原 著

L-asparaginase の凝固因子, 特にフィブリノゲン に対する影響

樋口 晶文* 桜田 恵右* 宮崎 保*
前川 勲** 川村 詔導** 三宅 高義**

The effect of L-asparaginase on blood coagulation factors, especially on fibrinogen

Akifumi HIGUCHI*, Keisuke SAKURADA*, Tamotsu MIYAZAKI*, Isao
MAEKAWA**, Tsugumichi KAWAMURA**, and Takayoshi MIYAKE**

Key words: L-asparaginase, hypofibrinogenemia, abnormal fibrinogen,
fibrin monomer polymerization, thrombin time

L-asparaginase, a unique anti-tumor agent that depletes L-asparagine, has been used as one of the effective drugs for human leukemias, especially for ALL.

However, this agent has been shown to exhibit various side effects which may cause serious problems clinically.

Although coagulation disturbance due to hypofibrinogenemia, among many side effects by the agent, has been well known, the mechanism involved has not been clearly defined.

In this study, we investigated the mechanism which may induce hypofibrinogenemia by administrating this agent to 10 cases of leukemias (7 cases of ALL, 1 case of AML, 1 case of AUL and 1 case of CML-BC).

- 1) In 9 out of 10 cases, hypofibrinogenemia (fibrinogen value is below to 200 mg/dl) was observed but it did not have any significant correlation to dose- or time-dependency.
- 2) PT and APTT in these cases were prolonged in parallel with the decrease in the fibrinogen value. FDP values were less than 20 μ g/ml.
- 3) The activities of other coagulation factors did not necessarily correspond to the decrease in the fibrinogen value.
- 4) The decrease in fibrinogen was followed by a decrease in serum albumin

* 北海道大学医学部第三内科 [〒060 札幌市北 15 条西 7 丁目], The Third Department of Internal Medicine, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan.

** 旭川市立病院内科, Department of Internal Medicine, Asahikawa City Hospital, Asahikawa, Japan,

level.

- 5) In some cases, dysfunction of fibrinogen was observed at the stage of hypofibrinogenemia.
- 6) It was speculated that the mechanisms of hypofibrinogenemia after administration of L-asparaginase were due not only to interference with protein synthesis but also to specific inhibition of synthesis of fibrinogen and disturbance of its function.

はじめに

L-asparaginase (以下 L-asp) は腫瘍細胞が外来性 asparagine 要求性をもつことより、この供給を阻害することにより、腫瘍細胞を死に至らしめる作用機序を持つユニークな抗腫瘍剤である。本剤は、白血病特に ALL に対して効果的な薬剤として、単剤あるいは多剤併用剤として広く用いられている¹⁻³⁾。

しかし、本剤は分子量約14万の酵素蛋白であり、アナフィラキシーショックをはじめとして、肝障害、消化器症状、発熱、高血糖などの副作用が報告されるようになり臨床で大きな問題となってきた⁴⁻⁶⁾。

一方、本剤の副作用として、低フィブリノーゲン血症をはじめとした凝固因子の低下をきたすことが知られており^{7,8)}、その原因として肝における本剤の蛋白合成障害が考えられているが、その機序についての詳細な報告は少ない。

今回、私達は L-asp 使用後に出現した凝固異常特に低フィブリノーゲン血症についてその頻度、機序をさぐるため若干の臨床的検討を行った。

I. 対象患者および L-asp 投与法

対象患者は、北大第3内科および旭川市立病院にて扱った入院患者10名である。

表1は、その概要を示したものである。年齢は16歳から78歳で平均38.3歳であり、男性4例、女性6例である。

診断は、すべて白血病であり、ALL 7例、AML 1例、CML-BC 1例、AUL 1例である。

L-asp 投与法は、すべて2剤以上の併用療法

Table 1 Patients and dosis of L-asparaginase

Patient	Age	Sex	Diagnosis	Agents	Dosis of L-asparaginase
E.D.	30	F	ALL	L-Asp Pred	6,000U×7days
K.K.	22	M	ALL	L-Asp DM.Pred	10,000U×7days
A.K.	16	F	AUL	L-Asp DM.Pred	10,000U×7days
M.N.	20	F	ALL	L-Asp Pred	10,000U×4days
K.N.	78	M	CML-BC	L-Asp VDS.Pred	500U×7days
I.A.	59	M	AML	L-Asp Pred	500U×9days
N.E.	38	F	ALL	L-Asp Pred	1,000U×3days
E.K.	50	F	ALL	L-Asp Pred	500U×7days
T.A.	32	F	ALL	L-Asp Pred	1,000U×4days
Y.S.	38	M	ALL	L-Asp VCR.Pred	500U×11days

で行い、投与量は4症例で6,000単位/日以上6例で500~1,000単位/日であり、投与期間は3日から11日であった。

表2は、L-asp 投与前の血液生化学および凝血学的検査を示したものである。

白血球数、血小板数は一定の傾向がなく、また、今回の検討では、白血病細胞数も種々を示した。PT は、1例のみ14.0秒を越しており、A-PTT は1例のみ40秒を越していた。フィブリノーゲン量は、Thrombin 法によったが、2例で200 mg/dl 以下を示した。FDP は3例以下で15 µg/ml を示したが、その他は10 µg/ml 以下であった。血清アルブミン量は、患者の栄養状態も反映してか、ばらつきがみられた。

Table. 2 Laboratory findings of 10 patients before administration of L-asparaginase

	WBC	Plts ($\times 10^4$)	P.T (sec)	A.PTT (sec)	Fbg (mg/dl)	FDP ($\mu\text{g/ml}$)	Alb (g/dl)	GPT (U)
E.D.	5,700	7.6	12.3	33.5	340	<10	3.5	44
K.K.	3,200	58.7	14.8	35.7	240	<10	4.2	51
A.K.	89,900	7.1	13.5	38.7	405	<10	3.4	26
M.N.	6,900	30.9	11.1	31.0	178	<10	4.9	29
K.N.	26,900	14.7	12.8	37.7	650	<10	3.7	12
I.A.	1,300	2.6	12.6	32.1	650	15	2.6	14
N.E.	2,700	28.2	11.6	37.9	250	<10	3.7	24
E.K.	7,300	3.7	11.0	33.2	225	<10	3.3	103
T.A.	19,800	7.0	12.5	40.3	180	15	3.9	121
Y.S.	93,000	2.8	13.7	36.2	315	15	3.1	63

GPT は、2例で100以上を示した。理学的には、著明な出血傾向を示す症例もなく、またDICの基準⁹⁾に合致する症例も認めなかった。

II. 成績

まず最初に、L-asparaginase 投与時の各時期における検査値の推移を検討した。図1は、フィブリノーゲン量を示したもので、治療前、平均値 $\pm$ SD にて $343.3 \pm 120.1 \text{ mg/dl}$ に対して、L-asparaginase 投与終了時 $139.0 \pm 70.4 \text{ mg/dl}$ と明らかな低下を示した。最低値は治療終了後平均3.5日で、 $110.6 \pm 61.0 \text{ mg/dl}$ を示した。また、治療終了後7日目には、 $211.1 \pm 76.2 \text{ mg/dl}$ と回復傾向を示していた。

なお、この間 FDP が $20 \mu\text{g/ml}$ 以上を示した症例はみられなかった。

次に、L-asparaginase 投与量を2群に分けてフィブリノーゲン量の推移を検討した。

Fig. 1 Fibrinogen concentration in various stages before and after the administration of L-asparaginase.

図2は、L-asparaginase 5,000~10,000 単位/日投与群の推移を示したもので、投与後急激な低下を示し、投与終了後3日目に最低値を示した。3例で 100 mg/dl 以下に低下した。一方投与終了後5日目頃より回復傾向を示した。

Fig. 2 Changes of fibrinogen (thrombin method) after the administration of L-asparaginase. (I)

Fig. 3 Changes of concentration of fibrinogen (thrombin method) after the administration of L-asparaginase. (II)

Fig. 4 Prothrombin time in various stages before and after the administration of L-asparaginase.

Fig. 5 A.PTT in various stages before and after the administration of L-asparaginase

図3は、L-asp 500~1,000単位/日投与群の推移を示したもので、1例以外低下を示し、投与期間にもよるが、初回投与後約10日目頃に、最低値を示す傾向がみられた。2例で100 mg/dl以下を示した。回復傾向は、大量投与群に比して、やや早い印象がみられた。

以上より、10例中5例に100 mg/dl以下の低フィブリノーゲン血症がみられ、さらにこれらの低下は、投与L-asp量に対するdose dependencyおよびtime dependencyの存在の有無は明らかでなかった。

図4、図5は、PT、APTTの推移を示したもので、フィブリノーゲン量の低下に伴い両者ともに延長を示した。

図6は、血清アルブミン値の推移であるが、

フィブリノーゲン量の最低値よりもさらに遅れて最低値を示しており、これは肝細胞における両蛋白産生量の相違およびturnoverの違いの他、複雑な宿主因子の相違が原因として推測された。

その他の凝固線溶因子活性の検討も、少数例で行ったが、フィブリノーゲン低値の時期に低下を示さない因子もあり、一定の傾向はつかめなかった。今後さらに他因子に関する検討の集積が必要であろう。

次にフィブリノーゲンの測定法に対するL-aspの影響を、L-asp投与前後に分けて比較検討した。表3は、3症例において、フィブリノーゲン量をThrombin法と免疫拡散法(SRID法)とで比較検討したものである。どちらも

Fig. 6 Serum albumin levels in various stages before and after the administration of L-asparaginase

L-asp 投与後フィブリノーゲン量の急激な低下を示しているが、ここで注目されるのは、症例 1 において、Thrombin 法では 340 mg/dl から 90 mg/dl に低下したのに対し、SRID 法にて 320 mg/dl から 140 mg/dl と、L-asp 投与後 SRID 法で高値を示した点である。同様な傾向は、症例 2, 3 でもみられた。

以上より、L-asp 投与後のフィブリノーゲンの機能異常を疑い以下の検討を行った。まず、機能異常のスクリーニングとして、Thrombin 時間、Reptilase 時間を、L-asp 投与前後で比較検討した。表 4 はその結果であるが、患者血漿中フィブリノーゲン量を免疫学的に測定して、生食にてフィブリノーゲン量 50 mg/dl に調整して用いた。加える Thrombin 濃度 10 U/ml, Reptilase 濃度 50 µg/ml にして用いた。症例 1 で、Thrombin 時間で L-asp 投与前 23.4 秒から投与後 39.6 秒と著明に延長しており、同様な傾向が Reptilase 時間および症例 2 でも示された。

次に表 4 の 2 症例について、Fibrin monomer polymerization を Soria¹⁰⁾ の方法を用いて検討した (図 7)。2 例共、L-asp 投与後その比濁度は、OD₃₅₀ で約 0.1 程度低下しており、L-asp 投与が、フィブリンの重合化に何らかの抑制を与えた可能性が示唆された。

さらに、L-asp 投与後の血漿中に存在するフィブリン重合比に対する Inhibitor の存在の有無を確認するため以下の実験を行った (表 5)。

コントロール血漿に L-asp 投与後血漿を添

Table 3 Comparison of 2 methods of estimation of fibrinogen concentration in 3 patients before and after the administration of L-asparaginase

	Thrombin method	SRID
	(mg/dl)	(mg/dl)
Case 1		
a	340	320
b	90	140
Case 2		
a	240	250
b	78	160
Case 3		
a	405	380
b	115	155

a : before administration of L-asparaginase

b : after administration of L-asparaginase

Table 4 Thrombin time and reptilase time in 3 patients before and after the administration of L-asparaginase

	Thrombin time	Reptilase time
	(sec)	(sec)
Case 1		
a	23.3	30.8
b	39.6	44.2
Case 2		
a	25.4	33.2
b	38.6	49.0
control	22.4	29.4

Fibrinogen concentration was adjusted to 50mg/dl with 0.85% NaCl.

a : before administration of L-asparaginase

b : after administration of L-asparaginase

加して、Thrombin 時間の変化をみた。患者血漿添加は、Thrombin 時間の遅延を引き起こさず、この検討では、患者血漿中の Inhibitor の存在は確認できなかった。

その他、免疫電気泳動を用いて、血漿中での、L-asp 投与前後のフィブリノーゲンの易動度を検討したが、差異はつかめなかった (図省略)。

III. 考察およびまとめ

L-asp 投与後の凝固異常については、PT, APTT の延長と、II, V, IX, X, XI, フィブ

Fig. 7 Fibrin monomer polymerization (Soria's method) in 2 patients before and after the administration of L-asparaginase. Plasma fibrinogen concentration was adjusted to 50mg/dl with 0.85% NaCl, and 10u/ml thrombin was added to plasma.

Table 5 Inhibition of normal plasma thrombin time

Percentage of Normal Plasma (NP)*	NP and Patients Plasma**	NP and Saline
(%)	(sec)	(sec)
100	22.0	22.0
75	24.0	23.8
50	28.1	26.2
25	34.1	36.8
0	37.2	—

* The fibrinogen value of the normal plasma was 250 mg/dl and 90 mg/dl for the patient's plasma.

** Patient's plasma was collected at 3rd day after the last administration of L-asparaginase.

リノーゲンの各因子の減少がみられることが報告されている⁷⁾⁸⁾¹¹⁻¹³⁾。さらに XIII 因子や、ATIII の減少も報告^{14,15)} されている。しかしこれらの多くの報告は、L-asp 使用初期の1970年頃の検討が主である。L-asp がより精製されて用いられた後の研究では、最も良くみられる凝固異常は、重篤な低フィブリノーゲン血症であり、次に IX, XI 因子の減少があげられている。

これらの減少の機序についての検討の報告は少ないが、¹³¹I-Fibrinogen を用いたフィブリノーゲン代謝の研究では、L-asp 投与後フィブリノーゲンの合成障害は認められたが、半減期の短縮はみられず、生成障害が主要原因と考えられている⁷⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし、これらの観察の中でも、L-asp 投与後のフィブリノーゲンの低下

は、免疫グロブリンやアルブミン合成に比して、より強く障害を受けていることが示され、本蛋白の減少を合成障害だけで説明することは、困難な点もある。

今回の私達の検討では、

- (1) L-asp 投与後10例中9例にフィブリノーゲン減少がみられ、5例に100 mg/dl 以下の低下がみられた。
- (2) PT, APTT もフィブリノーゲンの減少に伴い延長した。
- (3) FDP は 20 μ l/ml 以上に上昇する症例はなかった。
- (4) その他の凝固因子活性は、フィブリノーゲンの動きと平行しなかった。
- (5) 血清アルブミン量は、フィブリノーゲンの減少に比較して遅れる傾向があった。

(6) L-asp 投与後のフィブリノーゲン量は、SRID 法に比して、Thrombin 法で測定した値がより低値を示した。

(7) Thrombin 時間、Reptase 時間、Fibrin monomer polymerization の検討では、L-asp 投与後のフィブリノーゲンの機能異常が窺れた。

(8) L-asp 投与後血漿中には、フィブリノーゲンの機能を阻害する因子は確認されなかった。

以上の結果より、L-asp 投与後の低フィブリノーゲン血症の原因として、肝細胞におけるフィブリノーゲン産生障害、特に Asparagine, Gultamine を用いる蛋白合成障害が、従来の報告のごとく最も主要な原因として考えられた。

しかし、合成障害だけで説明できない点もあり、フィブリノーゲン量の測定の影響を与える機能異常をもつフィブリノーゲンの存在の可能性が示唆された。

Brodsky¹⁸⁾ も、L-asp 投与後に異常フィブリノーゲンの可能性を報告している。

今回の検討では、血漿中での検索であり、この機能異常を持つフィブリノーゲンの存在の確認は、精製フィブリノーゲンの作製や、肝細胞内フィブリノーゲンの産生過程の検討が、当然ながら必要であろう。

現在、精製フィブリノーゲンを作製中である。

文 献

- 1) Capizzi, R., Bertino, U.R., Skeel, R.T., et al.: L-asparaginase: Clinical, biochemical, pharmacological and immunological studies. *Ann. Intern. Med.*, **74**; 893~901, 1971.
- 2) Clarkson, B., Krakoff, I., Burchenol, J., Karnofsky, D., et al.: Clinical results of treatment with *E. coli* L-asparaginase in adults with leukemia, lymphoma and solid tumors. *Cancer*, **25**; 279~305, 1970.
- 3) Haskell, C.H., Canellos, G.P., Cooney, D. A., et al.: Pharmacologic studies in man with crystallized L-asparaginase. (NSC-1092 29). *Cancer Chemotherapy Rep.*, **56**; 611~617, 1972.
- 4) Haskell, C.H., Canellos, G.P., Leventhal, B.G., et al.: L-asparaginase. Therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease. *New Eng. J. Med.*, **281**; 1028~1034, 1969.
- 5) Killander, D., Dohlwitz, A., Engstedt, L., et al.: Hypersensitivity reactions and antibody formation during L-asparaginase in man. *Cancer*, **37**; 220~228, 1976.
- 6) Herhert, F., Phyllis, A., et al.: Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer*, **25**; 253~278, 1970.
- 7) Land, J., Sutow, W., Fenbach, J., et al.: Toxicity of L-asparaginase in children with advanced leukemia. *Cancer*, **30**; 339~346, 1972.
- 8) Gralnick, R., Henderson, S.: Hypofibrinogenemia and coagulation factor deficiencies with L-asparaginase treatment. *Cancer*, **27**; 1313~1320, 1971.
- 9) 前川正, 小林紀夫, 権守日出海, 田中廣, 高田雅史: DIC の診断基準について. 汎発性血管内血液凝固症Ⅲ. 小宮正文編, 5~12, 1980.
- 10) Soria, J., Soria, C., Yuer, J. and Samama, M.: Temps de reptilase Etude de la polymérisation de la fibrin en présence de reptilase. *Coagulation*, **2**; 173~181, 1969.
- 11) Ramsay, C., Coccia, F., Kvivit, W., et al.: The effect of L-asparaginase on plasma coagulation factors in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, **40**; 1398~1401, 1977.
- 12) Whitecar, J.P. et al.: L-asparaginase. *N. Engl. J. Med.*, **282**; 732~734, 1970.
- 13) Sills, H., Nelson, G., Stockman, J.A., III: L-asparaginase induced coagulopathy during therapy of acute lymphocytic leukemia. *Med. Prediatr. Oncol.*, **4**; 311~318, 1978.
- 14) Buchman, R., Holfkamp, A.: Reduced antithrombin III levels during L-asparaginase therapy in children with leukemia (abstr.). *Blood*, **54** (Suppl. 1); 273 a, 1979.
- 15) Wada, K., Datch, J., McGehee, G.: Low levels of antithrombin III (AT III) due to L-asparaginase (ASP) (abstr.). *Blood*, **54** (Suppl. 1); 308 a, 1979.

- 16) Bettigole, E., Himmelstein, S., Oetigen, F., et al.: Hypofibrinogen due to L-asparaginase. Studies of fibrinogen survival using autologous ^{125}I -fibrinogen. *Blood*, **35**; 195~200, 1970.
- 17) Givelber, H., Gralnick, H.: Fibrinogen metabolism in acute leukemia. *Blood*, **40**; 972, 1972.
- 18) Brodsky, I., Kahn, B., Vash, G., et al.: Fibrinogen survival with (^{75}Se) Seleomethionine during L-asparaginase therapy. *Br. J. Haematol.*, **20**; 477~487, 1971.

● 周産(生)期感染症の臨床指針書!

妊婦・胎児・新生児の感染症

編集 日本周産(生)期医学研究会 専門医91氏分担執筆

B5判 289頁 図102 表175 定価9,800円(〒240円)

本書は周産(生)期医学の立場に立って問題の多い妊婦、胎児、新生児の感染症を再検討し、ウイルス、マイコプラズマ、原虫、細菌を含めて、新しく見出された疾患、従来より知られた感染症を現代の進歩したウイルス学、細菌学および免疫学より洗い直し、産婦人科医、小児科医の実地診療上必要な感染症の臨床指針書である。

● 内容: [妊婦の感染症] 1. 妊婦感染症, 2. 化学療法, 3. 産褥感染症, 4. 妊婦慢性腎盂腎炎, [胎児の感染症] 1. 胎児感染症の化学療法, 2. 先天性トキソプラズマ症, 3. サイトロメガロウイルス感染症, 4. HBs抗原と垂直感染, 5. B型肝炎ウィルスの垂直感染, 6. B型肝炎ウィルスの母児間伝播, 7. 前期破水, 分娩遷延と未熟児感染症, 8. 感染の母児相関, 9. 新生児肺炎と産科的異常, 10. 妊婦予防接種の胎児への影響, [新生児の感染症] 1. 新生児感染症, 2. 新生児と抗生物質, 3. 新生児感染症の診断と治療, 4. 先天性免疫不全症と新生児敗血症, 5. 予後不良であった新生児細菌感染症, 6. 未熟児室における感染症の集団発生, 7. 新生児室内感染, 8. 細菌培養と感受性検査, [周産期感染症と免疫] 1. 妊婦の感染と免疫, 2. 胎児感染と免疫, 3. 新生児感染症と免疫, 4. 初乳の免疫に関する役割。