

(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
2011 年 9 月 22 日(22.09.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/114472 A1

- (51) 国際特許分類:
C08B 37/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/054595
- (22) 国際出願日: 2010 年 3 月 17 日(17.03.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 電気化学工業株式会社(DENKI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1038338 東京都中央区日本橋室町二丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 香坂 昌信(KOHSAKA Masanobu) [JP/JP]; 〒9490393 新潟県糸魚川市大字青海 2 2 0 9 番地 電気化学工業株式会社 青海工場内 Niigata (JP). 石毛 克己(ISHIGE Katsumi) [JP/JP]; 〒9490393 新潟県糸魚川市大字青海 2 2 0 9 番地 電気化学工業株式会社 青海工場内 Niigata (JP). 日置 和利(HIOKI Kazutoshi) [JP/JP]; 〒9490393 新潟県糸魚川市大字青海 2 2 0 9 番地 電気化学工業株式会社 青海工場内 Niigata (JP). 辻 強志(TSUJI Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒9490393 新潟県糸魚川市大字青海 2 2 0 9 番地 電気化学工業株式会社 青海工場内 Niigata (JP).
- (74) 代理人: 園田 吉隆, 外(SONODA Yoshitaka et al.); 〒1630434 東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 新宿三井ビル 3 4 階 園田・小林特許事務所 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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: HYALURONIC ACID PURIFICATION METHOD

(54) 発明の名称: ヒアルロン酸の精製方法

(57) Abstract: Provided is a simple, high-yield method for purifying hyaluronic acids to a high level of purity on an industrial scale. Specifically provided is a purification method for hyaluronic acids and/or salts thereof, which includes a process in which a hyaluronic acid solution comprising hyaluronic acid and/or salts thereof and impurities is brought into contact with an activated carbon suspension.

(57) 要約: 【課題】簡便かつ高収率で高純度のヒアルロン酸類を工業的規模で精製するための方法を提供することを目的とする。【解決手段】ヒアルロン酸及び／又はその塩と不純物を含むヒアルロン酸類溶液を、活性炭懸濁液と接触させる工程を含む、ヒアルロン酸及び／又はその塩の精製方法が提供される。



WO 2011/114472 A1

明 細 書

発明の名称： ヒアルロン酸の精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヒアルロン酸類の精製方法、その精製方法に用いる精製剤及び活性炭、それらの製造方法に関する。

背景技術

[0002] ヒアルロン酸は、化粧品の保湿剤の他、眼科、整形外科、皮膚科等で医薬品として用いられている。ヒアルロン酸は、動物組織、例えば、鶏の鶏冠、牛の眼の硝子体等からの抽出物により製造することができるが、夾雑物としてコンドロイチン硫酸等が混入したり、組織内に含まれるヒアルロニダーゼ等によって低分子量化されやすいため、ヒアルロン酸生産能を有する微生物を培養し、培養液からヒアルロン酸を製造すること（発酵法）も行なわれている（非特許文献1及び特許文献1）。

[0003] 抽出法や発酵法によって製造されるヒアルロン酸には、タンパク質や発熱性物質等が不純物として存在するため、これらを分離除去して高純度の製品を得る方法が検討されている。特に製造の初期段階での不純物の除去は、以降の精製工程の負荷の軽減を可能とし、医薬品としても使用可能な高純度な製品を得る方法としての開発が期待されている。その例として、例えば、発酵液にアルコール等の有機溶剤を加えることによりヒアルロン酸を析出し不純物と分離する精製法や、アニオン交換樹脂を用いて、発酵液から発熱性物質やタンパク質等を除去するヒアルロン酸の精製法が開示されている（特許文献2）。

[0004] 非特許文献1：Journal of General Microbiology, 85, 372-375, 1976

特許文献1：特公平4-12960号公報

特許文献2：特開昭63-12293号公報

発明の概要

[0005] しかしながら、工業的規模で注射液等の医薬品として使用できる高純度の

ヒアルロン酸類を得るには（１）初期段階での不純物の除去が十分に為されていないために、後工程への負荷が大きい（２）操作が煩雑な上に、ヒアルロン酸類の回収率が低い等のさらに改善の望まれる点が存在していた。

[0006] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、簡便かつ高収率で高純度のヒアルロン酸類を工業的規模で精製するための方法を提供することを目的とする。また、その精製方法に使われる精製剤、活性炭等や、それらの製造方法を提供することも目的とする。

[0007] 本発明者らは、上記目的を解決するために、ヒアルロン酸類含有液から不純物を効率よく分離除去し、高純度のヒアルロン酸類を簡便にかつ効率よく精製する方法について種々検討した結果、特定の前処理方法を用いて調製した活性炭を用いることにより、不純物を効率よく吸着除去することができることを見だし本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明によれば、ヒアルロン酸及び／又はその塩と不純物を含むヒアルロン酸類溶液を、活性炭懸濁液と接触させる工程とを含む、ヒアルロン酸及び／又はその塩の精製方法が提供される。この精製方法によると、活性炭を用いることにより、不純物を効率よく吸着除去することができる。

[0009] すなわち、本発明によれば、活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、その活性炭懸濁液を１００℃以上で２０分間以上加熱する工程と、その加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程と、ヒアルロン酸類と不純物とを含むヒアルロン酸類溶液を、該攪拌冷却後活性炭懸濁液と接触させる工程とを含む、ヒアルロン酸類の精製方法が提供される。この精製方法によると、ヒアルロン酸類の精製に適した状態に前処理された活性炭を用いることにより、不純物を効率よく吸着除去することができる。

[0010] また、本発明によれば、活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、その活性炭懸濁液を１００℃以上で２０分間以上加熱する工程と、その加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程とを含む、ヒアルロン酸類の精製剤の製造方法が提供される。この製造方法によると、活性炭をヒアルロン酸類の精製に適した状態に前処理することで、不純物を効率よく吸着除去

することのできるヒアルロン酸類の精製剤を製造することができる。

[0011] また、本発明によれば、活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、その活性炭懸濁液を100℃以上で20分間以上加熱する工程と、その加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程とを含む、活性炭の前処理方法が提供される。この前処理方法によると、活性炭をヒアルロン酸類の精製に適した状態に前処理することができる。

[0012] また、本発明によれば、活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、その活性炭懸濁液を100℃以上で20分間以上加熱する工程と、その加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程とを含む方法により製造された活性炭を含む、ヒアルロン酸類の精製剤が提供される。この精製剤は、ヒアルロン酸類の精製に適した状態に前処理された活性炭を含むことで、不純物を効率よく吸着除去することができる。

発明の実施の形態

[0013] [用語の説明]

本明細書における「ヒアルロン酸類」には、遊離のヒアルロン酸、及び、本発明の目的を損なわない範囲で使用可能な任意のヒアルロン酸塩（これに限定されるものではないが、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、リチウム塩などの金属塩や、塩酸塩、リン酸塩、クエン酸塩などの酸付加物など）や水和物、それらの混合物が含まれる。ここで、ヒアルロン酸とは、N-アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸とが結合した2糖単位がくりかえし連鎖してなる高分子量の多糖類をいい、各種塩は主にグルクロン酸部分が塩の形となったものをいう。ヒアルロン酸は、折り畳み可能な鎖部分と、D-グルクロン酸部分のカルボキシル基の負電荷の相互作用によって、空間に展開しやすく、これにより大量の水と結合してゲルを形成することができる。また、低濃度であっても、分子間力が強いため、比較的高い粘性を有する。このような作用から、例えば、関節の湿潤作用、皮膚の柔軟作用などを有し、生理的にもそれらの役割を担っている。

[0014] ヒアルロン酸類の中でも、分子量約200万Daのヒアルロン酸ナトリウ

ムは、分子量約80万Daのものに比べて医薬品として、変形性膝関節症、肩関節周囲炎、慢性関節リウマチ等の治療に優れた効果を発揮することが知られている（薬理と治療、Vol. 22、No. 9、289（1994）；薬理と治療、Vol. 22、No. 9、319（1994））。また、その他に、外科手術後の癒着防止用として、さらに皮膚科領域、眼科領域においても医薬品としての効果が知られており、一部は臨床的に一般に使用されている。医薬品として用いる場合には、平均分子量が100万以上のヒアルロン酸類を用いることが望ましい。さらに、入手や取り扱いの容易さを勘案すると、平均分子量100万～500万Daのヒアルロン酸類が医薬品としては望ましく、平均分子量150万～400万Daのヒアルロン酸類が特に望ましい。また、このような高分子量のヒアルロン酸類は、化粧品用途として使用した際にも、その高い保湿力から優れた効果を発揮する。

[0015] 医薬品として、ヒアルロン酸類を溶解する注射用溶解液としては、注射用水、生理食塩水等に、酸、アルカリ、リン酸塩のような緩衝剤を含むpH調整剤等を加えた一般に用いられる注射用溶解液（例えば、各国薬局方で認められているもの）を適宜使用することができる。

[0016] これらのヒアルロン酸類は、動物組織から抽出する抽出法により製造したものでも、ヒアルロン酸生産微生物菌株を用いて発酵させて得る発酵法で製造したものでもよい。しかしながら、動物組織から抽出したものには、他のムコ多糖などの不純物が比較的多く、分子量も小さいため、発酵法で得られるものを用いることが望ましい。本発明に適した発酵法の一例では、例えばストレプトコッカス属の微生物を使用して既知の方法でヒアルロン酸類を得ることができる。

[0017] 本発明の方法等に用いる溶液は、培養液をそのまま用いることが望ましいが、当然ながら、既知の方法、例えば、遠心分離やろ過処理等で除菌した液を使用してもよい。場合によっては、透析処理による低分子化合物の除去、精密ろ過処理による水不溶微粒子の除去等の操作を行ってもよく、アルコール等の水溶性有機溶媒を添加してヒアルロン酸を析出精製したものを使用し

てもよい。また、アルミナ等で処理したものを用いてもよい。

[0018] 本明細書における「ストレプトコッカス」には、ヒアルロン酸を生産することのできるストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属の任意の細菌・その変異株が含まれる。特に、特許文献2に記載されたストレプトコッカス・エキFM-100 (微工研菌寄第9027号)、特開平2-234689号公報に記載されたストレプトコッカス・エキFM-300 (微工研菌寄第2319号) のような高収率で安定にヒアルロン酸を生産する変異株を用いることが望ましい。ヒアルロン酸の生産に適したストレプトコッカス属の細菌の例としては、他に、これに限定されるものではないが、例えば、ストレプトコッカス・エキ (*Streptococcus equi*)、ストレプトコッカス・ズーエピデミカス (*Streptococcus zooepidemicus*)、ストレプトコッカス・エキシミリス (*Streptococcus equisimilis*)、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ (*Streptococcus dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) 及びこれらの変異株などが挙げられる。

[0019] 本明細書における「平均分子量」について、特記しない限り、ヒアルロン酸類の平均分子量を示す際は、粘度平均分子量のことをいう。粘度平均分子量は、当業者が通常行う方法により求めることができる。好ましくは、各国の薬局方等で一般的に用いられている測定方法により求めることができ、より好ましくは、日本薬局方で用いられている測定方法により求めることができる。一例としては、これに限定されるものではないが、例えば、その平均分子量は、極限粘度 $[\eta]$ を用いて、次式により求めることができる。

式 1

[0020]

$$\text{平均分子量} = \left(\frac{[\eta] \times 10^3}{22.8} \right)^{\frac{1}{0.816}}$$

[0021] 本明細書における「活性炭」とは、市販され、一般に用いられている、分離・除去・精製用の多孔質の炭素のことをいい、石炭又は木材等の原料の由来や、薬晶賦活又は水蒸気賦活等の製法に限定されるものではない。さらに、粉末活性炭、粒状活性炭等の形状や、乾式、湿式などの性状に限定されるものでもない。本発明の方法等においては、これに限定されるものではないが、木材由来の活性炭を用いることが望ましい。また、同様に、水蒸気賦活により製造されたものを用いることが望ましい。また、同様に、粉末活性炭を用いることが望ましい。

[0022] 活性炭の具体例としては、これに限定されるものではないが、例えば、ツルミコールGL-30S、ツルミコールHC-30S [以上粒状・(株)ツルミコール製]、白鷺WH5C8/32、白鷺LH2C20/48、白鷺WH2C8/32SS [以上、粒状・武田薬品工業(株)製]、白鷺A、白鷺P、精製白鷺、特性白鷺、カルボラフィン [以上、粉状・武田薬品工業(株)製]、北越SD、北越GSA [以上、粉状・北越炭素工業(株)製]、シルバーA、花F、雪A [以上、粉状・大三工業(株)製]などが挙げられる。

[0023] 本明細書における「不純物」とは、ヒアルロン酸類、水その他の溶媒成分、無機塩以外の物質、特に、最終製品としてのヒアルロン酸類を用いる際に不利益を与え得る物質（発熱性物質など）のことをいう。主な不純物源としては、ヒアルロン酸類の生産段階での組織、微生物又は培養液（培地）由来のもの、あるいは、その後の精製段階で混入したものが挙げられる。本明細書における不純物の例としては、これに限られるものではないが、組織又は菌体、タンパク質、核酸、多糖類、低分子化合物、あるいはエンドトキシンなどが挙げられる。不純物としての組織又は菌体には、これに限られるものではないが、それぞれ、抽出法で用いた抽出原料としての組織由来の組織片などや、発酵法で用いた微生物の菌体あるいは菌体片などが含まれる。不純物としてのタンパク質には、これに限られるものではないが、上記組織、菌由来のタンパク質や、生産後の工程で混入したタンパク質などが含まれる。

不純物としてのエンドトキシンには、これに限られるものではないが、上記菌由来のリポ多糖類などが含まれる。

[0024] 本明細書における「低分子化合物」とは、ヒアルロン酸類と比較して、分子量の比較的小さな化合物のことをいい、例えば、これに限られるものではないが、分子量2000Da以下、あるいは、分子量1000Da、あるいは分子量500Da以下の化合物のことをいう。このような低分子化合物には、各種アミノ酸、有機酸（例えば、乳酸）、糖（例えば、グルコース）などが含まれる。

[0025] 本明細書における「水性液」とは、水を主体（溶媒）とする液体のことをいい、各種塩、緩衝剤、少量の有機溶媒などが含まれたものも含む。水性液としては、本発明の目的を損なわない限り、任意のものを用いることができるが、最終製品としてのヒアルロン酸類を用いる際に不必要な物質の混入を防ぐ観点から、水が望ましい。

[0026] 本明細書における「攪拌冷却」とは、対象の液体を、攪拌を継続することにより、冷却することをいう。ここで、攪拌冷却後に達成された温度を、冷却完了温度とする。

[0027] 本明細書における「クリーン環境」とは、空調管理することで、環境由来の菌やエンドトキシンなどの不純物が製品にコンタミする可能性の極めて低い環境、特に医薬（菌、エンドトキシンフリー）相当製品の製造環境のことをいう。

クリーン環境の一例として、例えば、対象物質が以下のように規制された環境が挙げられる。

[表1]

	一般環境	クリーン環境
微粒子数 [個/m ³]	≥ 2900	< 2900
微生物数 [cfu/90mmφ/4hr]	≥ 50	< 50

[0028] 本明細書における「除去」には、対象の物質を完全に除き去ることに加え、部分的に除き去る（その物質の量を減少させる）ことも含まれる。本明細書における「精製」には、任意の又は特定の不純物を除去することが含まれる。

[0029] 本明細書における「精製剤」とは、吸着剤などの、精製のために使われる薬剤のことをいい、「物質Aの精製剤」という表現は、物質Aを精製するための薬剤のことを意味するものとする。精製剤は、精製用組成物の形態であってもよい。また、同様に、除去剤、分離剤等も、それぞれ、除去のために用いられる薬剤、分離のために用いられる薬剤のことをいい、例えば、吸着剤や担体等を含む用語であって、除去用組成物、分離用組成物などの形態であってもよい。

[0030] 本明細書におけるそれぞれの数値範囲については、「～」で示された上限値及び下限値をそれぞれ含むものとする。例えば、「A～B」なる記載は、A以上でありB以下であることを意味する。また、「を含有する」には、「から実質的になる」および「からなる」が含まれるものとする。

[0031] [実施の形態]

本発明は、これに限られるものではないが、例えば、以下の実施態様に関する。

[0032] 実施態様 1 .

活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、

該活性炭懸濁液を 100℃以上で 20 分間以上加熱する工程と、
該加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程と、
ヒアルロン酸及び／又はその塩と不純物とを含むヒアルロン酸類溶液を、
該攪拌冷却後活性炭懸濁液と接触させる工程とを含む、ヒアルロン酸及び／
又はその塩の精製方法。

[0033] 実施態様 2.

活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、
該活性炭懸濁液を 100℃以上で 20 分間以上加熱する工程と、
該加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程を含む、ヒアルロン酸及び／又
はその塩の精製剤の製造方法。

[0034] 実施態様 3.

活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、
該活性炭懸濁液を 100℃以上で 20 分間以上加熱する工程と、
該加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程を含む、活性炭の前処理方法。

[0035] 実施態様 4.

上記攪拌冷却する工程において、冷却完了温度が 60℃以下である、実施
態様 1 ないし 3 の何れか一態様に記載の方法。

[0036] 実施態様 5.

上記攪拌冷却する工程において、攪拌冷却が温度 10～60℃で 1 時間以
上行われる、実施態様 1 ないし 4 の何れか一態様に記載の方法。

[0037] 実施態様 6.

上記工程の少なくとも一つ以上がクリーン環境下で行われる、実施態様 1
ないし 5 の何れか一態様に記載の方法。

[0038] 実施態様 7.

ヒアルロン酸及び／又はその塩が発酵法で製造されたものである、実施態
様 1 ないし 6 の何れか一態様に記載の方法。

[0039] 実施態様 8.

精製後の上記ヒアルロン酸及び／又はその塩の平均分子量が 350 万～7

00万Daである、実施態様1ないし7の何れか一態様に記載の方法。

[0040] 実施態様9.

活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、
該活性炭懸濁液を100℃以上で20分間以上加熱する工程と、
該加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程を含む方法により製造された活性炭を含む、ヒアルロン酸及び／又はその塩の精製剤。

[0041] 以下、本発明の態様について説明する。

[0042] 本発明の第一の態様（例えば、実施態様1）は、活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、その活性炭懸濁液を100℃以上で20分間以上加熱する工程と、その加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程と、ヒアルロン酸類と不純物とを含むヒアルロン酸類溶液を、該攪拌冷却後活性炭懸濁液と接触させる工程とを含む、ヒアルロン酸類の精製方法である。この精製方法によると、ヒアルロン酸類の精製に適した状態に前処理された活性炭を用いることにより、不純物を効率よく吸着除去することができる。

[0043] 本発明の第二の態様（例えば、実施態様2）は、活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、その活性炭懸濁液を100℃以上で20分間以上加熱する工程と、その加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程とを含む、ヒアルロン酸類の精製剤の製造方法である。この製造方法によると、活性炭をヒアルロン酸類の精製に適した状態に前処理することで、不純物を効率よく吸着除去することのできるヒアルロン酸類の精製剤を製造することができる。

[0044] 本発明の第三の態様（例えば、実施態様3）は、活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、その活性炭懸濁液を100℃以上で20分間以上加熱する工程と、その加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程とを含む、活性炭の前処理方法である。この前処理方法によると、活性炭をヒアルロン酸類の精製に適した状態に前処理することができる。

[0045] 本発明の第四の態様（例えば、実施態様9）は、活性炭を水性液中に懸濁させて活性炭懸濁液を得る工程と、その活性炭懸濁液を100℃以上で20

分間以上加熱する工程と、その加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する工程とを含む方法により製造された活性炭を含む、ヒアルロン酸類の精製剤である。この精製剤は、ヒアルロン酸類の精製に適した状態に前処理された活性炭を含むことで、不純物を効率よく吸着除去することができる。

[0046] 上記第一の態様の精製方法、第二の態様の製造方法により製造された精製剤、第三の態様の前処理方法により前処理された活性炭、あるいは第四の態様の精製剤を用いた精製方法（以下、「上記態様の精製方法」と称する）は、無処理の活性炭を用いた精製方法と比較して、より高い不純物吸着力を有するため、より効果的な不純物除去を行うことができる。

[0047] すなわち、上記態様の精製方法を用いると、ヒアルロン酸類の消失は低く抑えながらも、不純物として、一般的に活性炭により除去可能とされる高分子化合物（例えば、菌体、タンパク質、核酸、エンドトキシン）のみならず、低分子化合物（例えば、アミノ酸、糖、有機酸）までも効率的に分離・除去することが可能であった。また、上記態様の精製方法は、無処理の活性炭を用いた精製方法と比較して、特に、生菌、タンパク質、エンドトキシンに対して顕著な除去効果を奏する。

[0048] また、上記態様の精製方法は、無処理の活性炭を用いる場合に比べ、ヒアルロン酸類の分子量の低下を軽減することもできる。精製時におけるヒアルロン酸類の分子量の低下を低減させることができ、特に、高分子量（例えば、精製後（例えば、吸着処理に続く濾過後）の平均分子量が350万～700万Da）のヒアルロン酸類の精製において、優れた効果を発揮する。また、従来は処理が困難であった比較的高濃度（例えば、1g/L～10g/L）のヒアルロン酸類溶液についても、効率的に処理することができる。

[0049] さらに、上記態様の精製方法を用いると、除菌処理、透析処理、精製処理等を行うことなく、培養液そのものを対象として精製する（不純物・菌体等を除去する）ことができ、培養液そのものからヒアルロン酸類を分離・精製する際にも優れた効果を奏する。遠心分離や濾過処理等の煩雑な操作を行うことなく、培養液をそのまま用いることで、さらなる効率化と、コスト削減等

の効果を得ることが出来る。

- [0050] 上記態様の精製方法を行う際のヒアルロン酸類溶液のヒアルロン酸類濃度は、溶液粘度の高さに起因する取り扱いの困難さ及びヒアルロン酸類の溶解度の観点からは、これに限定されるものではないが、0.1～20 g/Lが望ましく、0.5～15 g/Lがさらに望ましく、1～10 g/Lが最も望ましい。
- [0051] 上記態様の精製方法の対象となるヒアルロン酸類溶液のpHは、ヒアルロン酸の分解を防ぎ、分子量の低下を防ぐという観点からは、これに限定されるものではないが、3～12が望ましく、3～9が最も望ましい。さらに、精製（吸着）効果をさらに高めるという観点からは、これに限定されるものではないが、pHが3.5以上及び／又は7以下であることが望ましい。
- [0052] 上記態様の精製方法を用いる際のヒアルロン酸類溶液の温度は、これに限定されるものではないが、0～80℃であることが望ましい。温度が80℃以下であれば、処理中のヒアルロン酸類の分解及び分子量の低下を、強く抑えることができる。
- [0053] 上記態様の精製方法において、活性炭懸濁液を、精製対象のヒアルロン酸溶液と接触させる際には、一回懸濁し、そのまま保持してもよいが、持続して懸濁・攪拌することが望ましい。攪拌を行う場合は、これに限定されるものではないが、10分間～1時間の攪拌が望ましく、20～40分間の攪拌がさらに望ましい。
- [0054] 上記態様の各方法における活性炭懸濁液の加熱処理においては、活性炭懸濁液を100℃以上で20分間以上加熱することにより不純物の除去能力が向上する。しかしながら、加熱処理の効果を高めるために、温度は、これに限定されるものではないが、120℃以上が更に望ましく、121℃かまたはそれ以上であることが最も望ましい。また、加熱処理の効果を高めるために、加熱時の気圧が高いことが望ましい。そのような高い気圧としては、これに限定されるものではないが、例えば、0.1 MPa以上が望ましく、0.2 MPa以上がさらに望ましい。また、加熱処理の効果を高めるために、

加熱時間は、これに限定されるものではないが、30分以上であることが更に好ましく、1時間以上であることが最も好ましい。また、加熱時には、攪拌を持続しながら加熱することが望ましく、その際には、これに限定されるものではないが、50～1000rpmで攪拌することが望ましく、100～600rpmで攪拌することがさらに望ましい。

[0055] 上記態様の各方法において、加熱後活性炭懸濁液を攪拌冷却する際には、加熱した活性炭懸濁液を、攪拌を継続することにより、冷却する。前処理において攪拌を行いつつ冷却した場合、攪拌を行わないで冷却する場合と比較して、ヒアルロン酸類の精製時の分子量低下をより大きく低減することができる。攪拌冷却時の周囲の温度は、これに限定されるものではないが、0℃～80℃が望ましく、10℃～60℃がさらに望ましく、15～40℃が最も望ましい。また、特に操作を行わない温度である室温で操作してもよい。攪拌時間は、これに限定されるものではないが、1時間以上であることが望ましく、2時間以上であることがさらに望ましく、3時間以上であることがよりさらに望ましく、4時間以上であることが最も望ましい。冷却完了温度が同一の温度であっても、適切な攪拌時間で攪拌する方が、精製に用いた際のヒアルロン酸類の分子量の低減抑制効果が大きい。また、冷却完了温度は、ヒアルロン酸の分子量低下などに与える影響から、低い方が望ましい。これに限られるものではないが、冷却完了温度は80℃以下が望ましく、冷却完了温度は60℃以下がさらに望ましい（0℃以上）。

[0056] 上記態様の精製方法で用いられる活性炭の量は、これに限定されるものではないが、ヒアルロン酸類溶液100重量%に対し、0.5～20.0重量%であることが望ましく、5.0～20.0重量%であることがさらに望ましい。これらの範囲内では、より高い精製（吸着）作用が期待できる。

[0057] さらに、活性炭の原料としては、特に生体に適用する際に問題となり得る不純物等の観点からは、木材由来が望ましく、その形状は、分散性や吸着効率の観点からは、粉末状が望ましい。

[0058] また、本発明の更なる態様では、上記態様において、ヒアルロン酸類がス

トレプトコッカス・エキFM-100（微工研条寄第9027号）あるいはストレプトコッカス・エキFM-300（微工研条寄第2319号）により生産される。これらの微生物により生産されたヒアルロン酸類を精製対象として用いることで、より不純物が少なく、高分子量のヒアルロン酸類精製物を得ることができ、特に医薬として用いる際には優れた効果を発揮する。

[0059] 上記態様の精製方法を用いることで、ヒアルロン酸類の分離・精製工程の負荷を軽減することができるため、上記態様に関する精製方法は、製造の工業的なプロセスの比較的初期段階で用いることが特に有効的である。

[0060] さらに、上記態様の精製方法を、クリーン環境下で行うことにより、従来は困難であった、医薬品に要求される高品質のヒアルロン酸類の工業的規模での効率的な精製が可能となる。このような精製方法は、医薬品用のヒアルロン酸類の生産において、極めて高い産業的有用性を有する。

[0061] なお、上記実施態様、態様により説明される精製方法等は、本発明を限定するものではなく、例示することを意図して開示されているものである。本発明の技術的範囲は、特許請求の範囲の記載により定められるものであり、当業者は、特許請求の範囲に記載された発明の技術的範囲において種々の設計の変更が可能である。

[0062] 例えば、上記精製方法等は、更なる他の工程を含むか、あるいは、上記精製方法に引き続いて更なる他の工程・方法が実施され、ヒアルロン酸類等を製造する方法であってもよい。そのような工程・方法としては、例えば、同時あるいは別々に行われる、ヒアルロン酸生産微生物菌株を培養する工程、ヒアルロン酸産生微生物菌株培養液から培養濾液を製造する工程、精製対象液を遠心分離する工程、対象液を中和する工程、対象液に塩を添加する工程、精製対象液を精密濾過する工程、対象液を透析処理する工程、精製対象液に芳香族系吸着樹脂を加える工程、対象液を限外濾過する工程、対象液をクロマトグラフィーで精製する工程、対象液に活性炭の吸着剤を加える工程、活性炭を対象液から分離する工程、活性炭を対象液から除去する工程、有機溶媒を加えてヒアルロン酸類を沈殿させる工程、ヒアルロン酸類を結晶化す

る工程、ヒアルロン酸類を乾燥させる工程などが挙げられる。

実施例

[0063] 以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0064] ストレプトコッカス・エキFM-100（微工研菌寄第9027号）を用いて培養した発酵液150ml（ヒアルロン酸ナトリウム濃度3.5g/l、PH4.0）を300mlのガラスビーカーに採取し、表2又は3に示す条件で調製した吸着剤（活性炭等）による処理を行い、マグネチックスターラーを用い400rpmで30分間懸濁攪拌処理した。その処理液を濾紙を用いて濾過し、濾液150mlに塩化ナトリウム4.5g（3.0重量%）を添加後、エタノール600mlでヒアルロン酸ナトリウムを析出させた。この析出ヒアルロン酸ナトリウムを、エタノール300mlで洗浄した後、40℃で真空乾燥させてヒアルロン酸ナトリウム0.5gを得た。

[0065] このようにして得られたヒアルロン酸ナトリウムを、表4に示す評価項目、評価基準を用いて評価した。精製条件及び評価結果を表2及び3（実験例1～17）に示す。

[0066]

[表2]

活性炭前処理条件									
実施例	実験例1	実験例2	実験例3	実験例4	実験例5	実験例6	実験例7	実験例8	実験例9
活性炭の前処理(熱殺菌) 前処理	-	なし	あり	あり	あり	あり	あり	なし	あり
	加熱条件	加熱温度 [°C]	120	120	120	120	120	-	120
	加熱時間 [min]	-	60	60	60	60	60	-	60
	攪拌回転数 [rpm]	-	400	400	400	400	400	-	400
	冷却条件	冷却完了温度 [°C]	≤30	≤30	≤30	≤80	≤30	-	≤30
吸着条件	-	-	6	3	6	0.5	0.5	-	3
	冷却時間 [hr]	-	なし	あり	なし	あり	あり	-	あり
	攪拌実施有無	-	乾燥	乾燥	乾燥	湿潤	湿潤	湿潤	湿潤
	活性炭の状態	-	乾燥	乾燥	乾燥	湿潤	湿潤	湿潤	湿潤
	HA濃度 [g/L]	-	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
環境 品質	pH	-	4	4	4	4	4	4	4
	培養液量 [mL]	150	150	150	150	150	150	150	150
	AC(白炭P) [%]	-	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
	攪拌回転数 [rpm]	-	400	400	400	400	400	400	400
	攪拌時間 [min]	-	30	30	30	30	30	30	30
環境 品質	クリーン	一般	一般	一般	一般	一般	一般	一般	一般
	原料レベル	原料レベル	中	中	中	中	中	大	中
	タンパク質	原料レベル	中	中	中	中	中	大	中
	アミノ酸	原料レベル	少	少	少	少	少	少	少
	エンドキシン	原料レベル	大	中	中	中	中	大	中
極限粘度 [dL/g]		45	30	35	35	30	35	30	40

[0067] [表3]

[0068]

活性炭前処理条件								
実施例	実験例10	実験例11	実験例12	実験例13	実験例14	実験例15	実験例16	実験例17
活性炭の前処理 (熱殺菌)	前処理	加熱条件	加熱温度 [°C]	120	120	120	120	120
		加熱時間 [min]	60	60	60	60	60	
		攪拌回転数 [rpm]	400	400	400	400	400	
		冷却条件	冷却完了温度 [°C]	≤30	≤30	≤80	≤30	≤30
		冷却時間 [hr]	6	3	6	0.5	0.5	
		攪拌実施有無	なし	あり	なし	あり	あり	
吸着条件	活性炭の状態	乾燥	乾燥	湿潤	湿潤	湿潤	湿潤	湿潤
	HA濃度 [g/L]	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
	pH	4	4	4	4	4	4	4
	培養液量 [mL]	150	150	150	150	150	150	150
	AC (白鷺P)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
	攪拌回転数 [rpm]	400	400	400	400	400	400	400
環境品質	攪拌時間 [min]	30	30	30	30	30	30	30
	生菌数	クリーン	クリーン	クリーン	クリーン	クリーン	クリーン	クリーン
	タンパク質	中	少	少	少	少	中	少
	アミノ酸	少	少	少	少	少	少	少
	エンドキシン	中	少	少	少	少	中	少
	極限粘度 [dL/g]	25	30	35	35	30	35	30

[表4]

評価		少	中	多	原料レベル
評価項目					
生菌数	[cfu/mL]	≤ 100	$100 < \text{菌} < 1000$	$1000 \leq \text{菌} < 5000$	≥ 5000
菌漏れ	[cfu/mL]	≤ 100	$100 < \text{菌} < 1000$	$1000 \leq \text{菌} < 5000$	≥ 5000
タンパク質	[μ g/mL]	≤ 0.04	$0.04 < \text{protein} < 0.20$	$0.20 \leq \text{protein} < 0.5$	≥ 0.5
アミノ酸	[μ g/mL]	≤ 5	$5 < \text{amino acid} < 1000$	$1000 \leq \text{amino acid} < 150000$	≥ 150000
エンドトキシン(	[EU/mL]	≤ 0.001	$0.001 < \text{ET}^* < 0.01$	$0.01 \leq \text{ET}^* < 50000$	≥ 50000

*ET：エンドトキシン

[0069] 以上の実験の結果から、一定の前処理方法で前処理された活性炭を用いて精製することにより、ヒアルロン酸類溶液から、不純物を効果的に吸着除去し、精製できることが確認された。

[0070] 以上、本発明を実施例に基づいて説明した。この実施例はあくまで例示であり、種々の変形例が可能なこと、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

請求の範囲

- [請求項1] ヒアルロン酸及び／又はその塩と不純物を含むヒアルロン酸類溶液を、活性炭懸濁液と接触させる工程とを含む、ヒアルロン酸及び／又はその塩の精製方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/054595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C08B37/08

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)
C08B37/08

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 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

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	JP 2009-242522 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 22 October 2009 (22.10.2009), entire text; particularly, abstract; claim 1; examples 1 to 5 (Family: none)	1
X	JP 2009-256463 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 05 November 2009 (05.11.2009), entire text; particularly, abstract; claims 1 to 2; page 4, paragraph [0010]; examples 1 to 4 (Family: none)	1
X	JP 63-270701 A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 08 November 1988 (08.11.1988), entire text; particularly, claims 1 to 2; examples 1 to 3 (Family: none)	1

☒ 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
27 April, 2010 (27.04.10)

Date of mailing of the international search report
18 May, 2010 (18.05.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/054595

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 62-501471 A (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.), 18 June 1987 (18.06.1987), entire text; particularly, claims 2, 25 & WO 86/04355 A1 & US 4784990 A & US 4780414 A & EP 211037 A1 & EP 455263 A2 & DE 3683969 A & AT 72835 A & AU 5359986 A & AU 6231990 A & IL 94791 A & IL 77625 A & CA 1336177 A & HK 117496 A & ZA 8600366 A & CN 86100913 A	1

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C08B37/08 (2006.01) i

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. C08B37/08

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	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010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	JP 2009-242522 A (三菱レイヨン株式会社) 2009.10.22, 文献全体。特に、要約、請求項 1、及び実施例 1~5 を参照。 (ファミリーなし)	1
X	JP 2009-256463 A (三菱レイヨン株式会社) 2009.11.05, 文献全体。特に、要約、請求項 1~2、第 4 頁【0010】、及び実施例 1 ~4 を参照。 (ファミリーなし)	1

☒ 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

27.04.2010

国際調査報告の発送日

18.05.2010

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)

井上 典之

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

4 P

9360

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
X	JP 63-270701 A (日本化薬株式会社) 1988. 11. 08, 文献全体。特に、請求項 1~2、及び実施例 1~3 を参照。 (ファミリーなし)	1
X	JP 62-501471 A (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.) 1987. 06. 18, 文献全体。特に、請求項 2、25 を参照。 & WO 86/04355 A1 & US 4784990 A & US 4780414 A & EP 211037 A1 & EP 455263 A2 & DE 3683969 A & AT 72835 A & AU 5359986 A & AU 6231990 A & IL 94791 A & IL 77625 A & CA 1336177 A & HK 117496 A & ZA 8600366 A & CN 86100913 A	1