

犬の徐脈性不整脈に対する
シロスタゾールの有用性に関する
臨床的研究

2022 年

東京農工大学大学院農学府共同獣医学専攻

大 森 貴 裕

犬の徐脈性不整脈に対する
シロスタゾールの有用性に関する
臨床的研究

大 森 貴 裕

目次

序論.....	3
第1章 犬の徐脈性不整脈症例に対するシロスタゾールの使用状況とその有用性に関する回顧的調査	
1. 緒言.....	7
2. 材料および方法.....	8
3. 結果.....	12
4. 考察.....	19
5. 小括.....	26
6. 図表.....	27
第2章 健常犬におけるシロスタゾールの抗血小板作用に関する全血血栓形成観測システム T-TAS を用いた検討	
1. 緒言.....	37
2. 材料および方法.....	39
3. 結果.....	44
4. 考察.....	46
5. 小括.....	51
6. 図表.....	52
第3章 実験的房室ブロック犬におけるシロスタゾールの心拍数増加効果に関する検討	
1. 緒言.....	59
2. 材料および方法.....	61

3. 結果.....	68
4. 考察.....	71
5. 小括.....	76
6. 図表.....	77
総括.....	99
謝辞.....	102
文献.....	103

序 論

徐脈性不整脈とは、心拍数が基準値（犬では 60 bpm [Santilli et al., 2018]）を下回った状態を示す総称である。犬で最も一般的な徐脈性不整脈として洞徐脈、洞停止（もしくは洞房ブロック）、洞不全症候群（Sick sinus syndrome : SSS）、房室ブロックなどが挙げられる [Kobayashi et al., 2003, Machida et al., 1990, Shibasaki et al., 2001, Alexio et al., 2017]。これらの徐脈性不整脈の中には、心拍数の低下とそれに応じた一回拍出量の増加が十分に釣り合わず、拍出量が減少した結果、虚脱、一過性の意識喪失、突然死などの臨床徴候が現れるものもある [Ward et al., 2016]。

人医療において、臨床徴候を示す徐脈性不整脈に対してはペースメーカー植込み（Pacemaker implantation : PMI）が治療の第一選択となる。同様に、失神などの臨床徴候がみられる犬や猫に対しても、PMI は最良の選択肢とされている [Kobayashi et al., 2003]。しかしながら、獣医療においては、PMI を実施することが可能な施設が限られていること、装置の入手が容易ではないこと、一般に動物が高齢である、または基礎疾患を有している場合が多いなどの理由から、PMI を選択できない場合も決して少なくない。そのため臨床の現場では、徐脈性不整脈を有する犬および猫に対して、内科的治療が選択されることが多い。犬の徐脈性不整脈の治療に従来から用いられている薬剤は、副交感神経遮断薬である硫酸アトロピン [Machida et al., 1990]、交感神経 β 受容体作動薬のイソプロテレノール [Shibasaki et al., 2001] やテルブタリン [Ward et al., 2016]、ホスホジエステラーゼ（Phosphodiesterase : PDE）阻害薬かつアデノシン受容体拮抗薬であるアミノフィリン [Alexio et al., 2017] やテオフィリン [Billen and Israel, 2006] などである。しかし、これらの薬剤の効果はかなり限定的であり、多くの場合、生活の質は多少改善するものの、長期予後は期待できない [Ward et al., 2016]。

一方、環状アデノシン一リン酸（Cyclic adenosine monophosphate : cAMP）PDE III 阻害剤であるシロスタゾールが、ヒト [Atarashi et al., 1998, Kodama et al., 2003,

Moriya et al., 2004, Nimura et al., 2011]および犬 [Komiya et al., 2013, Kanno and Suzuki, 2017]の徐脈性不整脈の治療に有用であることが報告されてきている。シロスタゾールは、脳梗塞や慢性動脈閉塞症のヒト患者において、再発予防の目的で使用される血小板凝集抑制薬である [Kwon et al., 2005, Noma and Higashi, 2018]。以前から、本剤の副反応として頻脈の発現が認められており、現在ではこの効果を逆利用することで徐脈性不整脈の治療薬として用いられている [Sonoura et al., 2019]。そして、人医療と同様に、シロスタゾールは臨床徴候を示す徐脈性不整脈の犬および猫にも治療目的で投与され、それらの動物を長期的に管理することが可能であったとの報告もある [Iwasa et al., 2019, Johnson et al., 2007, Kanno and Suzuki, 2017]。

近年、私どもの研究室ではシロスタゾールが健常犬の心拍数を用量依存性に増加させることを報告した [Fukushima et al., 2018]。その研究の中で、3つの薬用量を設定したが、1回あたり 5 mg/kg および 10 mg/kg、1日2回投与した際に、有意な心拍数の増加を認めた。このことは、それ以前に臨床の現場で徐脈性不整脈の犬に対して経験的に使用されていたシロスタゾールの用量と一致していた。しかしながら、これはあくまでも健常犬を用いた研究であり、実際の症例における治療反応性に合致するか否かは不明である。加えて、シロスタゾールが洞結節に直接作用する可能性が指摘されてはいるものの [Saito et al., 1995]、それが心拍数の増加に反映するかどうかは明らかにされていない。

本研究では、徐脈性不整脈を呈した犬に対するシロスタゾールの適切な薬用量を検証すること、ならびにそれに伴う副反応や適応となる徐脈性不整脈の種類を明らかにすることで、本剤の臨床的有用性について検討することとした。本研究は以下の3章から構成されている。

第1章 犬の徐脈性不整脈に対するシロスタゾールの使用状況とその有用性に関する回顧的調査

東京農工大学農学部附属動物医療センター（以下、当センター）および国内23ヶ所の動物病院に調査協力を依頼し、犬の徐脈性不整脈治療薬としてのシロスタゾールの使用状況とその有用性を明らかにするとともに、至適用量および不整脈ごとの治療反応性や予後に関して、後ろ向き研究デザインにより解析した。

第2章 健常犬におけるシロスタゾールの抗血小板作用に関する全血血栓形成観測システム T-TAS を用いた検討

本来、抗血小板薬であるシロスタゾールが、健常犬の一次止血機構に与える影響について、人医療での新規検査機器 T-TAS を用いて検討した。その際、抗血小板作用が確認されているアスピリンを対照薬とした。

第3章 実験的房室ブロック犬におけるシロスタゾールの心拍数増加効果に関する検討

第1章および第2章にて検討したシロスタゾールの投与量が、実験的に作出した房室ブロック犬の心室拍動数にどのように影響するか、ホルター心電図検査により検討した。

第 1 章

犬の徐脈性不整脈症例に対するシロスタゾールの使用状況とその有用性
に関する回顧的調査

1. 緒言

洞徐脈、洞停止（もしくは洞房ブロック）、洞不全症候群（Sick sinus syndrome : SSS）、房室ブロックなどの徐脈性不整脈は、犬の臨床現場で遭遇する機会が非常に多い [Kobayashi et al., 2003, Machida et al., 1990, Shibasaki et al., 2001, Alexio et al., 2017]。これらの徐脈性不整脈のうち、臨床徴候を伴うものにはペースメーカ植込み（Pacemaker implantation : PMI）が治療の第一選択となるが [Kobayashi et al., 2003]、獣医療においては様々な理由から PMI を実施できないことが多い。こうした徐脈性不整脈の犬には内科的治療が施されるが、近年使用される機会が増えているのがシロスタゾールである。

ホスホジエステラーゼ（Phosphodiesterase : PDE）Ⅲ阻害剤であるシロスタゾールは、SSS 罹患犬の治療に有効であることが報告されているが [Komiya et al., 2013, Kanno and Suzuki, 2017]、その有用性や至適用量に関する大規模な検討はなされていない。そこで本章では、国内の動物病院における徐脈性不整脈治療薬としてのシロスタゾールの使用状況、ならびに徐脈性不整脈を呈した犬におけるシロスタゾールの臨床的有用性を明らかにし、臨床例に基づく至適用量の検討を目的として、各種不整脈に対する治療反応性や予後に関して後ろ向き研究デザインにより解析した。

2. 材料および方法

2-1. 調査対象

2010年1月から2021年8月までの期間に、当センターまたは国内23動物病院に来院し、臨床徴候の発現を伴った徐脈性不整脈に対してシロスタゾール（シロスタゾール50mg、沢井製薬株式会社、大阪）を投与した犬を対象とした。本剤の使用にあたって、すべての飼い主には必要な情報を提供し、十分な理解が得られた上で投与した。すべての犬に血液検査を含むスクリーニング検査を実施し、一過性の徐脈性不整脈を引き起こし得る要因が認められた例は除外した。シロスタゾール投与を開始した後の再診日は担当獣医師の指示によって決定された。

2-2. 調査項目

徐脈性不整脈の種類、犬種、年齢（徐脈性不整脈診断時）、性別、合併する心疾患、心臓以外の基礎疾患の有無とその治療内容などの情報を収集した。シロスタゾール投与前に徐脈性不整脈の治療目的で使用した薬剤の有無やその内容、シロスタゾールの用量、併用した心血管系薬剤さらにシロスタゾール使用後の臨床徴候の改善の有無と心電図所見の変化についても調査した。なお今回の調査では、オピオイド、抗うつ薬、 β ブロッカー、ジルチアゼム、ジギタリスなど [Nelson and Couto, 2019]、陰性変時作用を有する薬剤で治療中の犬は除外することとした。また、シロスタゾールの投与開始後の生存期間、死亡した犬についてはその死因、シロスタゾールの投与を中止または中断した犬についてはその理由も明らかにした。犬の死因は不整脈関連と不整脈非関連に分類し、後者の場合には担当獣医師から死因となり得る異常所見について聴取した。

心電図記録は、原則としてホルター心電計を用いて3日間実施したが、洞徐脈の症例の中には標準双極四肢誘導（Ⅰ誘導、Ⅱ誘導、Ⅲ誘導）および増高単極肢誘導（aVR誘導、aVL誘導、aVF誘導）を用いて3分以上連続で記録した犬も含めた。

この調査では、徐脈性不整脈として、洞徐脈（心拍数が 60 bpm 未満で洞調律 [Romito et al., 2021a]）、洞停止（RR 間隔が 2.0 秒を上回る [Hall et al., 1991]）、第 2 度房室ブロック（QRS 群を随伴しない P 波の出現 [Kittleson, 1998]）、高度房室ブロック（連続する 3 つの P 波のうち 1 つが QRS 群を随伴する房室伝導比 3:1 の状態もしくはそれ以上 [Schrope and Kelch, 2006]）、第 3 度房室ブロック（P 波と QRS 群が無関係に出現 [Schrope and Kelch, 2006]）を含むこととした。第 2 度房室ブロックは Mobitz I 型（Wenckebach）と II 型に分けられ、前者では QRS 群が脱落する前に PQ 間隔は漸次延長するが、後者は PQ 間隔の延長を示さない。迷走神経緊張による心拍数低下を示唆する心電図所見が、発咳、排尿、嘔吐、排便、極度の興奮などが誘因となって生じたとみなされた場合には、神経調節性失神と診断した [Santilli et al., 2018]。また、上室性頻脈性不整脈の後に長時間の洞停止（および／あるいは洞房ブロック）が認められた場合には、SSS と診断した [Santilli et al., 2018]。なお、失神を脳の灌流量低下による一過性の意識消失と定義し、意識消失を伴わないものの姿勢緊張が突然喪失した場合を虚脱とした [Martin, 2017]。

2-3. エンドポイントの設定

主要エンドポイントは、不整脈関連死あるいはシロスタゾールによる徐脈性不整脈のコントロールが不可能となった場合の PMI 実施とした。Borgarelli et al. (2008) の犬での研究をもとに、この調査における不整脈関連死を、徐脈性不整脈による臨床徴候の進行に起因する死亡と定義した。難治性の徐脈性不整脈を理由に安楽死処置を受けた犬は、心臓関連死とした。睡眠中や歩行などの活動中に死亡した場合や、呼吸困難などの心不全徴候の発現から 2 時間以内に死亡し他の死因が明らかでない場合も、心臓関連死に含めた。なお、死因については担当獣医師が判断することとした。担当獣医師により徐脈性不整脈に起因しないと判断された死亡例、途中でシロスタゾールの投与を中止した例、および調査終了時点で生存しており投与継続中であった例をその時点で打ち切りとした。副次的エンドポイントは不整脈関連死を

含むすべての死亡および PMI 実施とし、途中で投与を中止した例および投与継続中であつた例を打ち切りとした。シロスタゾールの投与開始からエンドポイント到達、または打ち切りまでの日数を生存期間とした。

2-4. シロスタゾールの至適用量設定のための解析

健康犬を対象とした研究の結果に基づき [Fukushima et al., 2018]、シロスタゾールの 1 回あたりの投与量に応じて、A 群 (0~5.0 mg/kg)、B 群 (5.1~7.5 mg/kg)、C 群 (7.6~9.9 mg/kg)、D 群 (10.0 mg/kg 以上) の 4 群に層別した。これら 4 群に対して層別生存時間解析として、Log-rank 検定 (Cochran-Mantel-Haenszel 検定) を実施するとともに、Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成した。以上の解析結果から、治療成績が最も良好であると判断された投与量を至適用量とした。

2-5. 生存時間解析

主要エンドポイントおよび副次的エンドポイントについて、まず単変量 Cox 比例ハザード解析により、各変数がエンドポイントまでの時間と関連するかどうかを評価し、ハザード比と 95%信頼限界を算出した。変数として、年齢 (徐脈性不整脈診断時)、性別 (雄および去勢済み雄、または雌および避妊済み雌)、合併した心疾患の有無、第 3 度房室ブロックであるか否か、1 回あたりの投与量が至適用量以上であるか否かの 5 項目を設定した。

次に、単変量解析において p 値が 0.1 未満であつた変数を組み込み、多変量 Cox 比例ハザード解析を実施した。多変量 Cox 比例ハザード解析には減少法を用い、残りのすべての変数の p 値が 0.1 未満の場合に最終モデルとなるようにした。最終モデルに残った変数のハザード比と 95%信頼限界を算出した。

さらに、単変量解析および多変量解析によって、シロスタゾールによる治療効果および予後と強く関連すると予測された変数について層別した。Log-rank 検定

(Cochran-Mantel-Haenszel 検定) および一般化 Wilcoxon 検定 (Gehan-Breslow 検定) による生存率の比較、ならびに Kaplan-Meier 法による生存曲線の作成を行った。

すべての統計解析処理は、コンピューター統計解析ソフトであるエクセル統計 (BellCurve for Excel、株式会社社会情報サービス、東京) を用いて行い、いずれも $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 調査対象例の概要

本調査の対象となった犬は 59 例で、年齢の 1～16 歳（中央値：11 歳）であった。59 例の中に多く含まれていた犬種は、ミニチュア・ダックスフンド（10 例）、ミニチュア・シュнауザー（8 例）および柴犬（8 例）であった（表 1-1）。性別は雄 21 例（うち去勢済み 12 例）、雌 38 例（うち避妊済み 28 例）であった。59 例のうち 12 例では、不整脈以外に血液検査、画像検査にて異常所見はみられなかった。

7 例に血液尿素窒素の上昇（34.3～87.2 mg/dL、基準値：9.2～29.2 mg/dL）、1 例に血中クレアチニン濃度の上昇（1.7 mg/dL、基準値：0.4～1.4 mg/dL）、6 例にアラニンアミノトランスフェラーゼ活性の上昇（137～1,119 U/L）、基準値：17～78 U/L）、1 例にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の上昇（76 U/L、基準値：17～44 U/L）、15 例にアルカリホスファターゼ活性の上昇（229～3,500 U/L、基準値：24～117 U/L）が認められた。電解質の異常は 59 例のいずれにも認められなかった。

何らかの心疾患が確認された犬は 37 例であり、このうち 10 例は心疾患のみであったが、27 例は心臓以外にも疾患を有していた。心臓以外の疾患の内訳としては、膵炎 6 例、慢性腎臓病 5 例、甲状腺機能低下症 4 例、膀胱炎 3 例であり、気管虚脱、肺線維症、椎間板ヘルニア、アジソン病、特発性てんかんはそれぞれ 2 例に、緑内障、慢性鼻炎、進行性網膜萎縮、炎症性腸疾患、歯周病はそれぞれ 1 例にみられた。また、肝臓、脾臓および乳腺の腫瘍がそれぞれ 3 例に、副腎腫瘍および皮膚肥満細胞腫がそれぞれ 1 例に認められた（表 1-2）。心臓以外にも疾患を有していた 27 例では、その治療はシロスタゾール投与の少なくとも 6 ヶ月前には開始されており、シロスタゾールの投与中に治療薬の投与量を増減させることはなかった。

59 例のうち 6 例は、シロスタゾールの投与に先立って陽性変時作用を有する薬剤で治療されていた。そのうち、4 例にはアミノフィリン、1 例にはアトロピン硫酸塩が使用されていたが、そのいずれにおいても、徐脈性不整脈とそれに伴う臨床徴候

への影響はまったくみられなかった。これらの薬剤はシロスタゾールの投与開始に合わせて中止された。

3-2. 心疾患を有する犬 37 例

心疾患を有していた 37 例の犬のうち、17 例 (29%) では僧帽弁の粘液腫様変性性疾患 (MMVD) 単独であり、MMVD と三尖弁の粘液腫様変性性疾患 (MTVD) の併発も 17 例 (29%) にみられた。後者のうちの 1 例は大動脈弁閉鎖不全を伴っていた。そのほか、MTVD 単独が 2 例 (3%)、心室中隔欠損が 1 例 (2%) にみられた。

27 例の犬では、シロスタゾール投与の少なくとも 1 ヶ月前から心血管系の治療薬が使用されていた。残りの 10 例には、心血管系の治療薬は投与されていなかった。14 例にはピモベンダンが 0.2~0.5 mg/kg (中央値 0.25 mg/kg)、1 日 2 回、8 例にはフロセミドが 0.2~2.0 mg/kg (中央値 1.0 mg/kg)、1 日 2 回、7 例にはアンジオテンシン変換酵素阻害薬が 0.5~3.0 mg/kg (中央値 1.0 mg/kg)、1 日 2 回、3 例には硝酸イソソルビドが 0.5~2.0 mg/kg (中央値 1.0 mg/kg)、1 日 2 回、それぞれ 1 例ずつにアムロジピンが 0.1 mg/kg、1 日 2 回、シルデナフィルが 1.0 mg/kg、1 日 3 回、ベラプロスト Na が 2 µg/kg、1 日 2 回投与されていた。治療は原則として、アメリカ獣医内科学会による各心臓病の診断と治療に関するコンセンサスガイドラインに従って実施された [Acierno et al., 2018, Keene et al., 2019, Reinero et al., 2020]。10 例の犬では上記薬剤が併用されていた。シロスタゾールの投与開始時において、心血管系治療薬使用の有無に関わらず、すべての犬で心疾患はおおむね良好にコントロールされていた。シロスタゾールの投与中、これらの薬剤は継続投与された。

3-3. 徐脈性不整脈の内訳

最も多かった徐脈性不整脈は洞停止の 24 例（41%）であり、次いで第 3 度房室ブロックが 11 例（19%）、洞徐脈が 10 例（17%）に認められた。また、徐脈性不整脈と頻脈性不整脈とが交互に出現する SSS（徐脈頻脈症候群）も 6 例（10%）にみられた。そのほかに高度房室ブロックが 4 例（7%）、神経調節性失神が 2 例（3%）、洞徐脈と第 2 度房室ブロック（Mobitz II 型）の併発が 1 例（2%）、洞調律と房室接合部調律、心室調律の混在が 1 例（2%）に認められた（表 1-3）。

3-4. シロスタゾール投与後の臨床徴候の変化

59 例の犬すべてに、徐脈性不整脈に起因する臨床徴候（活動性の低下、失神、食欲低下、虚脱、嘔吐、運動不耐性など）が認められた。シロスタゾールの投与により、52 例（88%）で臨床徴候に改善がみられた。活動性の低下を示した 14 例についてはそのすべてで改善が得られており、失神の消失（31 例中 17 例）あるいは頻度の減少（31 例中 10 例）も観察された。そのほかの臨床徴候についても、食欲減退が 6 例中 5 例、虚脱が 9 例中 8 例、嘔吐が 4 例中 3 例、運動不耐性が 2 例中 1 例で改善していた。一方、7 例（12%）で臨床徴候の改善がみられなかったものの、臨床徴候が悪化した例は認められなかった（表 1-4）。

3-5. シロスタゾール投与後の心電図の変化

心電図検査は、シロスタゾール投与開始後 7~180 日（中央値 11 日）目に実施した。シロスタゾールの投与により、43 例の犬で不整脈の心電図所見に変化がみられた（表 1-5）。洞停止の症例では、24 例中 20 例で洞停止時間の短縮（投与前 - 6.1 ± 2.7 秒；投与後 - 3.5 ± 2.2 秒）および心拍数の増加（投与前 - 73.7 ± 38.4 bpm；投与後 - 109.0 ± 40.6 bpm、いずれも 1 日の平均心拍数）が認められた。また、17 例では洞停止の発生頻度も減少していた。洞徐脈の症例では、10 例中 8 例で心拍数の増加（投与前 - 60.8 ± 15.7 bpm；投与後 - 96.1 ± 31.4 bpm、いずれも 1 日の平均心拍数）

が認められた。これら 10 例のうち 7 例にはホルター心電図検査を実施することができたが、残りの 3 例については標準双極四肢誘導と増高単極肢誘導を用いることにより評価した。第 3 度房室ブロックの症例では、10 例中 3 例で心室拍動数の増加（投与前 - 30、12 および 59 bpm ; 投与後 - 120、59 および 73 bpm）が認められた。高度房室ブロックの症例では、4 例中 3 例でブロックの消失が確認され、1 例でブロックの発生頻度が減少していた。神経調節性失神の症例では洞停止時間の短縮がみられ、洞徐脈と Mobitz II 型第 2 度房室ブロックが認められた症例においては、心拍数の増加とブロックの減少が観察された。一方、15 例では心電図所見に明らかな変化は認められなかった。また 1 例では、シロスタゾールの投与後に心電図検査を実施しなかった。

3-6. シロスタゾール投与の中止

シロスタゾールを死亡時まで継続投与した症例は 28 例（47%）、2021 年 8 月の調査終了時点で投与継続中であった症例は 13 例（22%）であった。12 例（20%）ではシロスタゾールの投与が途中で中止されたが、その理由は 5 例（8%）が PMI の実施（14～1,178 日間継続）、2 例（3%）が不整脈の改善（それぞれ 90 日、609 日間継続）、2 例（3%）が効果なし（それぞれ 14 日、69 日間継続）であった。また、2 例（3%）ではシロスタゾールの副反応が疑われる臨床徴候が観察されたため投与が中止された。それらのうち、1 例はシロスタゾールの投与開始から 14 日後に嘔吐し、もう 1 例では投与 180 日後に心房粗動が発生した。後者には、その原因となるような重度の心房拡大を伴う心疾患は確認されず、他の薬剤の投与も受けていなかったため、シロスタゾールによる副反応の可能性が疑われた。これらの犬に再投与はなされなかった。

3-7. シロスタゾールの用量および用法

シロスタゾールの用量および投与回数については、これまでの症例報告 [Komiya et al., 2013, Kanno and Suzuki, 2017]、基礎研究 [Fukushima et al., 2018]などを参考に、担当獣医師の経験に基づいて決定された。最も多く選択された用量は 10.0～10.9 mg/kg、1 日 2 回 (20.0～21.8 mg/kg/day) であった。次に多かったのは、5.0～5.9 mg/kg、1 日 2 回 (10.0～11.8 mg/kg/day) であった。1 日あたりの最低用量は 3.5 mg/kg/day であり、最高用量は 37.5 mg/kg/day であった。投与回数は 1 日 1 回が 2 例、1 日 2 回が 52 例、1 日 3 回が 5 例であった。本調査における投与期間は 2～2,453 日 (中央値 288 日) であった。

3-8. エンドポイント

本調査で対象となった 59 例のうち、調査終了時点で主要エンドポイントに到達した症例は 17 例 (不整脈関連死 12 例、PMI 実施 5 例) であった。副次的エンドポイントに到達したのは 33 例 (不整脈関連死 12 例、PMI 実施 5 例、不整脈関連死以外の死亡 16 例) であった。不整脈関連死以外の死亡理由は、老衰 6 例、腎不全 4 例、MMVD によるうっ血性左心不全 2 例であり、膵炎、肺腫瘍、誤嚥性肺炎、原因不明がそれぞれ 1 例ずつであった。

3-9. シロスタゾールの至適用量の探索

A 群には 13 例、B 群には 8 例、C 群には 12 例、D 群には 26 例が含まれた。これらの層別生存時間解析の結果、生存時間中央値は A 群が 412 日、B 群が 341 日、C 群が 132 日、D 群が 1,178 日であった。D 群の生存率が他の 3 群と比較して明らかに高かったことから、以降の生存時間解析において、1 回あたりのシロスタゾールの至適用量は 10.0 mg/kg とした。なお、副反応の発現や程度について各群間に差は認められなかった。

3-10. 生存時間解析

単変量 Cox ハザード解析では、第3度房室ブロックであることは、主要エンドポイントに到達するリスクを有意に増加させ（ハザード比：3.74、95%信頼区間：1.42～9.83、 $p<0.01$ ）、シロスタゾールの1回あたりの用量が10 mg/kg以上であることは、副次的エンドポイントに到達するリスクを有意に減少させた（ハザード比：0.38、95%信頼区間：0.18～0.80、 $p=0.01$ ）（表 1-6）。また、当該症例が高齢であることは、副次的エンドポイントに達するリスクを高める傾向にあった（ハザード比：1.09、95%信頼区間：0.99～1.20、 $p=0.07$ ）（表 1-6）。

多変量 Cox ハザード解析については、主要エンドポイントに達した例数が少なかったため、主要エンドポイントに関する解析を行うことができなかった。副次的エンドポイントにおける多変量解析では、高齢であること、第3度房室ブロックであること、シロスタゾールの1回あたりの投与量が10 mg/kg以上であることの3変数が最終モデルに組み込まれた。高齢であること、および第3度房室ブロックであることは、副次的エンドポイントに到達するリスクを有意に増加させた（それぞれ、ハザード比：1.14、95%信頼区間：1.03～1.27、 $p=0.01$ 、およびハザード比：2.98、95%信頼区間：1.30～6.88、 $p=0.01$ ）（表 1-7）。そして、1回あたりのシロスタゾールの用量が10 mg/kg以上であることは、副次的エンドポイントに達するリスクを有意に減少させた（ハザード比：0.34、95%信頼区間：0.15～0.74、 $p<0.01$ ）（表 1-7）。

単変量および多変量 Cox 比例ハザード解析により、第3度房室ブロックを有する犬は、他の徐脈性不整脈を有する犬と比べて、主要および副次的エンドポイントに到達するまでの時間が有意に短かった（それぞれ Log-rank 検定で $p<0.01$ 、一般化 Wilcoxon 検定で $p<0.01$ 、および Log-rank 検定で $p=0.13$ 、一般化 Wilcoxon 検定で $p<0.01$ ）（図 1-1）。1回あたりのシロスタゾールの用量が10 mg/kg以上であった症例は、10 mg/kg未滿の症例よりも主要エンドポイントに達するまでの時間が長かったが、統計的有意差は得られなかった（Log-rank 検定で $p=0.08$ 、一般化 Wilcoxon 検定

で $p=0.14$)。これらの犬は、副次的エンドポイントに到達するまでの時間は有意に長かった (Log-rank 検定で $p<0.01$ 、一般化 Wilcoxon 検定で $p=0.03$) (図 1-2)。

4. 考察

今回の調査では、犬の徐脈性不整脈症例に対するシロスタゾールの使用状況、適切な投与量、徐脈性不整脈の種類による有用性と予後の差異に関して、多くの重要な知見を得ることができた。

本調査では、徐脈性不整脈罹患犬 59 例中 41 例に洞徐脈、洞停止、SSS が認められた。このうち、8 例 (20%) はミニチュア・シュナウザー、7 例 (17%) はミニチュア・ダックスフンド、5 例 (12%) はアメリカン・コッカー・スパニエルであった。性別は、雄または去勢済み雄が 10 例 (24%) であったのに対し、雌または避妊済み雌は 31 例 (76%) であった。SSS はミニチュア・シュナウザー、ダックスフンド、コッカー・スパニエル、ウエスト・ハイランド・ホワイト・テリア、パグなどの犬種に好発し、中年齢から高齢の雌に多くみられることから、遺伝的素因の関与が指摘されている [Rishniw and Thomas, 2000, Edwards, 1987, Ware, 2011]。今回の SSS の症例のプロフィールは、これまでの報告と符合していた [Rishniw and Thomas, 2000, Edwards, 1987, Ware, 2011]。

一方、房室ブロックは 59 例中 16 例に認められた。これら 16 例のうち 4 例 (25%) は柴犬であり、3 例 (19%) はミニチュア・ダックスフンドであった。房室ブロックは、ダックスフンドやコッカー・スパニエル (房室接合部における特発性心筋線維化) など、RR 間隔の延長が起こりやすい犬種でその発生率が高いとする報告がある [Tilley, 1992]。また、先天性のヒス束狭窄が報告されているパグや、房室伝導系細胞の変性・脱落が多いとされるドーベルマン・ピンシャーなどの犬種においてもその発生率が高い [Tilley, 1992]。なお、柴犬が多く含まれていた理由として、本邦での飼育頭数が多いことに起因している可能性はあるが [Uddin et al., 2013]、病因については明らかでない。雄と去勢済み雄、雌と避妊済み雌がそれぞれ 8 例 (50%) ずつ含まれており、性別による偏りは認められなかった。

今回の調査対象となった徐脈性不整脈 59 例のうち、最も多かったのが洞停止の 24 例 (41%) であり、第 3 度房室ブロックの 11 例 (19%) がこれに次いでいた。

Uchino et al. (2007)は、転倒、運動不耐性あるいは失神を呈する犬にホルター心電図検査を実施したところ、洞停止が 22.0%と最も多く、第 3 度房室ブロックは 4.7%と少なかった。今回の調査結果は、発生傾向についてはこの報告に近いものであったが、Uchino et al. (2007)の報告には頻脈性不整脈も含まれていたことが、両者間の発生率の違いにつながったのかもしれない。

洞停止を呈した 24 例中 20 例 (83%) において、シロスタゾールの投与によって洞停止時間の短縮および発生頻度の減少がみられた。シロスタゾールは、摘出した洞結節標本に対して陽性変時作用を示すことから、洞結節に直接作用する可能性が指摘されている [Saito et al., 1995]。この機序としては、cAMP を介した細胞内情報伝達系の活性化による洞結節細胞の自動能亢進や、実験犬で示されている冠動脈灌流量の増加 [Shintani et al., 1985]による洞結節機能の改善などが考えられている [Yamashita et al., 1999]。したがって、シロスタゾールは洞結節機能障害に起因する不整脈である洞徐脈や洞停止、SSS に対して有効な治療薬となる可能性がある。近年、私どもの研究室では、犬においてシロスタゾールが QT 間隔に影響を及ぼすことなく、PQ 間隔を有意に短縮することを報告している [Fukushima et al., 2018]。したがって、シロスタゾールは房室伝導が維持されている症例や、房室伝導に異常があるものの完全には遮断されていない症例に対して有用である可能性がある。今回の調査でも、高度房室ブロックを呈した 4 例すべてで 1 日あたりの房室ブロック発生頻度の減少もしくは消失を確認している。

第 3 度房室ブロックを呈した 11 例すべてにおいて、シロスタゾールの投与により房室ブロックは消失しなかったが、これら 11 例のうち 7 例 (64%) では心室拍動数が 10~100 bpm 増加した。同様の所見は、第 3 度房室ブロックを認めた犬 [Komiya et al., 2013]およびヒト [Kodama et al., 2003]で報告されており、房室ブロック自体は消失していないにも関わらず、心室性補充調律のペースが速まっている。シロスタ

ゾールが第3度房室ブロック症例の心室拍動数を増加させるメカニズムについては明らかにされていないが、冠動脈の拡張 [Shintani et al., 1985]や cAMP の増加 [Okuda et al., 1993]が関与している可能性がある。今回の調査では、シロスタゾールの投与により、第3度房室ブロックを有する犬 11 例中 8 例 (73%) で臨床徴候の改善もみられた。したがって、飼い主の経済的な制約、専門の治療チームや機器の不足などの理由から PMI の実施が困難な場合に、QOL の維持ないしは向上を目的としてシロスタゾールの使用を検討する価値はあると考えられる。

その一方で、第3度房室ブロックの犬の生存率は、他の徐脈性不整脈の生存率と比較して有意に低く、主要エンドポイントに達するリスクが有意に高いことが明らかになった (11 例中 9 例 : 82%)。その理由として、シロスタゾールの投与により心室拍動数の増加が得られないか、あるいは増加が認められても全身への血液供給が不十分な症例の多いことが挙げられる。

単変量 Cox 比例ハザード解析では、高齢であるほど副次的エンドポイントに到達するリスクが高まる傾向にあったが、主要エンドポイントに達するリスクは増加させなかった。副次的エンドポイントに達した症例のうち、不整脈関連死以外の死亡原因は老衰と腎不全であり、当然ではあるが高齢犬に多くみられるものであった。また、不整脈以外の原因で死亡した例は、副次的エンドポイントに達した 33 例のうち 16 例 (48%) であった。以上のことから、シロスタゾールの投与は多くの例で長期的な治療管理を可能にし得ることが明らかになった。

犬でのこれまでの報告では [Komiya et al., 2013, Kanno and Suzuki, 2017, Fukushima et al., 2017a, Fukushima et al., 2017b]、シロスタゾールは 1 回あたり 5~10 mg/kg、1 日 2 回使用されていた。しかし、大規模な症例サンプルを用いた臨床研究は、前向き研究、後ろ向き研究ともに実施されていない。そこで今回の調査では、単変量解析および多変量解析による総合的な評価に先立って、投与量に関して探索的解析を実施した。その結果、1 回あたり 10 mg/kg 以上の用量で治療した群で最も生存率が高く、徐脈性不整脈の犬の長期生存に有用であることが明らかになった。この有用性

を検証するために、1回あたりの用量が10 mg/kg以上であることをCox比例ハザード解析における変数として組み込んだ。さらに、投与量が10 mg/kg以上であった群と10 mg/kg未満の群における生存曲線を比較したところ、10 mg/kg以上の群で生存率が上昇していることが明らかになった。Komiya et al. (2013)は、Rubenstein II型SSSの犬にシロスタゾールを5 mg/kg、1日2回投与したところ、心電図所見にほとんど変化がみられなかったものの、9.3 mg/kgに増量すると洞停止時間の短縮および頻度の減少が認められたとしている。したがって、従来開始用量とされていた1回あたり5 mg/kgの投与量では有効性に乏しく、10 mg/kg以上の投与量がより適切である可能性が高い。今回の調査結果と従来の推奨用量が一致しない理由として、臨床的に健常な若齢ビーグル犬を用いた実験的研究 [Fukushima et al., 2018]と、心臓に器質的または機能的な異常を有している可能性が高い高齢犬が主体をなしている臨床例 [Schrope and Kelch., 2006, Ward et al., 2016]との違いが挙げられる。

今回の調査において、シロスタゾールは大多数の症例（59例中52例：88%）では1日2回、5例（8%）では1日3回投与されており、後者のうち1頭は1回あたり9.5 mg/kg、他の4例はすべて10 mg/kg以上であった。1日3回投与の5例については、当初1日2回の投与であったが、臨床徴候の改善が乏しいために3回に増やしていた。このうち3例は増量後に臨床徴候の改善が認められ、その後も同量のシロスタゾールによる治療が継続された。残りの2例ではシロスタゾールの効果が不十分であり、いずれもPMIの実施へと移行した。Akiyama et al. (1985)は、犬におけるシロスタゾールの半減期は1.6時間であると報告している。また、健常犬を用いた研究では、有意な心拍数の増加が維持されたのはシロスタゾール投与後11時間までであった [Fukushima et al., 2018]。これらのことから、1日2回投与の場合、シロスタゾールの効果が十分に維持されない時間帯が存在する可能性がある。したがって、これまでの報告でも指摘されているように [Komiya et al., 2013]、徐脈性不整脈の症例においてシロスタゾールの1日2回投与で効果が不十分な場合、1日3回投与することで効果が得られる可能性がある。しかしながら、健常犬を対象とした毒性試験

において、シロスタゾールを 30 mg/kg/day の用量で 13 週間経口投与したところ、冠状動脈の内膜および中膜肥厚や心筋の線維化がみられたとされている [Nagano et al., 1985b]。今回の調査対象の中にも 13 週間を超えて投与された例が含まれており、病的な変化をきたしていた可能性は否定できない。さらに、本調査の結果から、1 回あたり 10 mg/kg 以上の投与量が望ましいこと、1 日 2 回の投与に比べて 1 日 3 回の方が有用である可能性が高いことが明らかになったが、その場合には 1 日の投与量が 30 mg/kg を超えることになり、副反応が懸念される。したがって、シロスタゾールを 1 日 3 回、1 回あたり 10 mg/kg 以上の用量で投与する場合には、より注意深いモニタリングが必要である。

人医療において、徐脈性不整脈を有する患者にシロスタゾールを使用したところ、洞頻脈 [Nimura et al., 2011]や突発的な心室性頻脈 [Gamssari et al., 2002]が発生したことが報告されている。今回の調査では、心房粗動が発生した 1 例を除き、頻脈性不整脈の発生は認められなかった。この症例に関しては、重度の心房拡大を伴う心疾患は確認されず、他の薬剤の投与も受けていなかったことから、シロスタゾールの副反応である可能性を疑った。しかし、微小な心房ミオパチーを完全に除外することはできず、不整脈誘発基質を併発していた可能性もある。さらに、心房粗動の発生はシロスタゾールの投与とは必ずしも関係なく、洞結節への迷走神経刺激の変動（すなわち、機能性心房粗動）を含めた他の交絡因子の関与も考慮する必要があるかもしれない [Romito et al., 2022a, Romito et al., 2022b]。

犬では、電解質異常、陰性変時作用を有する薬物の投与、自律神経機能に影響を及ぼす内分泌疾患、迷走神経緊張を引き起こす慢性呼吸器疾患および消化器疾患なども徐脈性不整脈を惹起する [Toaldo et al., 2017, Romito et al., 2021b, Kaneshige et al., 2007a, Kaneshige et al., 2007b]。今回調査した徐脈性不整脈罹患犬には、電解質異常はみられず、陰性変時作用を有する薬物の投与もなされていなかった。一方で、甲状腺機能低下症、アジソン病、肺線維症、気管虚脱、炎症性腸疾患、肝臓腫瘍、脾臓腫瘍などを有する犬が含まれていた。これらの犬はすべて、シロスタゾール投与の 6

ヶ月前から基礎疾患に対する治療を受けており、シロスタゾールの投与中、少なくとも心電図記録を行うまでの間に当該疾患の治療法に変更はなかった。したがって、これらの疾患の有無は、シロスタゾールの投与結果にほとんど影響していないものと考えられる。

今回の調査対象となった症例の併発心疾患として多くみられたのが、MMVD 単独の 17 例 (29%) と、MTVD を伴う MMVD の 17 例 (29%) であった。これら MMVD を有していた犬はすべて、徐脈性不整脈の診断時点でアメリカ獣医内科学会の分類による病期は B1 または B2 であり [Keene et al., 2019]、2021 年 8 月の調査終了時点において心不全徴候は認められなかった。その他の心疾患についても、徐脈性不整脈と診断された時点では、いずれも入院治療を必要とするような重篤なものは見られなかった。僧帽弁や三尖弁に生じる器質的変化は、粘液腫様変性に起因する慢性変性性弁疾患と呼ばれるものが多く、高齢の犬に比較的高率に発生する。今回の調査対象例の多くは、粘液腫様変性が好発する中年齢から高齢層であり [Keene et al., 2019]、シロスタゾール以外の薬剤による治療を受けていた。しかし、別に心疾患を有している場合のハザード比は 1.0 以下であった。以上のことから、これらの犬にみられた心疾患は比較的軽度であったか、あるいはピモベンダンで十分にコントロールされており、シロスタゾール自体の有用性の検証に与える影響は極めて小さいものであったと考えられる。

今回の調査にはいくつかの制限事項が存在する。第一に、調査に供した症例数が少ないことである。本来は、主要エンドポイントにおける多変量 Cox 比例ハザードモデルによる解析を実施する予定であった。しかし、主要エンドポイントに到達した症例数が少なかったため、この統計手法は断念せざるを得なかった。徐脈性不整脈に対するシロスタゾールの使用については、いまだ不明な点が多く、より多くの症例での検討が必要である。第二の制限は、個々の死因が不整脈に関連するか否かの判断を、それぞれの症例の担当獣医師に委ねた点である。不整脈に関連しない死亡の理由として、腎不全や心不全が挙げられた。しかし、これらを徐脈性不整脈に

起因するものと明確に区別することは困難であった。第三に、本調査の多くの症例では、シロスタゾール投与前後の心拍数や洞停止時間などの改善度合いをホルター心電図記録によって判定している。しかしながら、一部の症例では、標準四肢誘導を用いた心電図検査で行われた。標準四肢誘導による心電図記録はかなり短時間であり、得られる情報量が限られているため、解析結果もホルター心電図に比べて劣る点に留意する必要がある。第四に、今回調査対象とした症例には、不整脈の他に心疾患および／または非心疾患を有するものが含まれていた。可能な限り様々な要因を排除するように努めたが、不整脈以外の疾患がシロスタゾールの効果を制限または促進した可能性を完全に否定することはできない。最後に、シロスタゾール投与前後の臨床徴候の変化については、主に飼い主の稟告から判断したため、一部の症例では過大または過小評価された可能性がある。

結論として、徐脈性不整脈を有する犬に対するシロスタゾールの臨床的有用性が確認された。今後、本剤の投与効果をより詳細に把握するために、PMIを受けた犬と生存時間等を比較するべく、さらに多角的な検討が必要である。

5. 小括

シロスタゾールは近年、徐脈性不整脈を呈する犬に対して、PMI を代替する治療薬として使用されることが多い。しかし、これまでに大規模な臨床的研究報告はなく、本剤の用量は経験的に選択されているため、今回その使用状況と有用性に関して回顧的に調査した。

当センターおよび国内 23 動物病院に来院し、臨床徴候を伴った徐脈性不整脈に対してシロスタゾールを投与した犬 59 例を対象とした。年齢、犬種、性別、合併した心疾患、心臓以外の基礎疾患、徐脈性不整脈の種類、併用薬剤の有無について調査した。さらに、これらの犬をシロスタゾールの 1 回あたりの投与量ごとに層別し、至適用量の検討と不整脈ごとの治療反応性を明らかにすることを目的に生存時間解析を行った。

徐脈性不整脈罹患犬 59 例のうち、洞停止は 24 例、第 3 度房室ブロックは 11 例、洞徐脈は 10 例、SSS（徐脈頻脈症候群）は 6 例に認められた。層別生存時間解析の結果、1 回あたり 10 mg/kg 以上の用量で投与していた群において最も高い生存率であった。したがって、徐脈性不整脈を呈する犬に対してシロスタゾールを使用する場合には、従来開始用量とされてきた 5 mg/kg、1 日 2 回の投与では有効性が低く、10 mg/kg を 1 日 2 回投与するのが適しているものと考えられた。なお、1 日 2 回の投薬を実施しているものの有効性に乏しい症例については、1 日 3 回に増やすことで良好な治療効果が得られる可能性がある。一方、生存率に関して、第 3 度房室ブロック罹患犬と第 3 度房室ブロック以外の徐脈性不整脈罹患犬とを比較すると、前者が有意に下回っていた。しかしながら、第 3 度房室ブロック症例の中には心室拍動数が増加していた犬も含まれていたことから、QOL の向上および維持を目的としてシロスタゾールを使用する価値はあると考えられた。

表 1-1. 犬種の構成

犬種	例数
ミニチュア・ダックスフンド	10
ミニチュア・シュナウザー	8
柴	8
アメリカン・コッカー・スパニエル	6
トイ・プードル	4
チワワ	4
シー・ズー	3
ポメラニアン	3
ケアン・テリア	2
ウエストハイランド・ホワイト・テリア	2
キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル	2
ペキニーズ	2
チベタン・スパニエル	1
ウィペット	1
ヨークシャー・テリア	1
ミニチュア・ブルテリア	1
雑種	1
合計	59

表 1-2. 心臓以外の併発疾患

疾患	例数
肺炎	6
慢性腎臓病	5
甲状腺機能低下症	4
膀胱炎	3
肝臓腫瘍	3
脾臓腫瘍	3
乳腺腫瘍	3
気管虚脱	2
肺線維症	2
椎間板ヘルニア	2
アジソン病	2
特発性てんかん	2
緑内障	1
副腎腫瘍	1
慢性鼻炎	1
進行性網膜萎縮	1
炎症性腸疾患	1
皮膚肥満細胞腫	1
歯周病	1
合計	44
併発疾患なし（不整脈のみ）	23

同症例に複数の併発疾患を認めた場合、それぞれの疾患名としてカウントした。

表 1-3. 徐脈性不整脈の内訳

診断名	例数	割合
第3度房室ブロック	11	19%
高度房室ブロック	4	7%
洞徐脈	10	17%
洞徐脈 + 第2度房室ブロック (Mobitz II型)	1	2%
洞停止	24	41%
SSS III型 (徐脈頻脈症候群)	6	10%
神経調節性失神	2	3%
洞調律と房室接合部調律、心室調律の混在	1	2%
合計	59	100%

SSS : 洞不全症候群

表 1-4. シロスタゾール投与後の臨床徴候の変化

臨床徴候	徴候の改善			
	例数		例数	割合
失神	31	消失	17	55%
		減少	10	32%
		合計	27	87%
虚脱	9		8	89%
活動性の低下	14		14	100%
食欲減退	6		5	83%
嘔吐	4		3	75%
運動不耐性	2		1	50%
		改善なし	7	12%
		悪化	0	0%

表 1-5. シロスタゾール投与後の心電図の変化

改善の有無	診断名	心電図学的変化	例数	割合
改善あり			43	73%
	第3度房室ブロック	心室拍動数の増加	3	
	高度房室ブロック	房室ブロックの消失	3	
		房室ブロックの減少	1	
	洞徐脈	心拍数の増加	8	
	洞停止	洞停止時間の短縮 + 洞停止の減少 + 心拍数の増加	17	
		洞停止時間の短縮 + 心拍数の増加	3	
	SSS III型（徐脈頻脈症候群）	洞停止時間の短縮	3	
	神経調節性失神	洞停止時間の短縮	2	
	洞徐脈 + 第2度房室ブロック（Mobitz II型）	心拍数の増加 + 房室ブロックの減少	1	
改善なし			15	25%
悪化			0	0%
不明			1	2%
合計			59	100%

SSS：洞不全症候群

表 1-6. 単変量 Cox 比例ハザード解析による主要・副次的エンドポイント到達リスク

変数	主要エンドポイント			副次的エンドポイント		
	ハザード比	95%信頼区間	p 値	ハザード比	95%信頼区間	p 値
年齢	0.94	0.84-1.06	0.31	1.09	0.99-1.20	0.07
性別（雌または避妊雌）	1.07	0.39-2.90	0.90	0.81	0.40-1.66	0.57
併発心疾患（あり）	0.70	0.27-1.86	0.48	0.84	0.41-1.72	0.63
第3度房室ブロック	3.74	1.42-9.83	< 0.01	1.82	0.84-3.97	0.13
シロスタゾールの用量が10 mg/kg以上	0.40	0.14-1.14	0.09	0.38	0.18-0.80	0.01

主要エンドポイント：不整脈関連死またはシロスタゾールにより徐脈性不整脈のコントロールが不可能となった場合の PMI 実施

副次的エンドポイント：不整脈関連死を含むすべての死亡またはシロスタゾールにより徐脈性不整脈のコントロールが不可能となった場合の PMI 実施

表 1-7. 多変量 Cox 比例ハザード解析による副次的エンドポイント到達リスク

変数	ハザード比	95%信頼区間	p 値
年齢	1.14	1.03-1.27	0.01
第3度房室ブロック	2.98	1.30-6.88	0.01
シロスタゾールの用量が10 mg/kg以上	0.34	0.15-0.74	<0.01

減数法にて、残りのすべての変数の p 値が 0.1 未満の場合に最終モデルとなるように行った。

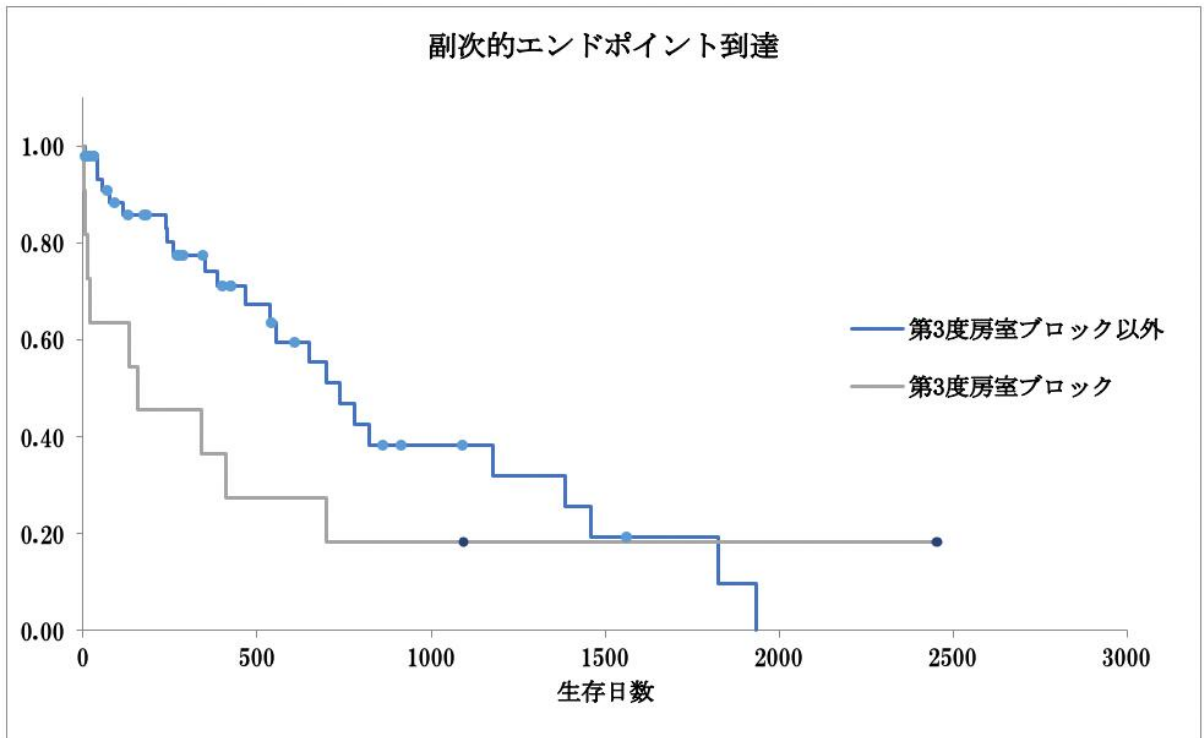
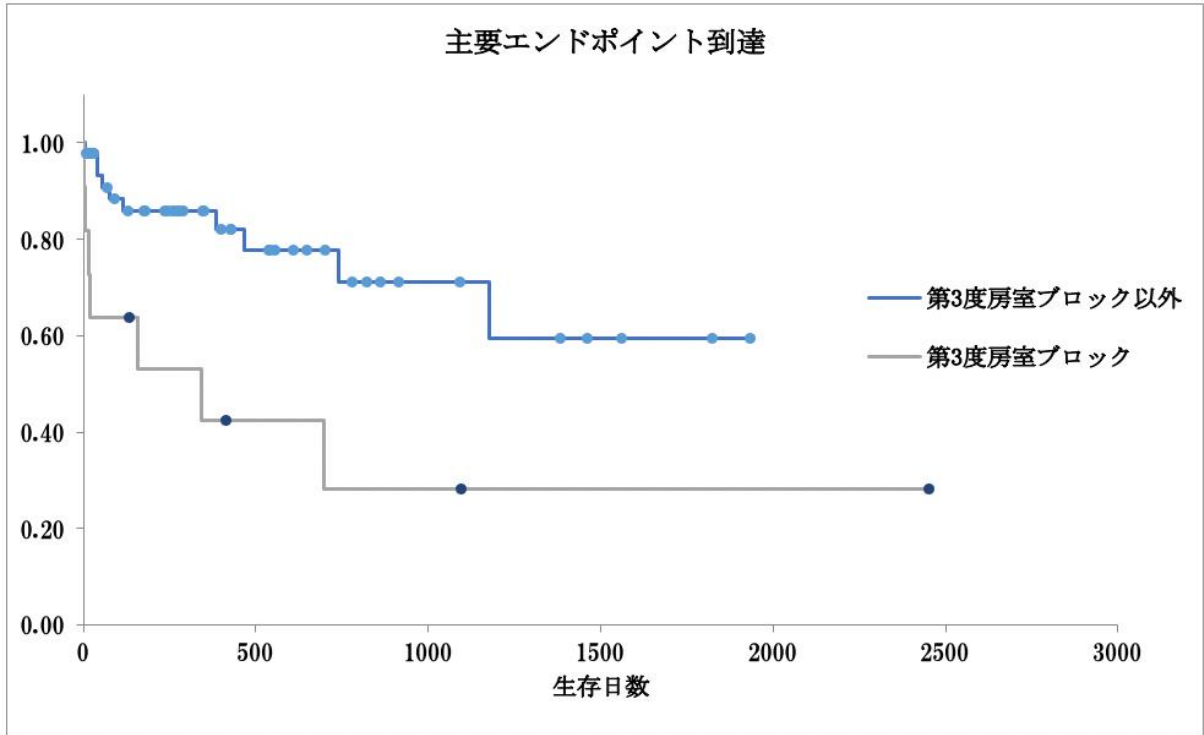


図 1-1. 第 3 度房室ブロックとそれ以外の不整脈症例の生存曲線

Kaplan-Meier 法で作成。打ち切り症例を●で示す。

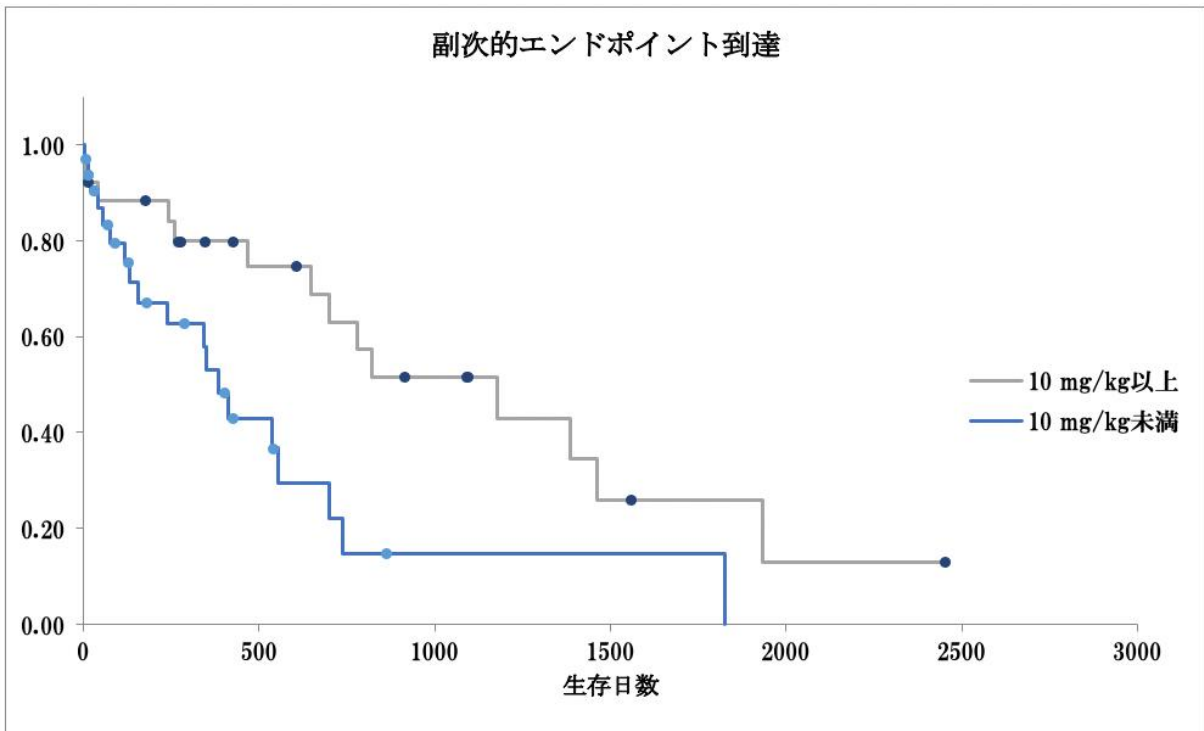
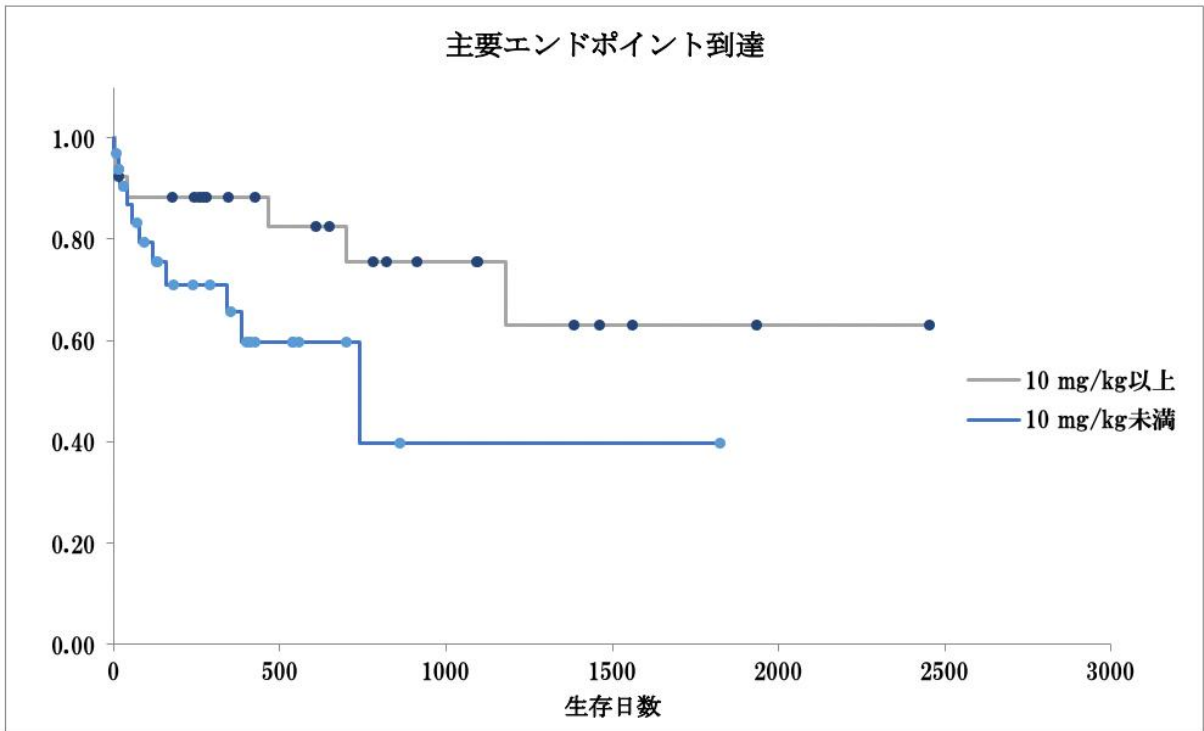


図 1-2. シロスタゾールの 1 回あたりの投与量を 10 mg/kg を境に分けた際の生存曲線 Kaplan-Meier 法で作成。打ち切り症例を●で示す。

第 2 章

健常犬におけるシロスタゾールの抗血小板作用に関する
全血血栓形成観測システム T-TAS を用いた検討

1. 緒言

近年、徐脈性不整脈の内科的治療薬として注目されているシロスタゾールは、ホスホジエステラーゼ（Phosphodiesterase : PDE）Ⅲ阻害作用により血小板内の環状アデノシンーリン酸（Cyclic adenosine monophosphate : cAMP）を増加させ、血小板凝集を抑制することが、ヒトおよび犬を用いた実験で明らかにされている [Kariyazono et al., 2001, Kimura et al., 1985]。本剤はこの血小板凝集抑制作用に基づき、脳梗塞や慢性動脈閉塞症を発症した患者を対象に、再発予防を目的とした抗血小板薬として認可されている [Kwon et al., 2005, Noma and Higashi, 2018]。ヒトへのシロスタゾール投与に伴う潜在的なリスクとして、出血や凝固時間の延長などの止血異常が挙げられ、それらのチェックが重要な課題となる。しかしながら、シロスタゾール投与中の犬で、止血異常の有無について調査した報告はなく、臨床用量で投与された際の抗血小板作用や一次止血機構の変化についても明らかにされていない。

従来、獣医療では一次止血機構の評価法として、血小板数の測定、血液塗抹標本上での血小板形態の観察、頬側粘膜出血時間（Buccal mucosal bleeding time : BMBT）の計測などが用いられてきた [Aumann et al., 2013]。しなしながら、血管内での血栓形成には血液成分だけでなく血流や血管壁の状態も大きく関与しており、これらの複合的な事象を単一の検査や項目によって評価することは極めて難しい [Hosokawa et al., 2011]。こうした背景の下、近年、マイクロチップ型フローチャンバーを使用して血流下における全血の血栓形成能を解析する全血血栓形成能解析装置（Total Thrombus-formation Analysis System : T-TAS、藤森工業、東京）が開発された。2種類の専用チップであるARチップとPLチップを使用することで、ヒトと同様に犬の止血凝固能も評価できることがこれまでに報告されている [Iwanaga et al., 2020, Iwanaga et al., 2017, Yamada et al., 2019, Yamada et al., 2018]。

第1章において、1回あたりのシロスタゾールの至適用量は10 mg/kgであることが明らかになった。そこで第2章では、本剤をこの投与量で用いた場合に血小板機

能を含む犬の止血凝固能が影響を受けるか否かを検証することとした。まず、健常犬の全血サンプルを T-TAS で測定することにより、シロスタゾールの投与前後における生体外の一次止血機構への影響を評価した。さらに、生体内の一次止血機構の変化を評価するため、BMBT の計測も行った。加えて、犬の抗血小板薬として臨床的に広く使用されているアスピリンを対照薬として用いた。アスピリンはシクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase : COX) -1 阻害薬であり、シロスタゾールとは異なる作用機序で血小板凝集を抑制する。本実験ではアスピリンを治療用量で投与し、T-TAS と BMBT の測定結果をシロスタゾール投与の前後に得られたものと比較検討した。

2. 材料および方法

2-1. ガイドラインの遵守

本実験は、東京農工大学動物実験倫理規定に準拠して実施した（承認番号：第 31-58 号）。

2-2. 生体外における一次止血機構の評価

2-2-1. 供試動物

本実験に先立って、身体検査、完全血球計算、血液生化学検査を実施し、臨床的に健常と判断されたビーグル犬（オリエンタル酵母工業株式会社、東京）12 頭を供試した。性別は雄と雌それぞれ 6 頭ずつ、年齢は 1～5 歳（中央値：2 歳）、体重は 9.2～10.6 kg（中央値：10.2 kg）であった。食餌は成犬用健康維持食（Eukanuba Adult maintenance：株式会社アイムスジャパン、東京）を、1 日あたり $1.8 \times [70 \times (\text{体重 kg})^{0.75}]$ kcal [Crane et al., 2000] となるように 2 回に分けて与え（午前 8 時と午後 5 時）、水はステンレス容器を用いて自由飲水とした。実験期間中、犬はそれぞれ個別のケージに収容し、室温 21 ± 2 °C、湿度 50 ± 20 %、12 時間交代の明暗サイクルにて維持した。

2-2-2. 投与薬剤

12 頭の犬を無作為に、シロスタゾール投与群（以下、Cilo 群）6 頭とアスピリン投与群（以下、Aspi 群）6 頭に分けた。Cilo 群の 6 頭には、シロスタゾール（シロスタゾール 50 mg、沢井製薬株式会社、大阪）を 2 錠（9.3～10.8 mg/kg、中央値：10.1 mg/kg）、1 日 2 回（午前 8 時と午後 8 時）、経口投与した。Aspi 群の 6 頭には、アスピリン（アスピリン「日医工」、株式会社日医工、富山）を 2 mg/kg の用量で 1 日 1 回（午前 8 時）、経口投与した。いずれの薬剤も 7 日間連続で投与した。

2-2-3. 採血方法

6.65 mL の血液サンプルを、頸静脈より 21G 針を用いて採取した。採血時に鎮静処置は施さなかった。採血後、3 mL を PL チップ用ヒルジン採血管（ヒルジン濃度 15 µg/mL）、2.7 mL を AR チップ用クエン酸採血管（3.8 %クエン酸 0.3mL 入り）、0.45 mL を凝固検査用採血管、0.5 mL をエチレンジアミン四酢酸（Ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA）採血管へこの順序で分注した。

各種検査はそれぞれの薬剤の投与前と投与後に実施した。その際、薬物の代謝を考慮して、上記採血は事前に設定した時間内に行うこととした（午前 11 時～12 時、両薬剤の最終投与から 3～4 時間後）。各採血管へ分注したのち、完全血球計算、血液凝固検査および T-TAS を用いた測定を実施した。

2-2-4. 完全血球計算

EDTA 採血管に分注した全血サンプルを、十分に混和してから測定に供した。全自動血球計数装置（MEK-6450 Celltac α：日本光電工業株式会社、東京）を用いて、総白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（HGB）、ヘマトクリット値（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）および血小板数（PLT）を測定した。

2-2-5. 血液凝固系検査

採取直後の全血 0.45 mL に 3.2 %クエン酸溶液 0.05 mL を添加し、血液：クエン酸比を 9：1 とした。この採血管を室温にて遠心分離（1,500×g、5 分間）し、血漿を得た。その後、血液凝固分析装置（WAKO Coag 2V：和光純薬工業株式会社、東京）を用いて、プロトロンビン時間（PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、フィブリノーゲン濃度（Fibn）を測定した。

PT の測定には、PT・APTT 測定用希釈液 B 50 µL（和光純薬工業株式会社、東京）と上記手順で得られたクエン酸加血漿 50 µL とを混合し、2 倍に希釈した血漿

100 μL を作製した。その後、トロンボプラスチン試薬カード（ウサギ脳由来）の試料挿入部に、希釈血漿 25 μL を添加して測定した。APTT の測定においても、PT 測定時に作製した 2 倍希釈血漿 25 μL を、活性化部分プロトロンビン含有試薬カード（ウサギ脳由来）の試料挿入部に添加して測定した。Fibn の測定には、フィブリノーゲン測定用希釈液 B 350 μL （和光純薬工業株式会社、東京）に、上記手順で得たクエン酸加血漿 25 μL を加えて混合し、15 倍に希釈した血漿 375 μL を作製した。その後、フィブリノーゲン試薬カード（ウシトロンビン）の試料挿入部に、15 倍希釈血漿 25 μL を添加して測定した。

各測定項目の参考値として、和光純薬工業株式会社で得た値（変動係数（CV）に関しては、PT、APTT、Fibn のそれぞれについて 10 %以下の範囲、正確性に関しては、PT、APTT のそれぞれについて既知凝固時間の ± 10 %以内、Fibn については既知濃度の ± 15 %以内）を用いた。

2-2-6. T-TAS

T-TAS では、2 種類の専用チップである AR チップと PL チップを使用した [Iwanaga et al., 2020]。AR チップは凝固因子と血小板による混合血栓を評価するチップであり、一次止血機構、二次止血機構の両者の影響を受ける。一方で、PL チップは血小板血栓を評価するチップであり、主に一次止血機構を反映する。PL チップでは、ヒルジン処理した全血 320 μL をそのまま測定に使用したが、AR チップでは、クエン酸処理した全血 480 μL に 1.25 mg/mL のコーントリプシン阻害薬を含む 0.3 M カルシウム溶液 20 μL を混合して凝固因子活性を回復させた上で測定した。

マイクロ流路内の流速とシェアストレスに関しては、過去の報告を参考に、AR チップは流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、シェアストレス 600 sec^{-1} 、PL チップは流速 18 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、シェアストレス $1,500 \text{ sec}^{-1}$ とした [Iwanaga et al., 2020, Iwanaga et al., 2017, Yamada et al., 2019, Yamada et al., 2018]。AR チップと PL チップのマイクロ流路にそれぞれの全血サンプルを流し、血栓形成に伴う内圧の上昇を測定した。各チップの内圧が基線よ

り+10 kPa に到達した時点を閉塞開始時間 (Time to 10 kPa 以下 T₁₀)、AR チップでは基線より+80 kPa、PL チップでは+60 kPa の時点をそれぞれ閉塞時間 (Occlusion time 以下 OT) として、それらの時間と圧上昇曲線の下部領域面積 (AUC) を計測した。

2-3. BMBT を用いた生体内における一次止血機構の評価

2-3-1. 供試動物

本実験に先立って、身体検査、完全血球計算、血液生化学検査を実施し、臨床的に健常と判断されたビーグル犬 6 頭を供試した。これらのビーグル犬はすべて十分に馴化されていた。性別は雄と雌それぞれ 3 頭ずつ、年齢は 1~5 歳 (中央値 : 2 歳)、体重は 9.2~10.6 kg (中央値 : 9.9 kg) であった。これら 6 頭も、T-TAS の測定に用いた 12 頭と同様に飼育管理した。

2-3-2. 投与薬剤

6 頭の犬にシロスタゾールを 2 錠 (9.3~10.8 mg/kg、中央値 : 10.2 mg/kg)、1 日 2 回 (午前 8 時と午後 8 時)、またはアスピリンを 2 mg/kg の用量で 1 日 1 回 (午前 8 時)、経口投与した。いずれの薬剤も 7 日間連続で投与した。

2-3-3. 実験プロトコール

本実験では、供試犬を無作為に 3 頭ずつの 2 群に分け、クロスオーバー法を採用した。投与の順序が測定結果に影響しないよう、最初の薬剤の最終投与から次の薬剤の投与開始まで 2 週間のウォッシュアウト期間を設けた。

2-3-4. BMBT

BMBT の測定には Surgicutt Vet.H (Accriva Diagnostics, Inc. CA, USA) を使用した。犬を横臥位にて保定し、頬粘膜を反転させて一定の長さの切り込みを入れた後、5 秒ごとにろ紙で流血を吸い取りながら止血が完了するまでの時間を測定した。

測定にあたって、いずれの犬にも鎮静剤は使用しなかった。本実験で使用した器具のメーカーによって算出されている基準値は4分以内であった。

BMBTの測定は各薬剤の投与前と投与後に実施した。その際、薬物の代謝を考慮して、上記測定は事前に設定した時間内に行うこととした（午前11時～12時、いずれの薬剤も最終投与から3～4時間後）。

2-4. 統計解析

各測定結果は平均値 ± 標準偏差で示した。測定値が正規分布しているかどうかを確認するための正規確率プロットを作成し、コルモゴロフ・スミルノフ検定を用いて、分布の正規性を検定した。その後、群内（投与前 vs 投与後）および群間（Cilo群 vs Aspi群）の比較には two-way ANOVA を用い、Bonferroni correction によって多重比較を行った。統計解析には統計ソフト（Mac 統計解析 Ver.3.0、株式会社エスミ、東京）を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

3-1. 生体外における一次止血機構の評価

3-1-1. 完全血球計算

Cilo 群、Aspi 群ともに、いずれの項目についても薬物投与の前後で有意な変化は認められなかった。さらに群間比較を行ったが、血小板数（投与前： $416.0 \pm 170.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs $324.0 \pm 58.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ 、投与後： $446.0 \pm 102.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs $323.0 \pm 54.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ）も含めて Cilo 群と Aspi 群の間に有意差は認められなかった（表 2-1）。

3-1-2. 血液凝固系検査

PT、APTT および Fibn 値に関して、Cilo 群、Aspi 群ともに、薬剤投与の前後で有意な変化は認められなかった。さらに群間比較においても、両群間に有意差は認められなかった（表 2-2）。

3-1-3. T-TAS

3-1-3-1. AR チップ

いずれの薬剤投与によっても、AR チップの測定項目に有意な変化は認められなかった（表 2-3）。しかし、Aspi 群では Cilo 群に比べて投与後の T_{10} が有意に延長していた（ $148.2 \pm 33.3 \text{ sec}$ vs $216.3 \pm 49.6 \text{ sec}$; $p < 0.01$ ）。さらに、Aspi 群では投与後の AUC が Cilo 群と比べて有意に減少していた（ 2094.0 ± 61.8 vs 2024.8 ± 84.1 ; $p < 0.05$ ）。その他の項目については、両群間に投与前後で有意差は認められなかった（表 2-3）。

3-1-3-2. PL チップ

Cilo 群において、投与の前後で有意な変化は認められなかった (図 2-1)。一方、Aspi 群では、投与後に OT が有意に延長していた (241.3 ± 93.1 sec vs 376.8 ± 68.3 sec ; $p < 0.05$) (図 2-2)。また、AUC も有意に減少していた (409.8 ± 64.8 vs 310.7 ± 67.2 ; $p < 0.05$)。Aspi 群では Cilo 群と比較して、投与後に T₁₀ (142.3 ± 36.4 sec vs 234.2 ± 65.5 sec ; $p < 0.05$) と OT (244.5 ± 82.2 sec vs 376.8 ± 68.3 sec ; $p < 0.05$) が有意に延長し、AUC (421.3 ± 57.5 vs 310.7 ± 67.2 ; $p < 0.05$) が有意に減少していた。その他の項目については両群間に有意差は認められなかった (表 2-3)。なお、すべての供試犬において、シロスタゾールとアスピリンの投与により、採血部位に出血傾向や紫斑の発生など止血異常は観察されなかった。また、全身状態の変化や消化器徴候なども認められなかった。

3-2. BMBT を用いた生体内における一次止血機構の評価

シロスタゾールとアスピリンの投与前後で BMBT に有意な変化は認められなかった。また、群間比較においても有意差は認められなかった (表 2-4)。なお、いずれの薬剤においても、投与の前後で基準値の 4 分を超えた犬はいなかった。

4. 考察

T-TAS による血栓形成能の測定結果から、1 回あたり 10 mg/kg のシロスタゾールを経口投与した場合、生体外での測定結果ではあるが、健常犬の一次止血機構に影響を与えないことが明らかになった。さらに、生体内における止血能を視覚的に確認することができる BMBT でも、シロスタゾール投与後に有意な延長がみられなかったことは、T-TAS の結果を支持するものと考えられる。また、T-TAS において、アスピリン投与により一次止血機構が抑制されることが明らかになり、本剤の既知の薬理作用が確認された。

本実験では、シロスタゾールの投与量は 10 mg/kg、1 日 2 回とした。これまでに私どもの研究室では、当該用量のシロスタゾールによって犬の心拍数が有意に増加することを確認している [Fukushima et al., 2018]。また、犬を用いたシロスタゾールの毒性試験では、52 週間と 13 週間の非毒性経口投与量が 12 mg/kg/day ならびに 30 mg/kg/day であることが報告されている [Nagano et al., 1985a, Nagano et al., 1985b]。これらのことから、高用量のシロスタゾールの長期的投与には注意が必要であるが、短期間の投与であった本実験での用量設定は適切であったと考えられる。

本実験では、犬の一次止血機構に与えるシロスタゾールの影響を明らかにする目的で、アスピリンを対照薬として用いた。アスピリンは COX-1 阻害薬であり、アセチル化によって COX-1 を不可逆的に阻害することでトロンボキサン A₂ の産生を減少させ、その結果として血小板凝集を抑制する。抗血小板作用を目的として犬の臨床例にアスピリンを使用する場合、1 日 1 回、0.5 mg/kg を初期用量とするのが一般的である [Mellett et al., 2011, Weinkle et al., 2005]。しかしながら、1 日 1 回、1 mg/kg の投与量では 67% の検体に抗血小板活性が認められなかったという報告や [Dudley et al., 2013]、1 mg/kg のアスピリンを 1 日 1 回経口投与しても血小板凝集を抑制できなかったという報告がある [Hoh et al., 2011]。一方、より最近の報告では、2 mg/kg のアスピリンを 1 日 1 回経口投与することで、血小板凝集が有意に抑制されている

[McLewee et al., 2018]。これらの報告に基づき、今回の実験におけるアスピリンの投与量を 2 mg/kg、1 日 1 回に設定した。

犬において、トロンボキサンの産生とアラキドン酸による血小板凝集を最小化するためには、アスピリンの投与後約 4 時間が必要である[Gilmer et al., 2013]。一方、シロスタゾールの臨床用量である 100 mg を 1 日 2 回投与された成人と、6.7~10.0 mg/kg を 1 日 2 回投与された犬とでは、Cmax（ヒト：554.31 ± 114.38 ng/mL、犬：575.1 ± 137.3 ng/mL）と Tmax（ヒト：3.25 ± 1.16 h、犬：2.6 ± 1.0 h）とがかなり近似している [Hasegawa et al., 2012, Miao et al., 2011]。そこで本実験では、各薬剤の最終投与から 3~4 時間後に採血することとした。

その結果、シロスタゾールとアスピリンの経口投与により PT、APTT および Fibn 濃度に有意な変化は認められなかった。したがって、本実験で設定した用量でのシロスタゾールとアスピリンの投与は、外因系および内因系凝固経路における凝固因子の欠乏または活性低下を引き起こさないこと、ならびに Fibn 濃度にも影響しないことが明らかになった。

本実験で使用した T-TAS では、専用の PL チップと AR チップを測定に用いた。PL チップの結果からは、2 mg/kg、1 日 1 回のアスピリン投与により、血小板血栓の形成能と血栓自体の強度が低下することが示された。このことは、アスピリンの投与を受けたヒトを対象に実施した T-TAS による測定の結果と一致している [Hosokawa et al., 2012]。したがって、今回の実験における T-TAS の使用は適切であり、結果の信頼性は高いものと判断された。一方、シロスタゾール投与の前後において、PL チップの測定項目に有意な変化は認められなかった。また、AR チップに関しても、シロスタゾールとアスピリンの投与前後で、それぞれ有意な変化は認められなかった。しかし、投与された 2 薬剤の群間比較を行ったところ、シロスタゾールに比べてアスピリンの投与では T₁₀ が有意に延長し、AUC は有意に減少していた。このうち、AR チップにおける T₁₀ は、血栓形成の初期段階である一次止血機構、すなわち血小板機能を反映していると考えられる。したがって、AR チップにお

ける群間差は、PL チップで確認することができたシロスタゾールとアスピリンの抗血小板作用の差異によるものと推測される。

BMBT は、血小板やフォンヴィレブランド因子 (von Willebrand factor : vWF) など一次止血機構を総合的に評価できる検査法であり、その様子を目視することができる [Panciera and Johnson, 1996]。基準値を超える結果が得られた場合には、血小板機能の低下や vWF の欠乏などが疑われる [Aumann et al., 2013]。BMBT の欠点としては、基準値の範囲が広すぎることで、切開部の血管分布や血管と周囲組織の収縮性などの影響を受けることが挙げられる。本実験では、シロスタゾールとアスピリンの投与により、BMBT の計測値に有意な変化は認められなかった。また、20 mg/kg の投与により BMBT が延長したことが報告されているが [Sakai et al., 2003]、今回設定した用量のアスピリン投与では、明らかな血小板機能の障害は認められなかった。今回のシロスタゾール投与前後の BMBT は、本剤が有する末梢血管抵抗の低下作用の影響を受けている可能性がある [Fukushima et al., 2018]。

T-TAS と BMBT による以上の測定結果から、現在、小動物臨床の現場で徐脈性不整脈に対して用いられているシロスタゾールの用量では、犬の一次止血機構はほとんど影響を受けないものと考えられる。

Kimura et al. (1985)は、ビーグル犬へのシロスタゾール 3 mg/kg の経口投与により、アデノシン二リン酸 (Adenosine diphosphate : ADP) やコラーゲンを添加した多血小板血漿 (Plate-rich plasma : PRP) において血小板凝集反応が抑制されることを *in vitro* で確認している。この試験結果は、PDE 阻害剤であるシロスタゾールが抗血小板作用を有していることを示唆している。一方、T-TAS と BMBT を用いた今回の測定結果には、有意な変化が認められなかった。Born が 1962 年に考案した、PRP を用いた透過光法 (Light transmission aggregometry : LTA) は、現在でも血小板凝集機能検査における標準的な手法に位置付けられている。LTA は単一のアゴニストの添加による活性化を評価するため、単一の経路を阻害する薬剤には感度が高い。Kimura らが LTA を用いて示したシロスタゾールの抗血小板作用が、今回 T-TAS において認

められなかったのは、生体内により近いチップ内における一次止血機構全般を反映した測定であったためと考えられる。

Platelet Function Analyzer (PFA) -100 は、T-TAS と同様に全血を使用し、シェアストレス下での血小板機能を評価する検査装置である。PFA-100 では、2種類のカートリッジ（血小板アゴニスト：コラーゲン+エピネフリン、コラーゲン+ADP）を使用する。全血が血小板アゴニストを塗布した膜を通過する際に形成される血栓によってカートリッジ内の回路が遮断されるまでの時間を測定する [Kaikita et al., 2019]。しかし、この装置による測定結果は、エピネフリンや ADP など特定の血小板アゴニストに依存している [Kaikita et al., 2019]。したがって、これらの検査は特定の血小板活性化経路の評価には役立つものの、一次止血機構全般のモニタリングとしての有用性は限定的である。一方、T-TAS の PL チップを用いた測定では、vWF による血小板の接着、内因性血小板アゴニストの放出、血小板の活性化という血栓形成の 3 大ステップを反映している [Kaikita et al., 2019]。PL チップは、血栓形成過程や一次止血機構全般の評価に有用であるが、一次止血機構の障害における個々の血小板活性化経路を特異的に評価することはできない。本実験では、T-TAS と PFA-100 の直接的な比較は行っていないが、PFA-100 によって評価すれば、シロスタゾールの血小板機能への影響をより正確に捉えることができたかもしれない。したがって、T-TAS の PL チップと PFA-100 のようなアゴニストベースの検査装置を相補的に組み合わせることで、一次止血機構を包括的に解析できると考えられる。

今回の実験にはいくつかの制限がある。まず、臨床の現場において、徐脈性不整脈を呈する犬は高齢であることが多く [Johnson et al., 2007, Ward et al., 2016]、基礎疾患や臓器障害等を有している可能性が少なくない。肝胆道系疾患、消化器疾患、血液疾患等を有する症例では、潜在的に出血傾向が存在し、抗血小板作用が増強される恐れがある。そのため、今回の健常犬での結果は、実際の臨床例での結果と必ずしも一致しない可能性がある。次に、本実験は 7 日間という短期間の投薬による変

化を調べているため、シロスタゾールを長期間投与した場合の結果とは異なる可能性がある。また、供試犬の数も限られていることから、今後はさらに増やして検討する必要がある。

5. 小括

犬の徐脈性不整脈に対して使用されるシロスタゾールは本来、抗血小板薬である。第1章で明らかにした1回あたりの至適用量は10 mg/kgであり、本剤をこの用量で投与した際に犬の止血凝固能が影響を受けるか否か、近年開発されたT-TASと従来行われているBMBTを用いて評価することとした。その際、アスピリンを対照薬として用い、比較検討した。

健常犬12頭を供試し、6頭ずつの2群に分け、各薬剤投与の前後に完全血球計算、血液凝固系検査、T-TASによる血栓形成能の測定を実施した。また、健常犬6頭を用いて、クロスオーバー法により各薬剤投与の前後にBMBTを実施した。薬剤の用量はシロスタゾール10 mg/kg、1日2回投与、アスピリン2 mg/kg、1日1回投与とした。

シロスタゾール投与の前後において、完全血球計算、血液凝固系検査、T-TASによる血栓形成能およびBMBTの測定結果に有意な変化は認められなかった。一方、アスピリン投与の前後においても、完全血球計算、血液凝固系検査およびBMBTの測定結果に有意な変化はみられなかったが、T-TASによる血栓形成能の測定では、血小板血栓の形成能と血栓自体の強度の低下が認められた。

以上の結果から、健常犬にシロスタゾールを10 mg/kg、1日2回投与した場合、一次止血機構への影響はほとんどないことが明らかになった。これらの結果は、犬の徐脈性不整脈の治療薬としてシロスタゾールを選択する際の有用な基礎情報を提供するものと考えられる。

表 2-1. シロスタゾールとアスピリンの投与前後における完全血球計算の変化

群	検査項目	投与前	投与後
Cilo群	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	11.4 ± 2.0	11.8 ± 2.1
	RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	7231.0 ± 537.0	6801.0 ± 382.0
	HGB (g/dL)	16.7 ± 1.7	15.8 ± 1.3
	HCT (%)	46.5 ± 4.2	43.7 ± 2.7
	MCV (fL)	64.3 ± 2.8	64.3 ± 2.7
	MCH (pg)	23.1 ± 1.3	23.3 ± 1.3
	MCHC (g/dL)	36.0 ± 0.8	36.2 ± 0.9
	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	416.0 ± 170.0	446.0 ± 102.0
Aspi群	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	9.6 ± 1.4	9.3 ± 2.3
	RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	7609.0 ± 929.0	7336.0 ± 578.0
	HGB (g/dL)	17.2 ± 2.4	16.8 ± 1.9
	HCT (%)	50.8 ± 6.5	49.5 ± 4.8
	MCV (fL)	65.5 ± 4.5	66.5 ± 1.9
	MCH (pg)	22.5 ± 0.7	22.5 ± 0.5
	MCHC (g/dL)	33.7 ± 0.4	33.4 ± 0.4
	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	324.0 ± 58.0	323.0 ± 54.0

WBC : 総白血球数 (基準値 : $6.0-17.0 \times 10^3/\mu\text{L}$)、RBC : 赤血球数 (基準値 : $5,500-8,500 \times 10^3/\mu\text{L}$)、HGB : ヘモグロビン濃度 (基準値 : $12.0-18.0 \text{ g/dL}$)、HCT : ヘマトクリット値 (基準値 : $37.0-55.0 \%$)、MCV : 平均赤血球容積 (基準値 : $60.0-77.0 \text{ fL}$)、MCH : 平均赤血球ヘモグロビン量 (基準値 : $19.5-24.5 \text{ pg}$)、MCHC : 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (基準値 : $32.0-36.0 \text{ g/dL}$)、PLT : 血小板数 (基準値 : $200-500 \times 10^3/\mu\text{L}$)

表 2-2. シロスタゾールとアスピリンの投与前後における血液凝固系検査の変化

群	検査項目	投与前	投与後
Cilo群	PT (sec)	7.7 ± 0.3	7.5 ± 0.2
	APTT (sec)	17.4 ± 4.1	19.7 ± 2.8
	Fibn (mg/dL)	188.3 ± 22.6	202.3 ± 29.8
Aspi群	PT (sec)	7.5 ± 0.2	7.4 ± 0.2
	APTT (sec)	15.1 ± 4.8	17.4 ± 4.8
	Fibn (mg/dL)	200.5 ± 20.4	202.8 ± 64.9

PT：プロトロンビン時間（基準値：7.4-8.8 sec）、APTT：活性化部分トロンボプラスチン時間（基準値：12.0-28.8 sec）、Fibn：フィブリノーゲン濃度（基準値：150-350 mg/dL）

表 2-3. シロスタゾールとアスピリンの投与前後における T-TAS の変化

検査項目	Cilo群		Aspi群	
	投与前	投与後	投与前	投与後
AR T ₁₀ (sec)	174.3 ± 12.4	148.2 ± 33.3	205.5 ± 42.9	216.3 ± 49.6 ††
AR OT (sec)	263.3 ± 17.9	300.7 ± 87.0	302.0 ± 37.0	339.3 ± 67.8
AR AUC	2115.2 ± 14.9	2094.0 ± 61.8	2062.7 ± 50.6	2024.8 ± 84.1 †
PL T ₁₀ (sec)	172.8 ± 67.8	142.3 ± 36.4	168.5 ± 46.5	234.2 ± 65.5 †
PL OT (sec)	300.7 ± 121.9	244.5 ± 82.2	241.3 ± 93.1	376.8 ± 68.3 * †
PL AUC	384.0 ± 86.9	421.3 ± 57.5	409.8 ± 64.8	310.7 ± 67.2 * †

T₁₀ : 基線より+10 kPa に到達した時点である閉塞開始時間 (基準値 : AR ; 183.8 ± 39.8 sec、PL ; 167.6 ± 51.7 sec)、OT : AR チップでは基線より+80 kPa、PL チップでは+60 kPa の時点である閉塞時間 (基準値 : AR ; 250.1 ± 49.2 sec、PL ; 269.0 ± 46.6 sec)、AUC : 時間および圧上昇曲線の下部領域面積 (基準値 : AR ; 2125.8 ± 50.3、PL ; 395.8 ± 45.5)

* 投与前と比較して、 $p < 0.05$ で有意差あり

† Cilo 群と比較して、 $p < 0.05$ で有意差あり

†† Cilo 群と比較して、 $p < 0.01$ で有意差あり

表 2-4. シロスタゾールとアスピリンの投与前後の BMBT の変化

薬剤	投与前	投与後
Cilostazol (sec)	130.5 ± 30.3	153.1 ± 75.1
Aspirin (sec)	122.5 ± 33.4	146.8 ± 41.7

基準値 : <240.0 sec (4 min)

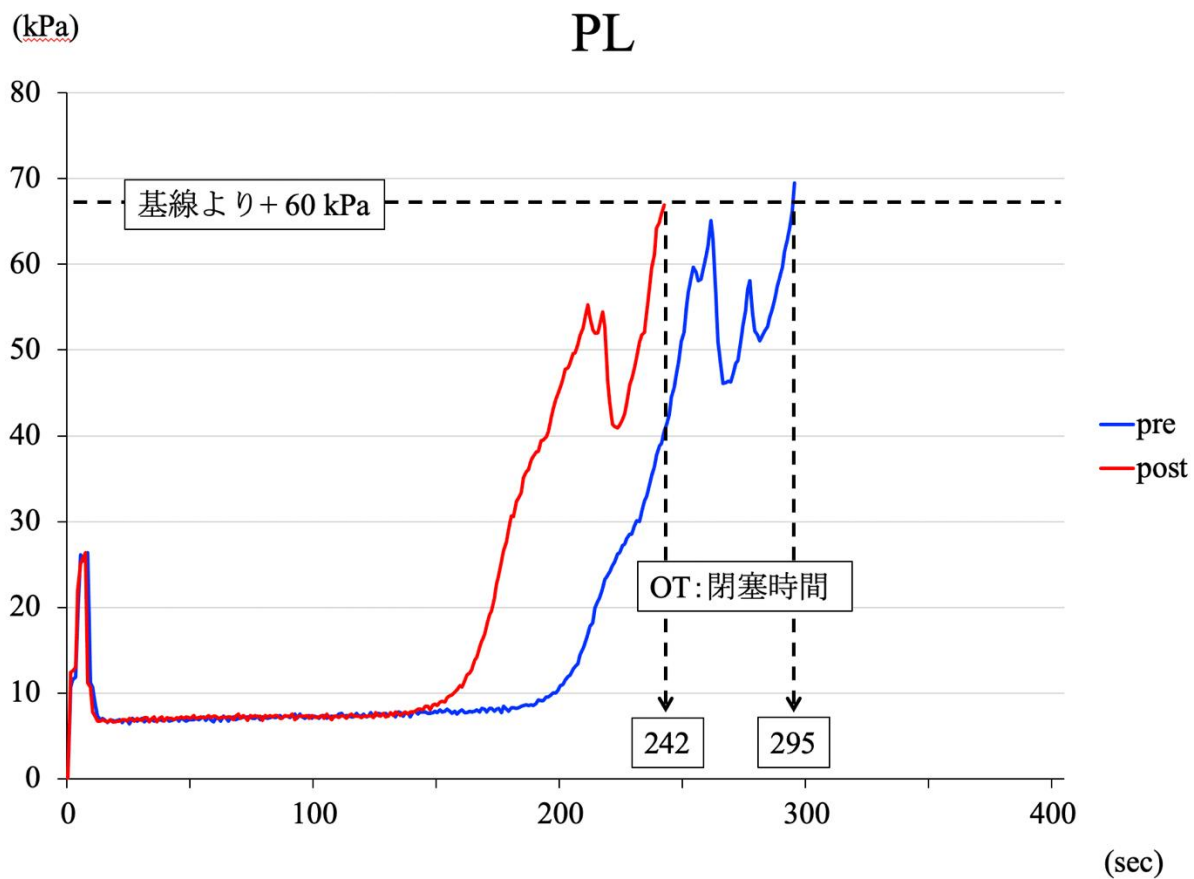


図 2-1. T-TAS による PL チップの内圧上昇曲線 (Cilo 群の 1 例)

シロスタゾールの投与前 (pre) と投与後 (post) の内圧上昇曲線から、それぞれの閉塞時間 (OT) を算出している。

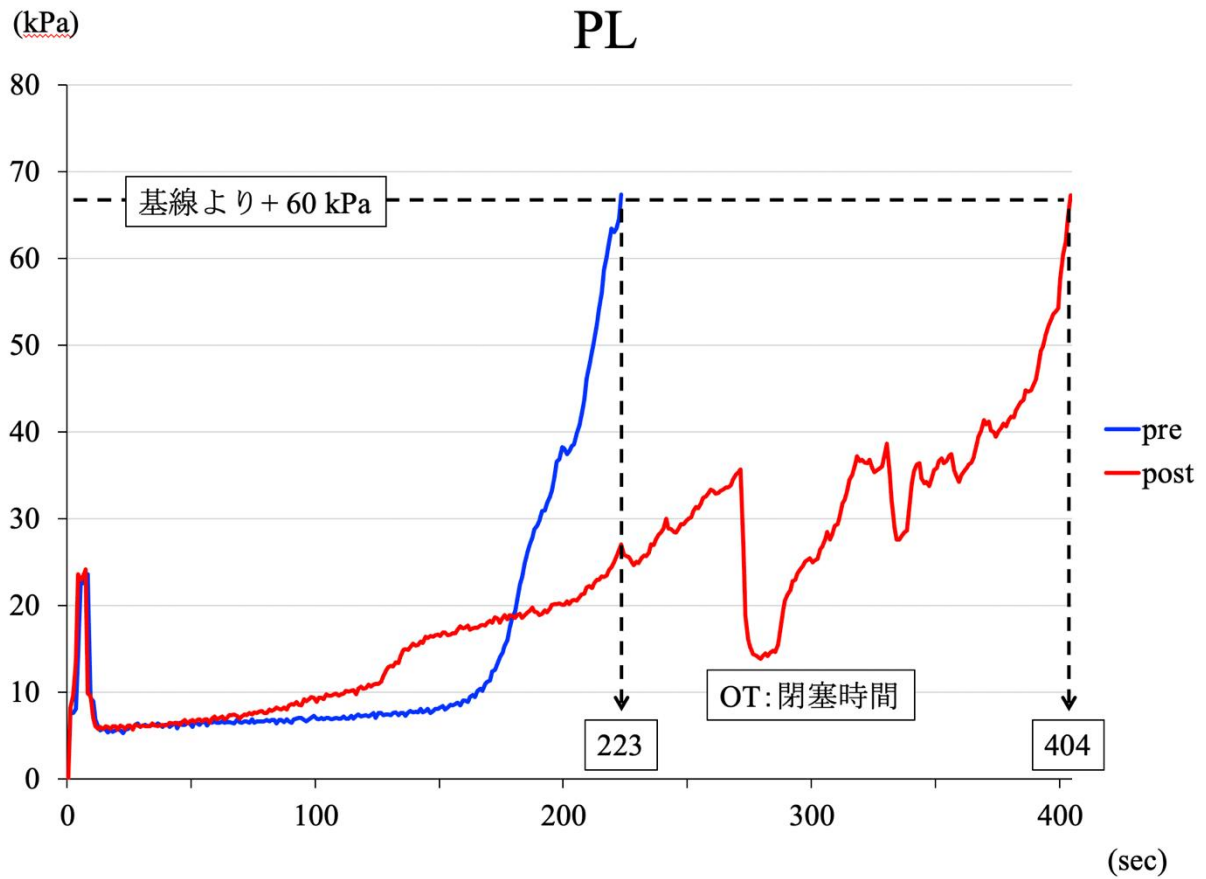


図 2-2. T-TAS による PL チップの内圧上昇曲線 (Aspi 群の 1 例)

アスピリンの投与前 (pre) と投与後 (post) の内圧上昇曲線から、それぞれの閉塞時間 (OT) を算出している。

第3章

実験的房室ブロック犬におけるシロスタゾールの 心拍数増加効果に関する検討

1. 緒言

房室ブロックとは、心房インパルスの房室伝導が遅延もしくは途絶することで生じる徐脈性不整脈の1つである [Kobayashi et al., 2003]。房室ブロックは第1度、第2度、第3度の3つに大別される。第1度房室ブロックは房室間の刺激伝導が遅延する状態、第2度房室ブロックは房室間の刺激伝導が間欠的に途絶する状態、第3度房室ブロックは房室間の刺激伝導が完全に途絶した状態である [Sawazaki, 1970, Kittleson, 1998, Schrope and Kelch, 2006]。また、心室への心房インパルスの伝導が2回もしくはそれ以上連続して途絶される状態を高度房室ブロックと呼び [Schrope and Kelch, 2006]、しばしば第2度と第3度の中間に位置づけられる。治療として、房室ブロックを引き起こしうる基礎疾患が介在している場合や薬剤が投与されている場合には、それらの要因を排除する必要がある [Nelson and Couto, 2019]。高度または第3度房室ブロックでは、心拍出量の減少により、失神やふらつきなどの臨床徴候を示し、突然死する危険性もあるため、ペースメーカー植込み (Pacemaker implantation : PMI) が必要となる [Kobayashi et al., 2003]。しかしながら、獣医療においては PMI を実施できる施設が限られているのに加えて、動物が高齢であったり基礎疾患を有していたりすることから、PMI が選択されないことも少なくない。

第1章における臨床例の回顧的調査から、PMI が実施できない徐脈性不整脈の犬に対してシロスタゾールの投与が選択されることも多いものの、第3度房室ブロックと診断された症例については、他の徐脈性不整脈に比べてシロスタゾールによる治療成績が思わしくないことが明らかになった。また、シロスタゾールが頻脈をもたらす機序として、血管拡張に伴う反射性交感神経緊張による二次的な頻脈発現によるもの [Yasuda et al., 1985]、洞結節細胞における心房インパルスの発火亢進作用によるもの [Saito et al., 1995]、冠血管拡張による結節部への血流増加によるもの [Shintani et al., 1985]、環状アデノシンリン酸 (Cyclic adenosine monophosphate : cAMP) の増加に伴う心筋収縮性促進によるものなどが指摘されているが [Weishaar

et al., 1985, Kauffman et al., 1986]、いまだ明確にされてはない [Fukushima et al., 2018]。そのため、シロスタゾールがどのような徐脈性不整脈に対して有用であるかについては十分な検討がなされていない。

本実験の目的は、房室接合部へのアルコール注入によって作出した房室ブロック犬を用いて、第1章で至適用量と判断し、第2章で止血機能への大きな影響がないことが確認された、1回あたり10 mg/kgのシロスタゾールを1日2回投与した際の心拍数増加効果を評価することにある。併せて、徐脈性不整脈に対するシロスタゾールの薬理作用と機序についても検討することとした。

2. 材料および方法

2-1. ガイドラインの遵守

本実験は、東京農工大学動物実験倫理規定に準拠して実施した（承認番号：第 R04-124 号）。

2-2. 供試動物

本実験にはビーグル犬（オリエンタル酵母工業株式会社、東京）4頭を用いた。性別は雄1頭、雌3頭であり、年齢は4～9歳（中央値：5歳）、体重は9.8～11.0 kg（中央値：10.4 kg）であった。すべての個体において、身体検査、心臓超音波検査および胸部レントゲン検査により特記すべき異常所見は見出されなかった。また、3頭では血液検査に異常は認められなかったが、1頭ではグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ濃度（GPT）が高値を示したものの、臨床徴候は観察されなかった。したがって、この1頭についても本実験を遂行する上で特に大きな問題はないと判断した。食餌は成犬用健康維持食（Eukanuba Adult maintenance：株式会社アイムスジャパン、東京）を、1日あたり $1.8 \times [70 \times (\text{体重 kg})^{0.75}] \text{ kcal}$ [Crane et al., 2000] となるように2回に分けて与え（午前9時と午後5時）、水はステンレス容器を用いて自由飲水とした。実験期間中、犬はそれぞれ個別のケージに収容し、室温 $21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20 \%$ 、12時間交代の明暗サイクルにて維持した。

2-3. 房室ブロックの作出

2-3-1. PMI

ビーグル犬4頭を全身麻酔下にて開胸し、心外膜ペーリングリード植込み術を実施した。麻酔前投与薬として、硫酸アトロピン 0.05 mg/kg 皮下注射（以下 SC）、酒石酸ブトルファノール 0.2 mg/kg 静脈注射（以下 IV）、ミダゾラム 0.2 mg/kg IV、メロキシカム 0.2 mg/kg SC を投与した後に、プロポフォール 6 mg/kg IV にて導入し、

イソフルラン吸入により麻酔維持を行った。右側横臥位にて保定し、左側第 5 肋間部開胸にて左心室にアプローチし、心外膜ペーシングリード（CapSure Epi（バイポーラ）リード：日本メドトロニック株式会社、東京）を 5-0 のポリプロピレン製非吸収性モノフィラメント縫合糸（5-0 PROLENE：ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社、東京）によって左心室の心外膜と縫着した（図 3-1）。その後、左側腹部を切開し、ペーシングリードを横隔膜から貫通させて腹腔内へ通し、VVIR モード、90 bpm に設定したジェネレータ（Attesta™ SR MRI SureScan：日本メドトロニック株式会社、東京）に接続した（図 3-2）。ジェネレータを側腹部筋間に埋設した後、常法に従って閉腹ならびに閉胸して麻酔から覚醒させた。抗生物質としてアンピシリン 20 mg/kg IV を麻酔導入前に投与し、手術中は 2 時間ごとに同量を追加投与した。手術の翌日から 3 日間はアモキシシリン 20 mg/kg を 1 日 2 回、経口投与した。

2-3-2. アルコール注入による房室ブロックの作出

PMI を実施してから 2 週間の回復期間を設けた後、ビーグル犬 4 頭に全身麻酔をかけ、開胸下でエタノール注入による房室ブロックの作出を行った [Vos et al., 1995, Steiner and Kovalik, 1968]。麻酔前投与薬および導入薬は PMI 時と同様のプロトコールとし、イソフルラン吸入により麻酔維持を行った。右側横臥位にて保定し、左側第 3 肋間部開胸にて心臓の頭側にアプローチした（図 3-3）。心臓超音波検査により心内腔を確認しながら右心耳をめくり、右心房壁下部から心房中隔に向けて 25G 注射針を刺入した。そして超音波画像をもとに、注射針の先端部を房室接合部領域（心房中隔の最下部）へと誘導した。なお、注射針に接続したシリンジを引いて血液吸引の有無を確認し、血液が吸引された場合は針先が心内腔にあるためその位置を微調整した。針先が房室接合部に刺入され、シリンジを引いても血液が吸引されないことを確認した後、エタノールを 0.5 mL ずつ 1~3 回、1 回につき 30 秒かけて注入した（図 3-4）。エタノールが房室接合部に位置する房室伝導系領域に注入されると、心電図波形は徐々に変化し、P 波と QRS 群（ペースメーカー由来の波形）がそ

れぞれ独立して出現するようになった。この状態を確認することで、房室伝導が遮断されたものと判断した。エタノール投与から 30 分経過した段階で洞調律に復していないことを確認した後、常法に従って閉胸し、麻酔から覚醒させた。抗生物質は PMI 時と同様に投与した。

手術当日から 2 週間の回復期間を設けたのち、房室ブロックの存在を確認するために心電図検査を実施した。4 頭のうち 2 頭は第 3 度房室ブロックを呈していたが、1 頭は第 2 度房室ブロック (Mobitz II 型)、もう 1 頭は左脚ブロックであった。このうち、左脚ブロックを呈した犬に関しては、本実験の目的である房室ブロックから外れるため、以後の実験からは除外した。第 3 度房室ブロックを呈した犬 2 頭をそれぞれ Dog 1、Dog 2、第 2 度房室ブロック (Mobitz II 型) を呈した犬を Dog 3 とした。この 3 頭の犬に植込んだペースメーカーの設定を変更し、ペーシングレートを 90 bpm から徐々に下げていったが、45 bpm に至った時点で運動不耐を呈する個体がみられたため、ペーシングレートを 50 bpm に上げ、この頻度でさらに 2 週間維持した。50 bpm への変更後はいずれの犬にも運動不耐はみられなかった。

2-4. 各種検査の手順

血液検査、体表心電図検査、胸部 X 線検査、血圧検査および心臓超音波検査は、シロスタゾール投与開始 4 日前に実施した。これらの検査は 18 時から開始した。ホルター心電図検査は、投与開始 3 日前から投与前日までの 3 日間実施した。ホルター心電図検査の終了翌日から 3 頭の犬にシロスタゾール (シロスタゾール 50 mg、沢井製薬株式会社、大阪) を 2 錠 (9.2~10.2 mg/kg、中央値 : 9.8 mg/kg)、1 日 2 回 (午前 8 時と午後 8 時) 投与し、12 日間継続した。投与後の血液検査、体表心電図検査、胸部 X 線検査、血圧検査および心臓超音波検査は投与 8 日目に実施し、ホルター心電図検査は投与 9 日目から 3 日間実施した (図 3-5)。

2-4-1. 血液検査

外側伏在静脈から 23G 針を用いて血液サンプルを採取し、EDTA チューブ (BD マイクロティナ微量採血管 BD マイクロガード™ キャップ付き EDTA2K、BD、USA) とヘパリンチューブ (富士ヘパリンチューブ、富士フィルムメディカル、東京) に分注した。

EDTA チューブに分注した血液については、自動血球計算装置 (IDEXX プロサイト Dx™、IDEXX Laboratories、Inc.、USA) を用いて、総白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘマトクリット値 (HCT)、ヘモグロビン濃度 (HGB)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) および血小板数 (PLT) の測定に供した。

ヘパリンチューブに分注した血液を遠心分離 (5,000 rpm、5 min) して血漿を得た後、動物用生化学分析装置 (富士ドライケム NX700V、富士フィルムメディカル株式会社、東京) を用いて、血液尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB) の各値を測定した。また、イオン選択性分析装置 (富士ドライケム 800、富士フィルムメディカル株式会社、東京) を用いてナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl) の各値も測定した。

2-4-2. 体表心電図検査

体表心電図検査は、動物用多機能心電計 (カーディサニーD700、フクダエム・イー工業株式会社、東京) を用いて、右側横臥位にて実施した。4 つの電極を両肘と両膝に装着し、標準双極四肢誘導 (I 誘導、II 誘導、III 誘導) と増高単極肢誘導 (aVR 誘導、aVL 誘導、aVF 誘導) により記録した。記録した心電図から PQ 間隔、QT 間隔、QT 間隔を Bazett 法により補正した QTc1 ($= QT/\sqrt{RR}$)、Fridericia 法により補正した QTc2 ($= QT/\sqrt[3]{RR}$) の値を計測および算出し、シロスタゾール投与の前後で比較した。

2-4-3. 胸部 X 線検査

右側横臥位の胸部 X 線画像より心臓脊椎スケール (Vertebral heart size : VHS) を、仰臥位の胸部 X 線画像より心胸郭比 (Cardio thoracic ratio : CTR) を算出した。CTR については、心臓の最大横径が犬の正中線から右側の最大となる幅 (MR) と左側の最大となる幅 (ML)、ならびに胸郭が最大となる幅 (MTD) を計測し、CTR (%) = (MR + ML) / MTD × 100 に代入して求めた。

2-4-4. 血圧検査

血圧は、動物用非観血的血圧計 (BP100D、フクダエム・イー工業株式会社、東京) を用いて、尾根部で測定した。カフ幅は測定部位周囲の 40~60%幅とした。3 回の測定で得られた収縮期動脈圧 (SAP)、平均動脈圧 (MAP)、拡張期動脈圧 (DAP) の平均値をそれぞれの値とした。

2-4-5. 心臓超音波検査

超音波検査装置 (Vivid™E95、GE Healthcare Japan、東京) を用いて、深触子には胸部用セクタプローブ・6S (可変周波数域 2.7-8 MHz) を選択した。

右傍胸骨左室短軸断面腱索レベルを描出し、M モードにて、左室拡張末期径 (LVIDd)、左室収縮末期径 (LVIDs)、左室内径短縮率 (Fractional shortening : FS) を測定した (図 3-6)。また、体重標準化左室拡張末期径 (Normalized LVIDd : $LVIDDN = LVIDd \text{ (cm)} / (\text{体重 (kg)})^{0.294}$ [Cornell et al., 2004])、体重標準化左室収縮末期径 (Normalized LVIDs : $LVIDSN = LVIDs \text{ (cm)} / (\text{体重 (kg)})^{0.315}$ [Cornell et al., 2004]) をそれぞれ算出した。

右傍胸骨左室短軸断面心基部レベルを描出し、B モードにて、左心房径と大動脈径の比 (LA/Ao) を計測した (図 3-7)。

左傍胸骨心尖部五腔断面において大動脈弁口部を描出し、大動脈血流速が 2 m/s 未満の場合はパルスドプラ法を、それ以上の場合は連続波ドプラ法を用いて大動脈弁

口部血流波形を記録した。大動脈弁輪部径 (LVOT-Diam) を計測し、大動脈弁口部血流波形をトレースして速度時間積分値 (VTI) を求めた。これらの値を用いて、一回拍出量 (Stroke volume : SV) を $\pi \times 1/4 \times (\text{LVOT-Diam})^2 \times \text{VTI}$ として算出した。心拍出量 (Cardiac output : CO) は $\text{SV} \times \text{HR}$ として算出した。SV と CO を体表面積 ($\text{BSA} = \{10.1 \times (\text{体重 (kg)})^{0.67}\} / 100$) で補正した一回拍出量係数 (SV index : $\text{SVI} = \text{SV}/\text{BSA}$) および心係数 (Cardiac index : $\text{CI} = \text{CO}/\text{BSA}$) をそれぞれ算出した。

左傍胸骨心尖部四腔断面において僧帽弁口部を描出し、パルスドプラ法を用いて左室流入波形を構成する早期流入波 (E 波、E wave) と心房収縮波 (A 波、A wave) の波高、E 波と A 波の比 (E/A) を計測した (図 3-8)。同じ断面において組織ドプラ法を用いて、僧帽弁輪部速度の拡張早期成分 (e') の波高を、心室中隔 (Septal e') と左室側壁 (Lateral e') のそれぞれについて計測し、E 波と e' の比を心室中隔 (Septal E/e') と左室側壁 (Lateral e') のそれぞれについて算出した (図 3-9)。

上記の心臓超音波検査の各項目は連続した 9 心拍において計測し、その平均値を計測値とした。

2-4-6. ホルター心電図検査

シロスタゾール投与前 3 日間および投与 9~12 日目に、データストック型のホルター心電図装置 (デジタルクイックコーダ QR2500、フクダエム・イー工業株式会社、東京) を用いて実施した。電極を装着する前に胸骨柄から剣状突起までを毛刈りし、アルコール綿で皮脂を落とした。5 つの電極を、胸骨柄部、胸骨中央部、剣状突起部、右胸部、左胸部に装着し、M-X 誘導と L-R 誘導を記録した。左右胸部の電極は、第 5~6 肋間かつ胸骨から 4~5 cm 離れた位置に装着した。投与前後のホルター心電図検査により得られた 3 日間のデータの平均値を、それぞれ投与前ならびに投与後の測定値として用いた。デバイスに保存されたデータは、ホルター心電図解析ソフト (HS マネージャ V4.0A、フクダエム・イー工業株式会社、東京) により解

析した。投与の前後において、総心拍数、最大心拍数、平均心拍数、最小心拍数、18時から30秒間のP波の数を記録した。

3. 結果

3-1. 血液検査

完全血球計算、血液生化学検査および電解質検査の結果をそれぞれ表 3-1、表 3-2 に示した。完全血球計算において、シロスタゾール投与前の Dog 2 では RBC の増加 ($8,570 \times 10^3/\mu\text{L}$ 、基準値：5,500~8,500 $\times 10^3/\mu\text{L}$)、HGB の増加 (19.9 g/dL、基準値：12.0~18.0 g/dL)、HCT の増加 (57.8 %、基準値：37.0~55.0 %) が認められた。血液生化学検査においては、Dog 1 では GPT が投与後に増加し基準範囲を超えた (83 U/L、基準値：17~78 U/L)。Dog 2 ではシロスタゾールの投与前後に GPT が 238 U/L から 199 U/L へと減少したが、投与の前後ともに基準範囲を超えていた (基準値：17~78 U/L)。また、Dog 2 の ALB は投与後に減少し基準範囲を下回っていた (2.5 g/dL、基準値：2.6~4.0 g/dL)。その他の測定値はいずれも基準範囲内にあった。

3-2. 体表心電図検査

各個体の体表心電図検査記録を図 3-10~図 3-15 に示し、各種計測結果を表 3-3 に示した。Dog 1、Dog 2 では P 波と独立した QRS 群が出現しており、QRS 群はいずれも心室ペーシング波形であったため、Dog 1 と Dog 2 では PQ 間隔の計測は実施していない。また、Dog 1 はシロスタゾール投与の前後に P 波の数が 45 個から 99 個へ増加しており (いずれも 30 秒間に出現した数)、心室ペーシング波形の直後に心室期外収縮を伴っていた。Dog 3 では、投与前は 30 秒間に約 6 個の頻度で観察された第 2 度房室ブロック (Mobitz II 型) が、投与後は 30 秒間に 1 個前後と明らかに減少し、心拍数についても 72 bpm から 90 bpm へ増加した。

シロスタゾール投与の前後で比較すると、Dog 3 の PQ 間隔は 137 ms から 100 ms に短縮した。Dog 1 の QT 間隔は 295 ms から 248 ms に短縮したが、QTc1 は 268 ms

から 320 ms に、QTc2 は 277 ms から 290 ms に延長していた。Dog 2 と Dog 3 の QT 間隔、QTc1、QTc2 はいずれもほとんど変化しなかった。

3-3. 胸部 X 線検査

胸部 X 線検査の結果を表 3-4 に示した。VHS は Dog 1 の投与前 (11.3)、Dog 2 の投与前 (11.5) と投与後 (12.3) において基準範囲 (10.1~10.9) を上回っており、シロスタゾール投与の前後で Dog 1 では 11.3 から 10.8 に減少し、Dog 2 では 11.5 から 12.3 に増加した。CTR はいずれの個体においても基準範囲内にあった。その他の項目については、投与の前後でほとんど変化しなかった。

3-4. 血圧検査

血圧検査の結果を表 3-5 に示した。Dog 2 ではシロスタゾール投与前に SAP の高値 (160 mmHg) がみられ、投与後は基準範囲内であるものの SAP が 160 mmHg から 136 mmHg に、MAP が 110 mmHg から 81 mmHg に、DAP が 85 mmHg から 59 mmHg に低下した。Dog 1 についても、基準範囲内の変動ではあるが投与の前後で MAP が 74 mmHg から 89 mmHg に、DAP が 54 mmHg から 74 mmHg に上昇した。その他の項目については、投与の前後でほとんど変化しなかった。

3-5. 心臓超音波検査

心臓超音波検査の結果を表 3-6 に示した。シロスタゾール投与の前後において、Dog 1 では FS が 47.8 %から 53.8 %に、LA/Ao が 1.22 から 1.36 に、SV が 22.8 mL から 28.2 mL に、CO が 3.2 L/min から 3.6 L/min に、SVI が 47.7 mL/m²から 58.8 mL/m²に、CI が 6.7 L/min/m²から 7.5 L/min/m²に、E wave が 0.74 m/s から 1.19 m/s に、A wave が 0.57 m/s から 0.72 m/s に、E/A が 1.30 から 1.65 に、Lateral E/e'が 7.4 から 10.8 に増加し、LVIDs は 1.66 cm から 1.44 cm に、LVIDSN は 0.80 から 0.69 に、LVOT-Diam は 1.24 cm から 1.09 cm に減少した。Dog 2 では投与の前後で LVIDd が

3.35 cm から 3.53 cm に、LVIDs が 1.72 cm から 1.87 cm に、LVIDDN が 1.71 から 1.80 に、LVIDSN が 0.84 から 0.91 に、Septal E/e' が 11.0 から 15.6 に増加し、FS は 48.6 % から 46.9 % に、LA/Ao は 1.46 から 1.36 に、SV は 24.4 mL から 21.2 mL に、SVI は 52.3 mL/m² から 45.5 mL/m² に、CI は 2.6 L/min/m² から 2.3 L/min/m² に減少した。Dog 3 では投与の前後で FS が 51.2 % から 55.9 % に、SV が 26.2 mL から 27.6 mL に、CO が 2.1 L/min から 2.8 L/min に、SVI が 52.0 mL/m² から 54.9 mL/m² に、CI が 4.1 L/min/m² から 5.6 L/min/m² に、Septal E/e' が 10.6 から 11.6 に増加し、LVIDd は 3.62 cm から 3.51 cm に、LVIDs は 1.77 cm から 1.55 cm に減少した。その他の項目については、投与の前後でほとんど変化しなかった。

3-6. ホルター心電図検査

ホルター心電図検査の結果を表 3-7 に示した。投与前後の総心拍数は、Dog 1 では 81,718 bpm から 93,595 bpm に、Dog 3 では 82,263 bpm から 87,551 bpm に増加した。Dog 2 の総心拍数は、投与の前後でほとんど変化しなかった（それぞれ 71,866 bpm、71,915 bpm）。平均心拍数に関してもおおむね同様の結果であり、Dog 1 では 55 bpm から 63 bpm に、Dog 3 では 55 bpm から 59 bpm に増加したが、Dog 2 では投与前後とも 49 bpm であった。最大心拍数は Dog 1 では 94 bpm から 106 bpm に、Dog 3 では 133 bpm から 162 bpm に増加したが、Dog 2 では 79 bpm から 64 bpm に減少した。最小心拍数については、3 頭とも投与の前後で 48~49 bpm とほとんど変化しなかった。30 秒間の P 波の数は、Dog 1 では 60 から 97 に、Dog 2 では 80 から 102 に、Dog 3 では 37 から 47 へと、すべての個体で投与後に増加した。

4. 考察

本実験では、房室接合部へのエタノール注入によって作出した房室ブロック犬3頭を用いて、シロスタゾール（10 mg/kg、1日2回）投与の前後に、血液検査、体表心電図検査、胸部X線検査、血圧検査、心臓超音波検査およびホルター心電図検査を実施した。

血液検査では、RBC、HGB、HCT、GPT、ALBを除くいずれの測定項目も基準範囲内にあった。シロスタゾール投与後のGPTに関しては、Dog 1では軽度に上昇し、Dog 2では軽度に減少した。Dog 3のGPTが投与前後で変化しなかったことも加味して、今回の3頭においてシロスタゾール投与による肝細胞傷害はみられなかったものと推察される。また、Dog 2において投与後にALBの低値が認められたが、投与前と比べてHCTとTPの低下も同時にみられたため、水和状態の影響を受けていたと考えられる。

体表心電図検査では、Dog 1において投与の前後にP波の数が増加しており、シロスタゾールが洞結節に対して陽性変時作用を及ぼしたものと推察される。また、投与後は心室ペーシング波形の直後に心室期外収縮が出現していたことから、心室における静止膜電位が変化した可能性がある。Dog 3では投与前に観察された第2度房室ブロックが、投与後には減少し、心拍数が増加していた。このことから、シロスタゾールは第2度房室ブロックのように房室間に電氣的伝導が残存している場合には、房室伝導を改善する効果を有している可能性がある。

Dog 1のQT間隔は、シロスタゾール投与後に短縮した。通常、QT間隔は心室活動電位の持続時間に一致し、この活動電位持続時間は心拍数の増加によって短縮する [有田 et al., 2007]。したがって、Dog 1におけるQT間隔の短縮は心拍数の増加に伴う変化であると考えられる。また、Dog 1におけるQTc1とQTc2には延長がみられた。犬においてQTc1とQTc2を比較し、それぞれの補正QTとRR間隔の相関関係について検討した研究の中で、QTc1はRR間隔と高い負の相関を示したが、QTc2

は QTc1 よりも RR 間隔との相関が低く、幅広い範囲の心拍数でほぼ一定であることが報告されている [Koyama et al., 2002]。Dog 1 では、投与前の体表心電図検査時には QRS 群は心室ペーシング波形のみであったが、投与後の検査時には心室ペーシング波形の直後に心室期外収縮が観察された。この心室期外収縮と直前の心室ペーシング波形の RR 間隔が非常に短いため、この QT 間隔が過剰補正され、QTc2 と比べると QTc1 でより延長したと考えられる。以上のことから、シロスタゾールは心室内の刺激伝導には影響していない可能性がある。

胸部 X 線検査において、Dog 1 の投与前と Dog 2 の投与前後に計測した VHS が基準範囲を上回っていた。開胸手術に伴う侵襲があり、さらに第 3 度房室ブロックによって心拍数が減少し、血液充満を行う心室の拡張期が延長したことで生じた心拡大と考えられる。シロスタゾールの投与によって Dog 1 の VHS は減少したが、投与後に心拍数が増加していることから、心室の拡張期が短縮したためと推測される。一方で、投与後に VHS が増加した Dog 2 では、心拍数は増加しなかったことから、血液検査の結果も踏まえると、水分過多の状態にあった可能性が推察される。

血圧検査において、Dog 2 には基準範囲内であるものの、SAP、MAP および DAP の低下がみられた。これはシロスタゾールの末梢血管拡張作用に起因するものと考えられる [Schrör, 2002]。Dog 1 と Dog 3 において血圧の低下が認められなかったのは、血管拡張作用による末梢血管抵抗の低下を、心拍数とともに増加した CO が打ち消していた可能性が推察される。

犬の心臓超音波検査では、一般に LVIDDN が 1.7 を超えると左心室拡大があるとされる [Cornell et al., 2004]。本実験に供した犬のうち、Dog 2 の LVIDDN が、シロスタゾール投与の前後において 1.7 を超えていた。その原因としては、前述のように手術侵襲や第 3 度房室ブロックによる心拍数の減少が影響している可能性がある。また、Dog 2 の LVIDd と LVIDDN は、いずれも投与の前後において増加しており、VHS の増加と同様の理由が考えられる。

CO と CI に関しては、Dog 1 と Dog 3 で増加しており、Dog 2 では減少していた。同様に、SV と SVI に関しても、Dog 1 と Dog 3 で増加しており、Dog 2 では減少していた。それぞれの測定値の変化から、Dog 1 では SV と心拍数の増加が、Dog 3 では主に心拍数の増加が CO と CI の変化を引き起こしたものと考えられる。

ホルター心電図検査において、30 秒間の P 波の数はすべての個体で投与後に増加した。シロスタゾールは洞結節に対して陽性変時作用を示すことが知られており [Saito et al., 1995]、洞性の徐脈性不整脈の治療に用いられている [Atarashi et al., 1998, Komiya et al., 2013]。また、健常犬では 5~10 mg/kg を 1 日 2 回経口投与することで心拍数が増加したことや [Fukushima et al., 2018]、洞不全症候群 (Sick sinus syndrome : SSS) の犬において失神徴候を軽減させたことが報告されている [Kanno and Suzuki, 2017]。本実験で得られた結果は、上記の報告と矛盾するものではない。シロスタゾールを 10 mg/kg、1 日 2 回の用量で犬に投与すると、洞結節に対する陽性変時作用によりインパルスの産生が増加した結果、P 波の数が増えたものと考えられる。この P 波の増数は、心房から心室への刺激伝導が完全または不完全に遮断されている症例でも同様に生じ得ることが、本実験の結果から推察される。

ホルター心電図検査から得られた総心拍数をシロスタゾールの投与前後で比較すると、3 頭中 2 頭 (Dog 1、Dog 3) で増加した。第 2 度房室ブロックを示した Dog 3 では、房室間伝導が完全には遮断されていなかったため、上記の P 波の増数による心拍数増加と考えられる。第 3 度房室ブロックの 2 頭 (Dog 1、Dog 2) のうち、Dog 1 では心室拍動数が明らかに増加したが、房室伝導異常の消失は認められなかった。その理由として、心室ペーシングによる QRS 群の直後に入る心室期外収縮が増加した可能性と心室補充収縮が増加した可能性の 2 つが考えられる。心室期外収縮の増加であった場合には、心室筋の興奮性が高まった可能性、または心室筋の傷害により心室期外収縮が増加した可能性が想起される [Marcus, 2020]。特に、PDE III 阻害剤であるシロスタゾールは、cAMP 濃度を上昇させるため、頻脈性不整脈の要因とな

り得る [Lerman, 2015]。心室補充収縮の増加であった場合、Dog 1 ではシロスタゾールの投与により心室筋の自動能が亢進したものと推察される。

一方、Dog 2 では総心拍数の増加が認められなかった。ヒトの第3度房室ブロック患者では、シロスタゾールの投与により房室伝導異常が消失していないにも関わらず、総心室拍動数の増加と心室補充収縮の増加が認められている [Kodama-Takahashi et al., 2003]。また第1章では、第3度房室ブロックを呈する犬においても、シロスタゾールを投与することで、房室伝導異常が消失することなく、総心室拍動数が増加している。これらのことから、第3度房室ブロック症例における心室拍動数の増加の程度や心電図波形に着目すると、心室における自動能がシロスタゾールの投与によって亢進された可能性が考えられる。本実験では、心室拍動数が増加した場合に、ペースメーカーの刺激頻度を上回ることができるよう 50 bpm に設定したが、シロスタゾールの投与によりこの頻度を上回る心室拍動数は得られなかった。第1章においても、第3度房室ブロックを呈した11例中4例の犬では心室拍動数の増加が得られなかった。このことは、本実験における Dog 2 のように、シロスタゾールが十分に作用できない症例が実際の臨床現場において存在することを裏付けているのかもしれない。

本実験に供した3頭すべてにおいて、シロスタゾールの投与による病態の悪化や副反応がみられなかったことから、実臨床への使用に伴う危険性も低いものと考えられる。しかしながら、本実験にはいくつかの制限事項がある。まず1つ目に、実験に供した動物は4頭と少なく、さらに4頭中2頭が第3度房室ブロックから離脱してしまったため、十分な統計解析が行えなかったことである。2つ目に、シロスタゾールの投与期間が限られていたことである。シロスタゾールを長期間投与した場合の効果や副反応は、本実験では検討できていない。3つ目に、本実験に供した犬は、事前に PMI を受けており、さらに房室ブロック作出時に2度目の開胸手術を実施したことで、実際の房室ブロック症例とは大きく異なっている点である。したが

って、臨床の現場に還元できる情報を得るためには、供試動物数やモデル作出方法を見直していく必要がある。

5. 小括

第1章における臨床例での調査結果から、第3度房室ブロック罹患犬はその他の徐脈性不整脈症例と比較して、シロスタゾールに対する治療反応性ならびに予後が悪いことが明らかになった。一方で、第3度房室ブロックの犬でも、シロスタゾールの投与によって心室拍動数が増加している例もみられた。この結果を受けて本章では、実験的に作出した房室ブロック犬にシロスタゾールを投与し、心室拍動数が変化する要因について検討することとした。

健常ビーグル犬の房室接合部領域にアルコールを注入することにより作出した第3度房室ブロック犬2頭と第2度房室ブロック（Mobitz II型）犬1頭を本実験に供した。シロスタゾール（10 mg/kg、1日2回）投与の前後に、血液検査、体表心電図検査、胸部X線検査、血圧検査、心臓超音波検査およびホルター心電図検査を実施した。

その結果、シロスタゾールの投与後すべての個体でP波の数が増加したことから、犬の洞結節に対する陽性変時作用が確認された。第2度房室ブロック犬では総心拍数が増加したことから、房室間の伝導が残存している場合には、シロスタゾールによる治療が有効である可能性が示唆された。第3度房室ブロック犬2頭ではそれぞれの検査結果が異なっていたことから、第3度房室ブロック症例における本剤の心室拍動数増加効果については、さらなる検証実験が必要である。

表 3-1. シロスタゾール 10 mg/kg 投与前後の完全血球計算の結果

検査項目	Dog 1		Dog 2		Dog 3	
	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	9.89	9.81	12.37	10.34	10.61	12.63
RBC ($10^3/\mu\text{L}$)	5,880	6,150	8,570	7,290	6,920	6,470
HGB (g/dL)	13.7	14.4	19.9	16.3	15.3	13.9
HCT (%)	40.0	41.4	57.8	47.8	42.7	39.8
MCV (fL)	68.0	67.3	67.4	65.6	61.7	61.5
MCH (pg)	23.3	23.4	23.2	22.4	22.1	21.5
MCHC (g/dL)	34.3	34.8	34.4	34.1	35.8	34.9
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	333	287	267	243	307	344

WBC : 総白血球数 (基準値 : $6.0-17.0 \times 10^3/\mu\text{L}$)、RBC : 赤血球数 (基準値 : $5,500-8,500 \times 10^3/\mu\text{L}$)、HGB : ヘモグロビン濃度 (基準値 : $12.0-18.0 \text{ g/dL}$)、HCT : ヘマトクリット値 (基準値 : $37.0-55.0 \%$)、MCV : 平均赤血球容積 (基準値 : $60.0-77.0 \text{ fL}$)、MCH : 平均赤血球ヘモグロビン量 (基準値 : $19.5-24.5 \text{ pg}$)、MCHC : 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (基準値 : $32.0-36.0 \text{ g/dL}$)、PLT : 血小板数 (基準値 : $200-500 \times 10^3/\mu\text{L}$)

表 3-2. シロスタゾール 10 mg/kg 投与前後の血液生化学検査および電解質検査の結果

検査項目	Dog 1		Dog 2		Dog 3	
	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後
BUN (mg/dL)	17.3	24.5	25.8	23.0	19.2	17.9
CRE (mg/dL)	0.56	0.72	0.79	0.69	0.54	0.46
GPT (U/L)	59	83	238	199	34	36
ALP (U/L)	27	38	44	62	56	56
TP (g/dL)	6.8	6.6	5.2	5.0	7.0	7.0
ALB (g/dL)	2.7	2.7	2.8	2.5	3.2	3.0
Na (mEq/L)	147	146	148	147	146	146
K (mEq/L)	4.4	4.4	4.6	4.8	4.3	4.1
Cl (mEq/L)	109	106	106	108	107	106

BUN：血液尿素窒素（基準値：9.2-29.2 mg/dL）、CRE：クレアチニン（基準値：0.40-1.40 mg/dL）、GPT：グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ濃度（基準値：17-78 U/L）、ALP：アルカリフォスファターゼ濃度（基準値：24-117 U/L）、TP：総蛋白（基準値：5.0-7.2 g/dL）、ALB：アルブミン（基準値：2.6-4.0 g/dL）、Na：ナトリウム（基準値：141-152 mEq/L）、K：カリウム（基準値：3.8-5.0 mEq/L）、Cl：クロール（基準値：102-117 mEq/L）

表 3-3. シロスタゾール 10 mg/kg 投与前後の体表心電図検査の結果

検査項目	Dog 1		Dog 2		Dog 3	
	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後
PQ間隔 (ms)	-	-	-	-	137	100
QT間隔 (ms)	295	248	305	310	235	228
QTc1 (ms)	268	320	276	281	269	269
QTc2 (ms)	277	290	286	291	257	254

QTc1 : Bazett 法による補正 QT 間隔、QTc2 : Fridericia 法による補正 QT 間隔

Dog 1 と Dog 2 では P 波と QRS 群が完全に独立していたため、PQ 間隔は算出していない。

表 3-4. シロスタゾール 10 mg/kg 投与前後の胸部 X 線検査の結果

検査項目	Dog 1		Dog 2		Dog 3	
	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後
VHS	11.3	10.8	11.5	12.3	10.7	10.5
CTR (%)	53.0	56.6	57.1	56.6	51.5	51.0

VHS : 心臓脊椎スケール法 (基準値 : 10.1-10.9)、CTR : 心胸郭比 (基準値 : < 65 %)

VHS の基準値として、心臓病でないビーグル犬 19 頭の平均値 ± 標準偏差を引用した [Kraetschmer et al., 2008]。

表 3-5. シロスタゾール 10 mg/kg 投与前後の血圧検査の結果

検査項目	Dog 1		Dog 2		Dog 3	
	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後
SAP (mmHg)	118	119	160	136	144	139
MAP (mmHg)	74	89	110	81	100	94
DAP (mmHg)	54	74	85	59	81	72

SAP : 収縮期動脈圧 (基準値 : 111-151 mmHg)、MAP : 平均動脈圧 (基準値 : 81-113 mmHg)、DAP : 拡張期動脈圧 (基準値 : 59-89 mmHg)

基準値として、健常犬 1,267 頭の平均値 ± 標準誤差を引用した [Bodey and Michell, 1996]。

表 3-6. シロスタゾール 10 mg/kg 投与前後の心臓超音波検査の結果

検査項目	Dog 1		Dog 2		Dog 3	
	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後
LVIDd (cm)	3.18	3.12	3.35	3.53	3.62	3.51
LVIDs (cm)	1.66	1.44	1.72	1.87	1.77	1.55
FS (%)	47.8	53.8	48.6	46.9	51.2	55.9
LVIDDN	1.61	1.58	1.71	1.80	1.79	1.73
LVIDSN	0.80	0.69	0.84	0.91	0.83	0.73
LA/Ao	1.22	1.36	1.46	1.36	1.28	1.19
LVOT-Diam (cm)	1.24	1.09	1.08	1.11	0.98	0.99
SV (mL)	22.8	28.2	24.4	21.2	26.2	27.6
CO (L/min)	3.2	3.6	1.2	1.1	2.1	2.8
SVI (mL/m ²)	47.7	58.8	52.3	45.5	52.0	54.9
CI (L/min/m ²)	6.7	7.5	2.6	2.3	4.1	5.6
E wave (m/s)	0.74	1.19	1.10	1.09	1.49	1.39
A wave (m/s)	0.57	0.72	0.68	0.66	0.94	0.93
E/A	1.30	1.65	1.62	1.65	1.59	1.49
Septal e' (m/s)	0.08	0.13	0.10	0.07	0.14	0.12
Septal E/e'	9.3	9.2	11.0	15.6	10.6	11.6
Lateral e' (m/s)	0.10	0.11	0.13	0.12	0.16	0.17
Lateral E/e'	7.4	10.8	8.5	9.1	9.3	8.2

LVIDd : 左室拡張末期径、LVIDs : 左室収縮末期径、FS : 左室内径短縮率、
LVIDDN : 体重標準化左室拡張末期径、LVIDSN : 体重標準化左室収縮末期径、
LA/Ao : 左心房径/大動脈径比、LVOT-Diam : 大動脈弁輪部径、SV : 一回拍出量、
CO : 心拍出量、SVI : 一回拍出量係数、CI : 心係数、E wave : 左室早期流入波、A
wave : 心房収縮波、E/A : E 波/A 波比、Septal e' : 心室中隔における僧帽弁輪部速度
の拡張早期成分、Septal E/e' : E 波/Septal e' 比、Lateral e' : 左室側壁における僧帽弁
輪部速度の拡張早期成分、Lateral E/e' : E 波/Lateral e' 比

表 3-7. シロスタゾール 10 mg/kg 投与前後のホルター心電図検査の結果

検査項目	Dog 1		Dog 2		Dog 3	
	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後
総心拍数 (bpm)	81,718	93,595	71,866	71,915	82,263	87,551
最大心拍数 (bpm)	94	106	79	64	133	162
平均心拍数 (bpm)	55	63	49	49	55	59
最小心拍数 (bpm)	49	49	49	49	48	49
P波の数 (30秒間)	60	97	80	102	37	47

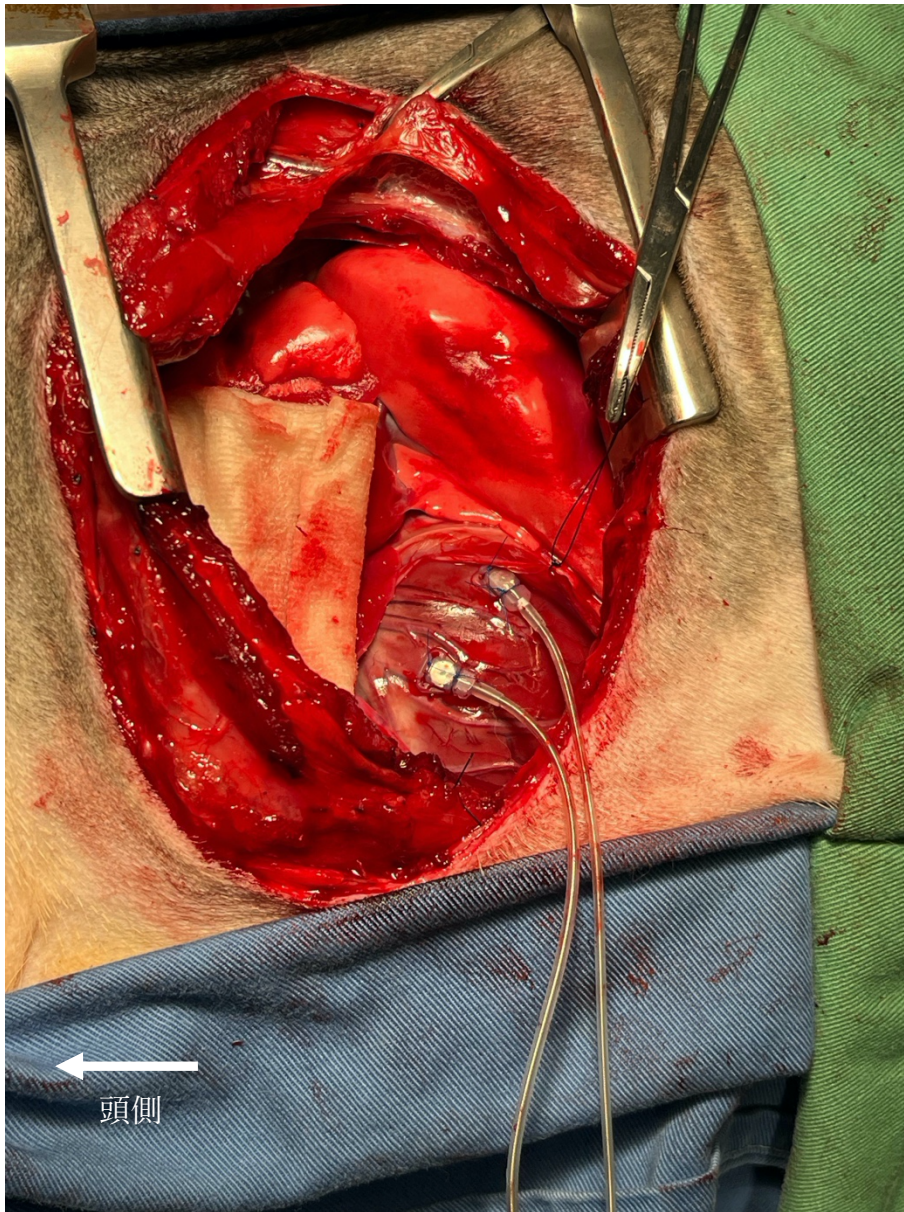


図 3-1. 心外膜ペーシングリードの設置

供試動物に全身麻酔をかけ、右側横臥位にて保定し、左側第 5 肋間部開胸にて、左心室にアプローチし、心外膜ペーシングリード（CapSure Epi（バイポーラ）リード：日本メドトロニック株式会社、東京）を 5-0 のポリプロピレン製非吸収性モノフィラメント縫合糸（5-0 PROLENE：ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社、東京）で左心室の心外膜と縫着した。

図は向かって左が頭側である。



図 3-2. ペーシングリードとジェネレータの接続

ペーシングリードは横隔膜を貫通させて腹腔内を通し、切開した左側腹部から1度体外へ出してからジェネレータ（Attesta™ SR MRI SureScan：日本メドトロニック株式会社、東京）に接続した。ジェネレータの設定は、VVIRモード、90 bpmとした。その後、切開した側腹部筋間にジェネレータを埋設した。

図は向かって左が頭側である。

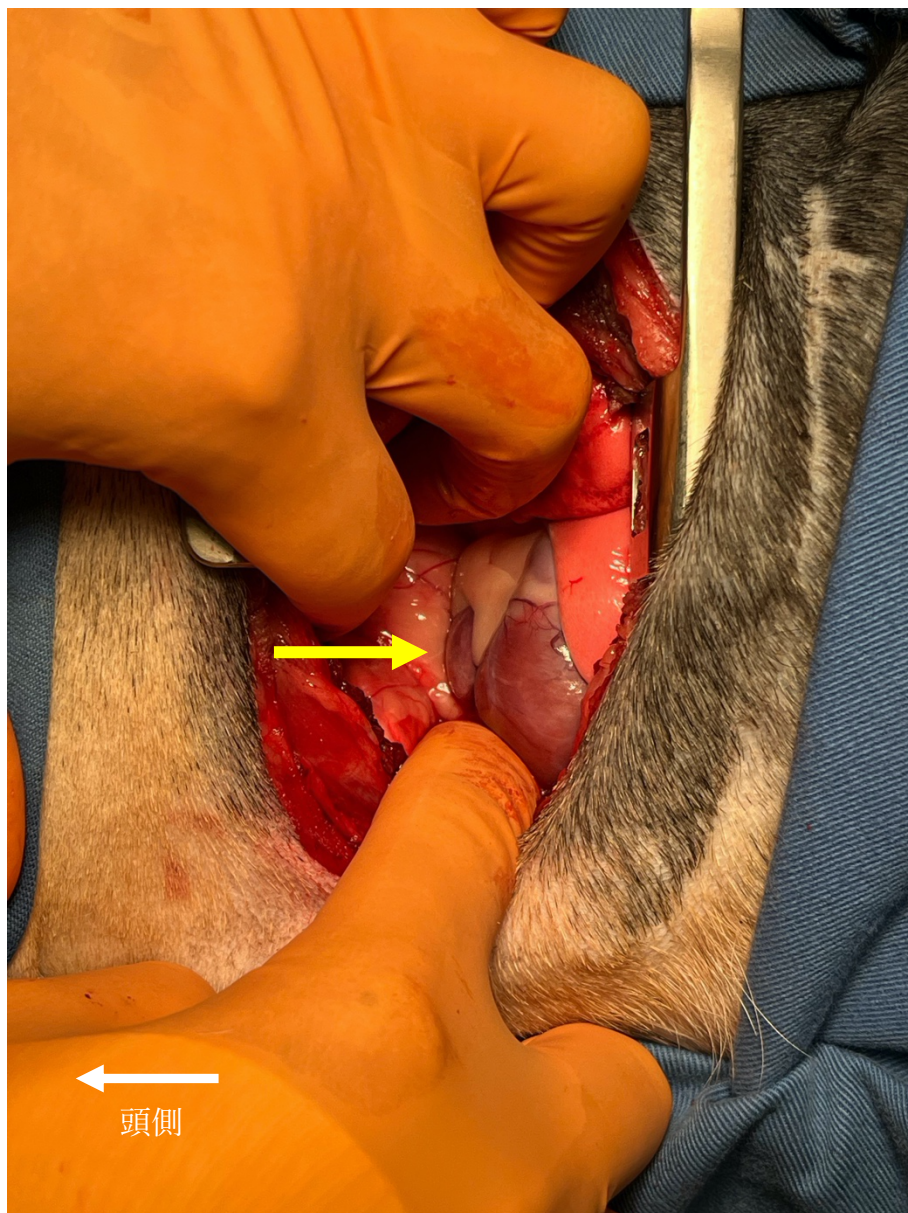


図 3-3. 右心耳の確認

供試動物に全身麻酔をかけ、右側横臥位にて保定し、左側第3肋間部開胸にて、心臓の頭側にアプローチし、右心耳（黄矢印）を確認している。

図は向かって左が頭側である。

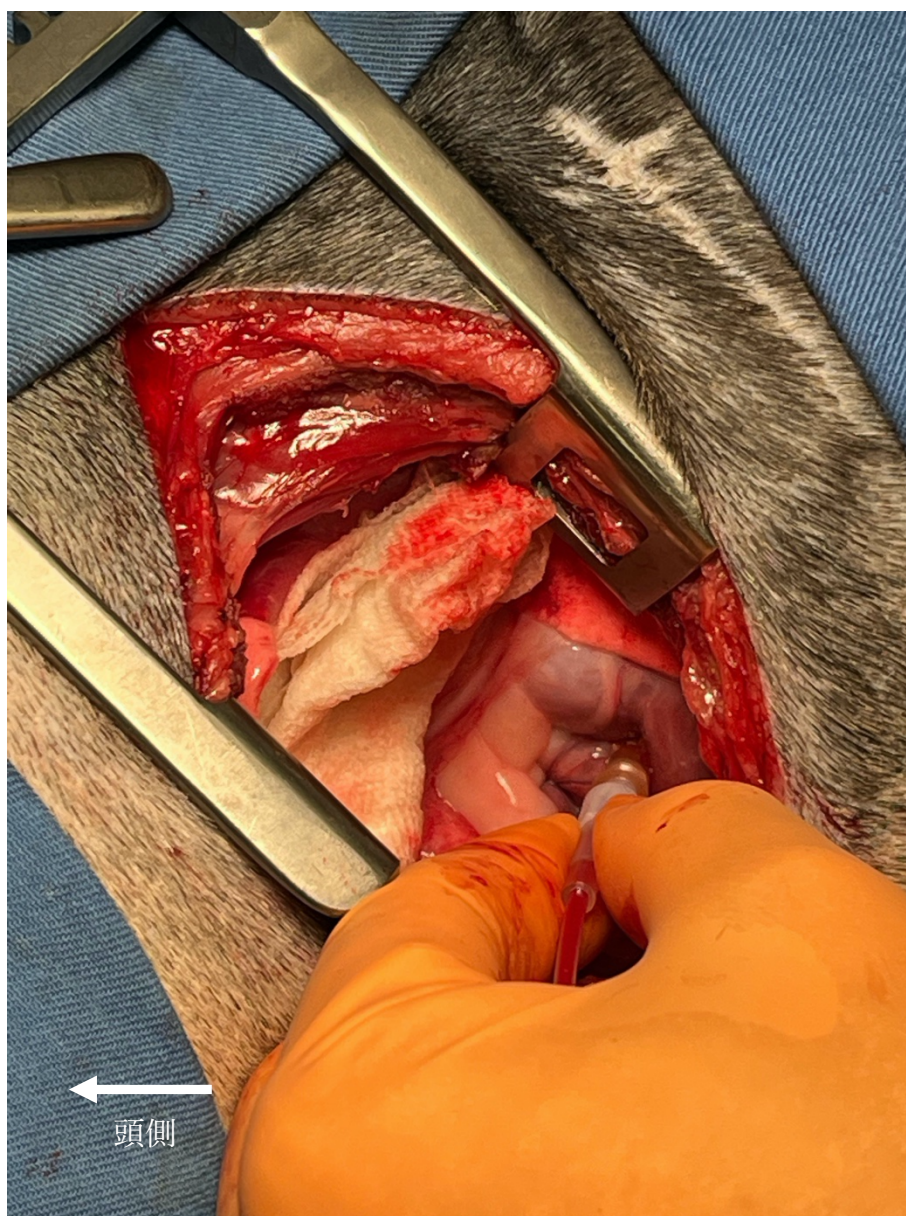


図 3-4. 房室結節へのアルコール注入

右心耳をめくり、右心房壁下部から心房中隔に向けて 25G 注射針を刺入しているところ。針先が心内腔に出ているか否か、エクステンションチューブを挟んでつないだ 2.5 mL のシリンジで吸引し、逆血が無いことを確認した上でエタノールを 0.5 mL ずつ 1~3 回、1 回につき 30 秒かけて投与した。

図は向かって左が頭側である。

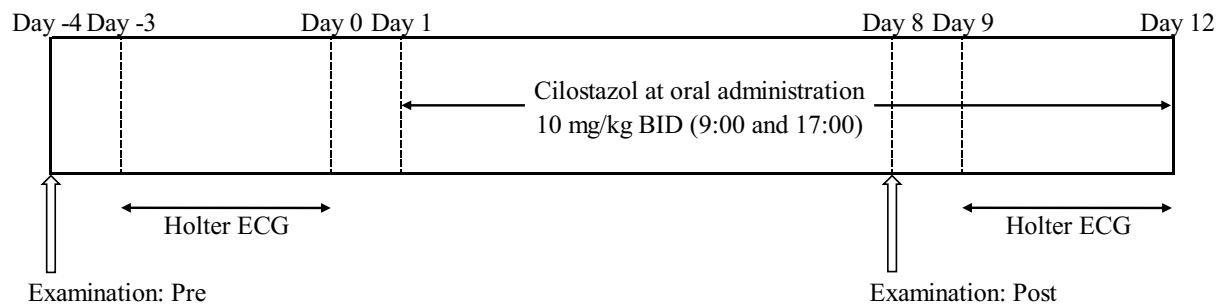


図 3-5. 実験スケジュール

血液検査、体表心電図検査、胸部 X 線検査、血圧検査および心臓超音波検査はシロスタゾール投与前に行った (Day -4)。ホルター心電図検査は、Day -3 から Day 0 までの 3 日間実施した。ホルター心電図検査終了後、翌日からシロスタゾールの投与を開始し、Day 1 から Day 12 まで継続した。投与後の血液検査、体表心電図検査、胸部 X 線検査、血圧検査および心臓超音波検査を Day 8 に行い、その翌日である Day 9 から Day 12 までの 3 日間、ホルター心電図検査を実施した。

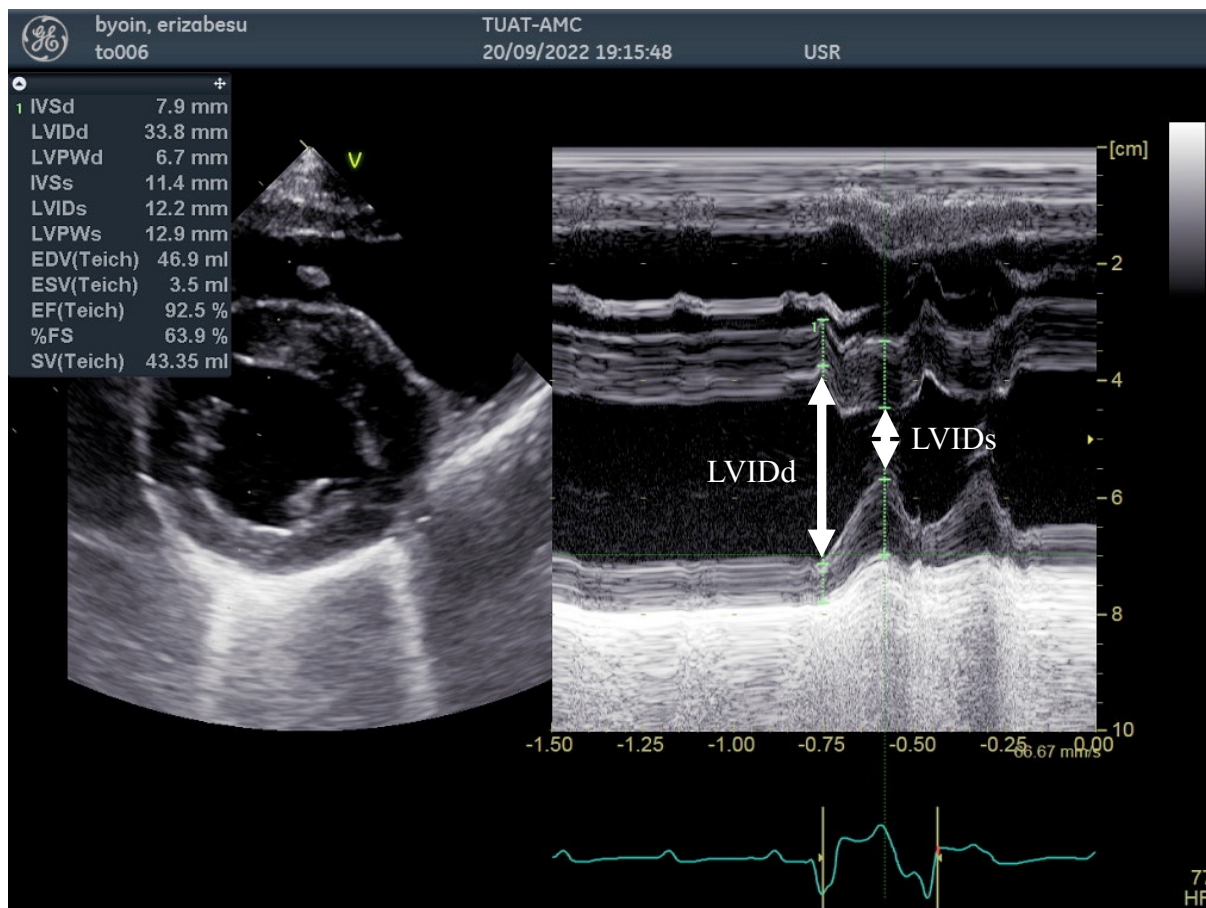


図 3-6. 右傍胸骨左室短軸断面腱索レベルの M モードにおける計測方法

左室拡張末期径 (LVIDd)、左室収縮末期径 (LVIDs)、左室内径短縮率 (Fractional shortening : FS) を測定した。

図は、第 3 度房室ブロックとなった Dog 1 のシロスタゾール投与後の心臓超音波検査所見である。心室ペーシングを示す QRS 群の直後に心室期外収縮が連続しており、どちらの時相においても左心室自由壁・心室中隔が収縮していることが明らかである。

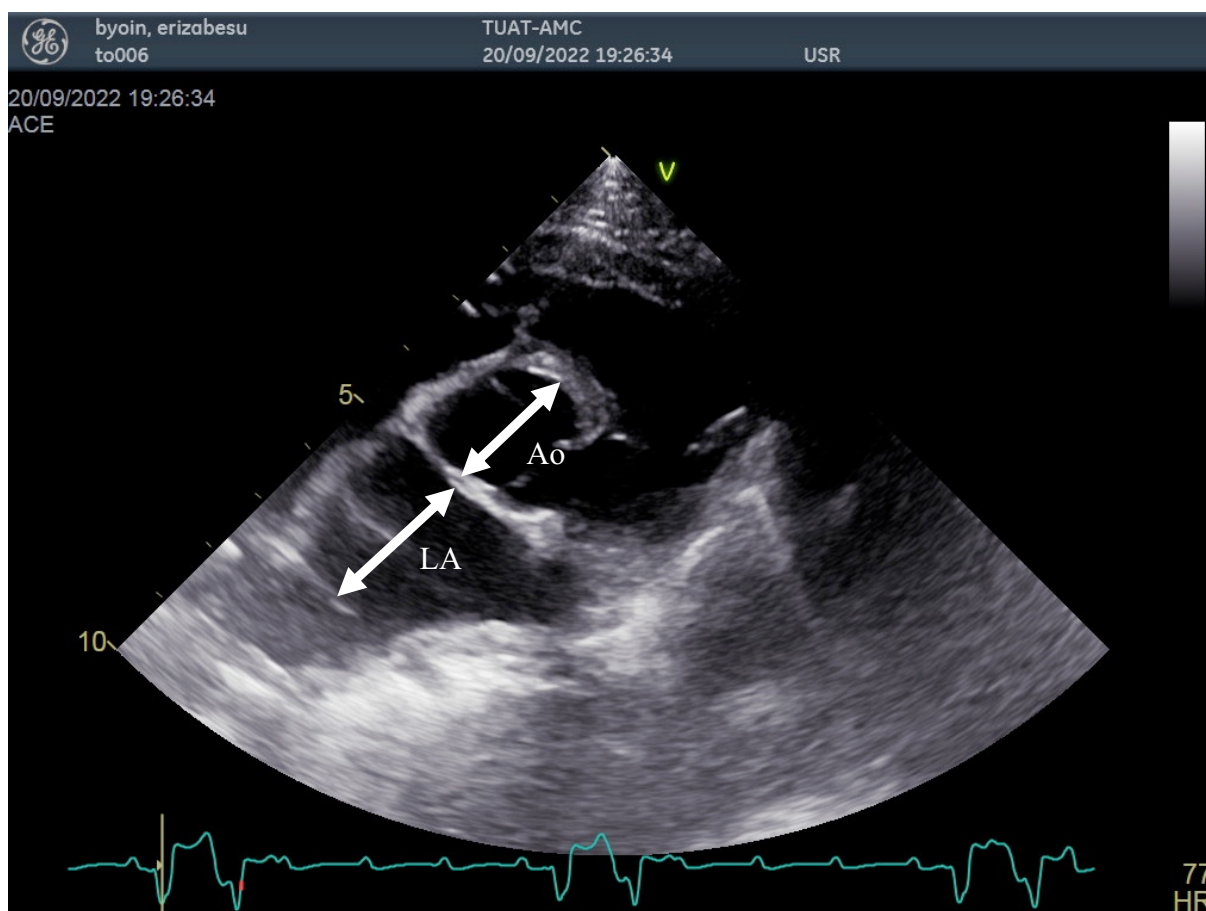


図 3-7. 右傍胸骨左室短軸断面心基部レベルの B モードにおける計測方法

左心房径 (LA (mm)) と大動脈径 (Ao (mm)) をそれぞれ収縮末期において測定し、さらにその比である LA/Ao を計測した。

図は、第 3 度房室ブロックとなった Dog 1 のシロスタゾール投与後の心臓超音波検査所見である。

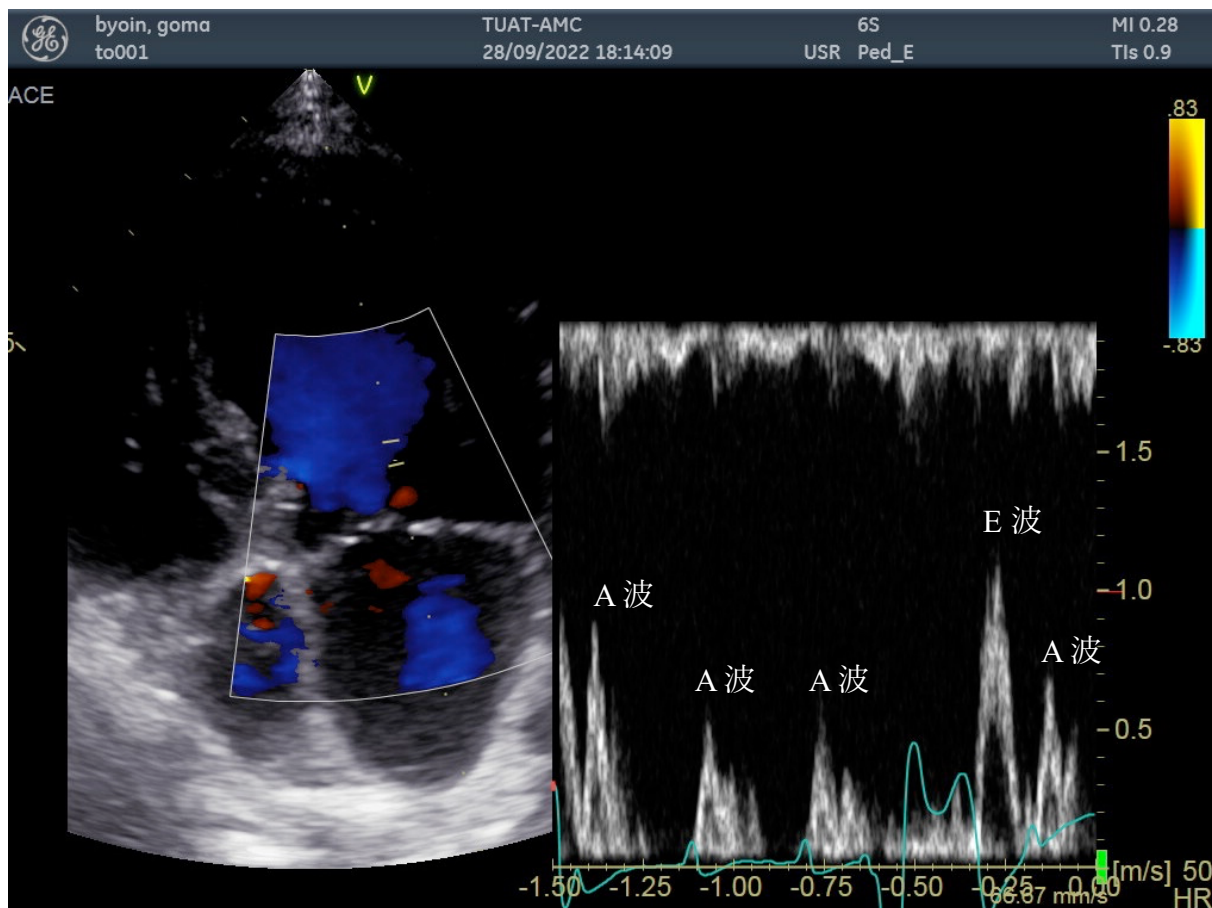


図 3-8. 左傍胸骨心尖部四腔断面における左室流入波形の計測

僧帽弁口部を描出し、パルスドプラ法を用いて左室流入波形を構成する早期流入波（E 波、E wave）と心房収縮波（A 波、A wave）の波高、E 波と A 波の比（E/A）を計測した。

図は、第 3 度房室ブロックとなった Dog 2 のシロスタゾール投与後の心臓超音波検査所見である。収縮末期に認められる E 波と P 波の直後に認められる A 波を、それぞれ確認することができる。

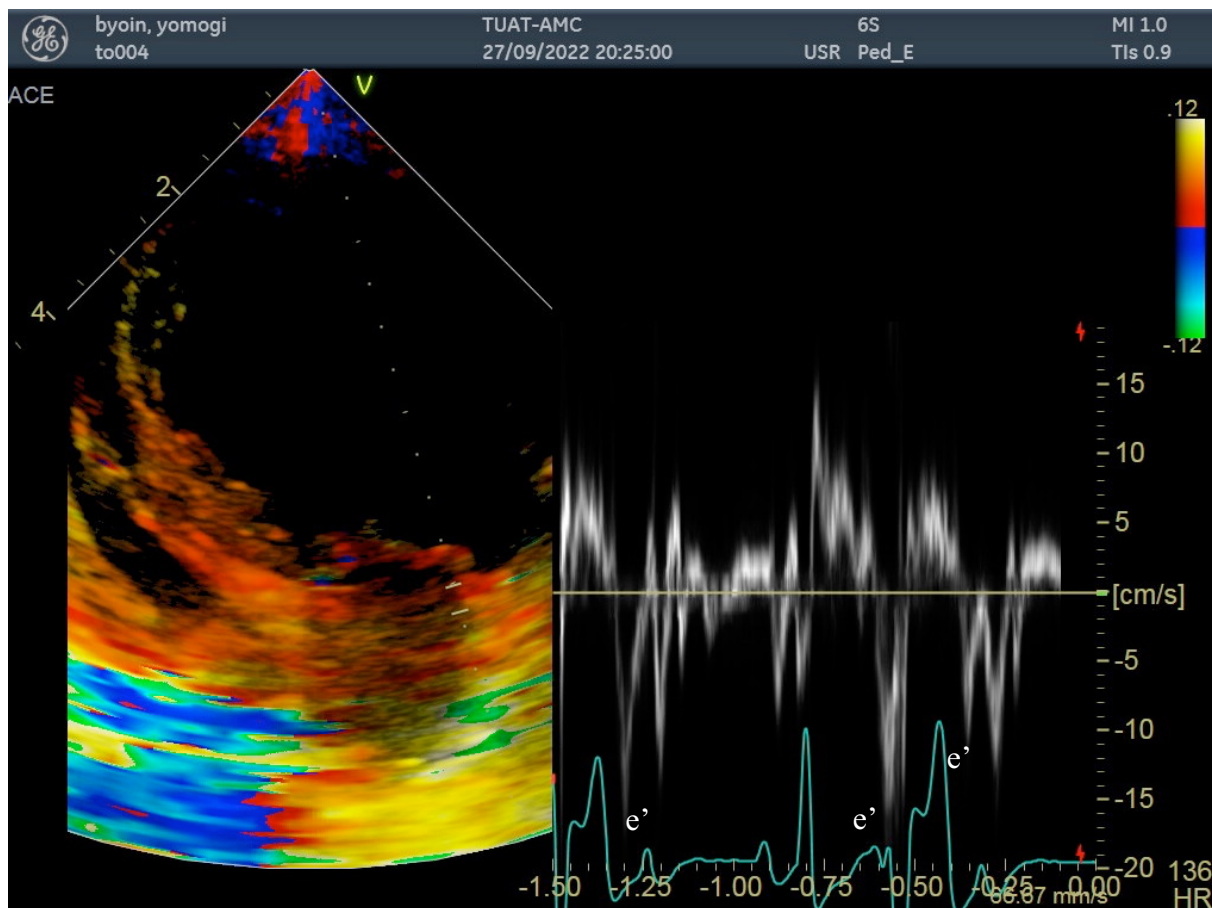


図 3-9. 左傍胸骨心尖部四腔断面における僧帽弁輪部速度の計測

僧帽弁口部を描出し、組織ドプラ法を用いて左心室側壁における僧帽弁輪部速度の拡張早期成分（e'）の波高（Lateral e'）を計測し、E波とe'の比（Lateral E/e'）を算出した。

図は、第2度房室ブロック（Mobitz II型）となったDog 3のシロスタゾール投与後の心臓超音波検査所見である。

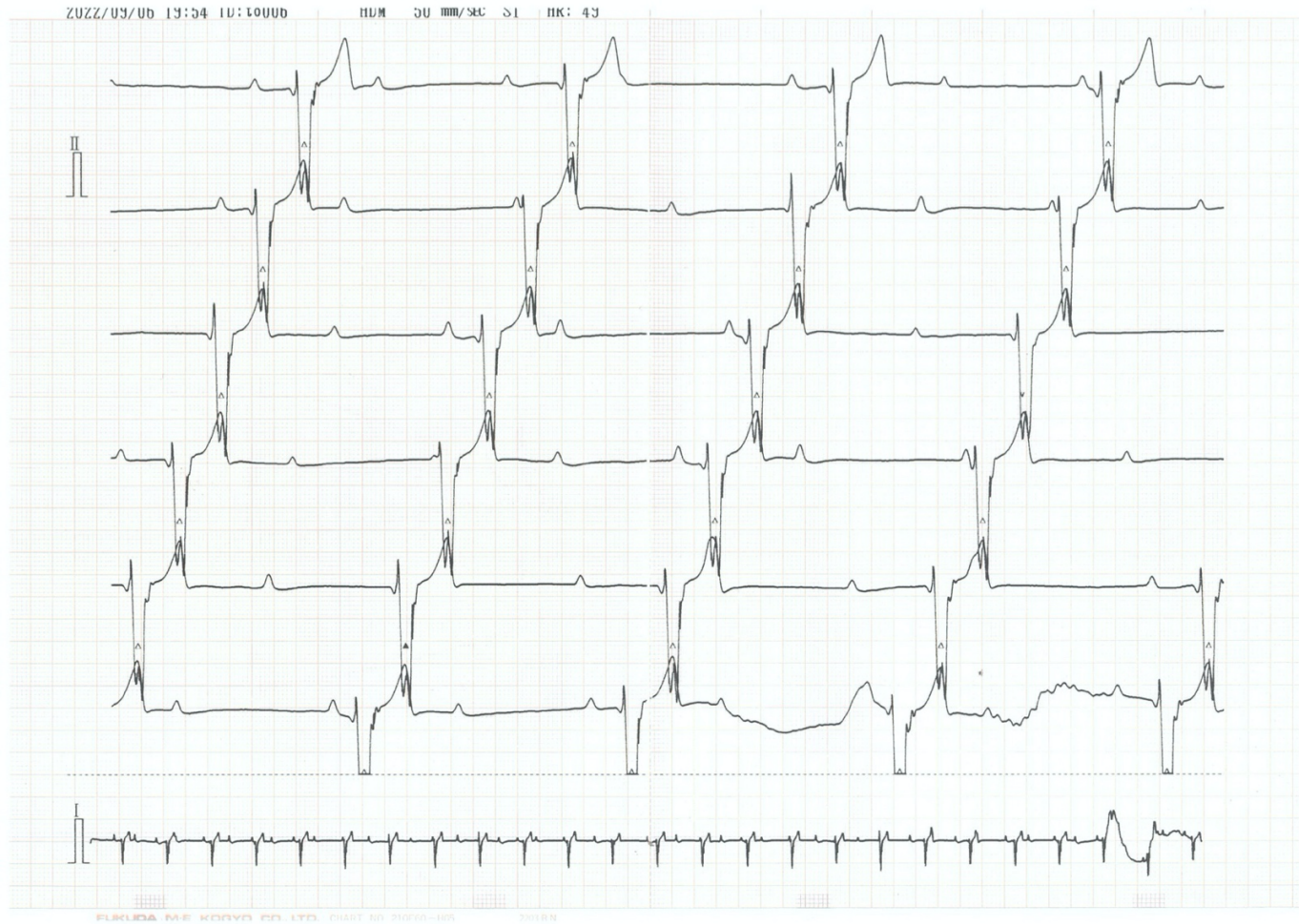


図 3-10. シロスタゾール投与前における Dog 1 の心電図検査記録

P 波と独立した QRS 群は心室ペーシング波形である。

II 誘導で 30 秒間記録した。心室拍動数は 50 bpm、ペーパースピードは 50 mm/sec である。



図 3-11. シロスタゾール投与後における Dog 1 の心電図検査記録

P 波と独立した QRS 群は心室ペーシング波形である。図 3-10 と比べて P 波が増え、心室ペーシング波形の直後に心室期外収縮を伴っている。

II 誘導で 30 秒間記録した。心室拍動数は 78 bpm、ペーパースピードは 50 mm/sec である。

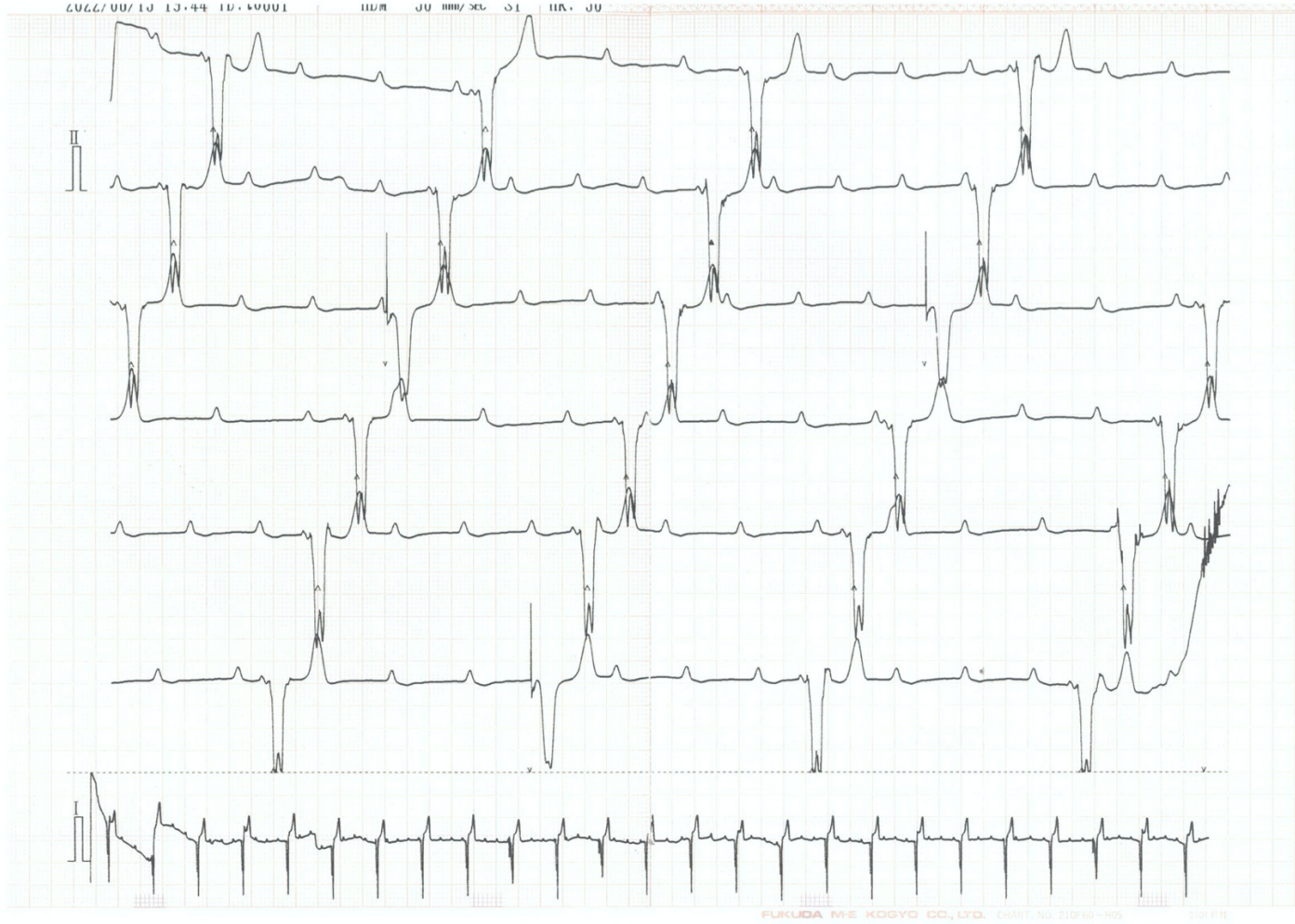


図 3-12. シロスタゾール投与前における Dog 2 の心電図検査記録

P 波と独立した QRS 群は心室ペーシング波形である。

II 誘導で 30 秒間記録した。心室拍動数は 50 bpm、ペーパースピードは 50 mm/sec である。



図 3-13. シロスタゾール投与後における Dog 2 の心電図検査記録

P 波と独立した QRS 群は心室ペーシング波形である。図 3-12 と比べて大きな変化はない。

II 誘導で 30 秒間記録した。心室拍動数は 50 bpm、ペーパースピードは 50 mm/sec である。

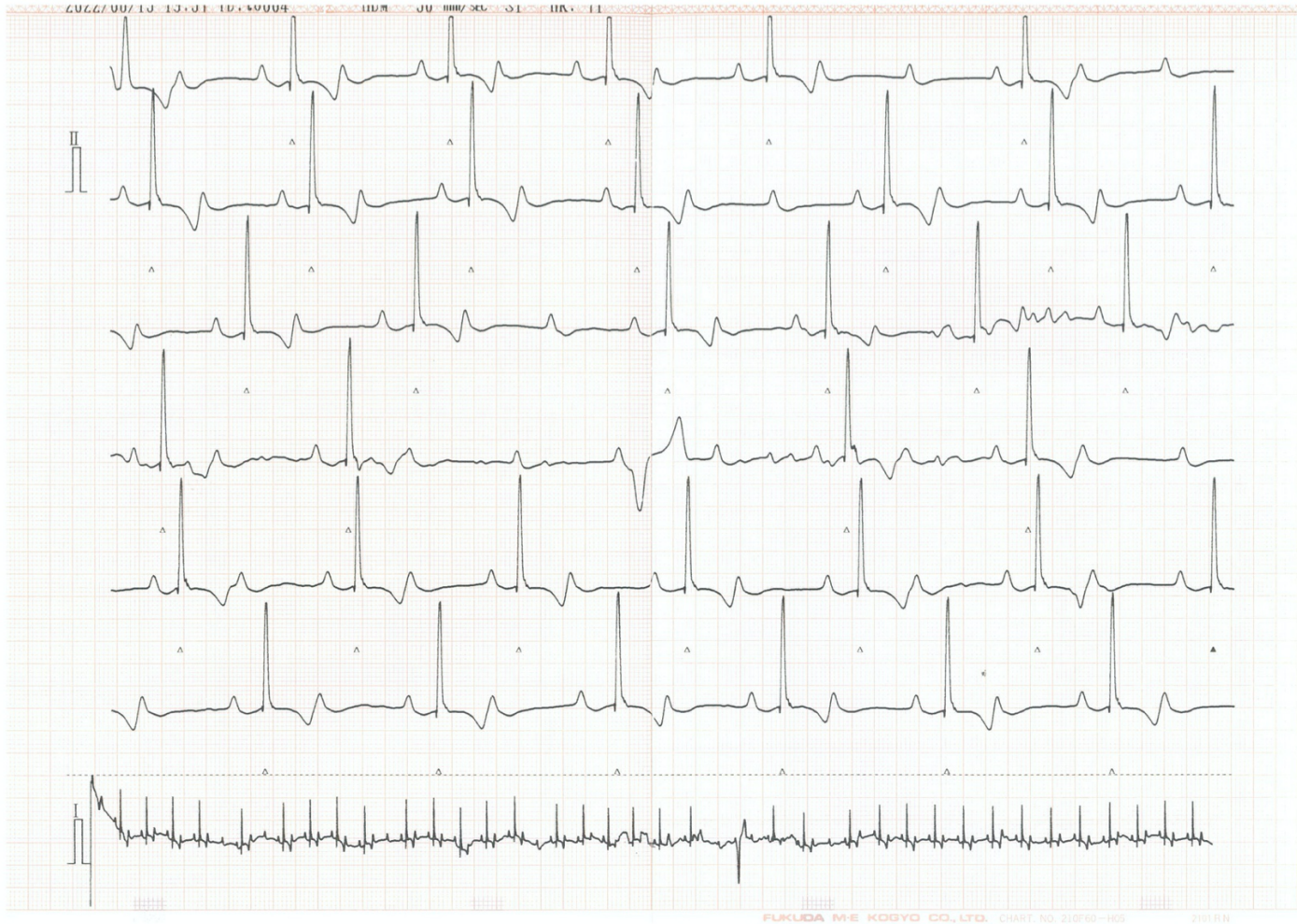


図 3-14. シロスタゾール投与前における Dog 3 の心電図検査記録

PQ 間隔の延長のない QRS 群の脱落を認め、第 2 度房室ブロック (Mobitz II 型) と判断した。

II 誘導で 30 秒間記録した。心拍数は 72 bpm、ペーパースピードは 50 mm/sec である。



図 3-15. シロスタゾール投与後における Dog 3 の心電図検査記録

1 拍目に心室期外収縮、直後に第 2 度房室ブロック (Mobitz II 型) を認めるものの、以降は不整脈を認めず洞調律である。

II 誘導で 30 秒間記録した。心拍数は 90 bpm、ペーパースピードは 50 mm/sec である。

総括

1. 犬の徐脈性不整脈症例に対するシロスタゾールの使用状況とその有用性に関する回顧的調査

近年、犬の徐脈性不整脈に対して抗血小板薬であるシロスタゾールが有用であるとの報告が増え、獣医療において実施が難しいペースメーカー植込み（Pacemaker implantation : PMI）の代替法として注目されている。PMI は実際の小動物臨床現場では治療の選択肢となり得ない場合も多いため、硫酸アトロピン、イソプロテレノール、テルブタリン、アミノフィリンなど、これまで様々な薬剤による内科的治療が試みられてきた。それらの薬剤よりも有用性の高いことが期待されるシロスタゾールであるが、現在も使用方法などに関して不明な点が多い。そこでまず第1章では、東京農工大学農学部附属動物医療センターおよび国内 23 ヶ所の動物病院に調査協力を依頼し、徐脈性不整脈を呈した犬に対するシロスタゾールの使用状況とその有用性を明らかにするとともに、臨床例に基づいて至適用量を検討することを目的として、各種不整脈に対する治療反応性や予後に関して解析した。

洞停止、洞徐脈、高度房室ブロック、第3度房室ブロック、SSS（徐脈頻脈症候群）などの徐脈性不整脈を呈し、シロスタゾールによる内科的治療を受けていた犬 59 例を対象とし、後ろ向き研究デザインにて層別生存時間解析を行った。その結果、1 回あたり 10 mg/kg 以上の投薬を受けていたグループの予後が最も良好であったことから、この量がシロスタゾールの至適用量であると判断された。一方、第3度房室ブロック罹患犬は、その他の徐脈性不整脈の症例よりもシロスタゾールに対する治療反応性と予後が明らかに悪かった。

2. 健常犬におけるシロスタゾールの抗血小板作用に関する全血血栓形成観測システム T-TAS を用いた検討

本来、シロスタゾールは抗血小板薬であることから、1回あたり 10 mg/kg、1日2回以上投与した場合に、副反応としての血小板凝集抑制作用が懸念されるところである。そこで第2章では、全血血栓形成能解析装置（Total Thrombus-formation Analysis System : T-TAS）を用いて、同用量のシロスタゾール投与によって、健常犬の止血機能がどの程度影響を受けるのか調べることにした。さらに、生体内における一次止血機構の評価として、BMBTの計測も実施した。加えて、抗血小板薬として獣医療においても広く使用されているアスピリンを対照薬として用い、シロスタゾールと比較検討した。

健常犬に対して、シロスタゾールを 10 mg/kg、1日2回の投与量で使用した場合、投薬の前後で T-TAS と BMBT の計測結果に変化は認められなかった。一方、アスピリンを 2 mg/kg、1日1回の用量で投与した場合には、シロスタゾール投与後のデータと比較して、T-TAS の測定項目において閉塞時間が延長し、圧上昇曲線の下部領域面積（AUC）も低下した。すなわち、アスピリンによって一次止血機構が抑制されていたが、今回の用量のシロスタゾール投与ではこの抑制は認められなかった。加えて、BMBT ではアスピリンを投与した場合でも明らかな変化がなかったことから、少なくとも BMBT と比べて T-TAS が止血機能の変化をより精緻に捕捉している可能性が示唆された。これらの結果から、第1章で至適用量とした 10 mg/kg、1日2回であれば短期間に止血機能に対して大きな影響を及ぼす可能性は低いものと考えられた。

3. 実験的房室ブロック犬におけるシロスタゾールの心拍数増加効果に関する検討

第3度房室ブロック罹患犬では、シロスタゾールに対する治療反応性と予後が、その他の徐脈性不整脈症例と比較して悪いことが、第1章での調査の結果から明らかになった。臨床の現場で第3度房室ブロックの犬に遭遇した場合、内科的治療による速やかな対応が必要とされる場面も少なくない。そこで本章では、実験的に作出した房室ブロック犬に、シロスタゾールを至適用量である 10 mg/kg、1日2回投

与することで、心拍数を含めた各種循環器機能にみられる変化を検証することとした。また、それらの結果から、本剤の徐脈性不整脈に対する薬理作用とその機序について検討を加えることとした。

実験犬の4頭の房室伝導系領域にエタノールを注入することにより、2頭に第3度房室ブロック、1頭に第2度房室ブロック（Mobitz II型）を誘発することができた。これら3頭の供試犬に至適用量である10 mg/kg、1日2回のシロスタゾールを投与したところ、すべての犬でP波の数が増加した。さらに、第2度房室ブロック犬では総心拍数が増加したことから、房室間の伝導が残存している場合には、心拍数を増やすうえで本剤の投与は有用であると考えられた。一方、2頭の第3度房室ブロック犬のうち1頭では心室拍動数が増加したものの、もう1頭では変化がみられなかった。前者においては、シロスタゾールにより心室筋の興奮性が高まったことや自動能が亢進したことで心室拍動数が増加したと推察される。また、心室拍動数に変化がみられなかった後者では、本剤が心室筋に対して十分に作用しなかった可能性があり、このことは実際の臨床例でシロスタゾールが奏効しなかった症例が含まれていた事実と呼応しているものと考えられた。

謝辞

本稿を終わるに臨み、本研究に関して終始にわたり丁寧かつ熱心な御指導、御鞭撻頂きました東京農工大学農学部附属小金井動物救急医療センター福島研究室・福島隆治教授に深謝致します。また、本学獣医臨床腫瘍学研究室・町田登教授にも本研究に関する大変有意義な御助言および御指導を賜り、ここに感謝の意を表します。また、本学位論文の完成のために御指導と御助言を頂きました本学獣医薬理学研究室・佐々木一昭准教授、岩手大学小動物病態診断学研究室・山崎真大教授、岩手大学獣医画像診断学研究室・片山泰章教授に厚く御礼申し上げます。

そして、日頃より御支援と御協力を頂きました本学農学部附属動物医療センターの特任助教、研修医の先生の皆様、本学農学部附属小金井動物救急医療センター福島研究室内の大学院生、学生の皆様に深く感謝致します。

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

引用文献

1. Acierno MJ, Brown S, Coleman AE, Jepson RE, Papich M, Stepien RL and Syme HM. (2018). ACVIM consensus statement: Guidelines of the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* **32**: 1803-1822.
2. Akiyama H, Kudo S and Shimizu T. (1985). The absorption, distribution and excretion of a new antithrombotic and vasodilating agent, cilostazol, in rat, rabbit, dog and man. *Arzneimittelforschung.* **35**: 1133-1140.
3. Alexio ASC, Alfonso A, Kichise BK, Neto FT, Giroto CH, Garzesi AM, Garcia LR, De Andrade RR and Lourenco MLG. (2017). Pacemaker implant in a dog with sick sinus syndrome. *Acta Scientiae Veterinariae.* **45**: 6.
4. 有田 眞, 犀川 哲典, 小野 克重. (2007). QT 間隔の診かた・考えかた, 医学書院, 東京
5. Atarashi H, Endoh Y, Saitoh H, Kishida H and Hayakawa H. (1998). Chronotropic effects of cilostazol, a new antithrombotic agent, in patients with bradyarrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol.* **31**: 534-539.
6. Aumann M, Rossi V, Boedec KL and Diquelou A. (2013). Comparison of the buccal mucosal bleeding time in dogs using 3 different-sized lancet devices. *Vet Clin Pathol.* **42**: 451-457.
7. Billen F and Israel NV. (2006). Syncope secondary to transient atrioventricular block in a german shepherd dog with dilated cardiomyopathy and atrial fibrillation. *J Vet Cardiol.* **8**: 63-68.
8. Bodey AR and Michell AR. (1996). Epidemiological study of blood pressure in domestic dogs. *J Small Anim Pract.* **37**: 116-125.
9. Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, Santilli RA, Chiavegato D, Poggi M, Bellino C, La Rosa G, Zanatta R, Haggstrom J and Tarducci A. (2008). Survival characteristics and

- prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med.* **22**: 120-128.
10. Born GVR. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* **194**: 927-929.
 11. Cornell CC, Kittleson MD, Torre PD, Haggstrom J, Lombard CW, Pedersen HD, Vollmar A and Wey A. (2004). Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Intern Med.* **18**: 311-321.
 12. Crane WS, Griffin WR and Messent RP. Introduction to commercial pet foods. 2000; pp. 111-126. In: *Small Animal Clinical Nutrition*, 4th ed (Hand, S. M., Thatcher, D. C., Remillard, L. R. and Roudebush, P. eds), Mark Morris Institute, Kansas.
 13. Dudley A, Thomason J, Fritz S, Grady J, Stokes J, Wills R, Pinchuk L, Mackin A and Lunsford K. (2013). Cyclooxygenase expression and platelet function in healthy dogs receiving low-dose aspirin. *J Vet Intern Med.* **27**: 141-149.
 14. Edwards NJ. *Bolton's Handbook of Canine and Feline Electrocardiography*, 2nd ed., 1987. WB Saunders, Philadelphia.
 15. Fukushima R, Kawaguchi T, Yamada S, Yoshimura A, Hirao D and Ohmori T. (2018). Effects of cilostazol on the heart rate in healthy dogs. *J Vet Med Sci.* **80**: 1707-1715.
 16. Fukushima R, Araie T, Suzuki S, Matsumoto H, Morita S, Aytemiz D, Ohmori T, Kawaguchi T, Yamada S, Uchide T and Itoh N. (2017). A case of situational syncope due to cough in a dog. *J Anim Clin Med.* **26**: 29-33. (in Japanese.)
 17. Fukushima R, Ohmori T, Goya S, Nakada M, Chantawong P, Kawaguchi T, Yamada S, Tanaka R, Uchide T and Morita S. (2017). Two dogs with improved renal function after administration of cilostazol. *Adv Anim Cardiol.* **50**: 15-19. (in Japanese.)
 18. Gamssari F, Mahmood H, Ho JS, Villareal RP, Liu B, Rasekh A, Garcia E and Massumi A. (2002). Rapid ventricular tachycardias associated with cilostazol use. *Tex Heart Inst J.* **29**: 140-142.

19. Gilmer JF, Murphy MA, Shannon JA, Breen CG, Ryder SA and Clancy JM. (2013). Single oral dose study of two isosorbide-based aspirin prodrugs in the dog. *J Pharm Pharmacol.* **55**: 1351-1357.
20. Hall LW, Dunn JK, Delaney M and Shapiro LM. (1991). Ambulatory electrocardiography in dogs. *Vet Rec.* **129**: 213-216.
21. Hasegawa S, Inomata J, Yano K, Shimofurutani N, Ueda S and Saitoh E. (2012). Bioequivalence study of improved modified formulation of cilostazol 100mg orally disintegrating tablet and currently marketed cilostazol 100mg orally disintegrating tablet (Pletaal® OD tablet 100mg) in healthy adult male subjects. *Jpn Pharmacol Ther.* **40**: 955-964.
22. Hoh CM, Smith SA, McMichael MA and Byron JK. (2011). Evaluation of effects of low-dose aspirin administration on urinary thromboxane metabolites in healthy dogs. *Am J Vet Res.* **72**: 1030-1045.
23. Hosokawa K, Ohnishi T, Fukasawa M, Kondo T, Sameshima H, Koide T, Tanaka KA and Maruyama I. (2012). A microchip flow-chamber system for quantitative assessment of the platelet thrombus formation process. *Microvasc Res.* **83**: 154-161.
24. Hosokawa K, Ohnishi T, Kondo T, Fukasawa M, Koide T, Maruyama I and Tanaka KA. (2011). A novel automated microchip flow-chamber system to quantitatively evaluate thrombus formation and antithrombotic agents under blood flow conditions. *J Thromb Haemost.* **9**: 2029-2037.
25. Iwanaga T, Miura N, Brainard BM, Brooks MB and Goggs R. (2020). A novel microchip flow chamber (total thrombus analysis system) to assess canine hemostasis. *Front Vet Sci.* **7**: 307.
26. Iwanaga T, Yamada S, Fukushima R, Nagasato T, Maruyama I and Miura N. (2017). Novel thrombogenicity examination of whole blood: total thrombus-formation analysis system in dogs. *J Vet Intern Med.* **31**: 1301.

27. Iwasa N, Nishii N, Takashima S, Kobatake Y, Nomura S, Iwasa K, Iwasa T, Suzuki T, Machida N and Kitagawa H. (2019). Long-term management of high-grade atrioventricular block using cilostazol in a cat. *JFMS Open Rep.* **5**: 2055116919878913.
28. Johnson MS, Martin MW and Henley W. (2007). Results of pacemaker implantation in 104 dogs. *J Small Anim Pract.* **48**: 4-11.
29. Kaikita K, Hosokawa K, Dahlen JR and Tsujita K. (2019). Total Thrombus-Formation Analysis System (T-TAS): Clinical application of quantitative analysis of thrombus formation in cardiovascular disease. *Thromb Haemost.* **119**: 1554-1562.
30. Kaneshige T, Machida N, Nakao S, Doiguchi O, Katsuda S and Yamane Y. (2007). Complete atrioventricular block associated with lymphocytic myocarditis of the atrioventricular node in two young adult dogs. *J Comp Pathol.* **137**: 146-150.
31. Kaneshige T, Machida N, Yamamoto S, Nakao S and Yamane Y. (2007). A histological study of the cardiac conduction system in canine cases of mitral valve endocardiosis with complete atrioventricular block. *J Comp Pathol.* **136**: 120-126.
32. Kanno N and Suzuki T. (2017). Long term effects of cilostazol in a dog with sick sinus syndrome. *J Vet Med Sci.* **79**: 1031-1034.
33. Kariyazono H, Nakamura K, Shinkawa T, Yamaguchi T, Sakata R and Yamada K. (2001). Inhibition of platelet aggregation and the release of P-selectin from platelets by cilostazol. *Thromb Res.* **101**: 445-453.
34. Kauffman RF, Crowe VG, Utterback BG and Robertson DW. (1986). LY195115: a potent, selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase located in the sarcoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol.* **30**: 609-616.
35. Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD, Fox PR, Haggstrom J, Fuentes VL, Oyama MA, Rush JE, Stepien R and Uechi M. (2019). ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med.* **33**: 1127-1140.
36. Kimura Y, Tani T, Kanbe T and Watanabe K. (1985). Effect of cilostazol on platelet

- aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung*. **35**: 1144-1149.
37. Kittleson MD. Diagnosis and treatment of arrhythmias (dysrhythmias). 1998; pp. 449-494. In: *Small Animal Cardiovascular Medicine*. (Kittleson MD, Kienle RD, eds.) St. Louis, MO: Mosby.
 38. Kobayashi M, Hoshi K, Hirao H, Shimizu M, Shimamura S, Akiyama M, Tanaka R, Maruo K and Yamane Y. (2003). Implantation of permanent transvenous endocardial pacemaker in a dog with atrioventricular block. *J Vet Med Sci*. **65**: 1131-1134.
 39. Kodama TK, Kurata A, Ohshima K, Yamamoto K, Uemura S, Watanabe S and Iwata T. (2003). Effect of cilostazol on the ventricular escape rate and neurohumoral factors in patients with third-degree atrioventricular block. *Chest*. **123**: 1161-1169.
 40. Komiya M, Sasaki N, Tanabe T, Ohmori T and Fukushima R. (2013). A canine case of sick sinus syndrome (Rubenstein-II) successfully treated with cilostazol: findings on monitoring with holter electrocardiography. *Adv Anim Cardiol*. **46**: 43-51. (in Japanese.)
 41. Kraetschmer S, Ludwig K, Meneses F, Nolte I and Simon D. (2008). Vertebral heart scale in the beagle dog. *J Small Anim Pract*. **49**: 240–243.
 42. Kwon SU, Cho YJ, Koo JS, Bae HJ, Lee YS, Hong KS, Lee JH and Kim JS. (2005). Cilostazol prevents the progression of the symptomatic intracranial arterial stenosis: the multicenter double-blind placebo-controlled trial of cilostazol in symptomatic intracranial arterial stenosis. *Stroke*. **36**: 782-786.
 43. Lerman BB. (2015). Mechanism, diagnosis, and treatment of outflow tract tachycardia. *Nat Rev Cardiol*. **12**: 597-608.
 44. Machida N, Yamaga Y and Kagota K. (1990). Three cases of sinus bradycardia in dogs. *J Jpn Vet Med Assoc*. **43**: 447-450.
 45. Marcus GM. (2020). Evaluation and management of premature ventricular complexes. *Circulation*. **141**: 1404-1418.
 46. Martin M. Syncope. 2017; pp. 123-126. In: *Textbook of veterinary internal medicine 8th*

- ed. (Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E eds.) Elsevier, St. Louis, Missouri.
47. McLewee N, Archer T, Wills R, Mackin A and Thomason J. (2018). Effects of aspirin dose escalation on platelet function and urinary thromboxane and prostacyclin levels in normal dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* **41**: 60-67.
 48. Mellett AM, Nakamura RK and Bianco D. (2011). A prospective study of clopidogrel therapy in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Intern Med.* **25**: 71-75.
 49. Miao X, Sun C, Jiang T, Zheng L, Wang T and Wang S. (2011). Investigation of nanosized crystalline form to improve the oral bioavailability of poorly water soluble cilostazol. *J Pharm Pharm Sci.* **14**: 196-214.
 50. Moriya I, Takahashi T, Nomura Y, Kawaura K, Kusaka K, Yamakawa J, Fujioka N, Okubo S, Itoh T and Kanda T. (2004). Chronotropic effect of the antithrombotic agent cilostazol in a patient with sick sinus syndrome and syncope. *J Int Med Res.* **32**: 549-551.
 51. Nagano K, Kitaura K, Hiraoka T, Saitoh Y, Ohkawa T, Hayabuchi T and Shintani S. (1985). Toxicological studies on cilostazol (VII) chronic toxicity in dogs. *Iyakuin Kenkyu.* **16**: 1285-1304. (in Japanese.)
 52. Nagano K, Kitaura K, Ohkawa T, Hyabuchi T and Shintani S. (1985). Toxicological studies on cilostazol (V). 13-Week subacute toxicity in dogs. *Iyakuin Kenkyu.* **16**: 1268-1284. (in Japanese.)
 53. Nelson RW and Couto CG. *Small Animal Internal Medicine* 6th ed., 2019. Elsevier, Amsterdam.
 54. Nimura A, Sato N, Sakuragi H, Koyama S, Maruyama J, Talib AK, Nakagawa N, Sakamoto N, Ota H, Tanabe Y, Takeuchi T, Kawamura Y and Hasebe N. (2011). Recovery of advanced atrioventricular block by cilostazol. *Intern Med.* **50**: 1957-1961.
 55. Noma K and Higashi Y. (2018). Cilostazol for treatment of cerebral infarction. *Expert Opin Pharmacother.* **15**: 1719-1726.

56. Okuda Y, Kimura Y and Yamashita K. (1993). Cilostazol. *Cardiovasc Drug Rev.* **11**:451-465.
57. Panciera DL and Johnson GS. (1996). Plasma von Willebrand factor antigen concentration and buccal mucosal bleeding time in dogs with experimental hypothyroidism. *J Vet Intern Med.* **10**: 60-64.
58. Reiner C, Visser LC, Kellihan HB, Masseau I, Rozanski E, Clercx C, Williams K, Abbott J, Borgarelli M and Scansen BA. (2020). ACVIM consensus statement guidelines for the diagnosis, classification, treatment, and monitoring of pulmonary hypertension in dogs. *J Vet Intern Med.* **34**: 549-573.
59. Rishniw M and Thomas WP. *Current Veterinary Therapy XIII.* (Kirk RW eds.) 2000. WB Saunders, Philadelphia.
60. Romito G, Summerfield N and Toaldo MB. (2022). Presumptive vagally-mediated atrial flutter in a dog. *J Vet Cardiol.* **39**: 46-50.
61. Romito G, Summerfield N and Toaldo MB. (2022). Corrigendum to ‘Presumptive vagally-mediated atrial flutter in a dog’ [*J Vet Cardiol* (2022) 39, 46-50]. *J Vet Cardiol.* **42**: 14.
62. Romito G, Gublielmi C, Poser H and Toaldo MB. (2021). Lorenz plot analysis in dogs with sinus rhythm and tachyarrhythmias. *Animals.* **11**: 1645.
63. Romito G, Diana A, Rigillo A, Morini M and Cipone M. (2021). Unusual presentation of aortic valve infective endocarditis in a dog: aorto-cavitary fistula, tricuspid valve endocarditis, and third-degree atrioventricular block. *Animals.* **11**: 690.
64. Saito K, Ohno N, Ono T, Nomura T, Endou Y, Arata H, Hayakawa K, Ochi M and Tanaka S. (1995). Usefulness of cilostazol for sinus node syndrome - about cases of manifestation of sinus node due to discontinuation of administration -. *Jpn Pharmacol Ther.* **23**: 977-882. (in Japanese.)
65. Sakai M, Watari T, Miura T, Maruyama H, Koie H, Yamaya Y, Takeuchi A and Hasegawa A. (2003). Effects of DDAVP administered subcutaneously in dogs with aspirin-induced

- platelet dysfunction and hemostatic impairment due to chronic liver diseases. *J Vet Med Sci.* **65**: 83-86.
66. Santilli R, Moise NS, Pariaut R and Perego M. *Electrocardiography of the dog and cat: Diagnosis of arrhythmias*, 2nd ed (Italian edition)., 2018. Edra Spa, Milano, Italia.
67. Sawazaki H. (1970). 犬の不整脈 -その臨床例から-. *Adv Anim ECG.* **3**: 67-72. (in Japanese.)
68. Schrope DP and Kelch WJ. (2006). Signalment, clinical signs, and prognostic indicators associated with high-grade second- or third-degree atrioventricular block in dogs: 124 cases (January 1, 1997-December 31, 1997). *J Am Vet Med Assoc.* **228**: 1710-1717.
69. Schrör K. (2002). The pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab.* **4 Suppl 2**: S14-19.
70. Shibasaki A, Katamoto H and Nomura K. (2001). A case of sick sinus syndrome in german shepherd dog. *J Anim Clin Med.* **11**: 143-146.
71. Shintani S, Watanabe K, kawamura K, Mori T, Tani T, Toba Y, Sasabe H, Nakagiri N, Hongoh O and Fujita S. (1985). General pharmacological properties of cilostazol, a new antithrombotic drug. Part II: Effect on the peripheral organs. *Arzneimittelforschung.* **35**: 1163-1172.
72. Sonoura T, Kodera S, Shakya S and Kanda J. (2019). Efficacy of cilostazol for sick sinus syndrome to avoid permanent pacemaker implantation: A retrospective case-control study. *J Cardiol.* **74**: 328-332.
73. Steiner C and Kovalik AT. (1968). A simple technique for production of chronic complete heart block in dogs. *J Appl Physiol.* **25**: 631-632.
74. Tilley LP. *Essentials of canine and feline electrography: interpretation and treatment*, 3rd ed., 1992. Lea & Febiger, Philadelphia.
75. Toaldo MB, Romito G, Cipone M, Diana A and Tursi M. (2017). Electrocardiographic, echocardiographic, and left atrial strain imaging features of a dog with atrial flutter and

- third-degree atrioventricular block. *J Vet Cardiol.* **19**: 462-468.
76. Uchino T, Kurita T and Yamaguchi M. (2007). The occurrence of serious ventricular arrhythmia in dogs and cats. *J Arrhythm.* **27**: 71-77.
77. Uddin MM, Arata S, Takeuchi Y, Chang HS, Mizukami K, Yabuki A, Rahman MM, Kohyama M, Hossain MA, Takayama K and Yamato O. (2013). Molecular epidemiology of canine GM1 gangliosidosis in the Shiba Inu breed in Japan: relationship between regional prevalence and carrier frequency. *BMC Vet Res.* **9**: 132.
78. Vos AM, Verduyn SC, Gorgels AP, Lipcsei GC and Wellens HJ. (1995). Reproducible induction of early afterdepolarizations and torsade de pointes arrhythmias by d-sotalol and pacing in dogs with chronic atrioventricular block. *Circulation.* **91**: 864-872.
79. Ward JL, DeFrancesco TC, Tou SP, Atkins CE, Griffith EH and Keene BW. (2016). Outcome and survival in canine sick sinus syndrome and sinus node dysfunction: 93 cases (2002-2014). *J Vet Cardiol.* **18**: 199-212.
80. Ware AW. *Cardiovascular Disease in Small Animal Medicine*, 3rd ed., 2011. Manson Pub./The Veterinary Press, London.
81. Weinkle TK, Center SA, Randolph JF, Warner KL, Barr SC and Erb HN. (2005). Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). *J Am Vet Med Assoc.* **226**: 1869-1880.
82. Weishaar RE, Quade MM, Schenden JA and Evans DB. (1985). Relationship between inhibition of cardiac muscle phosphodiesterases, changes in cyclic nucleotide levels, and contractile response for CI-914 and other novel cardiotonics. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res.* **10**: 551-564.
83. Yamada S, Hirao D, Miura N, Iwanaga T, Kawaguchi T, Yoshimura A, Ohmori T, Nagasato T, Maruyama I and Fukushima R. (2019). Comparison between blood coagulability in the intra-atrial and peripheral regions during the acute phase after rapid atrial pacing. *Exp Anim.* **68**: 137-146.

84. Yamada S, Hirao D, Miura N, Iwanaga T, Kawaguchi T, Yoshimura A, Ohmori T, Nagasato T, Maruyama I and Fukushima R. (2018). Comparison of chronological changes in blood characteristics in the atrium and peripheral vessels after the development of non-valvular atrial fibrillation. *Thromb Res.* **171**: 31-37.
85. Yamashita S, Miyagawa K, Inagaki T and Dohi Y. (1995). Cilostazol increased heart rate with improvement of activity of daily living in an elderly patient with sick sinus syndrome. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi.* **36**: 561-564. (in Japanese.)
86. Yasuda K, Sakuma M and Tanabe T. (1985). Hemodynamic effect of cilostazol on increasing peripheral blood flow in arteriosclerosis obliterans. *Arzneimittelforschung.* **35**: 1198-1200.