

フリーウェアを用いた耳石日周輪解析手法の検討 (技術報告)

城 幹昌*

北海道立総合研究機構栽培水産試験場

Methods of otolith microstructure analysis using free software (Technical report)

MIKIMASA JOH*

Mariculture Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan

キーワード: digiCamControl, Image J, 耳石日周輪解析, デジタル一眼レフカメラ, フリーウェア

魚類の初期生活史研究は、魚類の生物学的・生態学的知見の獲得のために重要である。また、一般的に、初期生活中の生残の良し悪しが魚類の年級群豊度を決定すると考えられているため、資源の将来予測などに関し、水産学上も不可欠な研究となっている (Anderson, 1988; Leggett and Deblois, 1994)。魚類の耳石の日周輪には孵化後1年も経過していない仔稚魚の孵化日や成長履歴といった貴重な生態情報が記録されていることから、耳石日周輪解析はその初期生活研究において非常に強力な手法となっており、様々な魚種で仔稚魚の孵化日や成長履歴が調査されてきた (Yoklavich and Bailey, 1990; Campana, 1996; Takahashi and Watanabe, 2004; Takasuka and Aoki, 2006; Joh et al., 2013, Joh and Wada, 2018)。

著者が魚類の初期生活史研究を開始した1990年台末までは、耳石日周輪解析は顕微鏡に接続したフィルムカメラやデジタルコンパクトカメラで画像を撮影し、それを印画紙やプリンター用紙上にプリントした後に手作業で日周輪の輪紋数の計数や幅の計測を行っていた。その後、顕微鏡に専用のCCDカメラを接続し、それから得られる画像をパソコンに直接取り込むことのできる装置や、デジタル画像をパソコンモニター上で解析するソフトウェアが登場し、顕微鏡画像の撮影、処理、解析が飛躍的に簡便になった。さらに、顕微鏡とCCDカメラとパソコンを接続した装置に加え、パソコンモニター上で専用ソフトウェアを用いて顕微鏡画像の撮影、画質の調整、日周輪の計数・計測を行う軸の設定、日周輪の計数・計測が一度に行えるシステムも現れ、現在ではこれが日周輪解析の最も強力な解析手法となっている (例えば、ラ

ックシステムエンジニアリング社のAPR)。

特定の解析を行う専用のシステムやソフトウェアは、もちろんその解析を行う上では最も便利であるが高価であり、そういったシステムが利用できない研究現場ではより安価なシステムで同様の解析ができるようになれば、これまであまり研究されてこなかった沿岸性魚類の初期生態の解明に寄与することが可能と思われる。現在、統計処理を行うためにはRと呼ばれるフリーウェアがあり、拡張性が高く、様々な解析を行うことができることから、広く用いられるようになっている。画像解析においても、Image Jというフリーウェアが存在し、距離や面積の測定など多くの解析ができるため、広く用いられている。こういった背景から、耳石日周輪解析もフリーウェアや一般的に市販されている汎用機器を組み合わせることにより安価で簡便に行うことが可能なのではないかと考え、今回はこの方法の検討、一連の作業の整理と記述を行うこととした。

試料 (材料) と方法

使用した機器

1. 生物顕微鏡: Nikon製 Eclipse 80i (20~40倍の通常の対物レンズ, および100倍の油浸対物レンズ, TV直筒, Cマウントダイレクトアダプター付属)
2. 顕微鏡に接続するデジタル一眼レフカメラ: Canon製 EOS 80D
3. 顕微鏡およびカメラと接続するパソコン: Panasonic製 CF-SZ5

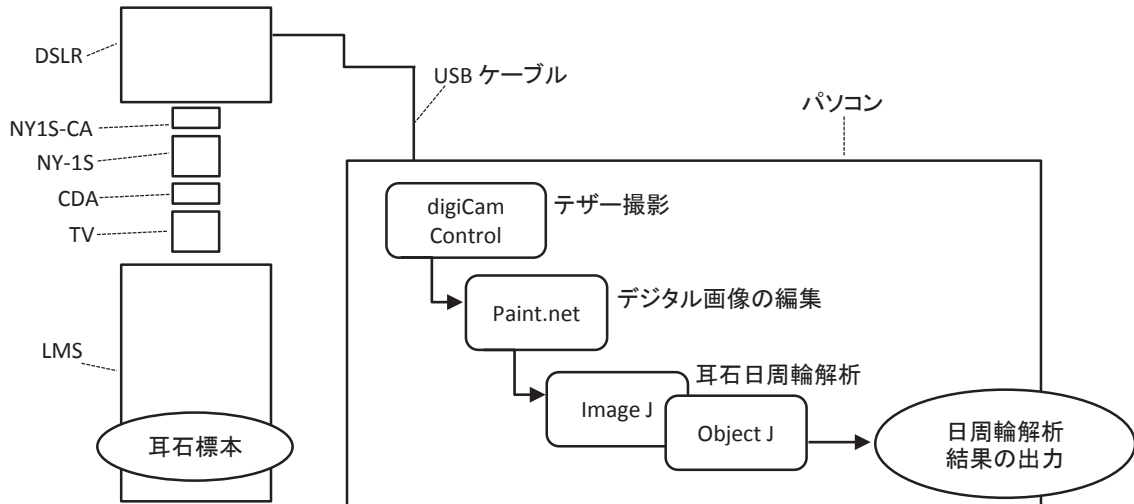


図1 本研究で用いた機器とソフトウェアのシステムダイアグラム

CDA, TV: 光学顕微鏡 (LMS) に接続したcマウントダイレクトアダプターとTV鏡筒

NY-1S, NY1S-CA: cマウントダイレクトアダプターとデジタル一眼レフカメラ (DSLR) を接続するアダプターとキヤノンcマウント用のアタッチメント

パソコン内の長方形: テザー撮影, 画像調整, 耳石日周輪解析に用いるフリーウェアおよびそのプラグイン

4. カメラを顕微鏡に接続するマウントアダプター: 美館イメージング製一眼レフ用アダプター (NY-1S), およびEOS用アタッチメント (NY1S-CA)

5. カメラとパソコンの接続: A-mini BタイプUSBケーブル

使用したフリーウェア

1. digiCam Control (テザー撮影用ソフトウェア): パソコンモニター上でデジタル一眼レフカメラのライブビューの観察, カメラの各種設定の変更, パソコン内への直接の画像保存ができるソフトウェア。本ソフトはCanonおよびNikon社製の多くのデジタル一眼レフカメラに対応しているため用いた。なお, 本報告作成時に使用したのは, バージョン2.0.49.0である。
2. Paint.Net (画像編集用ソフトウェア): 撮影された画像のコントラストや明るさの調整, 複数の画像の同じ位置に同じ角度の直線 (後に, 輪紋幅の計測軸として利用する) を描画するために用いた。なお, 本報告作成時に使用したのは, バージョン4.0.17である。
3. Image J (画像解析用ソフトウェア): Object J (Image J用プラグイン) を追加した状態で使用して, 耳石日周輪解析を行った。Object Jを導入することで, Image J上で樹木の年輪のような連続した計数形質の計数や幅の計測を行うことができるようになる。なお, 本報告作成時に使用したのは, バージョン1.48である。

なお, 今回使用するこれらフリーウェアのダウンロードできるサイトやインストール方法については, Google等インターネット上で容易に検索できるため本稿では省略する。以上の機器・フリーウェアのシステ

ムダイアグラムを図1に示す。

結果

顕微鏡画像撮影以前のdigiCamControlの設定 すべての機器を接続し, パソコン上でフリーウェアdigiCamControlを起動すると, Facebook等のSNS (social networking service) で本ソフトウェアをシェアするための小さいウィンドウが表示される。これを閉じると各種操作が可能となる。耳石日周輪解析では, 1個体の耳石の観察に複数枚の画像を撮影する必要があるが, こういった際の画像ファイルの名称は, 採集年や地点, 個体番号は同じでシリアル番号のみ異なるような名称にしておくと, 後々要らぬ混乱を避けることができる。例えば, 2011年にW14地点で採集されたホッケ稚魚の耳石日周輪画像を保存する場合に, 「2011_W14_ホッケ」という文字列は各耳石画像ファイルに共通に持たせ, その末尾に撮影順に番号を与えとする。この場合は, 本ソフトの左上にある「Session」メニューで設定が可能である。新たに, 設定を行う場合は「Session」→「add new session」を選択する。すると, ファイル名設定を行う「SESSION [ADD/EDIT]」ウィンドウが表示される (図2a)。一番上の「Session name」には調査年や魚種といった個体間で変化しない文字列を入力する (例えば, 「2011_ホッケ」など) (図2a-①)。上から2番目の「Folder」の右の「…」をクリックして (図2a-②), 画像を保存するフォルダを指定する。フォルダは個体ごとに作成すると良い。次に, 上から5番目の項目「File Name Template」の右端にある

「…」をクリックし (図2a-③), 「FILE NAME TEMPLATE EDITOR」ウィンドウを立ち上げて (図2b), ここで撮影する画像ファイル名の設定を行う。「File Name Template:」の入力枠 (図2b-①) にすでに文字列が入っているが, これは一旦削除し, その下に並ぶテンプレートの中からまず「Session Name」をクリックする (図2b-②)。次に, この入力枠内に「地点名」や「個体番号」を直接入力し, 最後に, テンプレートの中から, 「Counter 3 digit」をクリックする (図2b-③)。こうすることによって, 「年_魚種名_地点_個体番号_3桁の連番」というファイル名を撮影する画像に自動的に付与できるようになる。「FILE NAME TEMPLATE EDITOR」ウィンドウの下の「OK」を選択して (図2b-④), 「SESSION [ADD/EDIT]」ウィンドウ (図2a) に戻り, 上から6つ目

の「Counter:」の数値を0にする (図2a-④)。これによって, 画像ファイル名に1から始まる連番を付与できる。digiCamControlによる顕微鏡画像の撮影 digiCamControlを起動した後, カメラの電源を入れると, 本ソフトの左上のライブビューアイコン (Lv: 図2c) がアクティブになるので, これをクリックする。すると, ライブビューの新しいウィンドウが表示され, その時カメラが得ている顕微鏡のライブビューがパソコンモニター上で観察できる。ソフト本体の左端には, 接続されているカメラの情報や設定が表示され, ここでカメラに触れずともカメラのISO感度や露出補正を変更でき, 変更結果はライブビューにすぐさま反映される。実際に多く使用するのは, 露出補正機能であろう。ライブビューを見ながら, 顕微鏡を操作して視野やピントの調整を行った後に, 「ライブビュー」ウィンドウの「Capture」アイコンをクリックすれば, カメラによる画像の撮影とパソコン内への画像ファイルの直接保存が行われる。

なお, 次項の計測軸の設定や, 複数の画像を利用して1つの耳石を解析する場合を考えると, 1枚目の画像を撮影する段階で, 耳石の核付近から耳石外縁 (もしくは, 核からある程度離れた位置にある特徴的な輪紋や, ひび割れ模様) まだが1つの視野に収まった状態にしておくと, 後の作業を迅速に行うことができる。また, 観察されたデジタル画像上で計測した耳石日周輪の輪紋間の幅を μm 単位などで計測するためには, 各倍率において撮影された顕微鏡画像の1ピクセルが何 μm なのかを調べておく必要がある (距離補正值の算出)。このために, 耳石の観察が終わったら, 使用した倍率で対物マイクロメーターの画像も撮影しておく必要がある。

Paint.Netを用いた画像の前処理 上述の手順で撮影された顕微鏡画像は画像編集ソフトウェアで画質を調整したほうが, 日周輪が観察しやすいことが多い。特に, コントラストを適度に強調することが有効である。また, 1つの耳石について, 核付近から耳石外縁に向けて, 少しずつピントを変えて画像を複数撮影することもあるが, 観察している耳石断面が円形では無い場合, 輪紋幅の測定は画像間で共通した位置・角度に設定された単一の計測軸上で行う必要がある。

これらの作業はフリーウェアPaint.Netで行った。日本語のソフトであり, 一般的に行う画像の調整はすべて行うことができ便利である。「調整 (A)」メニュー (図3-a) を選択して「明るさ/コントラスト」で, 画像の明るさやコントラストの調整が可能である。つぎに, 複数の画像に単一の計測軸を設定する。この作業は, 1つの画像上に計測軸となる直線のレイヤーを追加し, このレイヤ

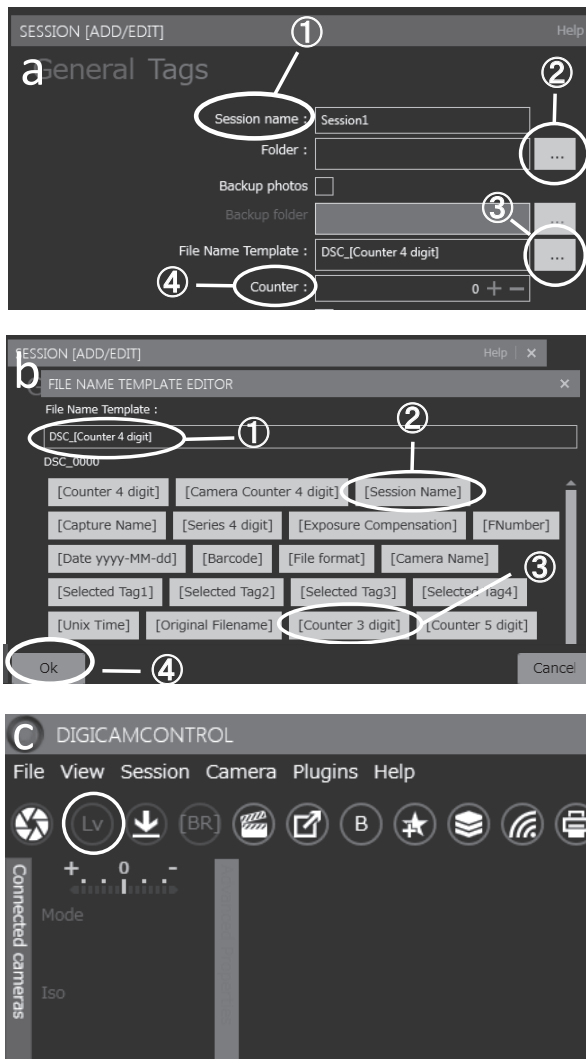


図2 テザー撮影ソフトウェア (digiCamControl) の操作画面

- (a)は「SESSION [ADD/EDIT]」
- (b)は「FILE NAME TEMPLATE EDITOR」
- (c)はメインウィンドウである。

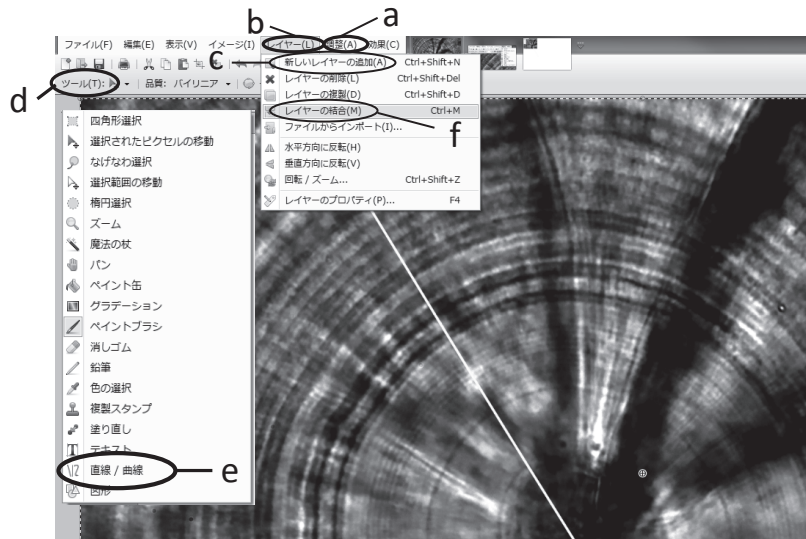


図3 画像編集ソフトウェア (Paint.NET) 上での新しいレイヤーの追加およびそのレイヤーとデジタル画像を結合する作業イメージ
背景の耳石画像はスケトウダラ稚魚の扁平石の中心部

を他の画像に貼り付けるといった手順で行った。まず、耳石の中心から外縁まで連続して観察できる画像を1枚、本ソフトウェアで開く。そして、「レイヤー (L)」メニューから (図3-b)、「新しいレイヤーの追加 (A)」 (図3-c) を選択すると、画像上に透明のシートが重ねられたような状態になる。この後に、「ツール (T)」 (図3-d) を選択して、ツールメニューの「直線/曲線」 (図3-e) から、計測軸を設定したい位置に直線を引く。そして、この直線が書かれたレイヤーをコピーし (キーボードショートカット: Ctrl+C)、次の画像をアクティブにする。次の画像でも、メニューの「レイヤー (L)」→「新しいレイヤーの追加 (A)」 (図3-c) とし、先程コピーしたレイヤーを貼り付ける (キーボードショートカット: Ctrl+V)。この作業をすべての画像で行った後に、「レイヤー (L)」→「レイヤーの結合 (M)」 (図3-f) という処理をすべての画像について行い、上書き保存する。これによって1つの耳石について撮影された複数の画像に同じ位置・同じ角度の計測軸を設定することができる。2枚目以降の画像に追加したレイヤーは移動可能であるので、画像間で耳石の位置が異なる場合は、耳石の中心や耳石上の特徴的な構造 (目立つ輪紋やひび割れなど) といった目印になる物をいずれの画像にも入れておくようにして、それを目印にレイヤーを移動すれば、結果として複数の画像間で同じ位置に計測軸を設定可能である。ただし、耳石の位置が複数の画像間で変わらなければ、沢山の画像を撮影してもレイヤーのコピーと貼り付けの作業の繰り返しのみで、速やかに計測軸がすべての画像で設定できるので、撮影前からライブビュー内の耳石の

位置を調整して耳石の画像上の位置の変更が最少になるよう工夫する必要がある。

Image Jを用いた耳石日周輪解析

1.計測に必要なファイルの準備および設定 まずは、撮影された画像上で、 μm 単位で距離が計測できるようにする。撮影しておいた対物マイクロメーターの画像をImage Jで開き、上から2段目にならぶアイコンの左から5つ目の「直線」アイコンをクリックして (図4-a)、任意の距離の直線を引く。その後、メニューの「Analyze」 (図4-b) →「Set Scale」とすると、「Set Scale」ウィンドウ (図4-c) が表示され、「Distance in pixels:」 (図4-d) には描画した直線のピクセル単位での距離が表示されているので、「Known distance:」 (図4-e) に既知の μm 単位の距離を入力する。すると、「OK」の上に「Scale: pixels/unit」と距離補正值が表示されるので (図4-f)、この数値を撮影した倍率ごとに記録する。

Image Jを用いて、耳石日周輪解析を行うには、Web上から「Object J」というプラグインをダウンロードする必要がある (<https://sil.s.fnwi.uva.nl/bcb/objectj/index.html>)。ダウンロードした「objectj.jar」というファイルは、パソコンのプログラムファイル内のImage Jフォルダの中の「plugins」というフォルダに追加するだけで良い。あとは、Image Jを起動して、メニューの「Plugins」から「Object J」を選択すれば、このプラグインが使用可能となる。

このプラグインは、1つの耳石や樹木の切り株に対し、1つのプロジェクトファイル (拡張子「.ojj」のファイル、以降「ojjファイル」と呼ぶ) を作成し、これによって

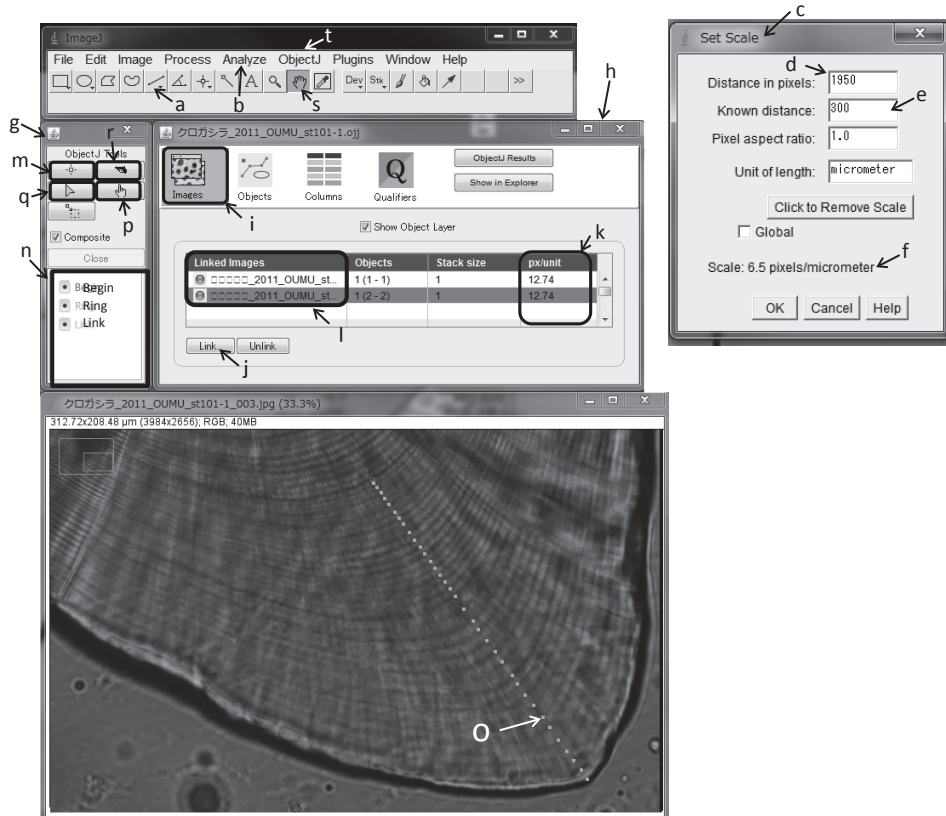


図4 画像解析ソフトウェア (Image J) にプラグイン (Object J) を組み合わせて耳石日周輪解析を行う作業イメージ
 図中の (a) から (t) : それぞれ「結果」中に記述される (a) から (t)
 背景の耳石画像はクロガシラガレイ稚魚の礫石の外縁部

使用した画像や輪紋の計数・計測履歴や結果をフォルダ単位で管理する。そのため、ojjファイルと耳石の画像の収められたフォルダは個体ごとに用意するほうが良い。上述のサイトの「Examples」タブをクリックすると、様々な解析への本プラグインの使用例が掲載されている。今回はここの「Otoliths and tree rings」から、樹木の年輪の解析例を1つダウンロードし、そこに含まれる既成のojjファイルを利用することにした。まず、これをコピーし、日周輪解析を行う個体の画像が保存されているフォルダ内に貼り付け、適宜ファイル名を変更した。これ以降の個体では、このojjファイルを個体ごとに次々とコピー・貼り付けし、名前を変えて使用すれば良い。

フォルダ内に作成したojjファイルをImage Jソフト上にクリック&ドラッグすると、「Object J Tools」ウィンドウ (図4-g) と、開いたプロジェクト名の書かれたウィンドウ (図4-h) が表示される。まずは、プロジェクト名ウィンドウの「Images」タブ (図4-i) をクリックする。そこには、コピー元のプロジェクトファイルにリンクされていた古い画像名が表示され (図4-l)、同じフォルダにその画像が無い場合左端にリンク切れを示す赤い丸印が表示される。これらは必要ないため、選択した

後に「Unlink」をクリックし削除する。その後、「Link」 (図4-j) をクリックすると、このojjファイルが存在するフォルダ内の画像の一覧が表示されるので、使用したい画像ファイルを1つずつ追加していく。使用する画像がすべて同じ倍率で撮影されたものであれば、右端の「px/unit」 (図4-k) で右クリックすると、「Scale All Linked Images」というウィンドウが表示され、ここにその倍率での距離補正值を入れ、「Propagate Scale」をクリックすると、全画像に同じ距離補正值を一度に適用できる。もし、100倍と40倍といった異なる倍率で撮影した画像を混用する場合は画像ごとに補正值を入力する必要があるため、次にその方法を説明する。

異なる倍率の対物レンズで撮影された画像を混用する場合、「Linked Images」列のそれぞれの画像ファイル名 (図4-l) をクリックして、ファイルを開いた後、Image Jのメニュー「Analyze」 (図4-b) → 「Set Scale」 (図4-c) とし、「Distance in pixels」欄 (図4-d) にそれぞれの画像を撮影した倍率における距離補正值を入力し、「Known distance:」 (図4-e) に1を入力し「OK」とすれば良い。

2.日周輪解析に関する作業 これまで準備が整ったので、Object Jを用いて耳石日周輪解析を行っていく。まずは、

「Linked Images」列で最初に解析したい画像ファイル名をダブルクリックして開く。Object Jは一つの起点「Begin」とそれに連なる輪紋「Ring」で構成される「object」が基本となっており、objectは1つの画像内で完結する必要がある。そのため、1つの耳石について撮影された複数の画像で1つのobjectを共有するようなことはできない。このような場合は、画像ごとにobjectを作成し、計数・計測結果は後ほど表計算ソフト等を利用して手動で統合する必要がある。まず、起点（Begin）となる点を設定するため、「Object J Tools」（図4-g）ウィンドウの左上の赤色の照準のようなアイコン（図4-m）をクリックする。すると、同じウィンドウの下から3つ目の「Begin」（図4-n）がアクティブになり、起点となる輪紋を計測軸上でクリックしマークする。すると、自動的に「Object J Tools」ウィンドウ（図4-g）では「Ring」（図4-n）がアクティブになり、連続して輪紋をクリックしていけば、輪紋が水色の四角でマークされていく（図4-o）。複数の画像にまたがって1つの耳石を解析する場合は、次に解析したい画像を「プロジェクトファイル」ウィンドウ（図4-h）の「Linked Images」（図4-l）から開き、上述の手順で再度起点を設定し、同様に輪紋をマークして次のobjectを作っていく。

Object Jはクリックした順番に輪紋を認識するため注意が必要である。例えば、起点を設定してから、5～10本目の輪紋を先にマークして、その後、起点と5本目までの間を埋めていくようなことは単純にはできない。単純にこのような操作をすると、第1輪紋幅は起点から5本目の輪紋までの幅となり、2本目の輪紋は8本目と認識されてしまう。もし、後から輪紋を補完したい場合は、Object J Toolsウィンドウ（図4-g）の上から2行目・右の「手」のアイコン（図4-p）をクリックする。そして、耳石画像上で輪紋を補充したいObjectをクリックして、そのObjectをアクティブにする。その後、輪紋を補完したい位置にカーソルを移動して、「F7」キーを押すことで、輪紋の補完が可能である。補完していく際は輪紋の並ぶ順序を考慮せずランダムに「F7」キーを押していても入力順序は問題にならず、画像上の輪紋の並びどおりに記録されていく。

打ち込んだ輪紋のマーク位置を修正したい場合は、Object J Toolsウィンドウ（図4-g）の上から2行目・左の黄色い「楔形」アイコン（図4-q）を選択し、Shiftキーを押しながら移動したい輪紋をドラッグすれば移動できる。なお、shiftキーを押さずにドラッグするとobjectごと移動することができる。

輪紋のマークを消去したい時は、Object J Toolsウィンドウ（図4-g）の一番上・右の「拳銃」アイコン（図4-r）

をクリックし、shiftキーを押しながら消去したい輪紋をクリックすると消去できる。なお、objectごと消去する時はshiftキーを押さずにクリックすれば良い。

耳石の成長に伴い、途中から輪紋幅を計測する軸を変更することも考えられるが、この場合は上述の方法で起点から輪紋をマークしていき、計測軸を変更したい輪紋までマークした後に、「Object J Tools」ウィンドウの「Link」（図4-n、図4-jのLinkとは異なる）を選択する。次に、新しく計測軸を設定したい部位において先ほど最後にマークした輪紋を特定し、それを「Link」（図4-n）でマークする。その後、再度「Object J Tools」ウィンドウ（図4-g）の「Ring」（図4-n）を選択してから、新しい部位で輪紋をマークしていけば1つのobjectで連続して複数の部位における解析結果を管理できる。

耳石輪紋が高いコントラストで明瞭に観察できる部位では、自動で輪紋をマークすることが可能である。起点から輪紋をマークしていき、自動入力をしたい部位まで到達したら、カーソルを自動入力を終えたい部位周辺へ移動させ、その後「F2」キーを押す。すると、最後にマークした輪紋からカーソルまで自動的に輪紋が認識される。何度かカーソルを微妙に移動させつつ、「F2」キーを押すと自動入力結果が変わるので、最適な結果が得られるまで繰り返せば良い。結果を確定したい場合は「F3」キーを押すと、結果が確定される。

すべての輪紋をマークし終えたら、すべてのobjectについて以下の作業が必要になる。まず、「手」アイコン（図4-s）を選択し、任意のobjectをアクティブにし、「F4」キーを押す。すると、「Enter year」というウィンドウが表示され、-2009などの値が入力された状態になっている。ここに、0以上の値を入力すると、そのobjectの起点から外に向かって、各輪紋が何本目かという情報が付与される。Object Jは、樹木の年輪を解析するものであり、この機能は本来であれば切り株の中心の年輪の形成年（正の値：例えば「1833」）、もしくは最外の年輪の形成年を指定した場合に（負の値：例えば「-1833」）、その他の各年輪が何年に形成されたかを記録するツールである。日周輪解析では特に必要のない作業であるが、0や1と入力しておけばそのobjectに含まれる輪紋数が把握できるので値を入力し、その後「OK」とする。この作業をすべてのobjectで行う。その後、Image Jメニュー「Object J」（図4-t）→「Output (List)」とすると、入力したすべてのobjectについて1本ごとの輪紋幅の計測値が別ウィンドウで表示される。結果を保存する場合は、このウィンドウのメニュー「File」→「Save as」とすれば、「Save as text」ウィンドウが開き、計測結果をテキストファイルで保存できるので、保存先フォルダを確認して保存す

る。あとは、表計算ソフトなどを用いて、輪紋数や輪紋幅を解析すれば良い(図5)。なお、objectはプロジェクト名ウィンドウでlinkした画像の順に番号が付与される。したがって、最初にobjectを作成したい画像は最初にlink(図4-j)しておく必要がある。

考 察

ラトックシステムエンジニアリング社が提供するAPRという耳石日周輪解析専用のシステムがあり、これは顕微鏡像のライブビューの観察、画像の撮影、計測軸の設定、輪紋のマークといったすべての作業が一度に可能である。また、今回の手法では、画像ごとにobjectを生成し、最後に表計算ソフトなどを用いてすべてのobjectの計測

値を手動で合算しなければならないが、APRでは一つの計測軸を複数の画像間で共有することができ、対物レンズの倍率を変更しても、計測軸の縮尺をそれに応じて変更する機能もあり、耳石日周輪解析を行う上では非常に便利なツールである(もちろん、最初に距離補正值の入力といった作業は必要)。さらに最近では、ライブビューのまま輪紋を打ち込んでいくことが可能になっており、大型の耳石でピントを徐々に変更しながら日周輪解析を行う場合でも、その都度画像を撮影する必要がなく、利便性がさらに高まっている。今回用いた手法は、こういった専用のシステムと比較すれば、1) 画像間でobjectを共有できない点、2) objectごとに出力される解析結果を手動で合算する必要がある点で作業性は低い。また、専用システムでは設定した計測軸上でしか輪紋のクリックはできず、軸上にきれいに輪紋がマークされていくが、今回のシステムでは基本的に画像上のどこにでもマーク可能であるので、描画した計測軸上からずれないようにクリックしていかなければならず、専用システムより注意が必要である。こういった難点もあるものの、市販の汎用デジタル一眼レフカメラ、マウントアダプターやパソコン、フリーウェアによって耳石日周輪解析ができる点は、規模の小さい研究現場では価格面で非常に魅力的であろう。また、Image JとObject Jをインストールしたパソコンであれば、場所・時間を選ばず気軽に解析ができる点はメリットであろう。

本稿では、複数のフリーウェアを用いた。使用したフリーウェアが突然利用できなくなり、今回整理した手法でフリーウェアによる日周輪解析ができなくなる可能性は否定できない。しかし、こういったソフトウェアの公開や保守の打ち切り、大幅な仕様変更などは、有償のソフトウェアや機器でも起きうるし、そうした場合には代わりとなる利便性がさらに向上したソフトや機器が出現しているはずであるので、より良いソフトウェアや機器の情報に注意を払っておけば、さほど問題とはならないと考えている。

本稿では、digiCamControlを用いて一度パソコン内に画像を保存した後に、Image Jでその画像ファイルを開き解析を行った。専用のシステムでは、ライブビューの観察から日周輪解析まで1つのソフトウェア上で可能である。Image Jについても、ライブビューの画像を直接キャプチャーしてImage J上に表示させ、そのまま解析を行っていくことは不可能ではない。Micro managerという画像解析のフリーウェアが存在するが、このソフトはImage Jのプラグインとしての機能も持っており、これを仲介させることで、これが可能となる。ただし、Windows OSのパソコンと、市販のデジタル一眼レフカ

	A	B	C
1			
2	201502JWI 4047_01.tif	---	Object 1
3	Year	Width	
4	1	7.9412	
5	2	0.4902	
6	3	0.5882	
7	4	0.6863	
8	5	0.4902	
9	6	0.5795	
10	7	0.7353	
11	8	0.5007	
12	9	0.6887	
13	10	0.7859	
14	11	0.7575	
15	12	0.804	
16	13	0.804	
17	14	0.7776	
18	15	0.8031	
19	16	0.9804	
20	17	0.8434	
21	18	0.6723	
22	19	0.9804	
23	20	0.9314	
24	21	1.0294	
25	22	0.9829	
26	23	0.9039	
27	24	0.9118	
28	25	1.1486	
29	26	0.9118	
30	27	1.265	
31	28	1.045	
32			
33	201502JWI 4047_01.tif	---	Object 2
34	Year	Width	
35	1	0.5441	
36	2	0.5923	
37	3	0.5984	
38	4	0.4217	
39	5	0.4625	
40	6	0.5315	
41	7	0.5971	
42	8	0.5352	
43	9	0.6507	
44	10	0.5047	
45	11	0.4217	
46	12	0.4217	
47	13	0.5481	
48	14	0.3829	
49	15	0.6345	
50			
51			
52			

図5 Image Jを用いて行った日周輪解析結果の出力例
ObjectごとにA列に日周輪数と各輪紋幅が記録されている
ここではMicrosoft Excelを用いている

メラを用いる場合には、現時点ではさらに有償のテザー撮影ソフトウェアを介する必要がある現実的ではない。

著者が日周輪解析を始めた頃の耳石日周輪の解析環境と比較すれば、カメラやパソコン、ソフトウェアに飛躍的な向上がみられ、現在は日周輪解析が非常に手軽に感じられる環境になったといえる。一方で、撮影および解析を行う機器の性能が向上しても、耳石の包埋、顕微鏡の光源や絞りの調整、耳石の研磨といった最良の耳石画像を撮影するまでのプロセスの重要性は現在も過去も変わりがなく、この部分をおざなりにしては良い機器を使用しても良い解析結果は得られない。画像の撮影や解析の作業が手軽になった分、こういったプロセスの重要性が相対的に増しているように感じられる。今回は、耳石画像の撮影から日周輪解析までを市販の機器やフリーウェアを用いて安価で簡便に行う手順について整理・記載したが、今後は標本の保存から耳石標本を顕微鏡で観察するまでのプロセスについて整理・記載していく予定である。

謝 辞

本報告は、北海道立総合研究機構の平成28年度職員研究奨励事業（シーズ探索型）課題「従来法では年齢査定が不正確な魚種への新年齢査定方法の開発と安価な顕微鏡画像解析システムの構築」の成果の一部である。

引用文献

Anderson JT. A review of size dependent survival during

pre-recruit stages of fishes in relation to recruitment. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.* 1988 ; 8 : 55-66.

Campana SE. Year-class strength and growth rate in young Atlantic cod *Gadus morhua*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1996 ; 135 : 21-26.

Joh M, Nakaya M, Yoshida N, Takatsu T. Interannual growth differences and growth-selective survival in larvae and juveniles of marbled sole *Pseudopleuronectes yokohamae*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2013 ; 494 : 267-279.

Joh M, Wada A. Inter-annual and spatial difference in hatch date and settlement date distribution and planktonic larval duration in yellow striped flounder *Pseudopleuronectes herzensteini*. *J Sea Res.* 2018 ; 137 : 26-34.

Leggett WC, Deblois E. Recruitment in marine fishes: is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stages? *Neth. J. Sea Res.* 1994 ; 32 : 119-134.

Takahashi M, Watanabe Y. Growth rate-dependent recruitment of Japanese anchovy *Engraulis japonicus* in the Kuroshio-Oyashio transitional waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2004 ; 266 : 227-238.

Takasuka A, Aoki I. Environmental determinants of growth rates for larval Japanese anchovy *Engraulis japonicus* in different waters. *Fish. Oceanogr.* 2006 ; 15 : 139-149.

Yoklavich MM, Bailey KM. Hatching period, growth and survival of young walleye pollock *Theragra chalcogramma* as determined from otolith analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1990 ; 64 : 13-23.