

令和元年6月21日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04611

研究課題名(和文) 深海トップ・プレデター研究のための全自動in situバイオブシーシステムの開発

研究課題名(英文) Development of autonomous in situ biopsy system for deep-sea top predators

研究代表者

藤原 義弘 (FUJIWARA, Yoshihiro)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生物多様性研究分野・分野長代理

研究者番号：20344294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：深海域に生息する大型生物から非致命的に生体試料を採取するためのin situバイオブシーシステムを開発することを目的として本研究を実施した。まず非常に硬い表皮を持つ深海ザメ類からも微量生体試料の採取を可能にするため、バイオブシー針の先端形状を検討し、針先を三角錐型、針先角度20度～30度とすれば95.3 N以上の力でサンプリング可能であることを示した。また新たに開発したバイオブシーヘッドを用いてサメ類からの微量試料のサンプリング試験を実施し、100mg程度の試料が採取可能であることを示した。さらにストラクチャードライト法を用いることでサメ類と硬骨魚類を安定的に識別できる手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生態系を保全し、持続的に資源を利用可能とするためには、生態系の構造や機能を正しく理解することが必要不可欠である。しかし、深海生態系においては調査研究の難しさから、最も重要な構成要素の一つであるトップ・プレデターの存在すら正しく認識されていない現状がある。そこで本研究では個体数が少なく、脆弱性が高いことが推定される深海のトップ・プレデターについて、可能な限り低負荷で生体試料を取得するための道筋を示した。本研究の成果を利用することで、これまで致命的に採集するしか方法のなかった深海のトップ・プレデター研究を、より安全で効率的に実施できるようになり、正しい深海生態系の姿を明らかにできるものと期待する。

研究成果の概要(英文)：Deep-sea top predators are thought to be vulnerable to anthropogenic impacts, but most studies were conducted using sampled individuals. An in situ biopsy system was developed for collecting small amount of muscle tissues from deep-sea top predators non-lethally for accommodation of scientific researches with lower environmental impacts. Some deep-sea sharks have very hard skin. We tested several types of needles (different shapes, angles, and thickness) and the best combination was the trigonal pyramid with the tip angle of 20 to 30 degrees, which required the shooting force larger than 95.3 N for collecting tissues from hard-skin sharks. A newly developed biopsy head was tested to collect muscle tissues from deep-sea sharks. About 100 mg of tissues were collected without fail, which was enough volume for molecular genetic studies. The structured light method was applied for species discrimination. Sharks and teleosts were clearly discriminated during laboratory tests.

研究分野：深海生物学

キーワード：環境低負荷 脆弱性 バイオブシー 深海 トップ・プレデター 自律的 非致命的 希少生物の保全

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、生態系の構造や機能の維持に、トップ・プレデターが重要な役割を果たしていることが知られるようになった(Sergio et al., 2005, *Nature*). 例えば米国イエローストーン国立公園のトップ・プレデターはハイロオオカミであったが、1926年に園内全てのオオカミが駆除された。その結果、オオカミの餌生物であったアメリカアカシカが爆発的に増殖し、植生に壊滅的な被害を与えた。崩壊した生態系の回復を図るために、合衆国政府は1995年にオオカミの再導入を実施した。その結果、イエローストーン国立公園内の生物多様性は徐々に回復傾向にあることがその後の継続調査で明らかとなっている(Ripple & Beschta, 2012, *Biol. Cons.*). このようにトップ・プレデターは食物連鎖を通じて生態系に大きな影響を及ぼすことが知られており、それらが人為的に除去された場合や持ち込まれた外来種がトップ・プレデターとなった場合、生態系に壊滅的な打撃をもたらされる例は枚挙に暇がない(Stolzenburg, 2009, “Where The Wild Things Were”).

しかしながら深海域ではトップ・プレデターに関する研究例は少なく、その多様性やバイオマスなど基礎的な情報が大きく欠如しており、トップ・プレデターの重要性を議論する前段階にある(Baum & Worm, 2009, *J. Anim. Ecol.*). これは深海トップ・プレデターを直接観察したり、試料を採集することが難しいことに起因する。もともと、どのような生態系においても生産者や低次消費者に支えられるトップ・プレデターの個体数は非常に少ない。陸域や浅海域では、この数少ないトップ・プレデターを継続的に追跡することが可能であり、行動観察から生態系内の食物連鎖を明瞭に示すことができる。一方、深海域へのアクセスには大型で特殊な装置、例えば有人潜水調査船や無人探査機などが必要であり、海底で滞在可能な時間も短く、深海トップ・プレデターと遭遇することは非常に稀であったため、計画的な研究を実施することが困難であった。

研究代表者らは10年以上に渡り、海底に沈んだ鯨遺骸周辺に形成される特殊な生物群集に関する研究を実施してきた。近年では海底に遺骸が沈んだ直後に起こる生物現象を捉えるために、鯨遺骸とタイムラプスビデオカメラを同時に海底設置し、蟻集する生物の多様性や消費速度に関する研究を実施してきた。

その中で明らかになったことは、蟻集するトップ・プレデターを事前に予測する術はなく、鯨遺骸を沈めてみるまでその海域のトップ・プレデターがどの種であるのかすらわからない、ということである。例えば相模湾と小笠原海域の水深500mでは沈設した鯨遺骸を食するために深海性のカグラザメが出現したが、沖縄海域の同一水深では表層性のイタチザメが出現した。

このように深海域の上位捕食者に関する情報は非常に希薄で、「サバンナのトップ・プレデターはライオンである」といったレベルの生態学の基本情報すら深海では得られていないのが現状である。一方で、漁業活動は表層資源の枯渇に伴い深海へと足を伸ばしつつあり、個体数が少なく成長も遅い可能性の高いトップ・プレデターの存続が懸念されている。実際、国際自然保護連合が策定するレッドリストには、絶滅の可能性が高い種として数多くの深海ザメが名を連ねる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、深海域に生息するトップ・プレデターから非致死的に生体試料を採取するための全自動 *in situ* バイオプシーシステムを開発することである。トップ・プレデターとは自身が捕食されることのない、食物連鎖の頂点に位置する捕食者のことであり、サバンナのライオンや浅海域のシャチのような存在である。トップ・プレデターはトップ・ダウン・コントロールを通じて、生態系の機能や生物多様性の維持に重要な役割を果たしていることが陸域や浅海域の研究から明らかになっている。しかしながら深海域では調査観測方法の不足から、トップ・プレデターに関する情報が著しく不足しており、地球最大の生物生息域である深海生態系を理解する妨げになっている。そこで上記システムを開発し、深海トップ・プレデター研究に道を開く。具体的には自律的に深海域の大型生物を認識し、非致死的にバイオプシーを実施して生体試料を多検体採取することのできる *in situ* バイオプシーシステムを開発する。先述の通り、トップ・プレデターの個体数は極めて少なく、また繁殖可能となる年齢に達する時間も長い可能性が高いため、本システムでは生態系への負荷を考慮して個体丸ごとを採集するのではなく、微量の生物試料を非致死的にすると同時に形態情報を記録するために動画撮影を行う。また申請者が実施した先行研究により、深海域のトップ・プレデターは潜水調査船などの出す雑音に敏感である可能性が高いことがわかっている。そこで本システムはその動作に潜水調査船などのサポートを必要とせず、静寂性が高く自律的に稼働できるものとする。さらに深海域へのアクセスには船舶を利用しなければならず、沿岸や陸域のように繰り返しての調査が容易ではない。そこで、一度の設置で複数の試料をできるシステムとする。

3. 研究の方法

本バイオプシーシステムの開発については、主に以下のパートに分けて実施し、最終的にシステム全体のアセンブルを実施した。

(1) バイオプシー針先形状の検討

深海ザメ類の中には、硬い表皮をもつヨロイザメやユメザメなどが知られており、このような魚類からも確実に試料を採取するためには、サメ類の表皮を効率よく貫通するための針の形状やそのときの貫通力を明らかにする必要がある。そこでヨロイザメ、ユメザメ、サガミザメの3種計11個体用いて、様々な針先の形状(円錐型、ベベル型、三角錐型)、針先角度(20度、30度、40度)、針径(6mm および 8mm)の針を使った表皮の刺突性評価試験を実施した。

(2) バイオプシー針の開発

生体試料に最適化した針先を持つバイオプシー針を用いて、分析に必要な量の生体試料をすることが可能か、また試料が外界から隔離保存できるのかを明らかにするために、表皮の硬さの異なる各種深海生物試料を用いて針刺し実験を実施した。

(3) 大型生物の自動探知手法の開発

大型生物の映像データを効率的に取得するため、可視光による大型生物の自動探知手法の開発を試みた。まず、2本のシートレーザーを用いる手法を検討した。シートレーザーが映る位置と大きさから、光切断法の応用によりターゲットの位置と形状を計測するとともに、形状に基づく特徴量によって大型生物の抽出を試みた。また、シートレーザーを用いた手法は簡便であるものの、計測エリアがシートレーザーに照射されている領域に限られてしまうため、大型生物の全体形状を計測し、それに基づく分類を行うためパターン光投影手法の導入を検討した。

4. 研究成果

平成 28 年度には全システムのうち、バイオプシー針射出装置以外の制作・整備を行った。映像部では、小型の高感度ハイビジョンカメラを採用すると共に、非圧縮動画データ収録によって、撮影されたトップ・プレデターの種判別・個体認識まで可能な高精細な映像データを取得できるシステムを導入した。認識部については、2本のシートレーザーによる光切断法を利用して対象生物のサイズと形状を計測し、条件に一致した生物のみにバイオプシー針を射出できるように設計・制作した。この装置を用いて、葛西臨海水族園および横浜八景島シーパラダイスにおいて、生物認識に関する作動試験を実施し、様々な条件での映像データを取得した(図 1)。特にサメ類について、他の魚類との識別が可能かを検証した結果、図 1 右のようにサメ(Case 1, 2)とそれ以外(Case 3, 4)を識別することに成功した。また対象生物を鮮明に撮影するための LED 照明を製作した。バイオプシー部についてはバイオプシー針の先端形状を確定した(図 2, 3)。

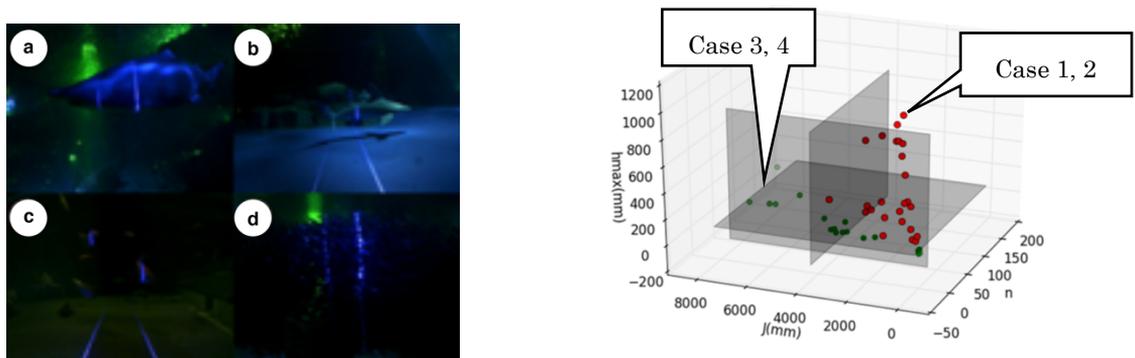


図 1. 光切断法による深海サメの自動計測および識別手法。左:水族館における計測例, 右:識別結果。

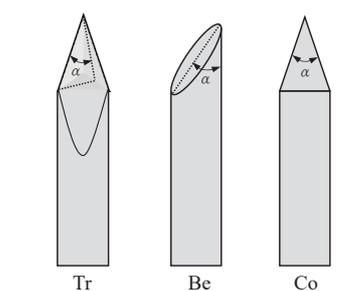


図 2. 刺突性評価試験に使用した針の模式図。Tr:三角錐型, Be:ベベル型, Co:円錐型。針先角度 (α) は, 20, 30, 40 度および針径は 6, 8mm のものを使用した。

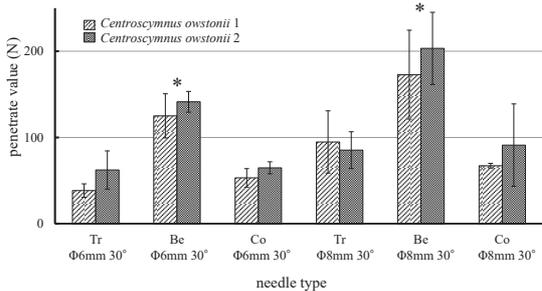


図 3. ユメザメ 2 個体を用いた各種針形状(三角錐型, ベベル型, 円錐型, 針径 6 および 8mm, 針先角度 30 度)における評価試験結果。垂直線は標準偏差を示す。アスタリスクは針形状間における貫通力に有意差があることを示す。

深海魚表皮の刺突性評価試験の結果、サメ類ではサガミザメを用いた場合がもっとも貫通力が小さく、針先が三角錐型、針先角度 30 度の場合で、22.1N で針先が表皮を貫通した。ユメザメとヨロイザメでもっとも貫通力が小さかったのは、どちらも針先が三角錐型、針先角度 20 度の場合で、それぞれ 65.3N, 95.3N で表皮を貫通した。もっとも大きな貫通力を必要としたのはヨロイザメの表皮で、サガミザメの 3.6~6.0 倍、マサバの 55.3 倍となった。自動現場バイオプシー装置の開発にあたり、針先を三角錐型、針先角度 20 度もしくは 30 度とし、95.3 N 以上の力で押し込む射出機構が必要であることを

示した(図 3)。

また採取したバイオブシー試料を格納可能なリトラクタブルタイプのバイオブシーヘッドを開発した(図 4)。このヘッドには刺突性評価試験の結果選定した三角錐型の針を装備し、針の軸を中空軸としてその一部をサンプル室とした。このヘッドを用いてサガミザメからの微量サンプリング試験を実施した結果、約 100mg の軟組織を安定してできることを示した。環境計測部については、代表研究者所有の ADCP+CTD/DO をシステムに組み込んだ。また各構成要素を搭載する簡易アルミフレームを試作した。以上の成果を板鯰類シンポジウム 2016, ブルーアース 2017 など公表するとともにバイオブシー針の開発に関する成果を学術雑誌に投稿した。

平成 29 年度にはシステムに全ての装置類を組み込み、海域での動作試験を実施した。まず装置類を搭載するフレームを設計・製作するとともに、バイオブシー針射出用ランチャー4本を整備した。このフレームにメインカメラ、バイオブシー針射出用ランチャーおよび安全対策装置、投光器、レーザー照射器などを組み込み、水槽での動作試験を実施した。その結果、ランチャーからバイオブシー針を正常に射出できることを確認した(図5)。また安全装置に関する圧力試験を高圧水槽内で実施したところ、気中でバイオブシー針の射線を塞ぐ安全対策ボールの挙動が不安定であり、装置内でジャムが発生し、十分な安全性を確保できないことが判明したことから、新たにピストン昇降式的安全対策装置を開発し、システムに組み込んだ。この安全装置を用いた加圧減圧試験を高圧実験水槽内で実施し、良好な試験結果を得た。そこで神奈川県立海洋科学高校の練習船「湘南丸」を用いて、駿河湾で現場海域試験を 11 月に実施した(図 6)。

まずバイオブシー針を装填しない状態でシステムの健全性の確認を行った。その結果、海底の濁りがシートレーザーによる光切断法を用いた生物の認識に悪影響を与え、対象生物を十分に認識できないことがわかった。また安全装置の一部の強度不足により、試験中に亀裂が発生したことから、今年度の海域試験ではバイオブシー針の実装を見送り、レーザー画像の取得を行った。その後、海洋研究開発機構岸壁において、生物認識部アルゴリズムを改良するためのデータの取得、システム全体の重量バランスの見直し、レーザー光の波長の変更、メインカメラの換装のための準備、システム全体の軽量化を実施した。

平成 29 年度に実施した実海域試験の結果、シートレーザーを用いた光切断法による生物認識は、陸上試験および水槽試験では十分な生物認識力を示したが、実海域では餌に蝟集する生物によって巻

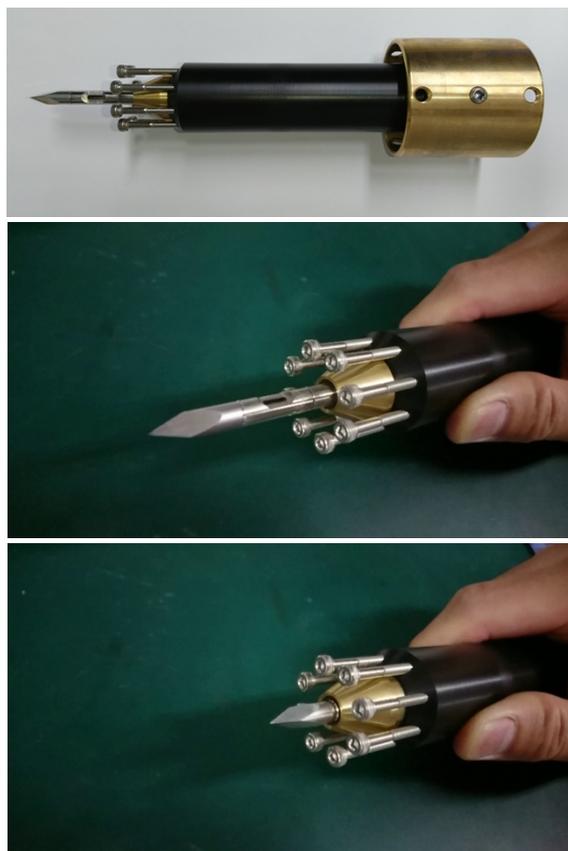


図 4. バイオブシーヘッド. 上: バイオブシーヘッド全体, 中: バイオブシーヘッド先端部. 針の中空軸下部にサンプル室が開く, 下: 針を引き込んだ状態. サンプル室の入り口が完全に隠れ, 試料を外界から隔離・保護する。

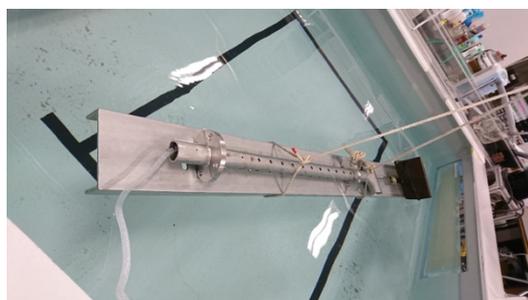


図 5. ランチャーに搭載したバイオブシー針の射出実験の様子。

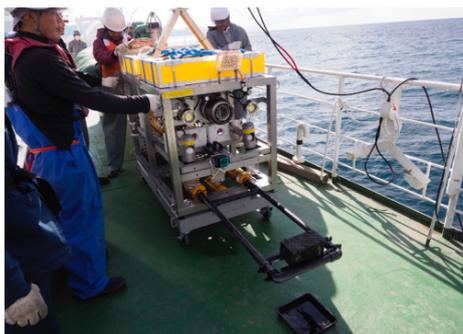


図 6. 「湘南丸」を用いて実施した現場海域試験の様子. 左: デッキ上の in situ バイオブシーシステム, 右: 投入中の in situ バイオブシーシステム

き上げられる海底堆積物が認識の障害となり、また計測エリアがシートレーザーに照射されている領域に限られてしまうため改善が必要であるとの結論に達した。そこで平成 30 年度には対象生物の全体形状を計測し、それに基づく分類を行うためにストラクチャードライト法を導入した(図 7)。まず水中において平面を計測した結果、計測誤差が標準偏差 3mm 程度に収まることを確認した。次に空気中で深海ザメを含む複数の生物標本を様々な向きで計測し、識別実験を行った。計測システム前方に回転台を設置し、台に乗せる魚種、姿勢を変えて計測を行った。今回の実験ではユメザメ 2 個体、フトツノザメ、アコウダイそれぞれ 1 個体について、頭を左側に向けた状態を初期状態として、反時計回りに角度 $\theta = 0^\circ, 30^\circ$ 回転させて計測を行った。形状既知のモデルとしては、各個体について $\theta = 0^\circ$ の状態でパターン光を照射したときの交点を手動で検出し、それをもとに復元した形状を用いた。その結果、8 ケース中 7 ケースにおいて正しく生物を分類することができた。

すなわちサメ類とアコウダイについては安定して識別可能であることを示した。図 8 に結果の一部を示す。本研究では深海ザメの映像、バイオブシー試料の現場を実現するために、水中において

深海ザメの三次元形状を計測し、他の魚種との識別をおこなう手法を提案し、計測手法の水中における精度および複数魚種、姿勢について観測された点群に対する形状の類似性を評価した。

その結果、特定魚種について提案手法が有効であることが確認できた。また本科研費での開発をもとに「バイオブシーデバイス、該バイオブシーデバイスを射出するための射出装置、及び、これらを備えたバイオブシー装置」として平成 30 年 6 月 5 日に特許出願(特願 2018-107507)を実施したほか、非常に硬い深海ザメの表皮を貫通させることを目的にバイオブシー針の先端形状を評価した研究成果を査読付き論文誌にて公表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① [Shinji Tsuchida](#), [Masaru Kawato](#), [Shinpei Gotoh](#), [Yoshimi Takahashi](#), [Ayaka Kasai](#), [Katsunori Fujikura](#), [Yoshihiro Fujiwara](#) (2019) Static penetration test on deep-sea shark skins -reports on needle types and penetration forces for developing an autonomous *in situ* biopsy equipment. JAMSTEC Report of Research and Development. 28: 35-42. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

- ① [藤原義弘](#), [土田真二](#), [野牧秀隆](#), [D. Langlet](#), [A. Weiner](#), [藤木徹一](#), [原田尚美](#), [藤倉克則](#), [山口篤](#), [角井敬知](#), [自見直人](#), [J. C. Hunt](#), [L. Bergman](#), [小川晟人](#), [中藤千晶](#), [小磯桃子](#), [渡辺茂樹](#), ほか MR17-04LEG2 関係者一同 (2018) ベーリング海南東部における「アリューション・マジック」観測。ブルーアースサイエンス・テク 2018. 口頭発表。
- ② [佐藤匠](#), [土田真二](#), [河戸勝](#), [小磯桃子](#), [結城仁夫](#), [岩崎弘倫](#), [藤倉克則](#), [藤原義弘](#) (2018) 駿河湾深海域におけるペイトカメラ調査の条件検討と上位捕食者の個体数密度推定。板鯰類シンポジウム 2018. ポスター。
- ③ [Takayuki Nishimura](#), [Toshihiro Maki](#), [Kotohiro Masuda](#), [Yoshihiro Fujiwara](#) (2017) Toward automatic detection of deep sea top predators by visible light. Oceans 2017. Poster.
- ④ [藤原義弘](#), [土田真二](#), [河戸勝](#), [佐藤匠](#), [小栗一将](#), [松本恭幸](#), [笠井彩香](#), [高橋幸愛](#), [藤倉克則](#), [小磯桃子](#), [後藤慎平](#), [田中彰](#) (2017) 深海生態系におけるトップ・プレデターの機能に関する研

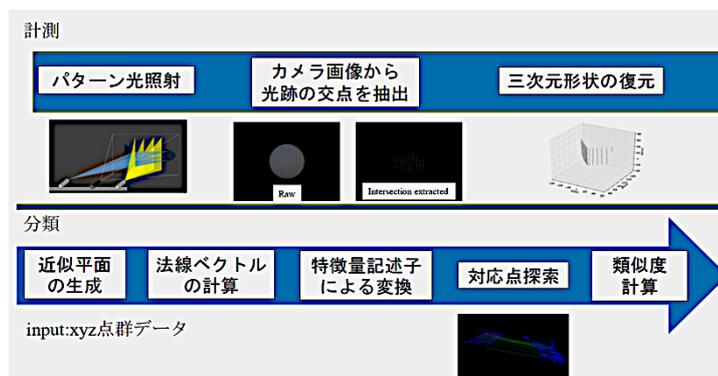


図 7. パターン光投影による大型生物の三次元形状計測および識別手法。

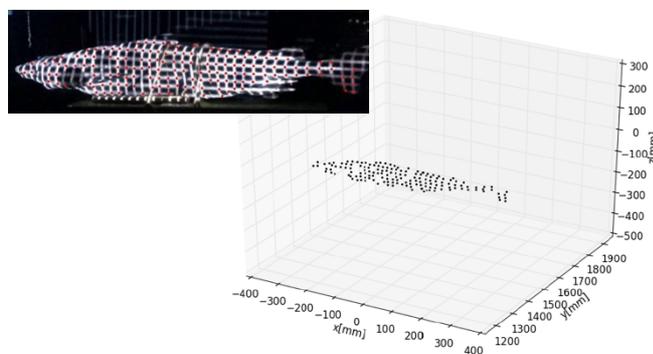


図 8. ストラクチャードライト法による空中での計測結果(ユメザメ 1, $\theta = 0^\circ$) 左上はカメラ画像における交点の抽出結果

究～生息密度の推定方法～. Blue Earth 2017. 口頭発表.

- ⑤ 藤原義弘, 土田真二, 河戸勝, 佐藤匠, 松本恭幸, 笠井彩香, 高橋幸愛, 力石嘉人, 大河内直彦, 藤倉克則, 山中寿朗, 大西雄二, 田中彰 (2016) 駿河湾深海域における上位捕食者の役割に関する研究. 板鯰類シンポジウム 2016. 口頭発表.

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

- ① 名称: バイオプシーデバイス, 該バイオプシーデバイスを射出するための射出装置, 及び, これら
を備えたバイオプシー装置
発明者: 藤原義弘, 土田真二, 河戸勝, 増田殊大, 巻俊宏
権利者: 海洋研究開発機構
種類: 特許
番号: 特願 2018-107507
出願年: 平成30年
国内外の別: 国内

[その他](計 3 件)

- ① 西村崇之 (2019) パターン光投影による深海ザメの三次元形状計測および識別手法. 修士論文. 東京大学大学院新領域創成科学研究科 (指導教員: 巻俊宏)
② 佐藤匠 (2019) DNA メタバーコーディングを用いた駿河湾産ヘラツノザメ属の食性解析. 修士論文. 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 (指導教員: 土田真二, 藤原義弘)
③ 西村崇之 (2017) 可視光による深海トッププレデターの自動探知手法. 卒業論文. 東京大学 (指導教員: 巻俊宏)
④ 海洋生物多様性研究分野ホームページ:
<http://www.jamstec.go.jp/bdive/j/about/#research1>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 土田 真二

ローマ字氏名: (TSUCHIDA, Shinji)

所属研究機関名: 国立研究開発法人海洋研究
開発機構

部局名: 海洋生物多様性研究分野

職名: 技術主幹

研究者番号 (8 桁): 30344295

研究分担者氏名: 巻 俊宏

ローマ字氏名: (MAKI, Toshihiro)

所属研究機関名: 東京大学

部局名: 生産技術研究所

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 50505451

研究分担者氏名: 河戸 勝

ローマ字氏名: (KAWATO, Masaru)

所属研究機関名: 国立研究開発法人海洋研究
開発機構

部局名: 海洋生物多様性研究分野

職名: 技術主任

研究者番号 (8 桁): 50533866

研究分担者氏名: 福場 辰洋

ローマ字氏名: (FUKUBA, Tatsuhiko)

所属研究機関名: 国立研究開発法人海洋研究
開発機構

部局名: 海洋工学センター

職名: 技術研究員

研究者番号 (8 桁): 80401272

研究分担者氏名: 後藤 慎平

ローマ字氏名: (GOTOH, Shinpei)

所属研究機関名: 東京海洋大学

部局名: 学術研究院

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 90772939

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 増田 殊大

ローマ字氏名: (MASUDA, Kotohiro)

研究協力者氏名: 八巻 鮎太

ローマ字氏名: (YAMAKI, Ayuta)