

## 犬のTAT測定の基礎的検討と臨床的有用性

福岡 玲      中田美央      梅下雄介      築澤寿栄  
 舩方祐子      安田和雄<sup>†</sup>

兵庫県 開業 (安田動物病院：〒663-8184 西宮市鳴尾町5-8-12)

(2016年6月7日受付・2016年9月3日受理)

## 要 約

トロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT) は、人医学領域においてDICや血栓塞栓症の早期診断マーカーとして測定されている。人用の測定系を用いて犬のTAT測定の基礎的検討を行ったところ、広範囲の濃度において犬のTATは人用のTAT測定に用いられている抗体と一定の交叉性を示し、基準値上限付近や高濃度における良好な再現性も確認された。凝固亢進傾向を示す基礎疾患を持つ犬において経時的にTATを測定した結果、原疾患の治療に良好に反応した症例ではTATが速やかに正常値化する過程が観察されたが、原疾患の治療に反応が乏しかった症例ではTATの高値が持続した。本測定系による犬のTAT測定では、測定値の変動の比較は可能であることが分かった。また、TATの変動を評価することで原疾患に対する治療の反応を確認できる可能性が示唆された。

——キーワード：DIC, 血液凝固亢進マーカー, TAT.

-----日獣会誌 70, 47~51 (2017)

TATは、凝固亢進に伴い最終的に産生されるトロンビンとその代表的な阻止因子であるアンチトロンビンとが1対1で結合した複合体である。半減期がきわめて短く測定不能なトロンビンに比べてTATの半減期は3~15分と長く、比較的安定した物質であり、トロンビンを測定する代わりにTATを測定することによりトロンビンの産生量を間接的に把握することが可能である。そのため、TATは近年人医学領域においてDICや血栓塞栓症の早期診断のために血液凝固亢進状態をとらえる感度の高いマーカーとして用いられている [1-6]。

本研究の目的は、人のTATをベッドサイドで測定できる機器を用いて、犬の血液凝固亢進状態が検出可能であるかを明らかにし、さらに血液凝固亢進傾向を示す基礎疾患を持つ犬において、血液凝固亢進マーカーとしてのTATの有用性を検討することである。

## 材料及び方法

TAT測定は化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA法) を測定原理とする、ベッドサイド測定機器 (パスファースト, (株)LSIメディエンス, 東京) 及び人用TAT測定試薬 (パスファーストTAT, (株)LSIメディエンス, 東京) を

用いて行った。TAT測定において、採血時に強い陰圧がかかった場合や、採血に時間を要した場合に大きな陽性誤差を生じるとされている [7, 8] ため、検体採取は23Gの注射針を用いて犬の頸静脈から1回の穿刺により最小限の吸引圧により採血できた血液のみを使用した。3.8%クエン酸Naと血液が1:9の割合となるように混合し、ただちに3,000rpmで10分間遠心分離して得られた血漿を用いた。即時測定を行わない場合は、速やかに検体を-60℃で冷凍保存した。なお、本研究における犬のTAT基準値は、同一の測定系を用いて算出された加藤ら (2015 JCVIMにて口頭発表) の報告にある0.1ng/ml未満とした。

まず本測定系で用いられている抗ヒトトロンビンマウスモノクローナル抗体及び抗ヒトアンチトロンビンウサギポリクローナル抗体が犬のTATと交叉性を示すか検討するためにTATが高値 (約15ng/ml) を示した犬の検体を、おおむね濃度ゼロと見なし得るTATが著しく低値の健常犬の血漿を用いて段階希釈し、TATを測定する希釈試験を行った。その結果からTATの評価が可能な濃度範囲についても検討した。また、TATが高値を示した犬の血漿と著しく低値を示した健常犬の血漿、及

<sup>†</sup> 連絡責任者：安田和雄 (安田動物病院)

〒663-8184 西宮市鳴尾町5-8-12 ☎・FAX 0798-45-2388 E-mail: info@yasuda-vet.com

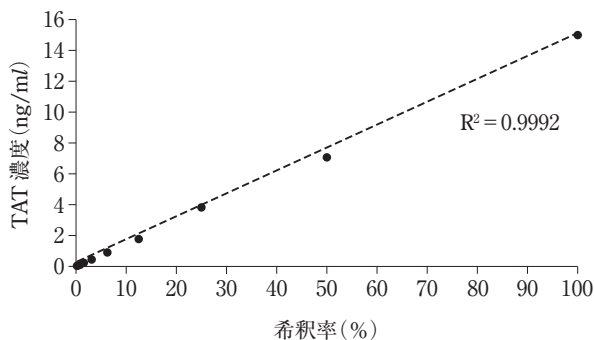


図1 高濃度 TAT 犬血漿を用いた希釈試験の結果

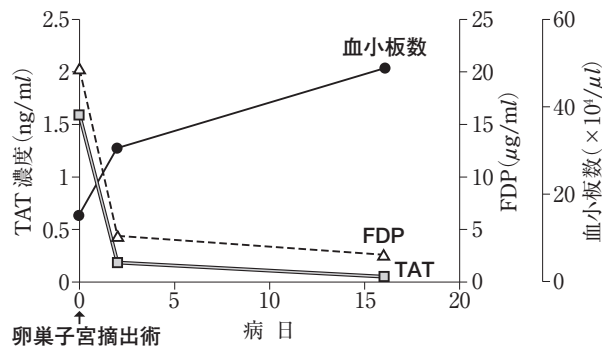


図2 症例1の TAT, FDP, 血小板数の推移

表 TAT 各濃度における再現性検討の結果

検体 No	TAT 濃度 (ng/ml)		
	低濃度の検体	基準値上限付近濃度の検体	高濃度の検体
1	0.018	0.156	15.0
2	0.029	0.154	15.3
3	0.021	0.177	15.9
4	0.013	0.176	14.9
5	0.017	0.167	15.7
6		0.161	15.4
7			14.1
8			14.3
Mean±SD	0.0196±0.0054	0.165±0.009	15.075±0.593
変動係数 (%)	27.3	5.45	3.93

び基準値上限付近の濃度を示した犬の血漿について、それぞれ複数回測定を行い、再現性を評価した。

さらに血液凝固を亢進させる基礎疾患を持つ犬3例について経時的に TAT を測定し、一般状態やその他の臨床検査結果との関連性について検討を加えた。

本研究では、血液凝固亢進を示し得る基礎疾患の存在に加え、血小板数の減少 ( $<20.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ )、FDP の増加 ( $>5.0 \mu\text{g/ml}$ )、PT または APTT の基準値 (それぞれ 6.8~8.6 秒, 13.1~26.9 秒) の 25% 以上の延長、という 3 項目のすべてが当てはまる場合を DIC、3 項目の内の 2 項目が当てはまる場合を pre DIC とする診断基準を用いた [9]。また、AT Ⅲ 活性やフィブリノーゲンの血中濃度が測定可能であった症例については、血小板数の減少、FDP の増加、PT または APTT の延長、フィブリノーゲンの減少 ( $<88 \text{mg/dl}$ )、AT Ⅲ 活性の低下 ( $<111\%$ ) の 6 項目中の 4 項目以上当てはまる場合を DIC と診断した [10, 11]。

血小板数の算定は動物用全自動血球計算機 (Celltac  $\alpha$  MEK-6450, 日本光電工業株, 東京) を、また PT 及び APTT、血中フィブリノーゲン濃度の測定は動物用血液凝固分析装置 (ドライヘマトシステム COAG 2V, 株エイアンドティー, 神奈川) を用いて院内で行った。FDP 濃度及び、AT Ⅲ 活性の測定はそれぞれ血液凝固試

薬 (ファクターオート P-FDP, (株) キューメイ 研究所, 大分及びテストチーム S AT Ⅲ, 積水メディカル株, 東京) を用いて委託検査で行った。

### 成 績

**TAT 測定に関する基礎的検討:** 希釈試験で得られた、TAT 濃度と希釈率を 2 変数とした回帰直線では、TAT 濃度 0.036~15ng/ml の範囲において  $r^2=0.9992$  というきわめて高い決定係数が得られた (図 1)。TAT が高値を示す犬、低値を示す健常犬血漿、基準値上限付近濃度を示す犬の血漿を複数回測定した結果、それぞれ  $15.075 \pm 0.593$  (平均±標準偏差,  $n=8$ ),  $0.0196 \pm 0.0054$  ( $n=5$ ),  $0.165 \pm 0.009$  ( $n=6$ ) という値が得られ、変動係数はそれぞれ 3.93%, 27.3%, 5.45% であった (表)。

**TAT を経時的に測定した 3 症例:** 症例 1 はミニチュアダックスフント 10 歳 6 カ月齢の未避妊雌で、子宮蓄膿症と診断された。第 0 病日に血小板数の減少 ( $16.1 \times 10^4/\mu\text{l}$ )、FDP の増加 ( $20.3 \mu\text{g/ml}$ ) が認められ、pre DIC と診断された。この時点で TAT は  $1.59 \text{ng/ml}$  と高値を示した。卵巣子宮摘出術の実施以降、血小板数の増加、FDP の減少、一般状態の改善が認められ、TAT の正常値化も観察された (図 2)。

症例 2 はアメリカンコッカースパニエル 16 歳 6 カ月齢の避妊雌で、慢性膀胱炎の急性増悪期と診断された。第 0 病日に血小板数の減少及び PT や APTT の延長は認められず、FDP が  $407.4 \mu\text{g/ml}$  と高値を示すのみであり、pre DIC よりもさらに前段階にあると考えられたが、TAT は  $6.04 \text{ng/ml}$  と著しい高値を示していた。輸液と鎮痛剤、制吐剤を用いた治療に良好に反応し、治療翌日より一般状態が改善した。また治療開始翌日から FDP の減少が認められ、第 7 病日には  $5.2 \mu\text{g/ml}$  と若干の高値を示したものの、おおむね正常値化した。TAT も治療開始翌日から減少を示し、第 7 病日には  $0.066 \text{ng/ml}$  と正常値化した (図 3)。

症例 3 はジャックラッセルテリア 10 歳 1 カ月齢の去勢雄で、IBD による蛋白喪失性腸症と診断され、免疫抑制治療中に急性膀胱炎を発症し、一般状態が悪化した。

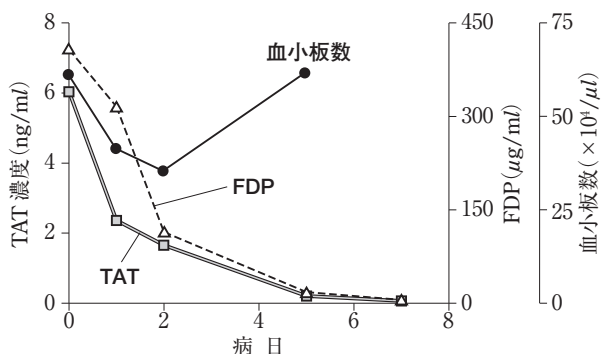


図3 症例2のTAT, FDP, 血小板数の推移

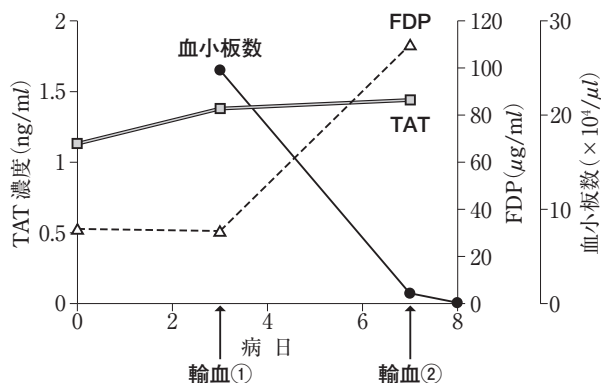


図4 症例3のTAT, FDP, 血小板数の推移

第0病日ではCRP 17mg/dl, v-Lip 234U/lと急性腭炎が疑われる異常値に加え, ALB 1.2g/dl, TP 4.0g/dlと低蛋白血症が認められ, FDPは31.7μg/mlと高値を示し, ATⅢ活性は72%と低下していた. TATは1.13ng/mlと高値を示した. 急性腭炎の治療に加え, 免疫抑制治療を継続したが, 低蛋白血症がさらに悪化したため, 第4病日に輸血を実施した. この時点で血小板数は $24.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ と減少を示していなかったが, FDP 30.8μg/ml, TAT 1.38ng/mlといずれも高値が持続していた. 第8病日には血小板数が $1.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ と減少し, PTの軽度延長(9.4秒), FDPの著しい増加(110μg/ml), ATⅢ活性の低下(81%)が認められたためDICと診断し, 再度の輸血と低分子ヘパリン(ダルテパリンNa静注, 日医工(株), 富山)の持続点滴を実施したが, 翌日肺出血を疑う咯血を呈した後に死亡した. 本症例の治療経過において, FDP及びTATは持続して高値を示していた(図4).

### 考 察

希釈試験の結果から, 希釈率とTAT濃度の測定値の間に高い相関関係が認められたことから, 少なくとも0.01ng/mlレベルの低濃度から10ng/mlレベルの高濃度の範囲において, 犬の血中TATと本測定系で用いられている抗体は一定の割合で交差反応を示すことが明らかになった. 本測定系は, 人のTAT標準品と人のTATに対する抗体を用いたものであり, 犬の測定値を人の基準値と直接比較することはできない. しかしながら本測定系を用いることで広域な濃度範囲において, 犬の血中TAT濃度の変動を比較検討することは可能であることが示された.

高濃度の検体及び基準値上限付近濃度の検体において得られた変動係数は10%未満であり, 高濃度及び基準値上限付近の濃度における良好な再現性が認められた. 低濃度検体において得られた変動係数は10%を大きく超えていたため, きわめて低濃度における測定値の再現性は低いと考えられた.

TATを経時的に測定した症例の結果から, いずれの症例も血小板数の減少やPTまたはAPTTの延長が認められるよりも早期にTATの上昇が認められた. このことから, TATの上昇によってpre DICのみならず, 本研究で用いたDIC診断基準ではpre DICにも該当しない血液凝固亢進傾向が早期に検出可能であることが示唆された.

また, TATが高値を示した場合であっても原疾患に対する治療に良好に反応した場合は, TATの速やかな正常値化が観察された. しかし原疾患に対する治療の反応が乏しく, TATの高値が持続した場合は, 血液凝固亢進状態が持続することにより後にDICに陥り, 予後も不良であったことから, TATの変動を観察することによって原疾患の治療に対する反応及び予後を評価することが可能であると考えられた.

また, 症例で認められたTATの上昇は, いずれにおいてもFDPの増加を伴っていた. このことから, 本測定系で検出されたTATの上昇は, 血栓形成を生じるような血液凝固亢進状態を反映しているものといえる. FDPは, 血液凝固亢進に伴って生じた血栓に対して活性化した線溶系の働きにより生じた分解産物であり, 線溶活性化マーカーである. その一方で, TATは血栓形成の結果として上昇するFDP等の線溶系マーカーの上昇よりも早期に血液凝固亢進状態を検出する凝固活性化マーカーであるといわれている[12, 13]. 本研究では, FDPの上昇よりも早期にTATが上昇する過程は観察されなかったものの, 症例2においては, 第7病日にTATの正常値化が認められた一方でFDPは軽度の高値を示していた. この時間的なずれは, 凝固亢進を検出するTATと, 凝固亢進の結果生じた血栓が分解されて増加する線溶系マーカーであるFDPのそれぞれの特性の違いによって生じたものと考えられる. したがって, 凝固亢進状態を誘発している原疾患の治療に対する反応が良好であった場合, FDPよりもTATの方が早期に正常値化する可能性が示された. その一方で, 治療の反応が乏しかった症例3では, 経過においてTATの大きな

変動を示さず高値を維持していたが、FDP の急激な上昇が認められた後に死亡したことから、原疾患の治療開始後も TAT の低下が認められない場合は、FDP 等のその他の凝固系項目と組み合わせた病態の評価を行う必要があると考えられた。

獣医学領域においてこれまで犬の TAT 測定を行った報告は複数存在するが、それらの報告はすべて人用の抗体を用いた酵素免疫測定法 (EIA 法) によるものである [14-18]。EIA 法による TAT 測定は、その測定手順が複雑なうえ、測定結果を得るまでに長時間を要するため、その結果を臨床現場において迅速に治療に反映することは困難であった。そのため、DIC を含めた血液凝固亢進状態の検出に TAT の測定を行うことは臨床レベルでは一般的ではなかった。本測定系は、EIA 法と比べて、測定手順が簡便であり、さらに 30 分と短時間で測定結果が得られるため、臨床現場においてただちに治療に反映可能であるという利点を持つ。したがって、本測定系を用いることで、臨床現場において DIC や深部血栓塞栓症等の迅速な対応が必要となる疾患を含めた、血液凝固亢進状態の早期診断及び治療が可能になるものと考えられた。

DIC において TAT は必ず上昇するとされ [12, 19]、人医学領域では 2014 年に作成された本邦における DIC 新診断基準暫定案において、TAT の上昇が診断基準の一項目として新たに組み込まれている (朝倉英策ほか: 日本血栓止血学会 DIC 診断基準暫定案, 血栓止血誌, 25, 629-646 (2014) に記載)。今後獣医学領域においても DIC を含めた各種血栓症の早期診断マーカーとして、TAT 測定をその他の血液凝固系検査と組み合わせて行うことにより、さらに詳細な病態の把握が可能になるものと期待される。

## 引用文献

- [1] 櫻川信男: トロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体 (TAT), 日本臨床, 684, 48-50 (1995)
- [2] 東原正明, 宮崎浩二: TAT, 臨床検査, 40, 121-122 (1996)
- [3] 田中朝志, 天野景裕, 磯貝直史, 山岸哲也, 福武勝幸: トロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体 (TAT) 「SRL」による TAT 測定の検討, 医学と薬学, 31, 203-208 (1994)
- [4] Boisclair MD, Ireland H, Lane DA: Assessment of hypercoagulable states by measurement of activation fragments and peptides, Blood Rev, 4, 25-40 (1990)
- [5] Wada H: Hemostatic abnormalities in DIC, Rinsho Byori, 50, 768-772 (2002)
- [6] Yamamoto K, Saito H: Diagnosis of predictive state of disseminated intravascular coagulation, Nihon Rinsho, 51, 74-78 (1993)
- [7] Omote M, Asakura H, Takamichi S, Shibayama M, Yoshida T, Kadohira Y, Maekawa M, Yamazaki M, Morishita E, Nakao S, Wada T: Changes in molecular markers of hemostatic and fibrinolytic activation under various sampling conditions using vacuum tube samples from healthy volunteers, Thromb Res, 123, 390-395 (2008)
- [8] Hering J, Amann B, Angelkort B, Rottmann M: Thrombin-antithrombin complex and the prothrombin fragment in arterial and venous blood of patients with peripheral arterial disease, Vasa, 32, 193-197 (2003)
- [9] Carr AP, Panciera DL, Kidd L: Prognostic Factors for Mortality and Thromboembolism in Canine Immune-Mediated Hemolytic Anemia: A Retrospective Study of 72 Dogs, J Vet Intern Med, 16, 504-509 (2002)
- [10] Machida T, Kokubu Hiromitsu, Matsuda K, Miyoshi K, Uchida E: Clinical Use of D-Dimer Measurement for the Diagnosis of Disseminated Intravascular Coagulation in Dogs, J Vet Med Sci, 72, 1301-1306 (2010)
- [11] Maruyama H, Miura T, Sakai M, Koie H, Yamaya Y, Shibuya H, Sato T, Watari T, Takeuchi A, Tokuriki M, Hasegawa A: The Incidence of Disseminated Intravascular Coagulation in Dogs with Malignant tumor, J Vet Med Sci, 66, 573-575 (2004)
- [12] Wada H, Wakita Y, Nakase T, Shimura M, Hiyoyama K, Nagaya S, Mori Y, Deguchi K, Shiku H: Diagnosis of pre-disseminated intravascular coagulation stage with hemostatic molecular markers. The Mie DIC Study Group, Pol J Pharmacol, 48, 225-228 (1996)
- [13] Kobayashi T, Terao T: Preeclampsia as chronic disseminated intravascular coagulation. Study of two parameters: thrombin-antithrombin III complex and D-dimers, Gynecol Obstet Invest, 24, 170-178 (1987)
- [14] Tarnow I, Falk T, Tidholm A, Martinuseen T, Jensen AL, Olsen LH, Pedersen HD, Kristensen AT: Hemostatic biomarkers in dogs with chronic congestive heart failure, J Vet Intern Med, 21, 451-457 (2007)
- [15] Maruyama H, Watari T, Miura T, Sakai M, Takahashi T, Koie H, Yamaya Y, Asano K, Edamura K, Sato T, Tanaka S, Hasegawa A, Tokuriki M: Plasma thrombin-antithrombin complex concentrations in dogs with malignant tumours, Vet Rec, 156, 839-840 (2005)
- [16] Pelzer H, Schwarz A, Heimburger N: Determination of human thrombin-antithrombin III complex in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay, Thromb Haemost, 59, 101-106 (1988)
- [17] Hoek JA, Sturk A, ten Cate JW, Lamping RJ, Berends F, Borm JJ: Laboratory and clinical evaluation of an assay of thrombin-antithrombin III complexes in plasma, Clin Chem, 34, 2058-2062 (1988)
- [18] Ravanat C, Freund M, Dol F, Cadroy Y, Roussi J, Incardona F, Maffrand JP, Boneu B, Drouet L, Legrand C, Herbert JM, Cazenave JP: Cross-reactivity of human molecular markers for detection of pre-thrombotic states in various animal species, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 6, 446-455 (1995)
- [19] Asakura H: Classifying types of disseminated intravascular coagulation: Clinical and animal models, J Intensive Care, 2, 20 (2014)

## Basic Study and Clinical Utility of TAT Measuring in Dogs

Rei FUKUOKA, Mio NAKATA, Yusuke UMESHITA, Hisae TSUKIZAWA,  
Yuko MASUKATA and Kazuo YASUDA<sup>†</sup>

\**Yasuda Animal Hospital, 5-8-12 Naruo-cho, Nishinomiya, 663-8184, Japan*

### SUMMARY

Thrombin-Antithrombin Complex (TAT) has recently been used in medicine for humans as an early diagnostic marker for disseminated intravascular coagulation (DIC) and thromboembolisms. It is unknown whether the same approach that is used to detect TAT in humans (hTAT) can also be applied to canine TAT (cTAT) in dogs. Thus, we used canine plasma with extremely low concentrations of cTAT to consecutively dilute canine plasma that contained high concentrations of cTAT and evaluated the extent to which the antibody commonly used to detect hTAT can also detect cTAT. Our results indicated that the hTAT antibody reproducibly reacted with cTAT over a wide range of concentrations of cTAT, excluding samples with extremely low concentrations of cTAT. Additionally, we measured fluctuations in the concentration of cTAT in dogs with underlying diseases that resulted in hypercoagulopathy. We found that the concentrations of cTAT rapidly normalized in dogs that responded favorably to the treatment for their underlying disease, while concentrations of cTAT remained high when the dogs responded poorly to the treatment. Our study demonstrates for the first time that the methods routinely used to detect hTAT in human patients can also be used in dogs to detect and compare various concentrations of cTAT and suggests that evaluating the concentrations of cTAT may be an effective way to confirm the subject's response to treatment. — Key words : DIC, hypercoagulability marker, TAT.

<sup>†</sup> *Correspondence to : Kazuo YASUDA (Yasuda Animal Hospital)*

*5-8-12 Naruo-cho, Nishinomiya, 663-8184, Japan*

*TEL · FAX 0798-45-2388 E-mail : info@yasuda-vet.com*

---

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 47 ~ 51 (2017)*