

Bioluminescenceによる乱流せん断力計測

Image measurements of shear stress distribution in turbulent flows based on Bioluminescence

北海道大学大学院工学研究科 ○学生員 坂井純 (Jun Sakai)
 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

本研究は、流体力などの外的刺激に対して発光応答する渦鞭毛藻類 *Pyrocystis lunura* を海水中に大量に散布し、振動流場における生物発光(Bioluminescence)を動画像計測することで、*Pyrocystis lunura* のせん断力に対する発光応答特性を調べ、流体中の空間的なせん断力分布を取得するための生態センサーを開発することを目的としている。

現在、いくつかのせん断力計測法が提案されているが、そのほとんどが接触型の一点計測であり、それらは河床や船体等の壁面には適用可能であるが、流体内の空間的なせん断力分布の取得が可能となるような計測法は未だ確立されていないというのが現状である。

一方、Cussat legras ら(2007)は海水を充填させた回転せん断流発生装置内に *Pyrocystis lunura* を混入させ、底面境界層付近のせん断力によって発光する微生物の動画像計測を行い、せん断力が *Pyrocystis lunura* の Bioluminescence を誘発させる、支配的なパラメータの内のひとつであることを報告している。

また既往の研究(Deane ら(2007))から、流れ場において作用するせん断力の変動により発光微生物による発光強度も変化することが報告されており、生物発光強度とせん断力の関係の特徴化することで、微生物が瞬間のせん断力分布を取得可能な計測媒体となり得ると考えている。発光微生物を海水中に混入させることで、任意点におけるせん断力を視覚的に捉えられるだけでなく、発光する個体をトレースすることで流れ場の可視化が可能となる。本計測法を実用レベルまで昇華させることができれば空間せん断力分布の非接触型計測が可能となり、乱流や砕波などの複合的な力が作用する流れ場に適用することで新たな知見の獲得が期待できる。

Bioluminescence とは生物が光を生成し放射する現象である(図-1 参照)。自然界には多様な発光生物が存在するが、そのほとんどは海棲生物である。特に深海生物の大多数は何らかの方法で発光し、その目的も多岐にわたることが知られている。

本研究では海洋性プランクトンの一種である渦鞭毛藻 *Pyrocystis lunula* を試料として採用している。本微生物は液体中の圧力変動やせん断力などの力学的刺激、あるいは pH の変化など化学的な外的刺激に対する応答として発光する。

本微生物は多くの生物と同様に概日性バイオリズム(図-2 参照)を有しており、ライトフェーズで光合成が、ダークフェーズで発光が活発となる。このバイオリズムの中で分裂あるいは分散に伴って発光強度が変化することが考えられ、この生物的影響に依存した発光強度の差異や分散を明らかにすることで力学的応答のみによる発光特性を取り出すことが可能となる。著者ら(2009)は、衝撃圧下における生物発光応答の生理的変動、即ち概日性リズム及び活性の日変動の特徴について報告している。これをもとに本研究では発光強度の最も安定する暗転後 7 時間、培地交換後 2-4 日後の実験・計測を行っている。

また本微生物は多くの発光微生物と同様に、「luciferin-luciferase 反応」(図-3 参照)によって発光する。ルシフェラーゼの触媒によりルシフェリンが酸化され、酸化型ルシフェ

リンが生じるときに 0.1 秒以下の短いフラッシュとして青色光が放出される。細胞内に多数存在する一重膜構造をした発光細胞小器官シンチロン内に、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びルシフェリン結合タンパク質(LBP)が含まれており、そのメカニズムはシンチロン内の pH がアルカリ性から酸性(およそ 8 から 6.5)へ変わることにより、LBP がルシフェリンから離れ、また同時にルシフェラーゼが活性化され、発光するというものである。

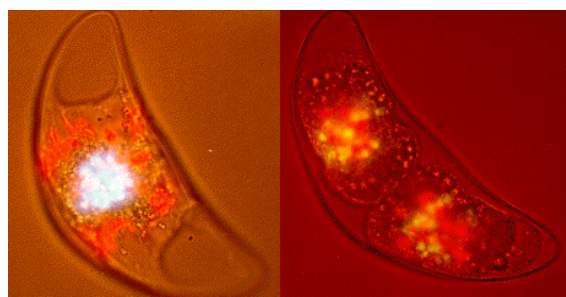


図-1 Bioluminescence 反応

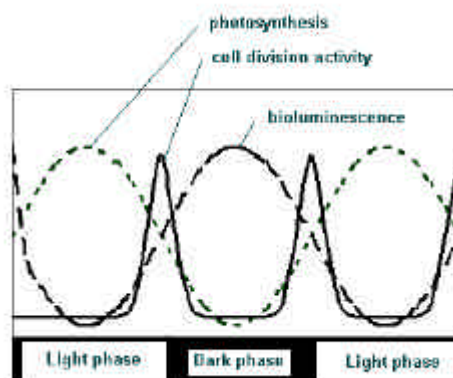


図-2 概日性バイオリズム

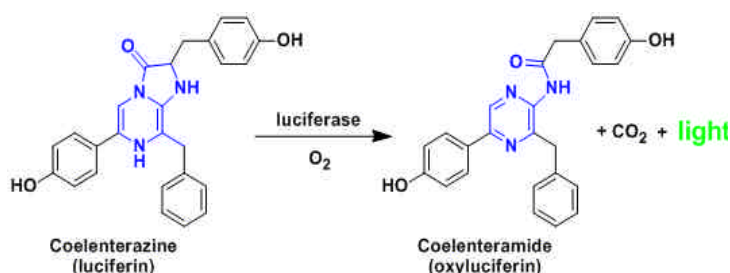


図-3 luciferin-luciferase 反応

2. 実験方法, 実験条件

流体内におけるせん断力と応答する生物発光強度の関係を調べるためには、あらかじめ装置内で発生する流速分布を推定する必要がある。本実験では、後述する振動流発生装置によって発生させた振動流場の流速分布を PIV 計測した。また同様の実験装置内に微生物を混入させ、発光応答する微生物を 12bit 高感度カメラにより動画像計測する。

(1) 振動流速分布計測

図-4 に示すように、空圧発生装置から全面透明アクリル製の U 字型振動流発生装置内へ空気を送り込み、空気圧によって振動流を発生させる。振動流発生装置内の壁面は滑らかであり、底面においては部品の差し替えにより粗度や底面形状を変更可能となっている。今回のケースでは滑らかな波状の底面（図-5 参照）における計測を行っている。

空圧発生装置の駆動系には電動シリンダ（EZHC (Oriental motor (株) 製)）を使用しており、これを PC と接続し、作成したシーケンスプログラムを読み込ませることにより制御している。シリンダを周期運動させ、シリンダ先端に接続したポンプにより振動流装置内へ空気を送り込み、装置内で振動流を発生させる。

あらかじめ装置内の流れ場に微細なトレーサ粒子を混入し、シート状のレーザーにより流れ場を二次元的に切断して装置内の流れ場の可視化を行っている。装置側面からトレーサ粒子からの散乱光を高速度カメラ(500fps)によって撮影し、取得した連続画像を画像解析した後、画像相関法によって流速分布を算出する。U 字の湾曲部における流れ場の乱れを考慮し、装置中央部において、リップルのトラフ部を中心に $50 \times 50 \text{ mm}$ （装置上端から下端まで）を撮影領域とした。

底面形状の座標系は以下の関数系によって算出したものを採用している。

$$\begin{aligned} x &= x - e \sin x \\ y &= e \cos x \\ e &= k_s a \end{aligned} \quad (\xi=0-2\pi) \quad (1)$$

ここに、波数 k_s 、波の振幅 a である。

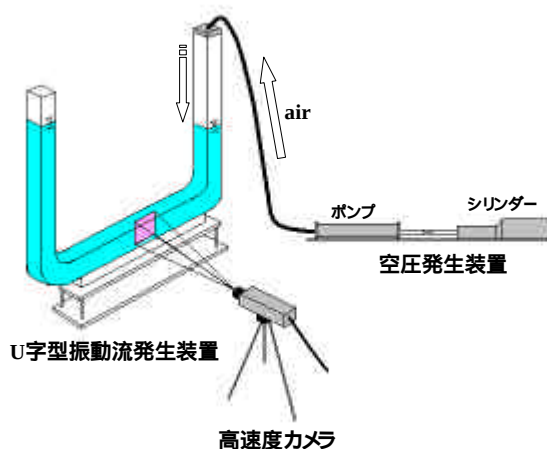


図-4 U字型振動流発生装置

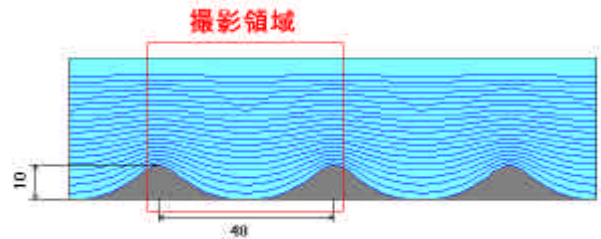


図-5 波状底面

(2) Bioluminescence 発光試験

波状底面を配置した振動流発生装置内に、微生物を一定の固体密度で混入した海水を入れ、(1)と同様の振動流を発生させた際に発光する微生物を 12bit 高感度カメラによって動画像計測する。(1)の実験と同様に装置側面にカメラを設置し、リップルのトラフ部を中心に $50 \times 50 \text{ mm}$ を撮影領域としている。

本計測は発光強度の安定する暗転後 7 時間、培地交換後 2 日の微生物を使用した。

3. 解析方法

(1) 振動流速分布計測

取得した画像はデジタル画像処理を行い、画像上の微小ノイズを除去した後、画像濃度の局所ピークをトレーサ粒子が存在する位置と定義し、粒子をピックアップする。前後 2 時刻間の画像において、局所的輝度値パターンの移動量から流速ベクトルを算出する。

また本計測では相関係数に一定の閾値（本計算では 65 %）を設けることにより、誤ベクトルの検出・除去を行っている。誤ベクトルの除去によって離散的となった速度ベクトルの分布を、距離の 2 乗の逆数補完（IDR-2）によって内挿した。本計算に用いた式を下記に示す。

$$U^* = \frac{\sum_{k=1}^n U_k / l_k^2}{\sum_{k=1}^n 1 / l_k^2} \quad (2)$$

ここに、補完のために考慮する最大の PIV データ数 n 、着目する格子点からその周辺の格子点までの距離 l である。これは距離を変数とする重み付平均であり、特に IDR-2 では遠方のデータがほとんど補完値に寄与しない。

(2) Bioluminescence 発光実験

取得した画像は輝度補正及び画像処理によるノイズの除去を行った後、画像濃度の局所ピーク値を示す位置を微生物が存在する位置と定義し、発光固体の抽出を行っている。図-6 に取得した画像の画像濃度分布を示す。図中の赤く表示した点において発光固体を抽出している。また予めフォトダイオードによって画像濃度と光量との関係を変数として特徴化しており、結果に示す発光輝度は光起電力 W として正規化している。

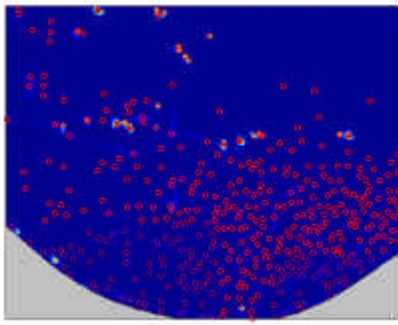


図-6 発光固体の抽出 (○・・・発光固体の抽出位置)

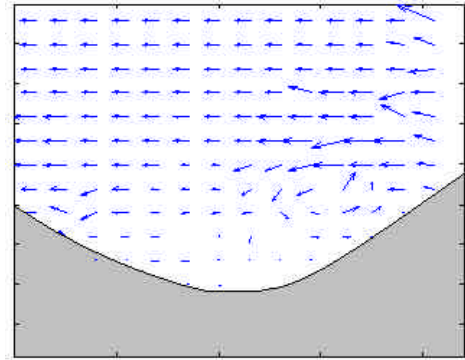


図-8 検査領域内における振動流速分布

4. 結果

(1) 振動流速分布計測

図-7 に示すのは波状底面を装置側方から実際に撮影した画像であるが、このようなリップルのトラフ部を中心に瞬間の流速分布を算出したものが図-8 である。リップルのクレスト部上方では一様な水平方向のベクトルが確認されるが、クレスト部より下の底面付近では強く乱れており、剥離渦が確認され、流れに影響を与えている。

ここで乱流量を評価するために次式を定義する。

$$\frac{1}{2}(\overline{u'^2} + \overline{v'^2}) \quad (3)$$

$$u = \bar{u} + u'$$

$$v = \bar{v} + v'$$

ここに検査領域内における空間平均流速 $\bar{u}$ 、 $\bar{v}$ 、検査領域内の各点における流速 u, v である。この式によって検査領域内の乱流量の分布をカラーマップで示したものが図-9 である。図-8 に示した分布と比較するとよく乱れが再現されていることがわかる。

図-10 は検査領域内における、3 成分のせん断力の分布をカラーマップで表示している。示した図は瞬間の流速分布から得られた値から算出しているため、PIV の精度の限界から、定性的な分布傾向の取得に留まる結果となった。より正確なせん断力の分布を取得するためには統計的な評価を行う必要があり、今後の課題となっている。

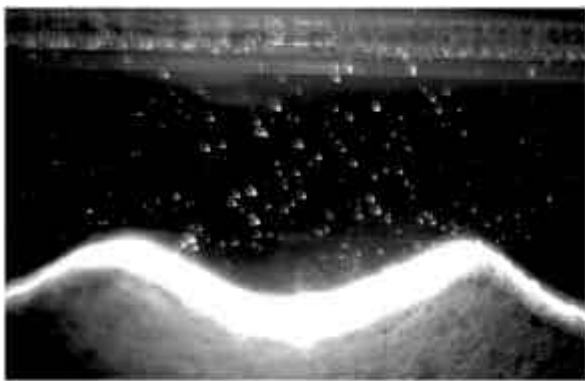


図-7 振動流装置側面から撮影した波状底面

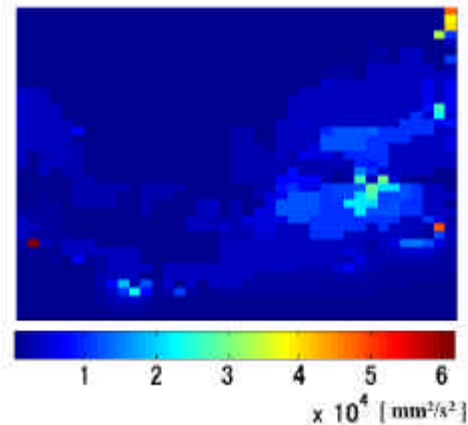


図-9 検査領域における乱流量

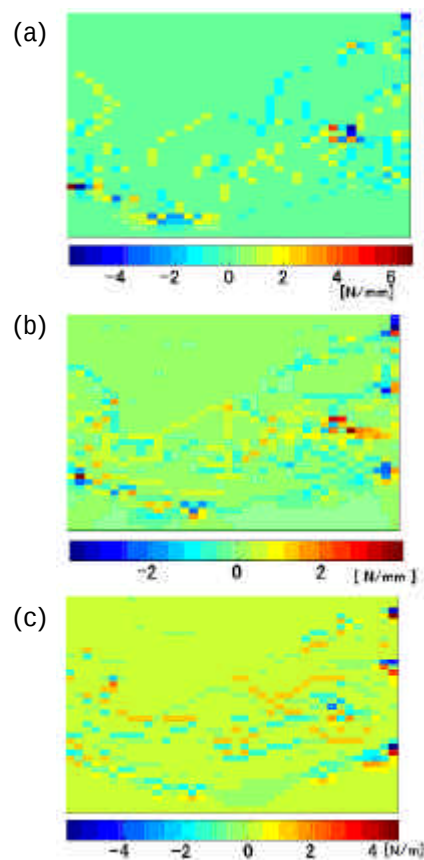


図-10 検査領域内におけるせん断力の分布
((a) T_{xx} , (b) T_{xy} , (c) T_{yy})

(2) Bioluminescence 発光試験

図-11 は、振動流場における生物発光の様子を撮影したものである。リップルのクレスト部より上方においては発光個体数が非常に少ないのに対し、トラフ部においては、渦の影響によって発光していると考えられる微生物が多数確認され、それらは流れ場の乱れに追従しながら発光している。

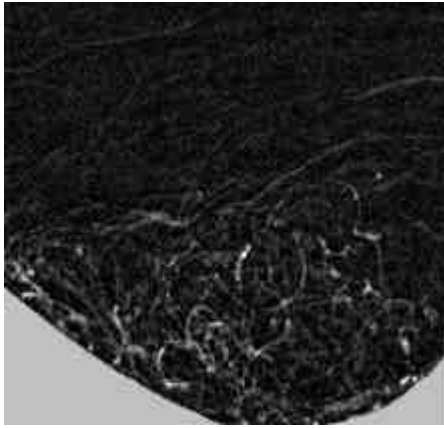


図-11 検査領域における生物発光の様子

図-12 は、画像において検出された全発光個体の発光強度を平均し、算出した平均発光強度の時系列を示したものである。また、図-13 は式(3)によって定義した乱流量について撮影領域内で平均した時系列となっており、図-14 は撮影領域内の各点におけるせん断力の t_{xy} 成分を絶対値化し、平均したものをせん断力の3成分について示した時系列となっている。各々の時系列は全て振動流の一周期分を表している。発光強度は半周期毎にピークを持ち、乱流量及びせん断力との間に相関が確認されるが、現段階では定性的な憶測にとどまり、その精度を向上させるためには試行回数を重ね、統計量による評価が必要である。

5. 結論

波状底面における振動流速分布を PIV によって測定した。リップルの前後で剥離渦が発生し、渦の発生過程を確認した。また乱れを評価するための式を定義して検査領域内における乱流量の分布を示し、得られた流速分布から乱流場におけるせん断力の定性的な分布形状を取得した。

乱流の発生する振動流場に微生物を混入させ、発光応答する微生物を撮影した。検査領域内における生物発光強度の時系列を示し、乱流量及びせん断力の時系列との比較を行った。その結果、発光強度は周期的にピークを示し、乱流量及びせん断力との間に相関が確認された。これは、底面せん断力のみならず、乱流に起因する流体内のせん断力によっても微生物が発光応答することを明らかにし、空間的なせん断力分布の取得を目的としている本計測法の実用化の可能性を示唆するものであると考える。現段階では定性的な相関傾向であるが、統計量による評価を行うことでより明確な応答特性を取り出すことが可能となると考えている。

本計測法の実現には更なる調査が必要である。今後はせん断力と生物発光強度との関係の特徴化するために、統計的な解析を行っていく。また、生物を計測媒体として利用するにあたり、活性や疲労など生物的影響に起因する発光強度の生理的変動の調査も今後の課題である。

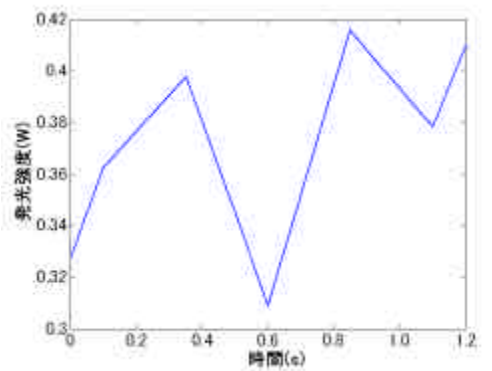


図-12 平均発光強度の時系列

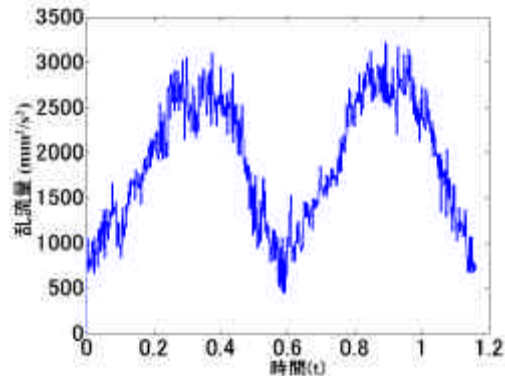
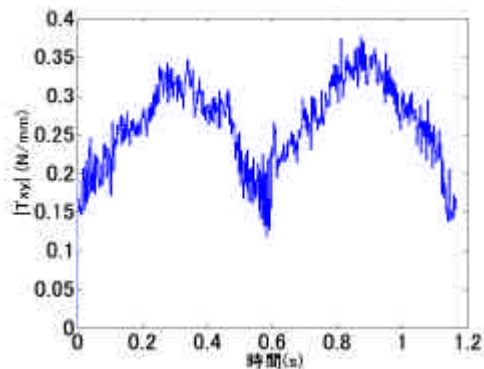


図-13 乱流量の時系列

図-14 $|T_{xy}|$ の時系列

6. 参考文献

渡部靖憲・田中康文・坂井純(2009) : Bioluminescence による流体衝撃圧計測法, 第 56 回海講論文集, pp.831-835

Anne-Sophie Cussatlegras, Patrice Le Gal(2007) : Variability in the bioluminescence response of the dinoflagellate *Pyrocystis lunula*, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 343 (2007) pp.74? 81

G.B.Deane, M.Dale Stokes(2007) : A quantitative model for flow-induced bioluminescence in dinoflagellates, Journal of Theoretical Biology 237 (2005) 147? 169

Shimomura, O(2006): Bioluminescence Chemical Principles and Methods, World Scientific, 470p.