(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
2015 年 4 月 23 日(23.04.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/056679 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 19/14 (2006.01) *C07K 1/22* (2006.01)
B01J 20/24 (2006.01) *C08B 15/10* (2006.01)
B01J 20/30 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/077360

(22) 国際出願日: 2014 年 10 月 14 日(14.10.2014)

(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 2013-215119 2013 年 10 月 15 日(15.10.2013) JP

(71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目３番１８号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 金谷 健登 (KANAYA, Kento); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 河井 義和 (KAWAI, Yoshikazu); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 大久保 尊弘 (OKUBO, Takahiro); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８ 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 森尾 健一郎 (MORIO, Ken-ichiro); 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島２－３－１８ 株式会社カネカ内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 植木 久一, 外 (UEKI, Kyuichi et al.); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島２丁目１番１６号 フジタ東洋紡ビル９階 Osaka (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), 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)）

(54) **Title**: PRODUCTION METHOD FOR POROUS CELLULOSE BEADS, AND ABSORBENT EMPLOYING SAME

(54) 発明の名称 : 多孔質セルロースビーズの製造方法及びそれを用いた吸着体

(57) **Abstract**: The purpose of the present invention is to provide a simple production method for high-functionality porous cellulose beads having high mechanical strength. Another purpose is to provide an absorbent that employs the high-functionality porous cellulose beads. Provided is a production method for high-functionality porous cellulose beads, characterized in that a cellulose-degrading enzyme is made to act upon crosslinked porous cellulose beads. According to the present invention, high-functionality porous cellulose beads can be produced from porous cellulose beads by a simple method. Additionally, an absorbent that exhibits high strength and high absorbent capacity can be obtained by a simple method employing the high-functionality porous cellulose beads.

(57) 要約: 本発明は、機械的強度の高い高機能多孔質セルロースビーズを簡便な製造方法を提供することにある。また前記高機能多孔質セルロースビーズを用いた吸着体を提供することを目的とする。架橋多孔質セルロースビーズにセルロース分解酵素を作用させることを特徴とする、高機能多孔質セルロースビーズの製造方法を提供した。本発明によれば、多孔質セルロースビーズから簡便な方法で高機能多孔質セルロースビーズを製造することができる。また前記高機能多孔質セルロースビーズを用いた高強度かつ高吸着量を示す吸着体を簡便な方法で得ることができる。

WO 2015/056679 A1

明　細　書

発明の名称 ：

多孔質セルロースビーズの製造方法及びそれを用いた吸着体

技術分野

[0001] 本発明は多孔質セルロースビーズの製造方法およびそれを用いた吸着体に関し、さらに詳しくは、吸着量と強度に優れた吸着体の製造に用いることが出来る、高機能多孔質セルロースビーズの製造方法およびそれを用いた吸着体に関する。

背景技術

[0002] 多孔質セルロースビーズを用いた吸着体は、他の合成系高分子を用いる場合に比べて安全性が高く、非特異的吸着が少なく、広いｐＨ域で使用できるという利点がある。また、多糖類でありながら機械的強度が大きいという利点もある。

[0003] 多孔質セルロースビーズを用いた吸着体の用途の例としては、各種医療用吸着体やクロマトグラフィー用吸着体やアフィニティー吸着体が挙げられる。なかでもアフィニティー吸着体は、効率よく目的物を精製したり不要物濃度を低減できることから、医療用吸着体や抗体医薬品精製用吸着体として利用されてきている。特に、リウマチ、血友病、拡張型心筋症の治療用吸着体または医療用吸着体として、プロテインＡをアフィニティーリガンドとして多孔質担体に固定化した吸着体が注目されている（例えば非特許文献１、非特許文献２）。

[0004] また、プロテインＡをアフィニティーリガンドとして多孔質担体に固定化した吸着体は、免疫グロブリン（ＩｇＧ）を特異的に吸着できる抗体医薬品精製用吸着体としての利用が注目されている。

[0005] 近年、抗体医薬品の需要の高まりにつれ、精製スケールが大きくなっており、高速精製が可能な多孔質セルロースビーズを用いた吸着体、すなわち、高強度の多孔質セルロースビーズを用いた吸着体が望まれていた。このよう

な状況の下、本発明者らは、多孔質担体に２官能以上の長鎖架橋剤を作用させることにより、多孔質担体の強度を大きくできることを見出し、既に特許出願を行っている（特許文献１）。

[0006] しかしながら、単に高強度化を目的として固形分含量を増大させると吸着量が低下する場合もあるため、機械的強度が高くかつ吸着量の大きい吸着体の製造に適した、高機能の多孔質セルロースビーズが望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開２０１１－２５２９２９号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ａｎｎａｌｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，２００５，Ｖｏｌ．１０５１，ｐ．６３５－６４６

非特許文献2：Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｈｅａｒｔ Ｊｏｕｒｎａｌ，Ｖｏｌ．１５２，Ｎｕｍｂｅｒ ４，２００６

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は従来の技術が有する上記課題を鑑みてなされたものであり、機械的強度の高い高機能多孔質セルロースビーズの簡便な製造方法を提供することを目的とする。また前記高機能多孔質セルロースビーズを用いた吸着体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者は、上記課題に鑑み鋭意検討を行った。その結果、架橋多孔質セルロースビーズにセルロース分解酵素を作用させることにより、驚くべきことに強度が維持されるか或いはかえって向上する上に、アフィニティーリガンドを固定化して吸着体とした場合に吸着量が顕著に増加することを見出して、本発明を完成した。

[0011] 以下、本発明を示す。

[0012] ［１］ 架橋多孔質セルロースビーズにセルロース分解酵素を作用させる工程を含むことを特徴とする、高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[0013] ［２］ 前記セルロース分解酵素としてエンド型セルロース分解酵素を用いる上記［１］に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[0014] ［３］ 前記セルロース分解酵素として、さらにエキソ型セルロース分解酵素を用いる上記［２］に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[0015] ［４］ 前記セルロース分解酵素を、１時間以上、１０時間以内、前記架橋多孔質セルロースビーズに作用させる上記［１］～［３］のいずれか一項に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[0016] ［５］ 前記架橋多孔質セルロースビーズが架橋剤としてグリシジルエーテル系化合物を用いて架橋されたものであることを特徴とする、上記［１］～［４］のいずれか一項に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[0017] ［６］ 前記架橋多孔質セルロースビーズが架橋反応の反応溶媒として水を用いて架橋されたものであることを特徴とする、上記［１］～［５］のいずれか一項に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[0018] ［７］ 上記［１］～［６］のいずれか一項に記載の方法で製造された高機能多孔質セルロースビーズに、目的吸着物質と相互作用するリガンドを固定化することにより吸着体を得る工程を含むことを特徴とする吸着体の製造方法。

[0019] ［８］ 上記［１］～［６］のいずれか一項に記載の方法で製造された高機能多孔質セルロースビーズ、および、目的吸着物質と相互作用するリガンドを含むことを特徴とする吸着体。

[0020] ［９］ 上記［１］～［６］のいずれか一項に記載の方法で製造された高機能多孔質セルロースビーズに、目的吸着物質と相互作用するリガンドを固定化することにより製造されたものであることを特徴とする吸着体。

[0021] ［１０］ 上記［８］または［９］に記載の吸着体と、前記目的吸着物質を含む溶液とを接触させる工程を含むことを特徴とする精製方法。

発明の効果

[0022] 本発明によれば、多孔質セルロースビーズから簡便な方法で高機能多孔質セルロースビーズを製造することができる。また前記高機能多孔質セルロースビーズを用い、高強度かつ高吸着量を示す吸着体を簡便な方法で得ることができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]本発明の製造例１の未架橋セルロースビーズの表面観察図である。

[図2]本発明の製造例１の架橋セルロースビーズの表面観察図である。

[図3]本発明の実施例１の高機能多孔質セルロースビーズの表面観察図である。

[図4]本発明の製造例２の架橋セルロースビーズの表面観察図である。

[図5]本発明の実施例２の高機能多孔質セルロースビーズの表面観察図である。

[図6]本発明の製造例３の架橋セルロースビーズの割断面観察図である。

[図7]本発明の実施例３の高機能多孔質セルロースビーズの割断面観察図である。

発明を実施するための形態

[0024] 本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズの製造方法は、架橋多孔質セルロースビーズにセルロース分解酵素を作用させる工程を含むことを特徴とする。当該架橋多孔質セルロースビーズとその前駆体である多孔質セルロースは、市販品があればそれを使用してもよいが、セルロースから製造してもよい。以下、セルロースから架橋多孔質セルロースビーズを製造する工程を含め、本発明方法を工程ごとに説明する。

[0025] １．多孔質セルロースビーズの製造工程

本工程では、セルロースエマルションに凝固溶媒を加えることにより多孔質セルロースビーズを得る。

[0026] 本発明において「セルロースエマルション」とは、セルロースを含む液滴が油溶性溶媒に分散しているものをいう。セルロースを含む液滴は、セルロース分散液であってもセルロース溶液であってもよいものとする。

[0027] セルロース分散液の溶媒としては、例えば、水酸化ナトリウム水溶液などの塩基性水溶液を挙げることができる。セルロースは溶解し難いが親水性であり、また、水酸基を多く有するため、溶解はできなくても塩基性水溶液に分散させることが可能である。セルロース溶液の溶媒としては、１－エチル－３－メチルイミダゾリウムアセテートなどのイオン液体を挙げることができる。原料であるセルロースとしては、分散または溶解し易いことからセルロース粉末を用いることが好ましい。

[0028] セルロースエマルションを構成する油溶性溶媒としては、例えば、動植物油脂、水素添加動植物油脂、脂肪酸トリグリセリド、脂肪族炭化水素系溶媒、芳香族炭化水素系溶媒を挙げることができる。また、非イオン界面活性剤などの界面活性剤を用いてもよい。

[0029] セルロースエマルションは、常法により調製すればよい。例えば、セルロースの分散液または溶液、脂溶性溶媒および界面活性剤を含む混合液を激しく攪拌することにより調製することができる。

[0030] 本工程では、セルロースエマルションに凝固溶媒を加えることにより、セルロースの液滴から溶媒を除去し、多孔質セルロースビーズを得る。セルロースエマルションは不安定である場合があるので、液滴同士が結合しないよう激しく攪拌した状態で凝固溶媒を添加することが好ましい。

[0031] 凝固溶媒は、セルロースの分散液または溶液の溶媒に親和性を示すものであれば特に制限されないが、例えば、アルコールおよびアルコール水溶液を挙げることができる。アルコールとしては、メタノール、エタノール、ｎ－プロパノール、イソプロパノール、ｎ－ブタノール、イソブタノール、ｓ－ブタノール、ｔ－ブタノールなどのC_{1-4}アルコールを挙げることができる。アルコール水溶液における水とアルコールの割合は、例えば、体積比で水：アルコール＝８０：２０～５：９５とすることができる。

[0032] 凝固溶媒を添加した後は、凝固した多孔質セルロースビーズを濾過や遠心分離などにより分離し、水やアルコールなどで洗浄すればよい。得られた多孔質セルロースビーズは、粒径を揃えるため、篩などを用いて分級してもよい。

[0033] なお、前述したように多孔質セルロースビーズとしては市販のものを用いてもよく、本工程の実施は任意である。

[0034] ２．多孔質セルロースビーズの架橋工程

本工程では、多孔質セルロースビーズを架橋剤により架橋して、架橋多孔質セルロースビーズを得る。

[0035] 架橋剤は、セルロース上の水酸基と共有結合を形成できる反応性基を２以上有し、セルロース分子間を架橋できるものをいう。本発明で用いることができる架橋多孔質セルロースビーズの架橋の条件や架橋剤に特に限定は無い。例えばＷＯ２００８/１４６９０６に記載の方法を用いることができる。

[0036] 一方で、本発明においては、前記多孔質セルロースビーズをグリシジルエーテル系化合物で架橋した場合、より顕著な効果を示す場合があることを見出した。詳しくは、特に分子量が大きく、および／または多官能性の架橋剤を用いて高度架橋を行った場合、多孔質セルロースビーズの表面孔が閉塞してしまう場合がある。このような場合においても、架橋剤としてグリシジルエーテル系化合物を用いることによって、ビーズの表面孔を生じさせることが可能となる場合がある。また、この場合、明らかにセルロース分解酵素が作用しているにも関わらず、ビーズの強度は低下しない。

[0037] 架橋剤として用いることができるグリシジルエーテル系化合物、即ちグリシジルエーテル系架橋剤としては、より好ましくは、レソルシノールジグリシジルエーテル、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテル、１，６－ヘキサンジオールジグリシジルエーテル、ヒドロゲナートビスフェノールＡジグリシジルエーテル、グリセロールジグリシジルエーテル、トリメチロールプロパンジグリシジルエーテル、ジグリシジルテレフタレート、ジグリシジルオルトフタレート、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ジエチ

レングリコールジグリシジルエーテル、プロピレングリコールジグリシジルエーテル、グリセロールポリグリシジルエーテル、トリメチロールプロパンポリグリシジルエーテル、ペンタエリスリトールポリグリシジルエーテル、ジグリセロールポリグリシジルエーテル、ポリグリセロールポリグリシジルエーテル、ソルビトールポリグリシジルエーテル等が挙げられる。

[0038] 架橋剤は、一種のみを単独で用いてもよいし、二種以上を併用してもよい。例えば、エピクロロヒドリン等の他の架橋剤とグリシジルエーテル系架橋剤を混合して使用することもできる。

[0039] 多孔質セルロースビーズを架橋剤により架橋する反応の溶媒は適宜選択すればよいが、例えば、水の他、メタノール、エタノール、イソプロパノールなどのアルコール系溶媒や、アセトニトリルなどのニトリル系溶媒などの水混和性有機溶媒を挙げることができる。また、架橋反応溶媒は、２以上を混合して用いてもよい。

[0040] また、グリシジルエーテル系架橋剤を用いることによって、セルロース分解酵素を作用させているにも関わらず、むしろ強度が向上した高機能の多孔質セルロースビーズが得られる場合がある。この現象は、前記セルロースビーズの架橋反応溶媒が水である場合や、前記グリシジルエーテル系架橋剤を用いて架橋された場合において発現しやすい。架橋反応溶媒が水であるとは、水の体積が反応系中の液体の組成の５０％以上であることを示す。当該割合としては、６０％以上、７０％以上または８０％以上が好ましく、９０％以上がさらに好ましく、９５％以上が特に好ましい。

[0041] 架橋反応は、複数回実施してもよく、各回で反応溶媒や架橋剤を変更してもよい。例えば、１回目の架橋反応を水混和性有機溶媒中で行い、最終回の架橋反応を水中で行ってもよい。この場合、途中の溶媒組成は、１回目と最終回のどちらかと同じであっても異なっていてもよく、それらの中間組成であってもよい。さらには全ての回を水溶媒中で実施してもよい。架橋剤についても同様である。なお、反応溶媒として水を用いれば特別な効果が得られることは上記のとおりであり、架橋反応を複数回実施する場合には反応溶媒

として全て水を用いることが好ましい。なお、架橋反応を複数回繰り返す場合、各架橋反応の間では、架橋多孔質セルロースを水などで洗浄して架橋剤を除去することが好ましい。

[0042] 架橋反応を促進するために、反応液には塩基を添加してもよい。かかる塩基としては、水酸化ナトリウムや水酸化カリウムなどのアルカリ金属水酸化物；炭酸水素ナトリウムや炭酸水素カリウムなどアルカリ金属の炭酸水素塩；炭酸ナトリウムや炭酸カリウムなどアルカリ金属の炭酸塩；トリエチルアミンやピリジンなどの有機塩基を挙げることができる。

[0043] 架橋反応後は、架橋多孔質セルロースビーズは不溶性であることから、水などの溶媒で洗浄すればよい。

[0044] なお、前述したように架橋多孔質セルロースビーズとしては市販のものを用いてもよく、本工程の実施は任意である。ただし、架橋剤としてグリシジルエーテル系架橋剤を用いたり架橋反応の溶媒として水を用いることにより良好な特性を有する高機能多孔質セルロースビーズが得られるため、好適には本工程を実施する。

[0045] ３．セルロース分解酵素による処理工程

本工程では、架橋多孔質セルロースビーズにセルロース分解酵素を作用させることにより、高機能多孔質セルロースビーズを得る。

[0046] 本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズは、架橋多孔質セルロースビーズにセルロース分解酵素を作用させて製造されることを特徴とし、強度に優れるとともに、高吸着量を示す吸着体が得られるという特性を有する。理由は定かではないが、驚くべきことに、本発明により得られた高機能多孔質セルロースビーズは、セルロース分解酵素を作用させたにも関わらず、作用前の強度を維持することができる。

[0047] また、本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズを用いた吸着体は、セルロース分解酵素を用いない場合に比べて、吸着量が大きくなることを本発明者らは見出した。おそらく、セルロース分解酵素によって、高機能多孔質セルロースビーズを構成するセルロース分子から未架橋のグルコースユニッ

トが遊離することにより、多孔質セルロースビーズ内の細孔容量が増大し、その結果、高機能多孔質セルロースビーズから吸着体を製造した場合、目的物の吸着サイトが増大し、吸着量が大きくなるものと考えられる。また、グルコースユニットが架橋されている場合には、セルロース分解酵素により基質として認識されなかったり、或いはセルロース分解酵素により攻撃されても架橋によりセルロース分子に結合したままであるので、ビーズの強度が維持されているものと考えられる。

[0048] 本発明に用いることができるセルロース分解酵素に特に限定は無いが、例えば、エンド－β－１，４－グルカナーゼやカルボキシメチルセルラーゼなどのエンド型セルロース分解酵素；エキソ－β－１，４－グルカナーゼなどのエキソ型セルロース分解酵素を挙げることができる。

[0049] 本発明においては、セルロース分解酵素が未架橋のグルコースユニットを選択的に攻撃していると考えられる。また、エンド型セルロース分解酵素は、セルロースに対してランダムに作用してセロデキストリン、セロビオース、グルコースを生成する。よって、エンド型セルロース分解酵素を用いれば、未架橋のグルコースユニットがセルロース分子中の非末端部に存在していても、そのグルコースユニットを脱離させることができ、強度が維持されながらも細孔容量が増加した高機能多孔質セルロースビーズが得られ易いといえる。

[0050] エキソ型セルロース分解酵素は、一般的に、セルロース分子を末端からセロビオース単位で切断する作用を示す。未架橋セルロースに対しては、一般にエンド型よりもエキソ型のセルロース分解酵素の方が分解能が高いとされており、セルロース分子の末端部のグルコースユニットが架橋されていない場合もあり得ることから、エキソ型セルロース分解酵素を用いることも好ましい。

[0051] セルロース分解酵素は、一種のみを単独で用いてもよいし、二種以上を併用してもよい。例えば、エンド型セルロース分解酵素とエキソ型セルロース分解酵素の混合物を使用してもよい。さらに、セロビオースをグリコースに

分解するβ－グルコシダーゼを使用してもよい。なお、エンド型とエキソ型の両方の作用を示すセルロース分解酵素もある。

[0052] セルロース分解酵素の由来としては、特に制限されず、高等植物、細菌、糸状菌、木材腐朽菌、シロアリの共生原生動物などに由来する天然のセルラーゼを用いてもよいし、遺伝子工学的方法で人工的に産生したものを用いてもよい。セルラーゼの由来として具体的には、トリコデルマ属（Trichoderma）菌、アスペルギルス属（Aspergillus）菌、フミコーラ属（Humicola）菌、スタフィロトリクム属（Staphylotrichum）菌、リゾプス属（Rhizopus）菌、ムコール属（Mucor）菌、アクレモニウム属（Acremonium）菌、カエトミウム属（Chaetomium）菌、アシドサーマス属（Acidothermus）菌、セルロモナス属（Cellulomonas）菌等を好適に例示することができる。入手のし易さからアスペルギルス属（Aspergillus）菌とトリコデルマ属（Trichoderma）菌がより好ましく、アスペルギルス属（Aspergillus）菌が最も好ましい。

[0053] 本発明に用いるセルロース分解酵素の使用量は特に限定されないが、例えば、酵素製剤の比活性が２００００～３００００ｕ／ｇ、特に２２９００ｕ／ｇの場合、湿潤ビーズ１ｇあたり０．０１ｇ以上であることが好ましい。また酵素反応後の洗浄効率やコストの観点から湿潤ビーズ１ｇあたり１０ｇ以下であることが好ましい。より好ましくは０．１ｇ以上５ｇ以下であり、さらに好ましくは０．２ｇ以上１ｇ以下であり、最も好ましくは０．５ｇ以上０．８ｇ以下である。なお、湿潤ビーズとは、ビーズのスラリーを濾過してビーズ周囲の余分な溶媒を除去した状態にあるビーズをいうものとする。

[0054] 酵素反応の溶媒としては、通常、水を用いる。

[0055] 本発明においてセルロース分解酵素を作用させる反応液のｐＨに特に限定は無いが、酵素反応を効率良く進行させる観点から、２以上、７以下であることが好ましい。当該ｐＨとしては、より好ましくは３以上、６以下、さらに好ましくは４以上５．５以下、最も好ましくは４．５以上５．１以下である。ｐＨの制御方法に特に限定は無いが、ｐＨ緩衝作用のある物質を用いることが好ましい。ｐＨ緩衝作用のある物質は特に限定されないが、例えば、

酢酸、酢酸塩、クエン酸、クエン酸塩、リン酸、リン酸塩、炭酸、炭酸塩等が挙げられ、少なくとも１種以上を用いることが好ましい。ｐＨ緩衝作用のある物質の使用量については特に限定は無いが、ｐＨの変動を抑制しやすいことから、反応液の０．０１重量％以上であることが好ましく、コストの観点から５０重量％以下であることが好ましい。より好ましくは０．０５重量％以上、１０重量％以下、さらに好ましくは０．１重量％以上５重量％以下である。

[0056] セルロース分解酵素を作用させる際の反応液温度に特に限定は無いが、効率的に反応を進行させるために０℃以上、１００℃以下であることが好ましい。より好ましくは１０℃以上、８０℃以下、さらに好ましくは２５℃以上、７０℃以下、特に好ましくは３５℃以上、６０℃以下、最も好ましくは４０℃以上、５５℃以下である。

[0057] セルロース分解酵素を作用させる時間に特に限定は無いが、反応効率を高めるために１分間以上であることが好ましく、生産効率の観点から４８時間以内であることが好ましい。当該反応時間としては、１０分以上がより好ましく、３０分以上がさらに好ましく、１時間以上が特に好ましく、また、２４時間以内がより好ましく、１２時間以内がさらに好ましく、６時間以内が特に好ましく、３時間以内が最も好ましい。特に、当該反応時間が１時間以上であれば、強度が維持されつつ、吸着性能の高い吸着体が製造できる高機能多孔質セルロースをより確実に得ることができる。また、当該反応時間が１０時間以内であれば、高機能多孔質セルロースビーズの強度をより確実に維持することが可能になる。

[0058] 本工程により得られた高機能多孔質セルロースビーズは、セルロース分解酵素による処理にもかかわらず、原料である架橋多孔質セルロースビーズに対して強度が維持されているか或いはかえって高まっている上に、アフィニティーリガンドを固定化して吸着体とした場合に、目的吸着物質に対して優れた吸着能を示す。本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズの強度の目安としては、例えば、２０％圧縮応力として０．０３ＭＰａ以上、０．４Ｍ

Ｐａ以下程度、好ましくは０．０８ＭＰａ以上、０．３ＭＰａ以下程度である。なお、２０％圧縮応力とは、ビーズの沈降体積が２０％減少するように圧縮した際においてビーズが示す応力をいうものとする。

[0059] ４． リガンドの固定化工程

本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズは、高強度である上に、目的吸着物質と相互作用するリガンドを固定化して吸着体とした場合に、目的吸着物質に対する吸着能に優れている。本工程では、本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズにリガンドを固定化することにより吸着体を得る。

[0060] 本発明における「リガンド」とは、目的吸着物質に対して特異的な親和力を有し、目的吸着物質と相互作用するアフィニティーリガンドをいう。例えば、目的吸着物質が抗体である場合、抗体に特異的に相互作用する抗原、タンパク質、ペプチド断片などを挙げることができる。 本発明に係る吸着体のために用いることができるリガンドは、本発明に係る吸着体を用いて精製すべき目的吸着物質に特異的な親和性を有するものであれば特に制限されない。

[0061] 本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズにリガンドを固定化する方法は特に制限されず、常法を用いることができる。例えば、笠井献一ら著，「アフィニティークロマトグラフィー」東京化学同人，１９９１年の表８・１、表８・２、図８・１５に示されるような、臭化シアン法、トリクロロトリアジン法、エポキシ法、トレシルクロリド法、過ヨウ素酸酸化法、ジビニルスルホン酸法、ベンゾキノン法、カルボニルジイミダゾール法、アシルアジド法等を用いてアミノ基含有リガンドを固定化する方法；エポキシ法、ジアゾカップリング法等を用いて水酸基含有リガンドを固定化する方法；エポキシ法、トレシルクロリド法、ジビニルスルホン酸法等を用いて、チオール基含有リガンドを固定化する方法；アミノ化担体にカルボン酸含有リガンドやホルミル基含有リガンドを固定化する方法等の様々な固定化方法を挙げることができる。当該文献の全内容が、本願に参考のため援用される。

[0062] 本発明に係る吸着体は、精製用吸着体として用いることが可能であるが、

近年注目されている抗体医薬品精製用吸着体としても用いることが可能である。抗体医薬品精製用吸着体などに用いられる場合のリガンドとしては、特に限定は無いが、例えば、抗体に特異性の高い抗原やタンパク質や、プロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＬやそれらの変異体、抗体結合活性を有するペプチド等のアミノ基含有リガンドを挙げることができる。

[0063] 特に、免疫グロブリン（ＩｇＧ）を特異的に吸着できる吸着体として、プロテインＡ、プロテインＧ、またはそれらの変異体をリガンドとして多孔質担体に固定化した吸着体が注目されている。本発明に用いることができる上記プロテインＡ等には特に限定は無く、天然物や遺伝子組み換え物等を制限なく使用することができる。また、抗体結合ドメイン、その変異体、それらのオリゴマーを含むもの、融合蛋白質等であってもよい。かかるオリゴマーの重合数としては、２以上、１０以下とすることができる。また、菌体抽出物もしくは培養上清より、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー及び膜分離技術を用いた分子量分画、分画沈殿法等の手法から選択される精製法を組合せ、および／または繰り返すことにより製造された、プロテインＡ等を用いることもできる。特に、国際公開特許公報ＷＯ２００６／００４０６７や米国特許公報ＵＳ５１５１３５０、ＷＯ２００３／０８０６５５、特開２００６－３０４６３３、ＷＯ２０１０／１１０２８８に記載されている方法で得られたプロテインＡであることが好ましい。これら公報の全内容が、本願に参考のため援用される。プロテインＡを固定化した本発明の吸着体は、拡張性心筋症などの治療に使用できる治療用吸着体として利用することもできる。また、デキストラン硫酸などを固定化した本発明の吸着体は、高コレステロール血症治療用吸着体として利用することができる。

[0064] リガンドを高機能多孔質セルロースビーズに導入する方法としては、前述の様々な固定化方法から選択することができるが、より好ましいのは多孔質粒子が含有するホルミル基と、リガンドのアミノ基との反応を利用して固定

化を行う方法である。例えば、特開平１－２７８５３４号公報に記載の方法がある。当該公報の全内容が、本願に参考のため援用される。

[0065] 本発明の吸着体のリガンドの固定化量は特に制限されないが、例えば、高機能多孔質セルロースビーズ１ｍＬ当り、１ｍｇ以上、１０００ｍｇ以下とすることができる。当該割合が１ｍｇ以上であれば、目的吸着物質に対する吸着量が大きくなるため好ましく、１０００ｍｇ以下であれば、製造コストを抑制できるため好ましい。リガンドの導入量としては、高機能多孔質セルロースビーズ１ｍＬ当り、２ｍｇ以上がより好ましく、４ｍｇ以上がさらに好ましく、５ｍｇ以上が特に好ましく、また、５００ｍｇ以下がより好ましく、２５０ｍｇ以下がさらに好ましく、２００ｍｇ以下が特に好ましく、１００ｍｇ以下が最も好ましい。

[0066] 本発明に係る吸着体は、本発明方法で製造された高機能多孔質セルロースビーズを用いて得られるものである。高機能多孔質セルロースビーズや吸着体の強度の評価法に特に限定は無いが、本願の試験例２に示すような圧縮応力測定により評価することができる。

[0067] 本発明は、架橋セルロースビーズにセルロース分解酵素を作用させるという極めて簡便な方法で、強度を維持しながら、あるいは強度を向上させつつ、多孔質セルロースビーズの表面開孔度を向上させたり、吸着体として用いた場合に、吸着量を大きくする効果がある。用いることができる吸着体に特に限定は無いが、医療用吸着体、中でも表面開孔度を向上できることから、サイズの大きい病因物質（ＬＤＬコレステロール等）を吸着除去する治療用吸着体に好適に用いることができる。また、各種クロマト担体、なかでも大径カラムに充填される産業用クロマト担体として用いることができる。特に近年需要が旺盛な抗体医薬品精製用吸着体として用いる場合に、その効果を発揮することができる。このような観点から、本発明の高機能多孔質ビーズにプロテインＡやプロテインＧ、プロテインＬを導入した吸着体として好適に用いることができる。

[0068] 本発明に係る吸着体を使って目的吸着物質を精製するには、当該吸着体と

、当該目的吸着物質を含む溶液とを接触させればよい。接触方法は特に制限されず、目的吸着物質を含む溶液中に本発明に係る吸着体を添加してもよいし、上記のようにカラムに本発明の吸着体を充填し、目的吸着物質を含む溶液を通液することにより、本発明の吸着体に目的吸着物質を選択的に吸着させればよい。本発明に係る吸着体は強度が高いため、特にカラムに充填する場合、高速度での通液が可能になり、目的吸着物質を効率的に精製することができる。

[0069] 次に、目的吸着物質が選択的に吸着した本発明の吸着体を、濾過や遠心分離などにより溶液から分離する。この工程により、目的吸着物質とその他の物質を分離することができる。さらに、溶出液を用い、目的吸着物質を本発明吸着体から分離する。溶出液としては、例えば、ｐＨが２．５以上、４．５以下程度の酸性緩衝液を用いることができる。

[0070] 本願は、２０１３年１０月１５日に出願された日本国特許出願第２０１３－２１５１１９号に基づく優先権の利益を主張するものである。２０１３年１０月１５日に出願された日本国特許出願第２０１３－２１５１１９号の明細書の全内容が、本願に参考のため援用される。

実施例

[0071] 以下、本発明を実施例をあげてさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではないことは言うまでもない。

[0072] 試験例１　走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）観察

各製造例と実施例で得られたビーズを５倍体積量の３０％エタノールで洗浄し、ビーズに含まれる液体部分を３０％エタノールで置換した。次いで、５０％エタノール、７０％エタノール、９０％エタノール、特級エタノール、特級エタノール、特級エタノールを順に用いてビーズを同様に処理し、液体部分をエタノールで置換した。さらにｔ－ブチルアルコール／エタノール＝３／７の混合液を用いてビーズを同様に処理した。次いで、ｔ－ブチルアルコール／エタノール＝５／５、７／７、９／１、１０／０、１０／０、１０／０の混合液を順に用いてビーズを処理し、液体部分をｔ－ブチルアルコ

ールで置換した後、凍結乾燥した。表面観察の場合は、凍結乾燥を行なったビーズに金／パラジウムを蒸着源とした蒸着処理を行い、走査型電子顕微鏡（日立製作所「Ｓ－８００」）にてＳＥＭ観察像を撮影した。割断面観察の場合は、凍結乾燥を行ったビーズを割ってビーズ内部を露出させ、四塩化オスミウム結晶を蒸着源とした蒸着処理を行った後、走査型電子顕微鏡（ＣａｒｌＺｅｉｓｓ社製「ＵＬＴＲＡｐｌｕｓ」）にてＳＥＭ観察像を撮影した。

[0073] 試験例２　２０％圧縮応力の測定

（１）　試料調製

試料ビーズに純水を加えて濃度約５０体積％のスラリーを調製した。このスラリーの攪拌による均質化と、それに続く３０分以上の減圧による脱気とからなる均質・脱気操作を３回繰り返して実施し、脱気スラリーを得た。この操作とは別に、処理対象を純水に変えて、前記均質・脱法操作を９０分以上実施し、脱気水を得た。

[0074] （２）　ビーズ充填シリンジ調製

５ｍＬのルアロック付ディスポーサブルシリンジ（ＨＡＮＫＥ　ＳＡＳＳＷＯＬＦ社製「商標名：ＮＯＲＭ－ＪＥＣＴ」）の先端にディスポーサブルフィルター（ザルトリウス社製，孔径：５．００μｍ，親水性）を取り付けた。シリンジのピストンを外し、シリンジ後端側から脱気水を約３ｍＬ投入し、この脱気水が０ｍＬの標線を下回らないうちに、脱気スラリーを投入した。ディスポーザブルフィルターの二次側にアスピレーターを接続し、前記脱気スラリーを吸引した。ただし、ビーズがサクションドライ状にならないように注意し、ビーズの沈降体積＋０．５ｍＬ程度まで液面が下がったところで吸引を停止した。以降の作業は、液面がビーズの沈降体積＋０．５ｍＬを下回らないよう、減圧脱気した純水を追加しながら実施した。振動を与えながら前記脱気スラリーを追加またはビーズを除去し、ビーズ充填高さを３ｍＬの標線に合わせ、振動を与えてもビーズ充填高さが低下しないことを確認した。ビーズが舞い上がらないようゆっくりと脱気水を溢れるまで追加

し、気泡が入らないように注意しながらピストンを挿入した。以下、このシリンジを「ビーズ充填シリンジ」という。

[0075] （３） 測定

物性測定器（レオテック社製「ＦＵＤＯＨ ＲＨＥＯ ＭＥＴＥＲ」）に１０Ｋのロードセルを取り付け、変位速度のダイヤルを２ｃｍ／ＭＩＮに合わせ、前記ビーズ充填シリンジをセットし、ピストンの変位を開始した。変位と応力との関係を記録し、下記式に基づき、２０％圧縮応力を求めた。

[0076] ２０％圧縮応力＝（充填ビーズが２０％圧縮された時の応力）－（ピストンがビーズ面に達する直前の応力）

試験例３ ＲＴ（Ｒｅｓｉｄｅｎｃｅ ｔｉｍｅ）３分でのＩｇＧの動的吸着量測定

（１） 溶液作成

下記Ａ～Ｅ液および中和液を調製し、使用前に脱気した。

[0077] Ａ液：シグマ社製「Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒｅｄ ｓａｌｉｎｅ」とＲＯ水（逆浸透膜精製水）を用いてｐＨ７．４のＰＢＳ緩衝液を調製した。

[0078] Ｂ液：酢酸、酢酸ナトリウムおよびＲＯ水を用いてｐＨ３．５の３５ｍＭ酢酸ナトリウム水溶液を調製した。

[0079] Ｃ液：酢酸とＲＯ水を用いて１Ｍ酢酸水溶液を調製した。

[0080] Ｄ液：ポリクロナール抗体（バクスター社製「ガンマガード」）と前記Ａ液を用いて濃度１ｍｇ／ｍＬのＩｇＧ水溶液を調製した。

[0081] Ｅ液：尿素とＲＯ水で６Ｍ尿素水溶液を調製した。

[0082] 中和液：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンとＲＯ水で２Ｍのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン水溶液を調製した。

[0083] （２） 充填、準備

架橋ビーズにリガンドを固定化したものを吸着体試料とした。また、移動相には、ＲＯ水にＮａＣｌを加えて調製した０．２Ｍ ＮａＣｌ水溶液を用いた。カラムクロマトグラフィー用装置として、ＡＫＴＡｅｘｐｌｏｒｅｒ

１００（ＧＥヘルスケア社製）を用い、直径０．５ｃｍ、高さ１５ｃｍのカラムに、吸着体試料を３ｍＬ入れ、線速２３０ｃｍ／ｈで０．２ＭのＮａＣｌ水溶液を１５分通液して充填した。フラクションコレクターに１５ｍＬの採取用チューブをセットし、溶出液の採取用チューブについては、あらかじめ中和液を入れておいた。

[0084] （３） ＩｇＧ精製

前記カラムにＡ液を１５ｍＬ通液し、次いでＤ液を１５０ｍＬ通液した。次いで、Ａ液を２１ｍＬ通液後、Ｂ液を１２ｍＬ通液してＩｇＧを溶出させた。次にＣ液を６ｍＬ、Ｅ液を６ｍＬ、Ａ液を１５ｍＬ通液した。なお各液の流速は１ｍＬ／分とし、吸着体との接触時間が３分となるようにした。

[0085] （４） 動的吸着量

ＩｇＧが５％破過するまでに吸着体に吸着したＩｇＧ量と吸着体体積からＲＴ３ｍｉｎでのＩｇＧの動的吸着量を求めた。以下、当該動的吸着量を「５％ＤＢＣ」と略記する。

[0086] 製造例１ 架橋多孔質セルロースビーズの作製

（１） アルカリ水溶液の作製

和光純薬社製の水酸化ナトリウムと純水を用いて、３３重量％の水酸化ナトリウム水溶液を作製し、温度を４℃に調整した。

[0087] （２） セルロース分散液の作製

粉末状のセルロース（旭化成ケミカルズ社製「局方セルロース ＰＨ－Ｆ２０ＪＰ」）７６ｇと純水８００ｇを混合し、攪拌しながら４℃に調整した。次いで設定温度と攪拌を維持しながら４℃に調整した前記アルカリ水溶液を４００ｇ投入し、３０分間攪拌した。

[0088] （３） 多孔質セルロースビーズの作製

４℃に調整されたセルロース分散液１２７６ｇと、４℃に調整したオルトジクロロベンゼン７８０１ｇと、４℃に調整したソルビタンモノオレエート（ｓｐａｎ８０相当品）７８ｇを混合し、ディスクタービン（Ｒｕｓｈｔｏｎ ｔｕｒｂｉｎｅ）翼２枚を取り付けた温調ジャケット付ステンレス容器

内にて４６０ｒｐｍ（Ｐｖ値：５．０ｋＷ／ｍ^3）で４℃、１５分間攪拌し、エマルションを作製した。設定温度と攪拌を維持しながら４℃に調整されたメタノール５９２ｇを凝固溶媒として加えた。また凝固溶媒の添加所要時間は５秒であった。その後、攪拌数と設定温度を維持しながら３０分間攪拌した。加圧濾過を行なった後、洗浄液としてメタノール３０００ｇを用いて洗浄を行い、次いで３０００ｇの水で洗浄を行い、多孔質セルロースビーズを得た。得られた多孔質セルロースビーズは、図１に示す通り、表面に良好な孔が空いていることが確認できた。

[0089] （４） 架橋多孔質セルロースビーズの作製

得られた多孔質セルロースビーズを、３８μｍと９０μｍの篩を用いて湿式分級した後、ビーズ体積として２０ｍＬに相当する多孔質セルロースビーズと水とのスラリーを反応容器に入れた。ビーズを自然沈降させた後、過剰の水を抜き取ることにより、液量を２２ｍＬに調整した。グリセロールポリグリシジルエーテル（ナガセケムテックス社製「デナコールＥＸ－３１４」）とアセトニトリルを体積比１：１で混合した架橋剤溶液２２ｍＬを投入し、一晩攪拌した。

[0090] グラスフィルター上にて濾過を行った後、ビーズに前記架橋剤溶液を２２ｍＬ通液し、再度濾過を行った。ビーズを反応容器に移し、前記架橋剤溶液で液量を２２ｍＬに調整した。次いで２Ｍの水酸化ナトリウム水溶液（純水と和光純薬社製の水酸化ナトリウムで作製）を１８ｍＬ添加し、４０℃で１０分間攪拌した。次いで、芒硝（和光純薬社製）７．６ｇとグリセロールポリグリシジルエーテル（ナガセケムテックス社製「デナコールＥＸ-３１４」）を３ｍＬ添加し、４０℃で４時間５０分攪拌した。濾過後、大量の純水で洗浄し、１回目架橋ビーズを得た。得られた１回目架橋ビーズと水のスラリーを反応容器に移し、ビーズを自然沈降させた後、過剰の水を抜き取ることにより、液量を２２ｍＬに調整した。これを４０℃に加熱し、２Ｍの水酸化ナトリウム水溶液１８ｍＬと芒硝７．６ｇとグリセロールポリグリシジルエーテル（ナガセケムテックス社製「デナコールＥＸ-３１４」）を３．０ｍＬ

添加し、４０℃で５時間攪拌した。濾過後、大量の純水で洗浄し、２回目架橋ビーズを得た。得られた２回目架橋ビーズと水のスラリーを反応容器に移し、ビーズを自然沈降させた後、過剰の水を抜き取ることにより、液量を２９ｍＬに調整した。これを４０℃に加熱し、４Ｍの水酸化ナトリウム水溶液（純水と和光純薬社製の水酸化ナトリウムで作製）３．７ｍＬと芒硝７．６ｇとエピクロロヒドリン２．６ｇを添加し、４０℃で２時間攪拌した。濾過後、大量の純水で洗浄し、３回目架橋ビーズを得た。得られた架橋３回ビーズを容器に移し、純水を加えて、全量をセルロースビーズの１０倍体積量とし、オートクレーブを用いて１２０℃で６０分間加温した。室温まで放冷した後、ビーズの５倍体積量以上の蒸留水で洗浄し、オートクレーブ済みの架橋３回ビーズを得て、これを架橋セルロースビーズとした。このビーズ表面のＳＥＭ観察像を図２に示す。また、このビーズの２０％圧縮応力は０．２５２ＭＰａであった。

[0091] 実施例１　高機能多孔質セルロースビーズの作製

製造例１で作製した架橋されたセルロースビーズを１５分間吸引濾過し、濾過後のビーズ６ｇを反応容器に投入した。０．１ｗｔ％のクエン酸一水和物（和光純薬社製）水溶液と０．１ｗｔ％のクエン酸三ナトリウム（和光純薬社製）水溶液を混合してｐＨ５．０の緩衝液を作製した。この緩衝液にセルラーゼ（東京化成工業社製，Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ由来，Ｌｏｔ：ＹＱ２１１－ＱＭ，比活性：２２９００ｕ／ｇ）が１ｗｔ％になるように添加し、溶解した。このセルラーゼが溶解したクエン酸系緩衝液４００ｍＬを前記反応容器へ投入し、４５℃で１時間攪拌した。反応容器の内容物を濾過後、大量の水で洗浄することにより、高機能多孔質セルロースビーズを取得した。得られたビーズ表面のＳＥＭ観察像を図３に示す。

[0092] 図２のとおり、セルラーゼ処理前のビーズには微細な表面孔がほとんど観察されなかったのに対して、図３のとおり、セルラーゼ処理した本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズには微細な表面孔が発現していた。また、得られたビーズの２０％圧縮応力は０．２５６ＭＰａであり、セルラーゼ処

理にもかかわらず、強度が維持されていた。

[0093] 製造例２　架橋多孔質セルロースビーズの作製

製造例１における架橋剤溶液のアセトニトリルをイソプロピルアルコールに替えた以外は、製造例１と同様の方法で架橋セルロースビーズを得た。このビーズ表面のＳＥＭ観察像を図４に示した。

[0094] 実施例２　高機能多孔質セルロースビーズの作製

架橋セルロースビーズとして製造例２で得られたものを用いること以外は、実施例１と同様の方法で、セルラーゼで処理された高機能多孔質セルロースビーズを得た。このビーズ表面のＳＥＭ観察像を図５に示した。

[0095] 図４と図５との比較においても、セルラーゼ処理前のビーズには微細な表面孔がほとんど観察されなかったのに対して、セルラーゼ処理した本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズには微細な表面孔が発現していた。

[0096] 製造例３　架橋多孔質セルロースビーズの作製

製造例１と同様に作製された未架橋の多孔質セルロースビーズ２０ｍＬを計量し、４０℃に温調した。その後、グラスフィルター上で濾過し、濾過後のビーズを反応容器に移した。この反応容器に４０℃に温調した２Ｍ水酸化ナトリウム水溶液を１２．２ｍＬ投入し、３０分間攪拌した。次いで、水素化ホウ素ナトリウム（和光純薬社製）を２４．４ｍｇ、グリセロールポリグリシジルエーテル（ナガセケムテックス社製「デナコールＥＸ-３１４」）を０．５ｍＬ投入し１０分間４０℃で攪拌した。その後、芒硝を７．６ｇ、グリセロールポリグリシジルエーテル（ナガセケムテックス社製「デナコールＥＸ-３１４」）を６．１ｍＬ投入し、４０℃で４時間５０分攪拌した。濾過後、大量の純水で洗浄し、１回目架橋ビーズを得た。さらに、得られた１回目架橋ビーズに対して、上記の４０℃への温調から大量の純水での洗浄までの架橋操作をもう１回繰り返し、架橋２回ビーズを得た。得られた２回目架橋ビーズと水のスラリーを反応容器に移し、ビーズを自然沈降させた後、過剰の水を抜き取ることにより、液量を２９ｍＬに調整した。これを４０℃に加熱し、４Ｍの水酸化ナトリウム水溶液（純水と和光純薬社製の水酸化ナト

リウムで作製）３．７ｍＬと芒硝７．６ｇとエピクロロヒドリン２．６ｇを添加し、４０℃で２時間攪拌した。濾過後、大量の純水で洗浄し、３回目架橋ビーズを得た。得られた３回目架橋ビーズを容器に移し、純水を加えて、全量をセルロースビーズの１０倍体積量とし、オートクレーブを用いて１２０℃で６０分間加温した。室温まで放冷した後、ビーズの５倍体積量以上の蒸留水で洗浄し、オートクレーブ済みの架橋３回ビーズを得て、これを架橋セルロースビーズとした。このビーズの割断面のＳＥＭ観察像を図６に示した。得られたビーズの２０％圧縮応力は０．０８４ＭＰａであった。

[0097] 実施例３　高機能多孔質セルロースビーズの作製

架橋セルロースビーズを製造例３で得られたものを用いること以外は、実施例１と同様の方法で、セルラーゼで処理された高機能多孔質セルロースビーズを得た。このビーズの割断面のＳＥＭ観察像を図７に示した。

[0098] 図６と図７のとおり、ビーズの内部において、セルラーゼ処理前のビーズは骨格が比較的太く細孔容量が少ないといえるのに対して、セルラーゼ処理した本発明に係る高機能多孔質セルロースビーズでは骨格が比較的細く、細孔容量が増大しているといえる。また、驚くべきことに、このように骨格がセルラーゼ処理により細くなっているにもかかわらず、得られた高機能多孔質セルロースビーズの２０％圧縮応力は０．１４０ＭＰａであり、強度はかえって向上されていた。

[0099] 製造例４　吸着体の作製

（１）　プロテインＡ調製工程

国際公開ＷＯ２０１１／１１８６９９号の実施例を参照して、改変型プロテインＡとして、国際公開ＷＯ２０１１／１１８６９９号記載のアルカリ耐性を有する改変Ｃドメイン５連結体を調製した。

[0100] （２）　プロテインＡ固定化工程

製造例３で得られた架橋多孔質セルロースビーズ５ｍＬを遠沈管に入れ、ＲＯ水を加えて、全量を７．５ｍＬとした。これを２５℃にてミックスローター（アズワン社製「ミックスローターＭＲ－３」）上に取り付けた後、撹

拌した。次に、過ヨウ素酸ナトリウムをＲＯ水に溶解して得られた１２．８４ｍｇ／ｍＬ過ヨウ素酸ナトリウム水溶液を２．５ｍＬ加え、２５℃で１時間撹拌した。反応後、グラスフィルター（シバタ社製「１１ＧＰ１００」）上で、濾液の電気伝導度が１μＳ／ｃｍ以下となるまでＲＯ水で洗浄し、ホルミル基含有架橋多孔質セルロースビーズを得た。洗浄濾液の電気伝導度は、導電率計（ＥＵＴＥＣＨ　ＩＮＳＴＲＵＭＥＮＴＳ社製「ＥＣＴｅｓｔｅｒ１０　Ｐｕｒｅ＋」）で測定した。

[0101] 得られたホルミル基含有架橋多孔質セルロースビーズ５ｍＬをグラスフィルター（シバタ社製「１１ＧＰ１００」）に移し、クエン酸三ナトリウム二水和物をＲＯ水に溶解して得られた０．２５Ｍクエン酸三ナトリウム水溶液を１５ｍＬ以上通液して、ビーズ内の液体を前記クエン酸三ナトリウム水溶液に置換した。前記０．２５Ｍクエン酸三ナトリウム水溶液を用い、置換後のホルミル基含有架橋多孔質セルロースビーズを、遠沈管に入れた。ホルミル基含有多孔質セルロースビーズを沈降させた後、総体積量７．５ｍＬとなるように上清を除去して調整した。ここに、前記改変型プロテインＡが入った水溶液（プロテインＡの濃度：６６．６７ｍｇ／ｍＬ）を１．５０ｇ加えた後、０．０８Ｎの水酸化ナトリウム水溶液でｐＨを１２に調整した。６℃にて２３時間、ミックスローター（アズワン社製「ミックスローターＭＲ－３」）を用い、攪拌させながら反応した。

[0102] その後、反応液のｐＨが５になるまで、クエン酸一水和物をＲＯ水に溶解して得られた２．４Ｍクエン酸水溶液を加え、引き続き６℃で４時間ミックスローターを用いて攪拌した。続いて、ジメチルアミンボランをＲＯ水に溶解して得られた５．５重量％ジメチルアミンボラン水溶液を１．１３ｍＬ加えて、６℃で１時間攪拌した。その後、反応温度を２５℃に上昇させ、２５℃で１８時間攪拌しながら反応した。

[0103] 反応後のビーズをグラスフィルター（シバタ社製「１１ＧＰ１００」）上で、ビーズの３倍体積量のＲＯ水で洗浄した。次いで、クエン酸一水和物をＲＯ水に溶解して得られた０．１Ｍクエン酸一水和物を３倍体積量加え、当

該ビーズに０．１Ｍクエン酸一水和物を加えて全量を３０ｍＬ以上とし、遠沈管に入れ、２５℃で３０分間攪拌しながら、酸洗浄を行った。

[0104] 酸洗浄後、ビーズをグラスフィルター（シバタ社製「１１ＧＰ１００」）上で、ビーズの３倍体積量のＲＯ水で洗浄し、次いで、水酸化ナトリウムをＲＯ水に溶解して得られた０．０５M水酸化ナトリウムと、硫酸ナトリウムをＲＯ水に溶解して得られた１M硫酸ナトリウム水溶液を、それぞれ３倍体積量加えた。次に、当該ビーズに、０．０５M水酸化ナトリウムと１M硫酸ナトリウム水溶液を加えて全量を３０ｍＬ以上とし、遠沈管に入れ、室温で３０分間攪拌しながら、アルカリ洗浄を行った。

[0105] アルカリ洗浄後、ビーズをグラスフィルター（シバタ社製「１１ＧＰ１００」）上で、ビーズの２０倍体積量のＲＯ水で洗浄した。次に、クエン酸三ナトリウム二水和物をＲＯ水に溶解して得られた０．１Ｍクエン酸ナトリウム水溶液をビーズの３倍量加え、濾液が中性になっていることを確認した後、ＲＯ水を用いて、洗浄濾液の電導度が１μＳ／ｃｍ以下になるまで洗浄することにより、プロテインＡを固定化した吸着体を得た。洗浄濾液の電導度は導電率計（ＥＵＴＥＣＨ　ＩＮＳＴＲＵＭＥＮＴＳ社製「ＥＣＴｅｓｔｅｒ１０　Ｐｕｒｅ＋」）で測定した。この吸着体のＲＴ３ｍｉｎでの５％ＤＢＣは２２．０ｇ/Ｌであった。

[0106] 実施例４　吸着体の作製

高機能多孔質セルロースビーズを実施例３で得られたものを用いること以外は製造例４と同様に吸着体を得た。この吸着体のＲＴ３ｍｉｎでの５％ＤＢＣは２４．４ｇ/Ｌであった。かかる結果のとおり、通常の吸着体に比べ、セルラーゼ処理を経た高機能多孔質セルロースビーズを含む吸着体の吸着性能は改善された。

請求の範囲

[請求項1] 架橋多孔質セルロースビーズにセルロース分解酵素を作用させる工程を含むことを特徴とする、高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項2] 前記セルロース分解酵素としてエンド型セルロース分解酵素を用いる請求項１に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項3] 前記セルロース分解酵素として、さらにエキソ型セルロース分解酵素を用いる請求項２に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項4] 前記セルロース分解酵素を、１時間以上、１０時間以内、前記架橋多孔質セルロースビーズに作用させる請求項１～３のいずれか一項に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項5] 前記架橋多孔質セルロースビーズが架橋剤としてグリシジルエーテル系化合物を用いて架橋されたものであることを特徴とする、請求項１～４のいずれか一項に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項6] 前記架橋多孔質セルロースビーズが架橋反応の反応溶媒として水を用いて架橋されたものであることを特徴とする、請求項１～５のいずれか一項に記載の高機能多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項7] 請求項１～６のいずれか一項に記載の方法で製造された高機能多孔質セルロースビーズに、目的吸着物質と相互作用するリガンドを固定化することにより吸着体を得る工程を含むことを特徴とする吸着体の製造方法。

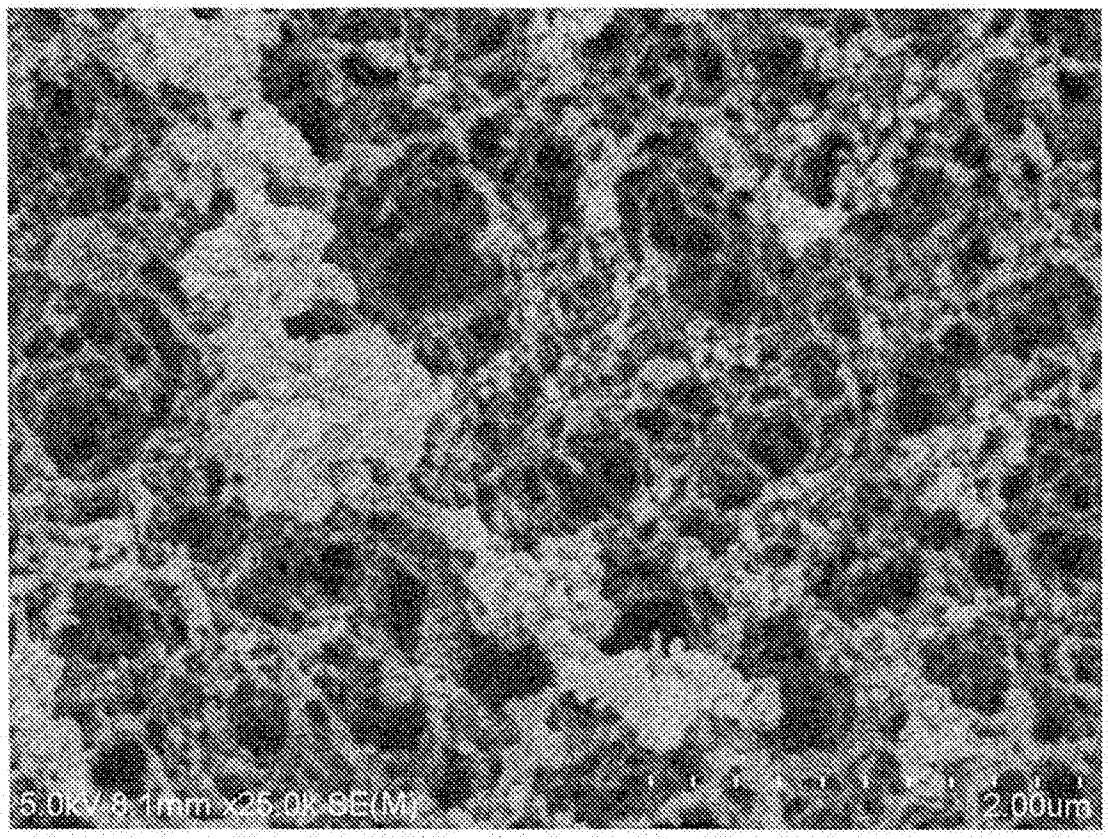
[請求項8] 請求項１～６のいずれか一項に記載の方法で製造された高機能多孔質セルロースビーズ、および、目的吸着物質と相互作用するリガンドを含むことを特徴とする吸着体。

[請求項9] 請求項１～６のいずれか一項に記載の方法で製造された高機能多孔質セルロースビーズに、目的吸着物質と相互作用するリガンドを固定

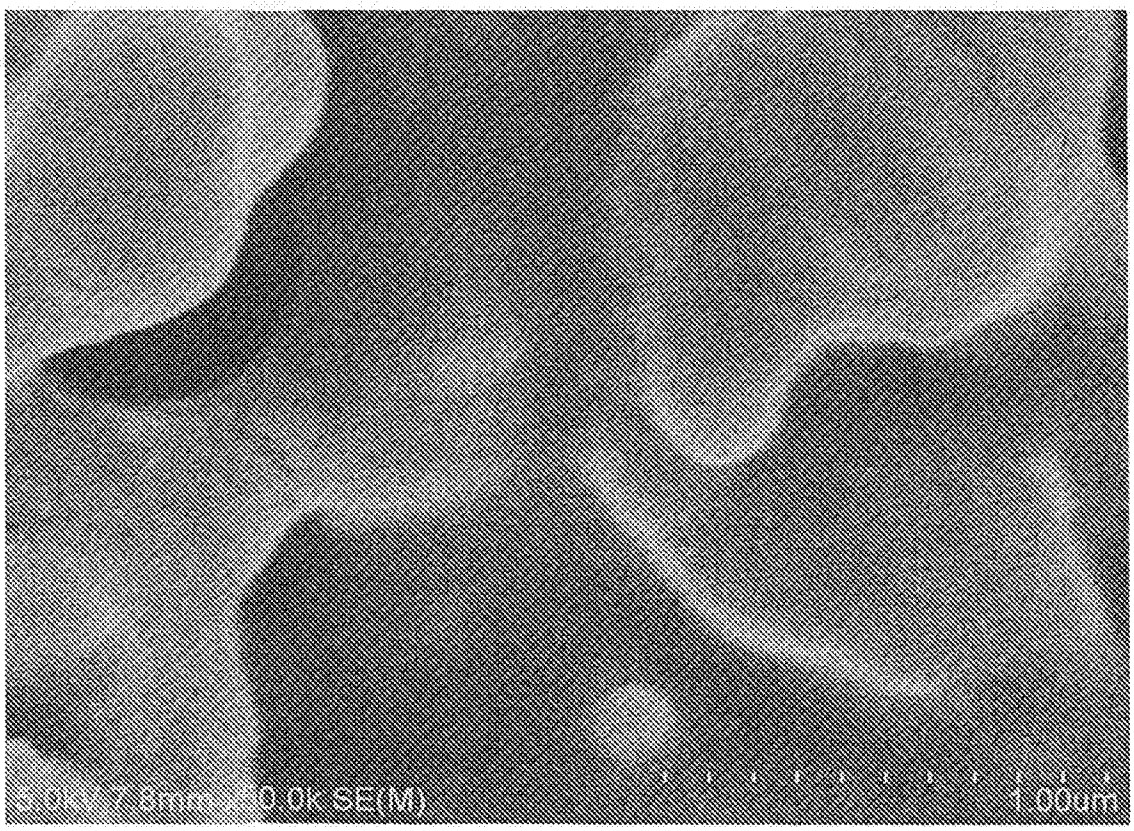
化することにより製造されたものであることを特徴とする吸着体。

[請求項10] 請求項８または９に記載の吸着体と、前記目的吸着物質を含む溶液とを接触させる工程を含むことを特徴とする精製方法。

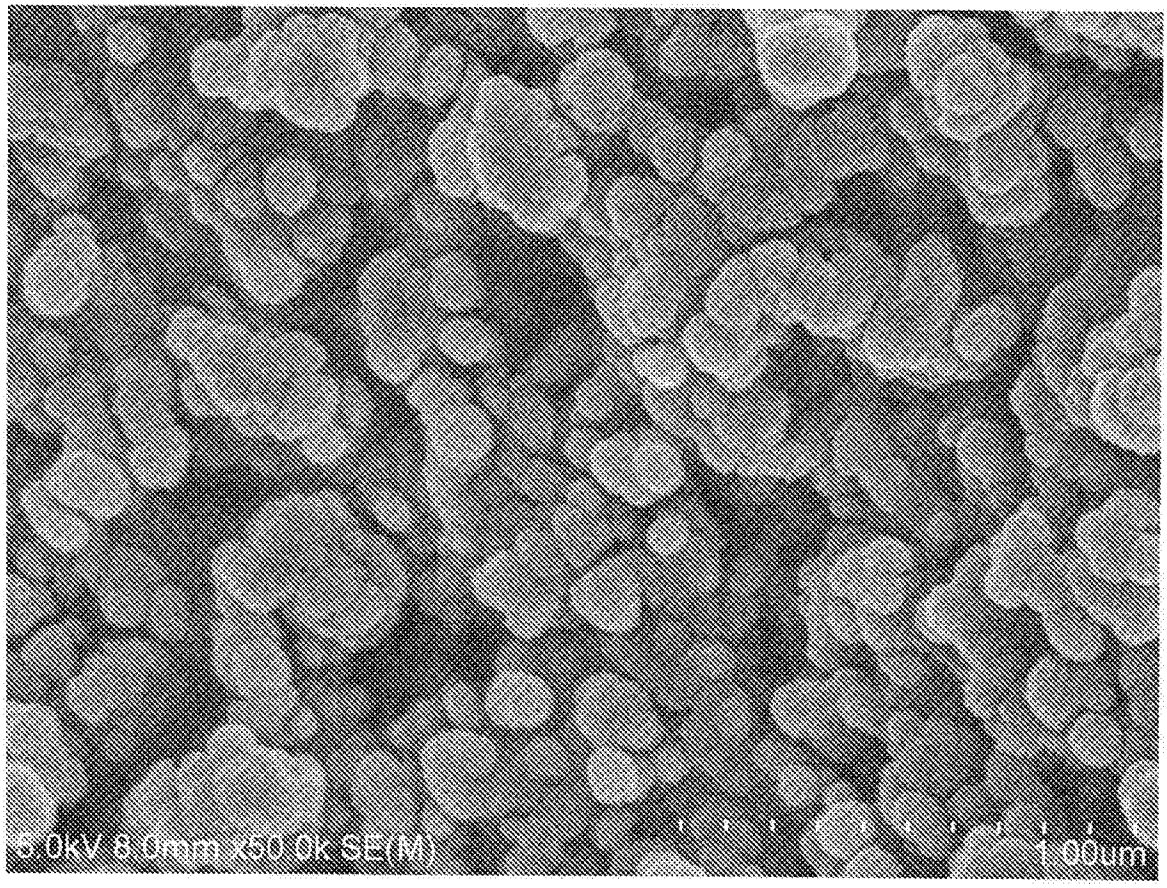
[図1]



[図2]



[図3]



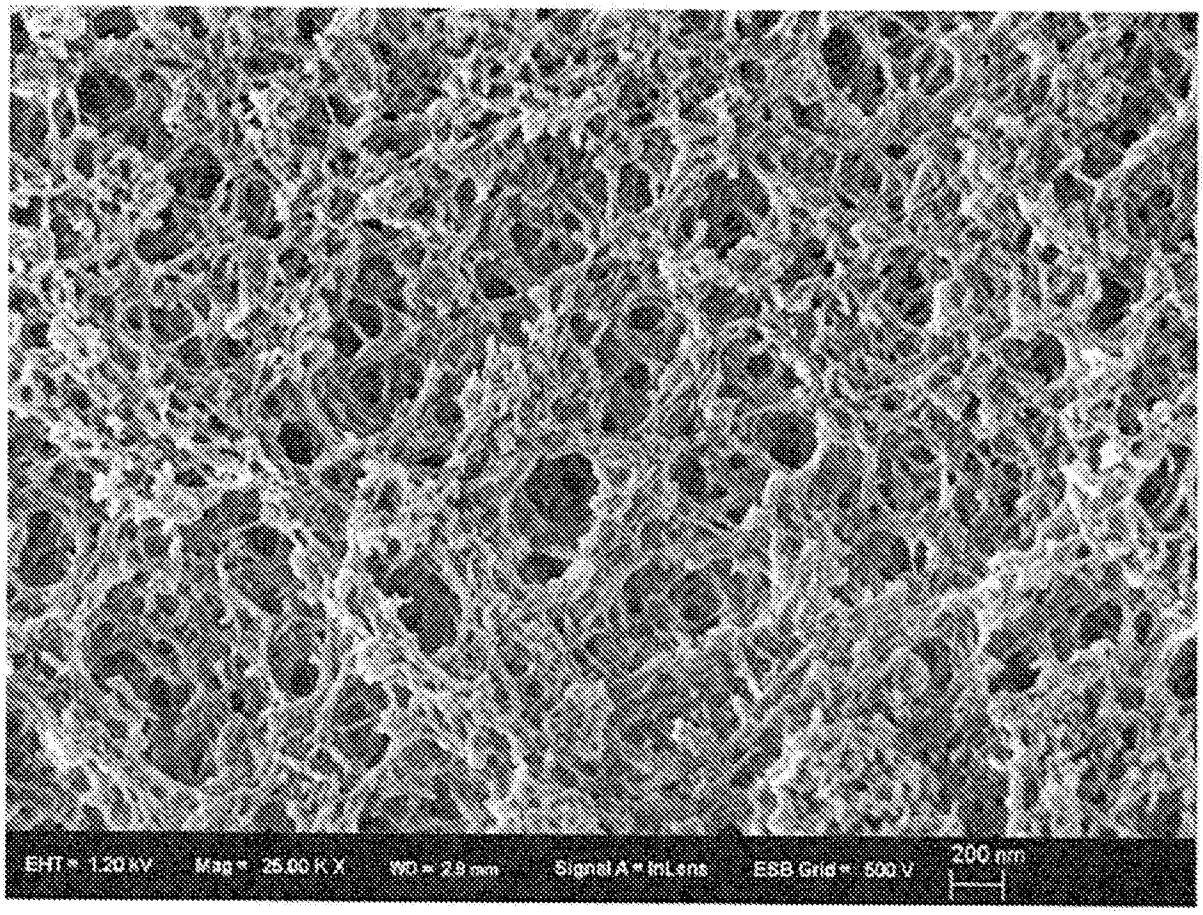
[図4]



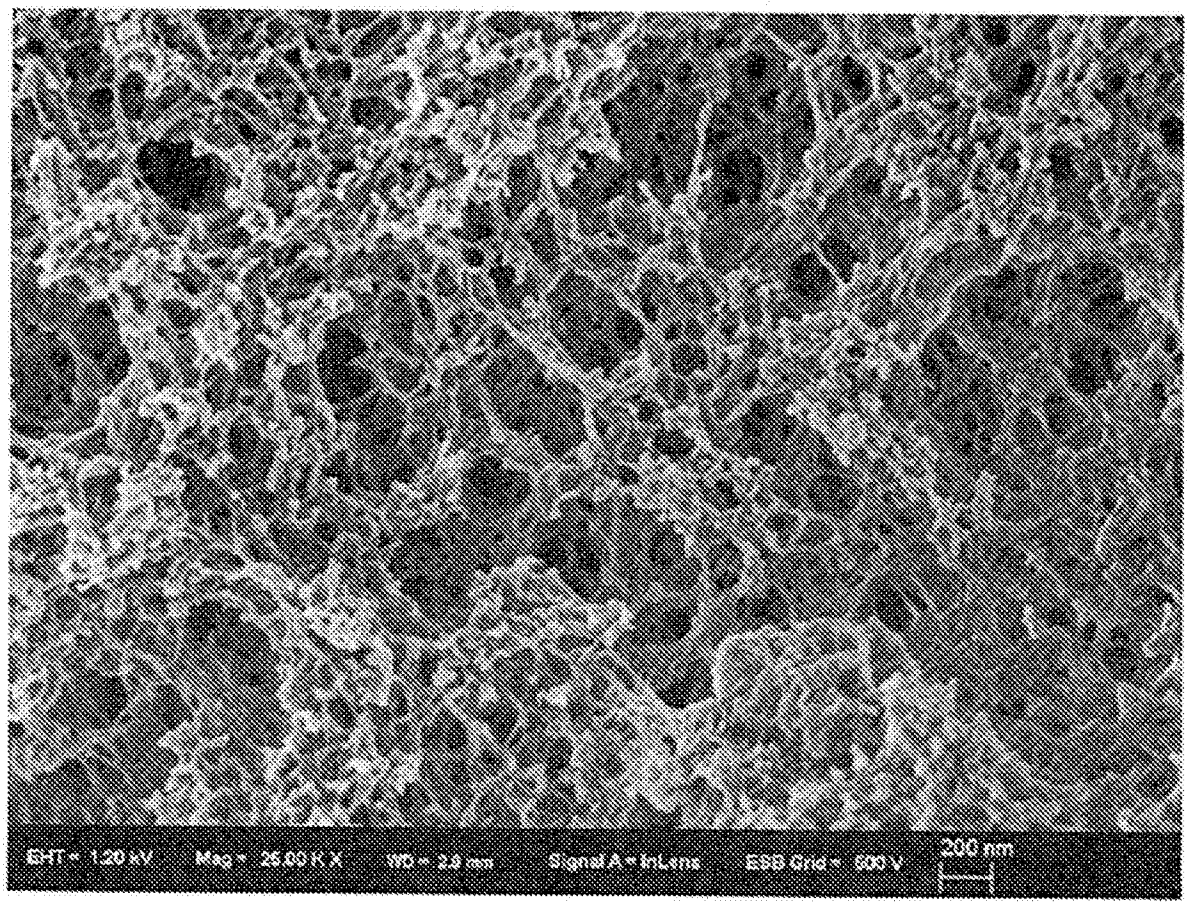
[図5]


5.0kV 8.1mm ×50.0k SE(M)
1.00μm

[図6]


EHT = 1.20 kV
Mag = 25.00 K X
WD = 2.9 mm
Signal A = InLens
ESB Grid = 500 V
200 nm

[図7]


EHT = 1.20 kV
Mag = 25.00 K X
WD = 2.9 mm
Signal A = InLens
ESB Grid = 500 V
200 nm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/077360

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P19/14(2006.01)i, *B01J20/24*(2006.01)i, *B01J20/30*(2006.01)i, *C07K1/22*(2006.01)i, *C08B15/10*(2006.01)i, *G01N30/88*(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)
C12P19/14, B01J20/24, B01J20/30, C07K1/22, C08B15/10, G01N30/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), 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.
Y	JP 2011-252929 A (Kaneka Corp.), 15 December 2011 (15.12.2011), (Family: none)	1-10
Y	WO 2008/146906 A1 (Kaneka Corp.), 04 December 2008 (04.12.2008), & US 2010/0184957 A1 & EP 2165758 A1	1-10
Y	JP 2009-247981 A (Saga University), 29 October 2009 (29.10.2009), (Family: none)	1-10
Y	JP 2001-139938 A (Keijiro NAKAMURA), 22 May 2001 (22.05.2001), (Family: none)	1-10

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"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
09 January 2015 (09.01.15)	27 January 2015 (27.01.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

The wording "method for purification" in claim 10 is unclear as to what is purified by the method. Consequently, the invention in claim 10 is unclear.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０７７３６０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P19/14(2006.01)i, B01J20/24(2006.01)i, B01J20/30(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C08B15/10(2006.01)i, G01N30/88(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.　C12P19/14, B01J20/24, B01J20/30, C07K1/22, C08B15/10, G01N30/88

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

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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), 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
Y	JP 2011-252929 A (株式会社カネカ) 2011.12.15, (ファミリーなし)	１－１０
Y	WO 2008/146906 A1 (株式会社カネカ) 2008.12.04, & US 2010/0184957 A1 & EP 2165758 A1	１－１０
Y	JP 2009-247981 A (国立大学法人佐賀大学) 2009.10.29, (ファミリーなし)	１－１０
Y	JP 2001-139938 A (中村啓次郎) 2001.05.22, (ファミリーなし)	１－１０

☐　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０９．０１．２０１５	２７．０１．２０１５

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）　４Ｂ　３１２６
松田　芳子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

請求項１０の「精製方法。」という記載では、何の精製方法であるかが不明確であるため、請求項１０に係る発明が不明確になっている。