

デジタル一眼レフカメラと画像解析による 簡便迅速な動物プランクトンの分析法

嶋田 宏

キーワード：デジタルカメラ、動物プランクトン、画像解析

海の恵みの根源、プランクトン

「プランクトン (plankton)」は、泳ぐ力に乏しく水中を浮遊する生物の総称で、微細な植物や動物が大半ですが、直径1mを超えるクラゲも「プランクトン」に含まれます。北海道周辺では例年3～5月頃に植物プランクトンが増え（春季ブルーム^注、図1）、これを餌として成長する動物プランクトンは少し遅れて4～6月頃に増えます（図2）。このような植物プランクトンと動物プランクトンの発生規模は年や海域によって異なり、日本海では植物プランクトンが多い年に動物プランクトンも多くなる傾向があります^{1)・2)}。また、動物プランクトンが増える4～6月頃はサケの稚魚やホッケの未成魚などが盛んに餌を食べて成長する時期でもあります。北海道周辺に生息する動

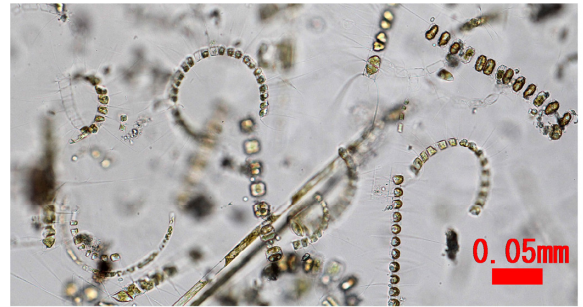


図1 植物プランクトンの「春季ブルーム^注」
(2014年3月5日、余市沿岸)



図2 晩春に増えた動物プランクトン
(2014年5月10日、積丹沖)

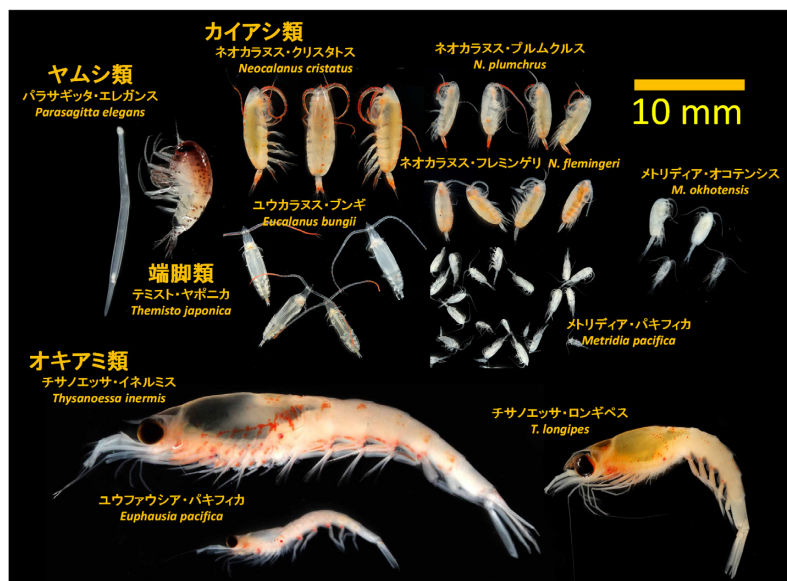


図3 北海道周辺海域に多く生息する動物プランクトン11種

注) 冬に深みから表層に供給された栄養塩を利用して、春に珪藻を主体とする植物プランクトンが増える現象

物プランクトンは比較的大型の甲殻類など十数種が主で(図3)、魚にとって大事な餌になります。水産資源を持続的に利用するためには、魚介類だけでなく、餌となるプランクトンについての継続的なモニタリングが重要です。

動物プランクトンの分析作業の省力化

魚の餌となる動物プランクトンの変動は当然、水産資源の変動に影響すると考えられますが、プランクトン分析作業の手間がボトルネックとなり、資源変動を説明するためのプランクトンの情報は乏しい状況にありました。つまり、微細で多様な生物を含むプランクトン試料の分析が「時間がかかる高度に専門的な作業」であることが問題だったわけです。そこで水産試験場は北海道大学と共同で、従来の分析法に代わる、デジタルカメラを用いた簡便迅速な分析法を開発しましたので、以下にご紹介します。

デジタルカメラを利用した撮影システムの構築

従来の分析法は、実体顕微鏡を用いてプランクトンを種別に選別した後に精密天秤で計量するもので、1試料あたりおおよそ半日を要していました。この手間を軽減するため、デジタル一眼レフカメラでシャーレに入れた試料を撮影した後、画像解析によって種別の個体数と重量を求める方法を検討しました。

動物プランクトン試料には多様なサイズの生物が含まれており、全体にピントの合った精細な画像を得る必要があるため、図4のような撮影システムを考案しました³⁾。留意したことは、次の3点です。

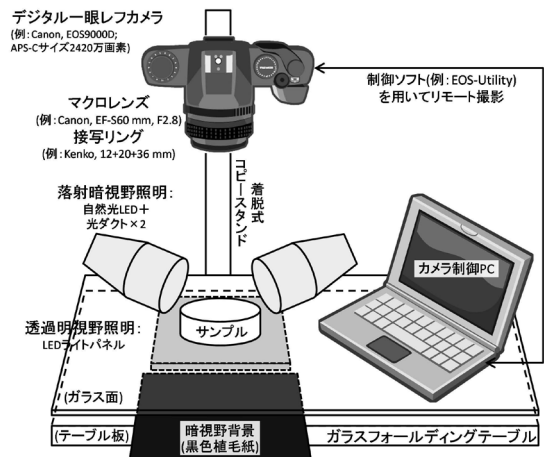


図4 撮影システムの概略図(嶋田・奥(2014)³⁾を改変)

- (1) 小さな生物を拡大(マクロ)撮影できること
- (2) 電子シャッターでリモート撮影できること(振動による「ブレ」防止のため)
- (3) 透過明視野/落射暗視野照明による撮影ができること(外形と色彩の精細な記録のため)

この撮影システムの構築によって、現在普及しているイメージセンサーサイズAPS-C/2,420万画素のカメラならば、一般的なマクロレンズの最高倍率である「等倍」(イメージセンサーと同じ視野面積: $22.3 \times 14.9 \text{ mm}^2$)の撮影時に0.01 mm (10 μm)を解像でき(図5)、動物プランクトンの分析に十分な品質の画像データを取得できるようになりました。また、このシステムはパソコンを除き約20万円で購入でき、一般的な器材(研究用実体顕微鏡と専用カメラ等)と比べて約1/5と低価格であることも特長です。



図5 APS-Cサイズ2,420万画素のデジタルカメラで「等倍」撮影した対物マイクロメーター(最小目盛0.01 mm = 10 μm)

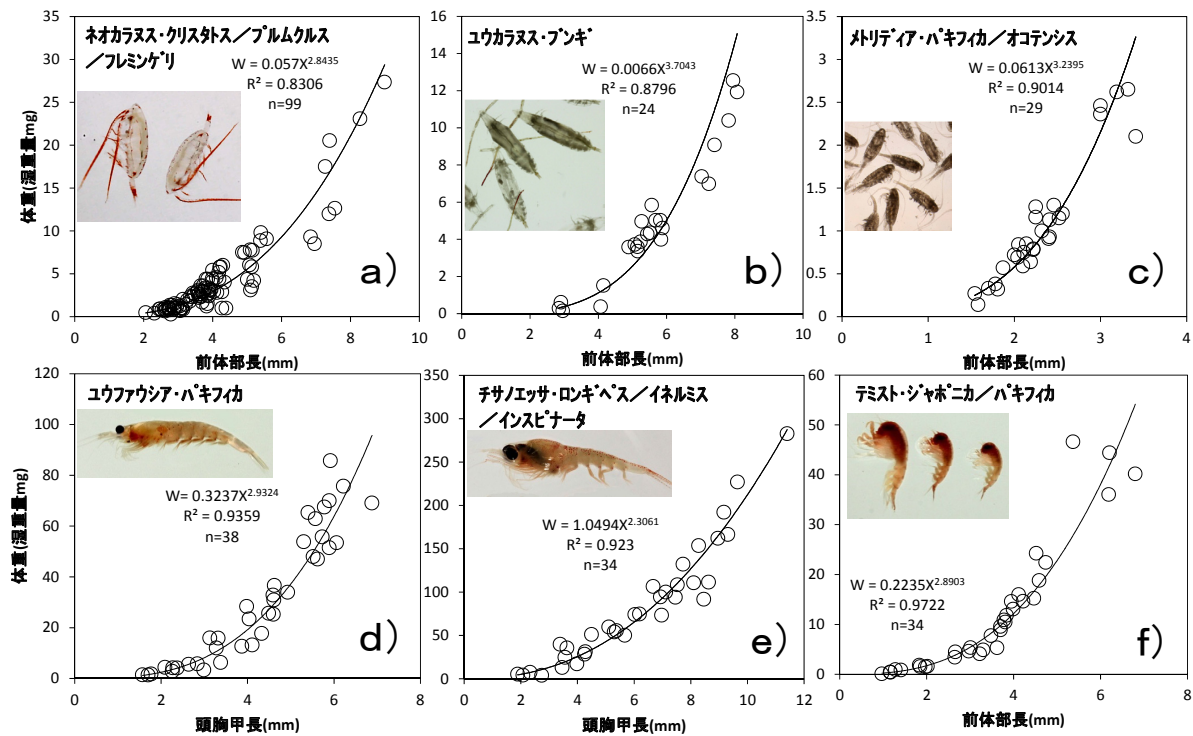


図6 大型動物プランクトン6種の体サイズ (X) と体重 (W) の関係
a) ~c) カイアシ類、d)・e) オキアミ類、f) 端脚類

種別の体サイズと体重の関係式

次に取り組んだのは、生物の画像を重さに換算するために、体サイズと体重の関係式を求めることでした。従来の分析法によって生物を選別した後に、個体ごとに体サイズを計測、精密天秤で重さを測る作業を繰り返して、種別または分類群別に、体サイズと体重の関係式を求めました。湿重量

を測った後はオープンに入れ、庫温55℃で3日間乾燥させた後に再び重さを測り、乾重量を求めました。

体サイズと体重の関係を北海道大学と共同で整理した結果⁴⁾、種別、分類群別に固有の関係式が求められ (図6)、画像データを用いて生物の体サイズを測り、重量を求めるための準備が整いました。

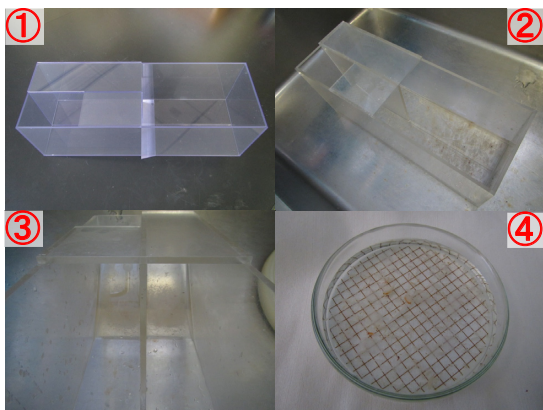


図7 プランクトン分割器 (1) を用いた試料の分割希釈 (2~4)

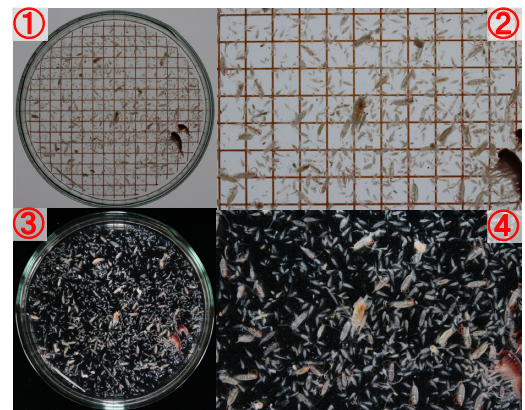


図8 撮影システムで得られた動物プランクトン試料の画像 (1・3: 全景、2・4: 拡大、1・2: 明視野、3・4: 暗視野)

動物プランクトン試料の撮影

プランクトンネットを用いて採集された動物プランクトン試料は、一般に多量の生物を含んでいるため、そのままでは撮影に向きません。そこで、「プランクトン分割器」(図7)を用いて、撮影時に生物が重なり過ぎない程度に分割希釈を繰り返す(元試料の1/4~1/16)、分割数を記録した後に、5 mm格子線の付いたφ90 mmシャーレに均一に試料を注ぎます(図7)。これを前述の撮影システムを用いて、まず0.15倍(試料全景、視野面積:150×100 mm²)、次いで0.37倍(部分拡大、視野面積:60×40 mm²)で、透過明視野/落射暗視野照明の双方について撮影します(図8)。このとき、全体にピントの合った精細な画像データを得るため、撮影モード/絞り値/ISO感度は原則として、絞り優先オート/絞り値 F = 5.6/ISO感度 = 400 に設定、露出については明視野では

0~-0.3、暗視野では-2~-3に補正して、マニュアルフォーカスで撮影します。これらの撮影モード/絞り値/ISO感度/露出設定の目的は、適度に絞り込むことでピント(被写界深度)の厚みを確保し、感度を上げて(露光時間を短縮して)ブレを防ぎつつ、白っぽい被写体の露出オーバー(白とび)を防ぐことにあります。

以上の手順で各試料4枚の画像データを記録しておけば、その試料の中身はいつでも分析できることになります。撮影は、プランクトンの生時の色彩が失われる前(採集、固定後1週間以内)に行うことが望ましく、色彩の情報は以下の画像解析の際に、よく似た種類の判別に役に立ちます。

画像解析ソフトを用いた体サイズ測定

ここでは、ImageJ(イメージジェイ、<https://imagej.nih.gov/ij/>)という解析ソフトを用いた

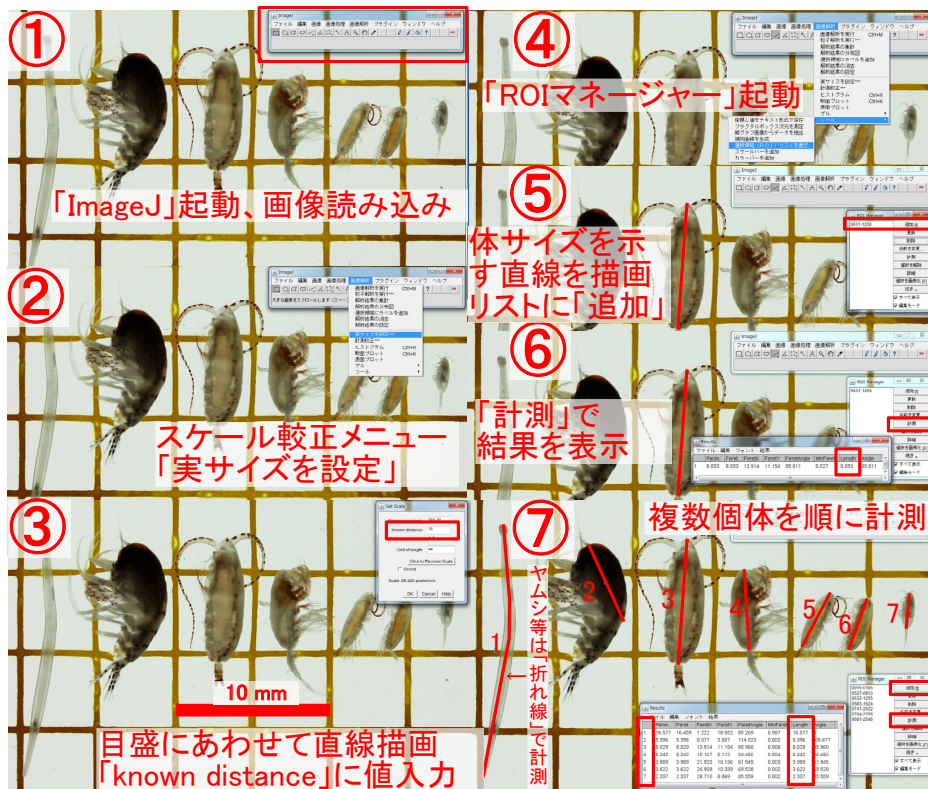


図9 画像解析ソフト「ImageJ」を用いた体サイズ測定

- ①~③: ソフト起動・画像データ読み込み・スケール較正
- ④~⑦: 「ROIマネージャ」による複数個体の連続測定

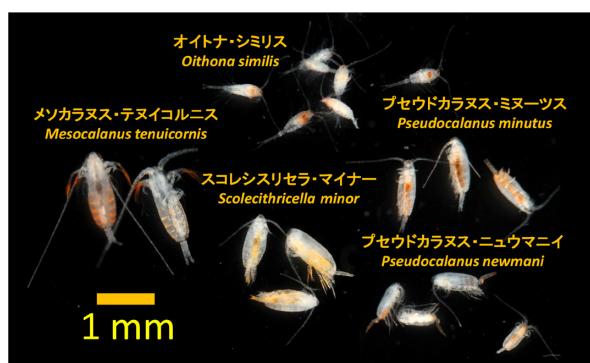


図10 北海道周辺海域に多く生息する
小型カイアシ類5種

計測例を示します。この他にもMotic Images plus (モーティックイメージズプラス、http://www.shimadzu-rika.co.jp/kyoiku/download/mip2_2.html)等のフリーソフトがありますが、使い方はだいたい同じです。どのソフトにおいても、生物のサイズ測定の際は、スケールを較正(画素あたりの実測値を決定)した後に、生物の体サイズを示す直線または折れ線の長さを測る(図9)、という手順で行います。

表1 動物プランクトン種別・動物群別の体サイズと体重の関係式

分類群	ネオカラヌス属	体サイズ(X)計測部位	体サイズ-体重関係式($W = aX^b$) または 湿重量-乾重量関係式($WW = cDW$)	
			湿重量(WW mg)	乾重量(DW mg)
カイアシ類	ネオカラヌス属	前体部長(mm)	$WW = 0.057X^{2.84}$ $WW = 7.22DW$	$DW = 0.0069X^{2.77}$
	ユウカラヌス・ブンギ	前体部長(mm)	$WW = 0.0066X^{3.7}$ $WW = 9.98DW$	$DW = 0.0012X^{3.39}$
	メトリディア属	前体部長(mm)	$WW = 0.0613X^{3.24}$ $WW = 4.82DW$	$DW = 0.0012X^{5.42}$
	パラユウキータ・エロンガタ	前体部長(mm)	$WW = 0.0519X^{3.19}$ $WW = 5.39DW$	$DW = 0.0025X^{4.03}$
	カラヌス属	前体部長(mm)	$WW = 0.0325X^{3.45}$ $WW = 5.79DW$	$DW = 0.005X^{3.42}$
	他大型カイアシ類	前体部長(mm)	$WW = 0.0766X^{2.93}$ $WW = 6.22DW$	$DW = 0.0104X^{2.97}$
端脚類	テミスト属	前体部長(mm)	$WW = 0.247X^{2.81}$ $WW = 7.84DW$	$DW = 0.0201X^{3.16}$
	他端脚類	前体部長(mm)	$WW = 0.29X^{2.33}$ $WW = 6.18DW$	$DW = 0.0414X^{2.33}$
オキアミ類	ユウファウシア・パキフィカ	頭胸甲長(mm)	$WW = 0.318X^{2.96}$ $WW = 5.19DW$	$DW = 0.0368X^{3.2}$
	チサノエツサ属	頭胸甲長(mm)	$WW = 1.05X^{2.31}$ $WW = 3.68DW$	$DW = 0.103X^{2.75}$
他甲殻類	アミ類	頭胸甲長(mm)	$WW = 0.707X^{2.13}$ $WW = 6.43DW$	$DW = 0.0486X^{2.54}$
	貝虫類	殻長(mm)	$WW = 7.78DW$	$DW = 0.0012X^{2.53}$
ヤムシ類		体長(mm)	$WW = 11.1DW$	$DW = 0.0001X^{3.13}$
脊索動物	尾虫類	体幹長(mm)	$WW = 8.83DW$	$DW = 0.0501X^{1.99}$
	他脊索動物	体長(mm)	$WW = 19.6DW$	$DW = 0.00229X^{2.73}$
クラゲ類		傘高(mm)	$WW = 18.9DW$	$DW = 0.0013X^{3.24}$
その他	多毛類	体長(mm)	$WW = 11.8DW$	$DW = 0.0309X^{1.53}$
	軟体動物	体長(mm)	$WW = 9.05DW$	$DW = 0.195X^{1.13}$

測定番号	分類群	計測値(X)	a	b	c	湿重量	乾重量
1	13	16.58	0.0001	3.13	11.1	7.28	0.68
2	7	5.40	0.0201	3.16	7.84	32.42	4.14
3	1	8.03	0.0069	2.77	7.22	15.97	2.21
4	4	5.24	0.0025	4.03	5.39	10.69	1.98
5	1	3.99	0.0069	2.77	7.22	2.30	0.32
6	1	3.62	0.0069	2.77	7.22	1.76	0.24
7	3	2.34	0.0012	5.42	4.82	0.58	0.12

分類群識別番号	a	b	c
1 ネオカラヌス属	0.0069	2.77	7.22
2 ユウカラヌス・フンギ	0.0012	3.39	9.98
3 メトリディア属	0.0012	5.42	4.82
4 パラユウキータ・エロンガタ	0.0025	4.03	5.39
5 カラヌス属	0.005	3.42	5.79
6 他大型カイアシ類	0.0104	2.97	6.22
7 デミスト属	0.0201	3.16	7.84
8 他端脚類	0.0414	2.33	6.18
9 ユウファウシア・パキフィカ	0.0368	3.2	5.19
10 チサノエッサ属	0.103	2.75	3.68
11 アミ類	0.0486	2.54	6.43
12 貝虫類	0.0012	2.53	7.78
13 ヤムシ類	0.0001	3.13	11.1
14 尾虫類	0.0501	1.99	8.83
15 他背索動物	0.00229	2.73	19.6
16 クラゲ類	0.0013	3.24	18.9
17 多毛類	0.0309	1.53	11.8
18 軟体動物	0.195	1.13	9.05

図11 分類群の識別番号と体サイズの計測値を入力して重量に換算するためのワークシート

体サイズ測定は、原則として成体の体サイズが 2 mmを超える大型優占種（図3）について種別に行います。種類によっては試料中に多量に含まれる場合がありますが、このときは30~50個体について体サイズを測り、残りは個体数のみの記録にとどめておくと、所要時間を短縮できます。同様に時間短縮のため、成体の体サイズが 2 mm未達の小型種（図10）については、原則として個体数のみを記録します。視野全体についての個体数が極めて多い場合は、50個体を目処に計数して、格子線を利用して「全視野 ○ mm²に対して、□ × △ mm²について計数した」ことを記録しておきます。この記録は、前述の分割数とともに、試料あたりの個体数を求めるのに用います。

表計算ソフトを用いた体サイズの重量への換算

体サイズデータは、種別、動物群別の体サイズと体重の関係式の一覧表（表1）に基づいて重量に換算します。汎用の表計算ソフトを用いて、分類群の識別番号と体サイズを順に入力すれば、簡単に重量に換算できるワークシートを作成しました（図11）。換算された種別、分類群別の重量から、前述の計数した面積と分割数の情報を用いて、試



図12 ホタテガイ浮遊幼生（1.9倍）撮影のための36mm接写リングの装着

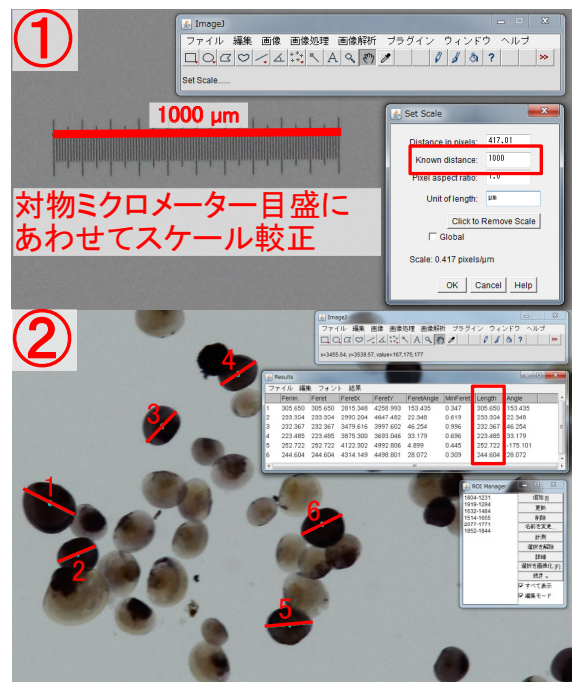


図13 免疫染色法で簡易同定⁵⁾したホタテガイ浮遊幼生の殻長測定
 ①：ソフト起動・スケール較正
 ②：「ROIマネージャ」による複数個体の連続測定

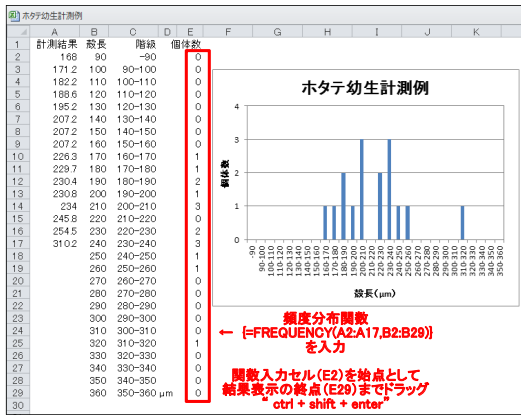


図14 殻長計測結果の頻度分布関数によるデータ整理とグラフ作成

料あたりの重量が求められます。

以上の分析法で撮影から画像解析までに要する時間は1試料あたり約1時間であり、従来法で半日要していた作業時間を大幅に短縮することができました。

ホタテガイ浮遊幼生の計測への応用

この研究で考案した撮影および画像解析法は、体サイズ0.1~100 mmの生物ならば応用可能です。例えばホタテガイ浮遊幼生を計測する場合は、殻

長0.1 ~0.25mmの小さな個体をサイズ別に計測するため、0.005 mm (5 μm) まで解像できるように、「等倍」にセットしたマクロレンズとカメラ本体の間に「接写リング」を取り付け (図12)、1.9倍 (視野面積: 11.7×7.8 mm²) の透過明視野照明で撮影します。プランクトンの場合と同様に、画像解析ソフトを用いて浮遊幼生の殻長を測り (図13)、表計算ソフトにデータを取り込めば、頻度分布 (ヒストグラム) 関数を用いて10 μm刻みで殻長組成を求め、棒グラフを作成することができます (図14)。この方法は試料の全景をパソコンのディスプレイに映出して間接的に計測できるため、従来の万能投影機等による直接観察に代わる方法として、普及が期待されます。

まとめ

新たな分析法の開発によって、動物プランクトンの分析は「時間がかかる高度に専門的な作業」から「より一般的な作業」に変わり、魚介類の餌環境を速やかに把握できるようになりました。動物プランクトン試料に含まれる生物の量と組成は

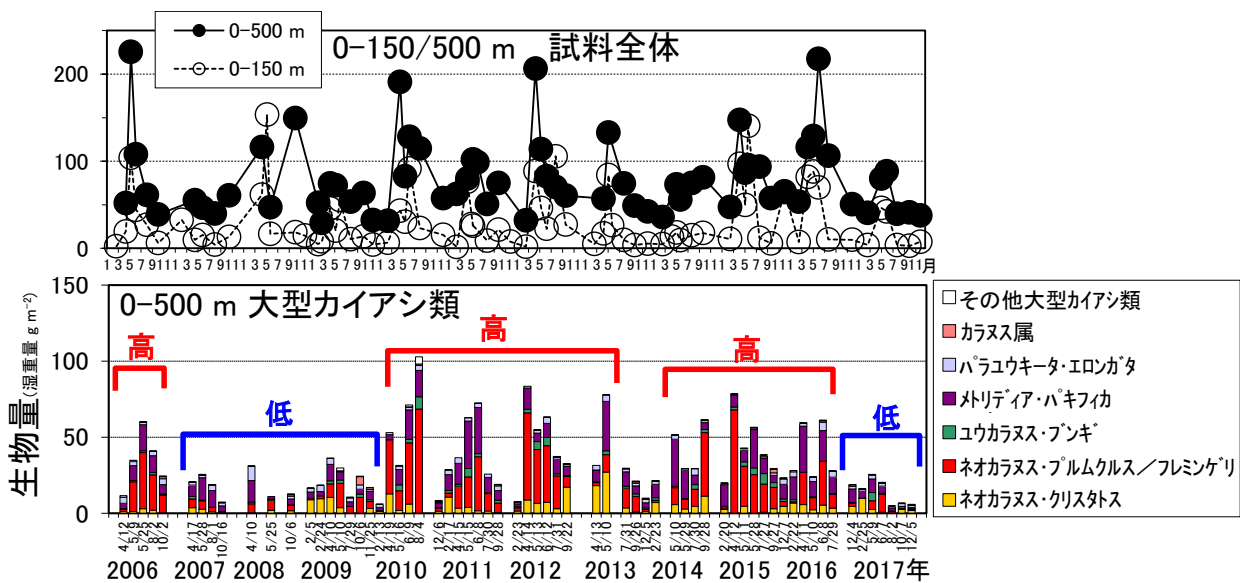


図15 北部日本海 (積丹沖) における動物プランクトン生物量の変動 (2006-2017年)
 上: 改良型ノルパックネットによる鉛直曳き採集試料全体
 下: 大型カイアシ類優占種

年、季節毎に大きく変わるため(図15)、分割希釈および計数等の作業内容(図7~9)を臨機応変にアレンジしながら、長期的視野でモニタリングを継続することが重要です。

今後は過去の未分析試料の処理を順次進めて、餌環境と資源変動の長期的な関係を調べる予定です。将来的には、プランクトンの種や分類群の判別について画像認識(機械学習)等の技術を検討し、自動化を進めていく方針です。

研究の進捗にあたり、動物プランクトン種別、分類群別の体サイズと体重の関係式のリストアップについては、北海道大学水産科学研究院の山口篤博士、松野孝平博士ならびに中村麻見氏にご協力いただきました。撮影システムについては、マイクロワールドサービスの奥修博士にご助言をいただきました。プランクトン試料の採集には稚内水試北洋丸、釧路水試北辰丸ならびに函館水試金星丸の三隻の試験調査船の皆様にご尽力いただきました。ここに記して御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 嶋田 宏, 坂口健司, 森 泰雄, 渡野邊雅道, 板谷和彦, 浅見大樹 (2012)北海道周辺4海域(道東・道南太平洋、北部日本海および南

部オホーツク海)における動物プランクトンバイオマスおよび種組成の季節変化と年変動, 日本プランクトン学会報, 59, 63-81.

- 2) 嶋田 宏 (2016)2.北海道周辺海域における植物・動物プランクトンの変動, 水産海洋研究, 80, 155-156.
- 3) 嶋田 宏, 奥 修 (2014)デジタル一眼レフカメラとマクロレンズを用いた動物プランクトン試料の撮影と生物測定, 日本プランクトン学会報, 61, 87-90.
- 4) 中村麻見, 松野孝平, 阿部義之, 嶋田 宏, 山口 篤 (2017)亜寒帯太平洋海域におけるメソ動物プランクトン優占種/分類群別の体サイズと体重の関係ならびに化学組成、特にカイアシ類による油脂蓄積の影響について(英文), Zoological Studies, 56, 13, 1-15.
- 5) 清水洋平, 岩井俊治, 高島信一, 川崎琢真, 山下正兼 (2014)ホタテガイ幼生簡易同定に用いる高特異的ポリクローナル抗体の作製, 水産技術, 7, 31-36.

(しまだひろし 中央水試資源管理部

報文番号B2423)