Environment Research and Technology Development Fund Final Research Report

環境研究総合推進費　終了研究成果報告書

公募区分：	環境問題対応型研究（一般課題）
研究予定期間：	令和3（2021）年度　～　令和5（2023）年度
課題番号：	【4-2103】
体系的番号：	（ＪＰＭＥＥＲＦ２０２１４００３）
研究課題：	「高度画像解析技術を用いたプランクトンモニタリング手法に基づく湖沼生態系監視技術の開発」
Research Title：	Development of a High-Resolution Image Analysis System for Monitoring and Forecasting Plankton Dynamics in Lake Ecosystems
研究代表者：	占部城太郎
研究代表機関：	国立大学法人東北大学
研究分担機関：	独立行政法人国立科学博物館
研究協力機関：	滋賀県琵琶湖科学研究センター
研究領域：	自然共生領域
キーワード：	湖沼、プランクトン、画像解析、DNA、生態系モニタリング

令和６（2024）年５月

目次

環境研究総合推進費　終了研究成果報告書 1
I. 成果の概要 4
１．　はじめに（研究背景等） 7
２．　研究開発目的 7
３．　研究目標 7
４．　研究開発内容 9
５．　研究成果 10
５－１．　成果の概要 10
５－２．　研究目標の達成状況 11
５－３．　研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献 14
６．　研究成果の発表状況の概要 16
６－１．　成果の件数 16
６－２．　主な査読付き論文等の主要な成果 16
７．　国際共同研究等の状況 17
８．　研究者略歴 17
II.　成果の詳細 19
II－１　サブテーマ１「プランクトンのDNA・画像データによる群集解析と画像解析システムの精度分析」 ..... エラー! ブックマークが定義されていません。
［サブテーマ１要旨］ 19
１．　サブテーマ１研究開発目的 19
２．　サブテーマ１研究目標 19
３．　サブテーマ１研究開発内容 20
４．　サブテーマ１結果及び考察 22
５．　サブテーマ１研究目標の達成状況 27
II－２　サブテーマ２「植物プランクトンのDNA・画像情報と形質データを付与したデータベースの構築」 28
［サブテーマ２要旨］ 28
１．　サブテーマ２研究開発目的 28
２．　サブテーマ２研究目標 28
３．　サブテーマ１研究開発内容 29
４．　サブテーマ１結果及び考察 31
５．　サブテーマ１研究目標の達成状況 39
II－３　サブテーマ３「高度画像解析手法によるプランクトン自動判別・計数システムの構築」 40
［サブテーマ３要旨］ 40
１．　サブテーマ３研究開発目的 40
２．　サブテーマ３研究目標 40
３．　サブテーマ３研究開発内容 40
４．　サブテーマ３結果及び考察 47
５．　サブテーマ３研究目標の達成状況 51
II－４　サブテーマ４「「プランクトン群集短期予報のための群集要素抽出と時系列解析による実証」」 52
［サブテーマ４要旨］ 52
１．　サブテーマ４研究開発目的 52

２．　サブテーマ４研究目標 52
３．　サブテーマ４研究開発内容 52
４．　サブテーマ４結果及び考察 53
５．　サブテーマ１研究目標の達成状況 64
III. 研究成果の発表状況の詳細 65
（１）　成果の件数 65
（２）　誌上発表 65
（３）　口頭発表 66
（４）　知的財産権 68
（５）　「国民との科学・技術対話」の実施 69
（６）　マスメディア等への公表・報道等 69
（７）　研究成果による受賞 69
（８）　その他の成果発表 69
Abstract 71

別紙　公募審査・中間評価結果への対応

Ⅰ．成果の概要

＜課題情報＞

公　募　区　分　：	環境問題対応型研究（一般課題）
研究実施期間：	令和３（2021）年度　～　令和　５（2023）年度
課　題　番　号　：	【4-2103】
研　究　課　題　：	「高度画像解析技術を用いたプランクトンモニタリング手法に基づく湖沼生態系監視技術の開発」
研究代表者：	占部城太郎（東北大学、教授）
重点課題（主）：	【重点課題⑭】生態系サービスの持続的な利用やシステム解明に関する研究・技術開発
重点課題（副）：	【重点課題④】環境問題の解決に資する新たな技術シーズの発掘・活用
行政要請研究テーマ（行政ニーズ）：	非該当 行政推薦課題：担当課室　水・大気環境局 水環境課
研　究　領　域　：	自然共生領域

＜キーワード＞

湖沼
プランクトン
画像解析
DNA
生態系モニタリング

＜研究体制＞

サブテーマ１「プランクトンのDNA・画像データによる群集解析と画像解析システムの精度分析」

＜サブテーマ１リーダー及び研究分担者＞

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
東北大学	大学院生命科学研究科	教授	占部　城太郎	2021年度～2023年度
東北大学	大学院生命科学研究科	助教	牧野　渡	2021年度～2023年度
東北大学	大学院生命科学研究科	助教(研究特任)	大竹　裕里恵	2022年度～2023年度

＜サブテーマ１研究協力者＞

機関名	部署名	役職名	氏名
東北大学	大学院生命科学研究科	技術補佐員	大槻　朝（2021年度～2023年度）
東北大学	大学院生命科学研究科	博士課程学生（後期）	市毛　崚太郎（2021年度～2023年度）
東北大学	大学院生命科学研究科	学術研究員	一瀬　諭（2021年度～2023年度）
滋賀県琵琶湖科学研究センター	環境監視部門	研究員	池田　将平（2021年度～2022年度）

サブテーマ２「植物プランクトンのDNA・画像情報と形質データを付与したデータベースの構築」

＜サブテーマ２リーダー及び研究分担者＞

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
国立科学博物館	植物研究部	研究主幹	辻　彰洋	2021年度～2023年度

＜サブテーマ２研究協力者＞

機関名	部署名	役職名	氏名
国立科学博物館	植物研究部	研究協力者	新山　優子

サブテーマ３「高度画像解析手法によるプランクトン自動判別・計数システムの構築」

＜サブテーマ３リーダー及び研究分担者＞

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
東北大学	大学院情報科学研究科	准教授	伊藤　康一	2021年度～2023年度
東北大学	大学院情報科学研究科	教授	青木　孝文	2021年度～2023年度

＜サブテーマ３研究協力者＞

機関名	部署名	役職名	氏名
東北大学	大学院情報科学研究科	博士課程学生（後期）	三浦　幹太
東北大学	大学院情報科学研究科	博士課程学生（前期）	吉田　凌太郎
東北大学	大学院情報科学研究科	博士課程学生（前期）	早川　慶信

サブテーマ４「プランクトン群集短期予報のための群集要素抽出と時系列解析による実証」

＜サブテーマ４リーダー及び研究分担者＞

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
東北大学	大学院生命科学研究科	教授	近藤 倫生	2021年度～2023年度
東北大学	大学院生命科学研究科	助教	川津 一隆	2021年度～2023年度
東北大学	大学院生命科学研究科	助教	岩崎 藍子	2021年度～2023年度

＜サブテーマ４研究協力者＞

機関名	部署名	役職名	氏名
東北大学	大学院生命科学研究科	助教（研究特任）	篠原 直登（2021年度～2023年度）
東北大学	大学院生命科学研究科	博士課程学生（後期）	楊 岱霖（2021年度～2023年度）
東北大学	大学院生命科学研究科	博士課程学生（後期）	岩下 源（2021年度～2023年度）
東北大学	大学院生命科学研究科	博士課程学生（後期）	行平 大樹（2021年度～2023年度）

＜研究経費（間接経費を含む）＞

年度	直接経費	間接経費	経費合計
2021	27,748千円	8,223千円	35,972千円
2022	27,727千円	8,221千円	35,949千円
2023	27,634千円	8,290千円	35,925千円
合計	83,110千円	24,735千円	107,846千円

１．　はじめに（研究背景等）

プランクトンは水圏の低次生産と魚類など高次生産を繋ぐとともに水質を決定づけるなど、水圏生態系サービスの根幹を担う生物群である。このため、指定湖沼やダム湖では、その生態系監視のため定期的な調査が行われている。水圏の生態系劣化は、プランクトンの過剰繁殖や侵略的外来種の増加による生物多様性の減少など、直接・間接的な人間活動に由来する。プランクトンの過剰繁殖はリン・窒素の外部負荷が主因であり、富栄養化が進行すると内部負荷による正のフィードバックにより、集水域からの栄養塩負荷を減らしても、十分な水質改善は望めない場合も多い。また、近年の温暖化によりプランクトンの活動が活発化し、有害プランクトンの出現や異常繁殖などの大きな変化も懸念されている。さらに、諸外国との交易が盛んな中で、外来種の侵入は予測不能であり、今後ますます増加することが指摘されている。このような状況で、湖沼の生態系サービスを効果的に利用して行くためは、富栄養化の緩和策（栄養塩負荷など原因の除去）だけでなく、適応策も必要である。例えば、数週間先のプランクトン動態が予測できれば、浄水場などの濾過準備による事前防除など、予測事象に対する適応的な対策が可能になる。またプランクトン群集の時系列データが整備されていれば、逐次観察によるアノマリー（anomaly）を迅速に検出来、例えば新たな外来種の脅威をいち早く察知し適応的な対策を講じることも可能となる。近年、高頻度の時系列データがあれば、Empirical Dynamic Modeling（EDM）など新たなデータ解析手法で複雑な生物群集の挙動についての短期予測が可能になることが示されている。しかし、プランクトンモニタリングは従事者の生物知識に依存するなどデータ精度に課題があり、予算や人材育成に限界があるため、温暖化などによる生態系変化の迅速な察知の必要性が高まっているにも関わらず、監視事業が立ち行かなくなりつつある。

２．　研究開発目的

本研究は、湖沼生態系や水質の監視に必要なプランクトンモニタリングに関わる人材不足や調査頻度等の問題を解決するため、高度画像解析技術による革新的なプランクトン自動判別・計数システムを開発して高頻度調査を可能にし、その時系列データから水質や生態系変化を迅速に察知できる革新的技術をパイプラインとして構築することを目的とする。

３．　研究目標

全体目標	湖沼生態系の健全性を把握するためのプランクトンモニタリング高度化実現のため、本研究では下記4つの目標を設定する。 （１）　湖沼の生態系保全や水質管理に不可欠となる動植物プランクトンデータベースを構築し、都道府県やコンサルタントが業務で行う環境モニタリングで参照できるよう公開する。 （２）　労力のかかるプランクトンの同定・計数を自動で行う高精度なプランクトン自動判別・計数システムを開発する。 （３）　画像解析とメタバーコーディング法による比較を行いプランクトン自動判別・計数システムとの補間性を提示する。 （４）　プランクトン自動判別・計数システムで可能となる高頻度時系列データを用い、プランクトン動態についての短期予測（予報）が行えるようにする。

サブテーマ１	「プランクトンのDNA・画像データによる群集解析と画像解析システムの精度分析」
サブテーマ１実施機関	東北大学大学院生命科学研究科
サブテーマ１目標	（１）　琵琶湖及び各地のダム湖から採集した動物プランクトン試料を用い、サブテーマ３で構築するプランクトン自動判別･計数システム開発に必要な教師データを作成・蓄積する。 （２）　動物プランクトンのバーコーディングの蓄積と、メタゲノム解析による動物プランクトン群集を把握するためのプロトコルとその

	問題点を抽出する。 （３） 画像と DNA 情報（バーコード）を合わせ、かつ体サイズや食性などの生態情報（アノテーション）を付与したデータベースを構築し、公開する。 （４） 動物プランクトン群集試料を用い、プランクトン自動判別・計数システムの精度評価を行うとともに、旧来型の目視計数、メタゲノム解析と比較することで、システムの有用性や補完性を検証する。 （５） 動物プランクトンを対象とした、プランクトン自動判別・計数システムの野外実装試験を行う。

サブテーマ２	「植物プランクトンのDNA・画像情報と形質データを付与したデータベースの構築」
サブテーマ２実施機関	国立科学博物館植物研究部
サブテーマ２目標	（１） 琵琶湖及び各地のダム湖から採集した植物プランクトン試料を用い、サブテーマ３で構築するプランクトン自動判別・計数システム開発に必要な教師データを作成・蓄積する。 （２） 採集した生サンプルから培養株を採取し系統保存するとともに、DNA バーコーディングを行うとともに、カビ臭や毒性の有無を確認する。 （３） 既存保存株を含めた画像と DNA 情報（バーコード）を合わせ、細胞や群体サイズなどの生態情報（アノテーション）を付与したデータベースを構築し、公開する。 （４） 本研究の強みである多様な培養株を活用したモック群集(人為的に作成した多種からなる実験群集)を作成し、プランクトン自動判別・計数システムとメタゲノム解析との定量評価を行うことで、画像解析システム・メタゲノム解析双方の有用性・限界性、および補完性を示す。 （５） サブテーマ１とともに、プランクトン自動判別・計数システムの野外実装試験を行う。

サブテーマ３	「高度画像解析手法によるプランクトン自動判別・計数システムの構築」
サブテーマ３実施機関	東北大学大学院情報科学研究科
サブテーマ３目標	（１） サブテーマ１，２より提供される教師データを用い、光学顕微鏡画像中のプランクトンを認識・同定する自動判別手法を開発する。 （２） 光学顕微鏡を用いた動・植物プランクトン計数システムを開発する。 （３） プランクトン自動判別・計数システムを開発し、モック群集や野外で採集されたプランクトン群集を用いて評価解析を行い、実装可能なシステムを構築する。

サブテーマ４	「プランクトン群集短期予報のための群集要素抽出と時系列解析による実証」
サブテーマ４実施機関	東北大学大学院生命科学研究科
サブテーマ４目標	（１） 琵琶湖などで公開されている既存の観測データを利用し、プランクトン群集動態予測モデルを構築し、予測範囲とその精度について検証を行う。 （２） 予測モデルを一般化し、他の湖沼でも利用できるアプリケーション化する。 （３） 開発されるプランクトン自動判別・計数システムのデータを利用し

	た予測モデルを構築、短期予報の実証を行う。予測のためのパイプラインを完成する。

４．　研究開発内容

湖沼生態系の健全性を把握するためのプランクトンモニタリング高度化実現のため、動植物プランクトンの画像データベースに必要な試料と画像の集積を行った。サブテーマ１では、琵琶湖を含む日本各地の湖沼やダム湖で採集された動物プランクトン試料を用い、サブテーマ３の担当者と協議を行って画像データを取得した。具体的には、動物プランクトン「群集」画像を高精度に撮影する顕微鏡システムを構築し、そこから「１個体ずつの画像」を効率良く取得する作業工程を確立した。これによりサブテーマ３に必要な教師データも構築した。これらと並行して、無脊椎動物群集のメタバーコーディングに適用できるミトコンドリアDNA・COI領域について、画像データベースに含まれるタクサを中心に、DNAバーコードの集積を行った。この過程で、本邦動物プランクトンの系統分類の知見を集積し、各種分類群の遺伝情報と分類形質を整理した。また、画像解析を用いたモニタリングと併用することが可能な、群集を対象としたメタバーコーディング解析のための技術的基盤を構築するため、モック群集を用いた実験を行い、メタバーコーディング解析を効率良く行うための手法を検討した。

サブテーマ２においても、サブテーマ１と同様に日本各地の湖沼で採集された試料を対象に画像データと遺伝情報の集積を行った。植物プランクトンにおいては、分類や遺伝情報の集積にあたって培養系統の確立が必須となる。そこで、各地で得られた生試料から植物プランクトンを網羅的に単離し、培養株を確立し、画像データを集積するとともに、バーコード領域の遺伝子解析を行った。それら形態観察と遺伝子解析結果から各種を同定した。画像解析については、１タクサあたり多数の写真を撮影し、動物プランクトンと同様に上位／下位分類群の系統情報を含む個体識別（アノテーション）を行った。これら画像情報は、サブテーマ３の必要な教師データとして提供した。またサブテーマ１とともに、画像データはデータペーパーとしてまとめ、論文として公開するとともに、現場技術者が使えるよう公表する準備を整えた。

サブテーマ３では、画像を用いたプランクトン分類の基本手法の開発、プランクトン画像データベースの構築を計画した。まず、プランクトン画像分類に関する文献調査を行い、プランクトンの多様な種類および画像撮影時の位置姿勢の変化に対応するために、機械学習に基づいてプランクトン画像分類に適した特徴量を抽出する手法が適当であると判断した。そこで、プランクトン画像分類のベースライン手法として、画像認識の分野で有効性が実証されている畳み込みニューラルネットワーク(Convolutional Neural Network: CNN) の基本的な手法を検討した。公開画像データベースを用いてベースライン手法の精度評価を行い、問題を明らかにした。次いで、サブテーマ1とサブテーマ2と共同で、必要とする教師データについて、プランクトンの分類ラベルおよび検出枠を付与するためのアノテーション環境を構築した。具体的には、従来にない新たな手法構築のため、広くプランクトンに関する研究で利用可能なデータベースとするために、綱・目・科・属・種からなる階層的なラベルを付与することにした。これら教師データを用いてMulti-Lebel ABNというプランクトン画像分類手法の高精度化技術を確立し、プランクトン画像検出の開発とともに、自動判別計数技術を開発した。さらに、その手法を用いて、未知タクサを含むプランクトン試料を用いた実証試験を実施した。

サブテーマ４では、琵琶湖北湖における植物プランクトン群集・水質モニタリングから作成したデータセットを用い、Empirical Dynamic Modeling等の手法によりプランクトン動態の非線形時系列予測を行った。予測にあたっては複数の物理環境とプランクトンの時間遅れ変数も用い、Multiview Embeddingにより水質・プランクトン変数の予測における相対的重要性の評価や、選択された変数のパターンと水質・プランクトン変数の関係を考慮した解析を行った。また、植物プランクトン観測データの群集変動を「見える化」するために主成分分析や冗長性分析（RDA）をベースとした解析手法を開発した。さらに、群集変動予測の鍵となる生物間相互作用は、種のみならず、属・科など様々な分類レベルを想定することでも解析が可能であるかを検討するため、新たに開発した非線形時系列因果推論にもとづくアグリゲーション技術の策定し、その手法の有用性と活用の可能性を検討した。その他、多種時

系列データから群集変動を構成する確率論・決定論的プロセスを評価する手法に関する研究や、撹乱環境下の群集動態に関する解析も実施した。

５．　研究成果

５－１．　成果の概要

サブテーマ１では、動物プランクトンについて、自動種判別・計数システムを構築するための教師画像として用いる顕微鏡写真の取得、及びこれを取りまとめた画像データベースの作成を行った。主要な動物プランクトンであるカイアシ類・枝角類・ワムシ類を対象とした。日本全国のダム湖・湖沼87地点から採集された371試料を用い、40倍と100倍で画像を取得した。教師画像は88704枚（40倍：62525枚、100倍：26189枚）取得し、211タクサを網羅している（成果番号17,20-22）。これは水辺の国勢調査対象タクサの56.9%にあたる。画像データベースについて、国立科学博物館の紀要として公開準備中である。これらと平行し、無脊椎動物群集のメタバーコーディングに適用できるミトコンドリアDNA・COI領域（いわゆるFolmer領域）を対象に、上記の画像に含まれるタクサを中心としたDNAバーコードデータの集積も行った。その結果、本邦産カイアシ類の22タクサから319バーコード（ハプロタイプに相当）、同枝角類の103タクサから436バーコード、同ワムシ類の53タクサから173バーコードを得た。これにより、本邦の動物プランクトンで、生物量として卓越する重要なタクサのDNAバーコードライブラリーが整備できた（成果番号1-4、23-25）。また、カイアシ類と枝角類のうち、分類に疑念があるタクサについては、DNAバーコーディングデータを踏まえて分類の再検討を行った（成果番号1-4、23-25）。さらにメタバーコーディング解析の技術的基盤を構築するため、組成既知のプランクトン群集（モック群集）を作成してテストランを行ったところ、プライマーや対象とする遺伝子座、さらには各タクサの存在比によって検出出来るタクサとその効率が変わることが判明した。つまり複数の遺伝子座を利用することで動物プランクトンのメタバーコーディング解析も可能となることが分かった。プロジェクトで得られた教師画像はサブテーマ３に提供し、サブテーマ３が開発したプランクトンの画像判別技術の実証実験を行った（サブテーマ目標5）。教師画像にあるタクサはほぼ100%の高い精度で判別出来、未知種であっても下位分類群であれば高い信頼性をもって判別出来ることが分かった(成果番号20-22,34-37)。

サブテーマ２では、シアノバクテリアで210株、珪藻で166株、緑藻で46株、合計422株の分離株を作成し、それらの株と固定標本を用いて60分類群について、教師データ作成を行った。植物プランクトンの目レベルでの達成率は40-100％、科レベルでは47-55％、チェックリストの浮遊種では35-54％である。特に優占種レベルではダム湖で優占する分類群を優先的に作成したため、その多くを網羅出来ていると考えている。437株・試料について培養株あるいは1群体を用いた全ゲノム増殖法によるゲノムを得た。そのうち、約300株について、遺伝子解析に成功し、バーコード配列を得た。カビ臭産生種については、産生遺伝子の解析を行い、それらが明瞭なクレードの分かれることを明らかにした。また、プランクトンとして優占するが分類学上の疑義がある種について検討を行い、その実体を明らかにした。

サブテーマ３では、サブテーマ１とサブテーマ２と協力して動物プランクトンデータベースおよび植物プランクトンデータベースの構築を行うための環境整備およびデータベースの仕様策定を行った。構築されたデータベースのうち、動物プランクトンデータベースを用いて、プランクトン群集画像からプランクトンを検出する自動計数の手法およびプランクトン画像を分類する自動判別の手法を検討した．とプランクトンが分類階級に基づいて命名されていること利用し、階層的にプランクトン画像を分類するMulti-Label Attention Branch Network (ML-ABN)と呼ぶプランクトン画像の分類に特化した手法を提案した。これは、本プロジェクトにおける顕著な成果の1つである。構築したデータセットを用いて実証実験を行ったところ、従来手法よりも高い正解率と精度が得られた。さらに、教師データにない種を含む群集テストでも科レベルでは80%の正解率がえられ、プランクトン群集画像からプランクトンの自動計数および判別を行う信頼性の高いコアとなるAI手法を開発することができた。

サブテーマ４では、まず琵琶湖北湖で実施された生態・環境変数の長期観測データを利用して、非

線形予測（Multiview Embedding）の性能を検証した。その結果、水質や他のプランクトン種の変動情報を利用したモデルは短期(2週間先)だけでなく中期(6ヶ月先)の予測精度が大きく向上することがわかった(相関係数≒0.8)。特に、長期(-4ヶ月前)の他プランクトン種変動データは予測の良さを大きく向上させることがわかった。本予測モデルはRでの入力・計算・出力をブラウザ上で行えるウェブアプリケーション「Shiny」によって実装した（成果番号12-14）。データ解析の過程で、1979年から2018年にかけての植物プランクトン種数の増加は、各種の自己抑制の密度依存性の高まりに起因することを明らかにした。また、複数の生物種をまとめるアグリゲーションが予測の良さを大きく左右することを見出すと共に、最適なアグリゲーションをデータから探索的に決定する手法を開発した(成果番号40-46)。

全体を通してみた場合、それぞれ約10万枚に及ぶ動物・植物プランクトンの画像データベースが構築出来たこと、各種プランクトンの遺伝情報に基づく分類学的な整理が整ったこと、画像判別にあたって従来手法よりも高い正解率・精度を有するシステムのコアとなるML-ABNが開発出来たこと、時系列データを用いれば、プランクトンの変動予測が行える手法が開発出来た。このように、３年の研究期間で核心的な基礎技術が開発出来たことは大きな進展である。ただし、当初考えていた期間内での実証実験が間に合わず、全体を通してのパッケージ化には至らなかった。しかし、システムのコアとなる画像データベースの構築やML-ABN等の成果は実社会で活用する必要がある。そこで、環境問題対応型研究（技術実証型）に応募し、本研究の成果を活用することとした。幸いなことに、提案は採択され、サブテーマ１-３の成果をコアとする、AIによる画像判別計数システムの汎用化とパッケージ化、さらには実務業務で実装出来るシステムの開発を2024年から実施することとなった（2024年度採択課題：4G-2401）。また、時系列解析手法のパッケージ化についても、引き続き別途競争資金を得て開発する予定であり、将来的には、画像判別計数システムと合わせたプランクトンモニタリングのパイプラインを構築したと考えている。

５－２．　研究目標の達成状況

＜全体の達成状況＞・・・・・・・・・・・・・　２．目標を上回る成果をあげた

「高度画像解析技術を用いたプランクトンモニタリング手法に基づく湖沼生態系監視技術の開発」

全体目標	全体の達成状況
湖沼生態系の健全性を把握するためのプランクトンモニタリング高度化実現のため、本研究では下記4つの目標を設定する。 (1) 湖沼の生態系保全や水質管理に不可欠となる動植物プランクトンデータベースを構築し、都道府県やコンサルタントが業務で行う環境モニタリングで参照できるよう公開する。 (2) 労力のかかるプランクトンの同定・計数を自動で行う高精度なプランクトン自動判別・計数システムを開発する。 (3) 画像解析とメタバーコーディング法による比較を行いプランクトン自動判別・計数システムとの補間性を提示する。 (4)プランクトン自動判別・計数システムで可能となる高頻度時系列データを用い、プランクトン動態についての短期予測（予報）が行えるようにする。	(1)動物・植物プランクトン各々において、約10万枚に及ぶ画像を集積し、分類情報と合わせてデータベース化した。その成果は2024年度中に論文として公開し、広く一般で利用出来るようにする予定である。 (2)生物分類の階層構造を組み込んだシステムのコアとなる画像自動判別技術を開発し、従来方法よりも正解率・精度がともに高いことを実証した。 (3)動物・植物プランクトンともに多数のタクサについて遺伝情報を調べ、データベース化した。これにより群集レベルでのメタバーコーディングに必要な要件を整備した。 (4)長期プランクトンデータを利用し、非線形時系列予測モデルを構築／開発するとともに、変動の可視化や予測に際しての生物間相互作用情報の組み込みや分類群のアグリゲーション手法の有用

	性を検討した。予測モデルについては、実際の現場で利用出来るよう実装化した。 研究期間内での実証実験が十分に行えなかったことから、全体をとおしてのパッケージ化には至らなかった。しかし、画像データベースが整備され、予想以上に高い正解率を有するML-ABNや、中期予報が可能な時系列予測モデルが開発出来、継続して研究を進めることで社会実装出来る目処がたった。よって自己評価を２とした。

＜【サブテーマ１】達成状況＞・・・・・・・　２．目標を上回る成果をあげた

「プランクトンのDNA・画像データによる群集解析と画像解析システムの精度分析」

サブテーマ１目標	サブテーマ１の達成状況
(1)琵琶湖及び各地のダム湖から採集した動物プランクトン試料を用い、サブテーマ３で構築するプランクトン自動判別・計数システム開発に必要な教師データを作成・蓄積する。 (2)動物プランクトンのバーコーディングの蓄積と、メタゲノム解析による動物プランクトン群集を把握するためのプロトコルとその問題点を抽出する。 (3)画像と DNA 情報（バーコード）を合わせ、かつ体サイズや食性などの生態情報（アノテーション）を付与したデータベースを構築し、公開する。 (4)動物プランクトン群集試料を用い、プランクトン自動判別・計数システムの精度評価を行うとともに、旧来型の目視計数、メタゲノム解析と比較することで、システムの有用性や補完性を検証する。 (5)動物プランクトンを対象とした、プランクトン自動判別・計数システムの野外実装試験を行う。	(1)日本全国計87の湖沼・ダム湖から371試料を得て、211タクサの動物プランクトンの教師画像88704枚を取得した。この過程で、隠蔽種や分布拡大種等を明らかにするなど、プランクトン分類や生物地理における新知見も取得した。 (2)バーコーディングデータ（COI領域）の蓄積は達成できた。また、メタバーコーディングは「旧来型の目視計数」よりも定量性に欠けることなど、DNA情報の取り扱いについての問題点が抽出された。 (3)(1)で取得した動物プランクトン画像をデータベースに取りまとめ、令和6年度中に、現場技術者が参照出来るシステムに必要な情報をデータペーパーとして公表する予定である。 (4)(2)で問題点を抽出し、その解決策として、メタバーコーディングの際に、分類群に応じて遺伝子領域を変えることで、出現種を正確に判定できることを明らかにした。これにより、画像解析で得られるデータと比較可能なDNAデータを取得する目処がたった。 (5)目標どおりの成果をあげた：システム構築に必要な教師データを提供するとともに、教師データにないタクサを含む野外試料を用いた試験を行った。ただし、多様な試料での実証試験は、本研究期間中には出来ず、サブテーマ３と共同で、継続的に試験を行っている。 野外実装には間に合わなかったが、実証試験により画像データベースの有用性とシステム構築に貢献出来たことから、自己評価を２とした。

＜【サブテーマ２】達成状況＞・・・・・・・　３．目標どおりの成果をあげた

「植物プランクトンのDNA・画像情報と形質データを付与したデータベースの構築」

サブテーマ２目標	サブテーマ２の達成状況
(1)琵琶湖及び各地のダム湖から採集した植物プランクトン試料を用い、サブテーマ３で構築する	(1)琵琶湖及び各地湖沼から得られた試料を対象に、56分類群（122プロジェクト）について、104,711

プランクトン自動判別・計数システム開発に必要な教師データを作成・蓄積する。 (2)採集した生サンプルから培養株を採取し系統保存するとともに、DNA バーコーディングを行うとともに、カビ臭や毒性の有無を確認する。 (3)既存保存株を含めた画像と DNA 情報（バーコード）を合わせ、細胞や群体サイズなどの生態情報（アノテーション）を付与したデータベースを構築し、公開する。 (4)本研究の強みである多様な培養株を活用したモック群集（人為的に作成した多種からなる実験群集）を作成し、プランクトン自動判別・計数システムとメタゲノム解析との定量評価を行うことで、画像解析システム・メタゲノム解析双方の有用性・限界性、および補完性を示す。 (5)サブテーマ１とともに、プランクトン自動判別・計数システムの野外実装試験を行う。	の画像を取得してアノテーションを行い、教師データを蓄積した。 (2)上記39分類群を含む437株を培養し、全ゲノム増殖法によるゲノムを得た。そのうち、約300株について、遺伝子解析に成功した。カビ臭産生種については2-MIB遺伝子，geoA遺伝子についても解析を行った。 (3)完成した教師データと遺伝子データについては、サブテーマ1と同様に国立科学博物館植物研究部の紀要にデータペーパーとして令和6年度中に投稿予定である。 (4)様々な培養株や標本を混ぜ合わせた５モック群集を東北大学のシステムで撮影しアノテーションを行った。植物プランクトンについては、教師データセットやモック群集データセットは予定通り作成した。 (5)サブテーマ３でのシステム開発が間に合わなかったため、教師データおよびモック群集を使った評価は、継続して実施している。 システムの性能試験が研究期間中に間に合わなかったので、自己評価を３とした。

＜【サブテーマ３】達成状況＞・・・・・・・　２．目標を上回る成果をあげた

「高度画像解析手法によるプランクトン自動判別・計数システムの構築」

サブテーマ３目標	サブテーマ３の達成状況
(1)サブテーマ１，２より提供される教師データを用い、光学顕微鏡画像中のプランクトンを認識・同定する自動判別手法を開発する。 (2)光学顕微鏡を用いた動・植物プランクトン計数システムを開発する。 (3)プランクトン自動判別・計数システムを開発し、モック群集や野外で採集されたプランクトン群集を用いて評価解析を行い、実装可能なシステムを構築する。	(1)プランクトンの分類階級に基づいて階層的に分類するためのML-ABNという新しい手法を開発した. (2)Faster R-CNNを用いてプランクトン群集画像から正確にプランクトンの個体を検出できることを実証した. (3)新規採取地点データセットを用いた評価実験を通してML-ABNを用いたプランクトン分類の実用性を実証した

＜【サブテーマ４】達成状況＞・・・・・・・　２．目標を上回る成果をあげた

「プランクトン群集短期予報のための群集要素抽出と時系列解析による実証」

サブテーマ４目標	サブテーマ４の達成状況
(1)琵琶湖などで公開されている既存の観測データを利用し、プランクトン群集動態予測モデルを構築し、予測範囲とその精度について検証を行う。 (2)予測モデルを一般化し、他の湖沼でも利用できるアプリケーション化する。	(1)プランクトン変動予測には多種情報と環境情報を適切に組みわせることが有効で、そのベストミックスを特定できた。 (2)過去の変動をもたらした主要な環境要因の特定やプランクトン変動で自己抑制の変化が果たした役割を特定し、予測モデリングの一般化には状況依存性の考慮が不可欠であるとの視点を得た。

(3) 開発されるプランクトン自動判別・計数システムのデータを利用した予測モデルを構築、短期予報の実証を行う。予測のためのパイプラインを完成する。	(3)モデル予測の高精度化には適切なアグリゲーションが求められることを明らかにした。その上で、あらゆる生態系における予測を高度化するための最適アグリゲーションを探索的に発見するための手法を開発した。

５－３．　研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

＜得られた研究成果の学術的意義＞

サブテーマ１では、例えば既存の淡水プランクトンデータベースであるZooLake (Kyathanahally et al. 2021)の35タクサを遥かにこえる、211タクサの詳細画像を格納した画像のデータベースが構築された。これは、海洋プランクトンのデータベースと比較しても多いタクサ数である。また、各プランクトン個体の下位／上位分類群（種・属・科・目・綱）に加え、採集日時と採集地点の情報が紐づいている。したがって、この画像データベースは、本プロジェクトの自動種判別・計数システムの開発に加え、機械学習による画像解析のサンプルとして広く画像AI技術の発展に貢献が期待できる。また、画像データベース構築の過程で、ツボワムシなどの蔽種種や分布拡大している種が見つかるなど、分類学や生物地理分布における重要知見も得られた。近年、特定の短いDNA塩基配列で生物種の同定を行うDNAバーコーディングの有用性が指摘されているが、社会実装に際して必須となるライブラリーの整備・充実については立ち遅れていた。本研究では、本邦産淡水動物プランクトンのDNAバーコードライブラリー（COI領域）を構築することができ、分類が錯綜していたいくつかの動物プランクトンタクサについて、正しく種判別ができるようになった。これらの成果は、本邦の淡水環境における生物多様性を正確に把握するために将来必須となる成果である。

サブテーマ２では、シアノバクテリアで210株、珪藻で166株、緑藻で46株、合計422株の分離株を作成し、それらの株と固定標本を用いて60分類群について、教師データ作成を行った。植物プランクトンの目レベルでの達成率は40-100%、科レベルでは47-55%、チェックリストの浮遊種では35-54%である。特に優占種レベルではダム湖で優占する分類群を優先的に作成したため、その多くを網羅出来ていると考えている。437株・試料について培養株あるいは1群体を用いた全ゲノム増殖法によるゲノムを得た。そのうち、約300株について、遺伝子解析に成功し、バーコード配列を得た。カビ臭産生種については、産生遺伝子の解析を行い、それらが明瞭なクレードの分かれることを明らかにした。また、プランクトンとして優占するが分類学上の疑義がある種について検討を行い、その実体を明らかにした。

サブテーマ３では，プランクトン画像分類において、プランクトンの分類階級を用いて階層的に分類する新しい手法であるML-ABNを提案した。従来は、プランクトン画像から抽出される画像特徴量を用いただけであったが、分類階級がプランクトンの形状に従って定義されていることに着目し、画像分類で重要となる領域を分類階級に従って画像特徴量にフィードバックする機構を考案した．プランクトンに特化した分類手法、特に分類階級を利用した手法はこれまでに提案されていない．性能評価実験を通して、一般的な画像分類手法と比較してML-ABNの有効性を実証しており、プランクトン画像解析における本研究の学術的な意味は極めて大きい。

サブテーマ４では、植物プランクトンの変動予測に求められる観測やモデリングに関する先進的な知見が得られた。重要な知見として、多種プランクトン観測データの意義を明らかにしたことが挙げられる。生態学では、生物群集は他種の相互作用系として理解されてきたが、このことは特定の生物種の予測には他種の情報が活用できることを示唆している。本研究課題では、実際に他の多くのプランクトン種の観測データを考慮することで、ターゲットとなるプランクトン種の短期～中期での予測が大きく改善することが示された。さらに、種を複数アグリゲーションして新たに構成したグループを再定義することで、予測の良さを改善できる可能性が示された。従来の生態学では、生物群集はしばしば種の集合として捉えられてきたが、予測というプラクティカルな目的のもとでは、これを一旦手放して再構成することでこれを大きく改善できることを示す革新的な成果と考える。その上、本研究課題では、予測

の良さを最大化するためのアグリゲーション探索手法の提案も行うことができた。

＜行政等に既に貢献した成果＞

琵琶湖で得られた*Uroglenopsis*およびシアノバクテリアの最新の分類学的成果は、琵琶湖水系のモニタリング等において、既に活用されている。また、カビ臭産生種として有名な種*Phormidium tenue*の取り扱いに関する上水試験方法2020年版補遺が、日本水道協会により作成された。また、本研究の成果をもとに、国土交通省のダム湖の植物プランクトンモニタリングの準拠文献として使われている国立科学博物館のホームページ「ダム湖の植物プランクトン」の改訂を行い、すでにモニタリングで用いられている。また、国土交通省が所管する直轄ダムでの水辺の国勢調査（ダム湖）では、プランクトンモニタリングのデータクリーニングに本研究成果が活用されるとともに、植物プランクトンモニタリングの準拠文献として使われている国立科学博物館のホームページ「ダム湖の植物プランクトン」の改訂を行い、現場技術者にモニタリングで用いられるようになった。さらに、本プロジェクトで開発している非線形予測技術は、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターが植物プラクトン変動の短期予報する際に試験的活用が開始され、試験的ではあるが浄水場などに速報として提供する試みが行われている。

＜行政等に貢献することが見込まれる成果＞

本研究では、従来のプラクトン画像解析システムよりも精度高く、プラクトンを同定し計数するシステムが開発された。また我が国の湖沼やダム湖に特化したプランクトン画像・DNAバーコードライブラリーも構築された。これらを用いたモニタリングシステムは、琵琶湖など指定湖沼で実施されているプランクトンモニタリング事業に直接利用することが出来る。特に琵琶湖に出現するプランクトンも教師データに利用しているため、滋賀年が実施している琵琶湖での定期モニタリングに実装することが可能である。また、プランクトンの優占種として出現したシアノバクテリア・珪藻・黄金藻類のいくつかの分類類を対象に分類学的検討を行い、濾過障害やカビ臭など有害有毒藻類の可能性が高い種として報告したが、その成果は浄水場や各地ダムでの水質悪化喚起に広く活用されると期待される。

本研究で開発した生物個体群の変動予測は、植物プランクトンに限らず、生態系の最大活用や持続的な利用を推進する上で欠かせない技術であり、データベースやモニタリング体制が整えられればあらゆる生物個体群へと適用できる可能性がある。このような、個体群変動予測は水源管理だけでなく、生態系の異常検出にも利用できるだろう。特に本研究で開発されたアグリゲーションによる予測の高度化は、より小さな異常を検出する新しい技術開発につながると期待される。

本研究で開発した画像データベースやML-ABN等の成果は、2024年から実施することとなった環境問題対応型研究（技術実証型）でのAIによる画像判別計数システムの汎用化とパッケージ化、さらには実務業務で実装出来るシステムに引き継ぐことになっており、そこで得られる成果は指定湖沼やダム湖での水質管理や生態系モニタリングでも利用されると期待されている。

６．　研究成果の発表状況の概要

６－１．　成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	14
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	0
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	2
口頭発表（学会等・査読なし）：	30
知的財産権：	0
「国民との科学・技術対話」の実施：	8
マスコミ等への公表・報道等：	0
研究成果による受賞：	1
その他の成果発表：	1

６－２．　主な査読付き論文等の主要な成果

成果番号	主要な成果（10件まで）
1	Sioud, I., W. Makino, J. Urabe. (2022) Comparative phylogeography of *Cyclops vicinus* Uljanin, 1875 and *Cyclops kikuchii* Smirnov, 1932 with implications for differences in their ecological characteristics. Journal of Plankton Research, 43, 974-985. doi: 10.1093/plankt/fbab076
3	Ohtsuki,H., H.Norimatsu,T.Makino,J. Urabe. (2022) Invasions of an obligate asexual daphnid species support the nearly neutral theory. Scientific Reports. 12, 7305. doi: 10.1038/s41598-022-11218-4
2	Makino, W., H. Suzuki, Yl. Otake, S. Ban, J.Urabe. (2023) The first report of the non-indigenous *Chydorus brevilabris* Frey, 1980 (Crustacea: Cladocera) in Asian freshwaters. Limnology, 24, 151-159. doi: 10.1007/s10201-023-00719-4
4	Suzuki, H., W. Makino, S.Takahashi, J. Urabe. (2024) Assessment of toxic effects of imidacloprid on freshwater zooplankton: an experimental test for 27 species. Science of the Total Environment, 927: 172378. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.172378

9	Tuji, A., Y. Niiyama and S. Ichise. (2023) Distribution and phylogeny of *Dolichospermum hangangense* (Nostcales, Cyanobacteria) found in Japanese lakes and reservoirs. Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B 49: 83-95. Doi: 10.50826/bnmnsbot.49.3_83
8	Tuji, A. and M. Nakagawa. (2023) The filamentous colony-forming diatom *Aulacoseira pusilla* with a high mantle height/valve diameter ratio. Plankton and Benthos Research 18:225-227. doi: 10.3800/pbr.18.225
7	Tuji, A., E. Ogiso-Tanaka and H. Yamaguchi. (2024) Complete genome sequence of *Annamia dubia*, filamentous colony-making Chroococcales with the analysis of FraC gene influencing filament integrity. Journal of Genomics 12: 1-5. doi: 10.7150/jgen.87678. eCollection 2024.
11	Koichi Ito, Kanta Miura, Takafumi Aoki, Yurie Otake, Wataru Makino, and Jotaro Urabe, “Zooplankton classification using hierarchical attention branch network,” Proceedings of Asian Conference on Pattern Recognition (LNCS 14407), pp. 409--419, November 2023. doi: 10.1007/978-3-031-47637-2_31
14	Iwashita, G., A. Yamawo, M. Kondoh. (2022) Predator discrimination of prey promotes the predator- mediated coexistence of prey species. Royal Society Open Science, doi. 10.1098/rsos.220859
13	Otomo, Y., R. Masuda,Y. Osada, K. Kawatsu, M. Kondoh. (2023) Dynamics-based characterization and classification of biodiversity indicators. Ecology & Evolution, doi: 10.1002/ece3.10271

※この欄の成果番号は「Ⅲ．研究成果の発表状況の詳細」と共通です。

７．　国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

８．　研究者略歴

＜研究代表者略歴＞

代表者氏名	略歴（学歴、学位、経歴、現職、研究テーマ等）
占部城太郎	東京都立大学理学研究科単位取得退学　理学博士(1987) 千葉県立中央博物館学芸研究員、東京都立大学理学部助手、京都大学生態学研究センター助教授を経て、現在、東北大学生命科学研究科教授（R6年度名誉教授） 国土交通省河川生態委員会委員長・環境省モニタリングサイト1000陸水検討会委員長 専門は生態学・陸水学、水圏生物の群集決定機構と生態系機能を研究

＜研究分担者（サブテーマリーダー）略歴＞

分担者氏名	略歴（学歴、学位、現職、研究テーマ等）	参画期間
辻彰洋	京都大学理学研究科修了 博士（理学） 国立科学博物館植物研究部研究主幹 主に微細藻類の分類学や固有種を研究	2021年度 ～ 2023年度
伊藤　康一	東北大学大学院情報科学研究科修了 博士（情報科学） 東北大学大学院情報科学研究科助教を経て、 現在、同研究科准教授 主に，画像処理，画像認識，機械学習を基本とする研究およ	2021年度 ～ 2023年度

	びそれらを応用してバイオメトリクス，3次元復元医用画像処理などの研究に従事	
近藤倫生	京都大学理学研究科修了 博士（理学） 英国カーディフ大学、オランダNIOO博士研究員、龍谷大学講師・准教授・教授を経て、現在、東北大学大学院生命科学研究科教授 主に生態学理論、生物多様性観測手法とデータ解析を研究	2021年度 ～ 2023年度

Ⅱ． 成果の詳細

Ⅱ－１ サブテーマ１「プランクトンのDNA・画像データによる群集解析と画像解析システムの精度分析」

［サブテーマ１要旨］

高精細のプランクトン画像を迅速に取得する方法を確立するとともに、自動判別計数システムに提供する動物プランクトン画像のフォーマットを策定した。それにより、画像を蓄積し、合計88704枚（40倍：62525枚，100倍：26189枚）の動物プランクトン画像を取得した。これら画像は、211タクサをふくんでおり、水辺の国勢調査の対象タクサの56.9%にあたる。これらの画像を取りまとめた画像データベースは、国立科学博物館の紀要として公開準備中である。また、無脊椎動物群集のメタバーコーディングに適用できるミトコンドリアDNA・COI領域（いわゆるFolmer領域）について、上記の画像（教師データ）に含まれるタクサを中心に、DNAバーコードの集積を行った。本邦産カイアシ類の22タクサから319バーコード（ハプロタイプに相当）、同枝角類の103タクサから436バーコード、同ワムシ類の53タクサから173バーコードが得られた。本邦の動物プランクトンモニタリング調査で採集されるタクサのうち、生物量として卓越する重要なタクサのDNAバーコードライブラリーが整備できた。また、カイアシ類と枝角類のうち、分類に疑念があるタクサについては、DNAバーコーディングデータを踏まえて分類の再検討を行った。さらにメタバーコーディング解析の技術的基盤を構築するため、組成既知のプランクトン群集（モック群集）を作成してテストランを行ったところ、プライマーや対象とする。その他、画像データやDNAデータを活用し、本邦に出現する動物プランクトンの分類学の再検討と生物地理に関する知見が得られ、水源地での動物プランクトンモニタリングに必要な基礎情報を蓄積した。以上にようにサブテーマ１として、予想を上回る成果を得たと自己評価した。

１． サブテーマ１研究開発目的

サブテーマ１では 動物プランクトン画像情報を蓄積し、DNA情報と合わせてデータベース化する。また、サブテーマ２とともにメタバーコーディング解析手法を確立し、サブテーマ３で開発する画像解析システムの性能試験や従来法・DNA法との比較解析を行う。これにより、システム構築に貢献する。

２． サブテーマ１研究目標

サブテーマ１	プランクトンのDNA・画像データによる群集解析と画像解析システムの精度分析
サブテーマ１実施機関	東北大学大学院生命科学研究科
サブテーマ１目標	（１） 琵琶湖及び各地のダム湖から採集した動物プランクトン試料を用い、サブテーマ３で構築するプランクトン自動判別・計数システム開発に必要な教師データを作成・蓄積する。 （２） 動物プランクトンのバーコーディングの蓄積と、メタゲノム解析による動物プランクトン群集を把握するためのプロトコルとその問題点を抽出する。 （３） 画像とDNA情報（バーコード）を合わせ、かつ体サイズや食性などの生態情報（アノテーション）を付与したデータベースを構築し、公開する。 （４） 動物プランクトン群集試料を用い、プランクトン自動判別・計数システムの精度評価を行うとともに、旧来型の目視計数、メタゲノム解析と比較することで、システムの有用性や補完性を検証する。 （５） 動物プランクトンを対象とした、プランクトン自動判別・計数システムの野外実装試験を行う。

３．　サブテーマ１研究開発内容

(1)画像データベース

動物プランクトンの教師画像を取得するため、日本全国から採集された水サンプルを用い、主要な動物プランクトンであるカイアシ類・枝角類・ワムシ類を対象として画像の撮影を行った。琵琶湖・水辺の国勢調査対象のダム湖・その他の湖池沼など合計87地点（図1-1）で採集された371サンプルを用いた。インテリジェント顕微鏡BX63（エビデント）を用い、動物プランクトンの計数作業に一般的に用いられる1 mlチャンバーに水サンプルを入れ、これをXYZ方向に合成した画像を群集画像（図1-2）として取得した。観察倍率について、大型の枝角類やカイアシ類に向けた40倍に加え、小型のワムシ類に向けて100倍での画像取得を行った。40倍はチャンバー全体をＺ方向に30層合成し、100倍は1 cm^2をZ方向に60層合成した。取得した群集画像上でみられる動物プランクトンを1個体ずつ手動でマーキングし、「門・綱・目・科・属・種」の複数階級の分類情報を付与した（図1-2）。分類情報については、水辺の国勢調査に用いられている「水野寿彦・高橋永治 編（2000）日本淡水動物プランクトン検索図説をベースに、Global Biodiversity Information Facility（GBIF）に準拠した。これらの作業はComputer Vision Annotation Tool（Cvat)を用いて行った。プランクトン個体の画像を切り出し、教師画像として利用するに加え、画像データベースの作成を行った。

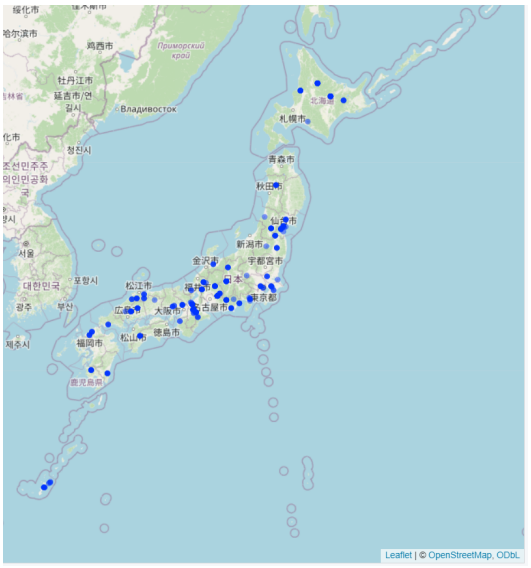


図1-1.　サンプル採集地点

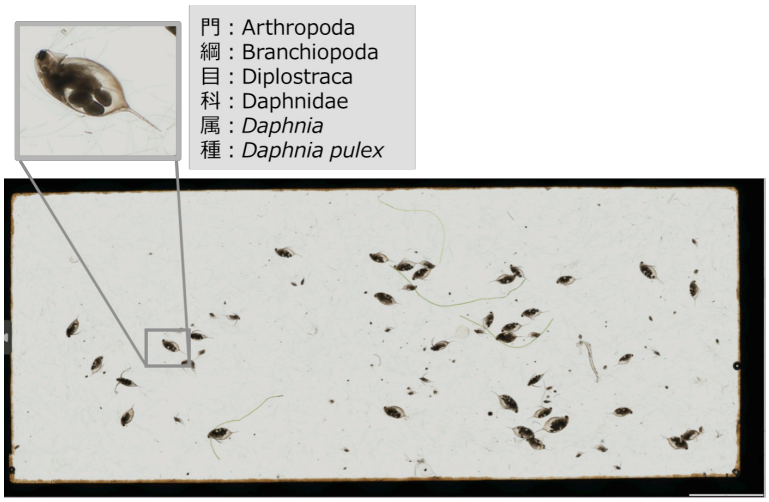


図1-2.　40倍で撮影した群集画像、及び、群集画像からのプランクトン画像の取得例

前述の群集画像の撮影条件について、検討実験の上で決定した。40倍、100倍それぞれで、撮影面積・Z方向の合成深度を変更し、撮影所要時間や画像の解像度を比較した。本研究で開発している自動種判別・計数システムを実際のプランクトンモニタリングに適用する際、各モニタリングサイトで群集画像を撮影し、これを入力データとして含まれるプランクトン種とその数を出力する形となる。そのため、実用の上で適切な撮影条件を検討した。

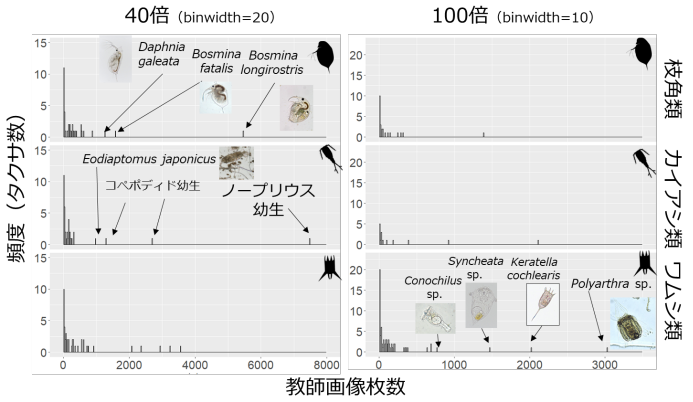


図1-3. 動物プランクトンタクサの取得教師画像数。

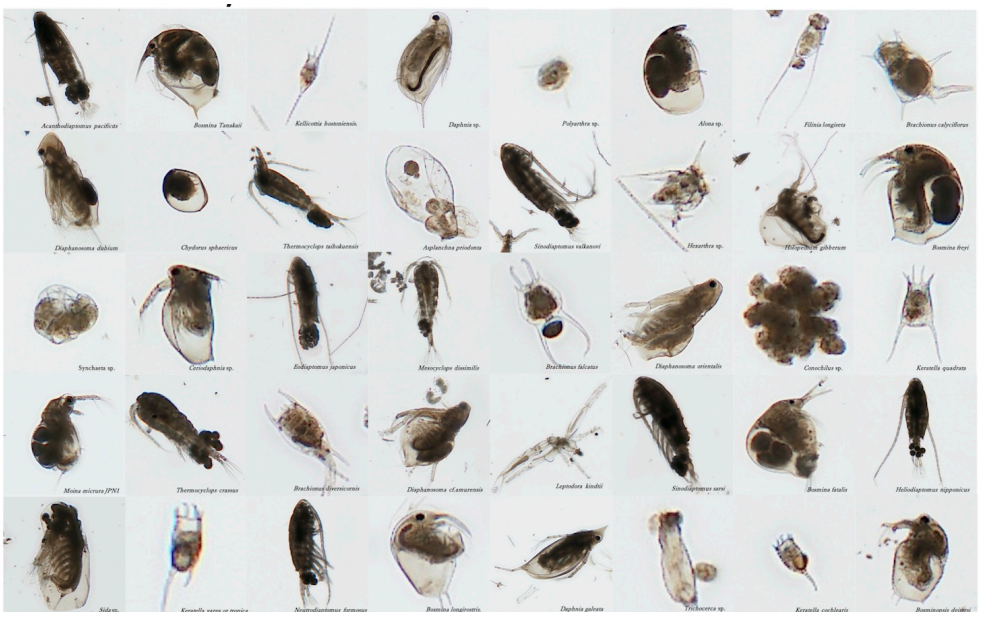


図1-4. 動物プランクトン教師データの例。ここでは40タクサについて１個体ずつの画像を示している。画像のスケールは統一されていない。

(2)DNAデータ

無脊椎動物群集のメタバーコーディングに適用できるミトコンドリアDNA・COI領域（いわゆるFolmer領域、Folmer et al., 1994）について、上記教師データに含まれるタクサを中心に、DNAバーコードの集積を行った。COI領域の塩基配列には、小さいながらも種内変異が存在すると予想されるため、1タクサあたり複数のCOIバーコードを得ることを前提とした。PCRに用いたプライマーとPCR条件はProsser et al.（2013）の通りである。次に、メタバーコーディング解析の技術的基盤を構築するため、組成既知のプランクトン群集（モック群集）を作成してテストランを行った。本邦の湖沼で頻出するプランクトン組成（カイアシ類の*Eodiaptomus japonicus*、*Cyclops vicinus*および*Thermocyclops* spp.、枝角類の*Daphnia ambigua*、*Daphnia galeata*、*Bosmina longirostris*、*Diaphanosoma dubium*からなる群集）を作成しDNAを抽出した。予備実験では、ミトコンドリアDNA・COI領域および核DNA・28SrDNA領域を増幅するプライマーセット（前者ではLeray et al.（2013）のmlCOIintfとGeller et al.（2013）のjgHCO2198、後者ではMachida and Knowlton（2012）の28s_#3と28S_#3_RC）を用いて、MiSeqによるメタバーコーディング（2x250bp）を行ったが、いずれもモック群集の組成、すなわち各種の個体数および生物量を正確に再現することができなかった。そこで予備実験で使用したDNA抽出物を別の遺伝子領域でメタバーコーディングすることを試みた。具体的には、ミトコンドリアDNA・12SrDNA領域を増幅するユニバーサルプライマーセット（フォワード側がL13337-12S、リバース側がH13845-12S、いずれもMachida et al. 2004）を使用して増幅した産物をMiSeq（2x300bp）でシーケンスした。MiSeqデータの

取得と解析では、株式会社ファスマックのターゲットアンプリコン解析を利用した。これに先立ち、モック群集構成種のDNAバーコードは、上述のプライマーセットを用いたPCR（条件は、Machida and Knowlton, 2012）の後サンガーシーケンスにて取得した。

４．　サブテーマ１結果及び考察

画像データベース

動物プランクトン画像は合計88704枚（40倍：62525枚，100倍：26189枚）取得した。211タクサの画像を取得した。これは、水辺の国勢調査の対象タクサの56.9%にあたる（成果番号17,20-22）。これらの画像を取りまとめた画像データベースは、国立科学博物館の紀要として公開予定である。

	目 (100%)	科 (100%)	属 (73.0%)	種 (60.2%)
枝角類	100% (1/1)	100% (7/8)+1	75.9% (22/29)	60.9% (39/64)+9
カイアシ類	100% (1/1)	100% (4/4)+2	86.4% (19/22)+1	58.6% (17/29)
ワムシ類	100% (3/3)	100% (17/17)+6	66.7% (40/60)	60.1% (94/153)+2

表1-1. 水辺の国勢調査対象分類群に対する画像取得率。「＋数字」は水野・高橋（2000）において未記載のもの。

カイアシ類・枝角類・ワムシ類それぞれについて、分類階級別の画像取得状況は表1-1に示した。タクサごとの取得画像数について、図1-3に示す。この図が示すように、タクサによって取得画像数に差異がある。優占が見られる種や、高頻度でみられる種については画像を十分取得できている一方で、沿岸性種や希少種については十分数の画像が取得できていないという課題が見られる。今後、教師画像およびデータベースの更なる充実を図る。

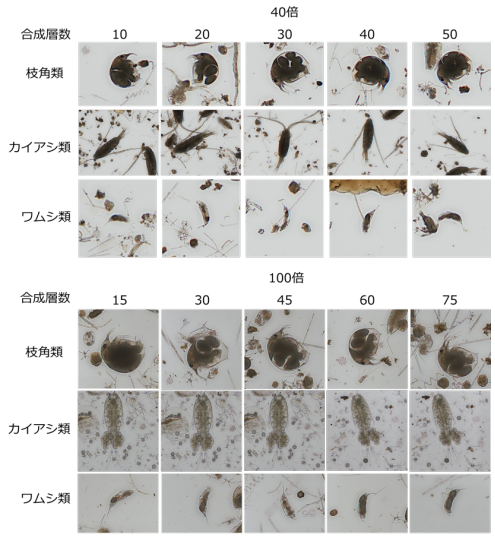


図1-5. 合成層数ごとのプランクトン画像

群集画像の撮影条件について、合成層数が少ない場合に細部の構造のつぶれが発生した。しかし、合成層数が多すぎる場合でも、中程度の合成層数よりも不鮮明になる部分が見られる場合があった（図1-5）。所用時間について、合成層数・撮影面積が大きくなるほど長くなった（図1-6）。30分程度で、多くの個体数を高解像度でとらえられる画像の撮影ができる条件として、「40倍：1 ml チャンバー全体，30層」、「100倍：1 cm2，60層」を標準条件として定めた（成果番号22）。

(2)DNAバーコード

ミトコンドリアDNA・COI領域について、本邦産カイアシ類の22タクサから319バーコード（ハプロタイプに相当）、同枝角類の103タクサから436バーコード、同ワムシ類の53タクサから173バーコードが得られた。

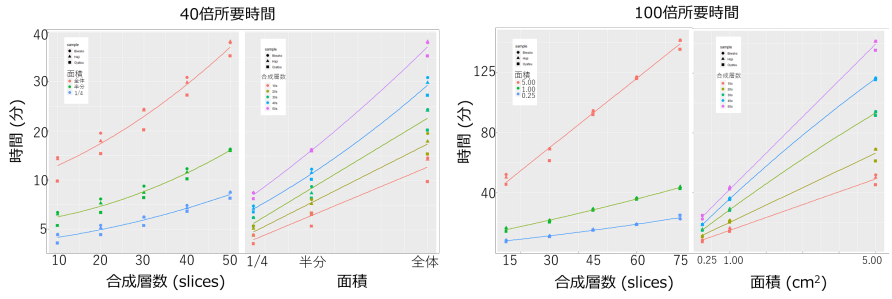


図1-6. 40倍・100倍それぞれにおける、合成層数と面積と撮影所用時間

これらのDNAバーコードは、カイアシ類と枝角類では画像解析で教師データに含めたタクサを網羅することができた（成果番

号1-4、23-25）。他方、ワムシ類では中間報告以降に教師データに含めたタクサについて、現在もDNAバーコードを取得中であるが、ワムシ類はプランクトン群集において生物量として卓越するタクサではない。従って、本邦の動物プランクトンモニタリング調査で採集されるタクサのうち、生物量として卓越する重要なタクサのDNAバーコードライブラリー（COI領域）は、本研究課題にて整備できたと言って差し支えない。

なお、主に底生性であるが、まれにプランクトンとして採集されることもあるマルミジンコ属（*Chydorus*属）についてもDNAバーコードライブラリーを整備することができた。その過程で、北米以外には分布しないはずの*Chydorus brevilabris*というマルミジンコ種（図1-7参照）が、本邦の各地に分布していることを見出した。この種では、DNAバーコードの多様性（ハプロタイプ多様性および塩基

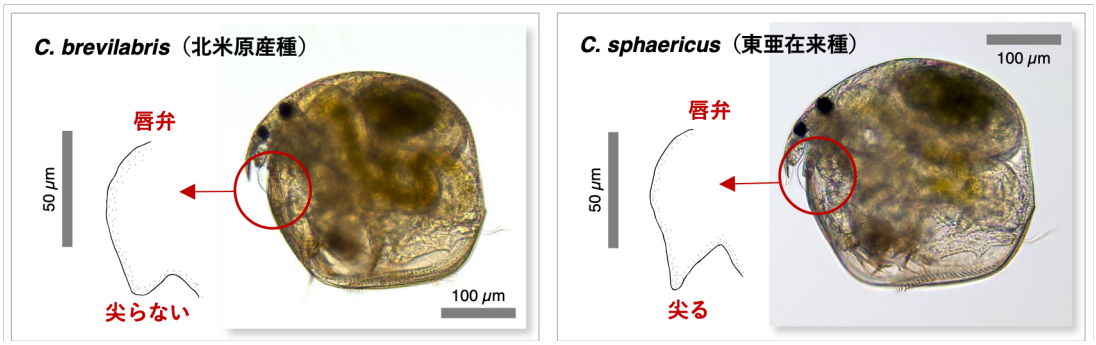


図1-7.　本邦から新たに確認された北米原産マルミジンコ種（*Chydorus brevilablis*、左）と本邦を含む東アジアの在来マルミジンコ種（広義の*Chydorus sphaericus*、右）の比較。

多様性）が、アジア在来種の近縁種・*Chydorus sphaericus*（広義）よりも著しく低かった。そして原産地の北米で取得されたハプロタイプと全く同一のハプロタイプが本邦からも取得されていた。これらの結果から、本邦の*C. brevilabris*は北米からの侵入種であることが明らかとなった（成果番号2、25）。

遺伝情報と画像情報（形態による分類）との紐付け

カイアシ類では、本邦の湖沼でプランクトンとして頻繁に出現するタクサについて、紐付けを完遂することができた。具体的には、ディアプトムス科ヒゲナガケンミジンコ類のヤマヒゲナガケンミジンコ（*Acanthodiaptomus*）属（*A. pacificus* species complex）、ヤマトヒゲナガケンミジンコ（*Eodiaptomus*）属（*E. japonicus*）、*Heliodiaptomus*属（*H. kikuchii*と*H. nipponicus*）、*Neodiaptomus*属（*N. schmackeri*）、*Neutrodiaptomus*属（*N. formosus*および*N. pachypoditus*）、および*Sinodiaptomus*属（*S. sarsi*および*S. valkanovi*）、ケンミジンコ類のケンミジンコ（*Cyclops*）属（湖沼の本属のほとんどは*C. vicinus*および*C. kikuchii*）、アサガオケンミジンコ（*Mesocyclops*）属（湖沼の本属はほとんどが*M. dissimilis*）、および*Thermocyclops*属（湖沼の本属はほとんどが*T. crassus*と*T. taihokuensis*）といったタクサである。

鰓脚亜綱でも、動物プランクトンとして高頻度で出現するタクサについて、遺伝情報と画像情報との紐付けを行うことができた。シダ科のオナガミジンコ（*Diapahanosoma*）属の5種（湖沼では、ほとんどの場合*D. dubium*、*D.* cf. *macrophthalma*、*D.* cf. *orientalis*である）とホロミジンコ（*Holopedium*）属の１種（全て*H. gibberum*）、ミジンコ科のネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia*）属の10種（後述するように、分類の再検討を行った）とミジンコ（*Daphnia*）属の15種（湖沼によく出現するのは*D. pulex*、*D. ambigua*、*D. dentifera*および*D. galeata*である）とアオムキミジンコ（*Scapholeberis*）属の１種（全て*S. smirnovi*）、ゾウミジンコ科のゾウミジンコ（*Bosmina*）属4種とニセゾウミジンコ属（*Bosminopsis*）1種（広義の*B. deitersi*）といったタクサである。

分類の検討

カイアシ類と枝角類のうち、分類に疑念があるタクサについては、DNAバーコーディング（COI領域）データを踏まえて分類の再検討を行った。

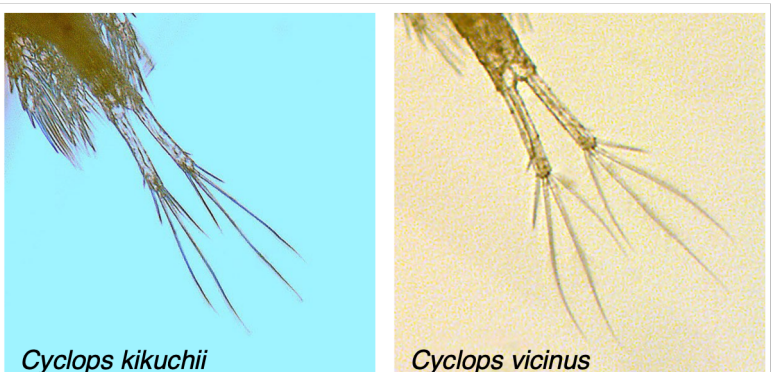


図1-8. *Cyclops kikuchii*（左）と*Cyclops vicinus*（右）では、furcaの末端刺毛の相対長が異なる。すなわち前者では後者よりも、最も内側の刺毛の、内側から２番目の刺毛に対する相対長が著しく短い。

本邦のケンミジンコ属（*Cyclops*）では、*C. vicinus*と*C. kikuchii*について、両種を独立種として認めるか否かで論争があり、未だ決着がついていなかった（ただし本邦以外では、例えばChang and Min（2005）のように、いずれも独立種として、以前から扱われていた）。現在でも本邦の多くの図鑑・図説類では後者を認めず*C. vicius*のみが掲載されているが、前者のみを認めるモノグラフ（石田 2013）もある。本研究では、多くの図鑑・図説類で*C. vicinus*とされるタクサの数多くの個体からDNAバーコードを得た（成果番号1）が、それらは塩基配列に非常に大きな変異（種内変異とみなすには無理のあるほど、大きな変異）がある、２つのバーコードグループに大別された。そして、それぞれのバーコードグループの形態を比較検討した結果、グループ間の形態の変異（特にfurcaと呼ばれる部分の末端刺毛の相対長の変異、図1-8を参照）は非連続的であることがわかった。さらに、２つのバーコードグループの形態は、*C. vicinus*あるいは*C. kikuchii*の、いずれか一方の形態的特徴（例えば、Chang and Min, 2005）とよく一致した。これらの結果から、*C. vicinus*と*C. kikuchii*は独立した種であると考える立場の方が、*C. kikuchii*を認めない立場よりも、得られたデータに対する矛盾が少ない（従って、より適切である）ことがわかった(成果番号1)。本研究の一連の画像解析では、*C. vicinus*と*C. kikuchii*は区別されていることに留意されたい。

鰓脚亜綱のうちネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia*）属は、夏季に比較的高頻度で出現するプランクトンであり、個体群サイズが一時的に著しく増加することがある。ネコゼミジンコ属では、種の分類に関して未だ議論の余地ある（例えば、Sharma and Kotov, 2013）。そこで本邦産のタクサについて、正確な種判別ができるようになることを目指した。全国各地から網羅的に採集したネコゼミジンコ個体について、その形態を詳細に調べるとともにDNAバーコードを取得し、双方のデータを比較検討した(成果番号24)。

ミトコンドリアDNA・COI領域の塩基配列から作成した分子系統樹が図1-9である。この系統樹から、本邦に存在するネコゼミジンコ属は10種であることがわかった（系統樹中では sp. 1からsp. 10と表示した）。そのうちの1種（sp. 9）は本邦の国立環境研究所（National Institute for Environmental Studies、以後NIESと表記）で維持・分譲されている、北米原産の*Ceriodaphnia dubia* NIES系統（由来については、Hiki et al., 2023）であり、この種は野外環境からは採集されなかった。ただし、このsp. 9とは形態的には不可分だが遺伝的には別種であると判断される種（sp. 5）が、主に東北地方の湖沼に分布していた。つまり*C. dubia*とされるタクサは隠蔽種の複合体（cryptic species complex）であることがわかった。また、sp. 1とsp. 10は遺伝的には別種であると判断されるが、どちらも*C. pulchella*の形態的特徴（例えば、Chiang and Du, 1979）を有していたことから、*C. pulchella*とされるタクサも隠蔽種の複合体であることがわかった。さらに、形態では*C. megops*（Chiang and Du, 1979

を参照）と判断されるべき個体の間では、DNAバーコードの塩基配列の変異が非常に大きく、全ての個

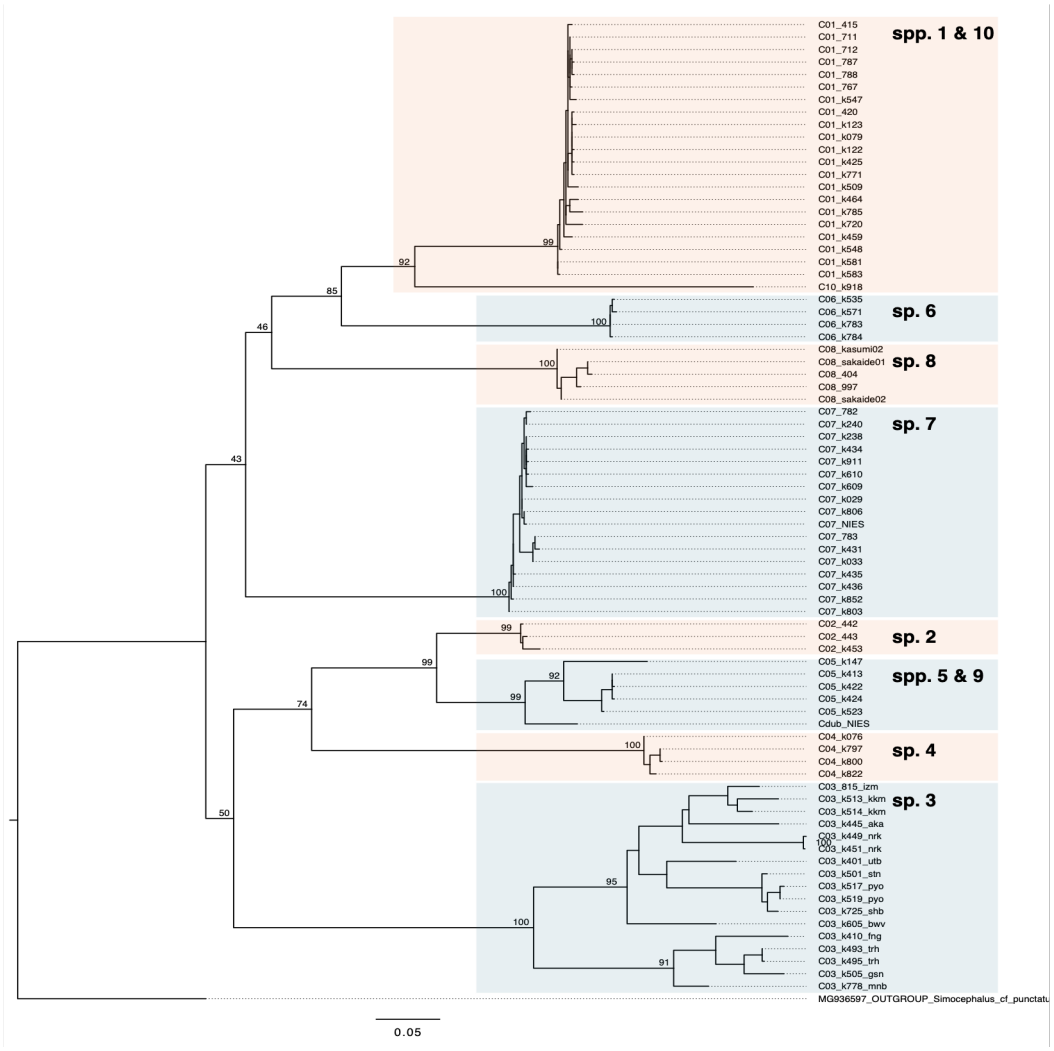


図1-9. 日本各地から網羅的に採集したネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia*）属個体について、ミトコンドリアDNA・COI領域の塩基配列に基づき、最尤法で作成した分子系統樹。主なノードについては、ブートストラップ支持率を示してある。

体が単一の種に属するとみなすことはできなかった。つまり*C. megops*とされるタクサも隠蔽種の複合体であることがわかった。

上記以外の種は（少なくとも本邦内では）遺伝的に一つの種であるとみなすことができ、系統樹中のsp. 6、sp.8、sp. 2、およびsp. 4は、その形態からそれぞれ*C. reticulata*、*C. cornuta*、*C.* cf. *lacustris*、および*C. laticaudata*であると、分類に関する詳細な文献（Chiang and Du, 1979およびSharma, 2014）に従い判断された。系統樹中のsp. 7、従来は*C. quadrangula*と判定されていた（と思われる）種であるが、形態を詳しく調べた結果、Alonso et al. (2021) が再記載した狭義の*C. quadrangula*の形態とは一致せず、むしろ*C. smirnovi*という種の形態的特徴と極めてよく一致した。このsp.7（*C.* cf. *smirnovi*と記す）は主に水田から採集された。

本研究で明らかとなった３つの隠蔽種の複合体については、異なる遺伝系統を判別し得る形態的特徴を見出すことができなかった。したがって画像解析の際には、現時点では、ネコゼミジンコ属は*C. pulchella*（分子系統樹のsp. 1とsp. 10）、*C. reticulata*（同sp. 6）、*C. cornuta*（同sp. 8）、*C.* cf. *smirnovi*（同sp. 7）、*C.* cf. *lacustris*（同sp. 2）、*C. dubia*（sp. 5とsp. 9）、*C. laticaudata*（同sp. 4）、および*C. megops*（同sp. 3）の８タクサに区別することが、分子系統を最も

よく反映した判別方法であると言える。

枝角類の1種である*Bosmina tanakai*の分布について新知見を取得した。この種は、従来は日本の青森以北のみに生息していると報告されていたが、本研究の過程で中部地方にも複数地点で生息していることを明らかにした。分子系統解析の結果、中部地方に位置する芦ノ湖で採集された*Bosmina*が、阿寒湖のパンケ湖に生息する*Bosmina tanakai*と同一のミトコンドリアCOI DNAを持つとわかった。加えて、ダム湖において、北海道に位置するダム2か所に加え、中部地方に位置するダム湖3地点からも、形態的に*B. tanakai*と同定される*Bosmina*が出現した（図1-10）。従って、*B. tanakai*が従来報告されていたより広域に分布していることを明らかにした。この成果について、国内学会2件で発表（成果番号17,19）を行い、投稿論文を準備中である。

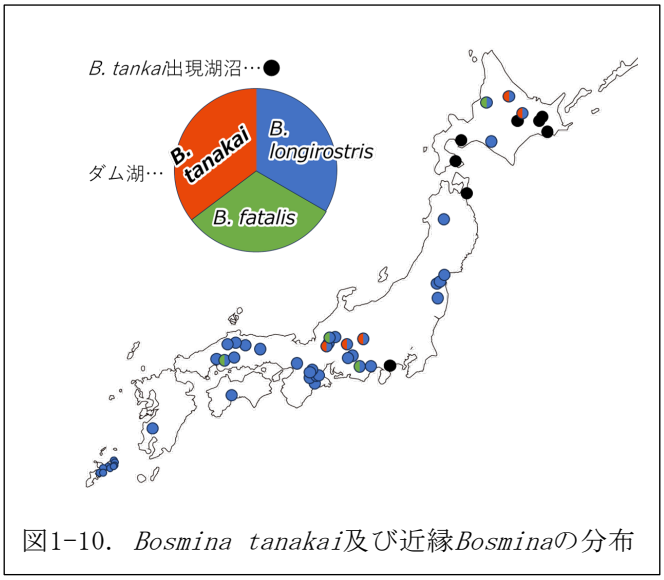


図1-10. *Bosmina tanakai*及び近縁*Bosmina*の分布

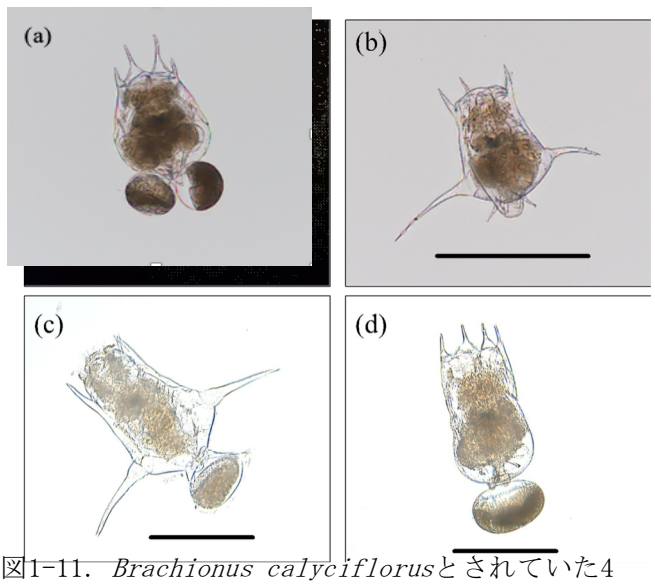


図1-11. *Brachionus calyciflorus*とされていた4種。(a)*Brachionus Dorcas*; (b) *Brachionus elevates*; (c) *Brachionus calyciflorus*; (d) *Brachionus fernandoi*

動物プランクトンの教師画像を、日本全国の湖池沼から取得する過程で、動物プランクトンの生態や分類を明らかにする研究も実施した。まず、代表的なワムシ類の1種であるツボワムシ（*Brachionus calyciflorus*）について、日本でこの種とされていた種に4種の隠蔽種が含まれていることを明らかにした（図1-11）。この4種は、遺伝的に離れているに加え、形態形質においても、全体の形態や側突起の伸長度合に違いが見られることが分かった。特に形態が他3種と異なる*Brachionus fernandoi*については、出現時期も他3種と異なっており秋-冬に出現する傾向にあるとわかった。この出現傾向から、単一湖沼における他の隠蔽種と季節的に置き換わりも見られた。この成果について、国内学会（成果番号18）において発表を行った。また、論文を作成し、Limnology誌へ投稿した。現在は改定稿の査読中である。

メタバーコーディング

モック群集から抽出したDNAのミトコンドリアDNA・12SrDNA領域を、前述したMachida et al. (2004)のユニバーサルプライマーセットでPCR増幅し、MiSeqアンプリコンシーケンスに供したところ、カイアシ類（*E. japonicus*、*C. vicinus*および*Thermocyclops* spp.）は全種類が検出できたが、枝角類（*D. ambigua*、*D. galeata*、*B. longirostris*、および*D. dubium*）については、全ての種がほとんど検出できなかった。この条件でのアンプリコンサイズは、カイアシ類では400から450bpであったのに対し、枝角類では100bp程度長い約550bpであったが、MiSeqシーケンサーでは、短いアンプリコンほど相対的によく増えると言われている。したがって今回の結果には、分類群依存的なアンプリコンサイズの長短が強く影響したと考えられた。これは換言すれば、このプライマーセットでメタバーコーディングを行え

ば、同一サンプル中の枝角類に干渉されることなく、カイアシ類の種組成を正確に調べることができるという意味でもある。

引用文献

Alonso, M., Neretina A. N., Ventura, M. 2021. *Ceriodaphnia smirnovi* (Crustacea: Cladocera), a new species from the Mediterranean Region, and a phylogenetic analysis of the commonest species. Zootaxa, 4974, 1-46

Chang, C.Y., Min, G.S. 2005. Key to the Korean freshwater cyclopoid copepods and their DNA taxonomy. Jung-haeng-Sa, Seoul, South Korea

Chiang, S, Du, N. 1979. Fauna Sinica. Crustacea. Freshwater Cladocera. Science Press, Academia Sinica. Peking, China

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3,294-299

Geller, J. B., Meyer, C. P., Parker, M., Hawk, H. 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. Molecular Ecology Resources 13, 851-856

Hiki, K., Oka, K., Nakajima, N., Watanabe, H., Yamamoto, H., Yamagishi, T. 2023. The complete mitochondrial genome of water flea *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea: Cladocera) NIES strain. Mitochondrial DNA B Resources, 8, 831-835

石田昭夫, 2013. 日本淡水ケンミジンコ図譜. 日本生物地理学会報, 57, 37-106

Leray, M., Yang, J., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J., Machida, R. J. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. Frontiers in Zoology, 10, 34

Machida, R. J., Knowlton, N. 2012. PCR primers for metazoan nuclear 18S and 28S ribosomal DNA sequences. PLoS ONE, 7, e46180

Machida, R. J., Miya, M. U., Yamamichi, M. M., Nishida, M., Nishida, S. 2004. Organization of the mitochondrial genome of Antaractic krill *Euphausia superba* (Crustacea: Malacostraca). Marine Biotechnology, 4, 406-417

水野寿彦, 高橋永治, 2000. 日本淡水動物プランクトン検索図説. 東海大学出版会

Prosser, S., Martínez-Arce, A., Eías-Guiérrez, M. 2013. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. Molecular Ecology Resources, 13, 1151-1155

Sharma, P. 2014. An investigation into Australian freshwater zooplankton with particular reference to *Ceriodaphnia* species (Cladocera: Daphniidae). Thesis (Ph. D), University of Adelaide.

Sharma, P., Kotov, A. 2013. Molecular approach to identify sibling species of the *Ceriodaphnia cornuta* complex (Cladocera: Daphniidae) from Australia with notes on the continental endemism of this group. Zootaxa, 3702, 79-89

５． サブテーマ１：研究目標の達成状況

目標（１）については、遺漏なく達成できた。目標（２）については、バーコーディングデータ（COI領域）の蓄積は達成でき、メタバーコーディングにかかる問題点の洗い出しもできた。すなわちメタバーコーディングは「旧来型の目視計数」よりも定量性に欠けることがわかった。目標（３）については、（１）で取得した動物プランクトン画像をデータベースに取りまとめ、令和6年度中に、現場技術者が参照出来るシステムに必要な情報をデータペーパーとして公表する予定である。目標（４）については、確かに「旧来型の目視計数」よりも定量性に欠けるのがメタバーコーディングだが、群集構成種の在不在については、カイアシ類と枝角類で増幅する遺伝子領域を変えることで、メタバーコーディングでも正確に判定できる見通しはついた。したがって「旧来型の目視計数」を併用することで定量性をカバーすれば良いと考えられた。目標（５）については、システム構築に必要な教師データを提供するとともに、教師データにないタクサを含む野外試料を用いた試験を行った。ただし、多様な試料での実証試験は、本研究期間中には出来ず、サブテーマ３と共同で、継続的に試験を行っている。以上のように、自動画像判別計数システムの開発に必要な画像データや動物プランクトンのモニタリングに重要な遺伝・分類学的知見を得ることができた。野外実装には間に合わなかったが、実証試験により画像データベースの有用性とシステム構築に貢献出来たことから、研究目標の達成状況についての自己評価を２とした。

Ⅱ－２　サブテーマ２「植物プランクトンのDNA・画像情報と形質データを付与したデータベースの構築」

［サブテーマ２要旨］

立体的で小型まで含む植物プランクトン画像を、効率的に取得する方法を確立すると共に、自動判別計数システムに提供する植物プランクトン画像のフォーマットを作成した。シアノバクテリア210株、珪藻166株、緑藻46株を含む420株の培養株を作成し、この培養株と固定標本を用いて7469枚の写真を撮影・登録し、104711点の個体識別（アノテーション）を行った。プロジェクト（種・倍率単位）の撮影枚数は、最低：10、平均：858、最大：16068である。目レベルでの達成率は40-100％、科レベルでは47-55％、チェックリストの浮遊種では35-54％である。全体としてはおおよそ半分程度の分類群について教師データを作成できた。特に優占種レベルでは重要種の教師データを優先的に作成したため、その多くを網羅出来ていると考えている。これらの画像を取りまとめた画像データベースは、国立科学博物館の紀要として公開準備中である。また、植物プランクトンのメタバーコーディング解析として、シアノバクテリアrbcL,珪藻rbcL、18S rRNAを対象とした解析を行い、現在までに約70％の種についてバーコード配列を得ている。分類上の疑義があるプランクトンの優占種７種について、分類の再検討を行った。その他、画像データやDNAデータを活用し、水源地での植物プランクトンモニタリングに必要な基礎情報を蓄積することが出来た。しかし、サブテーマ３でのシステム開発が間に合わなかったため、教師データおよびモック群集を使った評価は、令和６年度に継続して実施することとした。システムの性能試験が研究期間中に間に合わなかったので、自己評価を３とした。

１．　サブテーマ２研究開発目的

サブテーマ2については、植物プランクトンの機械学習システムの必要な正確な教師データを作成するとともに、汎用性のある画像データベースを構築する。分類の正確さを担保するため、クローン培養株を用いた植物プランクトンの撮影や、遺伝子解析を実施する。

２．　サブテーマ２研究目標

サブテーマ２	「植物プランクトンのDNA・画像情報と形質データを付与したデータベースの構築」
サブテーマ２実施機関	国立科学博物館植物研究部
サブテーマ２目標	（１）琵琶湖及び各地のダム湖から採集した植物プランクトン試料を用い、サブテーマ３で構築するプランクトン自動判別・計数システム開発に必要な教師データを作成・蓄積する。 （２）採集した生サンプルから培養株を採取し系統保存するとともに、DNAバーコーディングを行うとともに、カビ臭や毒性の有無を確認する。 （３）既存保存株を含めた画像とDNA情報（バーコード）を合わせ、細胞や群体サイズなどの生態情報（アノテーション）を付与したデータベースを構築し、公開する。 （４）本研究の強みである多様な培養株を活用したモック群集（人為的に作成した多種からなる実験群集）を作成し、プランクトン自動判別・計数システムとメタゲノム解析との定量評価を行うことで、画像解析システム・メタゲノム解析双方の有用性・限界性、および補完性を示す。 （５）サブテーマ１とともに、プランクトン自動判別・計数システムの野外実装試験を行う。

３．　サブテーマ２研究開発内容

撮影手法の開発

本サブテーマでは植物プランクトン画像を効率よく取得することが求められる。サブテーマ代表者の辻が管理している国土交通省の植物プランクトンモニタリングで用いられているチェックリスト（ダム湖の植物プランクトン：https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/microalgae/dam/）では、植物プランクトンモニタリングの最低限のレベルとして、「乾燥系の40倍の対物レンズ」を用いる事としている。モニタリング目的で通常用いられる乾燥系のアクロマート対物レンズの開口数は0.60-0.65であり、解像力の理論値は0.5μmであるが、この解像力はコンデンサーを完全に調整し、カバーグラスの厚みが指定値（0.17mm）で試料がカバーグラスに密接していることが条件である。そのため、実際の解像力は理論値よりはるかに劣化していることが多い。これら解像力の問題に加え、植物プランクトンは立体的であるため焦点深度が極めて重要である。分類研究では、焦点を変えながら観察し、それらを合成してスケッチすることが多いが、本プロジェクトの機械学習では一枚の写真にすべての情報を載せることが重要で、焦点深度が深いことも合わせて重要である。そこで、様々なタイプの顕微鏡とカメラの組み合わせてで撮影した結果、ZeissのPlan Neo Fluor NA 0.3の対物レンズを装着した倒立顕微鏡とキヤノンのミラーレスカメラの組み合わせが解像力・焦点深度を両立させるシステムとして安定的に好結果を示すことが分かった(図２−１)。

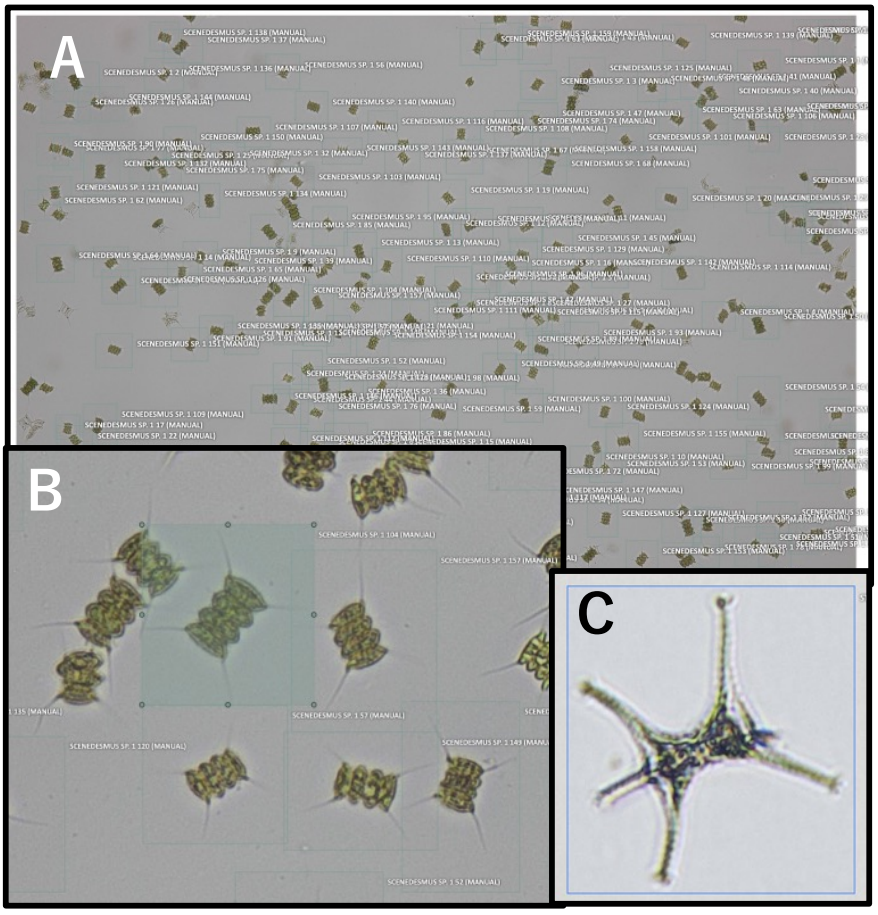


図２−１．A撮影した全景。撮影対象はイカダモ（*Scenedesmus (Desmodesmus)*属）群体長は約100μm (A)

倒立顕微鏡のためN.A.が小さく解像力は1.2μmしかないが、比較的小型の植物プランクトンである本種の内部構造や棘まで良好に撮影できている（B）、また、立体的な種類である*Staurastrum*属も焦点深度が深いため全体が撮影できている（C）。

焦点深度を増す方法として、サブテーマ1が採用しているスタッキングシステムも考えられるが、小型の植物プランクトンでは下図の様に細胞内構造や棘などが消えてしまい、同定が困難になることが分かった（図2―2）。イカダモは、植物プランクトンとしてはやや小さい種類があるが、本種が一定レベルで撮影できることから、この対物レンズ10倍での撮影をサブグループ２の植物プランクトン撮影の基準とした。実際には、さらに小さな植物プランクトンも多数存在するため、必要に応じて10倍の対物レンズに加え、20倍、40倍の対物レンズでの撮影を追加した。

図2−２　正立顕微鏡（対物１０倍）でスタッキングシステムを用いて撮影した
*Scenedesmus (Desmodesmus)*属

<u>調査試料</u>

植物プランクトンの分離や試料収集のため、琵琶湖環境科学研究所（琵琶湖、瀬田川、唐橋）および国立環境研究所（霞ヶ浦湖心等）から、毎月定期調査時の試水2Ｌを低温宅配便によって受け取った。

試料400ｍｌは低音高速遠心機によって濃縮し、検鏡・分離培養に利用すると共に、ホルマリン固定標本を作製した。アオコ発生時には、アオコ発生部分の表層水を別の瓶で受け取った。アオコは限られた種類でブルームを起こすことが多いので、そのままで教師データとして用いたケースもあった。

その他に、琵琶湖博物館の大塚泰介氏より烏丸半島・西の湖・琵琶湖博物館生態観察池の試水を提供して頂いた。合わせて私たちが出張により採集した試料も対象とした。

<u>培養株の確立と遺伝子解析</u>

得られた試水から、植物プランクトンをピペットウォッシング法や寒天プレート法などにより網羅的に分離し、重複も含め約420株を分離した。内訳はシアノバクテリア210株、珪藻166株、緑藻46株である。そのうち、約350株についてバーコード領域の遺伝子解析と同定のための簡易写真撮影に成功した。あわせて毎月の試水については、今後のメタゲノム解析および走査電子顕微鏡観察用のフィルターろ過を行い凍結保存した。また、琵琶湖を中心に赤潮・アオコ発生時に連絡・同定依頼を受けた分類群について、1群体を用いて全ゲノム増幅を行い、遺伝子解析・分子同定を行った。

遺伝子解析は、シアノバクテリアはrbcLXS領域をバーコード領域として解析した。PCRプライマーはPlanktothrix属以外について、Rudi et al. (1998)を改変したcx-b　5’-GGG GCA RGT ARG AAA GGR TTT CGT A-3’とcw-b　5’-CGT AGC TTC YGG TGG TAT CCA CGT-3’(Tuji & Niiyama 2018)を用いた。シークエンスプライマーとしては、多くの種が産生したDolichospermum属を含むネンジュモ目についてはCX-B, CW-Bに加えrb-nos226f 5’-TGG AAA GAA ATY AAG TTC GAG-3’とrb-nos367r　5’-GCC TGA TAA GTC AGR TAR CTT TG-3’を使用した。このシアノバクテリア特異なrbcLプライマーを用いる事で、PCRの成功率は16S rRNAを対象とする場合に比べて格段に向上する。珪藻の遺伝子解析は、バーコード領域としてrbcL領域のほぼ全長を対象として用いて行った。近年の珪藻研究はバーコード領域としてrbcLの3末端側の約半分の領域（rbcL-3P）を対象として行われることが多い。珪藻の特異的プライマーを用いたPCRを行ったため、PCRの成功率は高かった。一方、珪藻の同定は酸処理して永久プレパラートを作成するか、遺伝子解析を行う必要があり、生試料での同定は難しい。そのため、分離段階では確実な同定は難しく、結果的に多数の同一分類株を分離することになってしまった。緑藻類は、グループとして大きく緑藻類全体をカバーするrbcLプライマーが存在しない。本研究ではいくつかの種でrbcL解析に成功しているが、成功率は低く、真核生物ユニバーサルな18S rRNAプライマー(MedlinA, MedlinB)を

用いた18S rRNAをバーコード領域として用いた。しかし、特異的プライマーでないため、コンタミの影響が大きく、PCRの成功率は低かった。緑藻類に関しては正確な同定のためには生活史を検討することが重要であるが、時間的な制約もあり、本研究課題では最初の顕微鏡観察と遺伝子解析で同定できないものについては、培養株を維持しなかった。そのため、緑藻の培養株数が他のグループに比べて少なくなっている。黄金藻類については増殖が遅く増殖しても群体を形成しなかった。そのため、多数回の分離を試みたが、教師データ作成に使える株は得られなかった。これらの種類については、フィールドの固定標本を用いて教師データ作成を行った。

顕微鏡観察と遺伝子解析によって同定に疑義がある種については、走査型電子顕微鏡（SEM）観察や多数の分子種による遺伝子解析を併せて行った。これらの作業により後に述べる複数の新種（候補）および日本新産種が見つかってきた。

本研究課題で用いた分類階級について

微細藻類の分類は遺伝子解析等の進歩により急激に変化している。それに伴い、培養により生活環を確認することや遺伝子解析が種の正確な同定のためには必須事項となりつつある。一方で、環境モニタリングなどの植物プランクトンの応用利用においては、培養や遺伝子解析を常に個々の種で行う事は非現実的であり、光学顕微鏡による検鏡で同定可能なレベルを明らかにすることが求められてきた。私たちは、そのような応用利用を目的とした植物プランクトンのチェックリストを既に作成し、一般公開している（辻・新山　2022：ＨＰ　ダム湖の植物プランクトン；成果番号 56）。このチェックリストの上位分類群については、本申請課題中の検討結果も踏まえて、2022年3月にGenBankの分類階級を取り入れる形で大きく改訂した。本報告ではこの2022年3月版に基づいて、議論を行う。

(5)形状が不定形あるいは糸状藻類のアノテーションについて

植物プランクトンの中には形状が不定でランダムにつながる群体を形成する種が存在する。例えば、*Microcystis wesenbergii*は膜に囲まれた群体を形成するが、ランダムにつながるため、どこまでを一つの群体と認識するかが難しい（図2-3左）。この様な場合は、出来るだけ小さな単位について、アノテーションを行った。また、*Planktothrix* ‘pseudoagardii’（図2-3右）の様に長い糸状群体を形成する種類については、出来る限り短い群体を選んでアノテーションすると共に、長い群体については群体端を含む部分についてアノテーションを行った。ただし、これらのアノテーション方法については、機械学習システムの結果を踏まえて修正する必要があるため、本研究では暫定的な情報として扱った。

図2-3. *Microcystis wesenbergii*(左)と、*Planktothrix* ‘pseudoagardii’（右）。

４．　サブテーマ２結果及び考察

調査試料と分離株

サブテーマ２の植物プランクトン教師データ作成に用いた採集地と分離株数を表2-1に示す。

シアノバクテリアで210株、珪藻で166株、緑藻で46株、合計422株の分離株を研究の対象とした。緑藻類は分離したものの群体を形成せず、単細胞の状態になるものが多かったため培養を諦めたものが多かった。鞭毛藻類は分裂速度が遅いものが多く、同様に群体を形成しないものが多かったため、結果的に教師データ作成に用いた株はなかった。これらの分類群については、今回の調査地からのホルマリン固

定標本や国立科学博物館植物研究部の微細藻類収蔵庫に保管されている標本を用いて教師データ作成を行った。

表2-1. 採集地と取得した分離培養株数

採集地	略号	シアノバクテリア				珪藻	緑藻	
		ネンジュモ目	ユレモ目右以外	ユレモ目Planktothrix属	クロオコックス目			
		Cd	Co	Cp	C			
琵琶湖（瀬田川、唐橋）	BK	37	16	1	2	10		
琵琶湖（烏丸半島）	LBM	90	3		13	54	38	
琵琶湖（一瀬氏株）		10						
西の湖		2	2					
琵琶湖博物館（生態観察池）		7						
霞ヶ浦	KS	2	2	2	4	56		
芦ノ湖						2	4	
浦山ダム						4	1	
小川原湖		11						
空堀川						16		
つくば市ため池		6						
十和田湖						6	3	
鳴滝ダム						18		

教師データ作成

培養に成功した種を中心に60分類群について、倍率条件を変えて、画像解析に必要な多数の写真撮影を行った。アノテーションの登録はサブテーマ１の動物プランクトンと同様にCVATシステムを用いて行った。プロジェクトの作成は、培養株（標本）別に行い、撮影倍率（すべてのものについて10倍対物レンズを基本とし、必要に応じて20倍、40倍の対物レンズでの撮影を追加した）の違いによってもプロジェクトを分けた。水辺の国勢調査対象分類群に対する画像取得率は、表2-2の通りである。

現在の所、倍率違い・株違いも含めて7469枚の写真を撮影・登録し、104711点の個体識別（アノテーション）を行った。プロジェクト（種・倍率単位）の撮影枚数は、最低：10、平均：858、最大：16068である(表2-3)。これはサブテーマ３で行われた既存研究調査と比較しても、種数・種別平均画像数が共に多く、８年間にわたって多くの研究者によって実施されたWHOI-Planktonに継ぐ大規模データセットになっている。種数については、植物プランクトンだけでも既存のデータセットを超えるものとなる。

表2-2　水辺の国勢調査対象分類群に対する画像取得率

	目レベル(浮遊種)		科レベル(浮遊種)		属レベル(浮遊種)		チェックリスト(浮遊種)		チェックリスト（含付着種）	
	分類群数	%	分類群数	%	分類群数	%	分類群数	%		
シアノバクテリア	5/5	100	5/11	45	9/21	43	12/29	41	12/37	32
珪藻	9/10	90	8/16	50	8/18	44	14/26	54	15/83	18
広義の緑藻	5/6	83	7/15	47	12/34	35	12/34	35	12/40	30
鞭毛藻類	4/10	40	6/11	55	6/15	40	8/16	50	8/30	27

遺伝子解析

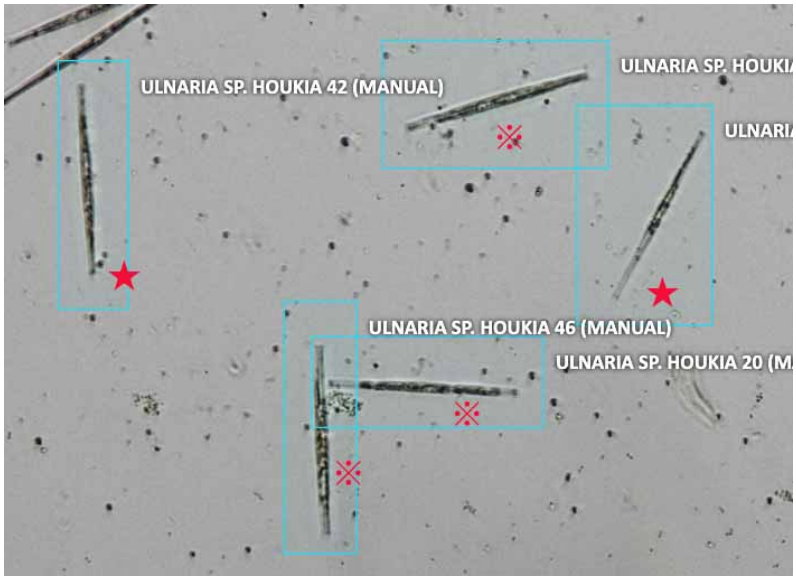
研究開発内容で述べた遺伝子解析を分離株（表2-3）のすべてについて行った。遺伝子解析の成功率は現在までにおよそ70%である。特異的プライマーが存在しない緑藻類で成功率が低かった。この遺伝子解析と顕微鏡観察から種同定を行った。

表2-3　CVATシステムに登録した植物プランクトンと画像・アノテーション数

	ラベル名	プロジェクト名	フィールドサンプル名	画像数	アノテーション数
1	Ulnaria japonica	Ulnaria japonicaX10F	TY031	24	3894
	Ulnaria japonica	Ulnaria japonica X20F	TY031	29	469
	Ulnaria japonica	Ulnaria-japonica x4 F	TY031	15	624
	Ulnaria japonica	Ulnaria-japonicax40F	TY031	8	33
2	*Ulnaria sp. houkia*	Ulnaria sp. houkia X40 F	AK2012	12	44
	Ulnaria sp. houkia	Ulnaria sp. houkia X10 F	AK2012	10	464
3	*Ulnaria biceps*	Ulnaria biceps x10 F	TY241	60	159
4	*Ulnaria ulna*	Ulnaria ulna X40 F	TY253	31	64
	Ulnaria ulna	Ulnaria ulna X10 F	TY253	23	371
5	*Scenedesmus*	Scenedesmus X40 F	TY190	20	212
	Scenedesmus	Scenedesmus X10 F	TY190	12	1777
6	*Fragilaria crotonensis s. l.*	Fragilaria crotonensis s.l. X40 F	TY272	7	10
	Fragilaria crotonensis s. l.	Fragilaria crotonensis s.l. X10 F	TY272	36	324
7	*Asterionella formosa*	Asterionella formosa s. l. X10 F	TNS63279	136	1267
8	*Aulacoseira granulata*	Aulacoseira granulata X40 F	TY285	18	20
	Aulacoseira granulata	Aulacoseira granulata X10 F	TY285	45	382
	Aulacoseira granulata	Aulacoseira granulata X4 F	TY285	5	100
9	*Cyclotella meneghiniana*	Cyclotella meneghiniana X10 F	TY233	21	1009
	Cyclotella meneghiniana	Cyclotella meneghiniana X40 F	TY233	23	778
10	*Pandorina morum*	Pandorina morum X10 F	TY050	36	1267
	Pandorina morum	Pandorina morum X40 F	TY050	31	125
11	*Pseudoanabaena mucicola*	Pseudanabaena mucicola X10 F	TY75	14	2107
	Pseudoanabaena mucicola	Pseudanabaena mucicola X40 F	TY75	25	633
12	*Dolichospermum affine*	Dolichospermum affine X10 F	TY117	29	189
	Dolichospermum affine	Dolichospermum affine X20 F	TY117	13	24
13	*Dolichospermum smithii*	Dolichospermum smithii X20 F	TY69	20	56
	Dolichospermum smithii	Dolichospermum smithii X10 F	TY69	28	219
14	*fragilaria longifusiformis ssp. eurofusiformis*	Fragilaria longifusiformis ssp. eurofusiformis X10 F	TY173	20	1758
	fragilaria longifusiformis ssp. eurofusiformis	Fragilaria longifusiformis ssp. eurofusiformis X40 F	TY173	21	119
15	*Staurastrum dorsidentiferum var. ornatum*	Staurastrum dorsidentiferum var. ornatum X10 F	TY161	129	337
	Staurastrum dorsidentiferum var. ornatum	Staurastrum dorsidentiferum var. ornatum x40 F	TY161	92	144
16	*Aulacoseira pusilla*	Aulacoseira pusilla x10 F	KS2203	40	1811
	Aulacoseira pusilla	Aulacoseira pusilla X40 F	KS2203	52	937
17	*Microcystis wesenbergii*	Microcystis wesenbergii　x10 F	TNS63811	187	777
	Microcystis wesenbergii	Chrysophyte-stomatocysts X40 F	TNS63998	295	1142
19	*Dinobryon sp.*	Dinobryon sp. X10 F	TNS63279	121	3837
20	*Planktothrix agardhii*	Planktothrix agardhii 1 X10 F	TY269	330	7313
	Planktothrix agardhii	Planktothrix agardhii 1 X40 F	TY269	224	1031
21	*Raphidiopsis raciborskii*	Raphidiopsis raciborskii X10 F	TY331	49	3609
	Raphidiopsis raciborskii	Raphidiopsis raciborskii X40 F	TY331	116	434
22	*Anagnostidinema cf. amphibium*	Anagnostidinema cf. amphibium X10 F	TY136	80	1453
	Anagnostidinema cf. amphibium	Anagnostidinema cf. amphibium X40 F	TY136	154	289
23	*Aphanizomenon flos-aquae*	Aphanizomenon flos-aquae X10 F	TY123	89	1010
	Aphanizomenon flos-aquae	Aphanizomenon flos-aquae X40 F	TY123	95	223
24	*Micrasterias hardyi*	Micrasterias hardyi X10 F	TY336	90	151
25	*Euglena gracilis*	Euglena gracilis NIES_49_X10 F	NIES-49	49	2068
26	*Cuspidothrix issatschenkoi*	Cuspidothrix issatschenkoi X10 F	TY262	82	5559
	Cuspidothrix issatschenkoi	Cuspidothrix issatschenkoi X40 F	TY262	116	796
27	*Ceratium furcoides*	Ceratium furcoides X10 F	TNS63777	65	292
	Ceratium furcoides	Ceratium furcoides X40 F	TNS63777	137	152
28	*Closterium aciculare*	Closterium aciculare X10 F	TNS63777	65	50
29	*Euglena gracilis*	Euglena gracilis NIES_49_X40 F	NIES-49	110	419
30	*Peridinium bipes*	Peridinium bipes X10 F	TNS63754	62	338
	Peridinium bipes	Peridinium bipes X40 F	TNS63754	101	127
31	*Planktothrix agardhii*	Planktothrix agardhii 2 X10 F	TY77	86	874
	Planktothrix agardhii	Planktothrix agardhii 2 X40 F	TY77	112	216
32	*Pleodorina japonica*	Pleodorina japonica X10 F	TNS63770	73	703
33	*Eudorina elegans*	Eudorina elegans X10 F	TNS63732	82	114
34	*Yamagishiella unicocca*	Yamagishiella unicocca X10 F	TNS63748	76	916
35	*Trachelomonas*	Trachelomonas X10 F	TNS63729	76	344
	Trachelomonas	Trachelomonas X40 F	TNS63729	115	148
36	*Pseudanabaena limnetica*	Pseudanabaena limnetica X10 F	AK1319	61	3298
	Pseudanabaena limnetica	Pseudanabaena limnetica X40 F	AK1319	71	345
37	*Pandorina*	Pandorina X10 F	TNS63777	65	308
	Pandorina	Pandorina X40 F	TNS63777	115	126
38	*Aphanizomenon gracile*	Aphanizomenon gracile X10 F	AK1302	77	16068
	Aphanizomenon gracile	Aphanizomenon gracile X40 F	AK1302	61	1384
39	*Volvox sp.*	Volvox sp x10 F	TNS63820	102	117
40	*Planktosphaeria sp.*	Planktosphaeria sp X10 F	TNS63764	20	2236
	Planktosphaeria sp.	Planktosphaeria sp X40 F	TNS63764	100	636
29b	*Peridinium bipes*	Peridinium bipes 2 X10 F	TNS61424	11	302
	Peridinium bipes	Peridinium bipes 2 X40 F	TNS61424	30	93
41	*Acanthoceras zachariasii*	Acanthoceras zachariasii X10 F	TNS63729	20	163
	Acanthoceras zachariasii	Acanthoceras zachariasii X40 F	TNS63729	89	176
42	*Ceratium hirudinella*	Ceratium hirudinella X10 F	TNS63754	115	161
43	*Aulacoseira granulata f. spiroides*	Aulacoseira granulata f. spiroides X10 F	TNS55277	10	19
	Aulacoseira granulata f. spiroides	Aulacoseira granulata f. spiroides X40 F	TNS55277	9	9
44	*Aulacoseira ambigua f. japonica*	Aulacoseira ambigua f. japonica X10 F	TNS55277	18	450
	Aulacoseira ambigua f. japonica	Aulacoseira ambigua f. japonica X40 F	TNS55277	70	100
45	*Achnanthidium catenatum*	Achnanthidium catenatum X10 F	TNS52979	2	695
	Achnanthidium catenatum	Achnanthidium catenatum X40 F	TNS52979	15	569
46	*Thalassiosira lacstris*	Thalassiosira lacstris X10 F	TNS61828	10	407
	Thalassiosira lacstris	Thalassiosira lacstris X40 F	TNS61828	25	199
47	*Pediastrum duplex*	Pediastrum duplex X10 F	TY207	52	353
	Pediastrum duplex	Pediastrum duplex X40 F	TY207	89	115
48	*Mougeotia sp.*	Mougeotia sp. X10 F	TY132	41	491
13b	*Dolichospermum smithii*	Dolichospermum smithii 2 X10 F	TY352	43	374
	Dolichospermum smithii	Dolichospermum smithii 2 X40 F	TY352	44	67
49	*Aulacoseira tenella*	Aulacoseira tenella X10 F	TNS63551	10	574
	Aulacoseira tenella	Aulacoseira tenella X40 F	TNS63551	66	345
50	*Dictyosphaerium sp.*	Dictyosphaerium sp. X10 F	TY284	62	1877
	Dictyosphaerium sp.	Dictyosphaerium sp. X40 F	TY284	124	471
51	*Naiadinium polonicum*	Naiadinium polonicum X10 F	Sagami220709	11	1962
	Naiadinium polonicum	Naiadinium polonicum X40 F	Sagami220709	48	490
52	*Planktothrix sp.*	Planktothrix sp. X10 F	NIshinoko2207	113	166
	Planktothrix sp.	Planktothrix sp. X40 F	NIshinoko2207	12	12
53	*Planktothrix pseudoagardii*	Planktothrix pseudoagardii X10 F	TNS63001	44	941
	Planktothrix pseudoagardii	Planktothrix pseudoagardii X40 F	TNS63001	48	216
54	*Spirulina*	Spirulina X 10 F	自然教育園	85	254
	Spirulina	Spirulina X 40 F	自然教育園	86	119
55	*Microcystis viridis*	Microcystis viridis X10 F	土浦のため池？	188	956
56	*Raphidiopsis raciborskii*	Raphidiopsis raciborskii 2 X10 F	AK2263	44	984
	Raphidiopsis raciborskii	Raphidiopsis raciborskii 2 X40 F	AK2263	121	1992
57	*Aphanizomenon flos-aquae*	Aphanizomenon flos-aquae 2 X10 F	TNS61368	13	13
	Aphanizomenon flos-aquae	Aphanizomenon flos-aquae 3 X10 F	TY123	62	287
	Aphanizomenon flos-aquae	Aphanizomenon flos-aquae 3 X40 F	TY123	51	127
	Aphanizomenon flos-aquae	Aphanizomenon flos-aquae 4 X10 F	TY125	33	305
	Aphanizomenon flos-aquae	Aphanizomenon flos-aquae 4 X40 F	TY125	25	148
58	*Microcystis novacekii*	Microcystis novacekii X10 F	土浦のため池？	188	481
59	*Uroglenopsis*	Uroglenopsis X10 R	TNS63048	78	163
	Uroglenopsis	Uroglenopsis X40 R	TNS63048	51	59
60	*Volvox sp.*	Volvox sp X10 R	確認中	207	651
	ミックス	#5400: Phytoplankton1_1/20_100	Phytoplankton1	1	1017
	ミックス	#5401: Phytoplankton1_1/20_200	Phytoplankton1	1	137
	ミックス	#5402: Phytoplankton2_1/20_100	Phytoplankton2	1	666
	ミックス	#5403: Phytoplankton2_1/20_200	Phytoplankton2	1	83
	ミックス	#5388: phyto_mixB_200	mixB	1	1245
	ミックス	#5397: Phyto_mixB_1/20_100	mixB	1	1719
	ミックス	#5385: plyto_mixD_100	mixD	1	142
	ミックス	#5386: plyto_mixD_200	mixD	2	72
	ミックス	#5389 phyto_mixA	mixA	2	412
	ミックス	#5390 phyto_mixA_200	mixA	1	252

教師データ作成にあたって注意を要した種

・珪藻の帯面観と殻面観　（図2-4）



珪藻を観察するときには、殻の形態がよく分かる殻面観（★印）と帯面観（※印）の2つの見え方がある。珪藻は種として殻面観に基づいて行い、帯面観では同定が難しい。今回作成した教師データには、殻面観と帯面観を区別せずにランダムで入力している。珪藻の分類研究で通常用いられる酸処理を行わずに固定試料を直接撮影しているため、帯面観の割合が高くなっている。

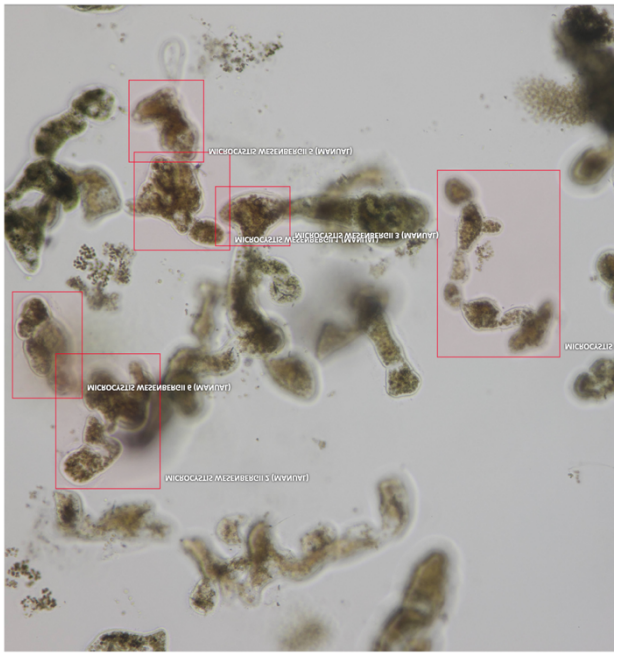
図2-4　珪藻(*Ulnaria* sp. houkia)の殻面観（★印）と帯面観（※印）

・*Dolichospermum*属等のアキネート生成種　（図2-5）

ネンジュモ目の同定にあたっては、ヘテロサイト（※印）と成熟したシスト（★印）を両方持つ事が必要である。本研究では、培養株や固定標本を多数検鏡し、両方が揃ったものについて、教師データ作成を行った。

図2-5　シアノバクテリア *Dolichospermum affine*のヘテロサイト（※印）と成熟したシスト（★印）

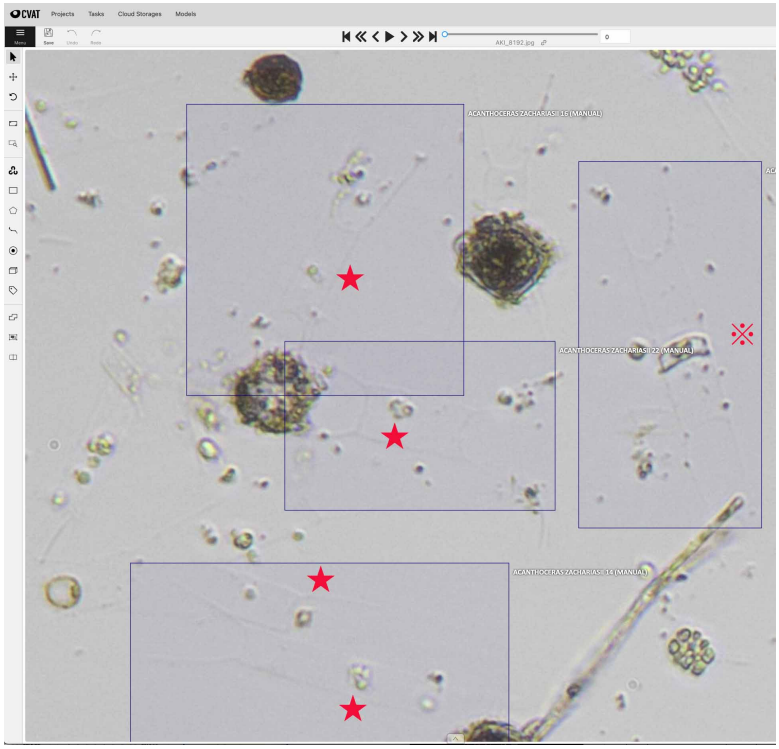
・*Microcystis*属の群体　（図2-6）



*Microcystis*属は、培養条件下では、コロニーを形成せずバラバラになることが知られている。そのため、教師データ作成にあたってはフィールドのアオコ発生時のサンプルを用いた。
アノテーション時の混乱を避けるために、各画像では1種類しかアノテーションを行わず、複数種をアノテーションしたい場合には、別画像としてCVATに登録して、アノテーション作業を行った。

図2-6　*Microcystis wesenbergii*の群体

・非常に透明な細胞質を持つ珪藻(*Acanthoceros*と*Urosolenia*)　　(図2-7)



*Acanthoceros*と*Urosolenia*属は見過ごされる場合が多いが、ダム湖の植物プランクトンとして優占することが多く、水道関係では濾過障害を引き起こす重要な生物である。これらの生物の同定には、球状に丸くなった細胞質の部分（★印）あるいは形成したシスト（※印）を目安に同定することとなる。これらの種類に関しては分離培養がうまくいかなかったため、国立科学博物館植物研究部に収蔵されている標本から保存状態が良く、細胞質が明瞭でシストを形成しているものを探し出し、撮影した。

図2-7　*Acanthoceros*属（珪藻）
細胞質の部分（★印）と形成したシスト（※印）

<u>カビ臭や毒性産生遺伝子の解析</u>

今回分離したシアノバクテリア株について、カビ臭及び毒産生遺伝子の解析を行った。ジオスミン産遺伝子であるgeoAの解析結果を図2-7に示す。この結果は2023年の国際学会で口頭発表を行った。ジオスミン産生遺伝子を持つ*Dolichospermum*属は、Tuji et al. (2023)で報告した日本新産の*Dolichospermum hangangense*が多く、また、*Dolichospermum crassum*と同定された種からもgeoA遺伝子が見つかった。*Dolichospermum crassum*は、geoAを持たないクレードも含め複数のクレードに別れ、分類学的再検討が必要であるが、模式産地のヨーロッパでも複数クレードが存在することや、既存研究で用いられた培養株の多くが絶えていたため、研究が進まなかった。

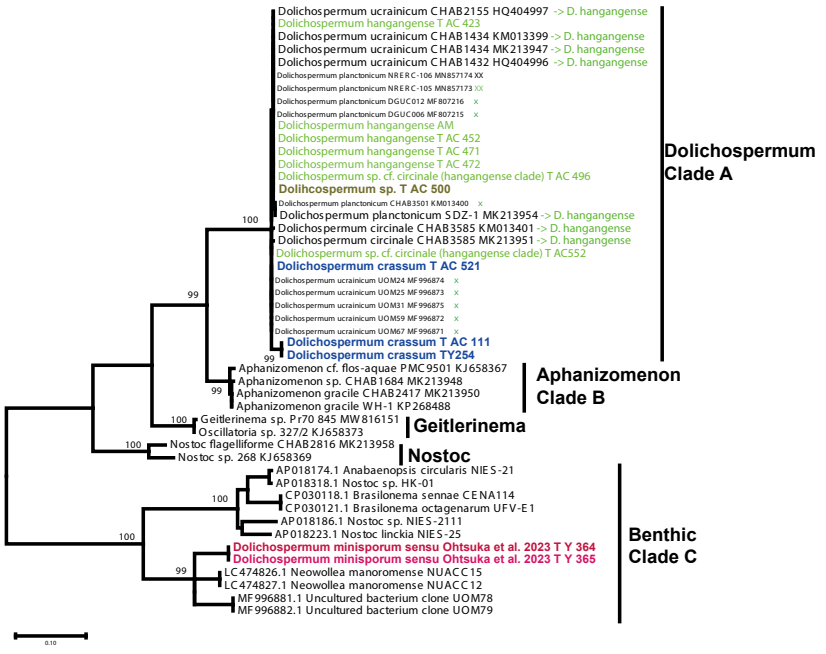


図2-8　ジオスミン産遺伝子(geoA)の解析結果（ML法）

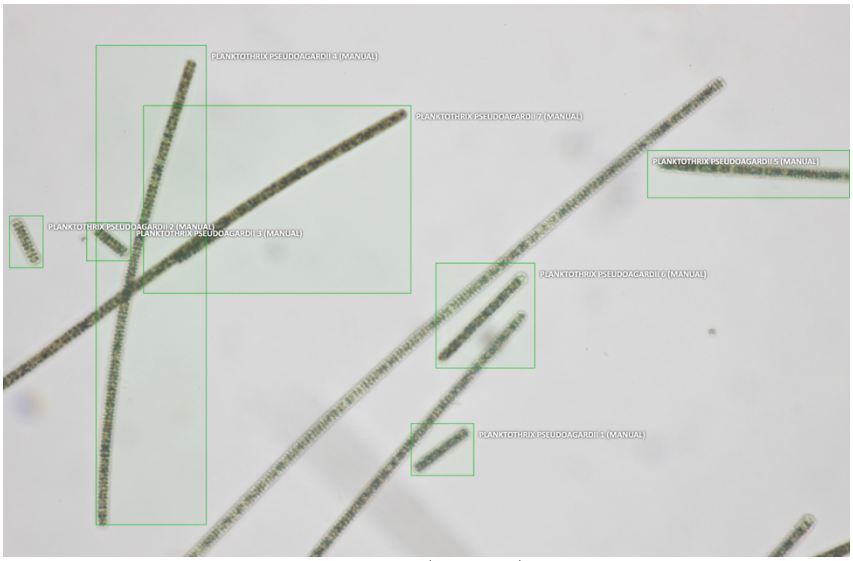
本研究課題中に大量発生しカビ臭で問題になった(成果番号10)で’Dolichospermum minisporum’とした種については、geoAの系統樹では付着性種のクレードに入る（図2-8）。この事は16S rRNAによる解析結果(図2-13)と整合的であり、本種が*Dolichospermum*属でない別属（新属の可能性が高い）事を示している。

毒産生遺伝子については、既存論文に用いられるＰＣＲプライマーセットを用いて、ＰＣＲのバンドが出たが、そのほとんどでダイレクトシークエンスが出来なかった。

本プロジェクトに関係して見いだされた新種・新産種等

・*Planktothrix* ‘pseudoagardii’　（図2-9）

2021年10月に琵琶湖内湖の西の湖から正体不明のOscillatoriaがスカム状にアオコを形成し優占しているため(滋賀県琵琶湖環境部発表：https://www.pref.shiga.lg.jp/file/attachment/5278215.pdf）、滋賀県立琵琶湖博物館および琵琶湖環境科学研究所から同定依頼を受けた。そこで、提供試料から１群体を分離・洗浄し、全ゲノム増幅（WGA）を行った上で、16S rRNAの遺伝子解析を行ったところ、

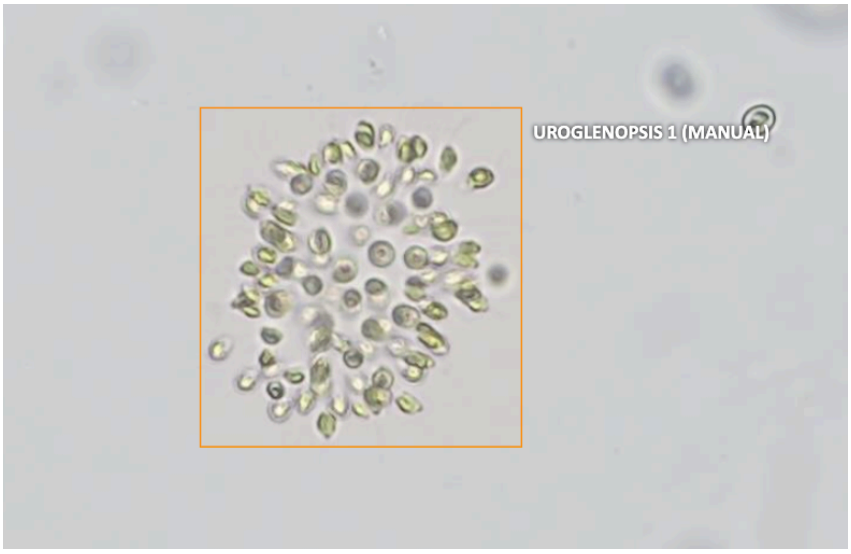


Planktothrix ‘pseudoagardii’と遺伝子が完全一致した。本種は命名規約上無効であるものの、タイ国で新種記載されていることから外来種と推定される。スカム状のアオコを形成するため、国内の各地水域で出現する可能性が高いため注意が必要である。一方、本種は*Planktothrix spiroides*と同一クレードを形成する。そのため、両種の全ゲノム解析を実施し、現在解析中である。

図2-9　*Planktothrix* ‘pseudoagardii’

・*Uroglenopsis* sp. cf. botrys（図2-10）

本種については、2022年3月に琵琶湖環境科学研究所及び滋賀県立琵琶湖博物館から、琵琶湖で出現している淡水赤潮の*Uroglena americana*（≡*Uroglenopsis americana*)が今までのものと性状が異なり別分類群の可能性があるため遺伝子解析の依頼を受け、本プロジェクトの一貫として解析した。全ゲノム増幅（WGA）を行った上で、特異的プライマーを設計し、SSU、 LSU、 rbcLの塩基配列を確定した。その結果、*U. americana*や *U. botrys*とは異なる新種の可能性が高いことが分かった。新種記載のためには、休眠胞子を観察する必要があるため、本種に由来する休眠胞子の特定を急いでいる。U. americanaは、淡水赤潮の構成生物として重要であり、その実体解明が重要となる。特に琵琶湖においては上水源として支障を来す恐れがあり、また、種が交代している可能性もあることから注意喚起が必要であり、琵琶湖を水源とする関係機関と「Uroglenopsis検討会」をオンラインで行った。



また、2023年に琵琶湖博物館の大塚泰介氏、根来健氏と共同で琵琶湖から様々な場所と日で異なる群体形状を持つ約100個体を単離し、遺伝子解析した。その結果、それらすべてが遺伝的に同一である事が確認できた。また、貧栄養水域である浦山ダムに発生したUroglenopsis（下図）についても遺伝子解析の結果同一の分類群である事を確認し、本分類群が貧栄養水域から琵琶湖南湖の中栄養水域まで出現することを明らかにした。

図2-10　*Uroglenopsis* sp. cf. botrys

・*Fragilaria longifusiformis* ssp. *Eurofusiformis*　（図2-11）

・*Fragilaria saxoplanctonica*

これら２種は、魚切ダム（広島県環境保健協会：溝渕綾）・霞ヶ浦（国立環境研究所：中川恵）・琵琶湖及び内湖（滋賀県立琵琶湖博物館：大塚泰介）・鳴滝ダム（岡山市水道局・小倉謙一）等で近年頻繁

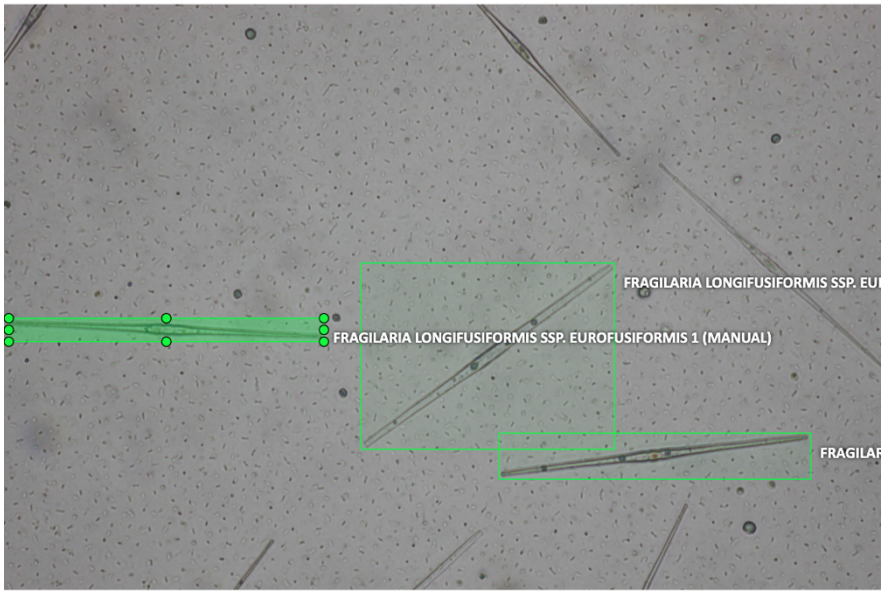


図2-11　*Fragilaria longifusiformis* ssp. *eurofusiformis*

に優占的に出現しており、日本新産の外来種と考えられる注意が必要な種である。そこで、本プロジェクトにて培養株を確立し、遺伝子解析や画像解析用の写真撮影を行うとともに、その形態や分布について報告した（成果番号5, 6）。

・*Ulnaria* sp. houkia　　（図2-12）

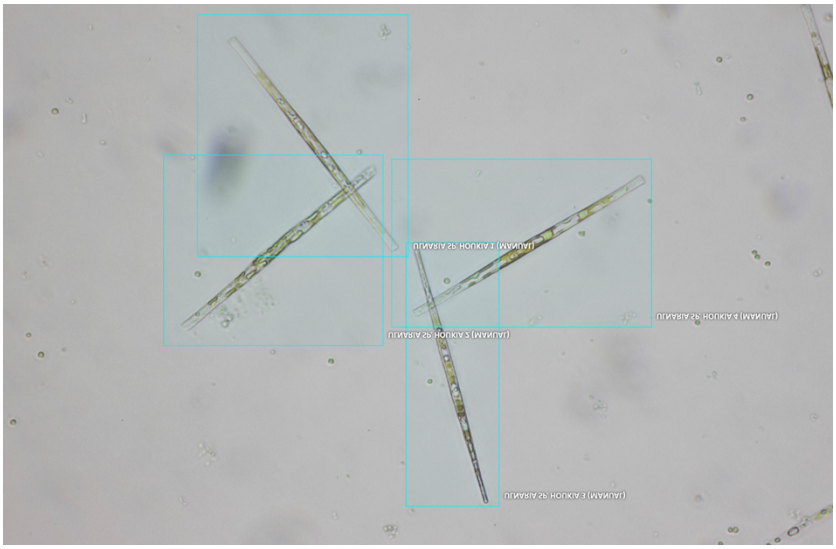


図2-12　*Ulnaria* sp. houkia

本種は従来*U. delicatissima*、*U. acus*と混同して扱われてきたが、本プロジェクトの網羅的な遺伝子解析から新種としてその存在が明らかになった（2022年の珪藻学会でオンライン口頭発表）。木崎湖・霞ヶ浦・北浦および鳴滝ダムから見いだしているが、日本全国に幅広く分布すると思われる。上水道の濾過障害の原因生物とされる*U. acus*には、*U. japonica*だけではなく、本種も含まれると考えられ、上水源では注意が必要な種である。

・*Dolichospermum hangangense*　（図2-13）

琵琶湖のカビ臭（ジオスミン）産生株として’*Anabaena macrospora*’として維持培養されてきた株（ＡＭ株）を琵琶湖環境科学研究所の一瀬氏より受け取り検討した結果、韓国から記載された*Dolichospermum hangangense*と同定できた（成果番号9）。これは日本新産種となる。上記したように本種は日本のジオスミン（カビ臭）産生種として重要と考えられた。

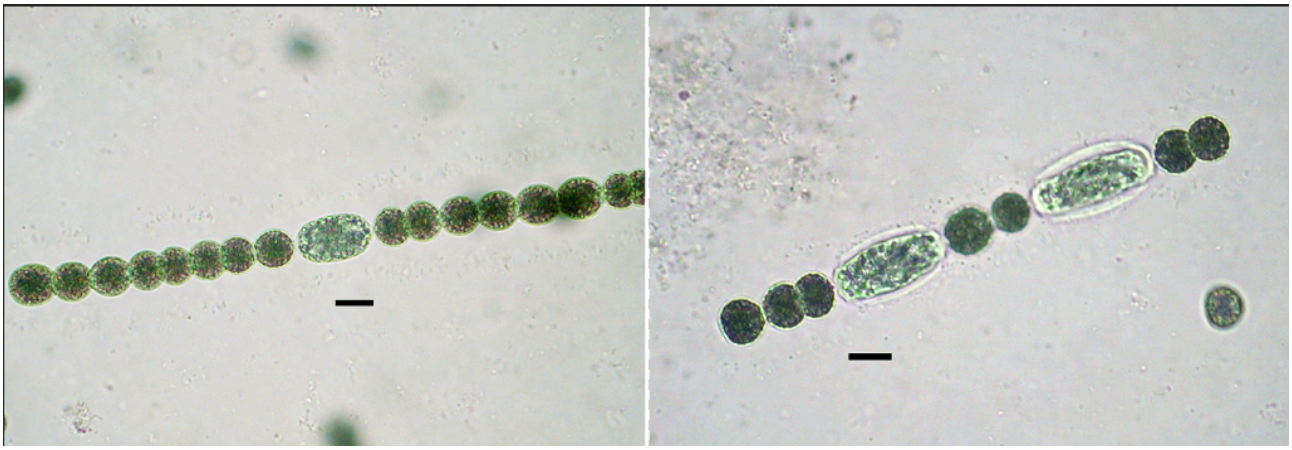
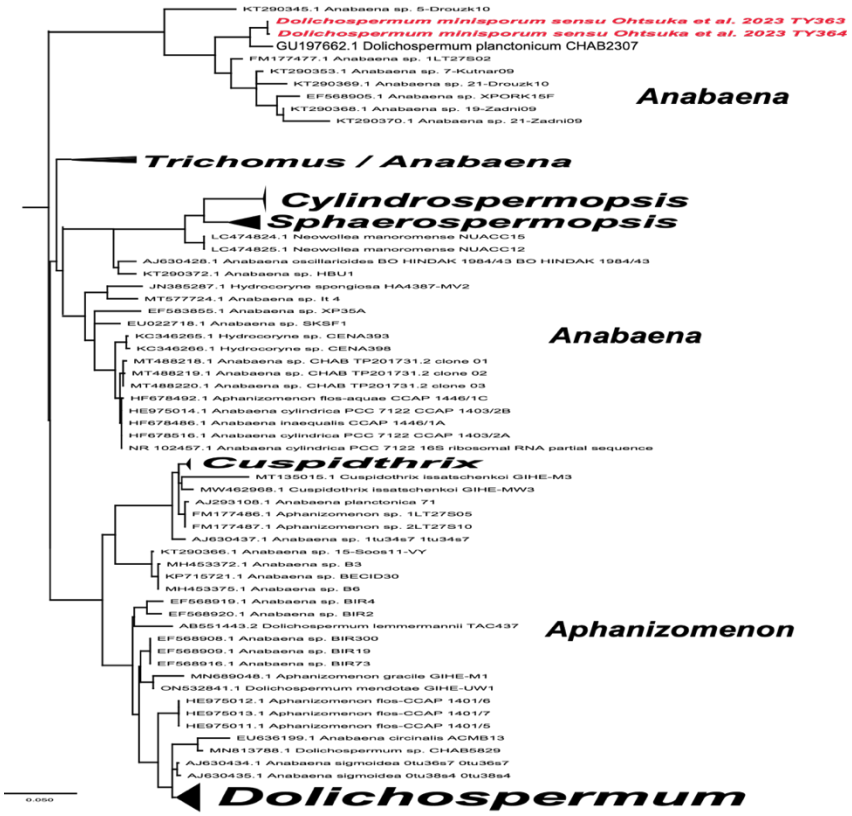


図2-13　*Dolichospermum hangangense*
・‘Dolichospermum minisporum’



本種は2020年9月に琵琶湖南湖で大量発生し、京都市の水道原水にカビ臭が発生したことから問題になった（成果番号10）。本申請課題の中でも本種の分離株が得られたため遺伝子解析したところ、当初考えられた*Dolichospermum*属ではない、付着性の*Anabaena*属に近い種であることが分かった（図2-13）。上記したようにジオスミン産生遺伝子であるgeoA遺伝子解析からもそのことが裏付けられている。現在、本種を新属とするかどうかも含め、分類学的検討を進めている。

図2-14　‘Dolichospermum minisporum’の16S rRNA系統樹（ＭＬ法）

さらに*Aulacoseira pusilla*の形態変異を明らかにした（成果番号8）ほか、琵琶湖から*Raphidiopsis raciborskii*を報告した（成果番号10）。また、霞ヶ浦に出現したMicrocystin毒を産生する*Annamia dubia*の全ゲノム解析をおこなった（成果番号7）。ここで示した10分類群は、すべてプランクトンの優占種として出現したもので、生態的に重要かつ濾過障害やカビ臭など有害有毒藻類の可能性が高い種である。このように本プロジェクトで、淡水域の植物プランクトン種について、分離培養及び遺伝子解析を幅広く実施することで、分類学的・生態的知見のみならず、水質に対しても有害となる重要種についての知見が得られている。特に本プロジェクトにおいて、画像データと合わせて、分離培養と遺伝子解析作業をリアルタイムで行える体制を構築することで、アオコや赤潮の発生したときに即時な対応が可能になることが分かった。

５．サブテーマ２研究目標の達成状況
目標（１）については、琵琶湖及び各地湖沼から得られた試料を対象に、56分類群（122プロジェクト）について、104,711の画像を取得してアノテーションを行い、教師データを蓄積するなど、予定通りの成果をあげることが出来た。目標（２）については、上記39分類群を含む437株を培養し、全ゲノ

ム増殖法によるゲノムを得た。そのうち、約300株について、遺伝子解析に成功した。カビ臭産生種については2-MIB遺伝子，geoA遺伝子についても解析を行うなど、予定を上回る知見を集積することが出来た。目標（３）については、完成した教師データと遺伝子データを、サブテーマ1と同様に国立科学博物館植物研究部の紀要にデータペーパーとして令和6年度中に投稿予定である。目標（４）については、様々な培養株や標本を混ぜ合わせた５モック群集を東北大学のシステムで撮影しアノテーションを行うなど、自動画像判別計数システムの開発と実証実験に必要なデータセットを構築した。しかし、サブテーマ３でのシステム開発が間に合わなかったため、教師データおよびモック群集を使った評価は、令和６年度に継続して実施している。システムの性能試験が研究期間中に間に合わなかったので、自己評価を３とした。

引用文献

Rudi, K　(1998) “Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains” Journal of bacteriology, vol. 180, no. 13, pp. 3453-3461.

Tuji, A., Niiyama, Y. (2018) “Two new *Pseudanabaena* (Cyanobacteria, Synechococcales) species from Japan, *Pseudanabaena cinerea* and *Pseudanabaena yagii*, which produce 2-methylisoborneol” Phycological Research, vol. 66, pp. 291-299.

Ⅱ－３　サブテーマ３「高度画像解析手法によるプランクトン自動判別・計数システムの構築」

［サブテーマ３要旨］

サブテーマ１とサブテーマ２と共同で動物プランクトンデータベースおよび植物プランクトンデータベースの構築を行うための環境整備およびデータベースの仕様策定を行った。構築されたデータベースのうち、動物プランクトンデータベースを用いて、プランクトン群集画像からプランクトンを検出する自動計数の手法およびプランクトン画像を分類する自動判別の手法を検討した。生物が分類階級に基づいて命名されていること利用し、分類群（種・属・科・目・綱）を階層的に取り込んで画像を分類するMulti-Label Attention Branch Network (ML-ABN)と呼ぶプランクトン画像の分類に特化した手法を提案した。これは、本プロジェクトにおける顕著な成果の1つである。構築したデータセットを用いた性能評価実験を通してML-ABNの分類精度の高さおよび実用性を実証したところ、従来手法よりも高い正解率と精度が得られた。さらに、教師データにない種を含む群集テストでも科レベルでは80%の正解率がえられ、プランクトン群集画像からプランクトンの自動計数および判別を行う信頼性の高い手法を開発することができた。ただし、植物プランクについては、期間内での実証実験が間に合わず、全体をとおしてのパッケージ化には至らなかった。しかし、システムのコアとなるML-ABNが開発出来たことから、汎用化とパッケージ化はサブテーマ１，２分担者と共同で実施する次期プロジェクトで達成する予定である。

１．　サブテーマ３研究開発目的

サブテーマ３の研究開発目的は、湖沼などの水源において採取されたサンプルを光学顕微鏡で撮影して得られるプランクトン群集画像からサンプルに含まれるプランクトンの種判別と計数を行う手法を開発し、プランクトンを自動的に判別および計数するシステムの構築をすることである。

２．　サブテーマ３研究目標

サブテーマ３	「高度画像解析手法によるプランクトン自動判別・計数システムの構築」
サブテーマ３実施機関	東北大学大学院情報科学研究科
サブテーマ３目標	（１）サブテーマ１、２より提供される教師データを用い、光学顕微鏡画像中のプランクトンを認識・同定する自動判別手法を開発する。 （２）光学顕微鏡を用いた動･植物プランクトン計数システムを開発する。 （３）プランクトン自動判別・計数システムを開発し、モック群集や野外で採集されたプランクトン群集を用いて評価解析を行い、実装可能なシステムを構築する。

３．　サブテーマ３研究開発内容

サブテーマ３の研究開発内容は、（１）プランクトン自動判別・計数についての関連研究の調査、（２）サブテーマ１と２との協力による動植物プランクトンデータベースの作成、（３）プランクトン自動判別・計数手法の検討、（４）性能評価実験の実施である。以下では、それぞれ項目について詳細を説明する。

関連研究の調査

プランクトン自動判別・計数手法を検討するにあたり、過去10年程度の関連研究について調査した。画像認識の分野では、2012年に深層学習（ディープラーニング）を用いた画像認識手法であるたたみ込みニューラルネットワーク（Convolutional Neural Network: CNN）がAlexNetという名で提案された。AlexNetは、大規模な画像認識コンペであるImageNet Large Scale Visual Recognition Competition（ILSVRC）2012において分類誤差を10ポイント低下させ、画像認識の分野に大きなインパクトを与えた。AlexNetが提案されて以来、画像認識だけではなく、コンピュータビジョンなど画像を扱う分野では、CNNを用いた手法が主流となった。プランクトン画像処理・解析も同様な傾向にあった。例えば、Gorsky et al. (2010)では、ZooScanと呼ばれる画像解析システムに搭載されている画像解析ツールが用いられている。これらの手法は、設計された特徴量であるScale-Invariant Feature Transform（SIFT）やLocal Binary Pattern（LBP)などでプランクトン画像から特徴量を抽出し、Support Vector Machine（SVM）のような機械学習の手法を用いて画像分類を行っている。Silva et al. (2019)も同様にZooScanの画像解析ツールが使用されている。Luo et al. (2018)では、ヒストグラム平滑化などの前処理をプランクトン画像に適用し、SparseConvNetと呼ばれるCNNを用いてプランクトン画像を分類している。Zheng et al.(2017)は、複数の設計された特徴量を組み合わせ、Multiple Kernel Learningにより画像分類する手法を提案している。Ellen et al.(2019)では、画像認識でよく用いられているCNNの1つであるVGG16を用いてプランクトン画像を分類する手法を提案している。Cheng et al.(2019)は、プランクトン群集画像から検出された複数のプランクトン領域をCNNに入力して得られる特徴量に対してSVMを用いて分類を行う手法を提案している。Lumini et al. (2019) やLumini et al. (2020)は、大規模な画像分類データセットで学習された複数のCNNを用いてプランクトン画像を分類する手法を提案している。Wang et al.(2020)は、CNNを用いて、プランクトン群集画像からプランクトン領域を検出する手法を提案しており、González et al. (2019)では、画像認識において一般的に広く用いられているCNNであるResNetを用いてプランクトン画像を分類する手法が提案されている。以上のように、最近になってCNNなどの画像認識分野で用いられている手法が応用されているが、ほとんどの研究は、画像認識の分野で提案されている手法をプランクトン画像解析に適用しているだけである。これに対して、サブテーマ３では、単にCNNを用いてプランクトン画像を分類するのではなく、プランクトンの特徴に基づいた手法を検討することにした。具体的には、プランクトンが分類階級に基づいて命名されていることに着目し、階層構造で表される分類階級を利用して画像分類を行うことを検討した。

プランクトン自動判別・計数手法を検討するにあたり、大規模なプランクトン画像データベースは必要不可欠である。上記の関連研究の調査と同時に、プランクトン画像データベースについても調査した。表3-1は、そのまとめである。

表3-1. 既存のプランクトン画像データベース。

	年	画像枚数	種類	種類ごとの画像枚数 (min/mean/max)	画像サイズ (min/mean/max)	場所	撮影方法	ラベル	公開／非公開
WHOI-Plankton [1]	2006	3,272,578	103 動植	4/31,773/2,340,564	18x113 54x139 861x1,378	海 (Martha's Vineyard)	水中	非階層	公開
WHOI [2]	2007	Train: 3,300 Test: 3,300	22 動植	150	45x62 156x367 961x1,261	海 (Woods Hole Harbor)	水中	非階層	公開
ZooScan [3]	2010	3,771	20 動	28/189/427	42x114 143x154 1,294x1,766	海 (Villefranche-sur-Mer Bay)	卓上	非階層	非公開
Kaggle [4]	2015	30,336	121 動植	9/251/1,979	21x41 67x73 399x410	海 (Florida Strait)	水中	階層（階級非統一）	公開
BeringSea [5]	2019	Train: 14,336 Test: 3,584	7 動	Train: 2,048 Test: 512	23x23 425x411 2,045x2,445	海 (Southeastern Bering Sea)	水中	非階層	公開
ZooLake [6]	2021	Train: 12,560 Val: 2,691 Test: 2,692	35 動	Train: 7/359/2,367 Val: 1/77/510 Test: 1/77/446	40x28 123x121 1,704x2,156	湖沼 (Lake Greifensee)	水中	非階層	公開
Ours	2023	Train: 15,886 Val: 2,961 Test: 16,973	76動	6/298/3,708	21x32 183x183 882x1,329	湖沼	卓上	階層	公開準備中

[1] https://hdl.handle.net/1912/7342

[2] H.M. Sosik et al., “Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry,” Limnology and Oceanography: Methods, vol. 5, no. 6, pp. 204--216, June 2007.

[3] G. Gorsky et al., “Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system,” J. plankton research, vol. 32, no. 3, pp. 285–303, March 2010.

[4] https://www.kaggle.com/c/datasciencebowl

[5] K. Cheng et al., “Enhanced convolutional neural network for plankton identification and enumeration,” PLoS ONE, vol. 14, no. 7, pp. e0219570-1-e0219570-17, July 2019.

[6] S.P. Kyathanahally et al., “Deep learning classification of lake zooplankton,” Frontiers in Microbiology, vol. 12, p.p. 3226, Nov. 2021.

多くのデータベースは、各プランクトンに1つの名称だけがラベルとして付与されていた。プランクトンは分類階級に従って命名されているが、そのような分類階級に従って階層的なラベルが各プランクトン画像に付与されているデータベースは調べた限り現存しなかった。なお、Kaggleデータベースには各プランクトン画像に階層的なラベルが付与されているが、これは分類階級に基づいたラベルではない。また、必ずしも種の数（ラベルの数）が多くなく、解像度も低く、多くの場合が海洋で取得されたプランクトンを対象としている。当初から本プロジェクトを通してプランクトン画像データベースの構築を行う予定であったが、プランクトン画像データベースの調査を通じて改めてプランクトン画像データベースの構築の必要性を確認することができた。本プロジェクトでは、日本の湖沼を対象として水サンプルを採取し、光学顕微鏡にてプランクトン群集画像を取得し、その画像に写るプランクトンに分類階級に従ったラベルを付与することにした。

引用文献

Gorsky et al. (2010) “Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system,” Journal of Plankton Research, vol. 32, no. 3, pp. 285-303.

Silva et al. (2019) “Using image analysis to assess the contributions of plankton and particles to tropical coastal ecosystems,” Estuarine, Coastal and Shelf Science, vol. 219, pp. 252-261.

Luo et al. (2018) “Automated plankton image analysis using convolutional neural networks,” Limnology and Oceanography: Methods, vol.

16, no. 12, pp. 814-827.

Zheng et al.(2017) “Automatic plankton image classification combining multiple view features via multiple kernel learning,” BMC Bioinformatics, vol. 18, no. 570, pp. 1-18.

Ellen et al.(2019) “Improving plankton image classification using context metadata,” Limnology and Oceanography: Methods, vol. 17, no. 8, pp. 439-461.

Cheng et al.(2019) “Enhanced convolutional neural network for plankton identification and enumeration,” PLoS ONE, vol. 14, no. 7, pp. e0219570-1-e0219570-17.

Lumini et al. (2019) “Deep learning and transfer learning features for plankton classification,” Ecological Informatics, vol. 51, pp. 33-43.

Lumini et al. (2020) “Deep learning for plankton and coral classification,” Applied Computing and Informatics, pp. 1-19, August 2020 (online first).

Wang et al. (2020) “Vision-based In situ monitoring of plankton size spectra via a convolutional neural network,” IEEE Journal of Oceanic Engineering, vol. 45, no. 2, pp. 511-520.

González et al. (2019) “Automatic plankton quantification using deep features,” Journal of Plankton Research, vol. 41, no. 4, pp. 449-463.

データベースの作成

本プロジェクトを通して、サブテーマ１では動物プランクトンデータベースを、サブテーマ２では植物プランクトンデータベースを作成した。サブテーマ３では、プランクトン判別・計数で必要となる画像分類用のデータベースの仕様を策定するとともに、データベース構築に必要不可欠な環境の整備を行った。

まず、データベースの仕様策定の詳細について述べる。プランクトン群集画像からプランクトンを検出することができるように、プランクトン群集画像に移っているプランクトン個体に矩形の枠をつけることにした。プランクトンの画像分類に使用する場合は、矩形の座標を用いてプランクトン個体を抽出し、プランクトン画像として使用する。各個体には、分類階級に基づいてラベルを付与することにした。本プロジェクトでは、綱、目、科、属、種の5階級を用いた。例えば、*Daphnia ambigua*であれば、Branchiopoda- Diplostraca -Daphniidae-*Daphnia*-*Daphnia ambigua*となる。以上は動物プランクトンデータベースの例であるが、植物プランクトンデータベースでも同様の仕様に基づいてデータベースを構築した。

次に、データベース構築に必要となる環境について述べる。サブテーマ１、サブテーマ２、サブテーマ３の拠点が異なるため、共同作業を行うために、Amazon Web Service (AWS)のレンタルサーバを用いて、データベース構築環境を整備した。AWSのLinuxサーバに画像認識のデータベース作成に用いられるComputer Vision Annotation Tool (CVAT) (https://github.com/cvat-ai/cvat) をインストールし、拠点に関係なくブラウザ上でデータベース構築を行うことができるようにした。CVATは、アップロードした画像の上に検出領域を矩形で指定できるとともに、各矩形にラベルを付与させることができる。図3-1は、そのCVATの編集画面のスクリーンショットである。

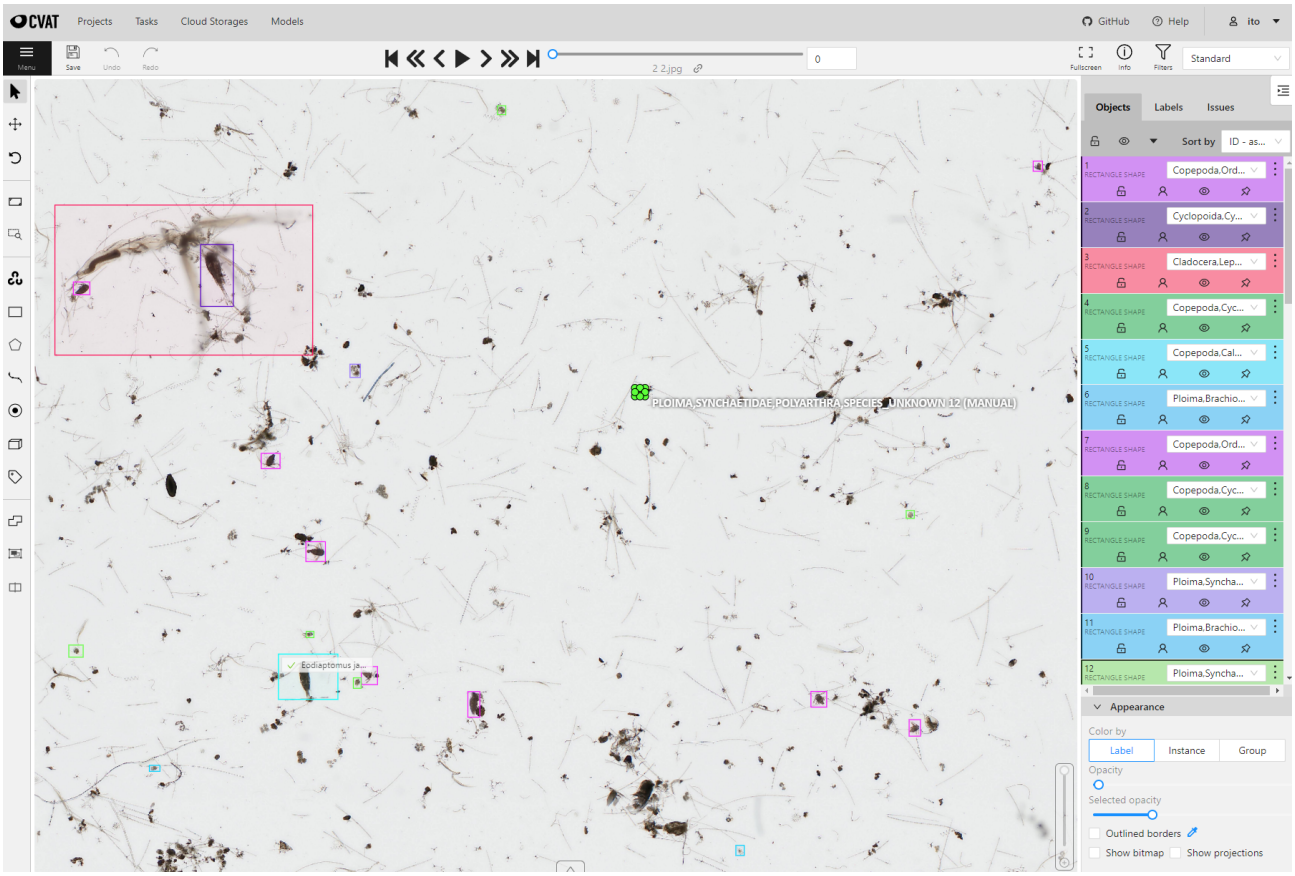


図3-1. CVATの編集画面のスクリーンショットの例。

また図3-2には、動物プランクトンの群集画像に対して、サブテーマ１がプランクトン個体に検出枠をつけ、各個体にラベルを付与した結果の例を示した。

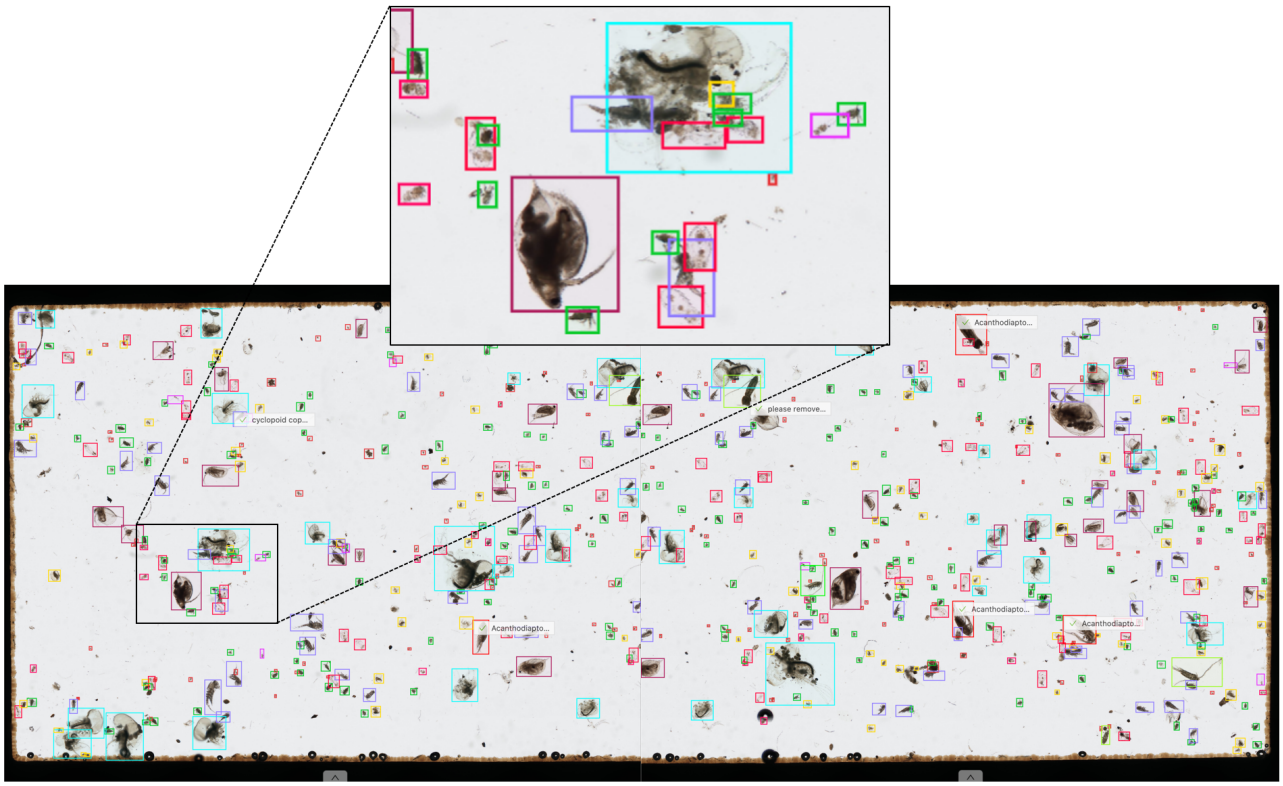


図3-2. サブテーマ１で得られた動物プランクトンの群集画像からの個体に検出枠。

このようなプランクトン画像データベースを動物プランクトンに対してサブテーマ１が、植物プランクトンに対してサブテーマ２が構築した。サブテーマ３では、プランクトン自動判別・計数手法の開発にこれらのデータベースが使用できるかを定期的に確認した。

プランクトン自動判別・計数手法

以上のように、サブテーマ１とサブテーマ２と協力して構築したプランクトン画像データベースを用いて、サブテーマ３の主目的であるプランクトン自動判別・計数手法を検討した。その中で、サブテーマ３では、動物プランクトンの分類手法に注力した。

各プランクトン画像には、分類階級に従ったラベルが付与されている。そのラベルは階層構造を持っており、可視化すると図3-3のような木構造となる。

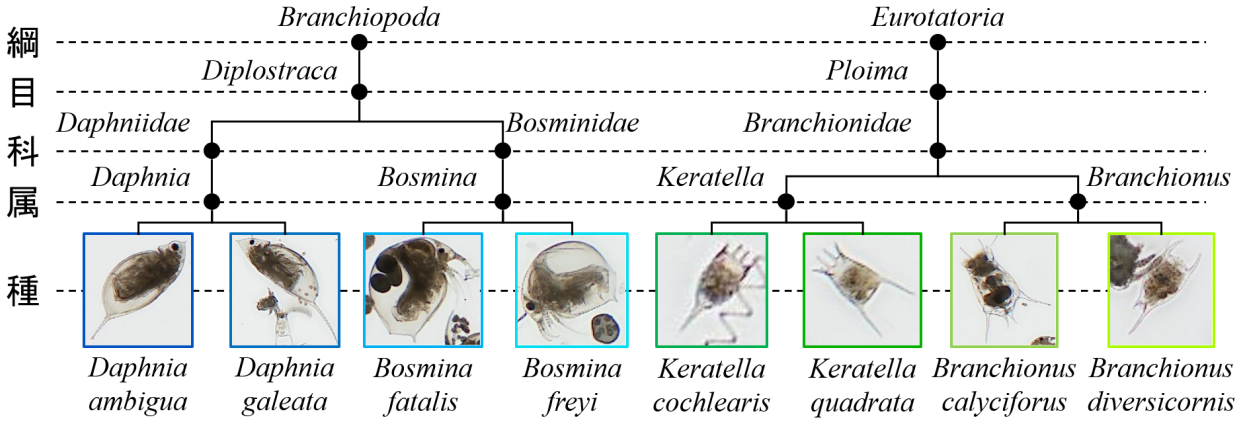


図3-3. 生物分類階級に従ったプランクトン画像のラベルの例。

プランクトン画像と分類階級による命名を比較すると、プランクトンの命名規則とプランクトンの形状に相関があることがわかる。例えば、「目」において、DiplostracaとPloimaは、丸い形状と四角い形状の違いがある。「属」において、*Daphnia*と*Bosmina*は、細長い楕円と円の違いがある。「種」になると専門家でも見分けることが難しい細かい違いがある。このように、分類階級による命名は、プランクトンの形状を反映していると考えられる。プランクトン画像を分類するにあたり、プランクトンの形状に基づいて段階に分類することは重要であると考え、分類階級の階層構造を利用した新しい手法を検討することにした。

プランクトン画像を分類するための画像特徴量の抽出には、ResNet (He et al. 2016)を用いることとした。これは、CNNにおいて畳み込み層を増やすことで生じる勾配消失問題に対して、各畳み込み層において差分を学習させることで畳み込み層を増やしても勾配消失を抑制させた手法である。現在の画像認識の分野では、ResNetが画像特徴量の抽出に一般的に用いられている。ResNetを用いてプランクトン画像を分類する予備実験を行ったが、単にResNetを用いただけではプランクトンの形状を十分に学習することができないため、既存手法と同程度の分類精度しか達成することができなかった。そこで、CNNに画像の形状を考慮させる方法としてアテンション機構の導入を検討した。アテンションとは、画像分類においてCNNが注視している領域に大きな重みをかけて画像特徴量を抽出させる手法である。一般的には、特徴抽出時にアテンションをかけるが、それでは、プランクトンの形状を十分に特徴抽出に反映できないと考えた。そこで、Attention Branch Network (ABN) (Fukui et al. 2019)と呼ばれるアテンション機構を伴ったCNNをベースラインとすることにした。ABNは、CNNで抽出された特徴量を特徴マップとし、その特徴マップから注視領域を表すアテンションマップをAttention Branchで求め、そのアテンションマップを特徴マップに掛け合わせて、Perception Branchで分類する

手法である。ABNを用いれば画像分類で重要となる領域を直接的に重み付けすることができるため、プランクトン分類において有効であると考えた。ただし、ABNは、階層的なラベルに対応していないため、ABNを基本として階層的に画像分類を行う手法を検討した。それがMulti-Level ABM (ML-ABN)(8: Ito et al. 2023)である。正確には、Hierarchical ABN (H-ABN)とすべきであるが、報告書等においてML-ABNとしていることに注意されたい。ML-ABNでは、対象とする階級数と同数のAttention Branchを用意し、それぞれの階級を分類する際に注視したアテンションマップを生成する。生成されたアテンションマップは、その下の階層の分類をするために用いる特徴マップに重みとして掛け合わせる。このようにすることで、上の階層で注視した領域（プランクトンの形状）を考慮して分類することができる。最終的に、ABNと同様にPerception Branchにおいてプランクトン画像を分類する。図3-4は、ML-ABNの概要である。

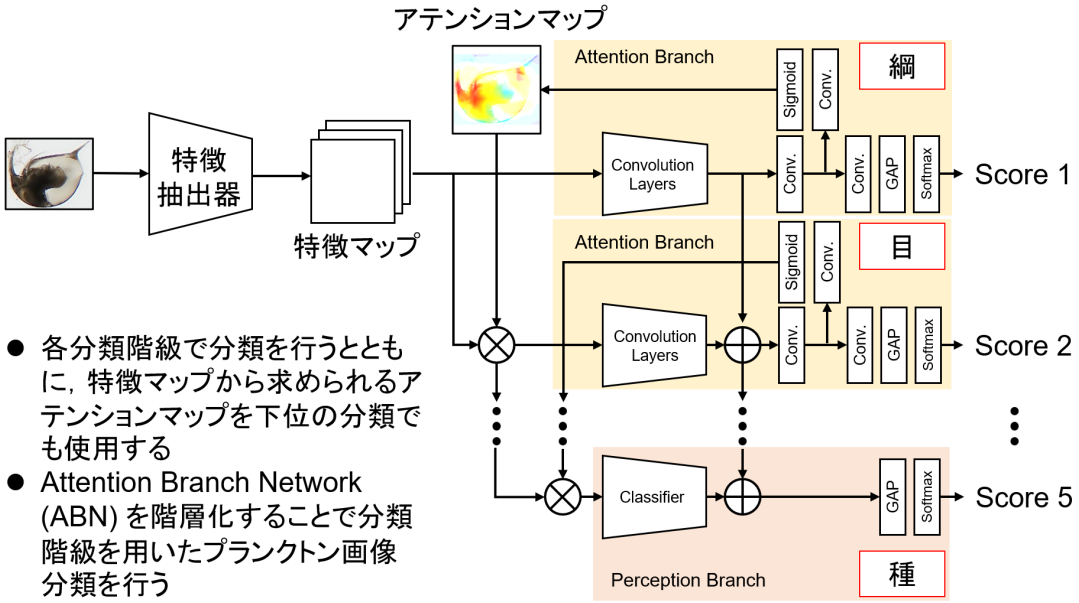


図3-4. 本研究で開発したML-ABNの構造スキーム（概略）。

プランクトンの計数は、プランクトン群集画像からプランクトンの個体を検出することで行うことができる。プランクトン群集画像は、光学顕微鏡で撮影された水サンプルの画像であるため、背景が基本的に白色である。そのため、既存の物体検出手法を使用することで、プランクトンを個体ごとに検出できると考えた。数多くの物体検出手法が提案されているが、その中で、Faster R-CNN (Ren et al. 2015)と呼ばれる物体検出手法を利用することした。その概要を図3-5に示す。

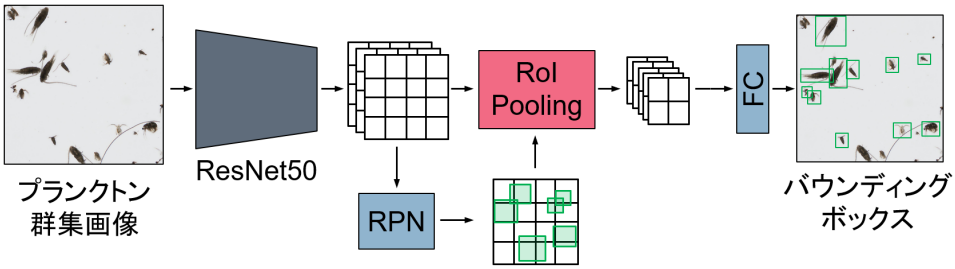


図3-5. Faster R-CNN による物体検出手法を適用した概要。

Faster R-CNNは、CNNを用いて入力画像から画像特徴量を特徴マップとして抽出する。ここでは、50層で構成されるResNet50を使用し、特徴マップをRegion Proposal Network (RPN)に入力し、対象となる物体があると思われる候補の位置を求めた。次いで、ROI Poolingにおいて、RPNで得られた位置と特徴マップを掛け合わせ、各領域で抽出された特徴量を用いて画像分類を行った。これにより物体

検出と分類をマルチタスクで学習することになるため、物体検出の精度が向上することが期待できる。

引用文献

He et al. (2016) “Deep residual learning for image recognition,” CVPR, pp. 770-778.

Fukui et al. (2019) “Attention branch network: Learning of attention mechanism for visual explanation,” CVPR.

Ito et al. (2023) “Zooplankton classification using hierarchical attention branch network,” ACPR, pp. 409--419.

Ren et al. (2015) “Faster R-CNN: Towards real-time object detection with region proposal networks,” NIPS.

性能評価実験

プランクトン自動判別・計数手法の性能を評価するために、本プロジェクトで構築した動物プランクトンデータベースを用いた。植物プランクトンデータベースも構築しているが、動物プランクトンデータベースの進捗が早かったため、手法の検討も含めて、動物プランクトンを優先的に進めた。

実験に用いたデータセットの概要を図3-6に示した。

データセット	画像枚数			クラス数
	学習	検証	評価	
基本データセット	15,886	2,961	3,799	76
新規採取地点データセット	---	---	13,174	44*

* 新規採取地点データセットのクラスは基本データセットに全て含まれている

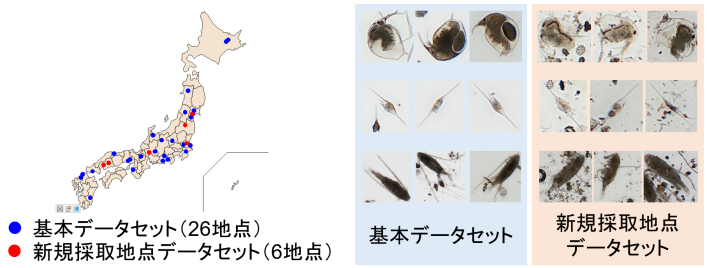


図3-6. サブテーマ１から提供された性能評価実験に用いたデータの概要

まず、26地点の湖沼で採取されたプランクトン群集画像からなる基本データセットを用意した。プランクトンの判別精度を評価するために、群集画像につけられた各個体の矩形を利用して抽出されたプランクトン画像を用いる。学習用に15、886枚のプランクトン画像を、学習の進みを確認する検証用に2,961枚のプランクトン画像を、分類精度の評価に3,799枚のプランクトン画像を用いる。これらのプランクトン画像の「種」のクラス数は76である。学習、検証、評価のサブセットは、ランダムに選択されたものであるため、学習と評価には、同じ地点で採取されたプランクトンが含まれている。分類手法の汎化性を評価するために、新規採取地点データセットを用意した。これは、基本データセットと別の6地点で採取されたサンプルからなるデータセットであり、基本データセットを構成する26地点で採取されたサンプルが含まれていない。新規採取地点データセットのプランクトン画像を評価に用いることで、分類手法の汎化性を評価することができる。

学習では、15,886枚のプランクトン画像を使用するが、CNNを十分に学習するためには画像枚数が足りない可能性がある。そこで、入力画像に変動を加えることで、CNNの学習精度を高める図3-7に示すようなデータ拡張を導入した。

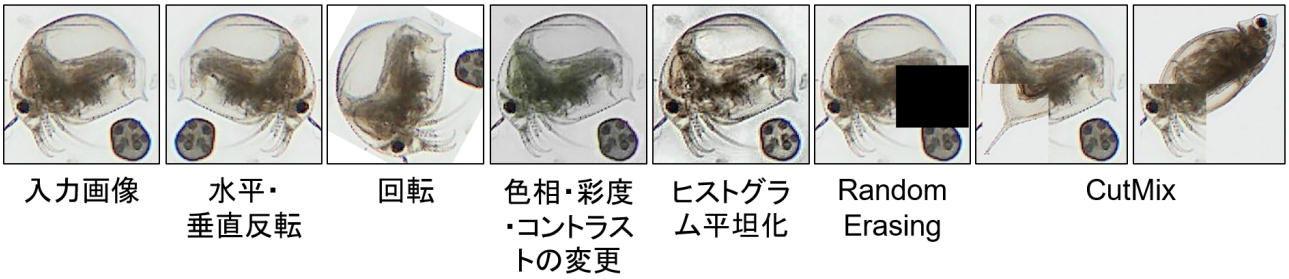


図3-7.データ拡張例

プランクトンは、様々な向きで撮影されるため、水平・垂直反転と回転は現実的な画像変動である。水質や顕微鏡の証明設定により明るさが異なるため、色相・彩度・コントラストを変化させることで、そのような変化を模倣することができる。顕微鏡のフォーカス設定により画像がぼけたりシャープになったりする。このような変化を模倣するためにヒストグラム平坦化を適用する。プランクトンが重なったり、ゴミが付着したりすることで、部分的な欠けが生じる。これを模倣するためにRandom Erasingを適用するとともに、複数の画像を混在させるCutMixも施す。これらのデータ拡張は、CNNの学習時において入力画像に確率50%で適用した。

プランクトン計数手法の評価実験では、Faster R-CNNに加えて、物体検出で一般的に広く用いられている手法と比較した。具体的には、SSD (Liu, et al. 2016)、YOLOv3 (Redmon et al. 2018)、YOLOv5(https://github.com/ultralytics/yolov5)、RetinaNet (Lin et al. 2017)、FCOS (Tian et al. (2019) と比較する。プランクトン群集画像を入力とし、矩形がつけられたプランクトンの検出割合を用いて評価した。

４．　サブテーマ３結果及び考察

プランクトン群集画像からのプランクトン検出（計数）の実験結果およびプランクトン画像の分類（自動判別）の実験結果についてまとめる。

表3-2. 各手法による、プランクトン群集画像からのプランクトン検出（計数）とプランクトン画像の分類（自動判別）の実験結果。

まずは、プランクトン検出の結果について述べる（表3-2）。検出対象のプランクトンの数は4,216であり、そのうち検出できた数を検出数、検出できなかった数を未検出数、プランクトンではない領域を検出した数を誤検出数としている。「検出」の定義は、ラベル付けられた検出枠と各手法で推定された検出枠の重なった割合が0.5以上とする。実験結果より、Faster R-CNNが最も検出率が高く、プランクトンを正確に計数できていることがわかる。一方で、Faster R-CNNは誤検出が他の手法に比べると多い。これは、プランクトンではない領域を誤検出しているのではなく、プランクトン群集画像にお

表3-2. 各手法による、プランクトン群集画像からのプランクトン検出（計数）とプランクトン画像の分類（自動判別）の実験結果。

手法	プランクトン数	検出数	未検出数	誤検出数	検出率 [%]	IoU
SSD	4,216	3,158	1,058	802	74.9	0.776
YOLOv3		3,324	892	1,067	78.8	0.775
YOLOv5		2,770	1,446	579	65.7	0.772
RetinaNet		2,865	1,351	488	68.0	0.803
FCOS		3,375	841	630	80.1	0.813
Faster R-CNN		3,931	285	2,371	93.2	0.781

- IoU (Intersection over Union)：正解と検出結果のバウンディングボックスが重なっている割合
- IoU>0.5 の検出結果を「検出」とする

いて矩形の枠がつけられていないプランクトンを検出してしまったために、誤検出と評価されたからである。そのため、プランクトン群集画像のラベル付けの精度を改善するか、あるいは、プランクトン検出に特化したデータセットの作成を検討する必要がある。これらについては、継続的に検討する予定である。図3-8は、Faster R-CNNを用いてプランクトン群集画像からプランクトンを検出した結果を示す。緑は正しく検出でき、かつ、プランクトンを正しく分類できた枠、青は正しく検出できたが、プランクトンを正しく分類できなかった枠を示す。ここでは、プランクトンの計数を目的としているため、緑および青の枠は、正しくプランクトンが検出できたと考えてよい。オレンジは誤検出の枠である。ゴミを誤ってプランクトンとして検出したり、検出枠が付与されていないプランクトンを検出したりしている。赤は未検出である。Faster R-CNNでは、未検出が少なく、小さいプランクトンや重なっているプランクトンが未検出となっているため、大きな問題にはならないと考えられる。以上より、Faster R-CNNを用いることで、プランクトン群集画像からプランクトンを計数できることが示された。

図3-8. Faster R-CNNを用いてプランクトン群集画像からプランクトンを検出した結果の例。

次に、プランクトンの分類結果について述べる。提案手法であるML-ABNの有効性を確認するために、ResNet50 (He et al.2016)、ABN (Fukui et al.2019)、MC (Dhall et al.2020) と分類精度を比較する。MCは、プランクトンと同様に分類階級で命名される鳥類を分類するために提案された手法である。提案手法については、Attention Branchを設定する階級を変更させて分類精度を評価した。例えば、「提案手法（属・種）」の場合は、属のAttention Branchでアテンションマップを求め、それを特徴マップに掛け合わせて種のPerception Branchで分類することを示す。「提案手法（科・属・種）」であれば、科と属のそれぞれのAttention Branchを設け、それらのアテンションマップを用いて種のPerception Branchで分類することを示す。「提案手法（綱・目・科・属・種）」がデータセットで設定されている分類階級ラベルを全て利用したML-ABNであることを示す。分類精度は、Accuracy と F1スコアを用いて評価した。Accuracyは、正解率を示し、データセットに付与されたラベルと推定されたラベルの一致度を表す。F1スコアは、分類結果に対する種類ごとの正解率の平均 (Precision) と各正解クラスを正しく分類できた割合の平均 (Recall) の調和平均を表す。AccuracyもF1スコアも値が高いほど分類精度が高いことを示す。まずは、基本データセットを用いた実験結果を表3-3に示す。各手法において、各階級におけるラベルの正解率を評価した結果と、種におけるF1スコアを示している。一番上位の「綱」では、どの手法でもほぼ正しく分類できている。階級が下がることで分類精度が低下している。最下層の「種」では、どの手法でも90%程度の正解率であるが、「提案手法（目・科・属・種）」が91。8%であり、最も高い精度でプランクトン画像を分類できている。ただ、基本データセットの場合は、学習データにも評価データにも同じ地点で採取されたサンプルが含ま

れるため、分類手法の基本性能しか評価できないことに注意されたい。

表3-3. 基本データセットのプランクトン画像を各手法で分類判別した実験の結果。

手法	綱	目	科	属	種	
	Acc. [%]					F1 [%]
ResNet50	99.3	98.6	94.1	93.1	90.5	74.9
ABN	99.5	98.8	94.2	92.9	90.5	76.6
MC	99.5	98.6	93.9	93.0	90.5	74.4
提案手法(属・種)	99.6	98.9	94.5	93.7	91.2	77.6
提案手法(科・属・種)	99.4	98.7	94.2	93.0	90.4	79.2
提案手法(目・科・属・種)	99.5	98.9	94.9	94.1	91.8	77.8
提案手法(綱・目・科・属・種)	99.5	98.8	94.5	93.4	90.8	77.0

Acc.:分類結果の正解率
F1:分類結果に対する種類ごとの正解率の平均 (Precision) と各正解クラスを正しく分類できた割合の平均 (Recall) の調和平均

表3-4は、新規採取地点データセットを用いた実験結果である。学習データに含まれていないサンプルを用いて評価を行っているため、各手法の汎化性（実用性）を評価することができる。基本データセットの結果と比べると、新規採取地点データセットの結果は全体的に分類精度が低くなっている。新規採取地点のプランクトンの形状が基本データセットのプランクトンの形状と異なっていたり、水質が異なっていたりすることが原因と考えられる。

表 3-4. 未知プランクトン画像を含むデータセットに対して、各手法で分類判別した実験の結果。

手法	綱	目	科	属	種
	Acc. [%]				
ResNet50	88.4	82.2	74.2	64.3	59.1
ABN	88.4	82.5	73.2	64.8	59.5
MC	88.5	83.1	74.8	68.4	63.0
提案手法(属・種)	88.8	84.0	75.8	65.6	60.2
提案手法(科・属・種)	90.3	84.8	77.5	68.6	61.9
提案手法(目・科・属・種)	92.6	86.5	79.0	69.9	64.0
提案手法(綱・目・科・属・種)	93.4	88.8	80.7	71.6	65.4

Acc.:分類結果の正解率

その中でも、「提案手法（綱・目・科・属・種）」は、「属」において唯一70%を越え、「種」において65.4%の分類精度であった。まだ改善の余地はあるが、分類階級を利用してプランクトン画像を分類することの有効性を実証することができた。

引用文献

He et al. (2016) “Deep residual learning for image recognition,” CVPR, pp. 770-778.

Fukui et al. (2019) “Attention branch network: Learning of attention mechanism for visual explanation,” CVPR.

Dhall et al.（2020） “Hierarchical image classification using entailment cone embeddings,” CVPR, June 2020.

５．　サブテーマ３研究目標の達成状況

サブテーマ３では、研究計画書において

１．サブテーマ１、２より提供される教師データを用い、光学顕微鏡画像中のプランクトンを認識・同定する自動判別手法を開発する。

２．光学顕微鏡を用いた動・植物プランクトン計数システムを開発する。

３．プランクトン自動判別・計数システムを開発し、モック群集や野外で採集されたプランクトン群集を用いて評価解析を行い、実装可能なシステムを構築する。

の3つの目標を設定した。１．については、プランクトンの分類階級を用いた手法を考案し、十分な精度でプランクトンを分類することができたため、十分に達成されたと考えられる。２．については、動物プランクトンについて、群集画像からプランクトンを検出する基本検討を行うことができた。群集画像のラベル付けの問題により誤検出が多くなってしまったが、全てのプランクトンをラベル付けできれば、誤検出がほとんどなかなったことは明らかである。評価実験を通してFaster R-CNNの有効性も十分に評価できており、システムとしては開発していないが、計数手法としては十分に検討することができた。３．については、新規採取地点データセットを用いた評価実験を通して、実際の環境下における提案手法の有効性を十分に評価することができた。システムとしては開発できていないが、プランクトン自動判別・計数手法としての基本要素の検討は十分にできたと考える。以上より、サブテーマ３の「高度画像解析手法によるプランクトン自動判別・計数システムの構築」は、システムとしての構築まではできなかったが、プランクトンの自動判別と計数に必要不可欠な基本要素については十分に開発することができた。

Ⅱ－４　サブテーマ４「プランクトン群集短期予報のための群集要素抽出と時系列解析による実証」

［サブテーマ４要旨］

琵琶湖北湖で実施された生態・環境変数の長期観測データを利用して、Multiview Embedding；Ye & Sugihara 2016）の性能を検証した。その結果、水質や他のプランクトン種の変動情報を利用したモデルは短期(2週間先)だけでなく中期(6ヶ月先)の予測精度が大きく向上することがわかった(相関係数≒0.8)。特に、長期(-4ヶ月前)の他プランクトン種変動データは予測の良さを大きく向上させることがわかった。本予測モデルはRでの入力・計算・出力をブラウザ上で行えるウェブアプリケーション「Shiny」によって実装した。これらをもとに詳細な解析を行ったところ、1979年から2018年にかけての琵琶湖での植物プランクトン種数の増加は、各種の自己抑制の密度依存性の高まりに起因することを明らかにした。また、複数の生物種をまとめるアグリゲーションが予測の良さを大きく左右することを見出すと共に、最適なアグリゲーションをデータから探索的に決定する手法を開発した。これらの知見を活かすことで、今後、開発された予測アプリの性能をさらに向上させるための発展の方向性が明らかになった。時系列データが整備されればプランクトン変動の中期予測が可能になること、生物種ｗまとめるアグリゲーション手法の有用性が確認できたことなど、期待以上の成果が得られたことから、サブテーマ４の自己評価は２とした。

１．　サブテーマ４研究開発目的

高度画像解析技術に基づく革新的なプランクトン自動判別・計数システムから得られる観測データに基づいて、植物プランクトンの変動を予測するための技術を開発し、その高度化に資する生態学的研究や統計モデリングに関する研究、さらにアプリケーション開発を行うことを目的とする。

２．　サブテーマ４研究目標

サブテーマ４	プランクトン群集短期予報のための群集要素抽出と時系列解析による実証
サブテーマ４実施機関	東北大学大学院生命科学研究科
サブテーマ４目標	（１）　琵琶湖などで公開されている既存の観測データを利用し、プランクトン群集動態予測モデルを構築し、予測範囲とその精度について検証を行う。 （２）予測モデルを一般化し、他の湖沼でも利用できるアプリケーション化する。 （３）開発されるプランクトン自動判別・計数システムのデータを利用した予測モデルを構築、短期予報の実証を行う。予測のためのパイプラインを完成する。

３．　サブテーマ４研究開発内容

サブテーマ４では互いに関連する以下の研究課題を実施した：

<u>プランクトン変動予測に求められる観測項目の抽出</u>

滋賀県立琵琶湖環境科学研究センターを主体として実施された、琵琶湖北湖における植物プランクトン群集・水質モニタリングから作成したデータセットを用いてプランクトン動態の非線形時系列予測モデルを構築した。最適予測モデルは複数の物理環境とプランクトンの時間遅れ変数から選択され、水質・プランクトン変数の予測における相対的重要性、選択された変数のパターンと水質・プランクトン変数の関係を考慮した解析を行った。

<u>植物プランクトン群集変動主要因解析</u>

びわ湖における植物プランクトン観測データを利用し、過去40年間の群集変動を主成分分析を利用することで「見える化」すると同時に、この変動がいかなる水質要素の変化と関連しているかを冗長性分析（RDA）によって調べた。

<u>プランクトン個体群変動の自己抑制効果の役割の検証</u>

びわ湖における植物プランクトン観測データより、多種を対象に個体群成長率と個体群密度の間の

関係を調べることで、多様性パターンを生み出す原因の解明のため、各種の動態が自種、他種の頻度によってどの程度規定されているかを検証した。

生物群間相互作用の分類解像度依存性解析

生物間相互作用は種のみならず、属・科など様々な分類レベルに適用可能である。ここではびわ湖の植物プランクトン観測データに新しく開発した非線形時系列因果推論を適用することで異なる分類レベル間の相互作用におけるパターン発見を試みた。特に、属・科といった高次分類群での相互作用が、種のような低次分類群での相互作用とどのような対応関係を持つかに着目した解析をおこなった。また、同様の解析手法を土壌微生物群集の培養実験系データにも適用し、本手法の活用の可能性を検討した。

予測モデルのアプリケーション化

時系列データに基づく非線形予測手法の一つであるS-mapを、誰もが容易に利用できるよう、Rでの入力・計算・出力をブラウザ上で行えるウェブアプリケーション「Shiny」によって実装した。

アグリゲーションによる予測性能の向上

複数の生物種を一つにまとめる（アグリゲーション）ことによるモデル予測のパフォーマンス向上に資する研究を実施した。

その他、多種時系列データから群集変動を構成する確率論・決定論的プロセスを評価する手法に関する研究や、撹乱環境下の群集動態に関する研究も合わせて実施した。

４．　サブテーマ４結果及び考察

サブテーマ４では以下の６つの結果を得た。それぞれの結果について考察する。

プランクトン変動予測に求められる観測項目の抽出

琵琶湖で行われた生態・環境変数の長期観測データを利用して、予測モデルの設定や条件、利用すべきデータについて検討を行った（成果番号12）。

最初に、特定の植物プランクトンの変動予測に関連して、他種の個体群変動データを利用した予測の改善について検討した。利用した観測データは 39年（1979年4月から2018年3月）に渡り琵琶湖の流出河川である瀬田川で実施された毎週の植物プランクトン観測（全2016回） によるものである。データに記録された621種の植物プランクトンのうち、種(16種)・科(12種)・綱(5種)に着目した（図4-1）。Multi-View Embeddingを利用した検討の結果、予測ターゲット以外の生物種の観測データを利用することで、予測が大きく改善することが確かめられた（図4-2）。これは、生物の密度変化には相互作用する他の生物に関する情報が含まれるため、多種の観測データは同一のシステムに対する多数の「視点」を提供することで予測精度が改善するという理論的予測（Ye & Sugihara 2016）を支持している。

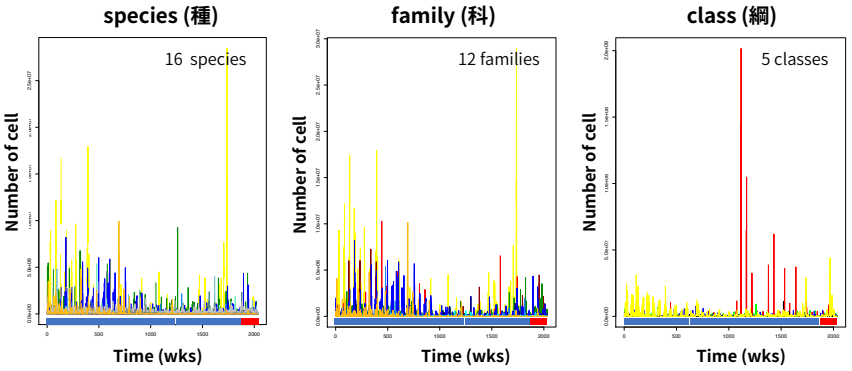


図4-1. 本研究で利用した琵琶湖瀬田川における長期プランクトン観測データ。

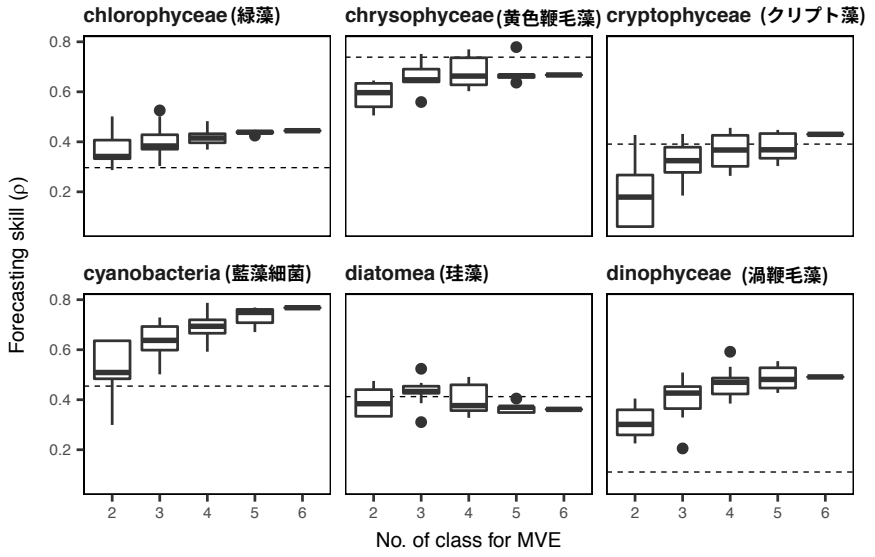


図4-2. ６つの植物プランクトンの綱について、Multi-View Embeddingを用いた１週間先の予測を行った。ターゲットとなる綱に加えて、他の１～５綱の観測データを利用した状態空間の再構成を実施し、これに基づいた予測値と実測値の予測の良さ（相関係数）を評価した。

続いて、植物プランクトンの変動予測において、利用すべきデータの観測時期に関する検討を行った。植物プランクトンの個体群密度変動はその変動メカニズムに由来する特定の「ルール（方程式）」に従って生じると予想されるが、この「ルール」は時間と共に変動してしまう可能性がある（成果番号14）。この時、変動ルールが異なる時期の観測データを使って予測モデルを構築しても、予測は良くないだろう（成果番号13）。この可能性を検討するために、1979～2018年のプランクトン変動データ（種、属、綱レベルの３通り）をPERIOD 1(1979-1991, EARLY)、PERIOD 2 (1991-2003, MIDDLE)、PERIOD 3 (2003-2015, RECENT)に分けた上でそれぞれのデータを使った状態空間の再構成を行い、直近3年間（2015-2018）の変動予測を試みた（図4-3）。その結果、高い分類解像度（種、属）での変動予測では、昔のデータを利用するほど直近の変動予測は悪くなったのに対して、低い解像度（綱）ではどのデータを利用しても高い予測性能を示した。このことは、変動ルールには時間依存性があり、これが予測モデルの予測の良さを低下させるが、この効果は低い分類解像度では弱くできることを示しているように思われる。

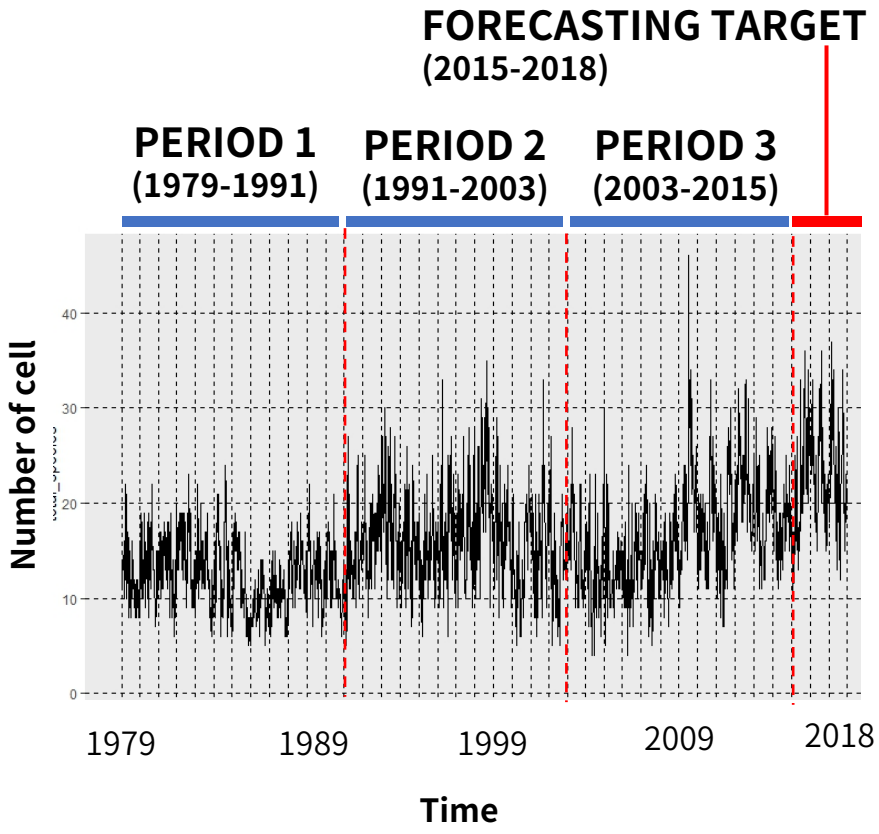


図4-3. 本研究の概念図 1979-2018データを３つの期間（PERIOD 1, 2, 3）に分けて予測モデルをそれぞれについて構築した上で、FORECASTING TARGET (2015-2018)の変動予測を実施する。

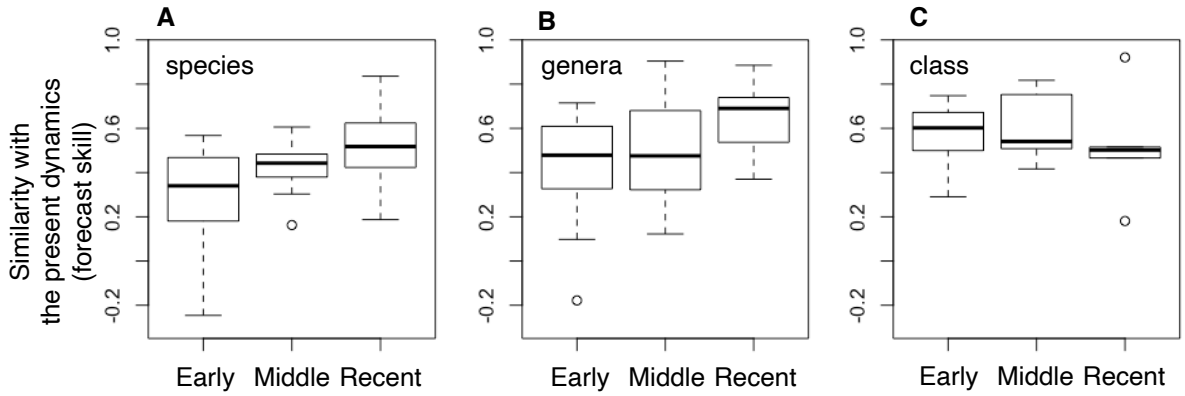


図4-4. 予測の良さの観測データ依存性 種（A)、属（B)のいずれの生物学的レベルにおいても、最も最近のデータ（Recent）を使った予測モデルが最もパフォーマンスが高く、ついでMiddle、Earlyの順にパフォーマンスは悪くなっていった。それに対して綱（C)のレベルにおいては、どのデータを使っても予測の良さは変わらなかった。

最後に、大型緑藻（*Staurastrum dorsidentiferum*)を対象に、Multiview Embedding(Ye & Sugihara 2016)を利用した予測モデルを構築し、変動予測をする際に採用すべき変数の種類の検討を行った（図4-5）。７種類の植物プランクトン変動データ（*Staurastrum dorisdentiferum*、 *Aphanothece clathrata*（藍藻）、 *Stephanodiscus suzukii*（珪藻）、 *Stephanodiscus pseudosuzukii*（珪藻）、 *Cryptomonas sp.*（クリプト藻）、 *Rhodomonas sp.*（クリプト藻）、 *Closterium aciculare*（緑藻)) と７種類の非生物要因変動データ（NO_3、 PO_4、 SiO_2 および彦根気象台での日平均気温、 日降水量、 日日照量、 日平均風速）を用意し、各因子の予測改善への貢献から、生物/非生物要素が個体数変動に果たす役割についての示唆を得ることが目的である。その結果、プランクトン自身の時間遅れ情報だけで構築したモデルと比べ、水質や他のプランクトン種の情報を利用したモデルは短期(2週間先)だけでなく中期(6ヶ月先)の予測精度が大きく向上した(相関係数≒0.8; 図4-5)。また、取りうる時間遅れの数

を増やすと(～4ヶ月前)予測精度が向上し、その際、最適予測モデルに含まれる生物変数の割合も増加した(全変数のうち約60%)。最後に最適予測モデルに選択された変数の時間遅れ数を調べたところ、物理環境よりもプランクトン変数の方がより過去の情報が予測モデルに利用されていることがわかった。これらの結果は、どれほど未来の予測を目指すかに関わらず、良い予測には生物要因と非生物要因の両方が重要であること、生物・非生物要因を考慮せず、自身のデータのみから予測すると遠い将来の予測は悪くなること、将来予測を実現しようとするほど生物観測データの重要性が高まること、過去のデータを予測に利用できるときには、生物的要因は非生物要因よりもより予測に貢献することが明らかとなった（図4-5、4-6）。

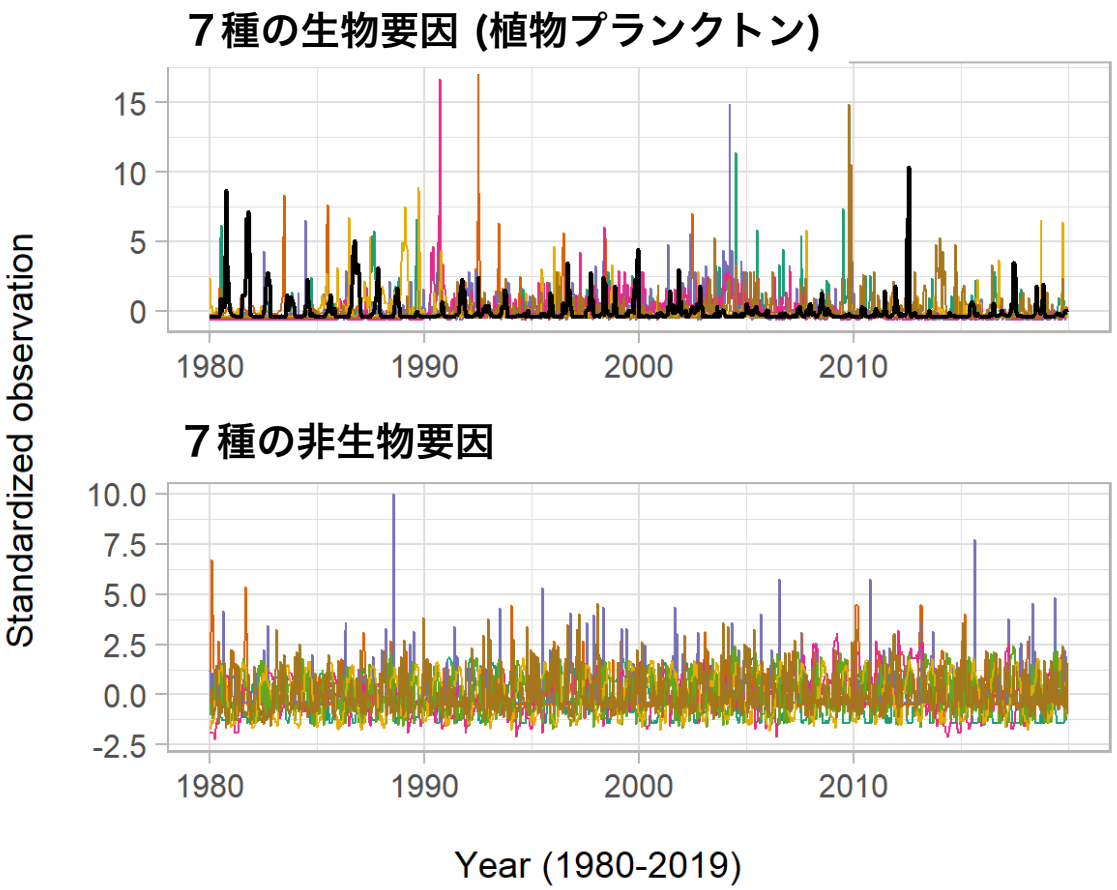


図4-4. 予測の良さの観測データ依存性 種 (A)、属 (B)のいずれの生物学的レベルにおいても、最も最近のデータ（Recent）を使った予測モデルが最もパフォーマンスが高く、ついでMiddle、Earlyの順にパフォーマンスは悪くなっていった。それに対して綱 (C)のレベルにおいては、どのデータを使っても予測の良さは変わらなかった。

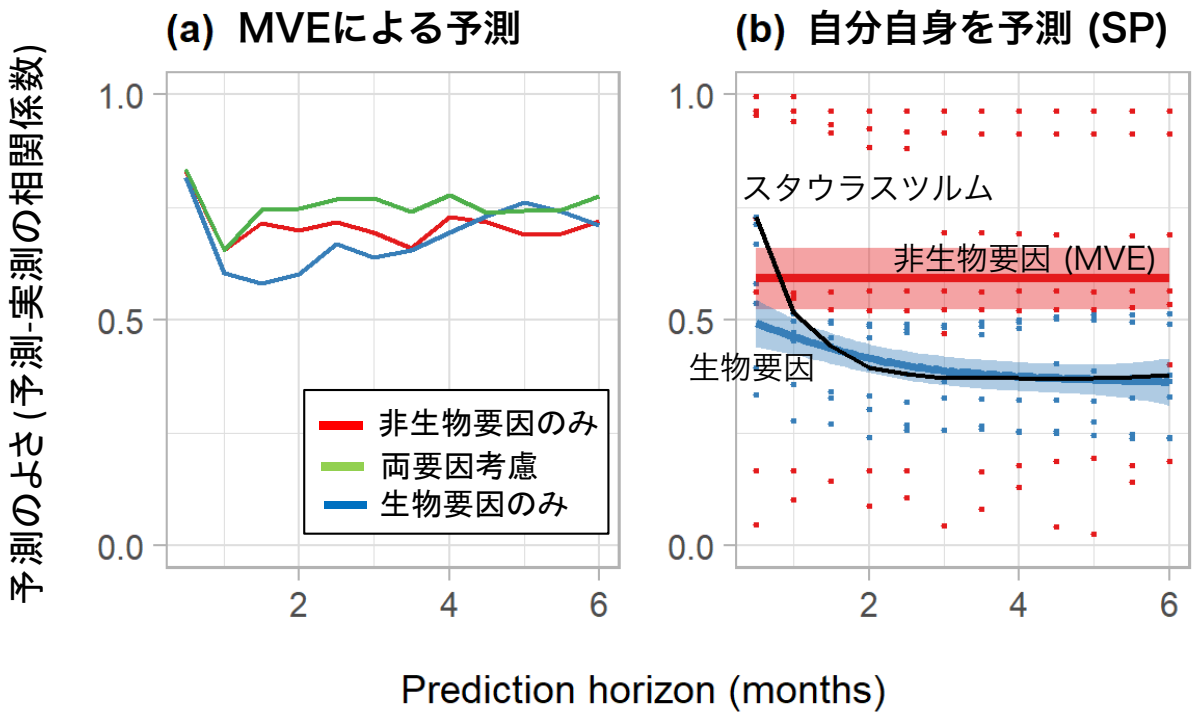


図4-5. MVEによる予測を試みたところ、生物要因と非生物要因の両方を考慮したモデルが最も良い予測を実現した。ただし予測先が遠いほど、生物学的要因の変動データの重要性が高まる傾向がある。

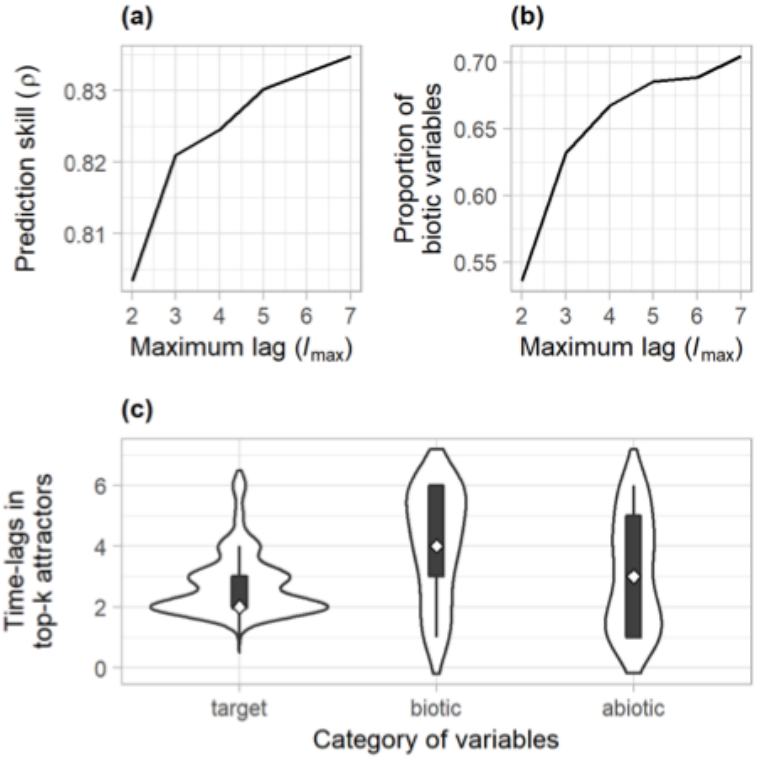


図4-6. MVEによる予測における過去データの重要性 (a) 生物/非生物要因によらず、過去観測データ利用は予測を改善する。(b) より過去のデータを予測に利用できるときには、生物的要因は非生物要因よりもより予測に貢献する。また(c) 性能の良い予測モデルにおいおいて、過去の観測データが重要になるのは生物要因であった。

(1) 琵琶湖プランクトン群集変動主要因解析

本研究では、琵琶湖の流出河川である瀬田川において40年間にわたって実施された毎週の植物プランクトン観測データを利用して、この間の群集組成の変化を可視化した（図4-7）。その結果、この40年間の群集組成変動にはいくつかの特徴的なパターンがあり、(1) 総リン量の減少、(2) 総窒素量の増加、(3) 水温の変化と密接に関わる３つのフェーズに分けられることがわかった（図4-8）。

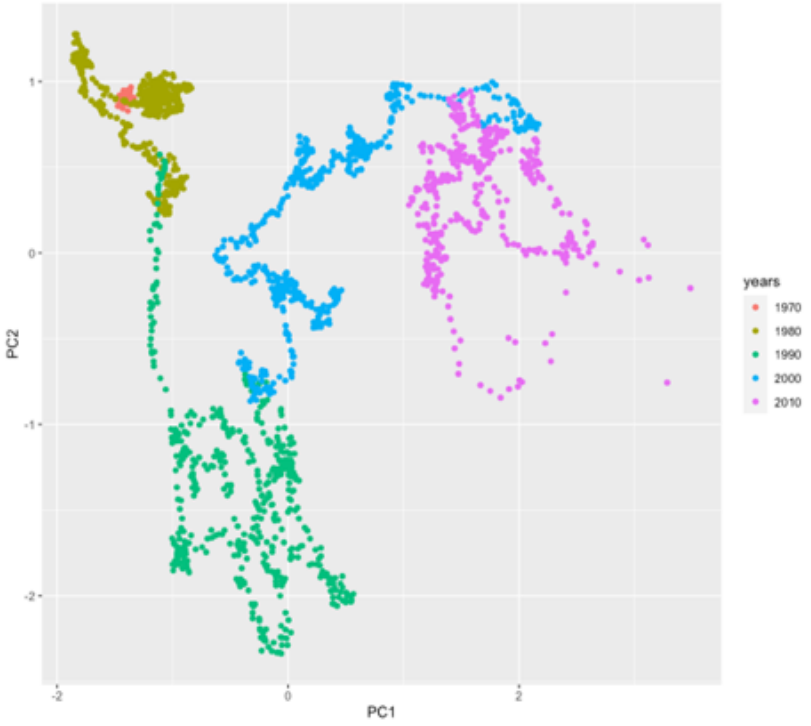


図4-7. PCAによって二次元空間に描かれた過去40年間のびわ湖プランクトン群集組成の変化。

図4-8. 冗長性分析（RDA）によって見出された、過去40年間のプランクトン群集組成変動と特に強い関係を持つ環境要素。

プランクトン個体群変動の自己抑制効果の役割の検証

主観競争に関わる生態学理論では、個体群成長率の負の密度依存性（自己抑制）は特定の生物種による他種の競争排除を抑止し、他種共存を促進しうることを予測している。琵琶湖では1979年から2018年にかけて、植物プランクトン種数の増加している（図4-9）。この種数増加がもたらされた原因として、理論予測されるとおり自己抑制効果が役割を果たしているかどうかの検証を実施した。プランクトン個体群の増殖率を相対密度に対してプロットしたところ（図4-9）、負の密度依存が検出され、しかもその効果は種数が多くなった2010年代の方が1990年代よりも強くなっていることがわかる。この結果は、近年にかけての植物プランクトンの種数の増加は、自己抑制効果が高まったことで種間の共存可能性が高くなっていることに起因する可能性があることを示唆している。

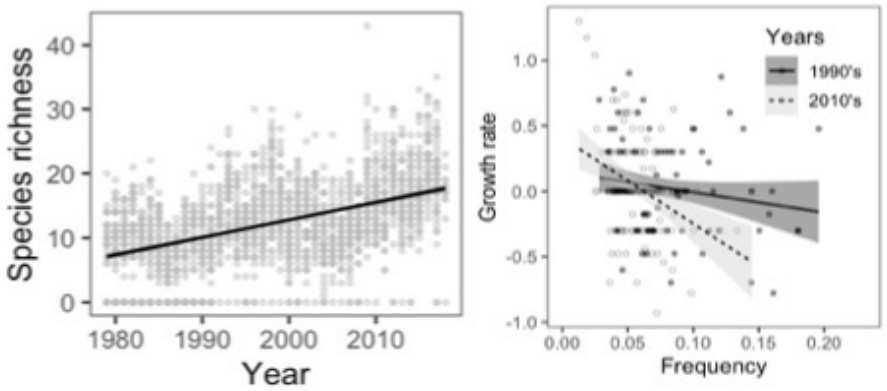


図4-9. 1979年からの 40年間での種数増加のトレンド(左)と自己抑制効果の評価（右）。1990と2010年代での珪藻Nitzschia.属についての頻度と成長率の関係、近年ほど負の関係が強い

生物群間相互作用の分類解像度依存性解析

びわ湖の植物プランクトン観測データをもとに、種、属、科などの異なる生物学的レベルの時系列データを作成し、線形時系列因果推論（Sugihara et al. 2012）を適用することで、これらの様々な生物学的レベルにおける相互作用を特定した（成果番号40）。異なる生物学的レベルでの相互作用の間の関係性を明らかにすべく、高次分類群における相互作用の在不在が、低次での生物間相互作用の多寡にどう依存するかを解析した（成果番号41-46）。その結果、高次分類群での相互作用は、そこに含まれる低次分類群での相互作用の数が多いほど存在しやすくなることが明らかとなった（図4-9）。

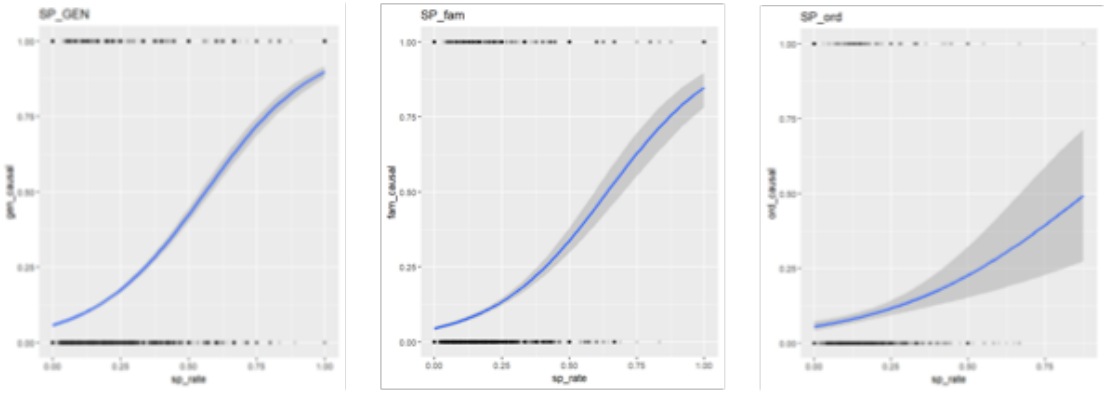


図4-9. 種レベルでの相互作用の密度に対して、高次分類群での相互作用の在不在をプロット ロジスティック回帰の結果から、どの分類階級でまとめても種レベルでリンクが結ばれているほど上位分類階級でリンクが結ばれやすいことがわかる。

予測モデルのアプリケーション化

非線形時系列予測手法であるS-mapに基づいた植物プランクトンの変動予測を簡便に実施できるよう、Rでの入力・計算・出力をブラウザ上で行えるウェブアプリケーション「Shiny」において当該手法を実

装した。過去40年近くにもおよぶ植物プランクトン137属348種の個体群動態データを用いて、非線形予測に必要な埋め込み次元数などの決定過程を自動化し、1週間後の個体群密度を予測するアプリケーションを作成した。短期予測の可能性を、いくつかの植物プランクトン（*Synedra*、*Uroglena*、*Phormidium tenue*、*Staurastrum dorsidentiferum var. ornatum*）で検証した（図4-10、 11、 12）。具体的には、データの一部を使って非線形時系列解析を行い、ある時点までの観察値から、何時点先の個体数が推定できるかを調べた。予測の良さは対象とする生物群によって異なるが、おおよそ１ヶ月以上の予測はどの場合も困難であった（図4-13）。

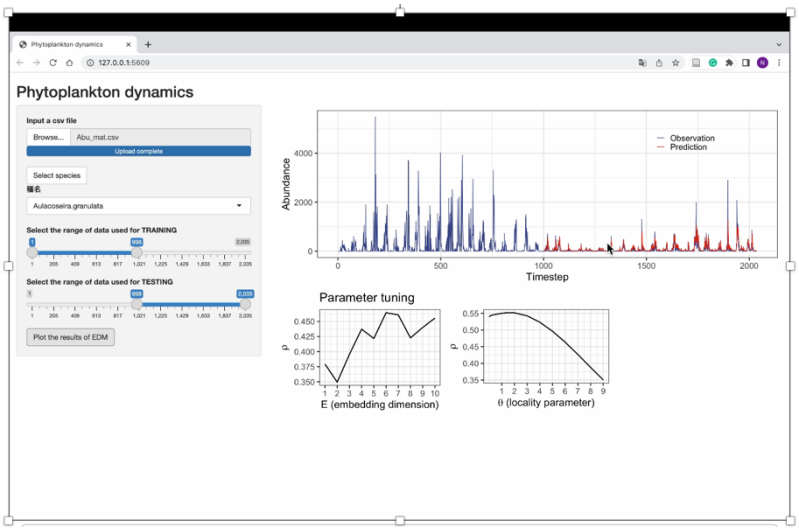


図4-9. 作成した予測アプリケーションのユーザーインターフェース。

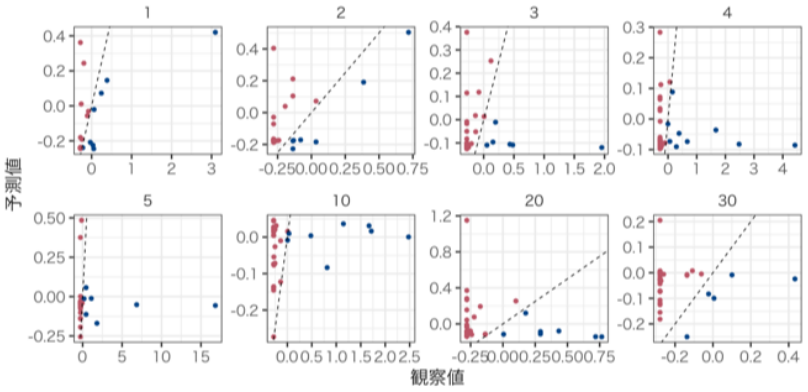


図4-10. 観測値と予測値の散布図。*Uroglena*の場合を示す。図の上の数字は予測先（週間）。

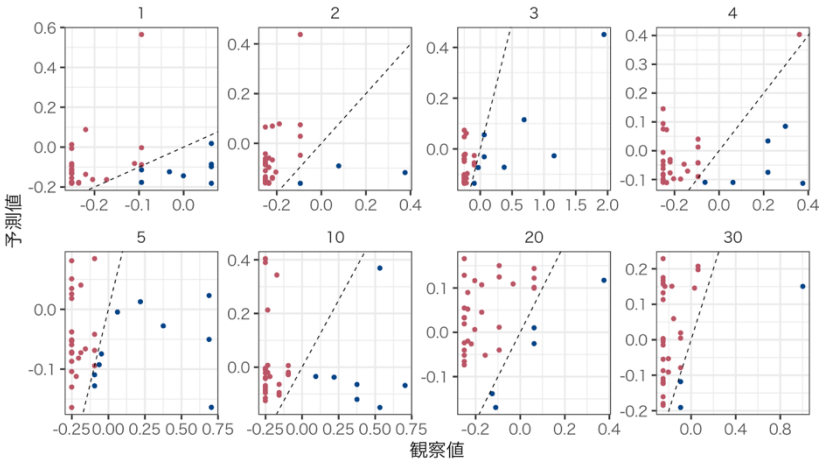


図4-11. 観測値と予測値の散布図。*Synedra*の場合を示す。図の上の数字は予測先（週間）。

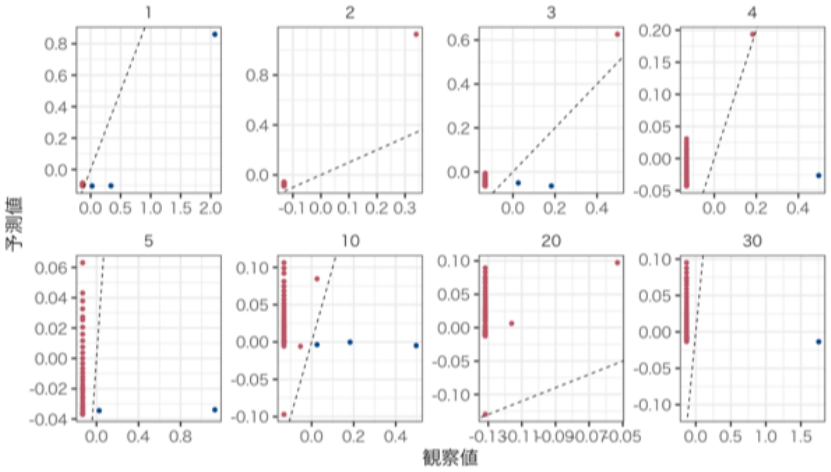


図4-12. 観測値と予測値の散布図。*Phormidium tenue*の場合を示す。図の上の数字は予測先（週

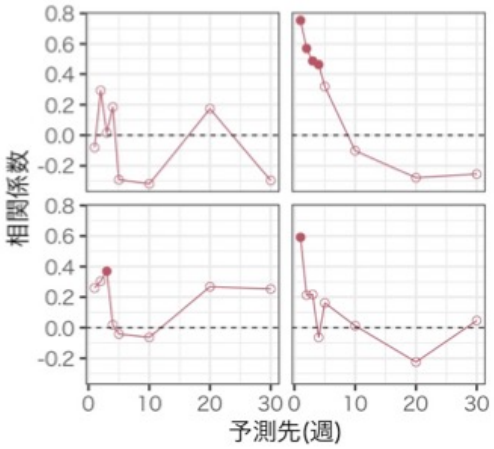


図4-13. 当該モデルによる予測のよさ 予測の良さ（予測値と実測値の相関係数）は予測対象となる種、属によってばらつくが、予測先を遠くするほど将来予測が低下する。塗りつぶしの印は相関が有意なもの。

アグリゲーションによる予測性能の向上

異なる複数の種をまとめる（アグリゲーション）ことで予測を向上させる手法について検討を行った。大きく分けて、(1) 分類解像度・サイズに基づくグルーピングが非線形時系列予測のパフォーマンスに及ぼす影響の評価、(2) 変動の複雑さのアグリゲーション依存性の評価、(3) 最適アグリゲーション手法の開発を行った。これらを順に解説する。

最初に、1979-2018年に渡る40年間の観測データを用いて、分類解像度がS-mapを用いた予測の良さに及ぼす影響を評価した。その結果、分類の解像度を低めるほど、予測値と観察値のフィットは向上することが明らかになった（図4-14）。また同様に、サイズ分画によりアグリゲーションを行うと、この場合も予測は向上した（図4-15）。これらの結果は適切なアグリゲーションが植物プランクトンの変動予測性を高めることを示唆している。

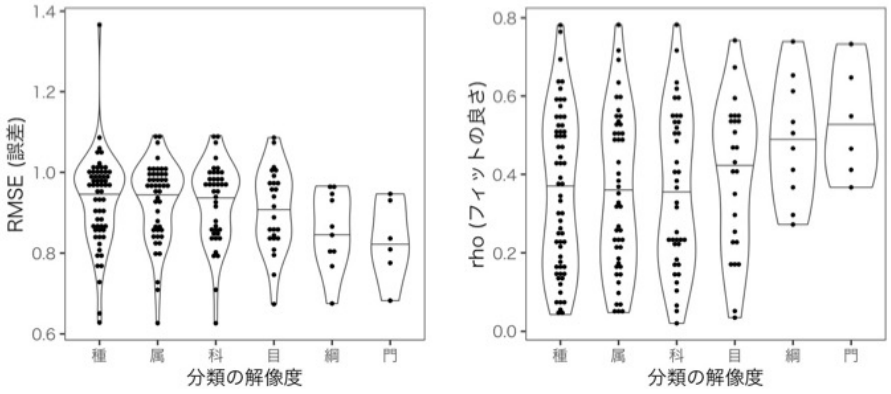


図4-14. 分類解像度と予測の良さの関係 予測の良さはRMSE（左）と相関係数（右）によって評価した。いずれに場合も目以下の分類解像度で予測が向上した。

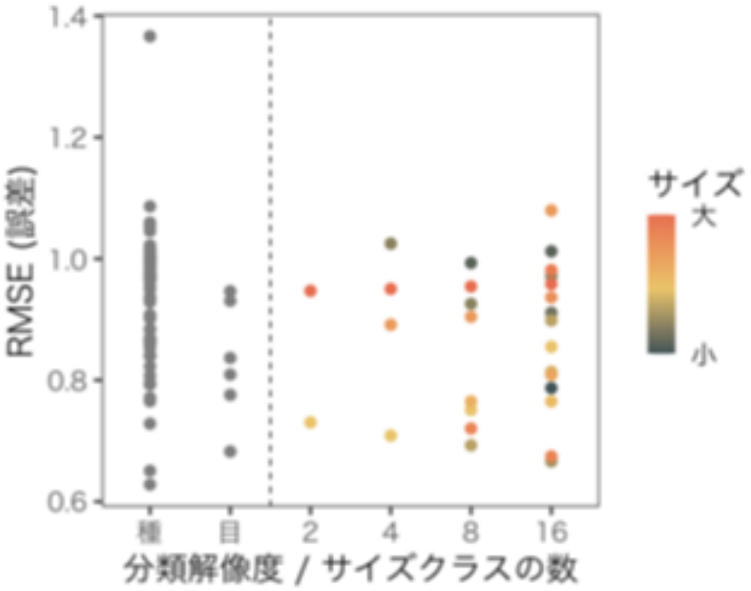


図4-15. サイズ分画による解像度低下と予測の良さの関係 予測の良さはRMSEによって評価した。解像度の低下（アグリゲーション）は予測をよくする効果があることが認められる。

次に、アグリゲーション法が、個体群密度の変動性に及ぼす影響を評価した。全植物プランクトン種をコロニー形成の有無、細胞サイズ（ピコ、ナノ、マイクロ）、栄養塩吸収（auto/mixo-troph）、分類群（緑藻、藍藻、珪藻、鞭毛藻）の３通りのやり方でアグリゲートした（図4-16）。そして、アグリゲーションごとに変動予測のしやすさをLyapunov Exponent（微妙な初期値のずれの将来拡大率）で評価した。その結果、珪藻、マイクロ、鞭毛藻は予測性が高いのに対し、コロニー形成種、藍藻類、独立栄養は予測が困難になりやすいことが明らかになった。適切なアグリゲーション法を見つけ出すことができれば、プランクトン変動予測はより正確に、容易になるかもしれないことが示唆された。

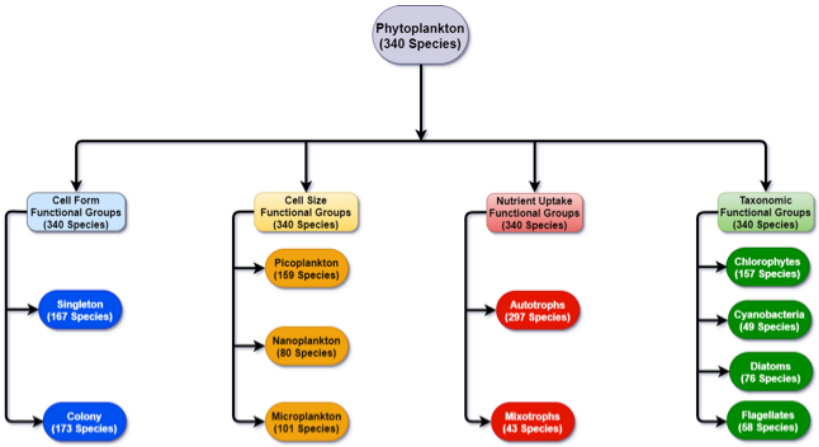


図4-16. ４種類のアグリゲーション基準に基づいて、11種類のグループを作成した。

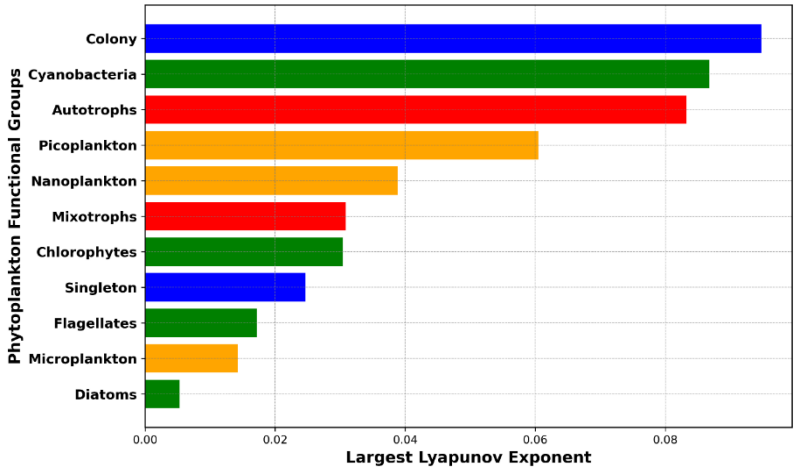


図4-17. アグリゲーションによって作成されたグループごとの個体群変動性の違い

この結果を受けて、予測の良さを高めるための最適なアグリゲーションを探索的に発見する手法の開発を行った（成果番号39）。他種の時系列データから対象種の時間変動を予測するという課題を設定した上で、対象種の予測を最も良くするようなアグリゲーションを発見することを目標とした。最終的には、非線形時系列解析(EDM)と組合せ最適化手法を利用して、アグリゲーション最適化問題を解くアルゴリズムを開発することができた。当該手法を琵琶湖の植物プランクトン観測データ（2016-2018）に適用し、最適なアグリゲーションを発見することができた（図4-18）。

引用文献

Sugihara G, May R, Ye H, Hsieh CH, Deyle E, Fogarty M, Munch S (2012) Detecting causality in complex ecosystems. Science, 338:496-500

Ye H., and G. Sugihara, 2016. Information leverage in interconnected ecosystems: Overcoming the curse of dimensionality. Science 353:922-925. (2016) Deep residual learning for image recognition. CVPR 770-778.

Aulacoseira granulata	{Mallomonas sp,Cyclotella sp,Synedra acus},{Aulacoseira granulata var angustissima f spiralis,Asterionella formosa,Staurastrum dorsidentiferum var ornatum} ,{Nitzschia acicularis,Micrasterias sp}
Aulacoseira granulata var angustissima	{Chrysamoeba radians,Cocconeis placentula},{Aulacoseira granulata,Aulacoseira granulata var angustissima f spiralis,Cyclotella sp,Fragilaria crotonensis} ,{Navicula sp,Nitzschia acicularis,Mougeotia sp,Micrasterias sp,Staurastrum dorsidentiferum var ornatum}
Aulacoseira granulata var angustissima f spiralis	NA
Cyclotella sp	{Chrysamoeba radians,Asterionella formosa,Micrasterias sp},{Mallomonas sp,Synedra acus,Navicula sp,Nitzschia acicularis}
Fragilaria crotonensis	{Chrysamoeba radians,Mallomonas sp,Cyclotella sp},{Asterionella formosa,Cocconeis placentula}, {Navicula sp},{Staurastrum dorsidentiferum var ornatum}
Asterionella formosa	NA
Synedra acus	{Chrysamoeba radians,Cocconeis placentula,Staurastrum dorsidentiferum var ornatum}, {Mallomonas sp,Navicula sp},{Aulacoseira granulata var angustissima,Asterionella formosa,}
Cocconeis placentula	{Chrysamoeba radians,Synedra acus,Nitzschia acicularis}, {Aulacoseira granulata,Aulacoseira granulata var angustissima f spiralis,Fragilaria crotonensis,Asterionella formosa,Micrasterias sp},{Navicula sp}
Navicula sp	{Aulacoseira granulata,Micrasterias sp},{Fragilaria crotonensis,Staurastrum dorsidentiferum var ornatum} ,{Asterionella formosa,Synedra acus,Nitzschia acicularis},{Mougeotia sp}
Nitzschia acicularis	{Mallomonas sp},{Aulacoseira granulata var angustissima,Navicula sp},{Fragilaria crotonensis,Mougeotia sp,Micrasterias sp}, {Asterionella formosa},{Staurastrum dorsidentiferum var ornatum}
Mougeotia sp	{Chrysamoeba radians,Synedra acus,Micrasterias sp}, {Cyclotella sp,Navicula sp,Nitzschia acicularis,Staurastrum dorsidentiferum var ornatum},{Fragilaria crotonensis}
Micrasterias sp	{Chrysamoeba radians},{Aulacoseira granulata var angustissima,Aulacoseira granulata var angustissima f spiralis,Asterionella formosa,Synedra acus} ,{Navicula sp},{Staurastrum dorsidentiferum var ornatum}
Staurastrum dorsidentiferum var ornatum	{Chrysamoeba radians},{Aulacoseira granulata var angustissima f spiralis}, {Fragilaria crotonensis,Nitzschia acicularis,Micrasterias sp},{Mougeotia sp}

図4-18. 新たに開発された手法によって特定された最適アグリゲーション

引用文献

Sugihara G, May R, Ye H, Hsieh CH, Deyle E, Fogarty M, Munch S (2012) Detecting causality in complex ecosystems. Science, 338:496-500

Ye H., and G. Sugihara, 2016. Information leverage in interconnected ecosystems: Overcoming the curse of dimensionality. Science 353:922-925. (2016) Deep residual learning for image recognition. CVPR 770-778.

５．　サブテーマ4研究目標の達成状況

サブテーマ4では非線形時系列解析を利用することで、植物プランクトンの変動予測が可能であること、さらに予測性を高めるための手段を複数提示した。特に、予測対象ではない種の長期にわたる変動データの蓄積や非生物要素の観測データが予測向上に貢献することが明らかになった。これによって目標4-1が達成された。またこれらの知見に基づいて、Shinyによる予測モデルの実装を行い、目標4-2及び4-3が達成された。さらに、研究の過程でアグリゲーションが変動予測の良さを向上する可能性のみならず、琵琶湖の植物プランクトンについて、予測を良くするアグリゲーション法を複数提案した。さらに、予測を最もよくする最適アグリゲーションを発見するためのアルゴリズムを開発し、琵琶湖データにて実証試験できた。これらの知見を活かすことで、今後、開発された予測アプリの性能をさらに向上させるための発展の方向性が明らかになった。

Ⅲ．研究成果の発表状況の詳細

（１）　成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	14
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	0
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	2
口頭発表（学会等・査読なし）：	30
知的財産権：	0
「国民との科学・技術対話」の実施：	8
マスコミ等への公表・報道等：	0
研究成果による受賞：	1
その他の成果発表：	1

（２）　誌上発表

＜査読付き論文＞

成果番号	【サブテーマ１】の査読付き論文
1	Sioud, I., W. Makino, J. Urabe. (2022) Comparative phylogeography of *Cyclops vicinus* Uljanin, 1875 and *Cyclops kikuchii* Smirnov, 1932 with implications for differences in their ecological characteristics. Journal of Plankton Research, 43, 974-985. doi: 10.1093/plankt/fbab076
2	Makino, W., H. Suzuki, Yl. Otake, S. Ban, J.Urabe. (2023) The first report of the non-indigenous *Chydorus brevilabris* Frey, 1980 (Crustacea: Cladocera) in Asian freshwaters. Limnology, 24, 151-159. doi: 10.1007/s10201-023-00719-4
3	Ohtsuki,H., H.Norimatsu,T.Makino,J. Urabe. (2022) Invasions of an obligate asexual daphnid species support the nearly neutral theory. Scientific Reports. 12, 7305. https://doi.org/10.1038/s41598-022-11218-4
4	Suzuki, H., W. Makino, S.Takahashi, J. Urabe. (2024) Assessment of toxic effects of imidacloprid on freshwater zooplankton: an experimental test for 27 species. Science of the Total Environment, 927: 172378.

成果番号	【サブテーマ２】の査読付き論文
5	辻彰洋・中川惠・溝渕綾・大塚泰介： 日本珪藻学会誌　第38巻（2022）　［研究ノート］淡水棲プランクトン珪藻*Fragilaria longifusiformis* ssp. *eurofusiformis*の本邦における近年の出現，　38: 14-17.
6	辻彰洋・中川惠： 日本珪藻学会誌　第38巻（2022）　［研究ノート］霞ヶ浦における*Fragilaria saxoplanctonica*の出現状況，38: 18-19.
7	Tuji, A., E. Ogiso-Tanaka and H. Yamaguchi, 2024. Complete genome sequence of *Annamia dubia*, filamentous colony-making Chroococcales with the analysis of FraC gene influencing filament integrity. Journal of Genomics 12: 1-5.
8	Tuji, A. and M. Nakagawa, 2023. The filamentous colony-forming diatom *Aulacoseira pusilla* with a high mantle height/valve diameter ratio. Plankton and Benthos Research 18:225-227.
9	Tuji, A., Y. Niiyama and S. Ichise, 2023. Distribution and phylogeny of *Dolichospermum hangangense* (Nostcales, Cyanobacteria) found in Japanese lakes and reservoirs. Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B 49: 83-95.
10	Ohtsuka, T., T. G. Suzuki and A. Tuji, 2023. Occurrence of a *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Bloom in a Pond near Lake Biwa. Japanese Journal of Water Treatment Biology 59: 27-32.

成果番号	【サブテーマ３】の査読付き論文
11	Koichi Ito, Kanta Miura, Takafumi Aoki, Yurie Otake, Wataru Makino, and Jotaro Urabe, “Zooplankton classification using hierarchical attention branch network,” Proceedings of Asian Conference on Pattern Recognition (LNCS 14407), pp. 409--419, November 2023.

成果番号	【サブテーマ4】の査読付き論文
12	Mori, A. S., Suzuki, K. F., Hori, M., Kadoya, T., Uraguchi, A., Muraoka, H., Sato, T., Shibata, H., Suzuki-Ohno, Y., Koba, K., Toda, M., Nakano, S., Kondoh, M., Kitajima, K., Nakamura, M.: (2023) Sustainability challenges, opportunities, and solutions for long-term ecosystem observations. Philosophical Transactions of The Royal Society B, doi. 10.1098/rstb.2022.0192
13	Otomo, Y., R. Masuda,Y. Osada, K. Kawatsu, M. Kondoh. (2023) Dynamics-based characterization and classification of biodiversity indicators. Ecology & Evolution, DOI: 10.1002/ece3.10271
14	Iwashita, G., Yamawo, A., Kondoh, M. : Royal Society Open Science, (2022) Predator discrimination of prey promotes the predator- mediated coexistence of prey species. Royal Society Open Science, doi. 10.1098/rsos.220859

＜査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）＞
特に記載すべき事項はない。

＜その他誌上発表（査読なし）＞
特に記載すべき事項はない。

（３）　口頭発表

＜口頭発表（国際学会等・査読付き）＞

成果番号	【サブテーマ１】の口頭発表（国際学会等・査読付き）

	特に記載すべき事項はない。

成果番号	【サブテーマ２】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
15	Tuji, A., Niiyama, Y., Ohtsuka, T., Nakagawa, M. & Ichise S. (2023), Taxonomy and phylogeny of geosmin-producing *Dolichospermum* species. 20th International Conference on Harmful Algae, Hiroshima.

成果番号	【サブテーマ３】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
16	Koichi Ito, Kanta Miura, Takafumi Aoki, Yurie Otake, Wataru Makino, and Jotaro Urabe, “Zooplankton classification using hierarchical attention branch network,” Proceedings of Asian Conference on Pattern Recognition (LNCS 14407), pp. 409--419, November 2023.

成果番号	【サブテーマ４】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
	特に記載すべき事項はない。

＜口頭発表（学会等・査読なし）＞

成果番号	【サブテーマ１】の口頭発表（学会等・査読なし）
17	大竹裕里恵, 牧野渡, 大曽根葵, 三浦幹太, 早川慶信, 吉田凌太朗, 伊藤康一, 青木孝文, 辻彰洋, 占部城太郎. 淡水動物プランクトンの、複数分類階級情報を含む顕微鏡画像データベースとその利用例, 日本生態学会第71回大会, 横浜, 2024/03
18	大竹裕里恵, 黒川麻伊, 丸岡奈津美, 中川惠, 牧野渡, 占部城太郎.日本におけるツボワムシ*Brachionus calyciflorus*の分類学的再検討, 日本陸水学会第83回大会, 大分, 2023/10
19	大竹裕里恵・牧野渡・岡田浩輔・大杉奉功・占部城太郎. ゾウミジンコ属*Bosmina tanakai*の分布範囲、及び近縁種との関係の検討, 2023年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 函館, 2023/09
20	大竹裕里恵, 吉田凌太朗, 大曽根葵, 牧野渡, 伊藤康一, 青木孝文, 占部城太郎. 動物プランクトン高解像度群集画像撮影手法の検討：自動種判別・計数システムに向けて, 第70回日本生態学会大会, オンライン, P2-273, 2023/03
21	Otake Y., Yoshida R., Osone A., Makino W., Ito K., Aoki T., Urabe J. An AI system for identifying and enumerating freshwater zooplankton species, OIST-Tohoku University Joint Workshop on Biodiversity, P15, 2022/10
22	大曽根葵, 吉田凌太朗, 牧野渡, *大竹裕里恵, 伊藤康一, 青木孝文, 占部城太郎. 機械学習による動物プランクトン自動判別・計数技術の開発に向けて：畳みこみニューラルネットワークによる種判別精度の検証.2022年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, P12, オンライン. 2022/09
23	牧野渡、大槻朝、丸岡奈津美、占部城太郎、国内オンライン、日本生態学会第69回大会（2022）、日本産ミジンコ属の多様性と分布：DNAバーコーディングの結果から（ポスター発表）
24	牧野渡、鈴木碩通、大竹裕里恵、占部城太郎、国内オンライン、日本生態学会第70回全国大会（2023）、日本産ネコゼミジンコ属の多様性と分布：DNAバーコーディングの結果から（ポスター発表）
25	牧野渡、槻木玲美、占部城太郎、中野伸一、国内オンライン、日本生態学会第71回全国大会（2024）、実は1990年代に生じていた北米原産マルミジンコの琵琶湖北湖への侵入（ポスター発表）

成果番号	【サブテーマ２】の口頭発表（学会等・査読なし）
26	辻彰洋、国内オンライン、日本珪藻学会第 41 回研究集会(2021)、 スズキケイソウと関連種の葉緑体ゲノム解析
27	大塚泰介、根来 健、辻 彰洋、国内オンライン、日本珪藻学会第 43 回大会(2022)、 西の湖(滋賀県)で出現した *Fragilaria longifusiformis* ssp.e*urofusiformis*
28	辻彰洋、大塚泰介、国内オンライン、 日本珪藻学会第 43 回大会(2022) オンライン開催)、本邦産の針状淡水浮遊性珪藻の整理と系統
29	大塚泰介・根来健・井上晴絵・小倉謙一・草間雄大・辻彰洋, 2023. 日本からの *Achnanthidium catenatum* の出現報告. 日本珪藻学会第 44 回大会. 2023 年 5 月 13 日. 文教大学（東京都足立区）.
30	根来健・大塚泰介・辻彰洋, 2023. 琵琶湖南湖で多産する円盤状珪藻. 2023 年 11 月 18 日. 水処理生物学会. 山形大学（鶴岡）.
31	新山優子・辻彰洋, 2023. *Phormidium tenuis* の学名の正体は？. 2023 年 11 月 18 日. 水処理生物学会. 山形大学（鶴岡）.
32	辻彰洋・新山優子, 2023. Genbank に登録されている geosmin 生成遺伝子(geoA)の存在種は *Dolichospermum hangangense* の誤同定が多くを占める. 2023 年 11 月 18 日. 水処理生物学会. 山形大学（鶴岡）.

成果番号	【サブテーマ３】の口頭発表（学会等・査読なし）
34	吉田凌太朗, 三浦幹太, 伊藤康一, 青木孝文, “CNN を用いたプランクトン画像の分類に関する検討,”2021 年度電気関係学会東北支部連合大会, August 2021, オンライン
35	吉田凌太朗, 三浦幹太, 伊藤康一, 青木孝文, “CNNを用いたプランクトン画像の分類とその評価,”映像情報メディア学会メディア工学研究会サマーセミナー2021, September 2021, オンライン
36	吉田凌太朗, 三浦幹太, 伊藤康一, 青木孝文, 大曽根葵, 牧野渡, 占部城太郎, “プランクトン画像のためのAttention Branch Networkに基づく階層的分類手法の検討” 第25回 画像の認識・理解シンポジウム, July 2022, 姫路
37	吉田凌太朗, 大曽根葵, 三浦幹太, 大竹裕里恵, 伊藤康一, 牧野渡, 青木孝文, 占部城太郎, “動物プランクトン画像データベースの構築と機械学習による自動種判別の精度評価,” 日本陸水学会第86回大会, September 2022, オンライン

成果番号	【サブテーマ4】の口頭発表（学会等・査読なし）
38	Aiko Iwasaki, Matthias Rillig「Forward is not eauql to backward? The importance of the sequence of treatments and their effect in ecological systems」日本生態学会第69回大会（2022)、
39	岩下源, 近藤倫生「時系列データを用いた生物群集の特徴づけについて」日本生態学会第69回大会(2022)
40	Naoto Shinohara 「On the relationship between species coexistence and ecosystem functioning」生態学会関東地区会シンポジウム「Response diversity, species asynchrony, and ecosystem stability」(2022年7月)
41	笠原剛樹、近藤倫生「植物プランクトン群集を対象とした動的結合ネットワークのアグリゲーション」、第67回日本生態学会東北地区会、2022年11月
42	笠原剛樹、近藤倫生「植物プランクトン群集を対象とした動的結合ネットワークのアグリゲーション」、東北大学理学生命科学合同シンポジウム、2023年2月
43	笠原剛樹、近藤倫生「植物プランクトン群集を対象とした動的結合ネットワークのアグリゲーション」、第70回日本生態学会大会、2023年3月

44	Gohki Kasahara、Michio Kondoh「Network structure of aggregated phytoplankton community」、The 8th CIJK conference on Mathematical and Theoretical Biology、2023年6月
45	笠原剛樹、近藤倫生「植物プランクトン群集を対象とした動的結合ネットワークのアグリゲーション」、2023年度数理生物学会年会、2023年9月
46	笠原剛樹、近藤倫生「植物プランクトン群集を対象とした動的結合ネットワークのアグリゲーション」、日本陸水学会第87回大分大会、2023年10月

（４） 知的財産権
特に記載すべき事項はない。

（５） 「国民との科学・技術対話」の実施

成果番号	実施年度	【サブテーマ１】の実施状況
47	2022	占部城太郎:ミジンコを巡る動物学と生態学の歴史 （主催 東北大学理学部ぶらり学、2022 年 3 月 26 日、聴講者約 200 名）
48	2023	Jotaro Urabe, Nature and Lake Ecosystems of the Japanese Archipelago through the Eyes of *Daphnia*. ROHM PLAZA, Ritsumeikan University, 23. Sep 23 2023 (40名)

成果番号	実施年度	【サブテーマ２】の実施状況
49	2022	辻彰洋、サイエンスで探求講座～水中の小さな生き物をかんさつしよう」(主催 国立科学博物館×日能研 ハイブリッド形式（オンライン＋３会場）、2022年5月29日、聴講者 小学4年生 43名 保護者 約45名）
50	2022	辻彰洋、琵琶湖の微小生物ワークショップ*Uroglenopsis*検討会 （主催 琵琶湖を上水道源とする自治体技術者有志および研究者、オンライン、2022年5月13日、参加者 6名）
51	2022	辻彰洋・新山優子、琵琶湖の微小生物ワークショップ第2回「シアノバクテリア」(主催 琵琶湖を上水道源とする自治体技術者有志および研究者)、琵琶湖博物館、2022年12月22日、参加者 18名）
52	2022	辻彰洋・新山優子、浮遊性シアノバクテリア講演会（主催:滋賀県立琵琶湖博物館・国立科学博物館微細藻類研究室、琵琶湖の微小生物ワークショップ委員会、後援:日本水処理生物学会 企画委員会）、ハイブリッド、2022年12月22日、参加者 62名
53	2023	辻彰洋・新山優子、水道生物研究集会、基調講演「シアノバクテリアのカビ臭産生種の分類額と遺伝子解析の現状」、山形大学、鶴岡、参加者 32名

成果番号	実施年度	【サブテーマ3】の実施状況
		特に記載すべき事項はない。

成果番号	実施年度	【サブテーマ4】の実施状況
54	2022	近藤倫生「身の周りにいる生き物を知ることはどうして大切か - みんなの役に立つという視点から」（サイエンスアゴラ「身の周りにはどんな生き物がいる？」を私たちが知る意味ってなんだろう，2022年10月22日）

（６） マスメディア等への公表・報道等
特に記載すべき事項はない。

（７） 研究成果による受賞

成果番号	【サブテーマ1】の研究成果による受賞
	特に記載すべき事項はない。

成果番号	【サブテーマ2】の研究成果による受賞
	特に記載すべき事項はない。

成果番号	【サブテーマ3】の研究成果による受賞
55	2022 日本陸水学会第86回大会優秀口頭発表賞 吉田凌太朗，三浦幹太，伊藤康一，青木孝文，大曽根葵，大竹裕里恵，牧野渡，占部城太郎．動物プランクトン画像データベースの構築と機械学習による自動種判別の精度評価，日本陸水学会第86回大会,オンライン，O-A11，2022/09

成果番号	【サブテーマ4】の研究成果による受賞
	特に記載すべき事項はない。

（８） その他の成果発表

成果番号	【サブテーマ１】のその他の成果発表
	特に記載すべき事項はない。

成果番号	【サブテーマ２】のその他の成果発表
56	ホームページ　ダム湖の植物プランクトン https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/microalgae/dam/

成果番号	【サブテーマ３】のその他の成果発表
	特に記載すべき事項はない。

成果番号	【サブテーマ４】のその他の成果発表
	特に記載すべき事項はない。

Abstract

[Research Title]

Development of a High-Resolution Image Analysis System for Monitoring and Forecasting Plankton Dynamics in Lake Ecosystems

Project Period (FY) :	2021-2023
Principal Investigator :	Jotaro Urabe
(PI ORCID) :	ORCID 0000-0001-5111-687X
Principal Institution :	Graduate School of Life Sciences, Tohoku University Sendai, 982-0011, JAPAN Tel: +81 22-795-6681 Fax: +81 22-795-6686 E-mail: urabe@tohoku.ac.jp
Cooperated by :	Tohoku University, National Museum of Nature and Science
Keywords :	Lake, plankton, image analysis, genetic information, ecosystem monitoring

[Abstract]

This study consists of four sub-themes. Sub-theme 1 aimed to create a comprehensive image database of zooplankton with genetic information. Plankton samples were collected from 371 locations in 87 lakes and reservoirs in Japan. A total of 88,704 images of 211 taxa were obtained, representing 56.9% of the taxa known in Japan. The images of zooplankton taxa obtained from this sub-theme were provided to sub-theme 3 to test the AI-based plankton image recognition technology developed by them. In addition, DNA barcoding data were collected from these samples. Taxonomic re-evaluation was also performed based on DNA barcoding data (Makino et al. 2023, Ohtuski et al. 2022, Sioud et al. 2022, Suzuki et al. 2023).

In sub-theme 2, live phytoplankton were collected to produce isolated strains of cyanobacteria, diatoms, and green algae, totaling 422 strains. These were then imaged with genomic data. During this study, toxin-producing species and taxonomically questionable dominant species were analyzed (Tuji et al. 2022, 2023, Tuji and Nakagawa 2023). The images of phytoplankton collected in this study were also used in sub-theme 3 to develop plankton image recognition technology.

Sub-theme 3 established a series of AI-based image analysis methods for automatic classification and counting of planktonic organisms. A specialized method for plankton image classification, called Multi-Label Attention Branch Network (ML-ABN), was developed and demonstrated high accuracy and practicality in classification experiments (Ito at al. 2023).

Using long-term environmental data collected in Lake Biwa, sub-theme 4 developed non-linear predictive models to predict plankton dynamics in the next days to weeks. A model using water quality and variation data of other plankton species showed improved prediction accuracy for short-term (2 weeks) and medium-term (6 months) forecasts, The model was implemented as a web application using R and Shiny for public use. Additional analysis showed the usefulness of aggregating multiple species into a few taxonomic groups to improve prediction accuracy (Otomo et al. 2023, Iwashita et al. 2022).

The plankton image database, AI-based image analysis methods for automatic classification, and nonlinear prediction models developed in this study will be used as the core knowledge for building an efficient automatic plankton monitoring system in the future.

[References]

Ito, K., K. Miura, T. Aoki, Y. Otake, W. Makino, and J. Urabe, "Zooplankton classification using hierarchical attention branch network," Proceedings of Asian Conference on Pattern Recognition (LNCS 14407), pp. 409--419, November 2023. doi: 10.1007/978-3-031-47637-2_31

Iwashita, G., A. Yamawo, M. Kondoh. (2022) Predator discrimination of prey promotes the predator-mediated coexistence of prey species. Royal Society Open Science, doi. 10.1098/rsos.220859

Makino, W., H. Suzuki, Yl. Otake, S. Ban, J.Urabe. (2023) The first report of the non-indigenous *Chydorus brevilabris* Frey, 1980 (Crustacea: Cladocera) in Asian freshwaters. Limnology, 24, 151-159. doi: 10.1007/s10201-023-00719-4

Otomo, Y., R. Masuda,Y. Osada, K. Kawatsu, M. Kondoh. (2023) Dynamics-based characterization and classification of biodiversity indicators. Ecology & Evolution, doi: 10.1002/ece3.10271

Ohtsuki,H., H.Norimatsu,T.Makino,J. Urabe. (2022) Invasions of an obligate asexual daphnid species support the nearly neutral theory. Scientific Reports. 12, 7305. doi: 10.1038/s41598-022-11218-4

Sioud, I., W. Makino, J. Urabe. (2022) Comparative phylogeography of *Cyclops vicinus* Uljanin, 1875 and *Cyclops kikuchii* Smirnov, 1932 with implications for differences in their ecological characteristics. Journal of Plankton Research, 43, 974-985. doi: 10.1093/plankt/fbab076

Suzuki, H., W. Makino, S.Takahashi, J. Urabe. (2024) Assessment of toxic effects of imidacloprid on freshwater zooplankton: an experimental test for 27 species. Science of the Total Environment, 927: 172378. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.172378

Tuji, A., Y. Niiyama,S. Ichise. (2023) Distribution and phylogeny of *Dolichospermum hangangense* (Nostcales, Cyanobacteria) found in Japanese lakes and reservoirs. Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B 49: 83-95. Doi: 10.50826/bnmnsbot.49.3_83

Tuji, A.,M. Nakagawa. (2023) The filamentous colony-forming diatom *Aulacoseira pusilla* with a high mantle height/valve diameter ratio. Plankton and Benthos Research 18:225-227. doi: 10.3800/pbr.18.225

Tuji, A., E. Ogiso-Tanaka, H. Yamaguchi. (2024) Complete genome sequence of *Annamia dubia*, filamentous colony-making Chroococcales with the analysis of FraC gene influencing filament integrity. Journal of Genomics 12: 1-5. doi: 10.7150/jgen.87678. eCollection 2024.

This research was funded by the Environment Research and Technology Development Fund (ERTDF).

別引糸氏

【参考資料】終了研究成果報告書　公募審査・中間評価結果への対応

指摘等	対応状況・非対応理由等
中間評価コメント「社会実装にむけて、着実に研究成果があがっていると評価する。プロジェクト全体としてのアウトリーチを期待する。サブテーマ４については学術的な貢献も期待する。	社会実装に必要なコアとなる技術及び画像データベースが整備出来、次期プロジェクトで社会実装出来る目処がたった。また非線形時系列解析を活用した予測技術や変動の可視化技術も開発し、その有用性に関する成果は学術論文としてもまとめる予定である。
中間評価コメント「機械学習のメリットをフルに利用することで、環境変化にも応用できる優れた進展が見られていると思われる。ただ、サブテーマ４に見られるような内容で、豪雨のような突発的変化に対しても予測が可能だろうか。その内容はどの様な精度でできるのだろうか。気候変動が顕著になってきたため、その部分についてご検討いただきたい。また、実務を担当するコンサルタントの方の力量（＝予算次第）に依存してきた群集構造の解明に、未来を拓く内容であると期待している。」	期待と応援を感謝いたします。これまでなかった環境変化に対する対応は現時点での時系列解析による予測は難しいかもしれないが、生物間相互作用や生理的応答を加味した要素を加えていくことで、将来は可能になるかもしれない。そのためにも、現在のモデルをブラッシュアップして行きたいと考えている。また、本研究で得られた画像データベースや画像判別技術は、現場でモニタリングしている実務者にも利用できるよう、次期プロジェクトで汎用性を高めたいと考えている。
中間評価コメント「プランクトン群集の解析に極めて有力な技術の開発である。さらに定量性が加われば応用範囲が広がることが期待される。」	定量性（細胞数や大きさ）も技術に組み込んでおり、ニーズに答えられる情報のアウトプットは可能になると考えている。
中間評価コメント「比較的に生物だけの試料を作成しやすいプランクトンについて、画像解析から群集構造を半自動的にできるだけ定量性高く評価できるようになることは、今後のさまざまな水圏の生態学的研究において、大いに貢献が期待できる。その点から本研究の進捗状況は順調で、その波及効果も期待できる。懸念としては、現在群集構造を把握する方法として、環境DNA の活用は広く進められており、両者の競合が想像できるので、この手法の優位性をしっかりと確保して、研究成果が無駄にならないようにしていただきたい。」	環境DNAとの連動は重要であると認識しており、本プロジェクトでも群集を対象としたメタバーコーディングが可能になる要件整備（データベース・解析技術）を行った。画像データと直接紐づけることは現時点では難しいが、群集解析結果を比較することは可能となった。ただし、比較技術の汎用性は、今後の課題と位置づけている。
中間評価コメント「最終成果の報告を期待しています。」	３年の研究期間では社会実装まで至らず、期待に答えられなかった部分もあると思います。ただし、社会実装出来るコアとなる技術の開発やデータベースが整備できたので、継続して研究することで社会実装を可能にして行きたい。
中間評価コメント「画像の解析の進展が素晴らしい。野外のデータ収集方	応援に感謝します。ダム湖でのモニタリングは、技術者不足から十分とは

法は、ダム湖などでは様々な手法がありうるのではないかと考える。チーム構成も成功の秘訣か。」	言えません。この技術を発展させて、社会ニーズに貢献することを目標にしています。
中間評価コメント「動植物プランクトンデータベースの構築、プランクトン自動判別・計数システムの開発など、順調に研究が進んでいる。」	コアとなる技術やデータは取得できました。その点では、十分な成果があがったと自己評価しています。しかし、当初掲げていた社会実装のためには、ステムのパイプライン化や汎用性試験実施などにあと２～３年かかると見込んでおり、そのためのチームを編成して研究を継続していく予定です。
中間評価コメント「研究の視点では全部を種まで落としたいところだが、スピードの点ではある程度のところで属や科までで打ち切る分析法を開発することも必要かと感じた。」	ご指摘のとおりで、どうしても種までは判別できないタクサがあります。判別出来ない種をシステムとして認識し、アラートを出すなど、アウトプットの方法を工夫して行きたいと考えています。
中間評価コメント「プランクトンモニタリングの高度化に役立つ重要な成果が得られつつある研究であると評価できる。」	ご期待と応援に感謝いたします。継続して研究することで社会実装を可能にしたいと考えています。
中間評価コメント「努力を傾けた進捗がよく理解できた。大分類も射程にした画像解析は秀逸であった。さらなる進展を期待する。」	未知種でも大分類であれば判別できる技術が開発出来たことは、本研究の大きな成果だと思っています。
中間評価コメント「このようなことができるのだと驚いた。プランクトンの同定ができる専門家の不足を補う技術として高く評価できる。また、さまざまな分類階級で同定・集計できるシステムを開発した意義は大きいと思う。行政を含め、広く使われるシステムとなることを期待する。」	システム全体のパイプライン化は本研究期間内に出来ませんでしたが、幸いなことに継続研究として、推進費の技術実証型プロジェクトが採択されたので、本研究の成果を踏まえたシステム開発とダム湖や指定湖沼でのモニタリングに際しての社会実装は、是非とも実現したいと考えています。