

令和元年6月12日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21698

研究課題名（和文）高速自動解析手法を用いた巨大地震がメイオファウナ群集に与えた影響評価

研究課題名（英文）Impact assessment of the big earthquake on meiofaunal assemblage using a rapid and automated analysis method

研究代表者

北橋 倫（KITAHASHI, Tomo）

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・特任技術副主任

研究者番号：60713807

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまで解析に時間の掛かっていたメイオファウナの解析を高速化、自動化するために、イメージング・フローサイトメーター（FlowCAM）を用いた解析手法の確立を行った。コロイド状シリカ溶液を用いた遠心法により堆積物試料からメイオファウナ個体を抽出し、FlowCAMに投入することで、高速にメイオファウナ個体の画像を取得する手法を確立した。この手法を用いたメイオファウナ群集の解析結果は、従来の顕微鏡を用いた解析結果と同等であり、本手法が環境影響評価に有用であることが示された。さらに、本手法で取得したメイオファウナの画像を元にデータベースを構築し、深層学習による画像の自動判別を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メイオファウナは浅海・深海にかかわらず、人為的・自然撓乱が生物に与えた影響をモニタリングする対象として有用である。本研究で確立したFlowCAMを用いたメイオファウナの解析手法により、メイオファウナ群集の解析が格段にスピードアップするため、生物群集の変化をより迅速に検出でき、環境改変による環境影響評価を素早く行うことができる。また、深層学習による自動分類システムが完成すれば、半自動で精度の高い影響評価を行うことができると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I developed a new method for investigating meiofauna using an imaging flow cytometer (FlowCAM) to investigate rapidly and automatically meiofauna, which has been needed time-consuming works to be investigated. Meiofaunal specimens were extracted from sediment using the centrifugal separation method with colloidal silica solution and then pipetted into the FlowCAM system and imaged. The results based on this new method were comparable to that based on the traditional microscopic methods, which indicating that this new method is useful to investigate meiofaunal assemblage. In addition, I established the image database of meiofauna captured using this new method and tried to automatically classify the images by deep learning methods.

研究分野：深海生態学

キーワード：メイオファウナ 巨大地震 環境影響評価 FlowCAM 深層学習

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2011年3月11日、東北地方太平洋沖地震が発生した。研究代表者は地震後に震源域である三陸沖日本海溝斜面の水深50mから5,600mにかけて海底調査を継続的に行っている。そのうち2011年と2012年に採集されたサンプルについて、深海生態系で重要な構成要素である小型底生生物(メイオフauナ)を解析し、生息密度は地震前後で変化していないが、高次分類レベルの群集組成は地震前後や地震後2011年から2012年にかけて変化していることを明らかにした(引用文献、)。しかし、定常状態で起こる群集組成の変動幅が不明なため、地震後の群集組成の変化が地震の影響によるものなのか、定常状態でも起こり得る変化であるのか判断するには至っていない。一方で、メイオフauナ群集の解析には実体顕微鏡下での作業が必須であり、大量のサンプルを解析するには膨大な時間が必要であり、この作業がメイオフauナ群集の研究におけるボトルネックとなっていた。

一方、同じく小サイズの生物を扱うプランクトン研究では、海水サンプル中に存在する粒子を高解像度 CCD カメラで撮影するイメージング・フローサイトメーター (FlowCAM: Flow Cytometer and Microscope, Fluid Imaging Technologies 社) を用いて解析の高速化を図っている。この FlowCAM による解析技術をメイオフauナに応用し、迅速に大量サンプルの解析を可能とすることで、地震後に起こったメイオフauナ群集の変化・回復・遷移過程を解明できると考えた。

### 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、メイオフauナ群集の解析を高速化する手法を開発することを目的とした。さらに、取得した画像データを元に深層学習に資するデータベースを作成し、深層学習を用いた画像の自動分類が可能か検証を行った。また、光学顕微鏡下での形態の詳細観察により、FlowCAM で取得できる画像では難しい下位分類レベルでの群集組成解析を行い、巨大地震が深海メイオフauナ群集に与えた影響の評価を行った。

### 3. 研究の方法

本研究では、(1) 堆積物からメイオフauナ個体の分離法、FlowCAM での撮影条件を検討し、FlowCAM を用いたメイオフauナ解析手法を確立した。また、(2) 確立した手法を用いてメイオフauナ画像のデータベースを構築し、深層学習を試みた。さらに、(3) FlowCAM で得られる画像では観察が難しい詳細な形態観察を顕微鏡下で行い、より詳細な群集組成解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 2015年3月に東北海洋生態系調査船「新青丸」による KS15-01 次航海において三陸沖日本海溝斜面で採集したサンプルの内、メイオフauナの生息密度が異なると予想される水深の異なる4つの測点(水深65m, 303m, 1,064m, 1,677m)の堆積物サンプルを用いて、FlowCAM を用いたメイオフauナ群集解析手法を確立した。まず、堆積物試料をコロイド状シリカ溶液に懸濁させ、遠心することで、生物を堆積物粒子から分離した。図1のように FlowCAM とコニカルチューブを接続することで、FlowCAM によるメイオフauナの撮影と、メイオフauナ標本を無傷で再捕集することに成功した。得られた画像はメイオフauナの高次分類レベルで分類するのに十分であった(図2)。メイオフauナ全体、及び深海メイオフauナ群集で優占する線虫類、カイアシ類について、FlowCAM 画像による計数と、撮影後に再捕集した試料の顕微鏡下での計数は有意に相関していた。また、両者の作業時間を比較すると、検鏡作業はどの試料についても数時間だったのに対して、FlowCAM 画像を用いた作業は数10分程度であった。これまでのメイオフauナ研究の伝統的な手法では、小さな個体を実体顕微鏡下で観察するという時間の掛かる作業が必須であり、複数の観測点に及び長期的な個体群動態を把握することが困難であった。本研究で確立した新規の手法は、東日本大震災による東北沖深海メイオフauナ群集への影響や、攪乱からの遷移・回復を評価するような長期的なモニタリングを行う際に有用だと考えられる。沖縄トラフで行われた海底掘削(人為的攪乱)による周辺メイオフauナ群集への影響を解析した結果、従来の顕微鏡下での解析方法と FlowCAM 画像を元にした解析でも同様の結果を示し、本手法でも十分に人工攪乱による環境変化の影響を検出できることを確認した。

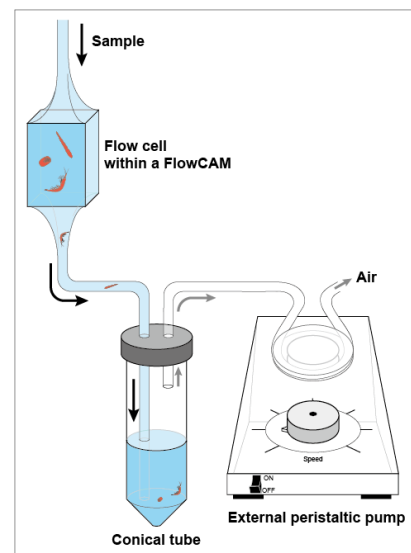


図1. FlowCAM でメイオフauナを撮影する際の概念図

黒い矢印で示すチューブはコロイド状シリカ溶液で満たしている。

Kitahashi et al. (2018, MethodsX)より。

(2) 一方で、メイオファウナの画像データを取得するまでの時間は大幅に短縮されたものの、画像を取得した後の画像データの分類は目視で行っていた。顕微鏡による観察と比べて作業時間は大幅に短縮できたものの、解析に掛かる時間をさらに短縮するために、機械学習・深層学習を応用した画像の自動分類を試みた。まず、深層学習に必要な教師データの構築のために、FlowCAM を用いた手法で様々な環境のメイオファウナ画像を蓄積した。構築したデータベースを元に、NVIDIA が提供する DIGITS、及び NEC が提供する RAPID を用いて、深層学習による画像データの分類を試みた。その結果、2つの深層学習システムとも深海メイオファウナ群集で優占する線虫類とカイアシ類の2つの分類群の分類は約98%と高い精度での分類に成功した。今後は、学習に用いる画像データの加工方法を検討し、他の分類群も分類できるように学習データセットの構築を進める必要がある。

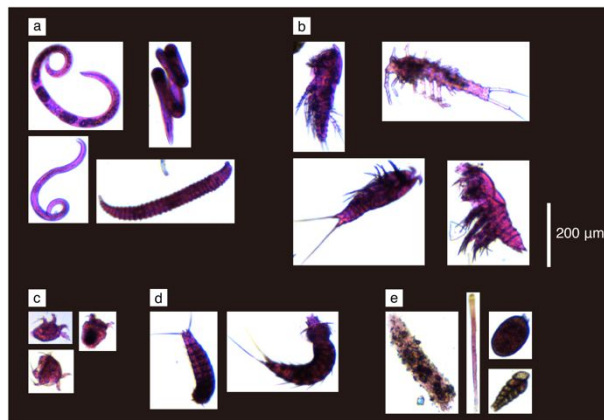


図2. FlowCAM で撮影されたメイオファウナ

a: 線虫類、b: カイアシ類、c: ノープリウス幼生、  
d: 動物動物、e: 有孔虫類

Kitahashi et al. (2018, MethodsX)より。

(3) 東北地方太平洋沖地震後の三陸沖日本海溝斜面のメイオファウナ群集の解析も行った。光学顕微鏡を用いた底生カイアシ類の詳細な形態観察の結果、地震後の全ての測点で2011年から2012年にかけての群集組成の変化は見られなかった。さらに、地震前の当該海域の群集組成と類似していると考えられる千島海溝周辺域の群集組成と比較すると、両者の深度変化パターンに有意な差は見られず、地震などの攪乱が頻発する三陸沖日本海溝斜面では、もともと攪乱に強い分類群が存在していたと考えられた。

#### <引用文献>

Kitahashi, T., Jenkins, R.G., Nomaki, H., Shimanaga, M., Fujikura, K., Kojima, S., 2014. Effect of the 2011 Tohoku Earthquake on deep-sea meiobenthic assemblages inhabiting the landward slope of the Japan Trench. *Marine Geology* 358, 128–137.  
DOI: 10.1016/j.margeo.2014.05.004

Kitahashi T., Watanabe, H., Ikehara, K., Jenkins, R.G., Kojima, S., Shimanaga, M., 2016. Deep-sea meiobenthic fauna off the Pacific coast of Tohoku and other trench slopes around Japan: a comparative study before and after the 2011 off the Pacific coast of Tohoku Earthquake. *Journal of Oceanography* 72, 129–139.  
DOI: 10.1007/s10872-015-0323-3

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Kitahashi, T., Jenkins, R.G., Kojima, S., Shimanaga, M., 2018. High resilience of harpacticoid copepods in the landward slope of the Japan Trench against disturbance of the 2011 Tohoku Earthquake. *Limnology and Oceanography* 63, 2751–2761. (査読あり)  
DOI: 10.1002/lno.11006

Kitahashi, T., Watanabe, H.K., Tsuchiya, M., Yamamoto, H., Yamamoto, H., 2018. A new method for acquiring images of meiobenthic images using the FlowCAM. *MethodsX* 5, 1330–1335. (査読あり)  
DOI: 10.1016/J.MEX.2018.10.012

[学会発表](計4件)

Kitahashi, T., Sugime, S., Nakamura, M., Nishijima, M., Inomata, K., Tsuchiya, M., Watanabe-Kayama, H., Yamamoto, H. Detecting the effect of scientific drilling on meiobenthic fauna with the traditional, metagenomic and image-based methods. 15th International Deep-Sea Biology Symposium, 2018

北橋倫, 杉目幸恵, 土屋正史, 渡部裕美, 山本啓之. 深海底科学掘削に伴う掘削屑がメイオファウナ群集に与えた影響—イメージング・フローサイトメーターを用いた結果との比較. 日本地球惑星科学連合 2018 年大会, 2018

北橋倫, 土屋正史, 渡部裕美, 杉目幸恵, 山本啓之, 大河原にい菜. イメージング・フローサイトメーターを用いたメイオファウナ群集の解析. 2016 年日本ベントス学会・日本プランクトン学会・合同大会, 2016

Kitahashi, T., Tsuchiya, M., Watanabe, H., Yamamoto, H. Spatial patterns of meiofaunal assemblage at the Noho site in the Okinawa Trough, NW Pacific: traditional v.s. semi-automated methods. 16th International Meiofauna Conference (ISIMCO 2016), 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：統合システム及び統合方法

発明者：北橋倫，西島美由紀，下田代雅文

権利者：海洋研究開発機構、(株)テクノスルガ・ラボ

種類：特許

番号：特願 2017-90809 号

出願年：平成 29 年

国内外の別： 国外

名称：生物粒子を含む試料の前処理方法、生物粒子の画像取得方法、生物粒子を含む試料の前処理装置、及び生物粒子画像取得装置

発明者：北橋倫，渡部裕美，土屋正史，山本啓之

権利者：海洋研究開発機構

種類：特許

番号：特願 2016-232868 号

出願年：平成 28 年

国内外の別： 国外

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。