(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
2017 年 2 月 2 日(02.02.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/018524 A1

(51) 国際特許分類:
B01J 20/22 (2006.01) *B01D 15/36* (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01) *B01J 20/30* (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01) *C02F 1/28* (2006.01)
B01D 15/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/072347

(22) 国際出願日: 2016 年 7 月 29 日(29.07.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-151271 2015 年 7 月 30 日(30.07.2015) 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). ナガセケムテックス株式会社(NAGASE CHEMTEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒5508668 大阪府大阪市西区新町１丁目１番１７号 Osaka (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). 坂本 十和子(SAKAMOTO, Towako); 〒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). 中村 大輔 (NAKAMURA, Daisuke); 〒6794124 兵庫県たつの市龍野町中井２３６番地 ナガセケムテックス株式会社内 Hyogo (JP). 前田 祐希 (MAEDA, Yuki); 〒6794124 兵庫県たつの市龍野町中井２３６番地 ナガセケムテックス株式会社内 Hyogo (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三丁目４番１０号 アクロポリス２１ビル８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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

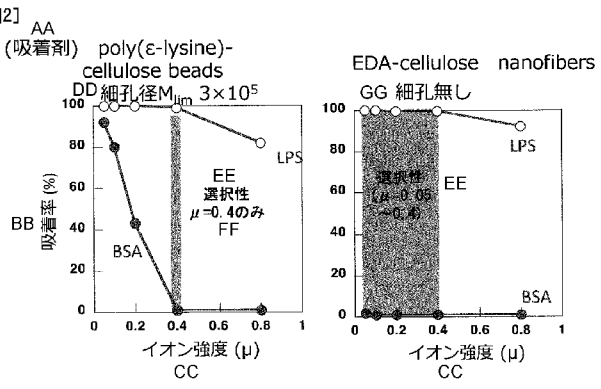
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) **Title**: ENDOTOXIN ADSORBENT

(54) 発明の名称 : エンドトキシン吸着剤

[図2]



AA... ADSORBENT
BB... ADSORPTION RATE (%)
CC... IONIC STRENGTH (μ)
DD... PORE DIAMETER
EE... SELECTIVITY
FF... μ = 0.4 ONLY
GG... WITHOUT PORES

(57) **Abstract**: Provided is a means for removing an endotoxin. An endotoxin is removed by bringing an endotoxin adsorbent, which comprises cellulose nanofibers having an amino group, into contact with a liquid containing the endotoxin.

(57) 要約: エンドトキシンを除去する手段を提供する。アミノ基を有するセルロースナノファイバーを備えるエンドトキシン吸着剤と、エンドトキシンを含有する液体とを接触させることにより、エンドトキシンを除去する。

WO 2017/018524 A1

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： エンドトキシン吸着剤

技術分野

[0001] 本発明は、エンドトキシン吸着剤、及びそれを用いたエンドトキシンの除去方法に関する。

背景技術

[0002] エンドトキシン（endotoxin；ＥＴ）は、毒性物質の1つであり、具体的には、グラム陰性細菌の外膜の成分であるリポ多糖（lipopolysaccharide；ＬＰＳ）を指す。ＥＴは、多糖とリピドＡで構成され、主にリピドＡが毒性に寄与する。ＥＴは、注射用溶液等への混入により生体内に取り込まれた場合、発熱やショック反応を引き起こす。そのため、日本薬局方においては、注射用溶液のＥＴ濃度を10～100 pg/mL (0.1～1.0 endotoxin unit (EU)/mL) 以下にすることが規定されている。例えば、近年、遺伝子組み換え大腸菌等からＤＮＡを分離精製してＤＮＡワクチンとして用いる試みがなされているが、そのようにして得られるＤＮＡには菌体由来のＥＴが残存している。よって、そのようにして得られるＤＮＡをＤＮＡワクチンとして生体に投与するためには、残存しているＥＴを除去する必要がある。このように、注射用溶液等の医薬品や、人工臓器や人工骨の原料となるポリマー材料等の医薬原料等の各種素材からＥＴを除去する方法の開発が切望されている。

[0003] ＥＴを除去する方法としては、例えば、各種ＥＴ吸着剤を利用する方法が知られている。ＥＴ吸着剤としては、例えば、ポリ（ε－リジン）固定化セルロース粒子（非特許文献１）等の、カチオン性のＥＴ吸着剤が知られている。しかしながら、カチオン性のＥＴ吸着剤は核酸や酸性タンパク質等の酸性物質とのイオン的相互作用も示すため、カチオン性のＥＴ吸着剤を利用して酸性物質の共存下でＥＴを選択的に除去するのは困難であった。そのため、ＥＴを選択的に除去することが可能なＥＴ吸着剤が熱望されている。ＢＳＡ等の酸性タンパク質の共存下でＥＴを選択的に除去することが可能なＥＴ

吸着剤としては、例えば、ポリエチレンイミン固定化再生セルロース繊維が知られている（非特許文献２）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL., 2002, 25(4): 601-614.

非特許文献2：森本侃ら，日本化学会誌，No.8，pp.726-730（1994）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、高いＥＴ吸着能を有する新規なＥＴ吸着剤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

[0006] 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、セルロースナノファイバーにアミノ基を導入することで、高いＥＴ吸着能を有するＥＴ吸着剤、特に酸性タンパク質の共存下で高い選択的ＥＴ吸着能を示すＥＴ吸着剤、が得られることを見出し、本発明を完成させた。

[0007] すなわち、本発明は下記の構成を含む。

［１］

アミノ基を有するセルロースナノファイバーを備える、エンドトキシン吸着剤。

［２］

前記セルロースナノファイバーにおけるアミノ基の量が、０．０５～３．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇである、前記エンドトキシン吸着剤。

［３］

前記セルロースナノファイバーが、１ｎｍ～１０００ｎｍの平均繊維径を有する、前記エンドトキシン吸着剤。

［４］

セルロースナノファイバーにアミノ基を導入する工程を含む、前記エンド

トキシン吸着剤を製造する方法。

［５］

前記エンドトキシン吸着剤と、エンドトキシンを含有する液体と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。

［６］

前記エンドトキシン吸着剤と、エンドトキシンを含有する液体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液体の製造方法。

［７］

前記エンドトキシン吸着剤と、目的物質およびエンドトキシンを含有する液体と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。

［８］

前記エンドトキシン吸着剤と、目的物質およびエンドトキシンを含有する液体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目的物質を含有する液体の製造方法。

［９］

前記目的物質が、マイナスチャージを示す物質である、前記方法。

［１０］

前記目的物質が、等電点が４．０～１０．５のタンパク質である、前記方法。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]Cell-PEIおよびpoly(ε-lysine)-cellulose beadsについて、ＥＴ吸着等温線とScatchard plotを示す図。

[図2]Cell-EDAおよびpoly(ε-lysine)-cellulose beadsについて、アルブミン(BSA)を含有する種々のイオン強度の試料溶液からのＥＴ（ＬＰＳ）吸着能を示す図。

発明を実施するための形態

[0009] ＜１＞本発明のエンドトキシン吸着剤およびその製造方法

本発明のエンドトキシン吸着剤（ＥＴ吸着剤）は、アミノ基を有するセル

ロースナノファイバーを備える、ＥＴ吸着剤である。当該アミノ基を有するセルロースナノファイバーを、「本発明で用いられるセルロースナノファイバー」ともいう。ＥＴを、「ＬＰＳ」ともいう。

[0010] 「セルロースナノファイバー」とは、ナノメートルオーダーの平均繊維径を有する繊維状のセルロースをいう。「セルロースナノファイバー」とは、具体的には、１ｎｍ～１０００ｎｍの平均繊維径を有する繊維状のセルロースであってよい。セルロースナノファイバーの平均繊維径は、上記のような範囲内であれば特に制限されない。セルロースナノファイバーの平均繊維径は、例えば、１ｎｍ以上、３ｎｍ以上、５ｎｍ以上、１０ｎｍ以上、２０ｎｍ以上、または３０ｎｍ以上であってもよく、１０００ｎｍ以下、５００ｎｍ以下、３００ｎｍ以下、２００ｎｍ以下、１５０ｎｍ以下、１００ｎｍ以下、９０ｎｍ以下、８０ｎｍ以下、７０ｎｍ以下、６０ｎｍ以下、または５０ｎｍ以下であってもよく、それらの組み合わせであってもよい。セルロースナノファイバーの平均繊維径は、具体的には、例えば、３ｎｍ～５００ｎｍ、５ｎｍ～３００ｎｍ、または１０ｎｍ～２００ｎｍであってもよい。また、セルロースナノファイバーは、繊維径についての高い均一性を有していてよい。すなわち、セルロースナノファイバーの繊維径分布の標準偏差は、例えば、１００ｎｍ以下、７０ｎｍ以下、５０ｎｍ以下、４０ｎｍ以下、３０ｎｍ以下、または２０ｎｍ以下であってもよい。

[0011] セルロースナノファイバーの平均繊維長は、所望のＥＴ吸着能が得られる限り、特に制限されない。セルロースナノファイバーの平均繊維長は、例えば、５μｍ以上、１０μｍ以上、５０μｍ以上、１００μｍ以上、２００μｍ以上、３００μｍ以上、５００μｍ以上、または１０００μｍ以上であってもよく、１００００μｍ以下、１００００μｍ以下、３０００μｍ以下、２５００μｍ以下、２０００μｍ以下、１５００μｍ以下、または１２００μｍ以下であってもよく、それらの組み合わせであってもよい。セルロースナノファイバーの平均繊維長は、具体的には、例えば、１０μｍ～３０００μｍ、１００μｍ～２５００μｍ、２００μｍ～２０００μｍ、３００μ

ｍ～１５００μｍ、または５００μｍ～１２００μｍであってもよい。

[0012] セルロースナノファイバーの平均アスペクト比は、所望のＥＴ吸着能が得られる限り、特に制限されない。「平均アスペクト比」とは、平均繊維径に対する平均繊維長の比（すなわち、平均繊維長／平均繊維径）をいう。セルロースナノファイバーの平均アスペクト比は、例えば、１００以上、５００以上、１０００以上、２０００以上、３０００以上、５０００以上、１００００以上、または２００００以上であってもよく、１００００００以下、８００００以下、５００００以下、４００００以下、または３５０００以下であってもよく、それらの組み合わせであってもよい。セルロースナノファイバーの平均アスペクト比は、具体的には、例えば、２０００～１００００００、３０００～８００００、５０００～５００００、１００００～４００００、または２００００～３５０００であってもよい。

[0013] なお、平均繊維径、繊維径分布の標準偏差、平均繊維長、平均アスペクト比は、いずれも、電子顕微鏡を用いて少なくとも２０本のランダムに選択されたセルロースナノファイバーの寸法を測定した結果に基づいて算出されるものとする。

[0014] なお、平均繊維径、繊維径分布の標準偏差、平均繊維長、平均アスペクト比は、セルロースナノファイバーにアミノ基を導入することによりアミノ基を有するセルロースナノファイバーを得る場合にあっては、それぞれ、アミノ基の導入前のセルロースナノファイバーの平均繊維径、繊維径分布の標準偏差、平均繊維長、平均アスペクト比を意味してよい。セルロースナノファイバーにアミノ基を導入することにより、セルロースナノファイバーが膨潤し得る。よって、例えば、アミノ基の導入後のセルロースナノファイバーの平均繊維径は、上記例示したセルロースナノファイバーの平均繊維径よりも大きくなり得る。

[0015] セルロースナノファイバーを製造する手法は特に制限されない。セルロースナノファイバーは、例えば、公知の方法により製造することができる。セルロースナノファイバーは、例えば、セルロース繊維を所望の平均繊維径が

得られるように適宜加工することにより得られる。セルロースナノファイバーを製造するための原料となるセルロース繊維を「原料繊維」ともいう。

[0016] 原料繊維の由来は特に制限されない。原料繊維としては、高等植物由来のセルロース繊維、動物由来のセルロース繊維、藻類由来のセルロース繊維、細菌由来のセルロース繊維、化学的に合成されたセルロース繊維、およびそれらの誘導体が挙げられる。高等植物由来のセルロース繊維としては、針葉樹や広葉樹由来の木材パルプ等の木材繊維；コットンリンター、ボンバックス綿、カポック等の種子毛繊維；麻、コウゾ、ミツマタ等の靭皮繊維；マニラ麻、サイザル麻、ニュージーランド麻等の葉脈繊維；竹繊維；サトウキビ繊維が挙げられる。動物由来のセルロース繊維としては、ホヤセルロースが挙げられる。藻類由来のセルロース繊維としては、バロニアセルロースが挙げられる。細菌由来のセルロース繊維としては、酢酸菌により製造されるセルロースが挙げられる。化学的に合成されたセルロース繊維としては、メチルセルロースやエチルセルロース等のアルキルセルロースが挙げられる。誘導体としては、官能基が導入（置換）されたセルロース繊維が挙げられる。すなわち、本発明において、「セルロース」という用語は、そのような官能基を有するものを包含する。導入（置換）される官能基の種類や量は、いずれも、本発明で用いられるセルロースナノファイバーを製造できる限り、特に制限されない。官能基としては、アミノ基や、後述する「他の官能基」（アミノ基以外の官能基）が挙げられる。

[0017] 原料繊維からセルロースナノファイバーを製造する方法としては、原料繊維をリファイナー、ホモジナイザー、媒体撹拌ミル、石臼、グラインダー等の破砕装置を用いてミクロフィブリル化することによりセルロースナノファイバーを製造する方法（特開2011-026760、特開2012-025833、特開2012-036517、特開2012-036518、特開2013-236585）、原料繊維と機能性粒子とを混合し、加圧条件化で混練することによりセルロースナノファイバーを製造する方法（特開2007-262594）、原料繊維を湿式で離解した後、予備的に解繊し、蒸煮処理し、破砕装置を用いてミクロフィブリル化することによりセルロー

スナノファイバーを製造する方法であって、酵素を併用する方法（特開2008-075214）、原料繊維を湿式で離解した後、予備的に解繊し、超音波処理によりミクロフィブリル化することによりセルロースナノファイバーを製造する方法であって、酵素を併用する方法（特開2008-169497）が挙げられる。

[0018] また、セルロースナノファイバーは、例えば、セルロースのイオン液体溶液やセルロースの有機溶媒溶液から紡糸することによっても製造できる（特開2015-004151、特開2009-203467）。

[0019] また、セルロースナノファイバーとしては、例えば、上述したような平均繊維径を本来的に有するセルロース繊維を、そのまま、あるいは適宜加工してから、利用することもできる。上述したような平均繊維径を本来的に有するセルロース繊維としては、酢酸菌により製造されるセルロースが挙げられる。

[0020] また、セルロースナノファイバーとしては、市販品を利用することもできる。セルロースナノファイバーの市販品としては、ダイセルファインケム株式会社製のセリッシュ（登録商標）やKelco社製のCellulon（登録商標）が挙げられる。セリッシュとしては、KY-100S、KY-100G、KY-110N、KY-1005が挙げられる。

[0021] 本発明で用いられるセルロースナノファイバーはアミノ基（－NH_2）を有する。本発明で用いられるセルロースナノファイバーは、本来的にアミノ基を有するものであってもよく、アミノ基を有するように改変されたものであってもよい。アミノ基を有するように改変されたセルロースナノファイバーを、「アミノ化セルロースナノファイバー」ともいう。アミノ化セルロースナノファイバーは、例えば、セルロースナノファイバーにアミノ基を導入することにより得られる。セルロースナノファイバーにアミノ基を導入する手法は特に制限されない。アミノ基は、例えば、セルロースにアミノ基を導入する公知の方法により、セルロースナノファイバーに導入することができる。

[0022] アミノ基は、例えば、セルロースの水酸基に導入することができる。水酸

基へのアミノ基の導入は、例えば、公知の方法により行うことができる。アミノ基をセルロースの水酸基に導入する方法としては、セルロースの水酸基を活性化剤で活性化し、次いで、アミノ基供与体と反応させる方法が挙げられる（特開2003-048902、特開2009-167307）。活性化剤としては、クロロメチルオキシラン（エピクロロヒドリン）、ｐ－トルエンスルホン酸クロリド、２－フルオロ－１－メチルピリジニウムが挙げられる。アミノ基供与体としては、ポリエチレンイミンやエチレンジアミン等の後述するものが挙げられる。具体的には、例えば、クロロメチルオキシランによりセルロースの水酸基をエポキシ化し、次いで、ポリエチレンイミンやエチレンジアミンを反応させることにより、水酸基にアミノ基が導入されたセルロースが得られる（実施例を参照）。また、アミノ基は、例えば、セルロースの特定の水酸基に選択的に導入することもできる。セルロースの特定の水酸基としては、セルロースの６位の水酸基が挙げられる。例えば、６－トシル化セルロース誘導体または６－酸化セルロース誘導体を経て、６位の水酸基にアミノ基が導入されたセルロースを製造することができる（Carbohydrate Research, 340(2005)1403-1406、Carbohydrate Research, 208(1990)183-191、特開2009-293017）。具体的には、例えば、ｐ－トルエンスルホン酸クロリドを用いて所定の条件でセルロースの６位の水酸基を選択的にトシル化し、ｐ－トルエンスルホニル基をアジド化し、アジド基を還元することにより、６位の水酸基がアミノ基に置換されたセルロースが得られる（特開2009-293017）。

[0023] アミノ基供与体としては、アンモニアやアミンが挙げられる。アミンとしては、１価のアミン（１つのアミノ基を有するアミン）や多価アミン（２つまたはそれ以上のアミノ基を有するアミン）が挙げられる。１価のアミンとしては、メチルアミン、エチルアミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン等のアルキルアミン；メタノールアミン、エタノールアミン、メチルエタノールアミン、エチルエタノールアミン、ジメチルエタノールアミン、ジエチルエタノールアミン等のアミノアルコール；アニリン等の芳香族アミンが挙げられる。多価アミンとしては、エチレンジアミン、テトラメチレンジアミン

、ヘキサメチレンジアミン等の脂肪族ジアミン；４，４′－ジアミノ－３，３′ジメチルジシクロヘキシルメタン、ジアミンシクロヘキサン、イソホロンジアミン等の脂環族ジアミン；フェニレンジアミン、ジアミノナフタレン、キシリレンジアミン等の芳香族ジアミン；ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミン、トリス（２－アミノエチル）アミン、トリス（３－アミノプロピル）アミン等の３価以上の脂肪族アミン；メラミン等の３価以上の芳香族アミン；ポリエチレンイミン、ポリビニルアミン、ポリアリルアミン等のアミノ基を有するポリマーが挙げられる。そのようなポリマーは、直鎖状であってもよく（linearタイプ）、分岐していてもよい（branchタイプ）。そのようなポリマーの数平均分子量は特に制限されない。そのようなポリマーの数平均分子量は、例えば、２００以上、３００以上、または４００以上であってもよく、１，０００，０００以下、１００，０００以下、１０，０００以下、５，０００以下、２，０００以下、または１，０００以下であってもよく、それらの組み合わせであってもよい。そのようなポリマーの数平均分子量は、具体的には、例えば、４００～１００，０００であってもよい。多価アミンとしては、特に、ポリエチレンイミン、エチレンジアミン、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミン、およびペンタエチレンヘキサミンが挙げられる。アミノ基供与体としては、１種のアミノ基供与体を用いてもよく、２種またはそれ以上のアミノ基供与体を用いてもよい。

[0024] また、アミノ基をセルロースに導入する手法としては、メタクリル酸グリシジルやアクリル酸グリシジル等のエポキシ基供与体をグラフト反応によりセルロースに導入し、次いでそのエポキシ基にアンモニアやアミン等のアミノ基供与体を反応させる方法も挙げられる。

[0025] 本発明で用いられるセルロースナノファイバーにおけるアミノ基の含有量は、所望のＥＴ吸着能が得られる限り、特に制限されない。セルロースナノファイバーにおけるアミノ基の含有量は、陰イオン交換容量（ＡＥＣ）として、例えば、０．０１ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以上、０．０３ｍｅｑ／ｄｒｙ－

ｇ以上、０．０５ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以上、０．０７ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以上、０．１ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以上、０．３ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以上、または０．５ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以上であってもよく、１０．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以下、５．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以下、３．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以下、２．５ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以下、２．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以下、１．５ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以下、１．２ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以下、または１．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ以下であってもよく、それらの組み合わせであってもよい。セルロースナノファイバーにおけるアミノ基の含有量は、陰イオン交換容量（ＡＥＣ）として、具体的には、例えば、０．０５～３．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ、０．１～２．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇ、または０．５～１．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇであってもよい。

[0026] 本発明で用いられるセルロースナノファイバーは、繊維形態を維持でき、且つ、所望のＥＴ吸着能が得られる限り、さらに、アミノ基以外の官能基（以下、「他の官能基」ともいう）を有していてもよい。本発明で用いられるセルロースナノファイバーは、本来的に他の官能基を有するものであってもよく、他の官能基を有するように改変されたものであってもよい。他の官能基としては、アルキル基、アルコキシ基、エポキシ基、カルボキシル基、水酸基、リン酸基、硫酸基、ホルミル基、アセチル基、水素、ハロゲンが挙げられる。アルキル基としては、例えば、炭素数１～１０、１～７、１～５、または１～３のアルキル基が挙げられる。アルキル基は、直鎖であってもよく、分岐を有していてもよい。アルコキシ基としては、例えば、炭素数１～１０、１～７、１～５、または１～３のアルコキシ基が挙げられる。アルコキシ基は、直鎖であってもよく、分岐を有していてもよい。アルキル基やアルコキシ基の水素は、さらに、それぞれ独立に、その他の官能基、例えば上記例示したような他の官能基やアミノ基、に置換されていてもよい。ハロゲンとしては、例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素が挙げられる。例えば、本発明で用いられるセルロースナノファイバーにおいて、セルロースナノファイバーが本来的に有する水酸基の一部または全部が残存していてもよいし

、アミノ基の導入に利用したエポキシ基等の官能基の一部が残存していていもよい。本発明で用いられるセルロースナノファイバーは、１種の他の官能基を有していてもよく、２種またはそれ以上の他の官能基を有していてもよい。

[0027] 本発明で用いられるセルロースナノファイバーにおける他の官能基の含有量は、繊維形態を維持でき、且つ、所望のＥＴ吸着能が得られる限り、特に制限されない。例えば、本発明のＥＴ吸着剤で処理する試料中に酸性物質等のマイナスチャージを有する物質が存在する場合に当該マイナ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、本発明で用いられるセルロースナノファイバーにおけるアミノ基以外の陰イオン交換基の含有量は、少ないのが好ましい場合があり得る。本発明で用いられるセルロースナノファイバーにおけるアミノ基以外の陰イオン交換基の含有量は、陰イオン交換容量（ＡＥＣ）として、例えば、１ｍｅｑ／ｇ以下、０．７ｍｅｑ／ｇ以下、０．５ｍｅｑ／ｇ以下、０．３ｍｅｑ／ｇ以下、０．１ｍｅｑ／ｇ以下、０．０５ｍｅｑ／ｇ以下、または０（ゼロ）であってよい。また、例えば、本発明のＥＴ吸着剤で処理する試料中に塩基性物質等の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、本発明で用いられるセルロースナノファイバーにおける陽イオン交換基の含有量は、少ないのが好ましい場合があり得る。本発明で用いられるセルロースナノファイバーにおける陽イオン交換基の含有量は、陽イオン交換容量（ＣＥＣ）として、例えば、１ｍｅｑ／ｇ以下、０．７ｍｅｑ／ｇ以下、０．５ｍｅｑ／ｇ以下、０．３ｍｅｑ／ｇ以下、０．１ｍｅｑ／ｇ以下、０．０５ｍｅｑ／ｇ以下、または０（ゼロ）であってよい。

[0028] イオン交換容量は、ｐＨ滴定法により定量できる。ｐＨ滴定法によりイオン交換容量を定量する具体的な手順については、例えば、実施例の記載を参照することができる。

[0029] 本発明で用いられるセルロースナノファイバーは、大きいＥＴ吸着容量を有していてよい。本発明で用いられるセルロースナノファイバーのＥＴ吸着

容量は、例えば、1 wet-g当り、500μg以上、700μg以上、800μg以上、または850μg以上であってよい。また、本発明で用いられるセルロースナノファイバーは、小さい見かけ上のＥＴ解離定数を有していてよい。本発明で用いられるセルロースナノファイバーの見かけ上のＥＴ解離定数は、例えば、2.0×10^{-11} M以下、1.7×10^{-11} M以下、1.5×10^{-11} M以下、または1.3×10^{-11} M以下であってよい。ＥＴ吸着容量および見かけ上のＥＴ解離定数は、ＥＴ吸着等温線に基づいて作成したScatchard plotより得られる直線式から算出することができる。そのようにしてＥＴ吸着容量および見かけ上のＥＴ解離定数を算出する具体的な手順については、例えば、実施例の記載を参照することができる。

[0030] アミノ基を有するセルロースナノファイバーは、メタノールやエタノール等の適当な分散媒に分散して保存することができる。

[0031] アミノ基を有するセルロースナノファイバーは、単独で、あるいは他の構成要素と組み合わせて、本発明のＥＴ吸着剤として利用できる。すなわち、本発明のＥＴ吸着剤は、アミノ基を有するセルロースナノファイバーからなるものであってもよく、さらに他の構成要素を備えるものであってもよい。他の構成要素は、所望のＥＴ吸着能が得られる限り、特に制限されない。

[0032] 得られた本発明のＥＴ吸着剤は、適宜ＥＴフリー化して利用することができる。ＥＴフリー化は常法により行うことができる。具体的には、ＥＴフリー化は、例えば、適当な洗浄液を用いて本発明のＥＴ吸着剤を１回または複数回洗浄することにより行うことができる。洗浄液としては、特に制限されないが、例えば、NaOH水溶液やNaOHエタノール溶液が挙げられる。洗浄後、遠心や濾過等の適当な固液分離手段により、本発明のＥＴ吸着剤と洗浄液とを分離することができる。

[0033] 本発明のＥＴ吸着剤は、そのまま、あるいは、適宜、加工等の処理をして提供されてよい。例えば、本発明のＥＴ吸着剤は、本発明のＥＴ除去方法に好適に利用できる形態で提供されてよい。例えば、本発明のＥＴ吸着剤は、粒子状や膜状等の任意の形態に加工して用いることができる。また、例えば

、本発明のＥＴ吸着剤をカラムに充填して用いることができる。すなわち、本発明のＥＴ吸着剤は、例えば、カラムに充填され、ＥＴ除去用のカラムとして提供されてもよい。すなわち、本発明は、本発明のＥＴ吸着剤が充填されたＥＴ除去用のカラムを提供する。

[0034] ＜２＞本発明のＥＴ吸着剤の利用

本発明のＥＴ吸着剤を利用して、ＥＴを除去することができる。すなわち、本発明は、本発明のＥＴ吸着剤と、ＥＴを含有する液体とを接触させることを含む、ＥＴを除去する方法を提供する。同方法を「本発明のＥＴ除去方法」ともいう。「ＥＴを含有する液体」を「ＥＴ含有液」ともいう。本発明のＥＴ除去方法により、ＥＴの除去された液体が得られる。すなわち、本発明のＥＴ除去方法は、本発明のＥＴ吸着剤と、ＥＴを含有する液体とを接触させることを含む、ＥＴの除去された液体の製造方法であってもよい。

[0035] ＥＴ含有液は、ＥＴを含有する液体であれば特に制限されない。ＥＴ含有液は、ＥＴに加えて、さらに、ＥＴ以外の物質を含有していてもよい。液体としては、例えば、水、水溶液等の溶液、水性懸濁液等の懸濁液が挙げられる。水としては、例えば、注射用水等の医療用水が挙げられる。

[0036] 本発明の一態様においては、ＥＴ含有液がＥＴとＥＴ以外の物質とを含有する場合に、ＥＴ含有液からＥＴを選択的に除去すること、すなわちＥＴとＥＴ以外の物質とを分離すること、ができる。ＥＴと分離されるべき「ＥＴ以外の物質」を「目的物質」ともいう。すなわち、本発明のＥＴ除去方法の一態様は、本発明のＥＴ吸着剤と、目的物質およびＥＴを含有する液体とを接触させることを含む、ＥＴを除去する方法である。本発明のＥＴ除去方法の一態様により、ＥＴの除去された目的物質を含有する液体が得られる。すなわち、本発明のＥＴ除去方法の一態様は、本発明のＥＴ吸着剤と、目的物質およびＥＴを含有する液体とを接触させることを含む、ＥＴの除去された目的物質を含有する液体の製造方法であってもよい。また、本発明のＥＴ除去方法の一態様により得られたＥＴの除去された目的物質を含有する液体から目的物質を回収することで、ＥＴの除去された目的物質が得られる。すな

わち、本発明のＥＴ除去方法の一態様は、本発明のＥＴ吸着剤と、目的物質およびＥＴを含有する液体とを接触させること、および目的物質を回収することを含む、ＥＴの除去された目的物質の製造方法であってもよい。

[0037] ＥＴ含有液は、例えば、本来的に目的物質およびＥＴを含有するものであってもよく、ＥＴに汚染された目的物質を液媒に溶解または懸濁することにより調製されたものであってもよい。ＥＴ含有液は、１種の目的物質を含有していてもよく、２種またはそれ以上の目的物質を含有していてもよい。

[0038] 目的物質は、特に制限されない。本発明のＥＴ吸着剤は、特に、マイナスチャージを示す物質や粘性物質の共存下でＥＴを選択的に除去するために利用され得る。よって、目的物質としては、例えば、マイナスチャージを示す物質や粘性物質が挙げられる。また、目的物質としては、例えば、注射用溶液等の医薬品に含まれる有効成分や、人工臓器や人工骨の原料となるポリマー材料等の医薬原料も挙げられる。これらの目的物質は、２またはそれ以上の区分に属していてもよい。例えば、目的物質は、マイナスチャージを示す粘性物質であってもよく、マイナスチャージや粘性を示す有効成分や医薬原料であってもよい。

[0039] 「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液体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含有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液体中、例えばＥＴ含有液中、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」としては、例えば、カルボキシル基、硫酸基、リン酸基等の酸性基が挙げられる。すなわち、「マイナスチャージを示す物質」としては、例えば、酸性物質が挙げられる。「マイナスチャージを示す物質」としては、例えば、マイナスチャージを示す、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、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タンパク質やペプチド」とは、例えば、等電点が４．０～１０．５のタンパク質やペプチドを意味してもよい。本発明のＥＴ除去方法においては、例えば、等電点が４．０～１０．５のタンパク質やペプチドの共存下で、ＥＴを選択的に除去できるのが好ましい。等電点が４．０～１０．５のタンパク質としては、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、グロブリン、ミオグロビン、リゾチームが挙げられる。マイナスチャージを示す多糖類としては、例えば、セルロース、アミロース、プルラン、デンプン、デキストリン等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等のグルコサミノグリカンが挙げられる。セルロースのポリアニオン誘導体としては、カルボキシメチルセルロースや硫酸化セルロースが挙げられる。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。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。

[0040] 「粘性物質」としては、例えば、繊維状粘性ポリマーが挙げられる。繊維状粘性ポリマーとしては、マイナスチャージを示す多糖類や、コラーゲンやゼラチン等の繊維状タンパク質が挙げられる。

[0041] 本発明のＥＴ除去方法において、ＥＴ含有液は、本発明のＥＴ吸着剤との接触前に、適宜、前処理等の処理がなされてもよい。例えば、ＥＴ含有液は、希釈または濃縮してから、本発明のＥＴ吸着剤と接触させてもよい。ＥＴ含有液のｐＨは、調整されてもよく、調整されなくてもよい。ＥＴ含有液のｐＨは、ＥＴが除去される限り、特に制限されない。ＥＴ含有液のｐＨは、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。ＥＴ含有液のｐＨは、例えば、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、所望のｐＨ等の諸条件に応じて適宜選択することができる。また、ＥＴ含有液のイオン強度は、調整されてもよく、調整されなくてもよい。ＥＴ含有液のイオン強度（μ）は、ＥＴが除去される限り、特に制限されない。ＥＴ含有液のイオン強度（μ）は、例えば、０．０５～０．８、０．０５～０．６、または０．０５～０．４であってよい。

[0042] 本発明のＥＴ吸着剤は、そのまま、あるいは、適宜、加工等の処理をして用いてよい。例えば、本発明のＥＴ吸着剤をカラムに充填して用いることができる。

[0043] 本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液とを接触させる手段は、特に制限されない。本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液とを接触させる手段は、本発明のＥＴ吸着剤の態様やＥＴ含有液の態様等の諸条件に応じて適宜選択できる。本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液との接触は、例えば、固体担体で液体試料を処理する公知の手段を参照して行うことができる。

[0044] 本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液との接触は、例えば、バッチ法により行うことができる。「バッチ法」とは、適当な容器内で本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液とを混合することにより、本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液とを接触させる手法である。すなわち、例えば、ＥＴ含有液に本発明のＥＴ吸着剤を投入することにより、本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液とを接触させることができる。バッチ法は、静置して実施してもよく、撹拌や振盪して実施してもよい。本発明のＥＴ吸着剤にＥＴを吸着させた後で混合物から本発明のＥＴ吸着剤を取り除くことで、ＥＴの除去された液体が得られる。

[0045] また、本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液との接触は、例えば、流動的分離法により行うことができる。「流動的分離法」とは、本発明のＥＴ吸着剤にＥＴ含有液を通液することにより、本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液とを接触させる手法である。すなわち、例えば、本発明のＥＴ吸着剤をカラムに充填して用いる場合には、本発明のＥＴ吸着剤が充填されたカラムにＥＴ含有

液を通液することにより、本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液とを接触させることができる（カラム法）。また、例えば、本発明のＥＴ吸着剤がフィルターとして構成されている場合は、当該フィルターにＥＴ含有液を通液することにより、本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液とを接触させることができる。流動的分離法としては、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；中空糸膜、チューブラー膜、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；吸着カラムを利用した体液等の試料の浄化；等の方法が挙げられる。

[0046] 本発明のＥＴ除去方法において、処理速度、すなわち、バッチ法における本発明のＥＴ吸着剤とＥＴ含有液との接触時間や流動的分離法におけるＥＴ含有液の流速（通液速度）は、ＥＴが除去される限り、特に制限されない。処理速度は、例えば、ＥＴ含有液におけるＥＴの含有量や、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。接触時間は、例えば、5分～120時間、30分～24時間、1～12時間、または2～4時間であってよい。通液速度も同等に設定してよい。また、本発明のＥＴ除去方法において、処理温度は、ＥＴが除去される限り、特に制限されない。処理温度は、例えば、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。処理温度は、例えば、5～80℃、15～65℃、または25～50℃であってよい。

[0047] 本発明のＥＴ除去方法によって、ＥＴ含有液中のＥＴが除去される。ＥＴの除去の程度は、処理後（本発明のＥＴ吸着剤との接触後）の液体中のＥＴ含有量が、処理前（本発明のＥＴ吸着剤との接触前）と比較して低下していれば特に制限されない。「ＥＴが除去される」とは、例えば、処理後の液体中のＥＴ含有量が、処理前と比較して、３０％以下、２０％以下、１０％以下、５％以下、２％以下、または１％以下に低下することであってよい。また、「ＥＴが除去される」とは、例えば、処理後の液体中のＥＴ含有量が、０．５ＥＵ／ｍＬ以下、０．２ＥＵ／ｍＬ以下、０．１ＥＵ／ｍＬ以下、０．０５ＥＵ／ｍＬ以下、０．０２ＥＵ／ｍＬ以下、０．０１ＥＵ／ｍＬ以下

、０．００５ＥＵ／ｍＬ以下、０．００２ＥＵ／ｍＬ以下、または０．００１ＥＵ／ｍＬ以下になることであってもよい。本発明のＥＴ除去方法においては、特に、希薄なＥＴ含有液からＥＴを除去できるのが好ましい。例えば、ＥＴ含有量が４０ＥＵ／ｍＬ以下、３０ＥＵ／ｍＬ以下、２０ＥＵ／ｍＬ以下、または１０ＥＵ／ｍＬ以下であるＥＴ含有液から、ＥＴ含有量が上記例示したような処理後の液体中のＥＴ含有量、例えば、０．１ＥＵ／ｍＬ以下、になるようにＥＴが除去されてよい。また、ＥＴと目的物質の分離を目的とする場合、処理後の液体中に目的物質を残存させる。目的物質の残存の程度は、処理後の液体中に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。目的物質は、実質的に除去されないのが好ましい。「目的物質が実質的に除去されない」とは、例えば、処理後の液体中の目的物質の含有量が、処理前と比較して、９０％以上、９５％以上、９７％以上、または９９％以上維持されることであってよい。

[0048] ＥＴが除去されたことは、処理後の液体中のＥＴを定量することにより確認できる。ＥＴの定量法としては、リムルス試薬を用いたリムルス試験が挙げられる。リムルス試験は、常法により行うことができる。リムルス試験は、例えば、比色法、比濁法、またはゲル化法により行うことができる。

実施例

[0049] 以下、本発明について実施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。

[0050] ＜１＞アミノ化セルロースナノファイバーの製造

アミノ化セルロースナノファイバーとして、ポリエチレンイミン（PEI）固定化セルロースナノファイバーとエチレンジアミン（EDA）固定化セルロースナノファイバーを、以下の手順で合成した。

[0051] 500mLセパラブルフラスコに、20 wet-gの湿潤状態のセルロースナノファイバー（セリッシュKY-100S；Lot.64011；ダイセルファインケム株式会社製）と、10%(w/w) 水酸化ナトリウム水溶液（10 gの水酸化ナトリウム（特級；ナカライテスク製）を90 mL水に溶解したもの）を入れ、30℃水浴中で1時間撹

拌した。次いで、セパラブルフラスコに160 mLのクロロメチルオキシラン（特級；和光純薬工業株式会社製）を加え、さらに30℃水浴中で2時間撹拌した。撹拌速度は一定とした。反応物を濾布（東レシルク，メッシュサイズ 20μm，東レ株式会社製）上で吸引ろ過し、固形分（ろ過残渣）としてエポキシ活性化セルロースナノファイバーを得た。得られたエポキシ活性化セルロースナノファイバーと、30%(v/v) PEI水溶液（30 mL PEI（linear；数平均分子量約423；アルドリッチ製）と70 mL水の混合液）をセパラブルフラスコに入れ、45℃の水浴中で4時間攪拌した。反応物を東レシルク上で超純水を用いて洗浄液のｐＨが中性付近になるまで十分に洗浄し、固形分（ろ過残渣）としてPEI固定化セルロースナノファイバー（以下、「Cell-PEI」または「PEI-cellulose nanofiber(s)」ともいう）を得た。なお、以下のＡＥＣ測定およびＥＴ（ＬＰＳ）吸着能の評価においては上記Cell-PEIについてのデータを記載するが、別途、いくつかのbranchタイプPEI（数平均分子量　500～78,000）を用いてPEI固定化セルロースナノファイバーを合成し、上記Cell-PEIと同様にＥＴ（ＬＰＳ）吸着能を示すことを確認した。

[0052] また、セリッシュKY-100S（Lot.64011；ダイセルファインケム株式会社製）と、30%(v/v) PEI水溶液に代えて30%(v/v) EDA水溶液（30 mL EDA（和光純薬工業株式会社製）と70 mL水の混合液）を用いて同様の手順で合成を行い、EDA固定化セルロースナノファイバー（以下、「Cell-EDA」または「EDA-cellulose nanofiber(s)」ともいう）を得た。

[0053] このようにして得られたアミノ化セルロースナノファイバーは、一部をAEC測定用に分取し、残部をメタノールに分散して使用時まで冷蔵保存した。

[0054] ＜２＞ＡＥＣ測定

合成したアミノ化セルロースナノファイバーの陰イオン交換容量（Anion Exchange Capacity；AEC）を測定することにより、アミノ化セルロースナノファイバーのアミノ基導入量を決定した。すなわち、AEC測定により、末端基である第１級アミン（－NH_2）の導入量を決定できる。AECは、逆滴定法により測定した。手順を以下に示す。

[0055] 各アミノ化セルロースナノファイバーを24時間以上減圧乾燥し、精秤後三角フラスコに入れた。ファクター既知の0.1 mol/l塩酸30 mlを加え、振とう機で2時間振とうした（200 rpm, 25℃）。ろ紙を用いてろ過し、ろ液20 mlを蒸留水で100 mlに希釈した。希釈溶液10 mlを別の三角フラスコにとり、ファクター既知の0.05 mol/l水酸化ナトリウムでフェノールフタレインを指示薬として滴定した。アミノ化セルロースナノファイバーのAECは、下記式（Ｉ）によって算出した。その結果、Cell-PEIのAECは0.64(meq/dry-g)、Cell-EDAのAECは0.83(meq/dry-g)であった。

AEC (meq/dry-g) = $(0.1\times f_{HCl}\times 30-0.05\times f_{NaOH}\times V\times 30/20\times 100/10)\div W$ ・・・（Ｉ）

f_{HCl} ：使用した塩酸のファクター

f_{NaOH} ：使用した水酸化ナトリウム水溶液のファクター

V ：滴定量（ml）

W ：粒子の乾燥重量（dry-g）

[0056] ＜３＞ＥＴ（ＬＰＳ）吸着能の評価

合成したアミノ化セルロースナノファイバーのＥＴ吸着能を測定し、既知のＥＴ吸着剤のＥＴ吸着能と比較した。既知のＥＴ吸着剤としてはcellulose-polylysine（J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL., 2002, 25(4): 601-614.）を用いた。cellulose-polylysineは、ポリ（ε－リジン）を固定化したセルロース粒子（AEC＝0.45 meq/g）である。以下、cellulose-polylysineを「poly(ε-lysine)-cellulose beads」ともいう。

[0057] ＜３－１＞評価法

ＥＴ吸着能の評価はバッチ法により行った。手順を以下に示す。

[0058] ガラス器具（三角フラスコ、メスピペット、バイアル瓶、リムルス用チューブ、チューブ用キャップ、薬さじ）は、よく洗浄したのち、乾燥機を用いて十分に乾燥させ、250℃で4時間滅菌して用いた。また、シリンジ、メンブランフィルター、チップは、予めγ線照射滅菌してあるものを用いた。また、純水は、オートクレーブにて120℃で30分間滅菌して用いた。

[0059] ＥＴ濃度の測定用に、市販のリムルス試薬であるエンドスペシーES-24M（カブトガニ血球抽出物の凍結乾燥品の入った試験管24本を含むセット，生化学工業株式会社製）の１試験管に対し、同リムルス試薬に添付の緩衝液0.2 mlを添加し、内容物を溶解させた。

[0060] 各吸着剤をガラスフィルター上で0.2M NaOH in 95% EtOH 25 mlで5回洗浄した。次いで、滅菌済みの純水でろ液が中性になるまで洗浄を繰り返した。次いで、リン酸緩衝液（pH 6，イオン強度μ= 0.2）25mLで２回洗浄した。

[0061] 20 ml三角フラスコに洗浄済の吸着剤を秤量し、それに所定の濃度のエンドトキシン（E coli 055:B5由来EVV Endotoxin，和光純薬工業株式会社製）を含むリン酸緩衝液（pH 6，イオン強度μ= 0.2)を加え、インキュベーター内で25～50℃、200 rpmで2～4時間振とうした。次いで、吸着剤を含む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。ろ液を大塚水(LPSフリーの蒸留水；大塚製薬株式会社製）で100倍希釈した。希釈液を上記リムルス試薬の入った試験管に0.2 mlずつ加え、ボルテックスでよく混合した。試験管をEG-リーダーSV-12（生化学工業株式会社製）に設置し、比色時間法により、ＥＴ残存濃度を決定した。

[0062] ＜３－２＞ＥＴ吸着容量およびＥＴ解離定数の比較

各吸着剤（Cell-PEIおよびpoly(ε-lysine)-cellulose beads）について、種々のＥＴ濃度の試料溶液（1～10000 EU/mL，pH 7.0，μ= 0.05）を用いてバッチ法によるＥＴ吸着試験を行い、吸着剤のＥＴ吸着等温線を作製した。バッチ法において、吸着剤は0.1 wet-g、試料溶液は4 mLを使用した。同吸着等温線よりScatchard plotを算出した。結果を図１に示す。同Scatchard plotより得られた直線式より、吸着剤とＥＴとの見かけ上の解離定数および吸着容量を算出した。

[0063] すなわち、y軸に吸着されたエンドトキシン量Ｂ（μg／g wet adsorbent）、x軸に残存エンドトキシン濃度Ｆ（μg／L）をプロットすると、図１左のグラフが得られた。x軸にＢを、y軸にＢ／Ｆ比をプロットすると、図１右のグラフ（Scatchard plot）が得られ、各吸着剤について直線式ｙ＝ａｘ＋ｂが

得られた。エンドトキシンの会合分子量を10^6と仮定すると、解離定数および吸着容量は以下の式で表せる。

見かけ上のエンドトキシン解離定数＝ $1/|a| \times 10^{12}$

エンドトキシン吸着容量（μg／wet-g of adsorbent）＝ $-(b/a)$

[0064] その結果、Cell-PEI（AEC＝0.64 meq/g）の1 wet-g当りのLPS吸着容量は、884μg（＝4.4×10^5 EU)、解離定数は1.2×10^{-11} Mであった。一方、poly(ε-lysine)-cellulose beadsの1 wet-g当りのLPS吸着容量は、695μg（＝3.5×10^5 EU)、解離定数は1.8×10^{-11} Mであった。すなわち、Cell-PEIのLPS吸着容量はpoly(ε-lysine)-cellulose beadsよりも高く（1.34倍）、Cell-PEIのLPS解離定数はpoly(ε-lysine)-cellulose beadsよりも低い（0.66倍）という結果が得られた。吸着剤のLPS吸着容量は大きい方が好ましく、また、吸着剤のLPS解離定数は小さい方が希薄なLPS溶液からLPSを除去できるため好ましい。よって、Cell-PEIはpoly(ε-lysine)-cellulose beadsよりも好ましいＥＴ吸着能を有することが示された。

[0065] ＜３－３＞アルブミン(BSA)溶液からの選択的ＥＴ（ＬＰＳ）吸着能の評価

各吸着剤（Cell-EDAおよびpoly(ε-lysine)-cellulose beads）について、アルブミン(BSA)を含有する種々のイオン強度の試料溶液（アルブミン(BSA) 500 μg/mL, LPS (E. Coli UKT-B) 25 EU/mL, pH 7.0）を用いてバッチ法によるＥＴ吸着試験を行い、選択的ＥＴ（ＬＰＳ）吸着能を評価した。バッチ法において、吸着剤は0.2 wet-g、試料溶液は2 mLを使用し、温度は25℃、反応時間（撹拌時間）は2時間とした。アルブミン(BSA)の定量は、UV-visスペクトル測定装置（GeneQuant 1300、ＧＥヘルスケア・ジャパン株式会社製）にて試料溶液のUV測定を行い、BSAのピーク（280 nm）における吸光度に基づいて行った。結果を図２に示す。Cell-EDAは、いずれのイオン強度（μ）においても、タンパク質を吸着することなく、LPSに高い選択性を示し、特にイオン強度μ＝0.05～0.4において高い効果（LPS吸着率99%, LPS残存濃度＜0.1 EU/mL）が得られた。一方、poly(ε-lysine)-cellulose beadsは、イオン強度μ＝0.05～0.4において高いLPS吸着能（LPS吸着率99%）を示したが、LP

S選択性は乏しかった。これは、poly(ε-lysine)-cellulose beadsにおいては、BSAが細孔に吸着されるためであると考えられる。よって、Cell-EDAはpoly(ε-lysine)-cellulose beadsよりも高い選択的ＥＴ吸着能を有することが示された。

[0066] また、各吸着剤（Cell-PEI、Cell-EDA、およびpoly(ε-lysine)-cellulose beads）について、表１に記載の条件で、アルブミン(BSA)を含有する試料溶液を用いてバッチ法によるＥＴ吸着試験を行い、選択的ＥＴ（ＬＰＳ）吸着能を評価した。バッチ法において、吸着剤は0.2 wet-g、試料溶液は2 mLを使用した。結果を表１の試料名「BSA溶液」に示す。いずれのアミノ化セルロースナノファイバーも、poly(ε-lysine)-cellulose beadsと比較して、アルブミン(BSA)の共存下で高い選択的ＥＴ吸着能を示した。

[0067] 以上の通り、本発明のＥＴ吸着剤は、酸性タンパク質等のマイナスチャージを有する物質の共存下で高い選択的ＥＴ吸着能を示すことが明らかとなった。

[0068] なお、ＢＳＡ等の酸性タンパク質の共存下でＥＴを選択的に除去することが可能なＥＴ吸着剤としては、例えば、ポリエチレンイミン固定化再生セルロース繊維が知られている（非特許文献２）。しかしながら、本発明者等によるさらなる解析の結果、ポリエチレンイミン固定化再生セルロース繊維は、成分不明な溶出物（再生繊維の紡糸に用いた成分に由来する可能性もある）の溶出が止まらず、ＥＴ吸着剤として実用化するのには困難があることが明らかとなっている。一方、本発明のＥＴ吸着剤は、そのような溶出物の溶出がなく、ＥＴ吸着剤として好適に利用することができる。すなわち、本発明のＥＴ吸着剤は、ポリエチレンイミン固定化再生セルロース繊維と比較しても、極めて優れたＥＴ吸着剤である。

[0069]

[表1]

表1

試料名	Before treatment		吸着条件				After treatment								
							poly(ε-lysine)-cellulose beads (AEC 0.3 meq/g)			PEI-cellulose nanofibers (0.6 meq/g)			EDA-cellulose nanofibers (1.5 meq/g)		
	サンプル濃度	LPS濃度	pH	Ionic strength	時間	温度	LPS残存濃度	LPS吸着率	protein吸着率	LPS残存濃度	LPS吸着率	protein吸着率	LPS残存濃度	LPS吸着率	protein吸着率
	mg/mL	EU/mL			h	℃	EU/mL	%	%	EU/mL	%	%	EU/mL	%	%
リン酸化多糖水溶液	31	30	6.8	<0.1	4	50	2.1	93.0	–	2.8	90.7	–	2.5	91.7	–
	31 (90℃5分処理)	25.2	7.0	0.1	2	25	0.25	99.0	–	0.25	99.0	–	0.20	99.2	–
コラーゲンペプチド溶液	30	26	7.0	0.2	2	50	0.11	99.6	8.0	0.15	99.4	8.0	0.10	99.6	6.0
BSA溶液	0.5	20	7.0	0.2	2	30	<0.01	>99.9	約42	<0.01	>99.9	<1	<0.01	>99.9	<1

バッチ法: 試料 2 mL, 吸着剤 0.2wet-g
90℃5分処理・・・リムルス反応擬陽性物質を分解

[0070] ＜３－４＞繊維状粘性ポリマー溶液からのＥＴ（ＬＰＳ）吸着能の評価

＜３－４－１＞リン酸化多糖溶液からのＥＴ（ＬＰＳ）吸着能の評価

Cell-EDAについて、リン酸化多糖を含有する試料溶液（リン酸化多糖溶液10mlと0.02Mリン酸Buffer 10ml(pH6.0, μ=0.2)を混合しリン酸化多糖濃度1.55%に調整，標準LPS（E. Coli UKT-B）換算で25 EU/mLのLPSを含有）を用いて種々の反応時間（撹拌時間）でバッチ法によるＥＴ吸着試験を行い、ＥＴ（ＬＰＳ）吸着能を評価した。バッチ法において、吸着剤は0.2 wet-g、試料溶液は2 mLを使用し、温度は30℃とした。結果を表２に示す。いずれの反応時間（撹拌時間）においても、Cell-EDAは、高いLPS吸着率を示した。

[0071] [表2]

表２　リン酸化多糖溶液からのLPS除去能の反応時間による評価

時間(h)	EDA-cellulose nanofibers LPS吸着率(%)
1	>99
3	>99
6	>99
24	>99

[0072] また、各吸着剤（Cell-PEI、Cell-EDA、およびpoly(ε-lysine)-cellulose beads）について、表１に記載の条件で、リン酸化多糖を含有する試料溶液を含有する試料溶液を用いてバッチ法によるＥＴ吸着試験を行い、ＥＴ（Ｌ

ＰＳ）吸着能を評価した。バッチ法において、吸着剤は0.2 wet-g、試料溶液は2 mLを使用した。結果を表１の試料名「リン酸化多糖水溶液」に示す。いずれのアミノ化セルロースナノファイバーも、リン酸化多糖の共存下で高いＥＴ吸着能を示した。

[0073] ＜３－４－２＞コラーゲン溶液からのＥＴ（ＬＰＳ）吸着能の評価

各吸着剤（Cell-PEIおよびpoly(ε-lysine)-cellulose beads）について、表１に記載の条件で、コラーゲンを含有する試料溶液（コラーゲンペプチド粉末1.5gを40mL Buffer(pH7.0, μ=0.2)で溶解, LPS (E. Coli UKT-B Lot.TFJ5099) 26 EU/mL）を用いてバッチ法によるＥＴ吸着試験を行い、選択的ＥＴ（ＬＰＳ）吸着能を評価した。バッチ法において、吸着剤は0.2 wet-g、試料溶液は2 mLを使用した。結果を表１の試料名「コラーゲンペプチド溶液」に示す。いずれのアミノ化セルロースナノファイバーも、コラーゲンの共存下で高い選択的ＥＴ吸着能を示した。

[0074] ＜３－４－３＞ゼラチン溶液および豚コラーゲン溶液からのＥＴ（ＬＰＳ）吸着能の評価

各吸着剤（Cell-PEIおよびpoly(ε-lysine)-cellulose beads）について、表３に記載の条件で、ゼラチンまたは豚コラーゲンを含有する試料溶液を用いてバッチ法によるＥＴ吸着試験を行い、選択的ＥＴ（ＬＰＳ）吸着能を評価した。結果を表３に示す。アミノ化セルロースナノファイバー（Cell-PEI）は、ゼラチンまたは豚コラーゲンの共存下で高い選択的ＥＴ吸着能を示した。

[0075]

[表3]

表3

Before treatment			吸着条件			After treatment					
						EDA-cellulose nanofibers			poly(ε-lysine) cellulose beads		
			(撹拌: 200 rpm, 2h)			AEC: 1.5 meq/g			AEC: 0.6 meq/g		
Name	試料濃度	LPS濃度	試料の量	吸着剤の量	処理温度	LPS除去能		試料吸着率	LPS除去能		試料吸着率
						LPS残存量	LPS吸着率		LPS残存量	LPS吸着率	
	mg/mL	EU/mL	mL	wet-g	℃	(EU/mL)	(%)	(%)	(EU/mL)	(%)	(%)
LPS	−	50	12	1.2	25	<0.01	>99.9	−	<0.01	>99.9	−
ゼラチン(生化学用)水溶液	30	110	12	1.2	50	22.50	83	9	66.80	53	21.3
	5	18	4	0.2	50	<0.01	>99.9	9.5	<0.01	>99.9	25.5
ゼラチン(食用)in 5 mM 酢酸溶液	10	14	4	0.2	25	2.97	78.2	7.5	11.6	14.7	15.3
			4	0.2	50	0.10	99.3	8.5	2.16	84.1	16.2
豚コラーゲン水溶液	1	0.21	4	0.2	25	0.03	85.7	8.3	0.05	76.2	11.9

[0076] 以上の通り、本発明のＥＴ吸着剤は、繊維状粘性ポリマー溶液等の粘性の高い試料に対しても高いＥＴ吸着能または高い選択的ＥＴ吸着能を示すことが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0077] 本発明によれば、高いＥＴ吸着能を有するＥＴ吸着剤を提供できる。特に、本発明の一態様によれば、酸性物質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なＥＴ吸着剤を提供できる。よって、本発明により提供されるＥＴ吸着剤を利用することにより、ＥＴを含有する液体からＥＴを除去することができる。特に、本発明の一態様によれば、本発明により提供されるＥＴ吸着剤を利用することにより、ＥＴとマイナスチャージを示す物質を含有する液体から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] アミノ基を有するセルロースナノファイバーを備える、エンドトキシン吸着剤。

[請求項2] 前記セルロースナノファイバーにおけるアミノ基の量が、０．０５～３．０ｍｅｑ／ｄｒｙ－ｇである、請求項１に記載のエンドトキシン吸着剤。

[請求項3] 前記セルロースナノファイバーが、１ｎｍ～１０００ｎｍの平均繊維径を有する、請求項１または２に記載のエンドトキシン吸着剤。

[請求項4] セルロースナノファイバーにアミノ基を導入する工程を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のエンドトキシン吸着剤を製造する方法。

[請求項5] 請求項１～３のいずれか１項に記載のエンドトキシン吸着剤と、エンドトキシンを含有する液体と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6] 請求項１～３のいずれか１項に記載のエンドトキシン吸着剤と、エンドトキシンを含有する液体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液体の製造方法。

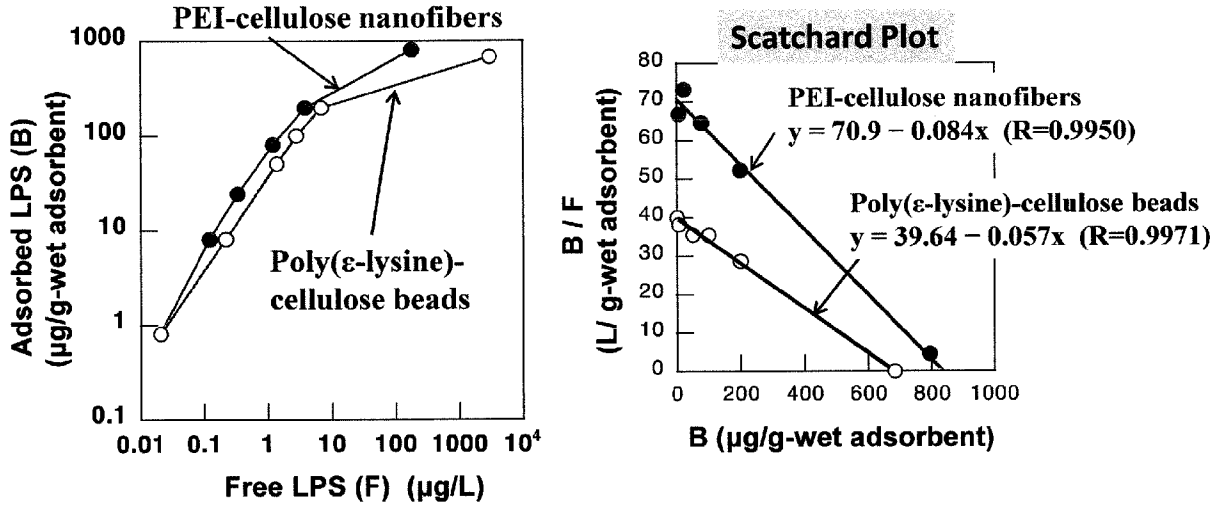
[請求項7] 請求項１～３のいずれか１項に記載のエンドトキシン吸着剤と、目的物質およびエンドトキシンを含有する液体とを接触させることを含む、エンドトキシンを除去する方法。

[請求項8] 請求項１～３のいずれか１項に記載のエンドトキシン吸着剤と、目的物質およびエンドトキシンを含有する液体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目的物質を含有する液体の製造方法。

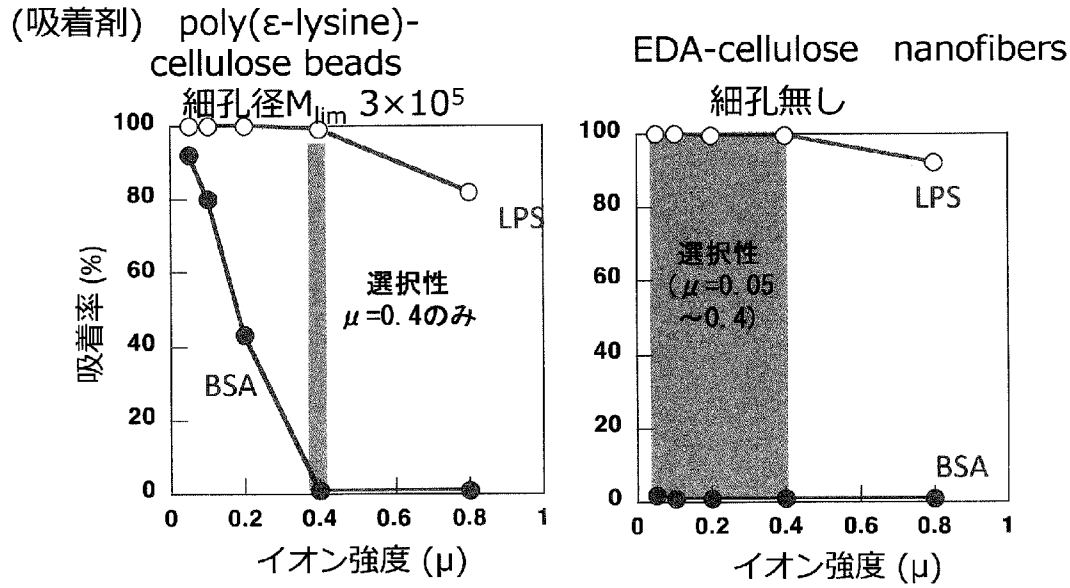
[請求項9] 前記目的物質が、マイナスチャージを示す物質である、請求項７または８に記載の方法。

[請求項10] 前記目的物質が、等電点が４．０～１０．５のタンパク質である、請求項７～９のいずれか１項に記載の方法。

[図1]


PEI-cellulose nanofibers
Poly(ε-lysine)-cellulose beads
Adsorbed LPS (B) (μg/g-wet adsorbent)
Free LPS (F) (μg/L)
Scatchard Plot
PEI-cellulose nanofibers
y = 70.9 − 0.084x (R=0.9950)
Poly(ε-lysine)-cellulose beads
y = 39.64 − 0.057x (R=0.9971)
B / F (L/ g-wet adsorbent)
B (μg/g-wet adsorbent)

[図2]


(吸着剤) poly(ε-lysine)-cellulose beads
細孔径M_{lim} 3×10^5
LPS
BSA
選択性
μ=0.4のみ
吸着率 (%)
イオン強度 (μ)
EDA-cellulose nanofibers
細孔無し
LPS
BSA
選択性
(μ=0.05 ~0.4)
イオン強度 (μ)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/072347

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
B01J20/22(2006.01)i, *A61K9/70*(2006.01)i, *A61K47/38*(2006.01)i, *B01D15/00*(2006.01)i, *B01D15/36*(2006.01)i, *B01J20/30*(2006.01)i, *C02F1/28*(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)
B01J20/22, A61K9/70, A61K47/38, B01D15/00, B01D15/36, B01J20/30, C02F1/28, C08B15/06, A61M1/36, C07K1/18, C07K1/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MORIMOTO, S. et al., Preparations and Applications of Polyethyleneimine-Immobilized Cellulose Fibers for Endotoxin Removal, Polymer Journal, 1995, Vol.27, No.8, p.831-839, ISSN:0032-3896	1-10
Y	JP 2007-145743 A (Chisso Corp.), 14 June 2007 (14.06.2007), claims; paragraphs [0013], [0016], [0018] to [0019], [0024]; examples; test examples & US 2007/0213258 A1 claims; paragraphs [0040] to [0044], [0049], [0058] to [0060], [0071] to [0072]; examples; test examples & DE 102006055558 A1	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
"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
20 September 2016 (20.09.16)	04 October 2016 (04.10.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/072347

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-263486 A (Chisso Corp.), 17 September 2002 (17.09.2002), claims; paragraphs [0022] to [0024], [0029] to [0030], [0034]; examples & US 2002/0130082 A1 claims; paragraphs [0025] to [0027], [0033] to [0034], [0038]; examples	1-10
Y	JP 59-112888 A (Toray Industries, Inc.), 29 June 1984 (29.06.1984), claims; page 1, lower left column, lines 10 to 17; page 2, upper right column, line 9 to lower right column, line 8; examples (Family: none)	1-10
Y	JP 2015-507181 A (UPM-Kymmene Corp.), 05 March 2015 (05.03.2015), claims; paragraphs [0060], [0070] to [0071], [0076] & US 2014/0374254 A1 & WO 2013/093196 A1 claims; page 12, line 33 to page 13, line 7; page 14, lines 12 to 24; page 15, lines 12 to 25 & EP 2794051 A1	1-10

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０７２３４７

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　B01J20/22(2006.01)i, A61K9/70(2006.01)i, A61K47/38(2006.01)i, B01D15/00(2006.01)i, B01D15/36(2006.01)i, B01J20/30(2006.01)i, C02F1/28(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.　B01J20/22, A61K9/70, A61K47/38, B01D15/00, B01D15/36, B01J20/30, C02F1/28, C08B15/06, A61M1/36, C07K1/18, C07K1/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
Y	MORIMOTO, S. et al., Preparations and Applications of Polyethyleneimine-Immobilized Cellulose Fibers for Endotoxin Removal, Polymer Journal, 1995, Vol.27, No.8, p.831-839, ISSN:0032-3896	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 ２０．０９．２０１６	国際調査報告の発送日 ０４．１０．２０１６
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）　４Ｄ　９５４６ 松本　直子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４２１

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2007-145743 A (チッソ株式会社) 2007.06.14, 特許請求の範囲, 段落[0013], [0016], [0018]-[0019], [0024], 実施例, 試験例 & US 2007/0213258 A1, 特許請求の範囲, 段落[0040]-[0044], [0049], [0058]-[0060], [0071]-[0072], Examples, Test Examples & DE 102006055558 A1	1-10
Y	JP 2002-263486 A (チッソ株式会社) 2002.09.17, 特許請求の範囲, 段落[0022]-[0024], [0029]-[0030], [0034], 実施例 & US 2002/0130082 A1, 特許請求の範囲, 段落[0025]-[0027], [0033]-[0034], [0038], 実施例	1-10
Y	JP 59-112888 A (東レ株式会社) 1984.06.29, 特許請求の範囲, 1頁左下欄10-17行, 2頁右上欄9行-右下欄8行, 実施例 (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2015-507181 A (ユー　ピー　エム　キュンメネ　コーポレーション) 2015.03.05, 特許請求の範囲, 段落[0060], [0070]-[0071], [0076] & US 2014/0374254 A1 & WO 2013/093196 A1, 特許請求の範囲, 12頁33行-13頁7行, 14頁12-24行, 15頁12-25行 & EP 2794051 A1	1-10