の血行動態に影響するものとしては、心房ブースター機能が重要である (38~41)。Af 発現中は、心房筋の数カ所において、収縮と弛緩が同時に行われる。そのため、心房筋全体の協調的収縮は失われ、心房の能動的な拍出機能の欠如が生じ、心不全を引き起こされる (33, 35, 36)。

一方、心エコー検査における組織ドプラ法 (TDI) では、選択した心筋領域の心筋速度が得られ、収縮期と拡張期の心筋の動きを描出できる。TDI では、拡張早期運動速度 (e')、拡張末期運動速度 (a') などが評価可能である。特に a' は、拡張後期において左房内血流が左室へ流入し、左室容積の拡大に伴い僧帽弁輪部が心基底方向へ移動する時の波形であるとされている (42~45)。そのため、心房の協調的収縮のない Af 時には a' は記録されないとされている。しかし、Af が生じている症例において a' 様波形が時折認められることがあり、その波形に関する詳細な説明を論じた報告は認められない。そのため、Af 時における a' 様波形の出現に関しては、未だに議論の余地がある。

第 3 章の研究では、Af モデルである高頻度心房刺激犬に対して、心エコー検査を使用し、Af 時の心房機能や心房鬱血の評価、および心房運動性に関して検討を行うことを目的とした。

2. 方法

2-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規定に準拠し遂行した。(承認番号：第 27-39 号)

2-2. 供試動物

本研究に先立ち、身体検査、心臓超音波検査、完全血球計算、血液化学検査および心電図検査を行い、心臓に問題がないと診断した実験用ビーグル犬 8 頭を供試した。性別は雄および雌それぞれ 4 頭ずつ、年齢は 1~5 歳齢 (中央値： 2 歳齢)、体重は 9.0~12.5 kg (中央値： 10.8 kg) であった。食餌は成犬用健康維持食 (Eukanuba Adult maintenance：株式会社アイムスジャパン、東京) を $1.8 \times [70 \times (\text{体重 kg})^{0.75}] \text{ kcal}$ となるように給餌し、飲水は自由飲水とした。

2-3. Af モデル犬の作成

前述のビーグル犬 8 頭に全身麻酔下で心外膜ペースメーカーリードを埋め込んだ。麻酔前投与薬として、硫酸アトロピン 0.05 mg/kg S.C、酒石酸ブトルファノール 0.2 mg/kg I.V、ミダゾラム 0.2 mg/kg I.V、メロキシカム 0.2 mg/kg S.C を投与した後に、プロポフォル 6 mg/kg I.V で導入し、イソフルランで麻酔維持を行った。右側横臥位にて保定し、左側第 4 肋間部開胸にて、左心房にアプローチし、心外膜ペースメーカーリード (心房刺激電極：ユニークメディカル、東京) (図 2-a) を 5-0 のポリプロピレン製非吸収性モノフィラメント縫合糸 (5-0 PROLENE：ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社、東京) で左心耳に縫合し固定した。その後、常法通りに閉胸し、リードは皮下を通し、背部から体外へ誘導した。ペースメーカーリードを体外式刺激装置 (EV4543 pacemaker：PACE Medical, Inc WALTHAM, MA U.S.A) に接続し (図 2-b)、2 mV、390 bpm にて高頻度心房刺激を行い、これを Af モデルとした (図 2-c, 2-d)。

2-4. 実験プロトコール

手術の影響を考慮して 10 日間の術後療養期間を設けた。その際、適切な抗生剤および鎮痛剤を投与した。その後、心房高頻度刺激前 (Pre)、刺激開始 1 週間後 (1w)、2 週間後 (2w) および 3 週間後 (3w) の各時点において下記的手法によって、心臓超音波検査を実施した。心臓超音波検査の測定は、各時点において、Af 発現時、または体外式ペースメーカーによる刺激を一度停止してから 30 分経過後に行った (図 2-e)。

2-5. 検査

2-5-1. 心臓超音波診断装置

超音波診断装置 (LOGIQ7 : GE ヘルスケアジャパン、東京) を使用し、また探触子には胸部用セクタプローブ・7S (可変周波数域 : 3.1~8.0MHz) を使用した。

2-5-2. Af が発現時における a' 様波形ならびに A 波様波形

左傍胸骨心尖部四腔断面において、組織ドプラモードを用いて、Af 発生時および Af 停止 30 分後の心房筋および心室筋の 8 か所におけるそれぞれの拡張早期最大速度 (e')、心房収縮期最大速度 (a') を計測し、心房筋と心室筋の運動の関連性を評価した。また、左傍胸骨心尖部四腔断面により僧房弁口部を描出し、Af 発生時における早期流入波 (E 波) と心房収縮波 (A 波) の発生の有無の確認を行った (図 2-f, 図 2-g)。

2-5-3. 左心房および左心室の評価

右傍胸骨左室短軸断面心基部レベルを描出し、左心房径 (LA)、大動脈径 (Ao) および左心房径と大動脈径の比 (LA/Ao) を計測した (図 2-h)。

右傍胸骨左室短軸断面腱索レベルを描出し、M モードを用いて、拡張末期心室中隔壁厚 (IVSd)、拡張末期左心室内径 (LVIDd)、拡張末期左心室自由壁厚 (LVPWd)、収縮末期左心室中隔壁厚 (IVSs)、収縮末期左心室内径 (LVIDs) 収縮末期左心室自由壁厚

(LVPWs)および左心室内径短縮率(FS)を計測した。FSは、「 $(LVIDd - LVIDs) / LVIDd \times 100\%$ 」の計算式により算出した(図2-i)。

また、心拍出量を評価するために左傍胸骨左室流出路断面像において、パルスドプラモードを用いて、左室における一回拍出量(SV)を測定し、SVと心拍数(HR)との積により心拍出量(CO)を求めた。加えて、大動脈弁口部最大流速(PFVLV)と大動脈弁口部血流波形から求めた前駆出時間/駆出時間(LV-PEP/ET)を計測した(図2-j)。

$$LV-CO (L/min) = LV-SV (mL) \times HR (回/min)$$

また、左傍胸骨心尖部四腔断面により僧房弁口部を描出し、左室流入波形を構成する早期流入波(E波)と心房収縮波(A波)の波高およびE波とA波の比(E/A)を算出した(図2-g)。

2-5-4. 左心房機能の評価

右傍胸骨左室短軸断面心基部レベルのLA/Aoの断面像において、最大左房径(LAmax)と最小左房径(LAmin)、心電図上でのP波における左房径(LAp)を測定し記録した(図2-k)。これらの各値を用いて、以下に示す数式を用いて、左房機能であるTotal LA emptying fraction (FT LA, %)、Passive LA emptying fraction (FRE LA, %)、Active LA emptying fraction (FAE LA, %)を求めた。

$$\text{Total LA emptying fraction (FT LA, \%)} : [LA \text{ max} - LA \text{ min} / LA \text{ max}]$$

$$\text{Passive LA emptying fraction (FRE LA, \%)} [LA \text{ max} - LA \text{ p} / LA \text{ max}]$$

$$\text{Active LA emptying fraction (FAE LA, \%)} [LA \text{ p} - LA \text{ min} / LA \text{ p}]$$

2-5-5. 組織ドプラ機能を用いた評価

左傍胸骨心尖部四腔断面において、組織ドプラモードを用いて、心房筋の8か所において、拡張早期最大速度(e')、心房収縮期最大速度(a')を継時的に計測した。なお、上記の心臓超音波検査の各項目の計測値は、連続した9心拍を計測し、その平均値をもって計測値をした(図2-l)。

2-5-6. 統計処理

データが正規分布する場合は、One-way ANOVA を行い、Dunnet test によって多重比較を行った。正規分布しない場合には、Freedman's test を行い、Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction によって多重比較を行った。p<0.05 を統計学的有意とした。

3. 結果

3-1. 左心房および左心室の評価

心房筋と心室筋の連動の関連性を見た組織ドプラ検査においては、心房筋と心室筋の 8 か所全ての箇所において、Pre と比較して 1w、2w、3w のいずれの測定時点においても、刺激中の心エコー検査の TDI 所見上において、A 波様波形や僧帽弁弁輪速度 a'様の波形が連続的に記録された。また、その a'は、心房と心室が同期的に運動していた（図 2-m, 図 2-n）。

3-2. 左心房および左心室の評価

刺激停止 30 分後の Ao は、1w、2w、3w のいずれにおいても刺激前と比較して有意な変化は認められなかった。LA に関しては、Pre と比較して、3w において有意に増加した (p<0.05)。また、LA/AO に関しては、Pre と比較して、2w、3w において有意に増加した (p<0.05) (図 2-o) (表 2-a)。FS および LV-CO は Pre と比較して、1w、2w において減少傾向があり、3w において有意に減少した (p<0.05) (p<0.01) (図 2-p, 図 2-q) (表 2-b, 表 2-c)。

LV-PEP/ET では、Pre と比較して、1w、2w、3w においてそれぞれ有意な増加がみられた (p<0.01) (表 2-c)。

A 波は、Pre と比較して、1w、2w、3w において有意な減少がみられた (p<0.05) (p<0.01)

(図 2-r) (表 2-d)。

3-2. 左心房機能の評価

LA passive EF は、Pre と比較して有意な変化は認められなかった。LA total EF ならびに LA active EF は、Pre と比較して 1w、2w、3w のいずれの時点においても有意な減少が認められた。(p<0.01) (図 2-s~図 2-u) (表 2-e)。

3-3. 組織ドプラ機能を用いた評価

心房筋における 8 箇所組織ドプラモードでは、8 箇所全ての心房領域の a'において、Pre と比較し有意な減少がみられた (p<0.05) (p<0.01)。e'に関しては、心房領域の⑥において、Pre と比較し、2w、3w において、有意な減少がみられた (p<0.05)。特に、元々心房の動きが大きい①、③、⑥、⑦、⑧の a'では、Pre と比較して、1 w、2 w、3 w において有意な減少がみられた (p<0.01) (表 2-f)。

また、今回の実験では 1 頭においてのみ心臓超音波検査上で心腔内の血栓およびもやもやエコー (Spontaneous Echo Contrast) の存在を示唆するような所見が得られた。

4. 考察

心房細動 (Af) は、医学ならびに獣医学において孤立性あるいは重度心不全に伴って二次性に発生する臨床的に重要な頻脈性不整脈の一つである (19, 20, 46, 47)。Af の原因としては、薬物 (ジギタリス中毒、麻酔薬など)、低酸素症、心不全など様々であるが、多くは心房拡大や心房腫瘍に起因する (46~48)。獣医療においては、慢性弁膜症、心房中隔欠損症、僧帽弁狭窄症、拡張型心筋症などで認められる (49~52)。また、心臓に器質的な異常が生じていない場合でも発生することがある。例えば、超大型犬などのように解剖学的に心房が大きい場合は、多数のリントリー回路が形成され、Af が生じる (孤立性心房細動)。また、人では心房筋が肺静脈に迷入することで Af が引き起こされる可能性がある (53)。Af の診断は、心電図により行われ、P 波の消失、R-R 間隔の絶対不整、心房細動波 (f 波) の出現といった所見が見受けられる (46, 47, 54, 55)。

通常、心臓は洞結節から発生した規則的な電氣的興奮に対して心房と心室が協調して収縮運動を行う。しかし、Af 時には、心房内の各所から異常な電氣的刺激が 300~600 bpm もの高頻度に発生し、心房の電氣的興奮は迅速かつ無秩序になる。それらの電氣的興奮の一部が無秩序に房室結節に到達するため、心房と心室の収縮の同期性が失われ、180~250 bpm ほどの心室拍動数となる (3~5)。これにより心拍出量が正常時の約 20~30% に低下する。また、拡張能の低下した肥大心の病態においては、容易に心拍出量の減少と平均左房圧の上昇を招き、心不全を引き起こす (46, 56, 57)。本研究においても、Af 発現 3 週後において、収縮能の指標である FS および左心室における心拍出量 (CO) が Af 発現 3 週後において有意に低下した。さらに、頻脈性心房細動が誘発されると、心房筋に早期から電気生理学的・機械的な変化を生じ、これは心房リモデリングと呼ばれている。

人の Af 発現時において、左房機能の指標である LA total EF ならびに LA active EF の低下が左房容積から独立した心房細動低下の評価として重要であることを報告している (40, 41)。犬および猫においても、うっ血性心不全時において左房機能の指標である LA active EF が有意に低下することを報告している (58, 59)。本研究においても、LA

total EF ならびに LA active EF が刺激 1 週目から有意に低下していたため、心房細動 1 週目より左房収縮機能の低下が起これ、その後も継時的に機能の低下が生じることが示唆された。

また、本研究の組織ドプラ検査において、心房筋の 8 か所中全ての箇所において僧帽弁弁輪速度 a' の低下が確認された。 a' は心房収縮時の心房の縦方向の動きを計測した値であり、継時的に a' が有意に低下したことは、心房のブースター機能が減弱していくことを示唆している (43~45)。また、心房の各セクションの運動性の評価では、刺激を加えていない右心房側でも低下が認められたことから、左房刺激による Af 時には、右心房においても刺激の伝導が認められることが示唆された。

Af 時には、異所性自動能が亢進するため、新たな不整脈源が生じたり、心筋細胞の障害が引き起こされたりすることにより、心房機能の消失や心筋の収縮能の低下、続発する房室弁逆流などが引き起こされることが知られている。この結果、心房が拡大し通常の 2~3 倍もの血流の鬱滞が生じると考えられている (38, 60, 61)。実際に、本研究においても、うっ血の指標とされている LA ならびに LA/Ao は、刺激 2 週目以降において有意に増加した ($p < 0.05$)。以上のことから、Af 時には、心房筋の収縮能の低下や心房拡大が生じ、継時的に心房拡大が進行していくことが分かった。このことは、血栓症の発症要因である Virchow の 3 要因のうちの一つ、血流の変化、すなわち、うっ血に大きく寄与している可能性が示唆された。

Af 時における左室機能障害による収縮能の低下は、左室拡張末期圧の上昇や左室の運動性である τ の減少を引き起こし、加えて、左房圧の上昇や心房の有効な収縮能の低下により、A 波は消失することが知られている (62)。また、それに伴い心房の協調的収縮のない Af 時には、拡張後期における左室容積の拡大に伴い僧帽弁弁輪部が心基部方向へ移動する時の波形である a' は記録されないとされている。そのため、当初、我々は、心房の協調的収縮のない Af 時には a' ならびに A 波様波形は記録されないと考えていたが、刺激後の 1w、2w そして 3w いずれの時点においても、TDI 所見上に a' 様波形ならびに A 波様波形が記録された。また、Af 発現時の心房筋と心室筋の 8 か所

全ての箇所において、僧帽弁弁輪速度 a' において、心房と心室が同期的に運動していることが示唆された。この理由として、左房の能動的収縮が消失する細動状態であっても、左室コンプライアンスがある程度残存しているため、拡張期において、心房筋が心室筋に引っ張られることによって、受動的に心房の収縮能である a' が認められたと考えられた。

以上より、本研究で用いた高頻度心房刺激モデル犬は、心房細動を誘発させることが可能であること、また、Af 開始後の心房収縮機能の低下によって、血栓症の発症要因である Virchow の 3 要因のうちの一つである血流の変化、すなわち心房内におけるうっ血が生じることが確認できた。以下の章においては、この Af モデル犬を用いて心房血および末梢血における血液性状の変化を捉えることとした。

5. 小括

Af時には、心房の協調的な収縮が失われる結果、組織ドプラ法（TDI）における a' および A 波様波形は記録されないとされているが、本研究では、Af 発現時の心房筋と心室筋の 8 か所全ての箇所において、 a' が認められ、心房筋と心室筋が同期的に運動していることが示唆された。この理由として、左房の能動的収縮が消失する細動状態であっても、左室コンプライアンスがある程度残存しているため、拡張期において、心房筋が心室筋に引っ張られることによって、受動的に、心房の収縮能である a' が認められるものと推察した。

また、心房のブースター機能である LA active EF が刺激 1 週目から有意に低下し、その後も継時的に低下していた。また、拡張末期僧帽弁弁輪速度 a' の低下も 1 週目から確認された。このことから、過去の報告と同様に Af 発症時には、心房筋が細動を起こし、Af 発症 1 週目より左房収縮機能の低下が起こり、その後も継時的に機能の低下が生じることが明らかになった。また、Af 発症 2 週目より LA/Ao が有意に増加したことから、心房の拡大が認められ、血液が心房内に滞留し易くなるということが明らかとなった。

以上のことから、本研究で使用した高頻度心房刺激モデル犬では、心房細動を誘発させることが可能であること、また、Af 開始後の心房収縮機能の低下によって心房内に血液のうっ滞が生じることにより、血栓形成の発症要因の Virchow の 3 要因の一つである血流の変化（うっ血）が引き起こされることを確認できた。以下の章においては、この Af モデル犬を用いて心房血および末梢血における血液性状の変化を捉えることとした。

6. 図表

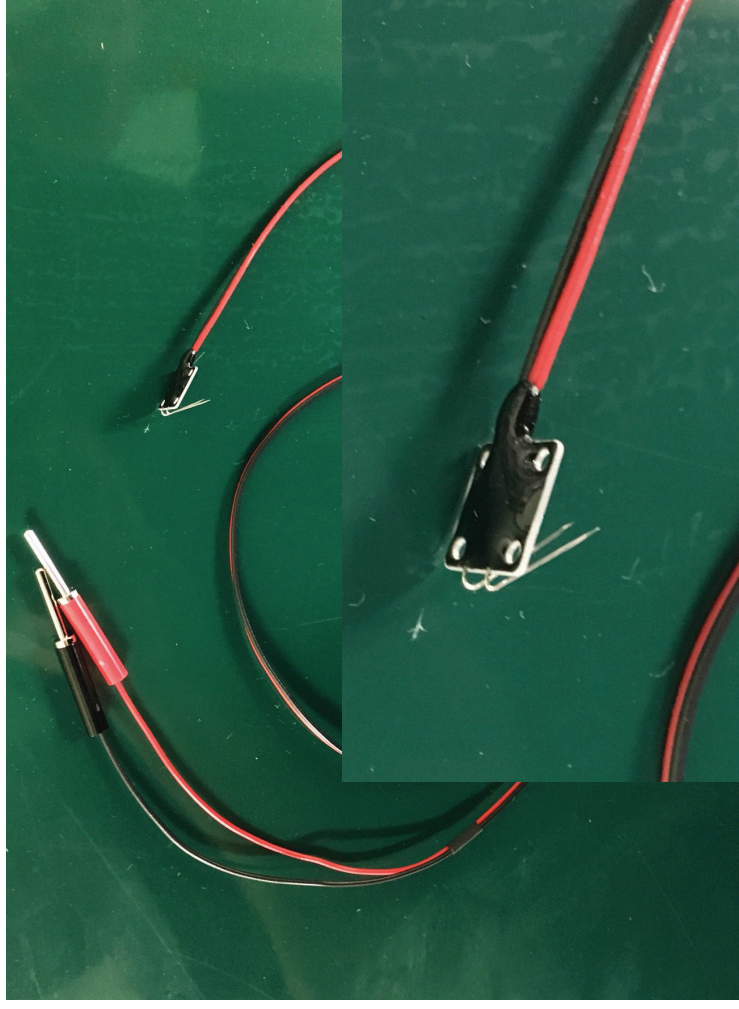


図 2-a. フック型双極心房刺激ペースメーカーリード (ユニークメデikal、東京)
供試動物を右側横臥位にて保定し、左側第 4 肋間部開胸にて、左心房にアプローチし、フック型双極心房刺激リード (心房刺激電極：ユニークメデikal、東京) を 5-0 のポリプロピレン製非吸収性モノフィラメント縫合糸 (5-0 PROLENE；ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社、東京) で左心耳に縫合し固定した。その後、常法通りに閉胸し、リードは皮下を通し、背部から体外へ誘導した。



図 2-b. 体外式心臓ペースメーカー動物の背面に露出した電極リードと接続し、390 bpm (回/分)、2mV の高頻度で心臓を刺激した。

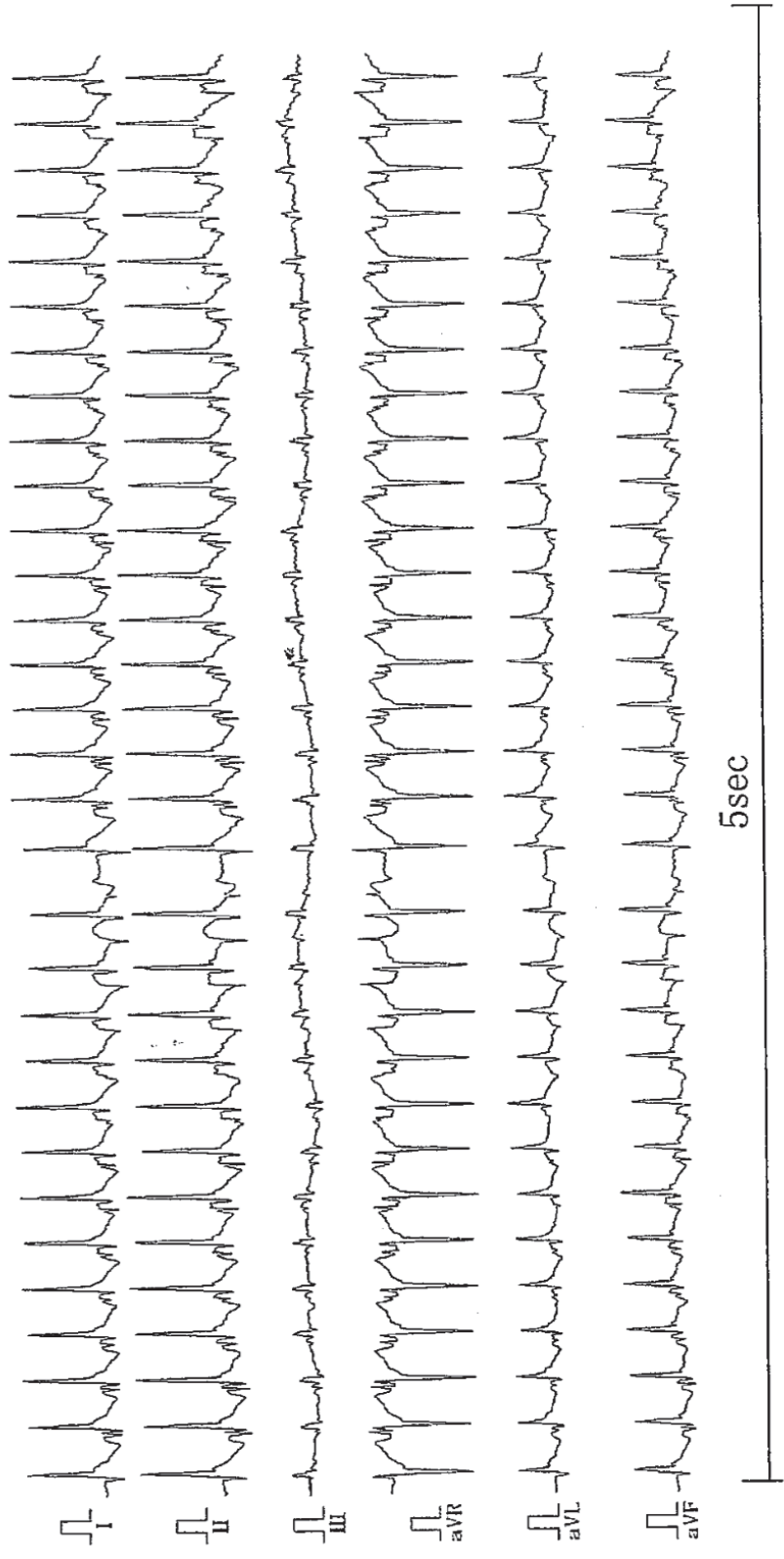


図 2-c. 高頻度心房刺激により誘発された心房細動 (2mV, 390 bpm).
 心電図検査にて、P 波の消失、R-R 間隔の絶対不整により心房細動と確定した。全ての実験犬において心房細動が発現されたことを確認した。

I : I 誘導、II : II 誘導、III : III 誘導、aVR : aVR 誘導、aVL : aVL 誘導、aVF : aVF 誘導。



図 2-d. ポケット付きホルタージャケットの装着

ポケット内に体外式ペースメーカーが収納できる。ジャケット内の体外式ペースメーカーと供試動物の背面の刺激電極リードを接続し、高頻度心房刺激の実施が可能となる。

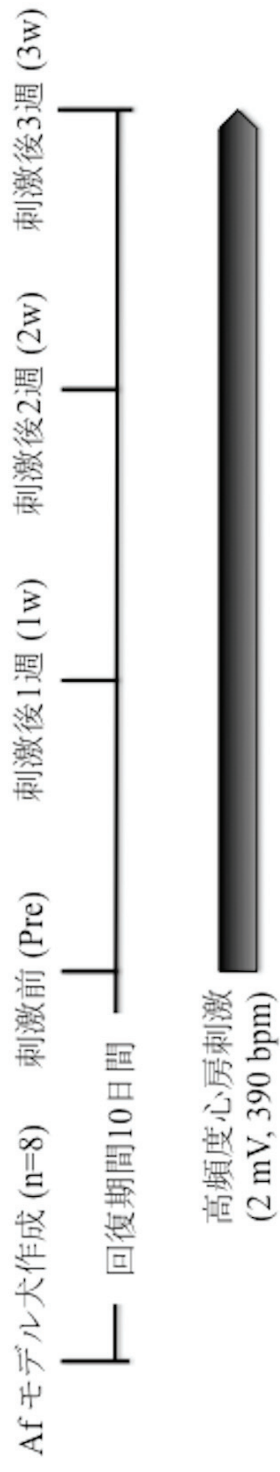


図 2-e. 実験のプロトコール
 Afモデル犬作成後、手術の影響を考慮して 10 日間の術後療養期間を設けた。その後、心房高頻度刺激前 (Pre)、刺激後 1 週 (1w)、2 週 (2w) および 3 週 (3w) の各時点において、心臓超音波検査を実施した。

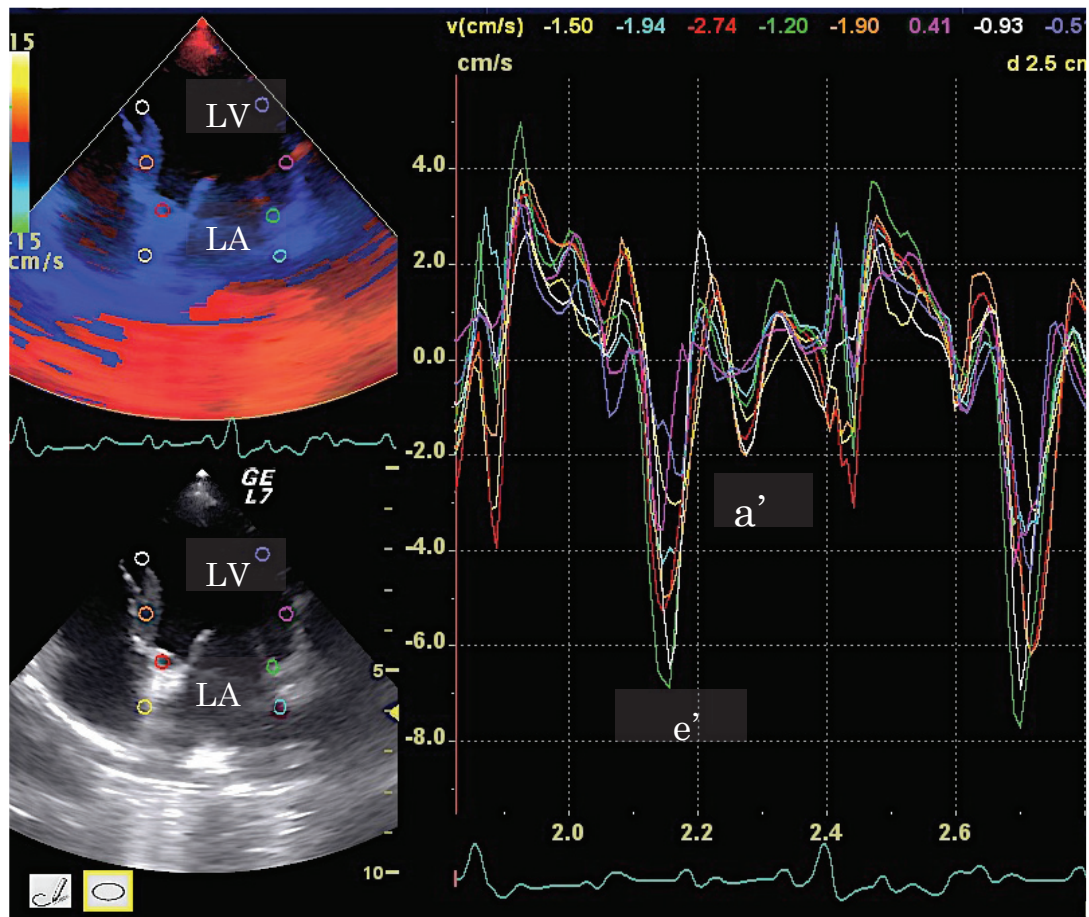


図 2-f. 左傍胸骨心尖部四腔断面における心房筋組織ドプラの計測位置：e'および a'

Af 発生時の心房筋および心室筋の 8 か所におけるそれぞれの拡張早期最大速度 (e')、心房収縮期最大速度 (a') を計測し、心房筋と心筋筋の運動の関連性を評価した。

LA : 左心房 LV : 左心室。

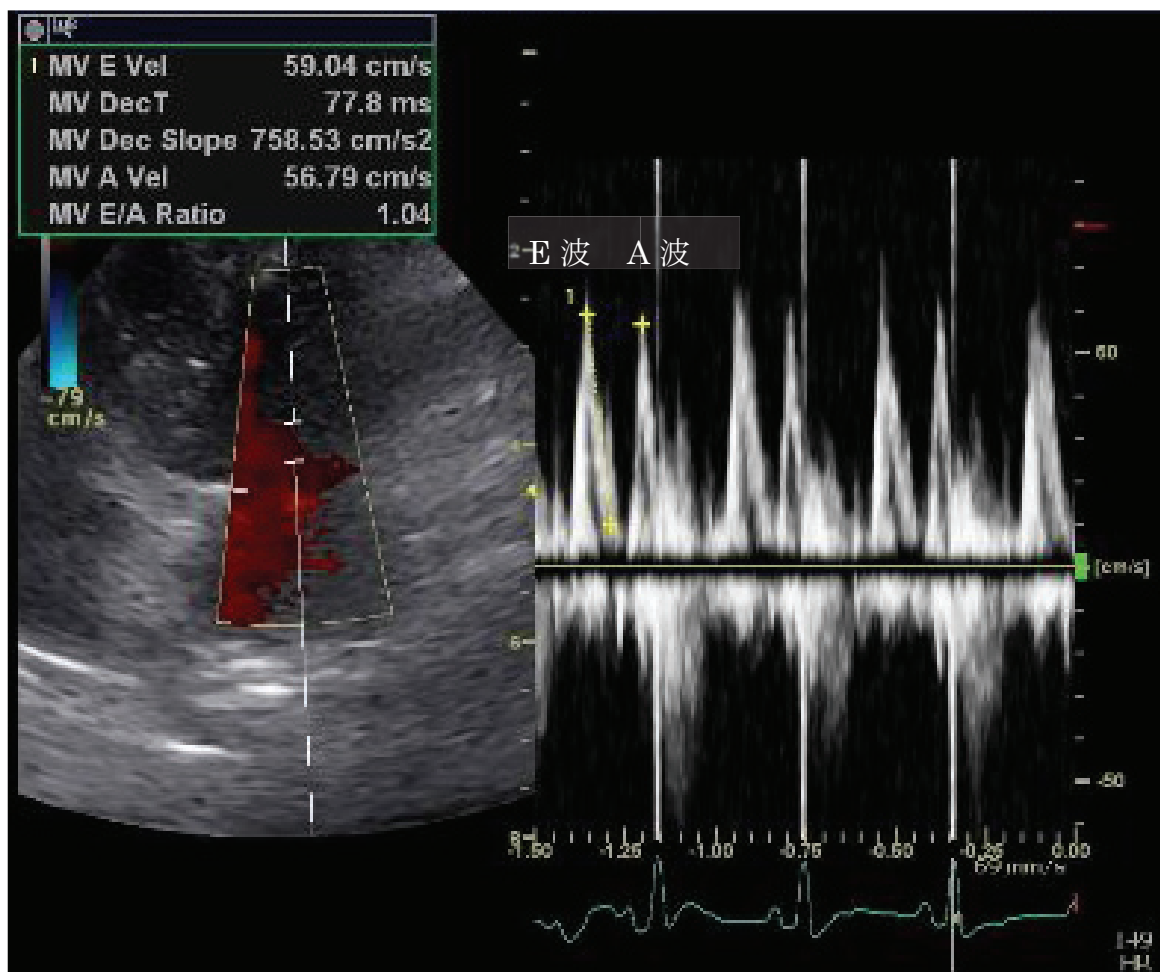


図 2-g. 左傍胸骨心尖部四腔断面における左室流入波形の測定

左傍胸骨心尖部四腔断面により僧房弁口部を描出し、左室流入波形を構成する E 波 A 波の波高および E 波と A 波の比 (E/A) を算出した。

E 波：早期流入波、A 波：心房収縮波。

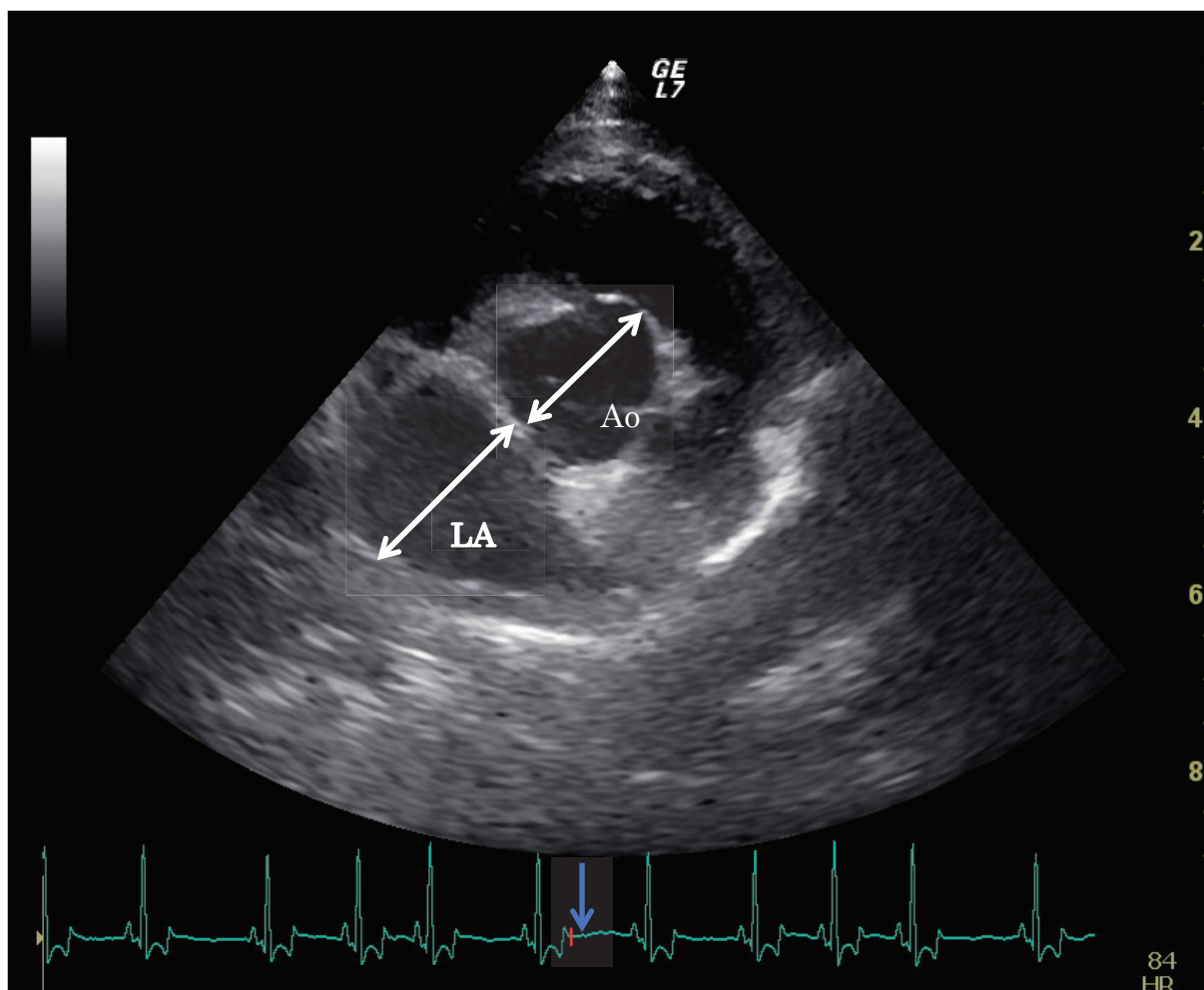


図 2-h. 左心房径/大動脈径 (LA/Ao) の計測方法

右傍胸骨左室短軸面像心基部レベルの B モードにおいて、収縮末期での大動脈径 (Ao (mm)) と左心房径 (LA (mm)) を測定した。また、LA を Ao で除した左心房径/大動脈径 (LA/Ao) を測定した。

心電図上の青矢印は拡張末期に一致している。

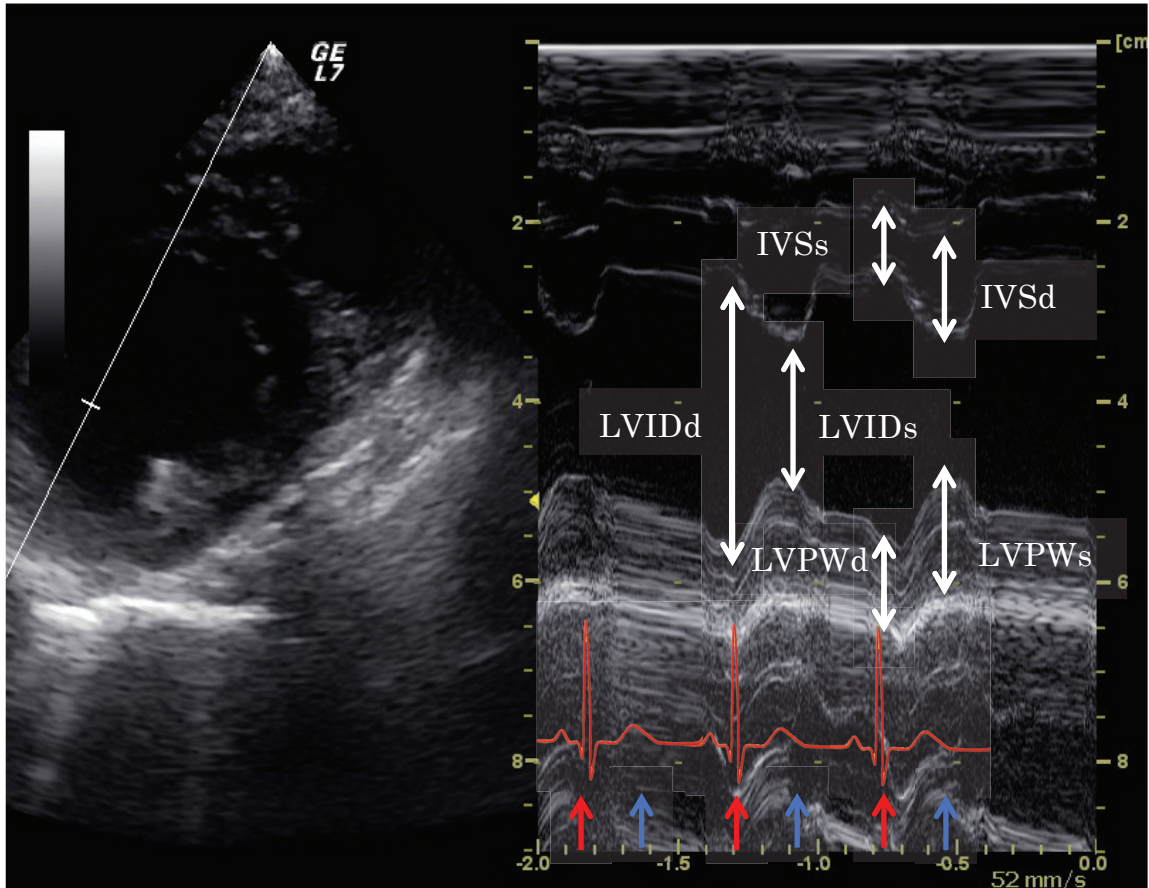


図 2-i. 右傍胸骨左室短軸面像心基底部レベルの M モードにおける計測方法

IVSs : 収縮末期心室中隔壁厚(mm) IVSd : 拡張末期心室中隔壁厚(mm)

LVPWs : 収縮末期心室自由壁厚(mm) LVPWd : 拡張末期心室自由壁厚(mm)

LVIDs : 収縮末期心室内径(mm) LVIDd : 拡張末期心室内径(mm)

FS : 左心室内径短縮率 (%) , $FS = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd \times 100\%$

心電図上の赤矢印は収縮末期、青矢印は拡張末期に一致している。

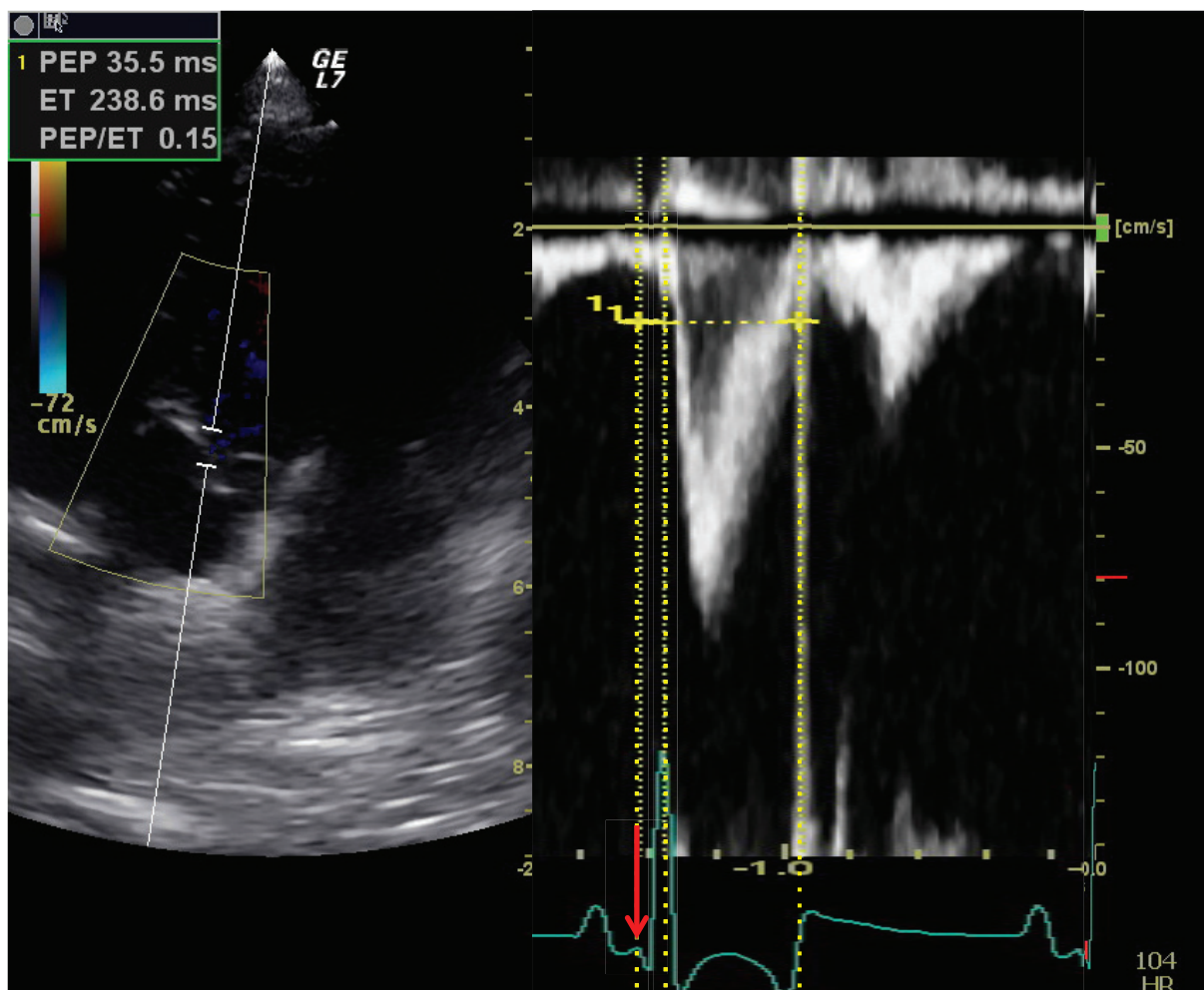


図 2-j. 大動脈弁口部血流波形での計測方法

左傍胸骨心尖部五腔断面像により大動脈弁口部を描出し、ドプラモードにおいて同部位での血流波形を得る。

PEP：前駆出時間 (msec)であり、心電図の Q 波の開始から、血流波形の開始までの時間。

ET：駆出時間 (msec)であり、血流波形の開始か終了までの時間。

心電図上での Q 波は、赤矢印と一致している。

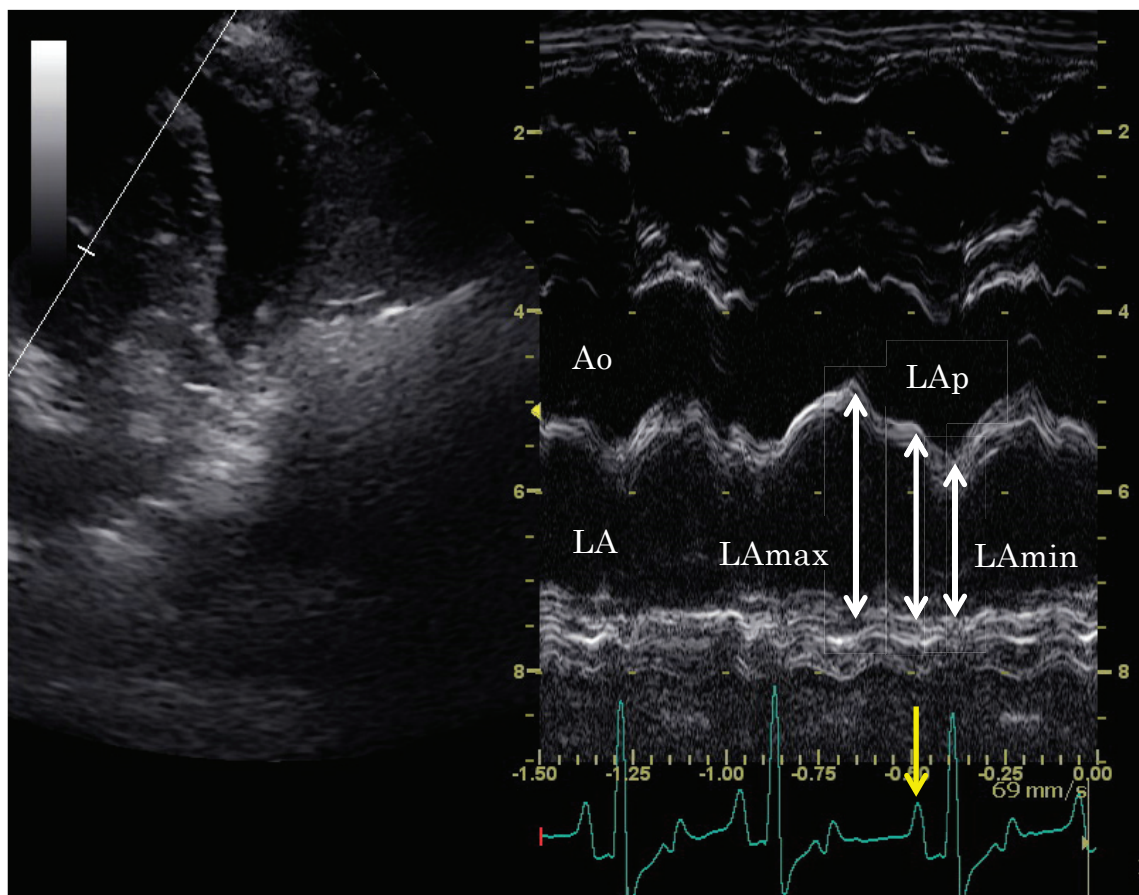


図 2-k. 右傍胸骨左室 LA/Ao 断面像の M モードにおける左房機能の測定

LA/Ao の断面像において、最大左房径 (LAmax) と最小左房径 (LAmin)、心電図上での P 波における左房径 (LAp) を測定し記録した。これらの各値を用いて、以下に示す数式を用いて左房機能である Total LA emptying fraction (FT LA, %)、Passive LA emptying fraction (FRE LA, %)、Active LA emptying fraction (FAE LA, %)を求めた。

Total LA emptying fraction (FT LA, %) : $[LA \text{ max} - LA \text{ min} / LA \text{ max}]$

Passive LA emptying fraction (FRE LA, %) $[LA \text{ max} - LA \text{ p} / LA \text{ max}]$

Active LA emptying fraction (FAE LA, %) $[LA \text{ p} - LA \text{ min} / LA \text{ p}]$

心電図上の黄矢印は P 波に一致している。

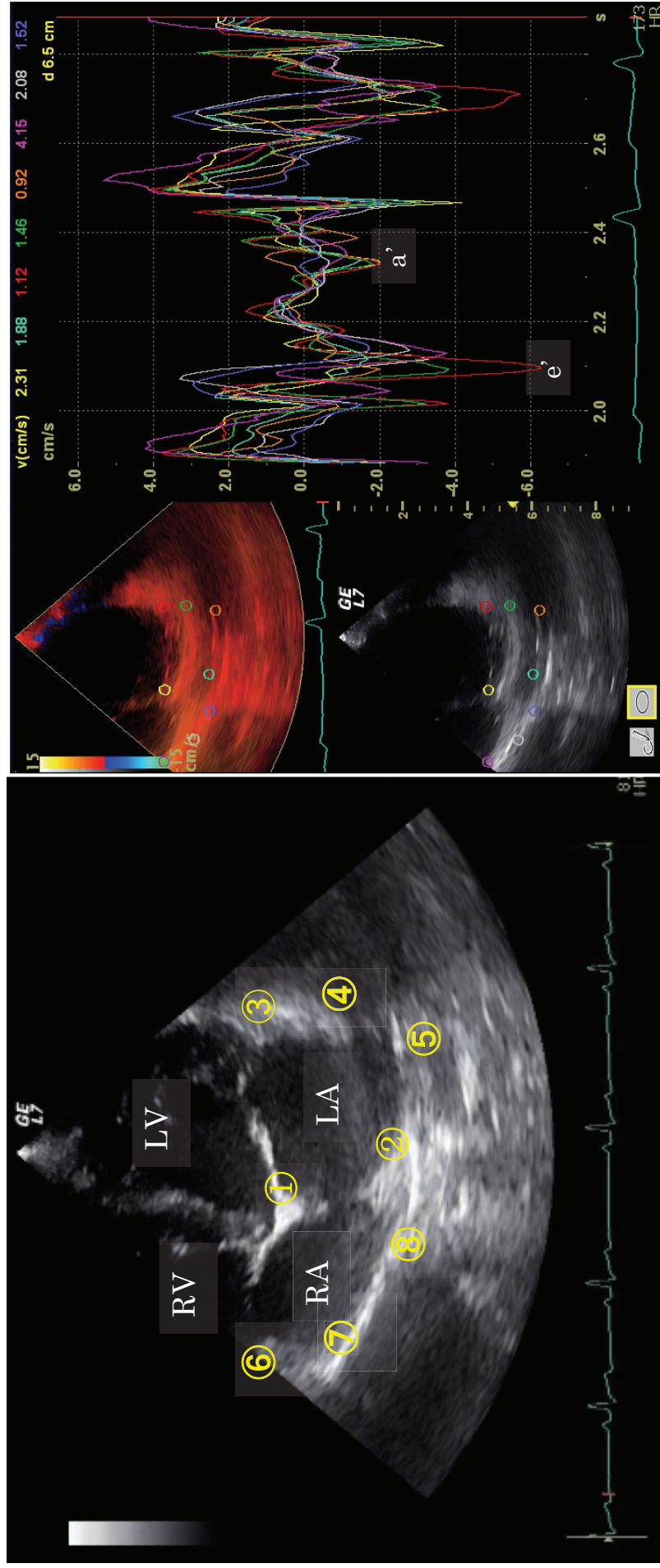


図 2-1. 左傍胸骨心尖部四腔断面における心房筋組織ドプラーの計測位置（左図）と代表的な 1 例の測定時の波形（右図）
 組織ドプラーモードを用いて、心房筋の 8 か所において、拡張早期最大速度（e'）、心房収縮期最大速度（a'）を計測した。各項目の計測値は、連続した 9 心拍を計測し、その平均値をもって計測値とした。

LA：左心房 LV：左心室 RA：右心房 RV：右心室。

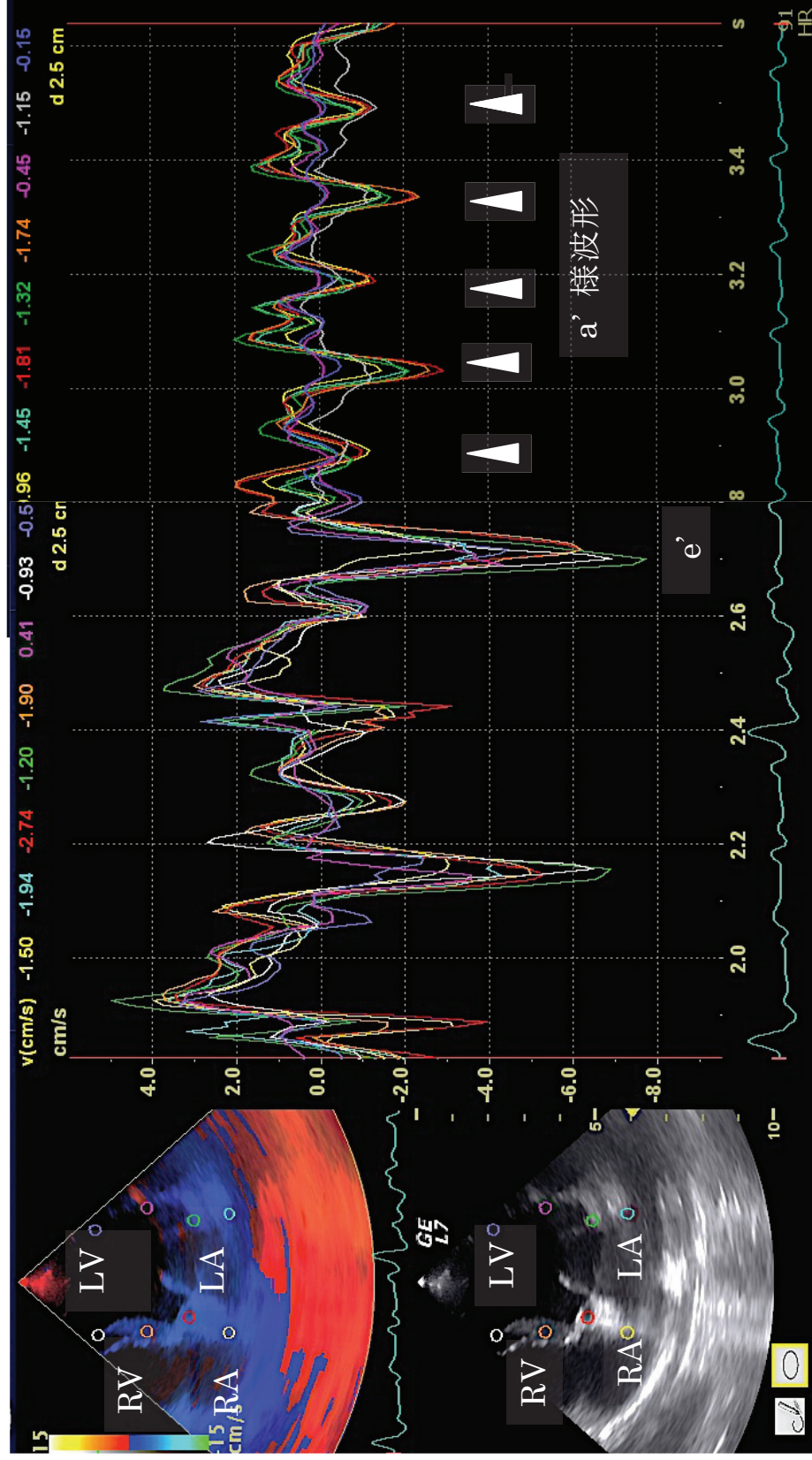


図 2-m. Af 発現時における左傍胸骨心尖部四腔断面での代表的な 1 例の心房筋組織ドプラー (e'および a' 様波形)
 Af 発現時における a' 様波形が持続的に出現していること (白矢印) や 8 箇所それぞれの心房筋と心室筋が重なって動いていることを確認できた。

LA: 左心房 LV: 左心室 RA: 右心房 RV: 右心室 e': 拡張早期最大速度、a': 拡張末期最大速度。

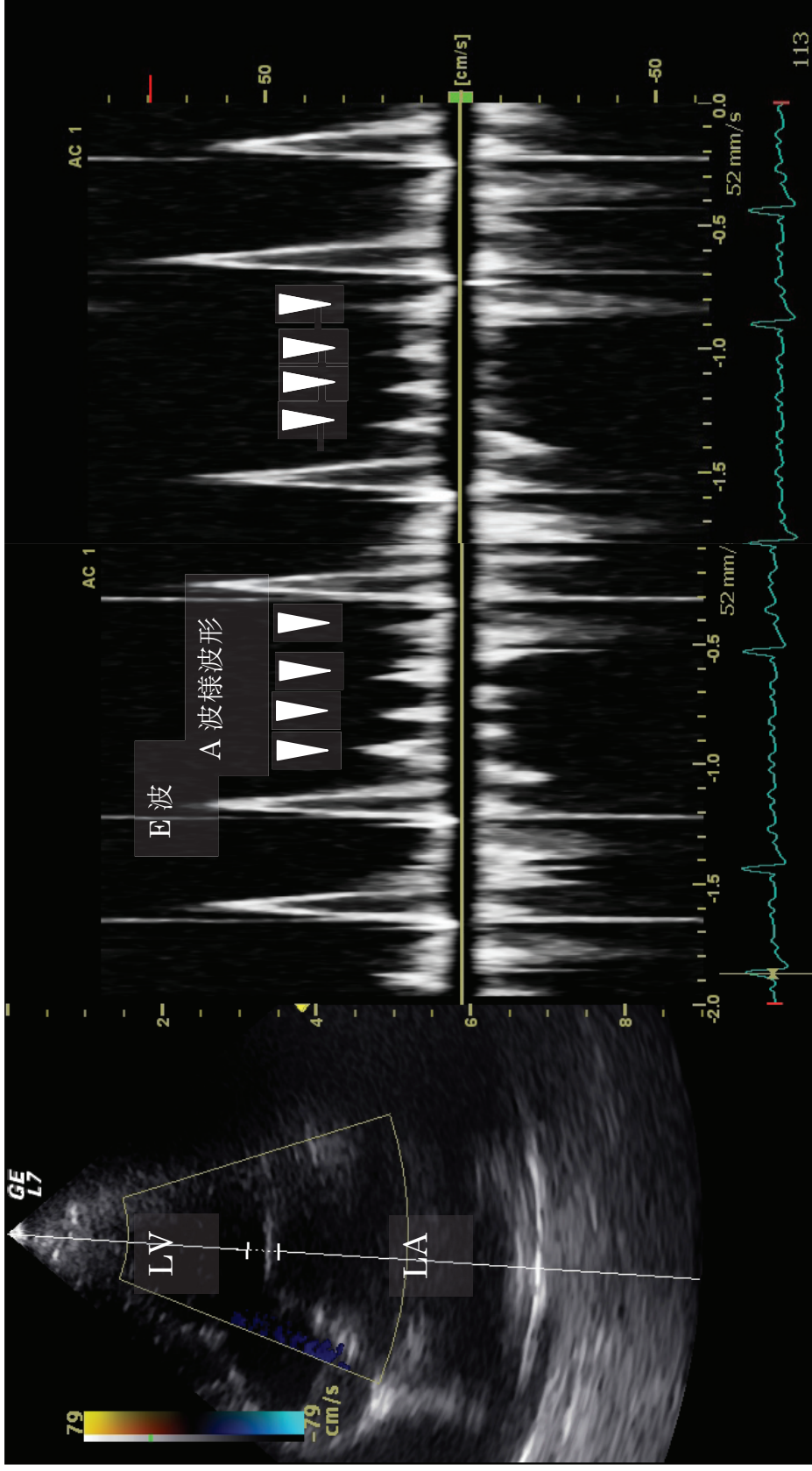


図 2-n. Af 発現時における左傍胸骨心尖部四腔断面での代表的な 1 例の左室流入波形 (E 波および A 波様波形) Af 発現時において A 様波形が持続的に出現していることが確認できた (白矢印)。

LA : 左心房 LV : 左心室 RA : 右心房 RV : 右心室、E 波 : 早期流入波形、A 波 : 心房収縮波形。

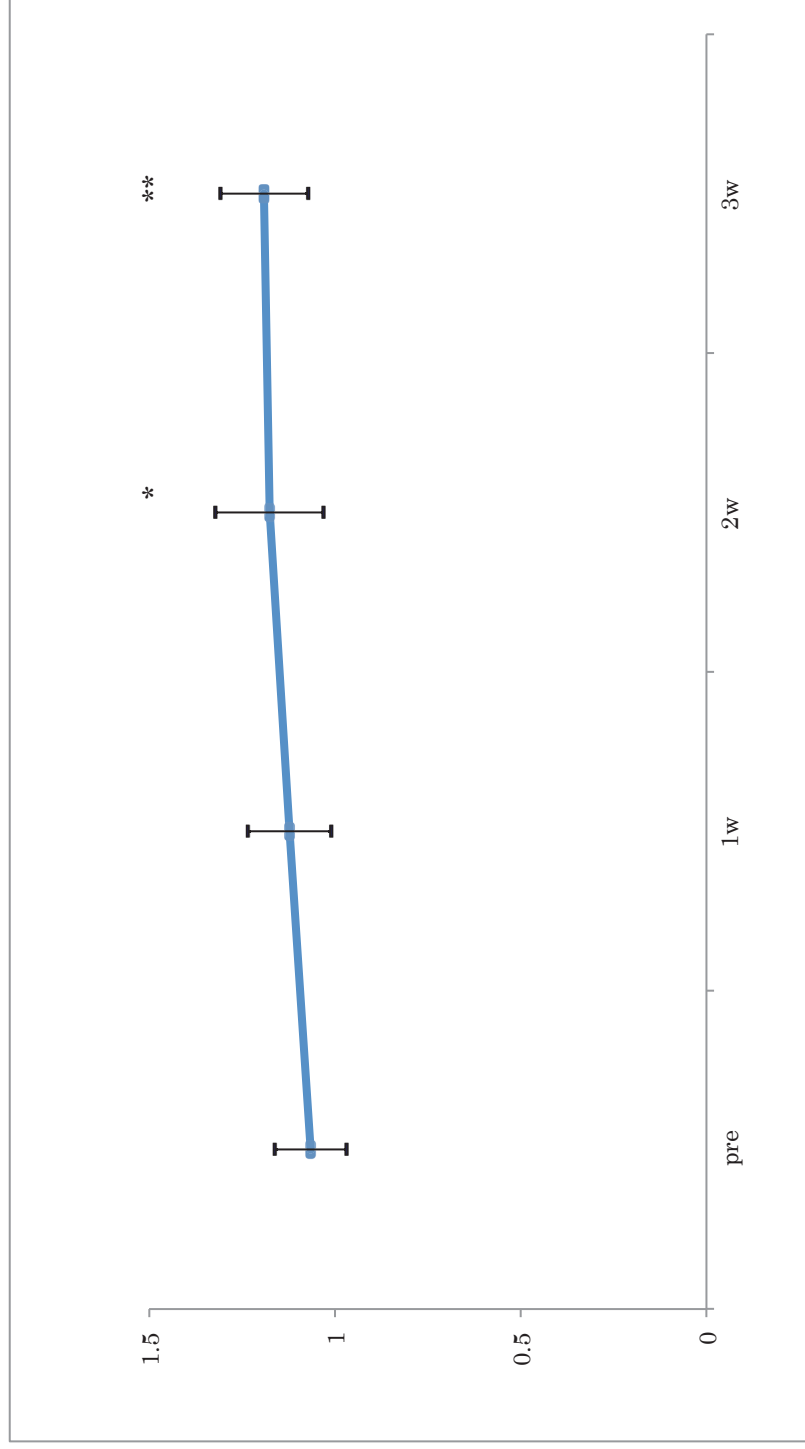


図 2-o. LA/Ao の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* 刺激前と比較して $p < 0.05$ で有意差あり、** 刺激前と比較して $p < 0.01$ で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、Ao: 大動脈径 (mm)、LA: 左心房径 (mm)、LA/Ao: 左心房径/大動脈径。

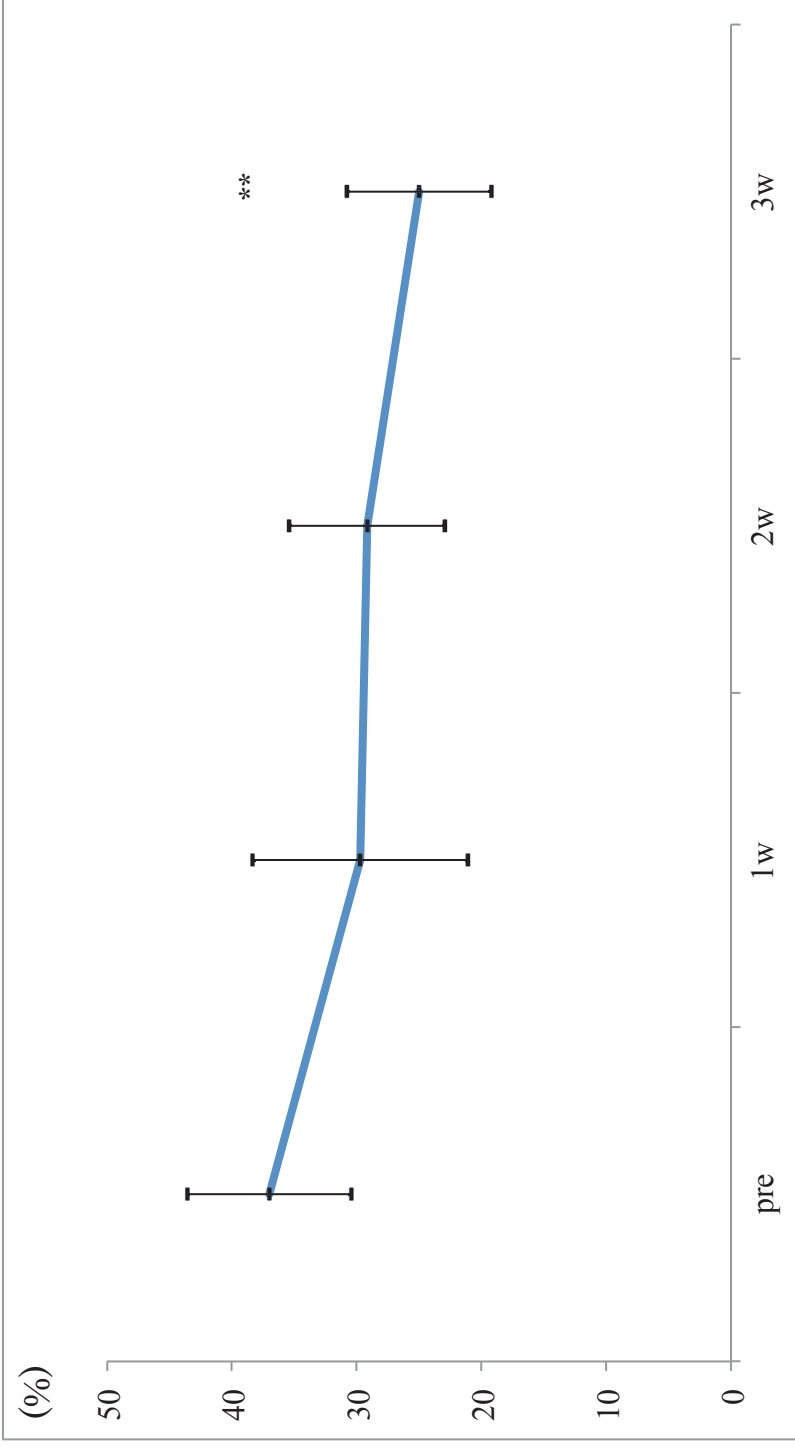


図 2-p. FS の継続的变化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。 ** 刺激前と比較して、 $p < 0.01$ で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、FS: 左室内径短縮率。

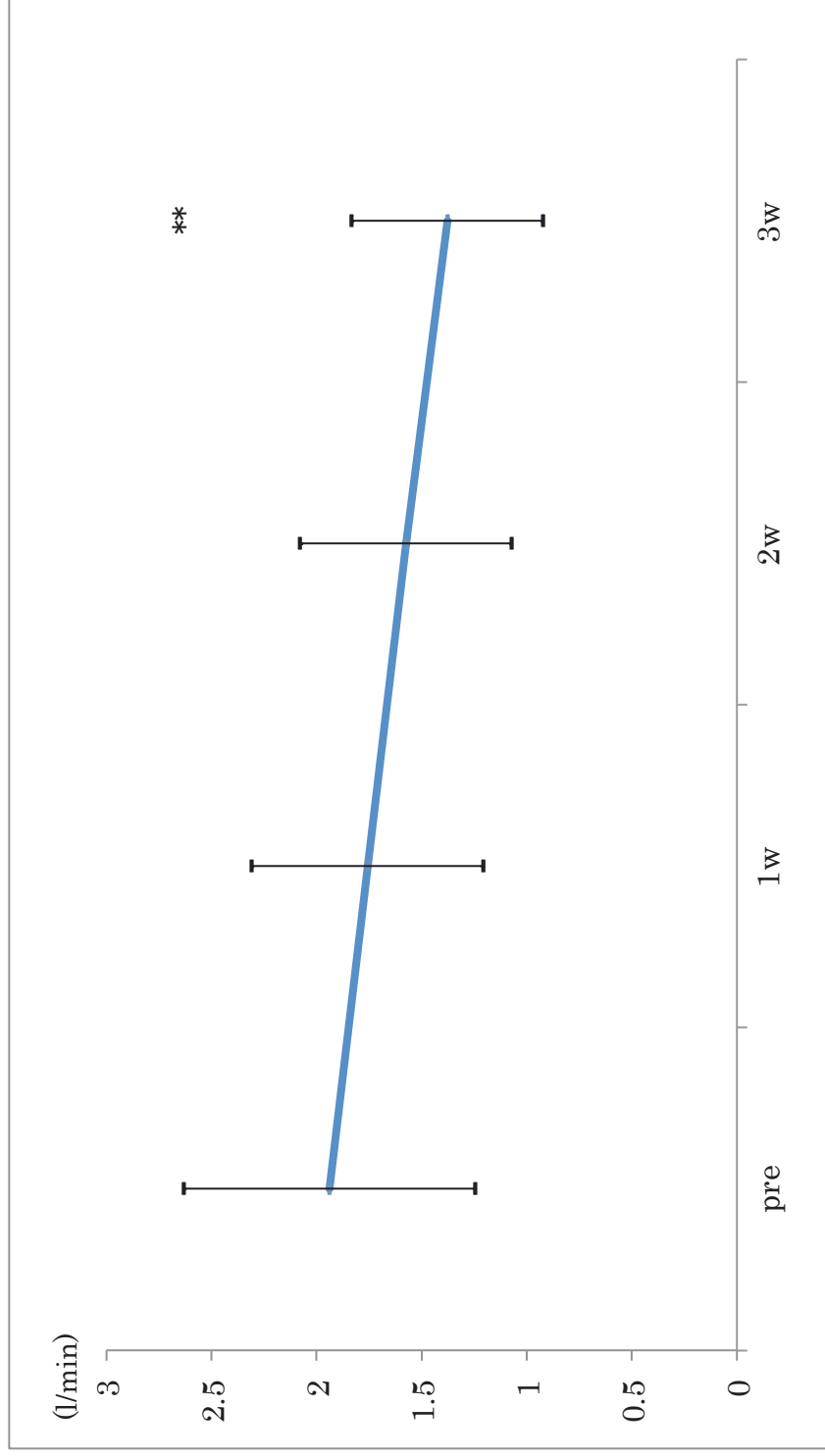


図 2-q. 左心室の心拍出量 (CO) の継続的变化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。** 刺激前と比較して $p < 0.01$ で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、CO: 心拍出量。

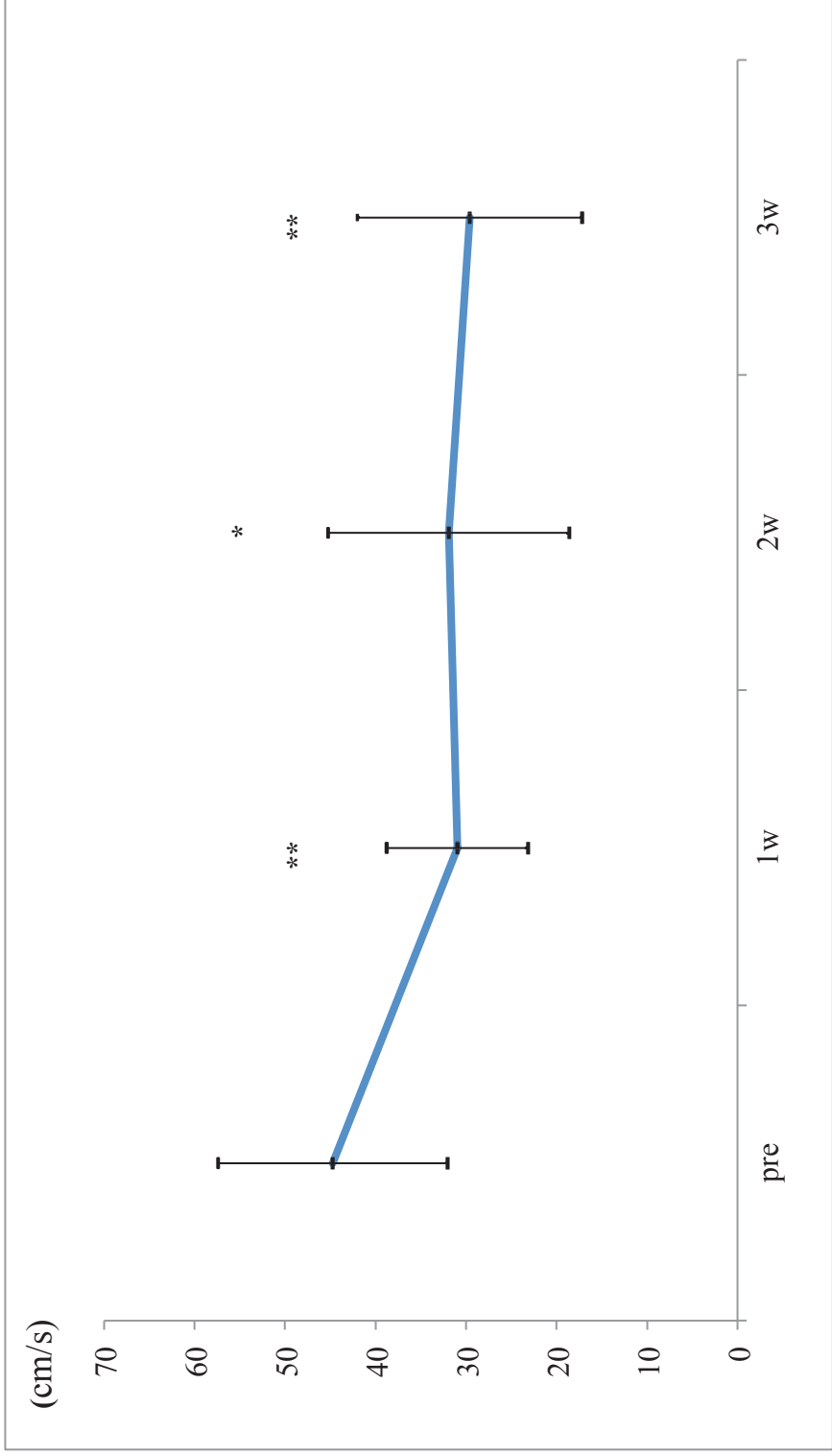


図 2-r. A 波の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* 刺激前と比較して $p < 0.05$ で有意差あり、** 刺激前と比較して $p < 0.01$ で有意差あり
 pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、A 波: 心房収縮波。

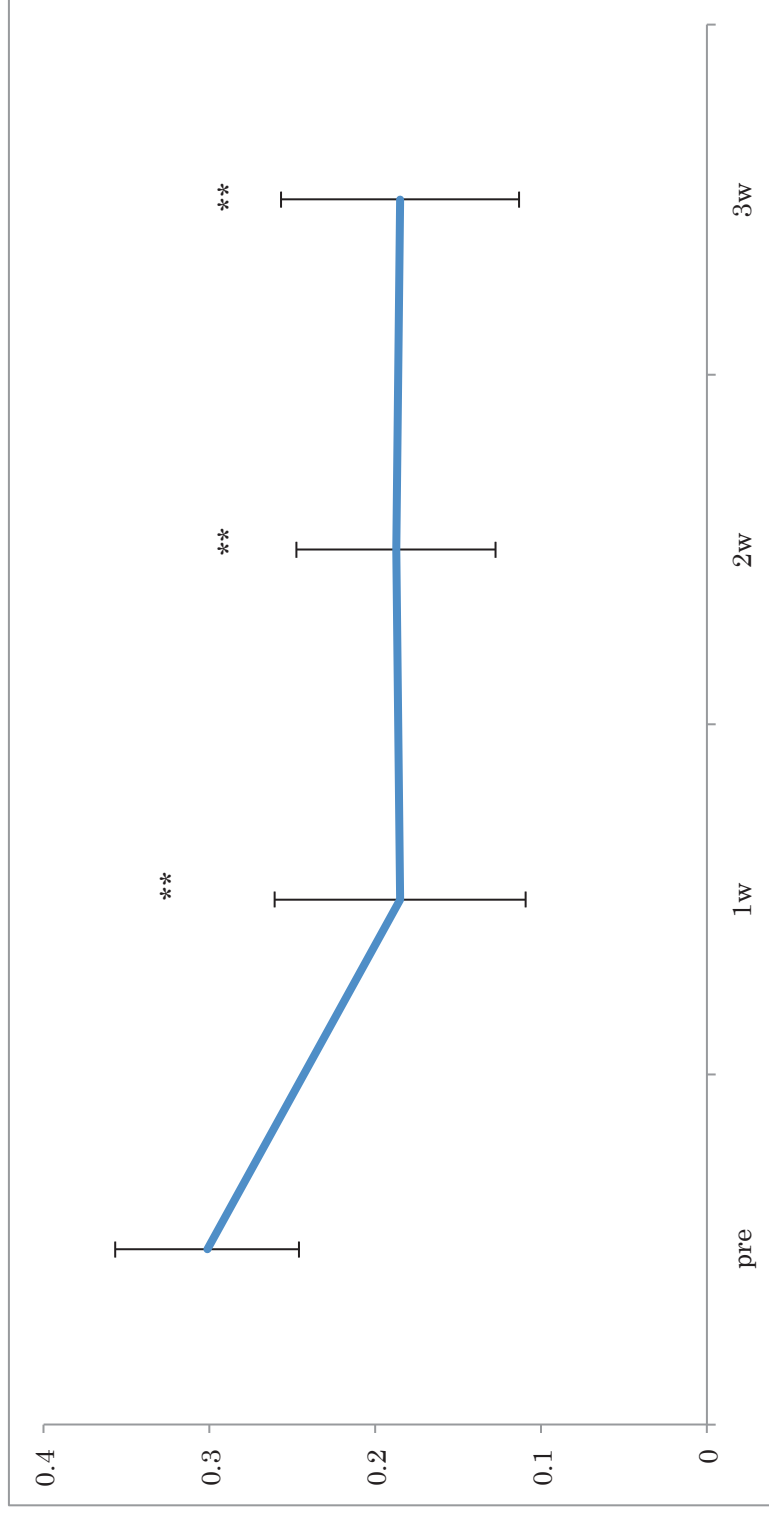


図 2-s. 心房機能における継時的変化 (FT LA: Total LA emptying fraction) (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。 ** : 刺激前と比較して $p < 0.01$ で有意差あり。

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、FT LA: Total LA emptying fraction (左房リザーバ一機能)。

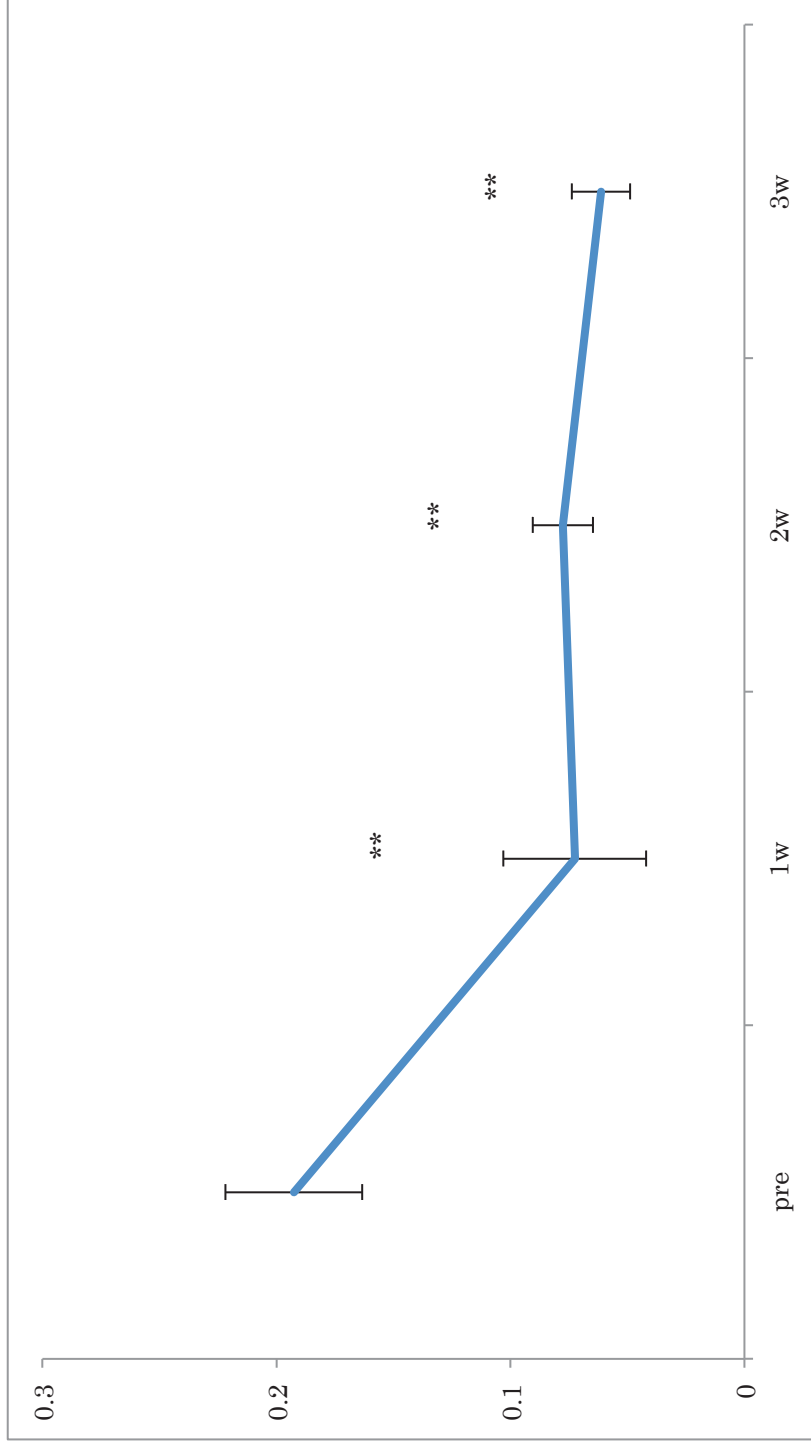


図 2-t. 心房機能における継時的変化 (FAE LA: Active LA emptying fraction) (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。** 刺激前と比較して、 $p < 0.01$ で有意差あり。

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、FT LA: Active LA emptying fraction (左房ブロースター機能)。

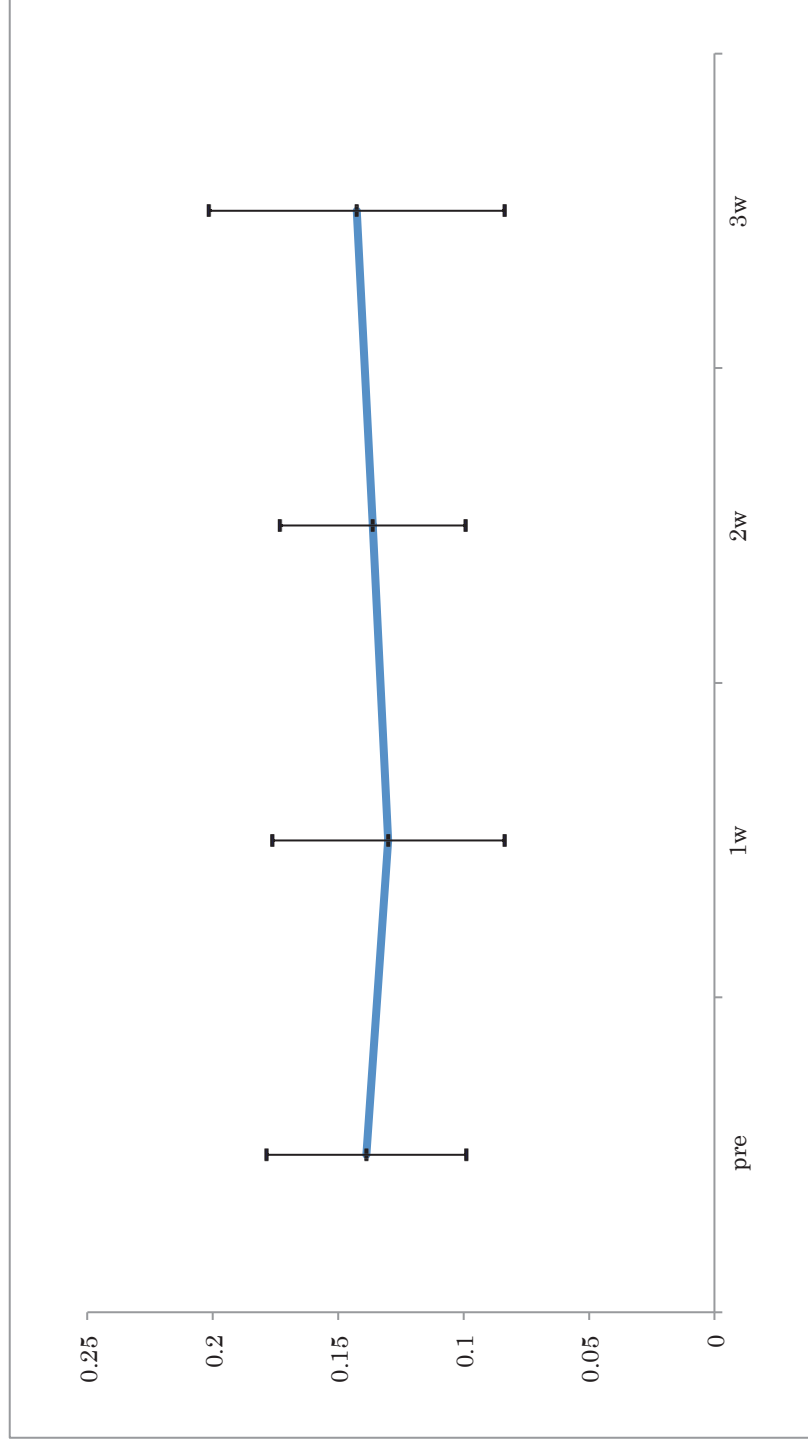


図 2-u. 心房機能における継時的変化 (FPE LA: Passive LA emptying fraction) (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、FPE LA: Passive LA emptying fraction (左房コンデンディエイト機能)。

	pre	1w	2w	3w
LA(mm)	20.0±2.0	20.8±1.8	21.3±2.0	22.0±2.5*
Ao(mm)	18.8±1.1	18.6±1.0	18.2±1.4	18.4±1.3
LA/Ao	1.07±0.10	1.12±0.11	1.18±0.15*	1.19±0.12**

表 2-a. LA, Ao, LA/Ao の数値の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* 刺激前と比較して、 $p < 0.05$ で有意差あり、** 刺激前と比較して、 $p < 0.01$ で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、LA: 左心房、Ao: 大動脈径、LA/Ao: 左心房径大動脈径比。

	pre	1w	2w	3w
IVSd(mm)	7.9±1.5	7.4±1.3	7.7±1.6	7.2±1.2
LVIDd(mm)	30.5±3.1	30.0±2.6	30.4±2.4*	30.4±3.1**
LVPWd(mm)	8.3±1.2	8.0±1.6*	7.9±1.1*	7.8±1.3*
IVSs(mm)	11.9±2.3	10.5±2.0	10.6±2.0	9.6±1.3**
LVIDs(mm)	18.5±2.5	21.1±3.1	21.8±2.4	22.5±3.5
LVPWs(mm)	11.5±1.2	10.3±2.0	10.3±1.2	10.1±1.3
FS(%)	39.4±5.5	29.0±6.2	28.2±5.0	26.2±4.7**

表 2-b. 左心室における各値の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* 刺激前と比較して、p<0.05 で有意差あり、** 刺激前と比較して、p<0.01 で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、IVSd: 拡張末期心室中隔壁厚, LVIDd: 拡張末期左室内径, LVPWd: 拡張末期左室後壁厚, IVSs: 収縮末期心室中隔壁厚, LVIDs: 収縮末期左室内径, LVPWs: 収縮末期左室後壁厚, FS: 左室内径短縮率。

	pre	1w	2w	3w
LV-HR (回/min)	136±61	153±20	138±28	132±26
LV-SV (ml)	18.3±7.0	13.5±3.7*	13.4±4.7*	12.6±4.7**
LV-CO (l/min)	1.9±0.7	1.8±0.5	1.6±0.5	1.4±0.5**
LV-PEPET	0.18±0.04	0.28±0.07**	0.29±0.05**	0.31±0.07**

表 2-c. 左心室機能の数値の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* 刺激前と比較して、p<0.05 で有意差あり、** 刺激前と比較して、p<0.01 で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、HR: 心室拍動数、SV: 1 回拍出量、CO: 心拍出量、PEP/ET: 前駆出時間/駆出時間。

	pre	1w	2w	3w
E 波 (cm/sec)	76.0±12.5	65.5±11.0	70.1±12.9	70.0±12.2
A 波 (cm/sec)	44.7±12.7	31.0±7.8**	31.9±13.3*	30.0±12.4**
E/A	1.8±0.46	2.2±0.55	2.5±0.89**	2.8±1.07**

表 2-d. 左室流入波形の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* 刺激前と比較して、p<0.05 で有意差あり、** 刺激前と比較して、p<0.01 で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、E 波: 早期流入波形、A 波: 心房収縮波形。

	pre	1w	2w	3w
FT LA (%)	0.30±0.05	0.19±0.08**	0.19±0.06**	0.19±0.07**
FPE LA (%)	0.14±0.04	0.13±0.05	0.14±0.04	0.14±0.06
FAE LA (%)	0.19±0.03	0.07±0.03**	0.08±0.01**	0.06±0.01**

表 2-e. 心房機能における各値の随時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。**：刺激前と比較して、 $p < 0.01$ で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、FT LA: Total LA emptying fraction (左房リザーバ一機能)、FPE LA: Passive LA emptying fraction (左房コンデンディエット機能)、AE LA: Active LA emptying fraction (左房ブースター機能)。

	pre	1w	2w	3w	
①	e' (cm/s)	5.2±0.9	4.9±1.4	5.0±1.9	5.2±1.5
	a' (cm/s)	4.0±1.2	1.9±1.0**	1.5±0.9**	1.6±0.9**
②	e' (cm/s)	2.1±0.7	2.5±0.9	1.9±0.8	2.0±0.9
	a' (cm/s)	1.1±0.4	0.7±0.5**	0.5±0.4**	0.7±0.6*
③	e' (cm/s)	5.3±1.8	5.0±2.0	5.3±1.8	5.3±2.3
	a' (cm/s)	2.8±1.0	1.2±0.7**	1.2±0.8**	1.2±0.7**
④	e' (cm/s)	3.1±1.3	2.9±1.0	3.0±1.3	2.8±1.4
	a' (cm/s)	2.1±1.0	1.1±0.6*	0.8±0.4**	1.0±0.5
⑤	e' (cm/s)	1.3±0.9	1.1±0.9	1.1±0.6	1.3±0.9
	a' (cm/s)	1.1±1.2	0.6±0.6	0.4±0.3*	0.6±0.8
⑥	e' (cm/s)	3.9±1.7	2.8±0.9*	2.6±0.9*	2.9±0.9*
	a' (cm/s)	3.6±1.3	2.0±0.9**	1.7±1.0**	1.3±0.7**
⑦	e' (cm/s)	2.2±0.9	2.0±0.9	2.1±0.8	2.0±0.8
	a' (cm/s)	2.5±1.0	1.2±0.7**	1.0±0.8**	0.9±0.6**
⑧	e' (cm/s)	2.2±0.9	2.0±0.9	2.1±0.8	2.0±0.8
	a' (cm/s)	1.2±0.4	0.6±0.6**	0.6±0.5**	0.5±0.4**

表 2-f. 組織ドプラーの数値の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。*: 刺激前と比較して、p<0.05 で有意差あり、**: 刺激前と比較して、p<0.01 で有意差あり。

pre: 高頻度心房刺激 1 週間後、1w: 心房刺激 2 週間後、2w: 心房刺激 3 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、e': 拡張早期最大速度、a': 拡張末期最大速度。

第3章 高頻度心房刺激犬を用いた血液凝固能の評価

2) - 急性期 (Af 開始 30 分後)における血液凝固能の評価 -

1. 緒言

心房細動 (Af) は、ヒトならびに犬において臨床的に重要な不整脈の一つである (19, 20, 46, 47)。Af の分類はいくつか存在するが、ヒトの *Guidelines for Pharmacotherapy of Atrial Fibrillation* (JCS 2013) では、臨床家にとって単純かつ使いやすいという理由から、初発性、発作性、持続性および永続性という分類基準が採用されている (83)。その分類基準のうち、発作性 Af とは、薬物療法、非薬物治療の有無にかかわらず、7 日以内 (多くは 48 時間以内) に洞調律に復するものであり (81~83)、Af の長い慢性経過からみると早期の病期に相当する。また、発作性 Af 患者のうち 5.6~33.1% は 7 日以内に持続性 Af に移行する (84, 85)。

人医療での血栓形成のタイミングに関しては、3 日間以内の Af が持続した急性症例の 5-14% において、および持続性 Af 患者の 29% において血栓が形成されると言われており (64, 86)、Af が生じた 12 時間以内に血小板と凝固因子の活性が開始されることが報告されている (87)。第 3 章の我々の慢性期実験では、心房に高頻度心房刺激 (2 mV, 390 bpm) を与えた Af モデル犬において、T-TAS を用いることにより Af 発現後の 1 週間後には心房内において血栓形成を示唆する血液性状の変化が生じ、それが 3 週間持続することが明らかとなった。しかしながら、医学ならびに獣医学の双方で Af の発現後の急性期において、どのタイミングで、心房内あるいは末梢部位において、血液性状の変化が生じるかは現在のところ明らかになっていない (13, 14, 64, 83, 86~88)。

本研究は、血液凝固検査である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)、フィブリノーゲン濃度 (Fibn)、D-ダイマー (D-dimer)、抗凝固因子 (ATⅢ) などの各検査と、新しい止血血栓評価機器である T-TAS を用いて、実験的に作成された Af モデル犬における Af 発現 30 分後の急性期における心房内ならびに末梢部位の血液性状を比較評価し、血栓形成リスクの把握を早期に捉えることを目的とした。

2. 方法

2-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規定に準拠し遂行した。(承認番号: 第 27-39 号)

2-2. 供試動物

慢性期実験と同様に健康的であると診断した実験用ビーグル犬 16 頭を供試した。

2-3. Af モデル犬の作成

慢性期実験と同様の方法を用いて、ビーグル犬 8 頭に全身麻酔下で心外膜ペースメーカーリードを埋め込んだ。その後、ペースメーカーリードを体外式刺激装置に接続し、2 mV、390 bpm にて高頻度心房刺激を行い、これを Af モデルとした。

2-4. 実験プロトコール

実験に用いた上記の Af モデル犬 8 頭をペーシング群とした。残り 8 頭はペーシングを行わずに刺激前後での採血のみを実施しコントロール群とした。ペーシング群では、手術の影響を考慮して 10 日間の術後療養期間を設けた。その後、心房高頻度刺激前 (Pre)、刺激開始 30 分後 (30 min) の各時点において下記の手法によって、T-TAS 検査、血液凝固機能検査、血液検査を実施した。血液検査は、各時点において、体外式刺激装置による刺激を一度停止してから 30 分経過後に行った (図 3-f)。

2-5. 検査

2-5-1. 採血方法

慢性期実験と同様に、Af モデル犬に、全身麻酔下において、5 Fr の栄養カテーテル

を、頸静脈より挿入し、X線透視下で位置を確認しながら右心房までカテーテルを進めた。カテーテルより右心房内の血液を採取したものを「心房血」とした。同麻酔条件下において外側伏在静脈より 20 G 翼状針を用いて採血したものを「末梢血」とした。

2-5-2. T-TAS による測定

慢性期実験と同様に、上記で採血した「心房血」と「末梢血」を用いて、T-TAS により血液凝固能および血小板機能を測定した。内圧が基線より+10 kPa に到達した時点を開塞開始時間 (time to 10kPa 以下 T_{10})、PL チップでは基線より+60 kPa、AR チップでは+80 kPa の時点を開塞時間 (Occlusion Time 以下 OT) として、それらの時間および圧上昇曲線の下部領域面積 (Area Under Curve 以下 AUC) を計測した。

2-5-3. 血液凝固検査

慢性期実験と同様に、上記で採血した「心房血」および「末梢血」を用いた。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)、フィブリノーゲン濃度 (Fibn)、D-ダイマー (D-dimer)、抗凝固因子 (ATIII) を測定した。

2-5-4. 統計解析

測定値は平均値±標準偏差で示した。各時点における計測値が正規分布しているかどうかを確認するための正規確率プロットを作成し、シャピロ・ウィルク検定およびコルモゴロフ・スミルノフ検定を用いて、分布の正規性の検定を行った。

データが正規分布する場合は、One-way ANOVA を行い、Dunnet test によって多重比較を行った。正規分布しない場合には、Freedman's test を行い、Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction によって多重比較を行った。p<0.05 を統計学的有意であると判断した。

3. 結果

3-1. T-TAS

(a)心房血

ペーシング群の心房血の AR チップにおいては、OT は刺激前と比較して、刺激 30 分後に有意に短縮した ($p<0.05$)。T₁₀ も同様に刺激前と比較して、刺激 30 分後に有意に減少した ($p<0.05$)。AUC は刺激前と比較して、刺激 30 分後に有意に上昇した ($p<0.05$) (図 3-g) (表 3-f)。また、心房血の PL チップにおいて、OT が刺激前と比較して、刺激 30 分後に有意に短縮した ($p<0.05$)。T₁₀ は、刺激前と比較して、短縮傾向を示したが、有意な変化は見受けられなかった。AUC は刺激前と比較して、刺激 30 分後に有意に上昇した ($p<0.05$) (図 3-h) (表 3-f)。一方、コントロール群の心房血においては、AR チップならびに PL チップでの T₁₀、OT および AUC の値に有意な変化は認められなかった。また、刺激前のペーシング群とコントロール群の測定間に有意差は認められなかった (図 3-g, 図 3-h) (表 3-f)。

(b)末梢血

ペーシング群の末梢血の AR チップならびに PL チップについては、いずれの項目も有意な変化はみられなかった (図 3-i, 図 3-j) (表 3-g)。一方、コントロール群においても、末梢血の AR チップならびに PL チップでの T₁₀、OT および AUC の値に有意な変化は認められなかった。また、刺激前のペーシング群とコントロール群の測定間に有意差は認められなかった (図 3-i, 図 3-j) (表 3-g)。

3-2. 血液凝固検査

ペーシング群において、刺激前後の PT、APTT、Fibn、D-dimer、ATⅢに関しては、「心房血」および「末梢血」のいずれの項目が参考値範囲内を推移し、有意な変化はみられなかった。また、コントロール群においても同様であった。そして、刺激前のペー

シング群とコントロール群の測定値間に有意差は認められなかった（表 3-h）。

4. 考察

血栓症の発症要因として Virchow の 3 要因、すなわち 1) 血流の変化、2) 血管壁の性状変化、3) 血液成分の変化が提唱されている (30~32)。人医学での Af 発現時には、これら Virchow の 3 要因のうち、主にうっ血と血液性状の変化が大きく関与していると考えられている (33)。ヒトにおける Af による血栓形成は、これまではフィブリンと赤血球に富む赤色血栓、いわゆる静脈血栓と言われていたが、現在では、血小板が加わった混合血栓であると考えられている (89)。しかし、本実験での Af 発現 30 後の「心房血」の AR と PL の双方において OT が短縮したことから、Af における血栓形成には血小板と凝固系が相互に作用し合うことで血栓形成が促進されていくことが示唆された。

PT は外因系凝固経路と共通経路、APTT は内因系凝固経路と共通経路における因子活性を反映するために、スクリーニング検査で用いられている (15~19)。本研究では、両群における「心房血」の PT、APTT のともに有意な変化は認められなかった。また、D-dimer は、安定化フィブリンがプラスミンによって分解されることで生じる分解産物であり、人の Af 患者における D-dimer の上昇は、血栓形成を確認するために有用であると考えられている (77~79)。ATIII は、血液中で凝固阻害因子として、凝固反応を制御する生理的セリンプロテアーゼインヒビターである。そのため、ATIII 活性の低下は血栓形成を示唆するものであるとされている (90, 91)。本研究において、心房内の D-dimer ならびに ATIII 活性に有意な継時的変化が認められなかった原因として、T-TAS の結果から、心房内の凝固因子の活性化という血液性状の変化は生じるものの、30 分という短期間では、完全なる血栓形成には至ってなかったものと考えられる。

また、人医学での血栓形成のタイミングに関しては、2 日間以上の Af が持続した症例の 5-14%において、および持続性 Af 患者の 29%においてに血栓が形成されると言われており (64, 87)、Af が生じた 12 時間以内に血小板と凝固因子の活性が開始されるこ

とが報告されている (87)。しかし、本研究では、T-TAS を測定した結果、高頻度心房刺激後わずか 30 分という短時間で、心房内において、血小板機能と凝固能の亢進が生じることが明らかとなった。また、コントロール群の心房血および末梢血では、いずれにおいても有意差が認められなかったことから、血栓形成傾向はペーシングによるものであることが明らかとなった。ただし、30 分という短時間では、心房内における血栓は確認出来ていないことから、血栓形成にまでは至っていないことが考えられる。

我々が知る限り、これまで Af 発現直後の心房内と末梢部位における血液性状の変化を比較した報告は認められていない。今回、心房内においてのみ劇的な血液性状の変化が観察されたが、末梢部位ではいずれの検査項目においても有意な継時的変化は認められなかった。この理由として、末梢部位では血液の淀みが少ないことや、細動という物理的な刺激による血管内皮障害が少ないことなどが推測される。以上の結果から、ヒトの AF 状態でも同様に、末梢血での凝固異常が認められない場合でも、心房内での凝固亢進状態に陥っている可能性が強く示唆される。

本研究において、血液凝固能（血栓形成能）の亢進をもたらした原因として、細動による正常な心房収縮が失われたことによる血液のうっ滞や心房内膜の傷害の存在が推測される。本実験で使用した AR と PL は、血小板数に影響されないと言われている (20) が、本実験では、これらの値に関しての検討は行っていないため、その解釈には十分に注意する必要があると考えられる。本研究での供試動物は、モデル作成時には健康かつ若齢固体であった。Guidelines for Pharmacotherapy of Atrial Fibrillation (JCS 2013) でいえば初発性 Af に相当する (83)。そのため、Af の基礎となる心房の病理学的変化が軽度であると考えられる。臨床現場で遭遇する Af 患者では、拡張型心筋症、慢性弁膜症、心房中隔欠損症、僧帽弁狭窄症など心疾患が進行した状態で認められることが知られているため、心疾患に伴う心筋障害が存在することからも、本研究の結果と比較して、心房内の血液性状の変化が、より劇的である可能性がある。

5. 小括

第 3 章の慢性期実験では、心房に高頻度心房刺激を与えた Af モデル犬において、T-TAS を用いることにより Af 発現後の 1 週間後には心房内において血栓形成となる血液性状の変化が生じ、それが 3 週間持続することが明らかとなった。しかしながら、Af の発現後の急性期において、どのタイミングで、心房内あるいは末梢部位において、血液性状の変化が生じるかは現在のところ明らかになっていない。

本研究では、T-TAS を用いることにより、Af 発現 30 分という短時間で、心房血内において血小板機能と凝固能の亢進が生じることが明らかとなった。

犬において Af の急性期の心房血の血液性状の変化を調べた報告は本研究が初めてであり、短時間で血栓傾向傾向が認められたことは、臨床現場において Af が認められた場合には、より早期に抗血栓療法を開始したほうが良いという新たな治療方針を提示できた可能性が高い。

6. 図表

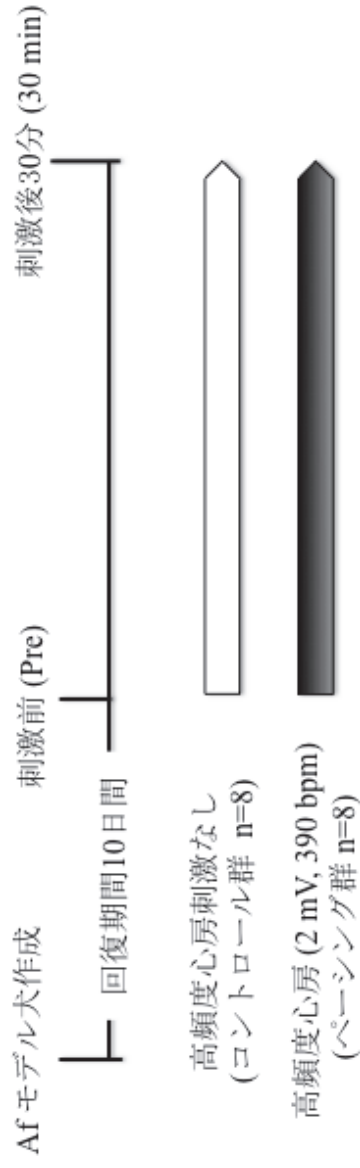


図 3-f. 実験のプロトコール

実験に用いたビーグル犬 16 頭のうち 8 頭に、全身麻酔下で心外膜ペースメーカーリードを埋め込んだ (ペーシング群)。残り 8 頭はペーシングを行わずに刺激前後での採血のみを実施した (コントロール群)。ペーシング群では、手術の影響を考慮して 10 日間の術後療養期間を設けた。その後、心房高頻度刺激前、刺激開始 30 分後の各時点において下記の手法によって、T-TAS 検査、血液凝固機能検査血液検査を実施した。

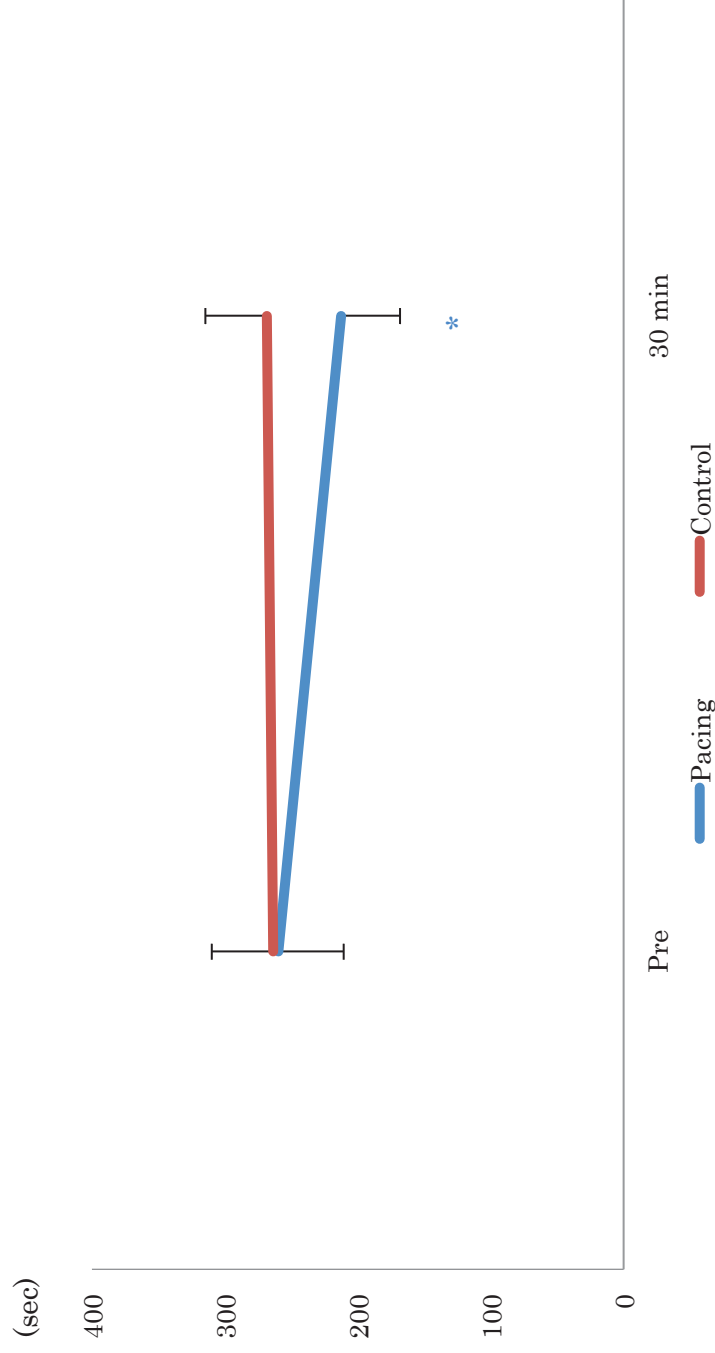


図 3-g ペーシング群とコントロール群における心房血の AR チップの OT

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* : ペーシング群において刺激前と比較して $p < 0.05$ で有意差あり

Pacing: ペーシングを実施した群 (390 bpm, 2mV, n=8)、**Control:** ペーシングを実施しなかった群 (n=8)、**Pre:** 高頻度心房刺激前、**30 min:** 高頻度心房刺激 30 分後 **AR:** 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、**OT:** 閉塞時間。

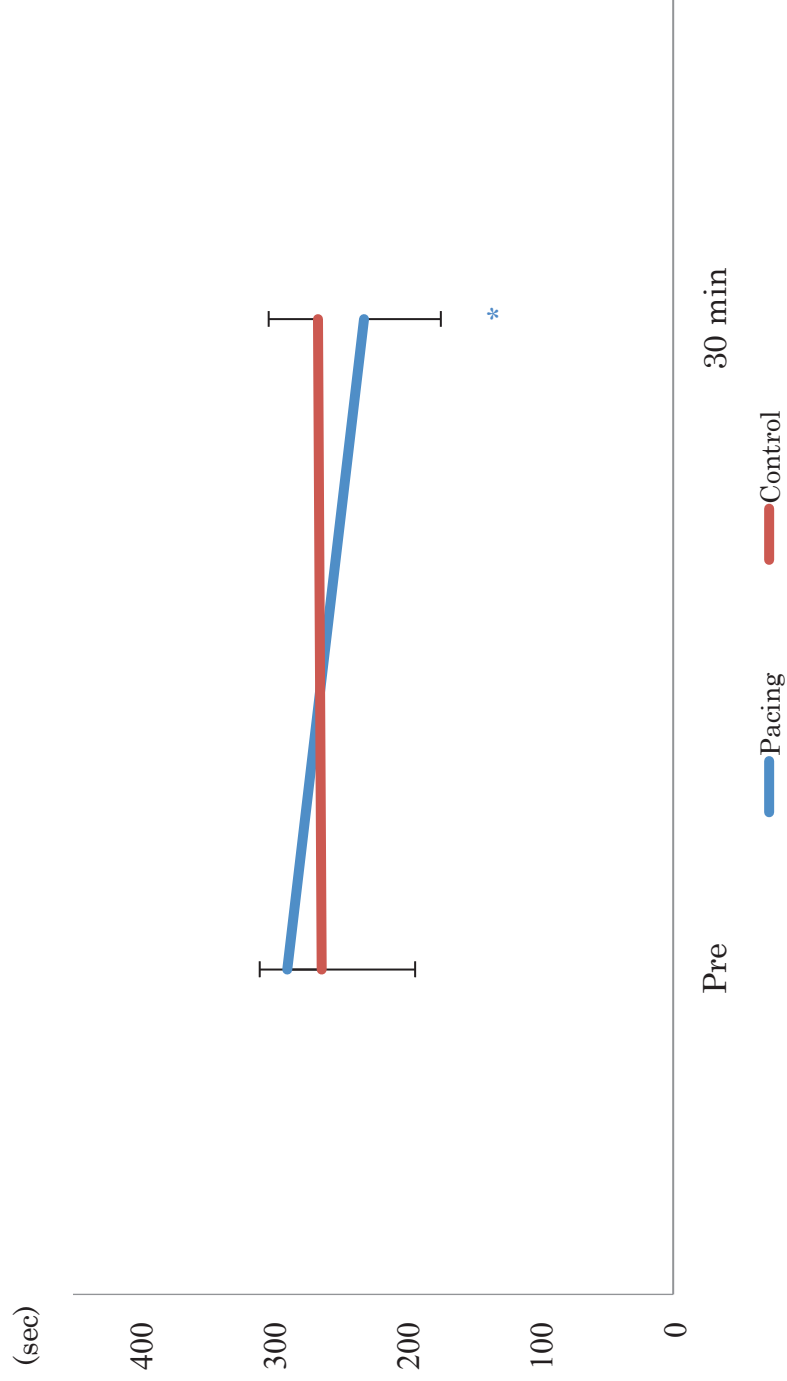


図 3-h. ペーシング群とコントロール群における心房血の PL チップの OT

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* : ペーシング群において刺激前と比較して $p < 0.05$ で有意差あり。

Pacing : ペーシングを実施した群 (390 bpm, 2 mV, n=8)、Control : ペーシングを行わなかった群 (n=8)、Pre : 高頻度心房刺激前、30 min : 高頻度心房刺激 30 分後 PL : 血小板機能を測定するチップ、OT : 閉塞時間。

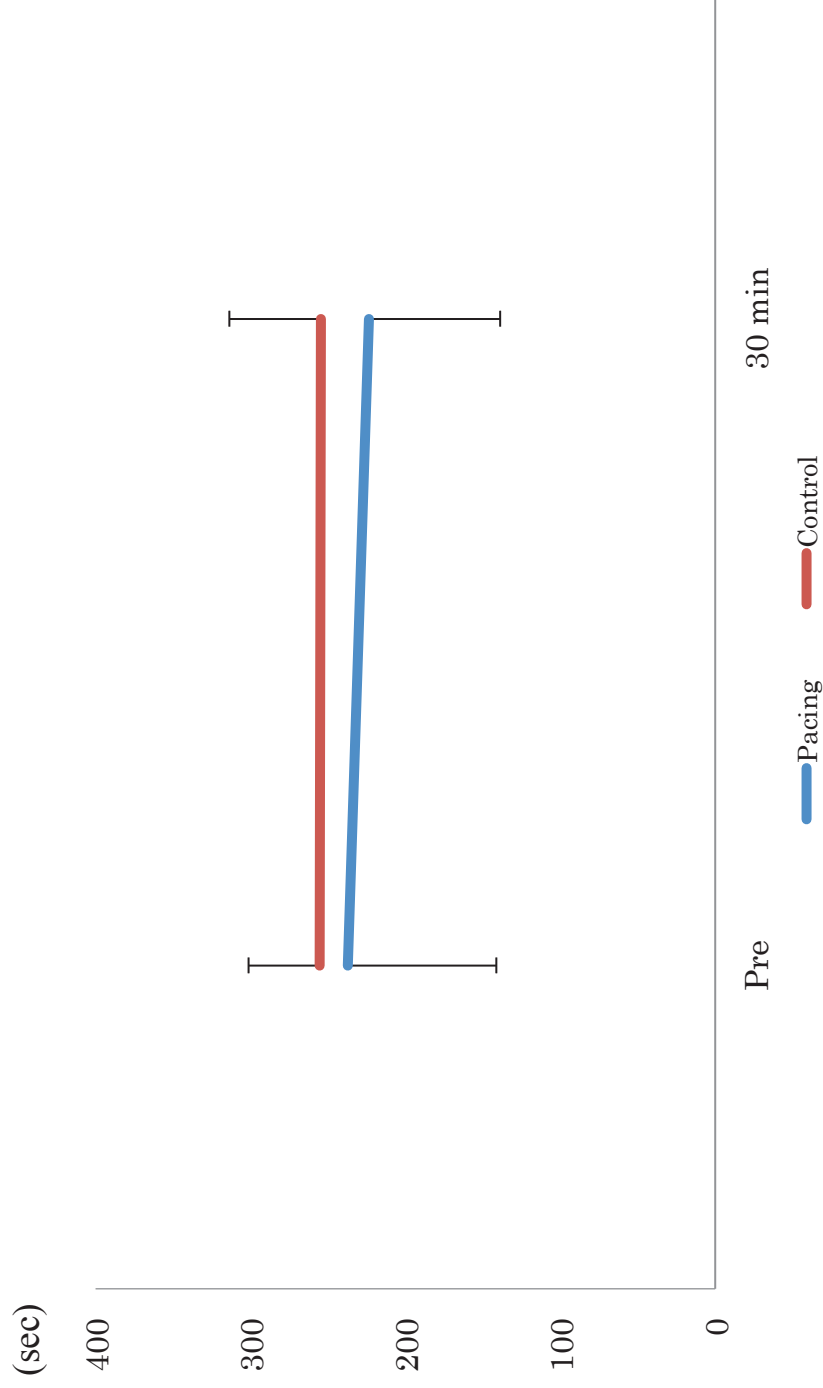


図 3-i. ペーシング群とコントロール群における末梢血の AR チップの OT 各測定値は、平均値 \pm 標準偏差で表した。Pacing : ペーシングを実施した群 (390 bpm, 2 mV, n=8)、Control : ペーシングを実施しなかった群 (n=8)、Pre : 高頻度心房刺激前、30 min : 高頻度心房刺激 30 分後 AR : 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、OT : 閉塞時間。

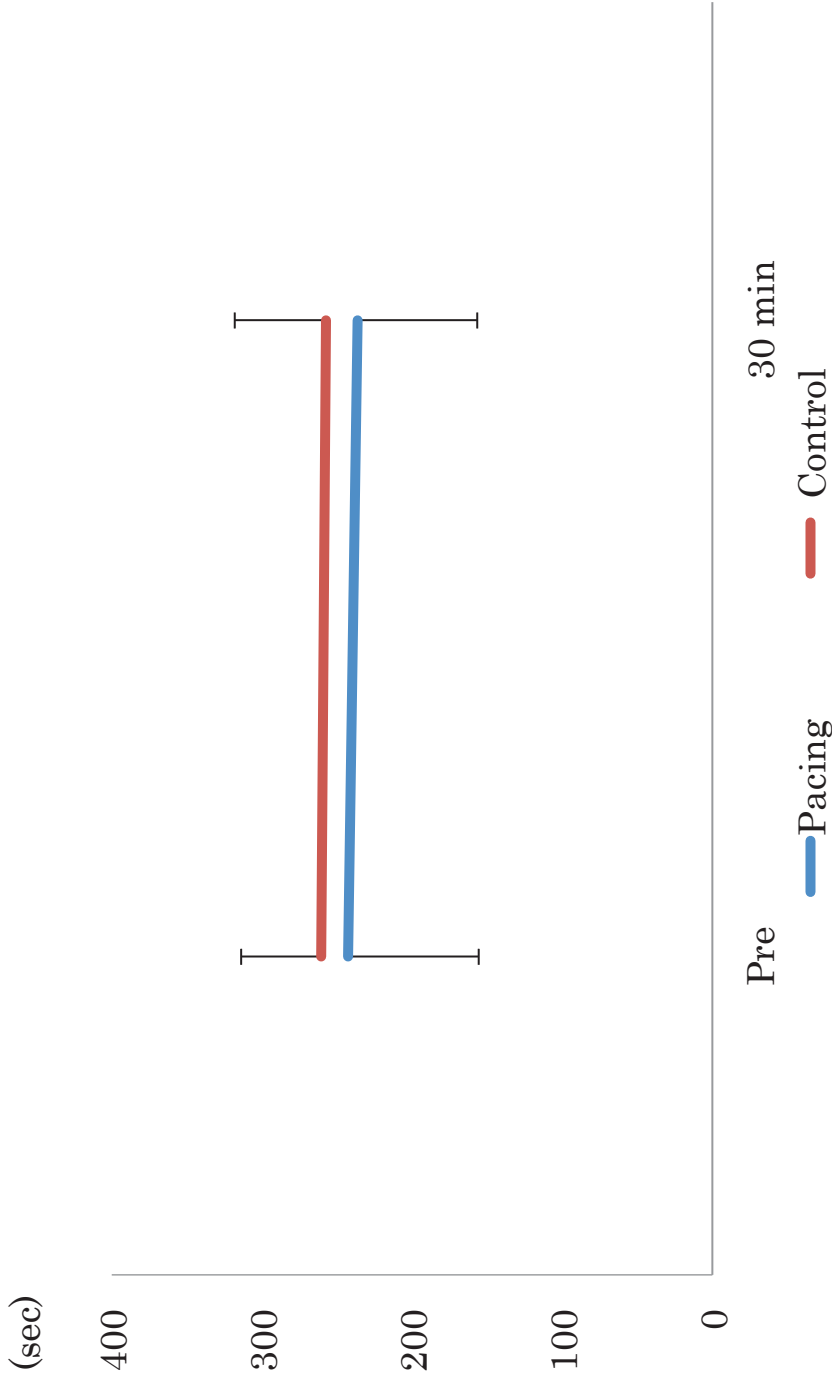


図 3-j. ペーシング群とコントロール群における末梢血の PL チップの OT 各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。Pacing : ペーシングを実施した群 (390 bpm, 2 mV, n=8)。Control : ペーシングを実施しなかった群 (n=8)。Pre : 高頻度心房刺激前、30 min : 高頻度心房刺激 30 分後 PL : 血小板機能を測定するチップ、OT : 閉塞時間。

	Pre	30 min
コントロール群 (n=8)	T ₁₀ (sec)	184.8±35.2
	OT (sec)	268.3±46.3
	AUC	2108.5±56.8
PL	T ₁₀ (sec)	121.6±21.6
	OT (sec)	266.3±37.1
	AUC	441.0±38.8
ペーシング群 (n=8)	T ₁₀ (sec)	194.5±47.5
	OT (sec)	212.4±44.3 *
	AUC	2164.3±53.0 *
PL	T ₁₀ (sec)	143.0±43.1
	OT (sec)	231.8±57.6 *
	AUC	426.0±42.4 *

表 3-f コントロール群とペーシング群における心房血の T-TAS 値の変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* : 刺激前と比較して $p < 0.05$ で有意差あり。コントロール群 : ペーシングを実施しなかつた群 (n=8)。ペーシング群 : ペーシングを実施した群 (390 bpm, 2 mV, n=8)。Pre : 高頻度心房刺激前、30 min : 高頻度心房刺激 30 分後、AR, chip : 凝固系と血小板機能を測定するチップ、PL, chip : 血小板機能を測定するチップ、T₁₀ : 閉塞開始時間、OT : 閉塞時間、AR チップでは +80 kPa、PL チップでは +60 kPa に到達した時間、AUC : 圧上昇曲線の下部領域面積。

		Pre	30 min
コントロール群 (n=8)	T ₁₀ (sec)	177.5±60.4	179.3±38.5
	AR	255.4±45.7	254.5±59.1
	AUC	2099.5±51.7	2106.2±44.2
PL	T ₁₀ (sec)	119.9±21.1	127.6±28.5
	OT (sec)	260.5±53.1	257.3±60.9
	AUC	426.2±35.5	425.2±51.8
ペーシング群 (n=8)	T ₁₀ (sec)	174.7±56.7	162.2±49.6
	AR	253.3±102.0	233.5±83.4
	AUC	2108.1±117.9	2134.0±87.0
PL	T ₁₀ (sec)	122.1±23.5	128.6±44.1
	OT (sec)	239.2±78.4	229.6±77.2
	AUC	424.7±43.2	429.1±57.7

表 3-g. コントロール群とペーシング群における末梢血の T-TAS 値の変化
各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。コントロール群：ペーシングを実施しなかった群 (n=8)。ペーシング群：ペーシングを実施した群 (390 bpm, 2 mV, n=8)。Pre : 高頻度心房刺激前、30 min : 高頻度心房刺激 30 分後、AR, chip : 凝固系と血小板機能を測定するチップ、PL, chip : 血小板機能を測定するチップ、T₁₀ : 閉塞開始時間、OT : 閉塞時間、AR チップでは+80 kPa、PL チップでは+60 kPa に到達した時間、AUC : 圧上昇曲線の下部領域面積。

	Pre	30 min
心房血	PT(sec)	7.9±0.3
	APTT(sec)	21.2±2.4
	Fibn(mg/dl)	210.4±35.2
末梢血	PT(sec)	7.8±0.3
	APTT(sec)	22.5±5.5
	Fibn(mg/dl)	223.0±42.2
心房血	PT(sec)	7.5±0.5
	APTT(sec)	17.5±1.9
	Fibn(mg/dl)	250.2±36.5
心房血	D-dimer(μg/ml)	1.46±1.0
	ATⅢ(%)	152.4±39.3
	PT(sec)	7.4±0.3
末梢血	APTT(sec)	18.3±3.5
	Fibn(mg/dl)	267.6±68.4
	Fibn(mg/dl)	256.3±51.4

表 3-h. コントロール群とペーシング群における心房血の血液凝固値の変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。コントロール群：ペーシングを実施しなかった群 (n=8)。ペーシング群：ペーシングを実施した群 (390 bpm, 2 mV, n=8)。Pre : 高頻度心房刺激前、30 min : 高頻度心房刺激 30 分後、PT : プロトロンビン時間(参考値, 7.4-8.8 s)、APTT : 活性化部分トロンボプラスチン時間(参考値, 12.0-28.8 s)、Fibn : フィブリノーゲン濃度(参考値, 150-350 mg/dl)、D-dimer : D-ダイマー (参考値 < 2.0 μg/dl)、ATⅢ : 抗凝固因子 (参考値, 102-156 %)。

第3章 高頻度心房刺激犬を用いた血液凝固能の評価

- 1) - 慢性期 (Af 開始 1, 2, 3 週間後) における血液凝固能の評価 -

1. 緒言

人医療において、心原性脳塞栓の原因のうち、非弁膜性心房細動 (non valvular Atrial fibrillation: NVAf) が占める割合は 45%と最も多く、大きな関心が注がれている (3, 63～65)。一方、獣医療において心房細動 (Af) による血栓塞栓症の報告は少なく (13, 14)、未だ研究が不十分である。

第 2 章の研究では、今回使用した Af モデル犬において、心房機能の低下や心房拡大により、心房内においてうっ血が生じることが判明した。Af 時には、主に左心耳に血栓が生じることが知られているが、これは、左房内のうっ血による血液性状の変化、特に凝固系の活性が生じることにより起因することが報告されている (6, 7)。凝固因子の一つである第IX因子は、血流速度の遅い左心耳などで活性化することが知られている (66)。また、人の Af 患者のうち、すでに血栓生成が認められているものでは、末梢血におけるフィブリノーゲン濃度 (Fibn : Fibrinogen) や第VIII因子などの凝固因子マーカーの高値化が報告されている (63, 67～70)。このように血液のうっ滞が生じる左房内では、凝固因子の活性化により、フィブリンを主とした血栓が形成されることが知られている。しかし、実際の Af 患者における心房内における血液性状の継時的変化を報告したものは認められない。また、犬の Af に関しては、人と同様に、Af が原因と考えられる血栓塞栓症が報告されているものの (13, 14)、Af 発現時における血栓形成のタイミングや血栓性状に関する情報はなく、明らかにされていない。

近年、全血血栓形成観測システム (Total Thrombus-formation Analysis System : T-TAS) という血栓止血検査機器が、より生体内に近い血流下での血小板機能と凝固因子機能を測定することを目的として医療用に開発され (20～22)、犬においても、その臨床応用の報告が認められている (29)。本研究は、従来からの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)、フィブリノーゲン濃度 (Fibn)、D-ダイマー (D-dimer)、抗凝固因子 (ATIII) などの血液凝固検査と、T-TAS を用いて、実験的に作成された Af 時の犬における心房内および末梢における血液凝固性状の継時的変化を比較検討し、血栓リスクを捉えることを目的とした。

2. 方法

2-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規定に準拠し遂行した。(承認番号: 第 27-39 号)

2-2. 供試動物

第 2 章と同様に、心臓に問題がないと診断した実験用ビーグル犬 8 頭を供試した。性別は雄および雌それぞれ 4 頭ずつ、年齢は 1~5 歳齢 (中央値: 2 歳齢)、体重は 9.0~12.5 kg (中央値: 10.8 kg) であった。

2-3. Af モデル犬の作成

第 2 章と同様の方法を用いて、ビーグル犬 8 頭に全身麻酔下で心外膜ペースメーカーリードを埋め込んだ。その後、ペースメーカーリードを体外式刺激装置に接続し、2 mV、390 bpm にて高頻度心房刺激を行い、これを Af モデルとした。

2-4. 実験プロトコール

第 2 章と同様の方法を用いて、手術の影響を考慮して 10 日間の術後療養期間を設けた。その後、心房高頻度刺激前 (Pre)、刺激開始 1 週間 (1w)、2 週間 (2w) および 3 週間 (3w) の各時点において下記の手法によって、T-TAS 検査、血液凝固機能検査、血液検査および血圧検査を実施した。血液検査および血圧検査は、各時点において、体外式刺激装置による刺激を一度停止してから 30 分経過後に行った (図 3-a)。

2-5. 検査

2-5-1. 採血方法

上記の Af モデル犬に、麻酔前投与薬として、硫酸アトロピン 0.05 mg/kg S.C、酒石

酸ブトルファノール 0.2 mg/kg I.V、ミダゾラム 0.2 mg/kg I.V を投与した後に、プロポフォル 6 mg/kg I.V で導入し、イソフルランで麻酔維持を行い、全身麻酔下においた。右側横臥位で保定し、左側頸部皮膚を約 4 cm 切開し、頸静脈を露出した。その後、5 Fr の栄養カテーテル（アトム栄養カテーテル 5 Fr：アトムメディカル株式会社、東京）を、頸静脈をカットダウンすることにより挿入し、X線透視下で位置を確認しながら右心房までカテーテルを進めた。カテーテルより右心房内の血液を採取したものを「心房血」とした。同麻酔条件下において外側伏在静脈より 20 G 翼状針を用いて採血したものを「末梢血」とした。

2-5-2. T-TAS による測定

T-TAS は全血を用い、血流ストレス存在下で血栓形成を数値的・視覚的に評価する総合的検査システムである。2種類の専用マイクロチップが存在し、PL チップは血小板機能を評価するチップであり、AR チップは凝固能および血小板機能を総合的に評価するチップである。各チップのマイクロ流路に心房血あるいは末梢血の全血サンプルを流入させ、マイクロ流路内における血栓形成による内圧上昇を測定した。内圧が基線より+10 kPa に到達した時点を閉塞開始時間（Time to 10 kPa 以下 T_{10} ）、PL チップでは基線より+60 kPa、AR チップでは+80 kPa の時点を閉塞時間（Occlusion Time 以下 OT）として、それらの時間および圧上昇曲線の下部領域面積（Area Under the flow pressure Curve 以下 AUC）を計測した。

2-5-3. 血液凝固能検査

2-5-3-1. PT、APTT、Fibn

上記の T-TAS に用いた採血方法によって採血した「心房血」および「末梢血」を用いた。全血 0.45ml に 3.2 %クエン酸溶液 0.05ml を添加した血液をチューブに分注し、小型微量遠心機（PMC-060：トミー精工、東京）を用いて、室温にて遠心分離（645×g・5 分間）を実施し血漿を得た後、直ちに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)、フィブリノーゲン濃度 (Fibn) を測定した。測定には、血液凝固分析装置 (WAKO Coag 2V : 和光純薬工業株式会社、東京) を使用した。

PT の測定には、PT・APTT 測定用希釈液 B 50 μ l (和光純薬工業株式会社、東京) と上記で得られたクエン酸加血漿 50 μ l を入れ混合し 2 倍希釈の血漿を作成した。その後、トロンボプラスチン試薬カード (ウサギ脳由来) の試料挿入部に、希釈検体 25 μ l を添加し測定した。APTT の測定には、PT 同様、PT・APTT 測定用希釈液 B 50 μ l (和光純薬工業株式会社、東京) と上記で得られたクエン酸加血漿 50 μ l を入れ混合し 2 倍希釈の血漿を作成し、その後、活性化部分プロトロンビン含有試薬カード (ウサギ脳由来) の試料挿入部に、希釈検体 25 μ l を添加し測定した。Fibn の測定には、フィブリノーゲン測定用希釈液 B 350 μ l (和光純薬工業株式会社、東京) と上記で得られたクエン酸加血漿 25 μ l を入れ混合し 15 倍希釈の血漿を作成した。その後、フィブリノーゲン試薬カード (ウシトロンビン) の試料挿入部に、希釈検体 25 μ l を添加し測定した。それぞれの参考値としては、和光純薬工業株式会社で得られた値 (変動係数 (CV) に関しては、PT、APTT、Fibn それぞれにおいて 10%以下の範囲、正確性に関しては、PT、APTT それぞれにおいて既知凝固時間の \pm 10%以内、Fibn では既知濃度の \pm 15%以内) を用いた。

2-5-3-2. D-dimer、ATIII

D-dimerおよびATIIIの測定は、上記の遠心分離したクエン酸血漿を、直ちに -80°C に冷凍保存したものをを用いた。それぞれの測定は、冷凍検体をまとめて集荷してもらい、富士フィルムモノリス株式会社において、以下の方法にて行った。

D-dimerは、ヒトフィブリンフラグメントD-dimer抗原に対して産生されたモノクローナル抗体に基づく免疫学的手法で検出される。本研究では、ラテックス免疫比濁法 (Latex turbidimetric immunoassay) (富士フィルムモノリス株式会社、東京) を使用した。抗ヒトD-dimerマウスモノクローナル抗体を感作したラテックス粒子に検体を反応させると検体中のD-ダイマーと抗ヒトD-dimerマウスモノクローナル抗体感作ラテックス

が抗原抗体反応を起こし、検体中のD-dimer濃度に比例してラテックス粒子が凝集する。この凝集の強さを波長500～800nmにおいて測定し、D-dimer濃度を求めた(71)。

ATⅢの測定には、合成基質法(Synthetic substrate method)(富士フィルムモノリス株式会社、東京)を使用した。ATⅢ活性は、検体中のATⅢを過剰のヘパリンと作用させ[ATⅢ・ヘパリン]複合体を導きさせた後、この活性化されたATⅢを一定過剰量のトロンビンに作用させると、複合体の量に見合った量のトロンビンと結合し失活する。残存するトロンビン活性を基質D-フェニルアラニル-プロリル-アルギニン-4-アセチルアラニド(NA-4100)を用いて測定することによって検体中のATⅢ活性を求めた。測定法は、レートアッセイ法にて行った(72)。

2-5-4. 完全血球計算(CBC)

EDTA採血管に分注した血液をよく攪拌した後、総白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素数(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、そして、総血小板数(PLT)を測定した。測定には動物向け全自動血球計算機(MEK-6450セルタックα:日本光電、東京)を使用した。

2-5-5. 血液化学検査

ヘパリンチューブに分注した血液を、小型微量遠心機(PMC-060:トミー精工、東京)を用いて遠心分離(645×g・5分間)して血漿を得た後、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミラーゼ濃度(GPT)、総蛋白(TP)、アルブミン(ALB)の各地を測定した。それぞれの測定には動物用血液化学分析装置(富士ドライケム7000:富士フィルムメディカル、東京)を使用した。

2-5-6. 電解質検査

ヘパリンチューブに分注した血液を、小型微量遠心機(PMC-060:トミー精工、東

京) を用いて室温にて遠心分離 (645×g・5 分間) を実施し血漿を得た後、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl) を測定した。測定にはイオン選択制分析装置 (富士ドライケム 800 : 富士フィルムメディカル、東京) を使用した。

2-5-7. 血圧検査

血圧測定は、オシロメトリック法を測定原理とした、動物用非観血的血圧計 (BP-100D : Fukuda ME Kogyo CO., Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。測定部位は、尾根部とし、カフ幅は測定部位周辺の 40~60 %幅とした (73)。収縮期動脈圧 (SAP ; systolic arterial blood pressure)、平均動脈圧 (MAP ; mean arterial blood pressure)、および拡張期動脈圧 (DAP ; diastolic arterial blood pressure) を 3 回計測し、その平均値をもって測定値とした。また、参考値は、Coulter らの値を用いた (74)。Pre、1w、2w および 3w の各時点において、体外式刺激装置による刺激を一度停止し、30 分経過後に測定をおこなった。

2-5-8. 統計解析

測定値は平均値±標準偏差で示した。各時点における計測値が正規分布しているかどうかを確認するための正規確率プロットを作成し、シャピロ・ウィルク検定およびコルモゴロフ・スミルノフ検定を用いて、分布の正規性の検定を行った。

データが正規分布する場合は、One-way ANOVA を行い、Dunnet test によって多重比較を行った。正規分布しない場合には、Freedman's test を行い、Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction によって多重比較を行った。p<0.05 を統計学的有意であると判断した。

3. 結果

3-1. T-TAS 検査

(a) 心房血

心房血の AR チップにおいて、OT と T₁₀ は Pre と比較して、1w、2w、3w においてそれぞれ有意に短縮した (いずれも $p < 0.05$)。AUC は Pre と比較して、1w、2w、3w においてそれぞれ有意に増加した (いずれも $p < 0.05$) (図 3-b)。心房血の PL チップにおいて、OT は Pre と比較して、刺激後に徐々に短縮傾向を示し、3w に有意に短縮した (いずれも $p < 0.05$)。T₁₀ は Pre と比較して、1w、2w、3w の全てにおいて短縮傾向は示したが、有意な変化はみられなかった。AUC は、3w に有意に上昇した。 ($p < 0.05$) (図 3-c) (表 3-a)。

(b)末梢血

末梢血においては、AR チップ、PL チップ共に全ての項目で有意な変化はみられなかった (図 3-d, 図 3-e) (表 3-a)。

3-2. 血液凝固機検査

(a)心房血

心房血の APTT において、Pre と比較して、1w、2w、3w のそれぞれにおいて有意に延長したが、いずれも参考値の範囲内での変化であった。PT、Fibn、D-dimer、ATIII の他の項目については参考値範囲内を推移し、有意な変化は見られなかった (参考値 PT : 7.4 秒~8.8 秒、APTT : 12.0~28.8 秒、Fib : 150~350 mg、D-dimer : 2 μ g/ml、ATIII : 102~156 %) (表 3-b)。

(b)末梢血

末梢血においては、いずれの項目においても有意な変化はみられなかった (参考値 PT : 7.4 秒~8.8 秒、APTT : 12.0~28.8 秒、Fib : 150~350 mg、D-dimer : 2 μ g/ml、ATIII : 102~156 %) (表 3-b)。

3-3. 完全血球計算 (CBC)

いずれの項目においても、有意な変化は確認されなかった。(表 3-c)

3-4. 血液化学検査および電解質検査

いずれの項目においても、有意な変化は確認されなかった。(表 3-d)

3-5. 血圧検査

SAP、MAP および DAP いずれにおいても、Pre と比較して、1w、2w、3w においてそれぞれ有意に低下した ($p<0.05$) (表 3-e)。

4. 考察

第 2 章の研究により、血栓症の発症要因として Virchow の 3 要因、すなわち 1) 血流の変化、2) 血管壁の性状変化、および 3) 血液成分の変化 (30~32) のうち、血流の変化、つまり心房内におけるうっ血が生じることが明らかとなった。人の Af 発現時には、心房内、とくに左心耳における血液のうっ滞と凝固系の亢進により、血栓が形成されることが知られている (33)。実際、人の Af 患者の心エコー検査において、左心房内に「もやもやエコー像 (Spontaneous echo contrast : SEC)」が確認されることがある (75)。この SEC の本体は、赤血球とフィブリノーゲンを介した連鎖形成であり、このような血液性状の変化が血栓形成に先駆けて観察されることが多い (76)。本研究においては、モデル動物の 1 頭にのみ心房内で、SEC が観察された。この症例では、刺激 3 週目において SEC が観察され、その心房血の値は、それぞれ PL の OT が 223 秒、AR の OT

が 176 秒と、他の個体と比較して、AR の短縮が認められた。このことから SEC は、フィブリノゲンを主体としたものの可能性が考えられた。

人の慢性の Af 患者における D-dimer の上昇は、血栓形成を確認するために有用であると考えられている (77~79)。本研究において、使用した D-dimer はラテックス免疫比濁法 (Latex turbidimetric immunoassay) であり、これは、抗ヒト D-dimer 抗体を用いている。また、今回使用したヒト用 D-dimer 測定試薬が動物検体と反応し、定量的評価が可能であることが判明しており、臨床的な有用性も確認されている (71)。心房内の D-dimer で増加傾向がみとめられたものの、有意な変化ではなかった。その原因として、心房内において凝固因子が活性化し、循環フィブリンからの D-dimer の増加は生じるものの、3w という期間では、可視化できるほどの血栓形成には至ってなかったものと考えられる。

また今回、心房血の ATIII では、刺激後どの時点においても有意な変化は認められなかった。本研究での ATIII 活性は、レートアッセイ法を用いて物質の活性を測定しているため、犬の検体においても ATIII 活性を測定することが可能であり、動物での交差性も証明されている (72)。

今回、本研究では、有意差は認められなかったが、心房血において 1w および 2w において D-dimer 値の上昇傾向と ATIII の低下傾向が示された。この理由として、心房内のうっ血による血栓性の亢進 (もしくは血栓形成傾向 : thrombogenesis) の結果により、分解産物である D-dimer が増加し、またそれに伴う凝固因子である ATIII が消費した結果であると考えられる。

APTT は、内因系凝固経路および共通経路における因子活性を反映ために、スクリーニング検査で用いられる (15~19)。本研究では、「心房血」の APTT が参考値範囲内ではあるものの 1w に有意な延長を示し、それが 3w まで維持された。また、この結果は、T-TAS において凝固因子機能を評価する AR チップの OT 短縮の継時的変化と一致していた。よって、APTT の延長は、心房内において凝固因子機能が活性化することで、凝固因子が消費されたことに起因するものと考えた。しかし、延長していた APTT の値は、

いずれも参考値の範囲内での変化であったため、出血傾向にまで陥っていた訳ではないこと判断した。一方、PTは、研究期間を通して有意な変化は認められなかった。

上述した各種凝固系の項目は、凝固カスケード全体の一部における反応がどの程度生じているかを評価するためには有用であると考えられる(15~19)。しかし、これらの評価は、試験管内での反応をつなぎ合わせたものにすぎない。実際の生体反応下での止血と出血は、多くの共通因子により制御され、血栓形成(血小板活性と凝固因子活性)と線溶系からなる複雑な反応である。このことが従来からの凝固系検査では、血栓形成のモニタリングを難しくしてきた要因であると考えられる。近年、ROTEMやT-TASなどの全血を利用する凝固系検査が注目されている(20~22, 29, 80)。T-TASでは、流速を変化させながら抗凝固処理した全血を模擬血管であるマイクロ流路に流すことで、流路内のコラーゲンや組織因子が検体の一部を活性化し、それが引き金となり生体内で起こる生理的な血栓形成を引き起こすことが可能な機器である。そのため、今まで評価できなかった血栓形成能の評価がT-TAS検査では評価できるものと考えられている(20~22)。

うっ血など血流速度が遅い部位において、赤血球エステラーゼによる第IX因子等の凝固因子の活性が引き起こされることが知られている。本研究では、「心房血」において、ARチップのOTが刺激前と比較して、1wという早期から有意な減少を示し、それが3wまで維持された。これは、Afの発生により、心房内における血液のうっ滞が生じた結果、凝固因子の活性が生じたことが考えられた。一方、PLチップのOTでは3wにおいてのみ有意な減少がみられた。この結果から、Afが持続することで心房内の内皮障害が生じ、露出したコラーゲンとフォンヴィレブランド因子(vWF)の伸展により、血小板機能の活性による血栓形成能の亢進が維持されるものと考えた。また、本研究では「心房血」の採血は右心房内から実施したが、これは、左心房のペーシングリードのフックによる細胞障害に起因する血栓形成の影響をなくすため、また採血のし易さなどを考慮した結果であるが、このことは、左心耳ペーシングであっても、その刺激が右心房まで伝導し、右心房においても血液凝固の亢進が生じるということを明らかにした。

我々が知る限り、これまで Af 発現時の心房内と末梢部位における血液性状の変化を比較した報告は認められていない。今回、心房内においてのみ劇的な血液性状の変化が観察されたが、末梢部位ではいずれの検査項目においても有意な継時的変化は認められなかった。この理由として、末梢部位では心房と比較して血液の淀みが少ないことや、細動という物理的な刺激による血管内皮障害が少ないことなどが推測される。心房内では、血液のうっ滞により、赤血球エステラーゼによる第IX因子の活性化が生じるが、血流速度が速い末梢血管内では、それが引き起こされなかったと考えられた。また、末梢血管内では内皮障害によるコラーゲンの露出が起こりにくいため、血小板凝集も惹起されないと考えられた。たとえ、内皮障害が存在し vWF が血管外のコラーゲンと結合したとしても、動脈と比較し流れが緩やかな状態であるため、vWF の伸展は起きにくく、vWF を介した血小板の活性化も惹起されにくいと考えられる。また、血管内皮細胞が障害されていない状況であれば、内皮細胞に存在するトロンボモジュリンやプロテイン C 等の抗血栓活性物質により、活性化された凝固因子は速やかに不活化されると考えられた。

人医療では、高血圧患者や血管障害を有する疾患患者における Af 時の血栓形成リスクは増大する (70, 81, 82)。また、犬の Af の基礎疾患である僧帽弁閉鎖不全症や拡張型心筋症の臨床例よりも、基礎となる心房の病理学的変化が軽度であると考えられる。今回のモデルでは、健常かつ 1 歳～5 歳という若齢の個体を使用したため、高血圧症や血管障害も認められず、明らかな血栓形成には至らなかったと考えられる。

以上の結果から、人の Af 状態でも同様に、末梢血での凝固異常が認められない場合でも、心房内での凝固亢進状態に陥っている可能性が強く示唆される。

5. 小括

今回の研究から、犬のAf発現後の1週間後には心房内において血栓形成となる血液性状の変化が生じ、それが3週間持続することが明らかとなった。また、それには凝固機能の活性化が血小板機能の活性化に先行することも判明した。

本研究では、心房血においてのみ劇的な血液性状の変化が観察されたが、末梢血ではいずれの調査項目においても有意な継時的変化は認められなかった。この理由として、末梢では血液の淀みが少ないことや細動という物理的な刺激による血管内皮障害が少ないことなどが推測される。

本研究で用いた心房血は右心房からの採血を行ったことから、左心耳ペーシングであっても、その刺激は右心房まで伝導し、右心房での血液凝固の亢進が生じることが判明した。

犬においてAfが認められた場合には、末梢部位での血液凝固性状の変化が認められない場合でも、心房内では、すでに血栓形成傾向である可能性があるため、Af発現後直ちに抗血栓療法を開始する必要があるという結論に至った。

6. 図表

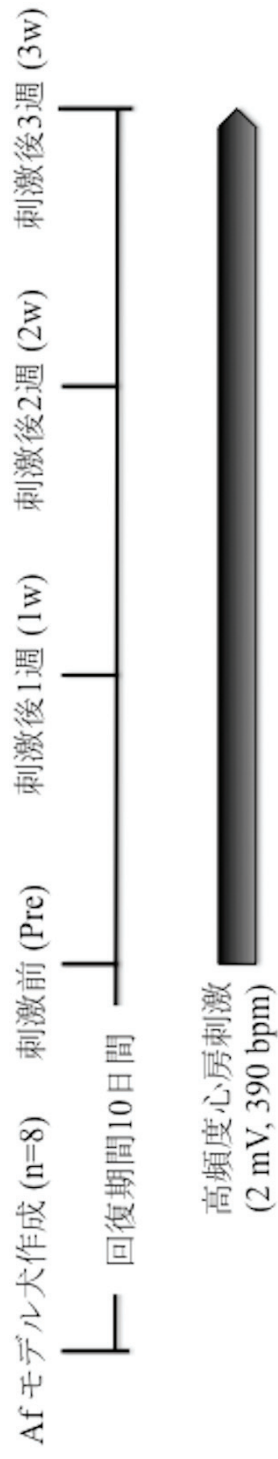


図 3-a. 実験のプロトコール

Afモデル犬作成後、手術の影響を考慮して10日間の術後療養期間を設けた。その後、心房高頻度刺激前 (Pre)、刺激後1週 (1w)、2週 (2w) および3週 (3w) の各時点において、T-TAS 検査、血液凝固機能検査血液検査および血圧検査を実施した。

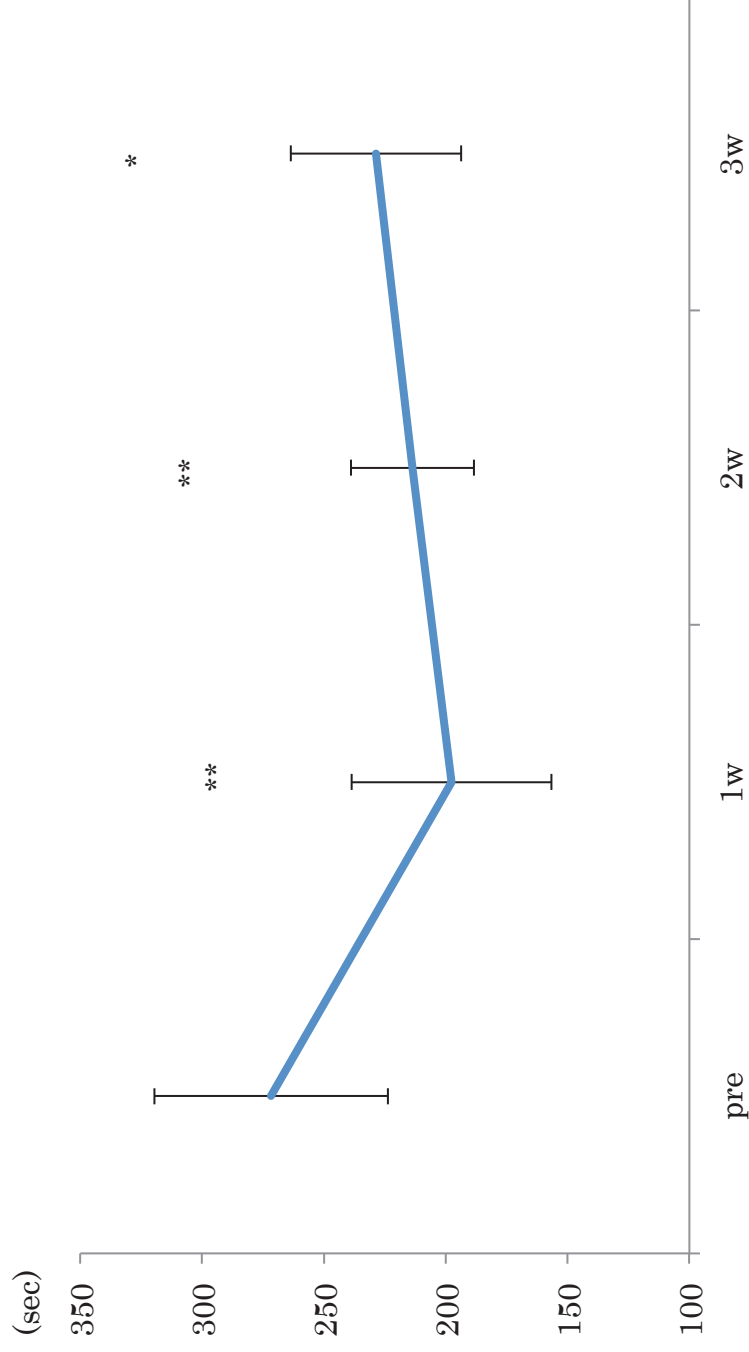


図 3-b. 心房血の AR チップの OT の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* : 刺激前と比較して $p < 0.05$ で有意差あり、** : 刺激前と比較して $p < 0.01$ で有意差あり。

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、AR: 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、OT: 閉塞時間。

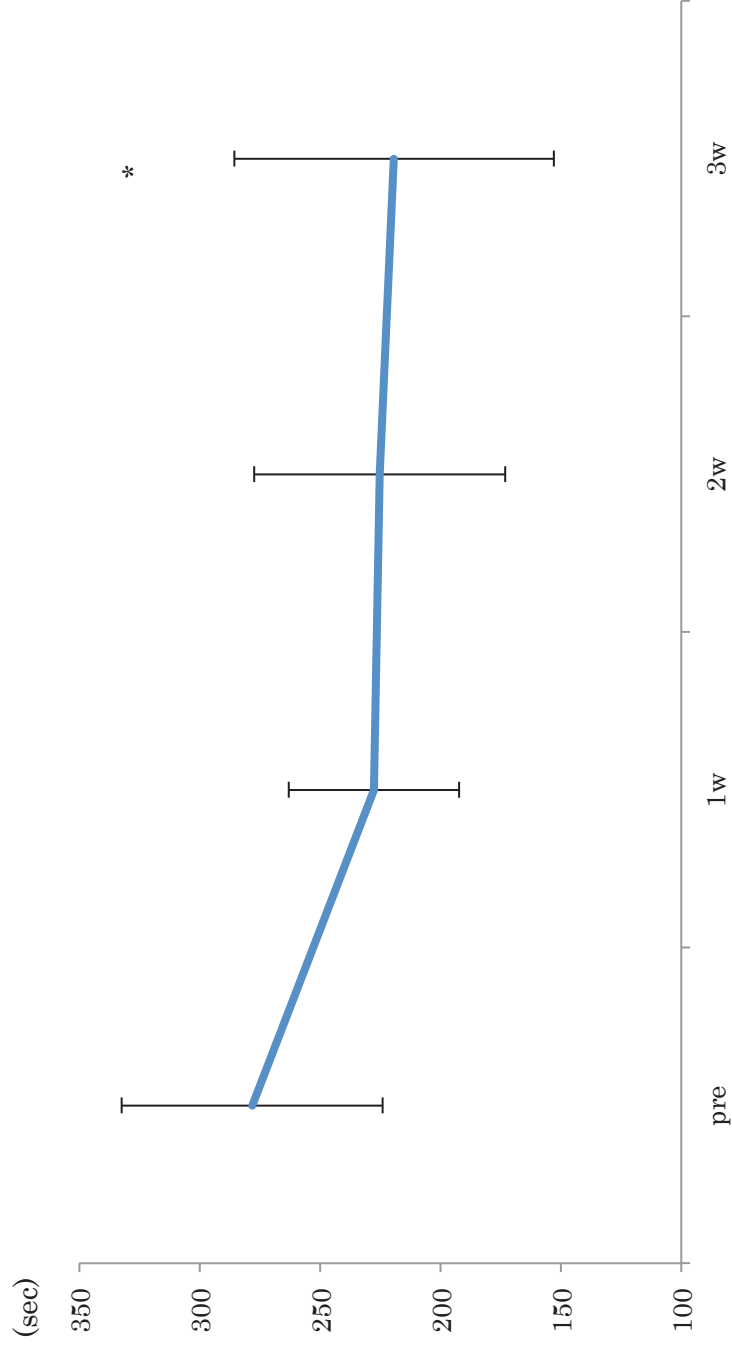


図 3-c. 心房血の PL チップの OT の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均 ± 標準偏差で表した。* : 刺激前と比較して $p < 0.05$ で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、Pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、PL: 血小板機能を測定するチップ、OT: 閉塞時間。

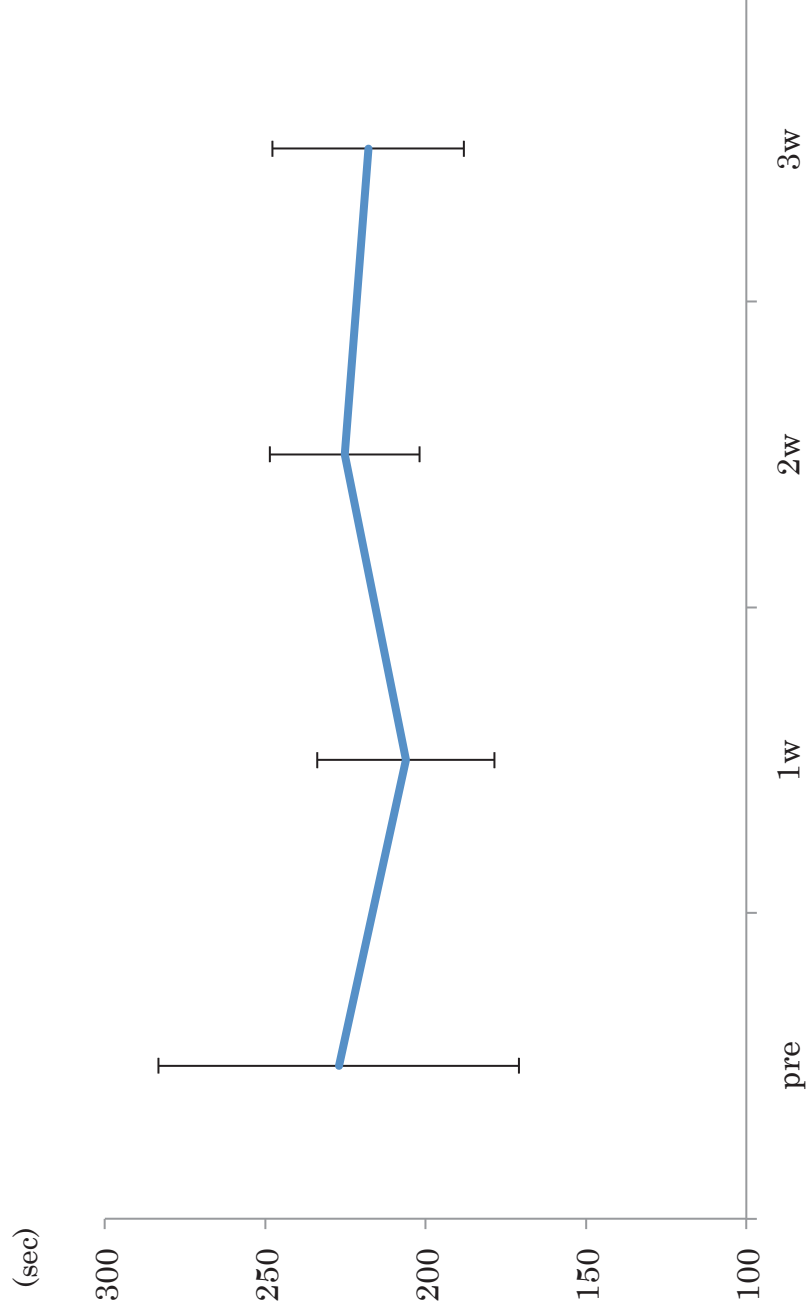


図 3-d. 末梢血の AR チップの OT の経時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、AR: 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、OT: 閉塞時間。

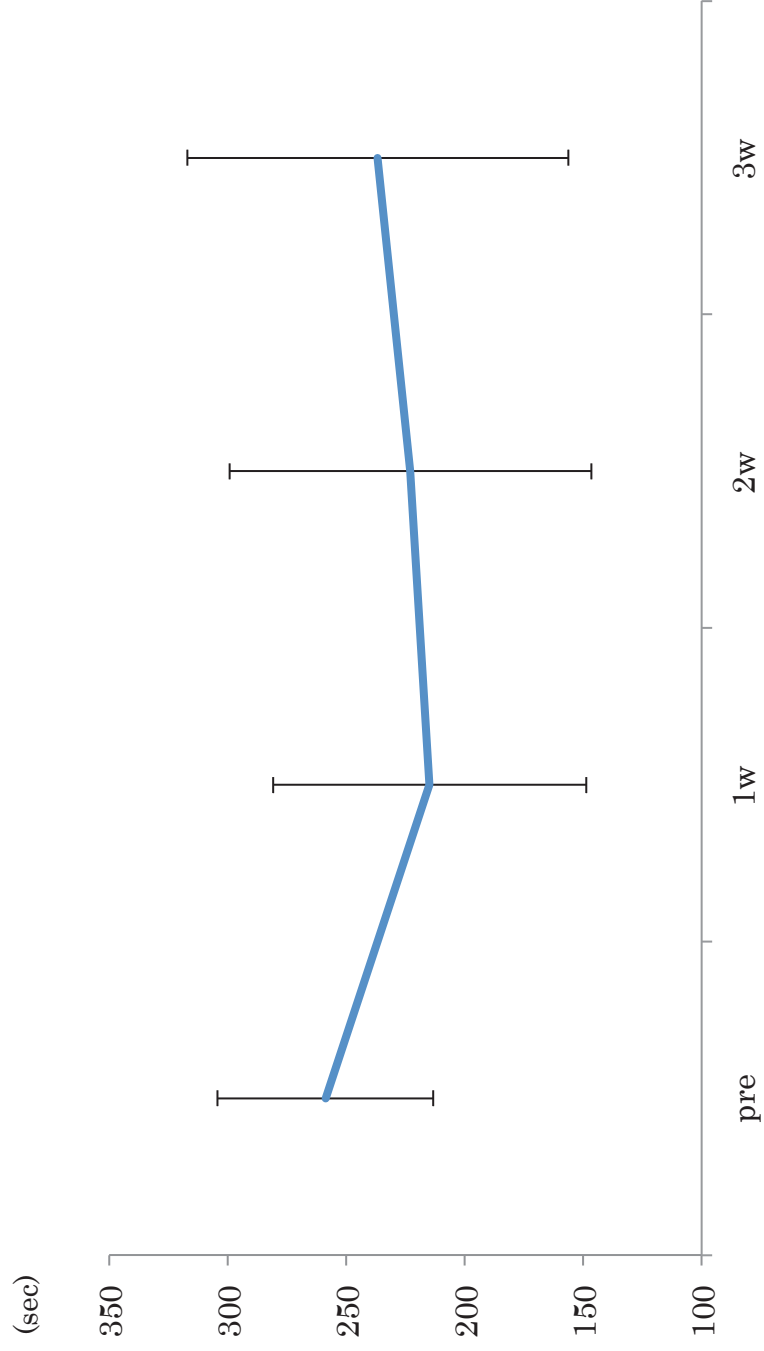


図 3-e. 末梢血の PL チップの OT の継時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、Pre : 高頻度心房刺激前、1w : 心房刺激 1 週間後、2w : 心房刺激 2 週間後、PL : 血小板機能を測定するチップ、OT : 閉塞時間。

	Pre	1w	2w	3w
AR T ₁₀ (sec)	195.4±37.6	141.5±26.8**	155.5±21.7*	168.1±34.4
AR OT(sec)	271.6±43.6	197.6±47.1**	213.6±23.0**	228.6±32.1*
AR AUC	2073.3±54.4	2170.2±56.1**	2150.1±28.5**	2134.3±44.3*
PL T ₁₀ (sec)	151.9±36.8	132.4±35.3	146.1±54.1	129.9±28.4
PL OT(sec)	278.1±62.8	227.6±24.1	225.3±29.2	219.3±78.1*
PL AUC	394.3±37.6	432.2±25.4	437.7±25.3	439.3±48.9*
AR T ₁₀ (sec)	161.6±36.1	144.3±18.3	155.3±32.4	158.5±31.4
AR OT(sec)	227.0±61.7	206.1±28.6	225.3±16.6	217.9±25.2
AR AUC	2133.0±75.1	2162.4±28.1	2143.0±27.1	2147.5±35.7
PL T ₁₀ (sec)	141.1±50.8	133.4±54.4	137.5±43.5	133.0±48.5
PL OT(sec)	258.8±49.6	214.8±70.8	222.9±73.1	236.6±93.9
PL AUC	413.0±48.0	446.5±57.9	431.5±47.8	428.2±67.1

心房血

末梢血

表 3-a. Af 発現前後における T-TAS 検査項目の経時的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* : 刺激前と比較して p<0.05 で有意差あり、** : 刺激前と比較して p<0.01 で有意差あり

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、T₁₀: 閉塞開始時間、OT: 閉塞時間、AUC: 圧上昇曲線の下部領域面積、AR: 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、PL: 血小板機能を測定するチップ。

		Pre		
		1w	2w	3w
心房血	PT (sec)	7.1±0.1	7.6±0.1	7.7±0.1
	APTT (sec)	18.2±1.3	24.1±2.2 *	22.8±2.5 *
	Fibn (mg/dl)	275±34	258±9	259±103
	D-dimer (μg/dl)	1.5±1.0	3.3±1.4	5.0±5.8
	ATIII (%)	154.3±42.7	140.6±50.8	131.8±45.9
末梢血	PT (sec)	7.5±0.3	7.7±0.3	7.7±0.2
	APTT (sec)	20.4±2.6	19.8±3.3	21.7±2.8
	Fibrinogen (mg/dl)	313±101	253±33	314±127
				308±87

表 3-b. Af 発現前後における心房血と末梢血の血液凝固検査項目の継続的変化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* : 刺激前と比較して、p<0.05 で有意差あり。

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、PT: プロトロンビン時間 (参考値, 7.4-8.8 s)、APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間 (参考値, 12.0-28.8 s)、Fibrinogen: フィブリノーゲン (参考値, 150-350 mg/dl)、D-dimer: D-ダイマー (参考値<2.0 μg/dl)、ATIII: 凝固因子 (参考値, 102-156%)。

	Pre	1w	2w	3w
WBC($10^2/\mu\text{l}$)	103±29	103±27	112±28	86±14
RBC($10^4/\mu\text{l}$)	652±76	662±84	661±101	657±94
HGB(g/dl)	14.8±1.7	15.0±1.7	14.4±1.3	14.8±2.0
HCT (%)	41.5±5.0	42.0±5.1	42.0±5.7	41.4±5.5
MCV(fl)	63.6±2.5	63.5±2.1	63.6±2.0	63.1±2.5
MCH(pg)	22.7±0.8	22.6±0.7	22.0±2.3	22.5±0.8
MCHC(g/dl)	35.6±0.5	35.6±0.7	34.6±3.3	35.8±0.9
PLT($10^4/\mu\text{l}$)	43.4±13.2	48.6±19.2	54.8±14.5	50.9±9.6

表 3-c. Af 発現前後における末梢血の完全血球計算 (CBC) の継続的変化 (n=8)
各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、WBC: 総白血球数、RBC: 総赤血球数、HGB: ヘモグロビン濃度、HCT: ヘマトクリット値、MCV: 平均赤血球容積、MCH: 平均赤血球ヘモグロビン量、MCHC: 平均赤血球ヘモグロビン濃度、PLT: 血小板数。

	Pre	1w	2w	3w
BUN (mg/dl)	15.0±6.4	16.0±5.0	16.7±8.9	16.0±5.5
Cre (mg/dl)	0.7±0.3	0.6±0.1	0.6±0.2	0.6±.1
ALT (U/l)	58±26	41±12	47±12	49±10
TP (g/dl)	6.5±0.7	6.3±0.4	6.5±0.5	6.4±0.7
Alb (g/dl)	3.0±0.3	2.9±0.3	3.0±0.3	2.9±0.2
Na (mmol/l)	148±1	148±2	147±3	148±3
K (mmol/l)	4.0±.2	3.9±0.3	4.0±0.2	4.2±0.3
Cl (mmol/l)	113±4	114±4	114±2	115±3

表 3-d. Af 発現前後における末梢血の血液化学検査および電解質検査の継時的変化 (n=8)
各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、BUN: 血清クレアチニン濃度、Cre: 血清尿素窒素濃度、ALT: 血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度、TP: 血清総タンパク濃度、Alb: 血清アルブミン濃度、Na: 血清ナトリウム濃度、K: 血清カリウム濃度、Cl: 血清クロール濃度。

	pre	1w	2w	3w
SAP (mmHg)	149.9±15.1	133.8±11.9*	136.2±14.1*	132.8±15.2*
MAP (mmHg)	117.1±12.3	100.1±13.6**	104.5±10.8*	100.0±12.5**
DAP (mmHg)	100.7±12.3	85.4±12.5*	88.2±0.6*	84.6±12.1*

表 3-e. Af 発現前後における血圧の継続的变化 (n=8)

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。* : 刺激前と比較して、p<0.05 で有意差あり、** : 刺激前と比較して、p<0.01 で有意差あり。

pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、SAP: 収縮期血圧 (参考値: 144 ± 27 mmHg), MAP: 平均血圧 (参考値: 110 ± 21 mmHg), DAP: 拡張期血圧 (参考値: 91 ± 20 mmHg)。

第4章 高頻度心房刺激犬を用いた抗血栓治療の評価

1) -抗凝固薬（ダルテパリン）による抗血栓治療の評価-

1. 緒言

人医療において、Afの持続により、心房内膜は線維細胞性に肥厚し、血栓形成傾向が増加すると考えられている(92)。人医療において、心房細動により左房内に生じた血栓は、本質的には静脈血栓、すなわち凝固成分から生じるフィブリン血栓が主な成分であることが言われてきたが、近年では血小板が混合した混合血栓であると考えられている(89)。その抗血栓療法に関しては、血栓形成において凝固因子が強く関与しているため、従来よりワーファリン等の抗凝固薬が用いられてきた(93~95)。実際に人の非弁膜性Af症例における大規模臨床試験では、いずれもワルファリンの有効性が示されている(96~100)。これらの臨床試験では、ワルファリンによる抗血栓効果はプラセボに比べて68%の抑制が可能であるとされている(101)。一方、獣医療における血栓形成に関しては、その機序や血栓成分に関する報告がなく、その組成は明らかではない。また、その治療に関しての明確なガイドラインも存在しない。獣医療におけるワルファリン療法には、煩雑さや制約が伴うため、血栓症に対してワルファリンが選択されることは少ない。その理由として、ワルファリンの薬効は個体差が大きく、使用時には頻回に凝固モニタリングおよび薬用量の調節を行う必要があり、さらに他の抗凝固薬より副作用が強いことが挙げられる(102~104)。また、ワルファリンと相互作用を示す薬剤は多種多様に存在し、併用により出血リスクを生じる薬剤に、ステロイド、抗菌薬、抗不整脈薬、抗悪性腫瘍薬など多くが知られている(105)。以上のように、犬におけるAf由来の血栓に関する情報は人医療のように豊富ではなく、主に選択される治療薬も異なるため、獣医療にて使用されるAf時の抗血栓薬の用法・用量については明らかではない。

第5章1部のダルテパリンの研究では、第3章の慢性期の実験を対照群(コントロール群)として、抗凝固薬であるダルテパリンを投与する(ダルテパリン群)ことで、犬のAf時の血栓形成傾向に対する心房内と末梢部位における抗凝固作用をT-TASを使用して調べることにした。

2. 方法

2-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規定に準拠し遂行した。(承認番号:第27-39号)

2-2. 供試動物

第2章と同様に、健康的であると診断した実験用ビーグル犬15頭を供試した。第3章の慢性期で用いた犬8頭をコントロール群とし、残り7頭をダルテパリン群とした。ダルテパリン群では、性別は、雄7頭、および雌8頭ずつ、年齢は1~5歳齢(中央値:2歳齢)、体重は8.6~12.0 kg(中央値:10.2 kg)であった。

2-3. モデル犬の作成

第2章と同様の方法を用いて、ビーグル犬15頭に全身麻酔下で心外膜ペースメーカーリードを埋め込んだ。その後、ペースメーカーリードを体外式刺激装置に接続し、2 mV、390 bpmにて高頻度心房刺激を行い、これをAfモデルとした。

2-4. 投与薬剤

ダルテパリン群では、Af開始と同時に抗凝固薬であるダルテパリン(ダルテパリンナトリウム フラグミン静注:ファイザー株式会社、東京)を150 IU/kg、TID(8時、16時、24時)で皮下注射を行った。この投与方法および薬用量は、Smith, S.A. (2012). Antithrombotic therapy. Top. Companion. Anim. Med. 27, 88~94. (107)を参考に薬用量を決定した。

2-5. 実験プロトコール

第2章と同様の方法を用いて、手術の影響を考慮して10日間の術後療養期間を設けた。第3章の慢性期で用いた犬8頭をコントロール群(無投薬群)とした。一方、ダルテ

パリン群では、残り 7 頭にペーシング開始と同時に 3 週間にわたりダルテパリン（ダルテパリンナトリウム フラグミン静注：ファイザー株式会社、東京）を 150 IU/kg、TID（8 時、16 時、24 時）で皮下注射を行った。高頻度心房刺激前（Pre）、刺激開始 1 週後（1w）、2 週後（2w）および 3 週後（3w）の各時点において下記の手法によって、T-TAS 検査、血液凝固機能検査および血液検査を実施した（図 4-a）。

2-6. 検査手順

2-6-1. 採血方法

第 2 章と同様の方法を用いて、コントロール群ならびにダルテパリン群の Af モデル犬に、全身麻酔下において、5 Fr の栄養カテーテルを、頸静脈より挿入し、X 線透視下で位置を確認しながら右心房までカテーテルを進めた。カテーテルより右心房内の血液を採取したものを「心房血」とした。同麻酔条件下において外側伏在静脈より 20 G 翼状針を用いて採血したものを「末梢血」とした。

2-6-2. T-TAS 検査

第 3 章の慢性期と同様の採血方法によって採血した「心房血」および「末梢血」を用いて、T-TAS 検査により血液凝固能と血小板機能を測定した。測定方法は、第 3 章の慢性期と同様の方法で測定した。

2-6-3. 血液凝固検査

第 3 章の慢性期と同様の方法によって、上記で採血した「心房血」および「末梢血」を用いた。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）、フィブリノーゲン濃度（Fibn）、D-ダイマー（D-dimer）および抗凝固因子（ATⅢ）を測定した。

2-6-4. 血圧検査

第3章の慢性期と同様にオシロメトリック法により、血圧測定を実施した。収縮期動脈圧 (SAP ; systolic arterial blood pressure)、平均動脈圧 (MAP ; mean arterial blood pressure)、および拡張期動脈圧 (DAP ; diastolic arterial blood pressure) を3回計測し、その平均値をもって測定値とした。Pre、1w、2w および 3w の各時点において、体外式刺激装置による刺激を一度停止し、30分経過後に測定を実施した。

2-6-5. 統計解析

測定値は平均値±標準偏差で示した。各時点における計測値が正規分布しているかどうかを確認するための正規確率プロットを作成し、シャピロ・ウィルク検定およびコルモゴロフ・スミルノフ検定を用いて、分布の正規性の検定を行った。

データが正規分布する場合は、Two-way ANOVA を行い、有意差が存在した場合において、Tukey 's test により多重比較を行った。正規分布しない場合には、Mann-Whitney U Test を行い、Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction によって多重比較を行った。p<0.05 を統計学的に有意であると判断した。有意差はコントロール群とダルテパリン群の群間における有意差のみを示した。

3. 結果

3-1. T-TAS 検査

(a) 心房血

ダルテパリン群の心房血の AR チップの OT では、1w において、コントロール群と比較して有意な延長、AUC では有意な増加が認められた (p<0.05%) (図 4-b) (表 4-a)。

しかし 2w 以降は、いずれの項目においても有意な変化は認められなかった。ダルテパリン群の心房血の PL チップでは、OT と T₁₀、AUC は、いずれもコントロール群と比較して各時点で有意差は認められなかった (図 4-c) (表 4-a)。

(a) 末梢血

ダルテパリン群の末梢血の AR チップの T₁₀、OT、AUC ではいずれも、コントロール群と比較して、1w、2w、3w のそれぞれにおいても有意な変化は確認できなかった (図 4-d) (表 4-b)。ダルテパリン群の末梢血の PL チップでは、OT ではコントロール群と比較して 2w に有意な延長が認められた (図 4-e) (表 4-b)。また、AUC では、コントロール群と比較して 2w で有意な減少が認められた (表 4-b)。

3-2. 血液凝固検査

(a) 心房血

ダルテパリン群の心房血においては、コントロール群と比較して、1w、2w、3w のそれぞれにおいて有意な変化は認められなかった。また、いずれも参考値の範囲内での変化であった (表 4-c)。(参考値 PT: 7.4 秒~8.8 秒、APTT: 12.0~28.8 秒、Fibn: 150~350 mg)

(b) 末梢血

ダルテパリン群の末梢血においては、コントロール群と比較して、1w、2w、3w のそれぞれにおいて有意な変化は認められなかった。また、いずれも参考値の範囲内での変化であった (表 4-d)。(参考値 PT: 7.4 秒~8.8 秒、APTT: 12.0~28.8 秒、Fibn: 150~350 mg)

3-3. 血液検査

3-3-1. 完全血球計算 (CBC)

ダルテパリン群では、コントロール群と比較していずれの項目においても、有意な変化はみられなかった (表 4-e)。

3-3-2. 生化学的検査および電解質検査

ダルテパリン群では、コントロール群と比較していずれの項目においても、有意な変化はみられなかった (表 4-f)。

3-4. 血圧検査

ダルテパリン群では、SAP、MAP および DAP いずれにおいても、コントロール群と比較していずれの項目においても、有意な変化はみられなかった (表 4-g)。

4. 考察

第 3 章の Af モデル犬を用いた慢性期の実験の結果から、犬における Af 起因の血栓形成に関しては、人と同様に (89) 血小板と凝固系の双方が関与している可能性が考えられた。

獣医療における抗血栓治療薬は、抗血小板薬、抗凝固薬、血栓溶解薬の 3 種類に大別される (8, 9, 12, 106, 107)。抗凝固薬に属する薬剤の中で、ヘパリンは古くから用いられているものであり、未分画ヘパリン (UFH) と低分子ヘパリン (LMWH) が主に用いられる。UFH は血漿中の抗凝固因子 (ATIII) と結合することで、トロンビンや活性型第 X 因子 (FXa) などの活性を阻害して抗凝固作用を示す (108)。

一方、LMWH とは、UFH のうち分子量 5,000 程度の小さな分子を分画したものの総称である。本研究で使用したダルテパリンは LMWH に区分される。LMWH は低分子量であるゆえ陰性荷電の長さが短く、ATIII の構造を変化させることはできても

ATIII とトロンビンを結びつける能力が減弱していることが知られている。つまり、LMWH は FXa を強く抑制するが、抗トロンビン作用は弱いため、UFH より出血の副作用が少ない薬剤である (109)。

ダルテパリン群では、心房血の AR チップにおいて、OT は刺激前と比較して有意な変化は認められず一貫して短縮傾向を示したままであり、コントロール群と類似した挙動であった。しかし、ダルテパリン群の方が OT の短縮率は軽度、すなわちコントロール群よりも OT が長く、刺激 1 週後に群間の有意差が認められた。ダルテパリンは、ATIII を介して主に活性型第 X 因子（他に活性型第 IX、XI、XII 因子、トロンビン）を阻害することで、Af による凝固因子の活性化を抑えていることが知られている (110)。刺激 1 週後において群間の有意差が認められたのは、このダルテパリンの抑制作用が 1 週後の時点では効果があったことによると推測された。しかし、継時的に凝固因子の活性が増していくことによってダルテパリンの抗凝固作用では抑えきれなくなり、最終的にはコントロール群と同じ程度まで OT が短縮したと考えられた。AUC は OT と連動して推移するパラメーターであり、OT が短縮すると AUC はそれに伴って増加する。したがって、ダルテパリン群の AUC は、刺激 1 週後にコントロール群と比べてその増加が抑えられたことで群間の有意差が認められ、最終的に刺激 3 週後においてはコントロール群と近い値に推移したと考えられた。

ダルテパリン群の心房血の PL チップは、群間において有意差が認められなかったため、血小板に対する作用は認められないと考えられた。また、APTT はコントロール群と異なり延長せず、有意な変化も認められなかった。このことは、ダルテパリンが活性型凝固因子（主に第 X 因子）の活性を阻害することで、その凝固因子よりもカスケードの下位に位置する凝固因子が残存しており、最終的にコントロール群と同じレベルまで凝固因子の活性が上がったとしても、APTT の延長をきたすほどまで凝固因子が消費されなかったことによると考えられた。

以上のように、ダルテパリン群では心房血の AR チップは刺激 1 週後において有意差が認められたが、その後は短縮傾向、また、APTT に関しては有意な変化は認めら

れなかった。APTT に関しては、両群において値が全て参考値内で推移していることから、APTT の測定結果を追うのみでは実際の血液性状を正確に把握することが困難であり、ダルテパリンによる治療効果のモニタリングには不適切であると考えられた。

また、ダルテパリン群の末梢血の PL の OT において、コントロール群と比較してダルテパリン群に有意な延長が認められた。このことは、本来、凝固抑制作用を持つダルテパリンが、血小板に対しても抑制効果を示したということを示唆している。ダルテパリンは本来、抗凝固薬であり、主として凝固因子に対しての作用を示し、血小板に対する抑制作用は少ないと言われていたが、血小板機能に対する作用も認められるとの報告が見受けられる (111, 112)。このことから、今回のダルテパリンの血小板機能を評価する PL の延長がみられたのではないかと考えられた。しかし、心房内における PL では、全ての時点において有意な変化が認められなかったことから、心房内では抗血小板作用を示すほどの強い作用はないことが判明した。

以上のことから、本実験の結果から Af 時に対してダルテパリンの単独投与では 2 週目以降の Af による凝固因子の活性を抑えることができないため、投与方法の変更 (静脈内投与や投薬量) や他の血栓治療薬との併用など再考すべき点があると考えられた。また、通常の Af の臨床症例は、心不全に伴って生じることが多く、実験時の Af モデル犬の心房内皮に比べ、その傷害の程度はより激しいことが予想されるため、さらなる治療戦略が求められる。また、ダルテパリンのみで奏功しなかった要因として、人と犬における Af 由来の血栓成分は、凝固因子と血小板因子の両方が関わっているものの、各血栓成分の活性および血栓の組成が異なる可能性も推測された。そのため今後は、抗血小板薬であるクロピドグレルとの併用や、直接経口抗凝固薬 (DOAC) における抗血栓治療効果、および心房機能の改善を勘案した治療の併用を検討する必要があると考えられた。

5. 小括

第3章の慢性期心房刺激群をコントロール群として用い、臨床現場で汎用されている抗凝固薬であるダルテパリンを調査対象薬として、Afモデル犬に対し3週間にわたり投与した。その結果、ダルテパリン群では、心房血のARチップにおいて、OTは刺激前と比較して有意な変化は認められず一貫して短縮傾向を示したままであり、コントロール群と類似した挙動であった。しかし、ダルテパリン群の方がOTの短縮率は軽度、すなわちコントロール群よりもOTが長く、刺激1週後に群間の有意差が認められた。

ダルテパリンは、ATIIIを介して主に活性型第X因子（他に活性型第IX、XI、XII因子、トロンビン）を阻害することで、Afによる凝固因子の活性化を抑えていることが知られている。刺激1週後において群間の有意差が認められたのは、このダルテパリンの抑制作用が1週後の時点では効果があったことによると推測された。しかし、継時的に凝固因子の活性が増していくことによってダルテパリンの抗凝固作用では抑えきれなくなり、最終的にはコントロール群と同じ程度までOTが短縮したと考えられた。

今回、ダルテパリンの投与にもかかわらず、心房血における血液止血機能（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、心房内における細胞障害や血液鬱滞が徐々に進行し、それに伴い凝固能も亢進したため、刺激1週目まで抑制可能であった凝固因子の活性が、薬剤の抗凝固作用を上回ったためであると推察した。そのため、犬のAf時の血栓予防・治療として、抗血液凝固治療のみでなく、抗血小板薬であるクロピドグレルとの併用や、直接経口抗凝固薬（DOAC）における抗血栓治療効果、および心房機能の改善を勘案した治療の併用を検討する必要があると結論付けた。

6. 図表

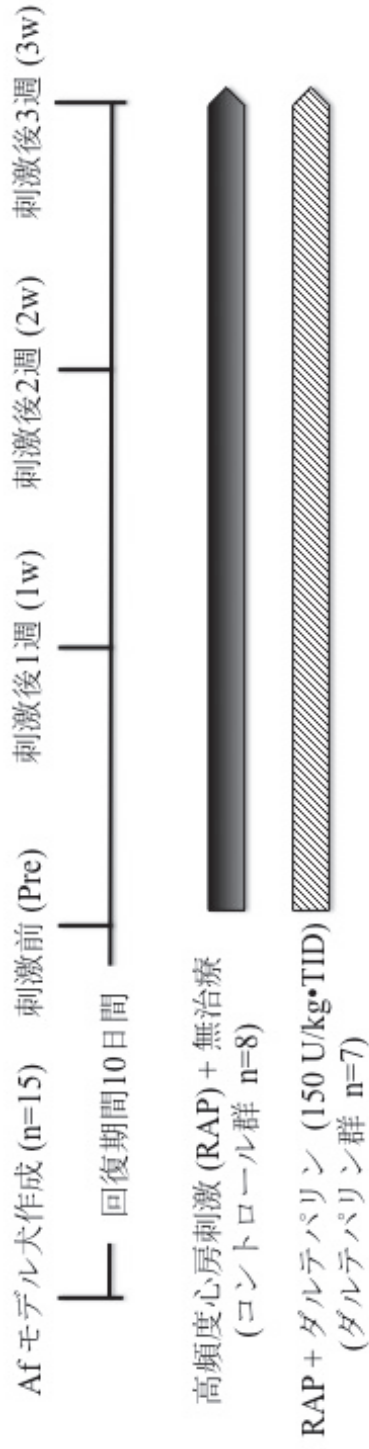


図 4-a. 実験のプロトコロール

コントロール群では、研究期間を通して無投薬とした。一方、ダルテパリン群では、ペーシング開始と同時に試験終了までダルテパリン（ダルテパリンナトリウム フラグミン静注：ファイザー株式会社、東京）を 150 IU/kg、TID（8時、16時、24時）で皮下注射を行った。その後、高頻度心房刺激前(Pre)、刺激開始 1 週後（1w）、2 週後（2w）および 3 週後（3w）の各時点において、T-TAS 検査、血液凝固機能検査および血液検査を実施した。

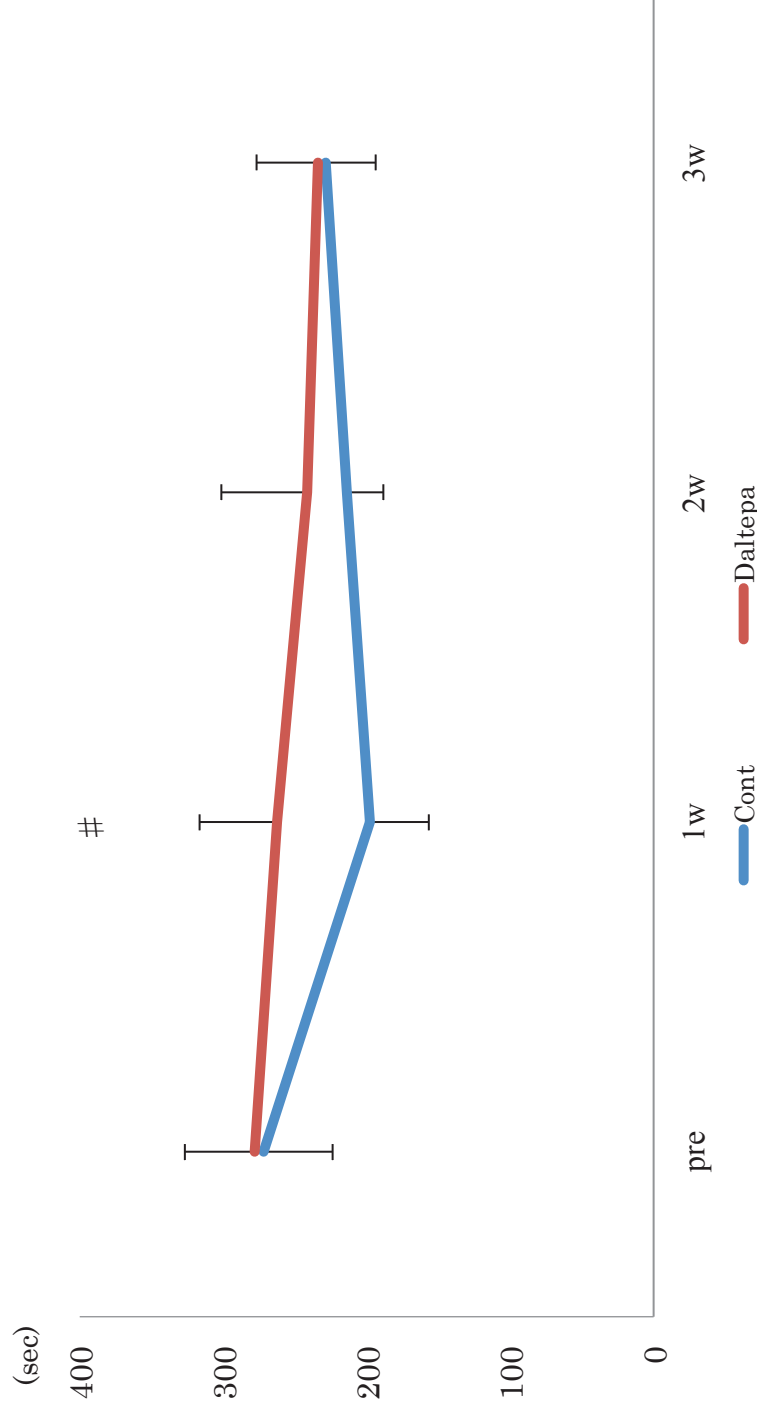


図 4-b. 心房血の AR チップの OT の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。#: コントロール群と比較して $p < 0.05$ で有意差あり

Cont: コントロール群 (n=8)、Daltepa: ダルテパリン群 (n=7)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週後、2w: 心房刺激 2 週後、3w: 心房刺激 3 週後、AR: 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、OT:閉塞時間。

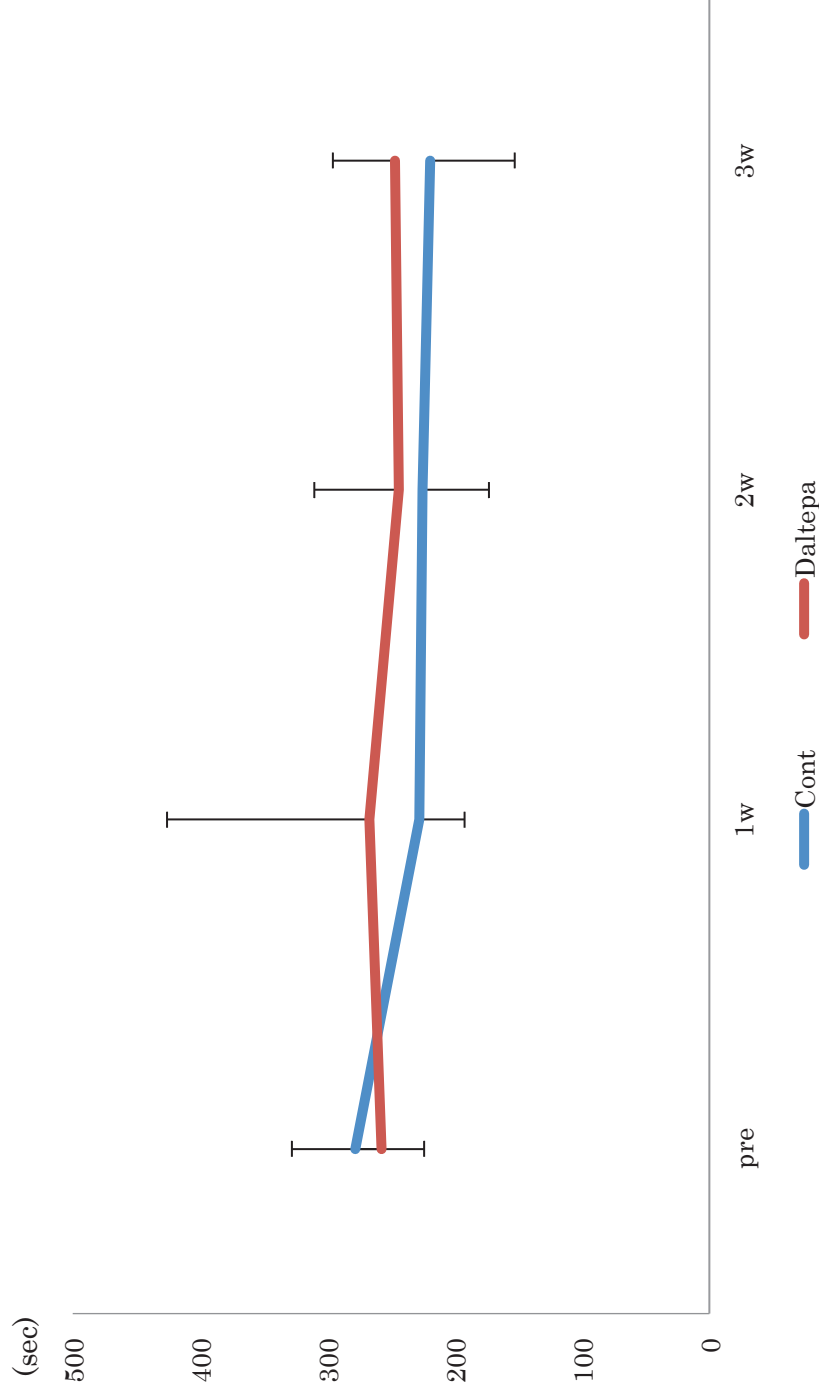


図 4-c. 心房血の PL チップの OT の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

Cont: コントロール群 (n=8)、Daltepa: ダルテパリン群 (n=7)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週後、2w: 心房刺激 2 週後、3w: 心房刺激 3 週後、PL: 血小板機能を測定するチップ、OT: 閉塞時間。

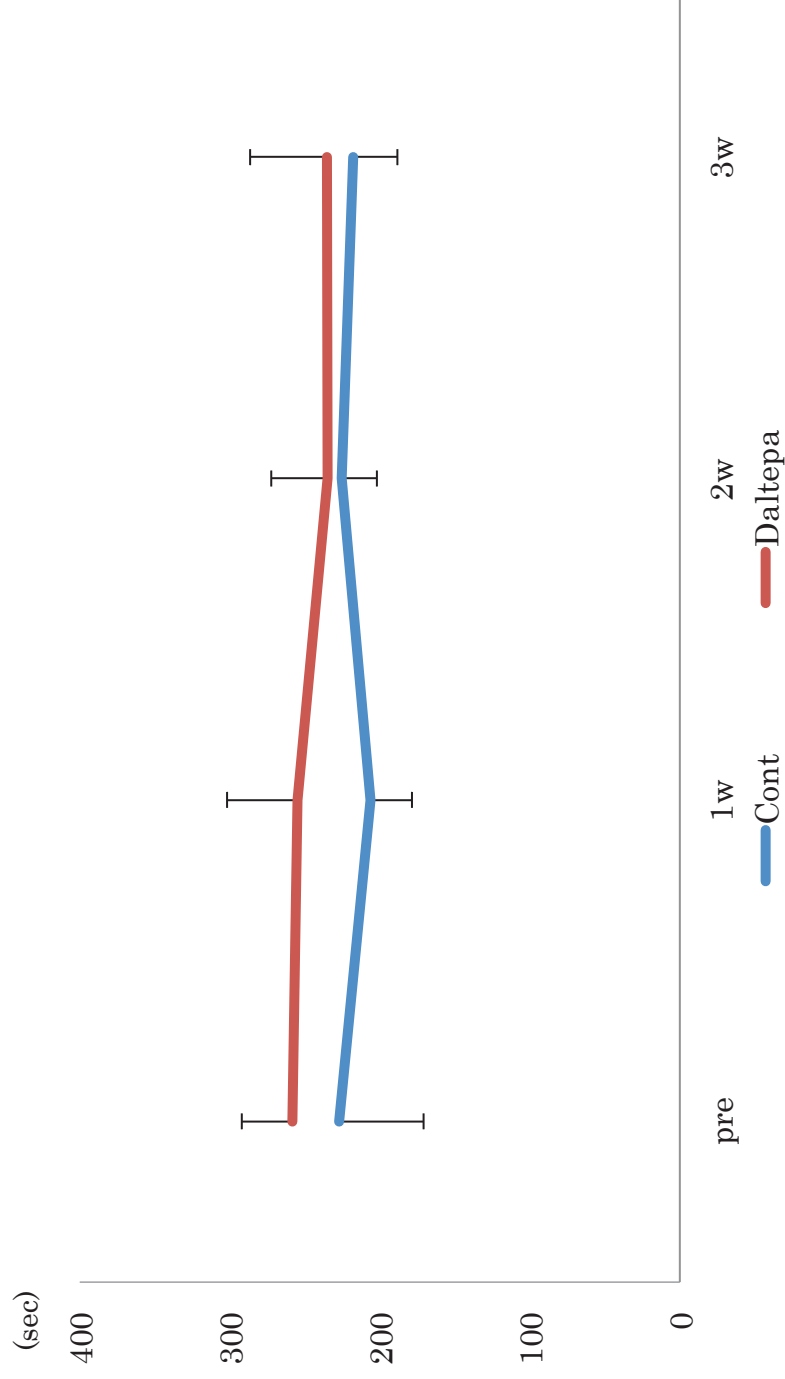


図 4-d. 末梢血の AR チップの OT の経時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

Cont: コントロール群 (n=8)、Daltepa: ダルテパリン群 (n=7)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週後、2w: 心房刺激 2 週後、3w: 心房刺激 3 週後、AR: 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、OT:閉塞時間。

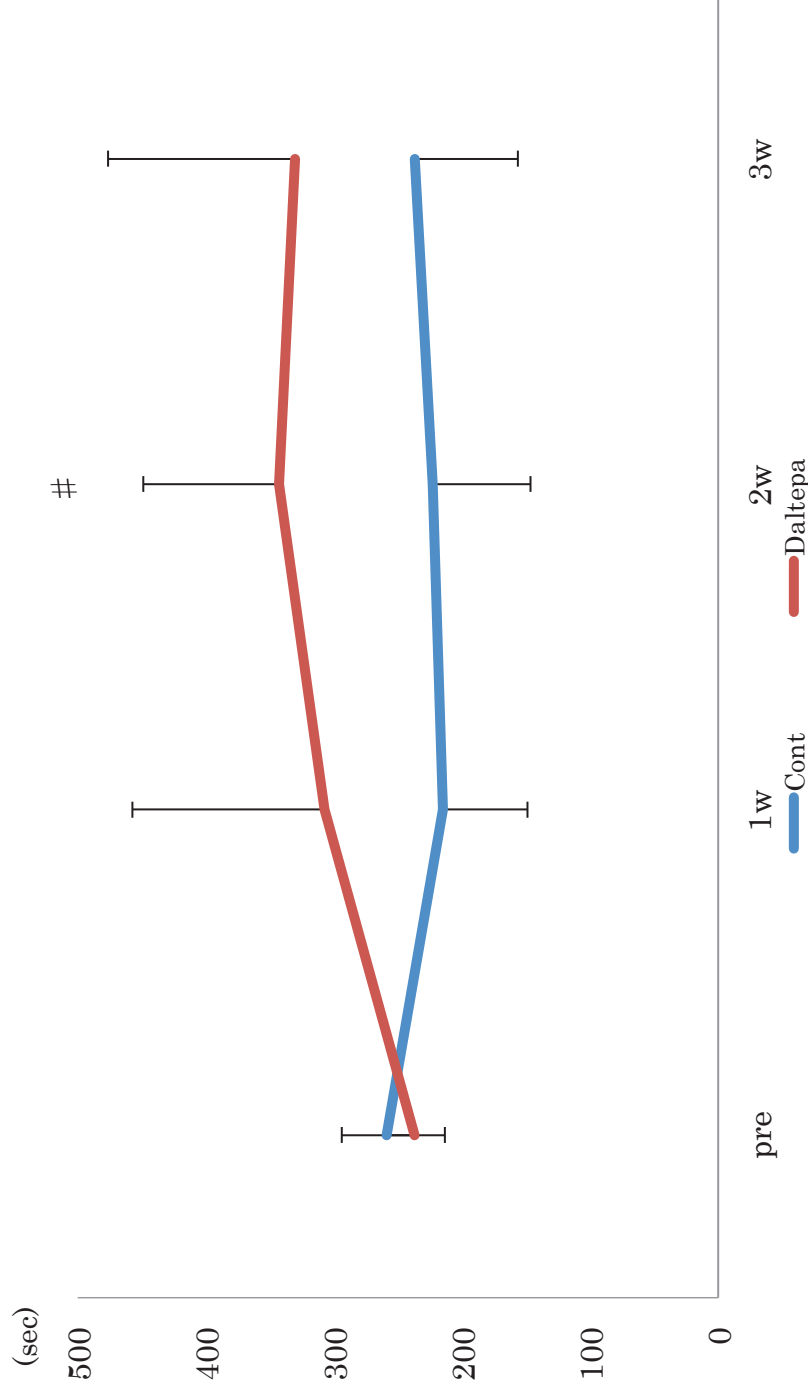


図 4-e. 末梢血の PL チップの OT の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。#: コントロール群と比較して $p < 0.05$ で有意差あり

Cont: コントロール群 (n=8)、Daltepa: ダルテパリン群 (n=7)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週後、2w: 心房刺激 2 週後、3w: 心房刺激 3 週後、PL: 血小板機能を測定するチップ、OT: 閉塞時間。

	Pre	1w	2w	3w
AR T ₁₀ (sec)	195.4±37.6	141.5±26.8	155.5±21.7	168.1±34.4
AR OT (sec)	271.6±43.6	197.6±47.1	213.6±23.0	228.6±32.1
AR AUC	2073.3±54.4	2170.2±56.1	2150.1±28.5	2134.3±44.3
コントロール群 (n=8)				
PL T ₁₀ (sec)	151.9±36.8	132.4±35.3	146.1±54.1	129.9±28.4
PL OT (sec)	278.1±62.8	227.6±24.1	225.3±29.2	219.3±78.1
PL AUC	394.3±37.6	432.2±25.4	437.7±25.3	439.3±48.9
AR T ₁₀ (sec)	237.6±46.0	156.9±23.0	162.0±33.4	148.6±17.4
AR OT (sec)	292.1±51.7	220.8±28.2 #	217.7±37.0	204.8±23.2
AR AUC	2059.0±70.4	2152.8±34.7 #	2153.6±47.3	2170.7±26.0
ダルテパリン群 (n=7)				
PL T ₁₀ (sec)	169.4±35.4	168.0±68.7	157.7±52.1	159.9±46.1
PL OT (sec)	268.9±62.6	270.8±130.3	253.3±87.7	255.6±54.0
PL AUC	395.1±44.0	396.3±94.9	410.7±68.2	405.4±57.9

表 4-a. 心房血の T-TAS の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。#: コントロール群と比較して p<0.05 で有意差あり。

T₁₀: 閉塞開始時間、OT: 閉塞時間の下部領域面積、PL: 血小小板機能を測定するチップ、AR: 血小小板機能と凝固機能を測定するチップ。pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激1週間後、2w: 心房刺激2週間後、3w: 心房刺激3週間後。

	Pre	1w	2w	3w
AR T ₁₀ (sec)	161.6±36.1	144.3±18.3	155.3±32.4	158.5±31.4
AR OT (sec)	227.0±61.7	206.1±28.6	225.3±16.6	217.9±25.2
AR AUC	2133.0±75.1	2162.4±28.1	2143.0±27.1	2147.5±35.7
コントロール群 (n=8)				
PL T ₁₀ (sec)	141.1±50.8	133.4±54.4	137.5±43.5	133.0±48.5
PL OT (sec)	258.8±49.6	214.8±70.8	222.9±73.1	236.6±93.9
PL AUC	413.0±48.0	446.5±57.9	431.5±47.8	428.2±67.1
AR T ₁₀ (sec)	196.3±28.2	169.8±36.5	166.8±27.7	171.8±37.2
AR OT (sec)	258.3±33.6	254.9±46.7	234.8±37.6	235.1±51.2
AR AUC	2103.3±38.6	2112.0±54.0	2133.1±46.2	2137.2±54.6
ダルテパリン群 (n=7)				
PL T ₁₀ (sec)	164.5±45.4	298.7±195.8	208.4±47.7	195.5±102.0
PL OT (sec)	237.0±57.1	307.3±149.9	342.8±106.0 #	330.2±146.2
PL AUC	418.9±41.5	338.0±153.4	328.6±93.1	337.2±133.8

表 4-b. 末梢血の T-TAS の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。#: コントロール群と比較して p < 0.05 で有意差あり。

T₁₀: 閉塞開始時間、OT: 閉塞時間、AUC: 圧上昇曲線の下部領域面積、PL: 血小板機能を測定するチップ、AR: 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
PT (sec)	7.1±0.1	7.6±0.1	7.7±0.1	7.7±0.1
APTT (sec)	18.2±1.3	24.1±2.2	22.8±2.5	22.4±4.9
Fibn (mg/dl)	275±34	258±9	259±103	288±52
D-dimer (μg/dl)	1.5±1.0	3.3±1.4	5.0±5.8	1.8±1.4
ATIII (%)	154.3±42.7	140.6±50.8	131.8±45.9	171.6±28.1
PT (sec)	7.99±0.22	7.89±0.45	7.94±0.43	7.89±0.40
APTT (sec)	18.76±2.89	19.63±4.32	20.90±2.34	17.96±3.71
Fibn (mg/dl)	257.1±87.3	283.1±95.3	280.1±47.8	365.6±174.9
D-dimer (μg/dl)	2.7±1.1	2.1±2.0	1.7±1.0	1.4±0.6
ATIII (%)	88.1±35.1	61.7±31.8	66.4±36.5	75.9±47.0

コントロール群
(n=8)

ダルテパリン群
(n=7)

表 4-c. 心房血における血液凝固能検査項目の経時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

PT: プロトロンビン時間 (参考値, 7.4-8.8 s)、APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間 (参考値, 12.0-28.8 s)、Fibrinogen: フィブリノーゲン (参考値, 150-350 mg/dl)、D-dimer: D-ダイマー (参考値 < 2.0 μg/dl)、ATIII: 抗凝固因子 (参考値, 102-156 %)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
コソトロール群 (n=8)				
PT (sec)	7.5±0.3	7.7±0.3	7.7±0.2	7.8±0.4
APTT (sec)	20.4±2.6	19.8±3.3	21.7±2.8	23.0±4.1
Fibn (mg/dl)	313±101	253±33	314±127	308±87
ダルテパリン群 (n=7)				
PT (sec)	7.9±0.4	8.0±0.6	8.0±0.5	7.9±0.5
APTT (sec)	18.1±1.6	18.2±5.1	18.1±2.8	18.3±2.9
Fibn (mg/dl)	297±90	354±156	302±123	309±203

表 4-d. 末梢血における血液凝固能検査項目の経時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

PT: プロトロンビン時間 (参考値, 7.4-8.8 s)、APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間 (参考値, 12.0-28.8 s)、Fibn: フィブリノーゲン (参考値, 150-350 mg/dl)、D-dimer: D-ダイマー (参考値 < 2.0 µg/dl)、ATIII: 抗凝固因子 (参考値, 102-156%)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
WBC ($10^2/\mu\text{l}$)	103±29	103±27	112±28	86±14
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	652±76	662±84	661±101	657±94
HGB (g/dl)	14.8±1.7	15.0±1.7	14.4±1.3	14.8±2.0
HCT (%)	41.5±5.0	42.0±5.1	42.0±5.7	41.4±5.5
MCV (fl)	63.6±2.5	63.5±2.1	63.6±2.0	63.1±2.5
MCH (pg)	22.7±0.8	22.6±0.7	22.0±2.3	22.5±0.8
MCHC (g/dl)	35.6±0.5	35.6±0.7	34.6±3.3	35.8±0.9
PLT ($10^4/\mu\text{l}$)	43.4±13.2	48.6±19.2	54.8±14.5	50.9±9.6
WBC ($10^2/\mu\text{l}$)	99.8±29.9	91.6±18.5	102.1±22.5	108.3±38.9
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	663.9±66.2	641.9±58.1	602.4±43.8	573.8±58.0
HGB (g/dl)	15.2±1.6	14.6±1.2	13.9±1.0	13.1±1.3
HCT (%)	44.3±5.7	41.5±3.5	39.1±2.7	37.5±3.8
MCV (fl)	64.8±1.4	65.0±1.4	65.0±1.6	65.4±1.4
MCH (pg)	22.9±0.9	22.8±0.8	23.0±0.3	22.9±0.8
MCHC (g/dl)	35.3±0.9	35.3±1.0	35.4±0.6	35.0±0.8
PLT ($10^4/\mu\text{l}$)	46.8±5.3	61.0±9.4	59.9±11.3	60.7±10.1

表 4-e. 末梢血における完全血球計算(CBC)の経時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

WBC: 総白血球数、RBC: 総赤血球数、HGB: ヘモグロビン濃度、HCT: ヘマトクリット値、MCV: 平均赤血球容積、MCH: 平均赤血球ヘモグロビン量、MCHC: 平均赤血球ヘモグロビン濃度、PLT: 血小板数、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
BUN (mg/dl)	15.0±6.4	16.0±5.0	16.7±8.9	16.0±5.5
Cre (mg/dl)	0.7±0.3	0.6±0.1	0.6±0.2	0.6±0.1
ALT (U/l)	58±26	41±12	47±12	49±10
TP (g/dl)	6.5±0.7	6.3±0.4	6.5±0.5	6.4±0.7
Alb (g/dl)	3.0±0.3	2.9±0.3	3.0±0.3	2.9±0.2
Na (mmol/l)	148±1	148±2	147±3	148±3
K (mmol/l)	4.0±.2	3.9±0.3	4.0±0.2	4.2±0.3
Cl (mmol/l)	113±4	114±4	114±2	115±3
BUN (mg/dl)	18.4±5.8	22.0±10.1	17.0±2.7	19.7±8.5
Cre (mg/dl)	0.7±0.2	0.9±0.5	0.6±0.1	0.8±0.6
ALT (U/l)	43±11	84±118	57±40	97±104
TP (g/dl)	6.4±0.5	6.5±0.4	6.3±0.3	6.3±0.4
Alb (g/dl)	3.2±0.3	3.0±0.2	2.9±0.2	2.9±0.3
Na (mmol/l)	147±3	147±2	146±1	146±2
K (mmol/l)	4.2±0.2	4.3±0.4	4.3±0.4	4.2±0.4
Cl (mmol/l)	111±4	111±4	111±4	111±5

コントロール群
(n=8)

ダルテパリン群
(n=7)

表 4-f. 末梢血における血液化学的検査および電解質検査の経時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。BUN: 血清クレアチニン濃度、Cre: 血清尿素窒素濃度、ALT: 血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度、TP: 血清総タンパク濃度、Alb: 血清アルブミン濃度、Na: 血清ナトリウム濃度、K: 血清カリウム濃度、Cl: 血清クロール濃度、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週後、2w: 心房刺激 2 週後、3w: 心房刺激 3 週後。

	Pre	1w	2w	3w	
コントロール群 (n=8)	SAP (mmHg)	149.9±15.1	133.8±11.9	136.2±14.1	132.8±15.2
	MAP (mmHg)	117.1±12.3	100.1±13.6	104.5±10.8	100.0±12.5
	DAP (mmHg)	100.7±12.3	85.4±12.5	88.2±0.6	84.6±12.1
ダルテパリン群 (n=7)	SAP (mmHg)	142.7±7.4	134.3±10.1	133.4±4.7	134.6±13.5
	MAP (mmHg)	107.2±7.1	104.5±8.5	102.8±5.7	99.6±9.7
	DAP (mmHg)	89.4±9.2	89.0±8.5	86.2±6.0	81.7±10.2

表 4-g. 血圧の継続的变化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

SAP: 収縮期血圧 (参考値:144 ± 27 mmHg)、MAP: 平均血圧 (参考値:110 ± 21 mmHg)、DAP: 拡張期血圧 (参考値:91 ± 20 mmHg)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

第4章 高頻度心房刺激犬を用いた抗血栓治療の評価

2) -抗血小板薬（クロピドグレル）による抗血栓治療の評価-

1. 緒言

人医療において、Afにより左房内に生じた血栓は、本質的にはフィブリン血栓が主な成分である静脈血栓であるため、非弁膜性Af症例の抗血栓療法に関しては、従来よりワーファリン等の抗凝固薬が用いられ(93~95)、その有効性も示されている(96~100)。一方、抗血小板薬であるアスピリンやクロピドグレルのAf症例に対する抗血栓効果の有用性は示されておらず、アスピリンによる治療効果はプラセボに比べて36%程度の抑制にとどまっている(101)。しかし、Af患者で冠動脈疾患を併発している血栓リスクが高い患者においては、抗凝固薬と抗血小板薬であるアスピリンやクロピドグレルの併用療法が必要となる場合もある(113)。

獣医療における血栓形成に関しては、その機序や血栓成分に関する報告が少なく、明らかではない。また、犬の大動脈血栓症例に対する治療としては、抗凝固薬や抗血小板薬の使用が報告されている(8~13)が、その中で、アスピリンやクロピドグレルが効果を示したという報告も認められている(8, 9, 12)。アスピリンは、高用量では血小板抑制作用を示すプロスタグランジン₂(PGI₂)も阻害してしまうという点(アスピリンジレンマ)、胃腸障害などの副作用の観点から、近年では、P2Y₁₂受容体を阻害するクロピドグレルが汎用されるようになってきた(114)。

第5章のダルテパリンの研究では、心房内において刺激後1週間までは凝固活性を抑制することが可能であったが、その後の凝固亢進を抑えることが出来なかった。その理由として、本モデル犬においては、Af状態が持続し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帯が重度であったものと推定した。また、第3章の慢性期および急性期の結果から、血栓形成時には血小板の活性も確認できたため、第5章2部の研究としては、第3章の慢性期の実験を対照群(コントロール群)として、抗血小板薬であるクロピドグレルを投与する(クロピドグレル群)ことで、犬のAf時の血栓形成傾向に対する心房内と末梢部位における抗凝固作用をT-TASを使用して調べることにした。

2. 方法

2-1. ガイドラインの遵守

本研究は東京農工大学動物実験倫理規定に準拠し遂行した。(承認番号: 第 27-39 号)

2-2. 供試動物

第 2 章と同様に、健康的であると診断した実験用ビーグル犬 15 頭を供試した。第 3 章の慢性期で用いた犬 8 頭をコントロール群とし、残り 7 頭をクロピドグレル群とした。クロピドグレル群では、性別は、雄 7 頭、および雌 8 頭ずつ、年齢は 1~5 歳齢 (中央値: 2 歳齢)、体重は 8.6~12.0 kg (中央値: 10.2 kg) であった。

2-3. Af モデル犬の作成

第 2 章と同様の方法を用いて、ビーグル犬 15 頭に全身麻酔下で心外膜ペースメーカーリードを埋め込んだ。その後、ペースメーカーリードを体外式刺激装置に接続し、2 mV、390 bpm にて高頻度心房刺激を行い、これを Af モデルとした。

2-4. 投与薬剤

クロピドグレル群では、Af 開始時から継続的に抗血小板薬であるクロピドグレル(クロピドグレル硫酸塩錠 プラビックス®錠 75 mg: サノフィ株式会社、東京)を 4 mg/kg, SID (16 時)、経口投与で投薬を開始した。投与量に関しては Smith, S.A. (2012). Antithrombotic therapy. Top. Companion. Anim. Med. 27, 88~94. (107) を参考に薬用量を決定した。

2-5. 実験プロトコール

第 2 章と同様の方法を用いて、手術の影響を考慮して 10 日間の術後療養期間を設けた。第 3 章の慢性期で用いた犬 8 頭をコントロール群 (無投薬群) とした。一方、クロ

ピドグレル群では、残り 7 頭に Af 開始と同時にクロピドグレル（クロピドグレル硫酸塩錠 プラビックス®錠 75 mg：サノフィ株式会社、東京）を 4 mg/kg, SID（16 時）、経口投与で投薬を開始した。高頻度心房刺激前（Pre）、刺激開始 1 週後（1w）、2 週後（2w）および 3 週後（3w）の各時点において下記の手法によって、T-TAS 検査、血液凝固機能検査および血液検査を実施した（図 4-a）。

2-6. 検査

2-6-1. 採血方法

第 3 章と同様の方法を用いて、両群の Af モデル犬に、全身麻酔下において、5Fr の栄養カテーテルを、頸静脈より挿入し、X 線透視下で位置を確認しながら右心房までカテーテルを進めた。カテーテルより右心房内の血液を採取したものを「心房血」とした。同麻酔条件下において外側伏在静脈より 20 G 翼状針を用いて採血したものを「末梢血」とした。

2-6-2. T-TAS 検査

第 3 章の慢性期と同様の採血方法によって採血した「心房血」および「末梢血」を用いて、T-TAS 検査により血液凝固能と血小板機能を測定した。測定方法は、第 3 章の慢性期と同様の方法で測定した。

2-6-3. 血液凝固検査

第 3 章の慢性期と同様の方法によって、上記で採血した「心房血」および「末梢血」を用いた。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）、フィブリノーゲン濃度（Fibn）、D-ダイマー（D-dimer）および抗凝固因子（ATⅢ）を測定した。

2-6-4. 血圧検査

第3章の慢性期と同様にオシロメトリック法により、血圧測定を実施した。収縮期動脈圧 (SAP ; systolic arterial blood pressure)、平均動脈圧 (MAP ; mean arterial blood pressure)、および拡張期動脈圧 (DAP ; diastolic arterial blood pressure) を3回計測し、その平均値をもって測定値とした。Pre、1w、2w および 3w の各時点において、体外式刺激装置による刺激を一度停止し、30分経過後に測定を実施した。

2-6-3. 統計解析

測定値は平均値±標準偏差で示した。各時点における計測値が正規分布しているかどうかを確認するための正規確率プロットを作成し、シャピロ・ウィルク検定およびコルモゴロフ・スミルノフ検定を用いて、分布の正規性の検定を行った。

データが正規分布する場合は、Two-way ANOVA を行い、有意差が存在した場合において、Tukey 's test により多重比較を行った。正規分布しない場合には、Mann-Whitney U Test を行い、Wilcoxon signed-rank test with Bonferroni correction によって多重比較を行った。p<0.05 を統計学的に有意であると判断した。有意差はコントロール群とクロピドグレル群の群間における有意差のみを示した。

3. 結果

3-1. T-TAS 検査

(a) 心房血

クロピドグレル群の心房血の AR チップでは、コントロール群と同様の推移を示した。AR チップの T₁₀、OT および AUC ではいずれも、コントロール群と比較して、1w、2w、3w のそれぞれにおいて有意な変化は認められなかった (図 4-g) (表 4-h)。心房

血の PL チップの T₁₀、OT では、コントロール群と比較して延長傾向、AUC では減少傾向が認められたが、1w、2w、3w のそれぞれにおいて有意な変化は認められなかった (図 4-h) (表 4-h)。

(b)末梢血

クロピドグレル群の末梢血の AR チップでは、T₁₀、OT および AUC においてはコントロール群と比較して、1w、2w、3w のそれぞれにおいても、有意な変化は認められなかった (図 4-i) (表 4-i)。クロピドグレル群の末梢血の PL チップにおいては、T₁₀、OT は、コントロールと比較して 1w、2w、3w のそれぞれにおいて、有意に延長し、AUC は有意に減少した ($p < 0.01$) (図 4-j) (表 4-i)。

3-2. 血液凝固機能検査

(a) 心房血

クロピドグレル群の心房血においては、コントロール群と比較して、1w、2w、3w のそれぞれにおいて有意な変化は認められなかった。また、いずれも参考値の範囲内での変化であった。(参考値 PT : 7.4 秒~8.8 秒、APTT : 12.0~28.8 秒、Fibn : 150~350 mg) (表 4-j)。

(b) 末梢血

クロピドグレル群の末梢血においては、コントロール群と比較して、1w、2w、3w のそれぞれにおいて有意な変化は認められなかった。また、いずれも参考値の範囲内での変化であった。(参考値 PT : 7.4 秒~8.8 秒、APTT : 12.0~28.8 秒、Fibn : 150~350 mg) (表 4-k)。

3-3. 血液検査

3-3-1. 完全血球計算 (CBC)

クロピドグレル群では、コントロール群と比較していずれの項目においても、有意な変化はみられなかった (表 4-l)。

3-3-2. 血液化学検査および電解質検査

クロピドグレル群では、コントロール群と比較していずれの項目においても、有意な変化はみられなかった (表 4-m)。

3-4. 血圧検査

クロピドグレル群では、SAP、MAP および DAP いずれにおいても、コントロール群と比較していずれの項目においても、有意な変化はみられなかった (表 4-n)。

4. 考察

第 3 章の Af モデル犬を用いた慢性期の実験においては、3 週間の高頻度心房刺激を行った結果、心房血の AR チップと PL チップの両方において OT が有意に短縮した。このことから、犬における Af 起因の血栓形成に関しても人と同様 (89) に、凝固因子と血小板因子の双方による血液凝固亢進状態が生じ、Af の持続によってそれが維持されることが判明した。

獣医学における内科的な血栓治療薬には、抗血小板薬、抗凝固薬、そして血栓溶解薬が存在する (8, 9, 12, 106, 107) が、犬の抗血栓治療には、どの薬剤が適しているかは現在のところ不明のままである。今回の研究では、犬の血栓治療薬としてのエビデンスが存在する、抗血小板薬のクロピドグレルを使用した。クロピドグレルは、P2Y₁₂ 受容体を阻害する抗血小板薬であり、獣医療での血栓症の治療薬として臨床的に汎用されている (8, 9, 12, 106, 107)。クロピドグレル自体は、抗血小板作用がないプロドラッグ

グであり、肝臓で CYP による代謝を受け、ADP 受容体の一つである P2Y₁₂ 受容体に非可逆的に結合することで、ADP による血小板凝集を用量依存性に抑制する (106, 107)。また、血管に対する作用がなく、血小板に選択的に作用することが知られている。その中でクロピドグレルは他の抗血小板薬と比較して、血栓症治療において患者の生存期間が長く、副作用も少ないことが言われており、注目されている薬剤である (107)。

今回のクロピドグレル投与群の研究では、クロピドグレル投与後、AR チップにおいて、心房血と末梢血の双方で、刺激 1 週目以降、一貫して短縮傾向を示し、コントロール群と同様の推移を示し、群間に有意差は認められなかった。そのため、血栓形成傾向を抑制することが出来なかったと考えられた。第 3 章の慢性期の研究においては、心房血の AR チップにおいて、1 週目から有意な短縮が認められたため、Af 時の凝固活性の変化としては、凝固機能と血小板機能の双方が関与していることが考えられ、クロピドグレルが持つ抗血小板作用のみの薬理作用では、血栓形成における抗凝固作用を打ち消すことが出来なかったためであると示唆された。

一方、血小板機能を評価する PL チップでは、末梢血において、コントロール群と比較して、刺激 1 週目以降有意に延長し、採血時においても止血異常が認められたため、末梢血においてはクロピドグレルの抗血小板作用は認められ、薬用量としても十分であると考えられた。しかし、同時に今回使用した薬用量では、出血のリスクも存在することも留意しなければならないと考えられた。人の Af 時のクロピドグレル投与時においても、大出血のリスクは存在し、抗血小板薬単剤よりも 2 剤以上で、また抗凝固薬併用下で、大出血の頻度は増加することが分かっている (115)。

一方、心房血の PL チップにおいては、コントロール群と比較して延長傾向が認められたものの、有意な変化は認められず、クロピドグレルが持つ抗血小板作用の効果がみられなかったことが判明した。この理由として、今回実施した高頻度心房刺激により、心房内のうっ血ならびに心房内皮障害が重度であり、血小板活性が生じた結果、クロピドグレル単独では、Af 時の血液凝固亢進状態を打ち消す程の強い抗凝固作用をもたらすことが出来なかったと示唆された。さらに、通常の Af の臨床症例は、僧帽弁閉鎖不

全症や拡張型心筋症などの心不全に伴って生じることが多く、実験時の心房内皮障害よりも激しいことが多いと予想される。

人の Af 患者で冠動脈疾患を併発している血栓リスクが高い患者においては、抗凝固薬と抗血小板薬であるアスピリンやクロピドグレルの併用療法が必要となる場合もある (113)。第 5 章の心房血の 1w の AR において、ダルテパリンの抗凝固作用が示されたことを考慮すると、クロピドグレルとの併用により、心房内の抗凝固能と抗血小板機能の双方の抑制により血栓形成を予防できる可能性も考えられた。

人医療において、クロピドグレルは、急性冠症候群の治療などにおいて重要な薬剤である (116) が、近年その効果が不十分であるクロピドグレル抵抗性の存在が知られるようになった。この原因としては、クロピドグレルは、プロドラッグであり肝臓での代謝を受け活性体に変換されるため、肝臓におけるチトクローム P450 2C19 (CYP2C19) の代謝能力が低い遺伝子多型を持つ患者に対しては、その効果が不十分であることが指摘されている (117, 118)。そのため、投与前に遺伝子多型解析を実施する場合もある。犬におけるクロピドグレルの遺伝子多型による報告は認められないが、本研究で使用したモデル犬において、遺伝子多型解析を実施していないため、クロピドグレル抵抗性によるクロピドグレルの効果を十分発揮できなかった可能性も考えられた。

以上の結果より、Af 時のクロピドグレル単独の投与は、臨床応用としては不十分であると考えられた。しかし、心房血の PL においてコントロール群と比較し延長傾向が認められたため、今後は、ダルテパリンやワーファリン等の抗凝固薬の併用投与、または直接経口抗凝固薬 (DOAC) における抗血栓治療、その他、心房機能の改善を勘案した治療を併用する必要があると結論付けた。

5. 小括

獣医療の臨床現場で汎用されている、抗血小板薬であるクロピドグレル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、血小板機能を評価するPLチップでは、末梢血において、コントロール群と比較して、刺激1週目以降有意に延長し、採血時においても止血異常が認められたため、末梢血においてはクロピドグレルの抗血小板作用は認められ、薬用量としても十分であると考えられた。

しかし、心房血のPLチップにおいては、コントロール群と比較して有意な変化は認められなかった。この理由として、今回実施した高頻度心房刺激による心房内のうっ血ならびに心房内皮障害が重度であり、クロピドグレル単独の作用では、Af時の血栓形成亢進状態を打ち消す程の強い抗凝固作用をもたらすことが出来なかったと示唆された。

心房血と末梢血のARチップにおいて、刺激1週目以降、一貫して短縮傾向を示し、群間に有意差は認められず、血栓形成傾向を抑制することが出来なかった。これはクロピドグレルの薬理効果以外である凝固因子抑制効果は見出せなかったためであると考えられた。

以上より、犬のAf時の血栓予防・治療として、クロピドグレルなどの抗血小板薬単独投与だけでは不十分であり、抗凝固薬の併用や直接経口抗凝固薬(DOAC)における抗血栓治療、および心房機能の改善を勘案した治療を併用する必要があると結論付けた。

6. 図表

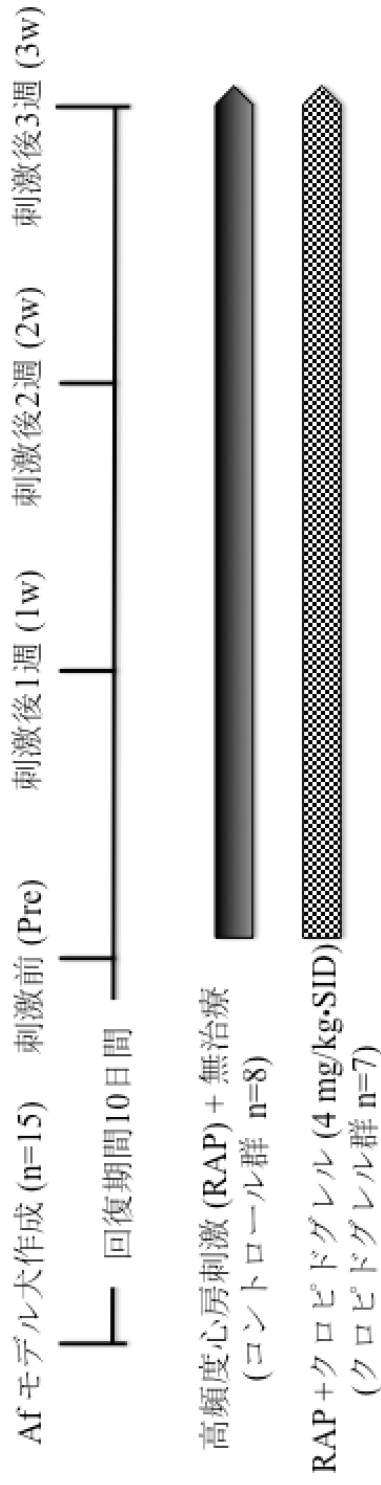


図 4-f. 実験のプロトコール

コントロール群では、研究期間を通して無投薬とした。一方、クロピドグレル群では、ペーシング開始と同時に試験終了までクロピドグレル (クロピドグレル硫酸塩 プラビックス®錠 75 mg: サノフィ株式会社、東京) を 4 mg/kg, SID (16 時)、経口投与で投薬を開始した。その後、高頻度心房刺激前 (Pre)、刺激開始 1 週後 (1w)、2 週後 (2w) および 3 週後 (3w) の各時点において、T-TAS 検査、血液凝固機能検査および血液検査を実施した。

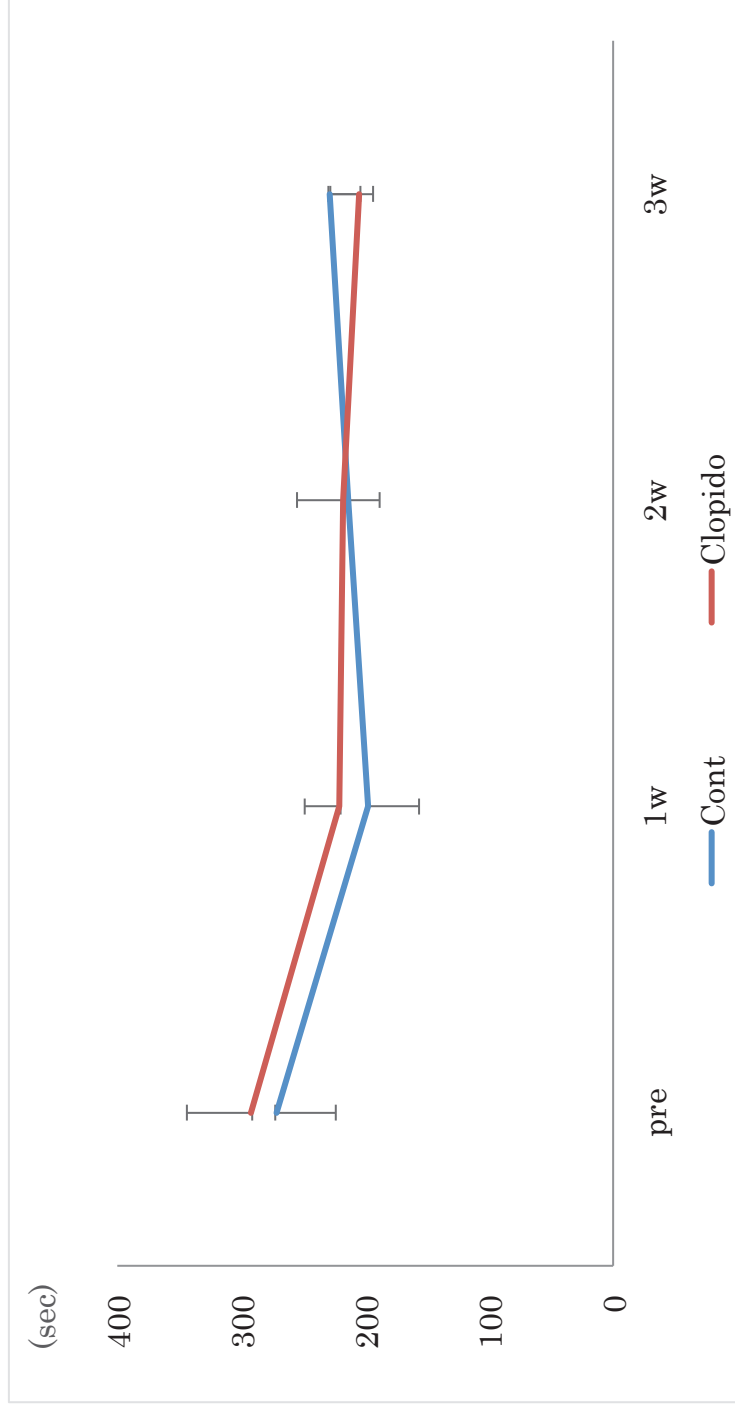


図 4-g. 心房血の AR チップの OT の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

Cont: コントロール群 (n=8)、Clopido: クロピドグレル群 (n=7)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、AR: 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、OT: 閉塞時間。

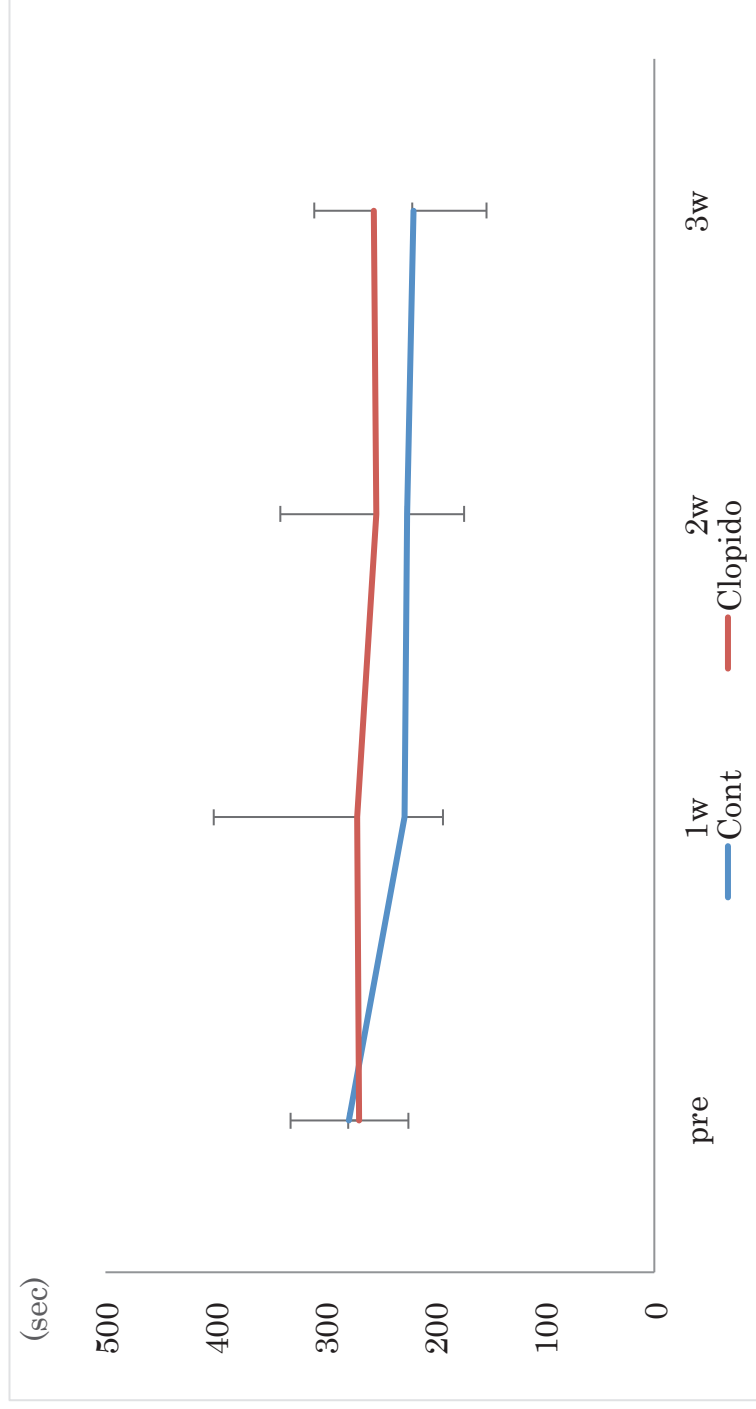


図 4-h. 心房血の PL チップの OT の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

Cont: コントロール群 (n=8)、Clopido: クロピドグレル群 (n=7)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、PL: 血小板機能を測定するチップ、OT: 閉塞時間。

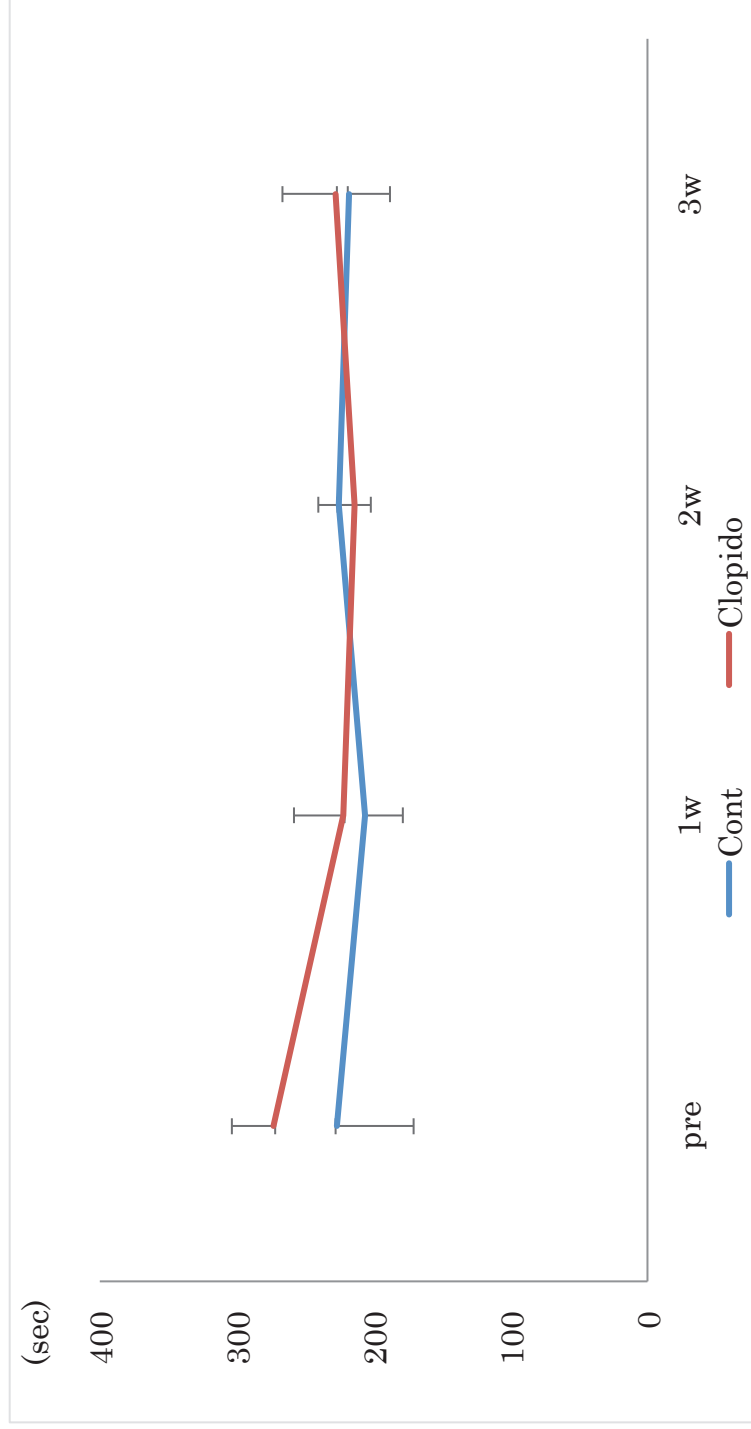


図 4-i. 末梢血の AR チップの OT の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

Cont: コントロール群 (n=8)、Clopido: クロピドグレル群 (n=7)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、AR: 血小板機能と凝固機能を測定するチップ、OT: 閉塞時間。

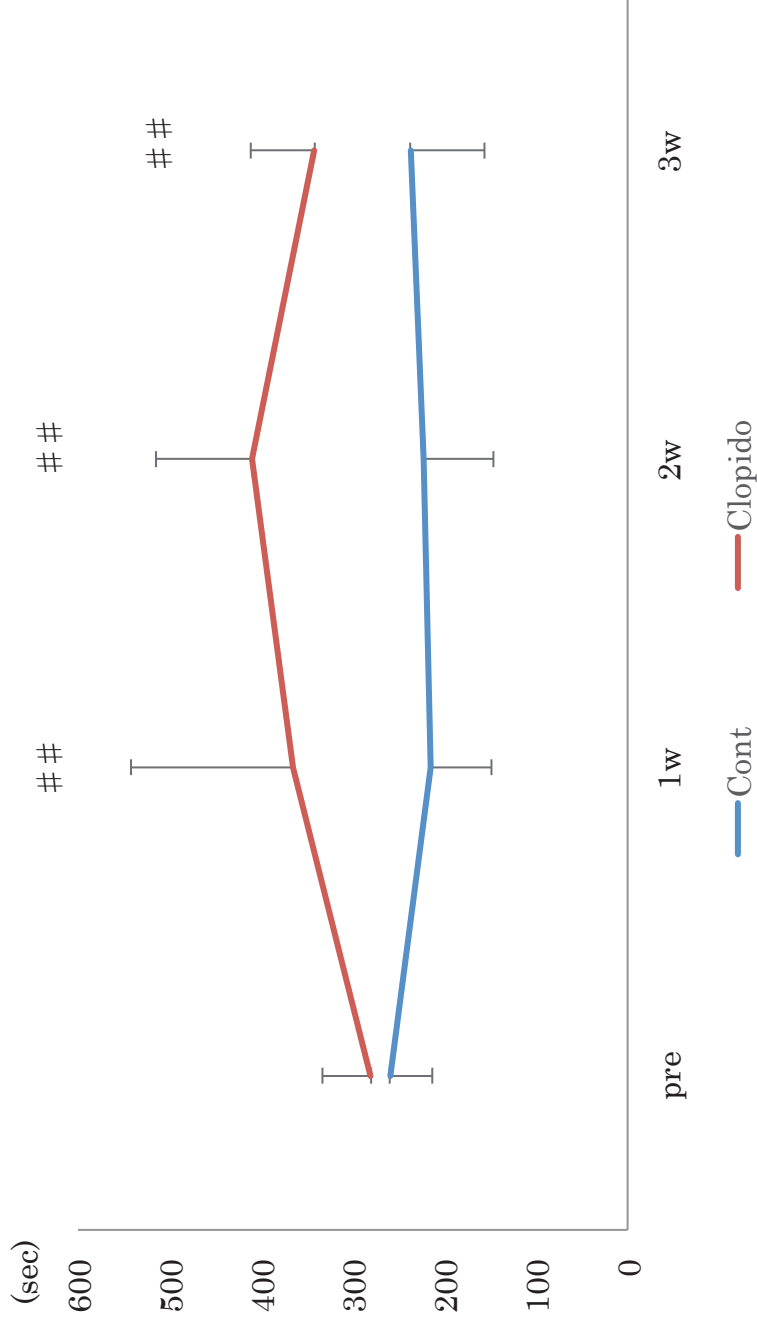


図 4-j. 末梢血の PL チップの OT の継続的变化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。##:コントロール群と比較して $p < 0.01$ で有意差あり。

Cont: コントロール群 (n=8)、Clopido: クロピドグレル群 (n=7)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後、PL: 血小板機能を測定するチップ、OT: 閉塞時間。

	Pre	1w	2w	3w
AR T ₁₀ (sec)	195.4±37.6	141.5±26.8	155.5±21.7	168.1±34.4
AR OT (sec)	271.6±43.6	197.6±47.1	213.6±23.0	228.6±32.1
AR AUC	2073.3±54.4	2170.2±56.1	2150.1±28.5	2134.3±44.3
コントロール群 (n=8)				
PL T ₁₀ (sec)	151.9±36.8	132.4±35.3	146.1±54.1	129.9±28.4
PL OT (sec)	278.1±62.8	227.6±24.1	225.3±29.2	219.3±78.1
PL AUC	394.3±37.6	432.2±25.4	437.7±25.3	439.3±48.9
AR T ₁₀ (sec)	237.6±46.0	156.9±23.0	162.0±33.4	148.6±17.4
AR OT (sec)	292.1±51.7	220.8±28.2	217.7±37.0	204.8±23.2
AR AUC	2059.0±70.4	2152.8±34.7	2153.6±47.3	2170.7±26.0
クロピドグレル群 (n=7)				
PL T ₁₀ (sec)	169.4±35.4	168.04±68.7	157.68±52.1	159.89±46.1
PL OT (sec)	268.9±62.6	270.8±130.3	253.3±87.7	255.6±54.0
PL AUC	395.1±44.0	396.3±94.9	410.7±68.2	405.4±57.9

表 4-h. 心房血の T-TAS の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

T₁₀: 閉塞開始時間、OT: 閉塞時間の下部位領域面積、PL: 血小板機能を測定するチップ、AR: 血小板機能と凝固機能を測定するチップ。pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
AR T ₁₀ (sec)	161.6±36.1	144.3±18.3	155.3±32.4	158.5±31.4
AR OT (sec)	227.0±61.7	206.1±28.6	225.3±16.6	217.9±25.2
AR AUC	2133.0±75.1	2162.4±28.1	2143.0±27.1	2147.5±35.7
コントロール群 (n=8)				
PL T ₁₀ (sec)	141.1±50.8	133.4±54.4	137.5±43.5	133.0±48.5
PL OT (sec)	258.8±49.6	214.8±70.8	222.9±73.1	236.6±93.9
PL AUC	413.0±48.0	446.5±57.9	431.5±47.8	428.2±67.1
AR T ₁₀ (sec)	208.7±32.7	166.3±37.0	159.2±21.6	163.0±32.1
AR OT (sec)	272.9±30.8	222.2±35.7	213.9±26.3	227.6±38.8
AR AUC	2087.2±42.4	2147.3±47.7	2158.9±31.2	2147.9±44.8
クロピドグレル群 (n=7)				
PL T ₁₀ (sec)	197.9±34.9	268.0±172.4 ^{##}	251.3±75.3 ^{##}	206.4±45.5 ^{##}
PL OT (sec)	280.7±52.2	365.6±176.6 ^{##}	410.1±104.9 ^{##}	342.4±63.3 ^{##}
PL AUC	376.4±43.5	312.2±146.8 ^{##}	338.8±111.4 ^{##}	346.5±54.7 ^{##}

表 4-i. 末梢血の T-TAS の継時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。##:コントロール群と比較して p<0.01 で有意差あり。

T₁₀: 閉塞開始時間、OT: 閉塞時間、AUC: 圧上昇曲線の下部位領域面積、PL:血小 板機能を測定するチップ、AR:血小 板機能と凝固機能を測定するチップ。pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
PT (sec)	7.1±0.1	7.6±0.1	7.7±0.1	7.7±0.1
APTT (sec)	18.2±1.3	24.1±2.2	22.8±2.5	22.4±4.9
Fibn (mg/dl)	275±34	258±9	259±103	288±52
D-dimer (μg/dl)	1.5±1.0	3.3±1.4	5.0±5.8	1.8±1.4
ATIII (%)	154.3±42.7	140.6±50.8	131.8±45.9	171.6±28.1
PT (sec)	7.75±0.25	7.6±0.55	7.83±0.49	7.87±0.91
APTT (sec)	16.97±3.89	16.61±3.07	16.26±5.14	18.49±3.89
Fibn (mg/dl)	259±130	343±165	299±112	332±173
D-dimer (μg/dl)	2.2±1.1	1.5±1.0	2.8±1.8	1.6±1.0
ATIII (%)	76.3±27.1	83.9±28.2	103.0±14.0	81.86±32.8

コントロール群
(n=8)

クロピドグレル群
(n=7)

表 4-j. 心房血における血液凝固機能検査の経時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

PT: プロトロンビン時間 (参考値, 7.4-8.8 s)、APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間 (参考値, 12.0-28.8 s)、Fibn: フィブリノーゲン濃度 (参考値, 150-350 mg/dl)、D-dimer: D-ダイマー (参考値 < 2.0 μg/dl)、ATIII: 抗凝固因子 (参考値, 102-156%)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
コントロール群 (n=8)				
PT (sec)	7.5±0.3	7.7±0.3	7.7±0.2	7.8±0.4
APTT (sec)	20.4±2.6	19.8±3.3	21.7±2.8	23.0±4.1
Fibn (mg/dl)	313±101	253±33	314±127	308±87
クロピドグレル群 (n=7)				
PT (sec)	7.68±0.24	7.83±0.40	8.14±1.20	8.07±0.73
APTT (sec)	16.0±3.6	18.3±4.2	16.7±5.3	19.0±9.2
Fibn (mg/dl)	298±54	340±123	349±94	301±137

表 4-k. 末梢血における血液凝固機能検査の経時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

PT: プロトロンビン時間 (参考値, 7.4-8.8 s)、APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間 (参考値, 12.0-28.8 s)、Fibn: フィブリノーゲン (参考値, 150-350 mg/dl)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
WBC($10^2/\mu\text{l}$)	103±29	103±27	112±28	86±14
RBC($10^4/\mu\text{l}$)	652±76	662±84	661±101	657±94
HGB(g/dl)	14.8±1.7	15.0±1.7	14.4±1.3	14.8±2.0
HCT(%)	41.5±5.0	42.0±5.1	42.0±5.7	41.4±5.5
MCV(fl)	63.6±2.5	63.5±2.1	63.6±2.0	63.1±2.5
MCH(pg)	22.7±0.8	22.6±0.7	22.0±2.3	22.5±0.8
MCHC(g/dl)	35.6±0.5	35.6±0.7	34.6±3.3	35.8±0.9
PLT($10^4/\mu\text{l}$)	43.4±13.2	48.6±19.2	54.8±14.5	50.9±9.6
WBC($10^2/\mu\text{l}$)	106±15.	103±21	122±21	101±14
RBC($10^4/\mu\text{l}$)	701±50	705±47	574±197	637±70
HGB(g/dl)	16.1±0.9	16.1±1.0	14.9±1.2	14.6±1.7
HCT(%)	45.6±2.6	45.4±2.7	42.2±3.3	41.3±4.7
MCV(fl)	65.1±1.6	64.5±1.3	64.9±1.2	64.9±1.2
MCH(pg)	23.0±0.9	22.8±0.6	22.9±0.9	23.0±0.7
MCHC(g/dl)	35.3±0.9	35.4±0.6	35.2±1.0	35.4±0.7
PLT($10^4/\mu\text{l}$)	52.1±13.6	51.5±7.2	57.6±8.0	56.9±12.0

表 4-1. 末梢血における完全血球計算 (CBC) の継時的変化

各測定値は、平均 ± 標準偏差で表した。WBC: 総白血球数、RBC: 総赤血球数、HGB: ヘモグロビン濃度、HCT: ヘマトクリット値、MCV: 平均赤血球容積、MCH: 平均赤血球ヘモグロビン量、MCHC: 平均赤血球ヘモグロビン濃度、PLT: 血小板数、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
BUN (mg/dl)	15.0±6.4	16.0±5.0	16.7±8.9	16.0±5.5
Cre (mg/dl)	0.7±0.3	0.6±0.1	0.6±0.2	0.6±0.1
ALT (U/l)	58±26	41±12	47±12	49±10
TP (g/dl)	6.5±0.7	6.3±0.4	6.5±0.5	6.4±0.7
Alb (g/dl)	3.0±0.3	2.9±0.3	3.0±0.3	2.9±0.2
Na (mmol/l)	148±1	148±2	147±3	148±3
K (mmol/l)	4.0±.2	3.9±0.3	4.0±0.2	4.2±0.3
Cl (mmol/l)	113±4	114±4	114±2	115±3
BUN (mg/dl)	17.8±9.1	16.8±7.4	17.0±4.4	18.7±7.3
Cre (mg/dl)	0.58±0.18	0.69±0.18	0.61±0.09	0.76±0.23
ALT (U/l)	50.6±29.4	37.0±9.1	54.4±52.0	48.6±27.9
TP (g/dl)	6.7±0.4	6.4±0.4	6.4±0.2	6.4±0.4
Alb (g/dl)	3.1±0.2	3.0±0.2	3.0±0.2	3.0±0.2
Na (mmol/l)	147.5±1.4	147.1±1.5	146.9±0.8	147.0±1.2
K (mmol/l)	4.1±0.3	4.3±0.3	4.3±0.2	4.3±0.3
Cl (mmol/l)	112.3±4.8	111.5±3.6	111.8±1.6	111.9±3.3

コントロール群
(n=8)

クロピドグレル群
(n=7)

表 4-m. 末梢血における血液化学的検査および電解質検査の経時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。BUN: 血清クレアチニン濃度、Cre: 血尿素窒素濃度、ALT: 血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度、TP: 血清総タンパク濃度、Alb: 血清アルブミン濃度、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

	Pre	1w	2w	3w
コントロール群 (n=8)	SAP (mmHg) 149.9±15.1	133.8±11.9	136.2±14.1	132.8±15.2
	MAP (mmHg) 117.1±12.3	100.1±13.6	104.5±10.8	100.0±12.5
	DAP (mmHg) 100.7±12.3	85.4±12.5	88.2±0.6	84.6±12.1
クロピドグレル群 (n=7)	SAP (mmHg) 145.1±6.6	135.3±20.6	125.9±14.6	134.5±9.8
	MAP (mmHg) 107.3±13.8	99.8±13.9	98.0±11.0	100.5±11.7
	DAP (mmHg) 88.3±16.7	86.2±8.5	81.5±9.6	84.6±13.6

表 4-n. 血圧の経時的変化

各測定値は、平均値 ± 標準偏差で表した。

SAP: 収縮期血圧 (参考値:144 ± 27 mmHg), MAP: 平均血圧 (参考値:110 ± 21 mmHg), DAP: 拡張期血圧 (参考値:91 ± 20 mmHg)、pre: 高頻度心房刺激前、1w: 心房刺激 1 週間後、2w: 心房刺激 2 週間後、3w: 心房刺激 3 週間後。

第5章 総括

1. 健常対照群における T-TAS の応用 (第 1 章)

血栓形成時における機序は、血小板と凝固因子が相互に作用する「複合的な反応」であり、血液成分のみならず血流や血管壁の状態が深く関与しており、血栓形成能を解析するためには、これらを複合的に評価する必要があると考えられている。獣医学領域における従来の血小板機能・凝固能の評価法は、いずれも血栓形成能そのものを評価するものではなく、また、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。また、臨床現場においても、血栓症症例に対する、抗血栓療法 of 投与タイミングや投与量に関して、未だ明確にされていない。

近年、全血血栓形成観測システム (Total Thrombus-formation Analysis System : T-TAS) という血栓止血検査機器が、より生体内に近い条件下で血小板機能と凝固因子機能を測定することを目的として医療用に開発された。T-TAS 検査は、流速を変化させながら凝固処理した全血を模擬血管であるマイクロ流路に流すことで、流路内のコラーゲンや組織因子が検体の一部を活性化させ、それが引き金となり生体内で起こるような、生理的な血栓形成を引き起こすことが可能な血栓止血検査機器である。これにより、血流下での血栓形成を数値的・視覚的により詳細に評価することが可能となっている。本研究では、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か否かを、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った。また、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した。その結果、同一個体において高い再現性が得られ、採決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われた。このことにより、犬でも T-TAS を利用可能であると結論付けた。

2. 高頻度心房刺激犬を用いた心房機能の評価 (第 2 章)

本研究では、高頻度心房刺激犬を用いることにより、血栓症の発症要因である Virchow

の3要因のうちの一つである血流の変化を捉えることを目的とした。本研究モデル犬での心房刺激中の心室拍動は330~390 bpmであり、心電図上において心房細動 (Af) が惹起されていることを確認した。Af時には心房機能の一つであるブースター機能、つまり心房からの能動的拍出機能が失われる。その結果、心拍出効率は20~30%低下するとされている。本研究では、心房のブースター機能であるLA active EFが刺激1週目から有意に低下し、また、拡張末期僧帽弁弁輪速度 a' の低下も確認された。このことから、過去の報告と同様にAf発現時には、心房筋が細動を起し、Af発現1週目より左房収縮機能の低下が起り、その後も継時的に機能の低下が生じることが明らかとなった。また、心房の拡大も認められたことから、血液が心房内に滞留し易くなるということが明らかとなった。すなわち、Af開始後の心房収縮機能の低下によって、心房内に血液うっ滞が引き起こされたことから、Virchowの3要因のうちの一つである血流の変化が生じることが確認できた。

また、Af時には、心房の協調的な収縮が失われる結果、組織ドプラ法 (TDI) における a' およびA波様波形は記録されないと言われているが、本研究では、Af発現時の心房筋と心室筋の8か所全ての箇所において、 a' が認められ、心房筋と心室筋が同期的に運動していることが示唆された。この理由として、左房の能動的収縮が消失する細動状態であっても、左室コンプライアンスがある程度残存しているため、拡張期において、心房筋が心室筋に引っ張られることによって、受動的に心房の収縮能である a' が認められるものと推察した。

3. 高頻度心房刺激犬を用いた血液凝固能の評価 (第3章)

1) -慢性期 (Af 開始 1, 2, 3 週間後)における血液凝固能の評価-

獣医学領域において、腫瘍、感染性心内膜炎、副腎皮質機能亢進症、免疫介在性溶血性貧血、蛋白漏出性腎症または蛋白漏出性腸症の際に血栓塞栓症が認められることが知られているが、犬におけるAf発生時による血栓塞栓症の報告は少なく、未だ研究が不

十分である。本研究では、犬の心房細動 (Af) 時における血液凝固性状を調べるために、第 2 章と同様に高頻度心房刺激犬を作成し、Af 時における心房内と末梢部位における血液凝固性能を、T-TAS および従来の凝固検査を用いて評価した。その結果、心房血の AR チップは 1 週目から、また、PL チップは 3 週目から有意に短縮し、その後も血液凝固亢進状態が持続することが明らかとなった。また、その血液凝固性状に関しては、凝固機能の活性化が血小板機能の活性化に先行することも判明した。本研究では、心房血においてのみ劇的な血液性状の変化が観察されたが、末梢血ではいずれの調査項目においても有意な経時的変化は認められなかった。この理由として、末梢では Af の刺激による心房内に生じるようなうっ血がなく、血液の淀みが少ないことや細動という物理的な刺激による血管内皮障害が少ないことなどが推測される。また、本研究で用いた心房血は右心房からの採血を行ったことから、左心耳ペーシングであっても、その刺激は右心房まで伝導し、右心房での血液凝固の亢進が生じることが判明した。

4. 高頻度心房刺激犬を用いた血液凝固能の評価 (第 3 章)

2) -急性期 (Af 開始 30 分後)における血液凝固能の評価-

人医療での血栓形成のタイミングに関しては、2 日間以上の Af が持続した症例の 5 ~14%において、および持続性 Af 患者の 29%においてに血栓が形成されると言われている。また、Af が生じた 12 時間以内に血小板と凝固因子の活性が開始されることが報告されている。しかしながら、医学ならびに獣医学の双方で Af の発現後の急性期において、どのタイミングで、心房内あるいは末梢部位において、血液性状の変化が生じるかは現在のところ明らかになっていない。本研究では、T-TAS を用いることにより、Af 発現 30 分という短時間で、心房血内において血小板機能と凝固能の亢進が生じることが明らかとなった。犬において Af の急性期の心房血の血液性状の変化を調べた報告は本実験が初めてであり、短時間で血栓傾向傾向が認められたことは、臨床現場において Af が認められた場合には、より早期に抗血栓療法を開始したほうが良いという新たな

治療方針を提示できた可能性が高い。

5. 高頻度心房刺激犬を用いた抗血栓治療の評価（第4章）

1) 抗凝固薬（ダルテパリン）による抗血栓治療の評価 -

人医療において、Af 時の血栓形成には、凝固因子が強く関与しているため、その抗血栓療法に関しては、従来よりワーファリン等の抗凝固薬が用いられ、その有効性も示されている。獣医療での抗凝固薬としては、ダルテパリンが臨床現場で利用されつつある。本研究では、第3章の慢性期心房刺激群をコントロール群として用い、ダルテパリンを Af モデル犬に対し3週間にわたり投与した群をダルテパリン群として、両群における血液凝固能の変化を評価した。その結果、ダルテパリン群では、心房血の AR チップの OT において、コントロール群と比較して、刺激1週後に有意な延長、すなわち血液凝固の抑制効果が認められた。しかし、その後は、有意な変化は認められず一貫して短縮傾向を示したままであった。ダルテパリンは、ATIII を介して主に活性型第 X 因子（他に活性型第 IX、XI、XII 因子、トロンビン）を阻害することで、Af による凝固因子の活性化を抑えていることが知られている。刺激1週後において群間の有意差が認められたのは、このダルテパリンの抑制作用が1週後の時点では効果があったことによると推測された。しかし継時的に凝固因子の活性が増強され、ダルテパリンの抗凝固作用では抑えきれなくなった結果、最終的にはコントロール群と同じ程度まで OT が短縮したと考えられた。今回、ダルテパリンの投与にもかかわらず、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は、Af 状態が持続しているため、心房内での血液うっ滞が重度であり、それによる凝固能の活性がダルテパリンの抗凝固作用を上回ったものであると推定した。そのため、犬の Af 時の血栓予防・治療として、抗血液凝固治療のみでは、治療効果が不十分であると考えられた。

6. 高頻度心房刺激犬を用いた抗血栓治療の評価（第4章）

2) 抗凝固薬（クロピドグレル）による抗血栓治療の評価 -

第4章のダルテパリンの投与群では、Afモデル犬に対する心房内での抗凝固作用は継時的に消失した。また、第3章の慢性期および急性期の結果から、血栓形成時には血小板の活性も確認できたことから、本研究では、犬の大動脈血栓症例に対する治療効果が報告されているクロピドグレルを対象薬剤として用いた。第3章の慢性期心房刺激群をコントロール群として用い、クロピドグレルをAfモデル犬に対し3週間にわたり投与した群をクロピドグレル群として、両群における血液凝固能の変化を評価した。その結果、血小板機能を評価するPLチップでは、末梢血において、コントロール群と比較して、刺激1週目以降有意に延長し、採血時においても止血異常が認められた。そのため、末梢血においてはクロピドグレルの抗血小板作用は確認でき、薬用量としても十分であると考えられた。しかし、心房血のPLチップにおいては、コントロール群と比較して延長傾向は認められたものの、有意な変化は認められなかった。この理由として、今回実施した高頻度心房刺激による心房内のうっ血ならびに心房内皮障害が重度であり、Af時の血栓形成亢進状態を打ち消す程の強い抗血小板作用をもたらすことが出来なかったと示唆された。また、心房血と末梢血のARチップにおいては、コントロール群と比較して有意な変化は認められなかった。これはクロピドグレルの薬理効果以外である凝固因子抑制効果は見出せなかったためであると考えられた。うっ血が生じる状況では、ずり応力は低下し、血小板の凝集作用は低下するとされている。それでもなお、抑制効果が認められなかったことは、血栓形成時には、凝固作用と血小板作用が相互に作用しているため、血小板機能のみの抑制では不十分であると考えられた。刺激1週目における心房血のダルテパリンの抗凝固作用を考慮すると、抗血小板薬のみではなく、抗血液凝固治療との併用や直接経口抗凝固薬（DOAC）における抗血栓治療、その他、心房機能の改善を勘案した治療を併用する必要があると結論付けた。

謝辞

本稿を終わるに臨み、本研究に際して終始にわたり丁寧かつ熱心な御指導および御助言を賜りました東京農工大学動物医療センター福島研究室・福島隆治教授に深謝致します。また、獣医臨床腫瘍学研究室・町田登教授にも本研究に関する御助言および御指導を頂き、ここに感謝の意を表します。また、獣医外科学研究室・田中綾准教授にも本研究に関する御助言を頂き、ここに感謝の意を表します。

本研究の共同研究者として、御協力および御指導賜りました鹿児島大学共同獣医学部・三浦直樹准教授ならびに同学部附属動物病院一次診療科・岩永朋子先生に感謝致します。

本研究で使用した検査機器 T-TAS の使用方法の御指導および機器調整など多岐にわたる御協力をしていただいた株式会社藤森工業の細川和也 (Kazuya Hosokawa) 様、大西朋子 (Tomoko Onishi wada) 様に対し大変感謝致しております。

そして、本研究に対し、多大なるご支援ならびにご協力を賜りました東京農工大学動物医療センター、獣医外科学研究室ならびに動物医療センターの研修医の先生方にもお礼申し上げます。

最後に本研究に対し、貴重な生命を提供していただいた供試動物に心から感謝の気持ちを捧げたいと思います。

参考文献

- 1) Furie, B. and Furie, B.C. (2008). "Mechanisms of thrombus formation". *N.Engl. J. Med.* 359, 938~949.
- 2) Takashima, N., Arima, H., Kita, Y., Fujii, T., Miyamatsu, N., Komori, M., Sugimoto, Y., Nagata, S., Miura, K. and Nozaki, K. (2017). Incidence, Management and Short-Term Outcome of Stroke in a General Population of 1.4 Million Japanese. -Shiga Stroke Registry -. *Circ. J.* 25, 1636~1646.
- 3) Greer, D.M., Homma, S. and Furie, K.L. (2011). Cardiac diseases. *In: L.P. Mohr, P.A. Wolf, J.C. Grotta, M.A. Moskowitz, M.Mayberg, R.V.Kummer, [eds] Stroke 5th : Pathophysiology, Diagnosis, and Management.*, pp.814~827. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- 4) 永金義成, 中山正法, 汐月博之 (2009) . 病型別にみた脳梗塞危険因子. (小林祥泰) 脳卒中データバンク 2009 pp. 60~61. 中山書店, 東京
- 5) Kubo, M., Kiyohara, Y., Ninomiya, T., Tanizaki, Y., Yonemoto, K., Doi, Y., Hata, J., Oishi, Y., Shikata, K. and Iida, M. (2006). Decreasing incidence of lacunar vs. other types of cerebral infarction in a Japanese population. *Neurology* 23, 1539~1544.
- 6) Aberg, H. (1969). Atrial fibrillation : A study of atrial thrombosis and systemic embolism in a necropsy material. *Acta. Med. Scand.* 185, 373~379.
- 7) Shirani, J. and Alaeddini, J. (2000). Structural remodeling of left atrial appendage in patients with chronic non-valvular atrial fibrillation: Implications for thrombus formation, systemic embolism, and assessment by transesophageal echocardiography. *Cardiovasc. Pathol.* 9, 95~101.
- 8) Lake-Bakaar, G.A., Johnson, E.G., and Griffiths, L.G. (2012). Aortic thrombosis in dogs: 31 cases (2000-2010). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1; 241, 910~915.
- 9) Boswood, A., Lamb, C.R. and White, R.N. (2000). Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *J. Small. Anim. Pract.* 41, 109~114.

- 10) Goncalves, R., Penderis, J., Chang, Y.P., Zoia, A., Mosley, J., and Anderson, T.J. (2008). Clinical and neurological characteristics of aortic thromboembolism in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 49, 178~184.
- 11) Sykes, J.E., Kittleson, M.D., Chomel, B.B., Macdonald, K.A., and Pesavento, P.A. (2006). Clinicopathologic findings and outcome in dogs with infective endocarditis : 71 cases (1992-2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 1735~1747.
- 12) Winter, R.L., Sedacca, S.D., Adams A, Orton EC. (2012). Aortic thrombosis in dogs: presentation, therapy, and outcome in 26 cases. *J Vet Cardiol.* 14, 333~342.
- 13) Paul, J.U., Janice, M.B., and Thomas, K.D. (2012). Thrombotic complications associated with atrial fibrillation in three dogs. *J. Vet. Cardiol.* 14, 453~458
- 14) Brownlie, S.E., and Cobb, M.A. (1999). Observations on the development of congestive heart failure in Irish wolfhounds with dilated cardiomyopathy. *J. Small. Anim. Pract.* 40, 371~377.
- 15) 内場光浩. (2013). グローバルテスト: PT, APTTの基礎と臨床. *日本検査血液学会雑誌.* 14, 227~343.
- 16) Matsumoto, K., Takahashi, Y., Yoshitake, S. and Noguchi, T. (1996). A hematologic coagulation monitoring system for bedside use. *Masui.* 45, 1525~1528.
- 17) Jergens, A.E., Turrentine, M.A., Kraus, K.H. and Johnson, G.S. (1987). Buccal mucosal bleeding times of healthy dogs and of dogs in various pathologic states, including thrombocytopenia, uremia and von Willebrand's disease. *Am. J. Vet. Res.* 48, 1337~1342.
- 18) Brooks, M.B. and Catalfamo, J.L. (2013). Current diagnostic trends in coagulation disorders among dogs and cats. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 43, 1349~1372.
- 19) Stockham, S.L., Scott, M.A., Hemostasis. *In* : Stockham S.L., Scott, M.A. [Eds] *Fundamentals of veterinary clinical pathology.* 1st., pp.155~226. Blackwell publishing,

Iowa.

- 20) Hosokawa, K., Ohnishi, T., Fukasawa, M., Kondo, T., Sameshima, H., Koide, T., Tanaka, K.A. and Maruyama, I. (2012). A microchip flow-chamber system for quantitative assessment of the platelet thrombus formation process. *Microvasc. Res.* 83, 154~161.
- 21) Yamaguchi, Y., Moriki, T., Igari, A., Matsubara, Y., Ohnishi, T., Hosokawa, K. and Murata, M. (2013). Studies of a microchip flow-chamber system to characterize whole blood thrombogenicity in healthy individuals. *Thromb. Res.* 132, 263~270.
- 22) Hosokawa, K., Ohnishi, T., Kondo, T., Fukasawa, M., Koide, T., Maruyama, I., Tanaka, K.A. (2011). A novel automated microchip flow-chamber system to quantitatively evaluate thrombus formation and antithrombotic agents under blood flow conditions. *J. Thromb. Haemost.* 9, 2029~2037.
- 23) 大西朋子, 細川和也. (2015). 血栓・血管・血流の包括的検査 (一瀬白帝, 丸山征郎, 村田満) 新血栓止血血管学 検査と診療 pp. 36~42. 金芳堂, 東京.
- 24) Saito, H. (1996). Normal hemostatic mechanisms. *In* : Ratnoff, O.D. and Forbes, C.D. [eds] Disorders of hemostasis. pp. 23~52. WB Saunders, Philadelphia.
- 25) 森田隆司 (2003). 血液凝固機構の新しい考え方. *日小血会誌* 17, 49~57.
- 26) Hoffman, M. and Monroe, D.M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 85, 958~965.
- 27) Smith, S.A. (2009). The cell-based model of coagulation. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 19, 3~10.
- 28) Nesbitt, W.S., Westein, E., Tovar-Lopez, F.J., Tolouei, E., Mitchell, A., Fu, J., Carberry, J., Fouras, A. and Jackson, S.P. (2009). A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. *Nat. Med.* 15, 665~673.
- 29) Iwanaga T., Yamada S., Fukushima R., Nagasato T., Maruyama I. and Miura N. (2017). Novel thrombogenicity examination of whole blood: Total Thrombus-formation analysis System in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 31, 1301.

- 30) Bagot, C.N. and Arya, R. (2008). Virchow and his triad : a question of attribution. *Br. J. Haematol.* 143, 180~190.
- 31) Wolberg, A.S., Aleman, M.M., Leiderman, K. and Machlus, K.R. (2012). Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth. Analg.* 114, 275~285.
- 32) Lip, G.Y. and Gibbs, C.R. (1999). Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited. *J. Am. Coll. Cardiol.* 33, 1424~1426.
- 33) Tondo C., Scherlag B.J., Otomo K., Antz M., Patterson E., Arruda M., Jackman W.M., Lazzara R. (1997). Critical atrial site for ablation of pacing-induced atrial fibrillation in the normal dog heart. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 8, 1255~1265.
- 34) (1992). Predictors of thromboembolism in atrial fibrillation: II. Echocardiographic features of patients at risk. The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators. *Ann Intern Med.* 116, 6~12.
- 35) Moriguchi, M., Niwano, S., Yoshizawa, N., Kitano, Y., Kojima, J., Inuo, K., Saitou J. and Izumi, T. (2001). Inhomogeneity in the appearance of electrical remodeling during chronic rapid atrial pacing: evaluation of the dispersion of atrial effective refractoriness. *Jpn. Circ..J.* 65, 335~340.
- 36) Everett, T.H., Li, H., Mangrum, J.M., McRury, I.D., Mitchell, M.A., Redick, J.A. and Haines, D.E. (2000). Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation. *Circulation.* 102, 1454~1460.
- 37) Everett, T.H., Li, H., Mangrum, J.M., McRury, I.D., Mitchell, M.A., Redick, J.A. and Haines, D.E. (2000). Electrical, morphological, and ultrastructural remodeling and reverse remodeling in a canine model of chronic atrial fibrillation. *Circulation.* 102, 1454~1460.
- 38) Shinbane, J.,S., Wood, M.A., Jensen, D.N., Ellenbogen, K.A, Fitzpatrick A.P., Scheinman, M.M. (1997). Tachycardia-induced cardiomyopathy: a review of animal models and clinical studies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 29, 709~715.

- 39) Kittleson, D.M. (1998). Diagnosis and treatment of arrhythmias (dysrhythmias). pp. 461~474. *In: Small Animal Cardiovascular Medicine*, 1st ed (Kittleson D.M, et al), Mosby, St.Louis.
- 40) Hirose, T., Kawasaki, M., Tanaka, R., Ono, K., Watanabe, T., Iwama, M., Noda, T., Watanabe, S., Takemura, G. and Minatoguchi, S. (2012). Left atrial function assessed by speckle tracking echocardiography as a predictor of new-onset non-valvular atrial fibrillation: results from a prospective study in 580 adults. *Eur. Heart. J. Cardiovasc. Imaging*. 13, 243~250.
- 41) Abhayaratna, W.P., Fatema, K., Barnes, M.E., Seward, J.B., Gersh, B.J., Bailey, K.R., Casaclang-Verzosa, G. and Tsang, T.S. (2008). Left atrial reservoir function as a potent marker for first atrial fibrillation or flutter in persons \geq 65 years of age. *Am. J. Cardiol*. 101, 1626~1629.
- 42) Hori, Y., Kunihiro, S., Kanai, K., Hoshi, F., Itoh, N. and Higuchi, S. (2009). The relationship between invasive hemodynamic measurements and tissue Doppler-derived myocardial velocity and acceleration during isovolumic relaxation in healthy dogs. *J. Vet. Med. Sci*. 71, 1419~1425.
- 43) Choi, J., Kim, H. and Yoon, J. (2013). Pulsed tissue Doppler imaging of the left ventricular septal mitral annulus in healthy dogs. *J. Vet. Sci*. 14, 85~90.
- 44) Isaaz, K., Thompson, A., Ethevenot, G., Cloez, J.L., Brembilla, B. and Pernot, C. (1989). Doppler echocardiographic measurement of low velocity motion of the left ventricular posterior wall. *Am. J. Cardiol*. 64, 66~75.
- 45) Teshima, K., Asano, K., Sasaki, Y., Kato, Y., Kutara, K., Edamura, K., Hasegawa, A. and Tanaka, S. (2005). Assessment of left ventricular function using pulsed tissue Doppler imaging in healthy dogs and dogs with spontaneous mitral regurgitation. *J. Vet. Med. Sci*. 67, 1207~1215.

- 46) Trappe, H.J., Brandts, B., and Weismueller, P. (2003). Arrhythmias in the intensive care patient. *Curr. Opin. Crit. Care.* 9, 345~355.
- 47) Moise, N.S. (1999). Diagnosis and management of canine arrhythmias. *In* : Fox P.R., Sisson D., Moise N.S., [eds] *Textbook of Canine and Feline Cardiology*, 2nd ed. , pp. 331~385. W.B. Saunders, Philadelphia.
- 48) Stantilli, R.A., Pergo, M., and Perini, A. (2006). Electrophysiologic characteristics and topographic distributeon of focal tachycardias in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 539~545.
- 49) Tilley, L.P. (1992). *Essentials of Canine and Feline Electrocardiography*, 3rd ed., pp. 127~207. Philadelphia, Lea & Febiger.
- 50) Jung, S.W., Sun,W., Griffiths, L.G. and Kittleson, M.D. (2016). Atrial Fibrillation as a Prognostic Indicator in Medium to Large- Sized Dogs with Myxomatous Mitral Valvular Degeneration and Congestive Heart Failure. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 51~57.
- 51) Jessica, W, Wendy W, R Lee. (2008). Epidemiology of Atrial Fibrillation in the Dog. *Intern J Appl Res Vet Med.* 6, 151~154.
- 52) Naoyuki, T., Kiyoshi, N. and Hisashi, H. (2002). Lone Atrial Fibrillation in a Dog. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1057~1059.
- 53) Haissaguerre, M., Jais, P., and Shah, D.C. (1998). Spontaneous initiateon of atrial fibrillation by ectopic originating in the pulmonary veins. *N. Emgl. J. Med.* 339, 659~666.
- 54) Mann, D., Zipes, P., Libby, P., and Bonow, R. (2015). Braunwald's Heart Disease. *In*: *A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 2-Volume Set, 10th Edition.. Elsevier Saunders, Pennsylvania.
- 55) Kittleson, D.,M .(1998). Diagnosis and treatment od arrhythmias (dysrhythmias). pp. 461~474. *In*: *Small Animal Cardiovascular Medicine*.,1st ed (Kittleson D.M, et al), Mosby, St.Louis.
- 56) Fukushima, R. and Koyama, H. (2008). A Case of Canine Atrial Fibrillation

- Successfully Remitted through Defibrillation by Efonidipine Hydrochloride. *J. Vet. Clin. Sci.* 1, 96~100.
- 57) Kannel, W.B., Abbott, R.D., Savage, D.D. and McNamara, P.M. (1982). Epidemiological features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N. Engl. J. Med.* 306, 1018~1022.
- 58) Nakamura, K., Kawamoto, S., Osuga, T., Morita, T., Sasaki, N., Morishita, K., Ohta, H. and Takiguchi, M. (2017). Left Atrial Strain at Different Stages of Myxomatous Mitral Valve Disease in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 31, 316~325.
- 59) Johns, S.M., Nelson, O.L. and Gay, J.M. (2012). Left atrial function in cats with left-sided cardiac disease and pleural effusion or pulmonary edema. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 1134~1139.
- 60) Sanfilippo, A.J., Abascal, V.M., Sheehan, M., Oertel, L.B., Harrigan, P., Hughes, R.A. and Weyman, A.E. (1990). Atrial enlargement as a consequence of atrial fibrillation. A prospective echocardiographic study. *Circulation.* 82, 792~797.
- 61) Aseem, D.D., Bradley, P.K. (2005). Effect of atrial fibrillation on chamber dimensions. *Heart Rhythm.* 2, 25~27.
- 62) Linderer, T., Chatterjee, K., Parmley, W.W., Sievers, R.E., Glantz, S.A. and Tyberg, J.V. (1983). Influence of atrial systole on the Frank-Starling relation and the end-diastolic pressure-diameter relation of the left ventricle. *Circulation.* 67, 1045~1053.
- 63) Watson T., Shantsila E. and Lip, G.Y. (2009). Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation : Virchow's triad revisited. *Lancet.* 373, 155~166.
- 64) Menke, J., Lüthje, L., Kastrup, A. and Larsen, J. (2010). Thromboembolism in atrial fibrillation. *Am. J. Cardiol.* 105, 502~510.
- 65) Choudhury, A. and Lip, G.Y. (2003-2004). Atrial fibrillation and the hypercoagulable state: from basic science to clinical practice. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33, 282~289.

- 66) 古川哲史 (2013). なぜ血小板血栓は動脈、フィブリン血栓は静脈にできやすいのか？. そうだったのか！臨床に役立つ循環器薬理学. (古川哲史) pp. 178. メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京.
- 67) Topcuoglu, M.A., Haydari, D., Ozturk, S., Ozcebe, O.I. and Saribas O. (2000). Plasma levels of coagulation and fibrinolysis markers in acute ischemic stroke patients with lone atrial fibrillation. *Neurol. Sci.* 21, 235~240.
- 68) Kahn, S.R., Solymoss, S. and Flegel, K.M. (1997). Nonvalvular atrial fibrillation: Evidence for a prothrombotic state. *Can. Med. Assoc. J.* 157, 673~681.
- 69) Kahn, S.R., Solymoss, S. and Flegel, K.M. (1997). Increased tissue plasminogen activator levels in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Can. Med. Assoc. J.* 157, 685~689.
- 70) Gage, B.F., Waterman, A.D., Shannon, W., Boechler, M., Rich M.W. and Radford, M.J. (2001). Validation of clinical classification schemes for predicting stroke: results from the National Registry of Atrial Fibrillation. *J.A.M.A.* 285, 2864~2870.
- 71) Miura N., Furukawa M., Magari Y. and Mmomoi Y. (2013). Cross-Reactivity of the Anti-Human D-dimer Monoclonal Antibody 1C9-6F10 to Canine Fibrin Degradation Products. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 963~966.
- 72) Kuzi, S., Segev, G., Haruvi, E. and Aroch, I. (2010). Plasma Antithrombin Activity as a Diagnostic and Prognostic Indicator in Dogs: A Retrospective Study of 149 Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 587~596.
- 73) Hilfiker-Kleiner, D., Landmesser, U., Drexler, H. (2006). Molecular Mechanisms in Heart Failure : Focus on Cardiac Hypertrophy, Inflammation, Angiogenesis, and Apoptosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, A56~A66.
- 74) Coulter ,D.B., Keith, J.C. Jr. and Eddy, J.B., (1984). Blood pressure obtained by indirect measurement in conscious dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 1375~1378.
- 75) González-Torrecilla, E., García-Fernández, M.A., Pérez-David, E., Bermejo, J., Moreno, M. and Delcán, J.L. (2000). Predictors of left atrial spontaneous echo contrast and thrombi

- in patients with mitral stenosis and atrial fibrillation. *Am. J. Cardiol.* 86, 529~534.
- 76) Rastegar, R., Harnick, D.J., Weidemann, P., Fuster, V., Coller, B., Badimon, J.J., Chesebro, J. and Goldman, M.E. (2003). Spontaneous echo contrast videodensity is flow-related and is dependent on the relative concentrations of fibrinogen and red blood cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 603~610.
- 77) Habara, S., Dote, K., Kato, M., Sasaki, S., Goto, K., Takemoto, H., Hasegawa, D. and Matsuda, O. (2007). Prediction of left atrial appendage thrombi in non-valvular atrial fibrillation. *Eur. Heart. J.* 28, 2217~2222.
- 78) Danese E., Montagnana, M., Cervellin, G. and Lippi, G. (2014). Hypercoagulability, D-dimer and atrial fibrillation: an overview of biological and clinical evidence. *Ann. Med.* 46, 364~371.
- 79) Stokol, T. (2003). Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 33, 1419~1435.
- 80) Schött, U. and Johansson, P.I. (2013). II. Bringing flow into haemostasis diagnostics. *Br. J. Anaesth.* 111, 864~867.
- 81) January, C.T., Wann, L.S., Alpert, J.S., Calkins, H., Cigarroa, J.E., Cleveland, J.C.Jr., Conti, J.B., Ellinor, P.T., Ezekowitz, M.D., Field, M.E., Murray, K.T., Sacco, R.L., Stevenson, W.G., Tchou, P.J., Tracy, C.M. and Yancy, C.W. (2014). 2014 ACC/AHA Task Force Members. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society. *Circulation.* 130, 2071~3104.
- 82) Camm, A.J., Lip, G.Y., De Caterina, R., Savelieva, I., Atar, D., Hohnloser, S.H., Hindricks, G. and Kirchhof, P. (2012). 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the

- management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur. Heart. J.* 33, 2719~2747.
- 83) Inoue, H., Atarashi, H., Kamakura, S., Koretsune, Y., Kumagai, K., Okumura, K., Sugi, K., Yamashita, T., Yasaka, M., Satomi, K., Kodama, I., Ogawa, S., Ohe, T. and Tsutsui, H. (2014). Guidelines for Pharmacotherapy of Atrial Fibrillation (JCS 2013). *Circ. J.* 78, 1997~2021.
- 84) Suttorp, M.J., Kingma, J.H., Koomen, E.M., van't Hof A, Tijssen J.G., Lie K.I. (1993). Recurrence of paroxysmal atrial fibrillation or flutter after successful cardioversion in patients with normal left ventricular function. *Am. J. Cardiol.* 71, 710~713.
- 85) Petersen, P. and Godtfredsen, J. (1986). Embolic complications in paroxysmal atrial fibrillation. *Stroke* 17, 622~626.
- 86) Stoddard, M.F., Dawkins, P.R., Prince, C.R., Ammash, N.M. (1995). Left atrial appendage thrombus is not uncommon in patients with acute atrial fibrillation and a recent embolic event: a transesophageal echocardiographic study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 25, 452~459.
- 87) Sohara, H., Amitani, S., Kurose, M. and Miyahara, K. (1997). Atrial fibrillation activates platelets and coagulation in a time-dependent manner: a study in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 29, 106~112.
- 88) Gallagher, M.M., Hennessy, B.J., Edvardsson, N., Hart, C.M., Shannon, M.S., Obel, O.A., Al-Saady, N.M. and Camm, A.J. (2002). Embolic complications of direct current cardioversion of atrial arrhythmias: association with low intensity of anticoagulation at the time of cardioversion. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 926~933.
- 89) Sato, Y., Ishibashi-Ueda, H., Iwakiri, T., Ikeda, Y., Matsuyama, T., Hatakeyama, K. and Asada, Y. (2012). Thrombus components in cardioembolic and atherothrombotic strokes. *Thromb. Res.* 130, 278~280.
- 90) Fukuda, Y., Kuroiwa, Y., Okumiya, K., Kuroiwa, N., Ohshige, T., Tabuchi, H., Sanada, J., Takaoka, S., Minami, Y., Kataoka, H., Furukawa, S., Miyahara, K., Nakamura, K. and

- Hashimoto, S. (1980). Hypercoagulability in patients with mitral stenosis from the viewpoint of the behavior of plasma antithrombin III and alpha2 plasmin inhibitor. *Jpn. Circ. J.* 44, 867~874
- 91) Hofer, J., Ulmer, H., Kilo, J., Margreiter, R., Grimm, M., Mair, P. and Ruttman, E. (2017). Antithrombin III is associated with acute liver failure in patients with end-stage heart failure undergoing mechanical circulatory support. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 153, 1374~1382.
- 92) Nakamura, Y., Nakamura, K., Fukushima-Kusano, K., Ohta, K., Matsubara, H., Hamuro, T., Yutani, C. and Ohe, T. (2003). Tissue factor expression in atrial endothelia associated with nonvalvular atrial fibrillation: possible involvement in intracardiac thrombogenesis. *Thromb Res.* 111, 137~142.
- 93) Atrial Fibrillation Investigators. (1994). Risk factors for stroke and efficacy of antithrombotic therapy in atrial fibrillation. *Arch. Intern. Med.* 154, 1449~1457.
- 94) Morgan, C.L., McEwan, P., Tukiendorf, A., Robinson, P.A., Clemens, A. and Plumb, J.M. (2009). Warfarin treatment in patients with atrial fibrillation: observing outcomes associated with varying levels of INR control. *Thromb. Res.* 124, 37~41.
- 95) Pimohamed, M., Burnside, G., Eriksson, N., Jorgensen, A.L., Toh, C.H., Nicholson, T., Kesteven, P., Christersson, C., Wahlström, B., Stafberg, C., Zhang, J.E., Leathart, J.B., Kohnke, H., Maitland-van der Zee, A.H., Williamson, P.R., Daly, A.K., Avery, P., Kamali, F. and Wadelius, M. EU-PACT Group. (2013). A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N. Engl. J. Med.* 369, 2294~2303.
- 96) Peterson, P., Boysen, G., Godtfredsen, J., Anderssen, E.D., Andersen, B. (1989). Placebo-controlled, randomised trial of warfarin and aspirin for prevention of thromboembolic complications in chronic atrial fibrillation. The Copenhagen AFASAK study. *Lancet.* 28, 175~179.
- 97) Boston Area Anticoagulation Trial for Atrial Fibrillation Investigators. (1990). The effect

- of low-dose warfarin on the risk of stroke in patients with nonrheumatic atrial fibrillation. N. Engl. J. Med. 323, 1505~1511.
- 98) Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators. (1991). Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Study. Final results. Circulation. 84, 527~539.
- 99) Connolly S.J., Laupacis, A., Gent, M., Roberts, R.S., Cairns, J.A., Joyner, C. (1991). Canadian Atrial Fibrillation Anticoagulation (CAFA) Study. J. Am. Coll. Cardiol. 18, 349~355.
- 100) Ezekowitz, M.D., Bridgers, S.L., James, K.E., Carliner, N.H., Colling, C.L., Gornick, C.C., Krause-Steinrauf, H., Kurtzke J.F., Nazarian, S.M. and Radford, M.J. (1992). Warfarin in the prevention of stroke associated with nonrheumatic atrial fibrillation. Veterans Affairs Stroke Prevention in Nonrheumatic Atrial Fibrillation Investigators. N.Engl. J. Med. 327, 1406~1412.
- 101) Atrial Fibrillation Investigators. (1994). Risk factors for stroke and efficacy of antithrombotic therapy in atrial fibrillation : Analysis of pooled data from five randomized controlled trails. Arch. Intern. Med. 154, 1149~1157.
- 102) Hagan, E.C. and Radomski, J.L. The toxicity of 3-(acetylbenzyl)-4-hydroxyl -coumarin (warfarin) to laboratory animals. (1953). J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. 42, 379~382.
- 103) Hayes, W.J.Jr. (1967). The 90-dose LD₅₀ and a chronicity factor as measures of toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 11, 327~335.
- 104) Kronick, J., Phelps, N.E., McCallion, D.J. and Hirsh, J. (1974). Effects of sodium warfarin administered during pregnancy in mice. Am. J. Obstet. Gynecol. 118, 819~823.
- 105) Holbrook, A.M., Pereira, J.A., Labiris, R., McDonald, H., Douketis, J.D., Crowther, M. and Wells, P.S. (2005). Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. Arch. Intern. Med. 165, 1095~1106.

- 106) Trevor, P.E., Williams, Scott Shaw, Adam Porter, Larry Berkwitt. (2017). Aortic thrombosis in dogs. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 27, 9~22.
- 107) Smith S.A. (2012). Antithrombotic therapy. *Top. Companion. Anim. Med.* 27, 88~94.
- 108) Rosenberg, R.D. and Lam, L. (1979). Correlation between structure and function of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 1218~1222.
- 109) Thomas, D.P. and Merton, R.E. (1982). A low molecular weight heparin compared with unfractionated heparin. *Thromb. Res.* 28, 343~350.
- 110) Patnaik, M.M. and Moll, S. (2008). Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia.* 14, 1229~1239.
- 111) Benjamin, M. B., Amie, K. Danielle, M.B., April, E.B. and Jordan, R.S. (2012). Viscoelastic pharmacys after dalteparin administration to healthr dogs. *A.J.V.R.* 73, 1577~1582.
- 112) Sobel, M., McNeill, P.M., Carlson, P.L., Kermode, J.C., Adelman, B., Conroy, R. and Marques, D. (1991). Heparin inhibition of von Willebrand factor-dependent platelet function in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 87, 1787~1793.
- 113) Dewilde, W.J., Oirbans, T., Verheugt, F.W., Kelder, J.C., De Smet, B.J., Herrman, J.P., Adriaenssens, T., Vrolix, M., Heestermans, A.A., Vis, M.M., Tijssen, J.G., van 't Hof, A.W., ten Berg, J.M. WOEST study investigators. (2013). Use of clopidogrel with or without aspirin in patients taking oral anticoagulant therapy and undergoing percutaneous coronary intervention: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet.* 30, 1107~1115.
- 114) Yao, S.K., Ober, J.C., Ferguson, J.J., Maffrand, J..P, Anderson, H.V., Buja, L.M. and Willerson, J.T. (1994). Clopidogrel is more effective than aspirin as adjuvant treatment to prevent reocclusion after thrombolysis. *Am J Physiol.* 267, H488~H493.
- 115) ACTIVE Writing Group of the ACTIVE Investigators. Connolly S, Pogue J, Hart R, Pfeffer M, Hohnloser S, Chrolavicius S, Pfeffer M, Hohnloser S, Yusuf S. (2006).

- Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Atrial Fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesartan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial. *Lancet*. 367, 1903~1912.
- 116) Fukuuchi, Y., Tohgi, H., Okudera, T., Ikeda, Y., Miyanaga, Y., Uchiyama, S., Hirano, M., Shinohara, Y., Matsumoto, M. and Yamaguchi, T. (2008). A randomized, double-blind study comparing the safety and efficacy of clopidogrel versus ticlopidine in Japanese patients with noncardioembolic cerebral infarction. *Cerebrovasc. Dis.* 25, 40~49.
- 117) Mega, J.L., Close, S.L., Wiviott, S.D., Shen, L., Hockett, R.D., Brandt, J.T., Walker, J.R., Antman, E.M., Macias, W., Braunld, E. and Sabatine, M.S. (2009). Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N. Engl. J. Med.* 360, 354~362.
- 118) Kim, K.A. and Park, P.W. (2008). The effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84, 236~242.