

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-196544

(P2017-196544A)

(43) 公開日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
BO1J 20/281 (2006.01)	BO1J 20/26 L	4D017
GO1N 30/88 (2006.01)	GO1N 30/88 2O1X	4F006
BO1D 15/38 (2006.01)	GO1N 30/88 2O1G	4G066
CO8J 7/04 (2006.01)	GO1N 30/88 1O1N	
	GO1N 30/88 1O1M	
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-86980 (P2016-86980)
 (22) 出願日 平成28年4月25日 (2016. 4. 25)

(71) 出願人 000004455
 日立化成株式会社
 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号
 (74) 代理人 100088155
 弁理士 長谷川 芳樹
 (74) 代理人 100128381
 弁理士 清水 義憲
 (74) 代理人 100169454
 弁理士 平野 裕之
 (72) 発明者 川口 亜季子
 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
 (72) 発明者 後藤 泰史
 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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分離材及びカラム

(57) 【要約】

【課題】タンパク質の非特異吸着が低減され、カラムに充填したときの通液性に優れる分離材を提供すること。

【解決手段】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、上記被覆層が、水酸基及び水酸基以外の官能基を有する官能基含有高分子を含む、分離材。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【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、水酸基及び水酸基以外の官能基を有する官能基含有高分子を含む、分離材。

【請求項 2】

前記水酸基以外の官能基が、カルボキシ基、エポキシ基、又はアミノ基である、請求項 1 に記載の分離材。

【請求項 3】

水中での 5 % 圧縮変形弾性率が 70 MPa 以上である、請求項 1 又は 2 に記載の分離材。

【請求項 4】

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 500 cm/h 以上である、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疎水性高分子を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の分離材。

【請求項 6】

前記官能基含有高分子が、多糖類又はその変性体に由来する構造を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の分離材。

【請求項 7】

前記官能基含有高分子が、アガロース又はその変性体に由来する構造を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の分離材。

【請求項 8】

前記官能基含有高分子が、架橋されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の分離材。

【請求項 9】

前記疎水性高分子粒子の平均粒径が 10 ~ 500 μm である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の分離材。

【請求項 10】

前記疎水性高分子粒子が多孔構造を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の分離材。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の分離材を備えるカラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分離材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。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た場合、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た場合、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】

10

20

30

40

50

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殆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、機械的強度も十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が持つ欠点を克服するため、これをいわば「骨格」となる剛直な物質と組み合わせる試みがこれまでになされている（例えば、特許文献1～7）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第4965289号明細書

【特許文献2】米国特許第4335017号明細書

【特許文献3】米国特許第4336161号明細書

【特許文献4】米国特許第3966489号明細書

【特許文献5】特開平1-254247号公報

【特許文献6】米国特許第5114577号明細書

【特許文献7】特開2009-244067号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、従来分離材は、タンパク質の非特異吸着が多く、かつカラムに充填したときの通液性に劣るといった問題がある。

【0007】

そこで、本発明は、タンパク質の非特異吸着が低減され、カラムに充填したときの通液性に優れた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】

【0008】

本発明の具体的態様を以下に示す。

[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、上記被覆層が、水酸基及び水酸基以外の官能基を有する官能基含有高分子を含む、分離材。

[2] 上記水酸基以外の官能基が、カルボキシ基、エポキシ基、又はアミノ基である、[1]に記載の分離材。

[3] 水中での5%圧縮変形弾性率が70MPa以上である、[1]又は[2]に記載の分離材。

[4] カラムに充填した場合、カラム圧0.3MPaのときに通液速度が500cm/h以上である、[1]～[3]のいずれかに記載の分離材。

[5] 上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疎水性高分子を含む、[1]～[4]のいずれかに記載の分離材。

[6] 上記官能基含有高分子が、多糖類又はその変性体に由来する構造を含む、[1]～[5]のいずれかに記載の分離材。

[7] 上記官能基含有高分子が、アガロース又はその変性体に由来する構造を含む、[1]～[6]のいずれかに記載の分離材。

[8] 上記官能基含有高分子が、架橋されている、[1]～[7]のいずれかに記載の分離材。

[9] 上記疎水性高分子粒子の平均粒径が10～500μmである、[1]～[8]のいずれかに記載の分離材。

[10] 上記疎水性高分子粒子が多孔構造を有する、[1]～[9]のいずれかに記載

10

20

30

40

50

の分離材。

[1 1] [1] ~ [1 0] のいずれかに記載の分離材を備えるカラム。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、タンパク質の非特異吸着が低減され、カラムに充填したときの通液性に優れる分離材及び当該分離材を備えるカラムを提供することができる。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

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。

【 0 0 1 1 】

< 分離材 >

本実施形態の分離材は、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、上記被覆層が、水酸基及び水酸基以外の官能基を有する官能基含有高分子を含む。なお、例えば、疎水性高分子粒子が多孔構造を有するような態様である場合において、「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。本実施形態の分離材によれば、タンパク質の非特異吸着が低減されると共に、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、耐アルカリ性及び耐圧性にも優れ、カラムに充填したときの吸着量（動的吸着量）も実用上十分に高いと考えられる。

【 0 0 1 2 】

本実施形態の分離材が上述の効果を発揮する理由を、本発明者らは、以下のように推測している。

【 0 0 1 3 】

本実施形態の分離材は、上記疎水性高分子粒子と、上記被覆層とを備えることにより、疎水性高分子粒子及び上記官能基含有高分子の双方の利点を有すると考えられる。例えば、本実施形態の分離材は、上記疎水性高分子粒子を備えることにより、耐久性、耐アルカリ性及び耐圧性に優れ、かつカラムに充填したときに優れた通液性を発揮すると考えられる。また、本実施形態の分離材は、上記被覆層を備えることにより、タンパク質の非特異吸着が低減されると共に、タンパク質等の吸脱着が起こり易く、同一流速下でのタンパク質等の吸着量（動的吸着量）が大きいと考えられる。

【 0 0 1 4 】

（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（以下、場合により「疎水性高分子」という）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疎水性高分子を含んでいてもよい。

【 0 0 1 5 】

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。

【 0 0 1 6 】

スチレン系モノマとしては、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。

【 0 0 1 7 】

多官能性モノマとしては、例えば、ジビニルベンゼン、ジビニルピフェニル、ジビニル

10

20

30

40

50

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て用いることができる。上記の中でも耐久性、耐酸性、耐アルカリ性に優れる観点から、ジビニルベンゼンが好ましい。

【0018】

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、*i*-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て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観点から、スチレンが好ましい。モノマは、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であってもよい。

10

【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。多孔質化剤の具体例は、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、シクロヘキサノール、ジエチルベンゼン等を含む。これらの多孔質化材は、1種を単独で又は2種以上を組み合わせて用いることができる。

20

【0020】

上記多孔質化剤の配合量は、モノマ全質量に対して、例えば、0~200質量%であってもよい。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。

【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、モノマに油性界面活性剤を溶解させ、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である。

30

【0022】

多孔質化に使用される油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、ヤシ脂肪酸アルコール）のジグリセロールモノ脂肪酸エーテル；及びこれらの混合物が挙げられる。

40

【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50%を超える、更に好ましくは純度約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%、更に好ましくは純度約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

50

%を超える、更に好ましくは純度約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、更に好ましくは純度約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トート(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、更に好ましくは純度約70%を超えるソルビタンモノミリストート)；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易くなる。また、油溶性界面活性剤の含有量が80質量%以下であると、重合後に疎水性高分子粒子が形状をより保持し易くなる。

10

【0025】

上記重合反応には、水性媒体を用いることもできる。上記水性媒体としては、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。

20

【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、及び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。

30

【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アルエーテル類、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、及び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。

40

【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、及び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】

上記重合反応においては、必要に応じて、重合開始剤を添加することもできる。上記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

50

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；及び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ニルカルボニトリル、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、例えば、0.1~7.0質量部の範囲で使用することができる。

【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】

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。

10

【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)、及び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。

【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、ヒドロキノン類、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。

20

【0036】

上記疎水性高分子粒子の平均粒径は、通液性が更に向上する観点から、10 μ m以上が好ましい。上記疎水性高分子粒子の平均粒径は、カラムの分離性の観点から、500 μ m以下が好ましい。これらの観点から、上記疎水性高分子粒子の平均粒径は、例えば、10~500 μ mであってもよい。

【0037】

疎水性高分子粒子の粒径の変動係数(C.V.)は、通液性が更に向上する観点から、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、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ことが挙げられる。

30

【0038】

疎水性高分子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C.V.(変動係数)を測定する。

40

【0039】

疎水性高分子粒子が、多孔構造を有する場合、当該粒子の空隙率(細孔容積)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。また、疎水性高分子粒子は、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)が0.1 μ m以上0.5 μ m未満である細孔、すなわちマクロポーア(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分布におけるモード径として、より好ましくは、0.2 μ m以上0.5 μ m未満である。細孔径分布におけるモード径が0.1 μ m以上であると、細孔内に物質が入り易くなる傾向にあり、細孔径分布におけるモード径が0.5 μ m未満であると、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。

50

【0040】

疎水性高分子粒子の比表面積は、 $30 \text{ m}^2 / \text{g}$ 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 $30 \text{ m}^2 / \text{g}$ 以上であると、分離する物質の吸着量が大きくなる傾向にある。

【0041】

本実施形態に係る疎水性高分子粒子又は分離材の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。試料約 0.05 g を、標準 5 mL 粉体用セル（ステム容積 0.4 mL ）に加え、初期圧 21 kPa （約 3 psia 、細孔直径約 $60 \mu\text{m}$ 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 130° 、水銀表面張力 485 dynes/cm に設定する。また、細孔径 $0.1 \sim 3 \mu\text{m}$ の範囲に限定してそれぞれの値を算出する。

【0042】

（被覆層）

本実施形態に係る被覆層は、水酸基及び水酸基以外の官能基を有する官能基含有高分子を含む。なお、上記官能基含有高分子において、上記官能基は化学結合により高分子に結合している。被覆層がこのようなものであると、イオン交換性又はリガンドとの結合性が付与される。

【0043】

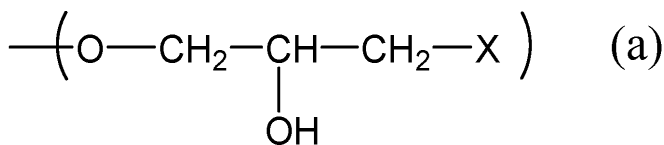
上記官能基としては、例えば、カルボキシ基、エポキシ基、アミノ基、4級アンモニウム基、スルホン酸基等が挙げられる。上記官能基は、カルボキシ基、エポキシ基、又はアミノ基であることが好ましい。アミノ基の具体例は、ジエチルアミノエチル（DEAE）基を含む。

【0044】

上記官能基含有高分子は、例えば、下記式（a）又は（b）で表される基を含んでいてもよい。

【0045】

【化1】



【0046】

式（a）中、Xは、カルボキシ基を含む基を表す。Xの具体例は、カルボキシ基で置換されたアルキル基を含む。

【0047】

【化2】



【0048】

式（b）中、Yは、アミノ基を含む基、又はエポキシ基を含む基を示す。Yの具体例は、グリシジル基、及びジエチルアミノエチル基を含む。

【0049】

上記官能基含有高分子は、親水性高分子であってもよい。

【0050】

上記官能基含有高分子は、親水性が向上する観点から、水酸基を有する高分子又はその変性体に由来する構造を含んでいてもよい。例えば、上記官能基含有高分子は、水酸基を有する高分子又はその変性体から1つ以上の水酸基を除いた構造を有するものであってもよい。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、

10

20

30

40

50

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、多糖類及びポリビニルアルコールが挙げられる。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、及びキトサンが挙げられる。すなわち、上記官能基含有高分子は、多糖類又はその変性体に由来する構造を含んでいてもよく、アガロース又はその変性体に由来する構造を含んでいてもよい。

【 0 0 5 1 】

水酸基を有する高分子の重量平均分子量 (M w) は、例えば、 1 0 0 0 0 ~ 2 0 0 0 0 0 程度であってもよい。

【 0 0 5 2 】

水酸基を有する高分子の変性体としては、例えば、水酸基を有する高分子を疎水基で変性したもの (以下、「疎水基変性体」ともいう) が挙げられる。上記官能基含有高分子が、このような変性体に由来する構造を含むと、界面吸着能が向上する傾向にある。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 ~ 1 0 のアリア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、及びプロピル基が挙げられる。炭素数 6 ~ 1 0 のアリアル基としては、例えば、フェニル基、及びナフチル基が挙げられる。疎水基は、例えば、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。

10

【 0 0 5 3 】

疎水基変性体において、疎水基変性体を構成する全構成単位の総モル量 (疎水基を含有する構成単位及び疎水基を含有しない構成単位のモル量の総和) に対する、疎水基を含有する構成単位の含有割合は、官能基含有高分子を疎水性高分子粒子の表面に吸着させ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の観点から、 5 ~ 3 0 % であることが好ましく、 1 0 ~ 2 0 % であることがより好ましく、 1 2 ~ 1 7 % であることが更に好ましい。

20

【 0 0 5 4 】

カラム圧の上昇がより抑制される観点から、上記官能基含有高分子は架橋されていてもよい。

【 0 0 5 5 】

(被覆層の形成方法)

本実施形態に係る被覆層は、例えば、疎水性高分子粒子表面に、水酸基を有する高分子又はその変性体を吸着させる工程 (吸着処理工程) と、上記水酸基を有する高分子又はその変性体を架橋する工程 (架橋処理工程) と、架橋された水酸基を有する高分子又はその変性体に官能基を導入する工程 (官能基導入工程) と、を備える方法により形成できる。以下、これらの工程について、具体的に説明する。

30

【 0 0 5 6 】

(吸着処理工程)

吸着処理工程においては、例えば、水酸基を有する高分子又はその変性体の溶液に、疎水性高分子粒子を含浸させることにより、疎水性高分子粒子表面に、水酸基を有する高分子又はその変性体を吸着させる。これにより、疎水性高分子粒子表面に、水酸基を有する高分子又はその変性体が固定化される。水酸基を有する高分子又はその変性体の溶液の溶媒としては、水酸基を有する高分子又はその変性体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 ~ 2 0 (m g / m L) が好ましい。

40

【 0 0 5 7 】

含浸方法としては、例えば、水酸基を有する高分子又はその変性体の溶液に疎水性高分子粒子を加えて一定時間放置する方法が挙げられる。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、例えば、疎水性高分子粒子が多孔構造を有する場合でも、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。

【 0 0 5 8 】

50

次いで、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又はその変性体を除去する。

【0059】

(架橋処理工程)

架橋処理工程においては、例えば、架橋剤を用いて、疎水性高分子粒子表面に吸着された水酸基を有する高分子又はその変性体を架橋反応させて、これらの架橋体を形成する。当該架橋体は、例えば、水酸基を有する3次元架橋網目構造を有する。

【0060】

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、及び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又はその変性体が、例えば、アミノ基を有する化合物(キトサン又はその変性体等)である場合には、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。

10

【0061】

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るが、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、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。

【0062】

架橋剤による架橋反応は、通常、水酸基を有する高分子又はその変性体が吸着された疎水性高分子粒子を、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。架橋剤の添加量が、上記下限値以上であると、被覆層が疎水性高分子粒子上に良好に保持される傾向にある。また、架橋剤の添加量が上記上限値以下であれば、水酸基を有する高分子又はその変性体の反応率が高い場合でも、水酸基を有する高分子又はその変性体の特性が損なわれ難い。

20

【0063】

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、例えば、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。

30

【0064】

例えば、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。

【0065】

水酸基を有する高分子又はその変性体が吸着された疎水性高分子粒子を分散、懸濁させる媒体は、例えば、高分子成分、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ことができる。上記媒体の具体例としては、水、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。

40

【0066】

架橋反応は、例えば、1~90の範囲の温度で行ってもよい。また、反応時間は、例えば、1~36時間であってもよく、1~24時間であってもよく、1~10時間であってもよい。

【0067】

架橋度を調整する場合、架橋反応を段階的に行うことができる。例えば、一度架橋反応を行った後、再度架橋反応させることによって、架橋の進行度を調整できる。

【0068】

架橋度は、熱分解による5%重量減少温度を測定し、その値から評価することができる

50

。架橋度が高い場合、重量減少開始温度は高くなり、架橋度が低い場合、重量減少開始温度も低くなる。熱分解による5%重量減少温度は、例えば、示差熱重量測定装置を用いて測定できる。

【0069】

架橋反応終了後、得られた粒子をろ別し、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る。これにより、疎水性高分子粒子の表面の少なくとも一部に、水酸基を有する高分子又はその変性体の架橋体を含む被覆層が形成された、架橋体被覆粒子を作製できる。

【0070】

(官能基導入工程)

官能基導入工程は、上記架橋体に官能基を導入する工程である。上記架橋体に官能基を導入する方法に特に制限はなく、任意の方法を選択できる。上記架橋体に官能基を導入する方法としては、例えば、上記架橋体に官能基を直接導入する方法、及び上記架橋体が有する水酸基を介して官能基を導入する方法が挙げられる。官能基の導入方法に特に制限はなく、官能基の種類等により適宜選択できる。水酸基を介して官能基を導入する方法としては、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。なお、水酸基を介して官能基を導入する場合、官能基は、架橋体が有する水酸基のうちの少なくとも一部に導入されていけばよい。

10

【0071】

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級アミン等が挙げられる。ハロゲン化アルキル化合物は、硫黄化合物、臭化物又は塩化物であってもよい。

20

【0072】

官能基として、弱酸性基であるカルボキシ基を導入する方法としては、例えば、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、架橋体被覆粒子の全質量に対して、0.2質量%以上であることが好ましい。

【0073】

官能基としてカルボキシ基を導入する方法は、例えば、上記架橋体が有する水酸基に、エピクロロヒドリン等のハロゲン基含有グリシジル化合物を反応させ、エポキシ基を導入した後、当該エポキシ基に、カルボン酸又はその塩を反応させる方法であってもよい。カルボン酸又はその塩としては、例えば、メルカプトプロピオン酸、及びメルカプト酢酸ナトリウムが挙げられる。

30

【0074】

官能基として、エポキシ基を導入する方法としては、例えば、上記架橋体に、エピハロヒドリン、エチレングリコールジグリシジルエーテル、1,2,3,4-ジエポキシブタン等のエポキシ基含有化合物を反応させる方法が挙げられる。エピハロヒドリンとして好ましいものとしては、エピクロロヒドリン、エピブromoヒドリン、エピヨードヒドリン、
-メチルエピクロロヒドリン、
-メチルエピブromoヒドリン、
-メチルエピヨードヒドリン等が挙げられる。これらのエポキシ基含有化合物の使用量は、架橋体被覆粒子の全質量に対して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。

40

【0075】

官能基としてエポキシ基を導入する方法は、例えば、上記架橋体が有する水酸基に、エピクロロヒドリン等のハロゲン基含有グリシジル化合物を反応させる方法であってもよい。

【0076】

官能基として、アミノ基を導入する方法としては、例えば、上記ハロゲン化アルキル化

50

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-、ジ-又はトリ-アルキルアミン、モノ-、ジ-又はトリ-アルカノールアミン、モノ-アルキル-モノ-アルカノールアミン、ジ-アルキル-モノ-アルカノールアミン、モノ-アルキル-ジ-ア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、架橋体被覆粒子の全質量に対して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。当該方法に用いられるハロゲン化アルキル化合物の具体例は、ジエチルアミノエチルクロライド塩酸塩を含む。

【0077】

官能基として、強酸性基であるスルホン酸基の導入方法としては、上記架橋体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架橋体被覆粒子を添加する方法等が挙げられる。反応条件は、30~90 で1~10時間であることが好ましい。

10

【0078】

また、アルカリ性雰囲気下で、上記架橋体に1,3-プロパンスルトンを反応させる方法によっても、上記架橋体に官能基を導入し得る。1,3-プロパンスルтонは、架橋体被覆粒子の全質量に対して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。

【0079】

本実施形態の分離材において、乾燥状態の分離材1g当たりの官能基のモル量(mmol)は、吸着させるタンパク質のサイズ、分離材の表面積、比重等に応じて適宜調整することが好ましい。

20

【0080】

本実施形態の分離材は、イオン交換担体として好適に使用し得る。また、本実施形態の分離材は、アフィニティ精製、タンパク質の静電的相互作用による分離等にも好適に使用し得る。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(例えば、液体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。より具体的には、本実施形態の分離材は、例えば、アフィニティークロマトグラフィー分野(特に抗体医薬品精製の分野)にも好適に利用できる。

30

【0081】

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。

40

【0082】

本実施形態の分離材は、疎水性高分子粒子1g当たり30~600mg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。

【0083】

本実施形態の分離材の水中での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、70MPa以上であってもよく、75MPa以上であってもよく、80MPa以上であってもよい。

【0084】

本明細書において、分離材の水中での5%圧縮変形弾性率(分離材が5%圧縮変形したときの圧縮弾性率、5%K値ともいう)は、以下の方法により算出された値をいう。

50

微小圧縮試験機（Fisher製）を用いて、室温（20～25）条件にて荷重負荷速度1mN/秒で、四角柱の平滑な端面（50μm×50μm）により、予め水中に浸漬させた分離材を50mN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。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。

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

F：分離材が5%圧縮変形したときの荷重（mN）

S：分離材が5%圧縮変形したときの圧縮変位（mm）

R：分離材の半径（mm）

【0085】

本実施形態の分離材は、カラムに充填した場合、カラム圧0.3MPaのときに通液速度が500cm/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、通常タンパク質分離用の分離材よりも速い通液速度500cm/h以上で使用することができる。なお、本明細書における通液速度とは、7.8×300mmのステンレスカラムに本実施形態の分離材を充填し、液を通じた際の通液速度を表す。

【0086】

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。

【0087】

本実施形態の分離材には、上記官能基を介して又は上記官能基とは別に、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。リガンド又はイオン交換基が更に導入された分離材は、例えば、アフィニティ精製、イオン交換精製等の用途に好適に使用し得る。

【0088】

本実施形態のカラムは、本実施形態の分離材を備えるものである。本実施形態のカラムは、例えば、カラムに本実施形態の分離材を充填することで製造できる。カラムに本実施形態の分離材を充填す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】

【0089】

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。

【0090】

（実施例1）

（疎水性の多孔質高分子粒子の合成）

500mLの三口フラスコに、モノマとしての純度96%のジビニルベンゼン（新日鉄住金株式会社製、商品名：DVB960）16g、多孔質化剤としてのヘキサノール16g及びジエチルベンゼン16g、並びに開始剤としての過酸化ベンゾイル0.64gをポリビニルアルコール（0.5質量%）分散剤水溶液に混合して、混合液を得た。得られた混合液を、マイクロプロセスサーバーを使用して乳化した後、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時間攪拌して粒子を得た。得られた粒子をろ別して、更にアセトンで洗浄し、疎水性の多孔質高分子粒子1を得た。得られた多孔質高分子粒子1の粒径をフロー型粒径測定装置で測定し、平均粒径を算出した。結果を表1に示す。

【0091】

（水酸基を有する高分子への疎水基の導入）

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

10

20

30

40

50

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。

【0092】

(変性アガロースの疎水基含有量の評価)

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。

【0093】

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、下記式より疎水基含有量を算出した。

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

$$\cdot C_{AG} : \text{変性されているアガロース構成単位の濃度}(\text{mmol/L}) \\ = A / G_{PE} \times 1000$$

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

$$\cdot A : \text{疎水基導入アガロースの真の吸光度} \\ = \text{疎水基を導入したアガロースの吸光度} - \text{変性されていないアガロースの吸収}$$

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

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

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

$$\cdot \text{変性されているアガロース構成単位の濃度}(\text{g/L}) = (C_{AG} \times \text{変性されているアガロース構成単位}(456 \text{ g/mol})) / 1000$$

【0094】

(水酸基を有する高分子の変性体の粒子へのコーティング)

20mg/mLの変性アガロース水溶液に多孔質高分子粒子1を70mL/粒子gの濃度で投入し、55で24h攪拌して、多孔質高分子粒子1に変性アガロースを吸着させた。次いで、変性アガロースを吸着させた多孔質高分子粒子1をろ別して、更に熱水で洗浄した。

【0095】

(コーティングした水酸基を有する高分子の変性体の架橋)

多孔質高分子粒子1の表面及び細孔内部に吸着した変性アガロースを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10gを0.4M水酸化ナトリウム水溶液に分散させ、0.02M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、純水で更に洗浄し、乾燥させることで、変性アガロースの架橋体を被覆層として有する架橋体被覆粒子を得た。

【0096】

(タンパク質の非特異吸着能の評価)

得られた架橋体被覆粒子0.2gを、BSA(Bovine Serum Albumin)濃度24mg/mLのTris-塩酸緩衝液(pH8.0)20mLに加え、24時間室温で攪拌した。その後、遠心分離で上澄み液を採取し、分光光度計で上澄み液の280nmの吸光度を測定することによって求めた上澄み液のBSA濃度より、粒子に吸着したBSA量を算出した。粒子1mLあたりのBSA量吸着量が、1mg以下である場合を「A」、1mg超5mg未満である場合を「B」、5mg以上である場合を「C」として評価した。結果を表1に示す。

10

20

30

40

50

【0097】

(カルボキシ基の導入)

得られた架橋体被覆粒子(乾燥質量1g)を、0.4Mの水酸化ナトリウム水溶液10mLに加えた後、エピクロロヒドリン0.6gを更に加え、室温で攪拌しながら3時間反応させた。反応終了後、粒子をろ別し、500mLの水で洗浄して、架橋体にエポキシ基を導入した。次いで、粒子に、水10mL、及び1Mのメルカプト酢酸ナトリウム水溶液10mLを加え、室温で24時間攪拌し、反応させた。反応終了後、粒子をろ別し、1000mLの水で洗浄して、架橋体にカルボキシ基を導入した。これにより本実施形態の分離材を得た。なお、本実施例における官能基導入剤は、メルカプト酢酸ナトリウムである。

10

【0098】

(カルボキシ基量の測定)

得られた分離材の官能基量を以下のように測定した。湿潤状態の分離材0.5gに、0.1Nの塩酸水溶液20gを加え、室温で30分攪拌した。攪拌後の分離材を吸引してろ別し、さらに、水500mLで洗浄し、洗浄液のpHが5以上であることを確認した。洗浄後の分離材に0.5Mの塩化ナトリウム水溶液10gを加え、室温で30分攪拌した。攪拌後の分離材の懸濁液を0.01N水酸化ナトリウム水溶液でpH7を終点として滴定することにより、乾燥状態の分離材1g当たりのカルボキシ基のモル量(mmol)を測定した。この結果を官能基密度(mmol/粒子g)として、表1に示す。

20

【0099】

(リガンドの固定化)

得られた分離材0.09gに、プロテインAを0.02g、WSC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)を0.02g、及びpH5.8に調整した50mMのPBSを2ml加えたのち、室温で24時間攪拌した。その後、粒子をろ別及び洗浄することによりリガンド固定化粒子を得た。

【0100】

(リガンド固定化量の算出)

24時間攪拌後の反応溶液から粒子をろ別した後、所定濃度の粒子を含む試料を調製した。当該試料の吸光度(280nm)を測定し、予め作成した検量線により、リガンド固定化量を算出した。結果を表1に示す。

30

【0101】

(水中での5%圧縮変形弾性率の算出)

得られた分離材の水中での5%圧縮変形弾性率を以下のようにして算出した。結果を表1に示す。

【0102】

微小圧縮試験機(Fisher製)を用いて、室温(20~25)条件にて荷重負荷速度1mN/秒で、四角柱の平滑な端面(50μm×50μm)により、予め水中に浸漬させた分離材を50mN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。

40

【0103】

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

F: 分離材が5%圧縮変形したときの荷重(mN)

S: 分離材が5%圧縮変形したときの圧縮変位(mm)

R: 分離材の半径(mm)

【0104】

(カラム特性評価)

得られた分離材を、濃度30質量%のスラリー(溶媒:メタノール)として、7.8×300mmのステンレスカラムに、15分充填した。その後、カラムに流速を変えなが

50

ら水を通し、流速とカラム圧との関係を測定し、0.3 MPa時の通液速度（線流速）を測定した。結果を表1に示す。

【0105】

（実施例2）

実施例1と同様にして、架橋体被覆粒子を作製した。

【0106】

（カルボキシ基の導入）

得られた架橋体被覆粒子（乾燥質量1g）を、0.4Mの水酸化ナトリウム水溶液10mLに加えた後、エピクロロヒドリン0.6gを更に加え、室温で攪拌しながら3時間反応させた。反応終了後、粒子をろ別し、500mLの水で洗浄して、架橋体にエポキシ基を導入した。次いで、粒子に、水酸化ナトリウム5gを水15mLに溶解させた水酸化ナトリウム水溶液15mLと、メルカプトプロピオン酸5gとを加え、室温で24時間攪拌し、反応させた。反応終了後、粒子をろ別し、1000mLの水で洗浄して、架橋体にカルボキシ基を導入した。これにより本実施形態の分離材を得た。なお、本実施例における官能基導入剤は、メルカプトプロピオン酸である。

10

【0107】

また、実施例1と同様にして、平均粒径、タンパク質の非特異吸着能、カルボキシ基量（官能基密度）、水中での5%圧縮変形弾性率、及びカラム特性（通液速度）を評価した。また、実施例1と同様にして、リガンドの固定化を行い、リガンド固定化量を算出した。結果を表1に示す。

20

【0108】

（実施例3）

実施例1と同様にして、架橋体被覆粒子を作製した。

【0109】

（エポキシ基の導入）

得られた架橋体被覆粒子（乾燥質量1g）を、0.4Mの水酸化ナトリウム水溶液10mLに加えた後、エピクロロヒドリン0.6gを更に加え、室温で攪拌しながら3時間反応させた。反応終了後、粒子をろ別し、500mLの水で洗浄し、架橋体にエポキシ基を導入した。これにより本実施形態の分離材を得た。

30

【0110】

（エポキシ基量の測定）

得られた分離材の官能基量を以下のように測定した。湿潤状態の分離材0.5gに水10g、1Nの塩酸水溶液1g加え、70℃で1時間攪拌し、反応させた。反応後、0.1N水酸化ナトリウムで中和滴定することにより、乾燥状態の分離材1g当たりのエポキシ基のモル量（mmol）を測定した。この結果を官能基密度（mmol/粒子g）として、表1に示す。

【0111】

（リガンドの固定化）

得られた分離材0.09gに、プロテインAを0.02g、及びpH10の0.5M炭酸バッファー（和光純薬工業社製の炭酸水素ナトリウム及び炭酸ナトリウムと、RO水とで調製）を2mL加え、30℃で24時間攪拌した。その後、粒子をろ別及び洗浄することによりリガンド固定化粒子を得た。

40

【0112】

（リガンド固定化量の算出）

24時間攪拌後の反応溶液から粒子をろ別した後、所定濃度の粒子を含む試料を調製した。当該試料の吸光度（280nm）を測定し、予め作成した検量線により、リガンド固定化量を算出した。結果を表1に示す。

【0113】

また、実施例1と同様にして、平均粒径、タンパク質の非特異吸着能、水中での5%圧縮変形弾性率、及びカラム特性（通液速度）を評価した。結果を表1に示す。

50

【0114】

(実施例4)

実施例1と同様にして、架橋体被覆粒子を作製した。

【0115】

(アミノ基の導入)

得られた架橋体被覆粒子(乾燥質量20g)を、5Mの水酸化ナトリウム水溶液200mLに加え、室温で1時間放置した。別途、ジエチルアミノエチルクロライド塩酸塩の所定量(10g)を200mL添加し、水溶液の温度を70℃まで上げ、攪拌しながら2時間反応させた。反応終了後、ろ過、水/エタノール(体積比5/1)で3回洗浄し、架橋体にジエチルアミノエチル(DEAE)基を導入した。これにより本実施形態の分離材を得た。

10

【0116】

(アミノ基量の測定)

得られた分離材の官能基量を以下のように測定した。湿潤状態の分離材0.5gを0.1N水酸化ナトリウム20mLに1時間浸漬し、室温で攪拌した。その後、溶液のpHが7以下となるように水で洗浄を行った。洗浄後の分離材を0.1N塩酸20mLに浸漬し、1時間攪拌させた。攪拌後の分離材をろ別後、塩酸水溶液を中和滴定することにより、乾燥状態の分離材1g当たりのアミノ基のモル量(mmol)を測定した。この結果を官能基密度(mmol/粒子g)として、表1に示す。

【0117】

また、実施例1と同様にして、平均粒径、タンパク質の非特異吸着能、水中での5%圧縮変形弾性率、及びカラム特性(通液速度)を評価した。結果を表1に示す。

20

【0118】

(比較例1)

市販のアガロース粒子(Capto DEAE(GEヘルスケア製、商品名))をそのまま分離材として用い、実施例1と同様に、平均粒径、タンパク質の非特異吸着能、水中での5%圧縮変形弾性率、及びカラム特性(通液速度)を評価した。結果を表1に示す。

【0119】

(比較例2)

多孔質高分子粒子1をそのまま分離材として用い、実施例1と同様に、平均粒径、タンパク質の非特異吸着能、水中での5%圧縮変形弾性率、及びカラム特性(通液速度)を評価した。結果を表1に示す。

30

【0120】

【表1】

項目	単位	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	比較例1	比較例2
疎水性高分子粒子	—	あり	あり	あり	あり	なし	あり
官能基含有高分子	—	あり	あり	あり	あり	あり	なし
非特異吸着 (官能基導入前)	—	A	A	A	A	A	C
官能基	—	カルボキシ基	カルボキシ基	エポキシ基	アミノ基	アミノ基	なし
官能基密度	mmol/粒子g	0.154	0.129	0.161	0.42	2.02	—
水中での 5%圧縮変形弾性率	MPa	100	90	110	85	59	140
通液速度 (3mPa時)	cm/h	1300	1280	1290	1255	250	1200
平均粒径	μm	120	121	119	121	90	100
プロテインA固定化量	g/粒子g	0.27	0.23	0.28	—	—	—

40

【0121】

表1の結果から、実施例1~4の分離材は、タンパク質の非特異吸着が低減され、カラ

50

Δに充填したときの通液性に優れていることがわかる。また、実施例 1 ~ 4 の分離材は、水中での 5 % 圧縮変形弾性率も高いことがわかる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	B 0 1 D 15/38	
	C 0 8 J 7/04	C E P T
	C 0 8 J 7/04	C E T

(72)発明者 渡邊 優
 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

(72)発明者 河内 史彦
 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

(72)発明者 後藤 昭人
 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

(72)発明者 安江 健
 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

(72)発明者 宮澤 笑
 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

Fターム(参考) 4D017 AA09 BA07 CA14 CB01 DA03 EA05
 4F006 AA15 AA51 AB03 BA10 CA09 EA01
 4G066 AB05D AB06D AB07D AB13D AC01B AC01C AC03B AC14C AC33B AC35B
 AC37B BA05 BA09 BA20 BA22 BA38 CA54 DA07 EA02