◆トピックス◆

ヒ ル ジ ン

辻 肇*

Hirudin

Hajime TSUJI*

Key words: hirudin, hirudo medicinalis, thrombin inhibition, thrombosis

はじめに

近年、心筋梗塞、肺梗塞などの血栓性疾患の増加が著しく、これらの予防あるいは治療に有用な新たな種々の抗血栓薬剤が開発されつつある。

蛭（ヒル）頭部の抽出物中に抗凝固活性を示す物質が存在することは古くから知られていた¹⁾。最近、この物質（ヒルジン）の化学構造と薬理特性が明らかにされ、遺伝子工学的手法を用い量産が可能となったことより、抗血栓薬剤としての臨床応用の可能性が検討されている。

本稿においてはヒルジンに関する最新の知見に関して概説する。

I. 構造と機能（図1）

Hirudo medicinalis から得られる天然型ヒルジンには一次構造上の変異により3種類の亜型が存在することが知られている²⁾。これらのヒルジンは65あるいは66のアミノ酸残基よりなる分子量7,000の一本鎖のポリペプチドで、6個のシステイン残基を有する。これらのシステイン残基間（Cys⁶~Cys¹⁴, Cys¹⁶~Cys²⁸ および Cys²²~Cys³⁹）の3個のジスルフィド結合により中心部分の三次構造が保持され、この部位がヒルジンのトロンビン阻害作用を発揮する上で重要と考えられる³⁾。さらに、酸性アミノ酸残基が多いC末端近傍は、トロンビンのフィブリノゲン認識部位に高い親和性を示し、N

図1 天然型ヒルジンの構造模式図（文献5）より）

* 京都府立医科大学付属病院輸血部，第二内科〔〒602 京都市上京区河原町広小路上がる梶井町465〕：Division of Transfusion Medicine, Second Department of Medicine, Kyoto Prefectural University Hospital, 465 Kajii-cho, Kawaramachi, Kamikyo-ku, Kyoto, 602 Japan.

末端近傍の疎水性部分とともにヒルジンのトロンビンに対する特異的阻害作用の発現に重要な役割を果たす⁴⁾。

ヒルジンの遺伝子構造が決定され、大腸菌などにおいて遺伝子組み替えヒルジンが発現されるが、これらには天然型ヒルジンにおいて認められる63位のチロシンに結合する硫酸基が存在しないことが知られている⁵⁾。

II. 抗凝固ならびに抗血栓効果

ヒルジンの阻害作用はトロンビンに対して特異的であり、活性化第X因子、プラスミン、カリクレイン、トリプシン、キモトリプシンあるいは補体系に対しては認められないと報告されている。ヒルジンは、トロンビンによるフィブリノゲンからのフィブリノペプチドの遊離、フィブリンへの変換、凝固第VあるいはVIII因子の活性化、血小板を含む種々の細胞の刺激など、トロンビンが有する広い範囲におよぶ生理活性を阻害するとされている⁶⁾。これらのヒルジンのトロンビン阻害反応はトロンビンとフィブリノゲンとの反応より速やかに進行し、遺伝子組換えヒルジンが天然型ヒルジンより強い阻害活性を示すと報告されている。

ヒルジンはトロンビンと1:1の非共有結合による複合体を形成し、特異的にトロンビンの作用を抑制するとされている。しかし、近年の培養血管内皮細胞を用いた研究において、ヒルジンは内皮細胞に結合したプロトロンビナーゼ複合体から活性化第X因子を遊離させる作用を持つことも明らかにされている。この作用機序の詳細は明かとされていないが、*in vivo*でのヒルジンの抗血栓効果を考える上で興味ある成績と考えられ注目される⁷⁾。

*in vitro*において、ヒルジンによるトロンビン抑制の結果、トロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間およびプロトロンビン時間などの凝固時間が延長する。この延長効果はヒルジンの血中濃度に相関することが知られ、ヒルジンによる抗凝固療法に際してのモニタリングの指標になりうると考えられている。

*in vivo*でのヒルジンの抗血栓効果に関しては、実験的汎発性血管内凝固症候群(DIC)を

始めとし、静脈ならびに動脈血栓症などの動物を用いた種々の血栓モデルにおいて主として検討されている。

活性化凝固因子あるいはエンドトキシン投与による実験的DICモデルにおいて、DICの進展ならびに続発する臓器合併症は $0.03\sim 0.15\text{ mg kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$ のヒルジン投与により抑制される。抑制効果は、血小板の減少よりフィブリノゲンの減少においてより顕著に認められ、これはトロンビンの親和性の差によると説明されている⁸⁾。

凝固系の活性化による種々の静脈血栓モデルにおいても、DICモデルで投与された量のヒルジンで抑制効果が認められる。一方、血管内皮細胞障害などにより形成される血小板を主体とする動脈血栓症の実験モデルにおいても、抑制効果が確認されるが、静脈血栓において用いられるより高濃度の投与が必要とされる。また、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)による血栓溶解に際して、ヒルジンは再疎通率を高めるとともに再閉塞を予防する上で有効と報告され、その作用機序の解明に興味をもたれるとともにt-PAによる血栓溶解療法における有用な併用抗凝固薬剤として期待される⁹⁾。

III. 代謝

動物実験において、静脈内に投与されたヒルジンは速やかに血管外スペースへ移動し、種差は認められるが約1時間の半減期で血漿中より消失する¹⁰⁾。イヌにおいて、大部分のヒルジンは代謝されずに尿中に排泄されるが、家兎においては一部のものが腎臓において代謝されると推測される。ヒトでの代謝経路の詳細は明かとされていないが、静脈内投与されたヒルジンの2相性の減衰曲線より半減時間は約1時間と推測され、家兎と同様の腎における代謝経路が考えられている。

IV. 臨床応用への展望

ヒルジンはトロンビンに対する特異的な阻害物質であり、種々の実験的血栓モデルにおいて有効な抗血栓効果が認められることより、抗血

栓薬剤としての臨床応用が考えられている。トロンピンは生体内において重要な止血機能を担っており、ヒルジンが抗血栓効果を発揮する濃度において出血作用を示さないか、臨床応用に際して安全性の面から検討が進められている。動物モデルにおいてヒルジンは出血時間を延長させることが知られ、またヒトにおいても血中ヒルジン濃度が高い場合、出血時間の延長が認められる¹¹⁾。活性化部分トロンボプラスチン時間を2.5~4倍に延長させる投与量において抗血栓効果が認められるが、安全性の面よりこの投与量が妥当かどうか十分検討されるべきと考えられる。

一方、ヒルジンのヒトに対する免疫原性あるいはアレルギー反応の発症に関しては、現在までのところ報告されてはならず、これらの副作用発症の可能性は低いと考えられている¹¹⁾。

おわりに

ヒルジンはトロンピンに対する特異的インヒビターであり、新たな抗血栓薬剤として臨床応用の可能性が検討されている。

さらに、ヒルジンの構造と機能に関する知見は、血液凝固調節機構の解明ならびに新たな抗血栓薬剤の開発に有益な情報を提供してくれるものと期待される。トロンピン阻害作用を発揮する上で重要な役割を果たすことが明かされたヒルジンのC末端領域に類似する種々のペプチド(ヒルログ)が合成され、それらの抗凝固並びに抗血栓作用に関して検討が進められている。これらは、従来の抗血栓薬剤とは異なる薬理特性を有し、新たな抗血栓薬剤として期待されている¹²⁾。

文 献

- 1) Markwardt, F.: Biochemistry and pharmacology of hirudin. *Hematology*, **7**: 255~269, 1988.
- 2) Scharf, P., Engels, J., Tripier, D.: Primary structure of new "iso-hirudins". *FEBS Lett*, **225**: 105~110, 1989.
- 3) Dodt, J., Seemeller, U., Maschler, R., Fritz, H.: The complete covalent structure of hirudin. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **366**: 379~385, 1985.
- 4) Chang, Y., Ngai, K., Rink, H., Dennis, S., Schlaepfli, M.: The structural elements of hirudin which bind to the fibrinogen recognition site of thrombin are exclusively located within its acidic C-terminal tail. *FEBS Lett*, **261**: 287~290, 1990.
- 5) Meyhack, B., Heim, J., Rink, H., Zimmerman, W., Maerki, W.: Desulfatohirudin, a specific thrombin inhibitor: expression and secretion in yeast. *Thromb Res Suppl*, **7**: 33, 1987.
- 6) Johnson, P., Friedberg, R., Sze, P., Winant, R., Almquist, R., Lazar, J., Sung, S., Hudson, D.: Structure function studies of the thrombin specific inhibitor hirudin. *Thromb Haemostas*, **62**: Abs 1016, 1989.
- 7) Pizzol, S., Friedberg, R., Sze, P., Winant, R., Hudson, D., Lazar, J., Johnson, P.: Recombinant hirudin displaces factor Xa from its endothelial binding site. *Thromb Res*, **57**: 803~806, 1990.
- 8) Ishikawa, A., Hafter, R., Seemuller, U., Gokel, J., Graeff, H.: The effect of hirudin on endotoxin induced disseminated intravascular coagulation (DIC). *Thromb Res*, **19**: 351~358, 1980.
- 9) Mirshahi, M., Soria, J., Soria, C., Faivre, R., Caen, J.P.: Evaluation of the inhibition by heparin and hirudin of coagulation activation during r-tPA-induced thrombolysis. *Blood*, **74**(3): 1025~1030, 1989.
- 10) Markwardt, F., Fink, G., Kaiser, B., Kloching, H. P., Nowak, G.: Pharmacological survey of recombinant hirudin. *Pharmazie*, **43**: 202~207, 1988.
- 11) Verstraete, M., Hoet, B., Tornai, I., Stockmans, F., Arnout, J.: Hirudin, a specific thrombin inhibitor: Pharmacokinetics and haemostatic effects in man. *Circulation*, **80**: (Abstr) 1673, 1989.
- 12) Maraganore, J., Bourdon, P., Jablonski, J., Ramachandran, K., Fenton, J.: Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochem*, **29**: 7095~7101, 1990.