Applied Measurement with Ultra Centrifugal Analysis Apparatus

#### 鵜 沼 充\* 伸 Ш 崎 Nobumitsu Unuma Yoshikazu Yamazaki

#### 内 梗 概 容

日立 UCA-1 形超遠心分析装置は種々の付属品を完備することにより、従来のものからその応用測定範囲が 拡張されている。すなわち高分解能を有する位相板 (phase plate)の使用, ロータ加熱温度制御による常温で 不溶もしくは難溶性の高分子物質の沈降解析の可能化、試料に応じて使用する分析用各種セル、および操作を 簡便化した自動撮影装置などをこのたび製品化したので、今回は超遠心分析機の一般説明と沈降理論を述べ各 製品の用法、性能について報告する。本報告には、実験結果からみたわれわれ独自の意見も多分に含まれてい る。

1. 緒 言

超遠心分析装置においては, 種々の特殊な付属装置を開発するこ とによって,その応用範囲が著しく拡張された。これによってこの 装置の利用価値は,従来の付属装置に比較して数倍大となる。本報 告は日立超遠心分析装置 UCA-1 形に最近採用された分析用各種セ ル,加熱温度制御装置,および位相板 (Phase-Plate)について述べ,



これらの装置の組み合わせによって沈降測定の基礎的なものから, 高分子の沈降理論の説明, 生物科学における応用, あるいは鎖状高 分子に対する応用など理学,工学,医学方面に使用され超遠心独自 の本領を発揮している。

# 2. 超遠心分析装置の一般的説明<sup>(1)(2)</sup>

超遠心分析装置は、遠心力場における溶液中の高分子物質の移動 速度を決定し,また比較的低速回転を行なっている遠心力場での高 分子物質の分離状態を決定するものである。超遠心分析装置による 沈降測定には大別して, 沈降速度法 (Sedimentation Velocity Method)と沈降平衡法 (Sedimentation Equilibrium Method) とがあ る。

前者のほうはかなり広く用いられ、ロータを高速回転(43,700~ 60,000 rpm) で使用しロータにそう入された試料に濃度変化を生じ させ、その変化量をシュリーレン円筒レンズ法(第3図参照)で写真 測定するのである。第1図Aは時間の経過とともにセル内の距離の 関数として濃度変化を示したものであり,第1図Bは沈降定数を決 定するための濃度こう配を示す。このBから沈降分子の形状および 大きさに関係ある沈降係数を直接導き出すことができる。またかな り信頼性のある拡散係数も求めることができるので分子量も求めら れる。

後者は比較的低速回転(6,000~12,000 rpm)で操作される。この 状態のもとで長時間後遠心力方向の溶質の移動は、溶液内の拡散に よって求心力方向とつりあいの状態になる。沈降速度法では、こう いったセル内の拡散の影響はさほど重要ではない。沈降平衡法にお ける初期の状態では、セル中心付近の濃度は始めの濃度と同じであ るが,時間の経過とともに濃度のプラトー範囲がなくなり,長時間



第3図 シュリーレン円筒レンズ法

またこのほか, Archibald法<sup>(3)</sup> (Approach-to-Equilibrium Method) があり、メニスカスとセル底の溶質分子状態を測定して直接 分子量を求める方法で, 合成分子としての多分散系溶質, 理想的単 分散系溶質の相互作用などに応用されている。

沈降分析は以上述べたように種々あるが、沈降速度測定では拡散 を無視できる状態(鎖状高分子, コロイドなどの溶液)を扱い, 沈 降平衡測定では(沈降と拡散の密接な関係を取り入れる)蛋白質な

後遂に平衡状態に達してしまうのである。第2図A, Bはこの変化 を示している。沈降平衡法によれば、沈降物質の分子量は直接求め られる。ただし溶質の部分比容値を必要とする。この方法にはいろ いろな因子の補正はするが理論的根拠は速度法よりもいっそう確実 さがあり蛋白質の研究ではかなり注目されている。

どを扱うが実験に数日,ときには数週間という長時間を要するのが 欠点である。この二つの方法の中間, すなわち Archibald 法は沈降 平衡実験の所要時間を短縮できるのでかなり重要視されてきてい る。現在日立製作所では、速度法、平衡法、Archibald 法すべての 測定が可能であるよう顧客の要求によりそれらの付属装置を取り付 けている。

日立製作所那珂工場



分子に対する運動方程式は次のようになる。

$$\left(\frac{M}{N_A}\right)(1-\bar{\boldsymbol{v}}\rho)\frac{d^2x}{dt^2} = \left(\frac{M}{N_A}\right)(1-\bar{\boldsymbol{v}}\rho)\omega^2x - f\frac{dx}{dt}$$
......(4)

また  $M/N_A$  は溶質分子の質量 (M は分子量,  $N_A$  はアボガドロ数) で  $\bar{v}$  はその体積,  $\rho$  は溶媒の密度である。したがって ( $1-\bar{v}\rho$ ) は浮力 補正項である。

さらに溶質の質量が小さいとして左辺の慣性項を無視して(1), (4)より

ただし分子摩擦係数fは直接測定することができないので、fの評価には無限希釈における  $f_0$ と拡散常数  $D_0$ との間に成立する Einstein の関係、

より Do を算出し(5)(6)より

ここで左辺は1個の高分子に作用する慣性力で,右辺の第1項は遠 心力,第2項は摩擦係数*f*が溶質分子の速度*dx/dt*に比例すると考 えたときの摩擦力である。

第5図 回転軸と分析用セルとの関係

## 3. 沈降理論

沈降理論の解析は遠心力上における溶質分子の運動を記述する方 程式の解にその基礎をおいている。

いま遠心力場の方向 x に dt 時間内に溶質が溶媒中を沈降する距離を dx とすれば、沈降速度は dx/dt で表わされる。この沈降速度を遠心力の強さ  $\omega^2 x$  (ここで  $\omega$  は回転の角速度、x は中心より着目した溶質分子までの距離)で割った量を沈降係数 (Sedimentation Coefficient) S と定義する。すなわち

 $S \ \text{ic cm/s/dyne/g at tit }$  ない  $S \ \text{ic cm/s/dyne/g at tit }$   $S \ \text{ic cm/s/dyne/g at tit }$ 

いま回転軸とセルとの関係を調べてみる(第5図参照)。

n(x,t): 時刻 t, 距離 x における単位面積当たりの溶質分子

**Q**(*x*,*t*): 時刻*t*,距離*x*における円筒面を通過する溶質 分子の単位時間当たりの数

とすると,

$$Q(x,t) = \left(\omega^2 Sxn(x,t) - D \frac{\partial n(x,t)}{\partial r}\right) x \theta a \dots (2)$$

ここに  $x, \theta, a$ は、考える中心からの x の距離における セルの断面 積、D, Sは考察点における溶質分子 n(x, t) の拡散定数および沈降 (7)は Svedberg の公式と呼ばれる最も普通に使用される関係式 である。

沈降平衡法の場合は、平衡条件として $t \rightarrow \infty$ ですべてのxに対してQ(x,t) = 0(2)式から

$$\frac{\partial n}{\partial x} = \frac{\omega^2 S x n}{D}$$
  
$$\therefore \quad \frac{\partial n}{n} = \frac{\omega^2 S x \cdot dx}{D} \qquad \int_{n_a}^{n_b} \frac{dn}{n} = \frac{\omega^2 S}{D} \int_{x_a}^{x_b} x dx$$
  
$$\therefore \quad \ln \frac{n_b}{n_a} = \frac{\omega^2 S}{D} \cdot \frac{1}{2} (x_b^2 - x_a^2) \quad \dots \dots \dots \dots \dots (8)$$

Einstein の式から $f_0D_0 = RT$ を用いて(8)に代入すると

となる。

ここに*a*,*b*はセルの中にある溶液柱の界面および底面を表わす。 溶質が均一で溶液が十分希薄であれば単一溶質系として求めた(9) 式から分子量を求められるが鎖状高分子のような多分子性の物質の 研究には(9)式から求めることはできないので,分子量分布が重要 な問題でありその分布を知るために,数平均分子量,重量平均分子 量,平均分子量など分子量のいろいろの種類の平均値を実験的に求 めることが問題となる。

Archibald 法<sup>(3)</sup>は、メニスカスおよびセル底面において、流束が 零であることから(3)式より導かれる。溶質が均一分子である場合 だけを考えると、(3)式を  $x_a$ (液面)、 $x_b$ (底面)の間で積分すると

係数である。この流束の表示にもとづいて溶質の流れに対する連続 方程式を作ると,

 $\frac{\partial n}{\partial t} = \frac{1}{x} \cdot \frac{\partial}{\partial x} \left[ \left( n S \omega^2 x - D \frac{\partial n}{\partial x} \right) x \right] \dots (3)$ 

沈降速度法,特に分子量の大きな高分子物質の場合には,その分

子のブラウン運動はあまり激しくなく、(3)式の拡散に基因する第

2項は第1項に比べて無視できる。このような場合には1個の溶質

 $(\partial n/\partial x) x_a = x_a n \delta$ ,  $(\partial n/\partial x) x_b = x_b n \delta$  であるから左辺は0



# 4. 分析用各種セルの使用法

超遠心分析装置は試料に応じてセルの使用法があり測定範囲が拡 張されるが、このたび製品化されたセルでは次に説明するような応





左より厚さは3mm, 5mm, 13mm, 17mm である。 第6図 シングル・セル(Single-Cell)









Schlieren-Pattern (A) Optical path の大きい高濃度の Schlieren-Pattern (B) 試料: ポリスチレン (平均分子量 20~25 万) 濃度: 0.55 g/100 ml 溶媒: M.E.K.

- 回転数: 60,000 rpm
- 角 度: 75度

用測定がある。

4.1 標準セル(Single-Cell)

これは最も普通のセルでわれわれはシングル・セルと呼んでいる が、第6図に示すとおりである。この種々の変化ある厚さは光路長 をかえているので大変意味がある。このセルの選択は溶液の濃度に よって決定するもので、高濃度の試料では光学的長さを小さくする ことにより可能となる(第7図A)。すなわちシュリーレン円筒レン ズ法(第3図)からスリットを通った後、コリメーテングレンズに平 行光束となって測定セルに入射する。この平行光束のうち測定セル A、Cのように濃度こう配(屈折率こう配)のない所を通る光は、 ビューイングレンズによりダイヤゴナルバー(ビューイングレンズ の焦点)にスリットの像を作る。しかしBのような屈折率こう配の ある位置を通る光束は、そのこう配*dn/dx*に比例した量だけ光軸よ りかたよった位置に像を結ぶ。その偏位は Snellius の法則から

- d: セルの厚さ(Optical path of the cell)
- l: ビューイングレンズからダイヤゴナルバーまでの 距離(Optical lever arm)

したがって(12)式から、濃度が高い場合  $\left(\frac{dn}{dx} \propto \frac{dc}{dx}\right)$  はダイヤゴ ナルバーからはずれて**第7**図Bに示すような Schlieren-Pattern と 第9図 合成界面セル (Synthetic Boundary Cell)

### 4.2 耐酸耐アルカリ用セル (Acid and Alkaline-Proof-Cell)

試料が強酸,強アルカリの場合,標準セルに使用されている超々 ジュラルミンの材料では,アルマイト処理を行なっているにもかか わらず,おかされてしまって使用することができない。最近では特 に試料に強酸強アルカリを使用する場合が多くなってきて,その種 のセルは必須なものとなってきている。製品化されたセル(**第8**図) は,従来の材料 (超々ジュラルミン)<sup>(10)</sup> をリングとして Kel-F (三 フッ化エチレン)<sup>(4)</sup>をはめ込みシュウ酸アルマイト処理を行なった ものである。Kel-F は非圧縮性のものであるゆえ,リングの抗張力 が十分もてばそのセル自体は安全である。したがって有機溶媒のど んな試料でも,標準セルと同じような使用法でさらに測定範囲が拡 張される訳である。試料としては,沈降速度法にて解析する S>1のものがおもに使用されている。

### 4.3 合成界面セル(Synthetic Boundary-cell)

このセル(第9図)は、分子量が比較的小さいもの、たとえば高分 子物質で分子量数万ぐらいのものや、生化学物質で数百ないし数千 くらいの分子量のものは、沈降界面測定にあたり沈降速度が遅くか つ拡散の影響が大きいため一般にある程度の濃度を必要とする。し たがって第6図に示したような標準セルでは,低分子量物質の沈降 定数の測定を行なうとメニスカスより界面が分離するのに長時間を 要し、さらに界面が大きく広がって明確な沈降界面をうることがで きない。そのためこのような低分子量物質の測定を行なう場合には 回転中溶液に溶媒を重層させ人工的に界面を形成させ沈降定数の測 定を行なうセルが合成界面セルである。第10図に合成界面セルの 構造を示す。 セルの扇形窓部の一部には穴があいていて, 溶液と溶 媒を別々に注入して使用する。すなわちセル組み立た後横に倒し, 溶液を約 0.4 ml 扇形窓部に注入し,溶媒約 0.25 ml を入れたコップ であらかじめはめ込まれたゴムせんでふさぐようにそう入する。ロ ータにそう入後ロータを回転させると回転数が増大するにつれゴム せんが遠心力にて圧縮され,扇形窓とコップ間にすきまを生じ,コ ップの小さい穴より溶媒がセル内にもれ、溶液に重層される。した がって人工的に溶液層と溶媒層との間に界面を形成する(第19図)。 現在の最大回転数は 60,000 rpm であり, 沈降定数 S<1 の場合は合

なり,光路長を小さくする(セルの厚さを小さくする)ことにより (12)式の偏位を小さくすることで測定可能となる(第7図A)。実際 乾板に写る像は倍率 G (円筒レンズによる縦倍率)とすれば  $Y=Z \cdot G \cdot \cot \theta$  $\theta$ ;水平とダイヤゴナルバーとの傾斜角度 また,この扇形は溶質が沈降する際に対流が起きて測定不可能とな らないように扇形角4度を取っている<sup>(2)</sup>。



2065



少量しか処理できないが、沈降の進行が比較的対流にわずらわされ ず, 試料をとるときのかくはんの影響が避けられること, また光学 的に観察できることが特長である。

4.5 ダブルセル (Double-Cell)

これは第12図に示すように二つの扇形窓部からできている。シ ュリーレン光学系で使用する場合は、一方の扇形部に溶媒を、もう 一方には溶液をそう入して溶液のパターンとともに溶媒でその基線

第14図 干渉法とダブル・セルの関係図

ットを入れれば、レリーの干渉計として使用することができる。こ の場合各レンズ・セルおよびスリットの位置はシュリーレン法とま ったく同じでフェーズ、プレイトは不要である。共通な光源スリッ ト S<sub>1</sub>から出た光は入射平行スリットによって二つの光線に分かれ, ダブルセルの窓C1, C2を通って乾板面で再び合する。この場合,二

を決める(流体静力学レベルを与える)。この方式によれば溶液中に	つの光路長が等しければ乾板面の光軸では明らかなしまとなる。
ある多分散系物質が,主成分より大小さまざまなときにこの溶液,溶	すなわち
媒の関係を比較して沈降物質の濃度を正確に知ることができる(2)。	$P' - P = \left(n + \frac{1}{2}\right)\lambda$ $n = 1, 2, 3$ iff
試料が低濃度かつ低分子では、シュリーレン光学系での測定は不	
可能で、ここにレリー干渉光学系(第13図)を用いて干渉しまの移	$P'-P=n\lambda$ n=1,2,3 明
動から分子量を求める。すなわち光源スリットを遠心力方向と一致	干渉を起こす二つの光束の一方の通路に屈折率 μ₀, 他方には屈折率
させ, 試料セルにはダブルセルを使用し, 入射スリット, 出射スリ	μ,厚さを入れると (μ-μ₀)tの光路差が生ずる。この光路差のなか
131	



70 オーム) にし,温度制御時は直列(抵抗17.5 オーム)にて使用す

#### 第16図 加 熱 装 置 部

には(μ-μ<sub>0</sub>)t/λ 個の波が含まれているから干渉しまは

$$J = \frac{(\mu - \mu_0)t}{\lambda} = \frac{\Delta \mu t}{\lambda} \qquad (\texttt{A})$$

となる。この λ は, 超高圧水銀灯の 546.1 mµ の単色光で Nd-filter および cut-filter (500 m µ 以下をするどくカットする)の組み合わせ により得られる。すなわち, 波長 λ, 試料の厚さ t を知り, しま(フ リンジ)の移動を測定すれば屈折率の差を求めることができる。始 めに屈折率の濃度変化 ∂µ/∂c を測定しておけば、干渉しまの移動か ら試料濃度変化がわかる。干渉法は第14図のダブル・セクタセル により観測できる。

### 5. ロータ加熱温度制御装置

高分子化学の進歩につれ,分子量分布が当然必要となってくる。 しかしながら常温にていかなる溶媒にも不溶,もしくは難溶性の高 分子物質は沈降法の適用が不可能であった。このたび、回転中のロ ータ加熱,温度制御装置(第15図)を製品化したので測定対象範囲 が拡張されている。

5.1 仕 様 測定温度および制御温度範囲 室温~70℃ 温度測定精度 平均測温誤差 0.2°C 最大測温誤差 0.3°C 温度制御精度 ±0.3℃ 加熱温度設定精度 ±1℃ 70℃における最高回転数 51,200 rpm 5.2 原理と構造

る。並列の状態で使うとワット数が直列の場合の4倍となり、ロー タが大容量の熱を受けることになり、この状態でヒータの ON, OFF 式制御を行なうと温度変化幅が広くなり、精密な温度制御を期する ことができないので、設定温度近くなれば自動的にヒータが並列か ら直列に切り換わり制御時は必ず直列状態で使用するようになって いる (第17図)。

これは零位法であるから、 ヘリポットを用いメータを零点に合わ せて,おのおののサーミスタの温度較正グラフ (ヘリホットの目盛 と温度との関係)からロータの温度を検出できるようになってい る。特に大事なのは、温度上昇に対するロータ(超々ジュラルミン) の抗張力である。これはロータの破壊現象となるので十分な検討が 必要となる。現在の段階では 70℃ までは最高回転数 51,200 rpm と いう数字がでている。これは Alcoa-75 S のデータから導きだされ、 実験の結果安全とみられている。今後の問題については、さらに高 温を必要とする高分子物質の測定のために高温化を目標として研究 中である。

# 6. 位相板(Phase-Plate)による高分解能 Schlieren Pattern

超遠心機において応用されているシュリーレン・円筒レンズ法 (第3図)に従来では、Diagonal-Bar または Diagonal-Wire を使用 し Schlieren-Pattern を得ていた。しかし低分子量でかつ拡散が大 きい試料では、Schlieren-Pattern の山が小さく(2)式からわかる ように  $\theta$  の 値を 小さくして 高倍率 (High Magnification Angle) に しないと測定できないものがある。しかしのを小さくすると光の回 折現象を生じ Schlieren-Pattern はぼけてしまい測定不可能となっ てしまう。今度,従来の方式を変えて位相板(第18図)を作成し, 第19図に示すような鮮明な屈折率こう配曲線のけわしい像を得る

ロータは高真空室内(10<sup>-4</sup> mmHg 以上)で高速回転が行なわれる ので、放射熱による温度を受熱板(白金ブラック)に接触したサー ミスタ (TM 600) にて検出し、その抵抗変化をブリッジの一端に入 れ、零位法による制御法を取っている。加熱装置部は第16図に示 すとおり、ヒータ、検温部およびヒータ台からなっており、ヒータ はロータ側面を囲むような位置にニクロム線(0.57 ø)を筒状に無誘 導巻きしたもので、中間タップを取り出し直列並列の使い分けを1

ことができるようになった。

位相板<sup>(7)</sup>とは MgF<sub>2</sub>を40 $\phi$ のガラス半面に hard-coating して, coating していない部分と, coating してある部分を透過した Mercury green line (λ=546.1 mµ)が位相差を半波長だけ生じるように したものである。中心に電線の張ってあるのは, base-line を決める ためである。これは、コルニュー曲線の回折現象から説明でき Z<sup>(7)(8)</sup>





位相板 角度 50度 Bar 角度 70度 試料は砂糖水 1% Weight-Percent, 角度が小さい程 High Magnification である。

第19図(A) 合成界面セルによる比較写真である



2067



第18図B 位 相 板

# 7. 自動撮影装置その他

長時間超遠心機を運転し沈降を行なう場合,当然自動撮影装置 (第20図)が要求されてくる。これは、ディジタルタイマ使用のト ランジスタ形無接点方式である。限時設定範囲は撮影間隔0~59分, 最小目盛り1分,露出時間0~3分59秒,最小目盛り1秒で6枚ど りである。このほか最近の化学工業では粉体が問題となっているこ とから、当然粒度分布が必要となってくる。超遠心を利用して、懸 濁液の粒子を強制沈降させ、その状態を光電管で受光して自記させ、 その曲線から粒度分布を求めるものも製品化した。

# 8. 結 言

以上最近製品化された付属品について,構造および性能について 述べた。今後は,さらに高温の加熱制御および紫外吸収装置などの 付属品を完備させ,新知識と新製作技術とによりさらに精度の高い よりすぐれたものにすることを念願して努力してゆきたい。本製品 を進めるにあたり,終始ご指導を賜わった日立製作所中央研究所明 山部長,日立工機徳重部長,牧野副工場長および超遠心機関係者各 位に深く感謝の意を表わす。 参考文献 (1) 佐々木重雄編:超遠心機とそれによる蛋白質およびヴィー

試料: アルブミン 濃度: 2% 回転数: 60,000 rpm 角度: 65度 60,000 rpm 設定40分後の写真である。

第19図(B) 位相板による Schlieren-Pattern (ただし標準シングルセルによるもの)



ルスの研究(日本学術振興会刊) (2) Schachman: "Ultracentrifugation in Biochemistry" (3) W I Archibald: I Phys Chem 51 1204 (1947)

(3) W. J. Archibald: J. Phys, Chem. 51, 1204 (1947)
(4) Verne: Nschu Makerand Barbara Marano Achieves of Biochemistry and Biophysics., 94, 532 (1961)
(5) E. G. Pickels, H. K. Schachaman: Proc, N. A. S. 39, 943 (1952)
(6) T. Svedberg: Nature. 140, 848 (1937)
(7) R. Trautman: Biochemica Biophysica Acta., 40, 26(1954)
(8) 久保田宏: 応用光学(岩波全書)
(9) 大沼ほか: 日立評論 40, 501 (昭 33-4)