

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7264397号
(P7264397)

(45)発行日 令和5年4月25日(2023.4.25)

(24)登録日 令和5年4月17日(2023.4.17)

(51)国際特許分類

B 0 1 J	20/08 (2006.01)	B 0 1 J	20/08	C
B 0 1 D	15/00 (2006.01)	B 0 1 D	15/00	M
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071	
C 1 2 M	3/00 (2006.01)	C 1 2 M	3/00	Z

請求項の数 4 (全16頁)

(21)出願番号 特願2019-205426(P2019-205426)
 (22)出願日 令和1年11月13日(2019.11.13)
 (65)公開番号 特開2021-74697(P2021-74697A)
 (43)公開日 令和3年5月20日(2021.5.20)
 審査請求日 令和4年3月31日(2022.3.31)

(73)特許権者 000226242
 日機装株式会社
 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
 (73)特許権者 504157024
 国立大学法人東北大学
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 (74)代理人 100105924
 弁理士 森下 賢樹
 吉岡 敏明
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 国立大学法人東北大学内
 (72)発明者 亀田 知人
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 国立大学法人東北大学内
 (72)発明者 北川 文彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 乳酸吸着剤および乳酸の除去方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の金属水酸化物層と前記金属水酸化物層の層間に保持される陰イオンおよび水分子とを有する層状複水酸化物、ならびに前記層状複水酸化物の酸化物である層状複酸化物の少なくとも一方を含み、

前記金属水酸化物層は、2価金属イオン M^{2+} および3価金属イオン M^{3+} を含み、

前記層状複水酸化物における前記2価金属イオン M^{2+} と前記3価金属イオン M^{3+} とのモル比(M^{2+} / M^{3+})は1.9~3.6であり、

前記層状複酸化物における前記モル比は1.8~3.6であり、

乳酸およびグルコースを含有する溶液に接触して前記溶液中の乳酸を吸着する乳酸吸着剤。

【請求項2】

前記2価金属イオン M^{2+} は、 Mg^{2+} または Ca^{2+} である請求項1に記載の乳酸吸着剤。

【請求項3】

前記溶液は、細胞または微生物の培養液である請求項1または2に記載の乳酸吸着剤。

【請求項4】

請求項1乃至3のいずれか1項に記載の乳酸吸着剤を、乳酸およびグルコースを含有する溶液に接触させることを含む乳酸の除去方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】**【0001】**

本発明は、乳酸吸着剤および乳酸の除去方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

近年、医薬品製造や再生医療などの分野において、細胞や微生物を人工的に効率よく大量培養することが求められている。大量培養が求められる細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）等の抗体産生細胞、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）等の多能性幹細胞等が挙げられる。これらの細胞を長期間安定的に大量培養できれば、モノクローナル抗体等の生体物質や多能性幹細胞由来の分化誘導組織を効率よく生産することができる。

10

【0003】

細胞や微生物を工業的に大量培養する方法としては、スピナーフラスコ等の培養槽を用いた浮遊攪拌培養が考えられる。一方、浮遊攪拌培養では設備規模が大きくなる傾向がある。したがって、コストの削減を図るために、細胞等の培養密度を高めることができるのである。しかしながら、培養密度を高めていくと、細胞等の増殖が抑えられることが知られている。これは、細胞等の高密度化によって培養液（液体培地）中の老廃物（代謝物）の濃度が上昇し、これにより細胞等の増殖活性が低下するためである。細胞等に影響を与える老廃物の代表的なものとしては、乳酸が知られている。

20

【0004】

したがって、細胞等を高密度状態で安定的に増殖させるためには、培養液中に蓄積する乳酸を除去することが望ましい。これに対し、例えば特許文献1には、濃度差に依存して成分を透過させる培養液成分調整膜を設けた送液ラインによって、細胞培養槽と成分調整液槽とを接続した細胞培養装置が開示されている。この細胞培養装置では、培養液中に蓄積した老廃物は、成分調整液側に移動することで培養液中の濃度が低下する。同時に、培養中に濃度が低下した栄養分は、成分調整液から培養液へ移動して補充される。これにより、培養液中の環境が細胞培養に適した状態に維持される。なお、成分調整液には、培養液そのものが用いられていた。

【先行技術文献】**【特許文献】**

30

【0005】**【文献】国際公開第2015/122528号****【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

特許文献1に開示される細胞培養装置は、透析の原理を利用して培養液から老廃物を除去していた。したがって、十分な老廃物の除去を実現するために、成分調整液槽の容積を細胞培養槽の容積の10倍以上に設定していた。このため、必要な液量が莫大でコストがかかるという課題があった。特に、成分調整液に培養液そのものを用いる場合には、高価な培地を大量に消費することになり、より一層のコストがかかってしまう。また、透析技術を利用して老廃物を除去する場合、培養装置の構造が複雑になるという課題もあった。

40

【0007】

このため、透析技術以外の手法を用いた新規な乳酸除去技術が強く望まれる。また、透析技術以外の乳酸除去手法においても、より良好な細胞等の増殖環境を得るために、乳酸の除去効率の高さが当然に求められる。

【0008】

本発明はこうした状況に鑑みてなされたものであり、その目的の1つは、乳酸の除去効率を高める技術を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

50

上記課題を解決するために、本発明のある態様は乳酸吸着剤である。この乳酸吸着剤は、複数の金属水酸化物層と金属水酸化物層の層間に保持される陰イオンおよび水分子とを有する層状複水酸化物、ならびに層状複水酸化物の酸化物である層状複酸化物の少なくとも一方を含む。金属水酸化物層は、2価金属イオン M^{2+} および3価金属イオン M^{3+} を含み、層状複水酸化物における2価金属イオン M^{2+} と3価金属イオン M^{3+} とのモル比(M^{2+}/M^{3+})は1.9~3.6であり、層状複酸化物におけるモル比は1.8~3.6である。この態様によれば、乳酸の除去効率を高めることができる。

【0010】

上記態様において、2価金属イオン M^{2+} は、 Mg^{2+} または Ca^{2+} であってもよい。また、乳酸吸着剤は、乳酸を含有する溶液に接触して、溶液中の乳酸を吸着するものであってもよい。また、溶液は、グルコースを含有する、細胞または微生物の培養液であってもよい。

10

【0011】

本発明の別の態様は、乳酸の除去方法である。当該除去方法は、上記いずれかの態様の乳酸吸着剤を乳酸に接触させることを含む。

【0012】

なお、以上の構成要素の任意の組み合わせや、本発明の構成要素や表現を方法、装置、システムなどの間で相互に置換したものもまた、本発明の態様として有効である。

20

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、乳酸の除去効率を高めることができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1(A)~図1(D)は、実施の形態に係る乳酸の除去方法を説明するための模式図である。

【図2】各層状複水酸化物および層状複酸化物における $Mg/A1$ モル比の目標値と実測値とを示す図である。

【図3】乳酸およびグルコースの水溶液における層状複水酸化物および層状複酸化物の乳酸吸着率およびグルコース吸着率を示す図である。

【図4】細胞培養液における層状複水酸化物および層状複酸化物の乳酸吸着率およびグルコース吸着率を示す図である。

30

【図5】細胞培養液における層状複水酸化物および層状複酸化物の乳酸吸着率およびグルコース吸着率を示す図である。

【図6】層状複水酸化物または層状複酸化物を培地に添加した際の細胞増殖率を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明を好適な実施の形態をもとに図面を参照しながら説明する。実施の形態は、発明を限定するものではなく例示であって、実施の形態に記述されるすべての特徴やその組み合わせは、必ずしも発明の本質的なものであるとは限らない。各図面に示される同一又は同等の構成要素、部材、処理には、同一の符号を付するものとし、適宜重複した説明は省略する。また、各図に示す各部の縮尺や形状は、説明を容易にするために便宜的に設定されており、特に言及がない限り限定的に解釈されるものではない。また、本明細書または請求項中に「第1」、「第2」等の用語が用いられる場合には、この用語はいかなる順序や重要度を表すものではなく、ある構成と他の構成とを区別するためのものである。また、各図面において実施の形態を説明する上で重要ではない部材の一部は省略して表示する。

40

【0016】

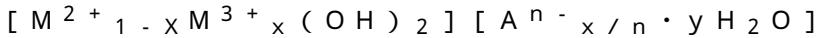
本実施の形態に係る乳酸吸着剤は、層状複水酸化物(Layered Double Hydroxide: LDH)および層状複酸化物(Layered Double oxide: LDO)の少なくとも一方を含

50

む。層状複水酸化物は、複数の金属水酸化物層と、金属水酸化物層の層間に保持される陰イオンおよび水分子とを有する。金属水酸化物層は、構成金属として2価金属イオン M^{2+} および3価金属イオン M^{3+} を含む。具体的には、層状複水酸化物は、2価金属の $M(OH)_2$ における M^{2+} の一部が M^{3+} に置換されることにより正電荷を帯びた八面体層のホスト層（金属水酸化物層）と、ホスト層の正電荷を補償する陰イオンおよび層間水からなるゲスト層とで構成される。乳酸（乳酸イオン）は、ゲスト層の陰イオンとイオン交換されることで、層状複水酸化物に吸着される。

【0017】

層状複水酸化物は、以下の化学式で表される。



上記式中、 M^{2+} は、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} および Cd^{2+} からなる群から選択される2価の金属イオンである。 M^{3+} は、 Al^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{3+} 、 In^{3+} 、 Mn^{3+} および V^{3+} からなる群から選択される3価の金属イオンである。 A^{n-} は、 CO_3^{2-} 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 、 OH^- 、 SiO_4^{4-} および NO_3^- からなる群から選択されるn価の陰イオンである。 n は1～3であり、 y は1～12である。 x は以下に説明する2価金属イオン M^{2+} と3価金属イオン M^{3+} とのモル比（ M^{2+} / M^{3+} ）を満たす数である。

【0018】

層状複水酸化物における2価金属イオン M^{2+} と3価金属イオン M^{3+} とのモル比は、1.9～3.6である。したがって、上記式中の x は、0.217～0.345である。金属水酸化物層における当該モル比を調整することで、層状複水酸化物が有する電荷や金属水酸化物層の層間距離を変えることができ、これにより層状複水酸化物の乳酸吸着能を調整することができる。特に、モル比を1.9以上3.6以下とすることで、層状複水酸化物の乳酸吸着率を高めることができる。また、層状複水酸化物を効率よく合成することができる。モル比は、原子吸光光度計を用いて測定される。

【0019】

層状複酸化物は、層状複水酸化物の酸化物である。層状複酸化物は、層状複水酸化物を例えば200～500で焼成して得られる。層状複酸化物を乳酸水溶液に接触させると、乳酸を層間に吸着した状態で層状複水酸化物の構造を再生する。層状複酸化物における2価金属イオン M^{2+} と3価金属イオン M^{3+} とのモル比は、1.8～3.6である。層状複酸化物についても、金属水酸化物層における当該モル比を調整することで、層状複酸化物が有する電荷や金属水酸化物層の層間距離を変えることができ、これにより層状複酸化物の乳酸吸着能を調整することができる。特に、モル比を1.8以上3.6以下とすることで、層状複酸化物の乳酸吸着率を高めることができる。また、層状複酸化物を効率よく合成することができる。

【0020】

金属水酸化物層を構成する2価金属イオン M^{2+} は、 Mg^{2+} または Ca^{2+} であることが好ましく、 Mg^{2+} であることがより好ましい。また、金属水酸化物層を構成する3価金属イオン M^{3+} は、 Al^{3+} であることが好ましい。つまり、 Mg - Al 系LDHおよび Mg - Al 系LDOがより好ましい。これにより、細胞等に対する層状複水酸化物および層状複酸化物の毒性を低減することができる。なお、金属水酸化物層を構成する金属イオンや陰イオンの種類が異なる複数種の層状複水酸化物および層状複酸化物を混合して用いてもよい。

【0021】

上述の層状複水酸化物および層状複酸化物の少なくとも一方を含む乳酸吸着剤を乳酸に接触させることで、乳酸を層状複水酸化物あるいは層状複酸化物に吸着させることができる。特に、本実施の形態の乳酸吸着剤は、溶液中の乳酸を吸着除去する場合に、好適に用いることができる。この場合、乳酸吸着剤を乳酸含有溶液に接触させることで、溶液中の乳酸を吸着させることができる。また、乳酸吸着剤は、溶液が、グルコースを含有する細胞または微生物の培養液であった場合に、培養液中に残すべきグルコースに比べて除去対

10

20

30

40

50

象である乳酸を高選択的に吸着することができる。なお、培養液の種類は特に限定されない。

【0022】

また、溶液への乳酸吸着剤の添加量、言い換えれば溶液中の乳酸吸着剤の濃度は、好ましくは0.0005g/mL超であり、より好ましくは0.005g/mL以上であり、さらに好ましくは0.005g/mL超であり、さらに好ましくは0.025g/mL以上である。また、当該添加量は、好ましくは0.2g/mL未満であり、より好ましくは0.1g/mL以下である。乳酸吸着剤の添加量を0.0005g/mL超とすることで、乳酸吸着率をより確実に高めることができる。また、乳酸吸着剤の添加量を0.2g/mL未満とすることで、グルコース吸着率をより確実に抑制でき、より効率よく細胞等を培養することができる。乳酸吸着率は、溶液中の全乳酸量に対する吸着した乳酸量の割合である。グルコース吸着率は、溶液中の全グルコース量に対する吸着したグルコース量の割合である。

【0023】

培養液を用いて培養される細胞および微生物は、特に限定されない。例えば培養細胞は、ヒトiPS細胞、ヒトES細胞、ヒトMuscle細胞等の多能性幹細胞および分化誘導細胞；間葉系幹細胞(MSC細胞)、ネフロン前駆細胞等の体性幹細胞；ヒト近位尿細管上皮細胞、ヒト遠位尿細管上皮細胞、ヒト集合管上皮細胞等の組織細胞；ヒト胎児腎細胞(HEK293細胞)等の抗体産生細胞株；チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、昆虫細胞(SF9細胞)等のヒト以外の動物由来の抗体産生細胞株等が挙げられる。これらの細胞は、大量培養が特に望まれる細胞であるため、本実施の形態に係る乳酸吸着剤の使用対象としてより好ましい。

【0024】

(乳酸の除去方法)

本実施の形態に係る乳酸の除去方法は、上述した乳酸吸着剤を乳酸(乳酸イオン)に接触させることを含む。好ましくは、乳酸を含有する溶液に乳酸吸着剤を接触させることを含む。乳酸吸着剤を乳酸に接触させる方法は特に限定されないが、以下の態様が例示される。図1(A)～図1(D)は、実施の形態に係る乳酸の除去方法を説明するための模式図である。以下では、培養液からの乳酸除去を例に挙げて説明するが、他の溶液からの乳酸除去についても同様に実施することができる。

【0025】

図1(A)に示すように、第1の態様では、カラム等の容器2に乳酸吸着剤4が充填された吸着モジュール6が用意される。容器2は、容器2の内外を連通する入口2aと出口2bとを有する。乳酸吸着剤4は、例えば粒子状である。吸着モジュール6は、循環路8を介して、スピナーフラスコ等の培養容器10に接続される。循環路8は、培養容器10と容器2の入口2aとを接続する往路8aと、容器2の出口2bと培養容器10とを接続する復路8bとを含む。往路8aの途中には、ポンプ12が接続される。培養容器10中には、培養液14と、細胞16とが収容される。なお、ポンプ12は復路8bに配置されてもよい。

【0026】

ポンプ12が駆動すると、培養液14は培養容器10から吸引され、往路8aを介して吸着モジュール6の容器2内に送られる。容器2内に送り込まれた培養液14は、復路8bを介して培養容器10内に戻される。培養液14は、培養容器10と吸着モジュール6との間を循環する過程で、容器2に充填された乳酸吸着剤4と接触する。このとき、培養液14中の乳酸は、乳酸吸着剤4に吸着される。この結果、培養液14中の乳酸が除去される。往路8aにおける培養容器10に接続される側の端部には、図示しないフィルタが設けられる。これにより、細胞16が吸着モジュール6側に流れることが抑制される。なお、培養容器10と吸着モジュール6との間で培養液14を循環させる過程で、細胞16の培養に必要なグルコースやタンパク質等の培地成分が培養液14に補充されてもよい。

【0027】

10

20

30

40

50

つまり、第1の態様では、乳酸吸着剤4を有する吸着モジュール6と、細胞または微生物、および培養液14が収容される培養容器10と、吸着モジュール6と培養容器10とをつなぎ培養液14を循環させる循環路8と、を備える培養装置を用いることで、培養液14中の乳酸が除去される。

【0028】

図1(B)に示すように、第2の態様では、培養容器10の内壁面に乳酸吸着剤4が支持されている。培養容器10中には、培養液14と、細胞16とが収容されている。したがって、培養液14は、培養容器10の内壁面において露出する乳酸吸着剤4に接触する。これにより、培養液14中の乳酸を乳酸吸着剤4に吸着させることができる。培養容器10としては、スピナーフラスコ、シャーレ、ウェルプレート、セルカルチャーチャーインサート、マイクロスフェア等が例示される。

10

【0029】

培養容器10の内壁面に乳酸吸着剤4を支持させる方法としては、例えば、乳酸吸着剤4を培養容器10の内壁面に接着させる方法や、培養容器10が樹脂製である場合には、予め乳酸吸着剤4を混合した樹脂で培養容器10を成形する方法等が挙げられる。つまり、第2の態様では、培養容器10と、培養容器10の内壁面に支持される乳酸吸着剤4と、を備える培養装置を用いることで、培養液14中の乳酸が除去される。

【0030】

図1(C)に示すように、第3の態様では、培養容器10は、多孔質膜等の隔膜18によって容器内部が上段10aと下段10bに区切られた構造を有する。このような培養容器10としては、セルカルチャーチャーインサートが例示される。上段10aには培養液14と細胞16が収容され、下段10bには培養液14と乳酸吸着剤4が収容される。培養液14は、隔膜18を通過して上段10aと下段10bとの間を行き来することができる。一方、細胞16および乳酸吸着剤4は、隔膜18を通過することができない。

20

【0031】

このような構造において、培養液14は、下段10bに収容された乳酸吸着剤4に接触する。これにより、培養液14中の乳酸を乳酸吸着剤4に吸着させることができる。つまり、第3の態様では、培養容器10と、乳酸吸着剤4と、培養容器10内を乳酸吸着剤4が収容される第1空間と細胞16が収容される第2空間とに区画する隔膜18と、を備える培養装置を用いることで、培養液14中の乳酸が除去される。

30

【0032】

図1(D)に示すように、第4の態様では、粒子状の乳酸吸着剤4を培養液14中に分散、沈降あるいは浮遊させる。これにより、培養液14中の乳酸を乳酸吸着剤4に吸着させることができる。なお、乳酸吸着剤4は、細胞16に貪食されることを防ぐために、所定サイズ以上、例えば $10\mu\text{m}$ 以上の大きさであることが好ましい。つまり、第4の態様では、培養容器10と、培養容器10内の培養液14に添加される乳酸吸着剤4と、を備える培養装置を用いることで、培養液14中の乳酸が除去される。

【0033】

好ましくは、乳酸吸着剤は、ポリビニルアルコール等の樹脂、コラーゲンやアルギン酸、ゼラチン等の生体由来ゲル等で被覆される。これにより、細胞等に影響を与える得る微粒子が乳酸吸着剤から培養液中に流出することを抑制することができる。あるいは、乳酸吸着剤は、セラミックスバインダー、樹脂バインダー、生体由来ゲル等と層状複水酸化物とを混練して成形される。これによっても、微粒子の流出を抑制することができる。セラミックスバインダーとしては、アルミナバインダー、コロイダルシリカ等が例示される。樹脂バインダーとしては、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース等が例示される。生体由来ゲルとしては、コラーゲン、アルギン酸、ゼラチン等が例示される。

40

【0034】

溶液中の乳酸濃度を検出する場合、その検出方法は特に限定されないが、培地成分アナライザーを使用することが好ましい。また、所定の測定試薬を用いた比色法、酵素の基質特異性を利用する酵素電極法、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等を利用して、

50

乳酸濃度を検出することができる。

【0035】

以上説明したように、本実施の形態に係る乳酸吸着剤は、複数の金属水酸化物層と金属水酸化物層の層間に保持される陰イオンおよび水分子とを有する層状複水酸化物、ならびに層状複水酸化物の酸化物である層状複酸化物の少なくとも一方を含む。金属水酸化物層は、2価金属イオン M^{2+} および3価金属イオン M^{3+} を含み、層状複水酸化物における2価金属イオン M^{2+} と3価金属イオン M^{3+} とのモル比(M^{2+} / M^{3+})は1.9~3.6であり、層状複酸化物におけるモル比は1.8~3.6である。また、本実施の形態に係る乳酸の除去方法は、この乳酸吸着剤を乳酸に接触させることを含む。

【0036】

層状複水酸化物および層状複酸化物における2価金属イオン M^{2+} と3価金属イオン M^{3+} とのモル比を上述の範囲に調整することで、乳酸の吸着率を高めることができる。これにより、乳酸の除去効率を高めることができる。

【0037】

また、本実施の形態によれば、従来の透析技術を用いて乳酸を除去する場合とは異なり、莫大な量の溶液を使用せずに乳酸を除去することができる。よって、低コストに乳酸を除去することができる。特に、溶液が細胞等の培養液である場合には、従来の透析技術に比べて培養液の使用量を減らすことができる。一般的に培養液は高価であるため、より一層の低コスト化が可能である。また、乳酸吸着剤を乳酸含有溶液に接触させるだけで乳酸を除去できるため、本実施の形態によれば培養装置の構造の簡略化を図ることができる。

【0038】

また、乳酸の除去により細胞等を高密度に大量培養することができる。また、乳酸によって培地のpHが低下することも抑制できるため、この点でも細胞を高密度に大量培養することができる。さらに、細胞が多能性幹細胞である場合には、乳酸の除去によって細胞の高密度大量培養が可能となることに加え、細胞が未分化の状態、つまり細胞の多分化能(分化多能性)を維持することができる。したがって、生体物質生産や分化誘導組織作製に好適な細胞を大量に得ることができる。これにより、医薬品製造や再生医療に要するコストを削減することができる。

【0039】

また、本実施の形態の乳酸吸着剤は、有用成分であるグルコースに対して乳酸を高選択的に吸着することができる。このため、より効率的な細胞培養が可能となる。よって、本実施の形態の乳酸吸着剤は、グルコースを含有する培養液における乳酸の除去に特に有用である。なお、本実施の形態の乳酸吸着剤は、他の細胞老廃物の吸着剤と併用してもよい。

【0040】

また、好ましくは、金属水酸化物層を構成する2価金属イオン M^{2+} は、 Mg^{2+} または Ca^{2+} である。これにより、細胞等に対する層状複水酸化物および層状複酸化物の毒性を低減することができる。よって、乳酸吸着剤に起因して細胞や微生物の増殖率が低下することを抑制することができる。また、好ましくは、金属水酸化物層を構成する3価金属 M^{3+} は、 Al^{3+} である。

【0041】

以上、本発明の実施の形態について詳細に説明した。前述した実施の形態は、本発明を実施するにあたっての具体例を示したものにすぎない。実施の形態の内容は、本発明の技術的範囲を限定するものではなく、請求の範囲に規定された発明の思想を逸脱しない範囲において、構成要素の変更、追加、削除等の多くの設計変更が可能である。設計変更が加えられた新たな実施の形態は、組み合わされる実施の形態および変形それぞれの効果をあわせもつ。前述の実施の形態では、このような設計変更が可能な内容に関して、「本実施の形態の」、「本実施の形態では」等の表記を付して強調しているが、そのような表記のない内容でも設計変更が許容される。以上の構成要素の任意の組み合わせも、本発明の態様として有効である。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0042】

以下、本発明の実施例を説明するが、実施例は本発明を好適に説明するための例示に過ぎず、なんら本発明を限定するものではない。

【0043】

[乳酸吸着剤の合成]

(Mg / Al モル比 = 1.0 の Mg / Al 混合溶液を用いた第1化合物の合成)

まず、イオン交換水を入れた三口フラスコを用意した。そして、窒素雰囲気、30 の条件下で、Mg (NO₃)₂ - Al (NO₃)₃ 混合溶液 (Mg / Al モル比 = 1.0) をイオン交換水に滴下しながら 300 rpm で攪拌した。滴下開始から 1 時間経過後、反応溶液をろ過、水洗して生成物を得た。得られた生成物を 40 、減圧下で 40 時間乾燥して、第1化合物を得た。この合成は、Mg / Al モル比が 1.0 である NO₃ 型 Mg - Al LDH の合成を目的としたものである。

10

【0044】

(Mg / Al モル比 = 2.0 の Mg / Al 混合溶液を用いた第2化合物の合成)

Mg (NO₃)₂ - Al (NO₃)₃ 混合溶液 (Mg / Al モル比 = 2.0) を用いた点を除いて第1化合物の合成と同じ手順で、第2化合物を合成した。この合成は、Mg / Al モル比が 2.0 である NO₃ 型 Mg - Al LDH の合成を目的としたものである。

20

【0045】

(Mg / Al モル比 = 3.0 の Mg / Al 混合溶液を用いた第3化合物の合成)

Mg (NO₃)₂ - Al (NO₃)₃ 混合溶液 (Mg / Al モル比 = 3.0) を用いた点を除いて第1化合物の合成と同じ手順で、第3化合物を合成した。この合成は、Mg / Al モル比が 3.0 である NO₃ 型 Mg - Al LDH の合成を目的としたものである。

20

【0046】

(Mg / Al モル比 = 4.0 の Mg / Al 混合溶液を用いた第4化合物の合成)

Mg (NO₃)₂ - Al (NO₃)₃ 混合溶液 (Mg / Al モル比 = 4.0) を用いた点を除いて第1化合物の合成と同じ手順で、第4化合物を合成した。この合成は、Mg / Al モル比が 4.0 である NO₃ 型 Mg - Al LDH の合成を目的としたものである。

20

【0047】

(Mg / Al モル比 = 5.0 の Mg / Al 混合溶液を用いた第5化合物の合成)

Mg (NO₃)₂ - Al (NO₃)₃ 混合溶液 (Mg / Al モル比 = 5.0) を用いた点を除いて第1化合物の合成と同じ手順で、第5化合物を合成した。この合成は、Mg / Al モル比が 5.0 である NO₃ 型 Mg - Al LDH の合成を目的としたものである。

30

【0048】

(第6化合物の合成)

第1化合物を電気炉に入れ、500 で 2 時間仮焼して第6化合物を得た。この合成は、Mg / Al モル比が 1.0 である Mg - Al LDO の合成を目的としたものである。

【0049】

(第7化合物の合成)

第2化合物を電気炉に入れ、500 で 2 時間仮焼して第7化合物を得た。この合成は、Mg / Al モル比が 2.0 である Mg - Al LDO の合成を目的としたものである。

40

【0050】

(第8化合物の合成)

第3化合物を電気炉に入れ、500 で 2 時間仮焼して第8化合物を得た。この合成は、Mg / Al モル比が 3.0 である Mg - Al LDO の合成を目的としたものである。

40

【0051】

(第9化合物の合成)

第4化合物を電気炉に入れ、500 で 2 時間仮焼して第9化合物を得た。この合成は、Mg / Al モル比が 4.0 である Mg - Al LDO の合成を目的としたものである。

【0052】

(第10化合物の合成)

50

第5化合物を電気炉に入れ、500℃で2時間仮焼して第10化合物を得た。この合成は、Mg/A1モル比が5.0であるMg-A1-LDOの合成を目的としたものである。

【0053】

【LDH合成およびLDO合成の確認】

X線回折装置(RINT-2200VHF:理学社製)を用いた粉末X線回折によって、上述の合成手順で得られた第1～10化合物の構造を確認した。Mg/A1モル比が1.0である層状複水酸化物を狙って合成した第1化合物については、複数の化合物が混在しており、粉末X線回折によって層状複水酸化物に由来するピークのみを確認できなかった(つまり他の化合物由来のピークも混在していた)。同様に、Mg/A1モル比が5.0である層状複水酸化物を狙って合成した第5化合物についても、粉末X線回折によって層状複水酸化物に由来するピークのみを確認できなかった。また、Mg/A1モル比が1.0である層状複酸化物を狙って合成した第6化合物、およびMg/A1モル比が5.0である層状複酸化物を狙って合成した第10化合物についても、層状複酸化物に由来するピークのみを確認できなかった。

10

【0054】

つまり、Mg/A1モル比が1.0である層状複水酸化物あるいは層状複酸化物を狙った合成、およびMg/A1モル比が5.0である層状複水酸化物あるいは層状複酸化物を狙った合成では、層状複水酸化物および層状複酸化物を单一相で合成できないことが確認された。Mg/A1モル比1.0の層状複水酸化物や層状複酸化物を狙った合成では、Mg/A1モル比が2付近の層状複水酸化物や層状複酸化物が合成されると考えられる。同様に、Mg/A1モル比5.0の層状複水酸化物や層状複酸化物を狙った合成では、Mg/A1モル比が4付近の層状複水酸化物や層状複酸化物が合成されると考えられる。また、これらの合成では、2価金属イオンの酸化物等の不純物が増加すると考えられる。

20

【0055】

一方、Mg/A1モル比2.0の層状複水酸化物を狙って合成した第2化合物については、粉末X線回折によって層状複水酸化物に由来する単一のピークを確認できた。同様に、Mg/A1モル比3.0の層状複水酸化物を狙って合成した第3化合物、Mg/A1モル比4.0の層状複水酸化物を狙って合成した第4化合物、Mg/A1モル比2.0の層状複酸化物を狙って合成した第7化合物、Mg/A1モル比3.0の層状複酸化物を狙って合成した第8化合物、およびMg/A1モル比4.0の層状複酸化物を狙って合成した第9化合物についても、層状複水酸化物あるいは層状複酸化物に由来する単一のピークを確認できた。つまり、Mg/A1モル比2.0、Mg/A1モル比3.0、およびMg/A1モル比4.0の層状複水酸化物あるいは層状複酸化物を狙った合成では、層状複水酸化物および層状複酸化物を单一相で合成できることが確認された。

30

【0056】

ICP発光分析装置(iCAP 6500 Duo: ThermoFisher Scientific社製)を用いて、合成した層状複水酸化物および層状複酸化物の組成を確認した。結果を図2に示す。図2は、各層状複水酸化物および層状複酸化物におけるMg/A1モル比の目標値と実測値とを示す図である。図2に示すように、Mg/A1モル比2.0を狙って合成した、つまりMg/A1モル比の目標値が2.0であるMg-A1-LDHは、Mg/A1モル比の実測値は1.9であった。目標値3.0のMg-A1-LDHの実測値は3.3、目標値4.0のMg-A1-LDHの実測値は3.6であった。目標値2.0であるMg-A1-LDOの実測値は1.8、目標値3.0のMg-A1-LDOの実測値は2.7、目標値4.0のMg-A1-LDOの実測値は3.6であった。

40

【0057】

【乳酸およびグルコースの水溶液(水系溶液)における吸着剤性能の解析】

乳酸ナトリウム(関東化学社)とグルコース(富士フイルム和光純薬社)とを純水に添加し、グルコース濃度1000ppm、乳酸濃度10mMの水溶液を作製した。この水溶液20mLを複数の50mL三角フラスコに分注した。また、各種の乳酸吸着剤0.5gを各三角フラスコの水溶液に添加した。したがって、乳酸吸着剤の濃度は0.025g/

50

m L である。乳酸吸着剤には、上述のとおり Mg / Al モル比を実測した Mg / Al LDH および Mg / Al LDO を用いた。

【0058】

37 、 150 rpm で水溶液を 24 時間攪拌した。24 時間経過後、0.1 μm フィルタで水溶液と乳酸吸着剤を分離した。そして、HPLC (日本分光社) を用いて水溶液中の乳酸濃度およびグルコース濃度を測定した。また、以下の式に基づいて、各吸着剤における乳酸の吸着率およびグルコースの吸着率を算出した。

$$\text{吸着率 (\%)} = [\text{吸着前濃度 (mM または ppm)} - \text{吸着後濃度 (mM または ppm)}] / \text{吸着前濃度 (mM または ppm)} \times 100$$

【0059】

結果を図 3 に示す。図 3 は、乳酸およびグルコースの水溶液における層状複水酸化物および層状複酸化物の乳酸吸着率およびグルコース吸着率を示す図である。図 3 に示すように、Mg / Al モル比が 1.9 ~ 3.6 である Mg - Al LDH と、Mg / Al モル比が 1.8 ~ 3.6 である Mg - Al LDO とは、高い乳酸吸着能を有することが確認された。特に、Mg - Al LDH においては、Mg / Al モル比 1.9 のものが最も高い乳酸吸着率を示した。また、Mg - Al LDO においては、Mg / Al モル比 1.8 のものが最も高い乳酸吸着率を示した。また、いずれの Mg - Al LDH および Mg - Al LDO も、水溶液中のグルコースをほとんど吸着しないことが確認された。

【0060】

以下に挙げる他の化合物についても、合成と吸着性能の解析とを実施した。

【0061】

(Cu / Al モル比 = 3.0 の Cu / Al 混合溶液を用いた第 11 化合物の合成)

イオン交換水を入れた三口フラスコを用意した。そして、窒素雰囲気、30 の条件下で、Cu (NO₃)₂ - Al (NO₃)₃ 混合溶液 (Cu / Al モル比 = 3.0) をイオン交換水に滴下しながら、且つ pH 8.0 に調整しながら 300 rpm で攪拌した。滴下開始から 1 時間経過後、反応溶液をろ過、水洗して生成物を得た。得られた生成物を 40 、減圧下で 40 時間乾燥して、第 11 化合物を得た。第 11 化合物の金属モル比 (Cu / Al) は 3.0 、乳酸吸着率は 72% 、グルコース吸着率は 4.2% であった。したがって、第 11 化合物においても、高い乳酸吸着能を有することが確認された。

【0062】

(Ni / Al モル比 = 3.0 の Ni / Al 混合溶液を用いた第 12 化合物の合成)

イオン交換水を入れた三口フラスコを用意した。そして、窒素雰囲気、30 の条件下で、Ni (NO₃)₂ - Al (NO₃)₃ 混合溶液 (Ni / Al モル比 = 3.0) をイオン交換水に滴下しながら、且つ pH 10.5 に調整しながら 300 rpm で攪拌した。滴下開始から 1 時間経過後、反応溶液をろ過、水洗して生成物を得た。得られた生成物を 40 、減圧下で 40 時間乾燥して、第 12 化合物を得た。第 12 化合物の金属モル比 (Ni / Al) は 2.6 、乳酸吸着率は 77% 、グルコース吸着率は 5.2% であった。したがって、第 12 化合物においても、高い乳酸吸着能を有することが確認された。

【0063】

(Ca / Al モル比 = 3.0 の Ca / Al 混合溶液を用いた第 13 化合物の合成)

イオン交換水を入れた三口フラスコを用意した。そして、窒素雰囲気、30 、 pH 12.5 の条件下で、Ca (NO₃)₂ - Al (NO₃)₃ 混合溶液 (Ca / Al モル比 = 3.0) をイオン交換水に滴下しながら 300 rpm で攪拌した。滴下開始から 1 時間経過後に滴下を終了し、条件を窒素雰囲気、80 、 pH 12.5 に変更した。条件変更から 2 時間経過後、反応溶液をろ過、水洗して生成物を得た。得られた生成物を 40 、減圧下で 40 時間乾燥して、第 13 化合物を得た。第 13 化合物の金属モル比 (Ca / Al) は 2.5 、乳酸吸着率は 48% 、グルコース吸着率は 22% であった。したがって、第 13 化合物においても、高い乳酸吸着能を有することが確認された。

【0064】

[細胞培養液における吸着剤性能の解析 1]

10

20

30

40

50

多能性幹細胞用培地 (S t e m F i t A K 0 2 N : 味の素社) に乳酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬社) を添加し、グルコース濃度 2 5 0 m g / d L 、乳酸濃度 1 0 m M の培地を作製した。この培地 2 0 m L を複数の 5 0 m L チューブ (ThermoFisher Scientific社) に分注した。また、各種の乳酸吸着剤 0 . 5 g を各チューブの培地に添加した。したがって、乳酸吸着剤の濃度は 0 . 0 2 5 g / m L である。乳酸吸着剤には、上述のとおり M g / A 1 モル比を実測した M g / A 1 L D H および M g / A 1 L D O を用いた。

【 0 0 6 5 】

37 、 60 回 / 分で培地を 24 時間振とうした。24 時間経過後、0 . 2 2 μ m フィルタで培地と乳酸吸着剤とを分離した。そして、血液ガス分析装置 (A B L 8 0 0 F L E X : ラジオメーター社) を用いて、培地中の乳酸濃度およびグルコース濃度を測定した。また、上記数式に基づいて、各乳酸吸着剤における乳酸の吸着率およびグルコースの吸着率を算出した。

【 0 0 6 6 】

結果を図 4 に示す。図 4 は、細胞培養液における層状複水酸化物および層状複酸化物の乳酸吸着率およびグルコース吸着率を示す図である。図 4 に示すように、水系溶液の場合に比べて多少は吸着率が低下するものの、M g / A 1 モル比が 1 . 9 ~ 3 . 6 である M g - A 1 L D H と、M g / A 1 モル比が 1 . 8 ~ 3 . 6 である M g - A 1 L D O とは、細胞培養液中でも乳酸を吸着できることが確認された。特に、M g - A 1 L D H においては、M g / A 1 モル比 1 . 9 のものが最も高い乳酸吸着率を示した。また、M g - A 1 L D O においては、M g / A 1 モル比 2 . 7 のものが最も高い乳酸吸着率を示した。また、いずれの M g - A 1 L D H および M g - A 1 L D O も、乳酸吸着率に比べてグルコース吸着率が低いことが確認された。

【 0 0 6 7 】

[細胞培養液における吸着剤性能の解析 2]

多能性幹細胞用培地 (S t e m F i t A K 0 2 N : 味の素社) に乳酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬社) を添加し、グルコース濃度 2 5 0 m g / d L 、乳酸濃度 1 0 m M の培地を作製した。この培地 2 0 m L を複数の 5 0 m L チューブ (ThermoFisher Scientific社) に分注した。また、各種の乳酸吸着剤を各チューブの培地に添加した。乳酸吸着剤には、M g / A 1 モル比の実測値が 1 . 9 である M g / A 1 L D H と、M g / A 1 モル比の実測値が 2 . 7 である M g / A 1 L D O を用いた。乳酸吸着剤の添加量 (濃度) は、0 . 1 g (0 . 0 0 5 g / m L) 、0 . 5 g (0 . 0 2 5 g / m L) 、1 . 0 g (0 . 0 5 g / m L) 、2 . 0 g (0 . 1 g / m L) とした。

【 0 0 6 8 】

37 、 60 回 / 分で培地を 24 時間振とうした。24 時間経過後、0 . 2 2 μ m フィルタで培地と乳酸吸着剤とを分離した。そして、血液ガス分析装置 (A B L 8 0 0 F L E X : ラジオメーター社) を用いて、培地中の乳酸濃度およびグルコース濃度を測定した。また、上記数式に基づいて、各乳酸吸着剤における乳酸の吸着率およびグルコースの吸着率を算出した。

【 0 0 6 9 】

結果を図 5 に示す。図 5 は、細胞培養液における層状複水酸化物および層状複酸化物の乳酸吸着率およびグルコース吸着率を示す図である。図 5 に示すように、吸着剤濃度が増加するにつれて乳酸吸着率が上昇することが確認された。特に、吸着剤濃度が 0 . 0 2 5 g / m L 以上のときに、より良好な乳酸吸着率が得られることが確認された。同時にグルコース吸着率も上昇するが、いずれの吸着剤濃度においてもグルコース吸着率は乳酸吸着率に比べて低かった。

【 0 0 7 0 】

[乳酸吸着剤の毒性評価]

(N O 3 型 C u - A 1 L D H の合成)

イオン交換水を入れた三口フラスコを用意した。そして、窒素雰囲気、3 0 、p H 1 0 . 5 の条件下で、C u (N O 3) 2 - A 1 (N O 3) 3 混合溶液 (C u / A 1 モル比 = 3

10

20

30

40

50

. 0) をイオン交換水に滴下しながら 3 0 0 r p m で攪拌した。滴下開始から 1 時間経過後、反応溶液をろ過、水洗して生成物を得た。得られた生成物を 4 0 、減圧下で 4 0 時間乾燥して、保持イオンが NO_3^- である NO_3 型 Cu-A1-LDH を得た。

【 0 0 7 1 】

(Cu-A1-LDO の合成)

NO_3 型 Cu-A1-LDH を電気炉に入れ、 2 0 0 で 4 時間仮焼して Cu-A1-LDO を得た。

【 0 0 7 2 】

(NO_3 型 Ni-A1-LDH の合成)

イオン交換水を入れた三口フラスコを用意した。そして、窒素雰囲気、 3 0 、 pH 1 10 0 . 5 の条件下で、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ - $\text{A1}(\text{NO}_3)_3$ 混合溶液 ($\text{Ni} / \text{A1}$ モル比 = 3 . 0) をイオン交換水に滴下しながら 3 0 0 r p m で攪拌した。滴下開始から 1 時間経過後、反応溶液をろ過、水洗して生成物を得た。得られた生成物を 4 0 、減圧下で 4 0 時間乾燥して、保持イオンが NO_3^- である NO_3 型 Ni-A1-LDH を得た。

【 0 0 7 3 】

(NO_3 型 Ca-A1-LDH の合成)

イオン交換水を入れた三口フラスコを用意した。そして、窒素雰囲気、 3 0 、 pH 1 2 . 5 の条件下で、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - $\text{A1}(\text{NO}_3)_3$ 混合溶液 ($\text{Ca} / \text{A1}$ モル比 = 3 . 0) をイオン交換水に滴下しながら 3 0 0 r p m で攪拌した。滴下開始から 1 時間経過後に滴下を終了し、条件を窒素雰囲気、 8 0 、 pH 1 2 . 5 に変更した。条件変更から 2 時間経過後、反応溶液をろ過、水洗して生成物を得た。得られた生成物を 4 0 、減圧下で 4 0 時間乾燥して、保持イオンが NO_3^- である NO_3 型 Ca-A1-LDH を得た。 20

【 0 0 7 4 】

多能性幹細胞用培地 (StemFit AK02N : 味の素社) 2 0 m L を複数の容器に分注した。そして、各種の乳酸吸着剤 0 . 5 g を各培地に添加して混合し、 4 で 2 4 時間静置した。したがって、乳酸吸着剤の濃度は 0 . 0 2 5 g / m L である。乳酸吸着剤には、 NO_3 型 Cu-A1-LDH 、 Cu-A1-LDO 、 NO_3 型 Ni-A1-LDH 、 NO_3 型 Ca-A1-LDH 、 Mg/A1 モル比の実測値が 3 . 3 である NO_3 型 Mg/A1-LDH および Mg/A1 モル比の実測値が 2 . 7 である Mg/A1-LDO を用いた。 30 2 4 時間経過後、 0 . 2 2 μm フィルタで培地と乳酸吸着剤とを分離した。

【 0 0 7 5 】

各培地に、ヒト iP S 細胞 (2 0 1 B 7 株 : Takahashi K, et al. (2007) Cell) を 2 0 0 0 0 個播種し、 1 2 0 時間培養した。培地は 2 4 時間毎に交換した。 1 2 0 時間経過後、各培地における細胞数を T C 2 0 全自動セルカウンター (バイオラッド社) を用いて計測した。そして、以下の数式に基づいて、各培地における細胞増殖率を算出した。

$$\text{細胞増殖率} (\%) = [\text{培養後細胞数} - \text{播種細胞数}] / \text{播種細胞数} \times 1 0 0$$

【 0 0 7 6 】

この結果、 NO_3 型 Cu-A1-LDH を添加した培地における細胞増殖率が最も低かった。そこで、 NO_3 型 Cu-A1-LDH の細胞増殖率を基準として、その他の L D H を添加した培地における細胞増殖率の比率 (以下では、単に細胞増殖率とする) を算出した。結果を図 6 に示す。図 6 は、層状複水酸化物または層状複酸化物を培地に添加した際の細胞増殖率を示す図である。図 6 に示すように、細胞増殖率は、 NO_3 型 Cu-A1-LDH 、 Cu-A1-LDO 、 NO_3 型 Ni-A1-LDH 、 NO_3 型 Ca-A1-LDH 、 NO_3 型 Mg/A1-LDH 、 Mg/A1-LDO の順に高くなることが確認された。 40

【 0 0 7 7 】

以上より、 2 価金属イオン M^{2+} と 3 価金属イオン M^{3+} とのモル比 ($\text{M}^{2+} / \text{M}^{3+}$) が 1 . 9 ~ 3 . 6 である層状複水酸化物、および当該モル比が 1 . 8 ~ 3 . 6 である層状複酸化物の少なくとも一方を含む乳酸吸着剤が、乳酸水溶液中および培地中のいずれにおいても、優れた乳酸吸着能を有することが確認された。また、グルコースに対して乳酸を高選択性に吸着することが確認された。本実施の形態の乳酸吸着剤によるグルコースの吸

10

20

30

40

50

着量は、細胞等の培養に与える影響が無視し得るレベルであった。このことから、本実施の形態の乳酸吸着剤がグルコースを含む培地中の乳酸除去に好適であることが確認された。また、培地中に含まれる主要な金属イオンである Mg^{2+} や Ca^{2+} を金属水酸化物層の構成金属として用いることで、細胞等の増殖に与える悪影響を低減できることが確認された。

【符号の説明】

【0078】

2 容器、 4 乳酸吸着剤、 6 吸着モジュール、 8 循環路、 10 培養容器、
12 ポンプ、 14 培養液、 16 細胞、 18 隔膜。

10

20

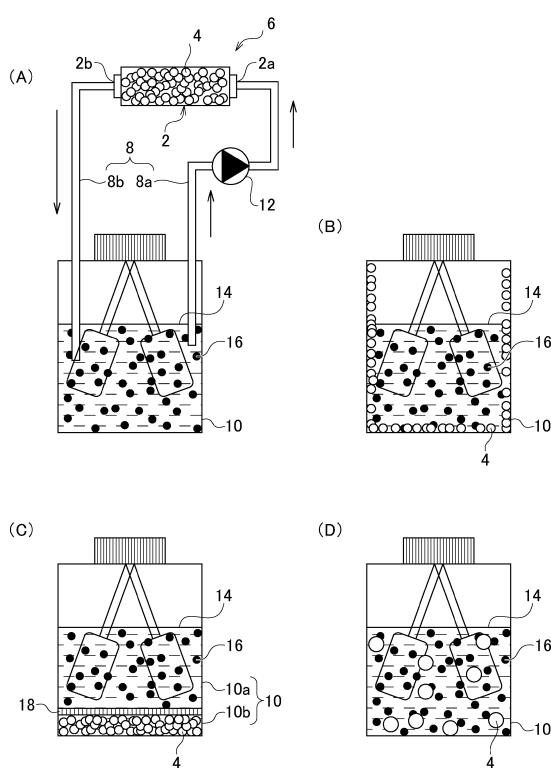
30

40

50

【図面】

【図 1】



【図 2】

Mg-Al LDH		Mg-Al LDO	
Mg/Alモル比の目標値	Mg/Alモル比の実測値	Mg/Alモル比の目標値	Mg/Alモル比の実測値
1.0	—	1.0	—
2.0	1.9	2.0	1.8
3.0	3.3	3.0	2.7
4.0	3.6	4.0	3.6
5.0	—	5.0	—

10

【図 3】

吸着剤濃度(g/mL)	Mg-Al LDH			Mg-Al LDO		
	0.025					
Mg/Alモル比	1.9	3.3	3.6	1.8	2.7	3.6
乳酸吸着率(%)	73	68	55	61	54	39
グルコース吸着率(%)	1	9	2	8	9	11

【図 4】

吸着剤濃度(g/mL)	Mg-Al LDH			Mg-Al LDO		
	0.025					
Mg/Alモル比	1.9	3.3	3.6	1.8	2.7	3.6
乳酸吸着率(%)	36	26	18	25	30	29
グルコース吸着率(%)	7.9	7.7	8.6	11	12	11

30

40

50

【図5】

吸着剤濃度(g/mL)	Mg-Al LDH				Mg-Al LDO			
	0.005	0.025	0.05	0.1	0.005	0.025	0.05	0.1
Mg/Alモル比	1.9				2.7			
乳酸吸着率(%)	18	34	46	58	8	28	37	48
グルコース吸着率(%)	4.2	7.5	10	14	5	13	16	19

【図6】

	NO ₃ 型 Cu-Al LDH	Cu-Al LDO	NO ₃ 型 Ni-Al LDH	NO ₃ 型 Ca-Al LDH	NO ₃ 型 Mg-Al LDH	Mg-Al LDO
細胞増殖率	1	2.3	3.8	7.1	7.2	8.3

10

20

30

40

50

フロントページの続き

石川県金沢市北陽台 3 - 1 日機装株式会社 金沢製作所内

(72)発明者 神保 陽一

石川県金沢市北陽台 3 - 1 日機装株式会社 金沢製作所内

(72)発明者 近藤 昌幸

石川県金沢市北陽台 3 - 1 日機装株式会社 金沢製作所内

審査官 瀧 恭子

(56)参考文献 特開 2016 - 036804 (JP, A)

特開昭 58 - 214338 (JP, A)

特開 2009 - 178682 (JP, A)

特開 2020 - 184979 (JP, A)

国際公開第 2020 / 050068 (WO, A1)

中国特許出願公開第 111001375 (CN, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

B 01 J 20 / 00 - 20 / 28 ; 20 / 30 - 20 / 34

B 01 D 15 / 00 - 15 / 42

C 12 N 1 / 00 - 7 / 08

C 12 M 1 / 00 - 3 / 10

C 01 F 1 / 00 - 17 / 38