

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6742302号
(P6742302)

(45) 発行日 令和2年8月19日(2020.8.19)

(24) 登録日 令和2年7月30日(2020.7.30)

(51) Int.Cl. F 1
C O 8 B 16/00 (2006.01) C O 8 B 16/00

請求項の数 6 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2017-510243 (P2017-510243)	(73) 特許権者	000002901 株式会社ダイセル 大阪府大阪市北区大深町3番1号
(86) (22) 出願日	平成28年4月1日(2016.4.1)	(74) 代理人	100124431 弁理士 田中 順也
(86) 国際出願番号	PCT/JP2016/060881	(74) 代理人	100174160 弁理士 水谷 馨也
(87) 国際公開番号	W02016/159334	(74) 代理人	100175651 弁理士 迫田 恭子
(87) 国際公開日	平成28年10月6日(2016.10.6)	(72) 発明者	柴田 徹 兵庫県姫路市網干区新在家1239 株式会社ダイセル内
審査請求日	平成31年3月25日(2019.3.25)	(72) 発明者	森下 康人 兵庫県姫路市網干区新在家1239 株式会社ダイセル内
(31) 優先権主張番号	特願2015-77028 (P2015-77028)		
(32) 優先日	平成27年4月3日(2015.4.3)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多孔質セルロース媒体の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

セルロースアセテートと、塩基性化合物と、水を含む溶媒とを含む流動性の均一組成物を、該均一組成物と混和しない分散媒体に分散させて分散液を得て、得られた分散液に含まれるセルロースアセテートの脱アセチル反応により前記組成物をゲル化させることにより、前記組成物から構成されるゲル化粒子を形成させる工程を含む、球状多孔質セルロース粒子の製造方法。

【請求項2】

前記工程の後に、得られたゲル化粒子を分離するための分離溶媒を、ゲル化粒子が形成された分散液に添加して、分離溶媒中にゲル化粒子を分離する工程を含む、請求項1に記載の球状多孔質セルロース粒子の製造方法。

【請求項3】

前記分離溶媒が水、メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトアミド、ホルムアミド、またはこれらのうち少なくとも2種の混合物である請求項2に記載の製造方法。

【請求項4】

セルロースアセテートと、塩基性化合物と、水を含む溶媒とを含む流動性の均一組成物を成型容器に入れ、セルロースアセテートの脱アセチル反応により、該成型容器内で均一組成物をゲル化させる工程を含む多孔質セルロースモノリスの製造方法。

【請求項5】

前記均一組成物における水を含む溶媒が有機溶媒を含み、該有機溶媒が、水と混和し、飽和炭化水素と混和しない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製造方法。

【請求項 6】

前記有機溶媒が、非プロトン性極性溶媒である、請求項 5 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多孔質セルロース媒体の製造方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

セルロースを代表とする多糖およびその誘導体は、さまざまな用途に利用されている。これらの微小多孔質体は、それ自体が吸着剤となりうるし、またその表面に何らかの化学修飾を行うことにより、吸着や分離の機能が付与できる。

【0003】

以下にそのひとつの例を挙げる。酵素利用の普及、バイオ医薬の開発などにより、タンパク質を始めとする生体高分子の分離精製は、重要な技術的課題の一つとなっている。これを解決するための重要な手段がクロマトグラフィーである。クロマトグラフィーでは、目的物あるいは除去対象となる不純物と相互作用する何らかの原子団（しばしばこれをセ

20

【0004】

レクタと呼ぶ）をマトリクスと呼ばれる固体に結合した分離剤が用いられる。タンパク質の非特異吸着がないことは、生体高分子を分離するための材料として極めて重要な特性であり、そのために多糖類がマトリクスとして重用されている。また、多糖類は分子内に水酸基を多く持つため、これを足場としてエーテル結合やエステル結合を介して容易にセレクタを結合することが出来、これも多糖類が重用される大きい要因となっている。

【0005】

また、生体高分子を分離精製するためには、一般的に、マトリクスに目的とする分子と何らかの親和性をもつセレクタを結合し、目的分子を吸着させた後に、何らかの方法で吸着させた目的分子を遊離させて回収する方法を用いる。多量の目的分子を得るためには、多量のセレクタを結合することができ、さらにそのセレクタと分子量の大きい生体高分子を効率よく相互作用させるために、マトリクスが、目的分子が自由に出入りできるような多孔質構造を備えていることが求められる。言い換えれば、該マトリクスをカラムに充填してサイズ排除クロマトグラフィーを行ったときに、精製したい分子とリガンドを併せたサイズよりも大きい排除限界を示すことが必要である。

30

【0006】

このようなマトリクスは、多くの場合、粒子としてカラムと呼ばれる管の中に充填して用いられる。しかし、近年注目されている新たな形態は、モノリスと呼ばれる一体の多孔質体である。これはキャピラーと呼ばれる細管や、カラムなどの容器に納めることにより、同じ用途に用いられる。比較的薄く面積の大きいモノリスは、ろ過膜として使うことも出来る。

40

【0007】

このようなマトリクスの使いやすさの要因として、分離対象に対する選択性に加えて、その物理強度の高さが挙げられる。すなわち、弾性率の低いマトリクスは、クロマトグラフィーやろ過において液体や気体を流したときに、圧縮変形や破断を被り、その結果クロマトグラフィーカラム内の液の流れが不均一になり、さらには閉塞することにより、カラムの分離効率を著しく低下させる。この点で、物理的強度の高さは重要な特性であり、この点において、セルロースは、多糖類の中でも優れた材料となっている。

【0008】

50

他にも、セルロースは、多糖の一般的な特徴としてその表面にアルコール性水酸基を持つため、化学反応によって多様な原子団を結合することが可能であること、純度の高い素材が多量に、比較的安価に入手できることなどの利点がある。

【0009】

以上の理由から、生体高分子の分離精製を主目的とする多孔質セルロース粒子が開発されている。これを製造するための方法としては、セルロースを何らかの方法で溶かした後、再生する方法が多いが、有機酸エステルを出発原料にする方法がいくつか見られる。これは、セルロースそのものを直接溶解することは、特殊な溶媒を必要としたり、溶液の粘度が非常に高いなどの難しさがあるのに対し、有機酸エステルは多くの溶媒に溶かすことができること、セルロースの有機酸エステルが、さまざまな有機酸とのさまざまな結合率、また重合度で、安定した品質の下、工業的に供給されること、また容易にエステル結合を分解し、セルロースを再生できることなどの利点を利用したものである。

10

【0010】

そのようなセルロース粒子の製造方法として、例えば特許文献1には、セルロース有機酸エステルをハロゲン化炭化水素のような有機溶媒に溶解させた溶液を、水性媒体中に分散してエステル溶液の微小液滴を形成させ、そこにアンモニウム塩などの加水分解促進剤を添加して該エステルの加水分解を行って、セルロース微小粒子を形成することが記載されている。

また、特許文献2には、セルロース脂肪酸エステルと、セルロース脂肪酸エステルのゲル化剤とを有機溶媒に溶解して溶液として、その溶液を水性媒体に攪拌添加して液滴を形成させ、さらに凝固促進剤を加えて液滴中のセルロース脂肪酸エステルをゲル粒子とし、生成した粒子からゲル化剤、凝固促進剤及び溶媒を除去することで、多孔球状粒子を製造する方法が記載されている。

20

【0011】

特許文献3には、セルロースを、パラホルムアルデヒドと、ジメチルスルホキシドの混合液に溶解し、その溶解液を分散媒体に分散させた後、凝固剤としてケイ素化合物を投入してセルロースの分散液滴をゲル化凝固して、粒状セルロースゲルを作製する方法が記載されている。

【0012】

非特許文献1には、セルロースアセテートを水溶解性の有機溶媒（アセトンとDMSOの混合溶媒）に溶解させ、これを水に分散させることで、セルロースアセテートを含む溶液が水に接触して凝固し、多孔質の粒子を形成することが記載されている。

30

【0013】

非特許文献2には、セルロースジアセテートを、DMSOに溶解させ、その後無水硫酸ナトリウムを加えて攪拌し、混合物を酸凝集浴槽（塩酸）に投入してセルロース粒子（ビーズ）を得ることが記載されている。また、ビーズの多孔性を高めるために、採取後のビーズを多量の温水に浸漬して硫酸ナトリウムを除去する手段が記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】特開昭62-277401号公報

【特許文献2】特開昭63-95237号公報

【特許文献3】特開昭57-159801号公報

40

【0015】

【非特許文献1】Chen, L. F.; Tsao, G. T. *Biotechnol. Bioeng.* 1976, 18, 1507

【非特許文献2】Bai, Y.-X.; Li, Y.-F. *Carbohydr. Polym.* 2006, 64, 402

【非特許文献3】A. J. Reuvers他, *J. Polym. Sci.*, 1986, 24, 793

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

50

特許文献1及び2の技術では、いずれの方法においても、ハロゲン化炭化水素を含む溶媒を用いており、粒子の作製の際にその溶媒の除去を気化で行うために、大きなエネルギーと、気化させた溶媒を回収するための装置が必要になる。また、特許文献2や3に記載のような凝固促進剤や凝固剤を用いた方法では、形成された液滴の中で凝固促進剤等と接触した部分で緻密なセルロース脂肪酸エステルの膜が形成されることで、いびつな粒子形になることがある。このことから、特許文献2や3に記載のように、液滴を形成させた後にゲル化を行わせる場合には、反応に偏りが生じる可能性がある。

【0017】

また、非特許文献1では、形成させたビーズをホルムアルデヒドと塩酸を用いて架橋反応を起こさせてビーズを架橋させることが記載されている。また、非特許文献2では、粒子に細孔を設けるために細孔形成剤を用いることが記されている。非特許文献1及び非特許文献1のいずれも、粒子の形成の際にその表面を処理する工程を含ませており、多孔質セルロース粒子を得るためには、表面処理に用いた物質を除去する必要がある。

10

【0018】

本発明は、原料となるセルロースアセテートを溶解した溶液について、特別なゲル化剤を用いずに多孔質セルロース媒体を作製する技術を提供することを主な課題とする。すなわち、本発明は、分離剤に応用できるような多孔質セルロース媒体の製造において、原料となるセルロースアセレートと、塩基性物質と、水を含む溶媒とを含有する均一組成物について、セルロースアセレートの脱アセチル反応を起こさせることで、系外への物質の移動を伴わずにゲル化することにより得られる多孔質セルロース媒体を作製する技術を提供

20

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明は、上記実情に鑑みてなされたものである。水を含む溶媒とセルロースアセレートを含む均一組成物が、ある温度以下になると相転移（液状 - ゲル状）を起こし、ゲル化することは、論文に報告されている（非特許文献3）。

【0020】

本発明者らは、これとは別に均一組成物として、セルロースアセレート、塩基性物質、水を含む溶媒とを含有させ、そのセルロースアセレートについて脱アセチル化を起こさせることで、非溶媒（ゲル化剤）の添加などによらず、塊状、粒子状など、目的に応じた形状のゲルを得ることができ、多孔質構造を維持し優れた特質を持ったセルロース媒体が得られることを見出した。

30

すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

【0021】

[1] セルロースアセレートと、塩基性化合物と、水を含む溶媒とを含む流動性の均一組成物を準備し、セルロースアセレートの脱アセチル反応により、当該組成物をゲル化させる工程を含む、多孔質セルロース媒体の製造方法。

[2] セルロースアセレートと、塩基性化合物と、水を含む溶媒とを含む流動性の均一組成物を、該均一組成物と混和しない分散媒体に分散させて分散液を得て、得られた分散液に含まれるセルロースアセレートの脱アセチル反応により前記組成物をゲル化させることにより前記組成物から構成されるゲル化粒子を形成させる工程を含む、球状多孔質セルロース粒子の製造方法。

40

[3] 前記工程の後に、得られたゲル化粒子を分離するための分離溶媒を、ゲル化粒子が形成された分散液に添加して、分離溶媒中にゲル化粒子を分離する工程を含む、[2]に記載の球状多孔質セルロース粒子の製造方法。

[4] 前記分離溶媒が水、メタノール、エタノール、2 - プロパノール、アセトアミド、ホルムアミド、またはこれらのうち少なくとも2種の混合物である[3]に記載の製造方法。

[5] セルロースアセレートと、塩基性化合物と、水を含む溶媒とを含む流動性の均一組成物を成型容器に入れ、セルロースアセレートの脱アセチル反応により、該成型容器内

50

で均一組成物をゲル化させる工程を含む多孔質セルロースモノリスの製造方法。

[6] 前記均一組成物における水を含む溶媒が有機溶媒を含み、該有機溶媒が、水と混和し、飽和炭化水素と混和しないものであることを特徴とする [1] ~ [5] のいずれかに記載の製造方法。

[7] 前記有機溶媒が、非プロトン性極性溶媒である、[6] に記載の製造方法。

[8] [1] に記載の製造方法を用いて得られた多孔質セルロース媒体、[2] ~ [4] のいずれかに記載の製造方法を用いて得られた球状多孔質セルロース粒子、または [5] に記載の製造方法を用いて得られた多孔質セルロースモノリスに、アフィニティータリガンドを固定化する工程を含む、吸着体の製造方法。

[9] アフィニティータリガンドが、プロテインA、プロテインG、プロテインL及びこれらの機能性変異体から選ばれる一種以上である、[8] に記載の吸着体の製造方法。

[10]

[8] または [9] に記載の吸着体と、標的物質を含む混合物とを接触させて、吸着体に固定化されたアフィニティータリガンドに標的物質を結合させる第一の工程と、吸着体のアフィニティータリガンドに結合した標的物質を分離する第二の工程を含む、標的物質の精製法。

【発明の効果】

【0022】

本発明によれば、多孔質セルロース粒子のような多孔質セルロース媒体の製造にあたり、セルロースアセテートを溶解させるためにハロゲン化炭化水素のような有機塩素系の溶媒を用いる必要がなくなるばかりでなく、セルロースアセテートを含む組成物をゲル化する際に、均一組成物において、脱アセチル化反応に伴うゲル化を利用するので、得られるセルロース媒体の細孔の大きさを均一にすることができる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明の製造方法を用いて得られた多孔質セルロース粒子（実施例1）の光学顕微鏡写真である。

【図2】本発明の製造方法を用いて得られた多孔質セルロース粒子（実施例2）の光学顕微鏡写真である。

【図3】本発明の製造方法を用いて得られた多孔質セルロース粒子（実施例2）の電子顕微鏡写真である。

【図4】本発明の製造方法を用いて得られた多孔質セルロース粒子（実施例3）の光学顕微鏡写真である。

【図5】本発明の製造方法を用いて得られた多孔質セルロース粒子（実施例3）の電子顕微鏡写真である。

【図6】本発明の製造方法を用いて得られた多孔質セルロース粒子（実施例4）の光学顕微鏡写真である。

【図7】実施例2, 3で得た多孔質セルロース粒子を用いて、標準ポリエチレンオキシドの分離を行って得た検量線を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明の多孔質セルロース媒体の製造方法は、セルロースアセテートと、塩基性物質と、水を含む溶媒とを含む均一組成物が、脱アセチル反応により、液体-ゲルの相転移を起こすものであることを利用し、前記均一組成物からなるゲルを形成させ、脱アセチル化によりセルロースに変換されたゲルを多孔質媒体とするものである。

【0025】

本発明において、脱アセチル化による液体-ゲルの相転移とは、流動性を持つ液状の組成物が、脱アセチル反応が進むに従い流動性を失う現象である。例えば温度が下がると粘度が高くなる現象は多くの均一溶液組成物に認められるが、液体からのゲル化においては、流動性は完全になくなり、多くの場合白濁する。本発明では、ゲル化を起こさせるため

10

20

30

40

50

に、塩基性物質以外の試薬等は添加せず、脱アセチル反応によりゲル化を起こさせる。

【0026】

<セルロースアセテート>

本発明で用いるセルロースアセテートは、塩基性物質と、水を含む溶媒と、当該セルロースアセテートとを含む組成物が、脱アセチル化によって相転移を起こすものであればいかなるものであってもよい。セルロースアセテートの代表的物性として、重合度と置換度を挙げることができる。

【0027】

重合度については、得られる多孔質セルロース粒子の機械的強度を高め、使用時の溶媒等への溶出を防ぐために重量平均で50以上であることが好ましい。一方、上限については入手可能なものであれば、いかなるものも使用できる。

10

【0028】

置換度は、セルロースアセテートの溶解性に強い影響を与える。置換度とは、セルロースのグルコース残基1個が有する3個の水酸基のうち、何個が置換されているかを示す数値であり、アセテートの場合には酢酸含量やアセチル基含量で表現される場合もあるが、これらは互いに換算することが出来る。一般的には、置換度が2.8~2.9付近のものがトリアセテート、2.5付近のものがジアセテートとして流通している。本発明においては、相転移を起こす組成物を与えるものであれば、いかなる置換度のものでもよい。

【0029】

20

セルロースアセテートについて、一般に流通しているものには、繊維材料などとして汎用的に用いられる、いわゆるセルロースジアセテート(中でも典型的な製品はアセチル置換度が2.5のものであり、酢酸の含量として表すと(酢化度)55%付近のもの)と、写真や液晶表示用のフィルム材料として用いられるトリアセテート(アセチル置換度が2.8~2.9のものであり、酢酸の含量として表すと(酢化度)60%付近のもの)がある。置換度が1付近のもの(モノアセテートと呼ばれるべきものであるが、一般に流通していないため、通称として確立されていない)は、水にも溶ける場合があり、極性溶媒系の選択肢が広い。このように、一般に流通していないグレードは、例えば、それより置換度の高いセルロースアセテートの溶液に計算量の塩基を加えて加溶媒分解することや、その含水酢酸溶液を硫酸などの酸触媒によって加水分解し、適当なタイミングで反応を停止する(硫酸を中和することなど)によって得ることができる。例えば、ジアセテート(二酢酸セルロース)を出発物質とし、グルコース単位当たり1.5当量の塩基を作用させて得ることができる。塩基としては、中性分子であるため多くの有機溶媒にも混和しやすく、かつ反応が速やかなヒドラジン、ヒドロキシルアミンが使いやすいが、要は原料溶液と混和する塩基であれば、水酸化物、例えば第四級アンモニウム水酸化物なども利用できる。

30

【0030】

アセチル化の程度におけるトリアセテート、ジアセテート、モノアセテートの境界は、明確に区別されていないが、本発明においては、便宜上2.7以上をトリアセテート、1.5以上2.7未満をジアセテート、0.5以上1.5未満をモノアセテートとする。

【0031】

40

<本発明における組成物>

本発明の製造方法において用いる組成物は、前述したセルロースアセテートと塩基性物質と有機溶媒と水を含む均一組成物である。均一組成物とは、塩基性物質と水を含む溶媒とセルロースアセテートとが均一に混和している状態の組成物のことである。

【0032】

本発明において、脱アセチル化による液体-ゲルの相転移とは、脱アセチル化の前は流動性を持つ液状の組成物が、脱アセチル化を行うことで流動性を失う現象である。本発明では、この組成物の組成や、含有させるセルロースアセテートの重合度や置換度を適宜調整することで、液体-ゲルの相転移が起こる脱アセチル化が起きる条件を調整することができる。

50

【0033】

前記組成物におけるセルロースアセテート、塩基性物質、水を含む溶媒の含有量は、それぞれ、セルロースアセテートの脱アセチル化を起こすものであれば、いかなるものであってもよい。

【0034】

該組成物におけるセルロースアセテートの含有量は、得られる多孔質セルロースが実用に適した細孔径と適度な硬さを有するためには、好ましくは1～20重量%であり、更に好ましくは4～15重量%であることが好ましい。

【0035】

該組成物に含有させる塩基性化合物は、アンモニア、ヒドラジン及びそれらのアルキル置換体、グアニジン類やアミジン類及びその置換体、ジアミン類、ヒドロキシルアミン、エタノールアミン等のヒドロキシアルキルアミン類、エチルアミン、プロピルアミン等のアルキルアミンのようなアミン類、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等の金属水酸化物、水酸化四級アンモニウム、金属アルコラート、ヒドロキサム酸塩などのような無機塩基を挙げることができる。

10

【0036】

該組成物における塩基性物質の含有量は、セルロースアセテートのアセチル基に対して、0.5～10モル倍である態様を挙げることができ、1～5モル倍であることが好ましい。このような比率で塩基性物質を含有させると、脱アセチル化を良好に起させることができる。

20

【0037】

本発明の多孔質セルロース媒体の製造方法では、セルロースアセテートと、塩基性化合物と、水を含む溶媒とを含む流動性の均一組成物を準備し、セルロースアセテートの脱アセチル反応により、当該組成物をゲル化させる。つまり、均一組成物におけるセルロースアセテートの脱アセチル化が進行するに従い、均一組成物がゲル化する。

【0038】

従来の方法、例えば特許文献1では、ゲル化を行った後に脱アセチル化を行っていたが、本発明では、脱アセチル化とゲル化が同時に起こる。前記均一組成物は、各成分を一度に混合してもよいが、一般にセルロース誘導体の溶解には時間がかかることが多く、完溶しないうちに部分的に脱アセチル反応が進行することは望ましくないため、あらかじめセルロースアセテートを、水を含む溶媒に溶解させた溶液を準備し、それとは別に、塩基性化合物を、水を含む溶媒に溶解させた溶液を準備し、それらの溶液を均一に混合して準備することが好ましい。なお、セルロースアセテートとして、セルロースモノアセテートを用いる場合は、水を単独（有機溶媒を含まずに）で溶媒として用いることができる。

30

【0039】

均一組成物は、その準備が完了したときから、脱アセチル反応が起こり始める。脱アセチル反応の速度は、均一組成物の温度を調整したり、塩基性化合物の種類やその濃度を調整したりすることで調整できる。

【0040】

前記組成物に含有させる水を含む溶媒については、水以外に有機溶媒を含ませる態様を挙げることができる。水と有機溶媒の比率については、当初セルロースアセテートが溶解し、反応によってゲル化を起こさせるものであれば、任意の割合を採用することができる。例えば、重量比で5：95～90：10である態様を挙げることができる。

40

【0041】

水を含む溶媒として、前記の非特許文献3に報告されているCDAに対するアセトン・水混合系、同じくジオキサン・水混合系を用いることも出来るが、これらの系に含まれる有機溶媒は、流動パラフィンにかなりの量が溶け込むことや、蒸気圧が高いことのため、分散処理の過程で温度以外の物質移動を伴う要因で、予期しないゲル化を起こしやすいなど、扱いにくい。したがって、流動パラフィンなどの非極性液体に対しても溶解性が低く、かつ蒸発による濃度変化が起きにくいものであることが望ましく、そのような属性を

50

持つ溶媒としては、ヘキサンのような飽和炭化水素に対して均一に混和しないものが好ましい。

【0042】

セルロースアセテート全般に対して溶解力が高く、且つ前記性質を備えた有機溶媒としては、非プロトン性極性溶媒といわれるものが多く該当し、DMSO、スルホラン、ジメチルスルホン、N-メチルピロリドン、N,N-ジメチルアセトアミド、N,N'-ジメチルホルムアミド、N,N'-ジメチルイミダゾリジノン、ヘキサメチルホスホロトリアミド、テトラメチルウレアなどのハロゲン含有しない溶媒から選択される一種以上が例示される。その中でも、DMSO、N-メチルピロリドン、N,N-ジメチルアセトアミドから選ばれる1種以上を用いる態様を好ましく挙げることができる。

10

【0043】

多孔質セルロース媒体の製造における取り扱いやすさにおいて好ましい脱アセチル反応を起こさせる温度は、-10~100、更に好ましくは0~70である。なお、塩基性物質として無機塩基を用いる場合、反応が必要以上に早く進まないようにするために、反応温度は-10~50の範囲で行わせる態様を挙げることができる。

【0044】

反応条件については、上記化合物が有する溶媒に対する溶解性、反応速度が異なるため、一義的に決めることはできないが、公知の方法を用いることができ、利用目的にふさわしい程度にアセチル基が除かれていればよい。

【0045】

脱アセチル化に要する時間、すなわち均一組成物がゲル化するまでの時間としては、1分~48時間、好ましくは5分間~24時間程度を挙げることができる。脱アセチル化に要する時間はできるだけ短い方が、分散液に分散させて粒子を得る場合、分散の安定性の観点から望ましい。

20

【0046】

反応終了後は、得られた多孔質セルロースに悪影響を及ぼさない溶媒で洗浄し、必要に応じて防腐剤を加える。

【0047】

<多孔質セルロース媒体の形状>

本発明の製造方法により製造される多孔質セルロース媒体は、球状粒子としてもモノリスとしても利用できる。球状粒子またはモノリスを作製する場合、上記の特定の組成物をセルロースアセテートについて脱アセチル化を起こさせ、ゲル化させる前に、形状を制御するためのプロセスが異なる。

30

【0048】

モノリスを製造するためには、任意形状を有する容器の中で前記均一組成物の相転移を起こさせるが、微粒子を製造するためには、通常、溶液状の均一組成物を、これと混和しない分散媒体の中に分散させた状態で温度変化させ、相転移を起こさせる。以下、これらの具体的な方法を簡単に説明する。

【0049】

<球状粒子>

本発明の球状多孔質セルロース粒子の製造方法としては、セルロースアセテートと、塩基性化合物と、水を含む溶媒とを含む流動性の均一組成物を、該均一組成物と混和しない分散媒体に分散させて分散液を得て、得られた分散液に含まれるセルロースアセテートの脱アセチル反応により、前記組成物をゲル化させることにより前記組成物から構成されるゲル化粒子を形成させる工程を含む態様を挙げることができる。

40

【0050】

また、前記工程の後に、得られたゲル化粒子を分離するための分離溶媒を、ゲル化粒子が形成された分散液に添加して、分離溶媒中にゲル化粒子を分離する工程を含んでもよい。

【0051】

50

本発明の球状多孔質セルロース粒子の製造方法においては、前記組成物を分散させるための分散媒体を用いる。本発明で用いることができる分散媒体としては、前記組成物中の水や有機溶媒と混和することによって前記組成物の意図しないゲル化や相転移温度の極端な変化を引き起こし、目的とする球状多孔質セルロース粒子の孔径に悪影響を与えるものでなければいかなるものであってもよい。

【0052】

前記組成物を分散させた際に、前記組成物が凝集することを防ぐために、分散媒体は、組成物の分散時にある程度の粘度を有していることが好ましい。分散媒体の粘度としては、25 において、0.2 ~ 20 Pa・s を挙げることができる。

【0053】

分散媒体は、前記組成物に含まれる水や有機溶媒と混和しないように、非極性のものであることが好ましく、例えば、流動パラフィンやワセリンのような炭素数20以上の炭化水素、シリコンオイル、フッ素化炭化水素を挙げることができる。

【0054】

ワセリンは特定の軟化温度以下にすると速やかに流動性を失う。このため、分散させたゲル化液の粒子が再凝集して塊を作りやすい場合には、まず軟化温度以上で分散液を調製し、これをまず軟化温度以下に下げ、ゲル化液滴同士が移動、接触できなくし、粒子の収率を上げる目的に、ワセリンの使用は有効である。ワセリンの軟化温度は、その種類によって異なり、適宜選択することができる。

【0055】

組成物に含有させる塩基性化合物は、上記で説明したものをを用いることができる。その含有量についても、セルロースアセテートのアセチル基に対する含有量として、上記で示した範囲を採用することができる。また、均一組成物における他の成分の含有量についても、<本発明における組成物>で示した上記範囲を用いることができる。

【0056】

本発明におけるセルロースアセテートを含む組成物は、分散媒体に分散させた後、脱アセチル化させてゲル化させるまでの間、分散状態を維持する必要がある。そのために、分散媒体に適当な分散安定剤を加えることが好ましい。

【0057】

分散安定剤は、前記組成物の分散状態の安定性を高め、組成物からなる粒子が凝集する速度を遅らせる効果があればいかなるものであってもよい。そのような分散安定剤として、グリセリン、ソルビタン、ポリグリセリン、ショ糖などの多価アルコールと高級カルボン酸とのエステル、極性基を少量含む変性シリコンなどを挙げることができ、それ以外の市販されている分散安定剤も使用することができる。

【0058】

セルロースアセテートを含む前記組成物を、前記分散媒体に分散させる方法としては、すでに色々な方法を挙げることができ、広い範囲の粒子径分布を与えるものから単分散の粒子径を与えるものなど、様々である。例えば、一般的にマイクロリアクターと称されるものを用い、液状の分散媒体を適当な速度で流す中に、より細かいノズルからゲル化した均一組成物を注入する方法は、粒子径がそろったものを作るのに適している。

【0059】

また、孔径の一定な膜から本発明の流動性の均一組成物を分散媒体中に押し出す方法、一定の大きさの孔を開けた内筒に、本発明の流動性の均一組成物を入れ、これを分散媒体中で回転させ、ゲル化した均一組成物を遠心力で押し出す方法、一定の大きさのビーズを充填したカラムの中に、必要に応じて分散安定剤を含む分散媒体と流動性の均一組成物を送液する方法、流動性の均一組成物を、振動ノズルを通して分散媒体中に注入する方法、(超)音波を用いる方法など、さまざまな方法を用いることができる。

【0060】

実施例においては、さまざまな粒子径の混合物を与えるが、もっとも簡単な攪拌による方法を例示する。これは、前記均一組成物を前記分散媒体に添加した後、前記組成物から

10

20

30

40

50

構成される概ね球状の粒子を生成させるとともに、分散液滴となった均一組成物の脱アセチル化を起こさせ、ゲル化させるものである。攪拌混合の条件は、目的とする平均粒子径に応じて適宜選ばばよい。

【0061】

分散媒体中で分散させた組成物は、1～48時間、好ましくは10～30時間程度放置して、均一組成物から構成される粒子中で脱アセチル反応を進行させる態様を挙げることができる。

【0062】

なお、セルロースアセテートを含む前記組成物を前記分散媒体に添加する際の、前記分散媒体の温度については、前記組成物が液状を保つ温度にする態様を挙げることができる。具体的には、分散媒体の温度を50～80程度に設定する態様を挙げることができる。分散媒体をそのような温度に設定することで、前記組成物の攪拌混合が容易になる。前記均一組成物が流動性を保っている状態で、前記均一組成物を分散媒体に添加し、分散することが好ましい。

【0063】

<分離溶媒>

この後のプロセスは特に限定されるものではないが、本発明の実施例においては、分散媒体からゲル化したセルロース粒子を取り出すために分離溶媒を用いる態様を挙げることができる。例えば、ゲル化された前記組成物から構成される粒子のうち、セルロース粒子のみを分散媒体からゲル状粒子として分離させるために、分離溶媒を前記組成物が分散された分散媒体に添加する態様を挙げることができる。

【0064】

分離溶媒としては、分散媒体とは混和せず、ゲル化した前記組成物のうち、セルロースは溶解しないが、水および該組成物中に含まれてもよい有機溶媒とは混和するものを用いる。これにより、ゲル化した前記組成物のうち、セルロースがふたたび溶解することを防ぐことができる。

【0065】

このような分離溶媒としては、水、メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトアミド、ホルムアミド、またはこれらの混合物を挙げることができる。これらの中でも、取扱いの容易さから、水を用いる態様を挙げることができる。

【0066】

分散媒体中に分散した状態のセルロースのゲル粒子を直接ろ別することも出来るが、一般に分散媒体は粘度が高いため、ろ過において圧力がかかり、ゲル粒子を変形あるいは破壊する危険性が高くなる。分散媒体にこれと混和する低粘度の液体を加えることによつて過時の圧力を下げることが可能である。

【0067】

得られた多孔質セルロース粒子は、水やエタノールなどを用いた適当な方法で洗浄し、通常水湿の状態での保存する。乾燥させる場合には糖類、グリセリンなどを適量加える。水湿で長期保存する場合には腐敗を防ぐためにアルコールやアジ化ナトリウムなどの防腐剤を加える。また、グリセリンや糖類、尿素などを加えた状態で乾燥することもできる。使用する際には、常法によってカラムに充填して用いる。

【0068】

本発明の製造方法により得られた多孔質セルロース粒子のうち、公知の適当な分級により、粒径(最大径)30～300μmの略球状～球状の形状を有するものを選別して、それをクロマトグラフィー用の充填剤として用いることができる。クロマトグラフィーとしては、サイズ排除クロマトグラフィーを挙げることができる。

【0069】

サイズ排除クロマトグラフィーに利用できることは、とりもなおさず、適当なりガンドを結合することによって、サイズ排除以外のさまざまなモードによるクロマトグラフィー分離にも利用できることを示す。これらには、イオン交換、疎水性、アフィニティーなど

10

20

30

40

50

のモードが含まれる。

【0070】

一般に、バイオテクノロジーで製造するような高分子、例えばホルモン、酵素、抗体医薬などを分離精製するには、それらの物質が十分進入できるような大きさの細孔を持つマトリクスが好ましい。すなわち、該粒子を充填したカラムを用い、水を移動相としてゲルろ過クロマトグラフィーを行うと、ポリエチレングリコールの分子量に換算して概ね $10^3 \sim 10^7$ の範囲の何らかの分子量領域で分画が起きることが期待できる。

【0071】

実施例1のGPCにおいて、分子量 $10^4 \sim 10^6$ の標準物質（ポリエチレングリコール）が異なった時間に溶出することは、本法によって作ることができるマトリクスの細孔径が、それら物質の分離精製に好適なものであることを示している。細孔の大きさは、ゲル化させる水を含む溶媒、セルロースアセテートを含む組成物中のセルロースアセテートの濃度を変えたり、ゲル化の条件（例えば、均一組成物の冷却速度の調整など）によって、微調整することができる。

【0072】

以下、アフィニティーのモードで用いる吸着体を作製する方法について説明する。アフィニティーリガンドとしては、タンパク質を用いることができる。本発明で用いることのできるタンパク質は、分子量 $3 \sim 300 \text{ kDa}$ 、好ましくは $30 \sim 150 \text{ kDa}$ であって、分離対象とする例えば抗体のようなタンパク質に対して親和性のある物質が挙げられる。これらの中でも、アフィニティーリガンドとしてプロテインA、プロテインG、プロテインL及びこれらの機能性変異体が抗体のタンパク質の分離に用いる際の選択率が高く好ましい。

【0073】

抗体の分離を主目的とする場合、リガンドとしては、免疫グロブリンの一部と特異的に結合可能なものが好ましい。上記機能性変異体は、天然アミノ酸配列において少なくとも1つの変性を有し、天然配列に伴われている少なくとも1つの機能をなお維持しているタンパク質を指す。天然配列には、本来自然に発生するアミノ酸配列が含まれる。アミノ酸の変化としては、1つ以上のアミノ酸の別のアミノ酸への置換、1つ以上のアミノ酸の削除および/または1つ以上のアミノ酸の追加またはこれらのいずれかの組合せを挙げることができる。天然配列に対して行われる追加、削除および置換の組合せのような態様も挙げられる。機能性変異体は、タンパク質の断片またはドメインを含むこともできる。機能性変異体のアミノ酸配列は、天然アミノ酸配列と少なくとも70%同一、少なくとも75%同一、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一であってもよく、天然配列に伴われている少なくとも1つの機能をなお維持している。

【0074】

上記多孔質セルロース粒子に対するタンパク質の担持量は、多孔質セルロース粒子100重量部に対して1.0~25重量部であることが好ましい。また、多孔質セルロース粒子の体積1mlあたり、1~50mgである態様を挙げることができる。

【0075】

本発明の製造方法で作製された多孔質セルロース媒体を製造する方法において、前記のアフィニティーリガンドを固定化する工程をさらに含ませることで、アフィニティーリガンドが結合した吸着体を作製することができる。この吸着体は、アフィニティークロマトグラフィー用の分離剤としても利用することができる。

【0076】

その製造工程としては、以下のような態様を挙げることができる。まず、前記の製造方法で製造された多孔質セルロース粒子について、架橋剤を用いて架橋反応を起こさせる工程を含んでもよい。架橋方法については特に制限されることはなく、例えば、エピクロロヒドリン、エピプロモヒドリン、ジクロロヒドリン等のハロヒドリンやビスオキシランやポリオキシランのような架橋剤を用いることができる。

10

20

30

40

50

【0077】

次に、架橋させたセルロース粒子について、活性化させる工程を含んでもよい。例えば、公知の反応性官能基を導入することにより、架橋させたセルロース粒子を活性化することができる。例えば、臭化シアン(CNBr)、N,N'-ジスクシイミジル炭酸エステル(DSC)、エポキシド及び活性化カルボン酸(NHSエステル)などで活性化することで、多孔質セルロース粒子が元々持っている官能基よりも、リガンドとして固定化する化合物が反応しやすい官能基に変えることができる。そして、その後、リガンドとして固定化する化合物と反応させて、リガンドと多孔質セルロース粒子を固定化する工程を経て、吸着体を製造する方法を挙げることができる。

【0078】

上記とは別に、吸着体の製造方法として、多孔質セルロース粒子とリガンドとして固定化する化合物が存在する系にカルボジイミドのような縮合試薬、または、グルタルアルデヒドのように分子中に複数の官能基を持つ試薬を加えて縮合、架橋することで、多孔質セルロース粒子とリガンドを固定化し、吸着体を得る方法が挙げられる。

【0079】

多孔質セルロース粒子とアフィニティリガンドとを結合させる別の態様として、セルロース、セルロース粒子にホルミル基を導入して、そのホルミル基とタンパク質のアミノ基とを反応させる態様を挙げることができる。ホルミル基を導入する反応については、例えば、ピシナルの水酸基を持つ多糖類を、過ヨウ素酸化法によって酸化し、糖鎖上にホルミル基を生成させる方法を挙げることができる。

【0080】

また、エポキシ基の開環により得られるグリセリル基に、過ヨウ素酸塩を作用させる方法等により得られる各種スペーサーを介して、ホルミル基を導入する方法が挙げられる。例えば、スペーサーとしてグルコサミン等のようなアミノ糖を用いることができる。

【0081】

そして、多孔質セルロース粒子のホルミル基と、プロテインAのようなタンパク質を結合させる方法としては、公知の方法を用いることができ、例えば、グルコサミン等のようなアミノ糖をスペーサーとして導入された多孔質セルロース粒子と、プロテインAを含有する溶液とを反応させる態様を挙げることができる。そのような方法として例えば、特開2008-279366号公報に記載の方法を挙げることができる。

【0082】

<モノリス>

モノリスは、多孔質素材を一体の塊としたものである。前記の粒子状充填剤を用いたクロマトグラフィーにおいては、展開液は粒子の微細孔をも通過するが、より多く粒子間空隙を通過する。これに対しモノリスにおいては一体の多孔質体の微細孔を通過させる。したがって、一般的に粒子状充填剤の場合に比べて固形分含量を低めにして、展開液の流れに対する抵抗を減らすようにする場合が多いが、ろ過材料として用いる場合を除けば本質的な分離のメカニズムは充填剤の場合とまったく変わらない。

【0083】

本発明の多孔質セルロースモノリスの製造方法は、セルロースアセテートと、塩基性化合物と、水を含む溶媒とを含む流動性の均一組成物を成型容器に入れ、脱アセチル反応により、該成型容器内で均一組成物をゲル化させる工程を含む。この方法で用いるセルロースアセテート、塩基性化合物、水を含む溶媒は、球状粒子の作製に用いるものと同じものを使用できる。また、均一組成物における、各成分の含有量についても、球状粒子の作製に用いる条件と同じ条件を用いることができる。

【0084】

液体クロマトグラフィーにおいては、分離剤の中のどの部分においても同様な速さで展開液が移動し、いわゆるピストン流を作ることが極めて重要である。充填剤においては、個々の粒子の特性のばらつきが混合によって平均化されるため、多少の粒子間の性質の違いは許容され、しかし液の流れの大きい部分を担う粒子間空隙の均一性が重要となる。こ

10

20

30

40

50

れには、充填剤をカラムと呼ばれる容器に充填する際の技術が重要となる。

【0085】

これに対してモノリスにおいては、生成する多孔質構造が、展開液の流れに対して直角の方向において均一であることと、モノリスと容器の間に液が流れやすい隙間ができないことが、きわめて重要である。ここで述べた直角方向において均一な多孔質体の調製は、ゲル化剤（沈殿剤）との接触や、公知技術である溶媒の蒸発によって行うことはできない。

【0086】

本発明のセルロースアセテートの脱アセチル反応によるゲル化を用いる方法は、ゲル化速度に比べて原料組成物の温度の均一化が速ければ、均一なゲルを与えることができるため、モノリスを調製するには好適である。

10

【0087】

モノリスを作製する際には、前記した塩基性化合物、水を含む溶媒及びセルロースアセテートを含む均一組成物を、任意形状の成型容器に投入し、その後、温度0～100程度で10分間～48時間、好ましくは1～24時間程度放置することで、セルロースアセテートの脱アセチル反応を起こさせて、その組成物からなるゲルを形成させ、これをそのまま、あるいは型から外した後に、適切な溶媒によって洗浄し、分離剤として用いることができる。一般に乾燥は、モノリスの形状の変形を起こしたり、微細孔構造を失わせる場合があるため、これを避けるが、適切な不揮発性添加剤を共存させれば可能となる。この不揮発性添加剤としては、グリセリン、蔗糖、トレハロース、水あめなどの糖や糖アルコール、各種アミド、DMSOなどの極性化合物が適している。

20

【0088】

調製したモノリスを評価するには、すでに述べたように、適切な容器に隙間や局所的な圧密化がないように納める必要がある。このための方法は、公知のどのようなものであってもよい。通常、ゲル化によってモノリスが生成するときには、多少の収縮が起こり、容器との間に隙間ができることが多い。そのような場合、容器壁面をセルロース系物質と親和性の強い化学構造に修飾し（例えば表面にセルロースを結合する）、隙間ができないようにするか、あるいはゲルの環境変化による収縮・膨潤を利用し、あるいは容器のサイズを適合可能（アジャスタブル）にすることなどによって、隙間なく納めることが可能になる。

30

【0089】

また、調製したモノリスは、前述した球状粒子の場合と同様に、アフィニティーリガンドを結合させることで、アフィニティークロマトグラフィー用の分離剤や吸着体として利用することもできる。モノリスに結合できるアフィニティーリガンドは、球状粒子の場合と同様であり、アフィニティーリガンドの結合方法についても、球状粒子の場合と同じ方法を用いることができる。

【0090】

<本発明の多孔質セルロース媒体をアフィニティーモードで用いて行う精製法>

上記で説明した、本発明の製造方法により作製された多孔質セルロース媒体に、アフィニティーリガンドを結合させて得られた吸着体を用いることで、様々な標的分子を生成する方法を提供することができる。

40

【0091】

標的分子としては、例えば免疫グロブリンのようなタンパク質を挙げるができる。免疫グロブリンとしては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびその機能的断片を挙げるができる。

【0092】

本発明の精製法は、以下のような工程を含む。本発明の製造方法により作製された多孔質セルロース媒体にアフィニティーリガンドを結合させて得られた吸着体と、標的物質を含む混合物とを接触させて、アフィニティーリガンドに標的物質を結合させる第一の工程と、吸着体のアフィニティーリガンドに結合した標的物質を分離する第二の工程を含む。

50

【0093】

吸着体のアフィニティーリガンドに結合した標的物質を分離する方法としては、第一の工程と第二の工程との間で、pHを変化させることや、塩濃度を変化させることが挙げられる。具体的には、第一の工程のpHを6～8のような中性に設定し、第二の工程の6未満のような酸性に設定することが挙げられる。また、塩濃度については、第一の工程で0.1M未満とし、第二の工程では0.1M以上としたり、第一の工程で0.1M以上としていたものを、第二の工程で0.1M未満にすることを挙げることができる。

【実施例】

【0094】

以下に、実施例をあげて、本発明について更に詳細に説明を加えるが、本発明の範囲がかかる実施例にのみ限定されないことはいうまでもない。

【0095】

<実験例>

脱アセチル反応によるゲル化の確認

VTRセルロースジアセテート(酢化度 54.75%、6%アセトン溶液粘度0.117 Pa·s(25)) 15.5gをDMSO 174.4gに溶解した。上記のセルロースジアセテートのDMSO溶液 30.0gを60 に保ちながら、ヒドラジーン水和物 2.0gと水 2.1g、DMSO 6.4gの混合溶液を加えよく混合した。この一部を40 で加温して12時間後、ゲル化しているのを確認した。

【0096】

<実施例1：多孔質セルロース粒子の調製>

白色ワセリン(和光純薬(株)製 和光一級)360g、乳化剤TSG10(日本エマルジョン製)0.63gをセパラブルフラスコに入れ、オイルバスで70 に保ち溶解した。上記セルロースアセテートのDMSO溶液 30.0gを60 に保ちながら、ヒドラジーン水和物 2.0gと水 2.1g、DMSO 6.4gの混合溶液を加えよく混合した。上記セルロースジアセテート溶液を上記のセパラブルフラスコに加え、直径4cmのディスペンサーを用い、約600rpmで5分間攪拌した。得られた分散液を氷浴で40 まで冷却し分散液を固化させ、40 で24時間静置し脱アセチル化してゲル化させた。分散液に水300mLを加え、70 に加温して分散液が溶解後、ゆっくりと攪拌して微粒子を抽出分液した。水相を分液後、再度水300mLを加えゆっくりと攪拌して抽出分液した。抽出した水相をガラスフィルターでろ過し、エタノール及び水で繰り返し洗浄した。得られた粒子を顕微鏡で確認した写真を図1に示すが、ほぼ真球に近い形状であることが判る。

【0097】

<実施例2：多孔質セルロース粒子の調製>

白色ワセリン(和光純薬(株)製 和光一級)733g、乳化剤TSG10(日本エマルジョン製)1.1gをセパラブルフラスコに入れ、オイルバスで70 に保ち溶解した。実施例1で調製したセルロースジアセテートのDMSO溶液 60.1gを60 に保ちながら、ヒドラジーン水和物 3.8gと水 8.8g、DMSO 26.9gの混合溶液を加えよく混合した。この混合溶液を上記のセパラブルフラスコに加え、直径80mmのディスペンサーを挿入し、約400rpmで5分間攪拌した。得られた分散液を氷浴で40 まで冷却し分散液を固化させ、40 で24時間静置し脱アセチル化してゲル化させた。分散液に水300mLを加え、70 に加温して分散液が溶解後、ゆっくりと攪拌して微粒子を抽出分液した。水相を分液後、再度水200mLを加えゆっくりと攪拌して抽出分液した。抽出した水相をガラスフィルターでろ過し、エタノール及び水で繰り返し洗浄した。得られた粒子の顕微鏡写真を図2に示した。得られた粒子の一部を30%エタノール、50%エタノール、70%エタノール、90%エタノール、エタノールで置換し、さらにt-ブチルアルコール/エタノール5/5、7/3、9/1、10/0の混合液で置換した後、凍結乾燥処理した。凍結乾燥した粒子を電子顕微鏡写真で確認すると、多孔質の表面が認められた(図3)。

【0098】

<実施例3：多孔質セルロース粒子の調製>

VTRセルロースジアセテート(酢化度 54.75%、6%アセトン溶液粘度0.117 Pa·s(25)) 15.3gをDMSO 172.4gに溶解した。

【0099】

白色ワセリン(和光純薬(株)製 和光一級)733g、乳化剤TSG10(日本エマルジョン製)1.4gをセパラブルフラスコに入れ、オイルバスで70℃に保ち溶解した。上記セルロースジアセテートのDMSO溶液60.6gを60℃に保ちながら、ヒドラジン-水和物9.1gと水13.3g、DMSO40.7gの混合溶液を加えよく混合した。この混合溶液を上記のセパラブルフラスコに加え、直径80mmのディスペーサを挿入し、約325rpmで5分間攪拌した。得られた分散液を氷浴で40℃まで冷却し分散液を固化させ、40℃で24時間静置し脱アセチル化してゲル化させた。分散液に水300mLを加え、70℃に加温して分散液が溶解後、ゆっくりと攪拌して微粒子を抽出分液した。水相を分液後、再度水200mLを加えゆっくりと攪拌して抽出分液した。抽出した水相をガラスフィルターでろ過し、エタノール及び水で繰り返し洗浄した。得られたセルロース粒子を水分散したままでステンレス製ふるい150μm、106μm、53μmによって分級した。53μm~106μmの部分の粒子をコンゴレッドで染色した顕微鏡写真を図4に示した。凍結乾燥した粒子の電子顕微鏡写真を図5に示したように多孔質のセルロース粒子を確認した。

10

【0100】

<実施例4：セルロースモノアセテートを用いたセルロース粒子の作製>

(1)セルロースモノアセテートの合成

酢酸セルロース(株式会社ダイセル製 商品名「L-50」、アセチル総置換度：2.43、6%粘度：110mPa·s)1重量部に対して、5.1重量部の酢酸および2.0重量部の水を加え、混合物を3時間攪拌して溶解した。この溶液に0.13重量部の硫酸を加え、得られた溶液を70℃に保持し、加水分解を行った。1時間後に0.67重量部の水を5分間にわたって加え、さらに2時間後、1.33重量部の水を10分にわたって加え、さらに6時間、反応を継続した。この後、反応液を25℃に冷却、15重量部のアセトン-メタノール等容混合液を加えて沈殿を生成させ、これをろ布を用いて遠心脱液した。得られた固形分約15重量%の溶媒含有ケーキに、原料酢酸セルロースに対し14重量部相当の水を加え、攪拌し、沈殿を溶解した。得られた溶液の4倍重量に当るメタノールを溶液に加えると、再び沈殿が生じ、これを脱液回収した。さらに水を加えて溶解、メタノールを加えて沈殿、脱液回収する操作を2回繰り返した。得られた溶媒含有沈殿物を、その8重量部にあたる0.004%炭酸カリウム含有メタノールに分散、脱液回収する操作を2回繰り返した後、50℃で真空乾燥し、原料となるセルロースモノアセテートを得た。

20

30

【0101】

(2)多孔質セルロース粒子の調製

上記で得られたセルロースモノアセテート2.0gを水11.3gに溶解した。

流動パラフィン(関東化学株式会社製 鹿1級)132g、乳化剤SPAN80(東京化成製)0.67gをセパラブルフラスコに入れ、氷浴で冷やしながらか混合した。氷浴で5~10℃に冷却した上記セルロースモノアセテート水溶液11.7g及び4重量%水酸化ナトリウム水溶液6.7gをよく混合し、速やかにこの混合溶液を上記のセパラブルフラスコに加え、直径40mmのディスペーサを挿入し、約350rpmで2分間攪拌した。得られた分散液を10分間静置して脱アセチル化してゲル化させた。分散液に水100mLを加え、25℃に加温し、ゆっくりと3時間攪拌して微粒子を抽出分液した。水相を分液後、再度水100mLを加えゆっくりと攪拌して抽出分液した。抽出した水相に、少量の水酸化カリウムを添加してゆっくりと拡販した後一晩静置した。酢酸を添加して中和し、25μmの篩を通過させた後、ガラスフィルターでろ過し、エタノール及び水で繰り返し洗浄した。得られたセルロース粒子を水分散したままでステンレス製ふるい150μm

40

50

、106 μm、53 μmによって分級した。53 μm ~ 106 μmの部分の粒子をコンゴールレッドで染色した顕微鏡写真を図6に示した。

【0102】

<実施例5>

サイズ排除クロマトグラフィー

実施例2及び3で作製したセルロース粒子を水分散したままでステンレス製ふるい150 μm、106 μm、53 μmによって分級した。53 μm ~ 106 μmの部分約7 mLを内径10 mm、高さ100 mmのカラムに充填し、下記の要領で、超純水を移動相とし、表1に示す標準ポリエチレンオキシドのサンプルを注入し、示差屈折検出器により検出した。常法に従って描いた検量線を図7に示す。

10

【0103】

使用カラム HR10/100 (GEヘルスケア)

Tricorn10/100 (GEヘルスケア)

流量 0.10ml/min

溶離液 超純水(脱気)

標準物質 TSKgel 標準ポリエチレンオキシド((株)東ソーより購入)

各試料を超純水で2 mg/mLに希釈した。

【0104】

【表1】

サンプル	Da
SE-150	940000
SE-70	610000
SE-30	240000
SE-15	120000
SE-8	92000
SE-5	37000
SE-2	13000

20

各標準物質の分配係数(Kav)を次式で算出した。

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

Veはサンプルの保持容量(mL)、Vtは空カラム体積(mL)、V0はSE-150の保持容量(mL)

30

【0105】

<実施例6>

(1) 架橋多孔質セルロース粒子の調製

100 mL三口フラスコに、実施例3で得られた多孔質セルロース粒子10 mL、硫酸ナトリウム 10.6 gを水28.8 gに溶解した液を加え、50 で攪拌した。45重量%水酸化ナトリウム水溶液0.37 gと水素化ホウ素ナトリウム60 mgを加え、攪拌した。45重量%水酸化ナトリウム水溶液5.42 gとエピクロロヒドリン5.55 gとをそれぞれ10等分した量を30分おきにおよそ5時間かけて添加した。添加終了後、50 で19時間反応させた。40 以下に冷却した後、酢酸0.62 gを加え、中和した。反応混合物をろ過して粒子を回収し、純水でろ過洗浄し、目的の架橋多孔質セルロース粒子を得た。

40

【0106】

(2) 架橋多孔質セルロース粒子へのプロテインA固定化とカラム作製

(1)で得られた架橋多孔質セルロース粒子をグラスフィルターでろ別し、アセトニトリルで洗浄して、担体3.3 mLを得た。フラスコに担体を移液し、アセトニトリル2.5 mLと炭酸ジ(N-スクシンイミジル) [N,N'-Disuccinimidyl carbonate] 5.5 mgを含むアセトニトリル溶液10 mLを加え、4、180 rpmで振とうした。次いでN,N-ジメチルアミノピリジン40 mgを含むアセトニトリル溶液1 mLを加え18時間振とうして反応させた。グラスフィルターでろ別して、アセトニトリル30 mL、5%酢酸を含むジオキサン30 mL、メタノール30 mL、2-プロパノール30 mLの順に洗浄して

50

活性化担体を得た。活性化担体 1 mL をガラスフィルターに採取してカップリング緩衝液 (0.1 M リン酸ナトリウム、pH 7.0) で洗浄した。活性化担体をフラスコに移し、プロテイン A (rSPA、Repligen) が 53.6 mg/mL のプロテイン A 含有溶液を 168 μ L、カップリング緩衝液を 2 mL 加え、5、130 rpm で 22 時間振とうして固定化した。ガラスフィルターで別し、カップリング緩衝液で洗浄した。反応後のろ液を Bradford 法で測定した結果、プロテイン A が担体 1 mL あたり 9.0 mg 固定化されていることがわかった。次いでフラスコに担体に移し、1 M トリス塩酸 (pH 8) 2 mL を加え、25、130 rpm で 2 時間振とうして未反応活性基をマスクした。ガラスフィルターで別し、洗浄液 1 (0.1 M トリス塩酸、0.5 M 塩化ナトリウム、pH 8.0)、洗浄液 2 (0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液、0.5 M 塩化ナトリウム、pH 4.0) を交互に 3 サイクル洗浄した。固定化担体 1 mL を純水で洗浄し、Tricorn 5/50 Column にパッキングした。また Sepharose 4FastFlow (GE Healthcare) も同様の操作でカラムを作製した (プロテイン A 固定化量 10mg/mL-gel)。

10

【0107】

(3) プロテイン A 固定化カラムの抗体吸着容量

(2) で作製したプロテイン A 固定化カラムを液体クロマトグラフィー装置 AKTA explore (GE Healthcare Bioscience) にセットし、吸着緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2) を 1 mL/min. もしくは 0.4 mL/min. の条件で流し平衡化させた後、1 mg/mL に調製したヒト血清由来 γ -globulin (和光純薬) を注入した。溶出液の 280 nm における吸光度の 15% に到達するまで注入を続けた後、吸着緩衝液で洗浄後、吸着緩衝液を 20 mM クエン酸 (pH 2.4) へ置換し吸着成分を溶出した。

20

動的吸着容量 (DBC) は、溶出液の 280 nm における非吸着成分を除いた吸光度が注入サンプルの吸光度の 10% に到達するまでに注入されたサンプル量から計算された。各固定化カラムの DBC を表 2 に示した。

【0108】

【表 2】

流速	プロテイン A 固定化 架橋多孔質セルロース粒子	プロテイン A 固定化 Sepharose 4FastFlow
1.0mL/min.	13mg	8mg
0.4mL/min.	23mg	22mg

30

【産業上の利用可能性】

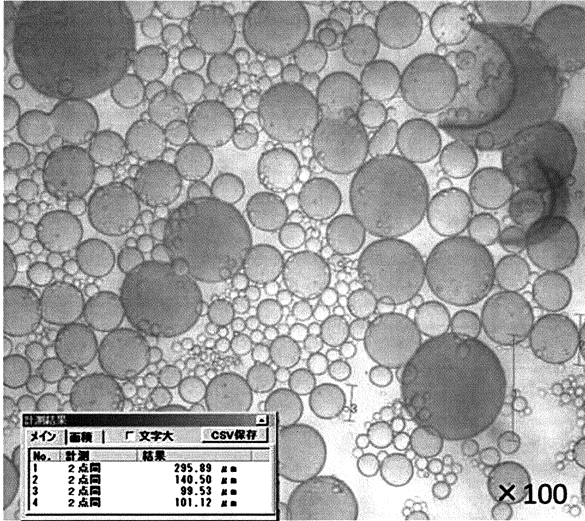
【0109】

本発明の製造方法では、セルロースアセテートを含む特定の組成物が脱アセチル反応によりゲル化が起こる性質を利用して多孔質セルロースアセテート媒体の製造を行う。

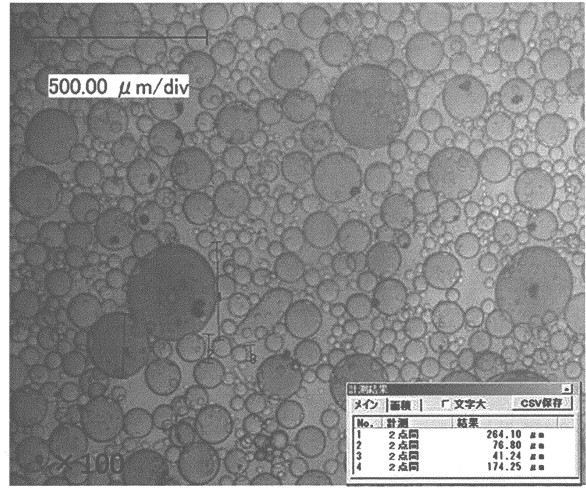
これにより、セルロースアセテートのゲル化の過程において、細孔の大きさが均一になる。このことは、従来の多孔質セルロース媒体の製造方法において、細孔の形成の過程で溶媒の蒸発を起こさせ、物質の移動を生じさせる態様とは異なる。また、本発明の製造方法によれば、得られる多孔質セルロース媒体の細孔の大きさは数千程度の大きなものとなる。本発明の製造方法により得られた多孔質セルロース媒体の硬度は、従来から存在する市販品と同程度である。本発明の製造方法により得られた多孔質媒体は、その形状が球状粒子であっても、モノリスであっても、吸着体や分離剤として有用である。特に、アフィニティリガンドを結合した吸着体は、様々な標的物質の分離に用いることができる。

40

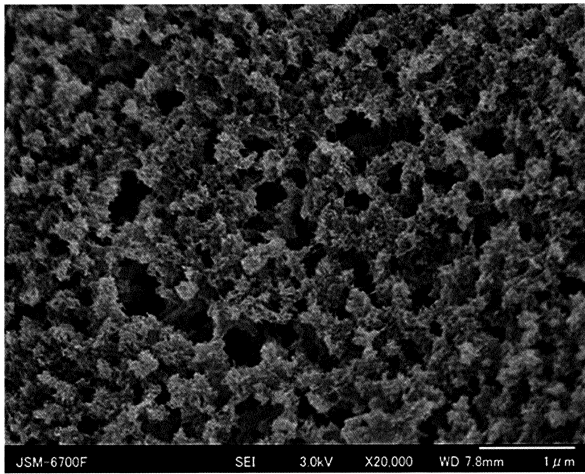
【 図 1 】



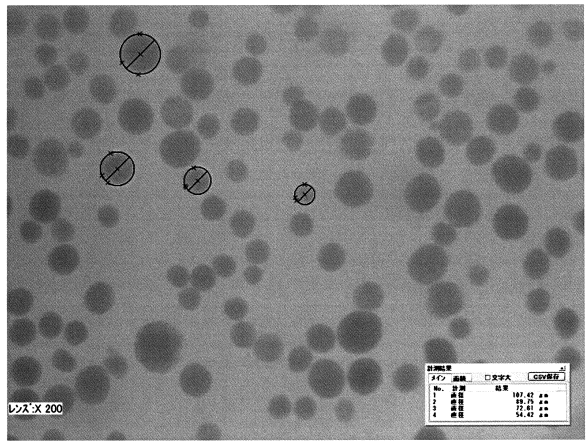
【 図 2 】



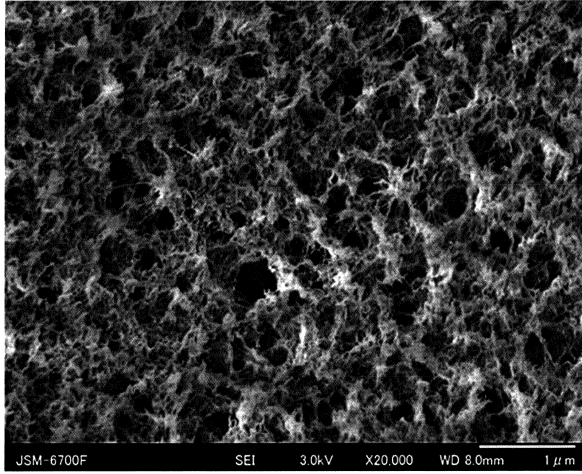
【 図 3 】



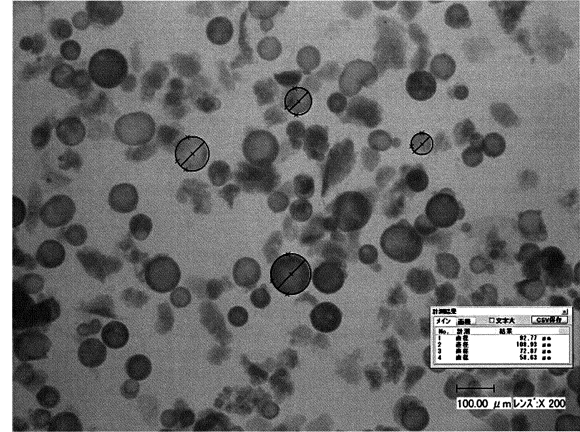
【 図 4 】



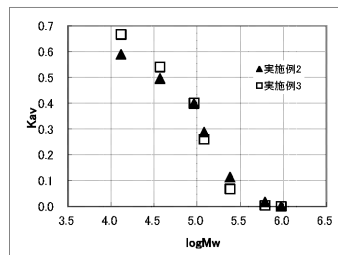
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(72)発明者 西原 啓二
新潟県妙高市新工町1番1号 株式会社ダイセル内

審査官 伊藤 幸司

(56)参考文献 特開昭62-277401(JP,A)
国際公開第2015/046473(WO,A1)
国際公開第2016/013568(WO,A1)
特開昭52-129788(JP,A)
特開昭57-038801(JP,A)
REUVERS, A. J. et al., Demixing and Gelation Behavior of Ternary Cellulose Acetate Solutions, Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics, 1986年, 24, pp.793-804

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B

C07K

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY(STN)