

学 位 論 文 要 旨

氏名 岩永 朋子

題 目 : Clinical Utility of Novel Thrombogenicity Examination Using Whole Blood: Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS) in Dogs
(犬における全血での新規血栓形成能評価装置の臨床利用 : 全血血栓形成分析システム (T-TAS) の検討)

論文要旨 :

Blood coagulation tests cannot reflect *in vivo* coagulation status in one system, including platelet function, fibrin clot formation, and whole blood flow. Thus, the development for a new technique that can evaluate the blood coagulation more similar to *in vivo* situation is emerging in the clinical situation. Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS) can evaluate blood coagulation ability more resemble *in vivo* situation because the principle of T-TAS reflects on Virchow's triad. In my thesis, I evaluated the potential of the T-TAS in veterinary medicine.

In Chapter 1, I investigated the utility of the newly developed diagnostic instrument, T-TAS, for clinically healthy dogs. The T-TAS, which is a microfluidic assay that simulates conditions *in vivo*, measures whole blood flow at defined shear rates under conditions designed to assess platelet function (PL-chip) or coagulation and fibrin clot formation (AR-chip). The T-TAS records occlusion start time (OST), occlusion time (OT), and area under the curve (AUC). The CV of the AUC of both chips was good (CVs of 6.45% [PL] and 1.57% [AR]). The T-TAS can adapt to the evaluation of canine blood coagulation as similar to human medicine.

In Chapter 2, I evaluated the effect of antiplatelet and anticoagulant drugs in dogs by using the T-TAS. In human medicine, T-TAS has assessed the effect of antiplatelet and anticoagulant drugs yet. I also investigated the effect of anticoagulation drugs; *in vivo* of acetylsalicylic acid and *in vitro* of low-molecular-weight heparin. I compared pre- and post-dose parameter values by 2-tailed paired *t*-tests using an alpha of 0.05. The inhibition of platelet function by acetylsalicylic acid was evident in the right-shift in the PL test pressure curve. The right-shift in the AR test pressure curves showed that the administration of low-molecular-weight heparin inhibited both platelets and the coagulation cascade. It is possible that the T-TAS may be useful in the evaluation of canine blood coagulation and can assess the effect of these drugs in dogs.

In Chapter 3, I finally assessed canine hemostasis patients with the T-TAS.

Hemorrhagic diseases are common in dogs. Current coagulation assays do not represent all aspects of in vivo hemostasis and may not predict bleeding risk. I evaluated the T-TAS in dogs with hereditary bleeding disorders and with acquired hemorrhagic syndromes (Group 1), and healthy controls (Group 2). Hereditary defects included von Willebrand disease (n=4), hemophilia A (n=2), and canine Scott syndrome (n=2). Acquired hemorrhagic disorders included neoplastic hemoperitoneum (n=2) and acute hemorrhagic diarrhea syndrome (n=1). I also procedure coagulation screening tests, fibrinogen analyses, D-dimer concentration, antithrombin activity, von Willebrand Factor antigen, PFA-100 closure time, and thromboelastography. Correlations between continuous variables were evaluated by Spearman's rank. Continuous variables were compared between groups by Student's t-test or the Mann-Whitney U test. Alpha was set at 0.05. In combined analyses of all dogs, significant correlations were identified between T-TAS variables, between the PFA-CT and PL-chip parameters, and between TEG variables and AR-chip parameters. The prothrombin time correlated with the AR-chip AUC at both shear rates. In Group 1 dogs, the AR-chip AUC at low shear was significantly reduced compared with Group 2 dogs. Distinct patterns of aberrant thrombus formation were seen in video images recorded from dogs with von Willebrand disease and hemophilia A. The T-TAS AR-chip analysis distinguished dogs with bleeding risk compared to healthy controls. Initial evaluations of the T-TAS suggest it may aid characterization of hemostasis in patients at-risk of bleeding and assist with delineating bleeding phenotypes.

In conclusion, the T-TAS can evaluate blood coagulation in dogs, the T-TAS may be added to existing blood coagulation tests to be able to know more detail of blood coagulation status from now on.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	岩永 朋子
審 査 委 員	主 査：鹿児島大学 教授 三浦 直樹
	副 査：鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副 査：鹿児島大学 教授 白石 光也
	副 査：山口大学 准教授 馬場 健司
	副 査：鹿児島大学 准教授 高橋 雅
題 目	Clinical Utility of Novel Thrombogenicity Examination Using Whole Blood: Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS) in Dogs (犬における全血での新規血栓形成能評価装置の臨床利用：全血血栓形成分析システム(T-TAS)の検討)
審査結果の要旨： 近年、獣医医療においても、血液凝固異常に関連する報告は増加しており、様々な疾患に関連することが知られている。一般に普及している血液凝固検査では、血小板機能、フィブリン塊形成、全血流など、生体内の凝固状態を1つのシステムで反映することは難しく、臨床現場では、より生体内の状況に近い血液凝固を評価できる新しい技術の開発が必要である。Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS)は、Virchow の3兆候に基づいて設計された装置で、血流負荷の存在下での検査であり、より生体に近い形で血液凝固能を評価することができる。本研究では、獣医療における T-TAS の可能性に着目して、健常な動物への応用性 (第1章)、薬剤の効果の判定性 (第2章)、さらに、血液凝固異常を示す臨床例での応用性 (第3章) に分けて、解析した。 本学位論文の研究は、以下の3章より構成される。 【第1章】これまでに獣医臨床では使用されていなかった装置である T-TAS を用いて、臨床的に健康な犬に対する有用性を調査した。T-TAS は、生体内の血管障害部位を模擬したマイクロ流体アッセイである。血小板機能 (PL-chip) や血小板機能+凝固能 (AR-chip) を評価するように設計された2種類の専用チップ (chip) を使用し、全血を利用して、血栓形成能を測定した。T-TAS のデータとしては、流路の閉塞開始時間 (OST)、流路閉塞時間 (OT)、曲線下面積 (AUC) を記録した。両チップの AUC の CV は良好であり (CV は 6.45%[PL] および 1.57%[AR])、再現性は高く、各個体の血液凝固能を評価できることを証明した。本研究では、T-TAS が人医療と同様に犬の血液凝固の評価に適応できることが示された。	

【第 2 章】次に T-TAS の実臨床応用を考慮した薬効評価に利用できるかを目的として研究を行った。研究では、犬の抗血小板薬（アセチルサリチル酸）と抗凝固薬（低分子ヘパリン）の効果を T-TAS で評価した。各薬剤の投与前と投与後の測定値を、T 検定 ($p < 0.05$) で比較した。アセチルサリチル酸による血小板機能の阻害は、血小板機能を反映する PL-chip による測定で、圧曲線が右シフトすることで、効果判定が可能であった。一方で、低分子ヘパリンは、血小板と凝固能を同時に反映する AR-chip で圧曲線の右シフトとして観察され、薬剤による凝固阻害が確認できた。この結果は、T-TAS は犬の血液凝固関連薬剤の評価にも有用であることを示している。本研究成果は、将来的に、犬におけるこれらの薬剤効果の評価が可能となり、さらに、他の薬剤への応用性も期待できることを示すものである。

【第 3 章】犬の止血異常患者を T-TAS で評価した。最後の研究として、血流負荷を考慮する T-TAS が、他の検査と比較してどのような特徴を持っているかを確認することを目的に研究を行った。遺伝性出血性疾患および後天性出血性症候群の犬（グループ 1）と健常犬（グループ 2）を T-TAS で評価した。遺伝性疾患には、von Willebrand 病 ($n=4$)、血友病 A ($n=2$)、犬のスコット症候群 ($n=2$) が含まれている。後天性出血性疾患としては、腫瘍性血腹症 ($n=2$)、急性出血性下痢症候群 ($n=1$) を含んでいる。T-TAS 以外の検査と項目として、凝固スクリーニング検査、フィブリノゲン分析、D ダイマー濃度、アンチトロンビン活性、von Willebrand 因子抗原、PFA-100 装置の閉鎖時間、トロンボエラストグラフィなどと比較評価した。相関関係は Spearman の順位で、群間の比較は Student's t-test または Mann-Whitney U test で比較した ($p < 0.05$)。試験に供したすべての犬を対象とした解析では、T-TAS での各測定項目、PFA-CT と PL-chip の測定項目、TEG 変数と AR-chip の測定項目の間に有意な相関関係が認められた。プロトロンビン時間は、AR-chip の AUC と相関していた。グループ 1 の犬では、グループ 2 の犬に比べて、低流速時の AR-chip の AUC が有意に低下していた。T-TAS では測定中のマイクロ流路の画像解析が可能であるが、von Willebrand 病や血友病 A の犬の画像では、異常な血栓形成の疾患特異的なパターンが見られた。T-TAS の AR-chip 分析では、臨床的に健康な犬と比較して、出血リスクのある犬を区別することができた。本研究の結果では、T-TAS では、出血のリスクがある動物の止血能力の特徴を明らかにすることが示され、画像解析では出血の原因となる疾患の表現型を明確にするのに役立つと考えられた。本研究成果は、T-TAS が臨床上問題となる疾患に対して、応用可能であることを示しており、さらに、症例の種類と数を蓄積することで、今後は既存の血液凝固検査に T-TAS を加えることで、より詳細な血液凝固状態を知ることができるようになることを示したと考えられる。

これら一連の研究は、適正な手法で実験が行われており、客観性のある科学的なデータが多く集積されていた。得られたデータは統計学的手法を用いて正しく解析されており、結果の意味するところも最新の文献を多数引用しながら適切に考察されていた。本研究の成果は獣医臨床領域の血液凝固学の病態解明と臨床検査法として大いに役立つと期待される。以上により、本論文は博士（獣医学）の学位に十分に値すると判断された。