

(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
2020年2月20日(20.02.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/036151 A1

(51) 国際特許分類:

B01J 20/24 (2006.01) **B01J 20/32** (2006.01)
B01J 20/285 (2006.01) **C07K 1/16** (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/031740

(22) 国際出願日: 2019年8月9日(09.08.2019)

(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 2018-152608 2018年8月14日(14.08.2018) 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: 河内 史彦(KAWAUCHI Fumihiko); 〒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). 青嶋 真裕(AOSHIMA Masahiro); 〒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). 安江 健(YASUE Ken); 〒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).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, 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, 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:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: SEPARATING MATERIAL, METHOD OF MANUFACTURING SEPARATING MATERIAL, AND COLUMN

(54) 発明の名称: 分離材、分離材の製造方法及びカラム

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a separating material which has excellent liquid permeability when used as a column. This separating material comprises a hydrophilic polymer that includes hydrophobic polymer particles and a coating layer that coats at least a portion of the surface of the hydrophobic polymer particles. The coating layer comprises a hydroxyl group and a group represented by -O-R-L (O is an oxygen atom derived from a hydroxyl group, R is an alkylene group having 1 to 5 carbon atoms, and L is a carboxyl group or alkali metal salt of a carboxyl group).

(57) 要約: カラムとして用いたときの通液性に優れる分離材の提供を目的とし、疎水性高分子粒子と、該疎水性高分子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、被覆層が、水酸基と、-O-R-L (Oは水酸基に由来する酸素原子を示し、Rは、炭素数1~5のアルキレン基を示し、Lはカルボキシ基又はカルボキシ基のアルカリ金属塩を示す。)で表される基と、を有する親水性高分子を含む、分離材を提供する。



WO 2020/036151 A1

明 細 書

発明の名称： 分離材、分離材の製造方法及びカラム

技術分野

[0001] 本発明は、分離材、分離材の製造方法及びカラムに関する。

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イオン交換体等が用いられている。多孔質型の合成高分子を母体とするイオン交換体の場合、塩濃度による体積変化が小さいため、カラムに充填してクロマトグラフィーで用いると、通液時の耐圧性に優れる傾向がある。しかし、このイオン交換体は、タンパク質等の分離に用いると、疎水的相互作用に基づく不可逆吸着等の非特異吸着が起こるため、ピークの非対称化が発生する、又は、該疎水的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という問題点がある。

[0003] 一方、デキストラン、アガロース等の多糖に代表される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、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った欠点がある。

[0004] 親水性天然高分子の架橋ゲルの欠点を克服するため、多孔性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（例えば、特許文献1参照）。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。また、硬質な合成高分子物質でゲルを包囲するため、カラムベッドの形態で使用しても、容積変化がなく、カラムを通過するフロースルーの圧力が変化しないと

いう利点を有する。

[0005] 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の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（例えば、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、イオン交換容量が向上し、リーク挙動が改善される。

[0006] また、有機合成ポリマ基体の細孔内に巨大網目構造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（例えば、特許文献3及び4参照）。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：米国特許第4 9 6 5 2 8 9号明細書
特許文献2：米国特許第3 9 6 6 4 8 9号明細書
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号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 従来の分離材には、カラムとして用いたときの通液性等のカラム特性において改善の余地がある。

[0009] そこで、本発明は、カラムとして用いたときの通液性に優れる分離材、該分離材を備えるカラム、及び該分離材の製造方法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

[0010] 本発明は、下記〔1〕～〔8〕に記載の分離材、分離材の製造方法及びカラムを提供する。

〔1〕疎水性高分子粒子と、該疎水性高分子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、被覆層が、水酸基と、 $-O-R-L$ （ O は水酸基に由来する酸素原子を示し、 R は、炭素数1～5のアルキレン基を示し、 L はカルボキシ基又はカルボキシ基のアルカリ金属塩を示す。）で表される基と、を有する親水性高分子を含む、分離材。

〔2〕 $-O-R-L$ で表される基の含有量が、分離材1 mL当たり100 μ mol以上である、〔1〕に記載の分離材。

〔3〕疎水性高分子粒子が、スチレン系モノマに由来する構造単位を有するポリマを含む粒子である、〔1〕又は〔2〕に記載の分離材。

〔4〕親水性高分子が、多糖類及びその変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種に由来する親水性高分子を含む、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の分離材。

〔5〕親水性高分子が、アガロース、デキストラン、セルロース、プルラン、キトサン及びこれらの変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種に由来する親水性高分子を含む、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の分離材。

〔6〕親水性高分子が、架橋されている、〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の分離材。

〔7〕〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の分離材を備える、カラム。

〔8〕〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の分離材の製造方法であって、疎水性高分子粒子の表面の少なくとも一部に、水酸基を有する親水性高分子を被覆する工程と、被覆された親水性高分子が有する水酸基の水素原子の一部を $-R-L$ （ R は、炭素数1～5のアルキレン基を示し、 L はカルボキシ基又はカルボキシ基のアルカリ金属塩を示す。）で表される基に置換する工程と、を備える、分離材の製造方法。

〔9〕水酸基を有する親水性高分子が、多糖類及びその変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、〔8〕に記載の分離材の製造方法。

〔10〕水酸基を有する親水性高分子が、アガロース、デキストラン、セルロース、プルラン、キトサン及びこれらの変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、〔8〕又は〔9〕に記載の分離材の製造方法。

発明の効果

- [0011] 本発明によれば、カラムとして用いたときの通液性に優れる分離材、当該分離材を備えるカラム及び当該分離材の製造方法を提供することができる。
- また、本発明は、タンパク質の非特異吸着を低減しつつ、タンパク質の動的吸着性及び回収率等のカラム特性に優れる分離材を提供することもできる。

発明を実施するための形態

- [0012] 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明するが、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。

[0013] <分離材>

本実施形態に係る分離材は、疎水性高分子粒子と、該疎水性高分子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、被覆層が親水性高分子を含み、親水性高分子が、水酸基と、 $-O-R-L$ （ O は水酸基に由来する酸素原子を示し、 R は、炭素数1～5のアルキレン基を示し、 L はカルボキシ基又はカルボキシ基のアルカリ金属塩を示す。）で表される基と、を有する。本実施形態の分離材によれば、カラムに充填したときに優れた通液性を有する。また、本実施形態の分離材は、耐久性及び耐アルカリ性に優れるとともに、タンパク質の非特異吸着を低減させることができ、カラムに充填したときのタンパク質の動的吸着量及び回収率も実用上十分に高いと考えられる。本実施形態の分離材は、強度にも優れると共に、真球に近い形状とすることもできる。真球状の分離材は、クロマトグラフィーで使用した場合、流体力学的に有利であると考えられる。したがって、このような分離材は、例えば、圧力損失を抑制し易く、クロマトグラフィーの操作がし易いと考えられる。なお、本明細中、「疎水性高分子粒子の表面」とは、疎水性高分子粒子の外側の表面のみでなく、疎水性高分子粒子の内部における細孔の表面を含むものとする。

[0014] [疎水性高分子粒子]

本実施形態に係る疎水性高分子粒子は、疎水性を有する高分子を含む粒子である。疎水性高分子粒子の製造方法に特に制限はないが、例えば、疎水性

を有する高分子を形成可能なモノマを重合させる方法が挙げられる。モノマとしては、疎水性を有する高分子を形成可能なものであれば、特に限定されないが、例えば、スチレン系モノマが挙げられる。すなわち、上記疎水性高分子粒子は、例えば、スチレン系モノマに由来する構造単位を有するポリマを含んでいてもよい。このような疎水性高分子粒子は、耐久性及び耐アルカリ性に優れると考えられる。

[0015] 本実施形態に係る疎水性高分子粒子は、多孔構造を有していてもよい。すなわち、本実施形態に係る疎水性高分子粒子は、例えば、疎水性の多孔質高分子粒子であってもよい。多孔質高分子粒子は、例えば、多孔質化剤の存在下でモノマを重合させて得られるポリマを含む粒子であり、従来の懸濁重合、乳化重合等により合成することができる。具体的なモノマとしては、以下のような多官能性モノマ、単官能性モノマ等が挙げられる。

[0016] 多官能性モノマとしては、例えば、ジビニルベンゼン、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種を単独で又は2種以上を組み合わせ用いることができる。上記の中でも、耐久性、耐酸性及び耐アルカリ性の観点より、モノマがジビニルベンゼンを含有することが好ましい。すなわち、疎水性高分子粒子は、ジビニルベンゼンに由来する構造単位を有するポリマを含むことが好ましい。

[0017] 単官能性モノマとしては、例えば、スチレン、*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及びその誘導体が挙げられる。これらの単官能性モノマは、1種を単独で又は2種以上を組み合わせ用いることができる。上記の中でも、耐

酸性及び耐アルカリ性に優れるという観点から、モノマがスチレンを含有することが好ましい。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。

[0018] 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、アルコール類等を用いることができる。多孔質化剤として、例えば、ジエチルベンゼン、トルエン、キシレン、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及びシクロヘキサノールが挙げられる。これらの多孔質化剤は、1種を単独で又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

[0019] 上記多孔質化剤は、モノマ全質量に対して0～200質量%使用することができる。多孔質化剤の量によって、疎水性高分子粒子の空隙率をコントロールすることができる。さらに、多孔質化剤の種類によって、疎水性高分子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。

[0020] 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、モノマの液滴が水を吸収することによって、粒子を多孔質化することが可能となる。

[0021] 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C 16～C 22アルコール又は鎖状飽和C 12～C 14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。

[0022] 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、純度が好ましくは約40%を超える、より好ましくは約50%を超える、更に好ましくは約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、純度が好ましくは約40%を超える、より好ましくは約50%を超える、更に好ましくは約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、純度が好ましくは約40%を超える、より好ましくは約50%を超える、更に好ましくは約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、純度が好ましくは約40%を超える、より好ましくは約50%を超える、更に好ましくは約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（純度が好ましくは約40%を超える、より好ましくは約50%を超える、更に好ましくは約70%を超えるジグリセロールモノミリステート）、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、又は、これらの混合物が好ましい。

[0023] 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使用量が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難くなる。また、油溶性界面活性剤の使用量が80質量%以下であると、重合後に疎水性高分子粒子の形状をより保持し易くなる。

[0024] 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。

- [0025] 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（例えばアルケルニルコハク酸ジカリウム塩）、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及びポリオキシエチレンアルキル硫酸エステル塩が挙げられる。
- [0026] 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。
- [0027] 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、シリコンの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。
- [0028] 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。
- [0029] 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。

- [0030] 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。
- [0031] 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。
- [0032] 疎水性高分子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。
- [0033] 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が挙げられ、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も併用することができる。これらのうち、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。
- [0034] 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。
- [0035] 疎水性高分子粒子の平均粒径は、好ましくは500 μ m以下、より好ましくは150 μ m以下、更に好ましくは110 μ m以下である。また、疎水性高分子粒子の平均粒径は、通液性の向上の観点から、好ましくは10 μ m以上、より好ましくは30 μ m以上、更に好ましくは50 μ m以上である。

[0036] 疎水性高分子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%であることが更に好ましい。 $C.V.$ を低減する方法としては、例えば、マイクロプロセスサーバー（株式会社日立製作所製）等の乳化装置により単分散化する方法が挙げられる。

[0037] 疎水性高分子粒子又は分離材の平均粒径及び粒径の変動係数は、以下の測定法により求めることができる。

1) 疎水性高分子粒子又は分離材を、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%の疎水性高分子粒子又は分離材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、上記分散液中の疎水性高分子粒子又は分離材約1万個の画像により平均粒径及び粒径の変動係数を測定する。

[0038] 疎水性高分子粒子の細孔容積（空隙率）は、疎水性高分子粒子の全体積基準で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。疎水性高分子粒子は、細孔径（モード径）が $0.05\mu\text{m}$ 以上 $0.6\mu\text{m}$ 未満である細孔、すなわちマクロポアー（マクロ孔）を有することが好ましい。疎水性高分子粒子の細孔径として、より好ましくは、 $0.2\mu\text{m}$ 以上 $0.5\mu\text{m}$ 未満である。細孔径が $0.05\mu\text{m}$ 以上であると、細孔内に物質が入り易くなる傾向があり、細孔径が $0.6\mu\text{m}$ 未満であると、比表面積が充分なものになる傾向がある。細孔容積及び細孔径は上述の多孔質化剤により調整可能である。

[0039] 疎水性高分子粒子の比表面積は、 $20\text{m}^2/\text{g}$ 以上であることが好ましい。より高い実用性の観点から、比表面積は $35\text{m}^2/\text{g}$ 以上であることがより好ましく、 $40\text{m}^2/\text{g}$ 以上であることが更に好ましい。比表面積が $20\text{m}^2/\text{g}$ 以上であると、分離する物質の吸着量が大きくなる傾向がある。

[0040] 疎水性高分子粒子及び分離材の、細孔径分布におけるモード径（又は平均細孔径）、比表面積、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る。これらは以下のようにして測定することができる。約0.05gの試料を、標準5mL粉体用セル(ステム容積0.4mL)に採り、初期圧21kPa(約3psia、細孔直径約60 μ m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130degrees、水銀表面張力485dynes/cmに設定する。細孔径0.05~5 μ mの範囲に限定してそれぞれの値を算出する。

[0041] [被覆層]

本実施形態に係る被覆層は、水酸基と、 $-O-R-L$ (Oは水酸基に由来する酸素原子を示し、Rは、炭素数1~5のアルキレン基を示し、Lはカルボキシ基又はカルボキシ基のアルカリ金属塩を示す。)で表される基と、を有する親水性高分子を含む。本実施形態に係る分離材は、被覆層に水酸基と $-O-R-L$ で表される基とを有する親水性高分子を含むことにより、カラムとして用いたときの通液性に優れる。また、本実施形態に係る分離材は、上述のような被覆層を備えることにより、タンパク質の非特異吸着を低減しつつ、タンパク質の動的吸着性及び回収率等の特性に優れる傾向がある。

[0042] Rを構成するアルキレン基は、直鎖状であってもよく、分岐状であってもよいが、通液性により優れる観点から、直鎖状であることが好ましい。また、Rは、通液性により優れる観点から、炭素数1~4のアルキレン基であることが好ましく、炭素数1~3のアルキレン基であることがより好ましい。Lは、通液性により優れる観点から、カルボキシ基、カルボキシ基のナトリウム塩及びカルボキシ基のカリウム塩からなる群より選ばれる少なくとも1種を含むことが好ましく、カルボキシ基及びカルボキシ基のナトリウム塩からなる群より選ばれる少なくとも1種を含むことがより好ましい。

[0043] 水酸基と $-O-R-L$ で表される基とを有する親水性高分子は、多糖類及びその変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種に由来する親水性高分子を含んでもよい。当該親水性高分子は、アガロース、デキストラン、セルロース、プルラン、キトサン及びこれらの変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種に由来する親水性高分子であってもよい。当該親水性高分子は

、架橋されていてもよい。

[0044] 水酸基を有する親水性高分子で、疎水性高分子粒子を被覆することにより、タンパク質の非特異吸着を抑制し易くなる傾向がある。また、水酸基を有する親水性高分子は、架橋されていることが好ましい。すなわち、被覆層は、水酸基を有する親水性高分子の架橋体を含むことが好ましい。水酸基を有する親水性高分子が架橋されていることにより、カラム圧の上昇を抑制できる傾向がある。

[0045] (水酸基を有する親水性高分子)

水酸基を有する親水性高分子は、1分子中に2個以上の水酸基を有することが好ましい。水酸基を有する親水性高分子としては、例えば、多糖類又はその変性体、及び、ポリビニルアルコール又はその変性体が挙げられる。水酸基を有する親水性高分子は、多糖類又はその変性体であることが好ましい。水酸基を有する親水性高分子は、多糖類及びその変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含んでもよい。多糖類としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロース、プルラン及びキトサンが挙げられる。水酸基を有する親水性高分子として、例えば、平均分子量1万～20万程度の高分子を使用することができる。水酸基を有する親水性高分子は、アガロース、デキストラン、セルロース、プルラン、キトサン、及びこれらの変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含んでもよい。

[0046] 水酸基を有する親水性高分子は、界面吸着能を向上させる観点から、疎水性基を導入した変性体であることが好ましい。疎水性基としては、例えば、炭素数1～6のアルキル基及び炭素数6～10のアリール基が挙げられる。炭素数1～6のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基及びプロピル基が挙げられる。炭素数6～10のアリール基としては、例えば、フェニル基及びナフチル基が挙げられる。疎水性基は、水酸基と反応する官能基（例えば、エポキシ基）及び疎水性基を有する化合物（例えば、グリシジルフェニルエーテル）を、水酸基を有する親水性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。

[0047] 疎水性基を導入した親水性高分子の変性体における疎水性基の含有量は、粒子表面に吸着するための疎水的相互作用力の保持と、タンパク質の非特異吸着の抑制とのバランスから、5～30質量%であることが好ましく、10～20質量%であることがより好ましく、12～17質量%であることが更に好ましい。

[0048] <分離材の製造方法>

本実施形態の分離材は、疎水性高分子粒子の表面の少なくとも一部に水酸基を有する親水性高分子を被覆する工程（1）と、被覆された親水性高分子が有する水酸基の水素原子の一部を、 $-R-L$ （Rは、炭素数1～5のアルキレン基を示し、Lはカルボキシ基又はカルボキシ基のアルカリ金属塩を示す。）で表される基に置換する工程（2）と、を備える方法により、製造することができる。被覆された親水性高分子は、工程（2）の前に、架橋されてもよい。本実施形態の分離材の製造方法は、例えば、疎水性高分子粒子の表面に水酸基を有する親水性高分子を吸着する工程と、吸着された親水性高分子を架橋する工程と、架橋された親水性高分子に水酸基を介して $-R-L$ で表される基を導入する工程とを含んでいてよい。

[0049] [被覆層の形成方法]

本実施形態に係る被覆層は、例えば、以下に示す方法により形成することができる。

[0050] （水酸基を有する親水性高分子の吸着）

まず、水酸基を有する親水性高分子の溶液を疎水性高分子粒子表面に吸着させる。水酸基を有する親水性高分子の溶液の溶媒としては、水酸基を有する親水性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。溶媒に溶解させる親水性高分子の濃度は、5～20（mg/mL）が好ましい。

[0051] この溶液を、疎水性高分子粒子に含浸させる。含浸方法は、水酸基を有する親水性高分子の溶液に疎水性高分子粒子を加えて一定時間放置する。含浸時間は、疎水性高分子粒子の表面状態によっても変わるが、通常一昼夜含浸

すれば親水性高分子濃度が疎水性高分子粒子の内部と外部とで平衡状態となる。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親水性高分子を除去する。

[0052] (架橋処理)

次いで、架橋剤を加えて疎水性高分子粒子表面に吸着された水酸基を有する親水性高分子を架橋反応させて、架橋体を形成する。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。

[0053] 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、水酸基を有する親水性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化合物も架橋剤として使用できる。

[0054] 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用いることができ、例えば、架橋剤がエピクロロ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、架橋剤が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。

[0055] 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、水酸基を有する親水性高分子として多糖類を使用した場合、多糖類を形成する単糖類の1単位を1モルとすると、それに対して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、被覆層が疎水性高分子粒子から剥離し易くなる傾向がある。また、架橋剤の添加量が過剰で、かつ、水酸基を有する親水性高分子との反応率が高い場合、原料の水酸基を有する親水性高分子の特性が損なわれる傾向がある。

[0056] 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

する親水性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0.01～10モル倍の範囲、好ましくは0.1～5モル倍の範囲で使用される。

[0057] 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。

[0058] 水酸基を有する親水性高分子の溶液等を含浸させた疎水性高分子粒子を分散、懸濁させる媒体は、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。媒体の具体例としては水、アルコール等が挙げられる。

[0059] 架橋反応は、通常、5～90℃の範囲の温度で、1～24時間かけて行う。好ましくは、30～90℃の範囲の温度である。

[0060] 架橋の進行度を調整する際は、該架橋反応を段階的に行ってもよい。例えば、一度架橋反応させた粒子を再度架橋反応させることでも架橋の進行度を調整できる。架橋の進行度は、熱分解の5%重量減少時の温度で評価する。架橋の進行度が高い場合、重量減少開始温度は高くなり、架橋の進行度が低い場合、重量減少開始温度も低くなる。

[0061] 5%熱重量減少量時の温度は、水酸基を有する親水性高分子の特性を保つ観点から、200～350℃であることが好ましく、220～330℃であることがより好ましく、230～320℃であることが更に好ましい。架橋度が低過ぎると水酸基を有する親水性高分子が粒子から脱落し易くなる傾向があり、架橋度が高過ぎると水酸基を有する親水性高分子の粒子からの脱落は防げるが、親水性高分子の膨潤又は官能基量の低下により動的吸着量が低下する傾向がある。

[0062] 架橋反応終了後、生成した粒子をろ別し、次いで、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、疎水性高分子粒子の表面の少なくとも一部が、水酸基を有する親水性高分子を含む被覆層により被覆された粒子（以下、場合により「被覆粒子」という。）が得られる。

[0063] (−O−R−Lで表される基の導入)

上記被覆粒子には、親水性高分子が有する水酸基を介してカルボキシ基を導入することができる。すなわち、本実施形態に係る被覆層には、親水性高分子の水酸基に由来する酸素原子に、カルボキシ基を有するアルキレン基が直接結合した、−O−R−Lで表される基が導入されている。

[0064] −O−R−Lで表される基を導入する手法としては、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。ハロゲン化アルキル化合物としては、例えば、モノハロゲノ酢酸、モノハロゲノプロピオン酸、モノハロゲノブタン酸、モノハロゲノペンタン酸、モノハロゲノヘキサン酸及びこれらのアルカリ金属塩が挙げられる。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。親水性高分子が有する水酸基にアルカリ条件下で、ハロゲン化アルキル化合物を反応させることにより、水酸基の水素原子を、−R−Lで表される基に置換することができる。

[0065] ここで、親水性高分子が有する水酸基に、エピクロルヒドリン等のエピハロヒドリン又はエチレングリコールジグリシジルエーテル等のジグリシジル化合物を反応させてエポキシ基を導入した後に、エポキシ基に、チオグリコール酸等のカルボン酸チオールを反応させて、カルボキシ基を導入することもできる。しかし、エポキシ基の導入は、被覆層の親水性高分子に対する架橋反応の進行も並行して生じるため、糖鎖等の親水性高分子の膨潤性が損なわれタンパク質の動的吸着量が減少する傾向にある。

[0066] これに対して、本実施形態に係る−O−R−Lで表される基の導入方法は、エポキシ基を導入する工程を経ないため、上記のような架橋反応の進行を回避することができ、タンパク質の動的吸着量を向上させることができる。親水性高分子が有する水酸基を介して、カルボキシ基を導入することにより、通液性に優れる分離材を作製することができる。

[0067] 分離材における−O−R−Lで表される基の含有量（導入されるカルボキシ基の量）は、分離材1 mL当たり100 μmol以上であることが好ましく、110 μmol以上であることがより好ましく、120 μmol以上で

あることが更に好ましく、 $125\mu\text{m}$ 以上であることが特に好ましい。カルボキシ基の量は、分離材 1mL 当たり $100\mu\text{m}$ 以上であることにより、分離材の通液性をより向上させることができると共に、分離材が有する静電力が強くなるため、タンパク質の動的吸着量を増加することができる。また、分離材における $-\text{O}-\text{R}-\text{L}$ で表される基の含有量（導入されるカルボキシ基の量）が多すぎる場合、分離材内にタンパク質が拡散し難くなる観点から、当該カルボキシ基の量は、分離材 1mL 当たり $1000\mu\text{m}$ 以下であることが好ましく、 $950\mu\text{m}$ 以下であることがより好ましい。

[0068] 本実施形態の分離材は、疎水性高分子粒子 1g 当たり $30\sim500\text{mg}$ の被覆層を備えると好ましい。被覆層の量は熱分解の重量減少等で測定することができる。

[0069] 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、カラムの圧力が 0.3MPa となるように水を通液させたときに、水の通液速度が 1300cm/h 以上であることが好ましく、 1500cm/h 以上であることがより好ましく、 2000cm/h 以上であることが更に好ましい。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 400cm/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 1300cm/h 以上で使用するすることができる。

[0070] 分離材の平均粒径は、通液性向上の観点から $10\sim500\mu\text{m}$ であることが好ましく、 $30\sim300\mu\text{m}$ であることがより好ましく、 $50\sim150\mu\text{m}$ であることが更に好ましく、 $50\sim110\mu\text{m}$ であることが特に好ましい。分離材の粒径の変動係数（C.V.）は、通液性向上の観点から、 $3\sim15\%$ であることが好ましく、 $5\sim15\%$ であることがより好ましく、 $5\sim10\%$ であることが更に好ましい。

- [0071] 分離材の細孔容積は、分離材の全体積基準で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く、50体積%以上70体積%以下であることが更に好ましい。分離材は、細孔径が0.05 μm 以上0.6 μm 未満である細孔、すなわちマクロポアー（マクロ孔）を有することが好ましい。分離材の細孔径として、より好ましくは、0.1 μm 以上0.5 μm 未満である。細孔径が0.05 μm 以上であると、細孔内に物質が入り易くなる傾向があり、細孔径が0.6 μm 未満であると、比表面積が充分なものになる傾向がある。
- [0072] 分離材の比表面積は、20 m^2/g 以上であることが好ましい。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 以上であることが更に好ましい。比表面積が20 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がある。
- [0073] 分離材の平均細孔径、比表面積等は、疎水性高分子粒子の原料、多孔質化剤、水酸基を有する親水性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。
- [0074] 分離材の水中での5%圧縮変形弾性率（湿潤状態での5%圧縮変形弾性率）は、例えば、70 MPa以上、100 MPa以上、150 MPa以上又は200 MPa以上であってもよい。5%圧縮変形弾性率の上限値は、特に限定されない。
- [0075] 分離材の水中での5%圧縮変形弾性率（5%K値）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（Fisher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 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ）により、予め水中に浸漬させた分離材を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、分離材が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 : 分離材が5 %圧縮変形したときの荷重 (m N)

S : 分離材が5 %圧縮変形したときの圧縮変位 (m m)

R : 分離材の半径 (m m)

[0076] 本実施形態の分離材には、上記－O－R－Lで表される基におけるカルボキシ基を介して、例えば、リガンド（例えば、プロテインA）又はイオン交換基を導入することができる。また、本実施形態の分離材には、－O－R－Lで表される基とは別に、例えばリガンド（例えば、プロテインA）又はイオン交換基を導入することもできる。

[0077] 本実施形態の分離材は、イオン交換精製、アフィニティ精製、タンパク質等の生体高分子の静電的相互作用による分離等に好適に使用することができる。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該分離材に吸着させた後、該分離材を溶液から別し、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して回収することができる。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。

[0078] 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が挙げられる。生体高分子の分子量は、好ましくは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、分離条件等を選ぶことができる。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。

[0079] 本実施形態の分離材は、被覆層にイオン交換基となるカルボキシ基又はカルボキシ基のアルカリ金属塩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高分子からなる粒子

のそれぞれの利点を有する。本実施形態の分離材は、上述のような被覆層を備えることにより、通液性に優れるとともに、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易い傾向がある。また、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）が大きい傾向がある。

[0080] <カラム>

本実施形態のカラムは、上述の分離材を備える。該カラムは、カラム内に上述の分離材を充填させることで製造することができる。カラム内に分離材を充填させる方法は、特に制限されるものではなく、例えば、公知の方法を採用することができる。

実施例

[0081] 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。

[0082] （疎水性高分子粒子）

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」）16 g、ヘキサノール16 g、ジエチルベンゼン16 g及び過酸化ベンゾイル0.64 gを、0.5質量%のポリビニルアルコール水溶液に加え、マイクロプロセスサーバー（株式会社日立製作所製）を使用して乳化させた後、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時間攪拌をした。得られた粒子をろ過により取り出した後、アセトンで洗浄を行い、疎水性高分子粒子を得た。

[0083] 疎水性高分子粒子の粒径をフロー型粒径測定装置で測定し、平均粒径及び粒径の変動係数（C.V.）を算出した。疎水性高分子粒子の平均粒径は102 μmであり、粒径のC.V.は8%であった。

[0084] （変性アガロース）

2質量%のアガロース水溶液480 mLに、水酸化ナトリウム0.98 g及びグリシジルフェニルエーテル4.90 gを投入して60℃で6時間反応

させ、アガロースに疎水性基として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。変性アガロースの疎水性基含有量を下記方法により算出したところ、14.2%であった。

[0085] 乾燥状態の粉末アガロース（変性されていないアガロース）と、揮発分0.1質量%未満まで乾燥させた疎水性基導入アガロース（変性アガロース）とを、それぞれ70℃の純水に溶解させ、0.05質量%の水溶液サンプルを調製した。分光光度計により各水溶液の269nmの吸光度を測定して濃度を求めることで、下記式より疎水性基含有量を算出した。下記において、アガロース構成単位とは、アガロースの二糖単位のことを意味し、変性アガロース構成単位とは、アガロースの二糖単位中の水酸基のうち少なくとも1つにフェニル基が導入されたものを意味する。

$$\cdot \text{疎水性基含有量 (\%)} = (C_{AG} / (C_{HAG} + C_{AG})) \times 100$$

$$\cdot C_{AG} : \text{変性アガロース構成単位の濃度 (mmol/L)} = A / \varepsilon_{GPE} \times 1000$$

$$\cdot C_{HAG} : \text{変性されていないアガロース構成単位の濃度 (mmol/L)} = (\text{変性されていないアガロース構成単位の濃度 (g/L)} / \text{アガロース構成単位 (306 g/mol)}) \times 1000$$

$$\cdot A : \text{変性アガロースの真の吸光度} = \text{変性アガロースの吸光度} - \text{変性されていないアガロースの吸収}$$

$$\cdot \varepsilon_{GPE} : \text{グリシジルフェニルエーテルの吸光係数} = 1372 \text{ (L / (mol} \cdot \text{cm))}$$

$$\cdot \text{変性されていないアガロース構成単位の濃度 (g/L)} = \text{変性アガロースのサンプル濃度 (質量\%)} \times 10 - \text{変性アガロース構成単位の濃度 (g/L)}$$

$$\cdot \text{変性されていないアガロースの吸収} = \text{変性されていないアガロースの吸光度} \times (\text{変性アガロースのサンプル濃度 (mmol/L)} / \text{変性されていないアガロースのサンプル濃度 (mmol/L)})$$

アガロースのサンプル濃度 (mmol/L))

・変性アガロース構成単位の濃度 (g/L) = (C_{AG} × 変性アガロース構成単位 (456 g/mol)) / 1000

[0086] [実施例1]

<被覆層の形成>

20 mg/mL の変性アガロース水溶液に、疎水性高分子粒子を 70 mL / 粒子 g の濃度で投入し、55℃で24時間攪拌して、疎水性高分子粒子に変性アガロースを吸着させた後、ろ過を行い、熱水で洗浄した。

[0087] (架橋処理)

疎水性高分子粒子に吸着した変性アガロースは次のようにして架橋した。変性アガロースが吸着した粒子 10 g を 0.4 M 水酸化ナトリウム水溶液に分散させ、0.02 M のエピクロロヒドリンを添加し、24時間室温にて攪拌した。その後、2質量%の熱ドデシル硫酸ナトリウム水溶液で洗浄後、純水で洗浄して、変性アガロースの架橋体を被覆層として有する被覆粒子を得た。被覆層の量は、熱分解の重量減少で測定し、疎水性高分子粒子 1 g 当たりの被覆量 (mg/g) を算出した。結果を表 1 に示す。

[0088] (タンパク質の非特異吸着量)

得られた被覆粒子 0.2 g を BSA (Bovine Serum Albumin) 濃度 24 mg/mL の Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 20 mL に投入し、24時間室温で攪拌を行った。その後、遠心分離で上澄み液をとった。当該上澄み液の BSA 濃度により、粒子に吸着した BSA 量を算出した。BSA 濃度は、分光光度計で上澄み液の 280 nm の吸光度から確認した。分離材 1 mL あたりの BSA 吸着量が、1 mg 未満である場合を「A」、1~10 mg である場合を「B」、10 mg を超える場合を「C」として、非特異吸着を評価した。結果を表 1 に示す。なお、比較例 1 では、非特異吸着を評価することはできなかった。

[0089] (カルボキシ基の導入)

得られた被覆粒子 10 g を 10 M の NaOH 水溶液 80 g 中に分散させた

分散液に、40 gのモノクロロ酢酸を添加し、70℃で3時間反応させた。反応後、水洗し、過剰なモノクロロ酢酸を除去して、変性アガロースの水酸基由来の酸素原子に $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 又は $-\text{CH}_2\text{COONa}$ が結合した基を有する分離材を得た。

[0090] (カルボキシ基量の測定)

得られた分離材のカルボキシ基量を以下のように測定した。湿潤状態の分離材1.0 mLに、0.1 mol/LのHCl水溶液20 gを加え、室温で30分攪拌した。攪拌後、吸引ろ過により分離材を純水で洗浄し、洗浄液のpHが5を超えるまで洗浄を続けた。その後、0.5 MのNaCl溶液20 g中に分離材を分散し、30分攪拌した。この粒子分散液に0.01 MのNaOH水溶液を滴下した。カルボキシ基量は以下の式から算出した。結果を表1に示す。

カルボキシ基導用量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $0.01 (\text{mol/L}) \times \text{滴下した } 0.01 \text{ MのNaOH水溶液量 (mL)} / \text{測定に使用した分離材の体積 (mL)} \times 1000$

[0091] (分離材の平均粒径等の測定)

分離材の粒径をフロー型粒径測定装置で測定し、平均粒径及び粒径の変動係数(C.V.)を算出した。また、分離材のモード細孔径、比表面積、空隙率は、水銀圧入測定装置にて測定した。結果を表1に示す。

[0092] (5%圧縮変形弾性率)

分離材の水中での5%圧縮変形弾性率は、上述の方法で測定した。結果を表2に示す。

[0093] (通液性)

得られた分離材をメタノールに分散して、濃度30質量%のスラリーを調製した。このスラリーを $\phi 7.8 \times 300 \text{ mm}$ のステンレスカラムに15分かけて充填し、充填カラムを得た。その後、カラムに流速を変えながら水を流し、流速とカラム圧との関係を測定し、カラム圧0.3 MPaの通液速度(線流速)を測定した。結果を表2に示す。

[0094] (動的吸着量及び回収率の測定)

緩衝液を充填カラムに10カラム容量分流した。その後、濃度2mg/mLでタンパク質を含む緩衝液を充填カラムにレジデンスタイム2分で流し、UV測定によりカラム出口でのタンパク質濃度を測定した。カラム入口と出口でのタンパク質濃度が一致するまで液を流し、その後、緩衝液に1M NaCl溶液を加えた溶液を脱離溶液として10カラム容量分通液し、吸着したタンパク質を回収した。10% breakthroughにおける動的吸着量(10% Dynamic Binding Capacity: 以下、10%DBC)を、以下の式を用いて算出した。また、回収液中のタンパク質量を算出し、動的吸着量に対するタンパク質の回収率R(%)を以下の式から算出した。緩衝液は、20mmol/Lの酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)を使用した。タンパク質は、IgG(免疫グロブリンG)を使用した。結果を表2に示す。

$$q_{10} = c_f F (t_{10} - t_0) / V_B$$

$$r_{10} = c_r \times V_r / V_B$$

$$R = r_{10} / q_{10} \times 100$$

q_{10} : 10% breakthroughにおける動的吸着量 (mg/mL wet resin)

c_f : 注入しているIgG濃度

F : 流速 (mL/min)

V_B : ベッド体積 (mL)

t_{10} : 10% breakthroughにおける時間 (min)

t_0 : IgG注入開始時間 (min)

r_{10} : タンパク質の回収量 (mg/mL wet resin)

c_r : 回収した脱離液中のIgG濃度 (mg/mL)

V_r : 回収した脱離液の体積 (mL)

R : 回収率 (%)

[0095] [実施例2]

モノクロロ酢酸 40 g をモノクロロ酢酸 20 g に変更した以外は実施例 1 と同様に行い、変性アガロースの水酸基由来の酸素原子上に $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 又は $-\text{CH}_2\text{COONa}$ が結合した基を有する分離材を作製し、実施例 1 と同様に評価を行った。

[0096] [実施例 3]

モノクロロ酢酸 40 g を 3-クロロプロピオン酸 40 g に変更し、3-クロロプロピオン酸添加後さらに DMF (N, N-ジメチルホルムアミド) を 40 g 添加した以外は実施例 1 と同様に行い、変性アガロースの水酸基由来の酸素原子に $-(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ 又は $-(\text{CH}_2)_2\text{COONa}$ が結合した基を有する分離材を作製し、実施例 1 と同様に評価を行った。

[0097] [実施例 4]

モノクロロ酢酸 40 g を 4-クロロブタン酸 40 g に変更し、4-クロロブタン酸添加後さらに DMF を 40 g 添加した以外は実施例 1 と同様に行い、変性アガロースの水酸基由来の酸素原子に $-(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ 又は $-(\text{CH}_2)_3\text{COONa}$ が結合した基を有する分離材を作製し、実施例 1 と同様に評価を行った。

[0098] [実施例 5]

モノクロロ酢酸 40 g を 5-クロロペンタン酸 40 g に変更し、5-クロロペンタン酸添加後さらに DMF を 40 g 添加した以外は実施例 1 と同様に行い、変性アガロースの水酸基由来の酸素原子に $-(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ 又は $-(\text{CH}_2)_4\text{COONa}$ が結合した基を有する分離材を作製し、実施例 1 と同様に評価を行った。

[0099] [実施例 6]

モノクロロ酢酸 40 g を 6-クロロヘキサン酸 40 g に変更し、6-クロロヘキサン酸添加後さらに DMF を 40 g 添加した以外は実施例 1 と同様に行い、変性アガロースの水酸基由来の酸素原子に $-(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ 又は $-(\text{CH}_2)_5\text{COONa}$ が結合した基を有する分離材を作製し、実施例 1 と同様に評価を行った。

[0100] [比較例 1]

市販のイオン交換クロマトグラフィー担体「CM Sepharose Fast Flow」(GEヘルスケア・ジャパン株式会社製)を分離材として用い、実施例 1 と同様に評価を行った。

[0101] [比較例 2]

モノクロロ酢酸 40 g を 11-ブロモウンデカン酸 40 g に変更し、11-ブロモウンデカン酸添加後さらに DMF を 40 g 添加した以外は実施例 1 と同様に行い、変性アガロースの水酸基由来の酸素原子に $-(CH_2)_{10}COOH$ 又は $-(CH_2)_{10}COONa$ が結合した基を有する分離材を作製し、実施例 1 と同様に評価を行った。

[0102] [表1]

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6	比較例1	比較例2
疎水性高分子粒子	あり	あり	あり	あり	あり	あり	なし	あり
R の炭素数	1	1	2	3	4	5	1	10
被覆量(mg/g)	350	350	355	352	350	352	—	350
非特異吸着量	A	A	A	A	A	A	—	A
カルボキシ基量 ($\mu\text{mol/mL}$)	180	150	140	130	140	140	110	110
平均粒径(μm)	103	103	102	102	102	104	98	102
粒径の C.V.(%)	8	8	7	8	8	8	36	8
モード細孔径(μm)	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.11	0.10	0.11
比表面積(m^2/g)	50	51	51	50	52	50	60	52
空隙率(%)	61	62	59	59	60	58	55	60

[0103] [表2]

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6	比較例1	比較例2
弾性率(MPa)	290	300	290	300	310	300	59	290
通液速度(cm/h)	3150	3200	3000	2900	2900	2700	730	1200
動的吸着量(mg/mL)	120	100	90	90	95	90	40	60
回収率(%)	>90	>90	>90	>90	>90	>90	>90	60

[0104] 実施例 1 ～ 6 の分離材は、カラムに充填したときの通液性に優れているとともに、タンパク質の動的吸着量及び回収率が高いことが確認された。また、実施例 1 ～ 6 の分離材は、タンパク質の非特異吸着を抑制することができ、5%圧縮変形弾性率が高いことも確認された。

[0105] 以上説明したとおり、本発明によれば、カラムとして用いたときの通液性に優れる分離材、当該分離材を備えるカラム及び当該分離材の製造方法を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 疎水性高分子粒子と、該疎水性高分子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、
- 前記被覆層が、水酸基と、 $-O-R-L$ （ O は前記水酸基に由来する酸素原子を示し、 R は、炭素数1～5のアルキレン基を示し、 L はカルボキシ基又はカルボキシ基のアルカリ金属塩を示す。）で表される基と、を有する親水性高分子を含む、分離材。
- [請求項2] 前記 $-O-R-L$ で表される基の含有量が、分離材1 mL当たり100 μmol 以上である、請求項1に記載の分離材。
- [請求項3] 前記疎水性高分子粒子が、スチレン系モノマに由来する構造単位を有するポリマを含む粒子である、請求項1又は2に記載の分離材。
- [請求項4] 前記親水性高分子が、多糖類及びその変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種に由来する親水性高分子を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の分離材。
- [請求項5] 前記親水性高分子が、アガロース、デキストラン、セルロース、プルラン、キトサン及びこれらの変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種に由来する親水性高分子を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の分離材。
- [請求項6] 前記親水性高分子が、架橋されている、請求項1～5のいずれか一項に記載の分離材。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の分離材を備える、カラム。
- [請求項8] 請求項1～6のいずれか一項に記載の分離材の製造方法であって、
- 疎水性高分子粒子の表面の少なくとも一部に、水酸基を有する親水性高分子を被覆する工程と、
- 前記被覆された親水性高分子が有する水酸基の水素原子の一部を、 $-R-L$ （ R は、炭素数1～5のアルキレン基を示し、 L はカルボキシ基又はカルボキシ基のアルカリ金属塩を示す。）で表される基に置換する工程と、

を備える、分離材の製造方法。

[請求項9] 前記水酸基を有する親水性高分子が、多糖類及びその変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、請求項8に記載の分離材の製造方法。

[請求項10] 前記水酸基を有する親水性高分子が、アガロース、デキストラン、セルロース、プルラン、キトサン及びこれらの変性体からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、請求項8又は9に記載の分離材の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/031740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. B01J20/24 (2006.01) i, B01J20/285 (2006.01) i, B01J20/32 (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)

Int.Cl. B01J20/24, B01J20/285, B01J20/32, C07K1/16

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	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/117574 A1 (HITACHI CHEMICAL CO., LTD.) 28 July 2016, paragraphs [0044], [0048]-[0056], [0060], [0063], [0128], [0131], [0167]-[0179], [0208]-[0223], tables 2, 7, 9 & US 2017/0368533 A1, paragraphs [0041]-[0192], [0216]-[0243], [0279]-[0311], tables 2, 7, 9 & EP 3248679 A1	1-10
A	JP 2017-196544 A (HITACHI CHEMICAL CO., LTD.) 02 November 2017, entire text (Family: none)	1-10

☒ 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

"I" 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
29 October 2019 (29.10.2019)

Date of mailing of the international search report
12 November 2019 (12.11.2019)

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/JP2019/031740

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 2018/181738 A1 (HITACHI CHEMICAL CO., LTD.) 04 October 2018, entire text (Family: none)	1-10

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, B01J20/285(2006.01)i, B01J20/32(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. B01J20/24, B01J20/285, B01J20/32, 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	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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）

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	W0 2016/117574 A1（日立化成株式会社）2016.07.28, 段落0044、0048-0056、0060、0063、0128、0131、0167-0179、0208-0223、表2、7、9 & US 2017/0368533 A1, 段落0041-0192, 0216-0243, 0279-0311, 表2, 7, 9 & EP 3248679 A1	1-10
A	JP 2017-196544 A（日立化成株式会社）2017.11.02, 全文（ファミリーなし）	1-10

☒ 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

29.10.2019

国際調査報告の発送日

12.11.2019

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）

瀧 恭子

4Q

3559

電話番号 03-3581-1101 内線 3468

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
P, A	WO 2018/181738 A1 (日立化成株式会社) 2018.10.04, 全文 (ファミリーなし)	1-10