



# 遠心分離について

## —遠心分離の基礎から超遠心や密度勾配遠心まで—

内山 進

### はじめに

「遠心分離」とは遠心力により分子あるいは粒子を沈降させ分離することである。一般に「遠心分離」というと遠心により分離したある成分を分取することを意味する場合が多い。しかしながら、「遠心分離」の様子を解析することで大きさや形を決定する「沈降分析」という解析法もある。英語では、centrifugeは目的に応じて、preparative centrifugeとanalytical centrifugeに大別され、前者は「分取用遠心」であり、後者は「分析用遠心」となる。こうした背景から、本稿では、遠心分離について、「遠心分取」を中心に、適宜、「遠心分析」についても記載する。

### 遠心分離の歴史

遠心による分取と分析は、目的が異なるだけで、沈降に関する原理や関係式は共通である。歴史的にはまず、19世紀末に分取を目的とした遠心分離が登場する。1880年頃にスウェーデンのde Lavalにより発明された、牛乳をクリームとスキムミルクに分離するクリームセパレーターが最初の遠心分離機のようなものである。それまでは、牛乳を長時間静置し、上層に集まったクリームを掬って集めて(“skim” 上澄みを掬う)いた作業が、クリームセパレーターの登場により大幅に短縮された。

1900年代になると、スウェーデンウプサラのSvedbergが、溶液中に粒子が分散した状態であるコロイド溶液の粒子物性に関する研究を開始した。当時は、近代物理学の黎明期で、Svedbergの興味は、EinsteinやSmoluchowskiが1905年に提唱したブラウン運動に関する関係式が溶液中の粒子にも成り立つかにあった。Svedbergは、1907年の学位取得後、Arrheniusの強い推薦もあり1912年に教授に就任し、金属コロイド溶液を中心に粒子の粒径分布(粒子径と分散状態)について研究を開始した<sup>1)</sup>。1920年頃には、小さなガラス管の中を重力で沈降する粒子の沈降速度の測定を行い、比較的粒径が大きな粒子の粒径分布決定に成功している。しかしながら、粒径が小さな粒子の場合、重力では非常にゆっ

くりとしか沈降せず、解析は不可能であった。そこで、Svedbergは遠心を利用することを思いつく。遠心力によりサイズの小さな粒子を沈降させ、その沈降の様子を観測することで粒子の粒径分布を求めるという、現在の最先端のバイオの研究でも利用されている沈降分析のアイデアがこの時に生み出された。1922年の秋のことである。1923年になり、Svedbergは米国ウィスコンシン大学に滞在し、遠心による粒径分布解析を実現するための装置開発に精力的に取り組んだ。このころからSvedbergの興味はタンパク質に移る。生物から作り出されるタンパク質のサイズが揃っているはずなどない、とSvedbergは考えていたので、それを証明しなかったのである。しかし、タンパク質は金属のコロイドに比べ沈降が遅い。そこで、Svedbergはオイルタービンを使って大きな遠心力を作り出し、ローターを回転させることを思いつく。Svedbergは、ultrafiltration(限外ろ過)やultramicroscope(限外顕微鏡、暗視野顕微鏡)に倣って、大きな遠心力を用いた分析をultracentrifugationと名付けた。当初は超遠心分取という手法はなく、ultracentrifugationは、大きな遠心力というより、「超遠心分析」を意味していた。この頃のスウェーデンの研究費状況は悪かったそうだが、Svedbergは医学分野への利用を盛り込んだ予算申請を行い、25,000クローネ(現在の日本円に換算すると15億円!?)もの巨額の研究資金を獲得し、1925年から26年にかけて超遠心分析を実現するための装置開発を行っている。25,000クローネの資金が割り当てられた時、「リスクが高い計画にそんな巨額が投じられるなんて!」という同僚の声に、Svedbergは“I am not going to fail”と言ったそうである。孤高の天才、という感じであろうか。

完成した超遠心分析装置を使って、現在では常識となっている、CO結合ヘモグロビンは分子量が揃った単量体が4分子集まって非共有結合により安定な4量体を形成している、ことを解明し、タンパク質の純度に「分散度」という新たな指標を与えたのである。そして、1926年に、超遠心分析によるコロイド分散系の解析に関する功績に対してSvedbergにノーベル化学賞が授与

著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻(准教授)、岡崎統合バイオサイエンスセンター(客員准教授)  
 E-mail: suchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp

された。超遠心分析では、溶液に10万～100万gの遠心力をかけ溶液中の粒子を沈降させ、粒子径分布を決定するが、現在、我々が利用している遠心分離に基づいた分取や分析の基礎はすべてSvedbergが作ったといっても過言ではない。

ノーベル賞受賞を契機に、Svedbergはコロイド研究から離れ、1940年代の半ばまで研究対象をタンパク質に絞り、超遠心分析さらに超遠心を利用した精製法である超遠心分取の研究を行っている。1930年頃は生物由来の試料の純度を評価する手法としては吸光スペクトル測定ぐらいしかなく、成分の分離を利用した超遠心分析は、タンパク質の純度決定に多大な寄与をした。1940年頃は、第二次世界大戦を背景に、血液からのタンパク質の精製や生化学的分析がCohnらにより盛んに行われていた時期であったことから、Svedbergも血液タンパク質を研究対象として多くの研究を行っている。このように、粒子（分子）の分散状態を知るための超遠心分析という科学をベースとして、分子を分取して利用するための遠心分取が誕生するのである。超遠心分析の装置のデザインやプロトタイプ制作はSvedbergが研究室を構えていたアップサラで行われたが、検出光学系の電気系統などの改良はSvedbergが滞在したウイスコンシンで行われた。

こうした研究開発をベースに、市販の超遠心分析装置であるModel-Eが1946年にSpinco社から発売され、その後、1949年にやはりSpinco社から超遠心分取装置であるModel-Lが発売されている。Spinco社は1954年に今のベックマン・コールター社に買収されている。なお、一時期Svedbergの研究助手であったTiseliusは、電気泳動を使ってタンパク質の分離と分析を研究し、主に血清タンパク質を対象とした電気泳動と吸着の研究により1948年にノーベル化学賞を受賞しており、タンパク質の分離分析でアップサラグループが果たした役割は大きい。なお、粒子の沈降の理論的取扱いの発展には、大阪大学の藤田博の貢献が大きく、藤田の“Mathematical theory of sedimentation analysis”は、現在でもこの分野の重要な教科書となっている<sup>2)</sup>。

1950年代以降には、ウィルスやプラスミドの単離、1970年代になると生体試料からの細胞内小器官の分取などが行われるようになり、それぞれの目的に応じ、分離用の超遠心の改良が進み、さらに、垂直ローターやスウィングローターなどが開発され、分子生物学、医化学、生化学などの分野で盛んに用いられるようになった。実際、多くの細胞内小器官やタンパク質複合体がこの頃に研究され、それぞれ沈降係数（後に説明）で特定されて

いる。超遠心分析については、2000年代に入り、装置の高精度化と解析手法の発達により、沈降パターンの直接解析が可能となり、今では、サイズが異なる5成分を超えるような混合系の分散度解析も実現され、創薬やバイオ医薬品の純度決定などで欠かせない手法となっている<sup>3,4)</sup>。

## 遠心分取の実際

**遠心力場での粒子の沈降の原理** 粒子に遠心により加速度（遠心力）をかけた際、粒子の沈降挙動を観測すると、ある時間 $t$ (s)における粒子の遠心軸からの位置 $r$ (cm)、さらに一定時間 $dt$ (s)の間の粒子の移動距離 $dr$ (cm)が得られる。そこで、粒子に角速度 $\omega$ ( $s^{-1}$ )で遠心力 $r\omega^2$ ( $cm\ s^{-2}$ )をかけた際の、粒子の移動速度と遠心力の比から沈降係数 $s$ (s)が、下記の式1のように定義されている。

$$s = \frac{dr/dt}{r\omega^2} \quad (1)$$

この関係式から、以下の式2が導かれ、

$$\ln r = s\omega^2 t \quad (2)$$

$t = 0$  sの時に遠心管の最上部( $r_{\min}$ )の位置にあった沈降係数 $s$ を持つ粒子の $t$ 時間後における位置 $r(t)$ として式3が得られる。

$$r(t) = r_{\min} \exp(s\omega^2 t) \quad (3)$$

なお、遠心ローターのカタログには $k$ 因子とよばれる数値が記載されているが、これは沈降係数 $s$ を持つ粒子が遠心チューブの最上部から底( $r_{\max}$ )に到達する時間( $t_p$ )を見積もるために利用される。

$$t_p = \frac{k}{s} \quad (4)$$

沈降係数の単位は秒(s)であるが、生体分子を扱う分野ではこれに $10^{13}$ を乗した値を単位とするS(Svedberg定数)がしばしば用いられる(Svedbergの功績にちなんだ命名で、sedimentationのSではない)。実験的に決定可能な値である沈降係数には、分子量、偏比容、摩擦係数の3因子が寄与する。分子量 $M$ の粒子に遠心力をかけると、角速度の二乗に応じた遠心力が働く(式5)。

$$\frac{Mr\omega^2}{N_A} \quad (5)$$

ここで、 $N_A$ はアボガドロ数である。ただし、粒子が溶

液中に存在する場合には粒子に浮力が働くため、実際に粒子にかかる遠心力は下記の式6となる。

$$\frac{M(1-\bar{v}\rho_0)r\omega^2}{N_A} \quad (6)$$

ここで、 $\bar{v}$  (cm<sup>3</sup>/g)は偏比容(分子1グラムが溶液中で占める体積、大まかに密度の逆数であるが水和の効果も含んだ値である点に注意)であり、 $\rho_0$  (g/cm<sup>3</sup>)は溶媒の密度である。したがって、分子量が大きくても溶媒の密度に近い密度を持つ、つまり $1-\bar{v}\rho_0$ がゼロに近いと、粒子は沈降が遅くなり、さらに、溶媒の密度と粒子の密度が一致すれば、粒子は沈降せず、大きな遠心力をかけても、その場に留まることになる。後述するが、等密度勾配遠心では、粒子の分離に溶媒と粒子の密度の釣り合いを利用している。なお、 $\bar{v}$ は溶液の密度の濃度依存性など他の手法により実験的に決定するのが好ましいが、構成要素の重量平均から計算により求めても大きくは異なる。たとえば、典型的な $\bar{v}$ として、タンパク質では0.73 cm<sup>3</sup>/g、核酸では0.55 cm<sup>3</sup>/gが用いられる。

一定速度で沈降する粒子には、溶媒分子と粒子との間の摩擦により、沈降方向とは逆向きに、粒子の摩擦係数 $f$  (g/s)に応じた摩擦力、 $fdr/dt$  (g cm/s<sup>2</sup>)が働くため、式7が成立する。

$$\frac{M(1-\bar{v}\rho_0)r\omega^2}{N_A} - f \frac{dr}{dt} = 0 \quad (7)$$

式1を代入すると、式8が得られる。

$$s = \frac{M(1-\bar{v}\rho_0)\omega^2}{N_A f} \quad (8)$$

式8から明らかなように、沈降係数は、分子量が大きいほど大きく、分子の偏比容が小さいほど大きく、一方、摩擦係数が大きいほど小さくなる。 $f$ は粒子の表面積に依存することから、同じ体積を持つ分子であっても表面積が小さい、つまり、分子が球体に近い形状を持つ場合には摩擦係数は小さくそのため沈降が速く、棒状分子や楕円体分子は摩擦係数が大きいため沈降が遅くなる。なお、半径 $a$  (cm)を持つ球体の、粒子の粘度 $\eta$  (Pa·s)を持つ溶媒中での摩擦係数 $f_0$ はいわゆるストークスアインシュタインの関係式(式9)として知られ、 $f$ は $f_0$ よりも大きな値をとる。

$$f_0 = 6\pi\eta a \quad (9)$$

式9から分かるように、摩擦力については、粒子の形状に加えて、溶媒の粘度についても考慮する必要がある。

つまり、溶媒の粘度が大きいと摩擦係数が大きくなり沈降が遅くなる。溶媒の粘度は溶媒に添加された緩衝剤、塩、糖類、の種類や濃度により異なり、さらに粘度は温度に大きく依存する。以上から、摩擦係数は、粒子の形状が球状から外れる、あるいは、溶媒の粘度が上昇する、と大きくなることとなる。

なお、粒子の摩擦係数と拡散係数 $D$  (cm<sup>2</sup>/s)は、気体定数を $R$ 、絶対温度を $T$  (K)とすると、式10の関係にある。

$$D = \frac{RT}{N_A f} \quad (10)$$

つまり、温度が一定であれば、粒子の拡散速度は摩擦係数に反比例する。式8に代入すれば、Svedbergの式として知られる式11が導かれる。

$$M = \frac{RTs}{(1-\bar{v}\rho_0)D} \quad (11)$$

遠心かけた際の粒子の沈降挙動は、熱力学と流体力学をベースとするLamm方程式と呼ばれる2階微分方程式で表される。Lamm方程式は沈降係数 $s$ を含む沈降の項と拡散係数 $D$ を含む拡散の項からなっており、コンピュータが発達した近年の超遠心分析では、時間経過に伴う粒子の沈降により生じる移動界面の時間変化を観測し、Lamm方程式をベースとして、有限要素法を用いた沈降パターンの数値解析を行うことで、複数種類の粒子の $s$ 、 $D$ および存在量を求め、溶液中の分子量分散を決定する手法が確立しており<sup>5,6)</sup>、創薬など生命科学の分野で盛んに用いられている<sup>7)</sup>。

**分取用遠心機のタイプと適用** 分取用遠心機のカテゴリとその適用範囲は概ね表1のように分類される。回転数が高くなると、ローターと空気との衝突による温度上昇が無視できなくなるため、温度上昇を抑えるために、真空ポンプを備える必要がある。ただし、超遠心機であれば2段式の真空機構を備えているが、高速遠心では真空ポンプを備えていない場合もある。このように、単に回転速度あるいは相対遠心力(RCF (relative centrifugal force)、地球の重力加速度 $g$ に対する相対的な値)の大きさだけでなく、遠心機のカテゴリーが異なると、ローターの材質やサイズ、温度制御機構など複数の仕様が変わってくる。1980年頃まで高速遠心は24,000 rpm、80,000 gが上限であったが、それ以降は、ローターや遠心チューブの高性能化により、高速遠心機でも30,000 rpm、100,000 gまで可能な装置も登場している。超遠心機と比べ、高速遠心機は高容量のローターが利用できる利点がある。

表1. 分取用遠心機のカテゴリ

	低速遠心	高速遠心	超遠心
回転速度 (r.p.m.)	2,000–6,000	18,000–30,000	35,000–150,000
最高RCF	8000	100,000	1,000,000
冷却	型式による	有	必須
真空	無	型式による	必須
加速・減速	通常は固定	調整可能	調整可能
適用			
細胞	可能	可能	可能
核	可能	可能	可能
沈殿	サイズによる	概ね可能	可能
膜性細胞内	サイズによる	可能	可能
小器官			
膜画分		可能な場合も有	可能
リボソーム		可能な場合も有	可能
高分子		可能な場合も有	可能

RCFとは、relative centrifugal force (相対遠心力) の略で、重力に対して何倍の加速度で有るかを表す単位。半径r (mm) のローターが毎分Q回転で遠心している場合、 $RCF = 1.12r(Q/1000)^2$ となる。

表2. ローターのタイプと適用

ローターのタイプ	分離方法		
	沈殿	レートゾーン	等密度
固定角	最適	不向き	可能
スウィング	不十分	可能	適度
垂直	不向き	可能	可能
ゾーナル	不十分	最適	適度

**ローターと遠心チューブのタイプ** 分取用ローターのタイプは大きく分けて、固定角タイプ、スウィング、垂直、およびゾーナルタイプに大別される(表2)。分析用ローターの詳細は引用文献3を参考にされたい。近年はプレートなど遠心専用チューブ以外の容器そのままの遠心が可能なローターも登場しているが、以下に説明する、各ローターの場合と基本的に同様の分離が行われると考えれば良い。固定角ローターは、沈殿の回収には向くが、密度勾配遠心(後に説明)のような、バンド状に分離しての分取には不向きである。これは、遠心に伴い粒子の遠心チューブ壁への衝突による対流が起こり、また、回転中の遠心力の方向と停止した際の重力の方向が異なるため、停止後にチューブ内で攪拌が起こるため

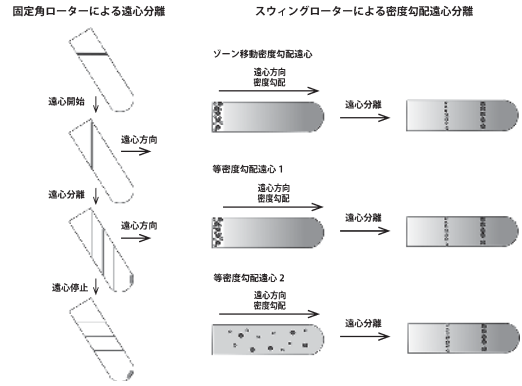


図1. 遠心分離の様子。(左) 固定角ローターによる遠心分離。(右) スウィングローターによる密度勾配遠心分離。

表3. 遠心チューブ一覧

材質	見た目	最高温度 (°C)	最高RCF	酸・アルカリ耐性	滅菌
ガラス	透明	300	1,000	+++	1, 2, 3, 4
PC	透明	120	1,000,000	+ -	1, 3, 4
PA	半透明	80	1,000,000	+++	1, 3, 4
PP	半透明	120	600,000	+++	2, 3, 4
UC	透明	60	600,000	+++	2, 3, 4

材質: PC = ポリカーボネート, PA = ポリアロマー, PP = ポリプロピレン, UC = ウルトラクリアー  
 滅菌方法: 1 = オートクレーブ, 2 = UV照射, 3 = エチレンオキシド, 4 = 37% フォルムアルデヒドまたは2% グルタルアルデヒド

である(図1左)。一方、スウィングローターは遠心とともに遠心チューブを入れたバケットの底が遠心力と同じ方向を向き、遠心チューブと沈降する分子との衝突が抑えられ(正確には分子の沈降方向とチューブ壁は同方向ではなく多少の対流は起こる)、さらに、停止した際の遠心チューブと重力方向が一致するため、バンド状での分離を目的とした密度勾配遠心などで使われる。垂直ローターでは、遠心により、サイズが異なる粒子を遠心方向にゾーンを形成するように分離させるが、その後、回転数を制御しながら停止させるアプローチがとられる。この適切な減速によりゾーンが乱れることなく停止させることが可能となっている。垂直ローターのメリットは、スウィングローターと比べると強度の高いローターを製作でき、したがって、高回転数が容易に達成できる点にある。しかしながら、遠心中に形成するゾーンのサイズが広いために、20Sを超えるような粒子の分離には不向きである。また、停止に伴うゾーンの乱れは抑えられても、減速時に多少のコンタミネーションが起こることは避けられない。表3のように遠心チューブにつ

いては複数種類が利用可能であるが、必ず、最高RCFを確認する必要がある。強度が不足している、あるいは、劣化したチューブを使用すると遠心中にチューブが破損しサンプルが漏れ出し、その結果、ローターのインバランスが起り事故につながる可能性もあることから、念入りに確認する必要がある。

遠心分取用のローターは、低速遠心や高速遠心ではアルミニウム製が中心で、容量が大きくなると重量の関係からカーボン繊維複合体製が利用されている。一方、高い回転数まで可能な高速遠心や超遠心では、軽くて強度が高いチタン合金製が主流である。ただし、今後、超遠心でも軽くて強度が高いカーボン繊維複合体製のローターが登場すると思われる。なお、超遠心用のローターの下部には、黒いチェッカー模様の内部にマグネットが埋め込まれた速度モニタープレートが貼付されている。このプレートに傷が入ると回転数モニターが適切にできず、回転数が高くなるとエラーが出やすくなるので、表面状態の確認や定期的な交換などのメンテナンスが必要である。

**多段階沈殿法** 遠心によりペレットを形成させ上清成分と沈殿成分を分画し、再度上清を遠心に供し上清と沈殿成分を分画する操作を繰り返す多段階沈殿法は、混合物中の粒子の沈降係数差が大きい場合に有効な手法である。どの程度の沈降係数差があれば有効に利用可能か述べる。すでに記載したように、分子同士の反発や拡散がないと仮定した場合、沈降係数 $s$ を持つ粒子の時間 $t$ における沈降位置 $r$ は式3となる。この関係式を用いると20Sの粒子を60,000 rpmで遠心軸から3.00 cmの位置から沈降させると、3000秒後に3.80 cm、6000秒後に4.82 cmの位置に到達することとなる。一方、7Sの粒子の場合、それぞれの時間で3.26 cmと3.54 cmに到達する。したがって、20S粒子と7S粒子の混合物を遠心分離した場合、遠心時間を3000秒から倍にすると20S粒子と7S粒子の分離は0.54 cmから1.28 cmに増加することとなる。細胞や菌体破砕物のように粒子サイズが大きく拡散が遅く、かつ、沈降挙動に与える水和の影響が小さい粒子の場合、沈降速度 $V_c$  (cm/s)の基礎式は粒子直径を $d_p$  (cm)、密度を $\rho_p$  (cm<sup>3</sup>/g)として以下の式で表され、この式から、ローターの半径を大きくする、回転数を上げる、粘度を下げる、といった分離のコツが理解できる。詳しくは教科書を参考にすると良い<sup>8)</sup>。

$$V_c = \frac{d_p(\rho_p - \rho_0)r\omega^2}{18\eta} \quad (12)$$

ただし、リボソームなどの細胞内小器官やタンパク質

複合体のように粒子サイズが小さくなると遠心と同時に拡散が起こる。遠心時間を倍にすると拡散が40%程度増加するため、両者が混合し特に沈降係数が小さな成分の純度を高めることが難しくなる。一般的には、高い分解能による分画の実現には沈降係数に10倍程度の差が必要であり、実際のところ、沈殿法は沈降係数が大きな成分の回収あるいは除去においてのみ有効であると捉えた方がよい。こうした理由から、操作が煩雑で時間を要するにもかかわらず、次に記述する、密度勾配遠心法が混合物の分離分画に利用されてきた。

**密度勾配遠心法** 密度勾配を利用した遠心分離には、ゾーン移動密度勾配遠心と等密度勾配遠心の2種類がある。ゾーン移動密度勾配遠心では、半径方向の距離をかせげるスウィングタイプのローターが利用される。密度勾配形成にはショ糖が利用され、濃度が異なるショ糖の手動による重層、あるいは密度勾配作成装置の使用により、遠心チューブ内に密度勾配を形成させ、その上に分離したい試料を穏やかにのせ、遠心分離にかける。沈降係数が大きい粒子は当初は速く沈降するが、沈降するにつれ密度と粘度が高い層に到達し、粒子にかかる遠心力の低下および摩擦係数の上昇により沈降速度が低下する。また、遠心時間が経過するにつれ、沈降係数が小さい粒子も徐々に沈降する。ショ糖による溶媒の高い粘性により、粒子の拡散速度は遅く、各成分はバンドを形成する。こうして、拡散を抑えながら沈降係数の違いを利用して粒子を分離する。等密度勾配遠心と異なり、遠心時間が長時間におよぶと分離した粒子の拡散が無視できなくなりバンドが広がる、遠心時間が長くなりすぎるとチューブの底に粒子が沈殿することに注意する必要がある。チューブ内で分離させた粒子の分取は、以前はチューブの底に針で穴を開け、底から連続的に液を回収するか、あるいは、チューブの下から高濃度のショ糖を流し入れ、上部から各成分を連続的に回収する手法が用いられていたが、いずれも回収時の混合のため分解能が下がる。20年ほど前からはカナダのCoombs博士が開発した密度勾配専用の回収装置が利用されるようになってきた。ゾーン移動密度勾配遠心はリボソーム、プロテアソーム、ヌクレオソーム、などの細胞内小器官、さらにタンパク質複合体の分離分画において盛んに用いられてきた歴史がある。

一方、等密度勾配遠心では、遠心により自ら密度勾配を形成するCsClなどを利用する(表4)。

たとえば、CsClと粒子を混合した溶液を遠心かけると、当初、粒子は遠心力により沈降するが、時間の経過と共にCsClが密度勾配を形成し、 $1 - \bar{\rho}_0$ がゼロとな

表4. 密度勾配遠心に利用される媒体とその適用

媒体	最大密度	イオン強度	浸透圧	適用例
<b>無機物質</b>				
塩化セシウム	1.9	高い	高い	核酸, 核-タンパク質
臭化ナトリウム	1.5	高い	高い	リボタンパク質
<b>糖類</b>				
ショ糖	1.3	非イオン性	適度	さまざまに可能
ソルビトール	1.26	非イオン性	適度	細胞, 膜
グリセロール	1.26	非イオン性	高い	膜, タンパク質, 核, 染色体
<b>トリヨードベンゼン系</b>				
Metrizamide	1.46	非イオン性	低い	さまざまに可能
Nycodenz	1.45	非イオン性	低い	さまざまに可能
<b>高分子系</b>				
フィコール	1.23	非イオン性	低い	膜, 細胞
<b>コロイドシリカ系</b>				
パーコール	1.23	低い	低い	細胞 細胞内小器官

最大密度の単位はg/mL

る位置に粒子が到達すると沈降を停止しバンドを形成する。このようにして、 $\bar{v}$ が異なる物質を分離することができる。あるいは、ゾーン移動密度勾配遠心と同様にあらかじめ遠心チューブ内に密度勾配を形成させた後分離したい成分を上からのせ遠心すると、 $1 - \bar{v}\rho_0$ がゼロとなる位置に粒子が到達すると沈降を停止しバンドを形成する。等密度勾配遠心では、遠心により自ら密度勾配を形成する成分を利用することから、密度勾配をあらかじめ作製する必要はなく、また、スウィングローターだけでなく、垂直ローターも利用可能である。密度勾配を形成する媒体としてCsCl以外にも複数種類あり、目的に応じて使い分けられてきた。

プラスミド精製については、イオン交換樹脂を用いた抽出法が登場する以前は、CsCl密度勾配遠心が中心的に利用されてきたが、近年は簡便なキットが多数登場し、あまり使用されなくなってきた。しかしながら、密度勾配遠心は、生体物質をできる限りインタクトな状態で高純度に精製可能な手法で、さらに分画位置から分子の性質に関する情報も得られることから、今後も有効な手法であるといえる。

**その他の遠心分取法** 大量の細胞内小器官の調製のためにゾーナルローターと呼ばれるバケツのような大容量ローターで連続的に密度勾配遠心を行う手法や、遠心力と逆方向のフローを発生させ遠心力と流れをバランスしながら細胞の分画を行うエルトリトリエーション遠

心、などの手法も存在する。いずれも遠心力を利用した優れた分取法で、今後も必要に応じた利用が期待される。

### 最後に

以上、遠心分離をベースとした分取について記載した。遠心分離はストレスを抑えた条件で生体試料の分析と分取が可能な手法であり、生体試料とは相性が良い。ローターを含め装置も十分に高性能化されている。分離を利用した分析と分取手段として、フィルターを使った手法も登場しているが、遠心分離は今後も継続して利用すべき有効な手段であろう。

### 文 献

- 1) Pederson, O.: *Selected Topics in the History of Biochemistry*, p. 233, Elsevier (1985).
- 2) Fujita, H.: *Physical chemistry: a series of monographs*, Academic Press, New York (1962).
- 3) 内山 進ら: 生物工学, **89**, 371 (2011).
- 4) 内山 進ら: 抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて, シーエムシー出版 (2015).
- 5) Uchiyama, S. *et al.*: *Analytical Ultracentrifugation, Instrumentation, Software, and Applications*, Springer (2016).
- 6) 内山 進ら: 蛋白質科学会アーカイブ, **1**, e043 (2008). [http://www.pssj.jp/archives/protocol/measurement/XLA\\_01/XLA\\_01.html](http://www.pssj.jp/archives/protocol/measurement/XLA_01/XLA_01.html) March (2017)
- 7) Ohto, U. *et al.*: *Nature*, **520**, 702 (2015).
- 8) 岸本通雅ら: 新生物化学工学第2版, 三共出版 (2013).