

明 細 書

発明の名称：多孔質セルロースビーズの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、多孔質セルロースビーズを製造するための方法に関する。

背景技術

[0002] 多孔質セルロースビーズは、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、多糖類でありながら機械的強度が大きく、また、吸着すべき目的物質と相互作用するリガンドを導入するのに利用できる水酸基を多く含有する等の利点から、各種吸着体として用いられている。例えば各種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、または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（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）。一方、免疫グロブリン（IgG）を特異的に吸着、溶出できる吸着体として、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（抗体医薬品精製用吸着体）が注目されている。

[0003] このような多孔質セルロースビーズの製造は、セルロースの溶解が困難であるとされていたことから、通常の合成ポリマーと比べて煩雑な工程を含むものが多い。その一つとして、チオシアン酸カルシウム水溶液などの腐食性、毒性が高く、設備化の難易度を高くしてしまう溶媒に溶解し、凝固する方法が開示されている（例えば特許文献1）。この方法で用いられるセルロース溶液が特異な挙動を示し、また、この方法で得られる多孔質セルロースビーズは、かなり大きい細孔を有することが知られている（例えば非特許文献3）。よって、当該方法で得られた多孔質セルロースビーズを抗体などの吸着体として用いる場合、比表面積が小さいことから、高い吸着性能を示すこ

とは期待できない。一方、セルロースの溶解性を上げるためにセルロースの水酸基に置換基を付与し、汎用の溶媒に溶解させて造粒を行い、造粒後に置換基を脱離させて多孔質セルロース系担体を得る方法が例示されている（例えば特許文献2）が、工程が煩雑であり、置換基を付与したり脱離させたりする過程で分子量の低下が起こり、近年求められている高速処理や大スケールで使用するのに適切な強度が得られ難い傾向がある。

[0004] また、セルロースを容易に溶解できる溶媒としてイオン液体が注目されており、非特許文献4においては、イオン液体にセルロースを溶解してセルロースビーズを得る方法が開示されている。しかしながら、イオン液体はかなり高価であり、産業レベルで副原料として使用するには不適であるし、微量とはいえ残留するであろうイオン液体の安全性については、毒性データ等が少なく、医療用や医薬品精製の吸着体製造用として使用する場合は、安全性確認の検討を相当要することが予想される。

[0005] また、低温の水酸化ナトリウム水溶液のみにセルロースを溶解できるという方法が開示されている（例えば特許文献3、4）。しかしながら、特許文献3に記載の方法では、セルロースと水素結合切断剤（a hydrogen bond-cleaving solution）の混合物を、加圧下、100～350℃で加熱する工程を経てから、アルカリ水溶液に溶解している。このような工程は、工業的に不利である。また、特許文献4に記載の方法では、セルロースを強塩基溶液に分散させ、当該分散液をいったん凍結させた後に溶解するという工程が必要である。

[0006] さらに、特許文献5にはアルカリ溶液に溶解性を示すセルロースが開示されているが、当該セルロースはミクロフィブリルの繊維径が1 μm 以下、さらには500 nm以下に微細化されたものである。このような微細化処理は、工業的製造には適さない。

[0007] ごく最近、特許文献6に示されるように、微生物セルロースを特許文献4に記載の方法にて溶解して溶液を作製し、該溶液を凍結させる工程を介してセルロースビーズを得る方法が開示されているが、工程が煩雑で工業的な製

法には適していない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特表2009-242770号公報

特許文献2：国際公開WO2006/025371

特許文献3：米国特許4634470号公報

特許文献4：米国特許5410034号公報

特許文献5：特開平9-124702号公報

特許文献6：特開2010-236975号公報

非特許文献

[0009] 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

非特許文献3：Journal of Chromatography, 195 (1980) 221-230

非特許文献3：Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 1298-1304

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、毒性、腐食性が高い副原料を使わず、工業的に不利である煩雑な工程を経ることなく、機械的強度が高い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。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。詳しくは、従来、多孔質セルロースビーズの製造においては、まず、毒性の低い安価な溶媒

に溶解し難いセルロースをいかに溶解するかが問題となっていた。本発明者らも、当初、セルロースを上記のような溶媒へ簡便に溶解する条件につき研究していた。ところが、本発明者らは、セルロース溶液を用いることなく、セルロースの分散液からでも多孔質セルロースビーズを良好に製造できることを見出して、本発明を完成した。

[0012] 本発明に係る多孔質セルロースビーズの製造方法は、低温のアルカリ水溶液とセルロースとを混合して作製したセルロース分散液を、凝固溶媒に接触させることを特徴とする。

[0013] 前記アルカリ水溶液のアルカリ濃度としては、5～15重量%が好ましい。この範囲であれば、セルロースのアルカリ水溶液への分散性と膨潤性が高くなる。

[0014] 本発明方法としては、原料であるセルロースとして、メジアン粒径が10 μ m以上、500 μ m以下のものを用いることが好ましい。メジアン粒径が10 μ m未満までセルロースを粉砕することは工業的に不利となり、全体の製造コストが上がってしまうおそれがあり得る。一方、当該メジアン粒径が過剰に大きなセルロースを用いると、安定的な分散液が得られず、ひいては多孔質セルロースビーズを良好に製造できない場合があり得るので、当該メジアン粒径としては500 μ m以下が好ましい。

[0015] 前記セルロース分散液中のセルロースの濃度としては、1～10重量%が好適である。当該濃度が1重量%未満であると、除去すべき溶液の量が多く、工業的に不利となるおそれがあり得る。一方、当該濃度が高過ぎると均一な分散液を製造するために攪拌時間が過剰に長くなり得るので、当該濃度としては10重量%以下が好ましい。

[0016] 前記凝固溶媒としては、アルコールを含有するものが好ましい。アルコールは安価である上に、アルコールを含む凝固溶媒であれば、本発明に係る多孔質セルロースビーズを良好に製造することが可能になる。

[0017] 前記凝固溶媒としては、酸性であるものが好ましい。凝固溶媒が酸性であれば、アルカリ水溶液を含むセルロース分散液を中和することができる。ま

た、本発明者らの知見によれば、凝固溶媒として酸性のものをを用いれば、得られる多孔質セルロースビーズの細孔径分布が狭くなる。そのような細孔径特性が所望される場合、凝固溶媒を酸性とすることが好ましい。

[0018] 前記セルロース分散液を作製・貯蔵する際における温度としては、 -20°C 以上 10°C 以下が好ましい。当該温度が -20°C 以上であればアルカリ水溶液の凍結を抑制することができる。一方、当該温度が 10°C 以下であれば、セルロース分散液を効率的に調製でき、また、セルロース分散液の着色を抑制することができる。

[0019] 前記セルロース分散液を分散媒に分散しエマルションを作製した後、該エマルションを凝固溶媒に接触させる態様も好適である。エマルションを調製することによって、より簡便に、より真球度の高い多孔質セルロースビーズが得られる。

[0020] 前記凝固溶媒の体積としては、前記エマルションの 0.01 倍～ 1 倍が好ましい。当該範囲内であれば、良好な細孔や表面孔を有する多孔質セルロースビーズを得られやすい。

[0021] エマルション作製時における P_v 値（単位体積あたりの動力）としては、 $0.1\text{ kW}/\text{m}^3$ 以上が好適である。当該攪拌動力が $0.1\text{ kW}/\text{m}^3$ 以上であれば、良好な真球性と細孔特性を得られ易い。

[0022] また、前記セルロース分散液と凝固溶媒の接触時の P_v 値（単位体積あたりの動力）としては、 $0.1\text{ kW}/\text{m}^3$ 以上が好適である。当該 P_v 値が $0.1\text{ kW}/\text{m}^3$ 以上であれば、良好な真球性と細孔特性の多孔質セルロースビーズが得られやすい。

[0023] エマルションへの凝固溶媒の添加所要時間としては 150 秒以内が好ましい。理由は定かではないが、驚くべきことに、当該時間が 150 秒以内であれば、得られる多孔質セルロースビーズの強度が向上する。

[0024] 前記セルロース分散液は、水とセルロースからなる予備分散液とアルカリ水溶液とを混合させることにより調製されることが好ましい。それにより、セルロースのダマの発生を抑制でき、セルロース分散液の作製に要する時間

を短縮できる。

[0025] 少なくとも一つ以上の工程における攪拌操作においては、タービン翼を用いることが好ましい。攪拌翼として剪断力が大きいタービン翼を用いると、理由は定かではないが、驚くべきことに、良好な真球性と細孔特性を有する多孔質セルロースビーズが得られやすい。

[0026] 本発明に係る架橋多孔質セルロースビーズの製造方法は、上記で説明した本発明製造方法により得られた多孔質セルロースビーズをさらに架橋することを特徴とする。

発明の効果

[0027] 本発明によれば、毒性、腐食性が高い副原料を使わず、工業的に不利である煩雑な工程を経ることなく、機械的強度が高い多孔質セルロースビーズを簡便に製造することができる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]図1（1）は、本発明に係るセルロース分散液であり、図1（2）は、従来方法に係るセルロース溶液である。

発明を実施するための形態

[0029] 本発明に係る多孔質セルロースビーズの製造方法は、低温のアルカリ水溶液とセルロースとを混合してセルロース分散液を調製する工程、および、当該セルロース分散液を凝固溶媒に接触させることにより、多孔質セルロースビーズを得る工程を含むことを特徴とする。

[0030] 本発明者らは、低温のアルカリ水溶液にセルロースを分散させたセルロース分散液を、該セルロース分散液が凍結しない温度にて凝固溶媒に接触させると、毒性や腐食性が高い溶媒や溶解助剤を実質的に用いることなく、多孔質セルロースビーズが安価に簡便に製造できることを見出した。また驚くべきことに、低温のアルカリ水溶液に通常の大さのセルロース粉末を投入すると、よく知られているように透明の溶解状態とは言い難い分散液が作製される場合が多いものの、鋭意検討の結果、このようなセルロース分散液からでさえ、多孔質セルロースビーズがより簡便に安価に製造できることを見出

した。おそらくは、セルロースがアルカリ水溶液に溶解しなくても、水とアルカリ成分が低温下で形成する特殊なクラスタにセルロースが配位されて膨潤し、かかるクラスタが凝固溶媒に吸収および置換され、セルロースが凝固しながら多孔質化するものと考えられる。

[0031] 以下、本発明を工程ごとに説明する。

[0032] (1) セルロース分散液の調製工程

本発明では、低温のアルカリ水溶液とセルロースとを混合する。セルロースが低温アルカリ水溶液に溶媒和される反応は発熱反応であるので、高温のアルカリ水溶液にセルロースを加えても均一で着色の無い分散液は得られない。そこで、セルロースとアルカリ水溶液の混合時には、低温を維持する。

[0033] ここで低温とは、常温より低い温度を指す。常温より低ければ大きな問題は無いが、 -20°C 以上であれば温調設備が簡便でランニングコストも低くなるため好ましい。また 10°C 以下であればセルロース分散液の着色が少なくなり、またセルロースの分散性・膨潤性が高くなるため好ましい。当該温度としては、 -10°C 以上、 20°C 以下が好ましい。 -10°C 以上であればアルカリ水溶液の凍結を抑制することができる。一方、 20°C 以下であれば、セルロース分散液を効率的に調製でき、また、セルロース分散液の着色を抑制することができる。当該温度としては、 -5°C 以上がより好ましく、 -2°C 以上がさらに好ましく、 -1°C 以上が特に好ましく、また、 15°C 以下がより好ましく、 9°C 以下がさらに好ましく、 5°C 以下がさらに好ましく、 4°C 以下がさらに好ましく、 1°C 以下がさらに好ましい。また、当該温度が 9°C 以下であれば、得られる多孔質セルロースビーズの真球度が高くなるため好ましい。

[0034] アルカリは、水溶液となった際にアルカリ性を示すものであれば特に限定なく用いることができる。入手のしやすさから水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムが好ましく、製品安全性や価格の面から水酸化ナトリウムが最も好ましい。

[0035] 前記アルカリ水溶液のアルカリ濃度に特に限定は無いが、 $3\sim 20$ 重量%

であることが好ましい。アルカリの濃度がこの範囲であれば、セルロースのアルカリ水溶液への分散性・膨潤性が高くなるため好ましい。より好ましいアルカリの濃度は5～15重量%であり、さらに好ましくは7～10重量%、最も好ましくは8～10重量%である。

[0036] 前記セルロースの種類には特に限定は無い。例えば、本発明方法では、セルロースを溶解させなくてもよいので、溶解性を上げるための置換基を導入したセルロースなど、置換セルロースを用いる必要はなく、通常は無置換セルロースを原料として用いることができる。

[0037] セルロースの分子量は特に制限されないが、重合度としては1000以下であることが好ましい。重合度が1000以下であれば、アルカリ水溶液への分散性・膨潤性が高くなり、好ましい。また重合度が10以上であれば、得られる多孔質セルロースビーズの機械的強度が大きくなるため好ましい。より好ましい重合度の範囲は50以上500以下、さらに好ましくは100以上400以下、特に好ましくは200以上350以下、最も好ましくは250以上350以下である。

[0038] 本発明方法で用いるセルロースとしては、そのメジアン粒径が10 μm 以上、500 μm 以下のものを用いることが好ましい。本発明方法ではセルロースを溶解しなくてもよいため、溶解性向上のためセルロースを特殊な方法で粉砕する必要が無い。また、セルロースを過剰に粉砕すると、全体の製造効率が低下する。即ち、従来、セルロースを低温アルカリ水溶液に溶解するために爆砕処理や湿式粉砕などによりセルロースを極端に微細化することが行われていたが、これらの処理は製造コストを上げる原因となる。よって、原料セルロースのメジアン粒径は、10 μm 以上が好ましい。また、メジアン粒径が10 μm 以上であれば、セルロース分散液中にダマが発生し難くなるという効果もある。一方、当該メジアン粒径が過剰に大きなセルロースを用いると、安定的な分散液が得られず、ひいては多孔質セルロースビーズを良好に製造できない場合があり得るので、当該メジアン粒径としては500 μm 以下が好ましい。当該メジアン粒径としては、15 μm 以上がより好ま

しく、 $20\mu\text{m}$ 以上がさらに好ましく、 $45\mu\text{m}$ 以上が特に好ましく、また、 $200\mu\text{m}$ 以下がさらに好ましい。

[0039] その他、溶解性が向上されたセルロースの例としては、溶解パルプを挙げることができる。溶解パルプは本発明のセルロース分散液を作製するのに適した原料であることを否めないが、従来から知られているように、溶解パルプを得るためには環境負荷が大きい製法を採る場合が多く、また現在では、セルロース関連産業の構造上の問題のせいか、多孔質セルロースビーズを製造するための原料としては非常に入手困難な原料であることを本発明者らは知るに至っている。本発明方法では、溶解パルプを使用しなくても、多孔質セルロースビーズを良好に製造することができる。即ち本発明では、全体的な製造コストや製造効率から、一般的に入手容易なセルロースを用いることが好ましい。

[0040] アルカリ水溶液とセルロースとの混合条件に特に限定は無い。例えば、アルカリ水溶液へセルロースを加えてもよいし、セルロースへアルカリ水溶液を加えてもよい。予めアルカリ水溶液を低温に調節してからセルロースを投入することが好ましい。

[0041] セルロースは、アルカリ水溶液と混合する前に、水へ懸濁しておいてもよい。それにより、セルロースのダマの発生を抑制でき、セルロース分散液の作製に要する時間を短縮でき、また、より均一なセルロース分散液が得られ易い。当該懸濁液におけるセルロースの割合は適宜調整すればよいが、例えば、1重量%以上、40重量%以下とすることができる。

[0042] アルカリ水溶液と混合する前に、セルロースまたはセルロース懸濁液の温度をアルカリ水溶液と同様に、低温に調節しておくことも好ましい。この際、アルカリ水溶液と、セルロースまたはセルロース懸濁液の温度は、同温度でなくてもよい。

[0043] セルロースまたはセルロース懸濁液を加えるべきアルカリ水溶液、および、アルカリ水溶液を加えるセルロース懸濁液は、攪拌しておくことが好ましい。この際の攪拌動力 P_v 値としては、 $0.01\text{ kW}/\text{m}^3$ 以上、 100 kW

／ m^3 以下が好ましい。当該攪拌動力が $0.01\text{ kW}/\text{m}^3$ 以上であれば、両者を効率的に混合することが可能になる。また、当該攪拌動力が過剰に高いと、かえって混合し難くなるおそれがあり得るので、当該攪拌動力としては $100\text{ kW}/\text{m}^3$ 以下が好ましい。

[0044] また驚くべきことに、セルロースを水に懸濁して低温に調節した後、攪拌しながらアルカリ水溶液を添加すると、均一なセルロース分散液が瞬時に調製できることを本発明者らは見出しており、特にこの方法を好ましく用いることができる。このとき、添加するアルカリ水溶液が低温であることがより好ましい。セルロース分散液の作製中および貯蔵中も低温に保持しておくことが好ましい。当該温度は、アルカリ水溶液で説明した温度と同様にすることができる。

[0045] またセルロース分散液中のセルロースの濃度は $1\sim10$ 重量%であることが好ましい。 1 重量%以上であれば、得られる多孔質ビーズの機械的強度が大きくなるため好ましく、 10 重量%以下であれば、セルロース分散液の粘度が低く、また分散・膨潤できない部分が少なくなるため、好ましい。より好ましくは $3\sim10$ 重量%、さらに好ましくは $4\sim8$ 重量%、特に好ましくは $5\sim7$ 重量%、最も好ましくは $5\sim6$ 重量%である。なお、このセルロース分散液中のセルロース濃度は、分散・膨潤しきれず均一にならなかった分を含めない。

[0046] (2) エマルションの調製工程

セルロース分散液は、分散媒に分散することによりエマルションを作製した後、当該エマルションを凝固溶媒に接触させてもよい。かかるエマルションの調製は任意であるが、当該工程を経ることによって、セルロース含量が比較的多いセルロース分散液から多孔質セルロースビーズを得られ易くなり、また、機械的強度の高い多孔質セルロースビーズが得られ易くなる。

[0047] 分散媒に特に限定は無く、セルロース分散液と相溶性が低いものであれば、好適に用いることができる。例えば、中鎖脂肪酸トリグリセリド(MCT)等の食用油；パーム油、ヤシ油、スクワランなどの天然油；イソステアリ

ルアルコールやオレイルアルコールなどの高級アルコール；2-オクチルドデカノールなどの高級エステル；ジクロロベンゼンなどの親油性有機溶媒などを用いることができる。また、分散媒には、ソルビタンラウレート、ソルビタンステアレート、ソルビタンオレエート、ソルビタントリオレエートなどのソルビタン脂肪酸エステルなどの界面活性剤を適量添加してもよい。

[0048] 分散媒の使用量は、セルロース分散液の液滴を十分に分散できる量とすればよい。例えば、セルロース分散液に対して1質量倍以上とすることができ、一方、分散媒の量が多過ぎると廃液量が過剰に増えるおそれがあり得るので、当該割合としては10質量倍以下が好ましい。当該割合としては、2質量倍以上がより好ましく、4質量倍以上がより好ましく、また、8質量倍以下がより好ましく、7質量倍以下がさらに好ましく、6質量倍以下が特に好ましい。

[0049] 分散時の温度はセルロース分散液と同等に調節しておくことが好ましい。即ち、分散媒の温度や、分散媒とセルロース分散液との混合時における温度、分散媒中へセルロース分散液を分散させる際の温度は、アルカリ水溶液と同様に低温にすることが好ましい。

[0050] エマルションを調製する際は、通常、攪拌した分散媒へセルロース分散媒を加えることが好ましい。この際の攪拌動力 P_v 値としては、 $0.1\text{ kW}/\text{m}^3$ 以上、 $12\text{ kW}/\text{m}^3$ 以下が好ましい。当該攪拌動力が $0.1\text{ kW}/\text{m}^3$ 以上であれば、良好な真球性と細孔特性を得られ易い。また、当該攪拌動力が過剰に高いとエマルションの流動状態が安定し難くなるおそれがあり得るので、当該攪拌動力としては $12\text{ kW}/\text{m}^3$ 以下が好ましい。当該攪拌動力としては、 $1.1\text{ W}/\text{m}^3$ 以上がより好ましく、 $3.1\text{ W}/\text{m}^3$ 以上がさらに好ましく、 $5.5\text{ W}/\text{m}^3$ 以上が特に好ましい。

[0051] (3) 凝固工程

次に、セルロース分散液を凝固溶媒に接触させることにより、セルロースを多孔質化する。

[0052] 本発明の凝固溶媒には特に限定は無く、セルロース分散液と接触してセル

ロースビーズが得られるものであれば、好適に用いることができる。中でも水とアルコールはセルロース分散液の良溶媒であるアルカリ水溶液との親和性が高く、好適に用いることができる。特にアルコールを用いると、水を用いた場合に比べてセルロースビーズの孔を小さくできるため好ましい。またアルコールを用いると真球性が向上するため好ましい。また水とアルコールの混合溶媒を用いると、混合比によってセルロースビーズの孔の大きさを任意に調整できるため、より好ましい。本発明に用いることができるアルコールには特に限定は無いが、炭素数6以下のアルコールがアルカリ水溶液との親和性が高いため好ましく、炭素数4以下がより好ましく、最も好ましいのはメタノールである。また、凝固溶媒は、アルコール水溶液であってもよい。

[0053] また本発明の凝固溶媒は酸性であることも好ましい。凝固溶媒が酸性であれば、アルカリ水溶液を中和できるため好ましい。この中和が早く行なえると、得られるセルロースビーズへの化学的ダメージが軽減されるため好ましい。また、驚くべきことに、本発明者らは凝固溶媒を酸性とすることによって、得られる多孔質ビーズの細孔径分布が狭くなることを見出しており、こういった細孔径特性が所望される場合、凝固溶媒を酸性にしておくことが特に好ましい。酸性にするための薬剤には特に限定は無く、硫酸、塩酸などの無機酸や、酢酸、クエン酸、酒石酸などの有機酸や、リン酸、炭酸などの緩衝効果を持つものなど、幅広く用いることができる。なお、凝固溶媒が酸性であるとは、凝固溶媒のpHが7.0未満であることをいう。当該pHとしては、5.0以下が好ましく、4.0以下がより好ましく、3.0以下がさらに好ましく、2.0以下が特に好ましい。なお、当該pHの下限は特に制限されないが、0.0以上であることが好ましい。

[0054] 凝固溶媒の使用量は特に制限されず、適宜調整すればよい。例えば、セルロース分散液に対して0.001倍体積以上、100倍体積以下程度とすることができる。また、エマルションに対しては、0.01倍体積以上、10倍体積以下程度とすることができる。これら範囲内であれば、多孔質セルロ

ースビーズを得られやすい。また、良好な細孔や表面孔を得られやすい。凝固溶媒の使用量としては、エマルションに対して0.025倍体積以上がより好ましく、0.05倍以上がさらに好ましく、0.07倍以上が特に好ましく、また、0.4倍体積以下がより好ましく、0.2倍体積以下がさらに好ましく、0.15倍体積以下が特に好ましい。上記使用量は、通常考えられる凝固溶媒量に比べてかなり少ないが、本発明者らは、驚くべきことに、本発明方法によれば凝固溶媒の使用量を低減しても多孔質セルロースビーズを良好に得られることを見出した。

[0055] 前記凝固溶媒の温度については特に限定は無いが、凝固溶媒中でセルロース分散液が凍結し、その後融解すると、セルロースビーズが変形したり、セルロースが破碎しやすくなるため、前記セルロース分散液が凍結しない温度であることが好ましい。また、凝固溶媒の温度は前記セルロース分散液の温度以上であることが好ましい。通常、凝固溶媒は、凝固速度を速める等の効果から、セルロース分散液より低温であるが、本発明者らは驚くべきことに、凝固溶媒の温度をセルロース分散液の温度以上にした方が凝固が速く進行することを見出した。具体的な温度については特に限定は無いが、凝固溶媒の温度は0℃以上、150℃以下であることが好ましく、より好ましくは25℃以上、100℃以下、さらに好ましくは45℃以上、80℃以下であるが、凝固溶媒の沸点等を鑑みて、適切に調整することが好ましい。なお、セルロース分散液の温度は、エマルションを使用する場合ではエマルションの温度をいうものとする。

[0056] 前記セルロース分散液またはエマルションと凝固溶媒の接触方法に特に限定はなく、気相法など従来公知の造粒方法を用いることができる。例えば、セルロース分散液またはエマルションを攪拌しておき、そこへ凝固溶媒を添加すればよい。気相法としては、例えば、特許文献2の実施例1として記載の振動法を挙げることができる。

[0057] セルロース分散液またはエマルションと凝固溶媒を接触させる際、攪拌しながら接触させることが、得られるビーズの真球性の観点から好ましい。攪

拌条件に特に限定は無いが、接触時の Pv 値（単位体積あたりの動力）が、良好な真球性と細孔特性を得られやすいことから、 0.1 kW/m^3 以上であることが好ましい。より好ましくは 1.1 kW/m^3 以上であり、特に好ましくは 3.1 kW/m^3 以上であり、最も好ましくは 5.5 kW/m^3 以上、 12 kW/m^3 以下である。 12 kW/m^3 を超えると、接触時の流動状態が安定し難くなる場合がある。これら Pv 値は比較的ソフトな材質であるセルロースを用いた多孔質ビーズの製造方法としては、考えられないほど大きい範囲を含んでおり、ビーズの破碎等の問題が大いに懸念されるべきであるが、驚くべきことに、本発明者らはむしろ Pv 値をこれらの範囲にすれば、良好な真球性と細孔特性を有する多孔質セルロースビーズを得られる場合があり、本発明に好ましく用いることができることを見出した。

[0058] セルロース分散液またはエマルションへの凝固溶媒の添加所要時間は特に限定は無く、適宜調整すればよいが、 150 秒以内であることが好ましい。理由は定かではないが、驚くべきことに、当該時間が 150 秒以内であれば、得られる多孔質セルロースビーズの強度が向上する。その結果、多孔質セルロースビーズをカラムに充填して通液した際、高線速下でも圧密化が発生し難くなる。当該時間としては、 60 秒以内がより好ましく、 40 秒以内がさらに好ましく、 2 秒以内が特に好ましい。一方、当該時間が短過ぎるとセルロースの多孔質化が局所的に発生するおそれがあるので、当該時間としては 0.1 秒間以上が好ましい。なお、セルロース分散液またはエマルションへの凝固溶媒の添加所要時間とは、凝固溶媒の添加開始から添加完了までに要する時間をいうものとする。

[0059] (4) 架橋工程

上記方法により得られる多孔質セルロースビーズの強度をさらに高めるため、架橋剤を用いて強度をさらに向上させることが可能である。架橋されている多孔質セルロースビーズは特に強度に優れているため、高線速下や高圧力下の使用にも耐えることができる。なお、本工程は任意である。

[0060] 架橋方法としては特に限定は無く、従来公知の方法を用いることができる

。架橋剤や架橋反応条件に特に限定は無く、公知の技術を用いて行うことができる。例えば、架橋剤としては、エピクロロヒドリン、エピブROMヒドリン、ジクロロヒドリンなどのハロヒドリン；2官能性ビスエポキシド（ビスオキシラン）；多官能性ポリエポキシド（ポリオキシラン）を挙げることができる。なかでも、特開2008-279366に示される方法を特に好適に用いることができる。本発明者らは特開2008-279366に示される方法をさらに発展させ、架橋反応を促進するアルカリ水溶液を分割添加することにより、さらに強度が向上することを見出しており、本発明における最も好適な架橋方法として用いることができる。これら公報は、本願に参考文献として援用される。

[0061] 上記セルロース分散液の調製工程、エマルションの調製工程および凝固工程においては、攪拌操作を用いることが好ましい。このうち少なくとも一つ以上の工程における攪拌操作がパドル翼やタービン翼のような剪断力の大きい攪拌翼を用いて行なわれていることが好ましい。これらの攪拌翼を用いるとより好ましい工程は、エマルションの調製工程と凝固工程であり、最も好ましくは凝固工程である。常識的に考えれば、凝固工程において、剪断力の大きい攪拌翼を用いると、比較的ソフトな材質であるセルロースを用いた多孔質ビーズは破砕等のおそれがあるので、通常このような攪拌翼を用いることは考えられないが、本発明者らはむしろ、これら剪断力が大きい攪拌翼を用いると、理由は定かではないが、驚くべきことに、良好な真球性と細孔特性を有する多孔質セルロースビーズを得られる場合が多いことを見出した。また前述の常識外れなPv値と組み合わせても、驚くべきことに良好な多孔質セルロースビーズが得られることも見出した。本発明に用いることができる剪断力の大きい攪拌翼としては特に限定は無いが、パドル翼、タービン翼を挙げることができる。なかでも傾斜パドル翼、傾斜パドル翼、ディスクタービン翼等を好適に用いることができる。また複数、複数種の翼を組み合わせることも好ましい。また傾斜翼を用いる場合は、例えば、容器の下側は掻き揚げ、上側はかき下げといったような使い分けをすることも好ましい。

。また、エマルションの調製工程においては、常識的には大型翼を用いることが分散の均一性や粒度分布のシャープさといった点から好ましいとされているが、驚くべきことに、本発明者らは小型翼（例えば、パドル翼やタービン翼）を用いる方が、得られる多孔質セルロースビーズの粒度分布がシャープで、しかも真球性が高いことから、好ましいことを見出している。

[0062] 本発明方法で製造された多孔質セルロースビーズは、着色が抑制されており、且つ機械的強度が高い。よって、特定のタンパク質などを結合させ、血液接触材料などとして利用することができる。

[0063] また、本発明方法によれば、毒性や腐食性が高い副原料を使わず、工業的に不利である煩雑な工程を経ることなく、上記のような高品質の多孔質セルロースビーズを製造することができる。また、条件によっては、多孔質セルロースビーズの真球度を高めたり、細孔を調整することも可能である。

[0064] 本願は、2011年3月8日出願された日本国特許出願第2011-050714号に基づく優先権の利益を主張するものである。2011年3月8日出願された日本国特許出願第2011-050714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

[0065] 以下、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0066] 先ず、製造された多孔質セルロースビーズの物性の試験方法につき説明する。

[0067] 試験例1 表面孔径の測定

各実施例で得られた多孔質セルロースビーズを5倍体積量の30%エタノールで洗浄し、多孔質セルロース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多孔質セルロース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／エタノールが3／7の混合液を用いて多孔

質セルロース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の混合液を用いて多孔質セルロースビーズを処理し、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。凍結乾燥を行なった多孔質セルロースビーズに蒸着処理を行い、2万5千倍のSEM像を撮影した。得られたSEM像からアメリカ国立衛生研究所製のソフトウェア・Image Jを用いて表面孔径を計測した。

[0068] 試験例2 最大細孔径の測定

(1) カラム充填

多孔質セルロースビーズをRO水に分散させ、1時間脱気した。脱気した多孔質粒子を、線速105 cm/hでカラム（GEヘルスケア・ジャパン社製Tricorn 10／300）に充填した。その後、pH7.5の溶出液（129 mL）を線速26 cm/hでカラムに通液した。

[0069] (2) マーカー添加

マーカーとして次のものを用いた。

[0070] ・Blue Dextran 2000 (Pharmacia Fine Chemicals社製)

・Low Density Lipoprotein (SIGMA社製), MW3,000,000

・Thyroglobulin (SIGMA社製), MW660,000

・フェリチン (SIGMA社製), MW440,000

・Aldolase (SIGMA社製), MW158,000

・IgG ヒト由来 (SIGMA社製), MW115,000 (参考例1には不使用)

・Bovine Serum Albumin (Wako社製), MW6,700

・Cytochrome C (Wako社製), MW12,400

・Bacitracin (Wako社製), MW1,400
前記溶出液を線速26cm/hでカラムに通液しながら、上記ローカーをpH7.5のバッファーにて5mg/mLに薄めたものを、各々12μLずつ注入した。なお、ローカーの濃度は都度微調整した。

[0071] (3) 測定

測定器として、DGU-20A3、SCL-10A、SPD-10A、LC-10AD、SIL-20AC、CTO-10AC (それぞれSHIMADZU社製) を用い、測定ソフトウェアとして、LC Solutionを用いた。液量測定には50mLメスシリンダーを用いた。

[0072] ローカー注入と同時にUVモニターおよび液量の測定を開始し、1) ブルーデキストランの最初のピークに対応する液量を V_0 (mL) とした。

[0073] 2) ローカーのピークに対応する液量を V_R (mL) とした。

[0074] 3) カラム内の多孔質粒子のトータルボリュームを V_t (mL) とした。

[0075] (4) 算出

ローカーの分配係数 (K_{av}) を次式で算出した。

$$[0076] \quad K_{av} = (V_R - V_0) / (V_t - V_0)$$

(5) 最大細孔径の算出

ローカーの K_{av} と分子量の対数をプロットし、直線性を示す部分から下記式の傾きと切片を求めた。

$$[0077] \quad K_{av} = k \times L_n (\text{分子量}) + b$$

[0078] 次に、求めた傾きと切片から K_{av} が0の時の分子量、つまり排除限界分子量を求めた。次に、中性緩衝液中の球状タンパク質の直径と分子量の下記相関式に排除限界分子量を代入し、求めた値を試料粒子の細孔径の最大径とした。

[0079] 球状タンパク質の中性緩衝液中の直径 ($\text{\AA}$) = 2.523 × 分子量^{0.3267}

[0080] 試験例3 平均細孔径の算出

上記試験例2 (5) において、直線性を示す部分の最大 K_{av} /2に相当する

分子量を前記中性緩衝液中の球状タンパク質の直径と分子量の相関式に代入し、求めた値を多孔質セルロースビーズの細孔の平均径とした。

[0081] なお、試験例2および試験例3において、吸着体の目的吸着物質に対する K_{av} を測定する場合、目的吸着物質が吸着されてしまい、正確な測定ができなくなるおそれがある。よって、吸着体の目的吸着物質に対する K_{av} は、目的吸着物質と近い分子量を有する2種以上のタンパク質の K_{av} を測定し、それらのデータから計算で求めた。例えば、目的吸着物質が1 g Gの場合、フェリチンとアルブミンのデータから K_{av} を求めた。

[0082] 試験例4 メジアン粒径の測定

レーザ回折／散乱式粒子径分布測定装置（堀場社製LA-950）を用いて、多孔質セルロースビーズの体積基準の粒度分布を測定し、メジアン粒径を求めた。

[0083] 試験例5 強度評価

AKTA explorer 10S（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を用い、直径0.5 cm、高さ15 cmのカラムに22 μ mのメッシュを取り付け、多孔質セルロースビーズをそれぞれ3 mL入れ、線速450 cm/hで20%エタノール水溶液（和光純薬工業社製エタノールと蒸留水で調製）を1時間通液して充填した。次いでpH 7.4リン酸バッファ（シグマ製）を任意の線速で通液し、圧密化がおきる線速を求めて強度評価とした。

[0084] 実施例1

（1） アルカリ水溶液Aの作製

和光純薬社製の水酸化ナトリウムと蒸留水を用いて、9重量%の水酸化ナトリウム水溶液を作製し、その温度を4℃に調整した。

[0085] （2） セルロース分散液Aの作製

4℃に調整した前記アルカリ水溶液Aを4℃に保持したまま攪拌し、次いで4℃の環境に2時間静置したJohnson Matthey社製微結晶性セルロース（メジアン粒径：71 μ m）を投入し、セルロースが5重量%

となるよう、少しずつ添加した。添加完了から4℃を保持したまま2時間攪拌を継続し、セルロースが均一に分散・膨潤したセルロース分散液を作製し、4℃で貯蔵した。得られたセルロース分散液の写真を図1(1)に示す。

[0086] (3) 多孔質セルロースビーズの作製

中鎖脂肪酸トリグリセリド（理研ビタミン社製アクターM-2）85 mLを4℃、300 rpmで攪拌し、セルロース分散液A 15 mLをこれに加え、4℃、300 rpmで15分間攪拌した。得られた分散液を50℃、300 rpmに調整した300 mLの90%メタノール水溶液に添加し、50℃、300 rpmで10分間攪拌した。吸引濾過を行なった後、エタノールを75 mL用いて洗浄を行い、次いで150 mL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の表面孔径のメジアン径は747 Åであった。このように、従来、セルロースが溶解しておらず、多孔質セルロースビーズの製造では用いられないと考えられていたセルロース分散液からでも、良好な物性を有する多孔質セルロースビーズを製造することができた。

[0087] 実施例2

凝固溶媒に1.2 Mクエン酸水溶液（和光純薬社製クエン酸一水和物と蒸留水にて作製）を用い、凝固溶媒の温度を75℃とした以外は、実施例1と同様の方法で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の表面孔径のメジアン径は1057 Åであった。

[0088] 実施例3

凝固溶媒にメタノールと1.2 Mクエン酸水溶液を9:1で混合した溶液を用いた以外は、実施例1と同様の方法で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の表面孔径のメジアン径は932 Åであった。

[0089] 実施例4

凝固溶媒にメタノールと和光純薬社製硫酸を8:2で混合した溶液を用いた以外は、実施例1と同様の方法で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の表面孔径のメジアン径は1298 Åであった。

[0090] 実施例5

(1) セルロース分散液Bの作製

セルロースを6重量%とした以外は、実施例1(2)のセルロース分散液Aと同様に作製した。

[0091] (2) 多孔質セルロースビーズの作製

和光純薬社製オルトジクロロベンゼン82 mLに和光純薬社製ソルビタンモノオレエート(span 80相当品)1.15 gを加え、4℃、330 rpmで攪拌し、セルロース分散液B18 mLをこれに加え、4℃、330 rpmで15分間攪拌した。得られたエマルションを55℃、300 rpmに調整した300 mLのメタノールに添加し、55℃、300 rpmで10分間攪拌し凝固させた。吸引濾過を行なった後、メタノール75 mLを用いて洗浄を行い、次いで150 mL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の表面孔径のメジアン径は667 Åであった。

[0092] 実施例6

凝固溶媒をエタノールに変更した以外は実施例5と同様の方法で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の表面孔径のメジアン径は453 Åであった。

[0093] 比較例1

(1) セルロース溶液の作製

4℃に調整した実施例1(1)のアルカリ水溶液Aを4℃に保持したまま攪拌し、次いで4℃の環境に2時間静置したJohnson Matthey社製微結晶性セルロース(メジアン粒径:71 μm)を投入し、セルロースが9重量%となるよう、少しずつ添加した。添加完了から4℃を保持したまま2時間攪拌を継続し、セルロースが均一に分散・膨潤させ、-20℃で完全に凍結させた。次いで4℃で融解し、体積が1.5倍になるように蒸留水で希釈し、攪拌を行い均一化した後、4℃で貯蔵した。得られたセルロー

ス溶液を、図 1 (2) に示す。

[0094] (2) 多孔質セルロースビーズの作製

セルロース分散液 B の代わりに上記セルロース溶液を用いた以外は、実施例 6 と同様の方法で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の表面孔径のメジアン径は 502 Å であった。

[0095] 比較例 2

比較例 1 (1) のセルロース溶液を用いて、凝固溶媒を 55℃ のメタノールから 4℃ の 60% メタノールに変更し、凝固溶媒の温度を 4℃ とした以外は実施例 5 と同様に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の表面孔径のメジアン径は 451 Å であった。

[0096] 比較例 3

凝固溶媒量を 5.4 mL とし、凝固溶媒をメタノールとした以外は、比較例 2 と同様に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の表面孔径のメジアン径は 531 Å であった。

[0097] 比較例 1 ～ 3 のとおり、セルロース分散液を凍結した後に融解することによってセルロース溶液を調製し、当該溶液と凝固溶媒を接触させても、多孔質セルロースビーズは得られた。しかし、分散液の凍結と融解にはエネルギーや時間がかかり、工業的な大量生産には適さない。一方、本発明方法によれば、凍結工程と融解工程を経なくても、同様の多孔質セルロースビーズを製造することができる。

[0098] 実施例 7

エマルション調製時の温度を 55℃ とし、凝固溶媒量を 7.2 mL とした以外は、実施例 5 と同様に多孔質セルロースビーズを作製した。

[0099] 実施例 8

凝固溶媒を 60% メタノールとした以外は実施例 7 と同様に多孔質セルロースビーズを得た。

[0100] 実施例 9

凝固溶媒を蒸留水とした以外は実施例 7 と同様に多孔質セルロースビーズ

を得た。

[0101] 実施例 10

凝固溶媒をエタノールとした以外は実施例 7 と同様に多孔質セルロースビーズを得た。

[0102] 実施例 11

(1) アルカリ水溶液 B の作製

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

[0103] (2) セルロース分散液 C の作製

旭化成ケミカルズ社製局方セルロース PH-F20JP (メジアン粒径: 21 μm) 9.2 重量部と蒸留水 104 重量部を混合し、攪拌しながら 4℃に調整した。次いで攪拌しながら 4℃に調整したアルカリ水溶液 B を 40 重量部投入し、30 分間 4℃で攪拌した。

[0104] (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 C 154 重量部と、4℃に調整されたオルトジクロロベンゼン 776 重量部と、4℃に調整されたソルビタンモノオレエート (span 80 相当品) 7.8 重量部を混合し、ディスクタービン翼 2 枚を取り付けたセパラブルフラスコ内で 300 rpm (Pv 値: 0.2 kW/m³) で 4℃、30 分間攪拌し、エマルションを作製した。温度と攪拌を維持しながら 4℃に調整されたメタノール 57 重量部を凝固溶媒として加えた。この時の凝固溶媒の体積はエマルションに対して 0.1 倍であった。また凝固溶媒の添加所要時間は 2 秒であった。その後、攪拌数と温度を維持しながら 20 分間攪拌した。吸引濾過を行なった後、洗浄液としてエタノール 240 重量部を用いて洗浄を行い、次いで 500 重量部の水で洗浄を行い、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を、38 μm と 90 μm の篩を用いて湿式分級した。

[0105] (4) 架橋 — 方法 A (特開 2008-279366 参考法)

上記多孔質セルロースビーズ 11 体積部に蒸留水を加えて 16.5 体積部

として、反応容器に移した。ここに4 N NaOH水溶液（ナカライテスク社製と蒸留水で調製）を3.86体積部加え、40℃に昇温させた。ここに架橋剤としてグリセロールポリグリシジルエーテルを含有するデナコールEX-314（ナガセケムテックス社製）を1.77重量部投入し、40℃で4時間攪拌した。反応終了後、吸引濾過をしながら、ビーズの20倍体積量以上の蒸留水で洗浄し、架橋1回ビーズを得た。

[0106] 得られた架橋1回ビーズを容器に移し、蒸留水を加えて、全量を架橋多孔質ビーズの10倍体積量とし、オートクレーブを用いて、120℃で1時間加温した。室温まで放冷した後、ビーズの5倍体積量以上のRO水で洗浄し、エポキシ基がグリセリル基に変化したオートクレーブ済みの架橋1回ビーズを得た。

[0107] 次いで、このオートクレーブ済みの架橋1回ビーズ11体積部に蒸留水を加えて16.5体積部とし、反応容器に移した。これに4 N NaOH水溶液（ナカライテスク社製と蒸留水で調製）を3.86体積部加え、40℃に昇温させた。ここにデナコールEX-314（ナガセケムテックス社製）を1.77重量部投入し40℃で4時間攪拌した。反応終了後、吸引濾過しながら、ビーズの20倍体積量以上の蒸留水で洗浄し、架橋2回ビーズを得た。

[0108] 得られた架橋2回ビーズを容器に移し、蒸留水を加えて、全量を架橋多孔質ビーズの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2回ビーズを得た。

[0109] (5) 物性試験

上記架橋ビーズのメジアン粒径は75 μm であった。また、平均細孔径は215 Å、最大細孔径は1756 Åで、排除限界分子量は5.0 $\times 10^8$ であった。

[0110] 実施例12

凝固溶媒を15重量%クエン酸一水和物メタノール溶液とした以外は実施

例 1 1 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。メジアン粒径は $75\ \mu\text{m}$ 、平均細孔径は $190\ \text{\AA}$ 、最大細孔径は $718\ \text{\AA}$ で、排除限界分子量は 3.2×10^7 であった。

[0111] 実施例 1 3

(1) 多孔質セルロースビーズの作製

攪拌速度を $500\ \text{rpm}$ (Pv 値: $1.1\ \text{kW/m}^3$) とし、 $90\ \mu\text{m}$ の篩を $63\ \mu\text{m}$ の篩に変更した以外は、実施例 1 1 と同様に、多孔質セルロースビーズを作製した。

[0112] (2) 架橋 — 方法 B

上記多孔質セルロースビーズ 20 体積部に蒸留水を加えて 30 体積部とし、反応容器に移した。ここに架橋剤としてグリセロールポリグリシジルエーテルを含有するデナコール EX-314 (ナガセケムテックス社製) を 2.3 重量部投入し、 40°C に調整しながら攪拌を続けた。 40°C に到達後、30 分間攪拌した。次いで、 $2\ \text{N}\ \text{NaOH}$ 水溶液 (ナカライテスク社製と蒸留水で調製) 7.1 体積部を用意し、1 時間に $1/4$ ずつ加えた。この間、温度を 40°C に維持し、攪拌も継続した。最後の $1/4$ 量を添加後、同温度で 1 時間攪拌した。反応終了後、吸引濾過をしながら、ビーズの 20 倍体積量以上の蒸留水で洗浄し、架橋 1 回ビーズを得た。

[0113] 得られた架橋 1 回ビーズを容器に移し、蒸留水を加えて、全量を架橋多孔質粒子の 10 倍体積量とし、オートクレーブを用いて、 120°C で 1 時間加熱した。室温まで放冷した後、ビーズの 5 倍体積量以上の RO 水で洗浄し、エポキシ基がグリセリル基に変化したオートクレーブ済みの架橋 1 回ビーズを得た。

[0114] 次いで、このオートクレーブ済みの架橋 1 回ビーズ 20 体積部に蒸留水を加えて 30 体積部とし、反応容器に移した。ここに架橋剤としてグリセロールポリグリシジルエーテルを含有するデナコール EX-314 (ナガセケムテックス社製) を 2.3 重量部投入し、 40°C に調整しながら攪拌を続けた。 40°C に到達後、30 分間攪拌した。次いで、 $2\ \text{N}\ \text{NaOH}$ 水溶液 (ナカ

ライテスク社製と蒸留水で調製) 7. 1 体積部を用意し、1 時間に 1 / 4 ずつ加えた。この間、温度を 4 0 °C に維持し、攪拌も継続した。最後の 1 / 4 量を添加後、同温度で 1 時間攪拌した。反応終了後、吸引濾過をしながら、ビーズの 2 0 倍体積量以上の蒸留水で洗浄し、架橋 2 回ビーズを得た。

[0115] 得られた架橋 2 回ビーズを容器に移し、蒸留水を加えて、全量を架橋多孔質粒子の 1 0 倍体積量とし、オートクレーブを用いて 1 2 0 °C で 6 0 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 2 回ビーズを得た。

[0116] (3) 物性試験

上記架橋ビーズのメジアン粒径は 5 6 μm であった。また、平均細孔径は 3 3 6 Å、最大細孔径は 3 4 0 0 Å で、排除限界分子量は 3.8×10^6 であった。このビーズは線速 3 0 5 7 cm/h でも圧密化しなかった。

[0117] 実施例 1 4

凝固溶媒を 1 5 重量%クエン酸一水和物エタノール溶液とした以外は実施例 1 1 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。メジアン粒径は 7 5 μm 、平均細孔径は 1 6 3 Å、最大細孔径は 1 0 4 0 Å で、排除限界分子量は 1.0×10^6 であった。

[0118] 実施例 1 5

凝固溶媒量を 2 8 重量部とした以外は実施例 1 1 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。メジアン粒径は 7 5 μm 、平均細孔径は 2 3 2 Å、最大細孔径は 1 4 1 9 Å で、排除限界分子量は 2.6×10^6 であった。

[0119] 実施例 1 6

6 3 μm の篩を 9 0 μm の篩に変更した以外は、実施例 1 3 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。メジアン粒径は 7 5 μm であった。このビーズは装置で通液可能な最大線速である 3 0 5 7 cm/h でも圧密化しなかった。

[0120] 実施例 1 7

攪拌速度を700rpm（Pv値：3.1kW/m³）とした以外は、実施例16と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。メジアン粒径は75μmであった。このビーズは線速3057cm/hでも圧密化しなかった。

[0121] 実施例18

攪拌速度を250rpm（Pv値：0.1kW/m³）とした以外は、実施例16と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。メジアン粒径は75μm、平均細孔径は130Å、最大細孔径は562Åで、排除限界分子量は1.5×10⁷であった。

[0122] 実施例19

攪拌翼をWH型大型翼1枚とし、攪拌速度を350rpm（Pv値：1.1kW/m³）とした以外は、実施例16と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。造粒直後の粒度分布は、実施例16と比べて広がった。

[0123] 実施例20

凝固溶媒の添加所要時間を60秒とした以外は、実施例16と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。メジアン粒径は75μmであった。

[0124] 実施例21

凝固溶媒の添加所要時間を160秒とした以外は、実施例16と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。メジアン粒径は75μmであった。このビーズは線速1987cm/hで圧密化した。また、カラムへの充填性が若干低下し、タンパク質は比較的早く流出した。

[0125] 実施例22

攪拌翼を傾斜パドル翼2枚とした以外は、実施例17と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0126] 実施例23

調整温度を9℃とした以外は、実施例22と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0127] 実施例 2 4

調整温度を 0℃とした以外は、実施例 2 2 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0128] 実施例 2 5

凝固溶媒の添加所要時間を 1 0 秒とした以外は、実施例 1 6 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0129] 実施例 2 6

凝固溶媒の添加所要時間を 3 0 秒とした以外は、実施例 1 6 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0130] 実施例 2 7

攪拌速度を 1 1 8 0 r p m (P v 値 : 1 2 k W / m³) とした以外は、実施例 1 6 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0131] 実施例 2 8

攪拌速度を 8 0 0 r p m (P v 値 : 5 . 5 k W / m³) とした以外は、実施例 1 6 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0132] 実施例 2 9

分散液作製のための攪拌時間を 3 0 分から 1 2 0 分に変更した以外は実施例 1 6 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0133] 実施例 3 0

(1) セルロース分散液 D の作製

旭化成ケミカルズ社製局方セルロース K G - 1 0 0 0 (メジアン粒径 : 5 4 μ m) を用いた以外は、実施例 1 1 (2) のセルロース分散液 C と同様に作製した。

[0134] (2) 多孔質セルロースビーズの作製

上記セルロース分散液 D を用いた以外は実施例 2 7 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0135] 実施例 3 1

セルロース分散液 D を用いた以外は実施例 2 7 と同様に、架橋された多孔

質セルロースビーズを得た。

[0136] 実施例 3 1

凝固溶媒量を 2 2 8 重量部とした以外は実施例 3 0 と同様に、架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0137] 比較例 4

和光純薬社製の水酸化ナトリウムと蒸留水を用いて、9 重量%の水酸化ナトリウム水溶液を作製し、2 5 °C に調整した。2 5 °C に調整した前記水酸化ナトリウム水溶液を 2 5 °C に保持したまま攪拌し、次いで 2 5 °C の環境に 2 時間静置した J o h n s o n M a t t h e y 社製微結晶性セルロースを投入し、セルロースが 5 重量%となるよう、少しずつ添加した。添加完了から 2 5 °C を保持したまま 2 時間攪拌を継続し、2 5 °C で貯蔵を行なったところ、セルロース粒子が沈降してしまい、セルロース分散液は得られなかった。また黄色に着色した。

[0138] 比較例 5

(1) セルロース溶液の作製

1 0 0 g のチオシアン酸カルシウム 6 0 重量%水溶液に 6 . 4 g の結晶性セルロース（旭化成ケミカルズ社製セオラス P H 1 0 1 , メジアン粒径 : 7 3 μ m) を加え、1 2 0 °C に加熱して溶解した。この温度で貯蔵することが困難なため、用時調整とした。

[0139] (2) 架橋多孔質セルロースビーズの作製

チオシアン酸カルシウムを用いて作製される多孔質セルロースビーズを、W O 2 0 1 0 / 0 9 5 5 7 3 の実施例を参考に、以下のように作製した。具体的には、上記セルロース溶液に界面活性剤としてソルビタンモノオレエート 6 g を添加し、1 4 0 °C に予め加熱したオルトジクロロベンゼン 4 8 0 m L 中に滴下し、3 0 0 r p m にて攪拌した。次いで上記分散液を 4 0 °C まで冷却し、メタノール 1 9 0 m L 中に注ぎ、凝固させた。吸引濾過を行なった後、メタノール 1 9 0 m L にて洗浄した。このメタノール洗浄を数回行なった。さらに大量の蒸留水で洗浄した後、吸引濾過を行い多孔質セルロースビ

ーズを得た。濾過後の多孔質セルロースビーズ100gを121gの蒸留水に60gの硫酸ナトリウムを溶解した液に加え、50℃で2時間攪拌した。次いで、45重量%の水酸化ナトリウム水溶液3.3gと水素化ホウ素ナトリウム0.5gを加えて攪拌した。50℃で攪拌を継続しながら、45重量%の水酸化ナトリウム水溶液48gとエピクロロヒドリン50gとをそれぞれ25等分した量を、15分置きに添加した。添加終了後、50℃で16時間反応させた。反応後、40℃に冷却し、酢酸2.6gを加えて中和し、吸引濾過を行い、蒸留水で洗浄した。53μmと90μmの篩を用いて湿式分級を行ない、平均粒子径78μmの架橋された多孔質セルロースビーズを得た。

[0140] (3) 物性試験

上記架橋多孔質セルロースビーズの表面孔径は1649Åで、平均細孔径は793Å、最大細孔径は14100Åで、排除限界分子量は 2.9×10^{11} であった。このビーズは線速3057cm/hでも圧密化しなかった。

[0141] このように、比較例5で得られた架橋多孔質セルロースは、かなり大き過ぎる細孔を有するものであった。また、毒性の高いチオシアン酸カルシウムを含む溶液が廃液として残ってしまった。

[0142] 参考例1

比較的、モノクローナル抗体の吸着量が大きいタイプとして販売されている、プロテインAが導入された多孔質アガロースビーズ、M a b S e l e c t S u R e L X (ジーイーヘルスケア社製)の平均細孔径は425Å、最大細孔径は2970Åで、排除限界分子量は 2.5×10^9 であった。

請求の範囲

- [請求項1] 低温のアルカリ水溶液とセルロースとを混合して作製したセルロース分散液を、凝固溶媒に接触させることを特徴とする、多孔質セルロースビーズの製造方法。
- [請求項2] 前記アルカリ水溶液のアルカリ濃度が5～15重量%であることを特徴とする、請求項1に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。
- [請求項3] メジアン粒径が10 μ m以上、500 μ m以下のセルロースを用いる請求項1または2に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。
- [請求項4] 前記セルロース分散液中のセルロースの濃度が1～10重量%である請求項1～3のいずれか一項に記載のセルロースビーズの製造方法。
- [請求項5] 前記凝固溶媒がアルコールを含有するものである請求項1～4のいずれか一項に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。
- [請求項6] 前記凝固溶媒が酸性である請求項1～5のいずれか一項に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。
- [請求項7] 前記セルロース分散液を作製・貯蔵する温度が-20℃以上10℃以下である請求項1～6のいずれか一項に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。
- [請求項8] 前記セルロース分散液を分散媒に分散しエマルションを作製した後、該エマルションを凝固溶媒に接触させる請求項1～7のいずれか一項に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。
- [請求項9] 前記凝固溶媒の体積がエマルションの0.01倍～1倍である請求項8に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。
- [請求項10] エマルション作製時のP_v値（単位体積あたりの動力）が0.1kW/m³以上である請求項8または9に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。
- [請求項11] 前記セルロース分散液と凝固溶媒の接触時のP_v値（単位体積あたりの動力）が0.1kW/m³以上である請求項1～10のいずれか

一項に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項12] 前記エマルションへの凝固溶媒の添加所要時間が150秒以内である請求項8～10のいずれか一項に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項13] 前記セルロース分散液が、水とセルロースからなる予備分散液とアルカリ水溶液とを混合させることにより調製されたものである請求項1～12のいずれか一項に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項14] 少なくとも一つ以上の工程における攪拌操作がタービン翼を用いて行なわれる請求項1～13のいずれか一項に記載の多孔質セルロースビーズの製造方法。

[請求項15] 請求項1～14に記載の製造方法により得られた多孔質セルロースビーズをさらに架橋することを特徴とする、架橋多孔質セルロースビーズの製造方法。