

波浪中の衝撃圧力計測に向けたBioluminescence Imaging Sensorの開発

Development of the bioluminescent imaging sensor to measure wave impact pressures

北海道大学工学研究科環境フィールド工学専攻 ○学生員 田中康文 (Yasufumi Tanaka)
北海道大学大学院工学研究科准教授 正員 渡部靖憲 (Yasunori Watanabe)

1. はじめに

台風や低気圧に伴う高波が沿岸域の構造物に衝突する際、設計波力を超える極めて大きな衝撃圧が発生し、護岸崩壊や海岸堤防の破壊など数多くの被害が国内外で報告されている (Fig.1). この衝撃圧の発生発達メカニズム解明は適切な沿岸構造物設計を行う上で欠かせないため、一世紀以上に亘って、種々の条件下での実験や現地観測による数多くの研究が進められているが、衝撃圧の適切な計測法が未だ存在しないために、発生状況の把握が困難である。この衝撃圧発生状況は非再現的であり、また局所的に瞬時に発生する圧力であるため、例えば一定の波浪条件下での衝撃圧計測においてさえ、圧力センサーを始めとする一点接触型での計測結果は離散的なものとなる。そのため、これらの波浪中の発生圧力計測においては、センサー設置位置に依存しない面的な圧力分布の計測法が望まれている。一方で、面圧計測手法は、感圧シートや感圧塗料 (PSP) などが他分野で提案され、実用化されているが、計測環境が海中であることやその応答性を考慮すると海岸工学分野上の研究要請に応える適切な面圧計測手段とは言えない。

そこで、本研究ではBioluminescenceを用いた画像計測での面的な圧力分布計測システムを提案することでこれらの解決策としたい。Bioluminescenceに関しては、海洋生物学や水産学、生化学等の分野において生物発光という特殊性に観点が置かれて研究が為されているが、それらを工学的に応用技術として利用する試みは国内では皆無であり、海外においてもいくつかの基礎研究が報告されているに過ぎない。依然として、本研究の狙いとしているようなBioluminescenceによる流体内の応力空間分布を測定する技術は、実用可能レベルに遠く及ばないというのが現状である。

2. Bioluminescence

Bioluminescenceとは、蛍に代表されるような体内での化学反応が進行する際に放出される生物発光のことであり、海生生物の中にも数多くの発光生物が確認されている。これらの発光生物の中には、力学的変化などの生育環境の急激な変化により発光する生物が確認されており、その変化の度合いが大きい場合、発光強度も大きくなるということが報告されている。本研究では、渦鞭毛藻類の一種である*Pyrocystis lunula* (以降、PLと略記) と呼ばれる体長約30 μm 程度の発光微生物を用いている。発光のメカニズムは、通常の生物発光と同様に「ルシフェリン (基質) - ルシフェラーゼ (酵素) 反応」である。酸素存在下、ルシフェラーゼの触媒によりルシフェリンの13²位が酸化され、酸化型ルシフェリンが生じるときに青色光 (最大波長=474nm) が放出される。実際には、渦鞭毛藻類に外的刺激が加わると反応が進行し、早い青色フラッシュとして光が観察される



Fig.1 周参見漁港防波堤崩壊 (和歌山)

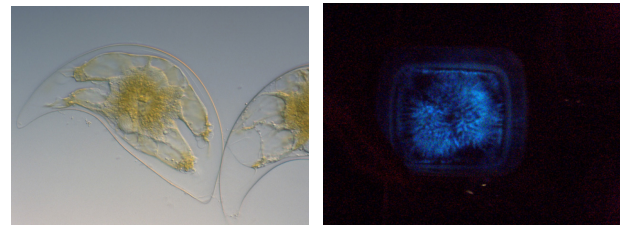


Fig.2 P. lunula

(Fig. 2). この外的刺激とはつまりは渦鞭毛藻類の生育環境の変化であり、圧力変化をはじめとして、温度変化やpH変化等を挙げることができる。本実験では、生育環境をコントロールし、圧力変化のみを与えることで反応を促し、これらの発光強度を測定することで圧力変化を見積もるという試みである。国立環境研究所微生物系統保存センターよりPL株の譲渡を受け、f/2培地を用いて月に2回培地替えを行い、昼夜12時間周期、水温20℃で画像計測する上で十分な解像度となるよう培養を行っている。

3. 実験装置と実験条件

本研究では、落錘衝撃試験機を用いて様々な大きさの衝撃圧を発生させ、その衝撃圧に対する応答としてのBioluminescence発光強度 (以降、BL強度と略記) を計測し、発光応答特性や衝撃圧に対する較正值を獲得することを本研究の狙いとしている。発光源であるPLは、成長速度が緩やかになった状態の株におよそ3~4倍程度の新規の培地液を投入することで活性状態下での実験となっている。このPLを混入した海水で全面透明アクリル製の測定容器 (5cm×5cm×5cm, 170ml) を満たす。PLは比重が1以上であり、長時間放置するとやがて容器底部に沈着するため、この容器底面部5cm四方をBL発光強度測定領域とする。測定容器を衝撃圧落錘試験機上に設置し、試験機上部に電磁石により固定されている落錘を、電源を切ることで瞬時に落下させ、測定容器に垂直に衝突させることで衝撃圧を発生させ、測定容器下部に設置したロードセルによりサンプリング周

波数25kHzで計測している。衝撃圧の大きさは、落錘落下高さが4cmで衝撃圧ピーク値が400kPa程度であり、実海域スケールの波浪が堤体に衝突する際に発生する衝撃圧ピーク値が同程度であることから、現地スケールと同規模かそれ以上での衝撃圧力下での実験となっている。また、測定容器の斜め上方に設置した12bit高感度カメラにより、この衝撃圧によるPLの発光状況をfps40、解像度11[pix/mm²]で計測している。なお、電磁石の電源を切る際に発生するTTLトリガー信号を用いて、ロードセルと高感度カメラを同期させ、同時刻での圧力情報とBL強度情報を獲得している。また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強度を絶対的な光強度に校正、換算している。

実験条件は、Tabel-1に示すように、水温20℃で明暗の培養時間をコントロールし、落錘の落下高さhを変えることで衝撃圧の大きさを変化させ、投入数密度Nや種々の時刻をパラメータとし、それらに対するBL応答特性に関して調査・検討を行った。なお、同程度の微生物活性状態下での計測を行うために、新規の培地投入後の経過日数による発光状況に関して観察を行っている。

4. 解析方法

(1) 画像処理法

PLの初期投入数密度に依存しないBL発光強度計測を行うために、撮影画像(40フレーム)を全て重ね合わせ、画像中での発光強度ピーク値がカメラのノイズの最大値より大きな位置をP. lunulaが存在し、発光している箇所としてピックアップを行った(fig.4)。各位置での平均値及び標準偏差を以下の式で導出している。

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

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

また、この画像処理の前処理として、ガウシアンフィルター及びメディアンフィルターを掛け、画像中のノイズ低減を図っている。

(2) 統計的処理法

画像処理の段階では、初期の投入数密度や容器底面部でのPLの沈着分布状況に依存しない結果を得ることが可能となっているが、投入時の個々のPLの活性状態や個体能力差によって、試行ごとに前式で導出される結果が大きく変わる可能性がある。多くのケースでのPLの発光確率が以下に示す指数関数で近似可能であり、また発光確率の統計モデルとしてStokesらも同様の指摘を行っている⁽³⁾。よって、以下に示す分布関数により画像濃度分布を標準化することで、PLの個体差を含めたBL強度を k_e 得ることが可能となっている(Fig.6 [下段])。

$$g = Af = Ae^{-Bk} \quad (3)$$

$$\bar{k}_e = \frac{\int gkdk}{\int gdk} \quad (4)$$

また、計測上検出不可能であるような発光強度が非常に小さい、もしくは発光していないPLに関しても指数関数を分布関数として持つことより、それらを含めた上での統計的評価となっている。

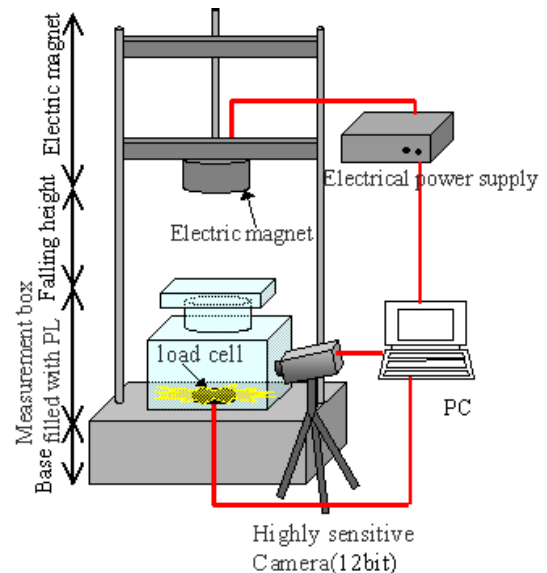


Fig.3 Circadian biological rhythm

Table-1 Experimental condition

case	h(cm)	N(#/cm ³)	経過日数	バイオリズム
1.1-1.10	3	173	1-10	暗転後7hr経過
2.1-2.4	5	125	1-4	
3.1-3.10	7	126	1-10	
4.1-4.9	10	149	1-9	
5.1-5.6		84	1-5	
6	3	388	3	暗転後2hr経過
7		333		暗転後3hr経過
8		416		暗転後5hr経過
9		874		暗転後6hr経過
10		499		暗転後7hr経過
11		499		暗転後9hr経過
12		499		暗転後10hr経過
13		319		暗転後12hr経過

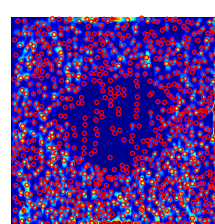


Fig.4 Extracted PL (case-4.3)

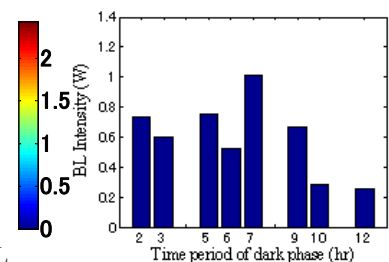


Fig.5 Circadian biological clock(case6-13)

いる。

5. 実験結果と考察

(1) 概日性リズム(Circadian biological clock)

PLをはじめとする発光微生物は、概日性を持ち、一般的に明期に光合成が盛んに行われ、真夜中に最も強いグロー発光が観察されることが分かっている⁽¹⁾⁽²⁾。本実験では、同一条件下での試行において、暗転後の経過時間が7hrの時にBL発光強度の最大値が存在し、また10hr以降のBL発光強度は急激に減衰することが確認された(Fig.5)。以降の計測はこの発光能力が最も高い状態と考えられる、暗転後の経過時間が7hr前後で計測を行うこととする。

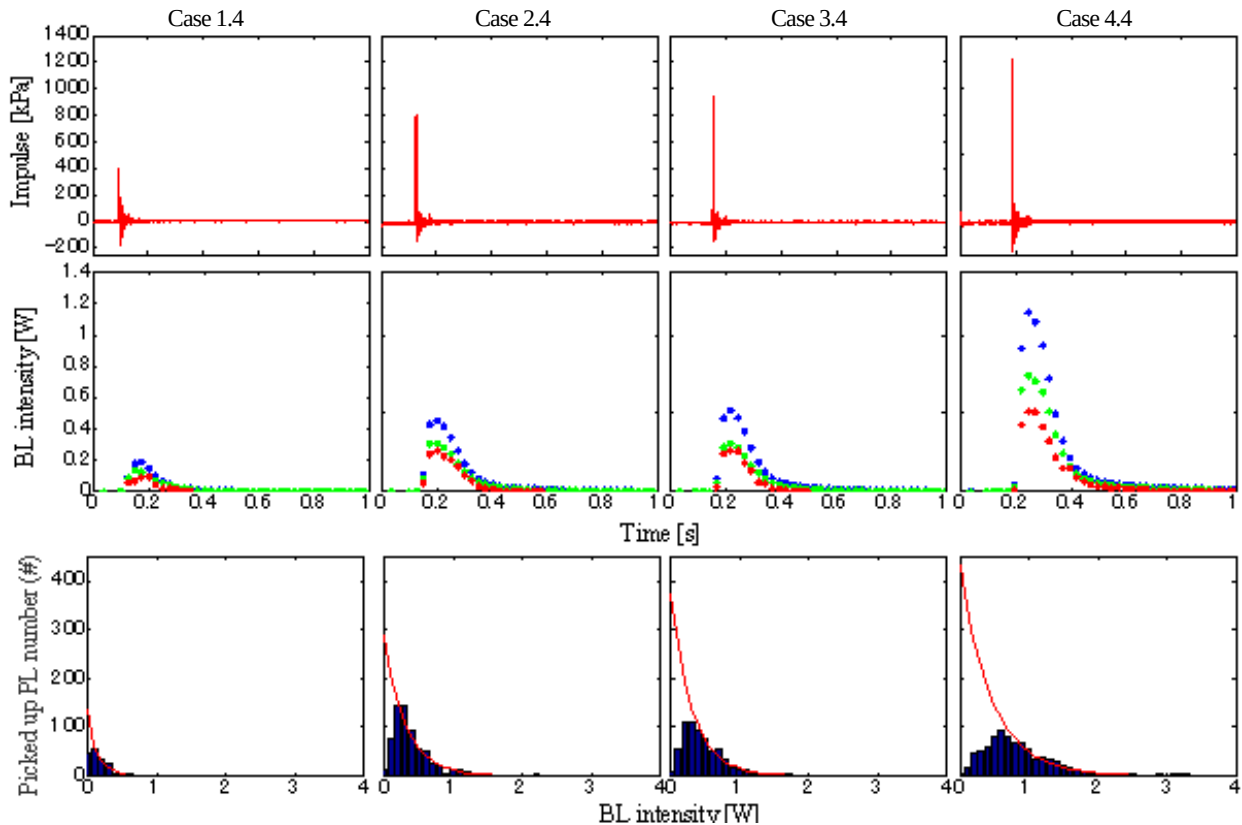


Fig.6 [上段]衝撃圧時系列 [中段]BL強度時系列(青色), BL強度分散値の時系列(緑色), 標準化したBL強度時系列(赤色)
[下段]各試行中の最大BL強度画像のBL強度に関するヒストグラム(青色)とその標準化のための分布関数(赤色)

同列の図は同一のケースでの計測結果であり、左の列より順番に落錘の落下高さが3cm, 5cm, 7cm, 10cmとなっている。

(2) 衝撃圧に対するBL発光応答特性

PLは衝撃圧を始めとする動的な圧力変動に対して発光する性質を持ち合わせており、本実験においてもそれらの基本的な応答については観察されている(Fig.6)。衝撃圧によるBL強度の時間的変化は、発光初期においては線形的に増加し、約50ms程度で最大BL強度に達する。その後、指数関数的に減衰し、発光終了時刻をBL強度がピーク値の1/10を下回った時と定義した場合、およそ250msで発光が終了することが確認された。また、衝撃圧ピーク値とBL強度ピーク値のタイムラグは50ms～100msである。これらの発光応答時間は、何れも衝撃圧の大きさに関係なく生じていることより、PL固有の応答特性であると考えられ、特に圧力に対する発光応答遅れ時間の存在は、少なくとも10Hz以上での圧力測定が困難であることを示す。

一方、衝撃圧に対して、BL強度ピーク値、標準化後のBL強度ピーク値が増大傾向にあることから、BLによる圧力計測の可能性を示唆するものであると考えられる。

Fig.7は、BL強度、総BL発光量、標準化したBL強度に対する衝撃圧および衝撃圧力積の変化をプロットした図になる。通常のBL強度値よりも総BL発光量や標準化したBL強度において比較的良好な相関が見られた(Table-2)。ただ、発光強度が大きくなるとFig. 6[下段]のヒストグラムの分布形状が変わってきているため、標準化の作業の際には、この分布形状に関して更なる考察が必要であろうと考えられる。

(3) BL強度時系列の推定

Fig.6でも示したように、BL強度の時系列形状は、初期に線形的に増加し、ピーク到達後、指数関数的に減衰することが予想されるため、式(5)のような近似関数を仮定した。各落下高

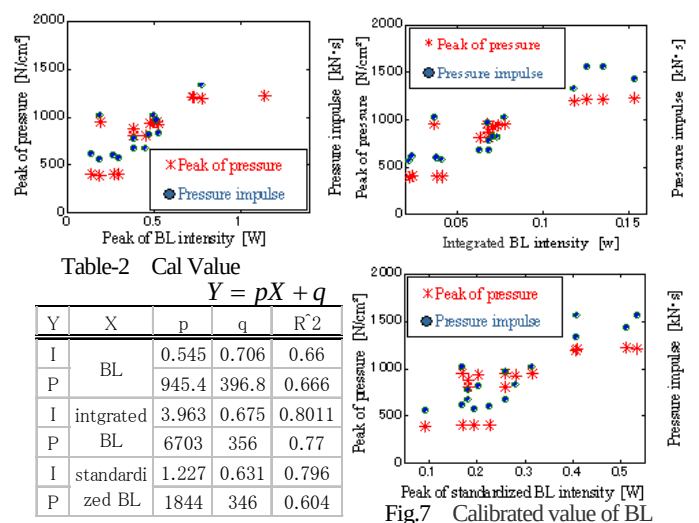


Fig.7 Calibrated value of BL

Table-2 Cal Value

$$Y = pX + q$$

Y	X	p	q	R ²
I	BL	0.545	0.706	0.66
P	BL	945.4	396.8	0.666
I	integrated	3.963	0.675	0.8011
P	BL	6703	356	0.77
I	standardi	1.227	0.631	0.796
P	zed BL	1844	346	0.604

さでの典型的なBL強度時系列形状に対してフィッティングを行うことで求めた係数A,Bは、各落下高さの衝撃圧力積の平均値に対して非常に良い相関があることが確認され、相関係数も係数A,Bともに0.9以上を示している(Fig.8)。これらの関係性を用いて式(6)(7)が導出される。

$$f = \frac{t}{A} \cdot e^{-B\left(\frac{t}{A}\right)^{(5)}} \quad A = -0.073 \cdot I + 0.117 \quad (6)$$

$$B = -1.224 \cdot I + 1.928 \quad (7)$$

これらの近似式を用いて、衝撃圧の力積を与えることで典型的なBL強度の時系列形状を把握することが可能となっている(Fig.9)。

(4) PL活性状態の判定

生体圧力センサーで最も重要なファクターは、発光源であるPLの活性状態の把握およびコントロールである。Fig.10は、いくつかの異なるシャーレより取り出したPLを用いて、新規の培地を投入してからの経過日数をコントロールすることで、種々の活性状態下での同一衝撃圧力($h=3\text{cm}$)に対する試験結果となっている。発光確率(=画像処理により抽出されたPL数/初期投入PL数)が増加するとBL強度も増加していることより、発光確率があるレベル以上のケースを発光源として採用することが望ましいと考えられる。

(5) 疲労回復実験

物理的な刺激等の外的因子により、PLの発光が観察されるが、圧力やせん断力といった力学的作用に対する応答と曝気によるPL個体が気体に触れることが刺激となり発光を示すケースが考えられる。生体センサーとして運用する際に、疲労履歴のあるPL再利用の可能性を調べるため、上記の二つの状態下で連続的に刺激を与え続け、完全に発光しなくなる疲労状態を作り、その後回復に要する期間を見積もった。

前者の刺激を対象とした曝気なしでの(水中での)力学的作用により発光し、疲労状態となったPLは、昼夜24時間の回復期間を持つと初期の発光強度と同程度まで回復し、疲労履歴がないPLと同様に再利用可能であることを示した。一方、曝気下での刺激により疲労状態になったPLは、7割回復を示すのに4日間かかった。このように、刺激状態が曝気下であるか否かによってPLの疲労状態が変化すると考えられ、また、水中のみでの刺激では発光しないPLも曝気下においてはその環境変化の大きさから発光数が増加しているために回復率に大きな差ができてしまったと考えられる。

6. 結論

本実験より以下の結論を得た。

- 生物固有の概日性リズムにより、同一条件下でのBL発光実験においてもBL発光強度が変化し、また、暗転後の経過時間が7hrの時に最大BL発光強度を示す
- BL強度、標準化されたBL強度を計測することで、比較的短時間に作用する衝撃圧力のピーク値と力積を見積もりうる。
- 近似関数により、衝撃圧力の力積情報より典型的なBL強度の時系列を見積もることが可能となった。
- 刺激状態が曝気下であるか否かによってPLの疲労状態が変化し、曝気下での刺激の方がより疲労度合いが大きいものとなる。

参考文献

- 1) パイオ・ケミルミネセンスハンドブック (2006), 1-2: 小江克典, 1-3: 呉純, 丸善
- 2) 近江谷克裕 (2008): 体内時計が光を制御する渦鞭毛藻, ミクロスコピア, 25, 2, pp35-38.
- 3) Stokes, M. D., G. B. Deane, M. I. Latz, J. Rohr (2004):
- 4) Bioluminescence imaging of wave-induced turbulence, J. Geophys. Res. Oceans, 109, pp.1871-1879
- 5) Widder, E. A., J. F. Case (1981): Two flash forms in the bioluminescent dinoflagellate, *Pyrocystis fusiformis*, J. Comp. Physiol., 143, pp. 43-52.

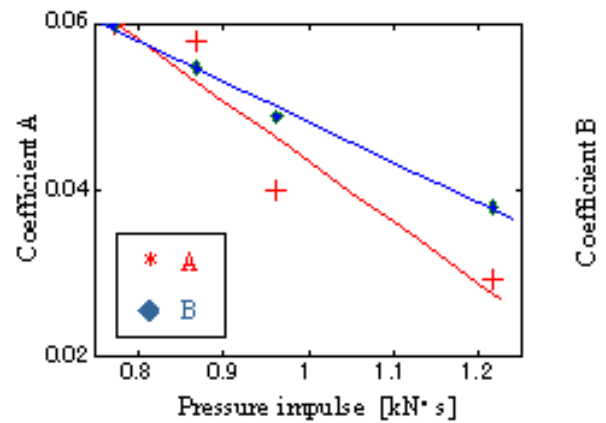


Fig.8 Coefficient estimation

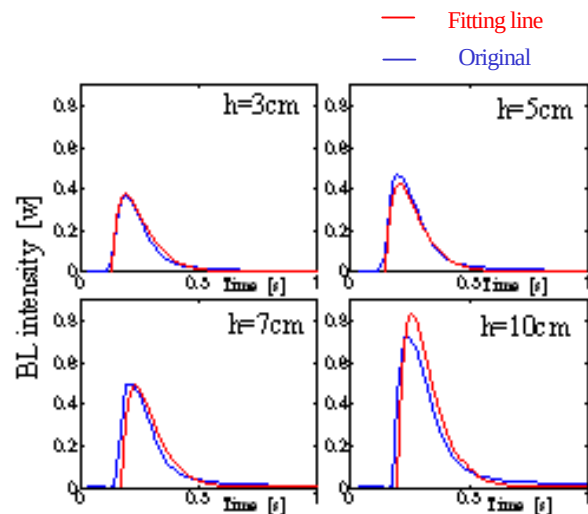


Fig.9 Fitting by approximate function

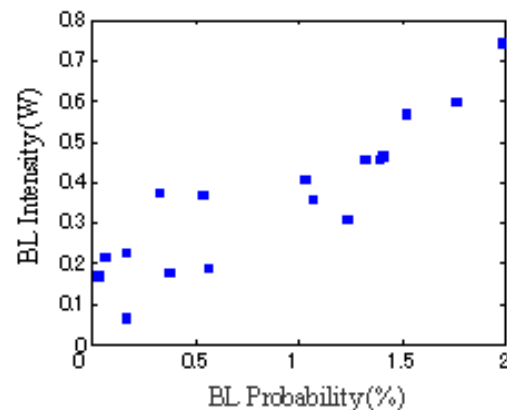


Fig.10 BL active status

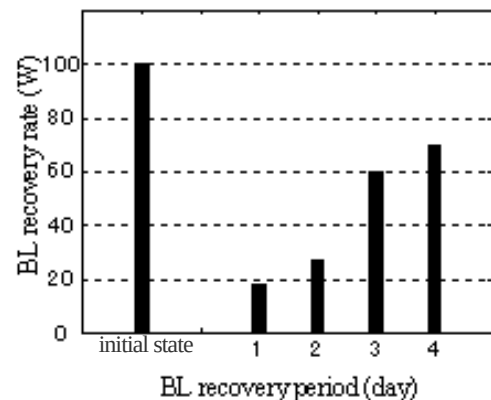


Fig.11 BL recovery