

イヌとネコにおける脳血管障害のケースコントロール研究
およびバイオマーカー測定の基礎的検討

山口大学大学院連合獣医学研究科

小澤 剛

2022年3月

略語表

ACD (acid citrate dextrose) : クエン酸 デキストロース

AnnexinV-FITC (annexinV fluorescein isothiocyanate) : FITC 標

識 アネキシン V

Calcein-AM (calcein tetraacetoxymethyl ester) : アセトキシメチルエステ

ル化カルセイン

CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) : カルボキシフルオレセイン

スクシンイミジルエステル

CSF (cerebrospinal fluid) : 脳脊髄液

CVD (cerebrovascular disorder) : 脳血管障害

EVs (extracellular vesicles) : 細胞外小胞

FCM (flow cytometry) : フローサイトメトリー

FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery)

FSC (forward scatter) : 前方散乱

Gd- (gadolinium contrast) : ガドリニウム造影

KyotoAR: KyotoAR 獣医神経病センター

MPs (microparticles) : マイクロパーティクル

MRI (magnetic resonance image) : 磁気共鳴画像

PFP (platelet-free plasma)

PRP (platelet-rich plasma)

PS (phosphatidylserine) : ホスファチジルセリン

SSC (side scatter) : 側方散乱

T1WI (T1 weighted image) : T1 強調画像

T2WI (T2 weighted image) : T2 強調画像

目次

序論	1
第 1 章 イヌおよびネコの脳血管障害におけるケースコントロール研究	4
1 要約	5
2 緒言	7
3 材料と方法	10
3-1 材料	10
3-1-1 対象動物の選抜方法	10
3-1-2 許可	11
3-2 方法	11
3-2-1 診療記録簿調査	11
3-2-2 臨床症状	12
3-2-3 MRI 診断	12
3-2-4 梗塞血管	14

3-2-5	脳脊髄液検査	15
3-2-6	予後調査	15
3-2-7	統計	16
4	結果	18
4-1	症例数	18
4-2	イヌ CVD 症例の解析	18
4-2-1	品種	18
4-2-2	発症月	19
4-2-3	体重と梗塞のタイプ(ラクナ梗塞 vs 領域梗塞)	20
4-2-4	年齢	20
4-2-5	臨床症状	21
4-2-6	痙攣	22
4-2-7	梗塞部位	22
4-2-8	脳脊髄液検査	23
4-2-9	CVD の併発疾患	24
4-2-10	予後調査	24

4-3	ネコ CVD 症例の解析	25
4-3-1	発症月	26
4-3-2	年齢	26
4-3-3	臨床症状	26
4-3-4	梗塞部位	27
4-3-5	脳脊髄液検査	27
4-3-6	CVD の併発疾患	27
4-3-7	予後調査	27
5	考察	29
5-1	イヌ CVD 症例における考察	29
5-1-1	CVD 発症月	29
5-1-2	一過性脳虚血	29
5-1-3	CVD 発症時の痙攣	30
5-1-4	梗塞血管	31
5-1-5	脳脊髄液検査所見	31
5-1-6	CVD 発症時の痙攣と予後の関連	32

5-1-7	CVD の予後	32
5-1-8	併発疾患	33
5-2	ネコ CVD 症例における考察	33
6	小括	35
7	図表	36
第 2 章 フローサイトメトリーによるイヌ血中マイクロパーティクル測定の基礎的検討		
	討	51
1	要約	52
2	緒言	54
3	材料と方法	58
3-1	材料	58
3-2	方法	58
3-2-1	承認	58
3-2-2	Platelet-rich plasma (PRP) の作製	58
3-2-3	Platelet-free plasma (PFP) の作製	59

3-2-4	MPs の蛍光染色	59
3-2-5	ネガティブコントロールの作製	60
3-2-6	フローサイトメリーの設定と測定方法	60
3-2-7	統計	61
4	結果	62
4-1	SSC/FSC プロットにおける MP 領域の決定	62
4-2	PRP と PFP における SSC/FSC プロットの比較	62
4-3	MP 数と陽性染色 MP 数の比較	62
4-4	各染色試薬に対する陽性率の比較	63
4-5	ACD 処理 PFP における蛍光強度の変動係数	64
4-6	各抗血液凝固薬における MP 絶対数の比較	64
5	考察	66
5-1	抗血液凝固剤が MP 数に与える影響	66
5-2	ヒトとイヌの MP 絶対数の比較	67
5-3	各 MP 染色試薬に対する陽性率の比較	68
6	小括	71

7 図表	72
参考文献	78
総括	91
謝辞	92

序論

脳血管障害（CVD）とは、梗塞や出血により一時的もしくは恒久的に障害を受けた脳の部位があり、病学的プロセスにより脳の正常な機能が損なわれるすべての障害を指す^{1,11,13,14,22,23,28,32,40,41}。重篤なCVDは致死的であり、2019年における日本人の死因の第4位である²⁹。さらに日常生活に多大な支障をきたす後遺症をもたらすことから、人医療では循環器病対策推進計画など国家的施策が実施されている。しかし、獣医領域ではイヌやネコにおけるCVDの存在は認識はされつつあるも、その事例についての報告は多くない。そのためCVDの臨床徴候は獣医領域において十分に認知されておらず、その診断、治療、予防手段は未だ明確ではない。獣医領域における限られたCVDの臨床研究^{13,14,23,28,31}では、症例がCVDであることを十分に担保するため症例選択の際に厳格な診断条件がクライテリアとして用いられており、一次診療で遭遇する脳梗塞が疑われる症例における症状と必ずしも一致しないことがある。また、それらの臨床研究は海外における症例報告であり、国内でのCVD症例の特徴を必ずしも反映していない可能性がある。したがって、イヌおよびネコ

における CVD の診断、治療、予防手段を明確にするためには、国内の CVD 症例を使ったケースコントロール研究を実施することにより、その臨床的特徴を明らかにする必要がある。

CVD の学術的なケースコントロール研究には、画像検査や電気生理学的検査などの実施が、診断クライテリアを満たすために必要である。CVD の診断には全身麻酔を必要とすることから、獣医療ではすべての CVD 症例に行われる検査ではない。この事が、診断クライテリアを充足することを困難とし、結果として CVD のケースコントロール研究が進められない理由でもある。それを解消する一助として、一次診療施設で CVD の発症をより簡便に検出可能な血中バイオマーカーの開発が望まれている。人医療では脳組織の傷害と関連し血液中で検出できるバイオマーカーとして、マイクロパーティクル^{3,21,24,27,30}、IL-6、TNF、S100B⁴⁴ など多くの検討がなされている。その中でマイクロパーティクルは、その数の増加だけでなく膜表面の抗原や内包するタンパクや核酸等の特異性からその起源を知り病態を反映することが示唆されている。しかし、獣医学領域におけるマイクロパーティクルの測定方法は確立されていない。

そこで本研究では、第 1 章にて国内の小動物臨床における CVD の現状を

明らかにすることを目的として、イヌおよびネコの CVD 症例におけるケースコントロール研究を実施した。さらに第 2 章では、CVD のバイオマーカーとして臨床応用可能なマイクロパーティクル測定方法について、イヌとウサギの血液を用いて基礎的検討を行った。

第 1 章

イヌおよびネコの脳血管障害におけるケースコントロール研究

1 要約

本研究の目的は、イヌとネコにおいて脳梗塞が疑われた症例の臨床徴候の特徴を明らかにすることである。一つの施設で記録、保管されている医療記録簿を基に、2009年から2016年の期間に脳血管障害に罹患したイヌとネコを研究対象として調査を行った。脳血管障害の診断は、急性発症、臨床徴候、磁気共鳴画像（MRI）診断所見を基に実施し、脳血管障害群における病歴、臨床徴候、併発疾患、梗塞部位、脳脊髄液検査所見、発症月、予後を調査した。また、調査期間中に来院したイヌの症例で脳血管障害を持たない頭部疾患の症例群をコントロール群として解析を行った。

上記期間中に来院した症例 5,312 頭の中から、122 頭が脳血管障害の症例として抽出された。その中で、本研究で設定した対象選択クライテリアと合致するイヌ 66 頭（1.2%）、ネコ 9 頭（0.2%）の症例を、本研究におけるケースコントロール研究で解析した。イヌの前脳梗塞は 66 例中 51 例で、その中での 24 例（47.1%）に CVD 発症時の痙攣が臨床症状として認められた。脳血管障害の季節性を検討するため発症月を解析した結果、脳血管障害と診断されたイ

ヌの数は、8月（59例中9例）と12月（59例中13例）で有意に高かった。イ

ヌの予後調査では、55例中の11例で悪化が認められた。

CVD発症時の痙攣はイヌの脳血管障害において重要な臨床徴候であると示された。また、国内においてイヌにおける脳血管障害の発症には季節変動があることが明らかとなった。本研究において明らかとなった臨床徴候は海外における報告事例と異なるものが示されたことから、国内における脳血管障害症例についてより詳細な調査が必要であると考えられた。

2 緒言

脳血管障害（CVD）の診断において磁気共鳴画像（MRI）診断は有用な手法^{11,13,14,18,28,31,32,41}であるが、確定診断には不十分である。また、CVDは発症から時間経過とともに改善することが多いことや脳生検が困難であることから、確定診断のために病理組織学的検査が実施されることは少ない。したがって、これまでに報告されたCVDの症例では、CVDであることの診断をより確実にするため、多くの診断クライテリアを課した上で限定された症例群によってその特徴が論じられてきた^{13,14,23,28,31}。

上述の多くの診断クライテリアとして、たとえば Garosi ら（2005 年、2006 年）^{13,14} は、以下のように脳梗塞の診断クライテリアを定義した。

- ・急性発症
- ・24 時間を超えての非進行性の臨床症状
- ・脳症状
- ・脳梗塞時の脳脊髄液検査所見と矛盾がない（高タンパク、軽度な細胞数増多、キサントクロミー、出血もしくは正常）

一方、McConnellら(2005年)²⁸は、多発性脳障害を示唆する神経学的異常は除外するクライテリアを策定している。しかしCVDではその発症から24時間以上の症状の進行^{26,32,41,42}や複数の障害³⁴を示す臨床徴候が認められる可能性があると報告されている。さらに、脳脊髄液検査結果も様々である^{18,26,32}とする報告があり、脳梗塞の臨床症状はこれまで考えられてきたものより多様であることが明らかとなってきた。その結果、既報の診断クライテリアによるCVD症例と一次診療施設でCVDが疑われる症例との間では、その臨床的特徴が異なる可能性が考えられた。例として、これまでの小動物におけるCVDの臨床徴候に関する報告では、痙攣は少ないとの複数の報告がある^{11,13,14,22}。

一方、イヌにおけるCVD症例27例のうち15例(56%)の症例で痙攣が認められたとの報告¹⁷もあり、見解は一致していない。したがって、本研究では一次診療で遭遇しうるCVDの臨床的特徴を明らかにするため、進行性症例、複数障害および脳脊髄液(CSF)異常を除外しないクライテリアにより抽出されたCVD症例群を対象として調査を実施した。

本研究の目的は、国内においてCVDと診断されたイヌおよびネコの症例群について、その臨床的特徴を明らかにすることであり、それにより小動物一次診

療での CVD 発症を早期に推測しかつ適切に診断、治療を行う一助となる。ひ
いては緊急的には臨床診断可能な施設へと移送することを可能となることで、
将来的に期待される CVD 特異的治療を行うための重要な礎となることが期待
できる。

3 材料と方法

3-1 材料

3-1-1 対象動物の選抜方法

二次診療施設である KyotoAR 獣医神経病センター (KyotoAR) において、2009 年 11 月～2016 年 12 月の診療記録簿から CVD と臨床診断されたイヌとネコの症例を抽出した。さらに、病歴の聴取、身体検査、神経学的検査、および MRI 検査のデータが適切に保存されている症例を選択した。

また、脳腫瘍など明らかに CVD とは異なる疾患が併発している場合は、神経学的検査にて CVD が責任病巣と診断された症例のみを抽出した。また長期コルチコステロイドを使用している症例は調査対象から除外した。また、進行性症例、複数障害および CSF 異常を除外しない診断クライテリアにより CVD 症例を抽出した。

本研究における CVD の診断クライテリアを以下に示す。

- ・急性発症

- ・なんらかの脳障害を認める
- ・MRIにて確認される病変がCVDと矛盾がない

なお、症例が以下の項目の症状を示したとしても除外しなかった。

- ・臨床徴候が進行性であることや改善なし
- ・神経学的検査で複数箇所の障害
- ・脳脊髄液（CSF）検査にて異常所見

3-1-2 許可

KyotoAR 受診時に、個人特定できない形での症例情報の学術使用について各動物飼い主から許可を得た症例を使用した。

3-2 方法

3-2-1 診療記録簿調査

品種、性別、年齢、体重、病歴、身体検査所見、神経学的検査所見、MRI検査所見、CVD発症時の併発疾患、臨床症状、梗塞の部位（左右と梗

塞血管)、発症月を調査した。年齢については、若年期(0-1歳)、青年期(2-6歳)、壮年期(7-11歳)、老年期(12歳以上)に分類した。また、体重については、15kg以上を大型犬、15kg未満を小型犬として分類し解析した。

3-2-2 臨床症状

麻痺、運動失調、測定障害は歩様異常として定義した。さらに、痙攣、脳神経異常、斜頸、視覚障害、意識障害、頭位回旋、行動異常を記録した。

KyotoAR 受診以前に認められた一過性の神経学的な臨床症状は、一過性脳虚血発作疑いと定義した。しかしMRI検査で多発性脳梗塞が認められた症例では、その一過性の神経学的異常が一過性脳虚血発作によるものかCVDによるものか判断できないため、一過性脳虚血発作群からは除外した。

3-2-3 MRI 診断

MRI装置は、0.3テスラ永久磁石型オープンタイプMRI(AIRIS Vento;日立メディコ、東京、日本)を使用した。コイルは症例の頭部のサイズに合わせて、人用膝・手首用コイルを使用した。MRI撮像条件を表1-1に示す。加算回数

やスライス厚等は、動物のサイズや麻酔リスク等を勘案し適宜調整した。造影剤は、Meglumine Gadopentetate 371.40 mg/ml (マグネビスト; バイエル薬品株式会社、大阪、日本)を使用し、用量はすべての症例で 0.2 ml/kg にて使用した。投与は用で行い、投与後すぐに撮像開始した。

MRI 所見として、少なくとも横断像における T2 強調画像 (T2WI)、fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) 画像、T1 強調画像 (T1WI)、ガドリニウム造影 T1 強調画像 (Gd-T1WI) が、CVD と診断された犬の医療記録簿から集められた。本研究における CVD は、脳梗塞および出血性梗塞を含み、MRI による脳梗塞および出血性梗塞の診断は、既報^{13,14}と同様に行なった。MRI で確認される CVD の典型的な所見を図 1-1 に示す。

- i. 輪郭がはっきりとした、均一の病変部位により近接した脳実質とはっきりと境界がある
- ii. T2 強調画像 and/or FLAIR 画像では高信号 (出血を疑う所見は除く) を示す
- iii. マスエフェクトはないか、あっても最小である

iv. MRIにて確認される主病変の広がり血管支配域を超えていない(浮腫やマスキング効果は超えて良い)

なお、病変の主座が灰白質か白質かは問わなかった。

3-2-4 梗塞血管

脳血管の支配領域^{14,40}は、解剖学的に個体差がある^{25,38}ことが報告されているが、臨床診断における大きな支障にはならないと判断した。したがってGarosiらの報告¹⁴を基に、椎骨動脈枝(Hillockら2006)²²および多発性脳梗塞(McConnellら2005²⁸, Wessmannら2009⁴¹, Paulら2010³¹, Salgerら2014³⁴)を追加した。MRI画像における梗塞部位から梗塞血管を推測した。梗塞血管の分類は、穿通枝血管(線条体動脈、近位貫通動脈、遠位貫通動脈、尾側貫通動脈および椎骨動脈枝)と脳大血管(前大脳動脈、中大脳動脈、後大脳動脈、前小脳動脈および後小脳動脈)とした。梗塞部位が複数認められる場合には多発性脳梗塞として分類した。また、ラクナ梗塞は穿通枝血管の梗塞(図 1-1 A,B)、領域梗塞は脳大血管の梗塞(図 1-1 C,D)と定義した。

3-2-5 脳脊髄液検査

脳脊髄液は大槽より採取した。脳脊髄液検査では、細胞数、細胞分類、蛋白定量、色調、パンディ、比重、犬ジステンパーウイルス抗体および抗 GFAP 抗体を実施した。脳脊髄液検査の参考値は獣医神経病学会の発表値に準じ、細胞数：0-5 / μ l、蛋白：25 mg/dl 以下、比重：1.004-1.006、細胞診：小単核球優位、色調：無色透明、パンディ：陰性とした。さらに抗犬ジステンパー抗体価（参考値：血清犬ジステンパー抗体価の 1/256 以下）、抗 GFAP 抗体（参考値：陰性）も一部症例で実施された。血液混入が目視で明確な検体に関しては、調査対象から除外した。

3-2-6 予後調査

予後に関しては、ファックスまたは電子メールにて主治医を対象にアンケート調査を実施した。アンケート内容を以下に示す。

- i. KyotoAR 受診後の経過（改善・一時改善したが再発・変化なし・悪化）

ii. 現在の状況（生存・死亡）

iii. 発症時の基礎疾患（有・無）

また、そのアンケートの結果に加えて、KyotoAR への再診があった症例では再診時の病歴聴取や神経学的検査、MRI 再検査結果からも予後の判断を行った。

3-2-7 統計

調査期間中に来院したイヌ・ネコの症例で脳梗塞を持たない頭部疾患の症例（イヌ 2,233 例・ネコ 228 例）をコントロール群とした。年齢分布はフィッシャー正確検定で、平均年齢はスチューデント t 検定でコントロール群と症例群の比較を行なった。大型犬と小型犬における梗塞のタイプの発生率、多発性と単発性の CVD における CSF の異常や蛋白細胞乖離の存在、基礎疾患と予後の関連は、フィッシャー正確検定を使用した。CVD の各月における発生率の比較はロジスティック回帰分析を使用した。CVD の発生率を従属変数として設定し、月を独立変数として設定した。参照基準は 1 年間でもっとも低い発生率の 10

月に設定した。さらに、1年の推定平均発生率の95%信頼区間(CI)から外れた発生率の月を特定し、発生率が高くなる傾向のある月を評価した。フィッシャー正確検定とスチューデント t 検定は、Graph Pad Prism ver. 7 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA) または the R program (R-Project for Statistical Computing, www.r-project.org/) を使用した。ロジスティック回帰分析は、SPSS version 24.0 (IBM Japan, Tokyo, Japan) を使用した。統計的有意差は、 $P < 0.05$ とした。

4 結果

4-1 症例数

調査期間（2009年11月～2016年12月）において KyotoAR に来院した症例は 5,312 例であり、その内 CVD と診断した症例は 122 症例であった。さらに本研究の診断クライテリアおよび抽出条件に合致した調査対象症例は、イヌ 66 例、ネコ 9 例で全症例数のイヌは 1.2%、ネコは 0.2%であった（図 1-2）。

4-2 イヌ CVD 症例の解析

4-2-1 品種

66 症例の品種は、チワワ 8 頭、雑種 7 頭、ラブラドル・レトリバー 5 頭、ミニチュア・ダックスフンド 5 頭、シー・ズー 4 頭、ボストンテリア 3 頭、ミニチュア・シュнауザー 3 頭、パグ 3 頭、シェットランド・シープドッグ 3 頭、ヨークシャー・テリア 3 頭、ビーグル 2 頭、フレンチ・ブルドッグ 2 頭、ゴールデン・レトリバー 2 頭、マルチ

ーズ 2 頭、ポメラニアン 2 頭、トイ・プードル 2 頭、ウェルッシュ・コーギー・ペンブ
ローク 2 頭、バーニーズ・マウンテン・ドッグ 1 頭、ビション・フリーゼ 1 頭、キャバ
リエ・キング・チャールズ・スパニエル 1 頭、ジャック・ラッセル・テリア 1 頭、ミニチ
ュア・ピンシャー 1 頭、パピヨン 1 頭、柴犬 1 頭、ウェスト・ハイランド・ホワイト・テ
リア 1 頭で(図 1-3)、38 頭が雄(内 19 頭が去勢済み)で、28 頭が雌(内 18
頭が避妊済み)であった。すべての症例は、発症後 0~127 日の間で MRI 撮
影を行っていた。

4-2-2 発症月

CVD 発症の季節変動を解析するため、発症月が特定できる 59 症例につ
いて調査を行った。コントロール群では月別の症例数に有意な差は見られなか
った($P=0.85$)。8 月と 12 月の CVD 発生率(それぞれ 4.7%、6.2%)は、1 年
の推定平均発生率(2.6%)の 95%CI(2: 2.0 - 3.4%)よりも高い値を示した。
各月の CVD 発生率に統計的有意差があるかを評価するために、ロジスティッ
ク回帰分析を実施したところ、8 月と 12 月の CVD 発生率は、1 年間でもっと
も発生率の低い 10 月の発生率(0.5%)よりも有意に高い値を示した($P=0.04$ 、

P=0.02) (図 1-4)。

4-2-3 体重と梗塞のタイプ(ラクナ梗塞 vs 領域梗塞)

CVD 症例のうち、大型犬と小型犬の数は、それぞれ 13 頭と 53 頭であった。

CVD 発症時の平均体重は 10.3kg、中央値は 8.0kg、最小値と最大値はそれぞれ 1.7 kg と 44.7kg であった。梗塞のタイプにおける分類では、大型犬ではラクナ梗塞が 7 例 (53.8%)、領域梗塞が 2 例 (15.4%)、ラクナ梗塞と領域梗塞が同時に認められた症例が 4 例 (30.8%)、小型犬ではラクナ梗塞が 9 例 (17.0%)、領域梗塞が 31 例 (58.5%)、両梗塞が 13 例 (24.5%) であった。大型犬と小型犬における梗塞タイプの割合には有意な差が認められ (P<0.01)、大型犬ではラクナ梗塞が多く、小型犬では領域梗塞が多く認められた (表 1-2)。

4-2-4 年齢

コントロール群の年齢は 10 か月齢～18 歳であり、平均は 7 歳 2 か月で中央値は 7 歳であった。CVD 症例群の発症時年齢は 5 歳 0 か月～15 歳 8 か月

であり、平均は 10 歳 7 か月、中央値は 11 歳 0 か月だった。CVD 症例群の年齢区分をコントロール群と比較したところ、その分布に有意な差が認められ (P<0.01)、CVD 症例群ではより高年齢で発症例が多くなる傾向が観察された (表 1-3)。また CVD 症例群の平均年齢 (10.6±0.4 歳) は、コントロール群の平均年齢 (7.2±0.1 歳) より有意に高かった (P<0.01)。

4-2-5 臨床症状

CVD 症例群 (66 症例) における臨床症状として、歩様異常 (53 症例, 80.3%) がもっとも多く、それに続き、CVD 発症時の痙攣 (26 症例, 39.4%)、捻転斜頸と視覚異常を除く脳神経異常 (17 症例, 25.8%)、捻転斜頸 (17 症例, 25.8%)、視覚異常 (13 症例, 19.7%)、旋回運動 (10 症例, 15.2%)、意識障害 (10 症例, 15.2%)、行動異常 (8 症例, 12.1%)、頭位回旋 (6 症例, 9.1%) が認められた (図 1-5)。様々な症状が CVD 症例群では認められ、CVD による特異的な症状は明確には観察されなかった。また、飼い主の稟告から、KyotoAR 受診以前に一過性脳虚血発作が疑われる症例が 4 例認められた。発症より 24 時間を超えて症状が進行した症例が、66 例中 12 例に認められた。

その内の 9 例は、対症療法のみで症状に改善がみられた。残りの 3 例の経過は、悪性腫瘍による播種性血管内凝固を発症し死亡（1 症例）、麻酔後覚醒せず死亡（1 症例）および不明（1 症例）であった。

4-2-6 痙攣

前脳での梗塞が認められた症例は 66 例中 51 例であり、その内 24 例（47.1%）で臨床症状として痙攣が認められた（表 1-4）。前脳以外で梗塞が認められた症例も含め痙攣を示した症例 26 例では、24 時間を超えて進行した症例が 4 例、CSF で異常を認めた症例が 6 例認められた。また 1 症例では進行性の臨床症状と CSF の異常が同時に認められた。

4-2-7 梗塞部位

MRI 画像における梗塞部位から推測された梗塞血管を表 1-5 に示している。梗塞病変は 105 か所で認められた。多発性脳梗塞は 25 例に認められた。また、ラクナ梗塞（40 例）より領域梗塞（65 例）の方が多く認められた。

4-2-8 脳脊髄液検査

CVD 症例（66 症例）のうち 36 症例で CSF を採取し、脳脊髄液検査を実施した。その結果は細胞数（最小値-最大値：1-109 / μ l、中央値：4.0 / μ l）、蛋白（最小値-最大値：8-136 mg/dl、中央値：21.5 mg/dl）、比重（最小値-最大値：1.006-1.008）であり、異常所見の認められた症例数は 24 例であった。その内訳は、細胞数上昇 7 例、好中球優位 6 例、蛋白の上昇 15 例、比重の上昇 8 例、キサントクロミー 1 例、パンディ陽性 13 例、抗 GFAP 抗体陽性 1 例であった（図 1-6）。抗 GFAP 抗体は 2 症例で測定し、陽性の症例はパグであった。CSF 検査を実施した CVD 症例（36 症例）のうち、単発脳梗塞は 18 例、多発性脳梗塞は 18 例であった。単発脳梗塞症例と多発性脳梗塞症例を比較したところ、多発性脳梗塞（18 例中 16 例）では単発の CVD（18 例中 9 例）よりも CSF 異常が有意に多く認められた（ $P=0.03$ ）。さらに蛋白細胞乖離も単発の CVD（18 例中 2 例）に比べ多発性脳梗塞（18 例中 9 例）で有意に多く認められた（ $P=0.03$ ）。細胞数上昇が認められた 7 例の内 5 例で経過を調査することができ、5 例とも輸液や抗てんかん薬による対症療法のみで改善が認められた。犬ジステンパーウイルス抗体は 21 例で測定したが、すべて陰性だった。

4-2-9 CVD の併発疾患

CVD の原因となり得る基礎疾患として心疾患、腎障害、甲状腺機能低下症、副腎皮質機能亢進症、悪性腫瘍、糖尿病および低アルブミン血症が重複症例を含めて 40 例観察された。CVD 症例（66 症例）中で 30 症例に基礎疾患の併発が認められた。基礎疾患は多いものから順に、心疾患（15 例）、腎障害（7 例）、甲状腺機能低下症（5 例）、副腎皮質機能亢進症（4 例）、悪性腫瘍（3 例）、糖尿病（3 例）、低アルブミン血症（3 例）であった（図 1-7）。
血圧測定や血液凝固に関する記録データは保存されていなかった。

4-2-10 予後調査

予後調査のできた症例数は、55 症例（アンケート有効回答数 50 例、MRI 再検査 5 例）であった。予後の観察期間は CVD 診断後 2 ヶ月～7 年であった。そのうち改善が 29 例、一時改善したが再発が 11 例、変化なしが 4 例、悪化が 11 例で見られた。悪化した症例の判断理由としては、痙攣発作頻度の増加が 6 例、MRI 検査時における麻酔からの覚醒不良による死亡または安楽死

した症例が 2 例、CVD 診断後から基礎疾患が悪化し死亡した症例が 1 例、アンケートでは悪化の回答があったが理由が不明なものが 2 例だった。

CVD の原因となり得る基礎疾患（心疾患、腎障害、甲状腺機能低下症、副腎皮質機能亢進症、悪性腫瘍、糖尿病および低アルブミン血症）と予後との関連を解析した。調査結果において改善と判断されたものを「予後良好」と分類し、再発、不変、悪化と判断されたものを「予後不良」として分類した。基礎疾患を併発する群（26 症例）で予後良好は 14 例（53.8%）、予後不良は 12 例（46.2%）であった。基礎疾患を併発していない群（29 例）で予後良好は 15 例（51.7%）、予後不良は 14 例（48.2%）であった。基礎疾患の有無と予後との関連について、統計学的有意差は認められなかった。

また、予後と痙攣（ $P=0.28$ ）、進行性の有無（ $P=0.67$ ）、多発性脳梗塞（ $P=0.10$ ）、CSF 異常（ $P=0.70$ ）、発症時年齢（ $P=0.61$ ）、梗塞部位（左右）（ $P=0.46$ ）、ラクナ梗塞/領域梗塞（ $P=0.41$ ）との関連をそれぞれ解析したが、統計学的に有意な関連は認められなかった。

4-3 ネコ CVD 症例の解析

4-3-1 発症月

ネコにおける CVD 発症の季節変動を解析した。すべての症例（9 症例）で発症月が特定でき、5-8 月中に 8 例が認められ、12 月にも 1 例が認められた（図 1-8）。コントロール群（228 症例）において、各月の平均来院症例数は 19.0 ± 1.1 症例で、最小値は 11 症例（4 月）、最大値は 25 症例（1 月）であった。

4-3-2 年齢

コントロール群（224 症例）の平均年齢は、7 歳 2 カ月、中央値は 8 歳 2 カ月だった。CVD 群（9 症例）の平均年齢は、10 歳 1 カ月、中央値は 10 歳 10 カ月だった。

4-3-3 臨床症状

歩様異常 7 例、痙攣 1 例、脳神経異常 6 例、捻転斜頸 7 例、視覚障害 4 例、旋回運動 4 例、意識障害 3 例、行動異常 0 例、頭位回旋 3 例だった。

4-3-4 梗塞部位

梗塞部位はのべ 11 か所認められ、前大脳動脈 1 例、後大脳動脈 2 例、後小脳動脈 4 例、線条体動脈 1 例、近位貫通動脈 1 例、遠位貫通動脈 1 例、尾側貫通動脈 1 例で、多発性脳梗塞は 2 例に認められた。ラクナ梗塞は 4 例、領域梗塞は 7 例であった。

4-3-5 脳脊髄液検査

脳脊髄液採取したのは 3 例で、1 例に蛋白細胞乖離が認められ、それは多発性脳梗塞症例だった。

4-3-6 CVD の併発疾患

併発疾患を認めたのは 1 例であり、甲状腺機能亢進症だった。

4-3-7 予後調査

全 9 症例で予後調査が実施され、予後良好が 6 例（改善が 6 例）、予後不良が 3 例（一時改善したが再発が 2 例、変化なしが 1 例）だった。

5 考察

5-1 イヌ CVD 症例における考察

5-1-1 CVD の発症月

イヌにおける CVD の発症を月別で比較することで、8 月と 12 月に高い頻度で CVD が発生していることが明らかとなった。本研究からは、イヌの CVD における月別変動の理由を明確にすることは困難であるが、同様の傾向が日本でのヒトにおける CVD 発症月分布においても観察されている。この日本人における CVD 月分布については、国内の気候に関連した季節性変化が発症に関与している可能性が報告されている^{36,37}。一般的に、国内のイヌはヒトに近い生活環境および同じ気候の元で飼育されていることから、イヌで認められた CVD 発症の季節性変化は、ヒトの報告と同様に気温の変化を含めた季節的変動が原因となっている可能性が考えられる。

5-1-2 一過性脳虚血

CVD 発症例（66 例）のうち、飼い主からの稟告で一過性脳虚血発作が疑われる事例が 4 症例に認められた。重度の CVD を発症する前に一過性脳虚血発作の発生がすでにイヌで報告されている^{14,22,28,41}。一過性脳虚血発作は一時的な脳虚血や軽度な CVD により生じるのかもしれない。人医療において重度の CVD に先行して一過性脳虚血発作がしばしば認められる²²。獣医領域においても、一過性脳虚血発作の発生が重度の CVD 発症を推測する重要な臨床的徴候になりうるのかどうか、さらなる研究が必要である。

5-1-3 CVD 発症時の痙攣

CVD 発症例（66 例）のうち、痙攣は 26 症例（39.4%）認められた。本研究において、CVD 発症時の痙攣は国内でのイヌにおける CVD 発症時の重要な臨床徴候であることが示唆された。いくつかの報告において、痙攣は CVD の臨床徴候としてはまれであると示されてきた^{11,13,14,22}。本研究と既報との間で認められた痙攣を示す CVD 症例における差異は、これまでの診断クライテリアにより除外されていた発症後 24 時間以上の症状の進行を示す症例や CSF の異常所見がある症例を本研究では調査対象として組み込んだという違いが要因とな

っていると考えられる。

5-1-4 梗塞血管

イヌの CVD で、梗塞がもっとも頻繁に発生した動脈は中大脳動脈であった。中大脳動脈は脳血管の中でもっとも広範囲に脳灌流を担っている血管であり、そのため中大脳動脈における梗塞が多く観察されたものと考えられる。また本研究では、既報^{1,14,31}よりも多くの多発性脳梗塞（66 症例中 25 症例）が認められた。その理由として、本研究における CVD の診断クライテリアとして CSF 異常や多発性神経学的異常を示す症例を除外せず対象症例群に含んだことにより、より多様な CVD 症例が含まれていることが一因であると考えられる。

5-1-5 脳脊髄液検査所見

CVD 症例における CSF 所見は、本研究においてさまざまな結果が示された。CSF の異常は脳炎などの脳疾患においても観察されることから、CSF 検査結果のみで脳炎と CVD を区別することは困難である。したがって、CVD を脳炎から区別するためには、臨床徴候、典型的な MRI 所見、経過などから総合的に診

断する必要がある。本研究では、蛋白細胞乖離は単発脳梗塞に比較して多発性脳梗塞において有意に多く認められることが明らかとなった。このことから繰り返し脳梗塞が生じている際に、蛋白細胞乖離が見られることを示唆している。

5-1-6 CVD 発症時の痙攣と予後の関連

ヒトの CVD 症例では、CVD 発症時の痙攣と予後の悪化が関連する可能性があると報告されている^{4,17}。しかし、本研究では CVD 発症時における痙攣の有無と予後との間に明らかな関連は認められなかった。このことから、発症時における痙攣の有無にかかわらず、積極的な治療介入を行うことにより、回復が期待できると考えられる。

5-1-7 CVD の予後

予後調査を行った 55 症例のうち、改善が 29 例、一時改善したが再発が 11 例あったことから、CVD を発症したイヌでは、短期的には比較的良い予後を得た。しかし本研究における予後調査期間は 2 か月～7 年と限られたものであり、またすべての患者で一定期間にすることができなかった。したがって、長期予後

を十分に評価するには不十分であり、さらに調査を実施する必要があると考えられた。

5-1-8 併発疾患

既報^{13,14,17,41}ではイヌ CVD における基礎疾患の併発が予後を悪化させることが報告されているが、本研究では基礎疾患の有無と予後との間に関連は認められなかった。また、本研究における基礎疾患の発生率は 55 例中 26 例であり既報¹³と比較し低かった。診察時のルーチンとして血圧測定や血液凝固検査は実施されていないこと、またアンケートにより併発疾患を診断した1次診療の獣医師から予後調査が行われたことから、併発疾患を診断するための検査が同一ではなかったことが予想され、ある一定数の併発疾患が診断されなかった可能性がある。併発疾患の関連調査のために、Systematic prospective study がなされるべきである。

5-2 ネコ CVD 症例における考察

症例数が 9 例であったため、統計的検討は実施しなかった。しかし CVD 発症月は、5～8 月に多く認められ、また 12 月にも 1 症例が認められ、イヌと同様の季節変動が観察された。また、発症平均年齢も 10 歳 1 ヶ月で、より高年齢での発症を反映しているものと考えられた。一方、発症時の痙攣を示した症例は 1 例のみであった。これは梗塞血管においてもっとも頻発したのが後小脳梗塞であったことと関連していると考えられ、脳幹症状が多くみられたことがネコの特徴である可能性がある。ネコにおける CVD の特徴をより詳細に捉えるためには、より多くの症例を対象とした検討が必要であると考えられた。

6 小括

本研究では、これまでのイヌ CVD 症例研究では除外されていた進行する臨床徴候、多発性神経学的徴候、CSF 異常を呈する CVD 症例を調査対象に含むことで、既報の研究とは異なるイヌ CVD の臨床徴候に関する新しい知見を示した。本研究により、CVD 発症時の痙攣はイヌ CVD の重要な臨床徴候であること、また国内における CVD の症例数は季節により変動することが明らかとなった。一方、ネコの CVD では、イヌとは異なる調査結果も認められ、今後もさらなる検討が必要である。本研究によって明らかとなった CVD の臨床的特徴は、1 次獣医療での CVD 診断において重要な知見であると考えられる。

7 図表

表 1-1 MRI 撮像時における各シーケンスの条件

Sequence	T2WI	FLAIR	T1WI/ Gd-T1WI
Generic sequence name	FSE	FLAIR	SE
Plane of acquisition	AX Cor Sagi	AX	AX Cor Sagi
2D vs. 3D acquisition	2D	2D	2D
TE	100	100	15
TR	4000/4500	9000/11000	380/400
TI	0	2000	0
Flip Angle	90	90	90
NEX	2-8	2-5	4-8
Slice thickness	3-4	3-4	3-4
interslice gap	0.5-1	0.5-1	0.5-1
FOV	160-180	160-180	160-180
matrix	256/112-178	256/112-178	256/112-178

TE (echo time) : エコー時間、TR (repetition time) : 繰り返し時間、
 TI (inversion time) : 反転時間、NEX (number of excitations) : 繰
 り返し時間、FOV (field of view) : 視野範囲。TR、FOV、NEX、Slice
 thickness、interslice gap、FOV、matrix は、動物サイズや麻酔リスク等を勘
 案し、各症例ごとに調整した。

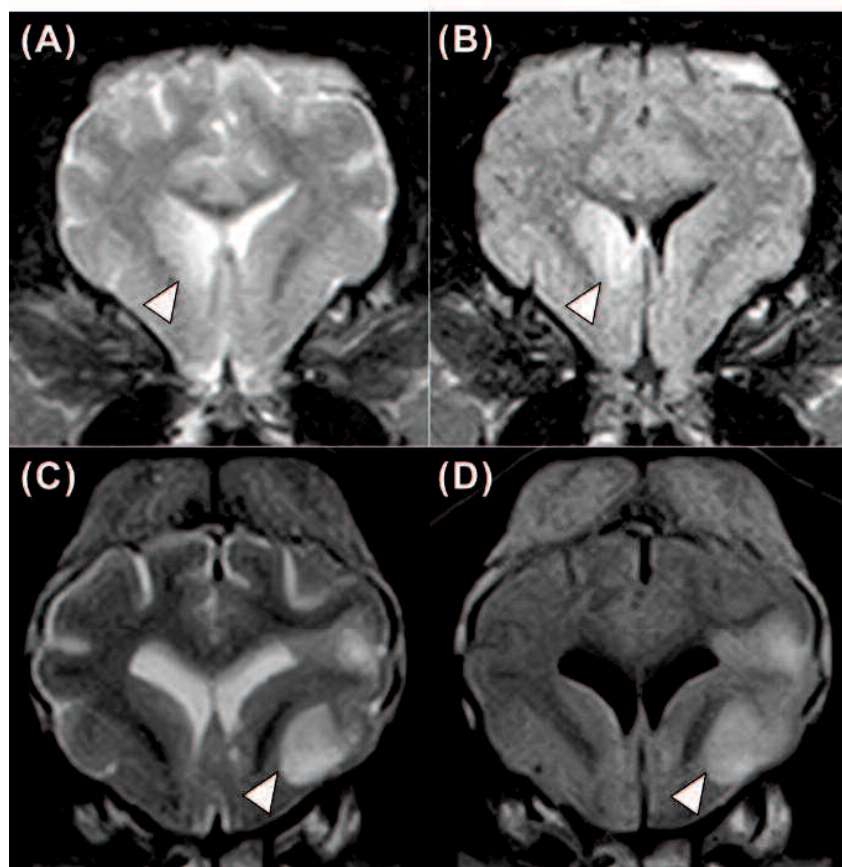


図 1-1 イヌにおける脳梗塞の典型的 MRI 画像

脳梗塞を発症したイヌにおける MRI 画像の代表例を示す。A と C: T2 強調画像、B と D: FLAIR 画像、A と B: ラクナ梗塞、C と D: 領域梗塞。以下に示す CVD における典型的な所見が認められる。

- i. 輪郭がはっきりとした、均一の病変部位により近接した脳実質とはっきりと境界がある
- ii. T2 強調画像 and/or FLAIR 画像では高信号（出血を疑う所見は除

く)を示す

iii. マスエフェクトはないか、あっても最小である

iv. MRI にて確認される主病変の広がり血管支配域を超えていない(浮腫やマスエフェクトは超えて良い)

また、MRI 画像における梗塞部位から梗塞血管を推測し、ラクナ梗塞は穿通枝血管の梗塞、領域梗塞は脳大血管の梗塞と定義した。

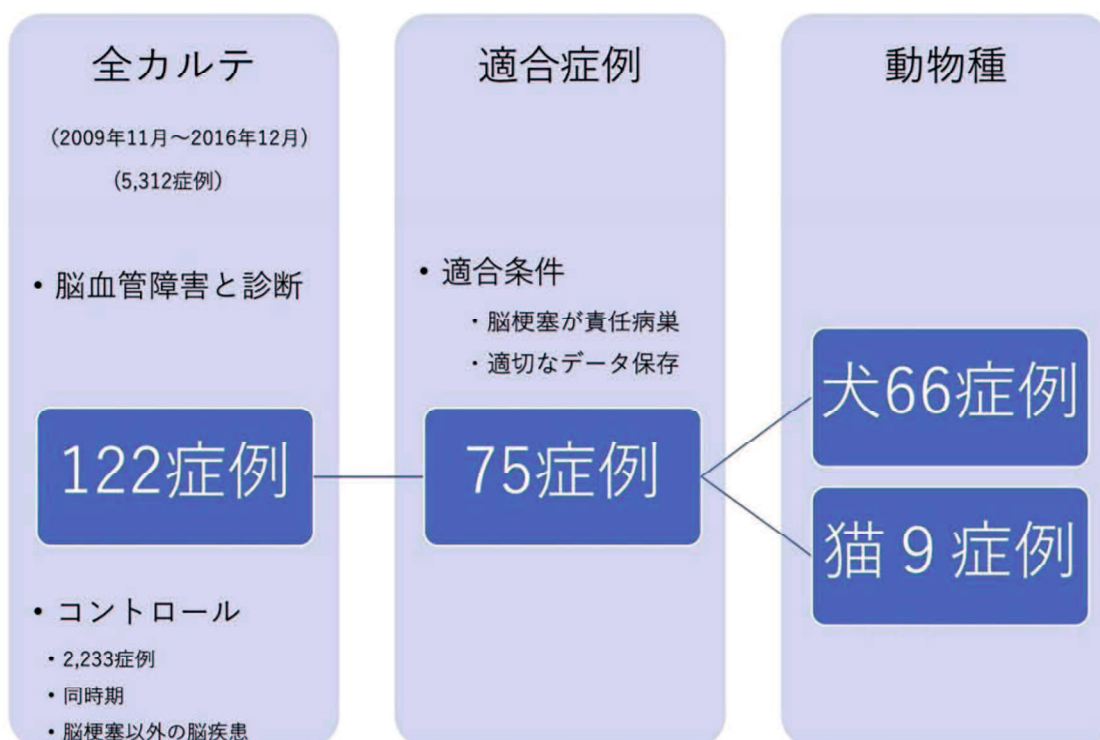


図 1-2 研究対象症例抽出カスケード

全カルテ（5,312 症例）の内 122 症例が脳血管障害と診断され、その内 75 症例（イヌ 66、ネコ 9 症例）が本研究の診断クライテリアに合致した。

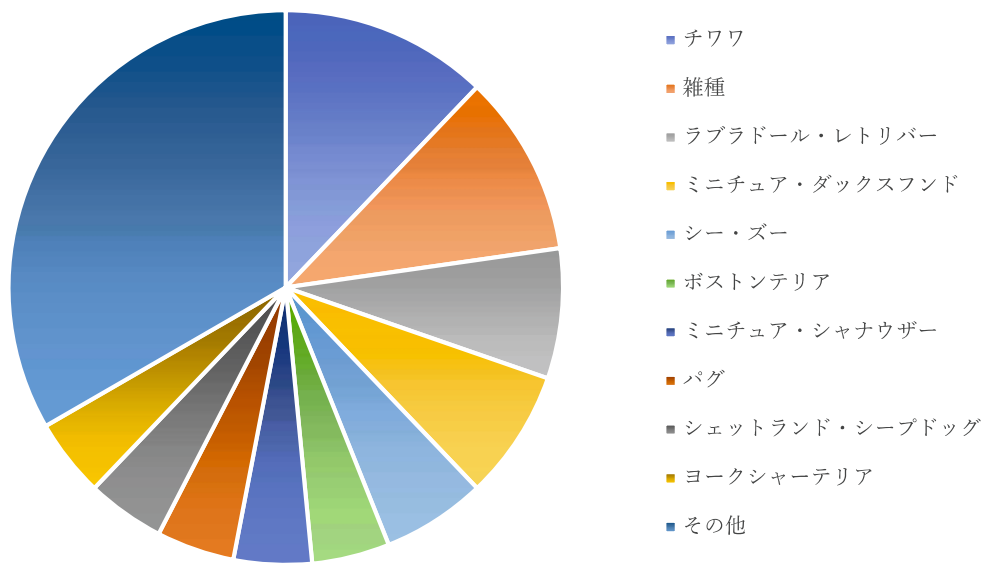


図 1-3 イヌの CVD 症例における品種の割合

イヌの CVD 症例 (66 症例) について品種で分類し、その割合を示す。国

内で飼育されている品種が幅広く認められ、特定品種へ偏りは認められなかつた。

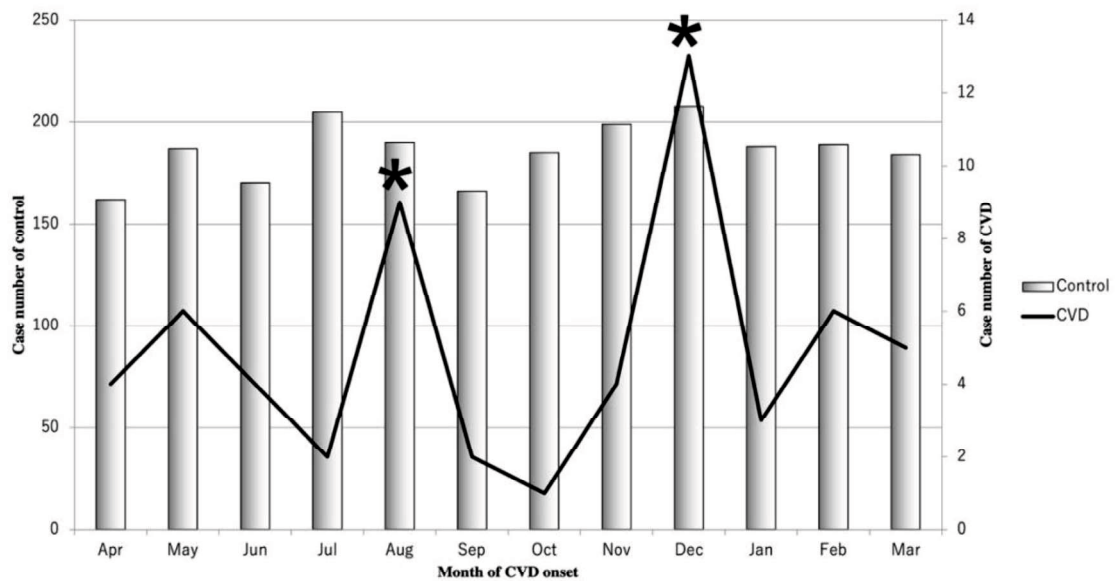


図 1-4 コントロール群の来院月およびイヌ CVD 症例の CVD 発症月

イヌ CVD 症例 (59 症例) における、発症月を示す。コントロール群 (2,233 症例) では年間を通じて各月の来院数に顕著な差は認められないが、イヌの CVD 群では 8 月と 12 月の発症が多く認められた。10 月の CVD 発症率を参照基準とした場合、8 月と 12 月の発症率は有意に高かった (* $P < 0.05$)。

表 1-2 大型犬と小型犬における梗塞タイプの比較

	ラクナ梗塞	領域梗塞	ラクナ／領域梗塞
大型犬	7	2	4
小型犬	9	31	13

CVD 症例 (66 例) について体重に従い大型犬 (15 kg 以上) と小型犬 (15 kg 未満) に分類し、梗塞タイプを比較した。大型犬と小型犬における梗塞タイプの割合には有意な差が認められ ($P < 0.01$)、大型犬にはラクナ梗塞が多く、小型犬には領域梗塞が多く認められた。

表 1-3 コントロールとイヌ CVD 66 症例の年齢の比較

	若年期	青年期	壮年期	老年期
コントロール	208	768	852	429
CVD 症例	0	7	28	31

コントロール(2,257 症例)および CVD 症例(66 症例)を年齢に従い若年期(0-1 歳)、青年期(2-6 歳)、壮年期(7-11 歳)、老年期(12 歳以上)に分類し、表にはそれぞれの症例数を示す。コントロール群と CVD 症例間に有意な分布の差が認められ($P < 0.01$)、CVD 症例群ではより高年齢で発症例が多くなる傾向が観察された。また、CVD 症例では、若年期の発症は認められなかった。

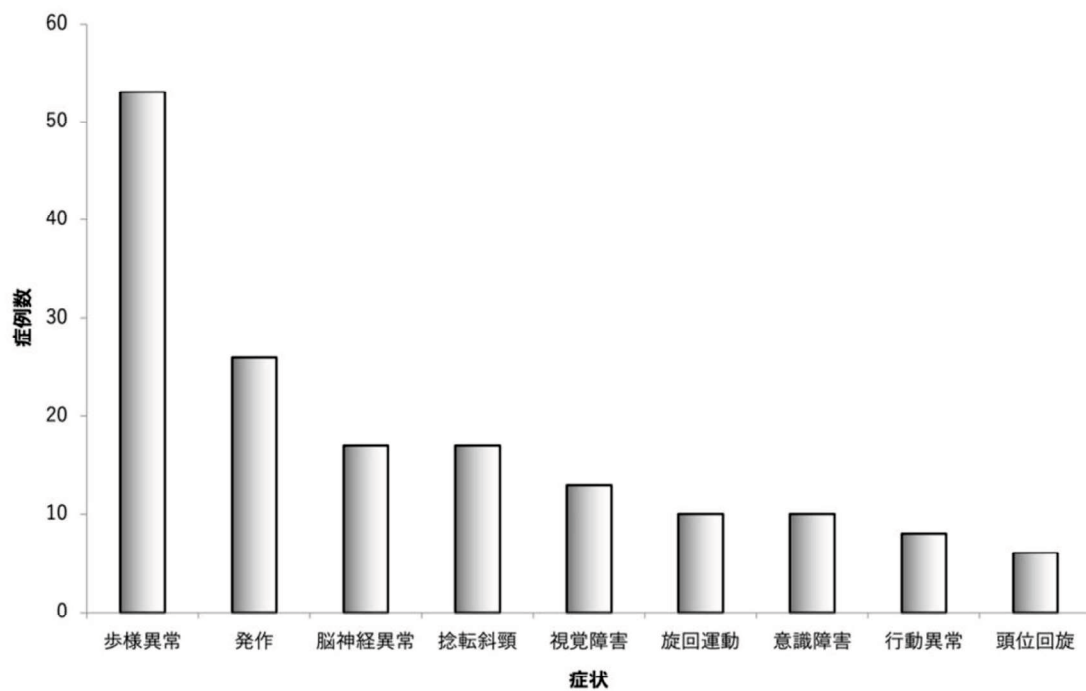


図 1-5 イヌ CVD 症例における発症時の臨床症状

CVD 症例（66 症例）において、発症時に認められた臨床症状を示す。歩様異常がもっとも多く認められ、次いで CVD 発症時の痙攣が多く認められた。

表 1-4 イヌ CVD 発症時の痙攣と梗塞部位

	痙攣あり	痙攣なし
前脳	24	27
前脳以外	2	13

CVD 症例（66 症例）では、前脳を梗塞部位とする症例（51 症例）が多く認められ、その中での 24 症例（47.1%）に CVD 発症時の痙攣が臨床症状として認められた。

表 1-5 イヌの梗塞血管および多発性脳梗塞

梗塞部位		例数
多発性脳梗塞		25
穿通枝血管 (ラクナ梗塞)	線条体動脈	12
	近位貫通動脈	15
	遠位貫通動脈	6
	尾側貫通動脈	6
	椎骨動脈枝	1
脳大血管 (領域梗塞)	前大脳動脈	9
	中大脳動脈	26
	後大脳動脈	9
	前小脳動脈	16
	後小脳動脈	5

CVD 症例 (66 症例) について、梗塞部位を MRI 画像から判定し分類した。中大脳動脈における梗塞がもっとも多く認められ、多発性脳梗塞は 25 症

例であった。

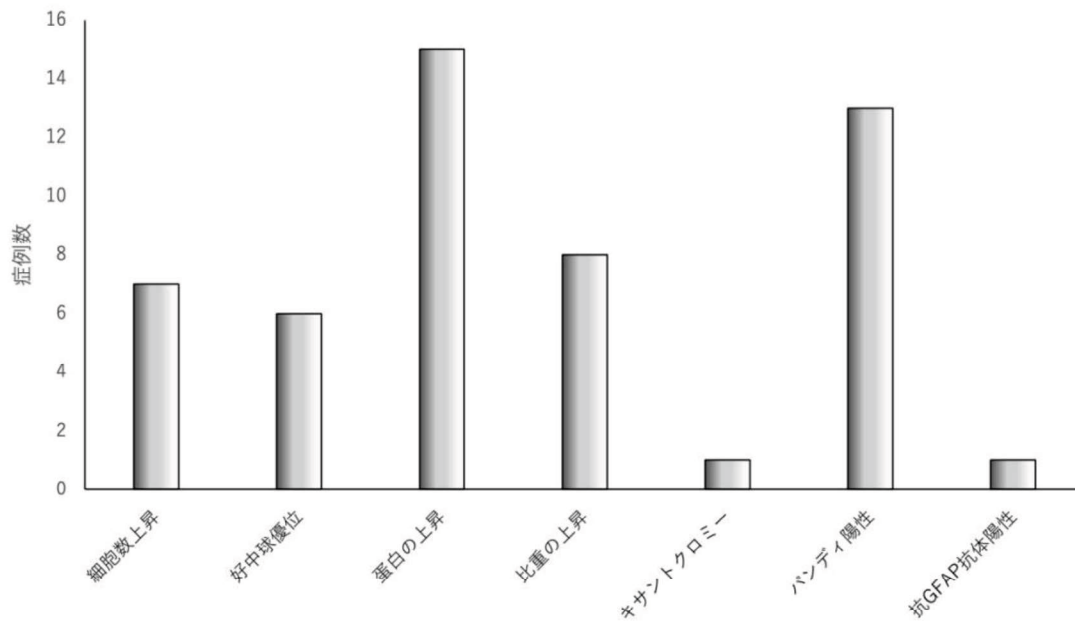


図 1-6 CVD 症例における脳脊髄液検査の異常

脳脊髄液を採取したイヌ CVD 症例（36 症例）で認められた脳脊髄液検査の異常を示す。異常所見は 24 症例で認められたが一定した傾向は認められず、脳炎の脳脊髄液検査所見との区別は困難であった。

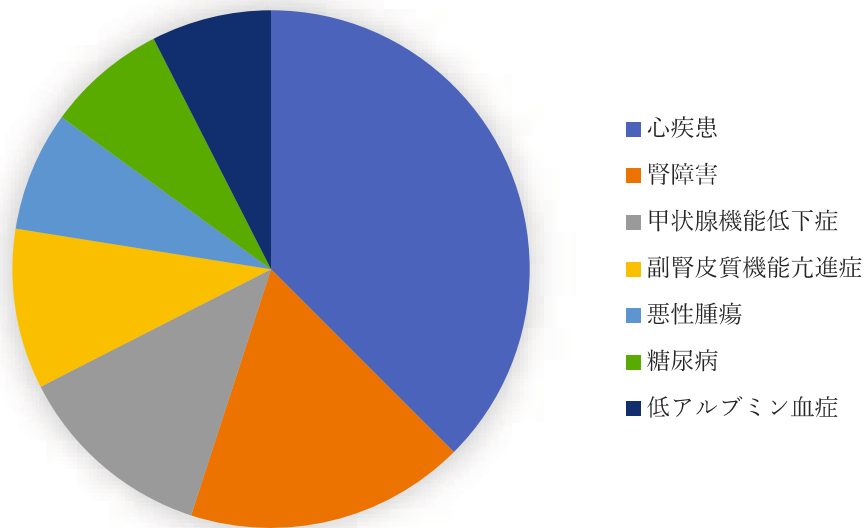


図 1-7 併発疾患を認めたイヌ CVD 症例における各疾患の割合

イヌ CVD 66 症例の内、30 症例において併発疾患が認められた。図は、認められた併発疾患とその割合を示している。心疾患がもっとも多く、次いで腎障害が認められた。高齢のイヌで認められることが多い疾患が多くを占めた。

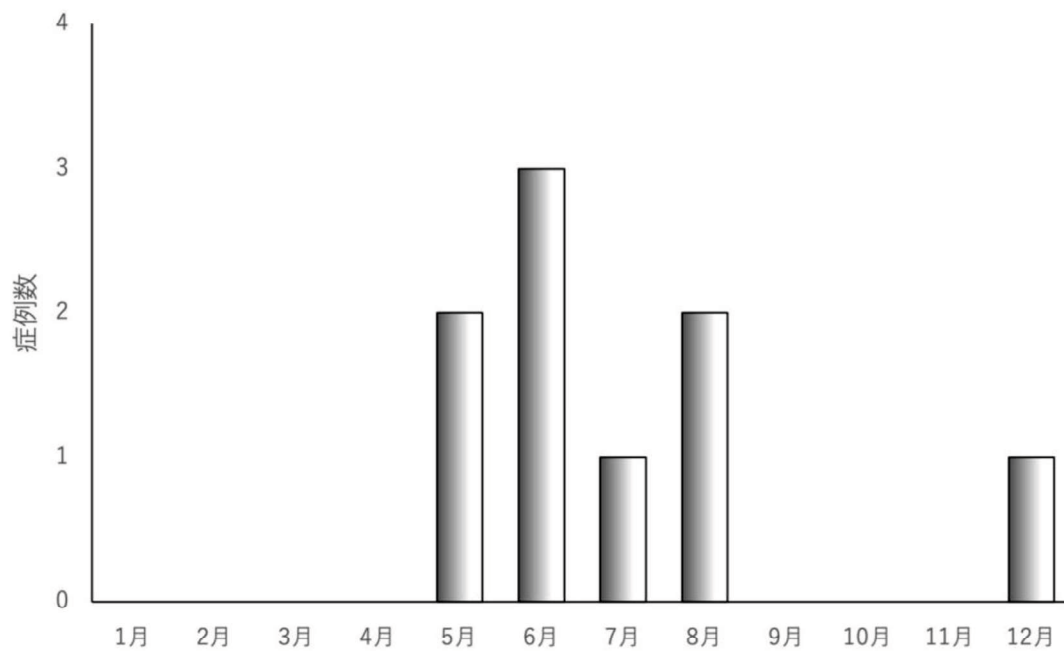


図 1-8 ネコ CVD 症例での CVD 発症月

ネコ CVD 症例（9 症例）における、CVD 発症月を示す。ネコ CVD は、5 月から 8 月に多く発症しており、12 月にも 1 症例の発症を認めた。

第 2 章

フローサイトメトリーによるイヌ血中マイクロパーティクル測定 of

基礎的検討

1 要約

マイクロパーティクル (MPs) は、細胞膜の一部から出芽し細胞から体液中に放出される膜小胞であり、様々な生理学的役割を果たしているほか、脳卒中などの疾患バイオマーカーとしても注目されている。しかし、フローサイトメトリーによるイヌ血中 MPs の測定方法については、いまだ標準化されていない。そこで本研究では、フローサイトメトリーを用いたイヌ血中 MP の測定において、抗血液凝固剤および MP 染色試薬が与える影響について基礎的な検討を行った。

Platelet-free plasma (PFP) 作製時には、抗血液凝固剤としてクエン酸デキストロース (ACD) とヘパリンを使用し、その影響を比較検討した。さらに、MP 染色試薬として annexinV、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)、calcein tetraacetoxymethyl ester (calcein-AM) を使用し、フローサイトメトリーによる MP 検出における各染色試薬の特徴について解析した。ACD またはヘパリン処理イヌ血液から作製した PFP において、フローサイトメトリーによる MPs の測定が可能であった。しかし、ヘパリン処理血液の中ではアーチファクトにより増加した MPs が含まれている可能性が考えられ、ACD による抗血液凝固がより適切

であることが示唆された。また、annexinV および calcein-AM を MP 染色試薬として用いた場合イヌ MP の陽性率は低く、CFSE 使用した際にもっとも高い MP 陽性率が観察された。

2 緒言

細胞外小胞 (extracellular vesicles: EVs) はさまざまな細胞から血液などを含む体液中に分泌、放出される膜小胞の総称である。EVsはその起源となる細胞に依存したタンパク質や RNA などの生理活性分子を内包し、それを別の細胞や組織に輸送することにより細胞間コミュニケーションを担っている。EVsによる細胞間コミュニケーションは生理学的のみならず病態生理学的にも重要な役割を果たしていると考えられており、近年注目を集めている。

EVsはその発生機序や大きさにより分類され、一般的に次のように定義されている。エクソソームは 20 nm-100 nm ほどの大きさをもつ膜小胞であり、多胞性エンドソーム (multivesicular body) で形成されたのちに細胞外へ分泌される^{2,7,24,39,43}。マイクロパーティクル (microparticles: MPs) は 200 nm-1000 nm の大きさを持ち、細胞膜の一部から出芽し細胞から放出される膜小胞である。MPs は、細胞の活性化、アポトーシス、細胞傷害などの様々な生理学的および病理学的条件下において放出されることが知られている^{2,7,20,24,39,43}。アポトー

シス小体と呼ばれる EVs は 1000 nm より大きな EVs 中で最大の小胞であり、アポトーシスした細胞の断片化により放出される^{2,7,20,24,39,43}。

MPs は、その起源となる細胞を構成する膜タンパク質や脂質、細胞質内の物質を保持しており、さまざまな生理学的な役割を担っていると考えられている。例として、MPs の膜表面に表出しているホスファチジルセリン (PS) は血液凝固カスケードを促進し^{3,10,20,21,39}、また補体活性化に寄与することで免疫調整に関与する^{3,20,21}。さらに MPs は、腫瘍における血管新生の促進、腫瘍細胞への P-糖タンパク質の輸送を介する薬剤耐性の発現、自己免疫疾患における炎症反応への関与など病態生理学的な役割も演じている³。さらに、ヒトの脳梗塞を含む脳卒中において、血液中に認められる血小板または血管内皮細胞由来の MPs が増加すること²⁴が知られており、MPs による血液凝固活性の促進と脳梗塞の発症が関連すること^{3,15,20,27,43}が示唆されていることから、MPs が脳卒中の有用なバイオマーカーとなる可能性が注目を集めている。

小動物臨床においてイヌの脳梗塞はしばしば発生するものの、その発生率や病態、臨床徴候、予後など、いまだ不明な点が多く残されている⁶。その理由として、人医療、獣医療ともに脳梗塞の診断には磁気共鳴画像 (MRI) 検査が

有効であり広く利用されているが、小動物医療における MRI 検査では全身麻酔が必要なため脳梗塞の臨床診断における大きな制限となっていることが挙げられる。そのため、従来の MRI 検査に加え、イヌ脳梗塞の診断に有用でより簡便な血中バイオマーカーを開発することが望まれている。

フローサイトメトリー (FCM) は、ヒトの MP 測定においてもっとも一般的に使用されている方法である。しかし、イヌ MPs の検出において特異的なマーカーとなるタンパク質の研究は乏しく、FCM によるイヌ MP の測定方法もいまだ確立されていない。そこで本研究では、FCM を用いたイヌ血中 MP 測定法を開発するため、抗血液凝固剤および MP 染色試薬が MP 測定に与える影響とその特徴について基礎的な検討を行った。MP 測定に供試するイヌ platelet-free plasma (PFP) の作製には、クエン酸デキストロース溶液 (ACD) またはヘパリンを抗血液凝固剤とした血液を用い、MP 測定への影響を比較検討した。また、ヒト MP の測定では MP 特異的マーカーに対する抗体が MP 検出に使用されているが、イヌにおける MP 特異的マーカーおよびマーカー特異的抗体に関する情報は不十分である。そこで、イヌ MP の検出では抗体を用いない手法として、annexin V、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) 、 calcein

tetraacetoxymethyl ester (calcein-AM) を MP の由来となる細胞を問わない

包括的 MP 染色試薬として使用し、その特性を解析した。

3 材料と方法

3-1 材料

ビーグル犬および日本白色種ウサギの血液は、ACD が採血量の 1/10 量、またはヘパリン（ニプロ株式会社；大阪、日本）の最終濃度が 1.7 単位/ml となるよう混合した。

3-2 方法

3-2-1 承認

実験プロトコールは、鹿児島大学動物実験指針に従い実施し、動物実験委員会の承認を得た（承認番号：VN20001）。

3-2-2 Platelet-rich plasma (PRP) の作製

ACD またはヘパリンで抗凝固処理した血液を、遠心時間：10～20 分、遠心

力：400～700 g、温度：20℃の条件で遠心（KUBOTA 2800；久保田商事株式会社、東京、日本）した。遠心後、沈降した赤血球および白血球を採集しないように注意しながら上清（PRP）を採集した。PRPは、自動血球計算機（Sysmex pocH-100iV；シスメックス株式会社、神戸、日本）にて赤血球や白血球が含まれていないことを確認した。赤血球および白血球の混入が認められた場合は、PRPを上記条件で再度遠心し、赤血球と白血球を除去した。

3-2-3 Platelet-free plasma (PFP) の作製

PRPを、2000 g、20分、室温の条件で遠心分離（KUBOTA2000）し、その上清をPFPとして採取した。自動血球計算機を使い、採取したPFPに血小板が存在しないことを確認した。

3-2-4 MPs の蛍光染色

PFP中のMPは、annexin V-FITC（Annexin Assay Kit；株式会社医学生物学研究所、東京、日本）、CFSE、calcein-AM（株式会社同仁化学研究所、熊本、日本）を用い、取扱説明書または既報に従い染色した^{12,16}。また、

CFSE と calcein-AM は、それぞれ 40 μ M、10 μ M の最終濃度となるよう調整した。

3-2-5 ネガティブコントロールの作製

Annexin V-FITC のネガティブコントロールは、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む PFP を使用して作製した。CFSE、calcein-AM のネガティブコントロール作製では、それらの染色試薬に代わり溶媒である dimethyl sulfoxide を使用した。

3-2-6 フローサイトメリーの設定と測定方法

FCM による MP の測定には、BD FACSVerge (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) を使用した。Forward scatter (FSC) -A、side scatter (SSC) -A の voltage と gating の設定を最適化するために、0.35、1.0、3.0 μ m のコントロールビーズ (Polysciences Asia Pacific Inc.、台北、台湾) を使用した。FSC と SSC の閾値は、本機の最小値である 200 とした。MP の測定は、計測されたイベント数が 10,000 となるまで継続した。SSC/FSC プロット上の MP 領域におけ

るイベント数を、全 MP 数として計測した。また、MP 領域でのイベントについて SSC/蛍光プロットにて陽性を示したイベントを MP 染色試薬による陽性染色 MP 数とした。MP 絶対数の測定では、蛍光標識された 3.0 μm コントロールビーズを 10^6 beads/ml 含む 100 倍希釈された PFP を使用した。コントロールビーズが 10,000 イベント (PFP の 1 μl 相当量) 計測されるまで測定を行った。

3-2-7 統計

スチューデント t 検定を 2 群間の比較に使用した。多群間の比較では、ボンフェローニ補正した有意水準を使用した。統計学的有意は $P < 0.05$ とした。値は平均 \pm 標準誤差で表した。

4 結果

4-1 SSC/FSC プロットにおける MP 領域の決定

MP 領域の設定のため、コントロールビーズ (0.35、1.0、3.0 μm) を使用した。

MP は、1.0 μm より小さい小胞と定義し、SSC/FSC プロット上に MP 領域を設定した (図 2-1)。

4-2 PRP と PFP における SSC/FSC プロットの比較

PRP および PFP の SSC/FSC プロットでは、コントロールビーズ (図 2-1) で 1 μm 以上の大きさの領域に PRP のみで認められる集団が観察され、このイベント集団は PFP では消失することからこの領域が血小板集団であると考えられた。また、PFP の SSC/FSC プロットでは血小板領域の集団が消失するが、これより小さなイベント集団が PRP の場合と同様に検出されたことから、PFP では十分に血小板が除去される一方、EVs が残存していることが示された (図 2-2)。

4-3 MP 数と陽性染色 MP 数の比較

図 2-3 はイヌ PFP における全 MP 数および各 MP 染色試薬の処理により蛍光染色された陽性染色 MP 数を示している。ACD またはヘパリンにより抗血液凝固処理された PFP において全 MP 数を比較したところ、ヘパリン処理 PFP における全 MP 数は ACD 処理 PFP に比べ有意に高かった (Heparin-CFSE vs. ACD-CFSE および Heparin-Calcein vs. ACD-Calcein)。同様の結果はウサギ PFP においても認められ、ヘパリン処理 PFP で検出された MP 数 ($2,329 \pm 284$, $n=6$) は、ACD 処理 PFP における MP 数 (994 ± 105 , $n=6$) よりも有意に高かった ($P=0.002$)。

ヘパリン処理された PFP において、各 MP 染色試薬間で全 MP 数に明らかな違いは認められないが、annexinV または calcein 染色における陽性染色 MP 数は、全 MP 数よりも有意に低い値を示した。一方、ACD 処理 PFP では、CFSE および calcein における陽性染色 MP 数は全 MP 数とほぼ同等の値を示した。

4-4 各染色試薬に対する陽性率の比較

MPs に対する MP 染色試薬の特性をより明確にするため、各 MP 染色試薬

に対する MPs の陽性率（陽性染色 MP 数 / 全 MP 数）を算出した（表 2-1）。ヘパリン処理 PFP において、annexin または calcein に対する MP 陽性率は低かった。一方、CFSE の陽性率は annexinV-FITC や calcein-AM と比較して有意に高かった。同様の結果は、ACD 処理された PFP でも認められ、CFSE に対する MP の陽性率は calcein-AM と比較して有意に高かった。ACD 処理 PFP を用いて annexinV-FITC による MP 染色を行ったが、FITC 陽性を示す MP は検出されなかった（data not shown）。

4-5 ACD 処理 PFP における蛍光強度の変動係数

各染色試薬による MP 染色の特徴を解析する目的で、ACD 処理 PFP において CFSE または calcein により陽性に染色された MPs の蛍光強度について変動係数（CV；標準偏差を平均値で除算したもの）を比較した。CFSE 染色における蛍光強度の変動係数（ 80.7 ± 5.5 ）は calcein-AM（ 51.8 ± 3.0 ）より有意に高い値を示した（ $P=0.027$ ）（図 2-4）。

4-6 各抗血液凝固薬における MP 絶対数の比較

ヘパリン処理 PFP におけるイヌ MP の絶対数 ($78.8 \times 10^4 \pm 37.7 \times 10^4$ MPs/ μ l、n=5) は、ACD 処理 PFP における MP 数 ($27.4 \times 10^4 \pm 10.7 \times 10^4$ MPs/ μ l) よりも 2.9 倍高い値を示した(図 2-5)。ウサギ PFP においても同様の結果が認められ、ヘパリン処理 PFP における MP 絶対数 ($8.5 \times 10^4 \pm 2.3 \times 10^4$ MPs/ μ l、n=6) は、ACD 処理 PFP における MP 絶対数 ($1.6 \times 10^4 \pm 0.2 \times 10^4$ MPs/ μ l、n=6) よりも有意に高かった (P=0.049)。

イヌにおける MP 絶対数において変動係数を算出した結果、その変動係数はヘパリン群で 1.07 (n=5) および ACD 群で 0.87 (n=5) であり、両者で高いばらつきが示されたが顕著な差は認められなかった。

5 考察

5-1 抗血液凝固剤が MP 数に与える影響

抗血液凝固剤の種類が FCM による MP 検出に与える影響を解析するため、ACD およびヘパリン処理 PFP において検出された MP 数を比較した。その結果、ACD 処理 PFP に比べヘパリン処理 PFP における全 MP 数は有意に高かった。さらにウサギ PFP においても、ヘパリン処理 PFP で検出された MP 数は、ACD 処理 PFP における MP 数よりも有意に高かった。同様の結果は、ヒトにおける検討においても報告されている^{3,8,35}。以上の結果は、動物種にかかわらずヘパリン処置 PFP では ACD に比べ、多くの MP が検出される可能性があることを示唆している。また MP の絶対数測定においても同様の傾向が認められ、有意差は認められなかったものの、ヘパリン処理されたイヌ PFP における MP 絶対数は、ACD 処理 PFP における MP 絶対数よりも 2.9 倍高い値を示した。また、ウサギにおいてもヘパリン処理 PFP 中の MP 絶対数は、ACD 処理 PFP における MP 絶対数よりも有意に高かった。使用する抗血液凝固剤により MP 数に差が認められる理由として、各抗凝固剤のカルシウムイオンに対するキレー

ト作用の有無が考えられる。カルシウムイオンは血小板の活性化に必須であり血小板活性化によりMPが放出されることが知られていることから^{3,8,10}、カルシウムイオンのキレート作用を持たないヘパリンで処理された血液では、採血後に生体外での血小板活性化が生じたことによりPFP中のMP数増加がアーチファクトとして認められた可能性がある。また以上の結果は、ACDによるカルシウムイオンのキレート作用は血小板活性化を抑制し、アーチファクトによる血小板由来MP形成の抑制により効果的であったことを示唆している。

5-2 ヒトとイヌのMP絶対数の比較

ヒトにおける血液、PRPまたはPFP中のMP絶対数は、さまざまな方法で測定されているが、それらは概ね 10^2 から 10^4 MPs/ μ lの範囲で報告されている⁸。一方、CremerらはイヌMPの絶対数は 10^4 から 10^6 MPs/ μ lと報告しており、これは本研究の結果（ヘパリン処理PFP： $78.8 \times 10^4 \pm 37.7 \times 10^4$ MPs/ μ lおよびACD処理PFP： $27.4 \times 10^4 \pm 10.7 \times 10^4$ MPs/ μ l）とおおむね一致している¹⁰。しかし、MP絶対数の変動係数を算出した結果、ヘパリン群（1.07、n=5）およびACD群（0.87、n=5）の両者に顕著な差は認められないものの高いばらつ

きが示された。この各群内で認められる MP 絶対数のばらつきが、PFP 作製時および測定時のアーチファクトを原因とするのか、もしくは個体差によるものなのかは本研究からは明確にすることができず、さらなる検討が必要である。

5-3 各 MP 染色試薬に対する陽性率の比較

FCM による MP 測定時におけるノイズと真のイベントを区別するため、また MP 検出の特異性を高めるため、annexinV、CFSE、calcein による蛍光標識をした PFP を用いて MP 測定を実施しその特性を解析した。ヘパリン処理 PFP において、annexin または calcein に対する MP の陽性率は低い値を示した。一方、CFSE の陽性率は annexinV-FITC や calcein-AM と比較して有意に高かった。同様の結果は、ACD 処理された PFP でも認められ、CFSE に対する MP の陽性率は calcein-AM と比較して有意に高かった。以上の結果は、CFSE では MPs の大部分が蛍光染色され FCM で検出されているが、annexinV および calcein では MPs の一部しか染色されていないことを示唆している。血液中に循環している MP は、その膜表面に PS を表出しており、これによりプロコアグulant 活性を有している。AnnexinV は PS と強い親和性を示し

MP 表面の PS に結合することから^{10,21,33}、FCM における MP 検出試薬として用いられている。PS への annexinV の結合はカルシウムイオンに依存しているため、ACD を抗血液凝固剤として使用した場合には、ACD によるカルシウムイオンのキレート作用により annexinV と PS との結合が阻害される。したがって、annexinV-FITC は、ACD により処理された PFP における MPs の染色には適しないと考えられた。また、無刺激の血液から作製される PFP 中に含まれる MPs の大部分は PS を表出していない^{9,10,39}との報告があることから、ヘパリン処理 PFP における annexin 陽性 MP 数は MP 領域に検出される全 MP 数と比べて有意に低かったと考えられる。以上のことから、annexinV は、FCM における MP 検出の染色試薬としては不適切と考えられた。

Calcein-AM と CFSE はいずれも細胞膜透過性を有し、細胞内エステラーゼによる切断により蛍光が誘起される物質である。これらの染色試薬は、細胞もしくは小胞に含まれる細胞質に取り込まれた後に蛍光を発するようになり、また同時に膜不透過性が高くなる。一方、主にサイズに依存した MP 検出 (SSC/FSC プロット) では MPs と誤って検出される可能性のある非細胞性のデブリはエステラーゼを内包していないため、これらの試薬により染色されない。さらに、calcein

と CFSE は起源となる細胞種にかかわらず MPs を染色できるため、MP 検出の特異的かつ包括的蛍光マーカーとして使用することが可能である^{5,19}。以上のように calcein-AM と CFSE は類似した機序により MP を染色するが本研究では顕著な相違がその MP 陽性率に認められ、ヘパリンまたは ACD 処理された PFP の両者で、CFSE は calcein-AM に比べ有意に高い MP 陽性率を示した。Rondら³³は EVs の検出において calcein-AM は CFSE よりも低い検出感度であったことを報告しており、その理由として calcein-AM はその蛍光輝度が検出に不十分であること、もしくは calcein-AM に対して EV 内に存在するエステラーゼ活性が十分ではない可能性を指摘している。さらに、CFSE はそのスクシンイミジル基を介して細胞内タンパク質と共有結合することで、細胞からほとんど漏出せずより長期に細胞内に保持される³⁰。これらのことから、本研究において CFSE が MP 染色において高い陽性率示した結果は、MP 以外の成分に対する非特異的染色によるものではなく、CFSE が MPs に対して高い染色率を示した結果であると考えられた。

6 小括

ACD を抗血液凝固剤としてイヌ血液より作製された PFP において、FCM により MPs を測定することが可能であった。また、CFSE を包括的 MP 染色試薬として使用することで、もっとも高い MP 陽性率が得られた。一方、ヘパリンは PFP 作製時における血小板活性化に伴う MP の放出を完全には抑制することができず、その結果、PFP 中の MP 数増加をもたらす可能性が考えられた。さらに annexinV および calcein-AM は、使用する抗血液凝固剤にかかわらず、イヌ MPs の一部のみが染色されるにとどまった。

7 図表

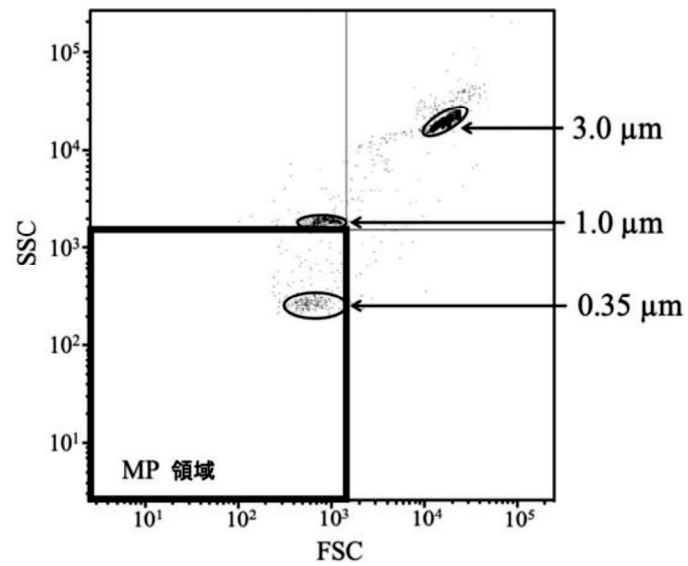


図 2-1 コントロールビーズの SSC/FSC プロットと MP 領域の設定

MP 領域の設定のため、コントロールビーズ (0.35、1.0、3.0 μm) を使用した。

MP は、1.0 μm より小さい小胞と定義し、SSC/FSC プロット上に MP 領域を設定した。

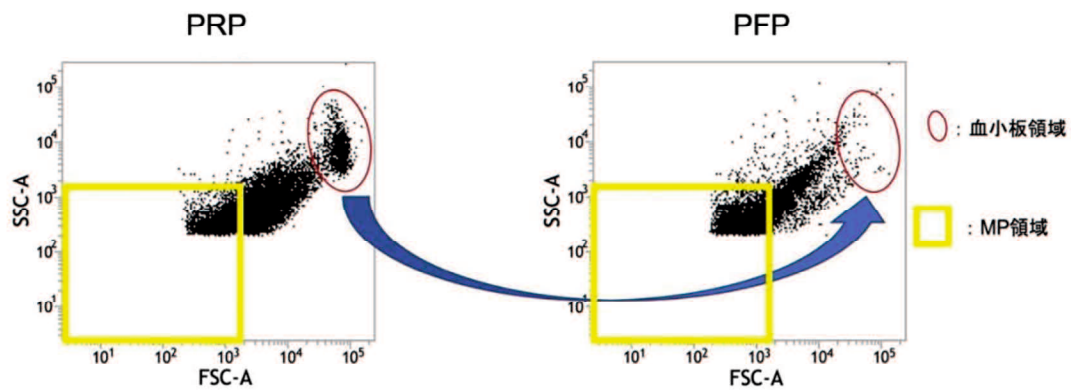


図 2-2 PRP と PFP における SSC/FSC プロットの比較

PRP または PFP における SSC/FSC プロットの代表例を示す。PRP の SSC/FSC プロットでは $1 \mu\text{m}$ 以上の大きさの領域に PRP のみで認められる集団が観察され、血小板集団であると考えられた。また、PFP の $1 \mu\text{m}$ より小さな領域に PRP と同様のイベントが検出され、EVs が残存していることが示された。(n=6)

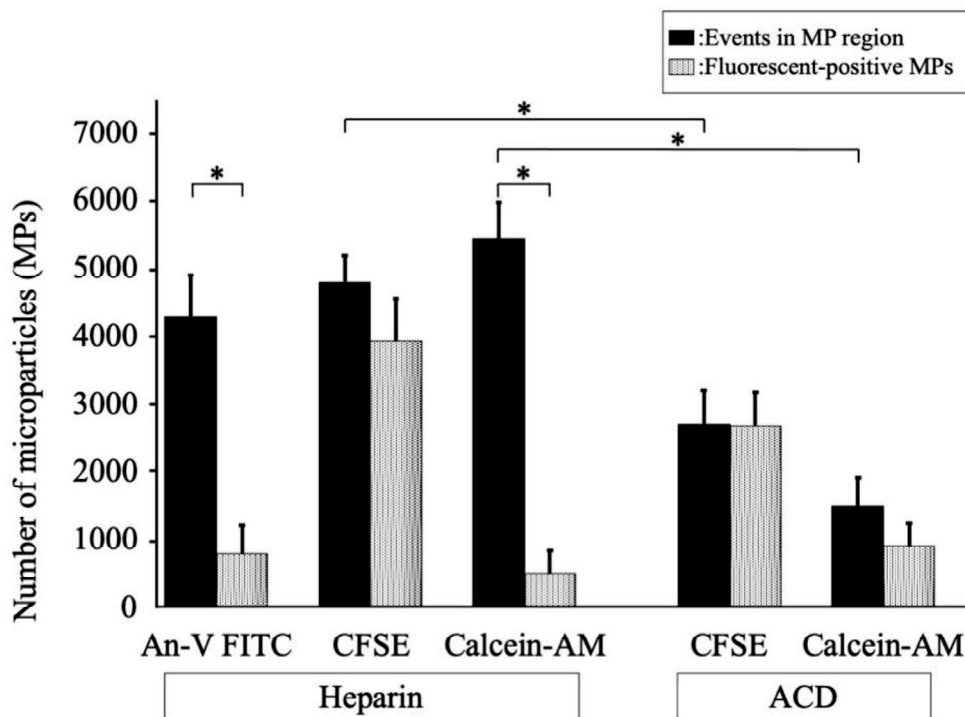


図 2-3 MP 領域および MP 陽性領域のイベント数の比較

全 MP 数は、ACD 処理 PFP に比べヘパリン処理 PFP の方が有意に高かった。ヘパリン処理された PFP において、annexinV (An-V FITC) または calcein 染色に対する陽性染色 MP 数は、全 MP 数よりも有意に低い値を示した。一方、ACD 処理 PFP では、各 MP 染色試薬における全 MP 数と陽性染色 MP 数の間に有意な差は認められなかった。(n=6, * P<0.05)

表 2-1 各実験条件下での PFP サンプルにおける MP 陽性率の比較

抗凝固剤	MP 染色試薬	陽性率
ヘパリン	Annexin V	0.18 ± 0.072*
	CFSE	0.79 ± 0.088
	Calcein-AM	0.10 ± 0.062*
ACD	CFSE	0.98 ± 0.005
	Calcein-AM	0.64 ± 0.099†

各抗凝固剤処置 PFP サンプルにおいて、CFSE は annexin および calcein 染色に比べ有意に高い陽性率を示した。(n=6, * P<0.05 vs. ヘパリン処置 CFSE 染色陽性率、† P<0.05 vs. ACD 処置 CFSE 染色陽性率)

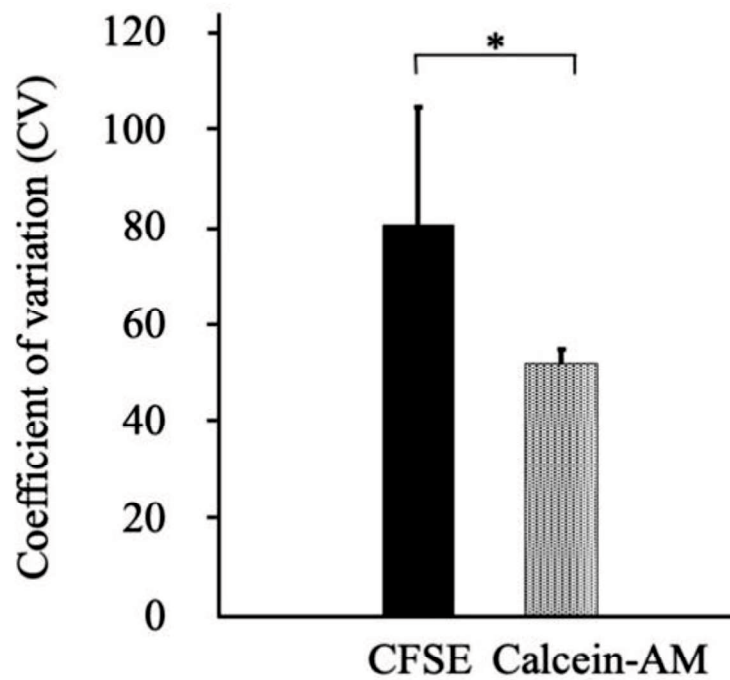


図 2-4 CFSE と calcein-AM に対する陽性染色 MP の蛍光強度における変動係数 (CV) の比較

CFSE または calcein-AM により染色された MP について、MP の蛍光強度の変動係数を比較した。CFSE における変動係数は calcein-AM に比べ有意に高い値を示した。(n=6, * P<0.05)

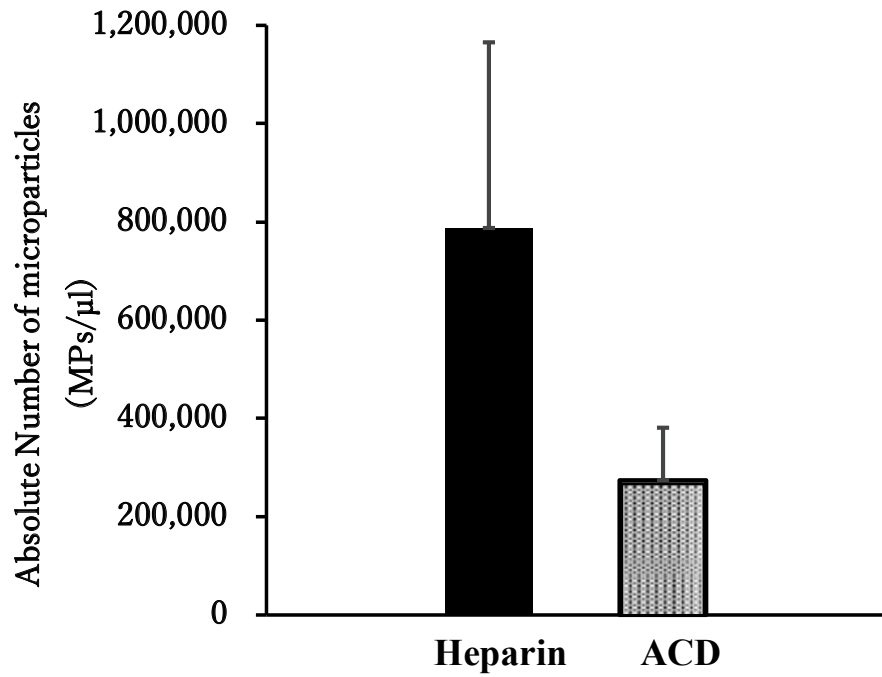


図 2-5 抗血液凝固剤が MP 絶対数に与える影響

ヘパリンまたはACD処理 PFPにおいて、MP絶対数を測定し比較した。ヘパリン処理 PFPでは、ACDと比較し2.9倍のMP絶対数を示した。(n=5)

参考文献

1. Altay, U. M., Skerritt, G. C., Hilbe M, Ehrensperger, F. and Steffen, F. 2011. Feline cerebrovascular disease: Clinical and histopathologic findings in 16 cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **47**: 89-97
2. Amiral, J. and Seghatchian, J. 2016. Measurement of extracellular vesicles as biomarkers of consequences or cause complications of pathological states, and prognosis of both evolution and therapeutic safety/efficacy. *Transfus. Apher. Sci.* **55**: 23-34.
3. Barteneva, N. S., Fasler-Kan, E., Bernimoulin, M., Stern, J. N., Ponomarev, E. D., Duckett, L. and Vorobjev, I. A. 2013. Circulating microparticles: square the circle *BMC Cell Biol.* **14**: 23
4. Berendt, M., Gredel, H., Ersbøll, A. K. and Alving, J. 2007. Premature

death, risk factors, and life patterns in dogs with epilepsy. *J. Vet. Intern.*

Med. **21**: 754-759

5. Bernimoulin, M., Waters, E. K., Foy, M., Steele, B.M., Sullivan, M.

Falet, H., Walsh, M. T., Barteneva, N., Geng, J. G., Hartwig, J. H.,

Maquire, P. B. and Wagner, D. D. 2009. Differential stimulation of monocyte cells results in distinct populations of microparticles. *Thromb.*

Haemost. **7(6)** : 1019-1028

6. Boudreau, C. E. 2018. An update on cerebrovascular disease in dogs and

cats. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* **48**: 45-62.

7. Burger, D. and Oleynik, P. 2017. Isolation and characterization of

circulating microparticles by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* **1527**:

271-281.

8. Chandler, W. I. 2016. Measurement of microvesicle levels in human blood using flow cytometry *Cytometry B Clin. Cytom.* **90B**: 326–336.
9. Connor, D. E., Exner, T., Ma, D. D. F. and Joseph, J. E. 2010. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* **103(5)** : 1044-1052.
10. Cremer, S. E., Krogh, A. K. H., Hedström, M. E. K., Christiansen, L. B., Tarnow, I. and Kristensen, A. T. 2018. Analytical validation of a flow cytometric protocol for quantification of platelet microparticle in dogs *Vet. Clin. Pathol.* **47**: 186-196
11. Dewey, C. W., da Costa, R. C. 2016. Ischemic/vascular encephalopathy pp 212-215. In: Practical guide to canine and feline neurology 3rd ed.,

John Wiley & Sons, Ltd, New York.

12. Ender, F., Zamzow, P., von Bubno, N. and Gieseler, F. 2019.

Detection and quantification of extracellular vesicles via FACS:

Membrane labeling matters! *Int. J. Mol. Sci.* **21(1)** : 291

13. Garosi, L., McConnell, J. F., Platt, S. R., Barone G., Baron, J. C., de

Lahunta, A. and Schatzberg, S. J. 2005. Result of diagnostic investigations

and long-term outcome of 33 dogs with brain infarction (2000-2004). *J.*

Vet. Intern. Med. **19**: 725-731

14. Garosi, L., McConnell, J. F., Platt, S. R., Barone, G., Baron, J. C., de

Lahunta, A. and Schatzberg, S. J. 2006. Clinical and topographic magnetic

resonance characteristics of suspected brain infarction 40 dogs. *J. Vet.*

Intern. Med. **20**: 311-321

15. Geiser, T., Sturzenegger, M., Genewein, U., Haeberli, A. and Beer, J.

H. 1998. Mechanisms of cerebrovascular events as assessed by procoagulant activity, cerebral microemboli, and platelet microparticles in patients with prosthetic heart valves. *Stroke* **29**: 1770-1777

16. Gray, W.D., Mitchell, A.J. and Searles, C.D. An accurate, precise method for general labeling of extracellular vesicles. *MethodsX* **2**: 360-367

17. Gredal, H., Skerritt, G. C., Gideon, P., Arlien-Soeborg, P. and Berendt, M. 2013a. Spontaneous ischaemic stroke in dogs: clinical topographic similarities to humans. *Acta Neurol Scand* **128**: e11-e16

18. Gredal, H., Toft, N., Westrup, U., Motta, L., Gideon, P., Arlien-Søborg, P., Skerritt, G. C. and Berendt, M. 2013b. Survival and clinical outcome

of dogs with ischaemic stroke. *Vet. J.* **196**: 408-413

19. Grisendi, G., Finetti, E., Manganaro, D., Cordova, N., Montagnani, G., Spano, C., Prapa, M., Guarneri, V., Otsuru, S., Horwitz, E. M., Mari, G. and Dominici, M. 2015. Detection of microparticles from human red cells by multiparametric flow cytometry. *Blood Transfus.* **13**: 274-280

20. Herring, J.M., McMichael, M.A. and Smith S.A. 2013 Microparticles in health and disease. *J. Vet. Intern. Med.* **27**: 1020–1033.

21. Herring, J. M., Smith, S. A., McMichael, M. A., O'Brien, M., Ngwenyama, T. R., Corsi, R., Galligon, A., Beloshapka, A. N., Deng, P. and Swanson, K. S. 2013. Microparticles in stored canine RBC concentrates. *Vet. Clin. Pathol.* **42/2**: 163–169

22. Hillock, S. M., Dewey, C. W., Stefanacci, J. D. and Fondacaro, J. V.

2006. Vascular encephalopathies in dogs: Incidence, risk factors, pathophysiology, and clinical signs. *The Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian* **28**: 196-207

23. Hillock, S. M., Dewey, C. W., Stefanacci, J.D., and Fondacaro, J. V. 2006. Vascular encephalopathies in dogs: Diagnosis, treatment, and prognosis. *The Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian* **28**: 208-217

24. Iraci, N., Leonardi, T., Gessler, F., Vega, B. and Pluchino, S. 2016. Focus on extracellular vesicles : physiological role and signaling properties of extracellular membrane vesicles *Int. J. Mol. Sci.* **17**: 171.

25. Jacqmot, O. D., Snaps, F. R., Maquet, N. M., Heinen, M. P. A. and Gabriel, A. E. 2011. Arterial head vascularization cartographies of normal metencephalic dogs using magnetic resonance angiography. *Anat. Rec.*

294: 1834-1841

26. Jeon, J., Jung, H., Jang, H., Moon, J., Park, K., Lee, H., Lim, H., Sur, J., Kang, B., Ha, J. and Jung, D. 2015. Canine model of ischemic stroke with permanent middle cerebral artery occlusion: clinical features, magnetic resonance imaging, histopathology, and immunohistochemistry. *J. Vet. Sci.* **16**: 75-85

27. Lee, Y. J., Jy, W., Horstman, L. L., Janania, J., Reyes, Y., Kelley, R. E. and Ahn, Y. S. 1993. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb. Res.* **72**: 295-304.

28. McConnell, J. F., Garosi, L. and Platt, S. R. 2005. Magnetic resonance imaging findings of presumed cerebellar cerebrovascular accident in twelve dogs. *Vet. Radio. Ultrasound* **46**: 1-10

29. Ministry of Health, Labor and Welfare. 2017.

<http://www.mhlw.go.jp/english/database/db-hh/xls/1-29.xls>.

30. Parish, C. R. 1999. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* **77**: 499–508.

31. Paul, A. E., Lenard, Z., Mansfield, C. S. 2010. Computed tomography diagnosis of eight dogs with brain infarction. *Aust. Vet. J.* **88**: 374-380

32. Platt, S. R., Garosi, L. S. 2012. CEREBROVASCULAR ACCIDENTS pp 319-332 In: Small animal neurological emergencies. Manson Publishing Ltd, London.

33. Rond, L., von der Pol, E., Hau, C. M., Vorga, Z., Sturk, A., van Leeuwen, T. G., Nieuwland, R. and Caumans, F. A. W. 2018. Comparison

of generic fluorescent markers for detection of extracellular vesicles by flow cytometry. *Clin. Chem.* **64: 4**: 680–689.

34. Salger, F., Stahl, C., Vandavelde, M., Piersigilli, A. and Henke, D. 2014. Multifocal ischemic brain infarctions secondary to spontaneous basilar artery occlusion in a dog with systemic thromboembolic disease. *J. Vet. Intern. Med.* **28**: 1875-1880

35. Shah, M. D., Bergeron, A. L., Dong, J. F. and Lòpez, J. A. 2008. Flow cytometric measurement of microparticles : pitfall and protocol modifications. *Platelets* **19(5)** : 365-372.

36. Takizawa, S., Shibata, T., Takagi, S., and Kobayashi, S. 2013. Seasonal variation of stroke incidence in Japan for 35631 stroke patients in the Japanese standard stroke registry 1998-2007. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **22(1)**: 36-4120.

37. Tanaka, H., Shinjo, M., Tsukuma, H., Kawaduma, Y., Shimoji, S., Kinoshita, N. and Morita, T. 2000. Seasonal variation in mortality from ischemic heart disease and cerebrovascular disease in Okinawa and Osaka - the possible role of air temperature. *J. Epidemiol.* **10**: 392-398

38. Tanuma, K. (1981) Morphological study on the circle of Willis in the dog. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* **58**: 155-176

39. Tomaniak, M., Gąsecka, A. and Filipiak, K. 2017. Cell-derived microvesicles in cardiovascular diseases and antiplatelet therapy monitoring — A lesson for future trials? Current evidence, recent progresses and perspectives of clinical application. *Int. J. Cardiol.* **236**: 93–102.

40. Vandeveldel, M., Higgins, R. J., Oevermann, A. 2012. Vascular

disorders. pp 38-47 In: Veterinary neuropathology- Essentials of theory and practice. John Wiley & Sons, Ltd, New York.

41. Wessmann, A., Chandler, K., Garosi, L. 2009. Ischaemic and haemorrhagic stroke in the dog. *Vet. J.* **180**: 290-303

42. Wolff, C. A., Holmes, S. P., Young, B. D., Chen, A. V., Kent, M., Platt, S. R., Savage, M. Y., Schatzberg, S. J., Fosgate, G. T. and Levine, J. M. 2012. Magnetic resonance imaging for the differentiation of neoplastic, inflammatory, and cerebrovascular brain disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **26**: 589-597

43. Yamamoto, S., Azuma, E., Muramatsu, M., Hamashima, T., Ishii, Y. and Sasahara, M. 2016. Significance of extracellular vesicles; pathobiological role in disease. *Cell Struct. Funct.* **41**: 137-143

44. 松尾龍(2015)脳梗塞の血液バイオマーカー探索 脳循環代謝 26:

225-232

総括

第1章で今まで知られていなかった小動物臨床領域における脳血管障害の臨床像を提示することができた。しかし、まだ不明な点は多くさらなる研究が必要である。その研究を進めるために、また脳血管障害の臨床診断のために、脳血管障害のバイオマーカーが開発されることは極めて意義が高い。第2章では、その端緒となるイヌのマイクロパーティクル測定を可能とした。今後はマイクロパーティクルの起源となる細胞を特定したり、内包するタンパクや核酸を分析したりすることにより、より特異的な脳血管障害のバイオマーカーになることが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官の先生方に多くのご指導を賜り、誠にありがとうございました。特に、実験・研究の手技や考え方、論文の組み立て方、ジャーナル査読者とのディスカッション方法を、基礎から丁寧に根気強くご指導いただきました生理学分野教授白石光也先生に深く感謝申し上げます。

また、この大学院で学ぶきっかけを与えてくださった川崎安亮先生に感謝申し上げますとともに、哀悼の意を表します。実験を遅い時間まで手伝っていただいた伊地知先生にも厚く御礼申し上げます。さらに研究を進めるにあたり、実験機材や場所を快く提供くださった越境性動物疾病研究センター教授小原恭子先生をはじめスタッフの皆様に感謝申し上げます。

最後に、大学院へ通学するにあたり、時間を融通しフォローしていただいたとわ動物病院、KyotoAR獣医神経病センターのスタッフの皆様に深く感謝し、御礼申し上げます。