

# ゾーナルロータと密度こう配作成ポンプの開発

Development of Zonal Rotors and Density Gradient Program Pump

近野 公重\* 永田 明郎\*  
Hisashige Konno Akio Nagata

## 要 旨

ゾーナルロータとロータの中に密度こう配液を作成するポンプを開発した。本装置を使用し、インフルエンザワクチン、人血清の分離を試み高精度の分離ができることを確認した。本稿はゾーナルロータ、ポンプの原理、構造の概要および分離例について概説したものである。

## 1. 緒 言

日立工機株式会社ではすでに、55P-2形、65P形分離用超遠心機を開発している。これらの分離用超遠心機を用いて、ゾーナル遠心分離を行なうゾーナルロータとロータの中に密度こう配液を作成するポンプを開発した。

ゾーナル遠心分離を目的としたゾーナル遠心機の原形は、1961年～1964年にアメリカ保健教育厚生省(U.S. Department of Health, Education, and Welfare)により開発された。開発は、Dr. Norman G. Anderson (Biology Division Oak Ridge National Laboratory)を中心として行なわれ、1966年に、その研究報告書が発表されている。

ゾーナル遠心法には、次のような特長がある。

- (1) 分離試料の量が多い。
- (2) Wall Effect (分離試料が、チューブ壁面で乱れる現象)がないため、分離された試料の乱れが少ない。
- (3) 試料の注入、抽出や分析操作を連続的にできる。

ゾーナル遠心法による分離結果は、各研究分野で注目されている。今回開発したゾーナルロータと密度こう配作成ポンプは、この要求にこたえるものである。

## 2. ゾーナル遠心法の概要

ゾーナル遠心法は、密度こう配遠心法の一つである。以下、密度こう配遠心法とゾーナル遠心法の概要について述べる。

### 2.1 密度こう配遠心法

図1に示すロータの中に試料を入れて回転させた場合(内部で拡散が起こらないとき)分子の沈降速度は、粒子の大きさ、形状、密度と溶媒の密度、粘度および遠心加速度の大きさによって決められる。Stokesの法則によると

$$\frac{4}{3}\pi a^3(\rho_p - \rho_m) \frac{r\omega^2}{g} = 6\pi\eta av \dots\dots\dots(1)$$

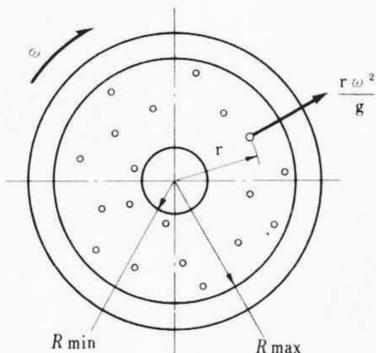


図1 回転しているロータ

$$v = \frac{dr}{dt} = \frac{2a^2}{9\eta g} (\rho_p - \rho_m) \cdot r\omega^2 \dots\dots\dots(2)$$

- ただし、 $\rho_p$ : 粒子の密度 (g/cm<sup>3</sup>)  
 $\rho_m$ : 溶媒の密度 (g/cm<sup>3</sup>)  
 $r$ : 回転軸からの半径 (cm)  
 $\eta$ : 粘性率  
 $a$ : 粒子の半径 (cm)  
 $v$ : 沈降粒子の半径方向の速度 (cm/s)  
 $\omega$ : 角速度 (rad/s)

ここで、 $\frac{2a^2}{9\eta g} (\rho_p - \rho_m) = S$  とすると

$$v = \frac{dr}{dt} = S \cdot r\omega^2 \dots\dots\dots(3)$$

SはSvedberg定数あるいは沈降定数と呼ばれる。既知粒子については、水20°Cについて一覧表がある。(3)式を積分すると沈降時間が求まる。ただし、一般に沈降定数Sは、溶媒の粘度、温度によって決まるもので簡単には求められない。正確な値を必要とする場合は、ロータ内を小分割し区分求積法で求める必要がある。実用的には、Sを一定と考え(3)式を積分すると(4)式のようになりRmin, Rmax, ωを決めれば沈降時間の目安がつけられる。

$$S = \frac{\text{Log } R_{\text{max}} - \text{Log } R_{\text{min}}}{\omega^2 \cdot (t_2 - t_1)} \dots\dots\dots(4)$$

ここで、沈降時間をTs(秒)とすると

$$Ts = (t_2 - t_1) = \frac{\text{Log } R_{\text{max}} - \text{Log } R_{\text{min}}}{S \cdot \omega^2} \dots\dots\dots(5)$$

ロータの形状と回転数によって決まるPerformance Index Piを

$$Pi = \frac{N^2}{\text{Log } R_{\text{max}} - \text{Log } R_{\text{min}}} \dots\dots\dots(6)$$

- ただし、Rmax: 回転軸からの最大半径 (cm)  
 Rmin: 回転軸からの最小半径 (cm)  
 N: 回転数 (rpm)

と定めておけば、(5)式は(7)式のようになり分離時間が決められる。

$$Ts = \frac{60}{4\pi^2} \times \frac{1}{Pi} \times \frac{1}{S} \text{ (分)} \dots\dots\dots(7)$$

よって、遠心力の場にしだいに濃くなる密度こう配液を作成し、これに数種の異なった密度を持つ試料を入れて遠心分離をすると沈降速度は近似的に(ρp-ρm)に比例するので、試料は自己の密度と等しい溶媒の密度のところに平衡を保って層状に分離されることになる。これが密度こう配遠心法である。

### 2.2 ゾーナル遠心システム

従来、細胞内物質やウィルスなどを分離する場合、水平ロータ(Swinging Bucket Rotor)のチューブの中に密度こう配液を作

\* 日立工機株式会社

成し、液面または液底に試料を注入し所定の遠心分離後分離試料を抽出して行なっていた。水平ロータを使った密度こう配遠心法には、次のような問題点があった。

- (1) Wall Effect がある。
- (2) 分離試料の量が少ない。
- (3) 小さなチューブの中で、精度よい密度こう配液を扱うことがむずかしい。

以上の問題を解決するため考え出されたのが、ゾーナル遠心法 (Zonal Centrifugation) である。ゾーナル遠心法は回転しているロータの中に密度こう配液を作成し、その中心部 (目的によっては外周部) に試料を注入し所定の回転数で遠心分離後、再び回転中に分離された試料を抽出する方法である。

水平ロータを使った密度こう配遠心法とゾーナル遠心法の比較を示したのが図2である。ゾーナル遠心法を行なうには、次の二つの方式がある。

- (1) 低速回転 (大気中、約3,000rpm) 中に、試料注入用アタッチメント (シール部) を取り付け、密度こう配液、試料を注入後シール部を取り、回転中の液漏れ防止用キャップをかぶせ所定の遠心分離を行なう。所定の遠心分離後、再び低速回転まで回転数を下げ、キャップを取りシール部を取り付けて分離試料を抽出する。
- (2) 所定の高速回転中 (真空中) に、連続的に試料の注入、抽出をする。

今回製品化した方式は、すでに発売中の分離用超遠心機を使ってゾーナル遠心法を行なうことを目的としたもので、方式(1)に属する。

### 3. 仕 様

#### 3.1 ロータの仕様

ロータの仕様は表1に示すとおりである。

#### 3.2 ポンプの仕様

ポンプの仕様は表2に示すとおりである。

表1 ロータの仕様

形式	材質	最高回転数 (rpm)	最大遠心加速度 × (g)	最大容量 (ml)	回転半径 (cm)	重量 (kg)
RPZ48T	チタン合金	48,000	171,800	660	R max 6.7 R min 2.3	7.4
RPZ35T	チタン合金	35,000	121,800	1,690	R max 8.9 R min 2.2	15.4
RPZ35	アルミ合金	35,000	91,300	660	R max 6.7 R min 2.3	4.6
RPZ22	アルミ合金	22,000	48,000	1,690	R max 8.9 R min 2.2	10.3

表2 ポンプの仕様

密度こう配作成可能な体積	ギヤヘッド(A)を使用した場合: 200~670ml ギヤヘッド(B)を使用した場合: 570~1,900ml ギヤヘッド(C)を使用した場合: 1,960~6,500ml
流量	50 Hz, 5.6ml/min~37.6ml/min : 60 Hz, 6.8ml/min~45.2ml/min
流量安定性	±1%以内 (室温15℃~55℃の変化に対して) ±2%以内 (圧力0~5kg/cm <sup>2</sup> の変動に対して)
大きさ・重量	幅34.0×奥行44.0×高さ63.0 (cm), 40kg
電源	AC 100V±5V, 2A, 50/60Hz

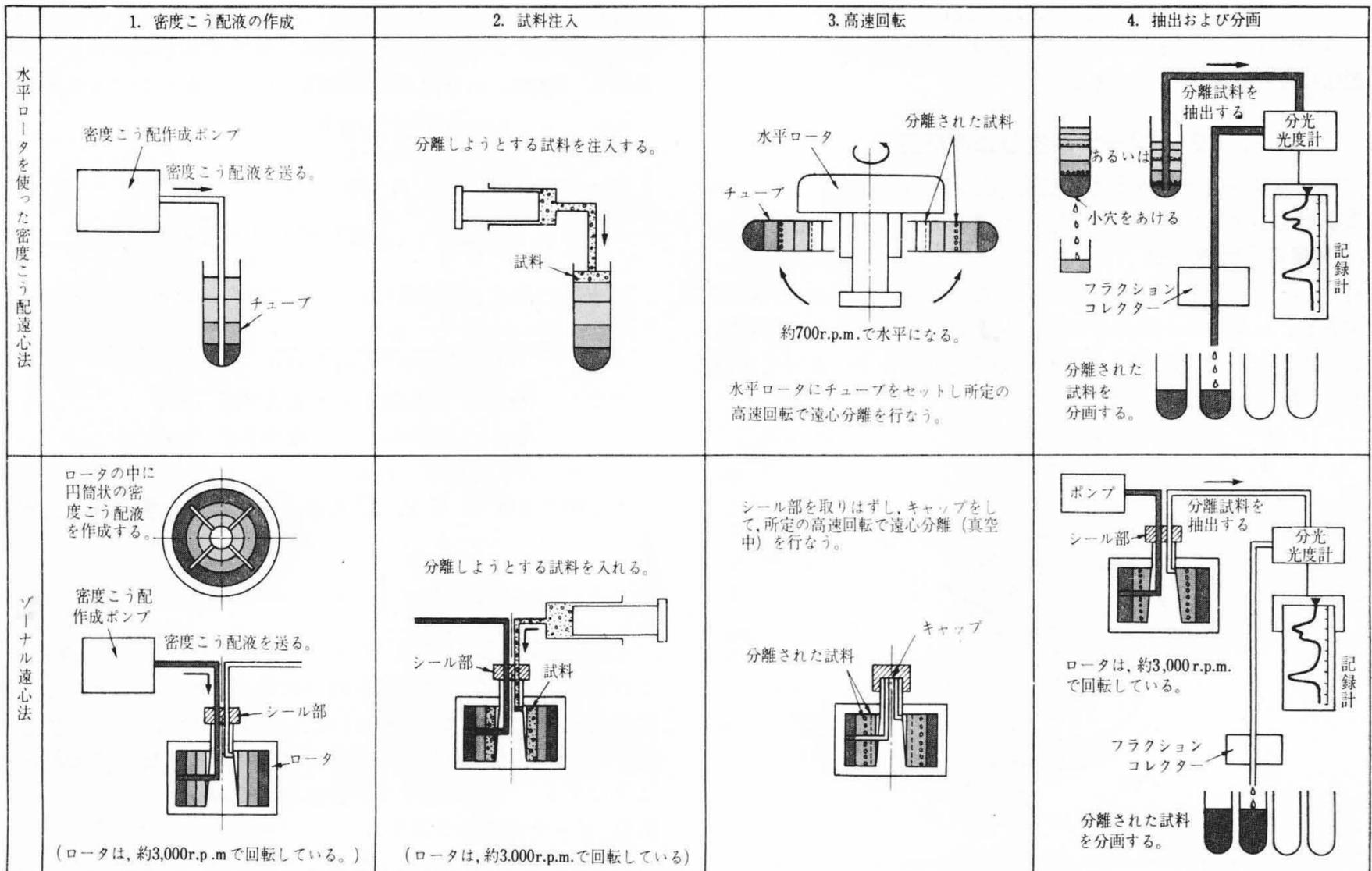


図2 水平ロータを使った密度こう配遠心法とゾーナル遠心法の比較

4. ロータについて

4.1 応力解析

ロータは、図3に示すように分離する溶液を入れ高速回転で使用される。ロータの設計にあたっては、容器に発生する応力を知ることが必要である。形状が単純であれば、簡単な計算式で予想することができるが、図3のような形状では簡単に計算できない。そこで有限要素法に注目し、電子計算機を用いてロータの応力解析を行なった。要素分割は図4のように行ない、計算にはHITAC 5020 F 電子計算機を使用した。その結果、図4のハッチングで示した部分に高応力が発生していることがわかり、これをもとに形状検討をして高応力を下げ、安全率を向上させることができた。

4.2 材 料

ロータ材料としては、高速回転に耐えることのほかに、遠心機が生化学分野で液体を試料として多く使用されることから耐食性が要求される。

回転体は自重が大きいと、その荷重により大きな遠心応力を発生し破壊する。この自重による応力に対する強さの尺度は比強度(強度/密度)で示され、比強度が大きいほど高速回転できる。比強度の大きい代表的材料を示したのが表3である。

比強度の最も大きいのは、GFRP(Glass Fibre Reinforced Plastic)とかCFRP(Carbon Fibre Reinforced Plastic)であるが、一般にFRPは異方性の材料で一方向に対し他方向の強度とか弾性係数が極端に下がるものが多い。最近、繊維の方向が改良され、比較的均一にできるようになったので注目されている。

マルエージング鋼でチタン合金より比強度の大きなものが開発されているが、加工後調質すること、耐食性がないことなど解決しなければならない問題がある。

チタン合金は、素材価格が高いこと、切削加工性が悪いことなど高価になりがちであるが、比強度、耐食性ともすぐれており、ロータ材としては最適である。

アルミ合金は、比強度、耐食性ともチタン合金に劣るが、加工性がよく比較的安価にできる利点がある。今回開発したロータには、ロータ材料としてチタン合金、アルミ合金の2種類を使用した。

5. ポンプについて

5.1 原 理

本ポンプは、ポンプに吸入される密度大なる液と小なる液の吸入割合を制御して、密度こう配液を作製するものである。2液の吸入割合を、時間の経過とともに変化させることにより任意の密度こう配を得ることができる。

5.1.1 作成体積

本ポンプは、200ml~6,500mlまでの密度こう配液を作成することができる。図5の原理図において、モータの回転を偏心カムにより、バーチカルシャフト(A)の上下運動に変換し、支点を介してバーチカルシャフト(B)を動かし、ポンプ(A)にポンプ作用を行なわせる。

モータの回転は、固定ギヤボックスと作成体積によって交換するギヤボックスにより減速され、プログラムドラムに伝達される。モータの回転数(ポンプ(A)のストローク数)とプログラムドラムの回転数の関係は、(8)式で示すことができる。

$$n = N \cdot G_1 \cdot G_2 \dots \dots \dots (8)$$

ただし n : プログラムドラムの回転数 (rpm)

N : モータの回転数 (rpm) あるいはポンプのストローク数 (回/min)

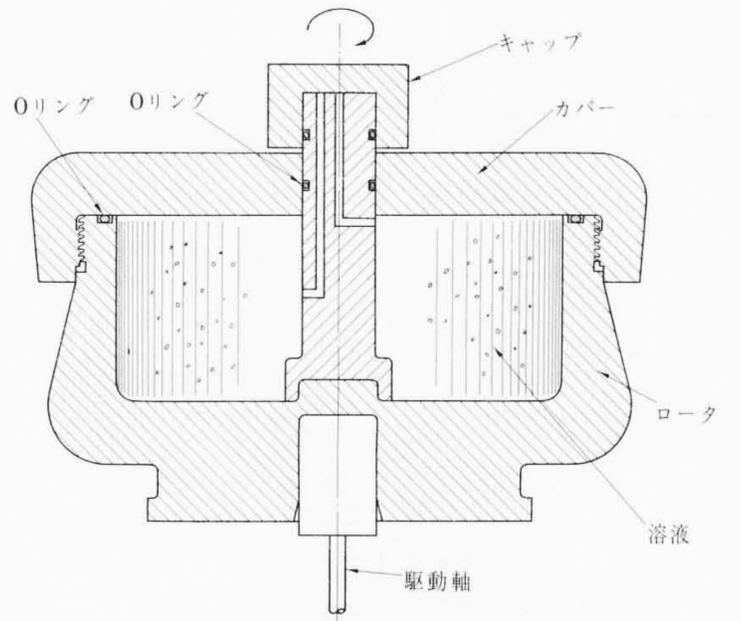


図3 ロータの使用状態

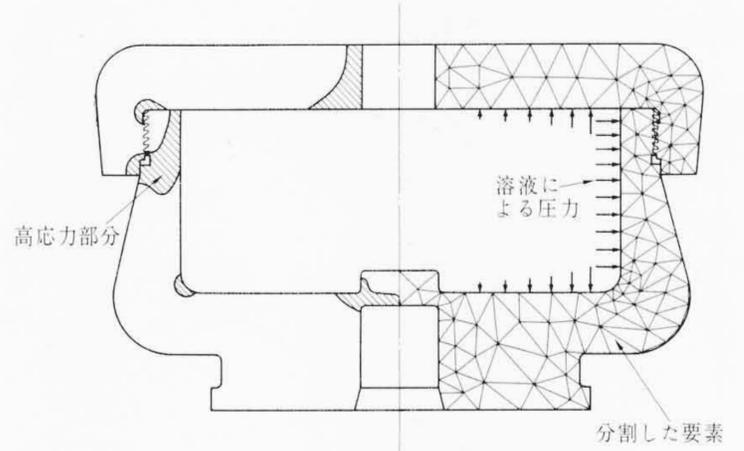


図4 要素分割と解析結果

表3 種々の材料と比強度

項目 材料の種類	引張強さ (kg/cm <sup>2</sup> )	単位体積あたりの重さ (kg/cm <sup>3</sup> )	比強度 (cm)
アルミ合金	55 × 10 <sup>2</sup>	2.8 × 10 <sup>-3</sup>	19.6 × 10 <sup>5</sup>
チタン合金	90~120 × 10 <sup>2</sup>	4.5 × 10 <sup>-3</sup>	20~26.7 × 10 <sup>5</sup>
GFRP	122 × 10 <sup>2</sup>	2.02 × 10 <sup>-3</sup>	61.0 × 10 <sup>5</sup>
CFRP	73 × 10 <sup>2</sup>	1.54 × 10 <sup>-3</sup>	47.5 × 10 <sup>5</sup>
マルエージング鋼	200 × 10 <sup>2</sup>	8.0 × 10 <sup>-3</sup>	25.0 × 10 <sup>5</sup>

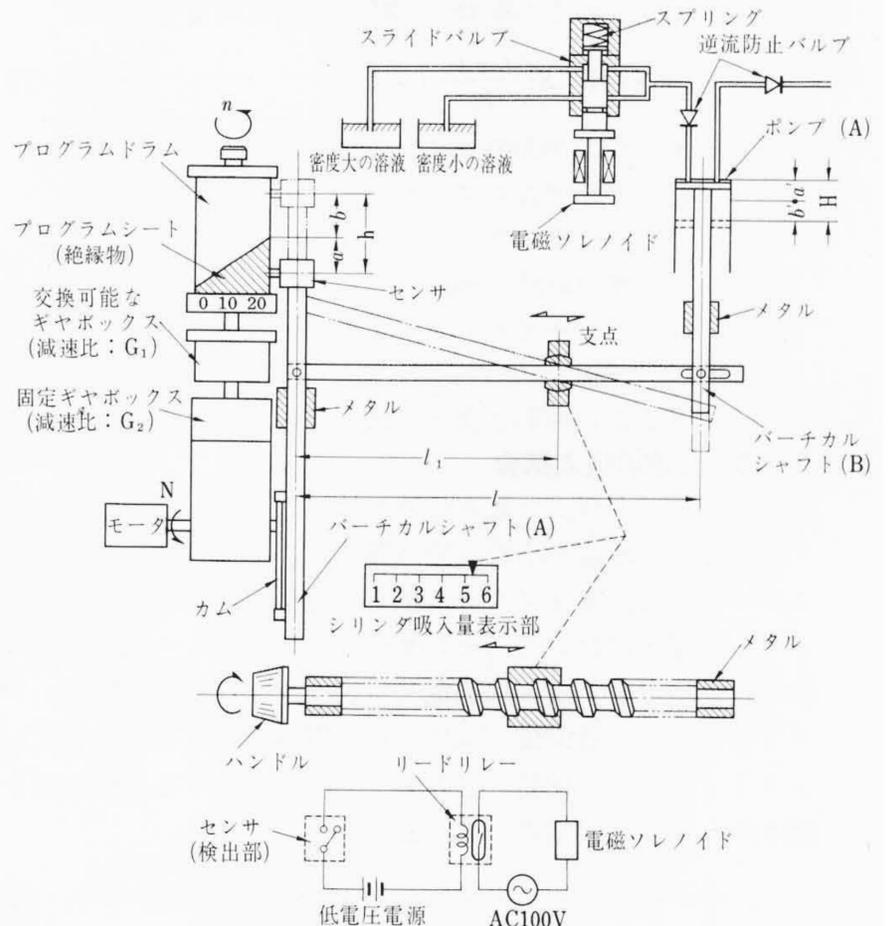


図5 ポンプの原理図

$G_1$  : 交換可能なギヤボックスの減速比

$G_2$  : 固定されたギヤボックスの減速比

また、プログラムドラムの有効回転角を  $\theta$ 、時間を  $T$  とすると

$$2\pi n T = \theta \dots\dots\dots (9)$$

したがって、 $T$  時間内におけるモータの総積算回転数（ポンプの総ストローク数）は、(10)式のようになる。

$$NT = \frac{\theta}{2\pi} \cdot \frac{1}{G_1 G_2} \dots\dots\dots (10)$$

また、ポンプ(A)が  $T$  時間内に送出する液量（作成する密度こう配液の量）は、(11)式で示すことができる。

$$V = V_0 \cdot NT = V_0 \cdot \frac{\theta}{2\pi} \cdot \frac{1}{G_1 G_2} \dots\dots\dots (11)$$

ただし、 $V_0$  : ポンプ(A)の1ストロークあたりの吸入量(ml)

よって、作成体積( $V$ )は、ポンプ(A)の1ストロークあたりの吸入量( $V_0$ )と、交換可能なギヤボックスの減速比  $G_1$  により決定される。図6はポンプ(A)の1ストロークあたりの吸入量と作成体積の関係を式したのもである。

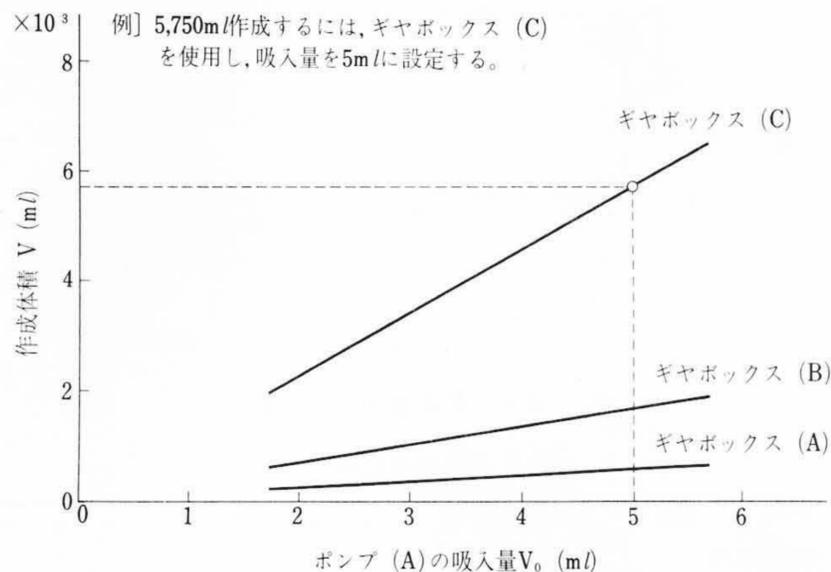


図6 作成体積と吸入量の関係

5.1.2 ポンプ(A)の吸入量

ポンプ(A)の吸入量調整は、ポンプ(A)のストロークを本体前部のハンドルにより支点を移動させることにより行なわれる。ポンプ(A)の吸入量と支点までの距離の関係は、(12)式のようになる。

$$V_0 = S \cdot H = S \left( \frac{l-l_1}{l_1} \right) \cdot h \dots\dots\dots (12)$$

ただし、 $S$  : ポンプ(A)のシリンダ部断面積 (cm<sup>2</sup>)

$H$  : ポンプ(A)のストローク (cm)

$l$  : パーチカルシャフト(A)とパーチカルシャフト(B)の距離 (cm)

$l_1$  : パーチカルシャフト(A)から支点までの距離 (cm)

$h$  : カムの形によって決まる一定ストローク (cm)

5.1.3 2液の吸入割合

プログラムドラムに取り付けたプログラムシートの形によって、密度大なる液と小なる液の吸入割合を決定する。プログラムシートには、ポリエステル紙を使用し電氣的に絶縁物の役目をする。図5において、センサがプログラムシート上にある場合は、電磁ソレノイドに通電せず密度大なる液を吸入し、プログラムドラム（導電体）部にくると電磁ソレノイドに通電し、スライドバルブを切換え密度小なる液を吸入する。吸入割合は図5から決まり、(13)式が成り立つ。

$$\frac{a}{b} = \frac{a'}{b'} \dots\dots\dots (13)$$

ただし、 $a$  : プログラムシート部の長さ (cm)

$b$  : プログラムドラム部の長さ (cm)

$a'$  : ポンプ(A)のプログラムシート部に対するストローク (cm)

$b'$  : ポンプ(A)のプログラムドラム部に対するストローク (cm)

(13)式より、各吸入工程ごとの2液吸入割合は、支点を移動させてポンプ(A)のストロークを変えても、常にプログラムシート（絶縁部）の長さ( $a$ )と導電部の長さ( $b$ )に比例する。プログラムドラムは、時間の経過とともに回転するので、吸入割合はプログラムシートの形によって制御される。

5.1.4 密度こう配の作成（プログラムシートの作成）

一般に、ロータの中に作成する密度こう配の形は、研究目的によって直線形、凸(とつ)形、凹(おう)形などがある。最も代表的な直線形の密度こう配液をRPZ48T形ロータの中に作成する場合について述べる。

作成しようとする密度こう配液の密度とロータの半径の関係を、図7に示す。またRPZ48Tロータの半径( $r$ )とロータ内の体積( $V$ )の関係は、(14)式で示すことができる。

$$V = 18.6r^2 - 23.8r - 5.2 \dots\dots\dots (14)$$

これより、ロータの内容積と作成する密度の関係を、プログラムシート上に作図することができる。実用にあたっては、各ロータの内容積と半径の関係をグラフ上より求めることができるようにしてある。作図したプログラムシートを、線に沿って上側を切り落とせばよい。

作成したシートを図8に示す。

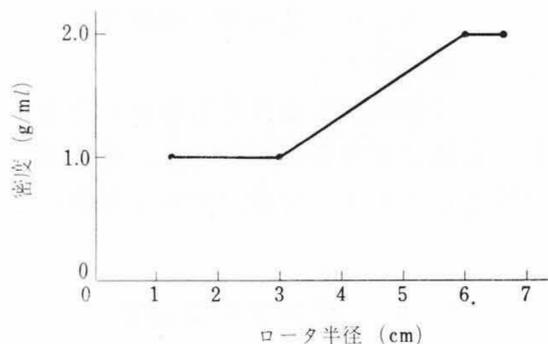


図7 作成する密度こう配の形

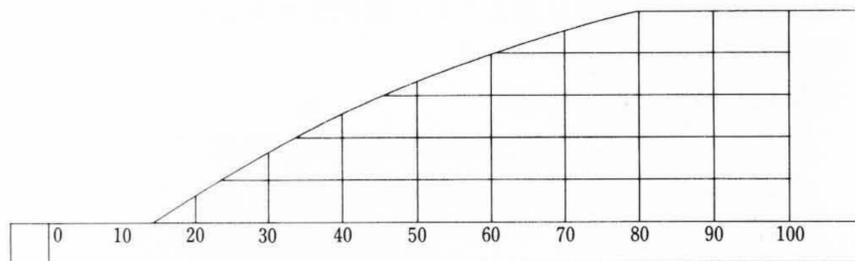


図8 作成したプログラムシート

6. 構造

6.1 ロータとその付属品

図9は、ロータ構成品とその付属品の外観を示したものである。ロータは、ロータ本体、セプタ、カバーより構成される。ロータ室内部は、セプタにより四つの扇状形に分けられている。セプタは、4枚の羽根を持ち、それぞれの羽根にはロータ外壁に通ずる穴と中心部に通ずる穴がつけられている。それぞれの穴は、ロー

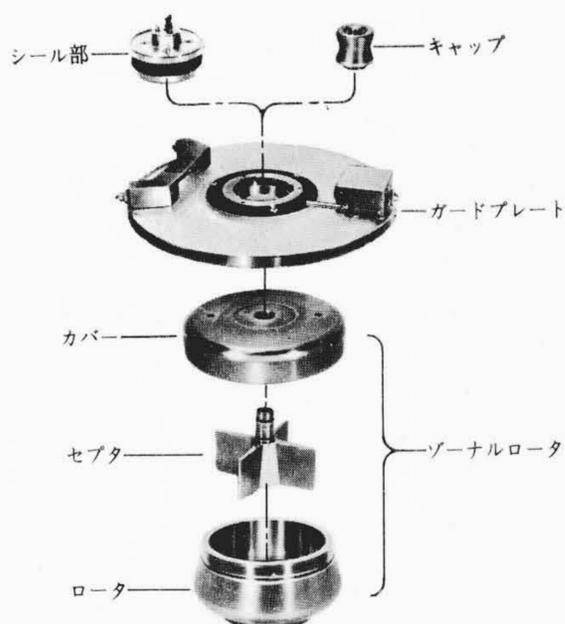


図9 ロータと付属品の外観

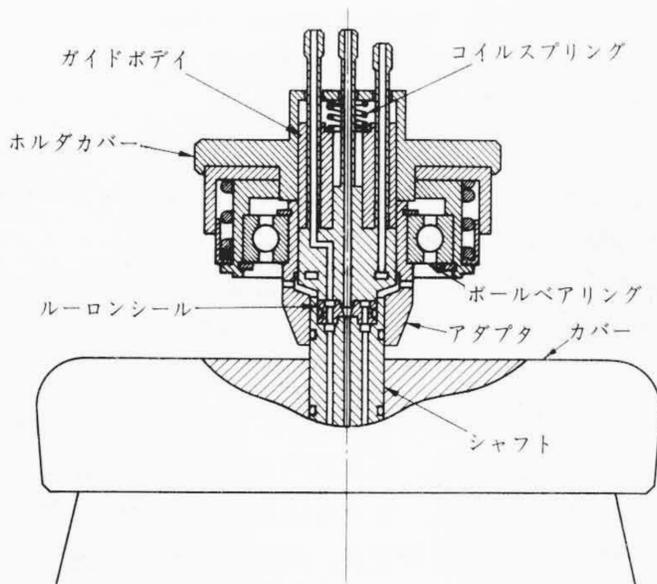


図10 シール部の構造

タ室に密度こう配液および試料を注入，抽出するとき使用される。

図10は，シール部の構造を示したものである。シール部は，回転しているロータの中に密度こう配液を注入，抽出する場合に使用されるもので，低速で回転しているロータに取り付け，取りはずしされる。ロータに取り付けられたシール部は，ガードプレート（ゾーナルロータを使用する場合のみ，ロータ室上部に取り付ける）により保持される。4本のパイプのうち2本は，密度こう配液，試料の注入，抽出用で，他の2本はシール部を冷却する場合，冷却水を流すために使用される。

キャップは，密度こう配液および試料を注入後，所定の高速遠心分離（真空中）を行なう際，ロータ内の溶液を密封するのに使用される。

### 6.2 ポンプ

本ポンプの外観は，図11に示すとおりである。本ポンプは，ポンプ(A)とポンプ(B)の2組のピストン式ポンプにより構成される。ポンプ(A)は，5.1に説明したようにこう配液の調合にあたるものであって，本体前部のハンドルにより，その吸入量を変化させることができる。ポンプ(B)は，吐出液が断続しないように設けた補助ポンプであって，その吸入量は常にポンプ(A)の吸入量の1/2になっている。また，ポンプ(A)と(B)のピストンの動きは逆で，ポンプ(A)が吐出工程時，ポンプ(B)はポンプ(A)よりの吐出液の半分を吸入しポンプ(A)が吸入工程時前工程で吸入した液を吐出する。こうして吐出液の切れを少なくしている。

プログラムドラムには，作成しようとする密度こう配の形に切り込んだプログラムシートを取り付ける。プログラムドラムの側

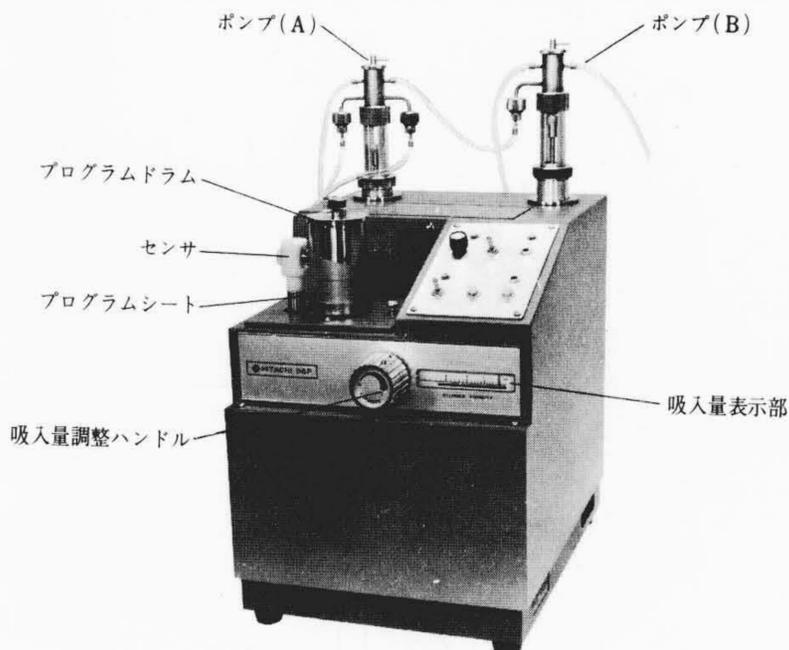


図11 ポンプの外観

面には，バーチカルシャフト(A)の上部にセンサがあり，プログラムドラムの導電部と絶縁部（プログラムシート）を検出する。このセンサによりスライドバルブの動きを制御し，密度大なる液と小なる液の吸入割合を決定する。プログラムドラムの下部には，作成体積の進行状態を表示する目盛があり，これが100%に達することはあらかじめ設定された密度こう配液が作成されたことを示すもので，ポンプは自動的に停止し停止信号がでる。

### 7. 実用試験

開発したゾーナルロータとDGP形プログラムポンプを用いてインフルエンザワクチンと人血清の分離，分析を行なった。

#### 7.1 インフルエンザワクチンの分離

インフルエンザワクチンは，100m $\mu$ 程度の球形粒子で沈降定数が，500~700 S（Sは，Svedberg定数）であることが知られており，短時間に結果を得るには好適な試料である。ゾーナル遠心分離を行なうに先だち，水平ロータによって沈降位置および密度こう配の範囲を求めた。その結果，ワクチンの沈降位置は密度1.2 (g/ml)付近に，シャープなピークとして分割できることがわかった。これらをもとにして，ゾーナル遠心分離の条件を次のように決めた。

条件

(1) 使用機械およびロータ	65 P 形分離用超遠心機，R P Z 48 T 形ゾーナルロータ
(2) 回転時間および分離時間	40,000 rpm, 20分 (20°C)
(3) 密度こう配液および形状	サッカロース液，10%~60% 直線形
(4) 試料の量	30ml
(5) 密度こう配注入速度	37.4 ml/min (ロータの回転数3,000 rpm)
(6) 抽出速度	25 ml/min
(7) 分析装置および条件	
分光光度計	日立124形(フローセル使用)
記録計	日立QPD34
波長	260m $\mu$ (スリット幅0.5)
スケール	ABS 0-2
記録速度	5 mm/min

図12は，インフルエンザワクチンの分離結果を示したものである。

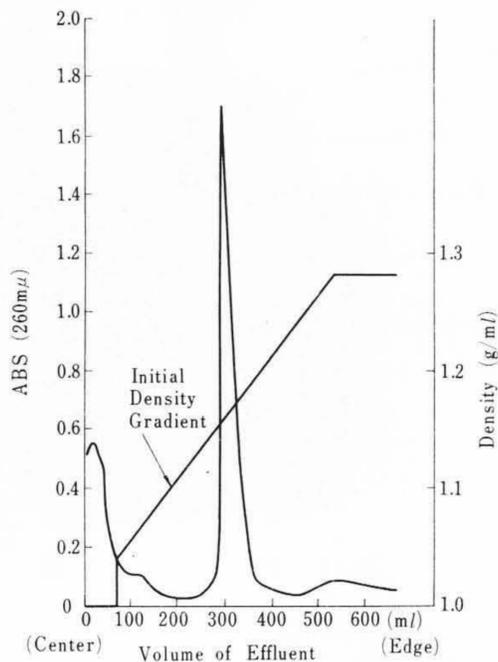


図12 インフルエンザワクチンの分離例

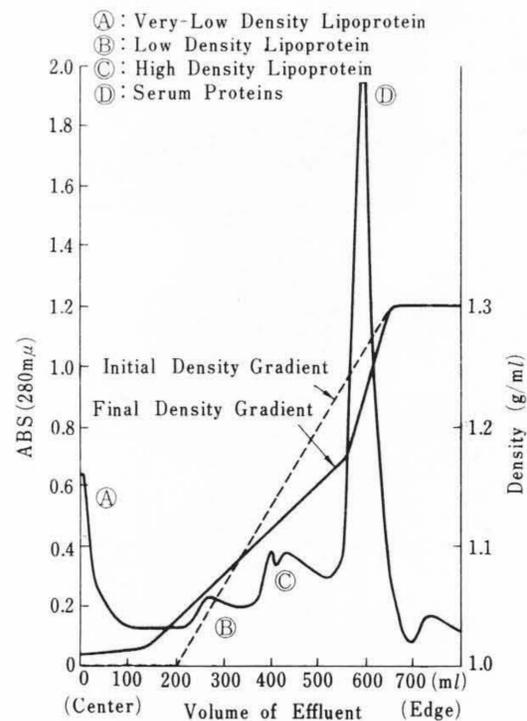


図13 人血清の分離例

7.2 人血清の分離

人血清の分析は、これまで電気泳動法が主流であったが、最近ゾーナル遠心分離による血清中のリポタンパク質の分離が報告され注目されている。本実験は、この報告をもとに再現実験を行ない、ゾーナル遠心システムの機能を試験した。人血清は、採血後3時間放置し、上澄み部をRP30ロータで、4,000rpm（遠心加速度 $1,940 \times g$ ）、20分遠心分離し上澄みを取り試料とした。

条件

1. 使用機械およびロータ 65P形分離用超遠心機, RPZ 48T形ゾーナルロータ
2. 回転数および分離時間 48,000rpm, 20時間(5℃)
3. 密度こう配液および形状 サッカロースとKBrを重量比2:1で混合し、密度は1.0~1.2(g/ml)とした。直線形
4. 試料の量 10mlとし、ロータの外周部に入れた。
5. 密度こう配液注入速度 37.4ml/min(ロータの回転数3,000rpm)
6. 抽出速度 21.2ml/min
7. 抽出液 密度1.3g/ml サッカロース液
8. 分析装置および条件
  - 分光光度計 日立124形(フローセル使用)
  - 記録計 日立QPD34
  - 波長 280mμ(スリット幅0.5)
  - スケール ABS 0-2
  - 記録紙の送り 5mm/min

図13は、人血清の分離結果を示したものである。

8. 結 言

以上、ゾーナルロータと密度こう配作成ポンプの仕様・原理・構造・分離例などについて述べた。

本装置の開発により、すでに製品化した55P-2形、65P形分離用超遠心機により、ゾーナル遠心分離を行なうことが可能となった。

終わりに、開発にあたって種々ご指導を賜った大阪大学医学部深井教授、五十嵐氏、東京医科歯科大学中尾教授、日立製作所那珂工場吉田副技師長、また有限要素法の解析にご尽力いただいた日立研究所岩崎主任研究員、清水研究員に深謝する。また試作および試験にご協力いただいた関係各位に厚くお礼申し上げます。

参 考 文 献

- (1) Anderson, N. G.: The Development of Zonal Centrifuges, Monograph 21. (1966, J. Natl. Cancer Inst)
- (2) C. De Durve, J. Berthet: Biophys. chem, 9.325-369 (1959)
- (3) 井上, 小谷: 理科学辞典, 707 (1953)
- (4) 品川: 医学薬学実験装置ハンドブック, 104 (昭40-10)
- (5) 東, 石田: ウイルス学, 676 (昭44-6)
- (6) 平井, 島屋: 電気泳動法, 理論と医学的応用134, 共立全書112 (昭30)
- (7) Henry G. W., M. Heimberg: Biochem. Biophys. Acta, 152, 424-426 (1968)
- (8) 強度設計データブック編集会編: 強度設計データブック, 1021 (昭37)