

(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
2016 年 7 月 28 日(28.07.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/117567 A1

- (51) 国際特許分類:
B01J 20/24 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01) C07K 1/16 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/051460
- (22) 国際出願日: 2016 年 1 月 19 日(19.01.2016)
- (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 2015-007776 2015 年 1 月 19 日(19.01.2015) JP
- (71) 出願人: 日立化成株式会社(HITACHI CHEMICAL COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 渡邊 優(WATANABE Masaru); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP). 後藤 泰史(GOTOH Yasushi); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP). 佛願道男(BUTSUGAN Michio); 〒3178555 茨城県日立市東町四丁目 1 3 番 1 号 日立化成テクノサービス株式会社内 Ibaraki (JP). 中西 良一(NAKANISHI Ryoichi); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目 1 番
- 1 号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9 階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))

(54) Title: SEPARATION MATERIAL

(54) 発明の名称: 分離材

(57) Abstract: The present invention provides a separation material that is provided with: porous polymer particles that include styrene and/or divinylbenzene as a monomer unit to the amount of 90 mass% or more in terms of the total monomer quantity; and a coating layer that coats at least a portion of the surface of the porous polymer particles and includes a polymer having a hydroxyl group. Therein, the coating amount of the coating layer is 1-15 mg/m² per unit specific surface area of the porous polymer particles.

(57) 要約: 本発明は、モノマ単位として、スチレン及びジビニルベンゼンの少なくとも一方を、モノマ全量基準で 90 質量%以上含む、多孔質ポリマ粒子と、該多孔質ポリマ粒子の表面の少なくとも一部を被覆する、水酸基を有する高分子を含む被覆層と、を備え、被覆層による被覆量が多孔質ポリマ粒子の単位比表面積当たり 1 ~ 15 mg/m²である分離材を提供する。



WO 2016/117567 A1

明 細 書

発明の名称：分離材

技術分野

[0001] 本発明は、分離材に関する。

背景技術

[0002] 従来、タンパク質に代表される生体高分子を分離精製する場合、一般的には多孔質型の合成高分子を母体とするイオン交換体、親水性天然高分子の架橋ゲルを母体とする粒子等が用いられている。上記の多孔質型の合成高分子を母体とするイオン交換体は、通液時の耐圧性が良いといった利点を持っている。しかし、このイオン交換体は、タンパク質等の分離に用いた場合、疎水性相互作用に基づく不可逆吸着等の非特異吸着が起き、ピークの非対称化が発生する、あるいは、疎水性相互作用でイオン交換体に吸着されたタンパク質が吸着されたまま回収できないことがあるといった問題点があった。

[0003] 一方、デキストラン、アガロース等の多糖に代表される上記親水性天然高分子の架橋ゲルを母体とするイオン交換体の場合、タンパク質の非特異吸着がほとんどないという利点がある。ところが、このイオン交換体は、水溶液中で著しく膨潤し、また、溶液のイオン強度による体積変化及び、遊離酸形と負荷形との体積変化が大きく、機械的強度も充分ではないという欠点を有する。特に、架橋ゲルをクロマトグラフィーで使用する場合、通液時の圧力損失が大きく、通液によりゲルが圧密化するという欠点がある。

[0004] 親水性天然高分子の架橋ゲルを持つ欠点を克服するため、いわば骨格となる剛直な物質を組み合わせる試みがこれまでなされている。

例えば、多孔質高分子の細孔内に天然高分子ゲル等のゲルを保持した複合体が、ペプチド合成の分野で知られている（特許文献1参照）。特許文献1には、このような複合体を用いることにより、反応性物質の負荷係数を高め、高収率の合成が可能となることが記載されている。

[0005] いわゆるマクロネットワーク構造のコポリマの細孔を、モノマから合成し

た架橋共重合体ゲルで埋めたハイブリッドコポリマのイオン交換体が知られている（特許文献2参照）。架橋共重合体ゲルは、架橋度が低い場合、圧力損失、体積変化等の問題があるが、ハイブリッドコポリマにすることで通液特性が改善され、圧力損失が少なくなること、また、イオン交換容量が向上し、リーク挙動が改善されていることが特許文献2に記載されている。

[0006] 有機合成ポリマ基体の細孔内に巨大網目を有する親水性天然高分子の架橋ゲルを充填した複合化充填材が提案されている（特許文献3及び4参照）。

[0007] メタクリル酸グリシジルとアクリル架橋モノマにより構成される多孔質粒子を合成する技術が知られている（特許文献5参照）。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：米国特許第4 9 6 5 2 8 9号公報

特許文献2：米国特許第3 9 6 6 4 8 9号公報

特許文献3：特開平1－2 5 4 2 4 7号公報

特許文献4：米国特許第5 1 1 4 5 7 7号公報

特許文献5：特開2 0 0 9－2 4 4 0 6 7号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 従来のカラム充填材では、天然高分子の課題である通液性、ポリマ粒子の課題である酵素等のタンパク質の非特異吸着の低減、吸着量の向上、変性の抑制を一挙に解決することが困難である。

[0010] そこで本発明は、通液性を確保し、且つタンパク質の非特異吸着の低減、吸着量の向上及び変性の抑制が可能な分離材を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明は、下記〔1〕～〔6〕に記載の分離材を提供する。

〔1〕 モノマ単位として、スチレン及びジビニルベンゼンの少なくとも一方を、モノマ全量基準で90質量%以上含む、多孔質ポリマ粒子と、該多孔

質ポリマ粒子の表面の少なくとも一部を被覆する、水酸基を有する高分子を含む被覆層と、を備え、被覆層による被覆量が多孔質ポリマ粒子の単位比表面積当たり $1 \sim 15 \text{ mg} / \text{m}^2$ である分離材。

[2] 上記分離材の表面における酸素元素比率が $10 \sim 50\%$ である、[1] に記載の分離材。

[3] 上記水酸基を有する高分子が多糖類又はその変性体である、[1] 又は [2] に記載の分離材。

[4] 上記多糖類がアガロース、キトサン、アルギン酸及びデキストランから選ばれる少なくとも一種である、[3] に記載の分離材。

[5] 水酸基を有する高分子が架橋されている、[1] ～ [4] のいずれかに記載の分離材。

[6] 上記多孔質ポリマ粒子における比表面積が $10 \text{ m}^2 / \text{g}$ 以上である、[1] ～ [5] のいずれかに記載の分離材。

[7] 上記多孔質ポリマ粒子の細孔径分布におけるモード径が $0.05 \sim 1 \mu\text{m}$ である、[1] ～ [6] のいずれかに記載の分離材。

[8] カラムと、該カラムに充填された上記 [1] ～ [7] のいずれかに記載の分離材とを備える、分離用カラム。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、通液性が確保され、且つタンパク質の非特異吸着の低減、吸着量の向上及び変性の抑制が可能な分離材を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1] 分離用カラムの一実施形態を示す断面図である。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明の好適な実施形態について説明をするが、本発明はこれらの実施形態に何ら限定されるものではない。

[0015] <分離材>

本実施形態の分離材は、多孔質ポリマ粒子と、該多孔質ポリマ粒子の表面の少なくとも一部を被覆する被覆層と、を備える。なお、本明細書中、「多

孔質ポリマ粒子の表面」とは、多孔質ポリマ粒子の外側の表面のみでなく、多孔質ポリマ粒子の内部における細孔の表面を含むものとする。

[0016] (多孔質ポリマ粒子)

本実施形態の多孔質ポリマ粒子は、多孔質化剤を含むモノマを硬化させた粒子であり、例えば、従来の懸濁重合、乳化重合等によって合成することができる。モノマ単位としては、スチレン及びジビニルベンゼンの少なくとも一方を、モノマ全量基準で90質量%以上含み、好ましくはジビニルベンゼンをモノマ全量基準で90質量%以上含む。所定量のスチレン又はジビニルベンゼンを含むことにより、耐圧性に優れる傾向にある。

モノマはさらに、以下のようなスチレン及びジビニルベンゼン以外の多官能性モノマ、単官能性モノマ等を含んでいてもよい。

[0017] ジビニルベンゼン以外の多官能性モノマとしては、例えば、ジビニルビフェニル、ジビニルナフタレン、ジビニルフェナントレン等のジビニル化合物が挙げられる。これらの多官能性モノマは、1種単独で又は2種類以上を組み合わせて用いることができる。

[0018] スチレン以外の単官能性モノマとしては、例えば、*o*-メチルスチレン、*m*-メチルスチレン、*p*-メチルスチレン、 α -メチルスチレン、*o*-エチルスチレン、*m*-エチルスチレン、*p*-エチルスチレン、2,4-ジメチルスチレン、*p*-*n*-ブチルスチレン、*p*-*t*-ブチルスチレン、*p*-*n*-ヘキシルスチレン、*p*-*n*-オクチルスチレン、*p*-*n*-ノニルスチレン、*p*-*n*-デシルスチレン、*p*-*n*-ドデシルスチレン、*p*-メトキシスチレン、*p*-フェニルスチレン、*p*-クロロスチレン、3,4-ジクロロスチレン等のスチレン誘導体が挙げられる。これらの単官能性モノマは、1種単独で又は2種類以上を組み合わせて用いることができる。また、カルボキシ基、アミノ基、水酸基、アルデヒド基等の官能基を有するスチレン誘導体も使用することができる。

[0019] 多孔質化剤としては、重合時に相分離を促し、粒子の多孔質化を促進する有機溶媒である脂肪族又は芳香族の炭化水素類、エステル類、ケトン類、エ

ーテル類、アルコール類等が挙げられる。具体的には、トルエン、キシレン、ジエチルベンゼン、シクロヘキサン、オクタン、酢酸ブチル、フタル酸ジブチル、メチルエチルケトン、ジブチルエーテル、1-ヘキサノール、2-オクタノール、デカノール、ラウリルアルコール、シクロヘキサノール等が挙げられる。これら多孔質化剤は、1種単独で又は2種類以上を組み合わせる用いることができる。

[0020] 上記多孔質化剤は、モノマ全質量に対して0～200質量%使用できる。多孔質化剤の量によって、多孔質ポリマ粒子の空隙率をコントロールできる。さらに、多孔質化剤の種類によって、多孔質ポリマ粒子の細孔の大きさ及び形状をコントロールすることができる。

[0021] 溶媒として使用する水を多孔質化剤とすることもできる。水を多孔質化剤とする場合は、モノマに油溶性界面活性剤を溶解させ、水を吸収することによって、多孔質化することが可能となる。

[0022] 多孔質化に使用される油溶性界面活性剤としては、分岐C16～C24脂肪酸、鎖状不飽和C16～C22脂肪酸又は鎖状飽和C12～C14脂肪酸のソルビタンモノエステル、例えば、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノミリステート又はヤシ脂肪酸から誘導されるソルビタンモノエステル；分岐C16～C24脂肪酸、鎖状不飽和C16～C22脂肪酸又は鎖状飽和C12～C14脂肪酸のジグリセロールモノエステル、例えば、ジグリセロールモノオレエート（例えば、C18：1（炭素数18個、二重結合数1個）脂肪酸のジグリセロールモノエステル）、ジグリセロールモノミリステート、ジグリセロールモノイソステアレート又はヤシ脂肪酸のジグリセロールモノエステル；分岐C16～C24アルコール（例えば、ゲルベアルコール）、鎖状不飽和C16～C22アルコール又は鎖状飽和C12～C14アルコール（例えば、ヤシ脂肪アルコール）のジグリセロールモノ脂肪族エーテル；及びこれらの混合物が挙げられる。

[0023] これらのうち、ソルビタンモノラウレート（例えば、SPAN（スパン、登録商標）20好ましくは純度約40%を超える、より好ましくは純度約5

0%を超える、最も好ましくは純度約70%を超えるソルビタンモノラウレート) ; ソルビタンモノオレエート (例えば、SPAN (スパン、登録商標) 80、好ましくは純度約40%、より好ましくは純度約50%、最も好ましくは純度約70%を超えるソルビタンモノオレエート) ; ジグリセロールモノオレエート (例えば、純度約40%を超える、より好ましくは純度約50%を超える、最も好ましくは純度約70%を超えるジグリセロールモノオレエート) ; ジグリセロールモノイソステアレート (例えば、好ましくは純度約40%を超える、より好ましくは純度約50%を超える、最も好ましくは純度約70%を超えるジグリセロールモノイソステアレート) ; ジグリセロールモノミリステート (好ましくは純度約40%を超える、より好ましくは純度約50%を超える、最も好ましくは純度約70%を超えるソルビタンモノミリステート) ; ジグリセロールのココイル (例えば、ラウリル基、ミリストイル基等) エーテル ; 及びこれらの混合物が好ましい。

[0024] これらの油溶性界面活性剤は、モノマ全質量に対して、5~80質量%の範囲で用いることが好ましい。油溶性界面活性剤の含有量が5質量%以上であると、水滴の安定性が充分となることから、大きな単一孔を形成しにくくなる。また、油溶性界面活性剤の含有量が80質量%以下であると、重合後に多孔質ポリマ粒子が形状をより保持しやすくなる。

[0025] 重合反応に用いられる水性媒体としては、水、水と水溶性溶媒 (例えば、低級アルコール) との混合媒体等が挙げられる。水性媒体には、界面活性剤が含まれていてもよい。界面活性剤としては、アニオン系、カチオン系、ノニオン系及び両性イオン系の界面活性剤のうち、いずれも用いることができる。

[0026] アニオン系界面活性剤としては、例えば、オレイン酸ナトリウム、ヒマシ油カリ等の脂肪酸油、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸アンモニウム等のアルキル硫酸エステル塩、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等のアルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキルナフタレンスルホン酸塩、アルカンスルホン酸塩、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム等のジアルキルスル

ホコハク酸塩、アルケルニルコハク酸塩（ジカリウム塩）、アルキルリン酸エステル塩、ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル硫酸エステル塩、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム等のポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステル塩などが挙げられる。

[0027] カチオン系界面活性剤としては、例えば、ラウリルアミンアセテート、ステアリルアミンアセテート等のアルキルアミン塩、ラウリルトリメチルアンモニウムクロライド等の第四級アンモニウム塩が挙げられる。

[0028] ノニオン系界面活性剤としては、例えば、ポリエチレングリコールアルキルエーテル類、ポリエチレングリコールアルキルアリールエーテル類、ポリエチレングリコールエステル類、ポリエチレングリコールソルビタンエステル類、ポリアルキレングリコールアルキルアミン又はアミド類等の炭化水素系ノニオン界面活性剤、シリコンのポリエチレンオキサイド付加物類、ポリプロピレンオキサイド付加物類等のポリエーテル変性シリコン系ノニオン界面活性剤、パーフルオロアルキルグリコール類等のフッ素系ノニオン界面活性剤が挙げられる。

[0029] 両性イオン系界面活性剤としては、例えば、ラウリルジメチルアミンオキサイド等の炭化水素界面活性剤、リン酸エステル系界面活性剤、亜リン酸エステル系界面活性剤が挙げられる。

[0030] 界面活性剤は、1種を単独で又は2種以上を組み合わせ用いてもよい。上記界面活性剤の中でも、モノマ重合時の分散安定性の観点から、アニオン系界面活性剤が好ましい。

[0031] 必要に応じて添加される重合開始剤としては、例えば、過酸化ベンゾイル、過酸化ラウロイル、オルソクロロ過酸化ベンゾイル、オルソメトキシ過酸化ベンゾイル、3, 5, 5-トリメチルヘキサノイルパーオキサイド、tert-ブチルパーオキシ-2-エチルヘキサノエート、ジ-tert-ブチルパーオキサイド等の有機過酸化物；2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル、1, 1'-アゾビスシクロヘキサンカルボニトリル、2, 2'-アゾビ

ス（２，４－ジメチルバレロニトリル）等のアゾ系化合物が挙げられる。重合開始剤は、モノマ１００質量部に対して、０．１～７．０質量部の範囲で使用する事ができる。

[0032] 重合温度は、モノマ及び重合開始剤の種類に応じて、適宜選択することができる。重合温度は、２５～１１０℃が好ましく、５０～１００℃がより好ましい。

[0033] 多孔質ポリマ粒子の合成において、粒子の分散安定性を向上させるために、高分子分散安定剤を用いてもよい。

[0034] 高分子分散安定剤としては、例えば、ポリビニルアルコール、ポリカルボン酸、セルロース類（ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース等）、ポリビニルピロリドン、第三リン酸カルシウム（ＴＣＰ）、トリポリリン酸ナトリウム等の無機系水溶性高分子化合物などが挙げられる。これらは、単独又は複数種を組み合わせ使用することができる。これらのうち、第三リン酸カルシウム（ＴＣＰ）、ポリビニルアルコール又はポリビニルピロリドンが好ましい。高分子分散安定剤の添加量は、モノマ１００質量部に対して１～１０質量部が好ましい。

[0035] モノマが単独で重合することを抑えるために、亜硝酸塩類、亜硫酸塩類、ハイドロキノン類、アスコルビン酸類、水溶性ビタミンＢ類、クエン酸、ポリフェノール類等の水溶性の重合禁止剤を用いてもよい。

[0036] 多孔質ポリマ粒子の平均粒径は、好ましくは３００μm以下、より好ましくは１５０μm以下、さらに好ましくは１００μm以下である。また、多孔質ポリマ粒子の平均粒径は、通液性の向上の観点から、好ましくは１０μm以上、より好ましくは３０μm以上、さらに好ましくは５０μm以上である。

[0037] 多孔質ポリマ粒子の粒径の変動係数（Ｃ．Ｖ．）は、通液性の向上の観点から、３～１５％であることが好ましく、５～１５％であることがより好ましく、５～１０％であることがさらに好ましい。Ｃ．Ｖ．を低減する方法としては、マイクロプロセスサーバー（株式会社日立製作所）等の乳化装置に

より単分散化することが挙げられる。

[0038] 多孔質ポリマ粒子又は分離材の平均粒径及び粒径の C. V. (変動係数) は、以下の測定法により求めることができる。

1) 粒子を、超音波分散装置を使用して水 (界面活性剤等の分散剤を含む) に分散させ、1 質量% の多孔質ポリマ粒子を含む分散液を調製する。

2) 粒度分布計 (シスメックスフロー、シスメックス株式会社製) を用いて、上記分散液中の粒子約 1 万個の画像により平均粒径及び粒径の C. V. (変動係数) を測定する。

[0039] 多孔質ポリマ粒子の細孔容積 (空隙率) は、多孔質ポリマ粒子の全体積 (細孔容積を含む) 基準で 30 体積% 以上 70 体積% 以下であることが好ましく、40 体積% 以上 70 体積% 以下であることがより好ましい。多孔質ポリマ粒子は、細孔径分布におけるモード径 (細孔径分布の最頻値、最大頻度細孔径、平均細孔径) が 0.05 ~ 1 μm である細孔を有することが好ましい。多孔質ポリマ粒子の細孔径分布におけるモード径として、より好ましくは、0.2 μm 以上 0.5 μm 未満である。細孔径分布におけるモード径が 0.05 μm 以上であると、細孔内に物質が入りやすくなる傾向にあり、細孔径分布におけるモード径が 1 μm 以下であると、比表面積が充分なものになる。これらは上述の多孔質化剤により調整可能である。

[0040] 多孔質ポリマ粒子の比表面積は、10 m^2/g 以上であることが好ましく、30 m^2/g 以上であることがより好ましい。より高い実用性の観点から、比表面積は 35 m^2/g 以上であることがより好ましく、40 m^2/g 以上であることがさらに好ましい。比表面積が 10 m^2/g 以上であると、分離する物質の吸着量が大きくなる傾向にある。多孔質ポリマ粒子の比表面積の上限は特に限定されないが、例えば 200 m^2/g 以下、100 m^2/g 以下とすることができる。

[0041] (被覆層)

本実施形態の被覆層は、所定量 (被覆量) の水酸基を有する高分子を含む。所定量の水酸基を有する高分子で多孔質ポリマ粒子を被覆することにより

カラム圧の上昇を抑制することができるとともに、タンパク質の非特異吸着を抑制することが可能となる上、分離材のタンパク質吸着量が良好となる傾向にある。さらに、水酸基を有する高分子が架橋されていると、カラム圧の上昇をより抑制することが可能となる。

[0042] 本実施形態の分離材は、被覆層による被覆量が、前記多孔質ポリマ粒子の単位比表面積当たり $1 \sim 15 \text{ mg/m}^2$ であり、 $5 \sim 15 \text{ mg/m}^2$ であると好ましく、 $8 \sim 15 \text{ mg/m}^2$ であるとより好ましい。被覆層による被覆量を所定の範囲とすることにより、タンパク質の分離材として用いた場合の非特異吸着とタンパク質変性の抑制及び吸着量の向上が可能となる。被覆層による被覆量は、実施例に記載の方法等により測定することができる。

[0043] 本実施形態の分離材は、その表面における酸素元素比率が $10 \sim 50\%$ であると好ましく、 $15 \sim 50\%$ であるとより好ましく、 $20 \sim 50\%$ であるとさらに好ましく、 $30 \sim 50\%$ であると特に好ましい。分離材の表面における酸素元素比率を所定の範囲とすることにより、タンパク質の分離材として用いた場合の非特異吸着とタンパク質変性の抑制効果及び吸着量の向上効果がさらに向上する。分離材の表面における酸素元素比率は、実施例に記載の方法等により測定することができる。分離材の表面における酸素元素比率は、分離材の外側から被覆層に対して X 線を照射する X 線光電子分光によって測定される。

[0044] (水酸基を有する高分子)

水酸基を有する高分子は、1 分子中に 2 個以上の水酸基を有することが好ましく、親水性高分子であることがより好ましい。水酸基を有する高分子としては、例えば、多糖類、ポリビニルアルコール等が挙げられる。多糖類としては、好ましくはアガロース、デキストラン、セルロース、キトサン、アルギン酸等が挙げられる。水酸基を有する高分子としては、例えば重量平均分子量 $1 \text{ 万} \sim 20 \text{ 万}$ 程度のものが使用できる。

[0045] 水酸基を有する高分子は、界面吸着能を向上させる観点から、疎水基により変性された変性体であることが好ましい。疎水基としては、例えば、炭素

数 1 ～ 6 のアルキル基、炭素数 6 ～ 10 のアリール基等が挙げられる。炭素数 1 ～ 6 のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基等が挙げられる。炭素数 6 ～ 10 のアリール基としては、例えば、フェニル基、ナフチル基等が挙げられる。疎水基は、水酸基と反応する官能基（例えば、エポキシ基）及び疎水基を有する化合物（例えば、グリシジルフェニルエーテル）を、水酸基を有する高分子と従来公知の方法で反応させることにより、導入することができる。

[0046] （被覆層の形成方法）

水酸基を有する高分子を含む被覆層は、例えば、以下に示す方法により形成することができる。

まず、水酸基を有する高分子の溶液を多孔質ポリマ粒子表面に吸着させる。水酸基を有する高分子の溶液の溶媒としては、水酸基を有する高分子を溶解することのできるものであれば、特に限定されないが、水が最も一般的である。溶媒に溶解させる高分子の濃度は、5 ～ 20 (mg/mL) が好ましい。

この溶液を、多孔質ポリマ粒子に含浸させる。含浸方法は、水酸基を有する高分子の溶液に多孔質ポリマ粒子を加えて一定時間放置する。含浸時間は多孔質体の表面状態によっても変わるが、通常一昼夜含浸すれば高分子濃度が多孔質体の内部で外部濃度と平衡状態となる。その後、水、アルコール等の溶媒で洗浄し、未吸着分の水酸基を有する高分子を除去する。

[0047] （架橋処理）

次いで、架橋剤を加えて多孔質ポリマ粒子表面に吸着された水酸基を有する高分子を架橋反応させて、架橋体を形成する。すなわち、分離材の水酸基を有する高分子は架橋されていてもよい。このとき、架橋体は、水酸基を有する 3 次元架橋網目構造を有する。

[0048] 架橋剤としては、例えばエピクロロヒドリン等のエピハロヒドリン、グルタルアルデヒド等のジアルデヒド化合物、メチレンジイソシアネート等のジイソシアネート化合物、エチレングリコールジグリシジルエーテル等のグリ

シジル化合物などのような、水酸基に活性な官能基を2個以上有する化合物が挙げられる。また、水酸基を有する高分子としてキトサンのようなアミノ基を有する化合物を使用する場合には、ジクロロオクタンのようなジハライドも架橋剤として使用できる。

[0049] この架橋反応には通常、触媒が用いられる。該触媒は架橋剤の種類に合わせて適宜従来公知のものをを用いることができるが、例えば、架橋剤がエピクロルヒドリン等の場合には水酸化ナトリウム等のアルカリが有効であり、ジアルデヒド化合物の場合には塩酸等の鉱酸が有効である。

[0050] 架橋剤による架橋反応は、通常、分離材を適当な媒体中に分散、懸濁させた系に架橋剤を添加することによって行われる。架橋剤の添加量は、水酸基を有する高分子として多糖類を使用した場合、単糖類の1単位を1モルとすると、それに対して例えば0.1～100モル倍の範囲内で、分離材の性能に応じて選定することができる。一般に、架橋剤の添加量を少なくすると、被覆層が多孔質ポリマ粒子から剥離しやすくなる傾向にある。また、架橋剤の添加量が過剰で、かつ、水酸基を有する高分子との反応率が高い場合、原料の水酸基を有する高分子の特性が損なわれる傾向にある。

[0051] 触媒の使用量としては、架橋剤の種類により異なるが、通常、水酸基を有する高分子として多糖類を使用する場合に、多糖類を形成する単糖類の1単位を1モルとすると、これに対して好ましくは0.01～10モル倍の範囲、さらに好ましくは0.1～5モル倍で使用される。

[0052] 例えば、該架橋反応条件を温度条件とした場合、反応系の温度を上げ、その温度が反応温度に達すれば架橋反応が生起する。

[0053] 水酸基を有する高分子の溶液等を含浸させた多孔質ポリマ粒子を分散、懸濁させる媒体としては含浸させた高分子溶液から高分子、架橋剤等を抽出してしまうことなく、かつ、架橋反応に不活性なものである必要がある。その具体例としては、水、アルコール、トルエン、ジクロロベンゼン、ニトロメタン等が挙げられる。

[0054] 架橋反応は、通常、5～90℃の範囲の温度で、1～10時間かけて行う

。好ましくは、30～90℃の範囲の温度である。

[0055] 架橋反応終了後、生成した粒子を濾別し、次いで水、メタノール、エタノール等の親水性有機溶媒で洗浄し、未反応の高分子、懸濁用媒体等を除去すれば、多孔質ポリマ粒子の表面の少なくとも一部が、水酸基を有する高分子を含む被覆層により被覆された分離材が得られる。

[0056] (イオン交換基の導入)

被覆層を備える分離材は、イオン交換基、リガンド(プロテインA)等を表面上の水酸基等を介して導入することによりイオン交換精製、アフィニティ精製等に使用することができる。イオン交換基の導入方法として、例えば、ハロゲン化アルキル化合物を用いる方法が挙げられる。

[0057] ハロゲン化アルキル化合物としては、モノハロゲノ酢酸、モノハロゲノプロピオン酸等のモノハロゲノカルボン酸及びそのナトリウム塩、ジエチルアミノエチルクロライド等のハロゲン化アルキル基を少なくとも1つ有する1級、2級又は3級アミン、ハロゲン化アルキル基を有する4級アンモニウムの塩酸塩などが挙げられる。これらのハロゲン化アルキル化合物は、臭化物又は塩化物であることが好ましい。ハロゲン化アルキル化合物の使用量としては、イオン交換基を付与する分離材の全質量に対して0.2質量%以上であることが好ましい。

[0058] イオン交換基の導入には、反応を促進させるために、有機溶媒を用いることが有効である。有機溶媒としては、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、イソブタノール、1-ペンタノール、イソペンタノール等のアルコール類が挙げられる。

[0059] 通常、イオン交換基の導入は、分離材表面の水酸基に行われるので、湿潤状態の粒子を、ろ過等により水切りした後、所定濃度のアルカリ性水溶液に浸漬し、一定時間放置した後、水-有機溶媒混合系で、上記ハロゲン化アルキル化合物を添加して反応させる。この反応は温度40～90℃で、0.5～12時間行うことが好ましい。上記の反応で使用されるハロゲン化アルキル化合物の種類により、付与されるイオン交換基が決定される。

- [0060] イオン交換基として、弱塩基性基であるアミノ基を導入する方法としては、上記ハロゲン化アルキル化合物のうち、水素原子の一部が塩素原子に置換されたアルキル基を少なくとも1つ有する、モノー、ジー又はトリーアルキルアミン、モノー、ジー又はトリーアルカノールアミン、モノーアルキルモノーアルカノールアミン、ジールキルモノーアルカノールアミン、モノーアルキルジールカノールアミン等を反応させる方法が挙げられる。これらのハロゲン化アルキル化合物の使用量としては、分離材の全質量に対して0.2質量%以上であることが好ましい。反応条件は、40～90℃で、0.5～12時間であることが好ましい。
- [0061] イオン交換基として、強塩基性基の4級アンモニウム基を導入する方法としては、まず、3級アミノ基を導入し、該3級アミノ基にエピクロロヒドリン等のハロゲン化アルキル化合物を反応させ、4級アンモニウム基に変換させる方法が挙げられる。また、4級アンモニウムの塩酸塩等を分離材に反応させてもよい。
- [0062] イオン交換基として、弱酸性基であるカルボキシ基を導入する方法としては、上記ハロゲン化アルキル化合物として、モノハロゲノ酢酸、モノハロゲノプロピオン酸等のモノハロゲノカルボン酸又はそのナトリウム塩を反応させる方法が挙げられる。これらハロゲン化アルキル化合物の使用量は、イオン交換基を導入する分離材の全質量に対して0.2質量%以上であることが好ましい。
- [0063] イオン交換基として、強酸性基であるスルホン酸基の導入方法としては、分離材に対してエピクロロヒドリン等のグリシジル化合物を反応させ、亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム等の亜硫酸塩又は重亜硫酸塩の飽和水溶液に分離材を添加する方法が挙げられる。反応条件は、30～90℃で1～10時間であることが好ましい。
- [0064] 一方、イオン交換基の導入方法として、アルカリ性雰囲気下で、分離材に1,3-プロパンスルトンと反応させる方法も挙げられる。1,3-プロパンスルтонは、分離材の全質量に対して0.4質量%以上使用することが好

ましい。反応条件は、0～90℃で0.5～12時間であることが好ましい。

[0065] 本実施形態の分離材の吸湿度は、次の方法で測定する。乾燥分離材1gを恒温恒湿度試験槽（温度60℃、湿度90%）に18時間放置した後、再度分離材の質量を測定することにより吸湿度を以下の式より算出する。

$$(\text{吸湿後分離材質量} - 1) \text{ g} / 1 \text{ g} \times 100 = \text{吸湿度} (\%)$$

[0066] 本実施形態の分離材の吸湿度は1～30質量%であることが好ましく、1～20質量%であることがより好ましく、1～10質量%であることがさらに好ましい。分離材の吸湿度が30質量%以下であると、被覆層の厚みによる分離材の通液性の低下を抑制することができる。

[0067] 本実施形態の分離材又は多孔質ポリマ粒子の平均細孔径、細孔径分布におけるモード径、比表面積及び空隙率は、水銀圧入測定装置（オートポア：株式会社島津製作所製）にて測定した値であり、以下のようにして測定する。試料0.05gを、標準5mL粉体用セル（ステム容積0.4mL）に加え、初期圧21kPa（約3psia、細孔直径約60μm相当）の条件で測定する。水銀パラメータは、装置デフォルトの水銀接触角130 degrees、水銀表面張力485dynes/cmに設定する。また、細孔径0.1～3μmの範囲に限定してそれぞれの値を算出する。

[0068] 本実施形態の分離材は、タンパク質を静電的相互作用による分離、アフィニティ精製に用いるのに好適である。例えば、タンパク質を含む混合溶液の中に本実施形態の分離材を添加し、静電的相互作用によりタンパク質だけを分離材に吸着させた後、該分離材を溶液からろ別し、塩濃度の高い水溶液中に添加すれば、分離材に吸着しているタンパク質を容易に脱離、回収できる。また、本実施形態の分離材は、カラムクロマトグラフィーにおいて、使用することも可能である。図1に分離用カラムの一実施形態を示す。分離用カラム10は、カラム1と、カラム1に充填された分離材2とを備える。

[0069] 本実施形態の分離材を用いて分離できる生体高分子としては、水溶性物質が好ましい。具体的には、血清アルブミン、免疫グロブリン等の血液タンパ

ク質などのタンパク質、生体中に存在する酵素、バイオテクノロジーにより生産されるタンパク質生理活性物質、DNA、生理活性をするペプチド等の生体高分子などであり、好ましくは重量平均分子量が200万以下、より好ましくは50万以下である。また、公知の方法に従い、タンパク質の等電点、イオン化状態等によって、分離材の性質、条件等を選ぶ必要がある。公知の方法としては、例えば、特開昭60-169427号公報等に記載の方法が挙げられる。

[0070] 本実施形態の分離材は、多孔質ポリマ粒子上の被覆層を架橋処理後、分離材の表面にイオン交換基、プロテインA等を導入することにより、タンパク質等の生体高分子の分離において、天然高分子からなる粒子又は合成ポリマからなる粒子のそれぞれの利点を有する。特に本実施形態の分離材における多孔質ポリマ粒子は、上述の方法で得られるものであるため、耐久性及び耐アルカリ性を有する。また、本実施形態の分離材は、タンパク質の非特異吸着を低減し、タンパク質の吸脱着が起こりやすい傾向にある。さらに、本実施形態の分離材は、同一流速下でのタンパク質等の吸着量（動的吸着量）が大きい傾向にある。

[0071] 本明細書における通液速度とは、 $\phi 7.8 \times 300 \text{ mm}$ のステンレスカラムに本実施形態の分離材を充填し、液を通した際の通液速度を表す。本実施形態の分離材は、カラムに充填した場合、カラム圧0.3 MPaのときに通液速度が800 cm/h以上であることが好ましい。カラムクロマトグラフィーでタンパク質の分離を行う場合、タンパク質溶液等の通液速度としては、一般に400 cm/h以下の範囲であるが、本実施形態の分離材を使用した場合は、通常のタンパク質分離用の分離材よりも速い通液速度800 cm/h以上で使用することができる。

[0072] 本実施形態の分離材の平均粒径は、10～300 μm であることが好ましい。分取用又は工業用のクロマトグラフィーでの使用には、カラム内圧の極端な増加を避けるために、10～100 μm であることが好ましい。

[0073] 本実施形態の分離材は、カラムクロマトグラフィーでカラム充填材として

使用した場合、使用する溶出液の性質に依らず、カラム内での体積変化がほとんどないため、操作性に優れる。

[0074] 本実施形態の分離材の5%圧縮変形弾性率は、以下のようにして算出することができる。

微小圧縮試験機（F i s h e r社製）を用いて、室温（25℃）条件にて荷重負荷速度1 mN／秒で、四角柱の平滑な端面（50 μm×50 μm）により粒子を50 mNまで圧縮したときの荷重及び圧縮変位を測定する。得られた測定値から、粒子が5%圧縮変形したときの圧縮弾性率（5%K値）を下記式により求めることができる。また、上記測定中の変位量が最も大きく変化する点の荷重を破壊強度（mN）とする。

$$5\%K\text{値}(\text{MPa}) = (3/2^{1/2}) \cdot F \cdot S^{-3/2} \cdot R^{-1/2}$$

F：架橋ポリマ粒子が40%圧縮変形したときの荷重（mN）

S：架橋ポリマ粒子が40%圧縮変形したときの圧縮変位（mm）

R：架橋ポリマ粒子の半径（mm）

[0075] 分離材を5%圧縮変形したときの圧縮弾性率（5%K値）は、100～1000 MPaであると好ましく、200～1000 MPaであるとより好ましく、250～1000 MPaであるとさらに好ましい。

[0076] 分離材の細孔容積（空隙率）は、分離材の全体積（細孔容積を含む）基準で30体積%以上70体積%以下であることが好ましく、40体積%以上70体積%以下であることがより好ましい。分離材は、平均細孔径が0.05～1 μmである細孔を有することが好ましい。平均細孔径は、好ましくは、0.2～0.5 μmである。細孔径が0.05 μm以上であると、細孔内に物質が入りやすくなる傾向にあり、細孔径が1 μm以下であると、比表面積が充分なものになる。

[0077] 分離材の比表面積は、10 m²／g以上であることが好ましく、30 m²／g以上であることがより好ましい。より高い実用性の観点から、比表面積は35 m²／g以上であることがより好ましく、40 m²／g以上であることがさらに好ましい。比表面積が10 m²／g以上であると、分離する物質の吸着

量が大きくなる傾向にある。

[0078] 分離材の5%変形弾性率、細孔径分布におけるモード径、比表面積等は、多孔質ポリマ粒子の原料、多孔質化剤、水酸基を有する高分子等を適宜選択することによって、調整することができる。

[0079] なお、本実施形態では、イオン交換基を導入する形態の分離材について説明したが、イオン交換基を導入しなくても分離材として用いることができる。このような分離材は、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィーに利用することができる。すなわち、本実施形態の分離用カラムは、カラムと該カラムに充填された本実施形態の分離材とを備えるものである。

実施例

[0080] 以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0081] (実施例1)

<多孔質ポリマ粒子の合成>

500 mLの三口フラスコに、純度96%のジビニルベンゼン（新日鉄住金化学株式会社製、商品名：DVB960）を16 g、イソアミルアルコールを19.5 g、ジエチルベンゼンを4.5 g、及び過酸化ベンゾイルを0.64 g加え、第三リン酸カルシウム（TCP）（0.5質量%）水溶液を調製した。この水溶液をマイクロプロセスサーバーを使用して乳化後、得られた乳化液をフラスコに移し、80℃のウォーターバスで加熱しながら、攪拌機を用いて約8時間攪拌した。得られた粒子をろ過後、アセトンで洗浄を行った。最後に酸性水溶液でTCPを溶解させ、多孔質ポリマ粒子1を得た。得られた粒子の比表面積、及び細孔径分布におけるモード径を水銀圧入法で、平均粒径をフロー型粒径測定装置で測定した。その結果を表1に示す。

[0082] <被覆層の形成及び架橋>

アガロース水溶液（2質量%）100 mLに水酸化ナトリウム4 g、グリシジルフェニルエーテル0.14 gを投入し、70℃で12時間反応させ、アガロースにフェニル基を導入した。得られた変性アガロースをイソプロピ

ルアルコールで再沈殿させ、洗浄した。

200 mg/mL の変性アガロース水溶液に多孔質ポリマ粒子 1 を、水溶液 70 mL に対して多孔質ポリマ粒子 1 を 1 g の割合で投入し、50℃で 24 時間攪拌させ、多孔質ポリマ粒子 1 に変性アガロースを吸着させた。吸着後、ろ過を行い、熱水で 8 時間洗浄した。

その結果を表 1 に示す。

変性アガロースは次のように架橋した。エチレングリコールジグリシジルエーテル及び水酸化ナトリウムの濃度がそれぞれ 0.64 M、0.4 M である水溶液に、水溶液 35 mL に対して変性アガロースが吸着した多孔質ポリマ粒子 1 を 1 g の割合で投入し、24 時間室温にて攪拌した。その後、熱した 2 質量%のドデシル硫酸ナトリウム水溶液で洗浄後、純水で洗浄し、乾燥させることで分離材を得た。

[0083] (変性アガロースによる多孔質ポリマ粒子への被覆量測定)

多孔質ポリマ粒子へのアガロースの吸着量の測定について、熱分解による重量減少による分析を行った。多孔質ポリマ粒子、変性アガロース、及び上記被覆層の形成及び架橋で得られた粒子（分離材）それぞれ 10 mg を 30℃から 900℃まで加温した。多孔質ポリマ粒子は 500℃、変性アガロースは 300℃で熱分解することが分かったので、この 2 つのデータから変性アガロース被覆多孔質ポリマ粒子の変性アガロース被覆量を概算した。

具体的には、熱重量分析により、変性アガロース及び多孔質ポリマ粒子の重量減少を測定し、多孔質ポリマ粒子 1 g 当たりの変性アガロース量を算出した。ここで算出した多孔質ポリマ粒子 1 g 当たりの変性アガロース量を比表面積で割ることによって、単位比表面積当たりの被覆量を算出した（下記式（1）参照）。その結果を表 1 に示す。

単位比表面積あたりの被覆量 $[\text{mg}/\text{m}^2] = (\text{水酸基を有する高分子の重量減少量} [\%]) / (\text{多孔質ポリマ粒子の重量減少量} [\%]) / (\text{比表面積} [\text{m}^2/\text{g}]) \times 1000 \quad \cdots \text{式 (1)}$

[0084] (タンパク質の非特異吸着能評価)

まず、既知濃度のBSA（牛血清アルブミン）水溶液で検量線を作成した（0～0.4%）。上記被覆層の形成及び架橋で得られた粒子（分離材）200mgを20℃の水に12時間浸して膨潤した。その膨潤粒子と水10mLをバイアル瓶に秤量した。100mLメスフラスコに、BSAを秤量し、リン酸食塩緩衝液（pH=7.1）で溶解し、12mg/mL及び24mg/mLのBSA水溶液を調製した。これらのBSA溶液10mLを上記の粒子溶液に添加し、25℃にて24時間ミックスロータで攪拌した。この溶液の上澄み10mLを10倍に希釈し、吸光度（280nm）を測定し、分離材へのBSA吸着量を非特異吸着量として算出した。その結果を表2に示す。

[0085]（酸素元素比率の測定）

上記被覆層の形成及び架橋で得られた粒子（分離材）を、乾燥機で70℃、12時間乾燥させた後、粒子表面の酸素元素比率を下記XPS（X線光電子分光）装置で測定した。その結果を表1に示す。

また、同様の方法で粒子を乾燥させた後、乳鉢で粒子を磨り潰して、粒子内部の酸素元素比率を下記XPS装置で測定した。その結果を表1に示す。

なお、酸素元素比率は、酸素元素に由来するピーク強度を、水素元素以外の元素のピーク強度で割り算することにより、算出した。

XPS装置：アルバック・ファイ社製 PHI 5000 VersaProbe II

X線：単色化Al K α 線（1486.6 eV）

分析面積：200 μm^2

分析深度：50 Å

[0086]＜イオン交換基の導入＞

上記被覆層の形成及び架橋で得られた粒子（分離材）を、遠心分離により水を除去した後、5M水酸化ナトリウム水溶液20mLと5Mジエチルアミノエチル塩酸塩水溶液20mLとを混合した液に投入し、70℃で12時間攪拌した。反応終了後、ろ過、水洗し、ジエチルアミノエチル（DEAE）

基をイオン交換基として有するDEAE変性分離材を得た。

[0087] (タンパク質結合容量と回収率評価)

得られたDEAE変性分離材200mgを20℃の水に12時間浸して膨潤した。その膨潤分離材と水10mLをバイアル瓶に秤量した。100mLメスフラスコに、牛血清アルブミン(BSA)を秤量し、リン酸食塩緩衝液(pH=7.1)で溶解し、1.2mg/mL及び12mg/mLのBSA水溶液を調製した。このBSA溶液10mLを、上記膨潤分離材を秤量したバイアル瓶に添加し、25℃にて24時間ミックスロータで攪拌した。この溶液の上澄み10mLを10倍に希釈し、吸光度(280nm)を測定し、DEAE変性分離材へのBSA吸着量(結合容量)を計算した。その結果を表2に示す。

[0088] NaCl 0.9gをこのバイアル瓶に添加し、25℃にて12時間ミックスロータで攪拌した。この溶液の上澄み5mLを10倍に希釈し、吸光度(280nm)を測定し、式(2)のように分離材によるBSA回収率を計算した。その結果を表2に示す。

タンパク質回収率 = (タンパク質脱着後吸光度 - タンパク質脱着前吸光度) / (タンパク質吸着後吸光度 - タンパク質吸着前吸光度) …式(2)

[0089] (イオン交換基の定量方法)

12時間以上水で膨潤させたDEAE変性分離材0.2~0.3gを定量し、ビーカに移し、0.1Nの水酸化ナトリウム溶液20mLを入れ、攪拌した。その後、吸引ろ過を行い、フィルタ上の粒子を、洗浄液が中性になるまで洗浄した。その後、ビーカに移し、0.1N塩酸水溶液20mLを添加し、室温で1時間攪拌した。その後、吸引ろ過を行い、フィルタ上の粒子を、洗浄液が中性になるまで洗浄した。この洗浄液を、0.1N水酸化ナトリウム水溶液で、自動電位差滴定装置を使用して、滴定を行い、イオン交換容量を測定した。その結果を表2に示す。

[0090] (カラム特性評価)

得られたDEAE変性分離材をφ7.8×300mmのステンレスカラム

に濃度 30 質量%のスラリー（溶媒：メタノール）として 15 分かけて充填した。その後、カラムに流速を変えながら水を流し、線流速とカラム圧の関係を測定し、0.3 MPa 時の線流速（通液速度）を測定した。その結果を表 1 に示す。

[0091]（実施例 2）

＜被覆層の形成及び架橋＞において、エチレングリコールジグリシジルエーテルに代えて、エピクロロヒドリンを使用した以外は実施例 1 と同様にして、合成及び評価を行った。

[0092]（実施例 3）

＜多孔質ポリマ粒子の合成＞において、イソアミルアルコール及びジエチルベンゼンの使用量を、それぞれ 16 g、8 g に変更した以外は実施例 2 と同様にして、合成及び評価を行った。

[0093]（比較例 1）

多孔質ポリマ粒子 1 をそのまま用いて、実施例 1 と同様の評価を行った。

[0094]（比較例 2）

＜被覆層の形成及び架橋＞において、変性アガロース水溶液の濃度を 20 mg/mL に変更した以外は実施例 1 と同様にして、合成及び評価を行った。

[0095]（比較例 3）

市販のアガロース粒子（C a p t o D E A E : G Eヘルスケア）を比較例 3 として使用し、実施例 1 と同様の評価を行った。

[0096]

[表1]

項目	平均粒径 (μm)	細孔径分布 におけるモ ード径(μm)	比表面積 (m^2/g)	線流速 (cm/h) 0.3MPa時	被覆量 (mg/m^2)	粒子表面 酸素元素 比率(%)	粒子内部 酸素元素 比率(%)
実施例1	95	0.3	28	1100	1.6	29	18
実施例2	95	0.3	28	1100	4.5	29	18
実施例3	95	0.1	73	1500	8.1	35	30
比較例1	95	0.3	28	1100	0	7	3
比較例2	95	0.3	28	1100	0.3	29	5
比較例3	98	0.15	—	750	—	35	35

[0097] [表2]

項目	イオン交換容量 (mmol/mL)	非特異吸着量 (mg/mL 粒子)	タンパク質結合容量 (mg/mL 粒子)	タンパク質回収率 (%)
実施例1	0.08	1以下	73	83
実施例2	0.21	1以下	83	90
実施例3	0.30	1以下	91	95
比較例1	0	180	0	0
比較例2	0.05	180	0	0
比較例3	0.26	1以下	61	80

[0098] 表1から明らかであるとおり、実施例1、2及び3並びに比較例1及び2の合成ポリマ粒子を用いた場合と、比較例3のアガロース粒子を用いた場合との線流速を比較すると、合成ポリマ粒子の方が大きく、通液性が良かった。しかし、水酸基を有する高分子による被覆を行わないと、比較例1のように、大量の非特異吸着が発生し、タンパク質が変性してしまった。比較例2は、水酸基を有する高分子による被覆量を減らしたものである。この場合も比較例1と同様に、大量の非特異吸着が発生し、タンパク質が変性してしま

った。実施例 1 は、水酸基を有する高分子による被覆量を本発明所定の範囲としたものである。これにより、非特異吸着とタンパク質変性を抑制することが可能となり、アガロース粒子を用いたものよりもタンパク質結合容量とタンパク質回収率が向上していた。さらに、実施例 2 は、実施例 1 とは架橋剤を変えたものである。実施例 2 では、実施例 1 と同様に非特異吸着とタンパク質変性が抑制され、さらにイオン交換容量が増加し、タンパク質結合容量が向上していた。そして、実施例 3 は、実施例 2 よりも粒子の単位比表面積当たりの被覆量を増加させたものである。実施例 3 では、実施例 2 と同様に非特異吸着とタンパク質変性を抑制し、さらにイオン交換容量が増加し、タンパク質結合容量とタンパク質回収率が大幅に向上していた。

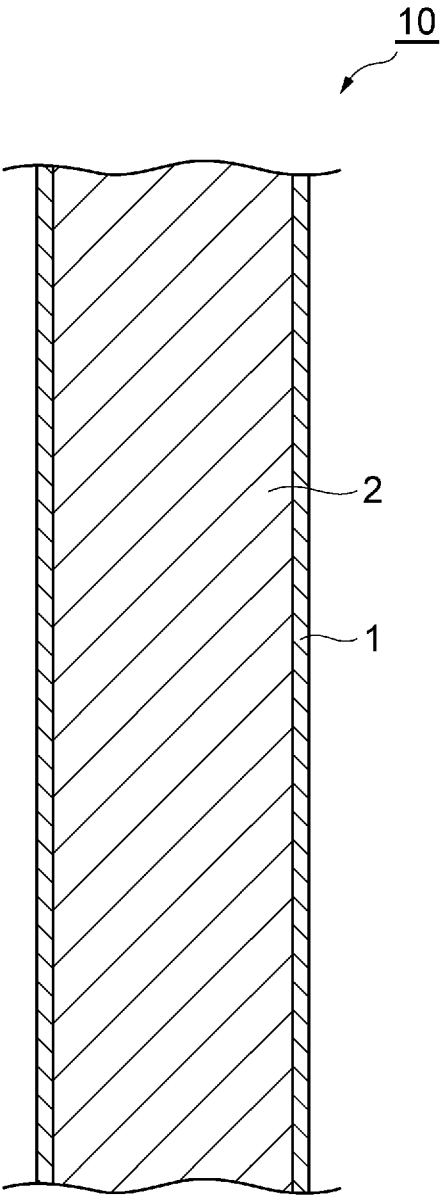
符号の説明

[0099] 1…カラム、2…分離材、10…分離用カラム。

請求の範囲

- [請求項1] モノマ単位として、スチレン及びジビニルベンゼンの少なくとも一方を、モノマ全量基準で90質量%以上含む、多孔質ポリマ粒子と、
 該多孔質ポリマ粒子の表面の少なくとも一部を被覆する、水酸基を有する高分子を含む被覆層と、を備え、
 前記被覆層による被覆量が、前記多孔質ポリマ粒子の単位比表面積当たり1～15 mg/m²である分離材。
- [請求項2] 前記分離材の表面における酸素元素比率が10～50%である、請求項1に記載の分離材。
- [請求項3] 前記水酸基を有する高分子が多糖類又はその変性体である、請求項1又は2に記載の分離材。
- [請求項4] 前記多糖類がアガロース、キトサン、アルギン酸及びデキストランから選ばれる少なくとも一種である、請求項3に記載の分離材。
- [請求項5] 前記水酸基を有する高分子が架橋されている、請求項1～4のいずれか一項に記載の分離材。
- [請求項6] 前記多孔質ポリマ粒子における比表面積が10 m²/g以上である、請求項1～5のいずれか一項に記載の分離材。
- [請求項7] 前記多孔質ポリマ粒子の細孔径分布におけるモード径が0.05～1 μmである、請求項1～6のいずれか一項に記載の分離材。
- [請求項8] カラムと、該カラムに充填された請求項1～7のいずれか一項に記載の分離材とを備える、分離用カラム。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/051460

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B01J20/24(2006.01)i, B01J20/28(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, C07K1/16(2006.01)n

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)

B01J20/00-20/34, G01N30/88, C07K1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	QU Jian-Bo, et al., An Effective Way To Hydrophilize Gigaporous Polystyrene Microspheres as Rapid Chromatographic Separation Media for Proteins, Langmuir, 2008, 24, p.13646-13652, ISSN 0743-7463, particularly, Abstract, Experimental Section, fig. 2, 5	1-8
A	QU Jian-Bo, et al., A novel stationary phase derivatized from hydrophilic gigaporous polystyrene-based microspheres for high-speed protein chromatography, Journal of Chromatography A, 2009, 1216, p.6511-6516, ISSN 0021-9673, particularly, Abstract, 2.Experimental, fig. 4	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
09 March 2016 (09.03.16)

Date of mailing of the international search report
22 March 2016 (22.03.16)

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

International application No.

PCT/JP2016/051460

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-95516 A (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 13 April 2006 (13.04.2006), claims 1 to 22; example 1 & WO 2006/025556 A1 claims 1 to 22; example 1	1-8
A	JP 63-236539 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 03 October 1988 (03.10.1988), claims; example 2 (Family: none)	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. B01J20/24(2006.01)i, B01J20/28(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, C07K1/16(2006.01)n

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))

Int.Cl. B01J20/00-20/34, G01N30/88, C07K1/16

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)

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
X	QU Jian-Bo, et al., An Effective Way To Hydrophilize Gigaporous Polystyrene Microspheres as Rapid Chromatographic Separation Media for Proteins, Langmuir, 2008, 24, p.13646-13652, ISSN 0743-7463, 特に Abstract, Experimental Section, 図 2, 5	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矛盾するものではなく、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

09.03.2016

国際調査報告の発送日

22.03.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松本 直子

4 D

5 3 7 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3421

C (続き) . 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
A	QU Jian-Bo, et al., A novel stationary phase derivatized from hydrophilic gigaporous polystyrene-based microspheres for high-speed protein chromatography, Journal of Chromatography A, 2009, 1216, p.6511-6516, ISSN 0021-9673, 特に Abstract, 2. Experimental, 図 4	1-8
A	JP 2006-95516 A (昭和電工株式会社) 2006.04.13, 請求項 1-22, 実施例 1 & WO 2006/025556 A1, 請求項 1-22, 実施例 1	1-8
A	JP 63-236539 A (住友ベークライト株式会社) 1988.10.03, 特許請求の範囲, 実施例 2 (ファミリーなし)	1-8