

競走馬の急性腸炎と続発する血液凝固異常に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

野村 基惟

2021年3月

略 語 表

APTT (activated partial thromboplastin time) : 活性化部分トロンボプラスチン時間

AT (antithrombin) : アンチトロンビン

CDAD (*Clostridioides difficile*-associated diseases) : *Clostridioides difficile* 感染症

DIC (disseminated intravascular coagulation) : 播種性血管内凝固症候群

FDP (fibrin and fibrinogen degradation products) : フィブリンならびに

フィブリノーゲン分解産物

FIB (fibrinogen) : フィブリノーゲン

LMWH (low molecular weight heparin) : 低分子ヘパリン

PT (prothrombin time) : プロトロンビン時間

PTAH (phosphotungstic acid hematoxylin) : リンタングステン酸・ヘマトキシリン

SIRS (systemic inflammatory response syndrome) : 全身性炎症反応症候群

TAT (thrombin antithrombin complex) : トロンビン・アンチトロンビン複合体

目 次

緒 言

| | |
|-------------------|----|
| 1. 背景 | 2 |
| 2. 競走馬の急性腸炎 | 2 |
| 3. 急性腸炎に対する治療法 | 4 |
| 4. 腸炎発症馬の病理組織学的特徴 | 4 |
| 5. 急性腸炎と血液凝固異常 | 5 |
| 6. 血液凝固異常に対する治療法 | 7 |
| 7. 本研究の目的 | 9 |
| 8. 図表 | 10 |

第 1 章 競走馬の腸炎の疫学と治療成績に関する調査

| | |
|------------------|----|
| 1. 背景 | 15 |
| 2. 材料および方法 | |
| 1) 調査方法 | 16 |
| 2) 糞便検体を用いた病原体検索 | 16 |
| 3) 臨床検査と治療成績 | 18 |
| 4) 統計解析法 | 18 |
| 3. 結果 | 19 |
| 4. 考察 | 21 |
| 5. 小括 | 26 |
| 6. 図表 | 27 |

第2章 競走馬の腸炎に伴う血液凝固異常に関する調査

| | |
|----------------------------|----|
| 1. 背景 | 31 |
| 2. 材料および方法 | |
| 1) 対象症例の選択 | 33 |
| 2) 血液凝固系検査 | 33 |
| 3) 病理組織学的検査 | 34 |
| 4) 統計解析法 | 34 |
| 3. 結果 | |
| 1) 健常馬群における測定結果 | 35 |
| 2) 腸炎発症馬の概要と臨床成績 | 35 |
| 3) 腸炎発症馬における凝固系パラメーターの測定結果 | 36 |
| 4) 病理組織学的検査所見 | 38 |
| 4. 考察 | 39 |
| 5. 小括 | 44 |
| 6. 図表 | 45 |

第3章 競走馬の腸炎に対する血漿輸液療法の有用性に関する検討

| | |
|------------------------|----|
| 1. 背景 | 54 |
| 2. 材料および方法 | |
| 1) 調査対象 | 55 |
| 2) 血漿輸液療法の適用基準と血漿の投与方法 | 55 |
| 3) 調査項目 | 57 |
| 4) 統計解析法 | 57 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 3. 結果 | |
| 1) 健常馬群における測定結果----- | 58 |
| 2) 血漿輸液適用症例の概要----- | 58 |
| 3) 血漿投与の概要と血漿輸液適用症例における血液検査値の変動----- | 58 |
| 4. 考察----- | 60 |
| 5. 小括----- | 65 |
| 6. 図表----- | 66 |
| | |
| 総 括----- | 70 |
| | |
| 引用文献----- | 74 |
| | |
| 謝 辞----- | 89 |

緒 言

1. 背景

ウマは草食動物であり、巨大な盲腸や結腸で繊維成分の発酵を行ってエネルギーとして利用する後腸発酵動物である。成馬で容積 100 L に及ぶ後腸内には多種多様な細菌が棲息し、腸内細菌叢を形成している。ウマの消化管の解剖学的特徴として、小腸（空腸）が広範な腸間膜によって体壁の背側に吊るされていること、大腸の一部が体壁に固定されていないこと、消化管の太さが著しく異なる部位があり腸管内容物が停滞しやすいこと、腸管に分布する末梢神経が鋭敏であることなどが知られている。また、さまざまなストレス因子により腸内細菌叢のバランスが変化することも相俟って、ウマは消化器疾患を発症しやすい動物といえる。日本中央競馬会（JRA）美浦および栗東トレーニング・センター（TC）では、それぞれ約 2,000 頭の競走期サラブレッドが繋養されているが、平成 31 年に JRA 競走馬診療所で診療対象となった全疾病の発生実頭数 41,535 頭のうち、消化器疾患の発生実頭数は 5,886 頭であり、全体の 14%を占めていた [107]。これは、運動器疾患に次ぎ 2 番目に多い割合であり、競走馬臨床において消化器疾患に対する治療の重要度は非常に高いことがわかる。

2. 競走馬の急性腸炎

競走馬に発症する消化器疾患の 1 つに、急性腸炎（以下、腸炎）がある。腸炎とは、主に盲腸や結腸の粘膜に壊死性の炎症が生じ、発熱や泥状～水様性の下痢といった臨床症状を呈する疾患である。重症例では、40℃以上の発熱と水様性の下痢に伴う脱水により覇気を喪失し、四肢の冷感や頻呼吸を認める状態で発見されることもある。病態が進行すると、腸粘膜が重度かつ広範囲に傷害され、肺炎、蹄葉炎、頸静脈炎や腎不全といったさまざま合併症を発症し、死に至ることも少なくない。ウマの腸炎発症に関する記述は古くからある。1960 年代には原因不明の致死率の高い腸炎に対して「X colitis（X大腸炎）」との名が付されたが [83]、その後ウマに腸炎を引き起こす病原体に対する調査が進み、サルモネラ属菌 [96]、

Clostridioides difficile [23], *Clostridium perfringens* [32], 子馬においては *Lawsonia intracellularis* [80], ロタウイルス [73]やコロナウイルス [74], *Neorickettsia risticii* [14]と
いった病原体が一部の X 大腸炎の原因となることが報告されている。しかし、競走期サラブレッドの臨床現場においては、これらの病原体が検出されない特発性の発症も少なくない。

競走期サラブレッドは、競走に出走することを目的に繋養されているため、出走に向けたトレーニングを実施する調教場、競馬場、休養のための牧場といった環境を転々としている（図 1）。調教場においては、高い強度のトレーニングを繰り返すことから、必然的に高いストレスがかかる。また、トレーニングに見合ったカロリーを摂取するため、高カロリーの飼料を多給される傾向にある。さらに、競馬場に向けて、あるいは休養のための牧場へ向けての馬運車や船舶によるウマの輸送は、時として 20 時間を超える移動となることもある。また、高負荷の運動に伴って発症する運動器疾患には、手術の実施が必要な疾患もあり、両 TC における年間の手術件数は 500 件を超える。さらに近年のウマ医療の高度化により、競走復帰を目的とした手術だけでなく、救命を目的とした長時間の手術への取り組みも進んでいる。このような手術の実施後も含め、入院治療が実施されることも少なくない。腸内における病原体の増殖、あるいは腸炎の発症そのものには、腸内細菌叢の変動が大きく関与すると考えられている。また、ウマの腸内細菌叢の変動を引き起こす要因として、給餌飼料の変更および絶食、抗菌薬の投与や長時間輸送、診療施設への入院、手術、その他さまざまなストレス因子が関与することが報告されている [6-7, 16, 33-34]。これらの事実を踏まえると、競走期サラブレッドはその生活環境において、腸炎発症のトリガーとなり得る要因に常に曝露されているといえる。近年、JRA 競走馬診療所で診療対象となった競走期サラブレッドにおける腸炎の発症頭数は増加傾向（図 2）にあり、腸炎の発症傾向の把握や治癒率の改善は、ウマの福祉はもとより、競走資源の確保やサラブレッドの血統的価値の観点からも喫緊の課題となっている。

3. 急性腸炎に対する治療法

腸炎に対する治療法は、原因となる病原体が明らかになった感染性腸炎に対しては、その病原体に対する抗菌薬・抗免疫血清投与などの原因療法と、全身症状に対する対症療法が実施される。原因療法として代表的なものには、*C. difficile* 感染が確認された症例に対するメトロニダゾールの投与等がある [8, 26]。一方、病原体が明らかとならない特発性腸炎に対しては、損傷を受けた腸粘膜がターンオーバーにより修復し、正常な栄養吸収が行われるようになるまでの対症療法が主たる治療法となる。具体的には、下痢による脱水を補正するための輸液療法、腸粘膜バリアの傷害に伴って生じるエンドトキシンショックに対する抗炎症薬（フルニキシン）の投与やエンドトキシンの吸着を目的とした薬剤（ポリミキシン，DTO スメクタイト）の投与などがこれに当たる [26, 61, 63]。さらに、腸内細菌叢の改善を狙ったプロバイオティクスとして、ウマ由来乳酸菌製剤の経口投与なども実施される。しかし、実際の臨床現場においては治療に難渋することが多く、有用な治療法が確立されているとは言えないのが現状である。

4. 腸炎発症馬の病理組織学的特徴

腸炎の発症に伴って生じる病態変化を理解し、治療法の改善を検討する方法の1つとして、死亡馬の病理学的検査所見に着目することは重要な視座と考えられる。腸炎発症馬の病理組織学的検査においては、主たる所見である腸粘膜面のびらん、潰瘍、壊死および壊死領域への炎症細胞浸潤に加え、腸粘膜下組織および粘膜固有層の小血管に、微小血栓形成や線維素（フィブリン）析出を認めることがある。さらに、全身諸臓器に対して病理組織学的検査が実施された症例のなかには、腸粘膜の小血管だけでなく、肺泡毛細血管、肝臓類洞および腎臓糸球体においても、微小血栓形成やフィブリン析出を認める症例が存在する。これらの所見は、生前に全身性の血液凝固活性化、すなわち播種性血管内凝固症候群（DIC；

disseminated intravascular coagulation) が生じていたことを示唆する所見と考えられる。過去の報告には、消化器疾患の重症度が高いほど病理組織学的検査での全身諸臓器におけるフィブリン析出のスコアが高く、臓器への血流を阻害することにより多臓器不全を惹起している可能性があるとした報告もある [13, 17-18]。

これらの事実を踏まえると、血液凝固機能の変化を把握して適切に治療を実施することは、多臓器不全への進行を予防し、腸炎の予後を改善する可能性があると考えられる。しかし、これまで本邦の競走馬医療においては血液凝固異常への関心は薄く、腸炎との関連性や治療における重要性については十分に検討されてこなかった。

5. 急性腸炎と血液凝固異常

播種性血管内凝固症候群 (DIC) は、さまざまな基礎疾患の存在下で全身性かつ持続的に血液凝固系および線溶系が活性化し、結果的に臓器障害や出血症状をきたす症候群である。ヒト医学領域において、本邦における DIC 患者数は年間 73,000 人程度存在し、臓器障害を示唆する臨床症状が出現すると予後は極めて不良であるとされている [110]。DIC の本態は血液凝固活性化であるが、それと同時進行的に生じる線溶活性化の程度は基礎疾患により差異があることが知られており、その差異に基づき大まかな DIC 病型分類が行われている (図 3) [3]。例えば、基礎疾患が敗血症および重度の感染症であった場合に生じる DIC は、線溶活性化の程度の小さい線溶抑制型 DIC であり、出血症状は認められず微小血栓形成による臓器症状がメインとなる。これらの病型分類に基づき抗凝固療法と抗線溶療法を組み合わせることにより、DIC に対する治療戦略が検討される。ヒトにおいて DIC を引き起こす基礎疾患は敗血症のほかにも多岐にわたり、白血病を含む造血器悪性腫瘍、固形癌、外傷・熱傷、熱中症、血管関連疾患、ショック、手術の実施などが挙げられる。DIC の診断基準は、ヒト医学領域においても未だ確立されたものはなく議論の余地を残しており [95]、代表的なものに

は、「厚生労働省 DIC 診断基準」 [54]、国際学会（ISTH ; International Society on Thrombosis and Hemostasis）の定める「Overt DIC 診断基準」 [92]、および日本救急医学会の定める「急性期 DIC 診断基準」 [30]がある。それぞれ診断に採用する臨床評価項目や血液検査項目は異なるが、このうち「急性期 DIC 診断基準」には、体温（発熱）・心拍数（頻拍）・呼吸数（頻呼吸）・白血球数（上昇または低下）を指標とする全身性炎症反応症候群（SIRS ; Systemic Inflammatory Response Syndrome）の発症も要素に含まれており、DIC と SIRS を関連付ける考え方が浸透しつつあることがうかがえる [39]。

ウマの DIC 発症に関してはさまざまな報告があり、腫瘍性疾患や細菌およびウイルス感染症に伴う発症の報告があるが、なかでも消化器疾患における DIC の発症についての報告が多く、消化器疾患において DIC を発症した場合は予後が悪いことが報告されている [18-20, 24, 46-47, 64-65, 70, 101]。また Monreal らは、重度の疝痛症例において血液凝固活性化と線溶抑制が生じることを報告しており [65]、これはウマの消化器疾患における DIC の発症機序の解明や、病型分類に有用な知見と考えられる。ウマにおいても、国際的にコンセンサスが得られた DIC 診断基準は存在しないが、血液凝固機能进行评估する検査項目のうち、複数の項目に異常値が認められた場合に DIC と診断する報告が多い [19, 24, 65, 70, 101]。血液凝固機能进行评估するパラメーターとして代表的なものには、血小板数 (PLT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT ; activated partial thromboplastin time) やプロトロンビン時間 (PT ; prothrombin time) といった凝固時間、アンチトロンビン (AT ; antithrombin) やプロテイン C といった生体内の抗凝固因子、フィブリノーゲン (FIB ; fibrinogen) やフィブリン・フィブリノーゲン分解産物 (FDP ; fibrin and fibrinogen degradation products) などがある。さらに近年では、トロンビンがアンチトロンビンに結合して生成されるトロンビン・アンチトロンビン複合体 (TAT ; thrombin antithrombin complex) が凝固活性化をより直接的に評価する分子マーカーとして用いられており、ウマの消化器疾患に伴う DIC において TAT の上昇

を確認した報告もある [19, 65, 93]。これらの過去の報告は、治療中のある一時点の血液凝固系検査値を用いて凝固活性化および線溶活性化を評価するものや、DIC 発症と予後との関連性を検討するものが中心であった [47, 65, 68, 101]。一方、臨床現場では、初診時から継続して血液凝固系検査を実施することが想定される。各血液凝固系パラメーターが、腸炎発症初期から重症化に伴ってどのような経時的変化を示すのか、さらにはパラメーターの変動を治療法の選択にどのように活用するか検討した報告はこれまでない。さらに、血液凝固系検査値は、病院ごと、ないし測定機器ごとに基準値を設定する必要があることがヒト医学領域における知見から知られており、またウマのなかでも特殊な環境で飼養されている競走期サラブレットの正常範囲は明らかにされていない。

6. 血液凝固異常に対する治療法

血液凝固異常に対する治療として最も重要なものは、原因となっている基礎疾患の治療である。また、それに加えて基本的な治療法となるのは、抗凝固・血栓療法である。ヒト医学領域における抗凝固療法には、ヘパリン類、遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤および合成プロテアーゼ阻害薬の投与などが知られている。現状、これらの治療法の中で競走馬医療に適用可能なものはヘパリン類の投与であり、痙痛に伴って発症した血液凝固異常に対して未分化ヘパリンあるいは低分子ヘパリンを投与して効果を比較した報告や、開腹手術後にヘパリンを投与することで蹄葉炎の発症を予防できるかを検討した報告もある [9, 22, 26, 67]。これらのヘパリン類は、体内に投与されると抗凝固因子である AT と結合し、AT の抗凝固活性を飛躍的に向上させることで効果を発揮する [45]。AT は主に肝臓で合成される分子量約 59,000 の単鎖糖タンパクで、トロンビンのみならず、活性化第 VII, IX, X, XI, XII 因子など多くの凝固因子と 1 対 1 で結合して抗凝固作用を示す (図 4) [56, 109]。このため、何らかの要因で体内の AT 活性が低下している場合、ヘパリン類を投与しても十分な効果が発揮

されない。DIC を発症した際に AT 活性が低下する機序は複数知られており，凝固活性化に伴って AT の消費が亢進することに加え，特に重度感染症・敗血症を原因とする DIC においては，血管透過性の亢進に伴う血管外への漏出や顆粒球エラスターゼによる分解が生じやすいことが明らかとなっている [15, 41]。このような要因により AT 活性が低下した場合，ヒト医学領域では AT 濃縮製剤の投与による補充療法が検討される。AT 活性が正常の 70%以下に低下した場合には AT 製剤の投与が保険適応となり，3～5 日間の投与が行われる [86, 111]。AT は抗凝固作用以外にも，血管内皮細胞のプロスタサイクリン産生を介する抗炎症作用も有することが明らかとなっており [76]，DIC に対する治療法の 1 つとして AT 投与療法の臨床研究が進められている [29, 31, 103]。また，AT を含む多種多様な凝固因子が消費亢進により低下して出血傾向を呈した場合には，包括的な凝固因子の補充を目的とした治療法として，新鮮凍結血漿の投与が実施されることもある [21, 71]。

筆者の知る限り，ウマに投与可能な AT 濃縮製剤は存在しない。一方，血漿輸液療法については，凝固因子欠乏に加え，低アルブミン血症，膠質浸透圧の減少および移行免疫不全の治療に用いられている [44, 60]。本邦では特に子馬の治療において，血液中のタンパク質成分である免疫グロブリンの投与が必要となる移行免疫不全症や，同じくタンパク質成分であるアルブミンが必要となるローソニア感染症に対する治療法として実施されている。しかし，成馬に対する血漿輸液療法については知見が少なく，腸炎発症馬に対して血漿輸液療法を実施した臨床報告は Welch らの 1 報に限られている [101]。このため，腸炎発症馬に対する血漿輸液療法の適用タイミング，投与量，投与回数および効果判定法といった臨床上的情報が不足している。

7. 本研究の目的

これまで述べてきた事実から、競走馬の腸炎において検討すべき課題として、致死率が高く発症傾向の把握や治療法の確立が急務であること、腸炎に伴って起こる血液凝固異常に対する治療が治癒率を改善する可能性があること、競走馬に実施可能な血液凝固異常に対する治療法としてヘパリン類の投与と血漿輸液療法があることに整理される。そこで本研究では、まず第1章で2010-2018年の9年間に腸炎を発症した競走馬137頭を対象として回顧的に調査し、発症事前因子や臨床検査所見、治療成績などを分析して特徴を明らかにした。続いて第2章では、腸炎により死亡した症例の病理組織学的検査所見を整理するとともに、腸炎に伴って生じる血液凝固機能の経時的変化を調査し、血液凝固異常に対する治療法選択に活用することを念頭に考察した。最後に第3章では、第2章の結果を踏まえ、ヘパリン投与と血漿輸液療法を組み合わせた血液凝固異常に対する治療基準を設定し、その有用性について検討した。



図1 競走期サラブレッドの生活環

馬運車や船舶を利用した輸送は、時として20時間を超えることもある。また、トレーニング中と休養中とでは、給餌される飼料の種類やカロリーが大きく異なっている。このような特徴的な生活環は、腸内細菌叢に影響を与える可能性がある。

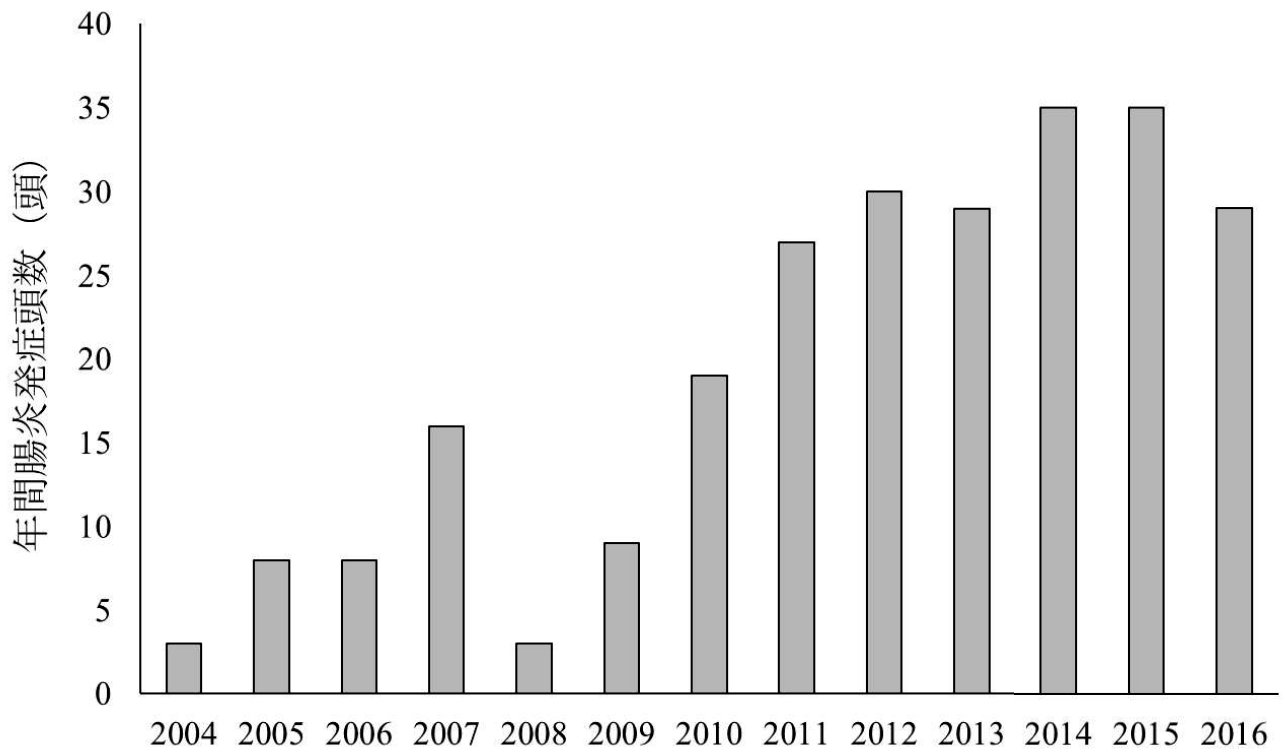


図2 日本中央競馬会施設内における腸炎発症頭数の推移（2004－2016年）

| 病 型 | 凝固 線溶 (TAT)(PIC) | 症状 | DD | PAI | 代表的 疾患 |
|-----------------------|---------------------|----------|----|-----|------------|
| 線溶抑制型 (凝固優位型) | | 臓器 症状 | 微増 | 著増 | 敗血症 |
| ↑ 線溶均衡型 (中間型) | | | | | 固形癌 |
| ↓ 線溶亢進型 (線溶優位型) | | 出血 症状 | 上昇 | 微増 | APL AAA |

図3 線溶活性化の程度による DIC の病型分類

(文献3の図を改変)

TAT：トロンビン・アンチトロンビン複合体

PIC：プラスミン・ α_2 プラスミンインヒビター複合体

DD：D-dimer

PAI：プラスミノゲンアクチベーターインヒビター

APL：急性前骨髄球性白血病

AAA：腹部大動脈瘤

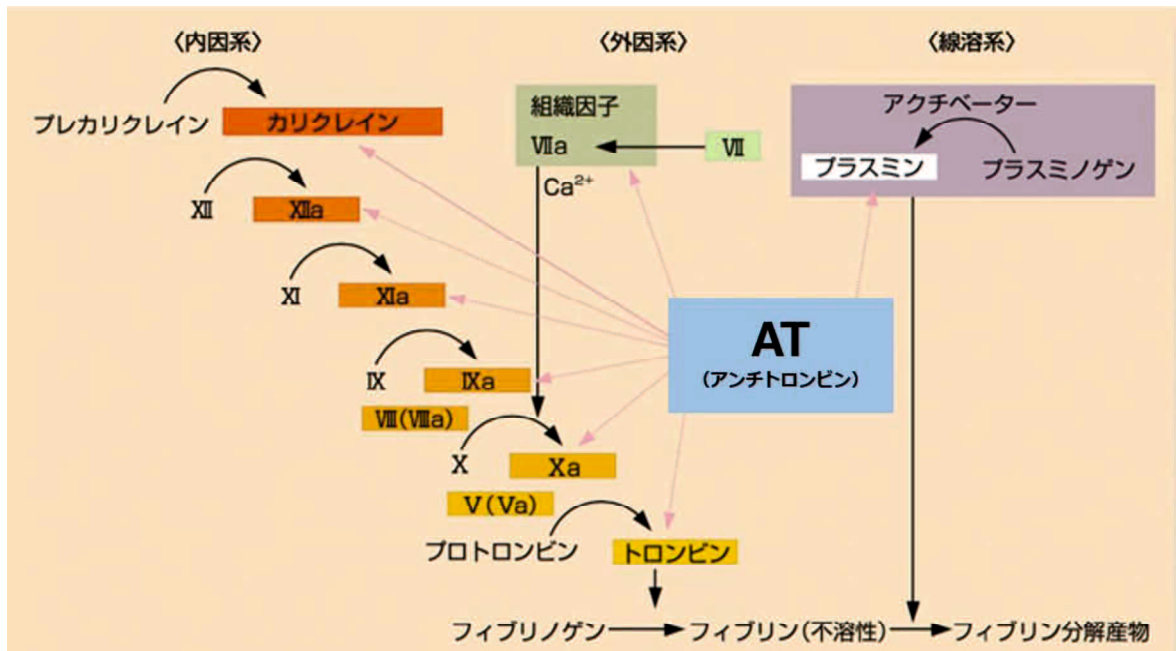


図4 血液凝固・線溶系カスケードとアンチトロンビン (AT) の抗凝固作用

(文献 109 の図を改変)

AT は主に肝臓で合成される分子量約 59,000 の単鎖糖タンパクで、トロンビンのみならず、活性化第 VII, IX, X, XI, XII 因子など多くの凝固因子と 1 対 1 で結合して抗凝固作用を示す。

第 1 章

競走馬の腸炎の疫学と治療成績に関する調査

1. 背景

競走馬に発症する消化器疾患の1つに、急性腸炎（以下、腸炎）がある。腸炎とは、主に盲腸や結腸の粘膜に壊死性の炎症が生じ、発熱や泥状～水様性の下痢といった臨床症状を呈する疾患である。重症例では、40℃以上の発熱と水様性の下痢に伴う脱水により、覇気を喪失し、四肢の冷感や頻呼吸を認める状態で発見されることもある。病態が進行すると、腸粘膜が重度かつ広範囲に傷害され、肺炎、蹄葉炎、頸静脈炎や腎不全といったさまざま合併症を発症し、死に至ることも少なくない。ウマの腸炎発症に関する記述は古くからある。1960年代には原因不明の致死率の高い腸炎に対して「X colitis（X大腸炎）」との名が付されたが [83]、その後、ウマに腸炎を引き起こす病原体に対する調査が進み、サルモネラ属菌 [96]、*Clostridioides difficile* [23]、*Clostridium perfringens* [32]、仔馬においては *Lawsonia intracellularis* [80]、ロタウイルス [73]やコロナウイルス [74]、*Neorickettsia risticii* [14]と いった病原体が一部の X 大腸炎の原因となることが報告されている。

競走期サラブレッドの臨床現場においては、これらの病原体が検出されない特発性の発症も少なくないが、*C. difficile* が検出された症例については、特に甚急性の転帰を辿る場合が多いことを臨床的に経験している。*C. difficile* は、偏性嫌気性グラム陽性有芽胞桿菌であり、土壌、干し草、砂などの自然環境やヒト、動物の腸管に棲息する [82]。芽胞は非常に強い環境抵抗性を有しており、診療施設や飼養環境への汚染も問題となっている [55]。ヒト医学領域では、抗菌薬関連下痢症や腸炎の主要な原因菌であり、ウマの腸炎や下痢症にも深く関与していることが 1980 年代以降欧米で報告されてきた [23, 49]。本邦においても、2010 年に初めてウマから分離が確認されており、腸炎発症との関連が指摘されている [75]。*C. difficile* 感染症（CDAD ; *Clostridioides difficile* -associated diseases）を含め、腸炎の発症メカニズムは未だ解明されていない。CD 腸炎の発症については、抗菌薬による腸内細菌の乱れが引き金になる可能性がヒト及びウマで報告されているが [5, 12]、抗菌薬を介さない発症

も報告されている [5, 85, 100]。ウマの CD 腸炎には抗菌薬以外にも輸送，入院，手術，食事の変更，絶食など因子も関与している可能性が考えられているが，まだ十分に解明されていない [7]。

競走期サラブレッドは，出走，調教，休養を繰り返すその生活環（図 1）から，腸炎発症のトリガーとなり得る要因に常に曝露されているといえる。近年，JRA 競走馬診療所で診療対象となった競走期サラブレッドにおいて腸炎の発症頭数は増加傾向にあり，発症傾向の把握や治癒率の改善は，ウマの福祉はもとより，競走資源の確保やサラブレッドとしての血統的価値の観点からも喫緊の課題となっている。そこで本章では，近年の腸炎発症馬について，発症事前因子，臨床検査結果および治療成績についてその特徴を調査するとともに，特に CD 腸炎と非 CD 腸炎との違いの有無を検討した。

2. 材料及び方法

1) 調査方法

2010 年から 2018 年の 9 年間に，JRA の美浦 TC，栗東 TC および函館競馬場競走馬診療所で，38.5℃以上の発熱と急性の下痢症を認め，獣医師により腸炎と診断され治療を受けたサラブレッド種競走馬 247 頭を調査した。このうち，糞便検体を用いて *C. difficile* の検出検査が実施された 137 頭について，診療記録システム (JARIS ; Japan Racing Information System) を用いて，個体情報や診療記録を調査対象として抽出した。

2) 糞便検体を用いた病原体検索

糞便検体は，下痢および発熱といった臨床症状を確認してから 24 時間以内に採取した。*C. difficile* 検査は，*C. difficile* の toxin A または toxin B，および特異抗原を検出する市販の検査キット (C. DIFF QUIK CHEK コンプリート ; アーリアメディカル株式会社) (図 5) を利用

し、全 137 頭に対してそれぞれ症状を確認した診療所で実施した。このうち、市販のキットを用いた検査で毒素および抗原の両方が陽性となった馬を CDAD 群、両方が陰性となった馬を non-CDAD 群に分類した。毒素あるいは抗原の一方のみが陽性となった場合には、精査のために糞便検体を嫌気冷蔵状態で JRA 競走馬総合研究所へ送付し、細菌分離培養検査を実施した。毒素産生性 *C. difficile* が検出された場合には CDAD 群に、検出されなかった場合には non-CDAD 群に分類した。

細菌培養検査は、*C. difficile* に加え、国内の馬の腸炎の原因細菌として報告のあるサルモネラおよび *C. perfringens* を対象として実施した。*C. difficile* 検査キットにより陽性と判定された馬については全頭、また陰性と判定された馬についてはその一部を含む、合計 64 頭に実施された。糞便検体は、検体量の 10 倍量の蒸留水によって希釈し、等量の 99.5%エタノールと混合した後、1 時間室温で静置した。混合液のうち 100 μ l を、*C. difficile* 分離用 CCMA-EX 培地（日水製薬、東京）および、*C. perfringens* 分離用 5%卵黄加 CW 寒天培地（日水製薬、東京）に播種し、37°C 嫌気条件下で 24 時間培養した。その後、コロニー形態、グラム染色、および Rapid ID 32A test kit（BioMerieux Japan、東京）を用いて菌同定を実施した。また、Kato らの既報に基づき、分離された *C. difficile* に対して toxin A 遺伝子 (*tcdA*)、toxin B 遺伝子 (*tcdB*)、および CDT の subunit A 遺伝子 (*cdtA*) を検出する PCR 解析を実施した [51-52, 89]。サルモネラの培養検査については、100 μ g の糞便検体を Rappaport-vassiliadis enrichment broth に播種し、42°C で 24 時間培養した。その後、DHL 寒天培地へ播種し、37°C で 24 時間培養した。サルモネラが疑われる黒色のコロニーを釣菌し、市販の同定キット API 20E（BioMerieux Japan、東京）を用いて菌同定を実施した。サルモネラと同定された場合には血清型別キット「生研」（デンカ生研株式会社、東京）を用いて、O 抗原、Vi 抗原、および H 抗原による血清型別を実施した。

3) 臨床検査と治療成績

38.5°C以上の発熱ならびに水様性下痢を呈して腸炎と診断され、初めて JRA 競走馬診療所での診察対象となった時点を初診と定義した。発症時の年齢ならびに性別、発症時季（3月～5月、6月～8月、9月～11月、12月～2月）、初診時のバイタルサイン（直腸温、心拍数、呼吸数）および致死率を調査した。また、血液検査値として、初診時のヘマトクリット値（PCV；packed cell volume）、白血球数（WBC；white blood cell）、尿素窒素（BUN；blood urea nitrogen）、クレアチニン（CRE；creatinine）、総蛋白（TP；total protein）、アルブミン（ALB；albumin）、および血清アミロイド A（SAA；serum amyloid A）を調査した。測定には、PCV および WBC については自動測定装置（MEK-6500、日本光電工業株式会社、東京）を、その他の項目については自動測定装置（Hitachi 7700、株式会社日立ハイテク、東京）を使用した。これらの調査結果を、CDAD 群と non-CDAD 群の間で比較した。

腸炎の発症事前因子の調査のため、発症の1ヶ月前以内に、抗菌薬の投与、手術、入院治療、および10時間以上の輸送を経験したか否かを調査し、結果を CDAD 群と non-CDAD 群の間で比較した。また、治療成績について比較するため、調査対象馬に実施された治療のなかから、メトロニダゾールの投与、ポリミキシン B の投与、DTO スメクタイト（毒素吸着剤）の経口投与、プロバイオティクス製剤の経口投与の実施について調査し、CDAD 群と non-CDAD 群で比較した。

4) 統計解析法

正規分布しない数値変数の群間比較については、マンホイットニーの U 検定を実施した。正規分布した PCV については、対応のない t 検定を実施した。カテゴリー変数については、カイ 2 乗検定を実施して群間比較を行った。全ての統計処理は JMP 13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて実施した。P < 0.05 となった項目を、統計的に有意差ありと判定した。

3. 結果

調査対象となった 137 頭のうち、34 頭は美浦 TC、94 頭は栗東 TC、9 頭は函館競馬場での発症であった。性別の内訳は、牡馬が 89 頭、牝馬が 40 頭、セン馬が 8 頭で、年齢は 3.2 ± 1.2 歳（平均±標準偏差）であった。

24 頭（18%）が CDAD 群に、113 頭（82%）が non-CDAD 群に分類された。CDAD 群では全頭糞便を用いた簡易キットによる検査で毒素および抗原の両方が陽性となり（図 5）、毒素あるいは抗原の一方のみが陽性となって細菌培養検査の結果により CDAD 群に分類された症例はいなかった。また、CDAD 群は、細菌培養検査において、全頭毒素産生性の *C. difficile* が分離された。一方、non-CDAD 群のうち細菌培養検査を実施した症例からは、毒素産生性、あるいは毒素非産生性の *C. difficile* は分離されなかった。サルモネラや *C. perfringens* 等のその他の病原体は、細菌培養検査を実施した計 64 頭からは分離されなかった。

CDAD 群と non-CDAD 群では、年齢、性別および発症時期には差を認めなかった。治療開始時、心拍数および呼吸数の増加が両群の大多数の症例で認められたが、このうち呼吸数については non-CDAD 群に比較して CDAD 群で有意に増加していた。また、初診時の血液検査については、PCV、BUN および SAA については CDAD 群で有意に高く、TP および ALB については CDAD 群で有意に低かった。CDAD 群のうち 14 頭、non-CDAD 群のうち 32 頭が治療に反応せず安楽死処置となり、CDAD 群、non-CDAD 群のうちそれぞれ 6 頭が状態悪化により死亡した。致死率については、CDAD 群で有意に高かった（表 1）。

CDAD 群では、発症前に抗菌薬の投与、手術の実施、あるいは入院治療を経験している症例の割合が、non-CDAD 群と比較して有意に多かった。一方、発症前に 10 時間以上の輸送を経験している症例の割合は、non-CDAD 群と比較して有意に少なかった（表 2）。CD 腸炎発症前に抗菌薬投与を受けた馬は 22 頭であり、その抗菌薬の種類はさまざまであった。22 頭のうち、19 頭（86%）はセファロスポリン系抗菌薬（セファロチン、セファゾリン、セフトリオキサム、お

よびセファレキシンのうちいずれか 1 種) を投与されており, また該当しない 3 頭については, それぞれエンロフロキサシン, ペニシリンとストレプトマイシンの合剤, カナマイシンを通常量投与されていた。セファロスポリン系抗菌薬を投与されていた 19 頭のうち 4 頭については, セファロスポリンに加え, ミノサイクリン (3 頭) およびマルボフロキサシン (1 頭) の投与を受けていた。CD 腸炎発症前に実施された手術の種類については, 開腹手術が 5 頭, 螺子固定術が 2 頭, 喉頭形成術, 結膜フラップ術, 関節鏡手術, 両第 4 中足骨々折骨片摘出術, および去勢術がそれぞれ 1 頭ずつであった。一方, 非 CD 腸炎発症前に実施された手術は, 関節鏡手術が 5 頭, 去勢術が 2 頭, 開腹術および螺子固定術がそれぞれ 1 頭ずつであった。入院治療後に CD 腸炎を発症した 12 頭は, 全て栗東トレーニング・センター競走馬診療所に入院した症例であった。そのうち 10 頭 (83%) については何らかの手術を実施した後に入院しており, 残りの 2 頭については, それぞれ細菌性角膜潰瘍, および肺炎の治療のために入院していた。

治療については, 両群の全ての馬に乳酸リンゲル液の輸液 (1-24 L/日) とフルニキシメグルミン (1.1 mg/kg, 1 日 2-3 回) の静脈内投与が実施された。両群を合わせた全 137 頭の致死率は 42% (58/137) であり, いずれの群においても致死率を有意に低下させる治療法は認められなかった。抗菌薬を用いた治療として, 35 頭 (26%) にメトロニダゾール (15 mg/kg, 1 日 3 回) の経口投与が実施された。CDAD 群においては, メトロニダゾールが投与された 16 頭の致死率が 75% (12/16), 投与されなかった 8 頭の致死率が 100% (8/8) となり, メトロニダゾールの投与は致死率を低下させたが, 統計学的な有意差は認められなかった ($P=0.057$)。

4. 考察

本調査において、*C. difficile* の検査が実施された腸炎発症馬 137 頭のうち、24 頭が CDAD 群に分類され、その致死率は 83%と、non-CDAD 群 113 頭の致死率 34%と比較して、有意に高い結果となった。成馬の CD 腸炎の致死率にはいくつかの報告があり、その範囲は 0-42%である [2, 57, 85, 99-100]。Weese らは、CD 腸炎の致死率を 26%、非 CD 腸炎の致死率は 17%と報告している [100]。また、Ruby らは、CD 腸炎の致死率を 24%、非 CD 腸炎の致死率を 10%と報告している [85]。これらの過去の報告と比較すると、本研究の調査結果は、CDAD および non-CDAD の両群とも高い致死率を示した。このことの原因として、過去の報告が発熱の有無に関わらず下痢症を呈した症例を調査対象としているのに対し、本調査では水様性の下痢症に加えて 38.5°C以上の発熱を伴う症例を腸炎と診断して調査対象としている。このことにより、本調査の調査対象には比較的重篤な症例が多く含まれ、結果として高い致死率を示した可能性がある。また、調査対象を常にストレス環境下にある競走期サラブレッドに限定していることも、高い致死率に関与している可能性がある。高い致死率や、呼吸数および血液検査所見 (PCV, BUN, TP, ALB, SAA) といった臨床所見から判断して、CDAD 群の病態は、non-CDAD 群と比較してより重篤と考えられる (表 1)。*C. difficile* の病原性については、相反する既報がある。例えば、ある報告では CD 腸炎発症馬の致死率は非 CD 腸炎発症馬の致死率より高いことを示唆している一方で [85, 99]、別の報告では両者の致死率に差はないと報告している [100]。ヒト医学領域においては高病原性株の急速な拡大が問題となっており [25]、ウマの腸炎における *C. difficile* 株の遺伝子型や毒素型を特定し、株間の病原性の差異についても今後さらなる調査が必要と考えられる。

心拍数・呼吸数の増加、白血球数の減少といった初診時の臨床所見は、CDAD および non-CDAD の両群の大多数のウマに認められ、その重症度は症例ごとに様々であった。これらの結果は、CD 腸炎発症馬の臨床所見は非 CD 腸炎発症の臨床所見と比較して特異的ではなく、臨

床所見だけでは CD 腸炎と非 CD 腸炎を区別することができないとする既報と一致していた [100]。本研究では、初診時の PCV, BUN および SAA の測定値は CDAD 群で有意に高く、TP および ALB の測定値は、CDAD 群で有意に低かった。そのうえ、致死率は CDAD 群で有意に高い結果となった。PCV は血液濃縮の指標であり [16], BUN および CRE は腎機能の指標となる [28]。これらの検査値の変動は、ウマの下痢症あるいは疝痛における高い致死率と関連することが過去にも報告されている [16, 79]。本調査においては、PCV および BUN が CDAD 群で有意に高値を示したのに対し、CRE には両群で有意差を認めなかった。これらの結果は、CD 腸炎発症馬において、初診時に重度の脱水と腎前性の高窒素血症を発症していることを示唆している。TP および ALB の減少は、ウマの急性腸炎における同様の報告があり [48], 全身性の炎症に伴う capillary leak syndrome による血管外漏出を示唆している。SAA は炎症の指標であり、50 µg/ml 以上の上昇により、腸炎や細菌感染症といった炎症性疾患の存在が疑われる [37, 43, 95]。また、ウマの疝痛における致死率との関連も報告されている [102]。これらの TP と ALB の減少、および SAA の上昇といった本調査の結果から、CD 腸炎発症馬においては、非 CD 腸炎発症馬と比較してより重度の全身性の炎症が生じていることが示唆された。また、これらの臨床検査結果を総合すると、CD 腸炎は非 CD 腸炎と比較して治療開始時点で病態が悪化しており、全身性の炎症や循環状態の悪化の進行が非常に早い特徴を持つことが示唆される。

CD 腸炎の発症メカニズムには、腸内細菌叢の変化に加え、内因性あるいは外因性の *C. difficile* の腸内における異常増殖が関与していると考えられている [5]。抗菌薬の投与は腸内細菌叢の変化をもたらす最も重要な因子とされており [5], CD 腸炎をはじめとする下痢症や腸炎の発症に、抗菌薬の関与を指摘する報告がある [4, 53, 81, 85]。本調査では、CDAD 群のほぼ全てのウマが腸炎発症前に抗菌薬投与を受けており、抗菌薬投与と CD 腸炎の発症との関連が示唆された。なかでも多くのウマはセファロスポリン系抗菌薬を投与されており、ウマに

における CD 腸炎発症の潜在的なリスクファクターと考えられる。しかし、セファロスポリン系抗菌薬は JRA の競走馬診療所において一般的に使用されており、使用頻度そのものが非常に高いため、他の抗菌薬と比較して CD 腸炎発症リスクが高いかを評価するのは困難である。手術、輸送、食餌の変更や絶食処置についても、腸内細菌叢を変化させる重要なリスク因子であることが報告されている [5]。CDAD 群においては、発症前に手術を受けていたウマの割合が、non-CDAD 群と比較して高かった。CDAD 群および non-CDAD 群それぞれの発症前に実施された手術の内容を比較すると、開腹術実施後のウマには CD 腸炎発症が多いという点は注目すべき結果である。しかし、手術の実施には術後の抗菌薬投与や絶食処置、入院などさまざまな要素が関与しているため、単純に手術内容と CD 腸炎発症リスクとの関連を評価するのは難しい。本調査では、手術や重篤な疾患に伴う入院治療も CD 腸炎発症と関連していることが示唆され、さらに全て同一の診療施設（栗東 TC 競走馬診療所）に入院していたウマが CD 腸炎を発症していることが明らかとなった。入院は外因性の *C. difficile* 増殖の高リスク因子として知られており、ウマの診療施設における環境汚染についても報告がある [8, 57, 59, 85, 98]。本調査対象馬のなかでも、一定のウマが栗東 TC 競走馬診療所における院内感染に伴う CD 腸炎発症であった可能性がある。一方、*C. difficile* は、健常馬からも検出されることや [62, 77, 87]、また院内感染ではなく放牧場などで内因性に CD 腸炎を発症するケースも報告されている [100]。本邦における *C. difficile* の感染経路を明らかにするため、腸炎発症馬から分離された *C. difficile* の遺伝子型や、診療施設の環境汚染、および健常馬における *C. difficile* の検出状況などについて、さらなる調査が必要と考えられる。本調査では、non-CDAD 群において、発症前に 10 時間を超える長時間の輸送が行われたウマの割合が、CDAD 群と比較して有意に高かった。輸送は、ウマにおける CD 腸炎発症のリスク因子であるとする報告もあるが [5, 78]、本調査結果とは一致せず、その理由についても明らかとはならなかった。

治療成績については、CDAD および non-CDAD の両群とも、致死率を有意に改善させる治

療法は存在しなかったものの、CDAD 群においてはメトロニダゾールの投与が致死率を改善させる可能性が示唆される結果となった。本調査においては、CDAD 群が 24 頭と症例数が少なく、メトロニダゾールの致死率改善効果については、症例を増やすことで有意な差を検出できるかもしれない。既報においては、ウマの腸炎から分離される *C. difficile* はメトロニダゾールおよびバンコマイシンに対して感受性であり、海外ではメトロニダゾールは CD 腸炎発症馬に対する第一選択薬として推奨されている [8, 26]。加えて、CD 腸炎発症馬に対してメトロニダゾールを用いて治療した群は、使用しなかった群に比較して生存率が有意に高く、またそのメトロニダゾールによる生存率の増加は、非 CD 腸炎発症馬においては認められないことが報告されている [100]。本調査の結果は、CD 腸炎発症馬にメトロニダゾール投与が有効とするこれらの報告に一致するものと考えられる。しかしながら、本調査においては、メトロニダゾールを投与された CD 腸炎発症馬においても極めて高い致死率を示しており、さらなる治療法の改善が必要である。

本調査のリミテーションとして、腸炎発症馬からの糞便を用いたサルモネラ分離培養検査を、初診時にしか実施していない点がある。サルモネラの分離培養検査は複数回実施する必要があるという報告があり [11]、本調査の対象馬の中には、*C. difficile* とサルモネラの共感染を起している馬がいる可能性を否定することはできない。CD 腸炎においてサルモネラの関与を完全に否定するためには、初診時を含む複数回の検査を実施する必要があると考えられる。

本章では、2010～2018 年に JRA 附属施設内で腸炎を発症した 137 頭を対象に、発症事前因子、臨床検査結果および治療成績について回顧的に調査した。その結果、腸炎の致死率は 42%で、なかでも *C. difficile* 感染が認められた 24 頭の致死率は 73%と極めて高いことが明らかとなった。*C. difficile* 腸炎発症馬は、初診時の血液検査において PCV、BUN および SAA の上昇が顕著であり、全身性の炎症と循環不全が急速に進行する特徴をもつことが示唆された。またその発症には、抗菌薬投与、手術および入院治療が関与する可能性が明らかと

なった。治療法については、腸炎全体として治癒率を有意に改善する治療法は認められなかったが、*C. difficile* 腸炎に対してはメトロニダゾールの投与が有効となる可能性が示唆された。

これらの結果から、競走期サラブレッドにおける腸炎の致死率はその要因に関わらず高く、治療法の改善が課題であることが明らかとなった。本章では、CD 腸炎に対するメトロニダゾール投与の有効性の可能性を示したが、他の症例では原因となる病原体が特定されない特発性腸炎の発症も多い。特に重症度の高い腸炎発症馬の病態初期の症状は、頻脈・頻呼吸、末梢血液中の炎症マーカーの上昇など、全身性の炎症を示唆するものである。これらは全身性炎症反応症候群（SIRS）に類する変化であり [84]、腸粘膜局所の炎症からさまざまな全身性の病態や合併症へ移行する起点となっていることが推察される。また SIRS から進展する病態の 1 つには DIC が知られており、競走馬の腸炎の病態にも関連している可能性がある。そこで第 2 章においては、腸炎で死亡したウマの病理組織学的所見を整理するとともに、競走馬の腸炎に伴う血液凝固異常に関する調査を実施し、予後との関連について調査した。

5. 小括

2010～2018年にJRA 附属施設内で腸炎を発症した137頭を対象に、発症事前因子、臨床検査所見および治療成績について回顧的に調査した。その結果、腸炎の致死率は42%と高く、治療法の改善が必要であることが再確認された。また、*C. difficile*感染を含む重症度の高い腸炎発症馬における病態初期の症状はSIRSとその急速な進行であり、腸粘膜局所の炎症からさまざまな全身性の病態へ移行する起点となっていることが推察された。

6. 図表



図5 *C. difficile* の toxin A または toxin B, および抗原を検出する市販の検査キット

(C. DIFF QUIK CHEK コンプリート ; アーリアメディカル株式会社)

写真は, 抗原・毒素とも陽性であった例を示す。

表 1 競走期サラブレッドにおける *C. difficile* (CD) 腸炎発症馬 (24 頭) と非 CD 腸炎発症馬 (113 頭) の各種所見の比較

| | | CD 腸炎 (n=24) | 非 CD 腸炎 (n=113) | P 値 |
|------------------|--|--------------------------|--------------------------|--------|
| 馬齢 | | 3.5 (2.8-5.0) | 3.0 (2.0-3.0) | 0.22 |
| 性別 | 牡 | 15 (62%) | 74 (65%) | 0.37 |
| | 牝 | 6 (25%) | 34 (30%) | |
| | セン | 3 (12%) | 5 (4%) | |
| 発症時季 | 春 (3-5 月) | 10 (41%) | 20 (17%) | 0.08 |
| | 夏 (6-8 月) | 7 (29%) | 35 (30%) | |
| | 秋 (9-11 月) | 4 (16%) | 36 (31%) | |
| | 冬 (12-2 月) | 3 (12%) | 22 (19%) | |
| バイタルサイン 【初診時】 | 直腸温 (°C) [RR: 37.5 – 38.5] | 39.0 (38.6 – 39.7) | 39.5 (39.0 – 40.0) | 0.07 |
| | 心拍数 (回/分) [RR: 30 – 40] | 60 (48 – 70) | 50 (44 – 60) | 0.12 |
| | 呼吸数 (回/分) [RR: 10 – 16] | 30 (21 – 44) | 24 (18 – 29) | 0.01 |
| 血液検査値 【初診時】 | ヘマトクリット (%) [RR: 30 – 48] | 60.1 (52.5 – 68.6) | 52.8 (46.8 – 58.8) | 0.04 |
| | 白血球数 (/ μ l) [RR: 6,000-10,000] | 3,950 (2,700 – 8,030) | 4,200 (2,700 – 6,900) | 0.77 |
| | 血中尿素窒素 (mg/dl) [RR: 11.2 – 22.4] | 32.5 (25.1 – 46.9) | 18.6 (14.6 – 24.7) | 0.001 |
| | クレアチニン (mg/dl) [RR: 1.1 – 1.8] | 1.7 (1.5 – 2.6) | 1.6 (1.4 – 1.8) | 0.07 |
| | 血清総蛋白質 (g/dl) [RR: 5.7 – 7.3] | 5.5 (5.0 – 5.9) | 6.3 (5.7 – 6.8) | 0.02 |
| | 血清アルブミン (g/dl) [RR: 2.5 – 3.5] | 3.1 (2.5 – 3.5) | 3.6 (3.3 – 3.9) | 0.002 |
| | 血清アミロイド A (μ g/ml) [RR: 0 – 1.0] | 389 (72 – 464) | 35.4 (8.8 – 162) | 0.003 |
| 致死率 | | 73% (20/24) | 34% (38/113) | <0.001 |

バイタルサインならびに血液検査値は、中央値 (四分位数範囲) で示した。

RR : 競走期サラブレッドにおける正常範囲

表 2 競走期サラブレッドにおける *C. difficile* (CD) 腸炎発症馬 (24 頭) と非 CD 腸炎発症馬 (113 頭) の発症事前因子の比較

| 発症事前因子 | | CD 腸炎 (n=24) | 非 CD 腸炎 (n=113) | P 値 |
|------------|---|-----------------|--------------------|--------|
| 抗菌薬の投与 | 有 | 22 (92%) | 37 (33%) | <0.001 |
| | 無 | 2 (8%) | 76 (67%) | |
| 手術 | 有 | 12 (50%) | 9 (8%) | <0.001 |
| | 無 | 12 (50%) | 104 (92%) | |
| 入院治療 | 有 | 12 (50%) | 7 (6%) | <0.001 |
| | 無 | 12 (50%) | 106 (94%) | |
| 10 時間以上の輸送 | 有 | 4 (17%) | 29 (26%) | 0.03 |
| | 無 | 20 (83%) | 84 (74%) | |

第 2 章

競走馬の腸炎に伴う血液凝固異常に関する調査

1. 背景

第1章では、競走馬の腸炎はその要因に関わらず致死率が高く、有用な治療法も確立されていないことが明らかとなった。また、特に重症度の高い腸炎発症馬における病態初期の症状は、頻脈・頻呼吸、末梢血液中の炎症マーカーの上昇など、全身性炎症反応症候群（SIRS）を示唆する所見に一致していた。

SIRS と関連する病態の1つに、播種性血管内凝固症候群（DIC）がある [39]。DIC は、重篤な消化器疾患や感染性疾患、外傷、手術、悪性腫瘍などが原因となって、生体の防御反応系の1つである血液凝固線溶系に異常をきたす症候群である [64]。主たる病態は持続性・全身性の血液凝固系活性化であり、線溶系については、基礎疾患によって活性化から抑制まで様々な程度の異常を示すことが知られている [3]。ウマにおいても、重度の感染症や疝痛、蹄葉炎といった病態と血液凝固異常との関連が報告されており、腸炎や急性腹症に DIC を併発すると有意に予後が悪化することが既に報告されている [24, 65]。腸炎を含む消化器疾患においては、全身性の炎症とエンドトキシン血症に伴って消費性の血液凝固異常が誘起され、DIC へと進行する。重度の DIC は微小循環不全に伴う多臓器不全へと進展し、致死的状态へ直結する [18, 91]。一方、血液凝固機能の評価は本邦の競走馬の臨床現場で着目されておらず、検査が十分に実施されてこなかった。

JRA 競走馬診療所では、腸炎を発症し、治療に反応せず安楽死処置に至った症例や死亡した症例については、可能な限り剖検および病理組織学的検査を実施している。剖検では、多くの症例において、盲腸から結腸にかけての広範な出血性の粘膜壊死が認められる (図 5)。さらに、急性経過を辿った症例の病理組織学的検査に着目すると、傷害を受けた結腸粘膜固有層ならびに粘膜下組織の小血管だけでなく、肺泡毛細血管、肝臓類洞、腎臓糸球体といった全身諸臓器に血栓や線維素（フィブリン）の析出が認められることがある。これらは全身性の血液凝固異常、すなわち DIC を示唆する所見であると考えられ、生前に血液凝固機能に異常をきたして

いたものと推察している。

血液凝固機能を評価する代表的なパラメーターとその変動には、凝固時間 (APTT および PT) の延長、抗凝固因子 (AT および プロテイン C) の減少、FIB の減少、および FDP の増加が挙げられる [24, 47, 70, 101]。さらに近年では、トロンビンが AT に結合する際に作られる、トロンビン・アンチトロンビン複合体 (TAT) が凝固活性化を評価する分子マーカーとして用いられるようになっており、ウマの消化器疾患に伴う DIC において TAT が上昇したとする報告もある [19, 65, 93]。これらの過去の報告は、治療中のある一時点の血液凝固系検査値を用いて凝固活性化および線溶活性化を評価するものや、DIC 発症と予後との関連性を検討するものが中心であった [47, 65, 68, 101]。一方、臨床現場では、初診時から継続して血液凝固系検査を実施することが想定される。各血液凝固系パラメーターが、腸炎発症初期から重症化に伴ってどのような経時的変化を示すのか、さらにはパラメーターの変動を治療法の選択にどのように活用するか検討した報告はこれまでない。

そこで本調査では、競走馬の腸炎に伴う全身性の血液凝固異常について、死亡した症例の病理組織学的検査所見を整理するとともに、血液凝固機能を評価する代表的なパラメーターを初診時から定期的に測定して経時的変化を調査し、予後との関連を解析した。

2. 材料と方法

1) 対象症例の選択

2014年6月から2015年10月の間、JRA 栗東 TC で出走へ向けて調教していたサラブレッド種競走馬のうち、38.5℃以上の発熱と水様性下痢を発症して腸炎と診断された症例を調査対象とした。また、同時期に栗東 TC に在厩していた临床上健康な競走馬 20 頭を任意に選んで調査し、健常群とした。

腸炎発症馬は、臨床的予後によって2つの群に分類した。治癒した症例、あるいは発熱や下痢症といった腸炎の症状は寛解したものの、別の疾病で安楽死処置された症例を回復群に分類した。また、治療に反応せず、発熱や下痢症といった症状が回復せずに安楽死処置あるいは死亡した症例を致死群に分類した。

2) 血液凝固系検査

腸炎と診断され、入院治療を開始した日 (Day1 と定義する) から、最長第 5 病日 (Day5) まで、1 日 1 回血液を継続して採取した。血液凝固系検査用の採材には、3.2% クエン酸添加採血管 (5ml; ベノジェクト II, テルモ, 東京) を用いた。この採血管を利用することにより、クエン酸 Na と血液の割合を、1:9 となるよう調整した。採血後は速やかに 3,000 rpm で 10 分間遠心し、分離した血漿を-80℃フリーザーにて冷凍保存した。血漿は外注測定業者 (富士フィルムモノリス, 東京) に送付し、採取から 1 ヶ月以内に測定を実施した [72]。また、検査用血液の採材および測定については、患馬の管理調教師の承認が得られた症例のみを対象とした。

血液凝固機能を評価する指標として、既報を参考に、APTT, PT, AT 活性, TAT, FIB および FDP の 6 項目を選定した [19, 24, 65, 101]。APTT, PT および FIB は、光散乱検出法 (CA-650, シスメックス株式会社, 神戸) にて測定した。AT 活性は、被検血漿に過剰量のヘパリンを加えて AT を活性化し、そこへ十分量のウシトロンビンを加えて AT を不活化させた

うえ、残存したトロンビン活性をクロモジェニック法で検出することにより測定した (BM6050, 日本電子株式会社, 東京)。FDP はラテックス凝集法 (BM6050, 日本電子株式会社, 東京), TAT は酵素免疫測定法 (PATHFAST, 株式会社 LSI メディエンス, 東京) を用いて測定した。これらの測定, および検体の取扱いについては, 既報や測定業者の指示に基づいて実施した [72]。

3) 病理組織学的検査

安楽死処置または死亡した症例に対し, 主治医の判断により, 病理組織学的検査を実施した。腸管, 肺, 肝臓および腎臓からの組織標本を, 死後 24 時間未満に実施した剖検時に採取した。肺サンプルは尾部肺葉から採取し, 肝および腎サンプルは肝臓および腎臓から無作為に採取した [13, 18]。サンプルは 20% 中性緩衝ホルマリンで固定し, 通常の手段でパラフィン包埋切片を作成した。切片を 6 μm のスライスに切断し, ヘマトキシリン・エオジン染色およびリンタングステン酸・ヘマトキシリン染色を実施し, 微小血栓やフィブリンの検出に使用した [101]。

4) 統計解析法

腸炎発症馬については, 最大 5 日間の測定値のなかから, DIC 発症を示唆する最も顕著な異常値として, APTT, PT, TAT および FDP の最大値, FIB および AT 活性の最小値を抽出した [20, 24, 64]。この代表値を用いて, 各測定項目について, 健常群・回復群・致死群の 3 群間で比較した。統計解析には, 3 群間における一元配置分散分析を実施した後, 有意差が検出された場合には Turkey-Kramer 検定を実施した。さらに, 初診時から 4 日間以上連続して採血可能であった症例に対して, 同じ病日における測定値を回復群と致死群の 2 群間で比較した。統計解析には, Welch の t 検定を用いた。

血液凝固系検査値と予後との関連については、Fisher 正確検定を用いて統計解析を実施した。血液凝固系検査値については、以下の 2 点に着目して評価した。

①測定期間中に最も顕著な異常を示した測定値が、健常群の測定値から算出した基準値（平均±2×標準偏差）から逸脱するか

②各測定項目において、持続的な変化、すなわち、初診日から 2 日間、3 日間、および 4 日間連続して上昇し続ける、または低下し続ける変化が認められるか

検査測定値は、健常群・回復群・致死群の各群について、平均および標準偏差（SD）を算出して表示した。統計解析には、R および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアである EZR（1.00, 埼玉医療センター, 自治医科大学, 埼玉）を利用し [50], $P < 0.05$ を有意と判定した。

3. 結果

1) 健常馬群における測定結果

健常馬 20 頭について、各項目における測定値を表 3 に示した。TAT は、全頭で測定限界値（1.0 ng/ml）以下であった。20 頭の測定値の平均±2×標準偏差を算出することにより、JRA 栗東 TC に繋養されるサラブレッド競走馬の基準値を設定した。

2) 腸炎発症馬の概要と臨床成績

14 症例が調査基準を満たし、その症例概要および予後は、表 4 のとおりであった。年齢の中央値は 3 歳で、範囲は 2 歳から 7 歳であった。臨床的予後により、9 頭が致死群、5 頭が回復群に分類された。致死群の生存期間の中央値は 4 日で、範囲は 2 日から 7 日であった。回復群では全頭で発熱や下痢症といった症状から回復し、腸炎に関する治療を終了した。このうち、症例 11 については第 80 病日に蹄葉炎、症例 13 については第 14 病日に盲腸便秘により、救

命困難と判断されて安楽死処置となった。

全ての症例には、持続輸液療法（乳酸リンゲル液および6%ヒドロキシエチルデンプン製剤）、抗エンドトキシン療法（フルニキシンメグルミンの低容量投与およびポリミキシン B）、およびプロバイオティクス療法が実施され、必要と判断された症例には抗菌薬療法（メトロニダゾールの経口投与、またはセファロチンの静脈内投与）が実施された。

3) 腸炎発症馬における凝固系パラメーターの測定結果

各症例について、DIC 発症を示唆する最も顕著な異常を示した代表値を最大 5 日間の測定値のなかから抽出し、健常群・回復群・致死群の 3 群間で比較した（図 9）。まず APTT は、健常群と比較して回復群・致死群とも有意に延長（健常群：43.6 ± 1.6 秒，回復群：105.2 ± 7.5 秒，致死群：102.3 ± 22.0 秒）していたが、回復群と致死群との間には有意差を認めなかった。PT についても同様、健常群と比較して回復群・致死群とも有意に延長（健常群：7.8 ± 0.4 秒，回復群：12.5 ± 1.2 秒，致死群：13.2 ± 2.8 秒）していたが、回復群と致死群との間には有意差を認めなかった。FIB については、3 群間に有意差を認めなかった（健常群：124.6 ± 10.7 mg/dl，回復群：126.2 ± 19.7 mg/dl，致死群：135.7 ± 53.7 mg/dl）。一方 AT 活性は、健常群と比較して回復群・致死群で有意に低下し、また回復群に比較して致死群で有意に低下した（健常群：315 ± 17%，回復群：203 ± 53%，致死群：122 ± 43%）。FDP は健常群と回復群の間に有意差を認めなかったが、致死群では有意に上昇していた（健常群：6.8 ± 0.5 μg/ml，回復群：7.5 ± 1.9 μg/ml，致死群：16.7 ± 8.3 μg/ml）。また TAT が測定可能だったのは、症例 1（2.4 ng/ml）、症例 4（4.9 ng/ml）、症例 5（1.8 ng/ml）、症例 6（3.1 ng/ml）、症例 7（2.9 ng/ml）、および症例 9（2.5 ng/ml）の 6 頭で、全て致死群に分類された症例であった。TAT が初めて検出されてから、安楽死または死亡に至るまでの期間に着目すると、症例 1（TAT 検出：第 1 病日，死亡：第 2 病日）、症例 4（TAT 検出：第 1 病日，死亡：第 2 病日）、症例 5（TAT 検出：第 3 病日、

死亡：第3病日），症例6（TAT検出：第3病日，死亡：第3病日），症例7（TAT検出：第5病日，死亡：第7病日），および症例9（TAT検出：第4病日，死亡：第4病日）となり，その間隔は最大でも2日間であった。また，これらの6頭は，FDPについても高値を示した（症例1：16.8 $\mu\text{g/ml}$ ，症例4：10.6 $\mu\text{g/ml}$ ，症例5：18.0 $\mu\text{g/ml}$ ，症例6：21.1 $\mu\text{g/ml}$ ，症例7：18.4 $\mu\text{g/ml}$ ，症例9：35.3 $\mu\text{g/ml}$ ）。その他の8頭のTAT測定値は，測定期間中全て検出限界以下（ $<1.0 \text{ ng/ml}$ ）であった。

14症例のうち，4日間以上連続したデータが得られたのは10症例で，致死群5症例（症例5-9），および回復群5例（症例10-14）であった。症例5および9が第4病日に死亡したことにより，第5病日には致死群が3症例しか残らないため，第5病日については統計解析対象から除外した。各測定項目の第1病日から第4病日までの測定値を，病日ごとに回復群・致死群の2群間で比較した結果を，図10に示す。なおTATについては，測定値が検出限界以下（ $<1.0 \text{ ng/ml}$ ）となった症例および病日があり，各群における平均値の算出が不可能であるため，この比較解析からは除外した。経時的变化に着目すると，回復群では，APTTとPTの延長およびAT活性の低下が第2あるいは3病日で最も顕著となり，その後は改善していく傾向が認められた。一方致死群では，APTTとPTの延長，AT活性の低下が，測定期間中悪化し続ける傾向が認められた。2群間の比較では，第4病日の致死群の測定値において，APTTの延長（回復群： 69.5 ± 13.7 秒，致死群： 108 ± 9.8 秒），PTの延長（回復群： 10.9 ± 1.2 秒，致死群： 14.3 ± 1.5 秒），AT活性の低下（回復群： $215 \pm 57\%$ ，致死群： $95.6 \pm 25\%$ ），およびFDPの上昇（回復群： $6.5 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ ，致死群： $18.2 \pm 9.4 \mu\text{g/ml}$ ）が有意に認められた。FIBについては，2群間に変動の差を認めなかった。

血液凝固系検査値と予後との関連について，表5に示した。予後と有意に関連があったのは，AT活性が第1病日から4日間持続的に低下すること，FDPが第1病日から4日間持続的に上昇すること，および測定期間中にTATが検出されること（ $>1.0 \text{ ng/ml}$ ）であった。経時的变化

を調査しなかった TAT を除く 5 つの測定項目について、2 日間、あるいは 3 日間のみ連続して生じる変動と予後には、関連は認められなかった。

4) 病理組織学的検査所見

病理組織学的検査は、2 症例（症例 6,7）を除くすべての死亡例に対して実施された。微小血管へのフィブリン析出は、盲結腸粘膜固有層および粘膜下組織の小血管（図 6）、肺泡毛細血管、肝臓類洞および腎臓糸球体（図 7）に認められた（表 4）。複数臓器でフィブリン析出が確認されたのは致死群の 4 例（症例 1, 2, 3 および 8）であった。なお、腸炎症状が寛解して回復群に分類された症例 11 ならびに 13 においては、消化管の粘膜壊死や小血管へのフィブリン析出は認められなかった。

4. 考察

本調査では、腸炎を発症した競走期サラブレッドの血液凝固系パラメーターについて、最も顕著な異常を示した測定値のみならず、その経時的変化に着目して評価し、臨床的予後との関連性について調査した。その結果、重症度に関わらず、全ての腸炎発症馬に何らかの凝固異常が認められた。しかし、凝固異常の程度やパラメーターの変動については、腸炎から回復した症例と、安楽死または死亡した症例との間で、差異が認められた。腸炎から回復した症例では、APTT と PT の延長ならびに AT 活性の低下は、第 2 あるいは 3 病日で最も顕著となり、その後は改善へ転じる傾向があった。一方安楽死または死亡した症例では、測定期間中、APTT と PT の延長に加えて AT 活性の低下や FDP の上昇が持続的に進行し、さらに死亡する 2 日程度前から TAT の上昇も認められた。回復した症例と死亡した症例を比較すると、第 4 病日の APTT, PT, AT 活性および FDP の測定値に有意差が認められた。

本調査を開始するにあたり、トレーニング環境下にあるサラブレッド種競走馬の血液凝固パラメーターの正常値に関する報告はこれまでないため、まず初めに JRA 栗東 TC に繋養されている臨床健全な競走馬に対して測定を実施した。APTT, PT, FIB および FDP については過去の報告とほぼ同様であったが [19], AT 活性は高く, TAT については低い結果となった。この結果について明確な原因は明らかとならなかったが、過去の報告も含めて検査法・測定法が異なるため測定値の単純な比較ができないことや、トレーニング環境下にある競走馬を測定対象としていることが影響したかもしれない。

TAT は、血液凝固活性化を直接的に反映する指標として知られており [93], ヒト医学領域においても DIC 診断に有用と考えられている [90]。本調査では、6 頭の腸炎発症馬で TAT が上昇 (>1.0 ng/ml) し、TAT の上昇と予後不良との間には有意な関連が認められた。TAT が上昇した 6 頭においては、微小血栓の形成とその溶解の指標である FDP も上昇していた [3, 65, 101]。TAT と FDP の両者の上昇は、凝固活性化に加えて線溶活性化が生じていることを示し

ており、DICの発症と腸炎発症馬における終末的状况を示唆していると考えられる。このことから、TATは腸炎の予後不良を判断する指標と考えることができ、これは疝痛発症馬に対してTAT測定を実施した既報とも一致する解釈である [19, 65]。本研究の調査対象馬においては、TAT上昇を確認してから約2日間で死に至った。このことから、TATを継続的にモニタリングすることは、重症度の高い腸炎の病態進行を確認するうえで重要と考えられた。

本調査では、回復した症例と比較して、安楽死あるいは死亡した症例で有意にFDPが高値を示した。第4病日の測定値を、回復した症例と安楽死あるいは死亡した症例の2群間で比較すると、安楽死あるいは死亡した症例で有意に高値を示した。加えて、FDPの持続的な上昇が、予後不良と有意に関連していた。このようなFDPの変動は、安楽死あるいは死亡した症例に特徴的と考えられ、凝固異常の進行や予後不良に直接的に関連していると判断できる結果となった。DICは、全身性の血液凝固活性化を主とする病態であり、それと同時進行的に生じる線溶活性化の程度は、基礎疾患により差異があることが知られている。凝固活性化と線溶活性化のバランスにより、線溶抑制型・線溶均衡型・線溶亢進型といったDICの病型分類が行われており、治療方針を決定するうえで重要な要素となっている (図3) [3]。Monrealらは、疝痛を発症したウマのDICにおいて血液凝固活性化と線溶抑制が生じると報告しているが [65]、本調査においては、凝固系と線溶系の両者の活性化が予後に関連しており、過去の報告を直接的に支持する結果とはならなかった。重度の消化器疾患には、エンドトキシン血症やSIRSといった病態が付随して生じることが報告されており [68-69, 88]、これらの病態とDIC発症との関連が予想されるが、その具体的なメカニズムについては不明な点が多い。腸炎に伴うDICの発症機序を明確するためには、腸炎以外の基礎疾患に伴って生じるFDP上昇との程度比較や、plasmin- α 2 plasmin inhibitor complexなどの線溶系を制御する分子マーカーをモニタリングすることが必要と考えられた [3, 58]。

AT 活性は、健常馬に比較して腸炎発症馬で有意に低下しており、また回復した症例に比較して安楽死または死亡した症例で有意に低下していた。さらに、AT 活性の持続的な低下と臨床的予後には相関を認め、第4病日の測定値においては、回復した症例と安楽死または死亡した症例との間に有意差が検出された。このことから、AT 活性のモニタリングは、腸炎発症馬における血液凝固異常の進行を把握する一助となることが示唆された。AT は主に肝臓で合成される分子量約 59,000 の単鎖糖タンパクで、トロンビンのみならず、多くの凝固因子と 1 対 1 で結合して抗凝固作用を有している (図 4) [56]。DIC に対する基本的な治療薬であるヘパリン類は、体内に投与されると抗凝固因子である AT と結合し、AT の抗凝固活性を飛躍的に向上させることで効果を発揮する [45]。このため、結合する対象である AT の活性が低下している場合、ヘパリン類の投与は十分な効果を発揮しない。DIC を発症した際に AT 活性が低下する機序は複数知られており、凝固活性化に伴って AT の消費が亢進することに加え、特に重度感染症・敗血症を原因とする DIC の際には、血管透過性の亢進に伴う血管外への漏出や顆粒球エラスターゼによる分解が生じることが明らかとなっている [15, 41]。このような要因により AT 活性が低下した場合、ヒト医学領域では AT 濃縮製剤の投与が検討される。AT 活性が正常の 70%以下に低下した場合には AT 製剤の投与が保険適応となり、3~5 日間の投与が行われる [86, 111]。筆者の知る限りでは、ウマに適用可能な AT 濃縮製剤はないが、血漿には AT を含む多種多様な抗凝固因子が含まれている。このことに着目すると、血漿輸液療法は、AT 活性が顕著に低下した症例に対する治療法の 1 つの選択肢となる。腸炎発症馬に対する血漿輸液療法については、投与プロトコルや副作用のリスクに関する更なる研究が必要だが、AT 活性値のモニタリングは、病態進行の把握のみならず、血漿輸液療法を含む治療法選択のベンチマークとして活用可能と考えられた。

APTT および PT は血液凝固異常を評価するパラメーターで、従前から長きにわたり用いられている [19, 24, 64-65]。APTT および PT の測定値は、健常馬に比較して腸炎発症馬で延長

していたが、回復した症例と、安楽死および死亡した症例との間には、最も顕著な異常を示した測定値において、有意差は認めなかった。第4病日の測定値においては、安楽死および死亡した症例で有意に延長していたが、持続的な延長と臨床的予後との関連は認められなかった。これらのことから、APTT および PT の測定だけでは、臨床的予後の予測は困難であると考えられた。臨床的には、治療期間中を通じて APTT および PT の測定値が正常範囲であった場合、その症例が腸炎を発症している可能性は低いと考えることができる。

FIB は DIC 発症時には低下することが知られているが [62, 92]、本調査においては、健常馬を含めた群間で差を認めなかった。この結果は、ウマの結腸捻転、および腸炎に伴う凝固異常に関する既報と一致していた [19, 24]。FIB は局所および全身性の炎症マーカーとしても知られており [10]、腸炎発症馬の FIB の変動は、炎症性反応 [20, 68] と消費性の凝固異常の両方に影響を受けているものと考えられる。

初診時からの経時的変化（初診から2日間連続して上昇または低下、初診から3日間連続して上昇または低下、初診から4日間連続して上昇または低下）と臨床的予後との関連調査では、初診から4日間連続して上昇または低下することのみが有意に関連していた。このことは、3日間以下のモニタリングは予後予測には不十分であることを示唆しており、より正確な病態把握や予後予測のためには、4日間以上継続してモニタリングすることが重要と考えられた。

致死群の一部の症例では、盲結腸粘膜固有層・粘膜下組織の小血管に加え、肺泡毛細血管、肝臓類洞および腎臓糸球体に、微小血栓形成とフィブリン析出が認められた。これらの症例は、病理学的観点から DIC を発症していたことが強く示唆された。肺、肝臓および腎臓のうち、最も多くの症例でフィブリン析出所見を認めたのは肺泡毛細血管であり、この傾向は過去の報告とも一致していた [18]。また、病理組織学検査において複数の臓器へフィブリン析出を認めた症例と、生前の凝固系検査値に顕著な異常を認めた症例は必ずしも一致せず、両者に関連性は認められなかった。このことは、フィブリン析出の有無および重症度と、生前の凝固障害の重

症度との間に相関関係がないとした Cesarini らの先行研究と一致していた [13]。凝固系と線溶系の両方が活性化していることが、病理組織学的所見と臨床的重症度の不一致に関与しているかもしれない。

本章では、2014～2015年の腸炎発症例のうち14頭を対象に、血液凝固機能の変動と予後との関連について調査した。その結果、予後に関わらずほぼ全ての腸炎発症馬に、APTTおよびPTの延長を認めた。特に死亡例では、TATおよびFDPの上昇を認めた。TATやFDPはヒト医学領域においてDICの診断指標と認識されており、これらの上昇は、ウマの腸炎においても病態を引き起こすDICの発症を示唆する変化と考えられた。加えて死亡例には、持続的にAT活性が低下する特徴が認められた。血液凝固活性化に対する一般的な治療法であるヘパリン類の投与は、十分なAT活性存在下でのみ有効であることから、ヒト医学領域ではAT活性値をAT補充療法の適用基準として利用している。このことから、AT活性のモニタリングは、競走馬の腸炎においても、病態把握・治療法選択の両面から有用となる可能性が示唆された。

ウマ医療においては、ATを含む凝固因子を補充する方法として血漿輸液療法が知られているが、腸炎へ適用した臨床報告は極めて少なく、投与するタイミングや効果に関する知見が不足している。そこで第3章では、AT活性値をベンチマークとした血漿輸液適用基準を設定し、その有用性と課題を検討した。

5. 小括

2014～2015年の腸炎発症例のうち14頭を対象に、血液凝固機能の変動と予後との関連について調査した。その結果、予後に関わらず全ての腸炎発症馬においてAPTTおよびPTの延長を認めた。特に死亡例ではTATおよびFDPの上昇を認め、病態を引き起こすDICの発症を示唆する変化と考えられた。また死亡例では、持続的にAT活性が低下する特徴が認められ、病態進行と活性低下の程度が連動していた。血液凝固活性化に対する一般的な治療法であるヘパリン類の投与は、十分なAT活性存在下でのみ有効であることから、ヒト医学領域ではAT活性値をAT補充療法の適用基準として利用している。そこで第3章では、腸炎発症馬に対する治療法としてAT活性値をベンチマークとした血漿輸液適用基準を設定し、その有用性と課題を検討した。

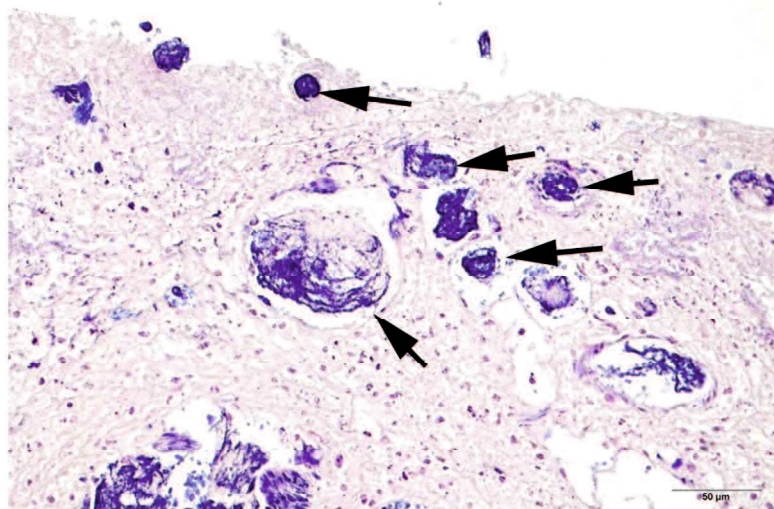
6. 図表



図6 腸炎による死亡馬の剖検像（盲結腸部粘膜面）

盲腸・結腸粘膜の広範囲に出血性壊死が認められる。

a) 結腸粘膜固有層



b) 結腸粘膜下組織

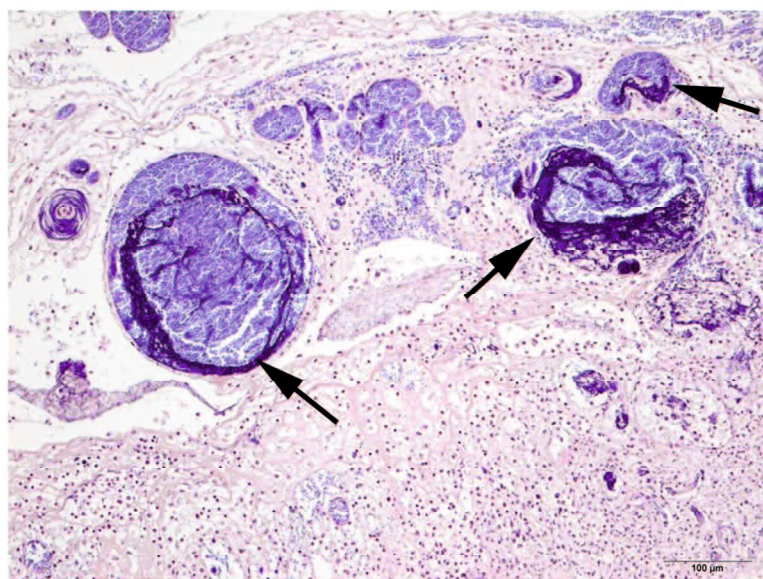
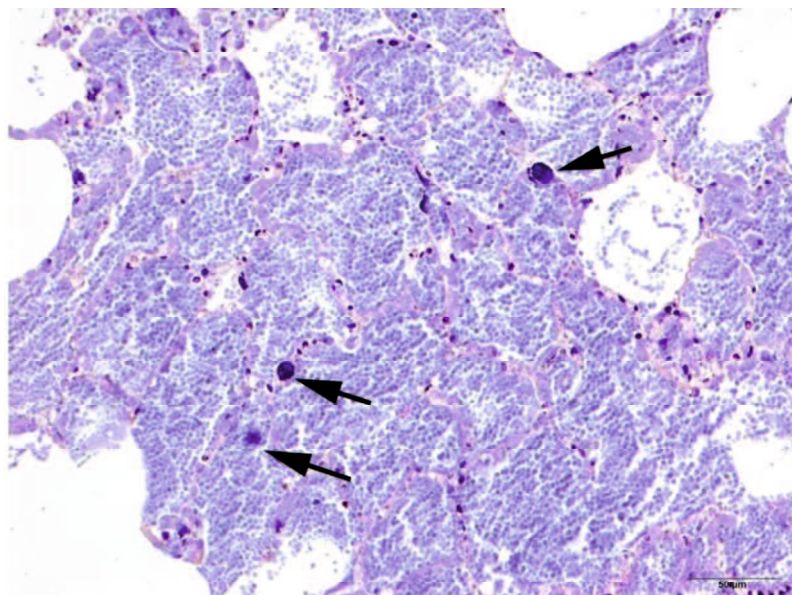


図7 腸炎発症馬の結腸粘膜における病理組織学的所見 (PTAH 染色像)

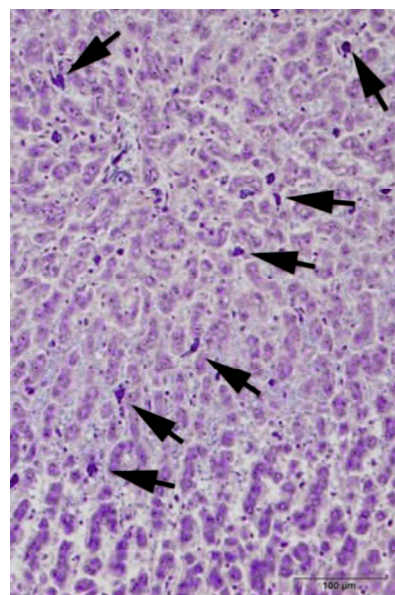
結腸粘膜固有層の微小血管 (a) ならびに粘膜下層の中小静脈 (b) において、
リンタングステン酸・ヘマトキシリン (PTAH) 染色で好染するフィブリン析出像
(矢印) を認める。

【画像は日本中央競馬会 競走馬総合研究所 上野 孝範 博士よりご提供いただいた】

a) 肺胞毛細血管



b) 肝臓類洞



c) 腎臓糸球体および腎皮質尿細管間血管

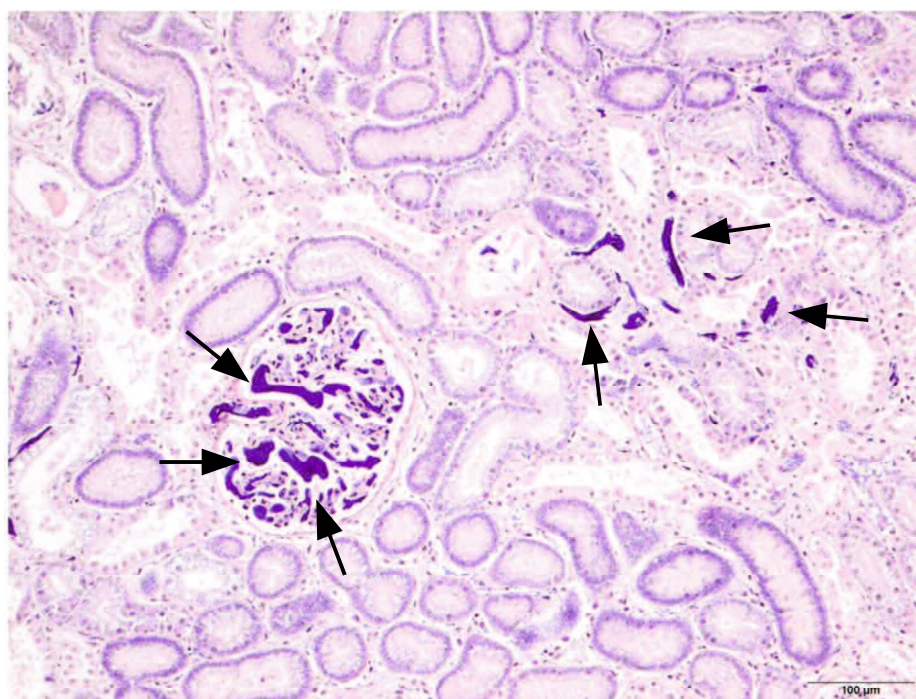


図8 腸炎発症馬の全身諸臓器における病理組織学的所見 (PTAH 染色像)

肺胞毛細血管 (a), 肝臓類洞 (b), 腎臓糸球体 (c) といった全身諸臓器の小血管に、
リンタングステン酸・ヘマトキシリン (PTAH) 染色にて好染するフィブリン析出像
(矢印) を確認。

【画像は日本中央競馬会 競走馬総合研究所 上野 孝範 博士よりご提供いただいた】

表 3 臨床上健康な競走期サラブレッド 20 頭を用いて算出した各パラメーターの標準値

| | 測定値 | 正常範囲 |
|-------------|--------------|---------------|
| APTT (秒) | 43.6 ± 1.6 | 40.4 – 46.8 |
| PT (秒) | 7.8 ± 0.4 | 7.0 – 8.6 |
| FIB (mg/dl) | 124.6 ± 10.7 | 103.2 – 146.0 |
| AT 活性 (%) | 315 ± 17 | 281 – 349 |
| FDP (μg/ml) | 6.8 ± 0.5 | 5.8 – 7.8 |
| TAT (ng/ml) | 1.0 > | 1.0 > |

正常範囲は、20 頭の測定値の平均±2×標準偏差を計算することで算出した。

APTT：活性化部分トロンボプラスチン時間

PT：プロトロンビン時間

FIB：フィブリノーゲン

AT：アンチトロンビン

FDP：フィブリンならびにフィブリノーゲン分解産物

TAT：トロンビン・アンチトロンビン複合体

表 4 調査対象となった腸炎発症馬 14 頭のプロフィールと病理組織学的所見

| No. | 馬齢 | 性別 | 発症前のイベント | 初診時の直腸温 (°C) | 予後による分類 () 内は死亡病日 | 病理組織学的検査における フィブリンの析出 |
|-----|----|----|-------------------|--------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | 7 | 牝 | 手術と抗菌薬の投与 | 38.7 | 致死群 (2) | 結腸および盲腸, 肝臓類洞 |
| 2 | 3 | 牝 | 20 時間以上の輸送と抗菌薬の投与 | 40.5 | 致死群 (3) | 結腸および盲腸, 肺胞毛細血管 |
| 3 | 2 | 牡 | 20 時間以上の輸送 | 40.8 | 致死群 (4) | 肺胞毛細血管, 肝臓類洞, 腎糸球体 |
| 4 | 3 | 牝 | 特になし | 39.6 | 致死群 (2) | 結腸 |
| 5 | 3 | 牡 | 強調教 | 40.0 | 致死群 (4) | 結腸 |
| 6 | 2 | 牡 | 強調教 | 40.4 | 致死群 (5) | 実施せず |
| 7 | 3 | 牡 | 強調教 | 39.6 | 致死群 (7) | 実施せず |
| 8 | 3 | 牝 | 特になし | 40.2 | 致死群 (7) | 結腸および盲腸, 肺胞毛細血管 |
| 9 | 2 | 牡 | 特になし | 40.3 | 致死群 (4) | 結腸および盲腸 |
| 10 | 4 | 牡 | レースへの出走 | 39.5 | 回復群 | — |
| 11 | 3 | 牡 | レースへの出走 | 40.0 | 回復群 ^a | 所見なし |
| 12 | 3 | 牡 | レースへの出走 | 40.0 | 回復群 | — |
| 13 | 2 | 牡 | 特になし | 41.0 | 回復群 ^b | 所見なし |
| 14 | 3 | 牡 | 強調教と抗菌薬の投与 | 39.2 | 回復群 | — |

a) 腸炎症状は寛解するものの, 入院 80 日後に蹄葉炎により安楽死処置

b) 腸炎症状は寛解するものの, 入院 14 日後に盲腸便秘により安楽死処置

—: 生存症例につき調査対象外

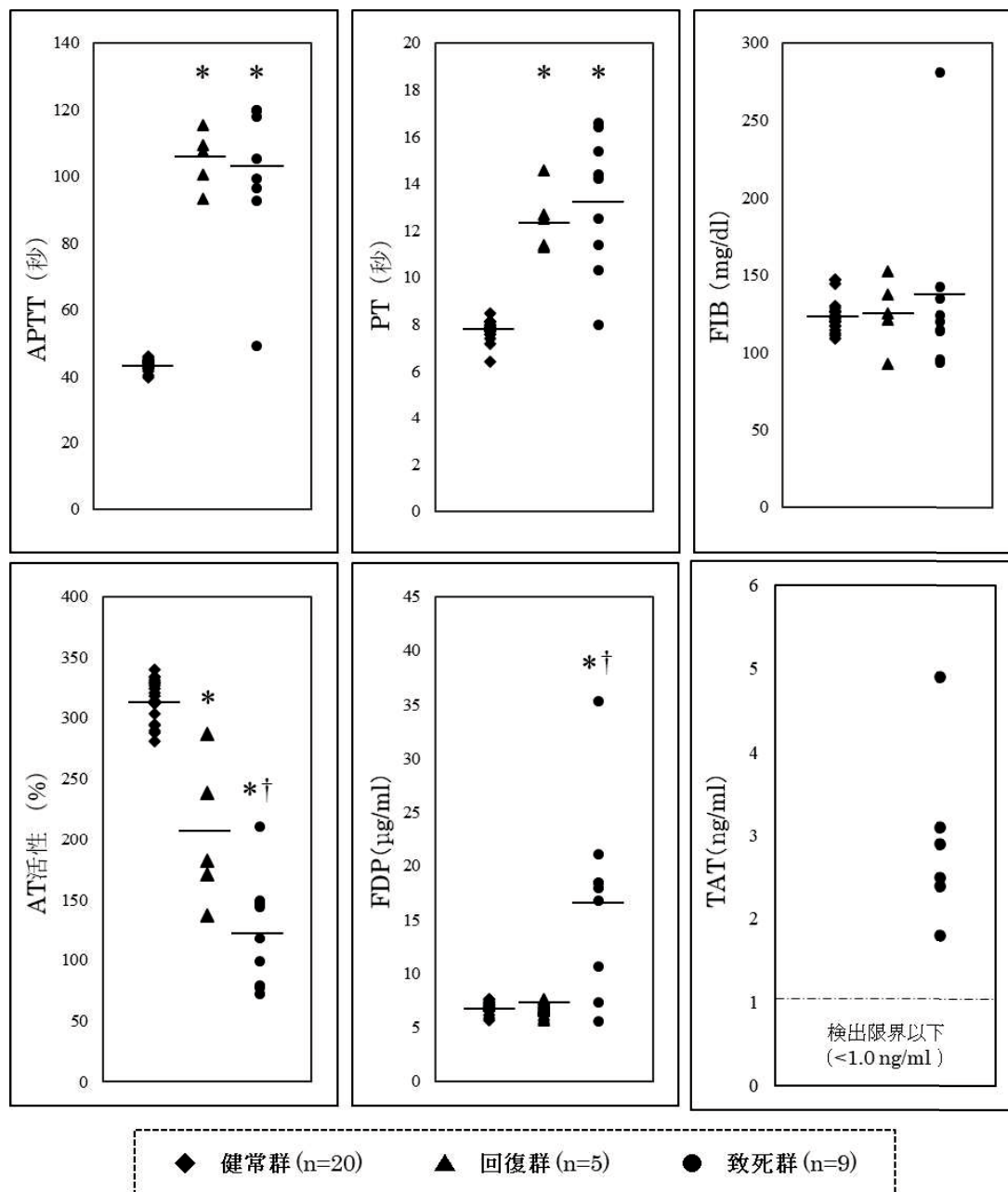


図9 临床上健康な競走馬 20 頭と、腸炎発症馬 14 頭における測定期間中の最も顕著な異常値

(APTT・PT・FDP・TAT の最大値, FIB・AT 活性の最低値) の分布

(* : P<0.05 ; 健常群との間に有意差あり, † : P<0.05 ; 回復群との間に有意差あり)

APTT : 活性化部分トロンボプラスチン時間

PT : プロトロンビン時間

FIB : フィブリノーゲン

AT : アンチトロンビン

FDP : フィブリンならびにフィブリノーゲン分解産物

TAT : トロンビン・アンチトロンビン複合体

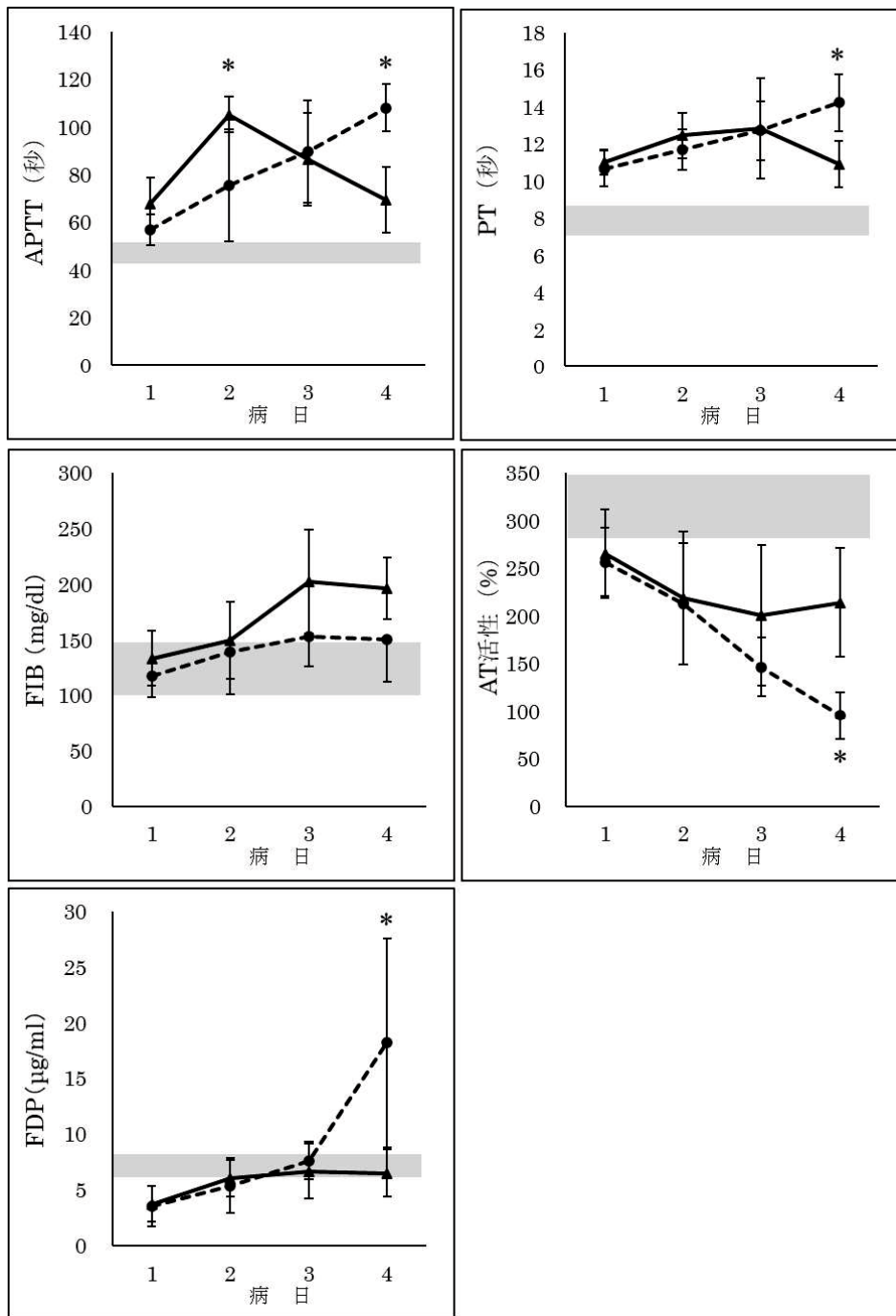


図 10 腸炎発症馬における血液凝固系検査値の経時的変化

実線は回復群，破線は致死群，灰色部は健常群の測定値から算出した正常範囲を示す。

(* : $P < 0.05$; 同病日において両群間に有意差あり)

APTT : 活性化部分トロンボプラスチン時間

PT : プロトロンビン時間

FIB : フィブリノーゲン

AT : アンチトロンビン

FDP : フィブリンならびにフィブリノーゲン分解産物

表 5 血液凝固系検査値の「測定期間中の最も顕著な異常値」と「初診日から 4 日間の継続した変動」の回復群と致死群の比較

| 測定期間中の最も顕著な異常値 | | | |
|---------------------------|--------------|--------------|-------|
| | 回復群 (n=5) | 致死群 (n=9) | P 値 |
| APTT の延長 | 5 / 5 (100%) | 9 / 9 (100%) | |
| PT の延長 | 5 / 5 (100%) | 8 / 9 (89%) | |
| FIB の減少 | 1 / 5 (20%) | 2 / 9 (22%) | |
| AT 活性の低下 | 4 / 5 (80%) | 9 / 9 (100%) | |
| FDP の上昇 | 2 / 5 (40%) | 7 / 9 (78%) | |
| TAT の上昇 | 0 / 5 (0%) | 6 / 9 (67%) | <0.05 |
| 初診日から第 4 病日までの変動 | | | |
| | 回復群 (n=5) | 致死群 (n=5) | P 値 |
| APTT の持続的な延長 ^a | 0 / 5 (0%) | 2 / 5 (40%) | |
| PT の持続的な延長 | 0 / 5 (0%) | 2 / 5 (40%) | |
| FIB の持続的な減少 | 0 / 5 (0%) | 0 / 5 (0%) | |
| AT 活性の持続的な低下 | 1 / 5 (20%) | 5 / 5 (100%) | <0.05 |
| FDP の持続的な上昇 | 0 / 5 (0%) | 5 / 5 (100%) | <0.05 |

a) 初診日から 4 日間連続して上昇し続ける, 低下し続けるなどの変化を「持続的な変化」と定義する

APTT : 活性化部分トロンボプラスチン時間

PT : プロトロンビン時間

FIB : フィブリノーゲン

AT : アンチトロンビン

FDP : フィブリンならびにフィブリノーゲン分解産物

TAT : トロンビン・アンチトロンビン複合体

第 3 章

競走馬の腸炎に対する血漿輸液療法の有用性に関する検討

1. 背景

第 2 章では、競走期サラブレッドの急性腸炎には全身性の血液凝固異常が伴っており、継続的な凝固異常のモニタリングが病態把握や予後予測に有用であることを明らかにした。また、血液凝固機能を評価するパラメーターのうち、AT 活性のモニタリングは病態把握・治療法選択の両方から有用となる可能性が示唆された。

血液凝固異常に対する代表的な治療法として抗凝固剤の投与があり、ウマにおいても血液凝固異常に対してヘパリンを投与した報告がある。Feige らは疝痛に伴う血液凝固異常に対する治療法として、未分化ヘパリンの投与と低分子ヘパリン (LMWH ; low molecular weight heparin) の投与とを比較し、LMWH の安全性が高いことを報告している [27]。ヒト医学領域では、これらの抗凝固療法に加え、種々の要因により AT 活性が正常の 70%以下へ低下した場合、ヒト血漿由来 AT 濃縮製剤や遺伝子組換えヒト AT 製剤を用いた AT 補充療法が適応となる [86, 111]。ウマ医療において利用可能な AT 濃縮製剤は筆者の知る限り存在しないが、AT をはじめとした凝固因子の欠乏に対処する方法として血漿輸液療法が実施されている [61]。血漿輸液療法は、本邦では特に子馬の治療において血液中のタンパク質成分である免疫グロブリンの投与が必要となる移行免疫不全症や、同じくタンパク質成分であるアルブミンが必要となるローソニア感染症に対する治療法として定着している。しかし、成馬に対する血漿輸液療法については知見が少なく、海外の報告に目を向けても腸炎発症馬に対して血漿輸液療法を適用した報告は Welch らの 1 報に限られている [101]。このため、腸炎発症馬に対して AT の補充を目的に実施する血漿輸液療法については、適用基準、投与量、投与回数および効果判定法といった臨床上の情報が不足しているのが現状である。

第 2 章での調査結果を踏まえ、JRA 競走馬診療所では、血液凝固機能を評価する検査項目のうち、APTT, PT および AT 活性をベッドサイドで測定可能な自動測定機器を導入し

た。このことにより、臨床現場におけるリアルタイムな血液凝固系検査が可能となった。そこで本章では、腸炎発症馬の血液凝固機能を継続してモニタリングし、ヒト医学領域の基準に倣って AT 活性が一定水準を下回った場合に血漿輸液療法を適用し、効果判定法や副作用についての知見を得ることともに、予後への影響を調査して有用性を検討することを目的とした。

2. 材料と方法

1) 調査対象

2016 年 10 月から 2020 年 7 月の間、JRA 美浦および栗東 TC において出走へ向けて調教していたサラブレッド種競走馬のうち、38.5℃以上の発熱および急性の下痢症を発症した症例を腸炎と診断した。これらの腸炎発症馬のうち、継続的に血液凝固機能の検査を受け、後述する適用基準を満たして血漿輸液療法が適用された症例を調査対象とした。なお、血漿輸液療法は、期待される効果に加えて副作用の可能性を十分に説明し、事前に患馬の管理調教師の承認が得られた症例のみに実施した。

また、同時期に TC に繋養されていた臨床上健康なサラブレッド種競走馬 40 頭をランダムに抽出し、新たに導入した全自動血液凝固測定装置 (CA-650, シスメックス株式会社, 神戸) における正常範囲の設定に利用した。

2) 血漿輸液の適用基準と血漿の投与方法

腸炎発症馬に対して、主治医が必要と判断した時点から、1 日 1 回の血液凝固機能検査を継続的に実施した。血液凝固機能を評価する指標として、APTT, PT および AT 活性を選定し、前述の全自動血液凝固測定装置 (CA-650) を用いて測定した。3 つの検査値のうちいずれかに異常を認めた時点で、主治医の判断に基づき、LMWH の 1 種であるダルテパリ

ン（フラグミン静注 5000 国際単位／5ml，ファイザー，東京）を，馬体重に合わせて 20,000～25,000 国際単位（製剤として 20～25ml）1 日 1 回皮下投与した [27,66]。また，前章の調査結果における回復群と致死群の AT 活性の変動を踏まえ，本調査における血漿輸液療法の適用基準を，「AT 活性値が健常馬の 50%程度に低下した場合」と設定し，基準を満たしたその日のうちに血漿を投与した。

投与する血漿のドナーには，副作用の予防を目的にハフリンガー種のユニバーサルドナー（UD）の血漿を優先して使用し，在庫が不足した場合には輸血歴の無い临床上健康なサラブレッドを利用した。ドナーからの採血後，血漿を分離して直ちに冷凍し，投与まで-20℃あるいは-80℃以下のフリーザーで保存した [106]。投与する血漿は，投与が決定した時点で 30-37℃の温水で攪拌しながら融解して使用した [108]。血漿の投与は，フィルター付きの輸血用の輸液ラインを使用して緩徐投与から実施し，5 分ごとに心拍数・呼吸数の確認を行って全身状態を確認した [61]。投与開始後 15 分間は特に慎重に観察し，異常が確認されなかった場合は，流速を上げて予定した全量を投与した。何らかの副作用が確認された場合には，投与を中止した。血漿の投与量は，均一性を考慮し，1 回の分離作業で得られる血漿量である 2-4 L を目安とした。1 日 1 回投与とし，改善が得られない場合など，主治医の判断で複数日間の投与を実施した。

全ての症例には，LMWH や血漿の投与に加えて，前章の調査対象馬と同様に持続輸液療法（乳酸リンゲル液および 6%ヒドロキシエチルデンプン製剤），抗エンドトキシン療法（フルニキシンメグルミンの低容量投与およびポリミキシン B），およびプロバイオティクス療法が実施され，必要と判断された症例には抗菌薬療法（メトロニダゾールの経口投与，またはセファロチンの静脈内投与）が実施された。

3) 調査項目

血漿輸液実施対象となった症例の年齢，性別に加え，初診時の直腸温，心拍数，呼吸数，PCV および SAA 値を調査した。PCV については自動測定装置 (MEK-6500, 日本光電工業株式会社, 東京), SAA については自動測定装置 (Hitachi 7700, 株式会社日立ハイテク, 東京) を用いて測定した。

血漿輸液療法実施の概要として，血漿投与回数，平均 1 回投与量 (L)，総投与量 (L) および血漿輸液適用病日を調査した。また，血漿投与後に生じた副作用について記録した。

4) 統計解析

血漿輸液療法実施馬を，予後により回復群，致死群に分類した。2 群間の比較において，正規分布数値 (心拍数，呼吸数および各血液検査値) に対しては対応のない t 検定，非正規分布数値 (年齢および体温) に対してはマンホイットニーの U 検定を使用して解析した。性別データ，およびヘパリン投与の有無については，全体に占める割合を算出し，Fisher の正確検定を用いて比較した。連続変数について，正規分布数値は平均値±標準偏差で示し，非正規分布数値は中央値 (第 1 四分位数 - 第 3 四分位数) で示した。AT 活性値については，血漿輸液療法実施日を Day0 と定義し，血漿投与開始前日 (Day -1) から投与開始 3 日後 (Day3) までの 5 日間の変動を分析した。各病日において，回復群，致死群の 2 群間で対応のない t 検定を用いて比較した。また，血漿投与基準を満たした時点での APTT，PT および AT 活性値を調査し，回復群，致死群の 2 群間で対応のない t 検定を用いて比較した。

統計解析には，R および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアである EZR (1.00, 埼玉医療センター，自治医科大学，埼玉) を利用し[50]， $P<0.05$ を有意差ありと判定した。

3. 結果

1) 健常馬群における測定結果

臨床上健康なサラブレッド種競走馬 40 頭 (2 歳~7 歳) について, APTT, PT および AT 活性値を測定し, 40 頭の測定値の平均 \pm 2 \times 標準偏差を算出することにより, 表 6 の通り正常範囲を設定した。

2) 血漿輸液適用症例の概要

調査期間に腸炎と診断されたウマは 43 頭で, そのうち血液凝固機能のモニタリングが実施され, 血漿輸液適用基準を満たした腸炎発症馬は 19 頭であった。予後により, 11 頭が回復群, 8 頭が致死群に分類され, 致死率は 42%であった。各症例のプロフィール, ならびに初診時の臨床所見を表 7 に示す。致死群では, 発症年齢が有意に低い傾向が認められた。また臨床所見においては, 致死群で心拍数が有意に上昇していたが, その他の項目に有意差は認められなかった。LMWH の投与は 19 頭のうち 17 頭 (89%) に実施され, 群間に差は認めなかった。

3) 血漿投与の概要と血漿輸液適用症例における血液検査値の変動について

各群における血漿投与の概要を表 8 に示す。血漿投与回数の中央値は, 回復群で 2 回, 致死群で 3 回であった。治療期間中の血漿総投与量は回復群で平均 4.4 L, 致死群で平均 7.1 L であり, 致死群で有意に多かった。また, 腸炎と診断された日を第 1 病日と定義すると, 血漿輸液を実施したタイミングは, 回復群で平均第 3.6 病日, 致死群で平均第 2.1 病日であり, 致死群で有意に早かった。19 頭に実施された延べ 40 回の投与のうち, 2 回 (5%) の投与において投与約 5 分後に発疹を認めたため, アレルギー反応を疑って投与を中止した。その際, 直腸温, 心拍数および呼吸数には変化は認められなかった。発疹は, 抗ヒスタミン

薬の投与により速やかに消失した。

AT 活性値が概ね 100%以下（健常馬の AT 活性値の約 50%以下）となり，血漿輸液適用となった時点での APTT，PT および AT 活性値を表 8 に示した。PT の延長は回復群と致死群で同程度であったが，APTT は回復群に比較して致死群で有意に延長していた。Day - 1 から Day3 における AT 活性の変動は，図 11 に示す通りとなった。血漿輸液開始前日および開始日（Day -1 および Day0）における測定値は両群でほぼ同程度であったが，血漿投与後，回復群は 94.6%（Day0）から 120.3%（Day3）へ上昇したのに対し，致死群は 96.2%（Day0）から 78.4%（Day3）へ低下した。各病日で回復群と致死群を比較すると，Day2 および Day3 において，回復群が有意に高値を示した。

4. 考察

本調査では、腸炎を発症した競走期サラブレッドに対して継続的に血液凝固機能をモニタリングし、AT活性が持続的に低下して一定水準を下回った症例に血漿輸液療法を適用し、その有用性を検討した。その結果、19頭に血漿輸液療法が実施され、11頭が治癒し、8頭が死亡・安楽死となった。AT活性の変動に着目すると、治癒した症例では、低下傾向にあったAT活性が血漿輸液の実施により上昇し、投与終了後もその傾向が維持された。一方、死亡あるいは安楽死となった症例においては、血漿投与後もAT活性が低下し続け、致死的状态に至った。血漿投与開始日から2日後および3日後のAT活性値は致死群に比較して回復群で有意に高値を示し、血漿輸液療法に反応してAT活性が回復するか否かが予後に関連する結果となった。

血液凝固異常に対する治療として最も重要なものは、原因となっている基礎疾患の治療である。また、それに加えて基本的な治療法となるのは、抗凝固・血栓療法である。本調査においては、血漿輸液が実施された19頭のうち17頭にはLMWHの1種であるダルテパリンが併用され、出血傾向等の副作用は認められなかった。本調査においては、全ての症例でLMWH投与と血漿輸液療法を組合せて実施したため純粋な治療効果は明らかとならなかったが、LMWHが副作用なく安全に使用可能であったことは、過去の報告に一致していた [27, 66]。

ウマの腸炎における血漿輸液療法の適用基準はこれまで提言されていないが、本調査では、第2章における回復群と致死群のAT活性値の変動パターンや、投与する血漿の確保のしやすさ等を勘案し、「健常馬におけるAT活性値の50%以下に低下した症例」を適用基準として設定した。その結果、調査期間中に腸炎を発症した43頭のうち19頭が血漿投与適用馬となり、その致死率は42%であった。第2章で調査した腸炎発症馬14頭のうち、AT活性が持続的に低下して正常の50%以下となったのは6頭で、そのうち5頭は死に至って

おり、致死率は 83%と算出される。検査体制に差異があるため単純な比較はできないが、AT 活性が顕著に低下する重症度の高い腸炎発症馬に対しても、LMWH の投与と血漿輸液療法を組み合わせた治療を実施することにより、救命が可能となる症例が存在することが示唆された。ヒト医学領域における AT 製剤の投与基準は既に述べたが、正常の 70%以下という基準の妥当性や、AT 製剤投与自体の有用性については未だ議論が続いている。DIC に対する AT 製剤の有効性を検討した臨床試験も数多く行われており、AT 製剤の投与は予後に影響を与えないとする報告 [1]や、出血性の副作用の危険性を指摘する報告 [97]がある一方、敗血症性 DIC に対しては予後を改善する可能性を示唆する報告が多い [36, 40, 42]。腸炎発症馬に生じる血液凝固異常の発生メカニズムは不明な点が多いものの、本調査の結果からは、腸炎発症馬に対する AT 投与療法は一定の予後改善効果を示す可能性が示唆された。

回復群においては、血漿輸液の実施により、低下傾向であった AT 活性が上昇に転じ、投与 3 日後には投与前日の水準まで回復した (図 7)。データには示していないが、その後も AT 活性値は徐々に上昇し、全ての治療が終了して退院する時点には正常範囲付近まで回復した。一方致死群については、投与後も AT 活性が低下し続け、一般状態も悪化して死に至った。結果として、投与日から 2 日後ならびに 3 日後の AT 活性値は、致死群に比較して回復群で有意に高値を示した。これらの変動は、ヒト医学領域において、AT 補充療法が適応となった患者に AT 濃縮製剤を投与した際、投与による AT 活性値の増加幅が DIC 症例の予後予測に有用であるとした報告に一致していた [31, 40]。血漿投与量ならびに回数は、AT 活性値と一般状態に基づき主治医の判断によって決定されたが、治療期間中の総投与量は致死群で有意に多かった (表 8)。致死群においては、血漿投与によって AT 活性の上昇や一般状態の回復が認められず、投与回数・量とも多くなったと考えられる。また、致死群においては、腸炎と診断されてから血漿輸液療法が適用となるまでの期間が回復群と比較し

て短く、早いタイミングで血漿を投与されていた。すなわち、致死群においては、早期から血漿輸液を開始し、なおかつより多くの血漿の投与を受けたにも関わらず、AT 活性値の上昇、ならびに一般状態の良化が認められなかったこととなる。回復群における血漿投与日数の中央値は 2 日間であり、また致死群に対して回復群の AT 活性値が有意に高値となったのも投与 2 日後であった。これらの結果から、2 日間程度の血漿輸液により AT 活性が上昇傾向へ転じるか否か、すなわち血漿輸液療法に対する治療応答性が、予後に関与することが示唆された。

回復群と致死群では、腸炎と診断された時点での臨床所見に大きな差は認められなかった(表 7)。一方血漿投与開始時点で比較すると、AT 活性の低下は両群で同程度であったが、致死群では APTT が有意に延長していた(表 8)。このことから、AT 活性が同程度であっても、血漿投与を開始した時点での血液凝固異常の程度には差異があることが明らかとなった。血液凝固異常を発症した際に AT 活性が低下する機序には、凝固活性化に伴って AT の消費が亢進することに加え、血管透過性の亢進に伴って血漿タンパクが血管外へ漏出することが要因と考えられている [41]。本調査において、同程度の AT 活性値でありながら血液凝固異常の程度にバラつきが生じた要因として、AT 活性低下の機序に、血液凝固異常の進行 (APTT の延長が重度) と、血管外への漏出 (APTT の延長は軽度) が関与するバランスが症例ごとに異なっていたことが影響した可能性がある。また本調査の結果からは、血液凝固異常がより進行している場合において血漿輸液療法に対する治療反応性が悪く、予後不良に強く関連するものと考えられた。これらの症例にはより積極的な血液凝固異常に対する治療が必要と考えられ、今後、AT 活性値と他の検査値を組み合わせた総合的な適用基準の設定や、1 回投与量に関する検討が必要である。

血漿投与は、19 頭に対して延べ 40 回実施された。血漿には原則として細胞成分が含まれないため、溶血性反応といった重篤な副作用を発症する可能性は極めて低い、抗原抗体反

応を含む非溶血性副作用には十分注意が必要である。本調査では、40回のうち2回（5%）において、投与後5分程度で蕁麻疹を発症した。ウマにおける血漿輸液における副作用は0-10%と報告されており、本調査においてもこれに矛盾しない結果となった [60]。またその程度は軽度であり、血漿投与の中止、ならびに抗ヒスタミン薬の投与によりアレルギー症状は速やかに寛解した。血漿輸液の実施においては、特に投与初期の15分間について副反応の兆候に注意する必要があるとされており [35, 38, 104]、定期的な状態チェックにより早期に異常を発見し、投与を中止するなどの対処を実施することで、副作用の影響を最小限に抑えられるものと考えられた。また、本調査で蕁麻疹を発症した2症例は、いずれも2回目の血漿投与での発症であった。本調査で利用した血漿のドナーであるハフリンガー種は、血液型検査ならびに赤血球抗原型検査において、Aa抗原およびQa抗原のいずれも持たず、また抗体を保有していないという条件を満たすUDであることを確認している。本調査においては、投与する血漿として可能な限りUDの血漿を優先して用いることでリスクコントロールを図ったが、2回目の投与時には以前投与された血漿タンパク成分と反応を起こす可能性があり、より注意が必要であると考えられた [61]。また、2例の副作用は、致死群での発症であった。このことの因果関係は不明であるが、一般状態が顕著に悪化している際には、投与速度を緩徐としたまま維持する等の工夫が必要かもしれない。

本調査のリミテーションとして、本調査で設定した血漿投与基準を満たしながら血漿投与を実施しなかった症例群や、LMWH投与のみを実施する群のみを設定していないため、AT活性の回復や予後の改善には、血漿輸液療法以外の要因が関与する可能性を否定することはできない。本調査の結果をもとに、治療法選択基準を再検討したうえで前向き研究を実施することで、それぞれの治療効果がより明確に追究できると考えられる。

本調査では、腸炎を発症した競走期サラブレッドに対して継続的に血液凝固機能をモニタリングし、AT活性が持続的に低下して一定水準を下回った症例に血漿輸液療法を適用し、

その有用性を検討した。その結果、AT 活性値の持続的かつ顕著な低下を伴う重篤な腸炎発症馬の治癒率は向上し、これまで救命困難であった症例に対して一定の予後改善効果があることが示唆された。一方、血漿輸液の実施によっても AT 活性値が回復せず死に至った症例では、血漿投与時点で AT 活性の低下に加えて APTT の延長が顕著であり、血液凝固異常が進行している特徴があった。今後、AT 活性値だけでなく、APTT 等他の検査値を勘案した評価基準を設定して治療法選択に反映させることで、重症度の高い腸炎発症馬の治癒率をさらに向上させることができるか検討が必要であると考えられた。

5. 小括

腸炎発症馬に対して継続的に血液凝固機能のモニタリングを実施し、AT 活性値が一定値（正常の 50%）を下回った 19 症例に、低分子ヘパリン投与に加えて血漿輸液療法を適用し、有用性を検討した。その結果、AT 活性の持続的かつ顕著な低下を伴う重篤な腸炎発症馬の治癒率は向上し、これまで救命困難であった症例に対して一定の予後改善効果があることが示唆された。また、回復例では、AT 活性値が血漿投与後に上昇傾向に転じるのに対し、死亡例では複数回の投与にも関わらず低下し続ける特徴があり、血漿輸液療法に対する治療応答性が予後に関与していることが示唆された。今後、1 回投与量の増量や、APTT 等其他の検査値を勘案した血漿輸液適用基準を設定して治療法選択に反映させることで、重症度の高い腸炎発症馬の治癒率をさらに向上させることができるか検討が必要である。

6. 図表

表 6 自動測定装置 (CA-650) における APTT, PT および AT 活性の正常範囲

| | 測定値 | 正常範囲 |
|-----------|----------------|-------------|
| APTT (秒) | 51.6 ± 3.8 | 44.1 - 59.1 |
| PT (秒) | 8.5 ± 0.3 | 7.9 - 9.1 |
| AT 活性 (%) | 195 ± 9.5 | 176 - 214 |

正常範囲は、20 頭の測定値の平均 ± 2 ×標準偏差を計算することで算出した。

APTT : 活性化部分トロンボプラスチン時間

PT : プロトロンビン時間

AT : アンチトロンビン

表 7 血漿輸液実施馬 19 頭のプロフィールと初診時の臨床所見

| | 回復群 (n=11) | 致死群 (n=8) | P 値 |
|--------------------|----------------------------|---------------------------|------|
| 馬齢 | 3 (3-4) | 3 (2.8-3) | 0.01 |
| 性別 (牡/セン/牝) | 5/2/4 (45% / 18% / 36%) | 6/0/2 (75% / 0% / 25%) | 0.52 |
| 直腸温 (°C) | 38.7 (38.6-39.0) | 39.8 (39.1-39.9) | 0.13 |
| 心拍数 (回/分) | 51 ± 7 | 60 ± 10 | 0.02 |
| 呼吸数 (回/分) | 22 ± 5.2 | 27 ± 13 | 0.12 |
| ヘマトクリット値 (%) | 49.9 ± 7.9 | 54.1 ± 8.4 | 0.16 |
| 血清アミロイド A (µg/ml) | 347 ± 360 | 391 ± 304 | 0.40 |
| 低分子ヘパリン投与 (有/無) | 9(82%) / 2(18%) | 8(100%) / 0(0%) | 0.49 |

心拍数，呼吸数および血液検査値は平均値±標準偏差，年齢および体温は中央値（第 1 四分位数 - 第 3 四分位数）で示した。性別およびヘパリン投与の有無は，該当症例数とその割合を示した。

表 8 血漿輸液療法の概要と血漿輸液開始日における血液学的所見

| 血漿輸液療法の概要 | | | |
|---------------------------|-------------|-------------|-------|
| | 回復群 (n=11) | 致死群 (n=8) | P 値 |
| 血漿投与回数 | 2 (1-2) | 2.5 (2-3) | 0.07 |
| 平均 1 回投与量 (L) | 2.4 ± 1.1 | 2.9 ± 1.1 | 0.39 |
| 総投与量 (L) | 4.4 ± 1.7 | 7.1 ± 3.8 | 0.03 |
| 血漿輸液適用病日 ^a | 3.6 ± 1.9 | 2.1 ± 1.0 | 0.03 |
| 血漿輸液開始日 (Day0) における血液学的所見 | | | |
| | 回復群 (n=11) | 致死群 (n=8) | P 値 |
| APTT (秒) | 61.2 ± 12.4 | 99.3 ± 46.0 | <0.01 |
| PT (秒) | 10.4 ± 1.4 | 11.0 ± 1.5 | 0.15 |
| AT 活性 (%) | 95 ± 15 | 96 ± 21 | 0.42 |

a) 腸炎と診断された日を第 1 病日と定義して算出

APTT : 活性化部分トロンボプラスチン時間

PT : プロトロンビン時間

AT : アンチトロンビン

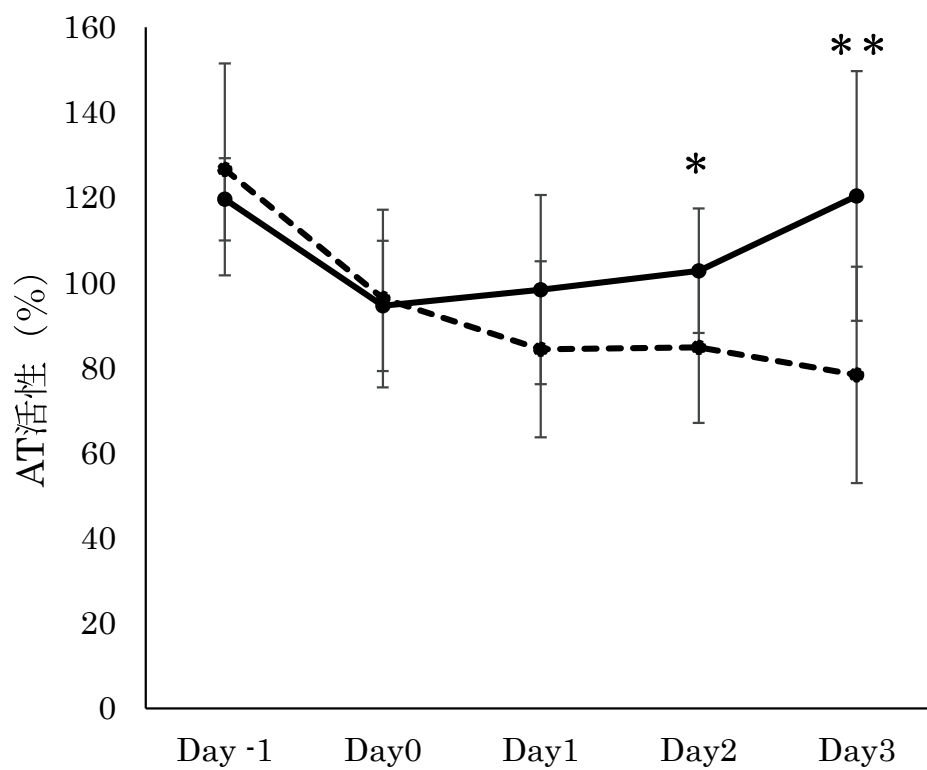


図 11 血漿投与開始前日 (Day -1) から開始 3 日後 (Day 3) までのアンチトロンビン (AT) 活性値の変動

実線は回復群，破線は致死群の変動を示す。

(* : P<0.05, ** : P<0.01 ; 同病日において両群間に有意差あり)

総 括

競走馬の急性腸炎（以下、腸炎）は、主に盲腸や結腸の粘膜における壊死性の炎症により、発熱や下痢といった臨床症状を呈する疾患である。病態が進行すると、腸粘膜の重度かつ広範囲な傷害とともに、肺炎や蹄葉炎、腎不全といった合併症を発症して死に至ることも少なくない。発症には細菌やウイルスの感染、腸内細菌叢の変動等が関与することが知られているが、特発性の発症も多く、有効な治療法は確立されていない。近年、競走期サラブレッドにおける腸炎発症頭数は増加傾向にあり、発症傾向の把握や治療法の改善が喫緊の課題となっている。

腸炎が重症化するキースケードの1つとして、全身性の炎症により惹起される播種性血管内凝固症候群（DIC）の関与が考えられる。ウマの消化器疾患におけるDICの発症に関する報告はいくつかあり、DICを併発した場合の予後は悪いとされている。また重篤な消化器疾患を発症して死亡した症例の病理組織学的検査において、肺、肝臓および腎臓に微小血栓形成やフィブリン析出を認めることがあり、DICは多臓器不全に関連することが予想される。このため、血液凝固異常に対して適切に治療を実施することにより、DICの発症を抑制し、腸炎の予後を改善できる可能性がある。しかし、これまで本邦の競走馬医療においては血液凝固異常への関心は薄く、腸炎との関連性や治療における重要性については十分に検討されていない。また既報においては、DIC診断と予後との関連を中心に検討しているものが多く、血液凝固機能を評価する各パラメーターが、腸炎疾患の発症初期から重症化に伴ってどのような経時的変化を示すのか、あるいはパラメーターの変動を治療法の選択にどのように活用するか検討した報告はこれまでない。そこで本研究では、まず第1章で2010-2018年の9年間に腸炎を発症した競走馬137頭を対象として回顧的に調査し、発症事前因子や臨床検査所見、治療成績などを分析して特徴を明らかにした。続いて第2章では、腸炎により死亡した症例の病理組織学的検査所見を整理するとともに、腸炎に伴って生じる血液凝固機能の経時的変化に焦点を当てて調査し、血液凝固異常に対す

る治療法選択に活用することを念頭に考察した。最後に第3章では、第2章の結果を踏まえ、ヘパリン投与と血漿輸液療法を組み合わせた血液凝固異常に対する治療基準を設定し、その有用性について検討した。

第1章では、2010～2018年にJRA附属施設内で腸炎を発症したサラブレッド種競走馬137頭を対象に、発症事前因子、臨床検査所見および治療成績について回顧的に調査した。その結果、腸炎の致死率は42%で、なかでも*Clostridioides difficile*感染が認められた24頭の致死率は73%と極めて高いことが明らかとなった。*C. difficile*腸炎発症馬は、発熱や頻呼吸に加えて初診時の血液検査においてヘマトクリット値、血中尿素窒素、血清アミロイドA濃度の上昇が顕著であり、全身性炎症反応症候群と循環不全が急速に進行する特徴をもつことが示唆された。また、その発症は、抗菌薬投与や手術および入院治療と関与する可能性が明らかとなった。治癒率を有意に改善する方法は認められなかったが、*C. difficile*腸炎に対してはメトロニダゾールの投与が有効となる可能性が示唆された。

第2章では、2014～2015年の腸炎発症馬のうち14頭（回復例5頭および死亡例9頭）を対象に、死亡した症例の病理組織学的検査所見を整理するとともに、血液凝固機能の変動と予後との関連について調査した。その結果、死亡例の病理組織学的検査所見において、腸粘膜固有層や粘膜下組織の小血管に加え、肺胞毛細血管（3例）、肝臓類洞（2例）および腎臓糸球体（1例）といった全身諸臓器の小血管にフィブリンの析出や微小血栓形成を認めた。これらの所見は、DICの発症を示唆する所見と考えられた。また、予後に関わらず全ての腸炎発症馬において、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）およびプロトロンビン時間の延長を認めた。特に死亡例では、トロンビン・アンチトロンビン複合体（TAT）およびフィブリン・フィブリノーゲン分解産物（FDP）の上昇を認めた。TATやFDPはヒト医学領域においてDICの診断指標と認識されており、これらの上昇は、ウマの腸炎においても病態を引き起こすDICの発症を示唆する変化と考えられた。加えて死亡例には、持続的に

アンチトロンビン（AT）活性値が低下する特徴が認められた。血液凝固活性化に対する一般的な治療法であるヘパリン類の投与は、十分な AT 活性存在下でのみ有効であることから、ヒト医学領域では AT 活性値を AT 補充療法の適用基準として利用している。このことから、AT 活性のモニタリングは、競走馬の腸炎において、病態把握・治療法選択の両面から有用となる可能性が示唆された。

ウマ医療においては、AT を含む凝固因子を補充する方法として血漿輸液療法が知られているが、腸炎へ適用した臨床報告は極めて少なく、投与するタイミングや効果に関する知見が不足している。第 3 章では、腸炎発症馬に対して継続的に血液凝固機能のモニタリングを実施し、AT 活性値が一定値（正常の 50%）を下回った 19 頭について、低分子ヘパリン投与に加えて血漿輸液療法を適用し、有用性を検討した。その結果、AT 活性の持続的かつ顕著な低下を伴う重篤な腸炎発症馬において、血液凝固異常に対する治療を導入する以前は 83%であった致死率が、42%まで低下した。また、回復例では血漿投与前まで持続的に低下していた AT 活性値が投与後に上昇傾向に転じるのに対し、死亡例では複数回の血漿投与にも関わらず AT 活性値が低下し続ける特徴があり、血漿輸液療法に対する治療応答性が予後に関与していることが示唆された。回復例と死亡例とを比較すると、死亡例では血漿投与時点での APTT が有意に延長していた。このことは、AT 活性値が同程度であっても病態進行の程度にはバラつきがあることを示唆しており、今後 APTT 等を含めた総合的な適用基準を設定することで、適切な血漿投与のタイミングが決定できるものと考えられた。

本研究では、競走馬に発症する腸炎の特徴を明らかにするとともに、腸炎に伴って生じる血液凝固異常の実態と、それに対する治療の有用性を明らかにした。今後、競走馬の腸炎発症におけるこれらの特徴を十分認識したうえで、病態把握法の 1 つとして血液凝固機能のモニタリングを活用し、血漿輸液療法をはじめとした適切な治療を実施することにより、さらなる治癒率の向上が期待される。

引 用 文 献

1. Allingstrup M, Wetterslev J, Ravn FB et al. (2016) Antithrombin III for critically ill patients: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Intensive Care Medicine* **42**, 505-520.
2. Arroyo LG, Stampfli HR, Weese JS (2006) Potential role of *Clostridium difficile* as a cause of duodenitis-proximal jejunitis in horses. *Journal of Medical Microbiology* **55**, 605-608.
3. Asakura H (2014) Classifying types of disseminated intravascular coagulation: clinical and animal models. *Journal of Intensive Care* **2**, 20.
4. Barr BS, Waldrige BM, Morresey PR et al. (2013) Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. *Equine Veterinary Journal* **45**, 154-158.
5. Baverud V (2004) *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *The Veterinary clinics of North America Equine practice* **20**, 615-630.
6. Baverud V, Franklin A, Gunnarsson A et al. (1998) *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal* **30**, 482-488.
7. Baverud V, Gustafsson A, Franklin A et al. (1997) *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Veterinary Journal* **29**, 279-284.
8. Baverud V, Gustafsson A, Franklin A et al. (2003) *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Veterinary Journal* **35**, 465-471.
9. Belknap JK, Moore JN (1989) Evaluation of heparin for prophylaxis of equine laminitis: 71 cases (1980-1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association*

195, 505-507.

10. Borges AS, Divers TJ, Stokol T et al. (2007) Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **21**, 489-494.

11. Burgess BA, Morley PS (2014) Managing Salmonella in equine populations. *The Veterinary clinics of North America Equine practice* **30**, 623-640.

12. Burke KE, Lamont JT (2014) *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease. *Gut Liver* **8**, 1-6.

13. Cesarini C, Cotovio M, Ríos J et al. (2016) Association between necropsy evidence of disseminated intravascular coagulation and hemostatic variables before death in horses with colic. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **30**, 269-275.

14. Coffman EA, Abd-Eldaim M, Craig LE (2008) Abortion in a horse following *Neorickettsia risticii* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **20**, 827-830.

15. Cohen JR, Sarfati I, Birnbaum E et al. (1990) The inactivation of antithrombin III by serum elastase in patients with surgical infections. *The American Surgeon* **56**, 665-667.

16. Cohen ND, Woods AM (1999) Characteristics and risk factors for failure of horses with acute diarrhea to survive: 122 cases (1990-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **214**, 382-390.

17. Cotovio M, Monreal L, Navarro M et al. (2007) Detection of fibrin deposits in horse tissues by immunohistochemistry. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **21**, 1083-1089.

18. Cotovio M, Monreal L, Navarro M et al. (2007) Detection of fibrin deposits in tissues

from horses with severe gastrointestinal disorders. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **21**, 308-313.

19. Dallap BL, Dolente B, Boston R (2003) Coagulation profiles in 27 horses with large colon volvulus. *Journal of Veterinary Emergency and Critical care* **13**, 215-225.

20. Dallap Schaer BL, Epstein K (2009) Coagulopathy of the critically ill equine patient. *Journal of Veterinary Emergency and Critical care* (San Antonio, Tex: 2001) **19**, 53-65.

21. Dara SI, Rana R, Afessa B et al. (2005) Fresh frozen plasma transfusion in critically ill medical patients with coagulopathy. *Critical care Medicine* **33**, 2667-2671.

22. de la Rebière de Pouyade G, Grulke S, Detilleux J et al. (2009) Evaluation of low-molecular-weight heparin for the prevention of equine laminitis after colic surgery. *Journal of Veterinary Emergency and Critical care* (San Antonio, Tex: 2001) **19**, 113-119.

23. Diab SS, Songer G, Uzal FA (2013) *Clostridium difficile* infection in horses: a review. *Veterinary Microbiology* **167**, 42-49.

24. Dolente BA, Wilkins PA, Boston RC (2002) Clinicopathologic evidence of disseminated intravascular coagulation in horses with acute colitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **220**, 1034-1038.

25. Fatima R, Aziz M (2019) The Hypervirulent Strain of *Clostridium Difficile*: NAP1/B1/027 - A Brief Overview. *Cureus* **11**, e3977.

26. Feary DJ, Hassel DM (2006) Enteritis and colitis in horses. *The Veterinary clinics of North America Equine practice* **22**, 437-479, ix.

27. Feige K, SchwarzwaldCC, Bombeli T (2003) Comparison of unfractionated and low molecular weight heparin for prophylaxis of coagulopathies in 52 horses with colic: a randomised double-blind clinical trial. *Equine Veterinary Journal* **35**, 506-513.

28. Finco DR, Duncan JR (1976) Evaluation of blood urea nitrogen and serum creatinine concentrations as indicators of renal dysfunction: a study of 111 cases and a review of related literature. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **168**, 593-601.
29. Gando S, Saitoh D, Ishikura H et al. (2013) A randomized, controlled, multicenter trial of the effects of antithrombin on disseminated intravascular coagulation in patients with sepsis. *Critical care* (London, England) **17**, R297.
30. Gando S, Saitoh D, Ogura H et al. (2008) Natural history of disseminated intravascular coagulation diagnosed based on the newly established diagnostic criteria for critically ill patients: results of a multicenter, prospective survey. *Critical care Medicine* **36**, 145-150.
31. Gando S, Sawamura A, Hayakawa M et al. (2006) First day dynamic changes in antithrombin III activity after supplementation have a predictive value in critically ill patients. *American Journal of Hematology* **81**, 907-914.
32. Gohari IM, Arroyo L, Macinnes JI et al. (2014) Characterization of *Clostridium perfringens* in the feces of adult horses and foals with acute enterocolitis. *The Canadian Journal of Veterinary Research* **78**, 1-7.
33. Gustafsson A (2004) Antibiotic Associated Diarrhea in Horses. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Veterinaria*, **166**.
34. Gustafsson A, Baverud V, Gunnarsson A et al. (2004) Study of faecal shedding of *Clostridium difficile* in horses treated with penicillin. *Equine Veterinary Journal* **36**, 180-182.
35. Hardefeldt LY, Keuler N, Peek SF (2010) Incidence of transfusion reactions to commercial equine plasma. *Journal of Veterinary Emergency and Critical care* (San

Antonio, Tex: 2001) **20**, 421-425.

36. Hayakawa M, Kudo D, Saito S et al. (2016) Antithrombin Supplementation and Mortality in Sepsis-Induced Disseminated Intravascular Coagulation: A Multicenter Retrospective Observational Study. *Shock* (Augusta, Ga) **46**, 623-631.

37. Hobo S, Niwa H, Anzai T (2007) Evaluation of serum amyloid A and surfactant protein D in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia. *Journal of Veterinary Medical Science* **69**, 827-830.

38. Hurcombe SD, Mudge MC, Hinchcliff KW (2007) Clinical and clinicopathologic variables in adult horses receiving blood transfusions: 31 cases (1999-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **231**, 267-274.

39. Iba T, Gando S, Murata A et al. (2007) Predicting the severity of systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-associated coagulopathy with hemostatic molecular markers and vascular endothelial injury markers. *The Journal of Trauma* **63**, 1093-1098.

40. Iba T, Saitoh D, Gando S et al. (2015) The usefulness of antithrombin activity monitoring during antithrombin supplementation in patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis Research* **135**, 897-901.

41. Ilias W, List W, Decruyenaere J et al. (2000) Antithrombin III in patients with severe sepsis: a pharmacokinetic study. *Intensive Care Medicine* **26**, 704-715.

42. Inthorn D, Hoffmann JN, Hartl WH et al. (1997) Antithrombin III supplementation in severe sepsis: beneficial effects on organ dysfunction. *Shock* (Augusta, Ga) **8**, 328-334.

43. Jacobsen S, Andersen PH (2007) The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education* **19**, 38-46.

44. Jeffcott LB (1975) The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 727-733.
45. Jin L, Abrahams JP, Skinner R et al. (1997) The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 14683-14688.
46. Johnstone IB, Blackwell TE (1984) Disseminated intravascular coagulation in a horse with postpartum ulcerative colitis and laminitis. *The Canadian Veterinary Journal = La revue veterinaire canadienne* **25**, 195-198.
47. Johnstone IB, Crane S (1986) Haemostatic abnormalities in horses with colic--their prognostic value. *Equine Veterinary Journal* **18**, 271-274.
48. Jones PA, Bain FT, Byars TD et al. (2001) Effect of hydroxyethyl starch infusion on colloid oncotic pressure in hypoproteinemic horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **218**, 1130-1135.
49. Jones RL, Adney WS, Alexander AF et al. (1988) Hemorrhagic necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium difficile* infection in four foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **193**, 76-79.
50. Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation* **48**, 452-458.
51. Kato H, Kato N, Katow S et al. (1999) Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains. *FEMS Microbiology Letters* **175**, 197-203.
52. Kato H, Kato N, Watanabe K et al. (1998) Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2178-2182.

53. Keir AA, Stampfli HR, Crawford J (1999) Outbreak of acute colitis on a horse farm associated with tetracycline-contaminated sweet feed. *The Canadian Veterinary Journal = La revue veterinaire canadienne* **40**, 718-720.
54. Kobayashi N, Maekawa T, Takada M et al. (1983) Criteria for diagnosis of DIC based on the analysis of clinical and laboratory findings in 345 DIC patients collected by the Research Committee on DIC in Japan. *Bibliotheca Haematologica*, 265-275.
55. Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* **6**, 130.
56. Lane DA, Caso R (1989) 9. Antithrombin: Structure, genomic organization, function and inherited deficiency. *Baillière's Clinical Haematology* **2**, 961-998.
57. Madewell BR, Tang YJ, Jang S et al. (1995) Apparent outbreaks of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in horses in a veterinary medical teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **7**, 343-346.
58. Madoiwa S, Nunomiya S, Ono T et al. (2006) Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *International Journal of Hematology* **84**, 398-405.
59. Magdesian KG, Dujowich M, Madigan JE et al. (2006) Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **228**, 751-755.
60. Margaret M (2015) Chapter 23 - Blood and blood product transfusions in horses. *In: Equine Fluid Therapy*. pp. 299-311.
61. McConnico RS (2015) Chapter 68 - Acute Colitis in Horses. *In: Robinson's Current*

Therapy in Equine Medicine (Seventh Edition). Sprayberry KA & Robinson NE (eds). W.B. Saunders, St. Louis. pp. 297-301.

62. Medina-Torres CE, Weese JS, Staempfli HR (2011) Prevalence of *Clostridium difficile* in horses. *Veterinary Microbiology* **152**, 212-215.

63. Minami K, Sakaguchi Y, Yoshida D et al. (2016) Successful treatments with polymyxin B hemoperfusion and recombinant human thrombomodulin for fulminant *Clostridium difficile*-associated colitis with septic shock and disseminated intravascular coagulation: a case report. *Surgical Case Reports* **2**, 76.

64. Monreal L (2007) Hypercoagulation and DIC in horses: clinical findings, diagnosis and treatment. *Proc. 25th Congress ACVIM*.

65. Monreal L, Anglés A, Espada Y et al. (2000) Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. *Equine Veterinary Journal Supplement*, 19-25.

66. Monreal L, Villatoro AJ, Monreal M et al. (1995) Comparison of the effects of low-molecular-weight and unfractionated heparin in horses. *American Journal of Veterinary Research* **56**, 1281-1285.

67. Moore BR, Hinchcliff KW (1994) Heparin: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Use in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **8**, 26-35.

68. Moore JN, Vandenplas ML (2014) Is it the systemic inflammatory response syndrome or endotoxemia in horses with colic? *The Veterinary clinics of North America Equine practice* **30**, 337-351, vii-viii.

69. Morris DD (1991) Endotoxemia in Horses: A Review of Cellular and Humoral Mediators Involved in its Pathogenesis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **5**, 167-181.

70. Morris DD, Beech J (1983) Disseminated intravascular coagulation in six horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **183**, 1067-1072.
71. Mueller MM, Bomke B, Seifried E (2002) Fresh frozen plasma in patients with disseminated intravascular coagulation or in patients with liver diseases. *Thrombosis Research* **107**, S9-S17.
72. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1991) Collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays, 3rd edn., Villanova.
73. Nemoto M, Nagai M, Tsunemitsu H et al. (2015) Whole-genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s and 2009-2010. *Archives of Virology* **160**, 1171-1179.
74. Nemoto M, Oue Y, Morita Y et al. (2014) Experimental inoculation of equine coronavirus into Japanese draft horses. *Archives of Virology* **159**, 3329-3334.
75. Niwa H, Kato H, Hobo S et al. (2013) Postoperative *Clostridium difficile* infection with PCR ribotype 078 strain identified at necropsy in five Thoroughbred racehorses. *Veterinary Record* **173**, 607.
76. Oelschläger C, Römisch J, Staubitz A et al. (2002) Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood* **99**, 4015-4020.
77. Ossiprandi MC, Buttrini M, Bottarelli E et al. (2010) Preliminary molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates from healthy horses in northern Italy. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **33**, e25-29.
78. Padalino B, Raidal SL, Hall E et al. (2016) Survey of horse transportation in

Australia: issues and practices. *Australian Veterinary Journal* **94**, 349-357.

79. Parry BW, Anderson GA, Gay CC (1983) Prognosis in equine colic: a study of individual variables used in case assessment. *Equine Veterinary Journal* **15**, 337-344.

80. Pusterla N, Gebhart C (2013) Lawsonia intracellularis infection and proliferative enteropathy in foals. *Veterinary Microbiology* **167**, 34-41.

81. Raisbeck MF, Holt GR, Osweiler GD (1981) Lincomycin-associated colitis in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **179**, 362-363.

82. Rodriguez C, Bouchafa L, Soumillion K et al. (2019) Seasonality of *Clostridium difficile* in the natural environment. *Transboundary and Emerging diseases* **66**, 2440-2449.

83. Rooney JR, Bryans JT, Doll ER (1963) Colitis "X" of horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **142**, 510-511.

84. Roy M-F, Kwong GPS, Lambert J et al. (2017) Prognostic value and development of a scoring system in horses with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **31**, 582-592.

85. Ruby R, Magdesian KG, Kass PH (2009) Comparison of clinical, microbiologic, and clinicopathologic findings in horses positive and negative for *Clostridium difficile* infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **234**, 777-784.

86. Sakamoto Y, Inoue S, Iwamura T et al. (2013) Studies on therapeutic effects and pathological features of an antithrombin preparation in septic disseminated intravascular coagulation patients. *Yonsei Medical Journal* **54**, 686-689.

87. Schoster A, Arroyo LG, Staempfli HR et al. (2012) Presence and molecular characterization of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in intestinal

compartments of healthy horses. *BMC Veterinary Research* **8**, 94.

88. Senior JM, Proudman CJ, Leuwer M et al. (2011) Plasma endotoxin in horses presented to an equine referral hospital: Correlation to selected clinical parameters and outcomes. *Equine Veterinary Journal* **43**, 585-591.

89. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M et al. (2000) Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters* **186**, 307-312.

90. Takahashi H, Wada K, Niwano H et al. (1992) Comparison of prothrombin fragment 1 + 2 with thrombin-antithrombin III complex in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood coagulation & fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* **3**, 813-818.

91. Tanaka T, Tsujinaka T, Kambayashi J et al. (1989) Sepsis model with reproducible manifestations of multiple organ failure (MOF) and disseminated intravascular coagulation (DIC). *Thrombosis Research* **54**, 53-61.

92. Taylor FB, Jr., Toh CH, Hoots WK et al. (2001) Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis and Haemostasis* **86**, 1327-1330.

93. Topper MJ, Prasse KW (1996) Use of enzyme-linked immunosorbent assay to measure thrombin-antithrombin III complexes in horses with colic. *American Journal of Veterinary Research* **57**, 456-462.

94. Vandenplas ML, Moore JN, Barton MH et al. (2005) Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. *American Journal of Veterinary Research* **66**, 1509-1516.

95. Wada H, Gabazza EC, Asakura H et al. (2003) Comparison of diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation (DIC): diagnostic criteria of the International Society of Thrombosis and Hemostasis and of the Japanese Ministry of Health and Welfare for overt DIC. *American Journal of Hematology* **74**, 17-22.
96. Ward MP, Alinovi CA, Couetil LL et al. (2005) Evaluation of a PCR to detect Salmonella in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **17**, 118-123.
97. Warren BL, Eid A, Singer P et al. (2001) High-dose antithrombin III in severe sepsis a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association* **286**, 1869-1878.
98. Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF (2000) Isolation of environmental *Clostridium difficile* from a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **12**, 449-452.
99. Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF (2001) A prospective study of the roles of clostridium difficile and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhoea. *Equine Veterinary Journal* **33**, 403-409.
100. Weese JS, Toxopeus L, Arroyo L (2006) *Clostridium difficile* associated diarrhoea in horses within the community: predictors, clinical presentation and outcome. *Equine Veterinary Journal* **38**, 185-188.
101. Welch RD, Watkins JP, Taylor TS et al. (1992) Disseminated intravascular coagulation associated with colic in 23 horses (1984-1989). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **6**, 29-35.
102. Westerman TL, Foster CM, Tornquist SJ et al. (2016) Evaluation of serum amyloid

A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with colic. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **248**, 935-940.

103. Wiedermann CJ, Kaneider NC (2006) A systematic review of antithrombin concentrate use in patients with disseminated intravascular coagulation of severe sepsis. *Blood coagulation & fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* **17**, 521-526.

104. Wilson EM, Holcombe SJ, Lamar A et al. (2009) Incidence of transfusion reactions and retention of procoagulant and anticoagulant factor activities in equine plasma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **23**, 323-328.

105. Wilson, I. and Gamble M. (2002) The hematoxylin and eosin. *In: Theory and Practice of Histological Techniques* (Bancroft J. D. and Gamble M. eds.), Churchill Livingstone, Philadelphia. pp. 125-138.

106. Yaxley PE, Beal MW, Jutkowitz LA et al. (2010) Comparative stability of canine and feline hemostatic proteins in freeze-thaw-cycled fresh frozen plasma. *Journal of Veterinary Emergency and Critical care* **20**, 472-478.

107. 日本中央競馬会馬事部 (2018) 競走馬保健衛生年報 日本中央競馬会 : 1-24

108. 岩城あづさら (1986) 解凍時の温度の FFP に及ぼす影響について 日赤薬剤師会誌 **54**: 66-73.

109. 上村 八尋ら (1987) 基礎と臨床 **21**, 13, 5241

110. 中川雅夫 (1999) 本邦における播種性血管内凝固(DIC)の発症頻度・原因疾患に関する調査報告. 厚生省特定疾患血液系疾患調査研究班血液凝固異常症分科会, 平成 10 年度研究業績報告書. 57-64

111. 日本血栓止血学会学術標準化委員会 DIC 部会 (2009) 科学的根拠に基づいた感染症

に伴う DIC 治療のエキスパートコンセンサス. *日本血栓止血学会誌* **20**: 77-113, 2009.

謝 辭

本稿を終えるにあたり、本研究の取りまとめに対する貴重な御助言ならびに本論文の御高閲を頂いた山口大学教授 度会 雅久 博士に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文の作成にあたり終始御懇篤なご指導を賜り、御高閲を頂いた日本中央競馬会 競走馬総合研究所 丹羽 秀和 博士に心から感謝の意を表します。さらに、本論文をご審査頂いた鹿児島大学教授 帆保 誠二 博士，山口大学准教授 清水 隆 博士，鹿児島大学教授 中馬 猛久 博士に深謝いたします。

本研究の遂行を支援していただいた，日本中央競馬会栗東および美浦トレーニング・センター競走馬診療所ならびに馬事部の皆様に心から深謝いたします。特に，本研究の構想について臨床的および病態生理学的な視座から多大なるアドバイスをいただいた黒田 泰輔 博士，村中 雅則 博士には，心からの尊敬の意を表します。また，新たな検査法や治療法の導入をサポートいただいた加藤 智弘 獣医師，額田 紀雄 獣医師，微生物学的・病理組織学的所見についてご教示いただいた上野 孝範 博士，越智 章仁 博士をはじめとする微生物研究室の皆様，血漿輸液の実施にあたって御協力を頂いた村瀬 晴崇 博士，新崎 裕太 獣医師に心から深謝申し上げます。さらに，臨床家としての視点で新たな科学的知見を取りまとめ発信する姿勢をお示しいただいた溝部 文彬 博士，和久野 愛 博士，ともに腸炎の治療に取り組み，臨床現場において数多くの有用な御助言を頂いた前 尚見 獣医師，大塚 佑 獣医師，浦山 俊太郎 獣医師，山本 匠 獣医師に感謝の意を表します。

最後に，英語論文執筆のサポートをはじめ，多方面から本研究の遂行を応援してくれた，妻である村木 泰子 獣医師に心から感謝と尊敬の意を表します。