(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
2013 年 12 月 5 日(05.12.2013)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2013/180176 A1

(51) 国際特許分類:
C08B 37/16 (2006.01) *B01J 20/30* (2006.01)
B01J 20/26 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/064905

(22) 国際出願日: 2013 年 5 月 29 日(29.05.2013)

(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 2012-123281 2012 年 5 月 30 日(30.05.2012) JP

(71) 出願人: 国立大学法人熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目３９番１号 Kumamoto (JP). ＪＮＣ株式会社(JNC CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008105 東京都千代田区大手町二丁目２番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 坂田 眞砂代 (SAKATA, Masayo); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目３９番１号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 戸所 正美(TODOKORO, Masami); 〒2368605 神奈川県横浜市金沢区大川５番１号 ＪＮＣ株式会社 横浜研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋３丁目４番１０号 アクロポリス２１ビル６階 Tokyo (JP).

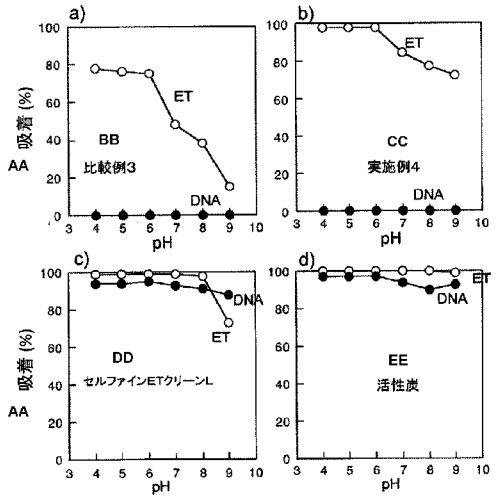
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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).

[続葉有]

(54) **Title**: ENDOTOXIN ADSORBENT

(54) 発明の名称 : エンドトキシン吸着材



AA Adsorption (%)
BB Comparative example 3
CC Example 4
DD Cellufine ET-Clean L
EE Activated carbon

(57) **Abstract**: Provided is a means for selectively removing endotoxin in the presence of a negatively charged substance such as a nucleic acid. A polymer obtained by crosslinking cyclodextrin with an isocyanate-based crosslinking agent is brought into contact with a solution that contains both endotoxin and a negatively charged substance such as a nucleic acid, thereby selectively removing the endotoxin.

(57) 要約: 核酸等のマイナスチャージを示す物質の共存下で、エンドトキシンを選択的に除去する手段を提供する。シクロデキストリンをイソシアネート系架橋剤で架橋して得られるポリマーと、核酸等のマイナスチャージを示す物質およびエンドトキシンを含有する溶液とを接触させることにより、エンドトキシンを選択的に除去する。

WO 2013/180176 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： エンドトキシン吸着材

技術分野

[0001] 本発明は、エンドトキシン吸着材、及びそれを用いたエンドトキシン（以下、「ＥＴ」ともいう）の除去方法に関する。本発明は、特に、ＤＮＡ等の酸性物質の共存下でＥＴを選択的に除去する方法に関する。

背景技術

[0002] ＥＴは、グラム陰性細菌の細胞壁外膜に存在するリポポリサッカライドを主成分とする毒性物質であり、菌が死滅する際に遊離してくるものである。ＥＴは、注射用の医薬品への混入等により生体内に取り込まれた場合、発熱やＥＴショックといった有害作用を引き起こす。また、ＥＴは細胞自体に対しても作用しうるために、各種の細胞を用いる実験に影響を与える可能性がある。これらＥＴの有害作用を防ぐ為に、注射溶液、体液と接触する物質、および実験用の試薬などからＥＴを除去する方法が研究されてきた。

[0003] ＥＴの除去方法としては、従来から、活性炭やイオン交換体による吸着法、膜やメンブレンフィルター等を使う濾過法、高温・高圧処理、酸処理、またはアルカリ処理による分解法が知られている。特にＥＴを吸着し除去する方法として、塩基性の抗生物質であるポリミキシンをリガンドとした吸着材（例えば非特許文献１、特許文献１、特許文献２を参照）や、同じく塩基性の抗生物質であるアミカシンなどをリガンドとした吸着材（例えば特許文献３を参照）などが知られている。これらの抗生物質をリガンドとした吸着材は、ＥＴを吸着するが、ＤＮＡなどの核酸も同時に吸着することが知られており、核酸の精製には不向きである。例えば、ポリミキシンーアガロースを用いたＤＮＡ溶液からのＥＴ除去の実験では、ＤＮＡの回収率は最高でも６０％であり、すなわち少なくとも４０％のＤＮＡがＥＴと共に除去される（例えば非特許文献２を参照）。

[0004] アミノ基を導入することにより製造したカチオン性（塩基性）の吸着材も

研究されている。例えば、ポリグルタミン酸メチルエステルにジアミンを反応させてアミノ基を導入することにより製造したカチオン性の吸着材が知られている（例えば特許文献４を参照）。この吸着材は細孔径がデキストランの分子量にして１０００以下で実質的に無多孔質であるという特徴を有し、アルブミンの共存下でＥＴの選択的除去が可能である。

[0005] 高分子のカチオン性物質をリガンドにした吸着材についても研究がされている。高分子としては、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリリジンなどが使われている（例えば非特許文献３、非特許文献４を参照）。これらの内、イプシロンポリリジンをリガンドとした吸着材は、特に基材の排除限界分子量が６０００以下の場合に、タンパク質溶液からのＥＴの除去が可能である。（例えば特許文献５を参照）。これらの塩基性（カチオン性）物質をリガンドとする吸着材は、イプシロンポリリジンを固定化した吸着材のように、タンパク質溶液からＥＴを選択的に取り除くことはできるが、ＤＮＡなどの核酸溶液からＥＴを選択的に取り除くことはできない。一方、ヘパリンのような高度に酸性な物質が共存する溶液から選択的にＥＴを除去する吸着材として、アミノ基を部分的にグリシジルエーテルなどで修飾したイプシロンポリリジンをリガンドとする吸着材が報告されている（例えば特許文献６を参照）。しかしながら、このリガンドは基本的にカチオン性であり、修飾によりヘパリン吸着は低減されるが、完全にヘパリン吸着を防げるわけではない。

[0006] シクロデキストリン（以下、「ＣＤ」ともいう）はグルコースが環状につながった分子であり、環の内側に入り込める化合物を包摂することが広く知られている。ＣＤをエピクロルヒドリンにより架橋することでビーズ状のＣＤポリマーを製造する方法が報告されている（例えば特許文献７、特許文献８、特許文献９を参照）。このようなＣＤポリマーあるいはＣＤとポリスチレン樹脂とのポリマーを、ビスフェノールＡなどの環境ホルモンの吸着材として用いることが知られている（例えば特許文献１０、特許文献１１を参照）。また、このようなＣＤポリマーを、コーヒー抽出液からのクロロゲン酸

の除去に用いることが知られている（例えば特許文献１２を参照）。しかしながら、これらのＣＤポリマーをＥＴの除去に用いることについては記載されていない。また、これらのＣＤポリマーはいずれもエピクロルヒドリンを架橋剤として用いて製造されるものである。特許文献８には、架橋剤として、エピクロルヒドリン以外にもジエポキシ化合物、ジイソシアネート、およびアクリルアミド誘導体等が例示されているが、エピクロルヒドリン以外の架橋剤材を用いて製造されるＣＤポリマーの性質は明らかにされていない。

[0007] 一方、ＣＤをジイソシアネート化合物により架橋してポリマーを調製し、そのポリマーをアルギン酸水溶液と混合した後に塩化カルシウム水溶液に滴下して球状のＣＤポリマーを調製し、その球状ポリマーで環境に影響をもたらすフェノール化合物を吸着させる発明がある（例えば特許文献１３を参照）。しかしながら、アルギン酸等と混合する前のＣＤポリマー単独でのフェノール化合物吸着能については示されていない。また、ジイソシアネート化合物を架橋剤として用いて製造したＣＤポリマーをＥＴの除去に用いることについては記載されていない。

[0008] また、エピクロルヒドリン等の架橋剤でＣＤを架橋して得られるポリマー樹脂を用いて血液中のリポ多糖類を吸着除去する試みがなされている（例えば特許文献１４を参照）。しかしながら、当該ＣＤポリマー樹脂によりＥＴを選択的に吸着除去できるかは記載されていない。また、特許文献１４には、架橋剤として、エピクロルヒドリン以外に、イソシアネート、ポリアミン、アクリレート、及びカーボネートが例示されているが、エピクロルヒドリン以外の架橋剤を用いて製造されるＣＤポリマー樹脂の性質は明らかにされていない。

[0009] また、エピクロルヒドリンでＣＤを架橋して得られるＣＤポリマービーズを用いてＤＮＡ溶液からＥＴを選択的に除去する試みがなされている（例えば非特許文献５を参照）。当該ＣＤポリマービーズによればＤＮＡの吸着がほとんど起こらず、ＥＴを選択的に除去できる。しかしながら、当該ＣＤポリマービーズによって吸着除去できるＥＴは総量の８０％程度であり、２０

％程度のＥＴは除去できずに溶液中に残存する。すなわち、当該ＣＤポリマービーズにはＥＴ吸着能の点で改善の余地があった。

[0010] また、ＥＴを含まないかＥＴを減少させた遺伝子治療のための核酸及び／またはオリゴヌクレオチドの製造方法が報告されている（例えば特許文献１５を参照）。特許文献１５には、界面活性材を含むＥＴ除去バッファーあるいはアルカリやＳＤＳを含むバッファーで事前にＥＴ除去処理した核酸溶液、またはニッケルキレートクロマトグラフィーもしくはポリミキシンやＤＮＡ　ＥＴＯＸ等を用いたクロマトグラフィーでＥＴ除去処理した核酸溶液を、無機クロマトグラフィーの支持体や高い塩濃度でＤＮＡを保持するイオン交換体を用いて処理し、ＤＮＡを精製する方法が示されている。しかしながら、当該方法は、非常に煩雑であり、多くの溶媒や塩類等の試薬と時間を要する。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開昭59-193135

特許文献2：特許第3817808号

特許文献3：特開2000-189792

特許文献4：特開平4-256438

特許文献5：特開2002-263486

特許文献6：特開2007-145743

特許文献7：特公昭60-11961

特許文献8：特開昭60-20924

特許文献9：特開2006-143953

特許文献10：特開2003-226737

特許文献11：特開2003-226755

特許文献12：特開平7-322823

特許文献13：特許第4683632号（特開2006-83379）

特許文献14：特表2009-502905

特許文献15：特表平9-508406

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Isserkutz A. C., J. Immunol. Methods 61, 275-281 (1983)

非特許文献2：Phillip M. Montbriand, et al., Journal of Biotechnology 44 (1996) 43-46

非特許文献3：Chuichi H., et al., Journal of Chromatography B, 781 (2002) 419-432

非特許文献4：Dagmar Petsch, et al., Journal of Biotechnology 76 (2000) 97-119

非特許文献5：Masayo Skata, et al., ANALYTICAL SCIENCES FEBRUARY (2011) VOL.27

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 従来、エンドトキシン（ＥＴ）を吸着除去する材料としては、ポリミキシンのような塩基性抗生物質をリガンドにした吸着材、ポリリジン、εポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミンなどのポリカチオンをリガンドにした吸着材、または不溶性担体にアミノ基などプラスチャージを導入した吸着材が開発され使用されて来たが、それらの吸着材では、ＤＮＡなどの核酸の共存下でＥＴを選択的に除去する事ができない。一方、エピクロルヒドリンでＣＤを架橋して得られるＣＤポリマーを用いることで、ＤＮＡの共存下でＥＴを選択的に除去する事が可能であるが、当該ポリマーにはＥＴ吸着能の点で改善の余地があった。本発明は、核酸等のマイナスチャージを示す物質の共存下で、ＥＴを選択的に除去する手段、および当該手段に利用できるエンドトキシン吸着材（ＥＴ吸着材）を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、上記課題を解決するべく鋭意検討を重ねた結果、シクロデキストリンをイソシアネート系架橋剤で架橋して得られるポリマーを用いる

ことにより、核酸等のマイナスチャージを示す物質の共存下で、ＥＴを選択的に除去することが可能であることを発見し、本発明を完成させた。

[0015] すなわち、本発明は下記の構成を含む。

[１]

以下の特徴（１）～（４）を有する、シクロデキストリンのポリマー：

（１）下記式１に示すＮ／Ｃ＝６～１５である；

Ｎ／Ｃ（モル％）＝窒素含有量（モル）÷炭素含有量（モル）×１００・・・（式１）

（２）シクロデキストリンの水酸基の一部がウレタン結合を形成している；

（３）水に不溶性である；

（４）陰イオン交換容量が０．１ｍｅｑ／ｇ未満である。

[２]

シクロデキストリンと架橋剤を反応させることを含む、前記ポリマーの製造方法であって、

前記架橋剤が、分子当たり、１またはそれ以上のイソシアネート基と、水酸基と反応しうる１またはそれ以上の官能基を有する化合物である、方法。

[３]

前記水酸基と反応しうる官能基がイソシアネート基である、前記方法。

[４]

基材と、該基材に固定化された前記ポリマーとを含む、エンドトキシン吸着材。

[５]

前記ポリマーを基材へ固定化することを含む、前記エンドトキシン吸着材の製造方法。

[６]

基材、シクロデキストリン、および架橋剤を反応させることを含む、前記エンドトキシン吸着材の製造方法であって、

前記架橋剤が、１またはそれ以上のイソシアネート基と、水酸基と反応し

うる１またはそれ以上の官能基を有する化合物である、方法。

［７］

前記水酸基と反応しうる官能基がイソシアネート基である、前記方法。

［８］

前記ポリマーまたは前記吸着材と、マイナスチャージを示す目的物質およびエンドトキシンを含有する溶液を接触させることを含む、エンドトキシンを除去する方法。

［９］

前記ポリマーまたは前記吸着材と、マイナスチャージを示す目的物質およびエンドトキシンを含有する溶液とを接触させることを含む、エンドトキシンの除去されたマイナスチャージを示す目的物質を含有する溶液の製造方法。

［１０］

前記マイナスチャージを示す目的物質が核酸である、前記方法。

［１１］

前記核酸がＤＮＡである、前記方法。

［１２］

前記核酸がＲＮＡである、前記方法。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]γＣＤおよび実施例４のＣＤポリマーのＩＲチャートを示す図。

[図2]各ＣＤポリマーのＥＴ吸着能を示す図。

[図3]ＥＴおよびＤＮＡの吸着能とイオン強度の関係を示す図。

[図4]ＥＴおよびＤＮＡの吸着能とｐＨの関係を示す図。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0018] 本願第１の発明は、下記の特徴（１）～（４）を有する、シクロデキストリン（ＣＤ）のポリマー（以下、「本発明のＣＤポリマー」ともいう）である。

（１）炭素原子に対して、モル比で６％～１５％の窒素原子を含有する；

（２）シクロデキストリンの水酸基の一部がウレタン結合を形成している；

（３）水に不溶性である；

（４）実質的に陰イオン交換能を示さない。

[0019] ＣＤは、複数分子のＤ－グルコースがα－１，４グリコシド結合により結合した環状構造を有する化合物である。ＣＤは、その空洞に種々の有機分子を包接することが知られている。ＣＤとして、具体的には、α－シクロデキストリン、β－シクロデキストリン、γ－シクロデキストリンが挙げられる。それぞれの特徴を表１に示す。表中、「グルコース単位」とは、ＣＤ１分子を形成するグルコース分子の個数、すなわちＣＤの環状構造を形成するグルコース分子の個数をいう。

[0020] [表1]

表１

名称	グルコース単位	分子量	空洞径	Cas No.
α－シクロデキストリン	６個	972	約0.6nm	10016-20-3
β－シクロデキストリン	７個	1135	0.7-0.8nm	7585-39-9
γ－シクロデキストリン	８個	1297	0.9-1.0nm	17465-86-0

[0021] ＣＤポリマーは、ＣＤが架橋された構造を有するポリマーである。本発明のＣＤポリマーは、例えば、ＣＤを後述する架橋剤により架橋することにより得られる。本発明のＣＤポリマーにおいては、１種のＣＤが架橋されていてもよく、２種またはそれ以上のＣＤが架橋されていてもよい。２種またはそれ以上のＣＤが架橋されている場合、各ＣＤの比率は特に制限されず、当業者が適宜選択してよい。

[0022] 本発明のＣＤポリマーは、炭素原子に対して、モル比で６％～１５％の窒素原子を含有する。すなわち、本発明のＣＤポリマーにおいては、下記式１に示すＮ／Ｃ（モル％）＝６～１５である。本発明における窒素含有量および炭素含有量は、元素分析により決定する。元素分析は、燃焼法により行う。

Ｎ／Ｃ（モル％）＝窒素含有量（モル）÷炭素含有量（モル）×１００

・・・（式１）

[0023] 本発明のＣＤポリマーは、水に不溶である。本発明において、「水に不溶」とは、本発明のＣＤポリマーの水への溶解度が２５℃で１ｍｇ／Ｌ未満、好ましくは１μｇ／Ｌ未満、より好ましくは０μｇ／Ｌであることをいう。

[0024] 本発明のＣＤポリマーは、実質的に陰イオン交換能を示さない。本発明において、「実質的に陰イオン交換能を示さない」とは、本発明のＣＤポリマーの陰イオン交換容量（ＡＥＣ）が０．１ｍｅｑ／ｇ未満であることをいう。本発明のＣＤポリマーは、陰イオン交換容量（ＡＥＣ）が０．１ｍｅｑ／ｇ未満である限り、陰イオン交換基を有していてもよく、有していなくともよい。本発明においては、本発明のＣＤポリマーが実質的に陰イオン交換能を示さないことにより、ＥＴと共存するマイナスチャージを示す目的物質の非特的吸着を低減できると考えられる。

[0025] また、本発明のＣＤポリマーは、陽イオン交換基を有していてもよく、有していなくともよい。本発明のＣＤポリマーが有する陽イオン交換基の量は、特に制限されないが、例えば、後述するＥＴ溶液（マイナスチャージを示す目的物質およびＥＴを含有する溶液）中にプラスチャージを有する物質が存在する場合に当該プラスチャージを有する物質の非特定的吸着を低減する観点から、少ないのが好ましい場合があり得る。例えば、本発明のＣＤポリマーは、実質的に陽イオン交換能を示さなくてもよい。本発明において、「実質的に陽イオン交換能を示さない」とは、本発明のＣＤポリマーの陽イオン交換容量（ＣＥＣ）が０．１ｍｅｑ／ｇ未満であることをいう。

[0026] イオン交換容量は、ｐＨ滴定法により定量する。イオン交換容量の定量については、具体的には、実施例の記載を参照することができる。

[0027] イオン交換基は、例えば、架橋反応により導入されたものであってもよく、架橋反応とは別途導入されたものであってもよい。イオン交換基は、フリー体であってもよく、塩を形成していてもよい。

[0028] 本発明のＣＤポリマーにおいては、ＣＤの水酸基の一部がウレタン結合を形成している。ここでいうウレタン結合とは、「（ＣＤ）－Ｏ－ＣＯ－ＮＨ

－Ｒ」で示される構造である。同構造中、「（ＣＤ）」は本発明のＣＤポリマーを構成するＣＤ分子を、「Ｒ」は任意の構造を示す。なお、本発明のＣＤポリマーにおいては、本発明のＣＤポリマーを構成する全てのＣＤ分子がウレタン結合を有していてもよく、一部のＣＤ分子はウレタン結合を有していなくともよい。ウレタン結合は、ＣＤと後述するイソシアネート系架橋剤とを反応させることにより形成することができる。すなわち、ウレタン結合は、具体的には、ＣＤ分子中の水酸基と、後述するイソシアネート系架橋剤中のイソシアネート基とが結合することにより形成することができる。本発明のＣＤポリマーを構成する全ＣＤ分子中の全水酸基に対するウレタン結合を形成する水酸基の比率は、例えば、架橋剤の種類や本発明のＣＤポリマーにおけるＮ／Ｃ（モル％）等の諸条件に応じて適宜設定される。

[0029] 本発明のＣＤポリマーの膨潤度は、特に制限されないが、例えば２～６であってよく、３～５であってもよい。膨潤度とは、本発明のＣＤポリマーを乾燥させた際の、乾燥重量に対する、乾燥前の体積（測定体積）の比率をいう。すなわち、膨潤度は、下記式３により算出できる。膨潤度の測定については、具体的には、実施例の記載を参照することができる。

膨潤度（ｗｅｔ－ｍＬ／ｄｒｙ－ｇ）＝測定体積（ｍＬ）／乾燥重量（ｇ）

・・・（式３）

[0030] 本発明のＣＤポリマーの粒子の形状は、特に制限されないが、例えば、粒状であってもよく、球状であってもよい。本発明のＣＤポリマーの粒子の平均粒径は、特に制限されないが、例えば、０．１μｍから５００μｍ、好ましくは１０μｍから３００μｍ、より好ましくは４０μｍから１５０μｍであってよい。本発明において、「平均粒径」とは、レーザ回折・散乱法によって得られた粒度分布における積算値５０％での粒径をいう。平均粒径は、具体的には、例えば、レーザ回折式粒度分布測定装置を用いて測定することができる。

[0031] 本発明のＣＤポリマーは、例えば、ＣＤを架橋剤と反応させることにより製造できる。すなわち、本発明は、ＣＤを架橋剤と反応させることを含む、

本発明のＣＤポリマーの製造方法を提供する。ここでいう「架橋剤」とは、分子当たり、１またはそれ以上のイソシアネート基と、水酸基と共有結合を形成しうる１またはそれ以上の官能基を有する化合物をいう。本発明においては、当該架橋剤を「イソシアネート系架橋剤」ともいう。水酸基と共有結合を形成しうる官能基としては、カルボキシル基やイソシアネート基が挙げられる。水酸基と共有結合を形成しうる官能基としては、イソシアネート基が好ましい。すなわち、架橋剤は、分子当たり、２またはそれ以上のイソシアネート基を有するのが好ましい。２またはそれ以上のイソシアネート基を有する化合物として、具体的には、例えば、下記表２に示す化合物が挙げられる。また、架橋剤は、その他の官能基を有していてもよい。例えば、架橋剤は、本発明の効果を損なわない範囲で、イオン交換基を有していてもよい。なお、架橋剤としては、１種の架橋剤を用いてもよく、２種またはそれ以上の架橋剤を組み合わせて用いてもよい。

[0032] [表2]

表２

略号	化合物名	分子量	Cas No.
HMDI	ヘキサメチレンジイソシアネート	168	822-06-0
DIDPM	ジイソシアン酸4，4’ジフェニルメタン	250	101-68-8
IPDI	イソホロンジイソシアネート	222	4098-71-9
TLDI	トリレンジイソシアネート	174	26471-62-5
BIPB	1,3-ビス(2-イソシアナト-2-プロピル)ベンゼン	244	2778-42-9
BIMCH	1,3-ビス(イソシアナトメチル)シクロヘキサン	194	38661-72-2
DCHMDI	ジシクロヘキシルメタン4,4’-ジイソシアナート	262	5124-30-1
TMHMDI	トリメチルヘキサメチレンジイソシアナート	210	28679-16-5

[0033] ＣＤとイソシアネート系架橋剤との反応（以下、「架橋反応」ともいう）は、適当な溶媒中で行うことができる。溶媒は、例えば、イソシアネート基との反応性を有しない溶媒であるのが好ましい。イソシアネート基との反応性を有しない溶媒として、具体的には、例えば、ジメチルアセトアミド（DMAC）およびジメチルホルムアミド（DMF）などのアミド類、ジオキサン、ジエチルエーテル、およびテトラヒドロフランなどのエーテル類、ならびにジメチルスルホキサイドが挙げられる。一方、水、アルコール、チオール、アミンなどの溶媒は、イソシアネート基との反応性の観点から、本発明の効果を

損なわない範囲で使用してもよいが、使用しないのが好ましい。なお、溶媒としては、１種の溶媒を用いてもよく、２種またはそれ以上の溶媒を組み合わせて用いてもよい。

[0034] 架橋反応は、例えば、それぞれ溶媒に溶解させたＣＤおよび架橋剤を混合することにより行ってもよく、ＣＤおよび架橋剤の一方を溶解させた溶媒に他方を添加することにより行ってもよく、ＣＤおよび架橋剤の両方を同時に溶媒に溶解することにより行ってもよい。架橋反応は、例えば、ＣＤを溶解させた溶媒に架橋剤を添加することにより行うのが好ましい。

[0035] 架橋反応を行う際の反応温度は、架橋剤の種類、溶媒の種類、および反応時間等の諸条件に応じて適宜設定することができる。反応温度は、特に制限されないが、例えば、１０℃～１００℃であってよく、５０℃～９０℃であってもよい。

[0036] 架橋反応を行う際の反応時間は、架橋剤の種類、溶媒の種類、および反応温度等の諸条件に応じて適宜設定することができる。反応時間は、特に制限されないが、例えば、３０分～２４時間であってよく、１時間～１０時間であってもよい。

[0037] 本発明のＣＤポリマーを製造する際の、ＣＤに対する架橋剤（ＣＬ）のモル比（ＣＬ/ＣＤ）は、例えば、１から２０であってよい。ＣＤに対する架橋剤のモル比（ＣＬ/ＣＤ）は、ポリマーの強度の観点から２から１０が好ましく、ＥＴ吸着能の観点から３から７がより好ましい。

[0038] 本発明のＣＤポリマーは、そのままエンドトキシン吸着材（ＥＴ吸着材）として利用できる。すなわち、本発明は、本発明のＣＤポリマーからなるＥＴ吸着材を提供する。また、本発明のＣＤポリマーは、粉砕等の加工を行ってからＥＴ吸着材として利用してもよい。本発明のＣＤポリマーは、ＣＤとイオン交換基を有さない架橋剤のみを原料として製造された場合、理論的にイオン交換基を有さない。そのようなＣＤポリマーは、イオン交換基がＥＴの選択的吸着に予期せぬ影響を与える可能性がない点で、ＥＴの吸着に好ましく用いることができる。

[0039] また、本発明のＣＤポリマーは、基材に固定化してＥＴ吸着材として利用できる。すなわち、本願第２の発明は、基材と、該基材に固定化された本発明のＣＤポリマーとを含む、ＥＴ吸着材である。

[0040] 本願第２の発明であるＥＴ吸着材において、ＣＤポリマーは、共有結合により基材に固定化されていてもよく、非共有結合により基材に固定化されていてもよい。ＣＤポリマーは、共有結合により基材に固定化されているのが好ましい。

[0041] 本願第２の発明であるＥＴ吸着材は、例えば、あらかじめ製造された本発明のＣＤポリマーを基材に固定化することにより製造できる。すなわち、本発明は、本発明のＣＤポリマーを基材に固定化することを含む、ＥＴ吸着材の製造方法を提供する。固定化の手法は、本発明のＣＤポリマーが有する官能基の種類や基材が有する官能基の種類等の諸条件に応じて適宜選択することができる。

[0042] 例えば、水酸基を有する基材を用いる場合、本発明のＣＤポリマー中に残存する水酸基と、基材中の水酸基とを上述したイソシアネート系架橋剤で架橋させることにより、本発明のＣＤポリマーを基材に固定化することができる。すなわち、固定化は、例えば、基材および本発明のＣＤポリマーをイソシアネート系架橋剤と反応させることによって行うことができる。固定化は、上述したような適当な溶媒中で行うことができる。また、固定化の反応温度や反応時間については、上述した本発明のＣＤポリマーを製造する際の架橋反応の反応温度や反応時間についての記載を準用してもよい。

[0043] 固定化は、例えば、それぞれ溶媒に溶解または分散させた基材、本発明のＣＤポリマー、および架橋剤を混合することにより行ってもよく、基材、本発明のＣＤポリマー、および架橋剤を任意の順番で溶媒に溶解または分散させることにより行ってもよく、基材、本発明のＣＤポリマー、および架橋剤を同時に溶媒に溶解または分散させることにより行ってもよい。本発明のＣＤポリマーは、粉砕等の加工を行ってから固定化に供してもよい。

[0044] また、本願第２の発明であるＥＴ吸着材は、例えば、基材およびＣＤをイ

ソシアネート系架橋剤と反応させることによっても製造できる。すなわち、本発明は、基材およびＣＤをイソシアネート系架橋剤と反応させることを含む、ＥＴ吸着材の製造方法を提供する。反応は、上述したような適当な溶媒中で行うことができる。また、反応温度や反応時間については、上述した本発明のＣＤポリマーを製造する際の架橋反応の反応温度や反応時間についての記載を準用してもよい。

[0045] 反応は、例えば、それぞれ溶媒に溶解または分散させた基材、ＣＤ、および架橋剤を混合することにより行ってもよく、基材、ＣＤ、および架橋剤を任意の順番で溶媒に溶解または分散させることにより行ってもよく、基材、ＣＤ、および架橋剤を同時に溶媒に溶解または分散させることにより行ってもよい。反応は、例えば、ＣＤを溶解させた溶媒に架橋剤を添加して架橋反応を進行させ、次いで基材を添加することにより行ってもよい。

[0046] なお、「基材およびＣＤをイソシアネート系架橋剤と反応させること」には、基材、ＣＤ、およびイソシアネート系架橋剤が原料として用いられる限り、基材自体がイソシアネート系架橋剤やそれと縮合したＣＤと共有結合を形成する場合に加えて、基材自体はイソシアネート系架橋剤やそれと縮合したＣＤと共有結合を形成しないが、非共有結合によりＣＤポリマーが基材に固定化されたＥＴ吸着材が形成される場合を含む。

[0047] 基材は、本発明のＣＤポリマーを固定化することによりＥＴ吸着材として利用できるものであれば特に制限されない。基材としては、例えば、すでに知られている吸着材やクロマトグラフィーの担体、ろ紙、膜、フィルター、中空糸、繊維、ナノファイバーに加工できる高分子、無機材料が挙げられる。基材として、具体的には、例えば、セルロース、アガロース、デンプン、アミロース、デキストラン、プルラン、グルコマンナンなどの多糖類；ポリアクリル酸またはその誘導体、ポリビニルアルコール、ナイロン、ポリスルホン、ポリアクリルニトリル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどの合成高分子；ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、ヒドロキシアパタイトなどの無機材料が挙げられる。基材は、本発明のＣＤポリマーを共有

結合により固定化するための官能基（以下、「固定化用官能基」ともいう）を有するのが好ましい。固定化用官能基としては、例えば、ＣＤポリマーを基材と直接結合させる場合には、ＣＤポリマー中の水酸基と共有結合を形成しうる官能基が挙げられる。また、固定化用官能基としては、例えば、架橋剤等の他の化合物を介してＣＤポリマーを基材と結合させる場合には、当該化合物中の官能基と共有結合を形成しうる官能基が挙げられる。例えば、イソシアネート系架橋剤を用いて本発明のＣＤポリマーを基材に固定化できる点を考慮すると、基材は、水酸基を有するのが好ましい。水酸基を有する基材としては、例えば、多糖類が挙げられる。多糖類としては、例えば、特にセルロース、アガロース、デキストランはクロマトグラフィーの担体としての使用実績もあり、特に好ましく使用することができる。「固定化用官能基」は、基材が本来的に有する官能基であってもよく、基材に導入された官能基であってもよい。例えば、ジオールを導入したシリカゲルを基材として用いることができる。シリカゲルへのジオールの導入は、例えば、シリカゲルをエポキシ化し、水分子を付加して開環させることにより行うことができる。シリカゲルへのジオールの導入については、具体的には、実施例の記載を参照することができる。なお、基材としては、１種の基材を用いてもよく、２種またはそれ以上の基材を組み合わせて用いてもよい。

[0048] 本願第１の発明であるＣＤポリマー（同ポリマーからなるＥＴ吸着材を含む）または本願第２の発明であるＥＴ吸着材と、ＥＴを含有する溶液とを接触させることにより、当該溶液からＥＴを除去することができる。なお、以下、本願第１の発明であるＣＤポリマー（同ポリマーからなるＥＴ吸着材を含む）および本願第２の発明であるＥＴ吸着材を総称して「本発明のＥＴ吸着材」ともいう。

[0049] ＥＴはリポポリサッカライドとも呼ばれ、リン酸化された糖に脂質が結合したリピッドＡと多糖とが結合した物質であり、マイナスチャージを示す物質である。本発明のＥＴ吸着材は、特に、ＥＴとＥＴ以外のマイナスチャージを示す物質とが共存している場合に、ＥＴを選択的に除去するのに有用で

ある。なお、本発明において、そのようなＥＴ以外のマイナスチャージを示す物質を、「マイナスチャージを示す目的物質」ともいう。

[0050] すなわち、本願第３の発明は、本発明のＥＴ吸着材と、マイナスチャージを示す目的物質およびＥＴを含有する溶液とを接触させることを含む、ＥＴを除去する方法（以下、「本発明のＥＴ除去方法」ともいう）である。以下、マイナスチャージを示す目的物質およびＥＴを含有する溶液を、「ＥＴ溶液」ともいう。ＥＴ溶液は、もともとマイナスチャージを示す目的物質およびＥＴを含有する溶液であってもよく、ＥＴに汚染されたマイナスチャージを示す目的物質を溶媒に溶解することにより調製された溶液であってもよい。

[0051] また、本発明のＥＴ除去方法により、ＥＴの除去された、マイナスチャージを示す目的物質を含有する溶液が得られる。すなわち、本発明のＥＴ除去方法の一態様は、本発明のＥＴ吸着材と、マイナスチャージを示す目的物質およびＥＴを含有する溶液とを接触させることを含む、ＥＴの除去されたマイナスチャージを示す目的物質を含有する溶液の製造方法である。また、同方法により得られたＥＴの除去された溶液からマイナスチャージを示す目的物質を回収することで、ＥＴの除去されたマイナスチャージを示す目的物質が得られる。

[0052] 本発明において、「マイナスチャージを示す物質」とは、分子内に陰イオンになりやすい官能基を有する物質をいう。「陰イオンになりやすい官能基」とは、当該官能基を有する物質を含有する任意の溶液中で陰イオンになりうる官能基をいう。具体的には、例えば、ＥＴ溶液中で陰イオンになりうる官能基は「陰イオンになりやすい官能基」である。すなわち、「マイナスチャージを示す物質」は、当該物質を含有する任意の溶液中、例えばＥＴ溶液中でマイナスチャージを示すものであってよい。「陰イオンになりやすい官能基」として、具体的には、例えば、カルボキシル基、硫酸基、リン酸基が挙げられる。

[0053] 本発明において、「マイナスチャージを示す目的物質」は、ＥＴ以外のマ

イナスチャージを示す物質であれば特に制限されない。「マイナスチャージを示す目的物質」としては、例えば、タンパク質類、ペプチド類、ホルモン類、多糖類、核酸類、脂質類、ビタミン類、各種人工高分子が挙げられる。マイナスチャージを示すタンパク質やペプチドとしては、例えば、酸性アミノ酸残基を含むタンパク質やペプチドが挙げられる。酸性アミノ酸残基としては、グルタミン酸残基やアスパラギン酸残基が挙げられる。マイナスチャージを示す多糖類としては、例えば、カルボキシメチルセルロースや硫酸化セルロースなどの多糖類のポリアニオン誘導体、およびヘパリン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などのグルコサミノグリカンが挙げられる。核酸はリン酸エステルが分子中に多く含まれている酸性物質であり、核酸としては、例えば、ＤＮＡやＲＮＡが挙げられる。本発明のＥＴ除去方法においては、核酸の共存下で、ＥＴを選択的に除去できるのが好ましい。マイナスチャージを示す人工高分子としては、例えば、ポリアクリル酸が挙げられる。これらの「マイナスチャージを示す目的物質」は、天然物、例えば生体由来物質であってもよく、人工的に改変または合成された物質であってもよい。

[0054] 本発明のＥＴ除去方法において、ＥＴ溶液は、本発明のＥＴ吸着材との接触前に、適宜、前処理等の処理がなされてもよい。例えば、ＥＴ溶液は、希釈または濃縮されてよい。また、ＥＴ溶液のｐＨは調整されてもよく、調整されなくてもよい。ｐＨは、特に制限されないが、例えば、３～１０、好ましくは４～９、より好ましくは４～６であってよい。ｐＨは、例えば、ＥＴ溶液中のマイナスチャージを示す目的物質の各ｐＨにおける安定性を考慮して調整されてもよい。ｐＨの調整は、例えば、緩衝液を用いて行うことができる。緩衝液の種類は特に制限されず、例えば所望のｐＨに応じて適宜選択することができる。また、ＥＴ溶液のイオン強度は特に制限されず、調整されてもよく、調整されなくてもよい。

[0055] 本発明のＥＴ除去方法において、本発明のＥＴ吸着材は、そのまま用いてもよく、適宜、加工等の処理をして用いてもよい。例えば、本発明のＥＴ吸着材が粒状や膜状等のクロマトグラフィーの担体に適した形状である場合、

本発明のＥＴ吸着材をカラムに充填して用いることができる。

[0056] 本発明のＥＴ吸着材とＥＴ溶液との接触は、例えば、ＥＴ溶液に本発明のＥＴ吸着材を投入することにより行うことができる。このような手法をバッチ法ともいう。投入した吸着材にＥＴを吸着させた後で溶液から吸着材を取り除くことで、ＥＴの除去された溶液が得られる。

[0057] また、例えば、本発明のＥＴ吸着材をカラムに充填して用いる場合には、本発明のＥＴ吸着材が充填されたカラムにＥＴ溶液を送りこむことにより、本発明のＥＴ吸着材とＥＴ溶液とを接触させることができる。また、例えば、本発明のＥＴ吸着材がフィルター状である場合は、フィルター状の吸着材にＥＴ溶液を送りこむことにより、本発明のＥＴ吸着材とＥＴ溶液とを接触させることができる。この様な流動的分離方法としては、例えば、液体クロマトグラフィー、メンブランクロマトグラフィー、モノリスクロマトグラフィー等のクロマトグラフィー；中空糸、平膜、メンブランフィルター、ろ紙等を用いたろ過；固相抽出；体液浄化のための吸着カラム等を利用することができる。

[0058] 本発明のＥＴ除去方法において、バッチ法における本発明のＥＴ吸着材とＥＴ溶液との接触時間や、流動的分離方法におけるＥＴ溶液の流速は、特に制限されないが、例えば、ＥＴ溶液におけるＥＴの含有量や、マイナスチャージを示す目的物質の含有量や種類等の諸条件に応じて適宜設定することができる。また、本発明のＥＴ除去方法における温度は、特に制限されないが、例えば、マイナスチャージを示す目的物質の種類等の諸条件に応じて適宜設定することができる。

[0059] 本発明のＥＴ除去方法によって、溶液中のＥＴが除去される。「ＥＴが除去される」とは、処理前（本発明のＥＴ吸着材との接触前）と比較して溶液中のＥＴの含有量が低下していれば特に制限されないが、例えば、溶液中のＥＴの含有量が、処理前（本発明のＥＴ吸着材との接触前）と比較して３０％以下、２０％以下、１０％以下、５％以下、または１％以下に低下することであってよい。また、本発明のＥＴ除去方法においては、処理後（本発明

のＥＴ吸着材との接触後）の溶液中にマイナスチャージを示す目的物質が所望の量で残存していれば特に制限されないが、マイナスチャージを示す目的物質が実質的に除去されないのが好ましい。「マイナスチャージを示す目的物質が実質的に除去されない」とは、例えば、溶液中のマイナスチャージを示す目的物質が、処理前（本発明のＥＴ吸着材との接触前）と比較して９０％以上、９５％以上、９７％以上、または９９％以上が残存することであってよい。

実施例

[0060] 以下、本発明について実施例及び比較例を用いてさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0061] ＜１＞ＣＤポリマーの合成

＜１－１＞実施例１～１８のＣＤポリマーの合成

[0062] ７０ｍＬのＮ,Ｎ-ジメチルホルムアミド(ＤＭＦ)溶液に１０ｇのシクロデキストリン（ＣＤ）を徐々に加えて溶解させた。得られたＣＤ溶液を５００ｍＬの三つ口フラスコに入れ、７０℃で１０分撹拌した。同フラスコにイソシアネート系架橋剤を加えた後、７０℃、２００ｒｐｍの条件下で、４時間撹拌した。得られた生成物をガラスフィルター（Ｇ３）上に移し、純水を用いてＤＭＦ臭が完全になくなるまで洗浄および吸引ろ過を繰り返した。得られた生成物から篩いを用いて粒径２０～１０５μｍの粒子を回収して、実施例１～１８のＣＤポリマーを得た。ＣＤポリマーは９５％メタノール中に保存した。

[0063] 用いたＣＤの種類と添加量および架橋剤の種類と添加量を表３に示す。架橋剤の略号は表２に示したとおりである。

[0064] ＜１－２＞比較例１～３のＣＤポリマーの合成

架橋剤としてエピクロロヒドリン（クロロメチルオキシラン（ＣＭＯ）ともいう）を用いた以外は、実施例１～１８のＣＤポリマーの合成と同様の手順で、比較例１～３のＣＤポリマーを合成した。用いたＣＤの種類と添加量および架橋剤の種類と添加量を表３に示す。

[0065] [表3]

表3

試料名	CD		架橋剤(CL)		CL/CD
	種類	仕込みg	種類	仕込みg	モル比
実施例1	γ	10	HMDI	3.9	3
実施例2	γ	10	HMDI	5.2	4
実施例3	γ	10	HMDI	6.5	5
実施例4	γ	10	HMDI	7.8	6
実施例5	γ	10	HMDI	9.1	7
実施例6	γ	10	TMHMDI	4.9	3
実施例7	γ	10	DCHMDI	6.1	3
実施例8	γ	10	BIMCH	4.5	3
実施例9	γ	10	BIPB	5.6	3
実施例10	γ	10	TLDI	4.0	3
実施例11	γ	10	IPDI	5.1	3
実施例12	γ	10	DIDPM	5.8	3
実施例13	β	10	HMDI	5.9	4
実施例14	β	10	TMHMDI	5.6	3
実施例15	β	10	BIPB	6.4	3
実施例16	α	10	HMDI	6.9	4
実施例17	α	10	TLDI	5.4	3
実施例18	α	10	BIPB	7.5	3
比較例1	α	10	CMO	14.3	15
比較例2	β	10	CMO	9.8	12
比較例3	γ	10	CMO	8.6	12

[0066] ＜２＞イソシアネート基の導入量の測定

上記で得られたＣＤポリマーにおけるイソシアネート基の導入量は、ＣＤポリマーを減圧乾燥した後、元素分析により求めた。ＣＤは窒素原子を有していないため、測定された窒素分は架橋剤のイソシアネート基に由来するものである。結果を表４に示す。

[0067]

[表4]

表4　CDポリマーのN／C比（モル%）

試料名	CD	架橋剤(CL)	CL/CD	元素分析
	種類	種類	モル比	N/C(モル%)
実施例1	γ	HMDI	3	8.5
実施例2	γ	HMDI	4	12.3
実施例3	γ	HMDI	5	12.4
実施例4	γ	HMDI	6	13.4
実施例5	γ	HMDI	7	14.6
実施例6	γ	TMHMDI	3	8.0
実施例7	γ	DCHMDI	3	7.2
実施例8	γ	BIMCH	3	8.6
実施例9	γ	BIPB	3	6.8
実施例10	γ	TLDI	3	8.4
実施例11	γ	IPDI	3	8.1
実施例12	γ	DIDPM	3	7.0
実施例13	β	HMDI	4	11.5
実施例14	β	TMHMDI	3	9.4
実施例15	β	BIPB	3	7.9
実施例16	α	HMDI	4	13.2
実施例17	α	TLDI	3	10.0
実施例18	α	BIPB	3	8.5
比較例1	α	CMO	15	0
比較例2	β	CMO	12	0
比較例3	γ	CMO	12	0

[0068] なお、ＣＤポリマーへのイソシアネート基の導入は赤外吸収スペクトルの測定によっても確認できる。γＣＤおよび実施例４のＣＤポリマーのＩＲチャートを図１に示す。架橋前のγＣＤと比較して、ＣＤポリマーは「Ｃ＝Ｏ」に由来するピークや「－ＮＨ－ＣＯ－」に由来するピークを有することを特徴とすることが明らかとなった。

[0069] ＜３＞陰イオン交換容量の測定

上記で得られたＣＤポリマーの陰イオン交換容量は、ｐＨ滴定法によって定量した。まずＣＤポリマー５ｍｌをガラスフィルター上に移し、メタノール、アセトン、およびエーテルで順に洗浄後、２４時間減圧乾燥した。得られた乾燥ＣＤポリマー０．５ｇを秤量し、１００ｍｌの三角フラスコに入れ、０．１Ｎ－塩酸水溶液を正確に２５ｍｌ加えた。２時間攪拌後、反応液を

１００ｍｌのメスフラスコにろ取し、蒸留水で１００ｍｌに定容した。この希釈液から２５ｍｌを分取し、０．０５Ｎ－水酸化ナトリウムを用い、フェノールフタレインを指示薬として滴定した。滴定は３回繰り返し、平均値を陰イオン交換容量の算出に用いた。陰イオン交換容量（ＡＥＣ）は下記式２により求めた。結果を表５に示す。併せて、市販のＥＴ吸着材であるセルファインＥＴクリーンＬ（ＪＮＣ株式会社製）およびデトキシゲル（Detoxi-Gel；サーモフィッシャー／ピアス製）の陰イオン交換容量も示す。

AEC(meq/g)＝(0.1×fHCl×VHCl－0.05×fNaOH×VNaOH×100/25)÷W ・・・（式２）

fHCl：0.1N-塩酸水溶液のファクター

fNaOH：0.05N-水酸化ナトリウム水溶液のファクター

VHCl：0.1N-塩酸の添加量（ml）

VNaOH：0.05N-水酸化ナトリウム水溶液の滴定量（ml）

W：乾燥ＣＤポリマーの重量（g）

[0070] ＜４＞膨潤度の測定

体積として３ｍＬ－６ｍＬ程度の量のＣＤポリマーを１０ｍＬメスシリンダーに入れた。体積値が安定するまで、静置とタッピングを繰り返し、その体積を測定した。次に、体積を測定したメスシリンダー中のＣＤポリマーを２０ｍＬのビーカーに全て回収し、８０℃で１６時間以上放置し水分を蒸発させてＣＤポリマーを乾燥させた後に、ＣＤポリマーの乾燥重量を測定した。膨潤度を下記式３により求めた。結果を表５に示す。

膨潤度（ｗｅｔ－ｍＬ/ｄｒｙ－ｇ）＝測定体積（ｍＬ）／乾燥重量（ｇ）・・・（式３）

[0071]

[表5]

表５　ＣＤポリマーのイオン交換容量

試料名	CD	架橋剤(CL)	CL/CD	陰イオン交換容量	膨潤度
	種類	種類	モル比	meq/g	Wet-mL/dry-g
実施例1	γ	HMDI	3	<0.1	4.2
実施例2	γ	HMDI	4	<0.1	4.1
実施例3	γ	HMDI	5	<0.1	3.9
実施例4	γ	HMDI	6	<0.1	3.5
実施例5	γ	HMDI	7	<0.1	3.4
実施例6	γ	TMHMDI	3	<0.1	4.1
実施例7	γ	DCHMDI	3	<0.1	4.0
実施例8	γ	BIMCH	3	<0.1	4.1
実施例9	γ	BIPB	3	<0.1	3.9
実施例10	γ	TLDI	3	<0.1	4.0
実施例11	γ	IPDI	3	<0.1	4.1
実施例12	γ	DIDPM	3	<0.1	3.8
実施例13	β	HMDI	4	<0.1	4.0
実施例14	β	TMHMDI	3	<0.1	4.1
実施例15	β	BIPB	3	<0.1	4.1
実施例16	α	HMDI	4	<0.1	3.9
実施例17	α	TLDI	3	<0.1	3.9
実施例18	α	BIPB	3	<0.1	3.8
比較例1	α	CMO	15	<0.1	5.0
比較例2	β	CMO	12	<0.1	5.5
比較例3	γ	CMO	12	<0.1	5.2
セルファインETクリーンL				0.6	15
デトキシゲル				0.2	21

[0072] ＜５＞ＣＤポリマーのＥＴ吸着量の測定

＜５－１＞ＥＴフリー化

ＥＴ吸着量の測定に供するＣＤポリマーおよび市販のＥＴ吸着材のＥＴフリー化を以下の手順で行った。上記で得られたＣＤポリマー、ならびに市販のＥＴ吸着材であるデトキシゲル（サーモフィッシャー／ピアス製）およびセルファインＥＴクリーンＬ（ＪＮＣ株式会社製）のそれぞれを５－１０ｇ秤量し、滅菌済みのガラスフィルター上で洗浄液（０．２Ｍ　ＮａＯＨを含む９５％エタノール溶液）５０ｍＬで５回洗浄を繰り返した。次に、洗浄後のサンプルを１００ｍＬ用フラスコに入れ、洗浄液を５０ｍＬ添加し、２５℃、１時間、２００ｒｐｍで撹拌した。次に、撹拌後のサンプルをガラスフィルター上で再び洗浄液２５ｍＬで５回洗浄し、さらに、注射用蒸留水を用いてろ液が中性になるまで洗浄を繰り返した後、イオン強度０．０５のリン

酸バッファー（ｐＨ６）で平衡化し、ＥＴフリー化済みの吸着材として以降の実験に用いた。

[0073] ＜５－２＞バッチ法によるＥＴ吸着除去

E.coli 055-B5株由来ＬＰＳを所定量含むイオン強度０．０５のリン酸バッファー（ｐＨ６）をサンプル溶液として用いて、以下の手順でＥＴ吸着除去試験を行った。上記で得られたＥＴフリー化済みの吸着材０．１ｇを２０ｍＬ三角フラスコに入れ、サンプル液を２ｍＬ加え、４℃、２００ｒｐｍで１時間撹拌した。得られた懸濁溶液をシリンジで吸い取り、０．８μｍメンブランフィルターでろ過した。得られたろ過液中の残存エンドキシン濃度を定量した。ＥＴ濃度の測定は、市販のキット（リムルスＥＳ－ＩＩテスト和光、和光純薬製）を用いて行った。

[0074] 結果を表６および図２に示す。なお、表６および図２のデータは、それぞれ別のバッチで得られたものである。エピクロルヒドリンで架橋されたＣＤポリマーと比較して、イソシアネート系架橋剤で架橋されたＣＤポリマーはＥＴ残存濃度が低く、ＥＴ除去能力が高い事が示された（表６）。また、実施例４のＣＤポリマーは、市販品のＥＴ吸着材であるデトキシゲルと同等のＥＴ吸着能力があることが判明した（図２）。

[0075]

[表6]

表6　CDポリマーのET吸着量

試料名	エンドトキシンの濃度（EU／mL）	
	処理前	処理後
実施例1	1	<0.01
	10	<0.01
	100	<0.01
	1000	<0.01
実施例2	1	<0.01
	10	<0.01
	100	<0.01
	1000	<0.01
実施例3	1	<0.01
	10	<0.01
	100	0.05
	1000	22
実施例4	1	<0.01
	10	<0.01
	100	2
	1000	45
実施例8	1	<0.01
	10	<0.01
	100	<0.01
	1000	<0.01
実施例10	1	<0.01
	10	<0.01
	100	<0.01
	1000	0.05

試料名	エンドトキシンの濃度（EU／mL）	
	処理前	処理後
実施例13	1	<0.01
	10	<0.01
	100	0.1
	1000	10
実施例16	1	<0.01
	10	0.1
	100	5
	1000	19
比較例2	1	0.9
	10	8.8
	100	45
	1000	未測定
比較例3	1	0.6
	10	2.2
	100	8.0
	1000	未測定
デトキシゲル	1	<0.01
	10	<0.01
	100	<0.01
	1000	<0.01
ETクリーンL	1	<0.01
	10	<0.01
	100	<0.01
	1000	<0.01

[0076] ＜５－３＞種々のイオン強度におけるＤＮＡ溶液中のＥＴ吸着除去

サンプル溶液として、E.coli 055-B5株由来ＬＰＳを１５ＥＵ／ｍＬ、鮭白子由来ＤＮＡを５０ｍｇ／ｍＬ含むイオン強度が０．０５から０．８のリン酸バッファー（ｐＨ６）を用いて、＜５－２＞と同様の手順でＥＴ吸着除去試験を行った。得られた処理液（ろ過液）中の残存エンドキシン濃度および残存ＤＮＡ濃度を定量し、イオン強度とＥＴの選択的吸着量の関係を調べた。ＥＴ濃度の測定は、＜５－２＞と同様に行った。ＤＮＡ濃度は、２６０ｎｍの吸光度に基づいて測定した。

[0077] 結果を図３に示す。実施例４のＣＤポリマーは、いずれのイオン強度においても、ほぼ１００％のＥＴを吸着し、且つ、ＤＮＡを吸着しない事が明ら

かとなった。一方、比較例３のＣＤポリマーは、いずれのイオン強度においても、ＤＮＡを吸着しないが、ＥＴの吸着が８０％程度と実施例４よりも低い事が明らかとなった。すなわち、実施例４のＣＤポリマーおよび比較例３のＣＤポリマーは、いずれもＤＮＡの共存下でＥＴを選択的に吸着することができるが、ＥＴ吸着能の点で実施例４のＣＤポリマーは比較例３のＣＤポリマーと比較して優れている。また、市販のＥＴ吸着材であるセルファインＥＴクリーンＬおよび活性炭は、いずれのイオン強度においてもＤＮＡとＥＴの両方を吸着し、ＤＮＡの共存下でＥＴを選択的に吸着することができなかった。

[0078] ＜５－４＞種々のｐＨにおけるＤＮＡ溶液中のＥＴ吸着除去

サンプル溶液として、E.coli 055-B5株由来ＬＰＳを１５ＥＵ／ｍＬ、鮭白子由来ＤＮＡを５０ｍｇ／ｍＬ含むイオン強度が０．０５でｐＨが４から９の緩衝液（下記）を用いて、＜５－２＞と同様の手順でＥＴ吸着除去試験を行った。得られた処理液（ろ過液）中の残存エンドキシン濃度および残存ＤＮＡ濃度を定量し、ｐＨとＥＴの選択的吸着量の関係を調べた。ＥＴ濃度の測定は、＜５－２＞と同様に行った。ＤＮＡ濃度は、２６０ｎｍの吸光度に基づいて測定した。

＜用いた緩衝液＞

ｐＨ４、５　酢酸緩衝液（$CH_3COOH-CH_3COONa$）

ｐＨ６、７　リン酸緩衝液（$Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$）

ｐＨ８、９　トリス緩衝液（Tris－HCl）

[0079] 結果を図４に示す。実施例４のＣＤポリマーは、いずれのｐＨにおいても、７０％以上のＥＴを吸着し、且つ、ＤＮＡを吸着しない事が明らかとなった。実施例４のＣＤポリマーは、特にｐＨ４から６においては、ほぼ１００％のＥＴを吸着できることが明らかとなった。すなわち、実施例４のＣＤポリマーは、幅広いｐＨ範囲で、ＤＮＡ溶液からＥＴを選択的に除去できる。一方、比較例３のＣＤポリマーは、いずれのｐＨにおいてもＤＮＡを吸着せず、且つ、ｐＨ４から６においてはＥＴを７０％以上吸着できることが明ら

かとなった。すなわち、比較例３のＣＤポリマーは、特にｐＨ４から６においてはＤＮＡ溶液からＥＴを選択的に除去することができるが、ＥＴ吸着能の点で実施例４には及ばない。また、市販のＥＴ吸着材であるセルファインＥＴクリーンＬおよび活性炭は、いずれのｐＨにおいてもＤＮＡとＥＴの両方を吸着し、ＤＮＡの共存下でＥＴを選択的に吸着することができなかった。

[0080] ＜６＞シリカ基材へ固定化されたＣＤポリマー（実施例１９の吸着材）の調製

多孔質シリカゲル２０ｇ（粒径３０μｍ、平均細孔径１３００Å）を、３－グリシドキシプロピルトリエトキシシラン２０ｇおよびトリエチルアミン５ｍＬに懸濁し、８時間還流させた。冷却後、シリカゲルをトルエン４００ｍＬ、メタノール４００ｍＬ、純水１Ｌ、アセトン４００ｍＬ、およびメタノール４００ｍＬの順で洗浄し、８０℃で真空乾燥して、エポキシ導入シリカゲルを２６ｇ得た。エポキシ導入シリカゲル２０ｇを、０．７％過酸化水素水９００ｍＬ及びアセトニトリル１００ｍＬに懸濁し、６時間還流させた。冷却後、シリカゲルをトルエン４００ｍＬ、メタノール４００ｍＬ、純水１Ｌ、アセトン４００ｍＬ、メタノール４００ｍＬの順で洗浄し８０℃で真空乾燥して、ジオール含有シリカゲル１５ｇを得た。７０ｍｌのＤＭＦ溶液に５ｇのγＣＤを徐々に加えて溶解させた。得られたＣＤ溶液を５００ｍＬの三つ口フラスコに入れ、７０℃で１０分撹拌した。同フラスコに架橋剤であるＨＭＤＩ２．５ｇを加えた後、７０℃、２００ｒｐｍで３０分間撹拌した。その後、ジオール含有シリカ１０ｇを加え、７０℃、２００ｒｐｍで４時間攪拌した。得られた生成物をガラスフィルター（Ｇ３）上に移し、純水を用いてＤＭＦ臭が完全になくなるまで洗浄および吸引ろ過を繰り返し、実施例１９の吸着材を得た。吸着材は９５％メタノール中に保存した。

[0081] ＜７＞セルロース基材へ固定化されたＣＤポリマー（実施例２０の吸着材）の調製

特開昭５３－８６７４９に記載の方法で製造されたセルロース粒子（平均

粒径およそ１００μｍ、排除限界分子量およそ２５００－３５００）２０ｇ湿重量（乾燥重量で約１０ｇ）を８０℃で乾燥させ、乾燥セルロース粒子を得た。７０ｍｌのＤＭＦ溶液に５ｇのγＣＤを徐々に加えて溶解させた。得られたＣＤ溶液を５００ｍＬの三つ口フラスコに入れ、７０℃で１０分撹拌した。同フラスコに架橋剤であるＨＭＤＩ４ｇを加えた後、７０℃、２００ｒｐｍで３０分間撹拌した。その後、乾燥セルロース粒子１０ｇを加え、７０℃、２００ｒｐｍで４時間攪拌した。得られた生成物をガラスフィルター（Ｇ３）上に移し、純水を用いてＤＭＦ臭が完全になくなるまで洗浄および吸引ろ過を繰り返し、実施例２０の吸着材を得た。吸着材は９５％メタノール中に保存した。

[0082] ＜８＞デキストラン基材へ固定化されたＣＤポリマー（実施例２１の吸着材）の調製

７０ｍｌのＤＭＦ溶液に５ｇのγＣＤを徐々に加えて溶解させた。得られたＣＤ溶液を５００ｍＬの三つ口フラスコに入れ、７０℃で１０分撹拌した。同フラスコに架橋剤であるＨＭＤＩ４ｇを加えた後、７０℃、２００ｒｐｍで３０分間撹拌した。その後、セファデックッスＧ－２５（粒径およそ８５－２６０μｍ、排除限界分子量５０００以上、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス株式会社）１０ｇ（乾燥重量）を加え、７０℃、２００ｒｐｍで４時間攪拌した。得られた生成物をガラスフィルター（Ｇ３）上に移し、純水を用いてＤＭＦ臭が完全になくなるまで洗浄および吸引ろ過を繰り返し、実施例２１の吸着材を得た。吸着材は９５％メタノール中に保存した。

[0083] ＜９＞セルロース基材へ固定化されたＣＤポリマー（実施例２２の吸着材）の調製

特開昭５５－４４３１２に記載の方法で製造されたセルロース粒子（平均粒径およそ１００μｍ、排除限界分子量２００万以上）１００ｇ湿重量（乾燥重量で約１０ｇ）に、γＣＤ１０ｇを溶解させた純水１００ｍＬを加えて、よく混合した。得られた懸濁液をエバポレーターで減圧乾固させて、乾燥物を得た。この乾燥物１９ｇに２００ｍＬのジオキサンを加えて、３０℃で

１時間、２００ｒｐｍで攪拌した。その後、温度を８０℃に上昇させ、架橋剤としてＨＭＤＩ９ｇを加えて、更に４時間攪拌した。得られた生成物をガラスフィルター（Ｇ３）上に移し、純水を用いてＤＭＦ臭が完全になくなるまで洗浄および吸引ろ過を繰り返し、実施例２２の吸着材を得た。吸着材は９５％メタノール中に保存した。

[0084] ＜１０＞ろ紙へ固定化されたＣＤポリマー（実施例２３の吸着材）の調製

実施例２のＣＤポリマー０．１ｇを乳鉢で粉砕して粒径がおよそ０．１～１μｍのＣＤポリマー粒子を調製し、ＤＭＦ５０ｍＬに懸濁した。得られた懸濁液をＮｏ５Ｃのろ紙（φ６ｃｍ）がセットされたフィルターホルダー（テフロン（登録商標）製）に循環し、ろ紙にＣＤポリマー粒子を保持させた。循環液にほとんどＣＤポリマー粒子がなくなった後に、温度を８０℃に上昇させ、架橋剤としてＨＭＤＩ１ｇを加え、４時間循環を継続した。液の循環を中止し、メタノール１００ｍＬ、純水１００ｍＬを順次流して洗浄し、実施例２３の吸着材を得た。吸着材は９５％メタノール中に保存した。

[0085] ＜１１＞実施例１９～２３の吸着材によるＤＮＡ溶液中のＥＴ吸着除去

＜１１－１＞カラムクロマトグラフィーによるＥＴ除去

１０ｍＬ容量のカラムに実施例１９～２２の吸着材のそれぞれを１ｍＬ充填し、洗浄液（０．２Ｍ　ＮａＯＨを含む９５％エタノール水溶液）を１０ｍＬ通液させ、その後３時間洗浄液に浸漬した。その後、洗浄液をさらに１０ｍＬ通液した後、注射用蒸留水を５０ｍＬ通液した。次いで、ＥＴフリーの０．２Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７）を５ｍＬ通液しカラムを平衡化した。

[0086] E.coli 055-B5株由来ＬＰＳおよび鮭白子由来ＤＮＡを所定量含む０．２Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７）２０ｍＬをカラムに通液し、カラム溶出液を回収した。得られたカラム溶出液中の残存エンドキシン濃度およびＤＮＡ濃度を定量した。ＥＴ濃度の測定は市販のキット（リムルスＥＳ－ＩＩテスト和光、和光純薬製）を用いて行った。ＤＮＡ濃度は２６０ｎｍの吸光度に基づいて測定した。

[0087] ＜１１－２＞フィルターろ紙によるＥＴ除去

実施例２３の吸着材（ＣＤポリマーの固定化されたろ紙）をセットしたフィルターホルダーに洗浄液（０．２Ｍ　ＮａＯＨを含む９５％エタノール水溶液）を１０ｍＬ通液させ、その後３時間洗浄液に浸漬した。その後、洗浄液をさらに１０ｍＬ通液した後、注射用蒸留水を５０ｍＬ通液した。次いで、ＥＴフリーの０．２Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７）を５ｍＬ通液し平衡化した。

[0088] E.coli 055-B5株由来ＬＰＳおよび鮭白子由来ＤＮＡを所定量含む０．２Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７）２０ｍＬを吸着材に通液し、ろ過液を回収した。得られたろ過液中の残存エンドキシン濃度およびＤＮＡ濃度を定量した。ＥＴ濃度の測定は市販のキット（リムルスＥＳ－ＩＩテスト和光、和光純薬製）を用いて行った。ＤＮＡ濃度は２６０ｎｍの吸光度に基づいて測定した。

[0089] 結果を表７に示す。実施例１９～２３の吸着材はいずれも、ＤＮＡの共存下でエンドトキシンを選択的に吸着できた。

[0090] [表7]

表７　実施例１９～２３の吸着材によるDNA溶液中のＥＴ吸着除去

	処理前(初期濃度)		処理後(残存濃度)	
	DNA	ET	DNA	ET
	μg／mL	EU／mL	μg／mL	EU／mL
実施例19	100	100	96.5	0.20
実施例20	100	100	99.0	0.08
実施例21	100	100	98.5	0.10
実施例22	100	100	99.0	0.05
実施例23	100	100	99.5	0.30

産業上の利用可能性

[0091] 本発明のＥＴ吸着材によれば、核酸等のマイナスチャージを示す物質の共存下で、ＥＴを選択的に除去することができる。

請求の範囲

[請求項1] 以下の特徴（１）～（４）を有する、シクロデキストリンのポリマー：

（１）下記式１に示すＮ／Ｃ＝６～１５である；

Ｎ／Ｃ（モル％）＝窒素含有量（モル）÷炭素含有量（モル）×１００ ・・・（式１）

（２）シクロデキストリンの水酸基の一部がウレタン結合を形成している；

（３）水に不溶性である；

（４）陰イオン交換容量が０．１ｍｅｑ／ｇ未満である。

[請求項2] シクロデキストリンと架橋剤を反応させることを含む、請求項１に記載のポリマーの製造方法であって、

前記架橋剤が、分子当たり、１またはそれ以上のイソシアネート基と、水酸基と反応しうる１またはそれ以上の官能基を有する化合物である、方法。

[請求項3] 前記水酸基と反応しうる官能基がイソシアネート基である、請求項２に記載の方法。

[請求項4] 基材と、該基材に固定化された請求項１に記載のポリマーとを含む、エンドトキシン吸着材。

[請求項5] 請求項１に記載のポリマーを基材へ固定化することを含む、請求項４に記載のエンドトキシン吸着材の製造方法。

[請求項6] 基材、シクロデキストリン、および架橋剤を反応させることを含む、請求項４に記載のエンドトキシン吸着材の製造方法であって、

前記架橋剤が、１またはそれ以上のイソシアネート基と、水酸基と反応しうる１またはそれ以上の官能基を有する化合物である、方法。

[請求項7] 前記水酸基と反応しうる官能基がイソシアネート基である、請求項６に記載の方法。

[請求項8] 請求項１に記載のポリマーまたは請求項４に記載の吸着材と、マイ

ナスチャージを示す目的物質およびエンドトキシンを含有する溶液を接触させることを含む、エンドトキシンを除去する方法。

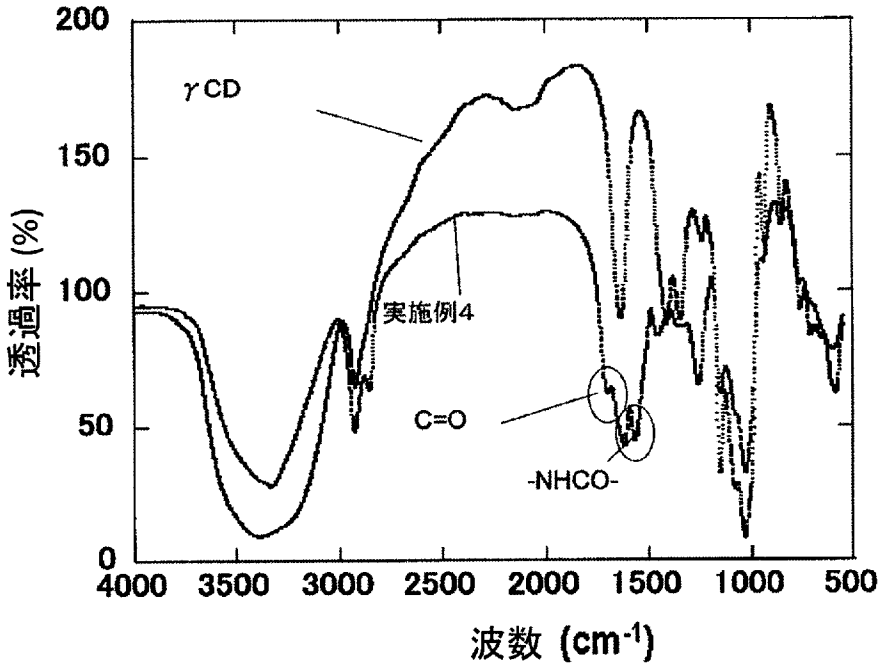
[請求項9] 請求項１に記載のポリマーまたは請求項４に記載の吸着材と、マイナスチャージを示す目的物質およびエンドトキシンを含有する溶液とを接触させることを含む、エンドトキシンの除去されたマイナスチャージを示す目的物質を含有する溶液の製造方法。

[請求項10] 前記マイナスチャージを示す目的物質が核酸である、請求項８または９に記載の方法。

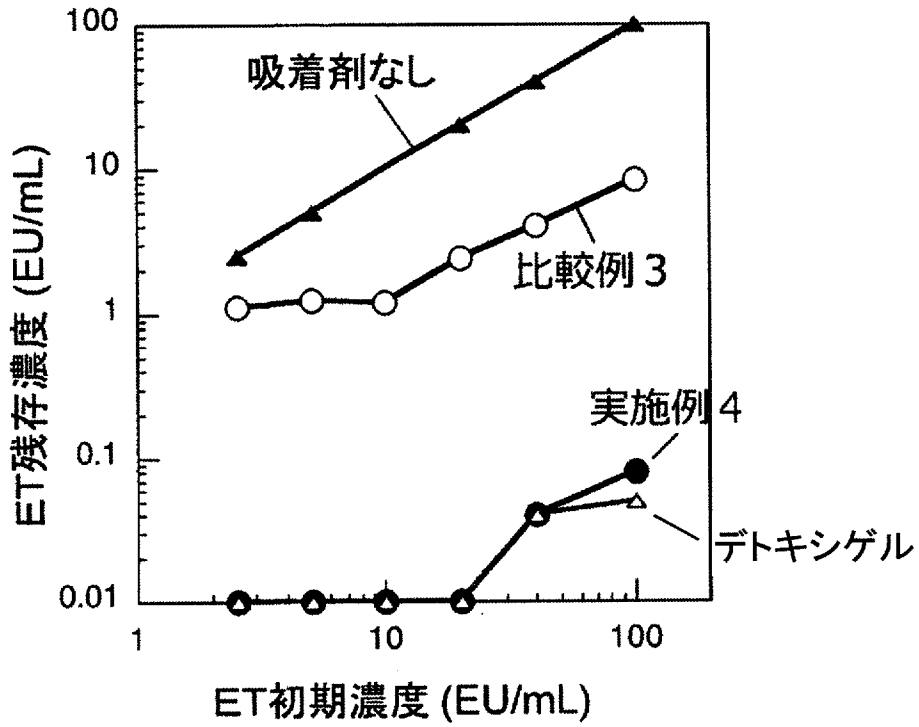
[請求項11] 前記核酸がＤＮＡである、請求項１０に記載の方法。

[請求項12] 前記核酸がＲＮＡである、請求項１０に記載の方法。

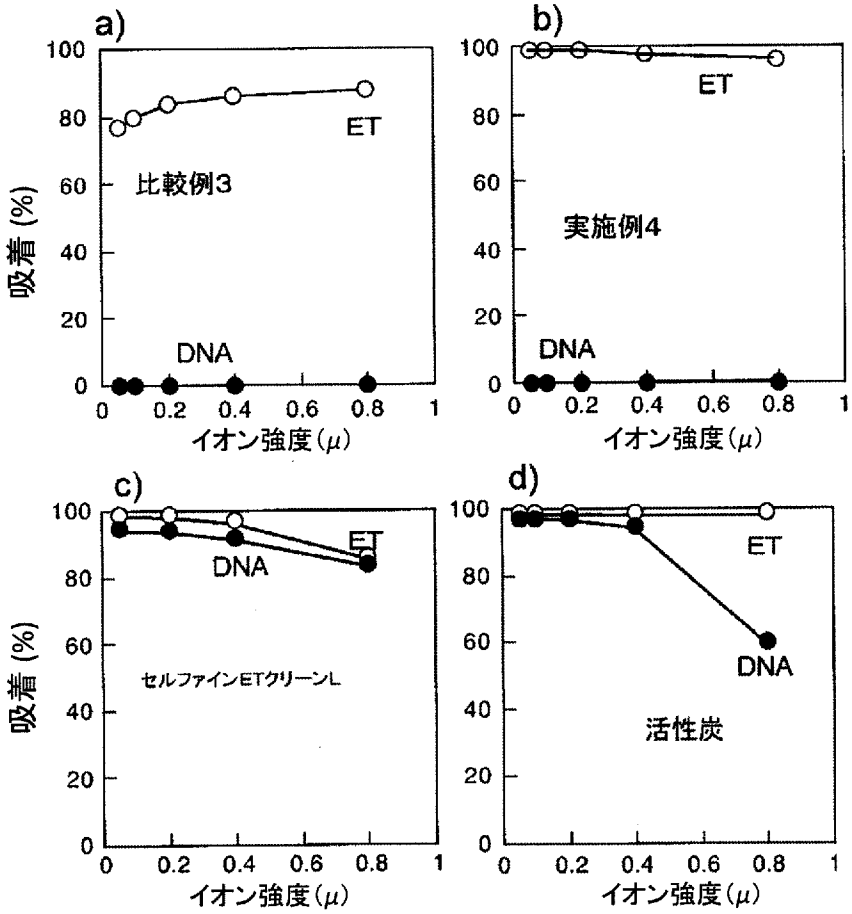
[図1]


200
150
100
50
0
透過率 (%)
γCD
実施例4
C=O
-NHCO-
4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000 500
波数 (cm-1)

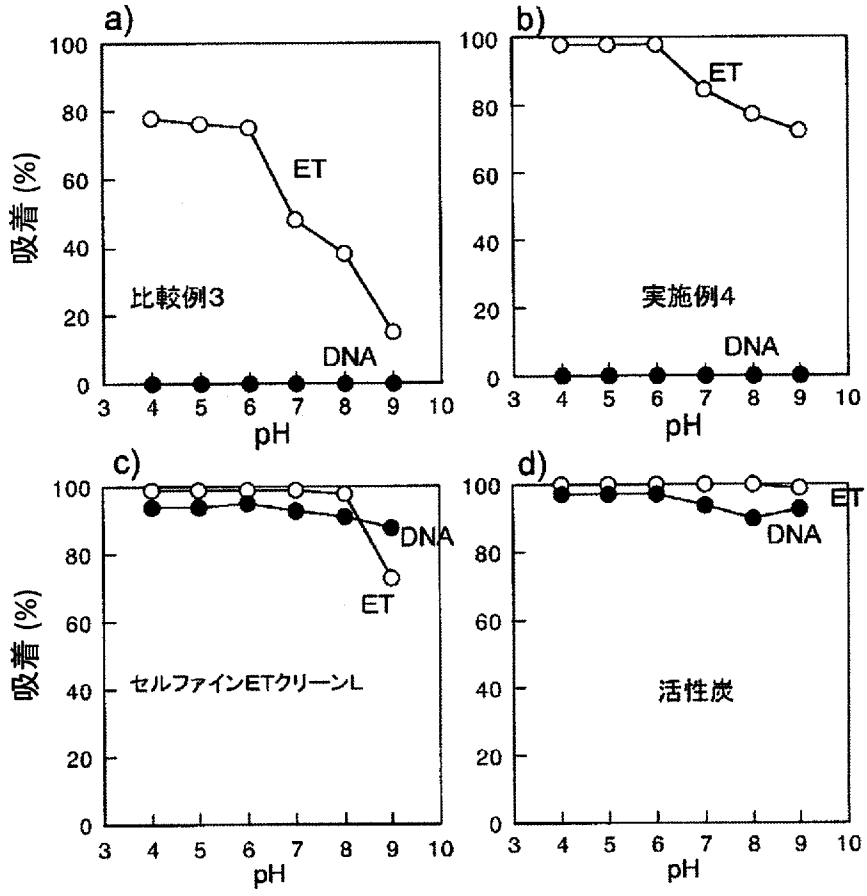
[図2]


100
10
1
0.1
0.01
ET残存濃度 (EU/mL)
吸着剤なし
比較例 3
実施例 4
デトキシゲル
1
10
100
ET初期濃度 (EU/mL)

[図3]


a)
b)
c)
d)
吸着 (%)
イオン強度(μ)
ET
DNA
比較例3
実施例4
セルファインETクリーンL
活性炭

[図4]


a)
b)
c)
d)
吸着 (%)
pH
ET
DNA
比較例3
実施例4
セルファインETクリーンL
活性炭

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/064905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C08B37/16(2006.01)i, *B01J20/26*(2006.01)i, *B01J20/30*(2006.01)i

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)
C08B37/16, B01J20/26, B01J20/30

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 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

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 Y	JP 2001-504879 A (The Regents of the University of California), 10 April 2001 (10.04.2001), claims 1 to 14; examples 1 to 16 & EP 939667 A1 & WO 1998/022197 A1	1-3 4-12
X Y	JP 2006-83379 A (Meiwa Plastic Industries, Ltd.), 30 March 2006 (30.03.2006), claims 1 to 12; paragraph [0030] (Family: none)	1-3 4-12
X Y	JP 10-195108 A (Makoto KOMIYAMA), 28 July 1998 (28.07.1998), claims 1 to 2; paragraphs [0018] to [0022] (Family: none)	1-3 4-12

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 July, 2013 (26.07.13)	06 August, 2013 (06.08.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/064905

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 3-296516 A (Ronarudo B. Ro), 27 December 1991 (27.12.1991), claims 1 to 2, 4 to 6, 8; examples 1, 8 (Family: none)	1-3
Y	JP 2009-502905 A (Humanitas Mirasole S.p.A.), 29 January 2009 (29.01.2009), claims 1 to 20; paragraphs [0023], [0028]; examples 1 to 3 & US 2008/0312575 A1 & EP 1752171 A1 & WO 2007/013122 A1	4-12
Y	M.Sakata, et al, Analytical Sciences, 2011.02. 10, No.2, Vol.27, pp213-216	4-12

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０６４９０５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C08B37/16(2006.01)i, B01J20/26(2006.01)i, B01J20/30(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.　C08B37/16, B01J20/26, B01J20/30

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	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３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 Y	JP 2001-504879 A (ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　カリフォルニア) 2001.04.10, 請求項１－１４、実施例１－１６ & EP 939667 A1 & WO 1998/022197 A1	1-3 4-12
X Y	JP 2006-83379 A (明和化成株式会社) 2006.03.30, 請求項１－１２、【００３０】段落 (ファミリーなし)	1-3 4-12

☑　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	国際調査報告の発送日
２６．０７．２０１３	０６．０８．２０１３

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｐ　５０８１
坂崎　恵美子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９２

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 Y	JP 10-195108 A（小宮山　真）1998.07.28, 請求項１－２、【００１８】－【００２２】段落 （ファミリーなし）	1-3 4-12
X	JP 3-296516 A（ロナルド　ビー．ロー）1991.12.27, 請求項１－２、４－６、８、実施例１、８ （ファミリーなし）	1-3
Y	JP 2009-502905 A（ヒューマニタス・ミラソーレ・エス．ビー．エー．）2009.01.29, 請求項１－２０、【００２３】、【００２８】段落、例１－３ & US 2008/0312575 A1 & EP 1752171 A1 & WO 2007/013122 A1	4-12
Y	M.Sakata, et al, Analytical Sciences, 2011.02.10, No.2, Vol.27, pp213-216	4-12