Bioluminescenceによる流体衝撃圧計測法

Bioluminescence Imaging Measurements of Impact Fluid Pressure

渡部靖憲¹·田中康文²·坂井 純³

Yasunori WATANABE, Yasufumi TANAKA and Jun SAKAI

This paper presents novel imaging measurements of imapact fluid pressure by using bioluminescent dinoflagellates. Uncertainities of the bioluminescent responses for the pressure due to circardian biological rhythm and variation of activity were identified experimentaly. It has been found that the bioluminescence inteisity linearly correlates with the impact pressure in the range less than 1200kPa, and the maximum pressure acting on the wall in the water drop test was reasonably estimated by the present bioluminescent imaging. The emperical formula describing the time variation of the bioluminescent inteinsity under the impact pressure was also proposed in this paper.

1. はじめに

本研究は、流体圧力変動に応答して発光する渦鞭毛藻 を衝撃圧計測メディアとして海水中に大量に混入し、衝 撃圧下におけるBioluminescence(生物発光)の動画像計 測により流体圧力の空間的分布を取得するためのシステ ムを開発し、その信頼性、応用性を検証するものである. この計測法は、圧力センサーが依然主体である現在の動 圧力計測と比べ、流体中に大量に散布することで、任意 の位置において圧力分布を計測することが可能となり、将 来的にPIV等の画像計測と組み合わせることで波浪下で流 況を支配する圧力と慣性力の同時計測が可能となる極めて 大きな利点があり、新たな知見の取得が期待できる.

自然界には多様な発光生物が生息し、それらの化学的 発光機構や光学的特徴が調べられており(Shimomura 2006)、海洋性プランクトン渦鞭毛藻のいくつかの種は、 力学的あるいは化学的外的刺激に対して発光することが 知られている. Stokesら (2004) はPyrocystis fusiformis を混入した造波水槽において砕波によるせん断力の生物 発光の画像計測を試みている.また,著者ら(2008)は, Pyrocystis lunuraの衝撃流体力に対する基礎的な応答を実 験的に調査し,動水圧と発光強度との相関を基に生物発 光による流体力計測の可能性と適応性について調査を行 った.一方,微生物を力学的刺激の計測媒体として利用 するにあたり,バイオリズム,活性や疲労,個体差等の 生物的応答性の差異による誤差が発生するため、この計 測法の実用化を実現するためには, 信頼性の評価, 生物 的誤差のパラメータ化とその合理的除去法を示す必要が ある.

本研究は、生物発光の流体衝撃圧の基本的応答の特性

1	正会員	博(工)	北海道大学准教授大学院工学研究科
2	正会員		東京電力(株)建設部
3	学生会員		北海道大学大学院工学研究科

とその種々の生物的要因への依存性,統計的性質と誤差 評価を行い,砕波ジェットを模擬した自由落下ジェット 水塊の壁体衝突時の衝撃圧計測へ適用し,その実用化に 向けた応用性を議論するものである.

2. Bioluminescenceの生理的変化

本研究で使用した渦鞭毛藻類のPyrocystis lunura は, 体長約30~40µm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)を白色照明による12時間のライトフェーズと12時 間のダークフェーズの光環境の下,f/2培地にて培養する. P.lunuraの生物発光は,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と力学的変化が報告されており, 化学的変化のない液体内において,結果として発生する 生物発光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.

一方,一般に生物は慨日性バイオリズムを有しており, P.lunuraの場合,ライトフェーズにおいては光合成が,ダ ークフェーズにおいて発光の生物活動が活発となる(図-2参照).また,渦鞭毛藻の分裂あるいは成長に伴って, 発光強度が変化する可能性がある.これらの発光活動に 対する生物的影響に依存した,同一の力学的刺激に対す る発光強度の差異や分散を予め明らかにしておくことで, 力学的応答のみによる発光特性を抽出可能となる.本研 究では,慨日性生物リズムについて、ダークフェーズ間 の時間的発光強度の変化を,長期的な生物の活性につい て,培地交換後の発光強度の日変化を同一荷重下におい て調査した.



図-1 Pyrocystis lunuraの顕微鏡写真.



3. 実験方法

本研究では、P.lunuraの発光強度,発光確率と衝撃圧 力との関係を取得するための落錘衝撃試験と、これによ り得られた発光強度と圧力の関係から流体ジェットの壁 体への衝撃試験を行った.

(1) 落錘衝撃試験

渦鞭毛藻 Pyrocystis lunura を計測メディアとし,海水を 充填した1辺5cmの立方体容器に一定の個体密度で混入 し可動式容器蓋で密閉する.重さ1298gの落錘を高さh=1 ~10cmから容器蓋に衝突させ,容器内の海水中に一様な 衝撃力を与え生物発光分布を12bit高速高感度カメラ(40 Hz,解像度105×245pixel)により動画像計測すると同時 に,同期したロードセルにより実圧力を計測する(図-3 参照).画像上の発光輝度は,予め生物発光による起電 力をフォトダイオードによって計測し,その較正値をも とに起電力として正規化される.以降,生物発光強度を この画像輝度を変換した光起電力(W)として定義する.

(2) 流体ジェット衝撃試験

内径10cmの透明アクリル製貯水パイプ下端にラテック スシートを均一に緊張して張り貯水パイプ内に0.51の海 水を溜め,鋼製針でシートを破ることにより透明アクリ ル製圧力計測ボックスの底面に向かってジェットを落下 させた(図-4参照).計測ボックス内には、あらかじめP. lunuraを混入した海水を5mm溜め、この水層にフォーカ





スした12bit高感度カメラをボックス下部に設置した. 導 水パイプ側方からパイプ中央部を通過するレーザー光を 落下するジェットが遮ると同時にTTLトリガ信号が送ら れ,着水点側方に設置された高速度カメラ(400fps)及 び生物光計測用高感度カメラを同時に起動し,同期した 2方向からの画像が取得できる.ジェット中心付近の圧 力を高感度動圧力センサー(PCB PIETRONICS社製, ICP型,M106B)により計測し,生物光により見積った 圧力と比較する.ジェット落下高さ*h* = 30cm,ジェット着 水速度*V* = 2.50m/sの単一条件に対して5回の試行計測を 行った.

4. 解析方法

容器底面に着床したP.lunuraの発光に対して,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,生物発光の局所ピークの位置を P. lunuraが存在する位置と定義し,それら個々の発光位置における換算光起電力の時系列について渡部・田中(2008)と同様に統計的に評価する.

個々のP.lunuraの生物発光強度(k_i)の検出された総個 体数に対する平均(\overline{k})と標準偏差(σ)は,

$$\overline{k} = \frac{1}{n} \sum_{i}^{n} k_{i} \cdots (1)$$

$$\sigma_{p} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i}^{n} (k_{i} - \overline{k})^{2}} \cdots (2)$$

ここで、nは検出できたP.lunuraの位置の総数である. 個々のP.lunuraが発する発光強度kに対するPL個体数g(k) を指数関数で近似し、個体差を含めた平均作用応力を見 積もることができる.この発光強度分布によって標準化 された画像濃度の平均は、

で与えられる.

5. 結果

(1) 落錘衝撃実験

図-5は、落錘衝撃実験における衝撃圧の時系列と、同時に計測された生物発光の光起電力の統計量を比較した ものである. 落錘初期高さhが大きいほど、最大発光強 度、並びにその分散は増加し、圧力と発光強度は相関し ているのがわかる.全てのケースにおいて発光強度は, 衝撃力発生直後、線形的に増加し、最大値発生後、指数 関数的に減少する.

図-6は、落錘初期高さh = 7cmに対する平均発光強度 (k) をダークフェーズ間の時間ごとに計測し、比較した ものである。時間ごとに多少のばらつきはあるが、2-9 時間後まではおおよそ変化が少ない同等の発光強度を示 す一方、10時間を経過すると細胞の分裂活動に起因する と考えられる発光強度の有意な低下が確認される。最大 発光強度が得られるダークフェーズの約7時間後の計測 で得られた結果についてこれ以降に議論していく。

図-7は、培地交換後の最大発光強度の日変化を調べた ものである。培地交換後、数日間は全ての落下高さに対 して比較的安定した発光強度を示すが、4日以降は変動 が顕著となり、圧力に対する最大発光強度が非線形とな るため一意に決定できなくなる。即ち、培地交換後4日 以降の計測は避けるべきであり、以降の結果は2-4日後 の微生物の発光に対する結果について議論を行う。

図-8は、平均発光強度k, k_eの最大値に対する同時計測 された圧力の最大値、力積とを比較したものである.両



図-5 衝撃圧力の時系列(左)と平均発光強度(\bar{k}),分散(σ_p), 標準化された発光強度(\bar{k}_e).(a) h=3cm,(b) h=5cm, (c) h=7cm,(d) h=10cm.



図-6 ダークフェーズ間の平均発光強度 (k) の変化 (h=7cm)

最大発光強度共に圧力が約1200kPa程度までは圧力との 線形相関関係が確認できる.この圧力レンジでは,表-1 に示す比例定数と切片をもつ線形近似が可能であり,特 に力積に対しては0.7以上の相関が期待できることが明ら かになった.この結果は,ある程度の誤差を許容した上 で,生物発光による衝撃圧の推定の可能性を示すもので ある.なお,この圧力レンジの上限は,実海域において も発生頻度が低い非常に高い衝撃圧に相当するものであ り,生物発光による圧力計測法としての高い許容値と広 い適用性を示唆するものである.

衝撃力に対する最大発光強度を予測するため、図-5で



図-8 平均発光強度(上)及び標準化された発光強度(下)の圧力 との関係.

表わされる発光強度の時間変化の特徴を抽出していく. 前述の様に,衝撃圧発生後,発光強度は急速に線形増加 し,最大発光位相を経過したのち指数関数的に減衰する. この時間(t)に対する発光強度変化の特徴を反映する関 数として次式を提案する.

ここで、A, Bは定数であり、 $f = k_0$ の時,平均発光強度 の時間変化を表し、 $f = k_e$ の時,標準化された平均発光強 度のそれを表す.図-9は、この関数形を仮定したときの それぞれの落下高さに対する定数A, Bを表したものであ る.両定数共に落下高さに対応する最大発光強度に対し て単調減少し、これら定数が線形関数で近似可能である ことが表わされている.線形近似により得られた定数を

表-1 最大生物発光強度 (x)と圧力 (y) の線形関係 (y = px+q) を 示す定数pとq.

У	x	р	q	相関係数
最大圧力	\overline{k}	1381	203	0.62
圧力の力積	\overline{k}	0.926	0.513	0.78
最大圧力	k _e	1722	382	0.49
圧力の力積	k _e	1.19	0.640	0.72



 図-9 式(4)中の定数AとBの最少自乗近似値のエラーバープロット(上),と近似した定数の平均を使って再現した発光 強度の時系列;h=3cm(a),h=5cm(b),h=7cm(c)そしてh=10cm(d)

式(4)に代入し算定した発光強度の時系列がよく実測 の発光強度を表しているのがわかる.

(2) 流体ジェット衝撃試験

図-10は、円柱状ジェットが計測ボックス壁面に衝突す る際の壁面上での微生物発光の分布を計測した結果であ る.ジェットの衝突後、ジェットの中央部付近を中心と して強い生物発光が発生し、発光領域は広く分布する. その後、流体は乱れた状態で放射状に噴出するため、微 生物はその流れの中で輸送されながら力学的刺激に応じ て発光していく.

図-11は、ジェットの落下高さ30cm(着水速度2.50m/s) で水塊を落下させた時に発生する衝撃圧と、既に線形近 似により得られた定数(表-1参照)を較正値として与え 生物発光強度から算定した圧力のアンサンブル平均の時 系列を比較したものである. 落錘実験と同様に最大圧力 を示す位相は実測値から遅れるが、最大圧力は適切に算 定されているのがわかる. 生物発光から算定した圧力は、 ジェット流体が計測ボックス内の側壁で跳ね上がり再着 水するなど複雑に混合されるため、計測領域内で部分的



図-10 円柱状ジェットの壁体への衝突の様子(左)と壁面上 の微生物発光強度の分布(右).時間間隔:25ms.

に発光する微生物が存在し継続的にアンサンブル統計量 に有意な値を与えてしまう.この流体の混合に伴う発光 に関してはさらなる検討が必要となるが、本研究で対象 とした衝撃圧力に応答する発光強度はこれと比べて十分 に大きく、P.lunuraを使った衝撃圧計測は有効であり今 後詳細な精度の見積もりを経て実用化の可能性を検討す るに値するものと考えている.

6. 結論

渦鞭毛藻 P.lunuraを圧力計測媒体として利用した落錘 衝撃圧試験において,衝撃的流体圧力と生物発光強度は 線形相関関係をもつ.これは本計測法の実用化に向けた 可能性を示唆する.衝撃圧力応答としての生物発光の生 理的変動,即ち慨日性リズム及び活性の日変動の特徴を 明らかにした.



生物的誤差を最小限に抑制した適切な計測を行うため には、ダークフェーズの2-9時間以内に実験を行う必要 があり、また培地交換後2-4日後の微生物を使用するこ とが望ましい.

衝撃力に応答する生物発光強度の時間変化を記述する 経験式を提案し、その妥当性を検討した.

本生物計測法により,液体ジェットの壁体への衝突時 に発生する衝撃圧を計測し,実測結果と比較した.本計 測法は,その最大圧力を適切に見積もることができた. この生物計測の実用化に向けて更なる調査が必要である.

参考文献

- 渡部靖憲・田中康文(2008): Bioluminescence による波浪中の 衝撃圧力分布計測法の開発へむけた基礎的研究,第55回海 講論文集,pp.846-850
- Shimomura. O(2006): Bioluminescence Chemical Principles and Methods, World Scientic, 470p.
- 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