

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450266

研究課題名(和文) 蛍光撮影技術を用いた簡便な海洋生物マッピングと漁場環境計測の基礎的研究

研究課題名(英文) Development of a simple and easy-to-use multi-wavelength excitation in-situ fluorescence imaging apparatus

研究代表者

古島 靖夫 (FURUSHIMA, Yasuo)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター・技術副主幹

研究者番号：90359159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：海洋生物のマッピング手法を構築することは、海洋生物の多様性、分布、個体数を知る上で重要である。本研究の目的は、サンゴが発する蛍光を面的に映像として捉え、海底地形図および環境データとを併せて、蛍光画像を用いた海洋生物マッピングの基礎を構築することである。そのために、〔1〕海洋生物の蛍光スペクトルの計測、〔2〕蛍光スペクトルに基づく励起光フィルター・カットフィルターの開発、〔3〕ハンディマルチ蛍光カメラの開発〔4〕小型ROV用マルチ蛍光カメラユニットの開発、〔5〕実海域撮影試験と海洋生物マッピング解析(データ解析および画像解析)を行った。

研究成果の概要(英文)：Coral fluorescence has been shown to vary with coral health and environmental factors, making it a possible non-destructive proxy for coral health. However, due to the lack of adequate system for in-situ observation, available data are rather limited.

We developed a "handy multi-fluorescence imaging apparatus" based on the measurement of the fluorescent spectra of several coral species and marine organisms. This apparatus is constructed in six kinds of exciting lights (470, 530, 591, 617, 655 nm, and white (5650k)) and five kinds of cut filters (<390, <480, <540, <620, <640nm). This system allows the imaging of not only the conventional blue to red wavelength but also longer wavelength such as deep red fluorescence. In the future, such method will make it possible to understand the relation between corals' fluorescence and their physiology, and to provide an useful monitoring tool for more effective marine ecosystems managements and environmental impact assessments.

研究分野：水産海洋学

キーワード：蛍光撮影技術 海洋生物の蛍光 蛍光スペクトル 海洋生物マッピング 多波長励起光 多波長カットフィルター サンゴ

1. 研究開始当初の背景

多くの海洋生物（サンゴ類やイソギンチャク、クラゲ類など）が蛍光を発していることは良く知られている。なぜ、彼らは蛍光を発するのか？その生理・生態学的な役割等の解明研究は、現在進行中である。サンゴは、蛍光蛋白質を持つものが多く（宮脇 2003）、アザミサンゴ（*Galaxeafascicularis*）からは緑色の蛍光を放つ Azami-Green (AG)、ミドリイシ（*Acropora* sp.）からは青緑色の蛍光を放つ Midoriishi-Cyan (MiCy) とされる蛍光蛋白質がそれぞれ単離同定されている（唐澤・宮脇 2007）。Salih et al. (2000) は、1998 年にグレートバリアリーフで起きた大規模なサンゴの白化現象時に、ごく浅い海域に分布するサンゴでは褐虫藻の集中している部分より上部に蛍光蛋白質が分布し、触手等の動きによって蛍光蛋白質の密度を変化させていることを確認した（蛍光蛋白質を多く発現する個体ほど白化しない傾向があった）。ゆえに、サンゴの蛍光蛋白質は、サンゴに共生している褐虫藻を太陽の強い光から保護する役割をもつ可能性があることが示唆された。一方、深い海のサンゴの蛍光タンパク質は、褐虫藻の直下に分布し、光合成の助けをしている可能性が示されつつある。

我々は、サンゴ蛍光の変動と環境変動とを現場で同時にかつ経時的に捉えることが出来れば、サンゴ礁海域における漁場環境変動とサンゴの状態との応答を知ることができると考え、「サンゴの蛍光蛋白質の変動と漁場環境変動との応答に関する研究」（科学研究費補助金,基盤研究 (C) 一般,H21~H23) を実施し、「サンゴの蛍光蛋白質モニタリング装置」を開発した。この装置を用いて、石西礁湖（沖縄県石垣島と西表島の間に位置するサンゴ礁海域）の南東海域（水深 8m）において、1 時間毎 26 日間の連続したサンゴ（*Acropora verweyi*）の蛍光画像と通常画像の撮影に成功した（Furushima et al. 2011）。また、蛍光画像の解析から環境変動（水温、流れ）とポリプ部分の蛍光輝度（サンゴの状態の指標）の変動との間に応答があることが示された（Furushima et al. 2011）。

この装置で使用したフィルターセットは、緑色蛍光蛋白質（GFP : Green Fluorescence Protein）の波長帯（460nm~480nm）に着目したものであった。ところが、サンゴは種類によって赤色や青色の蛍光を示す（C. D' Angelo, 2012）。サンゴ以外の海洋生物では、何色の蛍光色を示すか未解明な点が多い。そこで、我々は、1 種の波長帯のフィルターセットのみならず、可視光域（380nm~780nm）における蛍光（青色、シアン色、緑色、黄色、橙色、赤色）の波長帯（多波長）に適応した励起光フィルターとカットフィルターのセットを用いて蛍光画像を取得すれば、種々の海洋生物が発する蛍光が明らかになり、蛍光画像を用いた海洋生物の状態（例えば、健康度等）をマッピングするための基盤が構築で

きると考えた。さらに、この装置を小型 ROV に装着出来るようにすれば、海洋生物の状態を蛍光画像から面的捉えることが可能になるばかりでなく、潜水調査が困難な深度帯においても長時間のモニタリング調査が実施可能になると考えた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、蛍光画像を用いた海洋生物マッピングの基礎を構築することを目的に、以下について実施する。

- ①サンゴを主とする海洋生物の蛍光スペクトルの計測を行い、その計測結果に基づき可視光域の波長帯の異なる励起光フィルターとカットフィルターの開発を行なう。
- ②開発した蛍光フィルターが装備可能なハンディマルチ蛍光カメラを開発し、現場撮影試験および蛍光画像を用いた海洋生物マッピングの基礎を構築する。
- ③小型 ROV 搭載用のマルチ蛍光カメラユニットの設計と試作、および小型 ROV を用いた 30m 以深の実海域（石西礁湖を想定）における面的な蛍光撮影を試みる。

3. 研究の方法

(1) 励起光およびカットフィルターの開発

我々は、470nm の励起光とカットフィルターを用いて、海洋生物が有する緑色系蛍光の撮影が出来る装置を開発してきた。得られた画像には、緑色系の蛍光（蛍光蛋白質：GFP green fluorescent protein）のみならず赤色系や青色系の蛍光が見られることがあった（図 1）。ゆえに、励起光とカットフィルターを可変式にすることにより、GFP やクロロフィルによる蛍光、色素などの多波長の蛍光撮影が可能になると考えた。そこで、可視光域の波長帯の異なる励起光フィルターとカットフィルターを開発するために、サンゴを主体とした多種にわたる海洋生物が発する

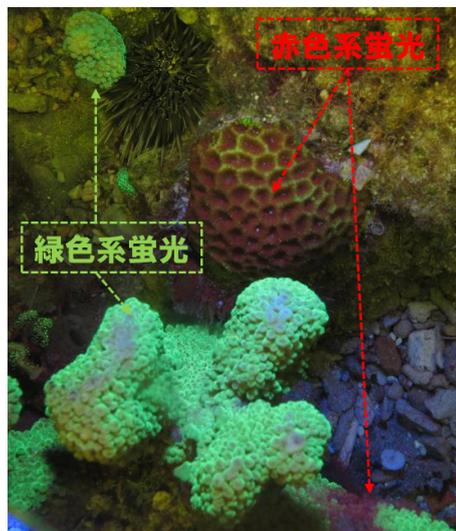


図 1 サンゴの蛍光画像(460nm~480nm の波長帯に着目した蛍光フィルターとカットフィルターを使って撮影)

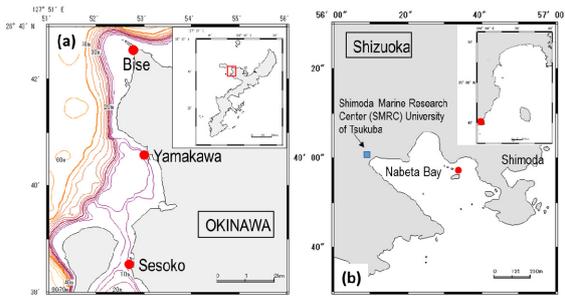


図2 海洋生物のスペクトル計測地点
 (a) 沖縄県瀬底島, 山川港, 備瀬崎周辺海域
 (b) 静岡県下田鍋田湾(筑波大学下田臨海実験センター観測地点)

蛍光スペクトルを計測し、開発するカメラに用いる励起光フィルターとカットフィルターの波長を検討した。

蛍光スペクトルの計測は、沖縄県の瀬底島, 山川港, 備瀬崎周辺海域 (図2(a)), および静岡県下田市鍋田湾 (図2(b)) におけるサンゴを主とした海洋生物を対象に実施した。蛍光スペクトルの計測には、小型分光器 (Jaz, Ocean Optics, Inc.) (図3) を用いた。小型分光器は、データロガー部と光ファイバーアセンブリで構成される (図3(a))。サンゴを主とした海洋生物のスペクトル計測は、対象とする生物の上部に 20cm 四方の方形枠を置き、その中の数か所 (3~5 点) で計測を行った。また、同時に通常の撮影と蛍光画像の撮影を併せて行った。

(2) ハンディマルチ蛍光撮影装置の開発と実海域試験

使用方法が簡便でかつ安価というコンセプトを基に、海洋生物が発する多波長の蛍光画像を捉えることが出来る、波長帯の異なる励起光フィルターとカットフィルターを有した、ハンディマルチ蛍光撮影装置を開発・製作した (図4)。

励起光フィルターとカットフィルターは、サンゴ等の海洋生物のスペクトル計測の結果から、6 種類の励起光 (470nm: ブルー, 530nm: グリーン, 591nm: 琥珀色, 617nm: レッド, 655nm: ディープレッド, 白色 (5650k)) と 5 種類のカットフィルター (< 390nm, < 480nm, < 580nm, < 620nm, < 640nm) を選定し装備した。

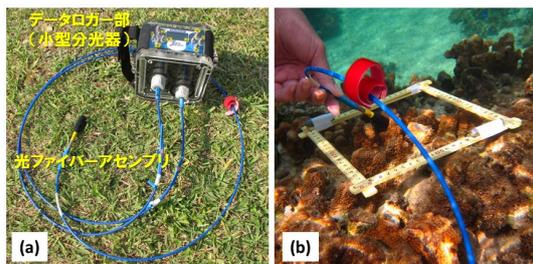


図3 JAZ(小型分光器)の概要
 (a) JAZ の構成
 (b) JAZ による蛍光スペクトル計測方法
 装置の正面に、励起光光源 (LED) が、ま

た正面中央部にカットフィルターを取付けた。カットフィルターはスライド式で、励起光に対応させて自由に動かすことが出来る。背面には、撮影用のデジタルカメラ (Canon PowerShot G1 X Mark II), 電源と励起光のコントローラー装備されている。また、コントローラーのスイッチ部で、励起光の種類を選択と強さが3段階で調節できる。この装置を使った撮影試験は、筑波大学下田臨海実験センターの屋外水槽の海洋生物と鍋田湾 (図1(b)) の観測地点で実施した。

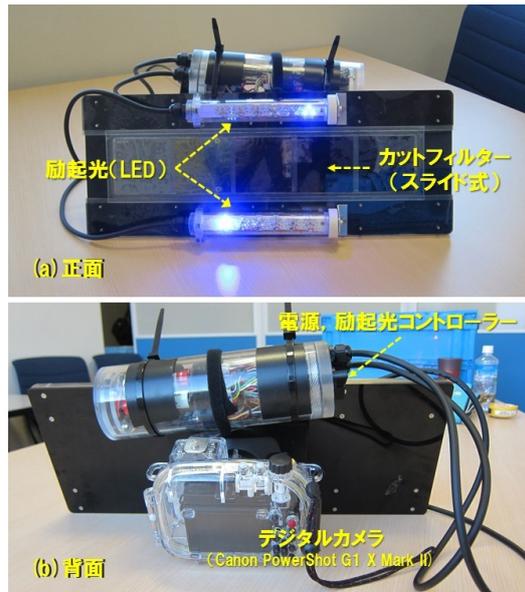


図4 ハンディマルチ蛍光撮影装置
 (a) 正面中央の上下に励起光(LED)光源がある。中央のカットフィルターはスライド式で自由に動かすことが出来る。
 (b) 背面には、デジタルカメラ(水中ハウジング付)と、電源および励起光のコントローラーがあり、右側のスイッチにより励起光の強さが3段階で調節できる。

4. 研究成果

(1) ハンディマルチ蛍光撮影装置に搭載した励起光とカットフィルター

ハンディマルチ蛍光撮影装置に搭載した励起光とカットフィルターを選択するために、表1に示す海洋生物のスペクトル計測を

表1 JAZ(小型分光器)を用いてスペクトル計測を行った主な海洋生物

瀬底大橋付近	山川港付近	備瀬崎付近	鍋田湾
コユビミドリイシ カメノキクメイシ ミドリイシ属 トダクメイシ属 カササキ属 サザナミサンゴ科 コムサンゴ属 ハマサンゴ属	オヤユビミドリイシ カメノキクメイシ ミドリイシ属 サザナミサンゴ科 コムサンゴ属 ノウサンゴ属 ダイノウサンゴ属	ニオウミドリイシ バリカメノキクメイシ シロキクメイシ ノウサンゴ カメノキクメイシ属 カメノキクメイシ属 シロサンゴ属 ハマサンゴ属	コホニアワサンゴ フタマタサンゴ ルリサンゴ エンタクミドリイシ アミメサンゴ カメノキクメイシ キカサンゴ トクイボサンゴ サンゴイソクセンチャク ナマコ
ハマサンゴ属	ノウサンゴ属	シロキクメイシ	

行った。図5に静岡県下田周辺海域で採集された、サンゴイソギンチャク、ルリサンゴ、キクメイシ、ニホンアワサンゴ、フタマタハマサンゴのスペクトル計測の結果を示した。各々の生物でスペクトルのピークが異なっていることが分かる。図6では、490nm, 515nm, 544nm, 580nm, 613nm, 682nm 付近にそれぞれスペクトルのピークが見られた。得られたスペクトルのピーク波長から、その波長より長い波長帯の蛍光画像が得られるように励起光とカットフィルターの波長を決めた。励起光とカットフィルターは、装置を安価にするため、市販のLEDやカットフィルターの中からスペクトルのピークに似合う物を選択し製作した(図4)。

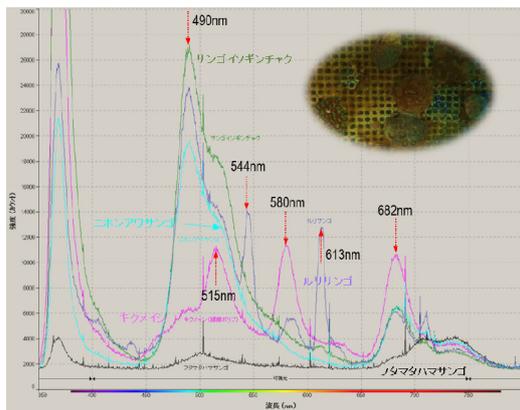


図5 海洋生物のスペクトル計測結果の一例

(2) ハンディマルチ蛍光撮影装置を用いた蛍光撮影(屋外水槽)

筑波大学下田臨海実験センターの屋外水槽で飼育されているキクメイシ、サンゴイソギンチャク、トゲイボサンゴ、ニホンアワサンゴ、ルリサンゴを対象に多波長励起による撮影試験を行った(図6)。図7(a), (b)に、屋外水槽における、ハンディマルチ蛍光撮影装置を用いた蛍光撮影試験の結果の一部を示す。図7(a)は、励起光をブルー(470nm)、カットフィルターを<480nmに設定して撮影した画像である。この設定は、従来から我々が蛍光撮影を行ってきた画像と同じで、グリーン系の蛍光が強調されていることが分かる。図7(b)は、励起光をグリーン(530nm)、



図6 屋外水槽における蛍光撮影試験

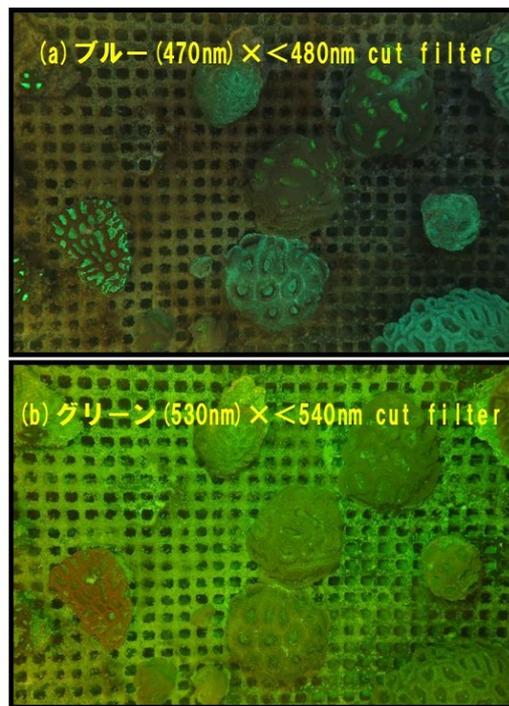


図7 ハンディマルチ蛍光撮影装置を用いた蛍光撮影試験の結果

(a) 励起光をブルー(470nm)、カットフィルターを<480nmに設定して撮影した画像

(b) 励起光をグリーン(530nm)、カットフィルターを<540nmに設定して撮影した

カットフィルターを<540nmに設定して撮影した画像である。この組合せは、図7(a)よりも波長が長いため、赤色系の蛍光が強調され、特に、骨格部分が赤色蛍光を示すことが分かった(ポリプ部分が緑色系蛍光)。

(3) 実海域におけるハンディマルチ蛍光撮影装置を用いた蛍光撮影(鍋田湾)

鍋田湾内における筑波大学臨海実験センターの観測定点において、ハンディマルチ蛍光撮影装置を用いた実海域での蛍光撮影試験を実施した。実海域における調査に際し、太陽光の影響を軽減させるため、ハンディマルチ蛍光撮影装置の全面に簡易式遮光ボックスを取付けた(図8)。

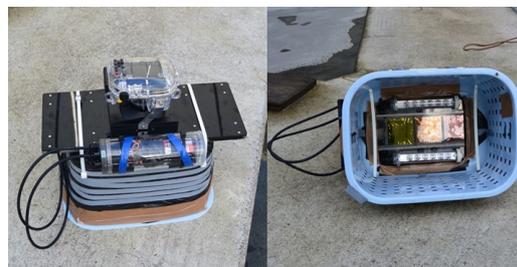


図8 実海域用にフレームを取付けたハンディマルチ蛍光撮影装置

多波長励起による蛍光撮影は、水深3m程度の場所でサンゴやイソギンチャク、海藻を対象に行った(図9)。蛍光撮影と併せて、蛍



図 9 ハンディマルチ蛍光撮影装置を用いた実海域における蛍光撮影調査

光強度の指標を得るために JAZ (小型分光器) によるスペクトル計測を行った。

図 10 に、ハンディマルチ蛍光撮影装置を用いた蛍光撮影試験の結果の一部を示す。図 10(a)は、励起光をホワイト (5650k)、カットフィルターを $<390\text{nm}$ に設定した画像である。図 10(b)は、励起光をブルー (470nm)、カットフィルターを $<480\text{nm}$ に設定した画像である。図 10(c)は、励起光をブルー (470nm)、カットフィルターを $<540\text{nm}$ に設定した画像である。図 10(d)は、励起光をグリーン (530nm)、カットフィルターを $<540\text{nm}$ にそれぞれ設定し得られた蛍光画像である。図 10(a)は、近紫外光をカットした画像ではほぼ通常撮影の結果と同じである。図 10(b)は、従来から我々が実施してきた蛍光画像と同様の緑色系を強調した蛍光画像である。図 10(c)と図 10(d)は、赤色系を強調させた画像である。ゆえに、藻類の赤色蛍光 (光合成蛍光) が強調された。図 10(d)を見ると、左上の紅藻類 (red algae) が赤色の蛍光で撮影されていた。このことから、褐藻類 (brown algae) と紅藻類 (red algae) では、赤色蛍光が見られる波長帯が異なるということが分かった。さらに、この結果から、サンゴや藻類、石灰層などの面的な分布を面積として定量評価出来る可能性が見出せた。得られた画像における、蛍光強度の定量的な評価が今後の課題として考えられた。以上の結果は、13th International Coral Reef Symposium で公表する (2016 年 6 月 22 日)。

我々の蛍光撮影技術は、安価で容易にできる非破壊の有益な方法である。しかし、海洋生物が有する蛍光を利用した海洋生物のイメージングとモニタリングを行うためには、未だ克服すべき技術的課題 (例えば、励起光の強さやカメラの感度) があり、さらに、その技術をどのように海洋生物の生理・生態学的研究に生かすかと言った重要な課題は残された。

<引用文献>

- ①宮脇敦史 (2003) 刺胞動物と蛍光蛋白質. 蛋白質 核酸 酵素 .Vol. 48, No. 11, pp1568-1572.
- ②唐澤智司・宮脇敦史 (2007) 新しい蛍光蛋白質の開発. 化学と生物 .Vol. 45, No. 12, pp863-868.

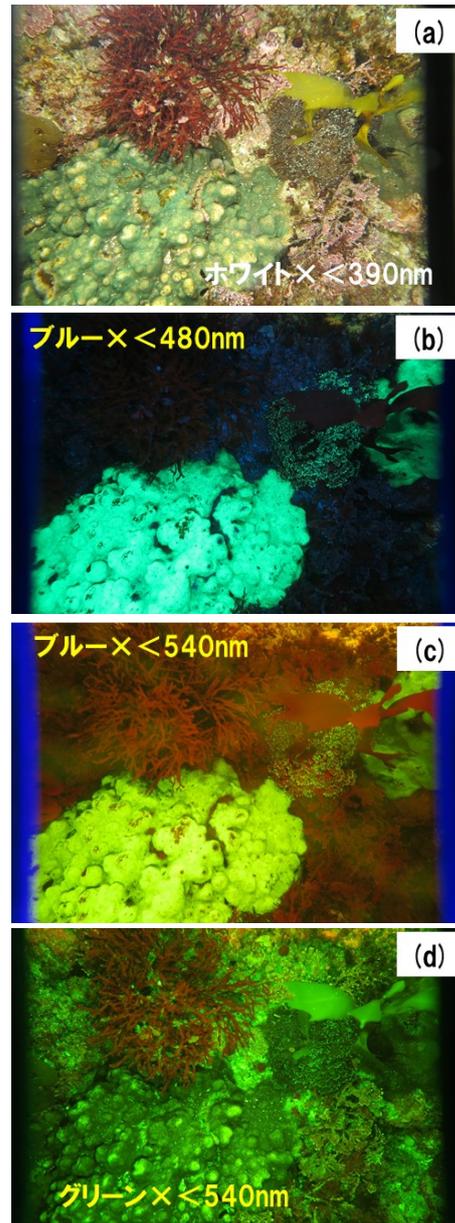


図 10 ハンディマルチ蛍光撮影装置を用いた実海域における蛍光撮影試験の結果
(a) 励起光ホワイト (5650k), カットフィルターを $<390\text{nm}$ で撮影した画像
(b) 励起光ブルー (470nm), カットフィルターを $<480\text{nm}$ で撮影した画像
(c) 励起光ブルー (470nm), カットフィルターを $<540\text{nm}$ で撮影した画像
(d) 励起光グリーン (530nm), カットフィルターを $<540\text{nm}$ で撮影した画像

- ③ Anya Salih et al. (2000) Fluorescent pigments in corals are photoprotective. NATURE, 408, pp850-853.
- ④ C. D' Angelo et al. (2012) Locally accelerated growth is part of the innate immune response and repair mechanisms in reef-building corals as detected by green fluorescent protein (GFP)-like pigments. Coral Reefs, 31, pp1045-1056.
- ⑤ Furushima Y. et al. (2011) Development of coral fluorescent protein monitoring system. Proceedings of the OCEANS 2011

MTS/IEEE KONA Conference & Exhibition,
ISBN CD-ROM:978-0-933957-39-8.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

①古島靖夫, 丸山正, Sylvain Agostini, 鈴木貞男, 篠野雅彦, 蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリングⅢ. 日本サンゴ礁学会ニュースレター, 査読無, No. 68, 2016, p. 4, URL http://www.jcrs.jp/wp/?page_id=560.

②古島靖夫, 丸山正, 篠野雅彦, 鈴木貞男, 蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリングⅡ. 日本サンゴ礁学会ニュースレター, 査読無, No. 64, 2015, p. 4, URL http://www.jcrs.jp/wp/?page_id=560&paged=2.

③M. Sasano, Y. Nakajima J. Yamamoto, Y. Furushima, "Use of Bio-fluorescent Characteristics for Ecosystem Monitoring on Hydrothermal Deposits", Marine Productivity: Perturbations and Resilience of Socio-ecosystems, Proceedings of the 15th French-Japanese Oceanography Symposium, 2015, p.207-213, 査読有, DOI:10.1007/978-3-319-13878-7.

④古島靖夫, 丸山正, 篠野雅彦, 鈴木貞男, 蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリング. 日本サンゴ礁学会ニュースレター, 査読無, No. 60, 2014, p. 5, URL http://www.jcrs.jp/wp/?page_id=560&paged=4.

[学会発表] (計8件)

①古島靖夫, 丸山正, 滋野修一, Sylvain Agostini, 鈴木貞男, ハンディマルチ蛍光撮影装置の開発. 日本サンゴ礁学会 第18回大会, 2015. 11. 28, 慶応義塾大学, 東京都, 港区.

②古島靖夫, 丸山正, 滋野修一, Sylvain Agostini, 鈴木貞男, ハンディマルチ蛍光撮影装置の開発について. 日本サンゴ礁学会 第18回大会 自由集会②「蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリング-III」, 2015. 11. 28, 慶応義塾大学, 東京都, 港区.

③古島靖夫, 丸山正, 滋野修一, 鈴木貞男, 篠野雅彦, 蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリングへの応用. 日本沿岸域学会 研究討論会 第28回, 2015. 7. 18, 茨城大学, 茨城県, 水戸市.

④古島靖夫, 丸山正, 鈴木貞男, 滋野修一, サンゴ(海洋生物)が発する蛍光の現場撮影技術と今後の展開. 日本サンゴ礁学会 第17回大会, 2014. 11. 28, 高知城ホール, 高知県, 高知市.

⑤古島靖夫, 丸山正, 鈴木貞男, 日本沿岸域学会 研究グループミーティング「蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリングへの応用」(概要報告). 日本サンゴ礁学会 第17回大会 自由集会③「蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリング II」2014. 11. 28, 高知城ホール, 高知県, 高知市.

⑥古島靖夫, 今までの蛍光撮影技術・装置について. 日本沿岸域学会 研究グループミーティング「蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリングへの応用」, 2014. 1. 20, 海洋研究開発機構, 神奈川県, 横須賀市.

⑦古島靖夫, 丸山正, 鈴木貞男, 篠野雅彦, サンゴ蛍光撮影技術の深海調査への応用. 日本サンゴ礁学会 第16回大会 自由集会③「蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリング」, 2013. 12. 13, 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄県, 国頭郡.

⑧三輪哲也, 古島靖夫, 滋野修一, 丸山正, ハイパースペクトルカメラの紹介. 日本サンゴ礁学会 第16回大会 自由集会③「蛍光撮影技術を生かした海洋生物イメージングとモニタリング」, 2013. 12. 13, 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄県, 国頭郡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古島 靖夫 (FURUSHIMA, Yasuo)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター・環境影響評価グループ

研究者番号：90359159

(2) 連携研究者

丸山 正 (MARUYAMA, Tadashi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター・アドバイザー
研究者番号：90373464