(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年6月10日(10.06.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/112014 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 5/083 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61L 31/04 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/044316

(22) 国際出願日： 2020年11月27日(27.11.2020)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2019-218181 2019年12月2日(02.12.2019) JP
特願 2020-140113 2020年8月21日(21.08.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (**KYOTO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP). 三洋化成工業株式会社 (**SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.**) [JP/JP]; 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町１１番地の１ Kyoto (JP).

(72) 発明者: 佐藤 寿彦 (**SATO, Toshihiko**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 上田 雄一郎 (**UEDA, Yuichiro**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 川端 慎吾 (**KAWABATA, Shingo**); 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町１１番地の１ 三洋化成工業株式会社内 Kyoto (JP). 杣本 聡 (**SOMAMOTO, Satoshi**); 〒6050995 京都府京都市東山区一橋野本町１１番地の１ 三洋化成工業株式会社内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 安富国際特許事務所 (**YASUTOMI & ASSOCIATES**); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原３丁目５番３６号 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH,

(54) Title: BRONCHIAL EMBOLIZATION MATERIAL

(54) 発明の名称： 気管支塞栓材料

(57) Abstract: A problem addressed by the present invention is to provide a bronchial embolization material capable of tissue repair and replacement. This bronchial embolization material contains a protein (A), wherein: the protein (A) has a polypeptide chain (Y) and/or a polypeptide chain (Y'); the total number of the polypeptide chains (Y) and the polypeptide chains (Y') in the protein (A) is 1-100; in the polypeptide chain (Y) are a contiguous 2-200 of at least one amino acid sequence (X) among a VPGVG sequence (1), which is an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, a GVGVP sequence (4), which is an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4, a GPP sequence, a GAP sequence, and a GAHGPAGPK sequence (3), which is an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3; in the polypeptide chain (Y'), no more than 5% of the amino acids in the polypeptide chain (Y) have been substituted by lysine and/or arginine; the total number of lysines and the arginines is 1-100; the protein (A) satisfies the relational expression (1) below; the density of the bronchial embolization material is 90-450 mg/cm^3; and the bronchial embolization material satisfies relational expression (2) below. (1) 0.50 ≦ (total number of amino acids constituting the amino acid sequence (X) contained in the protein (A) and amino acids constituting an amino acid sequence (X') contained in the protein (A))/(total number of amino acids constituting the protein (A)) ≦ 0.80 (where the amino acid sequence (X') is an amino acid sequence in which no more than 60% of the amino acids in the amino acid sequence (X) have been substituted by lysine and/or arginine) (2) 0.01 ≦ Q/P (where: P is the weight of a dry product (DP) obtained by drying the bronchial embolization material for three hours at 100 ° C at 1 atm, then drying said material for 15 hours at 40 ° C at 1 atm; and Q is the weight of the product (DQ) obtained by soaking the dry product (DP) for 72 hours at 25° C at 1 atm in water having 1,000-fold the weight of P, removing the soaked product, drying said product for three hours at 100 ° C at 1 atm, and then drying said product for 15 hours at 40°C at 1 atm.)

［続葉有］

WO 2021/112014 A1

KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(57) 要約：本発明の課題は、組織の修復及び置換が可能な気管支塞栓材料を提供することにある。 本発明の気管支塞栓材料は、タンパク質（Ａ）を含有する気管支塞栓材料であって、 前記タンパク質（Ａ）が、ポリペプチド鎖（Ｙ）及び／又はポリペプチド鎖（Ｙ'）を有し、 前記タンパク質（Ａ）中の前記ポリペプチド鎖（Ｙ）と前記ポリペプチド鎖（Ｙ'）との合計個数が１～１００個であり、 前記ポリペプチド鎖（Ｙ）が、配列番号１に示されるアミノ酸配列であるＶＰＧＶＧ配列（１）、配列番号４に示されるアミノ酸配列であるＧＶＧＶＰ配列（４）、ＧＰＰ配列、ＧＡＰ配列及び配列番号３に示されるアミノ酸配列であるＧＡＨＧＰＡＧＰＫ配列（３）のうち少なくとも１つのアミノ酸配列（Ｘ）が２～２００個連続したポリペプチド鎖であり、 前記ポリペプチド鎖（Ｙ'）が、前記ポリペプチド鎖（Ｙ）中の５％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたポリペプチド鎖であり、前記リシン及び前記アルギニンの合計個数が１～１００個であり、 前記タンパク質（Ａ）が、以下の関係式（１）を満たし、 前記気管支塞栓材料の密度が９０～４５０ｍｇ／ｃｍ^{3}であり、 前記気管支塞栓材料が以下の関係式（２）を満たす。 ０．５０≦［前記タンパク質（Ａ）に含まれる前記アミノ酸配列（Ｘ）を構成するアミノ酸及び前記タンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ'）を構成するアミノ酸の合計個数］／［前記タンパク質（Ａ）を構成する全アミノ酸数］≦０．８０ （１） ［関係式（１）において、前記アミノ酸配列（Ｘ'）は、前記アミノ酸配列（Ｘ）中の６０％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたアミノ酸配列である。］ ０．０１≦Ｑ／Ｐ （２） ［関係式（２）において、Ｐは、前記気管支塞栓材料を１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた乾燥物（ＤＰ）の重量であり；Ｑは、前記乾燥物（ＤＰ）を、Ｐの１，０００倍の重量の水に、１気圧２５℃で７２時間浸漬させた後取り出し、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた物（ＤＱ）の重量である。］

明　細　書

発明の名称 ： 気管支塞栓材料

技術分野

[0001]　本発明は気管支塞栓材料に関する。

背景技術

[0002]　従来は、肺切除による気管支や肺の断端部分からの空気リークを抑制するために、気管支塞栓材料を用いて、気管支を閉塞する手法が知られている。

（特許文献１）

しかしながら、特許文献１に記載の材料は、シリコンを材料としているため、組織の修復及び置換が行われず、シリコンが患部に残り続けるため、種々の問題（感染、治癒遅延、抜去の必要性等）を引き起こしている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開２００４－０２４８６４号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004]　本発明の課題は、組織の修復及び置換が可能な気管支塞栓材料を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0005]　本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、本発明に到達した。

即ち本発明は、タンパク質（Ａ）を含有する気管支塞栓材料であって、

前記タンパク質（Ａ）が、ポリペプチド鎖（Ｙ）及び／又はポリペプチド鎖（Ｙ’）を有し、

前記タンパク質（Ａ）中の前記ポリペプチド鎖（Ｙ）と前記ポリペプチド鎖（Ｙ’）との合計個数が１～１００個であり、

前記ポリペプチド鎖（Ｙ）が、配列番号１に示されるアミノ酸配列である

ＶＰＧＶＧ配列（１）、配列番号４に示されるアミノ酸配列であるＧＶＧＶＰ配列（４）、ＧＰＰ配列、ＧＡＰ配列及び配列番号３に示されるアミノ酸配列であるＧＡＨＧＰＡＧＰＫ配列（３）のうち少なくとも１つのアミノ酸配列（Ｘ）が２～２００個連続したポリペプチド鎖であり、

前記ポリペプチド鎖（Ｙ’）が、前記ポリペプチド鎖（Ｙ）中の５％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたポリペプチド鎖であり、前記リシン及び前記アルギニンの合計個数が１～１００個であり、

前記タンパク質（Ａ）が、以下の関係式（１）を満たし、

前記気管支塞栓材料の密度が９０～４５０ｍｇ／ｃｍ^{3}であり、

前記気管支塞栓材料が以下の関係式（２）を満たす気管支塞栓材料である。

０．５０≦［前記タンパク質（Ａ）に含まれる前記アミノ酸配列（Ｘ）を構成するアミノ酸及び前記タンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ’）を構成するアミノ酸の合計個数］／［前記タンパク質（Ａ）を構成する全アミノ酸数］≦０．８０　　（１）

［関係式（１）において、前記アミノ酸配列（Ｘ’）は、前記アミノ酸配列（Ｘ）中の６０％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたアミノ酸配列である。］

０．０１≦Ｑ／Ｐ　　（２）

［関係式（２）において、Ｐは、前記気管支塞栓材料を１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた乾燥物（ＤＰ）の重量であり；Ｑは、前記乾燥物（ＤＰ）を、Ｐの１，０００倍の重量の水に、１気圧２５℃で７２時間浸漬させた後取り出し、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた物（ＤＱ）の重量である。］

発明の効果

[0006] 本発明の気管支塞栓材料は、肺切除による気管支や肺の断端部分からの空気リークに対する塞栓材料として用いることができ、組織の修復及び置換を

促す効果を奏する。

発明を実施するための形態

[0007] 本発明における気管支塞栓材料は、タンパク質（Ａ）を含有する気管支塞栓材料である。

前記タンパク質（Ａ）は、ポリペプチド鎖（Ｙ）及び／又はポリペプチド鎖（Ｙ’）を有し、

前記タンパク質（Ａ）中の前記ポリペプチド鎖（Ｙ）と前記ポリペプチド鎖（Ｙ’）との合計個数が１～１００個であり、

前記ポリペプチド鎖（Ｙ）は、配列番号１に示されるアミノ酸配列であるＶＰＧＶＧ配列（１）、配列番号４に示されるアミノ酸配列であるＧＶＧＶＰ配列（４）、ＧＰＰ配列、ＧＡＰ配列及び配列番号３に示されるアミノ酸配列であるＧＡＨＧＰＡＧＰＫ配列（３）のうち少なくとも１つのアミノ酸配列（Ｘ）が２～２００個連続したポリペプチド鎖であり、

前記ポリペプチド鎖（Ｙ’）は、前記ポリペプチド鎖（Ｙ）中の５％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたポリペプチド鎖であり、前記リシン及び前記アルギニンの合計個数が１～１００個であり、

前記タンパク質（Ａ）は、以下の関係式（１）を満たす。

０．５０≦［前記タンパク質（Ａ）に含まれる前記アミノ酸配列（Ｘ）を構成するアミノ酸及び前記タンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ’）を構成するアミノ酸の合計個数］／［前記タンパク質（Ａ）を構成する全アミノ酸数］≦０．８０　　（１）

なお、関係式（１）における前記アミノ酸配列（Ｘ’）は、前記アミノ酸配列（Ｘ）中の６０％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたアミノ酸配列である。

[0008] 本発明の気管支塞栓材料は、タンパク質（Ａ）を含む。また、タンパク質（Ａ）は、ポリペプチド鎖（Ｙ）及び／又はポリペプチド鎖（Ｙ’）を有する。そのため、本発明の気管支塞栓材料は、優れた生体親和性を有し、かつ、肺の伸縮に対応可能な適度な弾性を有する。

[0009] ポリペプチド鎖（Ｙ）を構成するアミノ酸配列（Ｘ）の種類は１種類であってもよく、２種類以上であってもよい。

[0010] アミノ酸配列（Ｘ）としては、気管支塞栓材料の生体親和性、弾性並びに気管支及び肺組織の再生能の観点から、ＶＰＧＶＧ配列（１）及びＧＶＧＶＰ配列（４）が好ましい。

[0011] ポリペプチド鎖（Ｙ）としては、具体的には、（ＶＰＧＶＧ）$_b$配列、（ＧＶＧＶＰ）$_c$配列及び（ＧＡＨＧＰＡＧＰＫ）$_d$配列等が挙げられる。なお、ｂ～ｄは、それぞれ、アミノ酸配列（Ｘ）の連続する個数であり、２～２００の整数である。

タンパク質（Ａ）１分子中に、ポリペプチド鎖（Ｙ）を複数有する場合は、ポリペプチド鎖（Ｙ）は同一でも異なっていても良く、（ＶＰＧＶＧ）$_b$配列、（ＧＶＧＶＰ）$_c$配列及び（ＧＡＨＧＰＡＧＰＫ）$_d$配列からなる群から選ばれる１種を有してもよく、２種以上を有しても良い。

また、タンパク質（Ａ）中にポリペプチド鎖（Ｙ）を複数有する場合は、アミノ酸配列（Ｘ）の連続する個数は、ポリペプチド鎖（Ｙ）ごとに同一でも異なっていてもよい。すなわち、アミノ酸配列（Ｘ）の連続する個数ｂ～ｄが同じポリペプチド鎖（Ｙ）を複数有してもよく、ｂ～ｄが異なるポリペプチド鎖（Ｙ）を複数有してもよい。

ポリペプチド鎖（Ｙ）としては、気管支塞栓材料の生体親和性及び弾性の観点から、（ＶＰＧＶＧ）$_b$配列及び（ＧＶＧＶＰ）$_c$配列が好ましい。

[0012] ポリペプチド鎖（Ｙ）は、アミノ酸配列（Ｘ）が２～２００個連続した（上記ｂ～ｄが２～２００）ポリペプチド鎖であるが、気管支塞栓材料の生体親和性及び弾性の観点から、アミノ酸配列（Ｘ）が連続する個数は２～１００個（上記ｂ～ｄが２～１００）が好ましく、更に好ましくは２～５０個（上記ｂ～ｄが２～５０）、特に好ましくは２～４０個（ｂ～ｄが２～４０）である。

[0013] ポリペプチド鎖（Ｙ’）は、ポリペプチド鎖（Ｙ）中の５％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたポリペプチド鎖であり、置換

されたリシン及びアルギニンの合計個数が１～１００個である。

[0014] ポリペプチド鎖（Ｙ’）であるかどうかは、タンパク質（Ａ）の配列中の全てのリシン（Ｋ）及びアルギニン（Ｒ）を、他のアミノ酸［グリシン（Ｇ）、アラニン（Ａ）、バリン（Ｖ）、プロリン（Ｐ）又はヒスチジン（Ｈ）］に置きかえたときに、ポリペプチド鎖（Ｙ）となるかによって判断する。

[0015] ポリペプチド鎖（Ｙ’）において、置換されたリシン及び／又はアルギニンの割合は、気管支塞栓材料の生体親和性の観点から、０．０６％～５％であることが好ましく、０．５～５％が更に好ましく、特に好ましくは１～５％である。

[0016] また、ポリペプチド鎖（Ｙ’）は、アミノ酸配列（Ｘ）中の６０％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたアミノ酸配列（Ｘ’）を含んでいてもよい。

更に、ポリペプチド鎖（Ｙ’）を構成するアミノ酸配列（Ｘ）及び／又はアミノ酸配列（Ｘ’）の種類は、それぞれ１種類であってもよく、２種類以上であってもよい。

[0017] アミノ酸配列（Ｘ’）として、具体的には、配列番号７に示されるアミノ酸配列であるＧＫＧＶＰ配列（７）、配列番号８に示されるアミノ酸配列であるＧＫＧＫＰ配列（８）、配列番号９に示されるアミノ酸配列であるＧＫＧＲＰ配列（９）及び配列番号１０に示されるアミノ酸配列であるＧＲＧＲＰ配列（１０）等が挙げられる。

アミノ酸配列（Ｘ’）は、気管支塞栓材料の生体親和性の観点から、ＧＫＧＶＰ配列（７）、ＧＫＧＫＰ配列（８）及びＧＲＧＲＰ配列（１０）からなる群から選ばれる少なくとも１種の配列が好ましく、更に好ましくはＧＫＧＶＰ配列（７）及びＧＫＧＫＰ配列（８）である。

[0018] タンパク質（Ａ）１分子中のポリペプチド鎖（Ｙ）とポリペプチド鎖（Ｙ’）との合計個数は、１～１００個である。また、これらの合計個数は、１～８０個であることが好ましく、１～６０個であることがより好ましい。

タンパク質（Ａ）１分子中のポリペプチド鎖（Ｙ）とポリペプチド鎖（Ｙ

’）との合計個数が上記範囲であると、気管支塞栓材料の生体親和性及び弾性の観点で好ましい。

[0019] なお、タンパク質（Ａ）中に、アミノ酸配列（Ｘ）の種類及び／又は連続する個数が異なるポリペプチド鎖（Ｙ）を有している場合は、それぞれを１個として数え、ポリペプチド鎖（Ｙ）の個数はその合計である。ポリペプチド鎖（Ｙ’）についても同様である。

[0020] 本発明におけるタンパク質（Ａ）は、前述の通り、関係式（１）を満たす必要がある。

０．５０≦［タンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ）を構成するアミノ酸及びタンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ’）を構成するアミノ酸の合計個数］／［タンパク質（Ａ）を構成する全アミノ酸数］≦０．８０　　（１）

上記のアミノ酸数の比率が、０．５０未満の場合は、気管支及び肺組織の再生能が悪化し、０．８０を超えると水溶性が悪化する。

上記のアミノ酸数の比率は、気管支及び肺組織の再生能を向上させる観点から、０．５０～０．７０が好ましく、更に好ましくは０．５２５～０．６７５であり、特に好ましくは０．５２５～０．６５である。

[0021] 上記のアミノ酸数の比率は、プロテインシークエンサーによって求めることができる。具体的には、下記の測定法により求めることができる。

＜測定法＞

特定のアミノ酸残基で切断出来る切断方法から２種類以上を用いて、タンパク質（Ａ）を３０残基以下程度まで分解する。その後、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）にて分離した後、プロテインシークエンサーにてアミノ酸配列を読み取る。得られたアミノ酸配列からペプチドマッピングして、タンパク質（Ａ）の全配列を決定する。その後、「［タンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ）を構成するアミノ酸及びタンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ’）を構成するアミノ酸の合計個数］／［タンパク質（Ａ）を構成する全アミノ酸数］」を算出する。

[0022] タンパク質（Ａ）は、気管支塞栓材料の生体親和性並びに気管支及び肺組織の再生能の観点から、配列番号２に示されるアミノ酸配列であるＧＡＧＡＧＳ配列（２）が２～５０個連続して結合したポリペプチド鎖（Ｓ）を有することが好ましい。

ポリペプチド鎖（Ｓ）において、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）が連続する個数は、気管支塞栓材料の生体親和性の観点から、２～４０個が好ましく、更に好ましくは２～３０個であり、特に好ましくは２～１０個である。

[0023] タンパク質（Ａ）において、タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数に対する全てのＧＡＧＡＧＳ配列（２）中のアミノ酸数の割合［｛タンパク質（Ａ）中のＧＡＧＡＧＳ配列（２）の数×６｝／｛タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数｝×１００］は、気管支及び肺組織の再生能を向上させる観点から、５～５０％が好ましく、更に好ましくは１０～４７．５％であり、特に好ましくは２０～４５％である。

タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数に対する全てのＧＡＧＡＧＳ配列（２）中のアミノ酸数の割合は、プロテインシークエンサーによって求めることができる。具体的には、下記の測定法により求める。

[0024] ＜タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数に対する全てのＧＡＧＡＧＳ配列（２）中のアミノ酸数の割合＞

特定のアミノ酸残基で切断出来る切断方法の２種類以上を用いて、タンパク質（Ａ）を３０残基以下程度まで分解する。その後、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）にて分離した後、プロテインシークエンサーにてアミノ酸配列を読み取る。得られたアミノ酸配列からペプチドマッピングして、タンパク質（Ａ）の全配列を決定する。その後、以下記載の測定式にてタンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数に対する全てのＧＡＧＡＧＳ配列（２）中のアミノ酸数の割合を算出する。

タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数に対する全てのＧＡＧＡＧＳ配列（２）中のアミノ酸数の割合（％）＝［｛ＧＡＧＡＧＳ配列（２）の数×６｝／｛タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸の数｝］×１００

[0025] タンパク質（Ａ）が、ポリペプチド鎖（Ｙ）、ポリペプチド鎖（Ｙ’）及びポリペプチド鎖（Ｓ）からなる群より選ばれる少なくとも１種のポリペプチド鎖を合計２個以上有する場合は、これらの間に、介在アミノ酸配列（Ｚ）を有していてもいい。介在アミノ酸配列（Ｚ）は、アミノ酸が１個又は２個以上結合したペプチド配列であって、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）、アミノ酸配列（Ｘ）及びアミノ酸配列（Ｘ’）ではないペプチド配列である。介在アミノ酸配列（Ｚ）を構成するアミノ酸の数は、気管支塞栓材料の生体親和性及び弾性の観点から、１～３０個が好ましく、更に好ましくは１～１５個、特に好ましくは１～１０個である。介在アミノ酸配列（Ｚ）として、具体的には、配列番号１１に示されるアミノ酸配列であるＶＡＡＧＹ配列（１１）、配列番号１２に示されるアミノ酸配列であるＧＡＡＧＹ配列（１２）及びＬＧＰ配列等が挙げられる。

タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数に対する全ての介在アミノ酸配列（Ｚ）中のアミノ酸数の割合［Σ｛（介在アミノ酸配列（Ｚ）中のアミノ酸の数）×（介在アミノ酸配列（Ｚ）の数）｝／｛タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数｝×１００］は、気管支塞栓材料の生体親和性及び弾性の観点から、０～２５％が好ましく、更に好ましくは０～２２．５％であり、特に好ましくは０．０１～１５％である。

[0026] タンパク質（Ａ）は、生体内での分解性の観点から、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）、アミノ酸配列（Ｘ）、アミノ酸配列（Ｘ’）及び介在アミノ酸配列（Ｚ）以外にも、末端に末端アミノ酸配列（Ｔ）を有していてもよい。なお、末端アミノ酸配列（Ｔ）は、タンパク質（Ａ）の片末端にあってもよく、両末端にあってもよい。

なお、末端アミノ酸配列（Ｔ）には、後述の精製タグは含まれない。

タンパク質（Ａ）の末端の構造としては、ポリペプチド鎖（Ｙ）に末端アミノ酸配列（Ｔ）が結合した構造であることが好ましい。末端アミノ酸配列（Ｔ）は、アミノ酸が１個又は２個以上結合したペプチド配列であって、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）、アミノ酸配列（Ｘ）及びアミノ酸配列（Ｘ’）では

ないペプチド配列である。末端アミノ酸配列（Ｔ）を構成するアミノ酸の数は、生体内での分解性の観点から、１～１００個が好ましく、更に好ましくは１～５０個、特に好ましくは１～４０個である。末端アミノ酸配列（Ｔ）として、具体的には、配列番号１３に示されるアミノ酸配列であるＭＤＰＶＶＬＱＲＲＤＷＥＮＰＧＶＴＱＬＮＲＬＡＡＨＰＰＦＡＳＤＰＭ配列（１３）等が挙げられる。

[0027] タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数に対する末端アミノ酸配列（Ｔ）のアミノ酸数の割合は、生体内での分解性の観点から、０～２５％が好ましく、更に好ましくは０～２２．５％であり、特に好ましくは０．０１～１５％である。

[0028] タンパク質（Ａ）は、後述の通り、生物工学的手法により細菌を用いて製造することがある。このような場合、発現させたタンパク質（Ａ）の精製又は検出を容易にするために、タンパク質（Ａ）は末端アミノ酸配列（Ｔ）の他に、Ｎ又はＣ末端に特殊なアミノ酸配列を有するタンパク質又はペプチド（以下これらを「精製タグ」と称する）を有してもいい。精製タグとしては、アフィニティー精製用のタグが利用される。そのような精製タグとしては、ポリヒスチジンからなる６×Ｈｉｓタグ、Ｖ５タグ、Ｘｐｒｅｓｓタグ、ＡＵ１タグ、Ｔ７タグ、ＶＳＶ－Ｇタグ、ＤＤＤＤＫタグ、Ｓタグ、ＣｒｕｚＴａｇ０９ＴＭ、ＣｒｕｚＴａｇ２２ＴＭ、ＣｒｕｚＴａｇ４１ＴＭ、Ｇｌｕ－ＧｌｕタグＨａ．１１タグ及びＫＴ３タグ等がある。

以下に、各精製タグ（ｉ）とそのタグを認識結合するリガンド（ｉｉ）との組み合わせの一例を示す。

（ｉ－１）グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＴＳ）　（ｉｉ－１）グルタチオン

（ｉ－２）マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）　（ｉｉ－２）アミロース

（ｉ－３）ＨＱタグ　（ｉｉ－３）ニッケル

（ｉ－４）Ｍｙｃタグ　（ｉｉ－４）抗Ｍｙｃ抗体

（ｉ－５）ＨＡタグ　（ｉｉ－５）抗ＨＡ抗体

（ｉ－６）ＦＬＡＧタグ　（ｉｉ－６）抗ＦＬＡＧ抗体

（ｉ－７）６×Ｈｉｓタグ　（ｉｉ－７）ニッケル又はコバルト

前記精製タグ配列の導入方法としては、発現用ベクターにおけるタンパク質（Ａ）をコードする核酸の５’又は３’末端に精製タグをコードする核酸を挿入する方法や市販の精製タグ導入用ベクターを使用する方法等が挙げられる。

[0029] タンパク質（Ａ）において、タンパク質（Ａ）を構成する全ての介在アミノ酸配列（Ｚ）中のアミノ酸数、タンパク質（Ａ）を構成する全ての末端アミノ酸配列（Ｔ）中のアミノ酸数及び精製タグのアミノ酸数の合計数の割合は、生体内での分解性の観点から、タンパク質（Ａ）中の全アミノ酸数を基準として、０～２５％が好ましく、更に好ましくは０～２２．５％であり、特に好ましくは０．０１～１５％である。

[0030] タンパク質（Ａ）において、ポリペプチド鎖（Ｙ）及び／又はポリペプチド鎖（Ｙ’）並びにポリペプチド鎖（Ｓ）を含む場合、気管支塞栓材料の生体親和性及び弾性の観点から、ポリペプチド鎖（Ｙ）又はポリペプチド鎖（Ｙ’）とポリペプチド鎖（Ｓ）とが交互に化学結合していることが好ましい。

[0031] ＧＡＧＡＧＳ配列（２）の個数と、アミノ酸配列（Ｘ）及びアミノ酸配列（Ｘ’）の合計個数との比（ＧＡＧＡＧＳ配列（２）：アミノ酸配列（Ｘ）及びアミノ酸配列（Ｘ’）の合計）は、気管支及び肺組織の再生能を向上させる観点から、１：１．５～１：２０が好ましく、１：１．５～１：６が更に好ましく、１：２～１：５が特に好ましい。

[0032] 好ましいタンパク質（Ａ）の一部を以下に例示する。

（Ａ１）：アミノ酸配列（Ｘ）がＧＶＧＶＰ配列（４）であるタンパク質

（Ａ１１）：ＧＶＧＶＰ配列（４）が２～２００個連続したポリペプチド鎖（Ｙ１）中の１個のアミノ酸がリシン（Ｋ）で置換されたポリペプチド鎖（Ｙ’１）を有するタンパク質

（Ａ１１－１）：ポリペプチド鎖（Ｙ’１）とＧＡＧＡＧＳ配列（２）が２

～２００個連続したポリペプチド鎖（Ｓ１）とを有するタンパク質

（Ａ１１－２）：ＧＶＧＶＰ配列（４）が８個連続した配列番号１４に示されるアミノ酸配列である（ＧＶＧＶＰ）$_8$配列（１４）のポリペプチド鎖（Ｙ１１）の１個のアミノ酸がリシン（Ｋ）で置換された配列番号６に示されるアミノ酸配列である（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）（Ｙ’１１）と、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）が２～２００個連続したポリペプチド鎖（Ｓ１）を有するタンパク質

（Ａ１１－２－１）：ＧＡＧＡＧＳ配列（２）が４個連続した配列番号５に示されるアミノ酸配列である（ＧＡＧＡＧＳ）$_4$配列（５）であるポリペプチド鎖（Ｓ１－１）と配列番号６に示される（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）とを有するタンパク質

具体的には、下記タンパク質が含まれる。

（ｉ）（ＧＡＧＡＧＳ）$_4$配列（５）を１２個及び（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）を１３個有し、これらが交互に化学結合してなるものに、配列番号１５に示されるアミノ酸配列である（ＧＡＧＡＧＳ）$_2$配列（１５）が化学結合した分子質量が約８０ｋＤａの配列番号１６に示されるアミノ酸配列である配列（１６）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ）

（ｉｉ）（ＧＡＧＡＧＳ）$_4$配列（５）及び（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）をそれぞれ４個有し、これらが交互に化学結合してなる分子質量が約３０ｋＤａの配列番号２７に示されるアミノ酸配列である配列（２７）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ４）

（Ａ１１－２－２）：ＧＡＧＡＧＳ配列（２）が２個連続した配列番号１５に示されるアミノ酸配列である（ＧＡＧＡＧＳ）$_2$配列（１５）であるポリペプチド鎖（Ｓ１－２）と（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）とを有するタンパク質

（ｉ）（ＧＡＧＡＧＳ）$_2$配列（１５）及び（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）をそれぞれ１７個有し、これらが交互に化学結合してなる構造を有する分子質量が約８２ｋＤａの配列番号１７に示されるアミノ

酸配列である配列（１７）のタンパク質（ＳＥＬＰ０Ｋ）

[0033] （Ａ１１－３）：ＧＶＧＶＰ配列（４）が１２個連続したポリペプチド鎖の１個のアミノ酸がリシン（Ｋ）で置換された配列番号１８に示されるアミノ酸配列である（ＧＶＧＶＰ）$_6$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_5$配列（１８）（Ｙ’１２）と、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）が２～２００個連続したポリペプチド鎖（Ｓ１）を有するタンパク質

（Ａ１１－３－１）：ＧＡＧＡＧＳ配列（２）が４個連続した配列番号１９に示されるアミノ酸配列である（ＧＡＧＡＧＳ）$_4$配列（１９）と（ＧＶＧＶＰ）$_6$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_5$配列（１８）とを有するタンパク質

（ｉ）（ＧＡＧＡＧＳ）$_4$配列（１９）を１２個及び（ＧＶＧＶＰ）$_6$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_5$配列（１８）を１３個有し、これらが交互に化学結合してなるものに、（ＧＡＧＡＧＳ）$_2$配列（１５）が化学結合した分子質量が約１０５ｋＤａの配列番号２０に示されるアミノ酸配列である配列（２０）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ１２）

[0034] （Ａ２）：アミノ酸配列（Ｘ）がＶＰＧＶＧ配列（１）であるタンパク質

（Ａ２１）：ＶＰＧＶＧ配列（１）が２～２００個連続したポリペプチド鎖（Ｙ２）とＧＡＧＡＧＳ配列（２）を有するタンパク質

（ｉ）ＧＡＧＡＧＳ配列（２）、配列番号２４に示されるアミノ酸配列である（ＶＰＧＶＧ）$_4$配列（２４）及び配列番号２５に示されるアミノ酸配列である（ＶＰＧＶＧ）$_8$配列（２５）をそれぞれ４０個有し、これらが（ＶＰＧＶＧ）$_4$配列（２４）、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）、（ＶＰＧＶＧ）$_8$配列（２５）の順に結合したブロックが４０個化学結合してなる構造を有する分子質量約２００ｋＤａの配列番号２６に示されるアミノ酸配列である配列（２６）のタンパク質（ＥＬＰ１．１）

[0035] （Ａ３）：ＧＶＧＶＰ配列（４）が２～２００個連続したポリペプチド鎖（Ｙ１）とＧＡＧＡＧＳ配列（２）が２～２００個連続したポリペプチド鎖（Ｓ１）とを有するタンパク質

具体的には、下記タンパク質が含まれる。

（ｉ）配列番号２１に示されるアミノ酸配列である（ＧＡＧＡＧＳ）$_8$配列（２１）及び配列番号２２に示されるアミノ酸配列である（ＧＶＧＶＰ）$_{40}$配列（２２）をそれぞれ５個有し、これらが交互に化学結合してなる構造を有する分子質量が約１１０ｋＤａの配列番号２３に示されるアミノ酸配列である配列（２３）のタンパク質（ＳＥＬＰ６．１）

[0036] これらの中では、配列（１６）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ）、配列（１７）のタンパク質（ＳＥＬＰ０Ｋ）、配列（２０）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ１２）、配列（２３）のタンパク質（ＳＥＬＰ６．１）、配列（２６）のタンパク質（ＥＬＰ１．１）又は配列（２７）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ４）であることが好ましい。

また、タンパク質（Ａ）は、配列（１６）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ）、配列（１７）のタンパク質（ＳＥＬＰ０Ｋ）、配列（２０）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ１２）、配列（２３）のタンパク質（ＳＥＬＰ６．１）、配列（２６）のタンパク質（ＥＬＰ１．１）又は配列（２７）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ４）のアミノ酸配列と相同性が７０％以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であっても良い。

また、この相同性は、８０％以上であることが好ましく、９０％以上であることがより好ましい。

[0037] タンパク質（Ａ）のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動）法による分子質量は、生体内での分解性の観点から、１５～２００ｋＤａが好ましく、更に好ましくは３０～１５０ｋＤａであり、特に好ましくは７０～１２０ｋＤａである。

[0038] 本発明において、タンパク質（Ａ）の疎水性度は、気管支及び肺組織の再生能を向上させる観点から、０．２～１．２であることが好ましく、更に好ましくは０．４～１．０であり、特に好ましくは０．４２～０．８０である。

タンパク質（Ａ）の疎水性度は、タンパク質（Ａ）分子の疎水性の度合いを示すものであり、タンパク質（Ａ）分子を構成するそれぞれのアミノ酸残

基の数（Ｍα）、それぞれのアミノ酸の疎水性度（Ｎα）及びタンパク質（Ａ）１分子中のアミノ酸残基の総数（ＭＴ）を、下記数式に当てはめることにより算出することができる。なお、それぞれのアミノ酸の疎水性度は、非特許文献（アルバート・Ｌ．レーニンジャー、デビット・Ｌ．ネルソン、レーニンジャーの新生化学　上、廣川書店、２０１０年９月、ｐ．３４６－３４７）に記載されている下記の数値を用いる。

疎水性度＝Σ（Ｍα×Ｎα）／（ＭＴ）

Ｍα：人工タンパク質（Ａ）１分子中のそれぞれのアミノ酸残基の数

Ｎα：各アミノ酸の疎水性度

ＭＴ：人工タンパク質（Ａ）１分子中のアミノ酸残基の総数

Ａ（アラニン）：１．８

Ｒ（アルギニン）：－４．５

Ｎ（アスパラギン）：－３．５

Ｄ（アスパラギン酸）：－３．５

Ｃ（システイン）：２．５

Ｑ（グルタミン）：－３．５

Ｅ（グルタミン酸）：－３．５

Ｇ（グリシン）：－０．４

Ｈ（ヒスチジン）：－３．２

Ｉ（イソロイシン）：４．５

Ｌ（ロイシン）：３．８

Ｋ（リシン）：－３．９

Ｍ（メチオニン）：１．９

Ｆ（フェニルアラニン）：２．８

Ｐ（プロリン）：－１．６

Ｓ（セリン）：－０．８

Ｔ（トレオニン）：－０．７

Ｗ（トリプトファン）：－０．９

Ｙ（チロシン）：－１．３

Ｖ（バリン）：４．２

例えば、人工タンパク質（Ａ）が（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）である場合、人工タンパク質（Ａ）の疎水性度＝｛１６（Ｇの数）×（－０．４）＋１５（Ｖの数）×４．２＋８（Ｐの数）×（－１．６）＋１（Ｋの数）×（－３．９）｝／４０（アミノ酸残基の総数）＝１．０である。

[0039] 本発明の気管支塞栓材料は、上記のようなアミノ酸配列からなるタンパク質（Ａ）を含むものであることから、生体内の酵素により分解されるため、生分解性に優れている。

[0040] 本発明において、タンパク質（Ａ）は、天然物からの抽出、有機合成法（酵素法、固相合成法及び液相合成法等）及び遺伝子組み換え法等によって得られる。有機合成法に関しては、「生化学実験講座１、タンパク質の化学ＩＶ（１９８１年７月１日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行）」に記載されている方法、及び、「続生化学実験講座２、タンパク質の化学（下）（昭和６２年５月２０日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行）」に記載されている方法等が適用できる。遺伝子組み換え法に関しては、特許第３３３８４４１号公報に記載されている方法等が適用できる。天然物からの抽出、有機合成法及び遺伝子組み換え法はともに、タンパク質（Ａ）を得られるが、アミノ酸配列を簡便に変更でき、安価に大量生産できるという観点等から、遺伝子組み換え法が好ましい。

[0041] 本発明の気管支塞栓材料の密度は、９０～４５０ｍｇ／ｃｍ^{3}である。また、本発明の気管支塞栓材料は、スポンジ状であることが好ましい。

気管支塞栓材料の密度が９０ｍｇ／ｃｍ^{3}未満であると気管支塞栓効果が悪化し、４５０ｍｇ／ｃｍ^{3}を超えると気管支及び肺の組織修復が悪化する。

また、気管支塞栓効果並びに気管支及び肺の組織修復の観点から、気管支塞栓材料の密度は９０～３００ｍｇ／ｃｍ^{3}であることが好ましく、９５～２５０ｍｇ／ｃｍ^{3}であることが更に好ましく、１００～２２５ｍｇ／ｃｍ^{3}で

あることが特に好ましい。

また、密度を上記の範囲にするためには、後に詳述する気管支塞栓材料の成型方法における凍結乾燥工程にて、タンパク質（Ａ）を含有する水溶液の濃度を、後述の好ましい範囲に調整する方法等が挙げられる。

[0042] 本発明の気管支塞栓材料は、以下の関係式（２）を満たす必要がある。

０．０１≦Ｑ／Ｐ　　（２）

関係式（２）において、Ｐは、前記気管支塞栓材料を１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた乾燥物（ＤＰ）の重量である。

また、関係式（２）において、Ｑは、前記乾燥物（ＤＰ）を、Ｐの１，００倍の重量の水に、１気圧２５℃で７２時間浸漬させた後取り出し、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた物（ＤＱ）の重量である。

[0043] Ｑ／Ｐが、０．０１未満であると、気管支及び肺の組織修復効果が悪化する。

また、Ｑ／Ｐは、気管支塞栓効果並びに気管支及び肺の組織修復の観点から、０．０１～０．９０であることが好ましい。

Ｑ／Ｐを上記の範囲にするためには、後に詳述する気管支塞栓材料の成型方法における有機溶剤処理工程を実施することが好ましい。

また、前記のタンパク質（Ａ）の疎水性度を前記の好ましい値とすることで、Ｑ／Ｐを上記の範囲にすることができる。

[0044] 本発明の気管支塞栓材料は、更に、以下の関係式（３）を満たしていることが好ましい。

０．３≦Ｒ／Ｐ　　（３）

関係式（３）において、Ｐは、前記気管支塞栓材料を１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた乾燥物（ＤＰ）の重量である。

また、関係式（３）において、Ｒは、前記乾燥物（ＤＰ）を、Ｐの１，０

００倍の重量の水に、１気圧２５℃で２時間浸漬させた後取り出し、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた物（ＤＲ）の重量である。

[0045] Ｒ／Ｐが、上記の範囲であると、気管支及び肺の組織修復効果が更に向上する。

また、Ｒ／Ｐは、気管支塞栓効果並びに気管支及び肺の組織修復の観点から、０．３～１．００であることが更に好ましく、０．９５～１．００であることが特に好ましく、０．９６～１．００であることがとりわけ好ましく、１．００であることが最も好ましい。

Ｒ／Ｐを上記の範囲にするためには、後に詳述する気管支塞栓材料の成型方法における有機溶剤処理工程を実施することが好ましい。

[0046] 本発明の気管支塞栓材料は、以下の方法で、タンパク質（Ａ）を成型して製造することが好ましい。

成型方法として好ましい方法としては、タンパク質（Ａ）を含有する水溶液を凍結乾燥し、次いで、有機溶剤を用いて処理（「有機溶剤処理」と略記することがある）する方法等が挙げられる。

以下に、凍結乾燥工程及び有機溶剤処理工程について説明する。

[0047] 凍結乾燥工程は、タンパク質（Ａ）を含有する水溶液を、成型したい形状に応じた型（金型等）に投入し、凍結乾燥させることが好ましい。

前記の水溶液が含有するポリペプチド（Ａ）の重量割合は、気管支塞栓材料の密度を上記の範囲に調整する観点から、水溶液の体積を基準として、１２．５～１５０ｇ／Ｌであることが好ましく、２５～１００ｇ／Ｌであることが更に好ましく、２５～５０ｇ／Ｌであることが特に好ましい。

[0048] また、前記の凍結乾燥は、１次乾燥及び２次乾燥を実施することが好ましい。

１次乾燥時の温度としては、成型性の観点から、－３５～－５℃であることが好ましい。

１次乾燥時の真空度としては、成型性の観点から、０～２０Ｐａであるこ

とが好ましい。

１次乾燥時の時間としては、成型性の観点から、１０～１００時間であることが好ましい。

２次乾燥時の温度としては、成型性の観点から、５～３５℃であることが好ましく、５～３０℃であることが更に好ましい。

２次乾燥時の真空度としては、成型性の観点から、０～２０Ｐａであることが好ましい。

２次乾燥時の時間としては、成型性の観点から、１０～１００時間であることが好ましい。

[0049] 有機溶剤処理工程は、凍結乾燥工程で得た乾燥物を有機溶剤に浸漬し（１～４０℃で１～１６８時間浸漬することが好ましい）、その後、有機溶剤を加熱して（５～３０℃、湿度１０～８０ＲＨ％の条件であることが好ましい）除去することが好ましい。

なお、上記の浸漬時間が１時間以上であると、「Ｑ／Ｐ」値を上記の範囲に調整する観点から好ましい。また、浸漬時間が１６８時間以下であると、タンパク質（Ａ）の保存性の観点から好ましい。

また、上記の有機溶剤処理工程において、有機溶剤の量は、凍結乾燥工程で得た乾燥物が全量浸る量であることが好ましい。

[0050] 前記の有機溶剤は、特に限定されず、ヘキサン等の疎水性有機溶剤や、親水性有機溶剤であってもよい。

親水性有機溶剤のＳＰ値及び／又はＨＬＢ値は後述の更に好ましい範囲であることが好ましい。親水性有機溶剤は、具体的には、炭素数１～４のアルコール（メタノール、エタノール、プロパノール及びブタノール等）、炭素数３～６のケトン（アセトン、エチルメチルケトン及びメチルイソブチルケトン等）、炭素数２～６のグリコール（エチレングリコール、プロピレングリコール及びジエチレングリコール等）及びそのモノアルキル（炭素数１～２）エーテル、ジメチルホルムアミド並びに炭素数３～５の酢酸アルキルエステル（酢酸メチル及び酢酸エチル等）等が挙げられる。

前記の有機溶剤の内、気管支塞栓材料の成型性、気管支塞栓効果並びに気管支及び肺の組織修復の観点から好ましいのは炭素数１～４のアルコールであり、更に好ましいのはメタノール及びエタノールである。

[0051] 前記の有機溶剤のＳＰ値は、気管支塞栓材料の成型性、気管支塞栓効果並びに気管支及び肺の組織修復の観点から、５～２０（ｃａｌ／ｃｍ^3）$^{1/2}$であることが好ましく、１２～２０（ｃａｌ／ｃｍ^3）$^{1/2}$であることが更に好ましく１３．５～１５．０（ｃａｌ／ｃｍ^3）$^{1/2}$であることが特に好ましい。

なお本発明でのＳＰ値は、ロバートエフフェイダース（Ｒｏｂｅｒｔ Ｆ Ｆａｄｏｒｓ）らの著によるポリマーエンジニアリング アンド サイエンス（Ｐｏｌｙｍｅｒ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ ｓｃｉｅｎｃｅ）第１４巻、１５１～１５４ページに記載されている方法で計算したものである。

また、前記の有機溶剤のＨＬＢ値は、気管支塞栓材料の成型性、気管支塞栓効果並びに気管支及び肺の組織修復の観点から、０～７５であることが好ましく、２０～６０であることが更に好ましく３０～６０であることが特に好ましい。

なお本発明でのＨＬＢ値は、親水性と親油性のバランスを示す指標であって、例えば「界面活性剤入門」〔２００７年三洋化成工業株式会社発行、藤本武彦著〕２１２頁に記載されている小田法によって、有機化合物の有機性の値と無機性の値との比率から計算することができる。

ＨＬＢ＝１０×無機性／有機性

ＨＬＢを導き出すための有機性の値及び無機性の値については前記「界面活性剤入門」２１３頁に記載の表の値を用いて算出できる。

[0052] 本発明の気管支塞栓材料は、肺がん手術後に発生する気管支断端瘻、難治性の気胸、及び、有瘻性の膿胸等の治療において、気管支を閉塞する時に使用される。

具体的には、気管支瘻孔塞栓術並びに体網及び筋肉弁充填術等に使用される

。

気管支瘻孔塞栓術では、気管支鏡により、経気道的にアプローチされ、瘻孔の原因気管支に、本発明の気管支塞栓材料を挿入固定する方法等を用いることができる。

体網及び筋肉弁充填術では、ＲＡＴＳ、ＶＡＴＳ及び開胸等の胸腔アプローチにより、体網・筋肉弁の代わりに、瘻孔部分に、本発明の気管支塞栓材料を直接縫合及び挿入固定する方法等を用いることができる。

これらの方法は、本発明の気管支断端瘻、難治性の気胸、及び、有瘻性の膿胸の治療方法でもある。

[0053] 本発明の気管支塞栓材料は、組織の修復及び置換する効果を有する。このため、従来のシリコンを用いた材料と比較して、塞栓後の感染症合併率及び再気胸発生率が軽減されるため、治療用の材料として有用である。

[0054] また、気管支断端瘻、難治性の気胸、及び、有瘻性の膿胸からなる群から選択される少なくとも１種の疾患において、気管支を閉塞するための上記気管支塞栓材料の使用は、本発明の気管支塞栓材料の使用でもある。

実施例

[0055] 以下本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

尚、以下において部は重量部を表す。

[0056] ＜実施例１：気管支塞栓材料の製造＞

［ＳＥＬＰ８Ｋの作製］

○ＳＥＬＰ８Ｋ生産株の作製

特許第４０８８３４１号公報の実施例記載の方法に準じて、ＳＥＬＰ８ＫをコードしたプラスミドｐＰＴＳ０３４５を作製した。

作製したプラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションし、ＳＥＬＰ８Ｋ生産株を得た。以下、このＳＥＬＰ８Ｋ生産株を用いて、ポリペプチド（Ａ）の一種である（ＧＡＧＡＧＳ）$_4$配列（６）を１２個及び（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（７）を１３個有し、これらが交互に化学

結合した構造を有する分子質量が約８０ｋＤａの配列（１２）のポリペプチドであるＳＥＬＰ８Ｋ（ポリペプチド（Ａ１））を生産する方法を示す。

[0057] ○ＳＥＬＰ８Ｋ生産株の培養

３０℃で生育させたＳＥＬＰ８Ｋ生産株の一夜培養液を使用して、２５０ｍｌフラスコ中のＬＢ培地５０ｍｌに接種した。該ＬＢ培地に、カナマイシンを最終濃度５０μｇ／ｍｌとなるように加え培養液とし、該培養液を３０℃で攪拌しながら（２００ｒｐｍ）インキュベートした。培養液の濁度がＯＤ６００＝０．８（吸光度計ＵＶ１７００：島津製作所製を使用）となった時に、該培養液４０ｍｌを、４２℃に温められた別のフラスコに移し、４２℃で約２時間培養した。その後、培養した培養液を氷上で冷却し、培養液の濁度ＯＤ６００を測定し、遠心分離にて大腸菌を集菌した。

[0058] ○ＳＥＬＰ８Ｋの精製

集菌した大腸菌を用い、下記工程１：菌体溶解、工程２：遠心分離による不溶性細片の除去、工程３：硫安沈殿、工程４：限外濾過、工程５：陽イオン交換クロマトグラフィー、工程６：限外濾過、工程７：凍結乾燥により大腸菌バイオマスからタンパク質を精製した。このようにして、分子質量が約８５ｋＤａの精製したＳＥＬＰ８Ｋ（ポリペプチド（Ａ１））を得た。その後、工程８：成型（凍結乾燥）、工程９：成型（有機溶剤処理）を行い気管支塞栓材を得た。

[0059] 工程１：菌体溶解

集菌した大腸菌１００ｇに対して、脱イオン水２００ｇを加えて、高圧ホモジナイザー（５５ＭＰａ）にて菌体溶解し、溶解した菌体を含む菌体溶解液を得た。その後、菌体溶解液を氷酢酸にてｐＨ４．０に調整した。

[0060] 工程２：遠心分離による不溶性細片の除去

さらに菌体溶解液を遠心分離（６３００ｒｐｍ、４℃、３０分間）して、上清を回収した。

[0061] 工程３：硫安沈殿

工程２で回収した上清に硫安濃度が２５重量％となるように飽和硫安溶液

を投入した。その後、８～１２時間静置した後、遠心分離にて沈殿物を回収した。回収した沈殿物を脱イオン水に溶解した。次に、溶解した液に対して、硫安濃度が２５重量％となるように飽和硫安溶液を投入した。その後、８～１２時間静置した後、遠心分離にて沈殿物を回収した。回収した沈殿物を脱イオン水に溶解し、溶液を得た。

[0062] 工程４：限外濾過

工程３で得た溶液を分子質量３０，０００カットの限外濾過装置（ホロファイバー：ＧＥヘルスケア製）に供した。工程３で得た溶液に対して、２０倍量の脱イオン水を用いて、限外濾過を実施し、限外濾過後のポリペプチド溶液を得た。

[0063] 工程５：陽イオン交換クロマトグラフィー

ポリペプチドの濃度が２０ｇ／Ｌとなるように限外濾過後のポリペプチド溶液を、１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液に加え、その後、陽イオン交換カラムＨｉＰｒｅｐＳＰ　ＸＬ１６／１０（ＧＥヘルスケア社製）をセットしたＡＫＴＡＰｒｉｍｅ（アマシャム社製）に供した。溶出液として５００ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液を用いて、溶出画分を回収した。

[0064] 工程６：限外濾過

工程５で得た溶出画分を上記「４：限外濾過」と同様にして処理し、限外濾過後のポリペプチド溶液を得た。

[0065] 工程７：凍結乾燥

ポリペプチド濃度が３ｇ／Ｌとなるように、工程６で得たポリペプチド溶液を脱イオン水で希釈し、水位が１０ｍｍ以下となるようにステンレス製のバットに入れた。その後、凍結乾燥機（日本テクノサービス社製）に入れて、－３０℃、２４時間かけて凍結させた。凍結後、真空度が５Ｐａ以下、－３０℃で、１１０時間かけて１次乾燥、真空度が５Ｐａ以下、３０℃で、４８時間かけて２次乾燥させ、ＳＥＬＰ８Ｋ（タンパク質（Ａ－１））を得た。なお、タンパク質（Ａ）は、下記のウエスタンブロット法を用いて同定した。

また、タンパク質（Ａ－１）について、「［タンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ）を構成するアミノ酸及びタンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ’）を構成するアミノ酸の合計個数］／［タンパク質（Ａ）を構成する全アミノ酸数］」は０．５４である。

タンパク質（Ａ－１）１分子中の、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）の個数と、アミノ酸配列（Ｘ）及びアミノ酸配列（Ｘ’）の合計個数との比（ＧＡＧＡＧＳ配列（２）：アミノ酸配列（Ｘ）及びアミノ酸配列（Ｘ’）の合計）が、１：２である。

[0066] 工程８：成型（凍結乾燥工程）

工程７で得たタンパク質（Ａ－１）を脱イオン水で希釈して得たＳＥＬＰ８Ｋ溶液［タンパク質（Ａ－１）の濃度：１２．５ｇ／Ｌ］を底面積１．９ｍｍ^2、深さ１．７ｍｍの円柱状金型に１ｍｌ入れ、工程７と同様の条件で凍結乾燥をさせ、スポンジ形状へ成型させた。

[0067] 工程９：成型（有機溶剤処理）

工程８で成型したＳＥＬＰ８Ｋをメタノール１０ｍＬ中に浸漬し、４℃で４５時間静置した。その後、２５℃、湿度３０％ＲＨの条件でメタノールを完全に除去し、気管支塞栓材料（Ｚ－１）を得た。

[0068] ○ＳＥＬＰ８Ｋ（Ａ－１）の同定

ラビット抗ＳＥＬＰ８Ｋ抗体及びＣ末端配列の６×Ｈｉｓタグに対するラビット抗６×Ｈｉｓ抗体（Ｒｏｌａｎｄ社製）を用いたウエスタンブロット法により分析した。ウエスタンブロット法の手順は下記の通りとした。見かけ分子質量８０ｋＤａの位置に、各抗体に抗体反応性を示すバンドが見られた。

また、アミノ酸分析システム（Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ島津製作所製）を用いたアミノ酸組成分析より得られたタンパク質（Ａ）のアミノ酸の組成比率（実測値）と、合成遺伝子配列から推測されるＳＥＬＰ８Ｋのアミノ酸の組成比率（理論値）を表１に示す。

これらから、タンパク質（Ａ）はＧＶＧＶＰ配列（４）が８個連続したポ

リペプチド鎖（Ｙ）中のバリン（Ｖ）のうち１個がリシン（Ｋ）に置換された（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）のポリペプチド鎖（Ｙ’１１）を１３個及びＧＡＧＡＧＳ配列（２）が４個連続した（ＧＡＧＡＧＳ）$_4$配列（５）のポリペプチド鎖（Ｓ１－１）を１２個有し、これらが交互に化学結合してなるものに、配列番号１５に示されるアミノ酸配列である（ＧＡＧＡＧＳ）$_2$配列（１５）が化学結合してなる配列（１６）を有するタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ）であることを確認した。

[0069] [表1]

アミノ酸	実測	理論
	組成物率(%)	組成物率(%)
Ala	12.3	12.2
Asx	0.9	0.8
Glx	n.d.	0.4
Phe	0.4	0.1
Gly	43.7	41.5
His	0.4	0.8
Ile	0.3	0
Lys	1.5	1.5
Leu	0.3	0.5
Met	0.3	0.3
Pro	11.7	12.4
Arg	0.5	0.6
Ser	5.3	6.1
Thr	n.d.	0.1
Val	21.2	22.4
Tyr	1.1	0.1

[0070] ＜ウエスタンブロット法＞

ウエスタンブロット用サンプル２０μＬに３×ＳＤＳ処理バッファ［１５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣｌ（ｐＨ６．８）、３００ｍＭ　ジチオスレイトール、６重量％　ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、０．３重量％　ブロモフェノールブルー、及び３０重量％　グリセロールを含む］１０μＬを添加して９５℃で５分間加温し、泳動用試料を調製した。この泳動用試料１５μＬを用いてＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った。泳動後のゲルをフッ化ポリビニリデンメンブレンにトランスファー（以下、「メンブレン」と略記）し、これをブロッキングバッファ［２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．６）、１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、０．１重量％　Ｔｗｅｅｎ２０、及び５重量％　スキムミルクを

含む］に浸漬して１時間室温で振蕩することによりメンブレンのブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔ［２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．６）、１３７ｍＭ　ＮａＣｌ、及び０．１重量％　Ｔｗｅｅｎ２０を含む］で２分間洗浄した。次に、メンブレンを一次抗体溶液（一次抗体：抗ＳＥＬＰ８Ｋ抗体及び抗Ｈｉｓ－ｔａｇ抗体（Ｒｏｃｋｌａｎｄ社製）をＴＢＳ－Ｔで５００分の１に希釈した溶液）に浸漬し、４℃で一晩静置して抗体反応を行った。反応後、このメンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間、４回洗浄した後、一次抗体に結合可能であり且つ標識酵素として西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させた二次抗体の溶液（二次抗体：ＥＣＬ　ａｎｔｉ－ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧ　ＨＲＰ　ｌｉｎｋｅｄ　Ｆ（ａｂ’）２　ｆｒａｇｍｅｎｔ（ＧＥヘルスケア社製）をＴＢＳ－Ｔで２０００分の１に希釈した溶液）にメンブレンを浸漬し、３０分間室温で静置して抗体反応を行った。反応後、メンブレンをＴＢＳ－Ｔで５分間、４回洗浄した後、ＥＣＬ－Ａｄｖａｎｃｅ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｔｉｎｇ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＧＥヘルスケア社製）により酵素反応を行った。ルミノメーターＦｏｒＥＣＬ（ＧＥヘルスケア社製）を用いて、高感度インスタント黒白フィルム（富士フイルム株式会社製）に感光させ、バンドを可視化した。

[0071] ＜実施例２～６：気管支塞栓材料の製造＞

実施例１において、工程８のＳＥＬＰ８Ｋ溶液におけるタンパク質（Ａ－１）の濃度を１２．５ｇ／Ｌから２５、４０、５０、１００又は１５０ｇ／Ｌに変更した以外は、実施例１と同様に実施して、気管支塞栓材料（Ｚ－２）～（Ｚ－６）を得た。

[0072] ＜実施例７～９：気管支塞栓材料の製造＞

実施例４において、工程９で用いるメタノールをヘキサン、エタノール又はエチレングリコールに変更した以外は、実施例４と同様に実施して、気管支塞栓材料（Ｚ－７）～（Ｚ－９）を得た。

[0073] ＜実施例１０：気管支塞栓材料の製造＞

実施例４において、「ＳＥＬＰ８ＫをコードしたプラスミドｐＰＴ０３４５」に変えて、「ＳＥＬＰ０ＫをコードしたプラスミドｐＰＴ０３６４」を用いる以外は、実施例４と同様にして、（ＧＡＧＡＧＳ）$_2$配列（１５）及び（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）をそれぞれ１７個有し、これらが交互に化学結合してなる構造を有する分子質量が約８２ｋＤａの配列番号１７に示されるアミノ酸配列である配列（１７）のタンパク質（ＳＥＬＰ０Ｋ）を含有する気管支塞栓材料（Ｚ－１０）を得た。

[0074] ＜実施例１１：気管支塞栓材料の製造＞

実施例４において、「ＳＥＬＰ８ＫをコードしたプラスミドｐＰＴ０３４５」に変えて、「ＳＥＬＰ８Ｋ４をコードしたプラスミドｐＰＴ０３４５－４」を用いる以外は、実施例４と同様にして、（ＧＡＧＡＧＳ）$_4$配列（５）及び（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）をそれぞれ４個有し、これらが交互に化学結合してなる分子質量が約３０ｋＤａの配列番号２７に示されるアミノ酸配列である配列（２７）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ４）を含有する気管支塞栓材料（Ｚ－１１）を得た。

[0075] ＜実施例１２：気管支塞栓材料の製造＞

実施例４において、「ＳＥＬＰ８ＫをコードしたプラスミドｐＰＴ０３４５」に変えて、「ＳＥＬＰ８Ｋ１２をコードしたプラスミドｐＰＴ０３４５－１２」を用いる以外は、実施例４と同様にして、（ＧＡＧＡＧＳ）$_4$配列（１９）を１２個及び（ＧＶＧＶＰ）$_6$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_5$配列（１８）を１３個有し、これらが交互に化学結合してなるものに、（ＧＡＧＡＧＳ）$_2$配列（１５）が化学結合した分子質量が約１０５ｋＤａの配列番号２０に示されるアミノ酸配列である配列（２０）のタンパク質（ＳＥＬＰ８Ｋ１２）を含有する気管支塞栓材料（Ｚ－１２）を得た。

[0076] ＜実施例１３：気管支塞栓材料の製造＞

実施例４において、「ＳＥＬＰ８ＫをコードしたプラスミドｐＰＴ０３４５」に変えて、「ＥＬＰ１．１をコードしたプラスミドｐＰＴ０１０２－１」を用いる以外は、実施例４と同様にして、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）、配列

番号２４に示されるアミノ酸配列である（ＶＰＧＶＧ）$_4$配列（２４）及び配列番号２５に示されるアミノ酸配列である（ＶＰＧＶＧ）$_8$配列（２５）をそれぞれ４０個有し、これらが（ＶＰＧＶＧ）$_4$配列（２４）、ＧＡＧＡＧＳ配列（２）、（ＶＰＧＶＧ）$_8$配列（２５）の順に結合したブロックが４０個化学結合してなる構造を有する分子質量約２００ｋＤａの配列番号２６に示されるアミノ酸配列である配列（２６）のタンパク質（ＥＬＰ１．１）を含有する気管支塞栓材料（Ｚ－１３）を得た。

[0077] ＜実施例１４：気管支塞栓材料の製造＞

実施例４において、「ＳＥＬＰ８ＫをコードしたプラスミドｐＰＴ０３４５」に変えて、「ＳＥＬＰ６．１をコードしたプラスミドｐＰＴ０２７０－１」を用いる以外は、実施例４と同様にして、配列番号２１に示されるアミノ酸配列である（ＧＡＧＡＧＳ）$_8$配列（２１）及び配列番号２２に示されるアミノ酸配列である（ＧＶＧＶＰ）$_{40}$配列（２２）をそれぞれ５個有し、これらが交互に化学結合してなる構造を有する分子質量が約１１０ｋＤａの配列番号２３に示されるアミノ酸配列である配列（２３）のタンパク質（ＳＥＬＰ６．１）を含有する気管支塞栓材料（Ｚ－１４）を得た。

[0078] ＜比較例１～２：比較用の気管支塞栓材料の製造＞

実施例１において、工程８のＳＥＬＰ８Ｋ溶液におけるタンパク質（Ａ－１）の濃度を１２．５ｇ／Ｌから１０又は２００ｇ／Ｌに変更した以外は、実施例１と同様に実施して、比較用の気管支塞栓材料（Ｚ’－１）～（Ｚ’－２）を得た。

[0079] ＜比較例３：比較用の気管支塞栓材料の製造＞

実施例４において、「工程９：成型（有機溶剤処理）」を実施しなかったこと以外は、実施例４と同様に実施して、工程８で得た成型物を比較用の気管支塞栓材料（Ｚ’－３）とした。

[0080] 実施例１～１４で得た気管支塞栓材料及び比較例１～３で得た比較用の気管支塞栓材料を用いて、以下の方法で、密度、Ｑ／Ｐ、Ｒ／Ｐを評価した。結果を表２に記載する。

[0081] ＜密度＞

気管支塞栓材料の体積（得られた円柱状の気管支塞栓材料の底面積及び高さを測定し、計算）及び重量から、気管支塞栓材料の密度を算出した。結果を表２に示す。

[0082] ＜Ｑ／Ｐ＞

気管支塞栓材料を、循風乾燥機を用いて、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた乾燥物（ＤＰ）を得た。前記の乾燥物（ＤＰ）の重量をＰとした。

Ｐの１，０００倍の重量の水をプラスチック製カップに加え、これに前記の乾燥物（ＤＰ）を浸漬し、１気圧２５℃で７２時間静置した後取り出した。

これを、循風乾燥機を用いて、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた物（ＤＱ）の重量を得た。前記の（ＤＱ）の重量をＱとした。

前記のＰ及びＱを用いて、Ｑ／Ｐを算出した。結果を表２に示す。

[0083] ＜Ｒ／Ｐ＞

気管支塞栓材料を、循風乾燥機を用いて、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた乾燥物（ＤＰ）を得た。前記の乾燥物（ＤＰ）の重量をＰとした。

Ｐの１，０００倍の重量の水をプラスチック製カップに加え、これに前記の乾燥物（ＤＰ）を浸漬し、１気圧２５℃で２時間静置した後取り出した。

これを、循風乾燥機を用いて、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた物（ＤＲ）の重量を得た。前記の（ＤＲ）の重量をＲとした。

前記のＰ及びＲを用いて、Ｒ／Ｐを算出した。結果を表２に示す。

[0084]

[表2]

		気管支塞栓材料	[タンパク質(A)に含まれるアミノ酸配列(X)を構成するアミノ酸及びタンパク質(A)に含まれるアミノ酸配列(X')を構成するアミノ酸の合計個数]／[タンパク質(A)を構成する全アミノ酸数]	タンパク質(A)の疎水性度	工程8のタンパク質(A)溶液におけるタンパク質(A)の濃度(g/L)	工程9で用いる有機溶剤	密度(mg/cm^3)	Q／P	R／P
実施例	1	Z-1	0.54	0.62	12.5	メタノール	90	0.47	1
	2	Z-2	0.54	0.62	25	メタノール	100	0.99	1
	3	Z-3	0.54	0.62	40	メタノール	150	0.90	1
	4	Z-4	0.54	0.62	50	メタノール	200	0.71	1
	5	Z-5	0.54	0.62	100	メタノール	250	0.84	1
	6	Z-6	0.54	0.62	150	メタノール	300	0.72	1
	7	Z-7	0.54	0.62	50	ヘキサン	200	1	1
	8	Z-8	0.54	0.62	50	エタノール	120	0.1	0.95
	9	Z-9	0.54	0.62	50	エチレングリコール	100	0.01	0.3
	10	Z-10	0.72	0.72	50	メタノール	150	0.5	1
	11	Z-11	0.52	0.72	50	メタノール	250	0.6	1
	12	Z-12	0.69	0.84	50	メタノール	200	1	1
	13	Z-13	0.71	1.12	50	メタノール	450	1	1
	14	Z-14	0.77	1.02	50	メタノール	400	1	1
比較例	1	Z'-1	0.54	0.62	10	メタノール	80	0.45	1
	2	Z'-2	0.54	0.62	200	メタノール	310	0.58	1
	3	Z'-3	0.54	0.62	50	-	100	0.001	0.001

[0085] ＜評価例１～１５及び比較評価例１～３：気管支塞栓材料の評価＞

成犬ビーグル（１～２歳、体重９～１１ｋｇのビーグル犬）を全身麻酔下に開胸の上、肺切除（表３に記載の部位を切除）を行った。

断端気管支内膜同士を合わせるような縫合閉鎖は行わず、吸収性縫合糸を用いて、表３に記載の気管支塞栓材料を気管支断端に４点固定した。大きな空気漏れがないことを確認し、手術創を縫合した。

手術から２週間後、４週間後及び８週間後に、気管支鏡にて内腔を観察し、気管支塞栓材料の吸収の程度、塞栓の程度、逸脱の有無、空気漏れの有無、皮下気腫の有無を評価した。

また、手術から８週間後に犠牲死させ、気管と塞栓材料を留置した気管支断端を含めて組織を採取し、組織学的な気管支の塞栓度合及び修復度合、並びに肉芽の形成度合を評価した。

また、上記の組織学的な気管支の塞栓度合及び修復度合、並びに肉芽の形成度合の評価は、更に別の２頭の成犬ビーグルについて、犠牲死の時期を８週間後から、２週間後又は４週間後に変更して実施した。結果を表３に記載する。

[0086] ［気管支の塞栓度合の評価］

気管支鏡にて内腔を観察し、以下の基準で評価した。

気管支の塞栓度合の点数が高いほど、気管支塞栓効果に優れることを示す。

１：気管支が閉鎖している

０：気管支が閉鎖していない

[0087] ［気管支塞栓材の吸収程度］

気管支鏡にて内腔を観察し、以下の基準で評価した。

１：気管支塞栓材の吸収あり

０：気管支塞栓材の吸収なし

[0088] ［逸脱の有無］

気管支鏡にて内腔を観察し、以下の基準で評価した。

１：気管支塞栓材の逸脱なし

０：気管支塞栓材の逸脱あり

[0089] ［空気漏れの有無］

気管支鏡にて内腔を観察し、以下の基準で評価した。

１：空気漏れなし

０：空気漏れあり

[0090] ［皮下気腫の発生の評価］

イヌの体表を目視で観察し、以下の基準で評価した。

１：皮下気腫なし

０：皮下気腫あり

[0091] ［気管支の修復度合の評価］

採取した組織をヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡により観察し、炎症・血管増殖・神経再生・上皮再生の程度を、以下の基準で評価した。

＜炎症＞

３：軽度の炎症

２：中程度の炎症

１：強い炎症

＜血管増殖＞

３：良好な再生

２：中程度の再生

１：増殖なし

＜神経再生＞

３：良好な再生

２：中程度の再生

１：ほぼ再生せず

＜上皮再生＞

３：良好な再生

２：中程度の再生

１：ほぼ再生せず

[0092] ［肉芽の形成度合の評価］

採取した組織から組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡により組織切片画像を取得した。組織切片画像をＩｍａｇｅＪ（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，ＵＳＡ）で解析し、以下の計算式から、肉芽の形成度合を評価した。

肉芽の形成度合（％）＝肉芽再生長（ｍｍ）／気管支欠損長（ｍｍ）×１００

なお、「肉芽再生長」の値及び「気管支欠損長」の値は、組織切片画像をＩｍａｇｅＪで解析して得た。

[0093]

[表3]

		評価結果																					
		肉芽の形成度合				上皮再生				組織学的評価													
										血管増殖				神経再生				炎症の程度			
		2週間	4週間	8週間		2週間	4週間	8週間		2週間	4週間	8週間		2週間	4週間	8週間		2週間	4週間	8週間	
評価例	1	75	82	85		1	2	2		1	2	3		1	1	2		3	3	3		1	1
	2	88	89	100		1	2	2		2	2	3		1	1	2		2	3	3		1	1
	3	96	98	100		2	3	3		2	3	3		2	2	3		2	3	3		1	1
	4	97	100	100		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	2	3		1	1
	5	75	80	90		1	2	3		1	1	2		1	1	2		1	1	2		1	1
	6	65	70	79		1	2	2		1	2	3		1	2	2		2	2	2		1	1
	7	96	100	100		1	2	3		1	2	3		1	2	3		2	3	3		1	1
	8	75	80	85		1	2	3		1	1	2		1	1	2		1	2	2		1	1
	9	85	95	100		1	2	3		1	2	3		1	2	2		2	2	2		1	1
	10	75	85	85		1	1	2		1	2	3		1	1	2		2	2	2		1	1
	11	75	85	90		1	2	3		1	2	3		1	2	2		2	2	2		1	1
	12	65	70	80		1	2	3		1	2	3		1	2	2		2	2	2		1	1
	13	90	95	100		1	2	3		1	2	3		1	2	3		2	3	3		1	1
	14	55	60	69		1	1	2		1	2	2		1	1	2		1	2	2		1	1
	15	55	62	72		1	1	2		1	2	2		1	1	2		1	2	2		1	1
比較評価例	1	50	65	66		1	1	1		1	1	1		1	1	1		2	1	1		0	0
	2	30	40	50		1	1	1		1	1	1		1	1	1		2	2	2		1	1
	3	30	40	50		1	1	1		1	1	1		1	1	1		3	3	3		1	0

		評価結果																					
		皮下気腫の発生				空気漏れの有無				逸脱の有無				気管支塞栓材の吸収				気管支の閉塞				肺切除部位	気管支塞栓材料
		2週間	4週間	8週間		2週間	4週間	8週間		2週間	4週間	8週間		2週間	4週間	8週間		2週間	4週間	8週間			
評価例	1	1	1	1		0	0	1		1	1	0		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-1
	2	1	1	1		0	1	1		1	1	0		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-2
	3	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-3
	4	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-4
	5	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-5
	6	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-6
	7	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		左下葉	Z-4
	8	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	0	1		1	1	1		右上葉	Z-7
	9	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-8
	10	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z 9
	11	1	1	1		1	1	1		1	1	0		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-10
	12	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-11
	13	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-12
	14	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-13
	15	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		1	1	1		右上葉	Z-14
比較評価例	1	1	1	1		0	0	0		0	0	0		1	1	1		0	1	1		右上葉	Z'-1
	2	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	0	1		1	1	1		右上葉	Z'-2
	3	1	1	1		1	1	1		1	1	1		0	1	1		0	0	0		右上葉	Z'-3

産業上の利用可能性

[0094] 本発明の気管支塞栓材料は、肺切除による気管支や肺の断端部分からの空気リークに対する塞栓材料として用いることができ、組織の修復及び置換を促す効果を有するため、治療用の材料として適している。

請求の範囲

[請求項1] タンパク質（Ａ）を含有する気管支塞栓材料であって、

前記タンパク質（Ａ）が、ポリペプチド鎖（Ｙ）及び／又はポリペプチド鎖（Ｙ’）を有し、

前記タンパク質（Ａ）中の前記ポリペプチド鎖（Ｙ）と前記ポリペプチド鎖（Ｙ’）との合計個数が１～１００個であり、

前記ポリペプチド鎖（Ｙ）が、配列番号１に示されるアミノ酸配列であるＶＰＧＶＧ配列（１）、配列番号４に示されるアミノ酸配列であるＧＶＧＶＰ配列（４）、ＧＰＰ配列、ＧＡＰ配列及び配列番号３に示されるアミノ酸配列であるＧＡＨＧＰＡＧＰＫ配列（３）のうち少なくとも１つのアミノ酸配列（Ｘ）が２～２００個連続したポリペプチド鎖であり、

前記ポリペプチド鎖（Ｙ’）が、前記ポリペプチド鎖（Ｙ）中の５％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたポリペプチド鎖であり、前記リシン及び前記アルギニンの合計個数が１～１００個であり、

前記タンパク質（Ａ）が、以下の関係式（１）を満たし、

前記気管支塞栓材料の密度が９０～４５０ｍｇ／ｃｍ^{3}であり、

前記気管支塞栓材料が以下の関係式（２）を満たす気管支塞栓材料。

０．５０≦［前記タンパク質（Ａ）に含まれる前記アミノ酸配列（Ｘ）を構成するアミノ酸及び前記タンパク質（Ａ）に含まれるアミノ酸配列（Ｘ’）を構成するアミノ酸の合計個数］／［前記タンパク質（Ａ）を構成する全アミノ酸数］≦０．８０　　（１）

［関係式（１）において、前記アミノ酸配列（Ｘ’）は、前記アミノ酸配列（Ｘ）中の６０％以下のアミノ酸がリシン及び／又はアルギニンで置換されたアミノ酸配列である。］

０．０１≦Ｑ／Ｐ　　（２）

［関係式（２）において、Ｐは、前記気管支塞栓材料を１気圧１００

℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた乾燥物（ＤＰ）の重量であり；Ｑは、前記乾燥物（ＤＰ）を、Ｐの１，００倍の重量の水に、１気圧２５℃で７２時間浸漬させた後取り出し、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた物（ＤＱ）の重量である。］

[請求項2] 前記タンパク質（Ａ）が、以下の関係式（３）を満たす請求項１に記載の気管支塞栓材料。

０．３≦Ｒ／Ｐ （３）

［関係式（３）において、Ｐは、前記気管支塞栓材料を１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた乾燥物（ＤＰ）の重量であり；Ｒは、前記乾燥物（ＤＰ）を、Ｐの１，００倍の重量の水に、１気圧２５℃で２時間浸漬させた後取り出し、１気圧１００℃で３時間乾燥させた後に、１気圧４０℃で１５時間乾燥させた物（ＤＲ）の重量である。］

[請求項3] 前記タンパク質（Ａ）が、配列番号２に示されるアミノ酸配列であるＧＡＧＡＧＳ配列（２）が２～５０個連続して結合したポリペプチド鎖（Ｓ）を有する請求項１又は２に記載の気管支塞栓材料。

[請求項4] タンパク質（Ａ）１分子中の、前記ＧＡＧＡＧＳ配列（２）の個数と、前記アミノ酸配列（Ｘ）及び前記アミノ酸配列（Ｘ’）の合計個数との比（ＧＡＧＡＧＳ配列（２）：アミノ酸配列（Ｘ）及びアミノ酸配列（Ｘ’）の合計）が、１：１．５～１：２０である請求項３に記載の気管支塞栓材料。

[請求項5] 前記タンパク質（Ａ）が、前記ＧＶＧＶＰ配列（４）が２～２００個連続したアミノ酸配列中の１個のアミノ酸がリシンで置換されたポリペプチド鎖（Ｙ’１）を有するタンパク質（Ａ１１）である請求項１～４のいずれか１項に記載の気管支塞栓材料。

[請求項6] 前記タンパク質（Ａ）が、配列番号５に示される$(GAGAGS)_4$配列（５）であるポリペプチド鎖（Ｓ１－１）、及び、配列番号６に

示される（ＧＶＧＶＰ）$_4$ＧＫＧＶＰ（ＧＶＧＶＰ）$_3$配列（６）であるポリペプチド鎖（Ｙ’１１）を有するタンパク質（Ａ１１－２－１）である請求項１～５のいずれか１項に記載の気管支塞栓材料。

[請求項7] 前記タンパク質（Ａ）のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動）法による分子質量が１５～２００ｋＤａである請求項１～６のいずれか１項に記載の気管支塞栓材料。

[請求項8] 前記タンパク質（Ａ）が、配列番号１６に示されるアミノ酸配列、配列番号１７に示されるアミノ酸配列、配列番号２０に示されるアミノ酸配列、配列番号２３に示されるアミノ酸配列、配列番号２６に示されるアミノ酸配列、配列番号２７に示されるアミノ酸配列、又は、これらのアミノ酸配列との相同性が７０％以上であるアミノ酸配列を有する請求項１に記載の気管支塞栓材料。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/044316

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C07K5/083(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i, A61L31/04(2006.01)i, A61L31/14(2006.01)i
FI: A61L31/04120, A61L31/14, A61L31/14500, C07K14/00, C07K5/083, C07K7/06ZNA
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. A61L31/04, A61L31/14, C07K5/083, C07K7/06, C07K14/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2016-216453 A (KYOTO UNIVERSITY) 22 December 2016 (2016-12-22), claims 1-3, paragraph [0001], examples 1-12, table 3	1-8
Y	JP 2008-125916 A (BIO VERDE KK) 05 June 2008 (2008-06-05), paragraphs [0020], [0021]	1-8
Y	JP 2004-339395 A (JAPAN ATOMIC ENERGY RESEARCH INSTITUTE) 02 December 2004 (2004-12-02), paragraphs [0014], [0015]	1-8
Y	JP 2008-001763 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY) 10 January 2008 (2008-01-10), paragraphs [0032], [0033]	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 December 2020	12 January 2021
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/044316

JP 2016-216453 A	22 December 2016	(Family: none)
JP 2008-125916 A	05 June 2008	(Family: none)
JP 2004-339395 A	02 December 2004	(Family: none)
JP 2008-001763 A	10 January 2008	(Family: none)

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/044316

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 5/083(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C07K 14/00(2006.01)i; A61L 31/04(2006.01)i; A61L 31/14(2006.01)i
FI: A61L31/04 120; A61L31/14; A61L31/14 500; C07K14/00; C07K5/083; C07K7/06 ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61L31/04; A61L31/14; C07K5/083; C07K7/06; C07K14/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2016-216453 A (国立大学法人京都大学) 22.12.2016 (2016-12-22) 請求項1-3, 段落[0001], 実施例1-12, 表3	1-8
Y	JP 2008-125916 A (株式会社バイオベルデ) 05.06.2008 (2008-06-05) 段落[0020]-[0021]	1-8
Y	JP 2004-339395 A (日本原子力研究所) 02.12.2004 (2004-12-02) 段落[0014]-[0015]	1-8
Y	JP 2008-001763 A (国立大学法人群馬大学) 10.01.2008 (2008-01-10) 段落[0032]-[0033]	1-8

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
16.12.2020	12.01.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
梅田　隆志 4C 1785
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/044316

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/044316

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2016-216453	A	22.12.2016	（ファミリーなし）	
JP	2008-125916	A	05.06.2008	（ファミリーなし）	
JP	2004-339395	A	02.12.2004	（ファミリーなし）	
JP	2008-001763	A	10.01.2008	（ファミリーなし）	