

遠心機

1 はじめに

遠心機は遠心力によって試料中の様々な成分を分画する前処理装置である。理化学実験においては、遠心機によって試料を分画し、沈殿画分や浮上画分を得るほか、溶質の除去による試料の澄清化にも利用される。本稿では遠心機の原理や使用方法、また使用上の注意点を紹介し、遠心機を正しい理解のもと安全に使用するための知見を提供する。

2 遠心機の概要

遠心機において性能や能力を表す略号として、RPM (rpm) や RCF が使用されている。RPM (Revolution/Rotation of minute) は1分間回転あたりの回転数であり、RCF (Relative Centrifugal force) は直訳すると相対遠心力となる。これは絶対的な力の単位ではなく、地球の重力に対して何倍の力かという相対的な値になるため単位は (g) または ($\times g$) と表記される。なお、RCF は次の計算式によって算出が可能である。なお、RCF は半径 (r) では比例して、回転数では2乗に比例して大きくなる。

$$RCF = 1.12 \times r \times (rpm/1000)^2$$

遠心機は発生する遠心力の違いによって、超遠心機及び高速冷却遠心機、いわゆる普通の遠心機に大別される。超遠心機については明確な定義はされていないが、 $100000 \times g$ 以上の遠心力をうみだせれば超遠心機とされる。超遠心機の代表的アプリケーションである、タンパク質の精製、ウイルスの抽出、オルガネラの分画などは、一般に $100000 \times g$ の遠心力を利用する。 $100000 \times g$ を回転数に換算すると、おおむね固定角ロータで 30000 rpm、スウィングロータで 24000 rpm となる。

一方、高速冷却遠心機は、回転数はおおむね 20000 rpm ($50000 \times g$) 以上、最大ロータ容量は 500 mL \times 4 本 ~ 1 L \times 6 本の遠心機が多い。

3 遠心分離法の概要

本稿では遠心分離法の種類とその手法を概説する。なお、遠心分離法を大まかに分類すると以下となる (図 1)。

まず、分画遠心法のペレットリング法について記述する。最も一般的な遠心分離であり、溶媒より重い粒子を沈降させるものである (図 2)。

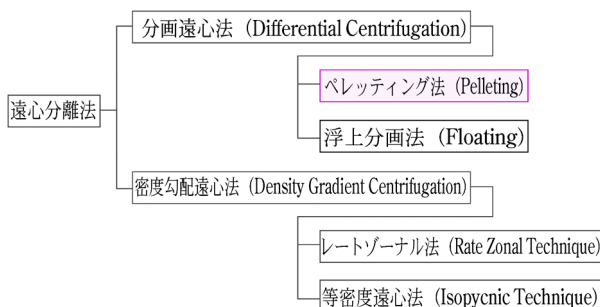


図 1 遠心分離法の分類

ペレットリング法でも必要な目的物を沈殿物から回収する場合と、不要な物を沈降させて必要な目的物を上清から回収する場合があります。前者の例としては細胞の回収、培養した細菌の集菌などがあり、後者の例は組織破碎サンプルからのタンパク質の精製などがある。このタンパク質の精製は、粗遠心後の上清を、さらに超遠心機で $100000 \times g$ 、1時間の遠心を行い、この遠心力では沈降しないタンパク質を回収する。

また、上記のペレットリング法とは逆となるが、溶媒より軽い粒子を浮かせて分離回収する浮上分画法という手法もある (図 3)。これは、サンプル溶液よりも密度が小さい成分を浮かせて分離する方法であり、代表例として血清からリポタンパク質を分離する場合がある。この分離は、NaCl あるいは NaBr などの密度調整液を血清に加えて遠心して、その調整液の上層にリポタンパク質を浮上させて回収する。

VLDL (Very Low Density Lipoprotein) 回収後に下層から一定量を別の遠心チューブに移し、再び別の NaCl 比重調整液を加えて混和後に遠心し浮上した LDL (low density lipoprotein) を回収する。沈殿からは HDL (high density lipoprotein) を回収する。以上のように浮上分画は、文字どおり浮かせて回収するものであり、ペレットリング時に沈降しない上清を回収することとは違う遠心分離法である。

次に、密度勾配遠心法について記述する。粒子の大きさや密度に大きな差がなく分画遠心法では分離ができない場合には、本手法が用いられる。なお、密度勾配遠心法はレートゾーナル法 (rate zonal technique) と等密度遠心法 (isopycnic technique) に分類される。

レートゾーナル法 (図 4) ではスウィングロータ及び密度勾配溶質の代表例としてのショ糖を使用する。密度

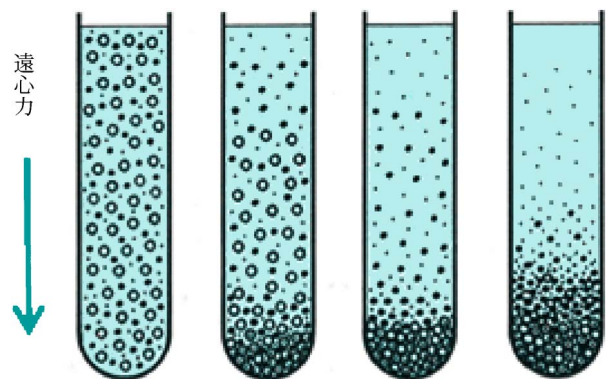


図 2 分画遠心法

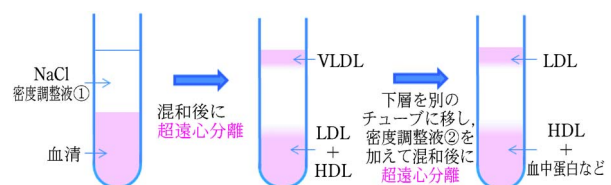


図 3 浮上分画法によるリポタンパク質の分離

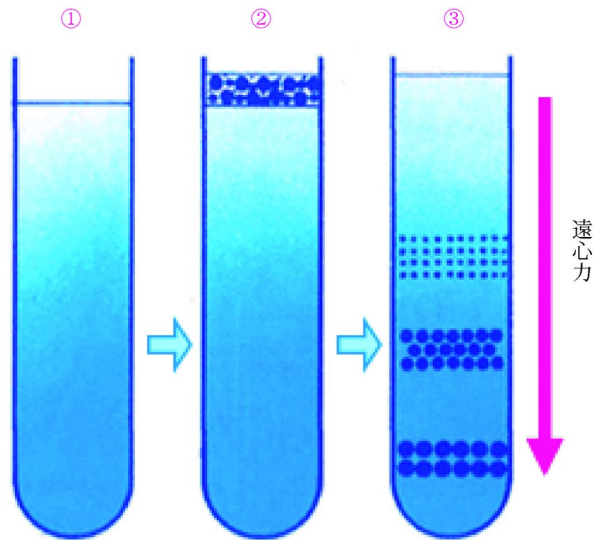


図4 レートゾナル法

勾配は連続的な勾配の場合と、ステップごと（例えば5%刻み）の場合とがある。遠心チューブ中にショ糖などの密度勾配溶液を調製しておき、その上に全体量の数%程度のサンプルを重層して遠心する。遠心後サンプル中の粒子は、その大きさや密度によって分離しバンドが形成される。このいくつかのバンドは、時間の経過とともにチューブの底に向かって沈降していき、最終的にはすべて沈降する。このような方法は沈降速度法ともよばれており、アプリケーションの例としては細胞小器官の分離などがある。

等密度遠心法は、プラスミドDNAの分離などに用いられ、バンド形成は同じであるが、最初は混合しておく方法である。

4 遠心機・ロータの安全な取り扱い

遠心機・ロータの正しい取り扱い方法の最も重要な点として、固定角ロータのサンプル配置法について記述する。往々にしてロータを、使用できるチューブ数の上限で使用するには問題がないが、上限より少ない本数で使用する場合には、決められたサンプルチューブの配置法がある。

6本がけのロータの場合は、2, 3, 4, 6本のサンプル数で遠心することが可能であるが、この場合奇数の3本でも遠心可能である（図5）。

重要な点として、均等な間隔でサンプルを配置するという事が重要である。以上のようにサンプルチューブを正しく配置することが、安全を確保し、さらにはロータの寿命を延ばすことにつながる。

5 点検及びメンテナンスの方法

超遠心機では真空のチャンバーの中でロータを回転させるが、O-リングによりロータの内部は常圧に保たれている。

O-リングが遠心中に切れたりすると、ロータ内部も真空になりサンプル漏れが起きたり、ロータの蓋がゆるんだりして大きなロータ事故につながる可能性がある。従い、O-リングの定期的な検査は安全に超遠心機を使うことにおいて非常に重要である。また、ロータの寿命を延ばす方法として、ロータの洗浄を心掛けることも重要である。遠心終了後にわずかでもサンプルがロータの穴の底に漏れていたという場合には、必ず洗浄を行う必要がある。ロータの洗浄及びメンテナンスの手順例を以下に示す（図6）。

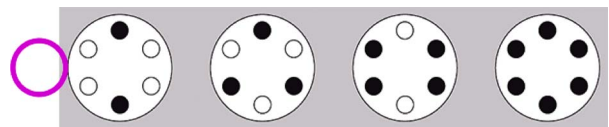


図5 6本がけのロータのサンプル配置法



図6 ロータ本体、O-リング、グリース及び蓋

- (1) O-リングを外す
- (2) ロータ本体、蓋を水洗いする
- (3) 洗剤、ブラシを使用して、ロータ内部も洗浄する
- (4) 蒸留水ですすぎ洗いを
- (5) ロータを逆さにして、乾燥させる（風乾）
- (6) O-リングにグリースを薄く塗ってから所定の場所に取り付ける
- (7) ネジ山部分に潤滑剤を塗る

以上を行うことでロータを腐食から護り、寿命を延ばすことが可能となる。

6 おわりに

本稿では、遠心機の原理や手法の概要・アプリケーション例に加え、安全な取り扱い方法やメンテナンス方法を概説した。遠心機は各種実験の前処理に用いられ、研究活動の基幹となる装置である。従い、遠心機にトラブルが発生すると、その下流の実験や研究に遅延を起しかねないリスクがある。遠心機を使用する研究室においては、取り扱い方法やメンテナンス方法の標準作業手順書の整備や定期的な教育訓練の実施が重要であり、また、運転記録（回転数や時間、温度など）の管理も必須である。またトラブルの発生を未然に防ぐためにも、点検や整備において装置ベンダーとの日常的な連携も重要と思料する。

文 献

- 1) 超遠心法による血清リポ蛋白 VLDL, LDL および HDL コレステロールの健常者平均値
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat1973/9/5/9_5_769/_article/-char/ja/
- 2) 鯨井教授の講義シリーズ
https://ls.beckmancoulter.co.jp/column/dr.yabui_ucf-lecture
- 3) 大学の共通機器室での機器管理とサポート体制について
<https://ls.beckmancoulter.co.jp/cases/view/15>

〔ベックマン・コールター株式会社 渋沢謙太郎〕