

Bench-top VPR (B-VPR) を用いたホルマリン液浸動物プランクトン試料の計 測

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2024-08-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 市川, 忠史, 瀬川, 恭平, 森田, 宏, 田中, 照喜 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2010457

This work is licensed under a Creative Commons
Attribution 4.0 International License.



原著論文

Bench-top VPR (B-VPR) を用いた ホルマリン液浸動物プランクトン試料の計測

市川忠史^{*1}・瀬川恭平^{*1}・森田 宏^{*1}・田中照喜^{*2}

Usefulness of Bench-top VPR(B-VPR) in Measuring Formalin-preserved Zooplankton Samples

Tadafumi ICHIKAWA^{*1}, Kyohei SEGAWA^{*1}, Hiroshi MORITA^{*1}, and Teruki TANAKA^{*2}

Zooplankton, especially of the class Copepoda, are an important component of the diets of most fish species during development. Consequently, copepod size and species composition can affect fish larval survival and therefore fisheries resources. However, the counting and sizing of formalin-preserved copepods by conventional microscopic methods is time consuming. To improve the speed and convenience of measuring copepod abundance and biomass density, we assessed the utility of bench-top VPR (B-VPR) for counting formalin-preserved zooplankton samples. Plankton imaging speed by B-VPR was more than 1500 individuals/min, and the total measurement time required was significantly shorter than with the conventional microscopic method. Because the accuracy of identification and classification of zooplankton images by using computer analysis systems has not yet been optimized, we hypothesized that a combination of both computer and manual classification with selection of regions of interest (ROIs) would enable efficient analysis. Copepod ROI image data obtained from B-VPR were compared with those taken by manual measurements under a microscope. B-VPR was capable of accurately estimating copepod abundance and biomass density using a conversion factor. We concluded that B-VPR enables zooplankton samples

2008 年 7 月 16 日受付, 2008 年 12 月 19 日受理

動物プランクトンは海洋生態系における物質輸送, 生物生産および魚類資源の加入の仲介者としての鍵となる生物群である¹⁾。特にカイアシ類は個体数の上で大きな割合を占め,²⁾ 稚仔魚の餌料として重要な存在である。一方, 魚類の餌料選択要因としては餌料の個体サイズが重要であり³⁾, たとえば太平洋ヘイクの再生産が動物プランクトンのサイズ別現存量変動と関係すること⁴⁾, 魚類の成長, 加入, 生産が動物プランクトンの分類群組成や体長組成の影響を受けることが指摘されている⁵⁻⁷⁾。このため稚仔魚の成長・生残によって左右される魚類資源の変動を考える上でカイアシ類のサイズ別現存量に関する情報は不可欠と考えられる。

カイアシ類など動物プランクトン現存量を把握するため, プランクトンネットを用いた採集が行われてきた。ネット採集は比較的簡便であること, 濾水量が大きく, 確実に試料が得られることなどから, 現在, 最も広く用いられている手法であり, 多くの試料が蓄積されている^{8,9)}。しかし, プランクトンネットで採集された大量のホルマリン液浸試料を顕微鏡下で分類, 計数ならびに計測する作業は, 多大な時間, 労力, さらに専門的な知見を必要とする。そのため稚仔魚の成長・生残を考える上で重要と考えられるカイアシ類のサイズ別現存量の長期変動に関する報告は NAKATA & HIDAKA¹⁰⁾ などに限られる。

^{*1} 独立行政法人水産総合研究センター 中央水産研究所 〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-4

National Research Institute of Fisheries Science, FRA, 2-12-1, Fuku-ura, Kanazawa-Ku, Yokohama, Kanagawa 236-8648, JAPAN
wamusi@affrc.go.jp

^{*2} 株式会社エス・イー・エイ

こうした問題を解決するため、ネット採集されたホルマリン液浸試料について機器を用いた計測が行われてきた^{4,11,12)}。その多くは Optical Plankton Counter¹³⁾ (OPC) を用いている。OPC は装置の構造が簡単で計測結果が即時に得られる利点があるが、得られる情報は粒子の大きさと数に限られる。そのため、計測した粒子の生物・非生物の判断や分類群の識別は難しい¹⁴⁾。

一方、動物プランクトンを画像として記録し、解析ならびに計数・計測することが試みられている。ホルマリン液浸試料を対象とした装置としては、試料をスキャナー上に展開し、スキャンされた画像からプランクトンを抽出し分類と計数・計測を行う ZOOSCAN があり¹⁵⁾、地中海で WP2 ネットで採集された試料を中心に測定が進められている¹⁶⁾。しかし、ZOOSCAN は前処理が必要で一度に記録できるプランクトン数に制限があるなどの問題があるため、記録数に制限がなく、より簡便に保存試料が計測できる装置の開発が必要と考えられた。一方、現場で動物プランクトンを計測する測器としては Video Plankton Recorder¹⁷⁾ (VPR) を用いた研究報告が多い¹⁸⁻²⁰⁾。VPR は *in situ* での記録を目的として開発されたため、ネット採集されたプランクトン試料を計測した例はないが、フローセルとポンプ採水を組み合わせ、二枚貝幼生を対象とした船上での連続観測が行われてい

る*。フローセルによる計測はスキャナー上に試料を展開しなければならない Zooscan に比べ、前処理の手間が無く、記録されるプランクトン数に制限がないため、より簡便に保存試料の画像化と計測が行えると考えられる。

本研究では、長期に渡って採集・蓄積されたプランクトン試料から、カイアシ類のサイズ別現存量を簡便かつ迅速に計測する手法として、水中用の VPR を実験室用に改良した室内型 VPR (Bench-top VPR; B-VPR) の有効性について検討した。B-VPR の計測に必要な条件や測定結果の信頼性について検討を行うとともに、簡便かつ迅速に大量の標本を処理する技術の実用性を検証し、今後の動物プランクトン保存試料の活用方法について考察した。

方 法

装置の概要 本研究では、SeaScan Inc. が制作した室内型 VPR (Bench-top VPR; B-VPR) を改良した装置を使用した。B-VPR は試料の投入部、フローセル部、カメラ・ストロボ部、試料の回収部および画像記録用 PC から構成される (図 1、写真 1)。本研究で使用した B-VPR は、プランクトン計測数の信頼性向上のため流量計を取り付

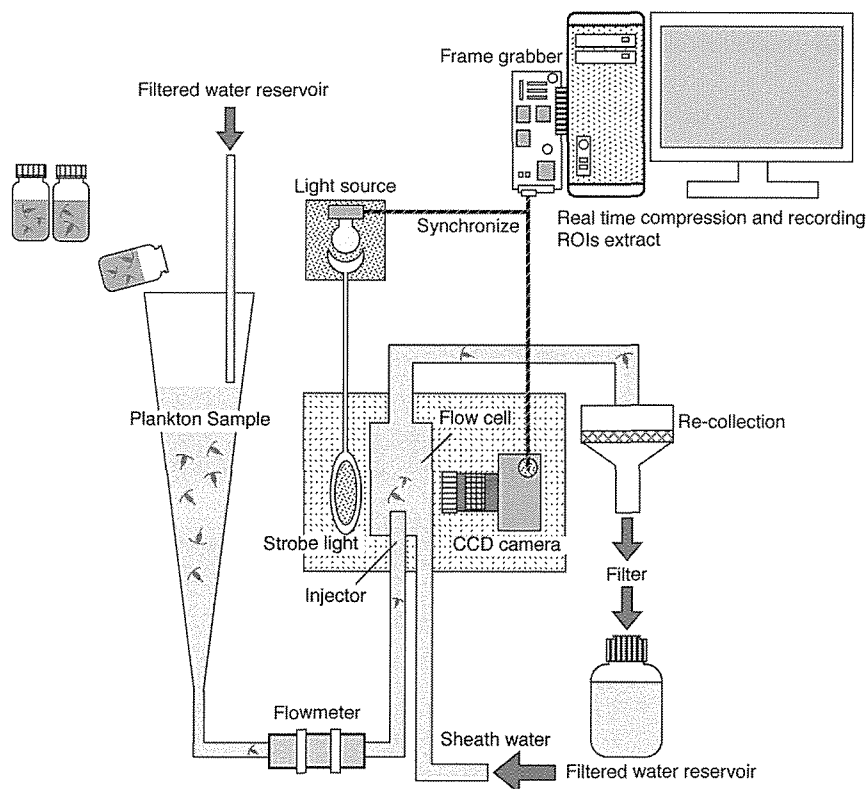


図 1. B-VPR の構成。左が試料の投入部、中央がフローセル部、カメラ・ストロボ部、右が試料の回収部。フローセルとカメラ・ストロボはケース内に格納される

*Gallager 私信

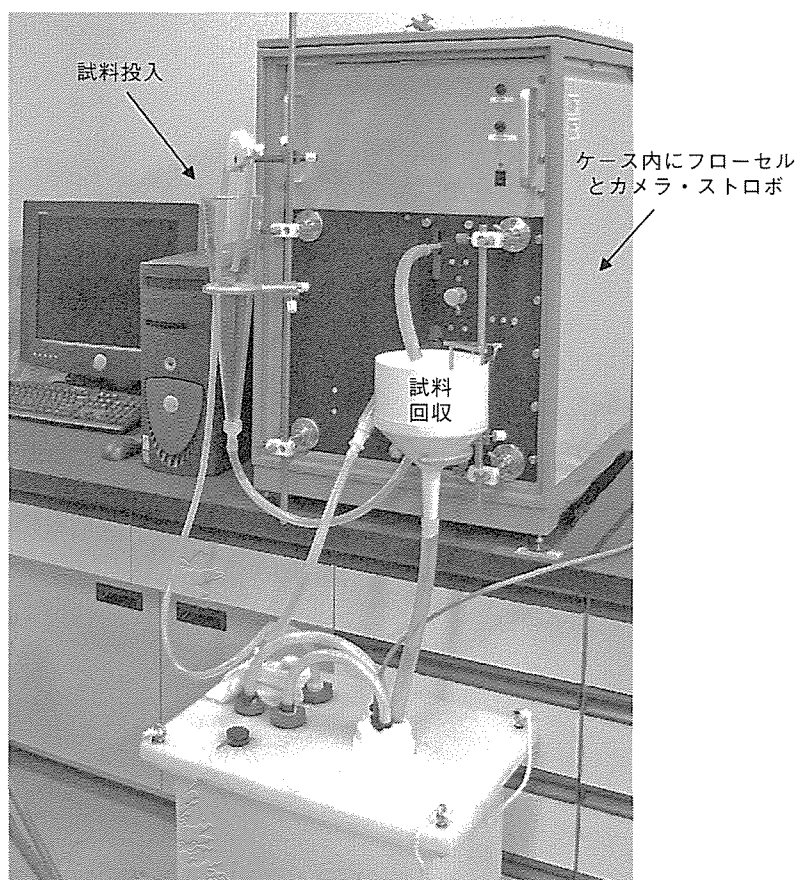


写真 1. 本研究で使用了 Bench-top VPR (B-VPR)

け、画像と同時に流量データを取得できるソフトウェアを開発して使用した点、計測対象となるプランクトン試料に合わせたフローセルを設計して取り付けただ点について改良を行った。

試料の投入部は円すい型の容器で、容器上部から計測するプランクトンを投入する。水中ポンプを用いてリザーバタンク内の水を投入容器上部から循環させ、プランクトンはその水流 (sample water) によってフローセルに運ばれる。sample water の流量を把握するため、フローセルの直前に流量計 (カイジョーソニック SLF-100) を取付け、1 秒ごとの平均流量を記録した。

フローセル (写真 2) は、プランクトンが流れるインナーチューブ (インジェクター) の外側に鞘状 (sheath) のアウターチューブを配置した構造となっている*。アウターチューブにもリザーバタンクからの水 (sheath water) を流すことで、インジェクターから出てくるプランクトンが壁面に接近してカメラの視野外となり、計測できない状況を防ぐ。同様の 2 重構造のフローセルは FlowCytobot²¹⁾ などでも使用されている。フローセルを通過したプランクトンは、採集時に使用されたプランクトンネットの網目幅に応じたネット地を用いて回収され

る。

カメラとリング状ストロボ (直径 6cm) はフローセルを挟んで設置されている。カメラは、 $1,392 \times 1,024$ pixel のプログレッシブ型の 2/3 インチ白黒 CCD カメラ (Hitachi KP-F120CL) を使用し、24fps でストロボと同調するように調整した。カメラからの画像は、画像記録用コンピュータに組み込まれたフレームグラバー (Matrox Meteor2-CL/32) 経由で、1 フレーム毎に JPEG2000 によるリアルタイム圧縮を行いながらハードディスクに記録される。圧縮記録されたファイルからは、専用の画像抽出プログラムを用いて 1 フレーム毎にプランクトンが記録された関心領域 (Region of Interests, ROI) を切り出し、TIFF 形式でディスクに保存する。

カメラ視野 本装置では、網目幅 0.33mm のプランクトンネットで採集されたホルマリン液浸試料を主な測定対象とし、さらに動物プランクトンの中でも稚仔魚の餌量として重要なカイアシ類を中心に計測を行うことを目的とした。そのため計測対象となるカイアシ類の体幅は 0.2mm 以上、前体部長 (Prosoma Length, PL) は 0.4mm 以上を想定した。画像をカイアシ類として識別するためには最低 30pixel が必要であることから²²⁾、B-VPR で記

*Gallager 私信

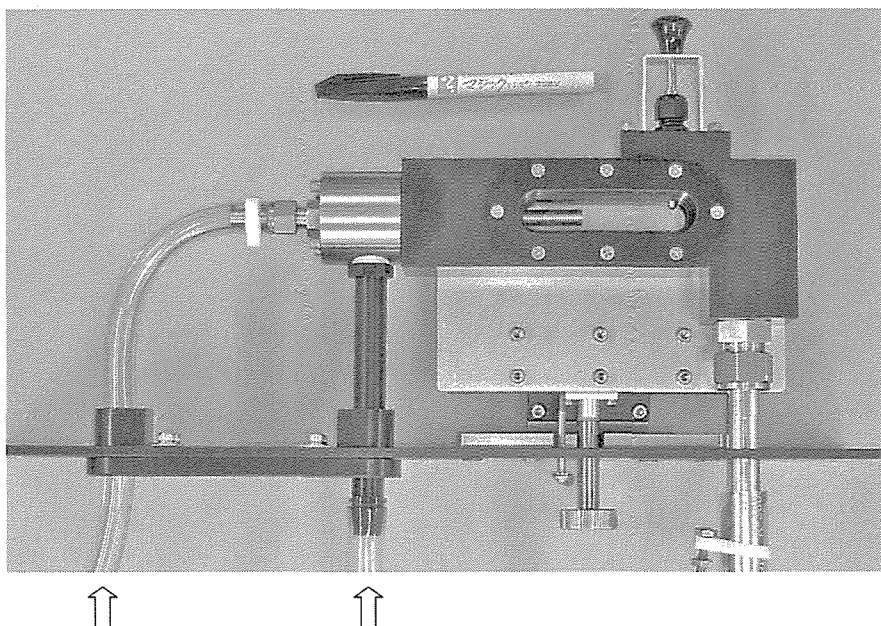


写真 2. B-VPR のフローセル。左の矢印からサンプルと sample water が、中央の矢印から sheath water がセル内に入る

録される画像では 0.015mm/pixel 以上の解像度が必要と考えた。カメラ画素数が $1,392 \times 1,024$ pixel であること、本装置では、解像度を優先してカメラ視野の短辺方向へプランクトンを流す構造としたことから、カメラ視野の幅、高さはそれぞれ 20.4×15.0 mm に設定した。視野の幅はアウターチューブの内径にほぼ相当する。アウターチューブの sheath water とインジェクターの sample water がほぼ 1:1 で流れるようにするため、インジェクター内径は 11mm とした。本装置で使用した CCD カメラ用レンズ (Computar[®] M2514-MP, $f=25$ mm, $F=1.4-16$) の最大絞り (F16) で使用した場合、計算上の被写界深度は約 12mm とインジェクター内径より大きく、また後述する実験においてカイアシ類を 1 個体ずつ計測した場合も、カイアシ類として判断できない画像はなかったため、インジェクターを通過するプランクトンはすべて被写界深度内に入っていたと判断された。

B-VPR と顕微鏡計測結果の比較 B-VPR による測定結果と顕微鏡下での計数・計測結果を比較する実験を行った。土佐湾内の水深 100m の定点 (B8) において、ポンゴネット (網目幅 0.33mm) を用いて 100m 深からの斜行曳網で採集した試料、および中央水産研究所海洋生産部が定線観測を実施している御前崎沖東経 135° 上の黒潮内側から黒潮域の測点において、ノルパックネット (網目幅 0.1mm) の 200m 深からの鉛直曳網で採集した試料を実験に用いた。いずれの試料もホルマリンの最終濃度が 5% となるように固定した。

実験では、カイアシ類の 1) 個体数、2) サイズ、および 3) 試料全体のサイズ別個体数について顕微鏡と B-VPR の測定結果を比較した。個体数の比較では、土佐湾採集試料から全長 0.5mm 以上のカイアシ類を 50 個

体ずつ分取したサブサンプルを複数用意し、流量を変えながら B-VPR で測定した。サイズの比較では、同じく土佐湾試料からカイアシ類を 1 個体ずつ分取し、接眼マイクロメーターを装着した生物顕微鏡下で、全長 (TL)、前部体長 (PL) および全幅 (W) を 0.001mm 単位で計測した。計測後のカイアシ類を 1 個体ずつ B-VPR で測定した。試料全体のサイズ別個体数の比較では、御前崎沖の定線で採集された試料を用いた。顕微鏡による計数・計測ではプランクトン量に応じて分割器で最大 1/64 まで試料を分割し、カイアシ類の種あるいは属段階で計数するとともに接眼マイクロメーターによりカイアシ類の PL を計測した。B-VPR による測定では試料の分割を行わず全試料を測定した。B-VPR では、フローセル通過時にプランクトンの個体同士が重なりと正確な個体数・サイズデータが得られないため、OPC を使った循環装置の結果^{11,14,23)}を参考に、1 フレーム内の記録個体が 5 以下となるよう投入量を調整しながら測定した。

B-VPR の測定後、フレーム単位で記録された圧縮画像から専用のソフトウェアを用いて、フレーム内のプランクトンが記録された部分 (ROI) を抽出し、TIFF 形式の画像ファイルとして保存した。ROI の抽出条件は市川ら²⁴⁾を参考に、Segmentation threshold=150, Sobel threshold=100 とした。抽出された ROI は、Woods Hole 海洋研究所が提供する VPR 用の解析ソフトウェア²⁵⁾ (Visual Plankton) を用いてカイアシ類の自動分別ならびに計測を行った。

Visual Plankton は、事前に構築したデータベースに従って、ROI として抽出された動物プランクトンを分類群ごとに自動分別する。しかし、今回使用したデータベースでは自動分別の学習が不十分で判定精度が低かった

め、自動分別後、再度全ての ROI を肉眼で確認・修正し、分類群を最終的に確定した。しかし、数万の ROI の確認・修正には時間を要した。顕微鏡による計数の場合、作業の効率化のため試料中のプランクトン量に応じて分割作業を行う。そこで同様に、全 ROI から一定の割合でランダムに ROI を選択した後、分別・計測する手法について検討した。選択する割合 (ROI の選択率) がカイアシ類のサイズ別個体数におよぼす影響を検討するため、御前崎沖の測点で採集された 3 試料を用いて

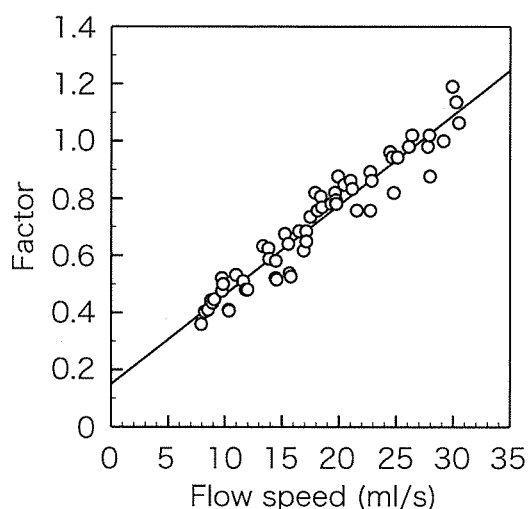


図 2. 流量と B-VPR で計測されたカイアシ類個体数の関係。Factor はフローセルを通過したカイアシ類の個体数 (実数) に対して、B-VPR で記録された個体数 (画像数) の比 (実数/画像数) を示す

ROI の選択率ごとにカイアシ類のサイズ別個体数を比較した。なお、全 ROI からの選択は、乱数を用いて TIFF 形式で保存された ROI のファイル名を元に選択を行う専用ソフトウェアを開発・使用した。カイアシ類のサイズは Visual Plankton による ROI の自動計測結果を顕微鏡計測結果と比較した。

結 果

カイアシ類個体数の換算 本装置では、カメラとストロボが 24 fps で同調するため、プランクトンが 1/24 s 以下でカメラ視野を通過すると、理論的に画像として記録されない場合が生じる。一方、1/24 s 以上では確実に記録されるが、同一個体が複数回記録される可能性がある。このようにフローセル内の流量によって記録されるカイアシ類個体数が変わるため補正が必要となる。流量を変えながら既知数 (50 個体) のカイアシ類を B-VPR で測定し、実数と比較した (図 2)。流量は、最初の個体が記録された瞬間から最後の個体が記録された瞬間までの平均値、係数 (Factor) は、実数に対して B-VPR で記録されたカイアシ類個体数の比とした。Factor が 1 以上の場合、画像として全く記録されないプランクトン個体が

存在することになる。B-VPR で画像として記録されたカイアシ類の個体数は、流量とともに一定の割合で変化することが示され (図 2)、流量 (x) と Factor (y) の間には

$$y = 0.0313x + 0.1494$$

$$(n = 74, r^2 = 0.925, p < 0.01) \cdots (1)$$

の有意な正の相関が得られた。記録された画像枚数に Factor を乗ずることで、実際に計測したプランクトン数を再現できることが示された。本研究に使用した

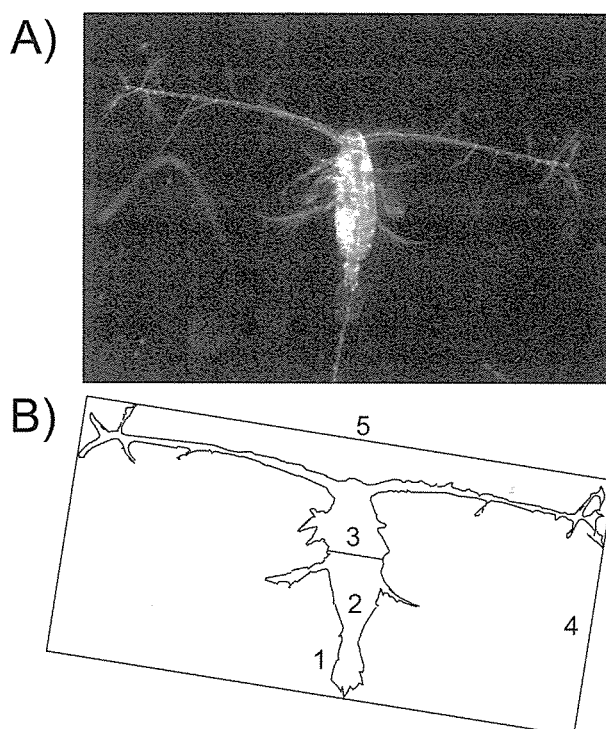


図 3. ROI として抽出されたカイアシ類の画像 (A) と Visual Plankton によるカイアシ類の計測のイメージ (B)。1: 周囲長, 2: 面積, 3: 幅, 4: 矩形の短辺, 5: 矩形の長辺長

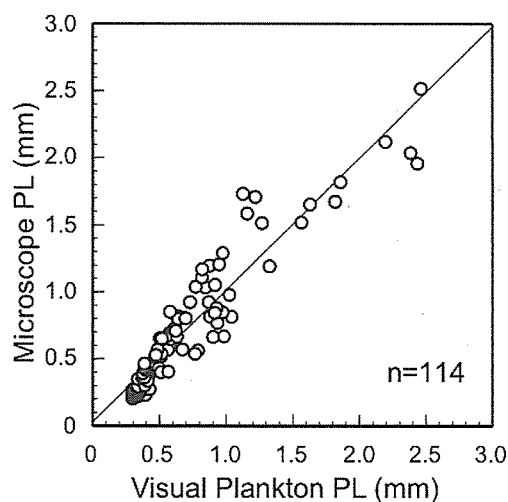


図 4. Visual Plankton による全てのカイアシ類画像の計測結果と顕微鏡による計測結果との比較。図中の直線は $y = x$

B-VPR とフローセルのサイズで、計算上、カイアシ類が画像として記録されない場合が生じる Factor が 1 以上となるのは、流量が 27.2 ml/s 以上であった。従って、実際は Factor が 1 以下、流量が多少変動しても画像として確実に記録できるように Factor は 0.8 を目安（流量で 18 ~ 20 ml/s）として計測を行った。本装置では、1 秒ごとの平均流量を記録して画像が記録された瞬間の流量を求め、(1) 式を使って実際に計測したプランクトン数を計算した。

カイアシ類サイズの換算 Visual Plankton ではプランクトンの 1) 周囲長 (x_1), 2) 面積 (x_2), 3) 幅 (x_3), 4) 矩形の短辺長 (x_4), 5) 矩形の長辺長 (x_5), の 5 部位をピクセル単位で計測する (図 3)。これら 5 部位を説明変数として顕微鏡で計測した PL との相関を調べ、相関係数が 0.5 以上となった説明変数を用いて重回帰分析を行った。その結果、周囲長 (x_1), 面積 (x_2), 幅 (x_3) と矩形の長辺長 (x_5) を用いた換算式で有意な関係が得られることが分かった (図 4)。ただし説明変数 (x_n) の単位はピクセルである。

$$\begin{aligned} \text{PL (mm)} = & 0.271 - 1.26 \times 10^{-3} x_1 + 4.40 \times 10^{-6} x_2 \\ & + 5.92 \times 10^{-3} x_3 + 6.56 \times 10^{-3} x_5 \quad \cdots (2) \\ (n = 114, r^2 = 0.889) \end{aligned}$$

一方、B-VPR では、プランクトンがフローセルを通過する際、カメラに対するプランクトンの向きが一定でないため、同じ大きさの個体でも計測されたサイズが異なる場合がある。特にカイアシ類では、正面（背面）から撮影された場合と正面以外（側面または背腹面）で撮影された場合とでは、顕微鏡で計測した全体長 (TL) あるいは前部体長 (PL) との関係が全く異なると考えられた。そこで正面と正面以外それぞれについて上記と同様に Visual Plankton で計測される 5 部位を説明変数として顕微鏡で計測した PL との相関を調べ、相関係数が

0.5 以上となった説明変数を用いて重回帰分析を行った。その結果、正面からの場合は、面積 (x_2) と矩形の長辺長 (x_5) の 2 変数で、正面以外の場合は、周囲長 (x_1), 面積 (x_2), 幅 (x_3) と矩形の長辺長 (x_5) で、それぞれ $p < 0.01$ となった。これらの説明変数を用いて B-VPR 計測結果から PL への換算式を作成した (図 5)。

$$\begin{aligned} \text{正面: PL (mm)} = & 0.823 + 0.438 \times 10^{-3} x_2 - 0.017 x_5 \\ & \cdots (3) \end{aligned}$$

$$(n = 15, r^2 = 0.923)$$

$$\begin{aligned} \text{正面以外: PL (mm)} = & 0.341 - 1.25 \times 10^{-3} x_1 + 5.40 \\ & \times 10^{-5} x_2 + 8.35 \times 10^{-3} x_3 \\ & + 4.88 \times 10^{-3} x_5 \quad \cdots (4) \end{aligned}$$

$$(n = 117, r^2 = 0.874)$$

カイアシ類の向きを考慮することにより (3) 式で決定係数が高くなったが、(4) 式では (2) 式よりわずかに決定係数が低くなった。また、いずれの場合も面積と矩形の長辺で囲まれた長さが説明変数として重要であった。自動計測から求めた PL は、顕微鏡による実測結果とは異なり、統計的計算に基づいた結果であるが、(2) 式、あるいは (3)・(4) 式を用いることで Visual Plankton による自動計測結果からカイアシ類のサイズに換算できることが示された。

ROI の選択率 B-VPR で得られた黒潮周辺海域の 1 試料あたりの ROI は数千~数万ファイルであり、その全てについて自動分別結果の確認・修正を行うと時間と労力を要する。そこで、ROI の最適な抽出数を判断するため、試料から抽出された全 ROI について、顕微鏡計測の際に行われているプランクトン試料の分割と同様、ランダムに ROI を選択してその中のカイアシ類を計数し、そのサイズ別個体数の割合を全画像から計数した結果と比較した (図 6)。カイアシ類の個体数は選択率 100% の場合を 1 とした相対値で示している。

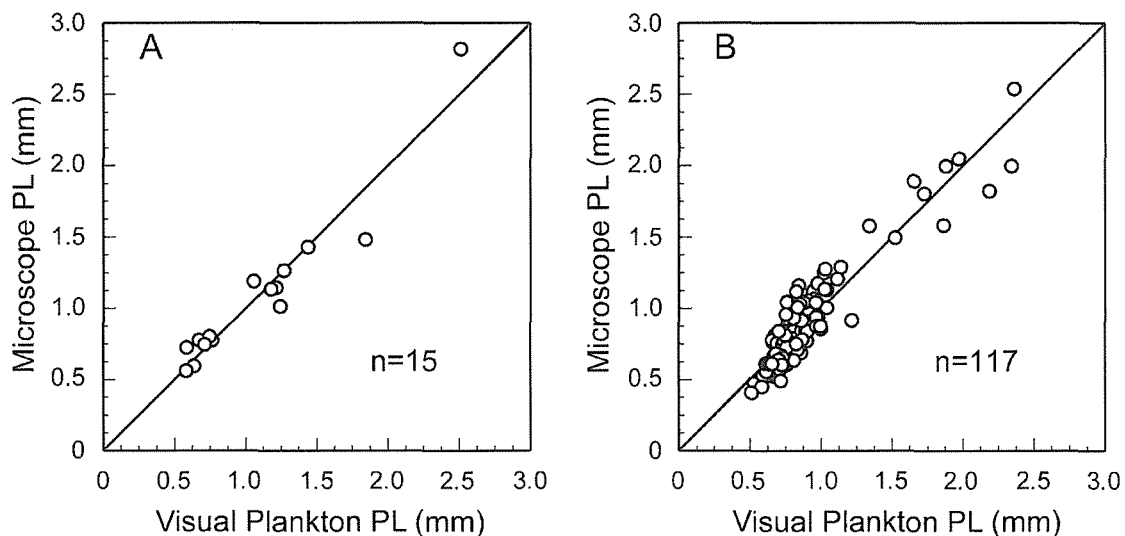


図 5. Visual Plankton によるカイアシ類画像の計測結果と顕微鏡による計測結果との比較。A: 正面から記録されたカイアシ類画像による比較。B: 正面以外の方向から記録されたカイアシ類画像による比較。図中の直線は $y = x$

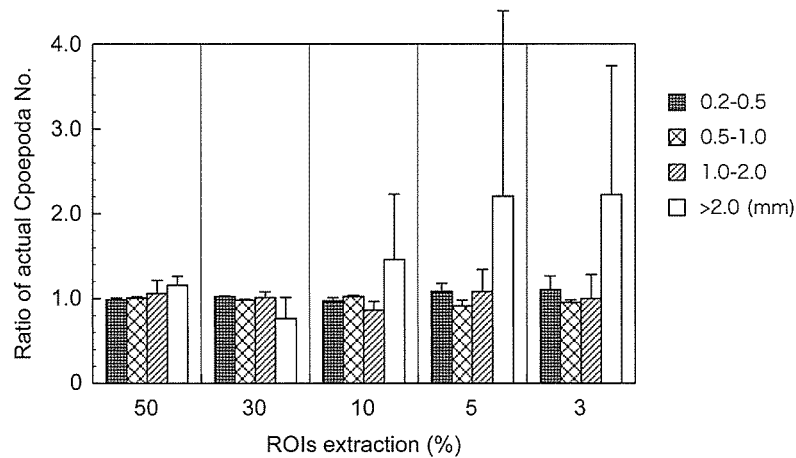


図 6. 試料中の全ての Region of interests (ROI, フレーム内からプランクトンとして切り出された関心領域) から選択率を変えて ROI を選択した場合の、各選択率におけるカイアシ類のサイズ別個体数の比較。カイアシ類個体数は選択率 100% を 1 とした場合の相対値で示した。エラーバーは標準偏差 ($n=3$)

分割前の 3 試料中のカイアシ類の個体数はそれぞれ 2,308, 2,958, 3,824 個体, その中で 1.0mm 以下の個体数の割合は 98.4, 87.4, 91.5% であり, さらに 2.0mm 以下では 99.9, 99.1, 99.8% と大半が 2.0mm 以下の個体で占められた。PL が 2.0mm 以下のカイアシ類では, 元の個体数に対する選択率 50% と 30% では, 選択率 50% の 1.0 ~ 2.0mm を除き, 元の個体数に対する差は 2% 以下と小さく, 標準偏差も小さかった。選択率 3% でも元の個体数に対して 10% 以下の差であった。標準偏差は 1.0mm 以下より 1.0 ~ 2.0mm のサイズが大きくなり, 試料中で個体数が相対的に少ないサイズほど標準偏差が大きくなった。一方, PL が 2mm 以上では, 選択率 10% で元の個体数との差が 45%, 選択率 5% 以下では 100% (2 倍) 以上の差が生じ, 元の個体数に対して過大評価となった。個体数が相対的に少ない大型個体, 特に PL が 2.0mm 以上のカイアシ類では, 選択率 10% 以上で計数・計測を行う必要がある。

試料全体のサイズ別個体数の比較 御前崎沖の黒潮内側から黒潮域において, ノルパックネット (網目幅 0.1mm) で採集した試料について, B-VPR と顕微鏡で測定したカイアシ類のサイズ別個体数を比較した (図 7)。なお, ROI の選択率は前述の実験結果を参考に 25% 以上に設定して計数した。季節や測点に関係なく, また, B-VPR, 顕微鏡いずれの計測でも, サイズが大きくなるほど個体数密度が減少する傾向が認められた。B-VPR では PL が 0.3 または 0.4mm 以下では顕微鏡に比べて個体数密度が低かった。これは本研究で設定した B-VPR の解像度 (0.010 ~ 0.015mm/pixel) およびカイアシ類を認識するために必要なピクセル数 (最低 30pixel) から計算した計測限界値と一致した。0.4mm 以上では B-VPR の計測数が多く, 一方, 1mm 以上では, 例えば

2004 年 1 月 21 日の St.B02 の 1.8 ~ 1.9mm 分画のように顕微鏡による個体数密度が高い場合があった。2mm 以上では, 顕微鏡でのみ特定のサイズ分画について個体数が記録された場合があった。

顕微鏡と B-VPR でサイズごとに計数されたカイアシ類個体数の平均値を比較した (図 8)。図 7 で指摘したように 0.2 ~ 0.3mm のサイズ分画では, 本研究で使用した B-VPR の計測限界により過小評価となっていたため, 0.2 ~ 0.3mm 分画の結果を除いた回帰式を作成した。1:1 の直線と比較した場合, 1mm 以下では B-VPR で個体数密度が高く, 1.0mm 以上のサイズ分画では顕微鏡がわずかに高かった。1.0mm 以上で顕微鏡の個体数が高かったのは 2004 年 1 月 21 日の St.B02 で, 2.0mm 以上のカイアシ類が多かった結果を反映したためと考えられた。

考 察

本研究では, B-VPR を用いたホルマリン液浸試料の計測の有効性について検討した。B-VPR を用いた計測結果は, 試料全体で比較した場合において顕微鏡計測結果と同じ傾向を示し (図 7, 図 8), 実個体数への換算 (図 2), カイアシ類の前部体長 (PL) への換算 (図 4, 図 5) とともに有意な相関関係が得られ, データとして有効に活用可能と判断された。B-VPR では 1,500 個体/min 以上でプランクトンの画像化が可能で, 1 試料に含まれるプランクトン数によって異なるが 1 試料あたり 20 ~ 30 分で画像化が完了する。記録された画像は Visual Plankton で自動分別・計測を行い, さらに自動分別された ROI の分類群を手作業で確認・修正する。ROI の抽出割合によって作業時間は異なるが, 5,000 個の ROI の

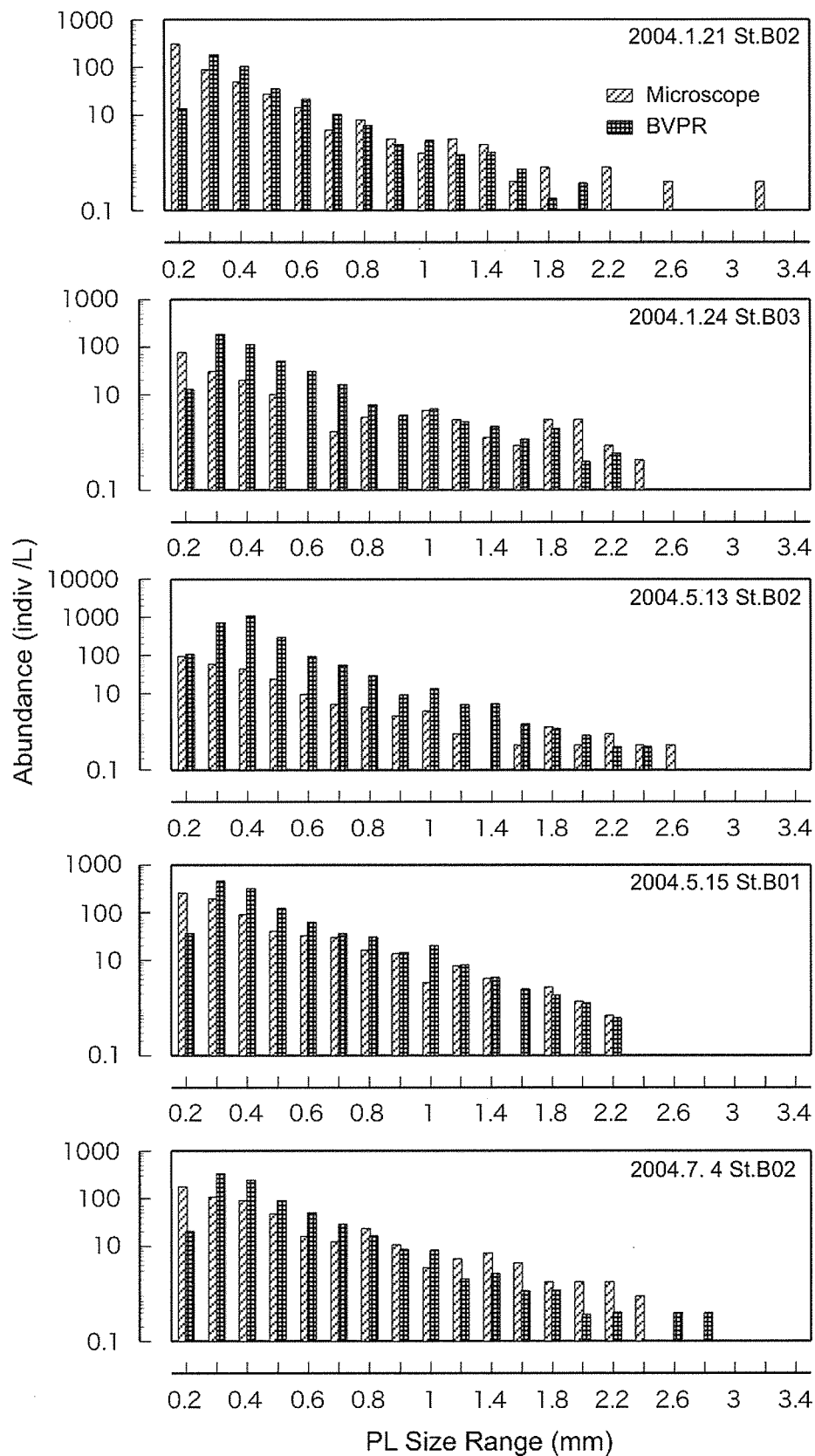


図 7. 御前崎沖測点において採集された試料を、B-VPR と顕微鏡で計測した場合のカイアシ類のサイズ別個体数密度の比較

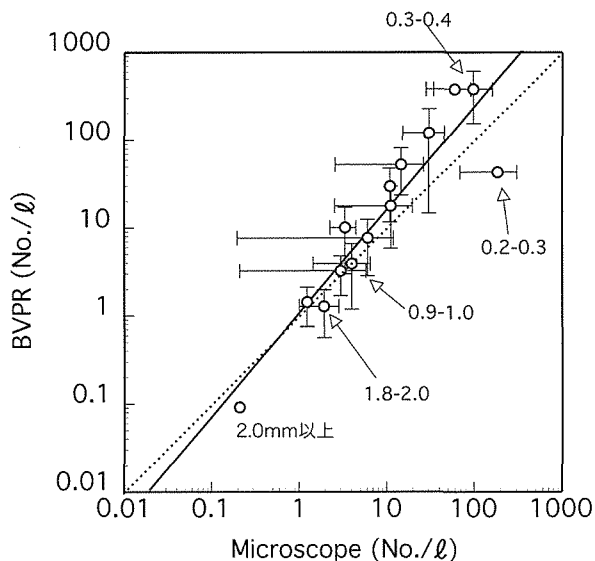


図8. 顕微鏡およびB-VPRで計測したカイアシ類の各サイズ別個体数密度の比較。図中の数字はカイアシ類のサイズを示す。直線は0.2-0.3mmを除いた回帰直線，エラーバーは標準偏差 ($n=5$)

手作業による確認・修正に約1時間を要する。1試料の処理は約1～1.5時間で終了する。現在、専門知識がなくても一連の作業を進められるように手順等のマニュアル化を行っており、大量の保存試料のデータ化、調査船上で採集結果の準リアルタイム提供なども可能になると考えられる。B-VPRと同様、プランクトンを画像として記録・計測するZooscan¹⁵⁾では、試料をあらかじめ0.5mm以下と0.5mm以上のサイズに分け、それぞれ解像度を変えてスキャンを行う¹⁶⁾。画像化の方式が異なるためB-VPRとZooscanの単純な優劣はつけられないが、B-VPRは、試料中の全プランクトンの画像化に手間がかからないこと、係数による復元が必要であるが、試料中の全個体数を正確に把握できること、動揺する船上でも使用できることが長所としてあげられる。

本研究では、作業効率の向上のためROIとして保存された全画像の中から一部をランダムに選択して（ROIの選択）プランクトンの分別と計測を行った。ROIの選択は乱数を元にソフトウェアで機械的に行われるため、試料を分割器で分割する際に発生する人為的影響は生じない。しかし、ROIの選択率10%以下の場合、PLが2mm以上のカイアシ類個体数が過小評価となった（図8）。伊東・青木²⁶⁾はカイアシ類の計数値にポアソン分布の信頼区間を適用できること、また計数値が10未満の場合、信頼区間は計数値の数倍に達するが、計数値が30以上であれば信頼区間は計数値 $\pm 40\%$ 以内となることを示した。また大森・池田²⁷⁾は優占種の個体数組成の把握に必要な計数値について検討し、計数値の信頼区間が計数値 $\pm 40\%$ 以内とするために総個体数で300以上

の計数が必要と報告している。カイアシ類の全個体数に対して2mm以上の個体が占める割合は試料ごとに異なる。本研究でROIの選択率を検討した黒潮周辺海域の3試料ではカイアシ類総個体数の0.9%以下、1試料あたりの個体数では25個体以下と少なく、信頼区間を計数値 $\pm 40\%$ 以内に近づけるためには、2mm以上のカイアシ類について全ROIの計測が必要となる。現在、自動判別精度が100%でないため、特定サイズ以上のカイアシ類のみをROIから選択することは難しいが、プランクトンサイズとROIのファイルサイズは比例するため、ファイルサイズを指標としたROIの選択は可能と考えられる。一方、顕微鏡による計測結果で1mm以下のサイズがB-VPRより少なく、特定の試料で2mm以上の個体数が多かったことは、顕微鏡の計測においても、伊東・青木²⁶⁾が述べた信頼区間においても個体数の信頼性に問題が生じる可能性があることを示していると考えられた。

本研究において、B-VPRによる計測で最も労力を必要としたのは、自動分類された画像を1画像ずつ肉眼で確認する作業である。現在、プランクトンの自動分別ソフトウェアとして公開されているのは、本研究で使ったVisual Planktonの他、ZooImage、Plankton Visual Analyzer²⁸⁾(PVA)である。ZooImageはShadow Image Particle Profiling and Evaluation Recorder²⁹⁾(SIPPER)用に開発されたソフトウェア³⁰⁾をベースにZooScanで使えるように改変されたソフトウェアで、ウェブ上にフォーラムが構築され自動分別用のデータセットなども公開されている*。しかし、ソフトウェアによる自動分別において100%の判定精度で分類群を分けるのは不可能であり、種組成が異なるため試料ごとに判別精度も異なる可能性も高い。最終的には、分別された結果を目で確認し、判別精度を確定する作業が不可欠と考えられる。今後、手作業による負担を軽減するようなソフトウェアの改良も同時に必要と考えられる。また自動計測では、顕微鏡による計測とは異なりPLを実測していない。本研究では(2)～(4)式で統計的に有意な相関が得られたが、実際にはカイアシ類の姿勢、アンテナの角度などによって計算結果が変わる可能性も高い。自動分別精度の向上とともに自動計測精度の向上も今後の課題である。

OPCあるいはZooScan、SIPPERのようにある線上を通過するプランクトンを計測する方式では同一個体の複数回記録はない。一方、B-VPRのようにあるエリアを記録するカメラで計測する測器では、ある瞬間を切り取った情報を使用するため複数回記録は避けられない。実験結果（図2）では流量による計測数の分散が小さく、直線性も高かったため、本研究は画像を確実に記録するためFactor=1以下で計測を行い、流量と(1)式から実際に計測したプランクトン数を推定できた。しかし、イ

* <http://www.sciviews.org/zooimage/>

インジェクターからフローセル内への水流は、厳密にはセル内の全ての場所で同方向かつ同速度ではないと考えられる。また、粒子の大きさや形状によって水流から受ける力が変わるため、セル内の通過時間も異なる可能性が高い。本研究では、カイアシ類 50 個体と 1 秒間の平均流量から換算式を作成したが、必要があればサイズ別、あるいはフローセル内の位置別に換算式を作成することで精度の向上が図れると考えられる。フローセル内の位置、すなわちフレーム内から ROI を抽出した場所については、座標情報として ROI に埋め込む事が可能である。

本研究では、網目幅 0.33mm のプランクトンネットで採集された保存試料を対象としたため、カイアシ類の計測下限を 0.3 ~ 0.4mm に設定した結果、0.3mm 以下のカイアシ類について過小評価が認められた (図 8)。海洋では 0.3mm 以下のカイアシ類の現存量は多く³¹⁾、仔稚魚の餌料としても重要と考えられ、より小さいサイズの測定を検討することも必要と考えられる。視野を狭くすることで計測下限を下げることは可能であるが、そのためにはフローセルのインジェクター直径を小さくする必要があり、1 試料あたりの計測時間も増大する。現在、民生用機器でもフル HD (1,980 × 1,080 pixel)、60fps の記録が可能となっており、画素数の多い CCD / CMOS カメラの使用、データ圧縮プロセスの見直し、高速なデータ転送ならびに記録可能な装置を使用することで、より小型サイズのプランクトンについても短時間で画像化が可能と考えられる。本研究で改良を行ったように、B-VPR のフローセルでは流量、インジェクター直径、解像度、1 試料あたりの計測時間の 4 条件をバランスさせることが必要である。

現在、地球温暖化による海洋環境への影響評価や資源の変動要因解析、変動予測のため生態系モデルが構築・利用されている^{32,33)}。水温・流れのような物理データ、栄養塩、植物プランクトン現存量と関係するクロロフィル a などは、測器によってほぼリアルタイムでデータが得られ、人工衛星によるリモートセンシングやアルゴフロートなどにより、ほぼ全球スケールでデータの蓄積が進んでいる。しかし、動物プランクトンについては、このようなデータセットは少ないのが現状である。B-VPR の使用により、短時間でカイアシ類動物プランクトンの個体数・サイズについて信頼性の高いデータを得ることが可能となる。これらのデータは、生態系モデルや予測モデルの精度向上に大きく貢献し、海洋生態系や魚類資源に対する動物プランクトンの役割の一端が明らかになると考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、B-VPR の改良に技術的なご助言とご協力をいただいたウッズホール海洋研究所の

Scott M. Gallager 博士、SeaScan Inc. の Pierre Tillier 氏、(株)エス・イー・エイの中川拓郎氏に謝意を表します。本研究の一部は、水産庁「我が国周辺水域資源調査推進委託事業実施要領」に基づき水産総合研究センターが実施している「資源動向要因分析調査」ならびに農林水産技術会議委託プロジェクト研究「環境変動に伴う海洋生物大発生の予測・制御技術の開発」の一環として行ったものである。

文 献

- 1) LENZ, J. (2000) Introduction. in "Zooplankton Methodology Manual" (ed. by R. HARRIS, P.H. WIEBE, J. LENZ, H. R. SKJOLDAL, and M. HUNTLEY), Academic Press, San Diego, pp. 1-32.
- 2) RAYMONT, J. E. G. (1983) Plankton and Productivity in the Oceans 2nd ed. Vol.2 Zooplankton, Pergamon Press, Southampton, pp. 52-332.
- 3) SHELDON, R. W., W. H. SUTCLIFFE JR. and M. PARANJPE (1977) Structure of pelagic food chain and relationship between plankton and fish production. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **34**, 2344-2353.
- 4) MULLIN, M. M., D. M. CHECKLEY JR. and M. P. THIMGAN (2003) Temporal and spatial variation in the sizes of California current macrozooplankton: analysis by optical plankton counter. *Prog. Oceanogr.*, **57**, 299-316.
- 5) FLINKMA, J., E. ARO, I. VUORINEN, and M. VIITASALO (1998) Changes in northern Baltic zooplankton and herring nutrition from 1980s to 1990s: top-down and bottom-up processes at work. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **165**, 127-136.
- 6) 高橋素光 (2001) カタクチイワシの仔稚魚期における成長・発達様式と資源加入機構. 東京大学農学生命科学研究科学位論文, 107pp.
- 7) PARSONS T. R. and C. M. LALLI (1988) Comparative oceanic ecology of the plankton communities of the subarctic Atlantic and Pacific Oceans. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **26**, 317-359.
- 8) 大関芳沖・木村 量 (2002) 日本周辺海域の卵稚仔プランクトンモニタリング. 水産海洋研究, **66**, 262-264.
- 9) 市川忠史・瀬川恭平 (2008) VPR による黒潮・黒潮続流域の動物プランクトン群集構造の長期変動解析. 環境変動に伴う海洋生物大発生の予測・制御技術の開発「魚種交代の予測・利用技術の開発」平成 19 年度研究成果報告書, 水産総合研究センター, 40-41.
- 10) NAKATA, K. and K. HIDAKA (2003) Decadal-scale variability in the Kuroshio marine ecosystem in winter. *Fish. Oceanogr.*, **12**, 234-244.
- 11) BEAULIEU, S. E., M. M. MULLIN, V. T. TANG, S. M. PYNE, A. L. KING and B. S. TWINING (1999) Using an optical plankton counter to determine the size distributions of preserved zooplankton samples. *J. Plankton Res.*, **21**, 1939-1956.
- 12) NOGUEIRA, E., G. GONZÁLEZ-NUÉVO, A. BODE, M. VARELA, X. A. G. MORÁN and L. VALDÉS (2004) Comparison of biomass and size spectra derived from optical plankton counter data and net samples: application to the assessment of mesoplankton distribution along the Northwest and North Iberian Shelf. *ICES*

- J. Mar. Sci.*, **61**, 508-517.
- 13) HERMAN, A. W. (1988) Simultaneous measurement of zooplankton and light attenuation with a new optical plankton counter. *Cont. Shelf Res.*, **8**, 205-221.
 - 14) 市川忠史・加藤 聡・中田 薫 (1999) 親潮水域および混合水域における動物プランクトン現存量把握のためのプランクトンカウンターの有効性. 中央水研報., **13**, 1-14.
 - 15) GORSKY, G. and P. GROSJEAN (2003) Qualitative and quantitative assessment of zooplankton samples. *GLOBEC Internat. Newsletter*, **9**, 5.
 - 16) GROSJEAN, P., M. PICHERAL, C. WAREMBOURG and G. GORSKY (2004) Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples using the ZOOSCAN digital imaging system. *ICES J. Mar. Sci.*, **61**, 518-525.
 - 17) DAVIS, C. S., S. M. GALLAGER, M. S. BERMAN, L. R. HAURY and J. R. STRICKLER (1992) The video plankton recorder (VPR): design and initial results. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **36**, 67-81.
 - 18) DAVIS, C. S., S. M. GALLAGER, M. MARRA and W. K. STEWART (1996) Rapid visualization of plankton abundance and taxonomic composition using the Video Plankton Recorder. *Deep Sea Res. II*, **43**, 1947-1970.
 - 19) GALLAGER, S. M., C. S. DAVIS, A. W. EPSTEIN, A. SOLOW and R. C. BEARDSLEY (1996) High-resolution observations of plankton spatial distributions correlated with hydrography in the Great South Channel, Georges Bank. *Deep Sea Res. II*, **43**, 1627-1663.
 - 20) BENFIELD, M. C., D. A. CARON, A. F. MICHAELS, S. M. GALLAGER and C. S. DAVIS (2002) Video plankton recorder reveals high abundances of colonial Radiolaria in surface waters of the central North Pacific. *J. Plankton Res.*, **24**, 797-805.
 - 21) OLSON, R., A. SHALAPYONOK and H. SOSIK (2003) An automated submersible flow cytometer for analyzing pico-and nanophytoplankton: FlowCytobot. *Deep Sea Res. I*, **50**, 301-315.
 - 22) 市川忠史・瀬川恭平・清沢弘志・古澤一思・寺崎 誠 (2006) マクロ動物プランクトンの個体数密度把握における VPR II と MOCNESS との比較 - クラゲ類・クシクラゲ類に対する VPR II の有効性 - . 日本プランクトン学会報, **53**, 87-97.
 - 23) 市川忠史・加藤 聡・瀬川恭平 (2003) プランクトンセンサーで何が分かるか - 水産海洋学の視点から . 日本プランクトン学会報, **50**, 29-35.
 - 24) 市川忠史・瀬川恭平・寺崎 誠 (2005) VPR II における画像取得パラメーターの特性 . 日本プランクトン学会報, **52**, 65-71.
 - 25) DAVIS, C. S., Q. HU, S. M. GALLAGER, X. TANG and C. J. ASHJIAN (2004) Real-time observation of taxa-specific plankton distributions: an optical sampling method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **284**, 77-96.
 - 26) 伊東 宏・青木延浩 (2000) 動物プランクトンの計数について. 日本プランクトン学会報, **47**, 82-85.
 - 27) 大森 信・池田 勉 (1973) 動物プランクトン生態研究法 生態学研究法講座 5. 共立出版株式会社. 東京, 229p.
 - 28) BOYRA, G., X. IRIGOIEN, A. ARISTEGIETA and I. ARREGI (2005) Plankton Visual Analyser. *GLOBEC Internat. Newsletter*, **11**(1), 9-10.
 - 29) REMSEN, A., T. L. HOPKINS and S. SAMSON (2004) What you see is not what you catch: a comparison of concurrently collected net, Optical Plankton Counter, and Shadowed Image Particle Profiling Evaluation Recorder data from the northeast Gulf of Mexico. *Deep Sea Res. I*, **51**, 129-151.
 - 30) LUO, T., K. KRAMER, D. B. GOLDFOG, L. O. HALL, S. SAMSON, A. REMSEN and T. HOPKINS (2004) Recognizing plankton images from the Shadow Image Particle Profiling Evaluation Recorder. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern. B.*, **34**, 1753-1762.
 - 31) GALLIENNE, C. P. and D. B. ROBINS (2001) Is *Oithona* the most important copepod in the world's oceans? *J. Plankton Res.*, **23**, 1421-1432.
 - 32) KISHI, M. J., M. KASHIWAI, D. M. WARE, B. A. MEGREY, D. L. ESLINGER, F. E. WERNER, M. NOGUCHI-AITA, T. AZUMAYA, M. FUJII, S. HASHIMOTO, D. HUANG, H. IIZUMI, Y. ISHIDA, S. KANG, G. A. KANTAKOV, H. C. KIM, K. KOMATSU, V. V. NAVROTSKY, S. L. SMITH, K. TADOKORO, A. TSUDA, O. YAMAMURA, Y. YAMANAKA, K. YOKOUCHI, N. YOSHIE, J. ZHANG, Y. I. ZUENKO, V. I. ZVALINSKY (2007) NEMURO-a lower trophic level model for the North Pacific marine ecosystem. *Ecol. Model.*, **202**, 12-25.
 - 33) ITO, S., B. A. MEGREY, M. J. KISHI, D. MUKAI, Y. KURITA, Y. UENO and Y. YAMANAKA (2007) On the interannual variability of the growth of Pacific saury (*Cololabis saira*) : A simple 3-box model using NEMURO. *FISH. Ecol. Model.*, **202**, 174-183.

Bench-top VPR (B-VPR) を用いたホルマリン液浸動物プランクトン試料の計測

市川忠史・瀬川恭平・森田 宏・田中照喜

ホルマリン液浸プランクトン試料から水産資源生物の餌料として重要なカイアシ類のサイズ別個体数を迅速かつ簡便に計測するため、水中用の VPR を実験室用に改良した室内型 VPR (Bench-top VPR; B-VPR) を用いて、計測条件、計測手法ならびに測定結果の信頼性について検討した。B-VPR で得られたカイアシ類画像の自動識別精度の向上に課題はあるものの、B-VPR の使用により、従来の顕微鏡による計測に比べ簡便かつ短時間にプランクトンの画像化と計測が行えること、換算式の適用により個体数ならびにサイズについても信頼性の高いデータが得られることが明らかになった。

水産技術, **1** (2), 13-23, 2008