

(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
2012年9月13日(13.09.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/121073 A1

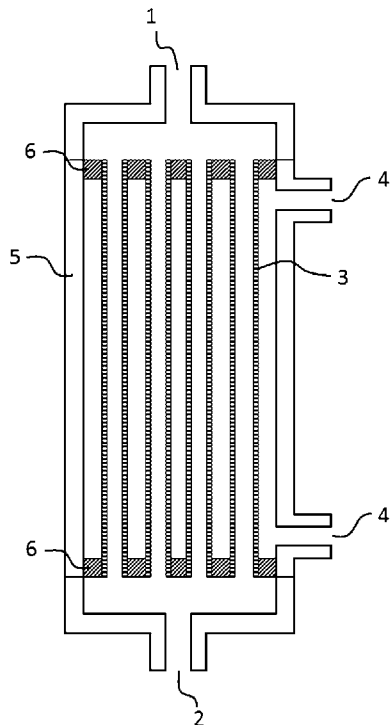
- (51) 国際特許分類:
A61M 1/36 (2006.01) A61M 1/34 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/055043
- (22) 国際出願日: 2012年2月29日(29.02.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-047556 2011年3月4日(04.03.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): D I C株式会社(DIC Corporation) [JP/JP]; 〒1748520 東京都板橋区坂下三丁目3番58号 Tokyo (JP). 国立大学法人浜松医科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HAMAMATSU UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) [JP/JP]; 〒4313192 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 櫻井 直人(SAKURAI Naoto) [JP/JP]; 〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C株式会社 総合研究所内 Chiba (JP). 生島 直也(IKUSHIMA Naoya) [JP/JP]; 〒2858668 千葉県佐倉市坂戸631番地 D I C株式会社 総合研究所内 Chiba (JP). 鈴木 哲朗(SUZUKI Tetsuro) [JP/JP]; 〒4313192 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号 国立大学法人浜松医科大学内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 河野 通洋(KONO Michihiro); 〒1038233 東京都中央区日本橋三丁目7番20号 D I C株式会社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

[続葉有]

(54) Title: SUGAR-IMMOBILIZED POLYMER SUBSTRATE FOR REMOVING VIRUSES, AND METHOD FOR REMOVING VIRUSES

(54) 発明の名称: 糖類固定化ウイルス除去用高分子基材、及びウイルスの除去方法

【図1】



(57) Abstract: The present invention provides a sugar-immobilized polymer substrate for removing viruses, said sugar-immobilized polymer substrate enabling efficient removal of hepatitis virus or the like from a body fluid, and a method for removing viruses. In the case of applying to blood of a living organism, in particular, the present invention provides a sugar-immobilized polymer substrate for removing viruses, said sugar-immobilized polymer substrate enabling removal of hepatitis virus or the like with low invasiveness, i.e., needing only a small amount of the blood to be taken out from the body and removing little useful blood components, and also enabling shortening of the operation time, and a method for removing viruses. A hollow fiber membrane according to the present invention is usable as a module that has a function of efficiently removing viruses and a function of not removing useful plasma components.

(57) 要約: 本発明は、効率的に液中の肝炎ウイルス等を除去する糖類が固定化されたウイルス除去用高分子基材及びウイルスの除去方法を提供することであり、特に、生体の血液に適用するにあたっては、体外に取り出す血液量や、血中有用成分の除去量が少なく、低い侵襲性で施術サイクルの短縮が可能な、肝炎ウイルス等を除去する糖類が固定化されたウイルス除去用高分子基材及びウイルスの除去方法を提供する。本発明の中空糸膜は、高いウイルス除去機能と有用な血漿成分を除去しない機能を有するモジュールとして利用が可能である。

WO 2012/121073 A1



MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, 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.

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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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, MD, RU, TJ, TM), ヨー

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：

糖類固定化ウイルス除去用高分子基材、及びウイルスの除去方法

技術分野

[0001] 本発明は、糖類固定化ウイルス除去用高分子基材、及びウイルスの除去方法に関する。

背景技術

[0002] C型肝炎はC型肝炎ウイルス（HCV）の慢性的感染が原因であり、薬剤による治療法としてペグインターフェロン、リバビリンの併用療法が一般的である。ジェノタイプ1bかつ血液中のウイルス量の多い患者では、治療成績は50%程度であり、肝硬変や肝がんへの移行割合が高いことから、より有効な治療法、薬剤の開発が望まれている（非特許文献1）。一般的に薬剤による治療では、血中のウイルス量が低い場合に治療成績が高いことが知られており、血中のHCVを多孔性のフィルターで除去し、薬剤との併用療法を行うと、治療成績が向上するとの報告がある（非特許文献2）。即ち、体内のウイルス量を下げることによって、治療成績が向上したものと推定される。

[0003] また、特許文献1には、血液入口、上流側血液回路、血漿分離手段、下流側血液回路がこの順に接続され、更に血漿分離手段の血漿出口、上流側血漿回路、血漿浄化手段、下流側血漿回路がこの順に接続され、下流側血漿回路の末端は下流側血液回路の途中に設けられた血液血漿混合手段に接続されている血液処理装置であって、下流側血液回路の血液血漿混合手段の下流側に少なくともウイルス及びウイルス感染細胞を除去する水不溶性担体からなる血球処理手段が設けられ血漿浄化手段が最大孔径20nm以上50nm以下の多孔性濾過膜からなる装置が記載されている。

[0004] しかしながら、上記フィルターで除去する方法は、一旦血球と血漿を分離した後、血漿成分からウイルスを除去することから、回路構成は複雑で、より簡便に血中からウイルスを除去する方法が望まれている。

リガンド等を固定化したC型肝炎ウイルス用の血液浄化用吸着材としては、特許文献2に、免疫グロブリン等と親和性のあるペプチドを水不溶性ゲルに固定化し、免疫複合体型C型肝炎ウイルスを効率良く除去する方法が報告されている。

[0005] 一方、HCVに結合するリガンドとしてヘパリンが有効なことが知られている（非特許文献3）。よって、血球と血漿を分離することなく全血を通過させることのできる中空糸等の高分子支持体にヘパリンが固定化された基材や血球血漿分離膜の細孔内などにヘパリンを固定化した基材であればより簡便にHCVを除去できる可能性があり、患者への負担の少ないHCV除去モジュール等を提供できることが期待される。

[0006] ヘパリンが固定化された基材の形態にはビーズや多孔質中空糸が挙げられる。多孔質中空糸を用いた内部循環型やろ過型の体外循環モジュールは、粒子状ヘパリン固定化基材の充填された体外循環モジュールと比較して血液の滞留部分が少ないことから、構成上血栓の形成が少ない利点を有する。多孔質中空糸にヘパリンを固定化する際、表面官能基の種類や固定化密度は基材材質によって異なり、各基材によって最適な方法を見出す必要がある。

[0007] 一方、糖鎖を有するウイルス吸着剤として、ヒト免疫不全ウイルス（以下HIV）に吸着作用を有する基材の報告がある。例えば、特許文献3には、主鎖にメチレン基を有する高分子基材に、エチレン性不飽和結合と糖鎖を有する重合性化合物、又は該重合性化合物を含む重合性組成物を接触させ、電離性放射線を照射するか、又は、前記高分子基材に電離放射線を照射した後、前記重合性化合物、又は該重合性化合物を含む重合性組成物を接触させて得られる、糖鎖を有するHIV吸着用高分子基材が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開2005-230165

特許文献2：特開平10-323387

特許文献3：特開2010-68910

非特許文献

[0009] 非特許文献1：ウイルス性肝炎－基礎・臨床研究の進歩－日本臨床69巻増刊号4（2011）

非特許文献2：A. K. Fujiwara et al. Hepatol. Res., 37, 701（2007）

非特許文献3：Zahn, J. P. Allain, J. Gen. Virol., 86, 677（2005）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の課題は、従来技術を鑑み、血栓等の生成による目詰まりを起こすことなく、血液等の体液を流すことができ、効率的に体液中のウイルスを除去することが可能な基材、器具を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 上記課題を解決するために、本発明者らは高分子支持体（A）の選択、ウイルスを除去する機能を有する糖類の高分子支持体（A）への固定化方法について詳細に検討を行った結果、本発明を完成させるに至った。

[0012] 即ち、本発明は、糖類が固定化されたウイルス除去用高分子基材であって、水酸基を有する高分子材で表面処理された高分子支持体（A）と、水酸基と反応して共有結合を形成しうる基を有する化合物（B）が結合し、更にアミノ基を有する化合物（C）を介して糖類が固定化されたことを特徴とするウイルス除去用高分子基材に関する。または、化合物（C）を介せずとも、化合物（B）を介して糖類が固定化されたことを特徴とするウイルス除去用高分子基材に関する。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、除去が好ましくない血液成分を吸着・除去することなく、ウイルスを選択的に除去できる機能を有する高分子基材、及びそれを用いた医療器具を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明の高分子基材を備えてなる医療器具の一例を示す概略断面図である。

発明を実施するための形態

[0015] 即ち、本発明は、

1. 糖類が固定化されたウイルス除去用高分子基材であって、水酸基を有する高分子材で表面処理された高分子支持体（A）と、水酸基と反応して共有結合を形成しうる基を有する化合物（B）が結合し、更にアミノ基を有する化合物（C）を介して糖類が固定化されたことを特徴とするウイルス除去用高分子基材、

2. 水酸基を有する高分子材で表面処理された高分子支持体（A）が、エチレンービニルアルコール共重合体、エチレンービニルアルコールー酢酸ビニル共重合体、エチレンー酢酸ビニル共重合体の部分けん化物、ビニルアルコールー酢酸ビニル共重合体、ヒドロキシメタクリレート共重合体、酢酸セルロースの部分けん化物又はグリセリン誘導体で表面処理された中空糸である

1. に記載のウイルス除去用高分子基材、

3. 中空糸が、多孔性中空糸である2. に記載のウイルス除去用高分子基材、

4. 中空糸が、ポリエチレン、ポリプロピレン又はポリ-4-メチルペンテンを基質とするものである2. 又は3. に記載のウイルス除去用高分子基材、

5. 多孔性中空糸の平均流量孔径が50～500nmの範囲である3. 又は4. に記載のウイルス除去用高分子基材、

6. 多孔性中空糸の内径が150～500 μ mの範囲である3. ～5. の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材、

7. 多孔性中空糸の膜厚が30～100 μ mの範囲である3. ～6. の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材、

8. 多孔性中空糸の糖類の固定化量が1～100 μ g/cm²の範囲である3

． ～ 7． の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材、

9． 水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物（B）が、エピクロロヒドリン、カルボン酸無水物、ジカルボン酸化合物、ジカルボン酸塩化物、ジイソシアネート、ジエポキシ化合物、（メタ）アクリル酸、グリシジル（メタ）アクリレート又は（メタ）アクリロイルオキシアルキルイソシアネートである 1． ～ 8． の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材、

10． アミノ基を有する化合物（C）が、ポリアリルアミン、アンモニア、2-アミノエタノール、エチレンジアミン、ブチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン、1, 2-ビス（2-アミノエトキシ）エタン、3, 3'-ジアミノジプロピルアミン、ジエチレントリアミン、フェニレンジアミン、又はポリエチレンジアミンである 1． ～ 9． の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材、

11． 糖類が、ヘパリン、ヘパリンの1級又は2級水酸基を硫酸エステル化したヘパリン誘導体、ヘパリンのN-アセチル基のアセチル基脱離体をN-硫酸エステル化したヘパリン誘導体、ヘパリンのN-硫酸基の硫酸基脱離体をN-アセチル化したヘパリン誘導体、低分子量ヘパリン、デキストラン硫酸、デキストラン硫酸、フコイダン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマタン硫酸、ヘパリン類似物質、ヘパラン硫酸、ラムナン硫酸、ケタラン硫酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、又はカルボキシメチルセルロースである 1． ～ 10． の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材、

12． ウイルスが、B型又はC型肝炎ウイルスである 1． ～ 11． の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材、

13． 1． ～ 12． の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材を用いたウイルスの除去方法、

14． 13． に記載のウイルス除去方法において、ウイルスを含む液を多孔性中空糸に通じることにより、中空糸の有する孔を通過した液と、孔を通過しなかった液とを混合する工程を有することを特徴とするウイルスの除去方法、

15. ウイルスを含む液が、ウイルスを含む血液である14.に記載のウイルスの除去方法。

[0016] 以下、詳細に本発明を説明する。

・高分子支持体（A）

本発明に用いる高分子支持体（A）は、水酸基を有する高分子材で表面処理された高分子支持体であれば特に制限はない。このような高分子支持体（A）としては血液適合性の高いものであれば種々のものを用いることができるが、例えば、オレフィン系樹脂、スチレン系樹脂、スルホン系樹脂、アクリル系樹脂、ウレタン系樹脂、エステル系樹脂、エーテル系樹脂又はセルロース混合エステル等が挙げられ、より具体的にはポリエチレンテレフタレート、ポリメチルメタクリレート、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリアクリロニトリル、ポリエチレン、ポリプロピレン又はポリ-4-メチルペンテン等で構成されるものを公知の方法で水酸基を有する高分子材で表面処理したものや水酸基を含有する樹脂を公知の方法で予め混練された樹脂を例示できる。

[0017] 高分子支持体（A）の形状には特に限定はなく、中空糸、ビーズなど種々の形態のものとして用いることができる。体外循環への適用時にはビーズとして用いることも可能であるが、ビーズは滞留部において血栓の発生が多くなることから、このような用途を目的とする場合は中空糸を使用することが望ましい。また、中空糸の形態は適宜選択することができる。

[0018] 多孔性中空糸は、使用目的に応じて、公知慣用の方法で製造すれば良い。ポリオレフィン中空糸の場合は、紡出糸をアニール処理、冷延伸、熱延伸、熱固定を行うことでさまざまな細孔径、孔径分布を有したものが調製可能である。

[0019] 多孔性中空糸を用いた場合には、ウイルスを含む液を中空糸の有する孔内を通じることにより、効率的にウイルスを除去することができる。体外循環時に血液を処理する場合を考えると、全血を孔内で処理出来ることが簡便で望ましいが、滞留の問題や細孔内に直接血球が接するために高い生体適合性を

要求されることが課題として挙げられる。

一方、血球と血漿成分を分離し、血漿成分だけを孔内に通過させ、血漿からウイルスを除去する方法が挙げられる。その場合は中空糸の有する孔を通過した液と孔を通過しなかった液とが生成する。ウイルスを含む液中のウイルスの除去率の検討から、中空糸の孔を通過した液中のウイルスの除去率は好成績であり、また、血液中の有用な成分であるアルブミンは除去しないことが明らかとなった。また、中空糸の孔を通過しなかった液すなわち内表面や内表面近傍の細孔のみに接触した液中のウイルス除去率は、中空糸の孔を通過した液中のウイルス除去率よりも低く、ウイルス除去の多くは、多孔性中空糸の孔を通過する際に起こっていることが示唆された。

ここで、孔を通過するとは、中空糸の内表面から外表面側に、もしくは外表面から内表面側に液が通り抜ける状態をさす。

[0020] 用いられる多孔性中空糸の細孔径は、上記のウイルスを効率的に除去させる孔径のものであれば、特に制限はない。例えば、体外循環で血漿中からウイルスを効率的に除去する場合は、以下のように設計する必要がある。血球と血漿を分離し、血漿中からウイルスを除去する場合、血漿分離膜としての機能を有する必要がある。したがって、血球成分や血小板が細孔内に入らないように平均流量孔径として500nm以下があることが望ましい。更に、血漿中のタンパク成分の透過性が落ちないように設計する必要があるために、平均流量孔径として50nm以上が望ましい。

したがって、血漿分離膜としての機能を有するためには、平均流量孔径としては50～500nmに設計する必要がある。本発明では、血液から分離した血漿中から効率的にウイルスを除去する特徴を有するため、ウイルスの除去を想定した場合、ウイルスの大きさによって最適な細孔径が異なる。C型肝炎ウイルスの場合を例に挙げると、好ましい細孔径は80～250nm、更に好ましくは100～180nmとなる。また、比較的大きいヒト免疫不全ウイルスの場合などは、好ましい細孔径が100～250nm、更に好ましくは120～200nmとなる。

[0021] 用いられる多孔性中空糸の内径は、上記のウイルスを効率的に除去させうる内径のものであれば、特に制限はない。例えば、体外循環で中空糸を用いる場合は、以下のように設計する必要がある。

人間から取り出して循環させられる血液量は限られているため、循環モジュール等のサイズは過度に大きくすることはできない。内径が大きい場合は、モジュールに入れられる糸の本数が少なくなるため接触面積が減少してしまうことや線速が劣って血液が滞留してしまう恐れがある。

一方、内径が小さくなりすぎる場合は、血球成分が詰まりやすくなることが考えられる。それらの点を考慮した場合、内径は150～500 μm が好ましく、更に好ましくは160～400 μm 、更に好ましくは170～350 μm となる。

[0022] 用いられる多孔性中空糸の膜厚は、上記のウイルスを効率的に除去させうる膜厚のものであれば、特に制限はない。例えば、体外循環で血漿中からウイルスを効率的に除去する場合などは血漿分離性能、接触面積、中空糸の機械強度等を考慮して、30～100 μm が好ましく、更に好ましくは35～80 μm 、更に好ましくは40～60 μm となる。

[0023] 更に、中空糸外部に、ウイルスを捕捉し除去させる機能を有する他の基材を組み合わせることで、ウイルスの除去率の向上を図ることも可能である。このような他の基材としては、ウイルスを捕捉し除去させる機能を有するものであれば特に制限はないが、例えば、糖鎖固定化ゲルや糖鎖固定化不織布等を挙げることができる。

[0024] ・高分子支持体（A）に含まれる水酸基を有する高分子材

本発明で使用が可能な水酸基を有する高分子材としては、例えば、エチレンービニルアルコール共重合体、エチレンービニルアルコールー酢酸ビニル共重合体、エチレンー酢酸ビニル共重合体の部分けん化物、ビニルアルコールー酢酸ビニル共重合体などのビニルアルコール共重合体を含んだもの、ヒドロキシメタクリレート共重合体を含んだもの、酢酸セルロースの部分けん化物又はグリセリン誘導体を例示することができる。ただし、例示したもの

以外にも、水酸基を有する樹脂であれば特に制限はない。

水酸基を有する高分子材での表面処理は、公知慣用の方法で行うことができ、例えば多孔化されたポリオレフィン、水酸基を有する高分子材を溶解させた溶液中に浸漬し、引き上げた後乾燥する等を好ましい方法として挙げるることができる。中でもエチレンービニルアルコール共重合体は、特開昭61-271003などにもあるように、ポリオレフィン多孔中空糸を簡便に親水化することができる点で好ましい。もしくは、予めポリオレフィン等と水酸基を有する高分子材を混合させたものを多孔化する手法を用いることも可能である。

[0025] ・水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物（B）

本発明で使用される水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物（B）は、表面処理された高分子支持体（A）の表面に存在する水酸基と反応しえる基を有し、固定化後にアミノ基と容易に反応する官能基などを有していれば特に制限はない。例えば、エピクロロヒドリン、カルボン酸無水物、ジカルボン酸、ジカルボン酸塩化物、ジイソシアネート、ジエポキシ化合物等の化合物が挙げられる。基材にグラフト重合できる化合物として、（メタ）アクリル酸、グリシジル（メタ）アクリレート、（メタ）アクリロイルオキシアルキルイソシアネート、無水マレイン酸等が挙げられる。

[0026] 高分子支持体（A）の表面に存在する水酸基に、水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物（B）を反応させて固定化する場合は、例えば公知慣用の水酸基とエポキシ基との反応、水酸基とカルボキシ基との反応、水酸基とカルボン酸無水物との反応、水酸基とイソシアネートとの反応に用いる条件等で行うことができる。

また、エチレン性不飽和基を有する化合物をグラフト重合させる場合には、水酸基を有する高分子材にラジカルを生成させることによるグラフト重合反応により、（メタ）アクリル酸、グリシジル（メタ）アクリレート、（メタ）アクリロイルオキシアルキルイソシアネート、又は無水マレイン酸等を固定化することが可能である。

ラジカルを生成させる方法としては、セルロースやポリビニルアルコール等の水酸基を有する高分子材のラジカル重合開始剤に広く用いられている硝酸ニアンモニウムセリウム等の試薬を用いる方法を挙げることが出来る。

[0027] なお、高分子支持体（A）の形状が中空糸であり、該中空糸へ水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物（B）を固定化する場合には、実施形態に応じて糸の内面、外面のどちらか又は両方に固定化することができる。例えば中空糸内表面に血液を灌流させる時は、中空糸内表面に水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物（B）を接触させて固定化すれば良く、逆に、外部灌流させる時には、中空糸外表面に水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物（B）を接触させれば良い。糸の細孔内も含めて内外表面に固定化したい場合は、糸を束ねて反応溶液に浸漬してもよいし、モジュールとして組み立ててから反応溶液を循環させる方法などが挙げられる。

[0028] ・アミノ基を有する化合物（C）

本発明で使用されるアミノ基を有する化合物（C）は、水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物（B）と反応し、糖類を簡便に固定化できるアミノ基が残存するものであれば特に制限はない。このような化合物（C）としては、例えば、ポリアリルアミン、アンモニア、2-アミノエタノール、エチレンジアミン、ブチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン、1, 2-ビス（2-アミノエトキシ）エタン、3, 3'-ジアミノジプロピルアミン、ジエチレントリアミン、フェニレンジアミン又はポリエチレンジアミン等のアミン類を挙げることができる。化合物（C）のアミノ基は、必要に応じてアミノ基に用いられる公知慣用の保護基を有していてもよい。使用される保護基としては、例えばt-ブチルカーバメート（Boc基）、ベンジルカーバメート等を挙げることができる。脱保護も公知慣用の方法を用いればよい。

化合物（C）と水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物（B）との反応は、公知慣用のアミノ基とエポキシ基との反応、アミノ基とカ

ルボキシ基との反応、アミノ基とカルボン酸無水物との反応、アミノ基とイソシアネートとの反応に用いる条件で適宜行うことができる。

[0029] ・糖類

本発明で使用される糖類は、ウイルスを吸着等の作用によって効率的に捕捉し、ウイルスを含む液からウイルスを除去することのできるのであれば、特に制限はない。このような糖類としては、例えば、ヘパリン、ヘパリンの1級又は2級水酸基を硫酸エステル化したヘパリン誘導体、ヘパリンのN-アセチル基のアセチル基脱離体をN-硫酸エステル化したヘパリン誘導体、ヘパリンのN-硫酸基の硫酸基脱離体をN-アセチル化したヘパリン誘導体、低分子量ヘパリン、デキストラン硫酸（イオウ含量3～6%のものが好ましい）、デキストラン硫酸（イオウ含量15～20%のものが好ましい）、フコイダン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマタン硫酸、ヘパリン類似物質、ヘパラン硫酸、ラムナン硫酸、ケタラン硫酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース等を挙げることができる。

[0030] ヘパリンは、通常公知のものを制限なく使用することができる。ヘパリンは、小腸、筋肉、肺、脾や肥満細胞など体内で幅広く存在し、化学的にはグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸の一種であり、 β -D-グルクロン酸、或いは α -L-イズロン酸とD-グルコサミンが1,4-結合により重合した高分子であって、ヘパラン硫酸と比べて硫酸化の度合いが特に高いという特徴を有する。

また、ヘパリンの平均分子量についても特に制限はないが、平均分子量が大きい場合には化合物(C)との反応性が低くなる為、ヘパリンの固定化の効率が悪いと考えられる。従って、ヘパリンの分子量は、概ね、500から500,000ダルトン、より好ましくは1,200から50,000ダルトン、更に好ましくは5,000～30,000ダルトンであることが好ましい。

[0031] 本発明で用いられるヘパリン誘導体としては、上記ヘパリンの1級又は2級

水酸基を硫酸エステル化したヘパリン誘導体、上記ヘパリンのN-アセチル基のアセチル基脱離体をN-硫酸エステル化したヘパリン誘導体、又はヘパリンのN-硫酸基の硫酸基脱離体をN-アセチル化したヘパリン誘導体を好ましく用いることができる。

[0032] ヘパリンの1級又は2級水酸基を硫酸エステル化したヘパリン誘導体を合成する場合には、例えば、上記ヘパリンのアルカリ塩類をイオン交換樹脂(H⁺)等に通じ、アミン類と処理することによりヘパリンアミン塩を調製する。その後、硫酸化剤で処理して目的とするヘパリン誘導体とすることができる。硫酸化剤としては、公知慣用のSO₃・ピリジン等が好ましい。

[0033] ヘパリンのN-アセチル基のアセチル基脱離体をN-硫酸エステル化したヘパリン誘導体を合成する場合には、例えば、ヘパリンのN-アセチル基をヒドラジン等で脱アセチル化した後に、硫酸化剤で処理して目的とするヘパリン誘導体とすることができる。硫酸化剤としては、公知慣用のSO₃・NMe₃等が好ましい。

ヘパリンのN-硫酸基の硫酸基脱離体をN-アセチル化したヘパリン誘導体を合成する場合には、例えば、ヘパリンのピリジニウム塩を調製後、窒素原子上の硫酸基のみを脱硫酸化し、公知慣用の方法でN-アセチル化すればよい。

また、低分子量ヘパリン、デキストラン硫酸(イオウ含量3~6%)、デキストラン硫酸(イオウ含量15~20%)、フコイダン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマタン硫酸、ヘパリン類似物質、ヘパラン硫酸、ラムナン硫酸、ケタラン硫酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、又はカルボキシメチルセルロースは公知慣用の化合物を用いることができる。

デキストラン硫酸の硫酸化度は、高硫酸化度(イオウ含量15~20%)であっても、低硫酸化度(イオウ含量3~6%)であっても良く、公知慣用の方法で得られるものであれば、特に硫酸化度に制限はない。

ヘパリン類似物質は、一般に日本薬局方外医薬品成分規格等に収載されている硫酸化多糖類を指すものである。しかし、公知慣用の抽出方法や調製方法

で得られるものであれば、日本薬局方外医薬品成分規格に記載されているものに限定されるものではない。

[0034] アミノ基を有する化合物（C）を介して糖類が固定化されるためには、化合物（C）と糖類が共有結合により結合されることが必要である。このような結合は公知慣用の反応を適宜行うことにより形成することができる。

糖類の固定化に好ましい反応として、アミド化反応もしくは還元アミノ化反応を挙げることができる。アミド化方法は、例えば、活性エステルによるアミド化、縮合剤によるアミド化、これらの併用、混合酸無水物法、アジド法、酸化還元法、DPPA法、ウッドワード法など、ペプチド合成などで用いられている公知慣用のアミド化反応を適宜行えばよい。還元アミノ化反応は、化合物（C）のアミノ基と糖類の還元末端を反応させる公知慣用の方法を用いればよい。

[0035] 活性エステルによるアミド化としては、例えば、NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）、ニトロフェノール、ペンタフルオロフェノール、DMAPI（4-ジメチルアミノピリジン）、HOBT（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール）、HOAT（ヒドロキシアザベンゾトリアゾール）等を用いて、脱離能の高い基をカルボキシ基と一旦縮合させた活性エステルを形成させておき、これにアミノ基を反応させる方法が挙げられる。縮合剤によるアミド化は、それ単独で用いても良いが、上記活性エステルと併用することができる。縮合剤としては、EDC（1-（3-ジメチルアミノプロピル-3-エチルカルボジイミドヒドロクロライド）、HONB（エンド-N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキサミド）、DCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド）、BOP（ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート）、HBTU（O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート）、TBTU（O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート）、HOBt（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール）、H

O O B t (3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン)、ジ-*p*-トリオイルカルボジイミド、D I C (ジイソプロピルカルボジイミド)、BDP (1-ベンゾトリアゾールジエチルホスフェート-1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニルエチル)カルボジイミド)、フッ化シアヌル、塩化シアヌル、T F F H (テトラメチルフルオロホルムアミジニウムヘキサフルオロホスホスフェート)、D P P A (ジフェニルホスホラジデート)、T S T U (O-(N-スクシニミジル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート)、H A T U (N-[(ジメチルアミノ)-1-H-1, 2, 3-トリアゾロ [4, 5, 6]-ピリジン-1-イルメチレン]-N-メチルメタンアミニウム・ヘキサフルオロホスフェート・N-オキシド)、B O P - C I (ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィンクロライド)、P y B O P ((1-H-1, 2, 3-ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)ートリス(ピロリジノ)ホスホニウム・テトラフルオロホスフェート)、B r O P (プロモトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート)、D E P B T (3-(ジエトキシホスホリルオキシ)-1, 2, 3-ベンゾトリアジン-4(3H)-オン)、P y B r O P (プロモトリス(ピロリジノ)ホスホニウム・ヘキサフルオロホスフェート)などが挙げられる。

[0036] これらのアミド化方法において利用できる溶媒としては、水及びペプチド合成に用いられる有機溶媒を使用することができ、例えばジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサホスホロアミド、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、酢酸エチル等、更にはこれらの混合溶媒やこれらを含む水溶液が挙げられる。

[0037] 糖類は、アミノ基を有する化合物(C)を介して固定化する以外にも、水酸基と反応して共有結合を形成しえる基を有する化合物(B)を介して固定することも可能である。使用目的、反応条件や設備等に応じて適宜選択すればよい。

また、糖類の固定化量は、ウイルスを効率的に除去出来れば特に制限はない

。ただし、体外循環時は、生体適合性が重要になるため、血漿タンパクの吸着や補体の活性化などが起きないように調整する必要がある。その際には、アミノ基を有する化合物（C）の導入量を調整する方法や糖類を固定化する反応条件を変える方法等で固定化量を調整することが可能である。検討した結果、 $1\sim 100\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、好ましくは $2\sim 80\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、更に好ましくは $3\sim 70\mu\text{g}/\text{cm}^2$ にすればよい。

[0038] ・ウイルスを含む液

本発明で対象とするウイルスを含む液は、ウイルスを含む液であれば特に制限はない。より具体的には、例えば、ヒトの体内液体成分である体液、ウイルスを含んだ培養液等を挙げることができる。体液のより具体的な例としては、血液、唾液、汗、尿、鼻水、精液、血漿、リンパ液、組織液等を挙げることができる。

[0039] 本発明の高分子基材を備えてなる医療器具の形態としては、前記用途に適用可能な形状であれば特に限定されるものではないが、例えば中空糸モジュールや濾過カラム、フィルターなどが挙げられる。中空糸モジュールや濾過カラムにおいて、容器の形状及び材質は特に限定されないが、体液（血液）の体外循環に適用する場合、内部容量が $10\sim 400\text{mL}$ で外径が $2\sim 10\text{cm}$ 程度の筒状容器とすることが好ましく、内部容量が $20\sim 300\text{mL}$ で外径が $2.5\sim 7\text{cm}$ 程度の筒状容器とすることがより好ましい。図1にその一例を挙げる。

[0040] 本発明の医療器具の使用方法としては、上記ウイルスを含む液と接触させて該液中のウイルスを除去、分離することができればいずれの方法でもよい。

実施例

[0041] 以下の実施例により本発明を更に詳細に説明する。

[0042] <多孔性高分子基材の孔径>

ASTM F316-86およびASTM E1294-89に準拠し、Porous Materials, Inc. 社製「パームポロメータCFP-200AEX」を用いてーフドライ法により平均流量孔径（膜の一方

から他方に向けて貫通する孔の窄み部分の平均孔径)を測定した。試液はパーフルオロポリエステル(商品名「Galwick」)を用いた。

細孔は必ずしも直状の管として膜を貫通している必要はなく、膜の内部で屈曲していても良い。また、幾つかの孔が膜内部で融合していたり、逆に一つの孔が枝分かれしていても良く、これらが混在していても良い。

[0043] <糖類の固定化量>

中空糸に固定化された糖類の量は、1,9-ジメチルメチレンブルーの色素吸着量より算出した。検量線の作成:色素水溶液を調製し、糖類を所定量添加し、糖類と色素の複合体を形成させる。そこへ、ヘキサンを加えて色素と糖類の複合体を水相から分離し、残った水溶液中の色素量を吸光度(650nm)で測定し、糖類の添加量と吸光度を用いて検量線を作成した。サンプル測定:色素溶液に、中空糸を所定の長さ入れ、色素の吸着量から換算して糖類の固定化量を算出した。

<HCV除去試験>

膜面積1.8cm²の中空糸モジュールを作製し、HCV患者血漿(原液)0.6mLを通液して、孔を通過した液(ろ液)0.3mL、孔を通過しなかった液(内液)0.3mLを得た。検体をオーソ製HCV抗原ELISAテストで測定し、

$$\text{HCV除去率(\%)} = (1 - \text{ろ液中のHCV量} / \text{原液中のHCV量}) \times 100$$

を求めた。

[0044] <ELISA>

検体を前処理液(SDS)で前処理し、HCVコア抗原を遊離させると同時に共存するHCV抗体を失活させ測定試料とする。測定試料をHCVコア抗原抗体固定化プレートに添加し、インキュベーションする。所定時間反応後、洗浄し、ホールラディッシュ由来ペルオキシダーゼ標識化HCVコア抗原抗体を添加し、インキュベーションする。所定時間反応後、洗浄し、オーフェニレンジアミン試薬を添加し、インキュベーションする。所定時間反応後

、反応停止液を添加する。492 nmの波長で発色を測光する。標品の吸光度より、濃度を算出する。

[0045] <血漿中アルブミン透過量>

検体にブロムクレゾールグリーン試薬を添加し、630 nmの波長で発色を測光する。標品の吸光度より、濃度を算出した。

アルブミン透過率 (%) = (ろ液中のアルブミン量 / 原液中のアルブミン量) × 100

[0046] 高分子支持体 (A) の調製例

密度0.968 g/cm³、メルトインデックス5.5の高密度ポリエチレン(三井石油化学工業株式会社製HIZEX 2200J)を吐出口径16 mm、円環スリット幅が2.5 mm、吐出断面積が1.06 cm²の中空糸賦型用紡糸口金を用い、紡糸温度160°Cで紡糸し、紡糸ドラフト1427で巻き取った。得られた未延伸中空糸の寸法は内径が308 μm、膜厚が64 μmであった。

この未延伸中空糸を115°Cで24時間、定長で熱処理した。つづいて室温で21400%/minの変形速度で1.8倍延伸した後、100°Cの加熱炉中で変形速度が330%/minとなるように総延伸倍率が4.8倍になるまで熱延伸を行った、更に125°Cの加熱炉で総延伸倍率が2.8倍になるまで連続的に熱収縮を行い、延伸糸を得た。続いて、エチレン含有率が44%のエチレン-ビニルアルコール共重合体(EVOH)を75%エタノール水溶液に加熱溶解し、濃度2.5重量%の溶液を得た。50°Cに保温した該溶液に延伸糸を100秒間浸漬し、50°Cのエタノール飽和蒸気下で80秒保温した後、更に80秒かけて溶剤を乾燥した。得られたEVOH親水化処理多孔性中空糸膜の内径は287 μm、膜厚は52 μmであった。

[0047] (実施例1)

特開平2-029260に従い、試験管にアセトン26 mL、エピクロロヒドリン21 mL、40%NaOH水溶液5 mLを入れ、そこへ内径287 μm、膜厚52 μm、平均孔径102 nmのEVOH親水化処理多孔性中空

糸膜を浸漬した。超音波をかけながら、30～40℃で5時間反応させた。反応終了後、アセトンと水で洗浄し、エポキシ基が導入された中空糸を得た。導入されたエポキシ基量は、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液を用い、 NaOH で滴定を行った結果、約 $0.01\ \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ 導入されていることがわかった。

次に、28%アンモニア水溶液にエポキシ基を導入した中空糸を浸漬し、室温で終夜反応させた。反応終了後は水で洗浄し、1級アミノ基が導入された中空糸を得た。導入されたアミノ基量を、 HCl により滴定して約 $0.03\ \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ 導入されていることがわかった。

次に、試験管にヘパリン400mgとシアノ水素化ホウ素ナトリウム50mgを入れ、PBS50mLに溶解し、アミノ基が導入された中空糸を浸漬して、40℃で3日間反応させた。反応終了後、飽和食塩水と水で洗浄した。残存しているアミノ基をアセチル化するために、中空糸をメタノール50%含有の AcONa 水溶液($0.2\ \text{mol}/\text{L}$)36mLに入れ、氷冷する。氷冷しながら無水酢酸18mLを滴下し、そのまま超音波で30分反応させた。

更に、水浴(10～25℃)にて、30分反応させた。反応終了後、水で洗浄を行い、再度同様のアセチル化処理を行った。反応終了後、飽和食塩水、水およびPBSで洗浄を行い、ヘパリン固定化中空糸を得た。固定化量をメチレンブルーの吸着量で測定したところ、 $17\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算)固定化されていた。

[0048] 上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが76%除去された。このとき、アルブミンの透過率は99%以上だった。

(比較例1)

実施例1で使用した糖類を固定化していないEVOH親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCVの除去率は64%であった。したがって、ヘパリンを固定化した中空糸は、アルブミンのような生体成分は除去せずに、HCVの除去率を向上させられることがわかった。

[0049] (実施例 2)

実施例 1 の E V O H 親水化処理膜を内径 267 μm 、膜厚 54 μm 、平均孔径 246 nm に変えた以外は、実施例 1 と同様の手法でヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV 患者の血漿をろ過したところ、HCV が 48% 除去された。このとき、アルブミンの透過率は 98% だった。

(比較例 2)

実施例 2 で使用した糖類を固定化していない E V O H 親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCV の除去率は 33% であった。

[0050] (実施例 3)

実施例 1 の E V O H 親水化処理膜を内径 300 μm 、膜厚 40 μm 、平均孔径 226 nm に変えた以外は、実施例 1 と同様の手法でヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV 患者の血漿をろ過したところ、HCV が 59% 除去された。このとき、アルブミンの透過率は 99% 以上だった。

(比較例 3)

実施例 3 で使用した糖類を固定化していない E V O H 親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCV の除去率は 37% であった。

[0051] (実施例 4)

実施例 1 の E V O H 親水化処理膜を内径 257 μm 、膜厚 54 μm 、平均孔径 183 nm に変えた以外は、実施例 1 と同様の手法でヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV 患者

の血漿をろ過したところ、HCVが69%除去された。このとき、アルブミンの透過率は99%以上だった。

(比較例4)

実施例4で使用した糖類を固定化していないEVOH親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCVの除去率は35%であった。

[0052] (実施例5)

実施例1のEVOH親水化処理膜を内径176 μm 、膜厚40 μm 、平均孔径153nmに変えた以外は、実施例1と同様の手法でヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが59%除去された。このとき、アルブミンの透過率は99%以上だった。

(比較例5)

実施例5で使用した糖類を固定化していないEVOH親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCVの除去率は31%であった。

[0053] (実施例6)

実施例1のEVOH親水化処理膜を内径168 μm 、膜厚63 μm 、平均孔径118nmに変えた以外は、実施例1と同様の手法でヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが67%除去された。このとき、アルブミンの透過率は96%だった。

(比較例6)

実施例6で使用した糖類を固定化していないEVOH親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCVの除去率は45%であった。

[0054] (実施例7)

実施例1のEVOH親水化処理膜を内径170 μm 、膜厚54 μm 、平均

孔径 117 nm に変えた以外は、実施例 1 と同様の手法でヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、 $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV 患者の血漿をろ過したところ、HCV が 67% 除去された。このとき、アルブミンの透過率は 97% だった。

(比較例 7)

実施例 7 で使用した糖類を固定化していない EVOH 親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCV の除去率は 55% であった。

[0055] (実施例 8)

実施例 4 のヘパリンを低分子量ヘパリンに変えた以外は、実施例 4 と同様の手法で低分子量ヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、 $21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記の低分子量ヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV 患者の血漿をろ過したところ、HCV が 51% 除去された。このとき、アルブミンの透過率は 99% 以上だった。

(比較例 8)

実施例 8 で使用した糖類を固定化していない EVOH 親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCV の除去率は 35% であった。したがって、低分子量ヘパリンを固定化した中空糸は、アルブミンのような生体成分は除去せずに、HCV の除去率を向上させられることがわかった。

[0056] (実施例 9)

実施例 4 のヘパリンを分子量 5000 のデキストラン硫酸 (硫酸化度 15 ~ 20%) に変えた以外は、実施例 4 と同様の手法でデキストラン硫酸を固定化した。固定化量を測定したところ、 $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記のデキストラン硫酸固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV 患者の血漿をろ過したところ、HCV が 49% 除去された。このとき、

アルブミンの透過率は99%以上だった。

(比較例9)

実施例9で使用した糖類を固定化していないEVOH親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCVの除去率は35%であった。したがって、分子量5000のデキストラン硫酸(硫酸化度15~20%)を固定化した中空糸は、アルブミンのような生体成分は除去せずに、HCVの除去率を向上させられることがわかった。

[0057] (実施例10)

実施例4のヘパリンを分子量20000のデキストラン硫酸(硫酸化度15~20%)に変えた以外は、実施例4と同様の手法でデキストラン硫酸を固定化した。固定化量を測定したところ、 $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算)固定化されていた。

上記のデキストラン硫酸固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが49%除去された。このとき、アルブミンの透過率は99%以上だった。

(比較例10)

実施例10で使用した糖類を固定化していないEVOH親水化処理中空糸膜で同様の評価を行ったところ、HCVの除去率は35%であった。したがって、分子量20000のデキストラン硫酸(硫酸化度15~20%)を固定化した中空糸は、アルブミンのような生体成分は除去せずに、HCVの除去率を向上させられることがわかった。

[0058] (実施例11)

実施例2の28%アンモニア水を5%ポリアリルアミン水溶液に変えた以外は、実施例2と同様の手法でヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、 $43\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算)固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが59%除去された。このとき、アルブミンの透過率は99%だった。

(比較例 1 1)

実施例 1 1 で使用した糖類を固定化していない E V O H 親水化処理中空糸膜で同様の評価を行ったところ、H C V の除去率は 3 3 % であった。

[0059] (実施例 1 2)

実施例 1 1 の E V O H 親水化処理膜を内径 2 5 7 μm 、膜厚 5 4 μm 、平均孔径 1 8 3 nm に変えた以外は、実施例 1 1 と同様の手法でヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、4 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、H C V 患者の血漿をろ過したところ、H C V が 5 9 % 除去された。このとき、アルブミンの透過率は 9 8 % だった。

(比較例 1 2)

実施例 1 2 で使用した糖類を固定化していない E V O H 親水化処理中空糸膜で同様の評価を行ったところ、H C V の除去率は 3 5 % であった。

[0060] (実施例 1 3)

実施例 1 2 のヘパリンを低分子量ヘパリンに変えた以外は、実施例 1 2 と同様の手法で低分子量ヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、7 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記の低分子量ヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、H C V 患者の血漿をろ過したところ、H C V が 5 9 % 除去された。このとき、アルブミンの透過率は 9 9 % 以上だった。

[0061] (実施例 1 4)

実施例 1 2 のヘパリンを分子量 5 0 0 0 のデキストラン硫酸 (イオウ含量 1 5 ~ 2 0 %) に変えた以外は、実施例 1 2 と同様の手法でデキストラン硫酸を固定化した。固定化量を測定したところ、3 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記のデキストラン硫酸固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、H C V 患者の血漿をろ過したところ、H C V が 5 8 % 除去された。このとき、

アルブミンの透過率は99%以上だった。

[0062] (実施例15)

実施例12のヘパリンを分子量20000のデキストラン硫酸（イオウ含量15～20%）に変えた以外は、実施例12と同様の手法でデキストラン硫酸を固定化した。固定化量を測定したところ、 $34 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ （内表面積換算）固定化されていた。

上記のデキストラン硫酸固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが67%除去された。このとき、アルブミンの透過率は99%だった。

[0063] (実施例16)

試験管にはく酸無水物3.5g、トリエチルアミン350 μL を入れ、アセトン30mLに溶解させた。そこへ、実施例4で使用したEVOH親水化処理中空糸膜を浸漬し、室温で24時間反応させた。反応終了後、アセトンおよび水で洗浄した。真空乾燥して、カルボキシル基が導入された中空糸を得た。

試験管にEDC19mg（0.1mmol）とNHS12mg（0.1mmol）を入れ、PBS30mLに溶解させた後、カルボキシル基を導入した中空糸を浸漬し、5分間反応させた。そこへ、ポリアリルアミンの20%水溶液を1mL滴下し、室温で4時間反応させた。反応終了後、水で洗浄し、1級アミノ基が導入された中空糸を得た。その後、実施例1と同様にヘパリンを固定化し、アミノ基のアセチル化処理を行い、ヘパリン固定化中空糸を得た。固定化量を測定したところ、 $66 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ （内表面積換算）固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが64%除去された。このとき、アルブミンの透過率は98%だった。

[0064] (実施例17)

実施例16のヘパリンを低分子量ヘパリンに変えた以外は、実施例16と

同様の手法で低分子量ヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、 $68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ （内表面積換算）固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが53%除去された。このとき、アルブミンの透過率は99%だった。

[0065]（実施例18）

実施例4で実施したアミノ基にヘパリンを固定化する反応を、還元アミノ化ではなくEDCを用いた活性エステル化による縮合反応に変えた以外は同様の操作でヘパリンを固定化した。固定化量を測定したところ、 $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ （内表面積換算）固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが56%除去された。このとき、アルブミンの透過率は94%だった。

[0066]（実施例19）

実施例4で用いたEVOH親水化中空糸膜に実施例1と同様の方法でエポキシ基を導入した後に10%のヘパリン水溶液に浸漬し、40°Cで反応させた。固定化量を測定したところ、 $11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ （内表面積換算）固定化されていた。

上記のヘパリン固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが41%除去された。このとき、アルブミンの透過率は99%だった。

[0067]（実施例20）

実施例4のヘパリンをデキストラン硫酸（イオウ含量3~6%）に変えた以外は、実施例4と同様の手法で低硫酸化度のデキストラン硫酸を固定化した。固定化量を測定したところ、 $41 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ （内表面積換算）固定化されていた。

上記の低硫酸化度のデキストラン硫酸を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが40%除去された。このとき、ア

ルブミンの透過率は99%以上だった。

[0068] (比較例13)

実施例20で使用した糖類を固定化していないEVOH親水化処理中空糸膜を用いて同様の評価を行ったところ、HCVの除去率は30%であった。したがって、低硫酸化度のデキストラン硫酸を固定化した中空糸は、アルブミンのような生体成分は除去せずに、HCVの除去率を向上させられることがわかった。

[0069] (実施例21)

実施例4のヘパリンをヘパリン類似物質に変えた以外は、実施例4と同様の手法でヘパリン類似物質を固定化した。固定化量を測定したところ、 $18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (内表面積換算) 固定化されていた。

上記のヘパリン類似物質固定化中空糸膜を用いて得られるモジュールで、HCV患者の血漿をろ過したところ、HCVが62%除去された。このとき、アルブミンの透過率は99%以上だった。

(比較例14)

実施例21で使用した糖類を固定化していないEVOH親水化処理中空糸膜で同様の評価を行ったところ、HCVの除去率は30%であった。したがって、ヘパリン類似物質を固定化した中空糸は、アルブミンのような生体成分は除去せずに、HCVの除去率を向上させられることがわかった。

[0070] (実施例22) 血球血漿分離試験

中空糸モジュール用ハウジングパイプ (内径3mm×外径5mm、全長225mm) の両端側面に血漿取り出し用のニードル (15ゲージ2条ネジプラスチックニードル、武蔵エンジニアリング(株)製) を取り付け、実施例1で調製した多孔質中空糸膜を37本挿入し、両端部を5分型エポキシ樹脂系接着剤 (ボンドクイックセット、コニシ(株)) を用いてハウジングパイプに固定した。更に両端部に血液流入出用コネクター (ルアーフィッティング、アイシス製) を取り付けて、有効長15cm、有効ろ過面積 50cm^2 の中空糸モジュールを得た。健常なボランティアから採血し、血液保存液 (CPD液

、クエン酸リン酸ブドウ糖液)を混合して抗凝固した血液を調製し、そこにHCV患者血漿を添加してウイルス除去能評価用の血液とした。HCV入り血液16mLをリザーバーに入れて37℃に加温し、中空糸モジュールに血液流量0.33mL/分で血液を流入させ、血漿ろ過流量0.1mL/分で血漿分離を行った。30分後、分離された血漿側のウイルス量を測定したところ、80%除去されていた。このとき、アルブミンは99%以上、LDLは89%透過しており、有用な血漿成分を除去せずに効率的にウイルスを除去出来ることがわかった。試験中には、目詰まりによるTMP等の上昇や目だった溶血もみられなかった。このことから、リガンドを固定化した中空糸膜モジュールを使用することで、簡便かつ継続的に血漿分離をしながら同時にウイルスを除去できることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0071] 本発明の高分子基材は、ウイルス除去器具への利用が可能であり、当該器具はウイルスの除去に利用が可能である。

符号の説明

- [0072] 1：ウイルス液流入口
2：孔を通過しなかった液の流出口
3：中空糸膜
4：孔を通過したウイルス液の流出口
5：容器
6：隔壁

請求の範囲

- [請求項1] 糖類が固定化されたウイルス除去用高分子基材であって、水酸基を有する高分子材で表面処理された高分子支持体（A）と、水酸基と反応して共有結合を形成しうる基を有する化合物（B）が結合し、更にアミノ基を有する化合物（C）を介して糖類が固定化されたことを特徴とするウイルス除去用高分子基材。
- [請求項2] 水酸基を有する高分子材で表面処理された高分子支持体（A）が、エチレンービニルアルコール共重合体、エチレンービニルアルコールー酢酸ビニル共重合体、エチレンー酢酸ビニル共重合体の部分けん化物、ビニルアルコールー酢酸ビニル共重合体、ヒドロキシメタクリレート共重合体、酢酸セルロースの部分けん化物又はグリセリン誘導体で表面処理された中空糸である請求項1に記載のウイルス除去用高分子基材。
- [請求項3] 中空糸が、多孔性中空糸である請求項2に記載のウイルス除去用高分子基材。
- [請求項4] 中空糸が、ポリエチレン、ポリプロピレン又はポリー4ーメチルペンテンを基質とするものである請求項3に記載のウイルス除去用高分子基材。
- [請求項5] 多孔性中空糸の平均流量孔径が50～500nmの範囲である請求項3又は4に記載のウイルス除去用高分子基材。
- [請求項6] 多孔性中空糸の内径が150～500 μ mの範囲である請求項3～5の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材。
- [請求項7] 多孔性中空糸の膜厚が30～100 μ mの範囲である請求項3～6の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材。
- [請求項8] 多孔性中空糸の糖類の固定化量が1～100 μ g/cm²の範囲である請求項3～7の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材。
- [請求項9] 水酸基と反応して共有結合を形成しうる基を有する化合物（B）が、エピクロロヒドリン、カルボン酸無水物、ジカルボン酸化合物、ジカ

ルボン酸塩化物、ジイソシアネート、ジエポキシ化合物、(メタ)アクリル酸、グリシジル(メタ)アクリレート又は(メタ)アクリロイルオキシアルキルイソシアネートである請求項1～8の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材。

[請求項10] アミノ基を有する化合物(C)が、ポリアリルアミン、アンモニア、2-アミノエタノール、エチレンジアミン、ブチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミン、1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン、3,3'-ジアミノジプロピルアミン、ジエチレントリアミン、フェニレンジアミン、又はポリエチレンジアミンである請求項1～9の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材。

[請求項11] 糖類が、ヘパリン、ヘパリンの1級又は2級水酸基を硫酸エステル化したヘパリン誘導体、ヘパリンのN-アセチル基のアセチル基脱離体をN-硫酸エステル化したヘパリン誘導体、ヘパリンのN-硫酸基の硫酸基脱離体をN-アセチル化したヘパリン誘導体、低分子量ヘパリン、デキストラン硫酸、デキストラン硫酸、フコイダン、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、デルマタン硫酸、ヘパリン類似物質、ヘパラン硫酸、ラムナン硫酸、ケタラン硫酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、又はカルボキシメチルセルロースである請求項1～10の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材。

[請求項12] ウイルスが、B型又はC型肝炎ウイルスである請求項1～11の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材。

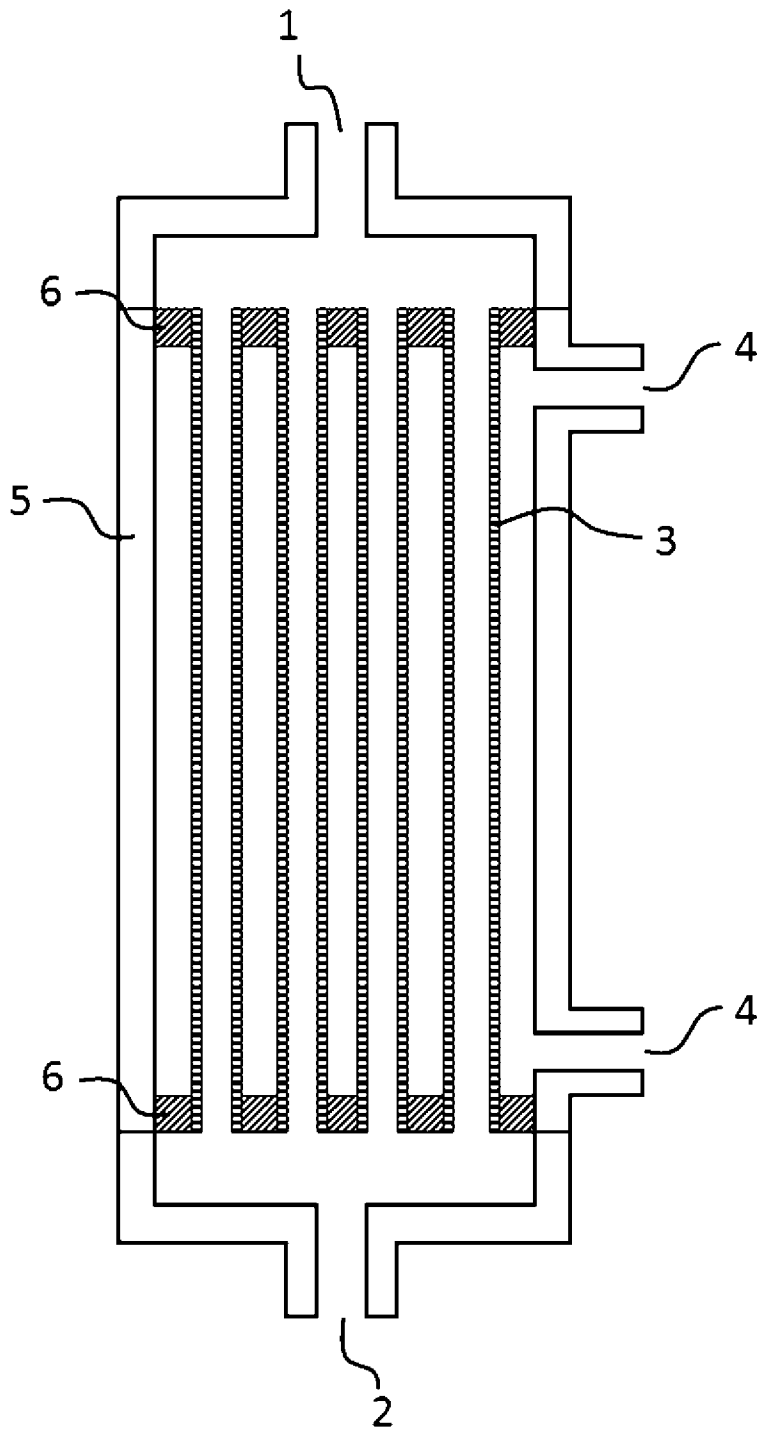
[請求項13] 請求項1～12の何れかに記載のウイルス除去用高分子基材を用いたウイルスの除去方法。

[請求項14] 請求項13に記載のウイルス除去方法において、ウイルスを含む液を多孔性中空糸に通じることにより、中空糸の有する孔を通過した液と、孔を通過しなかった液とを混合する工程を有することを特徴とするウイルスの除去方法。

[請求項15] ウイルスを含む液が、ウイルスを含む血液である請求項14に記載の

ウイルスの除去方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055043

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61M1/36(2006.01) i, A61M1/34(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)

A61M1/36, A61M1/34, B01J20/00

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 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2777604 B2 (Asahi Medical Co., Ltd.), 23 July 1998 (23.07.1998), entire text; all drawings (Family: none)	1-12
A	JP 7-289891 A (Terumo Corp.), 07 November 1995 (07.11.1995), entire text; all drawings & US 5667684 A & EP 679436 A1 & DE 69517466 T2	1-12
A	JP 59-102436 A (Kaneka Corp.), 13 June 1984 (13.06.1984), entire text; all drawings & US 4576928 A & EP 464872 A1 & DE 3382723 T2	1-12

 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
18 May, 2012 (18.05.12)Date of mailing of the international search report
29 May, 2012 (29.05.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055043

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-521413 A (Exthera AB.), 04 June 2009 (04.06.2009), entire text; all drawings & US 2009/0136586 A1 & WO 2007/069983 A1 & KR 10-2008-0077405 A & CN 101370536 A	1-12
A	JP 2003-135596 A (The Foundation for the Promotion of Industrial Science), 13 May 2003 (13.05.2003), entire text; all drawings (Family: none)	1-12
A	JP 2010-68910 A (DIC Corp. et al.), 02 April 2010 (02.04.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055043

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 13-15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055043

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Claims 13-15 pertain to a method for treatment of the human body by therapy since the inventions of claims 13-15 involves removal of virus from blood in a patient through extracorporeal circulation, and thus relate to a subject matter on which it is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61M1/36(2006.01)i, A61M1/34(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. A61M1/36, A61M1/34, B01J20/00		
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 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012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(JDreamII)		
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
A	JP 2777604 B2 (旭メディカル株式会社) 1998.07.23, 全文, 全図 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 7-289891 A (テルモ株式会社) 1995.11.07, 全文, 全図 & US 5667684 A & EP 679436 A1 & DE 69517466 T2	1-12
A	JP 59-102436 A (鐘淵化学工業株式会社) 1984.06.13, 全文, 全図 & US 4576928 A & EP 464872 A1 & DE 3382723 T2	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 18.05.2012	国際調査報告の発送日 29.05.2012	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 瀬戸 康平 電話番号 03-3581-1101 内線 3346	31 3217

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
A	JP 2009-521413 A (エクステラ・アーベール) 2009.06.04, 全文, 全図 & US 2009/0136586 A1 & WO 2007/069983 A1 & KR 10-2008-0077405 A & CN 101370536 A	1-12
A	JP 2003-135596 A (財団法人生産技術研究奨励会) 2003.05.13, 全文, 全図 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2010-68910 A (D I C株式会社 外2名) 2010.04.02, 全文, 全図 (ファミリーなし)	1-12

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 13-15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 13-15 は、体外循環により患者の血液からウイルスを除去することを含むと解されるから、治療による人体の処置方法に関するものであり、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。