

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06217

研究課題名(和文) 多波長励起式蛍光撮影技術を用いた海洋生物イメージングとモニタリングの基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental study on marine biological imaging and monitoring using multi-wavelength excitation fluorescence photographing technique

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・地球環境部門(海洋生物環境影響研究センター)・グループリーダー代理

研究者番号：90359159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、サンゴの白化現象や磯焼けによる藻場の消失といった、海洋(漁場)環境の悪化が懸念されている。環境変動に伴う海洋生物の分布・個体数や多様性の変化は、迅速に把握することが重要である。そのため、簡便・安価でかつ迅速に環境変動やその影響が評価できる環境計測の技術(装置)開発が求められている。

本研究では、海洋生物(主に藻類やサンゴの固着性生物)が有する蛍光を多波長(4種の波長)で撮影できる蛍光撮影装置を開発した。また、本装置を小型ROVに搭載し、広域で海洋生物の蛍光マッピングが出来る装置も併せて開発した。さらに、これらの開発装置によって得られた蛍光画像について、画像処理手法を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した多波長励起式蛍光撮影装置は、海洋生物が発する蛍光を画像としてとらえることで、生物マッピング撮影技術の基盤を構築した。さらに、小型ROVに本装置を搭載することで、これまで人が潜水調査で観察するには難しい水深50m以深の海域(Methophotic Zone)における生物観察とマッピングを可能にしたことは、学術的な意義が大きい。また、本装置は多少の改良が必要だが、研究協力者O.R.E(代表：鈴木貞男氏)を通じて製品化の可能性を見出した。本装置が比較的簡便・安価に製品化されれば、海洋生物観察とマッピング(環境計測)の有効なツールとなり、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)： In recent years, there has been concern about the deterioration of the marine (fishing) environment, such as coral bleaching and the loss of seaweed beds due to rocky shore scorching. It is important to quickly assess changes in the distribution, abundance and diversity of marine organisms due to environmental change. Therefore, there is a need for the development of environmental measurement technology (equipment) that is simple, inexpensive and can quickly assess environmental changes and their effects.

In this study, a fluorescence imaging device was developed that can capture the fluorescence of marine organisms (mainly algae and coral adherents) at multiple wavelengths (four different wavelengths). This device was also developed to be mounted on a small ROV to enable fluorescence mapping of marine organisms over a wide area. Furthermore, an image processing method was investigated for the fluorescence images obtained by these developed devices.

研究分野：水産海洋学

キーワード：多波長励起式蛍光撮影装置 海洋生物マッピング 蛍光撮影技術 小型ROV 環境影響 沿岸域

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁域や藻場は、魚卵・稚子の生育の場、潜水漁業等の社会活動の場として非常に重要な海域である。しかし、近年、サンゴの白化現象や磯焼けにより、漁業生産量は減少傾向にあり漁場環境の悪化が懸念されている(古島・菅野 2003, 吉村ら 2015)。このような海域では、継続的な環境モニタリングの実施が急務である。サンゴや藻場の分布調査は、主に潜水作業によって行われるが、潜水時間や潜水深度の制約により調査範囲は限定される。ところが、人間が潜水するには困難な深度帯(50m以深)においても、多くの海洋生物(テーブル状サンゴを含む)が分布(図1)していることが小型 ROV による調査から確認されている(Humblet et al. 2010)。このような深度帯における調査は、主に小型 ROV が使われるが、装置が高価であることや画像処理(マッピング等)の手法が確立されていないため稀である。

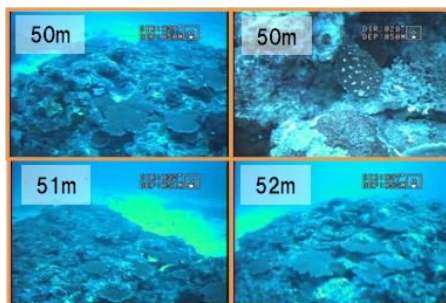


図1 石西礁湖南東海域水深50m付近のサンゴ分布(国際海洋環境情報センター小型ROVによる画像)

サンゴや藻類等の多くの海洋生物が、蛍光物質を持つことは良く知られている。サンゴは、GFP (green fluorescent protein) に代表される蛍光蛋白質を持つものが多く存在し(宮脇 2003)、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と考えられている(Salih et al. 2000)。すなわち、サンゴの蛍光蛋白質は、サンゴを白化から守るために紫外線防御の働きをされると考えられる。ゆえに、海洋生物が発する蛍光が、生理・生態学的にどのような意味や役割を持つのか、と言った問題は数多く残されているものの、海洋生物が発する蛍光を、現場で環境情報と併せてイメージングが出来れば、その蛍光画像から分布の状態だけではなく健康状態等を明らかにすることが出来るのではないかと考えた。研究代表者らは、GFPの緑色系蛍光を強調させるフィルターセット(470nmの励起光と480nmより下の帯域をカットするカットフィルター)を用いて、簡便かつ安価で昼夜を問わずにサンゴの蛍光画像が撮影・観察できる装置等を開発してきた。さらに、この技術をサンゴの白化予測や種判別等へ応用するためには、蛍光撮影装置の撮影モードの拡張が必要であると考え、GFPのみならずクロロフィルによる蛍光(葉緑体の蛍光)等の撮影を可能にするため、波長帯の異なる励起光とカットフィルターを有するハンディマルチ蛍光カメラを開発した(科研費: 25450266, 基盤研究(C)一般, H25~H27)。これを用いた実海域における撮影試験から、藻類の赤色蛍光(葉緑体の蛍光)を強調するフィルターセットでは、褐藻類(brown algae)と紅藻類(red algae)で、赤色蛍光が見られる波長帯が異なることが明らかになり(図2)、サンゴや藻類、石灰藻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(古島ら. 2017)。また、多波長励起による蛍光イメージングは、2016年に石西礁湖(沖縄県石垣島と西表島の間に位置する我が国で最大のサンゴ礁海域)で発生したサンゴの白化現象等に対して、既に死んでしまっ

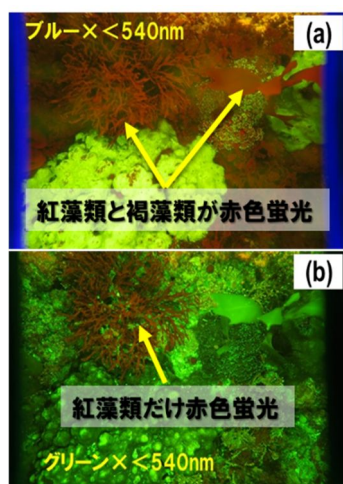


図2 多波長励起による蛍光画像
(a)励起光 blue, cut filter <math>< 540\text{nm}</math>
(b)励起光 green, cut filter <math>< 540\text{nm}</math>

て骨になったサンゴなのか、白化してはいるが生きているのか、といった判断にも使える可能性が示唆された。しかしながら、装置の大きさや水中での取り扱いの悪さ、得られた蛍光画像における蛍光強度の定量的な評価方法の確立、広域のかつ潜水が困難な深度帯における撮影技術の対応等の課題として残された。

[参考文献]

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.
 Anya Salih et al.(2000) Fluorescent pigments in corals are photoprotective. NATURE, 408, pp850-85.
 古島靖夫・菅野進(2003) サンゴ礁海域をとりまく環境の長期変動について. 日本沿岸域学会論文集. 15号 pp147-158
 古島靖夫, S. Agostini, 丸山正, 鈴木貞男, 山下洋(2017)簡便な多波長励起式蛍光撮影装置は、海洋生物のイメージングとモニタリングのツールになり得るか? 日本沿岸域学会研究討論会 2017, 講演概要集 No.30, 15-5.
 Humblet Marc et al. (2010) The twilight zone of modern and fossil reefs in the Ryukyu Islands. Japan Geoscience Union (JPGU) Meeting 2010, BBG006-P03.
 吉村拓, 八谷光介, 清本節夫(2015)小型海藻藻場の重要性和磯焼け域におけるその回復の試み. 水産工

2. 研究の目的

本研究の目的は、藻類やサンゴなどの固着性の海洋生物が有する蛍光を多波長の蛍光画像で捉え、分布や生物判別、および生物活性が簡便・安価かつ広域的に把握できる海洋生物マッピング技術の基礎を構築することである。そのために、多波長励起式蛍光撮影装置の開発、および開発した多波長励起式蛍光撮影装置が搭載できる小型 ROV の開発を行った。また、本装置を用いた水槽および現場撮影試験を行うと共に、多波長蛍光画像の解析手法の基盤設計について検討した。

3. 研究の方法

(1) 多波長励起式蛍光撮影装置の開発

多波長励起式蛍光撮影装置は、カメラユニット、励起光ユニット、制御ユニット、電源ユニットの4部から構成される(図3)。各ユニットは、小型 ROV に搭載することを考慮し、カメラユニット: 250×250×200 mm、励起光ユニット: 30×220 mm、制御ユニット: 240×240×160 mm、電源ユニット: 90×240 mmと大きさを小型化(軽量化)し、耐圧は水深 150m とした。

カメラユニットには、小型デジタルカメラ (SONY DSC-RX0M) 4 台と、カメラレンズの前面に脱着式カットフィルターを装備した。カットフィルターは、390nm (透明) 480nm (黄色) 540nm (橙色) 620nm (赤色) の帯域以下をカットする市販されているフィルターをそれぞれ使用した。また、本装置では励起光として、2 個の励起光ユニットに青色光 (470nm) 緑色光 (530nm) 赤色光 (617nm) 白色光 (5650k) の 4 種の LED ライトを装備した。本装置の標準設定では、撮影できる画像は励起光とカットフィルターの組み合わせから、白色光×390nm、青色光×480nm、緑色光×540nm、赤色光×620nm の 4 種である。これらの励起光とカットフィルターの組合せは、主に GFP の緑色系蛍光(青色光×480nm) と藻類の葉緑体の赤色蛍光(緑色光×540nm) を強調する。カットフィルターは、容易に脱着が可能であるため、観察者(研究者)が撮影したい帯域に併せて変更ができる。

多波長励起式蛍光撮影装置は、観察者が潜水調査で使用できて、かつ小型 ROV に搭載しての観察も可能にするための、各種ユニットは、小型 ROV (BlueROV2) 用のステイ (BlueROV2 Payload Skid) を用いて開発した(図3)。撮影装置の下部には、昼間における蛍光撮影を可能するため、カメラユニットと励起光ユニットを覆うように遮光フレームを取付けた。

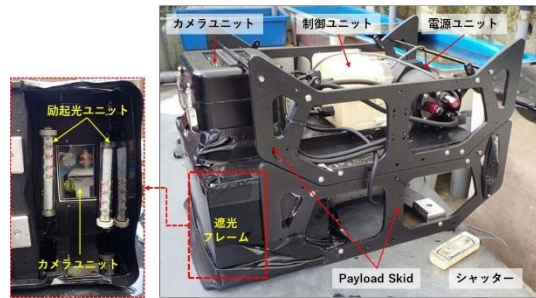


図3 多波長励起式蛍光撮影装置

(2) 多波長励起式蛍光撮影装置を搭載した小型 ROV 開発

小型 ROV は、Blue Robotics 製の BlueROV2 を用い、多波長励起式蛍光撮影装置が搭載できるように改良・改造を加えつつ製作・開発を行った。多波長励起式蛍光撮影装置を搭載した小型 ROV による性能評価試験は、鍋田湾(静岡県下田市)の棧橋および砂浜、登野城港岸壁(沖縄県石垣市) 城ヶ島岸壁(神奈川県三浦市)等で行った(図4)。沖縄県石垣市登野城港における撮影試験は、2022 年日本サンゴ礁学会第 25 回大会において、主宰した自由集会「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 - VII」の一環として他研究機関や民間企業の方々と交えて実施した。



図4 多波長励起式蛍光撮影装置を搭載した小型 ROV による性能評価試験
(a): 鍋田湾砂浜、(b): 鍋田湾防波堤、(c): 登野城漁港、(d): 城ヶ島における消波ブロック護岸

(3) 装置を用いた現場撮影試験

開発した多波長励起式蛍光撮影装置を用いて、海洋生物の多波長励起による蛍光撮影試験を筑波大学下田臨海実験センターの屋外水槽で実施した(図5)。屋外水槽で飼育されている固着性生物を対象に 4 種の蛍光画像を取得し本装置の性能確認を行った。併せて、小型分光器(JAZ, Ocean Optics Inc.)を用いて蛍光スペクトルの



図5 多波長励起式蛍光撮影装置による蛍光撮影試験
(筑波大学下田臨海実験センター)

計測を行った。また、多波長励起式蛍光撮影装置を用いた実海域（鍋田湾）における潜水調査試験、および磯周辺における徒歩による撮影試験も実施した。

4. 研究成果

(1) 多波長励起式蛍光撮影装置を搭載した小型 ROV の性能評価試験

鍋田湾における観測定点と船着き場付近で得られた蛍光画像を図 6 に示した。画像は左から、白色光 × 390nm, 青色光 × 480nm, 緑色光 × 540nm、赤色光 × 620nm (励起光 × カットフィルター) の 4 種である。両地点共に、青色光の画像において藻類の赤色蛍光が撮影出来た。また、緑色光においても僅かに赤色系の蛍光が見られた。これらの蛍光を発する物質の特定は、引き続き研究協力者と検討する。

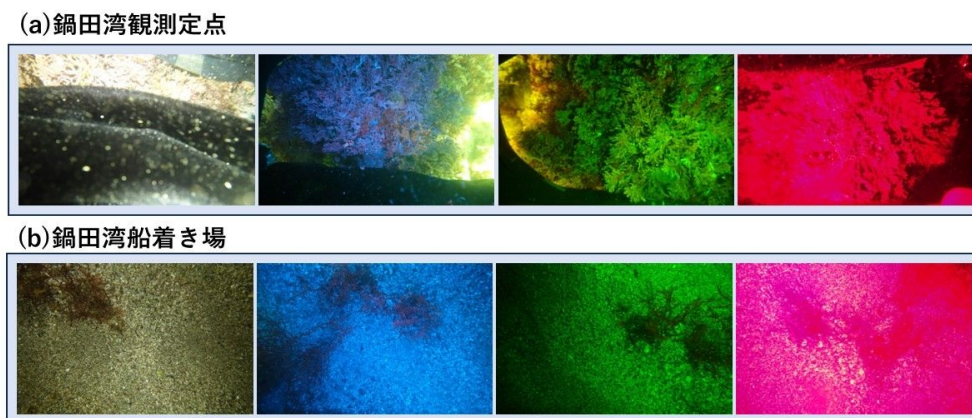


図 6 多波長励起式蛍光撮影装置を搭載した小型 ROV により得られた 4 種の蛍光画像
(a) : 鍋田湾観測定点、(b) : 鍋田湾船着き場



図 7 登野城漁港（沖縄県石垣市）における多波長励起式蛍光撮影装置を搭載した小型 ROV による蛍光撮影試験

登野城漁港において、多波長励起式蛍光撮影装置を搭載した小型 ROV で得られた蛍光画像を図 7 に示した。Micro-SD カードの不具合により、赤色光 × 620nm の画像は得られなかった。青色光の画像においてサンゴの緑色蛍光(サンゴが持つ GPP: 緑色

光タンパク質)が撮影出来た。また、緑色光において、藻類の赤色系の蛍光と見られる画像を得ることができた。城ヶ島の消波ブロック護岸において、同様の海底観察試験を行った結果を図 8 に示した。青色光の画像において藻類の赤色蛍光が、また、緑色光においては、藻類に赤色系の弱い蛍光が見られた。

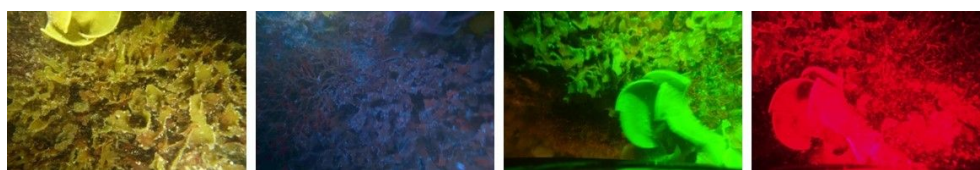


図 8 城ヶ島の消波ブロック護岸における小型 ROV による蛍光撮影試験

開発した多波長励起式蛍光撮影装置を搭載した小型 ROV の遮光フレームが撮影と航走に大きな影響を与えることが分かった。鍋田湾観測定点の画像（図 6(a)）には、遮光フレームが映り込んでしまっていた。そこで、遮光性および航走性を加味し、アクリル板で光フレームを製作し取付け問題点を解消した。さらに、小型 ROV の後部スラスタを ROV 本体の外側に取付けることで推進力の強化を図った。一方で、撮影対象物を追尾するカメラを別系統で搭載する必要があることが判明し課題として残された。

(2) 多波長励起式蛍光撮影装置による蛍光撮影試験

実験センター内の屋外水槽における多波長励起式蛍光撮影装置による蛍光撮影試験結果のとりまとめの一例(ミダレカメノコキクメイシの場合)を図 9 に示した。図 9 上段の 4 種の蛍光画像を見ると、カメラの位置関係により各蛍光画像の画角が若干ずれるが、概ね良好に蛍光画像が取得できることが分かった。また、図 9 下段は対象とする生物が発する蛍光スペクトル強度の変化を示す。この図から、蛍光画像処理解析を行う際の基礎データなる各生物が発する蛍光スペクトル強度を求めた。対象とした生物とそれらが発する蛍光スペクトル強度を表 1 にまとめた。サンゴ類は、概ね 490 ~ 520 程度の蛍光スペクトルを発していることが分かった。これらは、サン

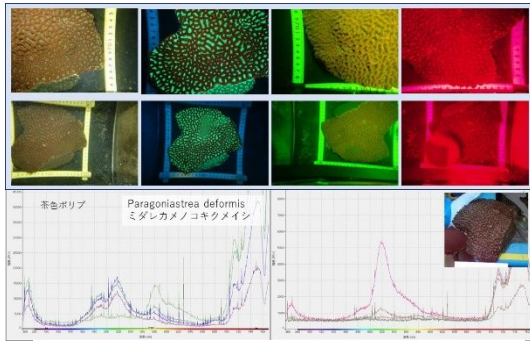


図 9 多波長励起式蛍光撮影装置による蛍光撮影試験結果のとりまとめ
 上段：蛍光画像
 下段：蛍光スペクトル強度

表 1 多波長励起式蛍光撮影装置による蛍光撮影対象生物と蛍光スペクトル

和名	撮影対象生物	学名	計測部位	小型分光器による蛍光スペクトルのピーク波長 (nm)
アミメサンゴ	<i>Psammocora profundacella</i>		ポリブ	508 570 605 -- --
ミダレカメノコキクメイシ	<i>Paragoniastrea deformis</i>		ポリブ内側(緑色部)	510 520 580 605 --
			ポリブ外側(茶色部)	490 518 580 -- --
ミダレカメノコキクメイシ	<i>Paragoniastrea deformis</i>		小個体	490 518 580 605 --
ミダレノウサンゴ	<i>Platygyra concorta</i>		ポリブ	450 580 605 -- --
キクメイシ	<i>Dipsastraea speciosa</i>		中個体	490 517 580 -- --
			ポリブ内側	490 525 575 610 --
キクメイシ	<i>Dipsastraea speciosa</i>		ポリブ外側	490 525 575 608 --
エンタクミドリイシ	<i>Acropora solitaryensis</i>		小個体	490 525 575 -- --
			サンゴポリブ	490 525 575 605 --
エンタクミドリイシ	<i>Acropora solitaryensis</i>		サンゴ茶色部	530 575 608 710 --
			サンゴ白色部	490 525 570 610 --
			ポリブ中央	490 520 580 -- --
キッカサンゴ	<i>Echinophyllia aspera</i>		ポリブ外側	490 522 572 605 --
フタマタハマサンゴ	<i>Poites heronensis</i>		ポリブ	460 500 680 -- --
ルリサンゴの一種	<i>Leptastrea sp.</i>		サンゴ中央部	520 575 605 -- --
トゲイボサンゴ	<i>Hydnophora exesa</i>		緑色部	490 570 680 -- --
ヒメエダミドリイシ	<i>Acropora pruinosa</i>		ポリブ	520 572 605 -- --
アオサの仲間	<i>Ulva sp.</i>		表面	535 560 603 -- --
ミル(産藻)の一種	<i>Codium sp.</i>		表面	530 570 607 -- --
ウミウチワ	<i>Padina arborescens</i>		表面	460 495 530 573 608
ガンガゼ	<i>Diadema setosum</i>		表面	458 -- -- -- --

ゴ類が保有する蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) を示すものである。海洋生物の多波長励起による蛍光画像とスペクトルデータの収集は、継続して実施する予定である。

(3) 多波長蛍光画像の解析手法の基盤設計の検討

本研究では、得られた多波長励起による蛍光画像の解析処理について、誰もが利用できる手法を構築したいため、フリーソフトの Image-J を用いた基本的な設計を検討した。

まず、「画像の読み込みと前処理」(図 16) として、得られた蛍光画像を読み込み、RGB 形式で保存されている画像をそれぞれのチャンネル (R,G,B) に分離する。次に、ノイズ除去のためのフィルタリングを行う (平滑化やメディアンフィルタなどの機能を利用)。その後「画像の閾値処理」として、「閾値...」機能を用いて適切な閾値を設定し、蛍光部分と非蛍光部分を分離する。次に閾値処理により蛍光部分を分離したら、「蛍光強度の計測」として「測定...」機能を用いて蛍光強度を計測し、各ピクセルの蛍光強度 (画素値) を求める。さらに、「データの解析と可視化」を行うために、得られた蛍光強度のデータを CSV 形式で保存し、平均値と標準偏差の算出や検定といった統計的な解析処理を行う。その結果を基に、蛍光強度のばらつきを評価し、ヒストグラム等のグラフを用いて、蛍光画像データを数値的に理解できるようにする。ここまでが、蛍光画像の基本的な前処理段階として検討された。

次に、蛍光強度から対象生物の種別や健康度を推定するためには、まず、各生物種が発する蛍光の特性を調査する必要がある。これには、小型分光器による蛍光強度の計測値や、既存文献から得られる蛍光強度の計測値等により収集する必要がある。各生物種が発する蛍光の波長や強度が異なる場合、これらの特性を利用して生物種を識別することが可能になると考えられる。次に、生物の健康度と蛍光強度との関連性については、蛍光強度が健康状態に影響を与える指標になり得るかの検討が必要である。このために、同一の生物種において、健康な個体とそうでない個体の蛍光強度を比較する必要がある。これについては、文献調査や本研究で実施した蛍光撮影試験と蛍光スペクトル計測の時期を変えて年

間に複数回実施する等の更なる措置が必要だと考えられる。ゆえに、以上の解析手法を基に、対象生物の種別や健康度の評価を適切に行うことが出来れば、生物学的研究や環境モニタリングでの重要なツールになり得るばかりではなく、環境影響評価のための重要な技術 (環境影響評価パッケージの1つ) になることが期待される。

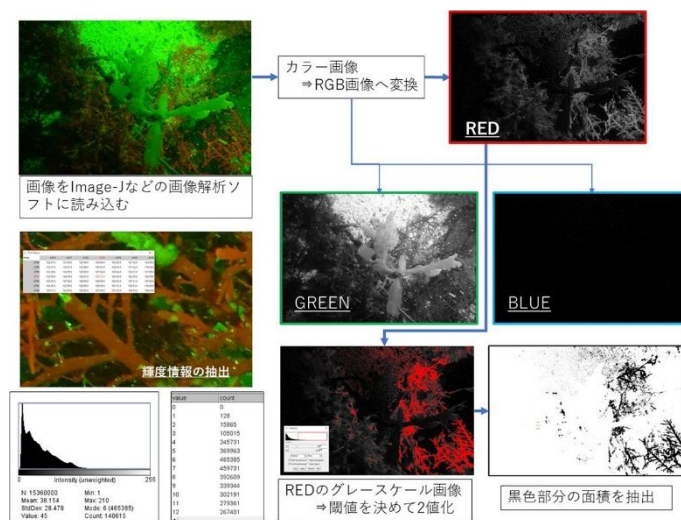


図 10 多波長励起式蛍光撮影装置で得られた蛍光画像の前処理の検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noguchi Yukiyasu, Sakamaki Takashi, Ito Shohei, Humblet Marc, Furushima Yasuo, Maki Toshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Wide area seafloor imaging by a low-cost AUV	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Global Oceans 2020: Singapore - U.S. Gulf Coast. IEEE, 2020.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/IEEECONF38699.2020.9388993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古島 靖夫, 鈴木 貞男, Sylvain Agostini, 和田 茂樹, 山下 洋, 山北 剛久
2. 発表標題 多波長励起蛍光撮影装置を搭載した簡便・安価な小型ROVの開発
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古島 靖夫
2. 発表標題 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 - I
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会 自由集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noguch Y. T. Sakamaki S. Ito M. Humblet Y. Furushima T. Maki
2. 発表標題 Wide area seafloor imaging by a low-cost AUV
3. 学会等名 Global OCEANS 2020: Singapore-U.S. Gulf Coast (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------