

Bioluminescence による波浪中の衝撃圧力分布計測法の開発へ向けた基礎的研究

Fundamental Study for Measuring Spatial Distributions of Impact Pressure by Bioluminescence

渡部靖憲¹・田中康文²

Yasunori WATANABE and Yasufumi TANAKA

Fundamental optical responses of bioluminescent dinoflagellates, *Pyrocystis lunura* under impacting water pressure were measured in the imaging experiment. Effects of biological parameters, such as fatigue and biorhythm, to the responses were also examined. A good correlation of the bioluminescent intensity and the dynamic pressure was obtained on the basis of our proposing statistical image preprocessing, indicating a possibility to develop new bio-measurement tool for acquiring spatial distributions of hydro-dynamic pressure.

1. はじめに

構造物-碎波相互作用に関して非常に多くの研究が行われてきたにも関わらず, 衝撃碎波圧の定量的な予測の一般化は達成されていない。碎波圧は一般に非再現的であり, またその圧力変動は時空間的に局所的である一方, 圧力変動を点計測に頼らざるを得ず, 重要な個々の碎波に対する局所的圧力空間分布を取得する計測ツールが存在しないことが, 衝撃碎波圧問題の解明を遅らせている。

近年になって植物プランクトンの Bioluminescence, (BL と略記, 生物発光) を利用して, 流体中の応力を計測しようとする試みが行われている (例えば, Latz・Rohr, 1997)。Stokes ら (2004) は, 渦鞭毛藻類である *Pyrocystis fusiformis* (PF) を混入した波浪水槽で碎波を発生させ, PF の発光分布の画像計測から流体中のせん断力分布を見積もる試みを行っている。しかしながら, BL の応力応答だけでなく, バイオリズム, 生物的疲労など発光に影響を与えるファクターに対する応答が十分理解されていないため, 実用化までは程遠い状況である。しかしながら, かつてない非接触で空間的応力分布取得可能となれば, 未解明問題に新たな知見が得られることは確実であり, 新たな計測法として期待すべきである。

本研究の目的は, 圧力応答性のある植物プランクトン *Pyrocystis lunura* (PL と略記) による BL を画像計測することにより, 流体中の衝撃圧あるいは動圧力の空間分布の計測法を開発することである。個体差を含めた生物発光の不確実性を統計処理により低減し, 計測結果に反映させない新たな方法を提案し, 生物的衝撃碎波力測定システムとしての可能性と実用化へ向けた基本特性について議論している。

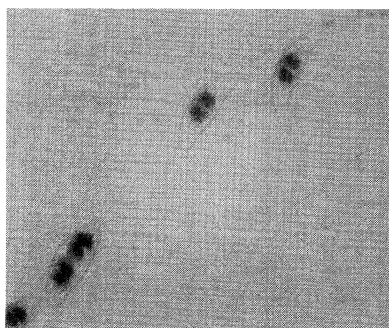


図-1 *Pyrocystis lunura* の顕微鏡写真。

2. Bioluminescence

力学的あるいは化学的な外的作用に対して発光する海生生物がチョウチンアンコウやホタルイカなどの大型生物から植物プランクトンなど微生物に至るまで多数存在することは知られている。本研究で BL による圧力の生体センサーとして採用した渦鞭毛藻類の *Pyrocystis lunura* (PL) は, 体長約 30~40 μm の微生物であり (図-1 参照), 国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲された株 (NIES-609) を昼12時間夜12時間のバイオリズムの下で培養し増殖させたものである。PL の Bioluminescence のメカニズムは, 酸素存在下におけるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応であり, 外的刺激が加わると反応が進行し酸化型ルシフェリンが生じるときに青色光 (ピーク波長 474nm) が放出される。この外的刺激には, 化学的生息環境の変化 (例えば液体の PH が急に変化するなど) と力学的変化が報告されており, 化学的变化のない液体内において, 結果として発生する BL の輝度を画像計測することで力学的変化を取得することが可能となる。

1 正 会 員 博 (工) 北海道大学 准教授 大学院工学研究科

2 学生会員 北海道大学大学院工学研究科

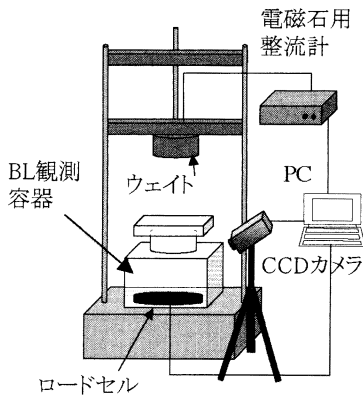


図-2 実験装置.

3. 実験方法

海水中にPLを数密度 N で混入させた $5 \times 5 \times 5 \text{ cm}$ の透明アクリル製容器の上蓋に重さ 1298 g のウェイトを落錘高さ $h=1 \sim 10 \text{ cm}$ から落下させ、容器内に衝撃砕波力を模擬した衝撃力を発生させる (図-2参照). なお、PLの数密度は予め培地中のPLをデジタル顕微鏡で観察し、単位容積内のPL数から換算したものである. 容器斜め上方から12bit高感度カメラ (40Hz, 解像度 $105 \times 245 \text{ pixel}$) でPLの発光を撮影すると同時に容器底部に設置したロードセルにより圧力を計測した. カメラとロードセルは、電磁石によって固定されていたウェイトを開放する際に送信されるTTLトリガー信号によって同時計測され、同一時刻における生物発光と圧力の関係を取得できる. 予めフォトダイオードで計測したBLと同色人工光に対する光起電力と計測画像の関係から、BL強度を較正、換算する. 表-1に示すように、発光強度が相対的に強い夜間において種々の時刻、PL数密度、そして落錘高さを変えて実験を行い、圧力応答の基本特性を調査した. なお、PLの疲労による応答の変化を調べるため、全てのケースについて、5分の間隔で同一実験条件の裁荷を繰り返し実験を行った.

4. 解析方法

容器内のPLは、十分な時間の経過後、容器底面に着床する. 底面上を斜め上方から撮影した取得画像は、線形投影により実座標に対応する正方形画像へと変換される. 載荷後、最大発光を示す位相において、BLの局所ピークの位置をPLが存在する位置と定義し、それら個々のPL位置における換算光起電力の時系列について統計的に評価する. 生育状況、バイオリズムや疲労等、個体差による不確実性が現われるBLによる光起電力 (k) の検出された総個体数に対する平均 ($\bar{k}$) と標準偏差 (σ) は、

表-1 実験条件

case	$h(\text{cm})$	$N(\#/\text{cm}^3)$	水温($^{\circ}\text{C}$)	バイオリズム
1	1.0	333	20	夜5hr後開始
2	1.5	485	20	夜5hr後開始
3	2.0	416	20	夜5hr後開始
4	2.5	347	20	夜5hr後開始
5	3.0	319	20	夜5hr後開始
6	4.0	430	20	夜5hr後開始
7	2.0	1817	23	夜5hr後開始
8	5.0	2150	22	夜5hr後開始
9	7.0	804	22	夜5hr後開始
10	10.0	902	22	夜5hr後開始
11	10.0	776	21	夜12hr後開始
12	10.0	1290	22	夜8hr後開始
13	10.0	582	23	夜6hr後開始
14	10.0	1165	22	夜1hr後開始

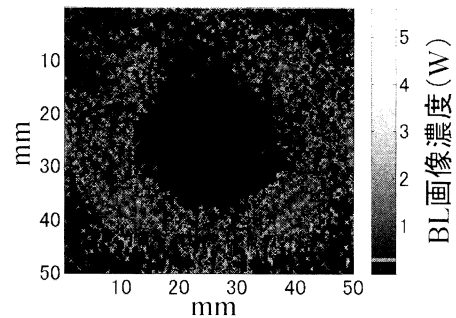


図-3 変換されたBLの画像とPL位置(case6, 最大発光を示す位相).

$$\bar{k} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n k \quad (1)$$

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (k - \bar{k})^2} \quad (2)$$

ここで、 n は検出できたPL位置の総数である. 一方 n は、容器内に混入させたPLの総数とは大きく異なる. つまり、同一の荷重下においても発光しないPLあるいは計測上検出できないレベルのBLを発光するPLが多数存在しており、これらの個体差の影響を受けずに定量的に作用した圧力を算定するためには、BLの発光確率を元に統計的に評価し標準化する必要がある. 図-4は、case10の最大発光位相におけるBLによる画像濃度のヒストグラムの一例を表している. この例が示すとおり、個々のPLが発する光起電力 k に対してPL個体数 $g(k)$ が指数関数で近似可能であることがわかる. 即ち、PLの発光確率密度(f)は、定数 B をもつ指数分布として次の様に表して良いであろう.

$$f = e^{-Bk} \quad (3)$$

画像から検出されないPLも含めた個体数分布は、未知定数 A を使って

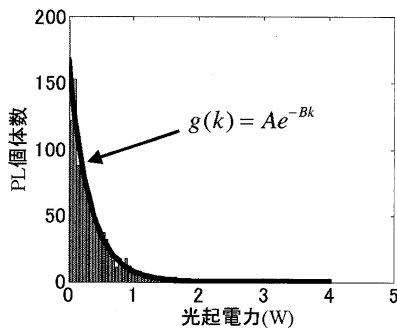


図-4 最大発光位相におけるBLによる画像濃度のヒストグラム(case10).

$$g = Af = Ae^{-Bk} \quad (4)$$

と仮定する。これらの定数 A, B は、外力に対する力学的な応答を表し、これらを最小二乗法で決定し分布関数を基に標準化することにより個体差を含めた作用応力を見積もることができる。標準化後のBL画像濃度の平均は、

$$\bar{k}_e = \frac{\int g k dk}{\int g dk} \quad (5)$$

で与えられ、 $\bar{k}_e$ と圧力の関係が調べられる。

5. 結果

衝撃圧発生時のPLによるBLの光学的応答の基礎を以下に調査し、新たな計測法としての適応性、実用性、これらに対する問題について議論を行う。

(1) BLの基礎的力学応答特性

個々のPLは、静加重には応答しないが、衝撃力による動圧力変化に伴い青色に発光する。図-5は、落錘落下高さをパラメータとする平均光起電力の時間変化とcase6の最大光起電力を示す前後の位相におけるBLの変化を表している。衝撃力の発生直後、BLは線形的に上昇し最大発光を示した後、指数関数的に減衰する。このBLの時間変化の特徴は全てのケースに共通するものであるが、落錘高さの増加に応じて最大光起電力が増加する。この圧力に対応したBL光起電力の変化は、BLによる圧力計測の可能性を示唆するものである。この光起電力が最大となる位相の前後では、ドーナツ状に分布したPL位置において、その発光強度にばらつきを持ちながらも平均的に増減していることがわかる。なお、ドーナツ状PLの分布は、荷重を海水へ直接伝える容器の円柱状上蓋直下において、動荷重発生時に海水中で僅かな圧力差が生まれ中心付近のPLが同心円状に移動させられることに因るものであり、計測に関して影響を与えるものではない。

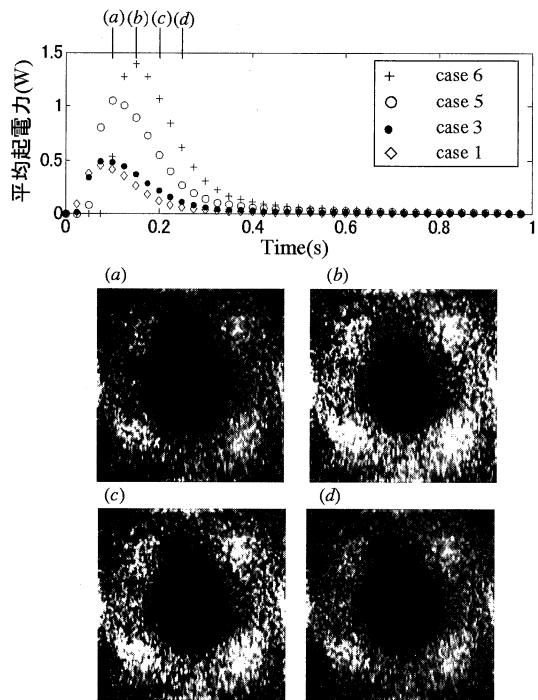


図-5 平均光起電力の時系列(上)と case 6 に対する底面上のBL分布(下)。

図-6は、衝撃圧力とBLによる光起電力の時間変化を比較したものである。衝撃圧が極めて短時間で最大値となる間に、BL光起電力は上昇を開始する。その後、圧力が減衰し十分低下するまでの経過時間約0.05s後によりやくBL光起電力が最大値となる。この衝撃圧発生からBL光起電力のピークまでの遅れ時間は、PLに働く圧力に依存せずどのケースにおいても約0.075s程度であった。即ち、この遅れ時間は本研究で採用した微生物PL固有の応答性を示すものであり、少なくともこの遅れ時間より短い時間内の変動(13Hz以上)を解像できないことを意味している。特に今回対象とする衝撃圧に対しては、高周波で変動する圧力には応答しないため、圧力の位相情報ではなく最大圧力のみ計測可能となる。

光起電力の標準偏差の時系列は光起電力と類似した時間変化を示す。光起電力の標準偏差と最大値の比は、高い衝撃圧ほど高くなる。つまり、混入したPLの中には個体差から、ある程度までしか発光できないものも含まれ、高い圧力ほどばらつきが大きくなると考えられる。このばらつきを考慮した標準化された光起電力 $\bar{k}_e$ もまた平均光起電力と類似した時間変化を示す。

図-7は、case 7~10に対するBLの光起電力を衝撃圧の最大値及び力積と比較したものである。平均光起電力を考えた場合、その増加が衝撃圧あるいはその力積の増加

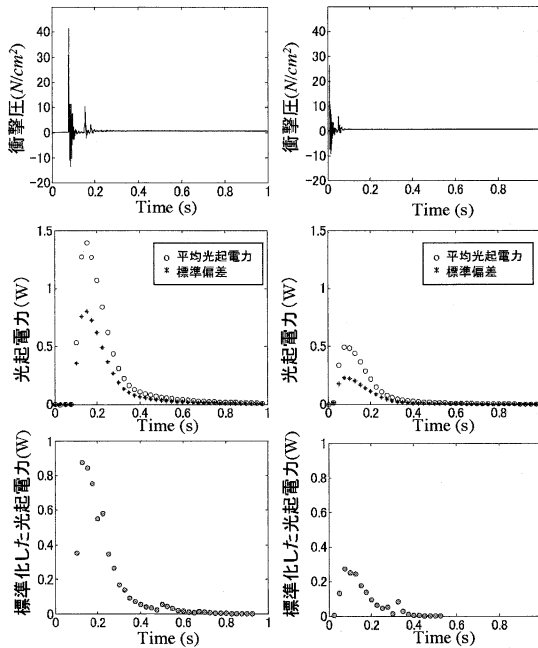


図-6 衝撃圧力(上), 光起電力の平均及び標準偏差(中)と標準化された光起電力(k_e)の時系列: 左; case 6, 右; case 3.

を表すとは限らないことがわかる。一方、標準化された光起電力は、PLの数密度の差異及びPLの個体差による発光度合(発光のし易さ)を発光分布関数により標準化しているため、最大衝撃圧及び力積共に最大光起電力に対して単調増加している。即ち、予めこの関係を較正值として与えることにより標準化された光起電力を計測することで最大衝撃圧及び力積を計測できる可能性がある。

図-8は、case 1~6の図-7と同様な比較を表したものである。これによると、発光し得るPL数自体が非常に少なくなり統計的評価が困難となる圧力が低いケース case 1 及び 2 では、相対的に誤差が大きくなるが、それら以外のケースでは図-7と同様に標準化された光起電力は衝撃圧と良い相関をもつ。しかしながら、これらのケースはより高い衝撃圧が課せられている図-7のケースよりも強い光起電力が生じている。case 1~6とcase 7~10は、異なるシャーレではあるが同一環境の下で培養されたものであり、唯一異なるパラメータである水温がBL発光強度に与える影響についてさらなる研究が必要である。

(2) 疲労の影響

BLの生物の疲労による影響についていくつかの研究がある。Blaserら(2002)は、発光渦鞭毛藻類の一種である *Pyrocystis fusiformis* の攪拌の繰り返し実験によるBLの低減について調べている。本研究では、PLに対する5分間隔で行った繰り返し衝撃力载荷実験によるBLへの

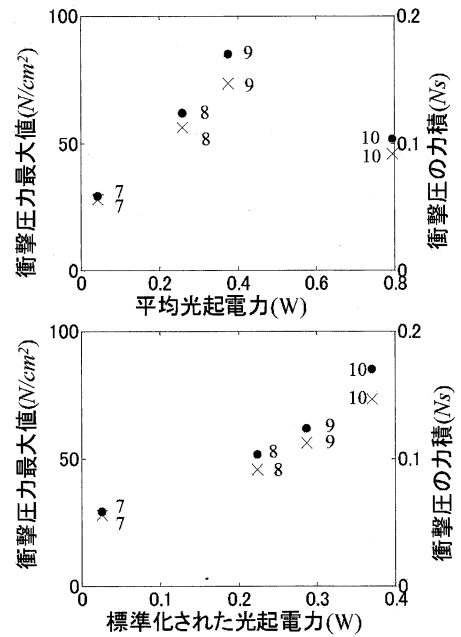


図-7 最大衝撃圧、衝撃圧の力積と平均光起電力(上)、標準化された光起電力(下)との関係(case 7~10)。

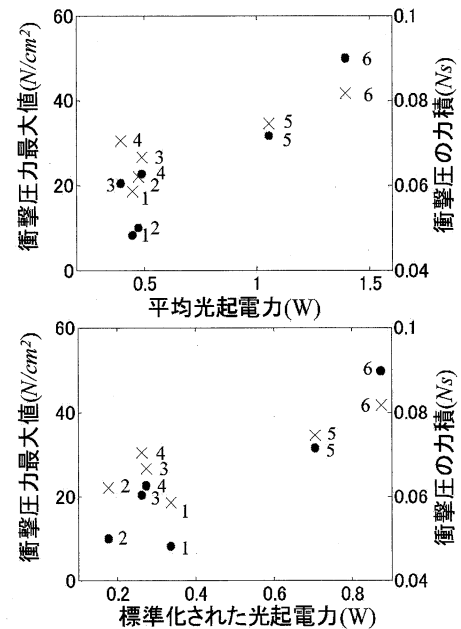


図-8 最大衝撃圧、衝撃圧の力積と平均光起電力(上)、標準化された光起電力(下)との関係(case 1~6)。

影響について調査を行った(図-9参照)。どのケースも初回の光起電力が最も高く、2回目の载荷では初回の光起電力と比べて半減する。光起電力の低下率は、発光し

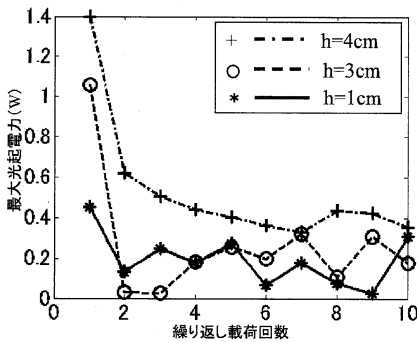


図-9 繰り返し衝撃荷重下での光起電力の変化.

た履歴に依存し、高い圧力下で高強度で発光するほど顕著となる。さらに繰り返し载荷を継続すると、ほぼ一定のBL強度で発光するようになるが、発光履歴によりBL強度が変化し相対的に変動成分が大きくなるため、PLが疲労状態での計測は適切ではないと考える。力学的刺激以外にBL強度に作用する一因としてバイオリズムの影響がある (Widder・Case, 1981)。一般には、渦鞭毛藻類は昼間に発光強度は低く夜間に高くなる傾向があるといわれている。同一の衝撃荷重下におけるバイオリズムの発光強度への影響 (case 10~14) を比較した結果、夜間4,5時間後が最も安定した発光を得られることが確認された。

6. 結論

個々のPLは、静加重には応答しないが、衝撃力による動圧力変化に伴い青色に発光する。最大BL強度を発した後、指数関数的に減少する。

生物を使った制御で最も困難な問題は、生育速度、環境、活動履歴等の差異による個体差をどのように処理するかである。個々のPLの位置に対応するBLによる光起

電力に対して、PL個体数分布が指数関数で近似可能であることが明らかになった。このPL個体数分布を基にBLの光起電力分布を統計的に標準化し、大きく逸脱したBLを排除可能となる。この方法により、初期PL投入密度に依存せずに計測可能となる。

標準化されたBL画像濃度平均は、任意の落錘高さ h における衝撃圧の力積及び最大衝撃圧と高い相関がある。これらの関係を較正值として与えれば、BLによる光起電力分布から衝撃圧を計測することが可能であると考えられる。しかしながら、未解明であるBL強度の水温依存性を明らかにして適切な較正值を取得する必要がある。

繰り返し载荷を受ける場合、応力履歴がない場合と比較して、BLによる光起電力は低下する。即ち、PLの疲労を考慮する必要がある。光起電力の低下率は、発光した履歴に依存し、高い圧力下で高強度で発光するほど顕著となる。

バイオリズムの夜間4,5時間後が最も安定した発光を得られることが確認された。

BL強度に与える生物的要素による影響について未解明な点が残されている。信頼性のある生体圧力センサーの開発に向けてさらなる研究が必要である。

参考文献

- Blaser, S., F. Kurisu, H. Satoh, T. Mino (2002): Hydromechanical stimulation of bioluminescent plankton, *Luminescence*, 17, pp.370-380.
- Rohr, J., J. Allen, J. Losee, and M. I. Latz (1997): The use of bioluminescence as a flow diagnostic, *Phys. Lett. A*, 228, pp.408-416.
- Stokes, M. D., G. B. Deane, M. I. Latz, J. Rohr (2004): Bioluminescence imaging of wave-induced turbulence, *J. Geophys. Res. Oceans*, 109, pp.1871-1879.
- Widder, E. A., J. F. Case (1981): Two flash forms in the bioluminescent dinoflagellate, *Pyrocystis fusiformis*, *J. Comp. Physiol.*, 143, pp.43-52.