

Environment Research and Technology Development Fund
環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

S II -7-1 深海生物相の画像解析によるモニタリング法及びサンプリング法
の開発
(JPMEERF20S20710)

令和2年度～令和4年度

Development of monitoring by image analysis and sampling methods for deep-sea biodiversity

<研究代表機関>

国立研究開発法人海洋研究開発機構

<研究分担機関>

国立研究開発法人国立環境研究所
東京大学（令和2年度～令和3年度）

<研究協力機関>

いであ株式会社

○図表番号の付番方法について

「I. 成果の概要」の図表番号は「0. 通し番号」としております。なお、「II. 成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「II. 成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号. 通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和5年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	2
2. 研究開発目的	2
3. 研究目標	3
4. 研究開発内容	3
5. 研究成果	5
5-1. 成果の概要	5
5-2. 環境政策等への貢献	9
5-3. 研究目標の達成状況	11
6. 研究成果の発表状況	14
6-1. 査読付き論文	14
6-2. 知的財産権	14
6-3. その他発表件数	14
7. 国際共同研究等の状況	15
8. 研究者略歴	15
II. 成果の詳細	
II-1 深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案 （国立研究開発法人海洋研究開発機構、東京大学）	16
要旨	
1. 研究開発目的	17
2. 研究目標	17
3. 研究開発内容	17
4. 結果及び考察	18
5. 研究目標の達成状況	28
6. 引用文献	29
II-2 深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発 （国立研究開発法人国立環境研究所、国立研究開発法人海洋研究開発機構）	31
要旨	
1. 研究開発目的	31
2. 研究目標	32
3. 研究開発内容	32
4. 結果及び考察	33
5. 研究目標の達成状況	41
6. 引用文献	41
III. 研究成果の発表状況の詳細	42
IV. 英文Abstract	47

I. 成果の概要

課題名 【S II -7-1】 深海生物相の画像解析によるモニタリング法及びサンプリング法の開発

課題代表者名 藤倉 克則（国立研究開発法人海洋研究開発機構 地球環境部門 海洋生物環境影響研究センターセンター長）

研究実施期間 令和2年度～令和4年度

研究経費

144,945千円（合計額）

（各年度の内訳：令和2年度：48,315千円、令和3年度：48,315千円、令和4年度：48,315千円）

研究体制

（サブテーマ1）深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案（国立研究開発法人海洋研究開発機構、東京大学（令和2年度～令和3年度））

（JPMEERF20S20701）

（サブテーマ2）深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発（国立研究開発法人国立環境研究所、国立研究開発法人海洋研究開発機構（令和2年度～令和3年度））

（JPMEERF20S20702）

研究協力機関

いであ株式会社

本研究のキーワード 深海生態系モニタリング、生物多様性、現場観測装置（ランダー）、海洋保護区、画像解析、環境、環境DNA

1. はじめに（研究背景等）

海洋生態系や海洋生物多様性の変動は著しく、海洋生態系の保全は地球規模の課題となっている。国際的にも生物多様性条約の愛知目標や持続可能な開発目標（SDGs）に、2020年までに沿岸域及び海域の10%を保全する目標が掲げられた。日本でも環境省を中心に、この目標を達成するため日本周辺海域において海洋保護区の指定を加速させた。

日本の海洋保護区は、管轄権内海域のうち沿岸域を中心に8.3%が指定されていたが、沖合域に関しては具体的な施策は一部を除き講じられておらず海洋保護区の設定は十分とは言えなかった。環境省では、日本が環境保全し得る領海及びEEZ内で重要度が高い海域を抽出し、2016年に「生物多様性の観点から重要度の高い海域」（重要海域）として公表した。このときに用いた抽出の基準（以下、重要海域海選定基準）は、生物多様性条約で推奨される基準も参照しつつ、1.唯一性又は希少性、2.種の生活史における重要性、3.絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地、4.脆弱性、感受性又は低回復性、5.生物学的生産性、6.生物学的多様性、7.自然性、8.典型性・代表性の8項目であった。

環境省は、沖合域における海洋保護区（深海底の海洋保護区）の設定について中央環境審議会の答申を踏まえて改正法案を国会に提出し、2019年に改正自然環境保全法が成立した。海洋保護区の設定は、「重要海域」を基礎とし、海山、化学合成生態系が形成される熱水噴出域や湧水域、海溝等を対象として、可能な限りどの生態系の種類もいずれかの海洋保護区に含めるという方針を踏まえ、2020年に同法に基づき、①伊豆・小笠原海溝、②中マリアナ海嶺・西マリアナ海嶺北部、③西七島海嶺、④マリアナ海溝北部が「指定書および保全計画書」（以下、指定書）のもとに深海底の海洋保護区である沖合海底自然環境保全地域に指定された。

深海生態系は漁業・資源開発、テクトニクス、ゴミなどによって変動するため、設定した海洋保護区での生物多様性の変動があるか、開発等により自然環境が劣化していないか、海洋保護区として保全効果が発揮できているか等を評価するための継続的なモニタリングが必要である。つまり、海洋保護区の設定後もその管理が重要となる。

深海域の調査観測は、沿岸域・表層に比べ大がかりな調査機器と経費が必要となる。例えば、沿岸域の海洋調査は、徒歩、シュノーケリング、スクーバ潜水、小型船舶などによる調査が高頻度かつ容易に実施できる。一方で、深海域の調査には、大型調査船、無人探査機ROV、有人潜水調査船、大型ウインチなどが必要であり調査の機会も限られる。大がかりな調査機器と高額な経費は、深海域の海洋保護区の継続的なモニタリングに大きな制約となる。最近、分子生物学的手法や画像解析手法が生物多様性や生態系の調査観測に用いられようになってきた。これら新手法を応用することで、深海域のモニタリングを効率的な調査機器と経費で行うことが可能になると思われる。

沖合海底自然環境保全地域のモニタリングでは、重要海選定基準の指標や指定書で海洋保護区として保全効果が発揮できているか等を評価することが重要である。深海底にも多様な生物が生息しており、微小生物（原核生物やメイオセントス）は海底かく乱が生じた際の環境変動への応答が早いという特徴を有し、魚類や大型無脊椎動物は希少性・固有性・脆弱性を評価するのに適している。よって広範囲の生物群について重要海選定基準や指定書の事項が維持されているかを評価することが肝要である。

深海のモニタリングを効率的な調査機器と経費で行えるかを評価するためには、実際のフィールドで調査する必要がある。沖合海底自然環境保全地域は、水深6000 mを超える海溝も含むが、日本で計画されている鉱物資源開発は水深2000 m以浅であること、底引きトロールの最大水深は約1500 mであること、生物量や多様性が高く漁場になっている海山の重要性を踏まえ、少なくとも水深2000 mまでのフィールド調査で評価する必要がある。

2. 研究開発目的

沖合海底自然環境保全地域において、継続的かつ多地点でのモニタリングを実現するために、生物多様性や生態系研究で技術発展がめざましい分子生物学的手法や画像解析手法を取り込んだ簡便な深海生態系モニタリング法の構築を目的とする。そして、本研究により開発される低コストかつ簡便なモニタリング技術を、海洋保護区の実効的管理の第一歩とし、今後の継続的な深海モニタリングへの土台にすることを目標とする。フィールド調査海域としては、沖合海底自然環境保全地域のうち海山が多く、本土から近距離にある

「西七島海嶺」とする。

本テーマ【SII-7-1】では、深海調査用大型研究船を用いなくても、サンプルやデータを取得できる技術を開発することを目的とする。また、画像から大型生物や堆積物中のメイオファウナの分類群同定と個体数測定を簡便にできる画像解析法を開発し、重要海域選定基準を評価するための画像によるモニタリング法を構築することを目的とする。

3. 研究目標

全体目標	本推進費全体では、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえ、広範囲の生物群（原核生物から脊椎動物まで）を対象に生物情報等を取得するべく、これまでの深海生態系調査に比べ低コストで実施できる簡便な深海生態系モニタリング法を構築することを目標とする。このために、人工知能などを用いた画像解析、環境DNAやメタゲノムの解析技術を用い、映像・水・堆積物から生物データが取得できるようにする。また、水／堆積物採取と環境計測が可能な小型化したフリーフォール式現場観測装置を開発し、上記解析のためのサンプル・データを提供できるようにする。
サブテーマ1	深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案
サブテーマリーダー/ 所属機関	藤倉 克則／国立研究開発法人海洋研究開発機構
目標	無人探査機などの映像から大型生物の分類群同定と個体数測定を簡便にできる画像解析法を開発し、映像による生物情報生成法を提示する。各サブテーマに用いるサンプルを提供できるようにする。画像解析法はテーマ1サブテーマ2で実施予定の堆積物中の生物を対象にした画像解析にも応用できるようにする。また、他のサブテーマと情報交換しながら小型フリーフォール式現場観測装置を開発し、環境データ取得や環境DNAやメタゲノムの解析などに用いるサンプルを他のサブテーマに提供する。サブテーマ間との連携・協働によって効率的に研究を推進し、沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法を示す。
サブテーマ2	深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発
サブテーマリーダー/ 所属機関	河地 正伸／国立研究開発法人国立環境研究所
目標	深海堆積物中に遍在するメイオファウナの分類群同定と個体数測定を迅速かつ簡便に行える画像解析法の開発を行い、テーマ1サブテーマ1と連携・協働して、画像解析による生物情報生成法の構築を担う。また深海小型底生生物のメタゲノム解析を担当するテーマ3サブテーマ2と連携し、画像解析法（本サブテーマ）とメタゲノム解析法の相互検証を行い、両解析手法の相互の精度向上に取り組む。沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法の1つとして提示できるようにする。

4. 研究開発内容

【サブテーマ1】 深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案

全体目標を踏まえ、本サブテーマでは、大型調査船、大型無人探査機、有人潜水調査船、大型ウインチなど大型プラットフォームを用いなくても低コストで簡便に深海生態系をモニタリングできるフリーフォール式現場観測装置（以下、ランダー）を開発した。ランダーとは、金属フレームにサンプル採集機器や環境計測機器を搭載し、船上からフリーフォールで深海底に設置し、観測終了後に錘を切離し自己浮上する観測装置である（図1）。このランダーを用いて、環境DNAやメタゲノムの解析などに用いる海水、堆積物、海水ろ過物といったサンプルや環境データを取得して他のサブテーマに提供した。民間環境会社等においても無

人探査機により深海映像が取得可能となってきた。映像から大型生物の量や多様性のデータを取得するために、深層学習等を用いた画像解析モデルによって生物組成や分布量を算出する画像解析技術を開発した。さらに、本サブテーマは、課題全体の推進や取りまとめを行った。

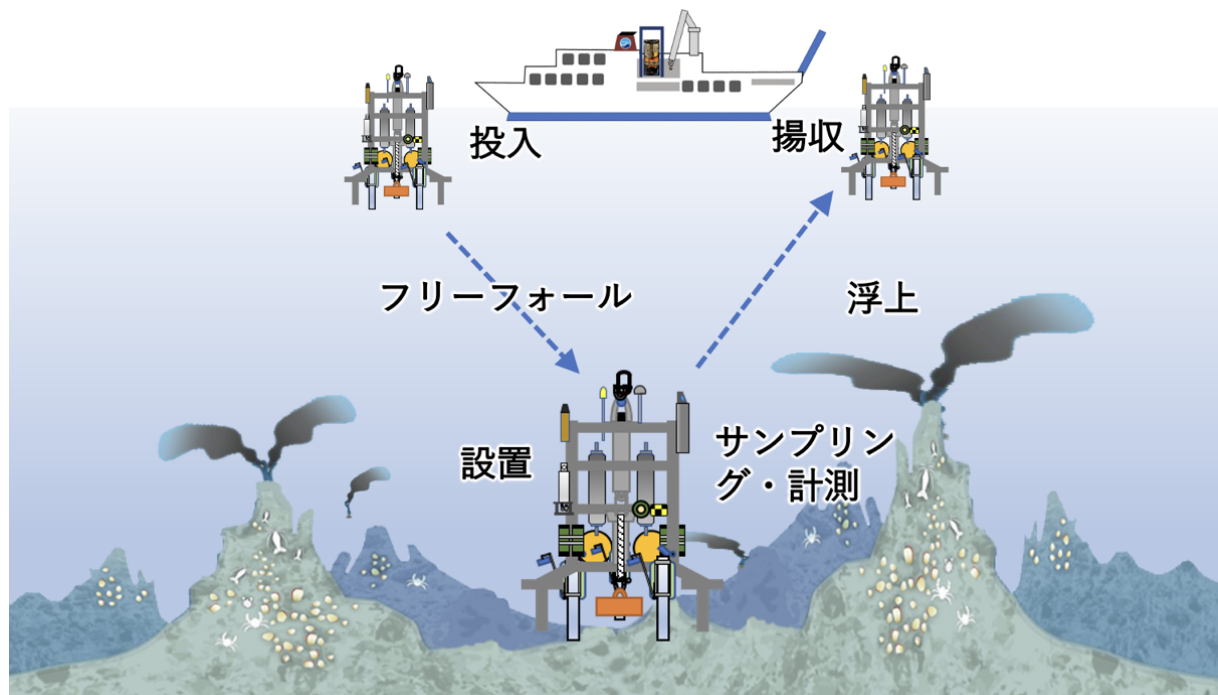


図1.フリーフォール式現場観測装置（ランダー）の投入から回収までのイメージ図。ランダーに錘を付け船上から投入し、観測終了後に音響信号により切り離し装置で錘を切り離し浮上させる。

2020（令和2）年度は、ランダー開発として、実海域で基本システムを作動させ一部のサンプルを取得するために、システムデザイン、採水器の搭載、現場大量ろ過システム（以下、MASS Pump）の設計とポンプ部を製作し、実海域にて作動試験を行った。大型生物画像解析技術開発として、映像から大型生物の分類群同定と個体数測定を可能にするために、既存の画像解析手法を試行しながら画像解析に用いる学習・検証データを作成した。沖合海底自然環境保全地域にて調査航海を行い、ランダー作動試験のみならず調査船に装備されているロゼッタ式採水器、無人探査機ROVなどでサンプル・データを取得し、他のサブテーマへ提供した。

2021（令和3）年度は、ランダー開発として、採集機器や観測装置の作動確認と問題点を洗い出し適宜改良するとともに、MASS Pumpを製作した。大型生物画像解析技術開発として、精度向上と効果的処理方法を確立するために、実映像を用いて解析ソフトウェアなどを調整した。沖合海底自然環境保全地域にて調査航海を行い、ランダー作動試験のみならず調査船に装備されているロゼッタ式採水器、無人探査機などでサンプル・データを取得し、他のサブテーマへ提供した。

2022（令和4）年度は、ランダーでデータ・サンプルが取得できるようにするため、装置の製作と実海域での使用を行うとともに、ランダーで取得したサンプルとデータを各サブテーマに提供した。大型生物画像解析技術開発として、映像から沖合海底自然環境保全地域の指定書の記載事項や重要海域選定基準を踏まえたモニタリング指標を得るため、実海域のデータからモニタリング指標を解析する手法を開発した。沖合海底自然環境保全地域の管理に向けた簡便で安価な深海生態系モニタリング技術を提案するために、開発された技術のコスト計算やモニタリング指標を環境省に提示するとともに、本課題全体で開発した深海生態系モニタリング方法のマニュアルをWebページで公表した。

【サブテーマ2】深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発

本サブテーマでは、深海底堆積物中のメイオベントスを対象として、迅速かつ簡便に群集組成情報を取得するために、画像解析を用いた解析手法の開発を行った。メイオベントスは、1 mmのメッシュを通過して

32 µmのメッシュで捕捉されるサイズの底生動物の総称である。深海底において最も生息密度の高い動物群であり、代表グループとして、線虫類、カイアシ類等が含まれる。また過去の研究では、メイオベントス群集組成が、人為的な攪乱や環境変動により変化することが知られている。メイオベントス群集の生物多様性を評価するためには、顕微鏡下で堆積物中のメイオベントスの計数と同定を行う必要があり、時間や労力、さらには分類学的知識と経験が求められる。モニタリング対象として利用するには、メイオベントスの専門家だけでなく堆積物からメイオベントスを分離するためのサンプル前処理技術、迅速かつ簡便にメイオベントスの分類群同定と個体数測定を可能とする技術の開発と実用化が求められる。

本サブテーマでは、沖合海底自然環境保全地域等からの海底堆積物を採取して、2020～2021年度にまず堆積物からメイオベントスを効率的に分画する技術について検討した上で、イメージングフローサイトメトリ（FlowCAM）を用いてメイオベントスの画像の取得と深層学習による画像解析に基づく自動計数・分類システムを構築した。また沖合海底自然環境保全地域の調査航海において、他のサブテーマとともに構築した手法の性能評価や改良に取り組むとともに、2022年度には、モデルの改良、チューニングを行うことで分類精度の向上を図るとともに、作業の簡略化・プロトコル化を進めることで、沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法を提示できるようにした。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

【サブテーマ1】深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案

本サブテーマ1では、低コストで簡便に深海生態系をモニタリングできるフリーフォール式現場観測装置（ランダー）および映像から大型生物の生物組成や分布量を算出する画像解析技術を開発した。さらに、本サブテーマは課題全体を推進するため、調査航海の実施、参画者への情報提供、アドバイザー会合の開催、環境省担当部署との連携や課題全体の取りまとめを担った。

(1) フリーフォール式現場観測装置（ランダー）開発

大型プラットフォームを用いずに、低コストで簡便に深海生態系をモニタリングする要件として、

- ・数千トンもの大型海洋調査船を用いずにオペレーションできること、
- ・任意の時間と場所で設置と回収ができること、
- ・少なくとも水深2000 mまでの観測ができること、
- ・原核生物から魚類にわたる多様性を分析するための海水と堆積物が採集できること、
- ・深海底に何らかの攪乱が生じた場合に変動する環境因子（水温、塩分、酸素濃度、水圧、濁度、流向流速）の計測ができること

とした。

そして、これらの要件を満たすフリーフォール式現場観測装置（ランダー）を開発し（図1、2）、実海域での実証を行いつつ、上記要件を満たし深海生態系を多角的にモニタリングできるようにした。

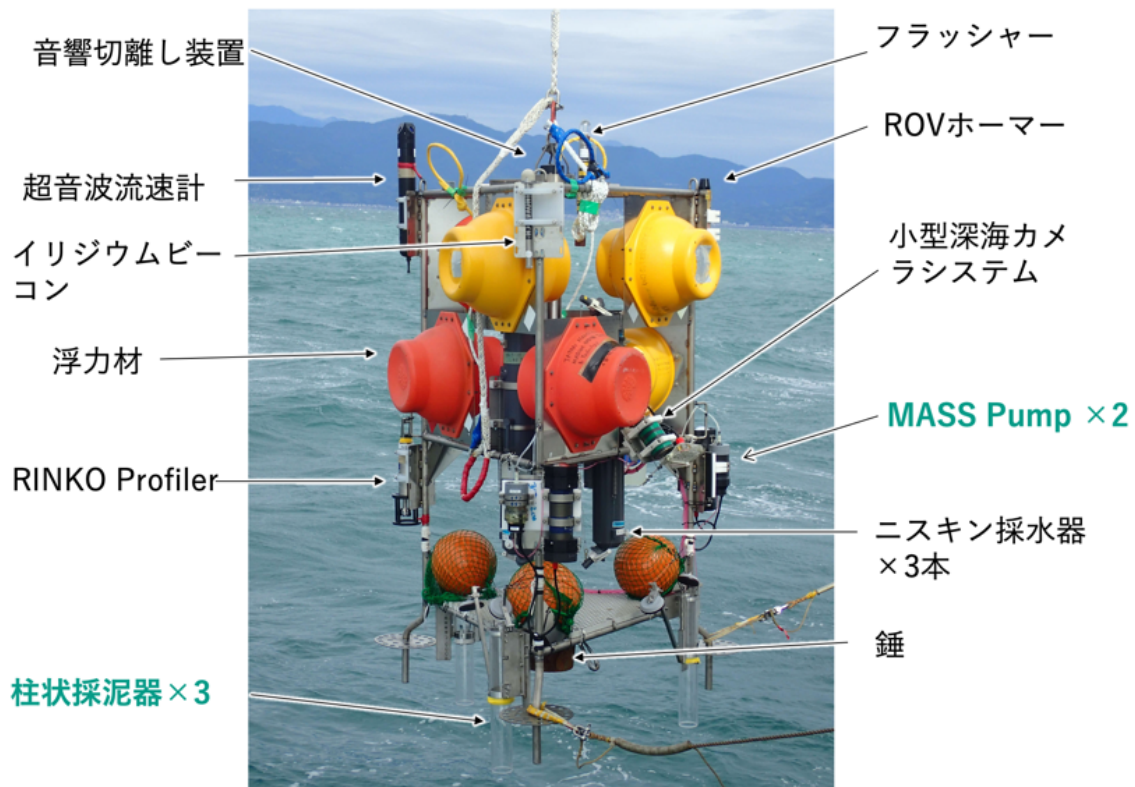


図2. 本課題で開発したランダー

このランダーの特徴は以下になる。

- ・大型海洋調査船を用いないオペレーション：高さ2.35 m、幅1.5 m、空中重量452 kgとなり、従来の大型無人探査機、有人潜水調査船、大型ウインチなど深海調査プラットフォームに比べ小型で軽量となった。この大きさや重量であれば、小型クレーンを装備した数百トンから1000トンクラスの船舶でも十オペレーションでき、調査航海経費も低コストになる。
- ・任意の時間と場所での設置と回収：音響切り離し装置により、船上から任意の時間と場所でフリーフォールで設置し、装備した観測装置やサンプリング装置を任意の時間で作動させるように設定でき、観測終了後は切り離し信号により任意の時刻に回収できるようにした。
- ・水深2000 mまでの観測：ランダーに装備する機器類のうちRINKO Profiler（水温・塩分・圧力・濁度・溶存酸素計測）は水深2000 mまで観測できるものを使用し、それ以外のは水深2000 m以深でも作動できる機器とした。とりわけ採水、柱状堆積物の採取はフルデプス（10900 m）まで作動できるようにした。より大深度で使用できるRINKO Profilerを装備すれば、より深い水深でのモニタリングも可能となる。
- ・原核生物から魚類にわたる多様性を分析するためのサンプル採集：魚類と大型無脊椎動物の環境DNAを分析するための海水ろ過物と海水、原核生物とマイオセントスのメタゲノム分析するための海水と堆積物、マイオセントスの画像解析をするための堆積物をサンプルを採集できるようにした。特に、海水ろ過物をin-situで採集できる現場大量ろ過システムMASS Pumpは新たなアイデアを取り入れ開発したもので特許申請済みである。堆積物の層を乱さずに採集する柱状採泥器もシンプルな工夫でサンプルを得ることができるようになった。
- ・環境因子の計測：既存センサーを装備し水温、塩分、水圧、酸素濃度、濁度、流向流速に加え、映像も取得できるようにした。
- ・製作費の低コスト化：ランダーの製作費は約3千万円となる。従来の大型無人探査機、有人潜水調査船、大型ウインチなど深海調査プラットフォームに比べ一桁以上低価格になった。
- ・オペレーションの簡素化：ランダーのオペレーションには特殊な資格や免許は不要である。調査時に専用のオペレータは不要となり、研究者や船員のみで観測できるようになった。

(2) 大型生物画像解析技術開発

沖合海底自然環境保全地域指定の根拠となる重要海域選定基準や指定書の指標を評価するには、生物組成や個体数を算出することが肝要である。そこで、民間環境会社等で用いる無人探査機ROVや自律型無人潜水機AUVの映像から、大型生物（メガベントス）を対象として生物組成や分布量などを算出する画像解析技術を開発した。そして、深層学習における矩形検出を用いることで形態と色彩などの情報から刺胞動物や海綿動物について、高次分類群レベルで個体数や被度を算出できるようにした（図3）。これらのデータは、重要海域選定基準や指定書の評価に使える。

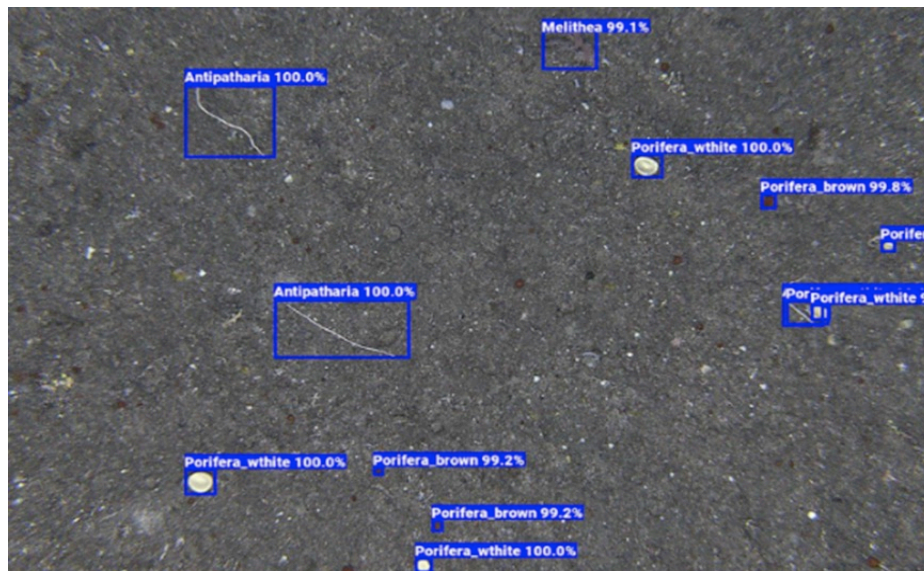


図3. 矩形抽出モデルYOLOによる海綿動物と刺胞動物の自動識別例。

(3) プロジェクト推進

本サブテーマは、他のテーマやサブテーマの研究開発を推進するため、2020年度から2022年度にかけて、実際の沖合海底自然環境保全地域において、海洋研究開発機構の海底広域研究船「かいめい」や深海潜水調査船支援母船「よこすか」を用いた調査を行い、ランダーの試験を行った。また、これらの調査船に装備されているロゼッタ式採水器、無人探査機、有人潜水調査船などでサンプルやデータを取得し、他のテーマやサブテーマに提供するとともに、ランダーで取得したサンプルやデータも提供し、モニタリング手法の確立を図った。他の調査で民間企業の無人探査機が取得した映像データなども活用し、民間企業のデータも深海生態系モニタリングに使えることを検証した。

本課題の全体目標は、これまでの深海生態系調査に比べ低コストで実施できる簡便な深海生態系モニタリング法を構築することである。ランダーを用いた調査航海について、民間環境調査会社と海洋研究開発機構の調査船を用いた場合の経費試算を比較した。その結果、海洋研究開発機構にくらべ、民間環境調査会社では半額程度の金額で実行できる可能性が示された。また、本プロジェクトの参加者以外でも、開発した手法を用いたモニタリングを実施できるように、詳細なマニュアルを作成しインターネット

https://www.jamstec.go.jp/bioenv/j/mpa-monitoring-method/pdf/monitoring_manual.pdfで公開した。

本課題全体を通じ、環境省の政策への貢献が期待されることから、自然環境局自然環境計画課と密接な意見交換を行いながら研究開発を進め、課題推進にあたり疑問点などが生じた場合は、プログラムオフィサーや環境再生保全機構の担当者と相談し、課題全体に情報を共有した。また、アドバイザー会合を開催し、研究開発に関する専門的アドバイスやテーマ間の連携などを深めた。

(4) 特筆する成果

特筆すべき成果としては、西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域からのヨコヅナイワシの発見が挙げられる（図4）。ヨコヅナイワシは2016年に採集され、2021年に新種として記載されたセクトリイワシ科最大の魚類で、食物連鎖における栄養段階が非常に高く、駿河湾最深部の生態系の頂点に立つトップ・プレデター

であることが判明していた。これまでに採集されたヨコヅナイワシはわずか7個体のみで、駿河湾以外の海域からは報告がなかったが、2020年、2021年の深海調査によって、駿河湾より400キロメートル以上離れた沖合海底自然環境保全地域から、ヨコヅナイワシの遺伝子配列を検出した。そこでベイトカメラ（海底設置型餌付きカメラ）を投入したところ、全長2.5メートルを超す巨大なヨコヅナイワシの撮影に成功し、本種の新たな生息域を明確に示すことができた。トップ・プレデターは生態系の生物多様性や機能の維持に重要な役割を果たしており、トップ・プレデターが失われると、生態系が大きく崩壊してしまうことが報告されている。沖合海底自然環境保全地域でヨコヅナイワシのようなトップ・プレデターの存在が確認できたことで、保全地域の健全性が明らかとなり、今後の生態系モニタリングの絶好の対象種となった。

また2020年からの一連の調査により、沖合海底自然環境保全地域から8種を新種記載したほか、数多くの日本初記録種や希少種の発見が相次いだ。

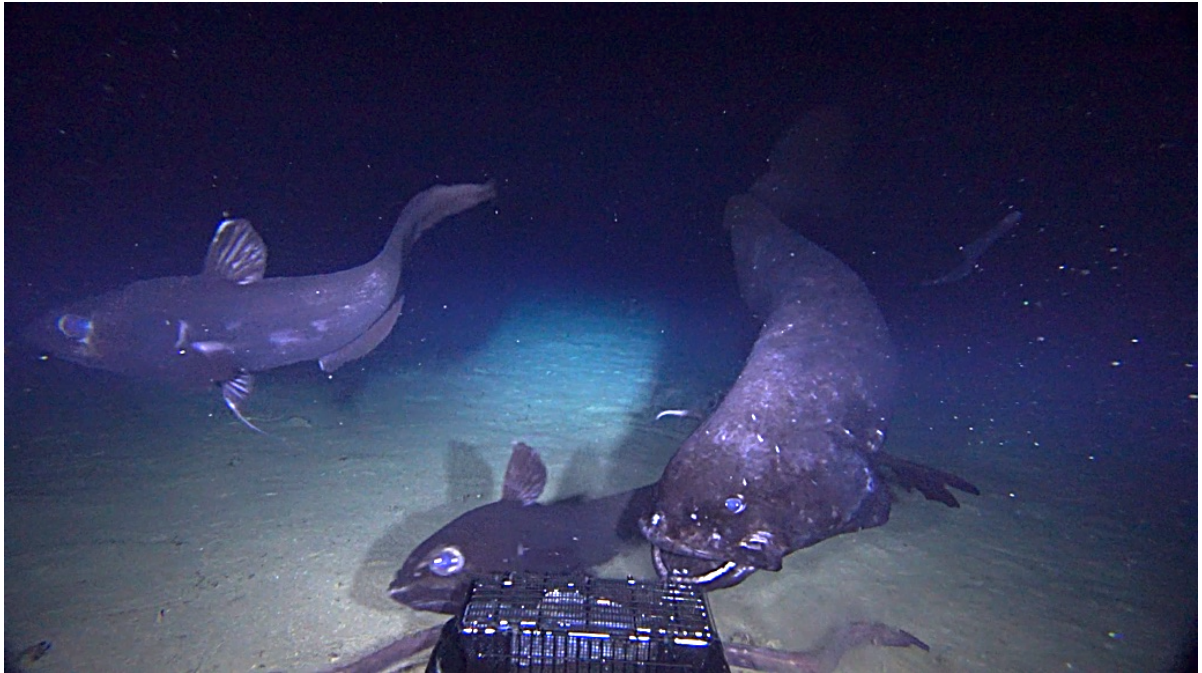


図4. 西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域で生息が確認されたヨコヅナイワシ

【サブテーマ2】深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発

本サブテーマでは、沖合海底自然環境保全地域における深海底堆積物中のメイオベントスを対象として、迅速かつ簡便に、継続的に多地点での群集組成のモニタリングを実現するために、堆積物試料の処理法の検討を行い、メイオベントスの画像情報の取得と画像処理、そして深層学習による自動分類・計数システムを構築した。

(1) 堆積物試料の採取・処理、分画手法の検討

堆積物からメイオベントスを分画、回収する工程において、従来法（ステンレス篩によるサイズ分画とLudoxによる回収）と比較して、本サブテーマで考案した方法（Ludoxによる回収とセルストレーナーによるサイズ分画）は、より簡便、高い回収率でメイオベントスを分画することができた。

(2) FlowCAMを用いたメイオベントスの画像の取得と深層学習による自動分類・計数システムの構築

FlowCAM画像の深層学習による分類予測モデルの構築では、まずFlowCAM付属のプログラムVisualSpreadSheetのclassification機能とライブラリ機能等を活用して、懸濁粒子の分類及び複数サンプル画像を分類ごとに画像セットに統合する作業を行い、個別画像の抽出、背景合成・正方形化等の画像処理と分類情報との紐付けやデータベース化を行った。層化無作為抽出法で、各フォルダ画像を、教師画像（60%）、検証用画像（20%）そして性能評価用テスト画像（20%）に分割し、分類予測モデルを用いて、予測性能評価を行い、分類方法の見直しやパラメータ調整、モデル構造の修正を行うことで分類精度の向上を図った。また対象とする分類群を8クラスから26クラスに拡大することで、正答率の向上を図ることができた。

FlowCAMと深層学習を利用する場合、1試料につきおおよそ20-30分の時間が必要で、その分類・計測の精度は教師画像の整備状況や分類モデルの予測性能によって決まった。一方、従来の検鏡による分類・計数では、1試料につき15-60分の時間が必要で、分類や計測の精度は作業者の経験や技術に依存する。FlowCAMと深層学習を用いる場合、各試料の画像情報が保存されるため、新しい分類システムを利用して繰り返し分類や計数を行うことが可能で、分類や計測結果の検証や更新も可能となる。モニタリング時に多数の試料について分類・計数を行うことが必要な場合、FlowCAMと深層学習を用いることで、作業量や時間を削減できるなど、より効率的な方法と言える。

(3) 特筆する成果

堆積物からメイオセントスを簡便かつ高い回収率で分画、回収するための新たなサンプル処理技術を開発できたこと、そして主要なメイオセントスについて、自動分類と計数を行うための基盤的な技術開発に成功し、基本的な教師画像についても整備することができたことが成果としてあげられる。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

本課題で実施した西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域のフィールド調査は、沖合海底自然環境保全地域を管理するために環境省の受託調査航海「沖合海底自然環境保全地域モニタリング」と連携して実施した。よって本課題で得られた情報の一部は、環境省に提示し、西七島海嶺の沖合海底自然環境保全地域の管理に用いられた。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

A. 沖合海底自然環境保全地域（深海底の海洋保護区）の管理

【深海における生態系モニタリングの効率化】

深海域で生物多様性や生態系に関する科学的データを取得するには、専用の深海調査用大型プラットフォームや、高額な経費、高度なノウハウが必要なため調査の機会は限定的である。本課題で開発したフリーフォール式現場観測装置（ランダー）を主体とした簡便で低コストな深海生態系のモニタリング手法は、高頻度な深海調査の機会を増加させ、深海域の生物多様性や生態系に関する科学的データの取得を促進に活用されることが期待できる。

解説

深海の生物多様性や生態系の調査には、数千トンの大型調査船とそれに搭載する有人潜水調査船、大型無人探査機、1万メートル以上のケーブルを装備した大型ウインチとロゼッタ式採水器やマルチプルコアなどをを用いる。これらは高額であり、かつ調査には専用オペレータのノウハウが必要となっているため、日本で深海調査ができる機関や機会は限定的である。

日本は世界第6位の広大な排他的経済水域EEZを有し、そのほとんどが深海であるが、深海調査の機会の少なさがボトルネックとなり、深海の生物多様性や生態系に関する科学的データが十分にあるとは言えない。海洋保護区を指定するには、生物多様性条約で推奨される抽出基準などから「生物多様性の観点から重要度の高い海域」（重要海域）を抽出する必要があるが、抽出基準の評価は限られたデータを用いて行われた。

フリーフォール式現場観測装置（ランダー）は、船上から投入し、海底で任意の時間観測し、観測終了後は浮上する観測機器で（図1、2）、深海の生物多様性や環境に関するデータが取得できるモニタリング装置である。具体的には、魚類や大型無脊椎動物の分類群を検出するための環境DNA解析用海水ろ過物、メイオセントスや原核生物の分類群や数を検出するためのメタゲノム解析用海水や堆積物などが採集でき、各種センサーにより水温、塩分、圧力、濁度、溶存酸素、流向流速のデータを取得できる。ランダーは、従来の深海調査機器に比べ一桁以上安価な約3千万で製作できオペレーションに免許や資格は不要である。大きさは幅1.5m、高さ2.35m、空中重量452kgの三角錐型で、従来の深海調査機器に比べ小型軽量となっている。

海水や堆積物を用い、出現生物を特定する環境DNA分析や生物の機能を特定するメタゲノム分析、さらに

機械学習や深層学習を用いて分類群の同定や個体数計測ができる画像解析は近年目覚ましい進展がある。ランダーで得られるサンプルやデータを用い、これらの手法で分析することで、原核生物、メイオセントス、魚類や大型無脊椎動物の分類群の特定、個体数、機能に関するデータが得られるようになった。

このような簡便で効率的な深海生態系のモニタリング方法は、研究機関のみならず民間企業による深海調査の機会を増大させ、深海域の生物多様性や生態系に関する科学的データの取得を加速させることになる。

【沖合海底自然環境保全地域指定条件や生物多様性の観点から重要度の高い海域（重要海域）選定条件の点検】

深海生態系は自然のみならず漁業や資源開発などにより変動するため、沖合海底自然環境保全地域指定後も指定した条件が満たされているか確認する必要がある。環境DNA、メタゲノム、画像から得られる生物多様性データと、ランダーで計測する環境データは沖合海底自然環境保全地域の「指定書」にある条件の評価に活用されることが期待できる。

解説

海洋保護区の指定前に行われた「生物多様性の観点から重要度の高い海域」（重要海域）の抽出には、「唯一性、又は希少性」、「種の生活史における重要性」、「絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地」、「脆弱性、感受性又は低回復性」、「生物学的生産性」、「生物学的多様性」、「自然性」、「典型性・代表性」の8つの基準が使われた。その後、沖合海底自然環境保全地域（深海底の海洋保護区）は4海域が「指定書及び保全計画書」とともに指定され、この「指定書及び保全計画書」の下、保全地域を管理する必要がある。

「指定書及び保全計画書」の「指定書」には、指定理由として使われた重要海域の抽出基準と、各保全地域の特徴的な出現分類群、微生物の多様性の高さ、環境などが示されている。深海生態系は自然変動のみならず漁業や資源開発など人為的影響により変動するため、沖合海底自然環境保全地域指定後も指定理由が満たされているかどうか確認する必要がある。

フリーフォール式現場観測装置（ランダー）で得たサンプルで、沖合海底自然環境保全地域の海水や海水ろ過物からは、環境DNAで魚類、大型無脊椎動物が検出できるようになり、手法の有効性が確認された。この手法により、「指定書」にある特徴的な出現分類群の分布が確認できるようになった。小型無人探査機による調査が実施された場合、画像解析による大型無脊椎動物の分類群や個体数に関するデータも取得できるようになった。これは、沖合海底自然環境保全地域の指定理由の評価に強固なデータを与えることになる。

また、「指定書」には記載されていないが深海生態系の重要種で希少な大型魚類ヨコヅナイワシも西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域において、環境DNA解析などから確認された（図4）。本種は西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域における適したモニタリング対象種になる。

以上のようにランダーで得られるサンプルやデータと小型無人探査機で得られる映像は、沖合海底自然環境保全地域の指定条件が満たされているか点検することに活用できる。なお、小型無人探査機を用いなくてもランダーだけでも必要なデータは取得可能である。

【沖合海底自然環境保全地域保全計画の推進】

沖合海底自然環境保全地域の指定書には、沖合海底自然環境保全地域における「調査研究等の推進」と「おおむね10年ごとの点検」が提示されている。簡便で低コストな深海生態系のモニタリング手法を用い、高頻度で深海域の生物多様性や生態系に関する科学的データを取得することで、保全計画の効率的な実行に貢献することが期待できる。

解説

「1-2. 沖合海底自然環境保全地域指定条件の点検」で述べたように、沖合海底自然環境保全地域（深海底の海洋保護区）は、各保全地域の「指定書及び保全計画書」の下で管理することが肝要である。「指定書及

び保全計画書」の「保全計画書」には、当該地域における自然環境の保全に関する情報の収集、整理及び分析並びに調査研究等の推進や、おおむね10年ごとに点検を行う旨が示されている。

「1-1. 深海における生態系モニタリングの効率化」で述べたように、ランダーは、従来の深海調査機器に比べ低コストで簡易な深海生態系のモニタリング方法となる。このランダーなどを用いた深海生態系のモニタリング方法については、詳細なマニュアルがインターネット上で公開され（図1、https://www.jamstec.go.jp/bioenv/j/mpa-monitoring-method/pdf/monitoring_manual.pdf）、海洋調査、海洋生物研究、分子生物研究の基礎知識と経験を有すれば、このマニュアルを参照しながら深海生態系のモニタリングが実施できる。

このような安価・簡便で効率的な深海生態系のモニタリング方法は、研究機関のみならず民間企業による深海調査の機会を増大させ、高頻度で深海域の生物多様性や生態系に関する科学的データが取得することで、保全計画が実行できる可能性が高くなる。

B. 30by30に向けた科学情報の集積

昆明・モンリオール生物多様性枠組における2030年までに海域の30%を保全する（30by30）目標を日本周辺の海域で達成するには、主に深海底を含む沖合海域で海洋保護区もしくはOECMが設定される可能性が高い。これらの保全海域を設定するためには、深海底を含む沖合海域で生物多様性や生態系に関する科学的データの集積が必要となる。効率的な深海生態系のモニタリング手法は、新たな保全海域設定のための科学的データの集積に活用できる。

解説

生物多様性条約COP15（2023年）で愛知目標の後継となる「昆明・モンリオール生物多様性枠組」には、「2030年までに、陸域及び内陸水域並びに沿岸域及び海域の少なくとも30%、とりわけ生物多様性と生態系の機能及びサービスにとって特に重要な地域が、保護地域及びOECMからなるシステムを通じて、効果的に保全及び管理する（30by30）」ことや「生物多様性の保全と持続可能な利用のための科学研究とモニタリング能力を強化」などが掲げられている。

日本近海で保全海域を拡大し30by30を達成するには、深海底を含む沖合で海洋保護区やOECMを設定する必要があると思われる。これらを設定するには、「生物多様性の観点から重要度の高い海域」（重要海域）の再評価や新たに重要海域を抽出することも予想される。そのためには、重要海域の抽出基準（「唯一性、又は希少性」、「種の生活史における重要性」、「絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地」、「脆弱性、感受性又は低回復性」、「生物学的生産性」、「生物学的多様性」、「自然性」、「典型性・代表性」）を評価できる科学的なデータが不可欠となる。

フリーフォール式現場観測装置（ランダー）などによる深海生態系の効率的・簡易的な調査手法は、重要海域の抽出に資する科学的データの集積を加速し、さらに深海生態系の包括的理解を推進すると期待できる。

5-3. 研究目標の達成状況

全体目標	目標の達成状況
<p>本推進費全体では、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえ、広範囲の生物群（原核生物から脊椎動物まで）を対象に生物情報等を取得するべく、これまでの深海生態系調査に比べ低コストで実施できる簡便な深海生態系モニタリング法を構築することを目標とする。このために、人工知能などを用いた画像解析、環境DNAやメタゲノムの解析技術を</p>	<p>目標を上回る成果をあげた。 ランダーを開発し、沖合海底自然環境保全地域において環境DNA、メタゲノム、画像解析の分析に用いるサンプル（海水・堆積物・海水ろ過物）と、環境データを取得できるようにした。サンプルは他のテーマやサブテーマに提供した。堆積物中のメイオベントスおよび無人探査機の映像から大型底生動物について、画像解析から分類群判別と個体数を効率的に取得できるようにした。これら開発した手法で、重要海域選定基準および指定書を踏まえた基準や条件を評価する情報を取得できるようにした。ランダーは従来より深海調査に用いられている調</p>

<p>用い、映像・水・堆積物から生物データが取得できるようにする。また、水／堆積物採取と環境計測が可能な小型化したフリーフォール式現場観測装置を開発し、上記解析のためのサンプル・データを提供できるようにする。</p>	<p>査機器に比べ、小型・軽量化、製作費を一桁以上低コスト化、オペレーションの簡便化、調査航海経費の低コスト化ができた。ここまでは目標どおりの成果となる。</p> <p>本課題で開発した技術を広く展開するために、詳細なマニュアルを整備し公表した。深海生態系の最上位捕食者で、かつ希少種である巨大深海魚「ヨコヅナイワシ」を沖合海底自然環境保全地域で確認し、今後、当該海域の重要なモニタリング指標種となることを見出した。限られた予算のなかで沖合海底自然環境保全地域のフィールド調査を実施したが、他の研究プロジェクト航海と連携した航海の実施などにより、フィールド調査の機会を予算規模以上に増加させ、他のテーマも含め調査手法の開発機会を増加できた。これらは目標を上回る成果と思われる。</p>
--	--

サブテーマ1 目標	目標の達成状況
<p>無人探査機などの映像から大型生物の分類群同定と個体数測定を簡便にできる画像解析法を開発し、映像による生物情報生成法を提示する。各サブテーマに用いるサンプルを提供できるようにする。画像解析法はテーマ1サブテーマ2で実施予定の堆積物中の生物を対象にした画像解析にも応用できるようにする。また、他のサブテーマと情報交換しながら小型フリーフォール式現場観測装置を開発し、環境データ取得や環境DNAやメタゲノムの解析などに用いるサンプルを他のサブテーマに提供する。サブテーマ間との連携・協働によって効率的に研究を推進し、沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法を示す。</p>	<p>目標を上回る成果をあげた。</p> <p>無人探査機を用いた深海調査を想定し、機械学習やモデルを用いた画像解析から重要海域海選定基準の「脆弱性・低回復性」と「多様性」にあたる海綿動物と冷水性サンゴ類といった大型底生動物の分類群判別と個体数、被度を効率的に取得できるようにした（P28-29、5. 研究目標の達成状況参照）。画像解析の深層学習のモデルとして、画像の判別（xception）、物体の検出（YOLO）、セグメンテーション（塗分け；MASK RCNN/U-NET）について、サブテーマ2とそれぞれを分担して検討し効果的なモデルを採用することができた。ランダーを開発し、沖合海底自然環境保全地域において環境DNA、メタゲノム、画像解析の分析に用いるサンプルと、環境データを取得できるようにし、他のテーマやサブテーマに提供した。ランダーは従来より深海調査に用いられている調査機器に比べ、小型・軽量化、製作費を一桁以上低コスト化、オペレーションの簡便化、調査航海経費の低コスト化ができた（P29、5. 研究目標の達成状況参照）。調査航海の実施、アドバイザーの助言取り込み、全体会合などを行い、各テーマ・サブテーマが連携・協同して効率的に計画が進められるようにしにした。ここまでは目標どおりの成果となる。</p> <p>さらに、本課題で開発した技術を広く展開するために、詳細なマニュアルを整備し公表した。テーマ2と共同で深海生態系の最上位捕食者で、かつ希少種である巨大深海魚「ヨコヅナイワシ」を沖合海底自然環境保全地域で確認し、今後、当該海域の重要なモニタリング指標種となることを見出した。ほかにも7新種の発見があり沖合海底自然環境保全地域には未知種が生息するポテンシャルを示し海洋保護区としての重要性をした。限られた予算のなかで海洋調査船による沖合海底自然環境保全地域のフィールド調査を実施したが、他の研究プロジェクト航海と連携した航海の実施などにより、フィールド調査の機会を予算規模以上に増加させ、他のテーマも含め調査手法の開発機会を増加できた。これらは目標を上回る成果と思われる。</p>
サブテーマ2 目標	目標の達成状況

<p>深海堆積物中に遍在するメイオファウナの分類群同定と個体数測定を迅速かつ簡便に行える画像解析法の開発を行い、テーマ1サブテーマ1と連携・協働して、画像解析による生物情報生成法の構築を担う。また深海小型底生生物のメタゲノム解析を担当するテーマ3サブテーマ2と連携し、画像解析法（本サブテーマ）とメタゲノム解析法の相互検証を行い、両解析手法の相互の精度向上に取り組む。沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法の1つとして提示できるようにする。</p>	<p><u>目標どおりの成果をあげた。</u></p> <p>深海堆積物からメイオベントス（メイオファウナと同義）を簡便かつ高い回収率で分画、回収するための新たなサンプル処理技術を開発できた。またFlowCAM画像の取得から、統一的な画像処理、教師画像データセットの作成、深層学習モデルの構築、分類モデルの性能評価や分類精度向上の検討といった、主要なメイオベントスの自動分類・計測に必要な基盤技術の開発に成功することができたことに加えて、一連の作業工程について詳細な解説を行ったマニュアルを整備できた。</p> <p>テーマ3サブテーマ2と連携に対し、深海堆積物試料の固定に関して、メタゲノム解析に供することも可能な高濃度ルゴール固定試料(10%)を作成し、セルストレーナーとLudoxを用いたメイオベントスの効率的な分画手法が十分に適用可能であることを確認した。これにより、FlowCAMで画像情報を取得したメイオベントスについても、DNAバーコーディングやメタゲノム解析を行う見込みを立てることができ、両解析手法の精度向上に向けた取り組みを進めることができた。</p> <p>重要海域海選定基準の生物学的多様性のデータを簡便に取得できるようになった。</p> <p>以上のことから目標通りの成果をあげることができたと思われる。</p>
--	---

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

12 件

<主な査読付き論文>

- 1) Kawato, M., T. Yoshida, M. Miya, S. Tsuchida, Y. Nagano, M. Nomura, A. Yabuki, Y. Fujiwara, K. Fujikura (2021) Optimization of environmental DNA extraction and amplification methods for metabarcoding of deep-sea fish. *Method X*, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101238> (IF: 1.837)
- 2) Koeda, K., S. Takashima, T. Yamakita, S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2021) Deep-sea fish fauna on the seamounts of southern Japan with taxonomic notes on the observed species. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(11), 1294, <https://doi.org/10.3390/jmse9111294> (IF:2.744)
- 3) Aoki, K., Fujiwara Y, Tsuchida S (2022) Estimating deep-sea fish population density from the odour extension area: A theoretical basis and comparison with the conventional methods. *Frontiers in Marine Science*, doi.org/10.3389/fmars.2022.854958 (IF:5.247)
- 4) Fujiwara., Y., Tsuchida S., Kawato M., Masuda K., Sakaguchi S.O., Sado T., Miya M. and Yoshida T. (2022) Detection of the Largest Deep-Sea-Endemic Teleost Fish at Depths of Over 2,000 m Through a Combination of eDNA Metabarcoding and Baited Camera Observations. *Frontiers in Marine Science* 9:945758. doi: 10.3389/fmars.2022.945758 (IF:5.247)
- 5) Hookabe N, Koeda K, Fujiwara Y, Tsuchida S, Ueshima R. (2022) First eumonostiliferous nemertean from the Nishi-Shichito Ridge, *Genrokunemertes obesa* gen. et sp. nov. (Eumonostilifera, Nemertea). *PeerJ*, 10:e13857 <https://doi.org/10.7717/peerj.13857> (IF:3.061)
- 6) Hookabe, N, N. Jimi, H. Yokooka, S. Tsuchida, Fujiwara, Y. (2022) *Lacydonia shohoensis* (Annelida, Lacydoniidae) sp. nov. — a new lacydonid species from deep-sea sunken wood discovered at the Nishi-Shichito Ridge, Northwestern Pacific Ocean. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 101(6) 1-7, DOI:10.1017/S0025315421000862 (IF:1.559)
- 7) Jimi, N., C. Chen, Y. Fujiwara (2022) Two new species of *Branchinotogluma* (Polynoidae: Annelida) from chemosynthesis-based ecosystems in Japan. *Zootaxa* 5138 (1): 017–030. doi 10.11646/zootaxa.5138.1.2 (IF:1.028)
- 8) Hookabe, N., H. Kohtsuka, Y. Fujiwara, S. Tsuchida, R. Ueshima (2023) Three new species in *Tetrastemma* Ehrenberg, 1828 (Nemertea, Monostilifera) from sublittoral to upper bathyal zones of the northwestern Pacific. *ZooKeys* 1146: 135-146. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1146.95004> (IF:1.496)
- 9) Jimi, N., I. Kobayashi, T. Moritaki, S. P. Woo, S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2023) Insights into the diversification of deep-sea endoparasites: phylogenetic relationships within *Dendrogaster* (Crustacea: Ascothoracida) and a new species description from a western Pacific seamount. *Deep-Sea Research I*, <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2023.104025> (IF:3.101)
- 10) Komai, T., S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2023) A new deep-sea palaemonid shrimp assigned to *Periclimenes* Costa, 1844 (Decapoda: Caridea) from the West Mariana Ridge, northwestern Pacific. *Zootaxa* 5231 (4): 376–392. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5231.4.2> (IF:1.028)

6-2. 知的財産権

- 1) 藤原義弘、土田真二、河戸勝、吉田尊雄、増田殊大；「自律型大量濾過システム」、特許願22P007、令和5年3月20日

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	3件
口頭発表（学会等）	10件
「国民との科学・技術対話」の実施	20件
マスコミ等への公表・報道等	38件

本研究費の研究成果による受賞	0件
その他の成果発表	5件

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（テーマリーダー）

藤倉 克則

東京水産大学大学院修了、学術博士（水産学）、現在、国立研究開発法人海洋研究開発機構 地球環境部門
海洋生物環境影響研究センター長

研究分担者

サブテーマ1リーダー

藤倉 克則

東京水産大学大学院修了、学術博士（水産学）、現在、国立研究開発法人海洋研究開発機構 地球環境部門
海洋生物環境影響研究センター長

II. 成果の詳細

II-1 深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案

国立研究開発法人海洋研究開発機構

地球環境部門海洋生物環境影響研究センター 藤倉 克則

地球環境部門海洋生物環境影響研究センター 小栗 一将

地球環境部門海洋生物環境影響研究センター深海生物多様性研究グループ 藤原 義弘

地球環境部門海洋生物環境影響研究センター海洋環境影響評価研究グループ 山北 剛久

地球環境部門海洋生物環境影響研究センター海洋環境影響評価研究グループ 古島 靖夫 (令和3～令和4年度)

東京大学

生産技術研究所機械・生体系部門 巻 俊宏 (令和2～令和3年度)

<研究協力者>

国立研究開発法人海洋研究開発機構

海洋生物環境影響研究センター深海生物多様性研究グループ 吉田 尊雄

海洋生物環境影響研究センター深海生物多様性研究グループ 河戸 勝

海洋生物環境影響研究センター深海生物多様性研究グループ 土田 真二

東京大学

生産技術研究所機械・生体系部門 増田 殊大 (令和2～令和3年度)

[要旨]

本サブテーマでは、沖合海底自然環境保全地域指定後も重要海域選定基準や指定書の事項が維持されているかを評価する必要性を踏まえ、継続的かつ多地点での深海生態系のモニタリングを実現するために、深海調査用大型プラットフォームを用いなくても、サンプルやデータを取得できる技術を開発することを目的とした。また、画像から大型底生動物の分類群同定と個体数測定を簡便にできる画像解析法を開発し、重要海域選定基準を評価するための画像によるモニタリング法を構築することを目的とした。

ランダーを開発し、環境データ取得や環境DNAやメタゲノムの解析などに用いるサンプルを他のサブテーマに提供すること、無人探査機などの映像から大型底生動物の分類群同定と個体数測定を簡便にできる画像解析法を開発し、映像による生物情報生成法を提示することを目標とした。サブテーマ間との連携・協働によって効率的に研究を推進し、沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法を示すことも目標とした。

大型プラットフォームを用いなくても船上からフリーフォールで深海底に設置し、観測終了後に錘を切離し自己浮上する低コストで簡便に深海生態系をモニタリングできるフリーフォール式現場観測装置（以下、ランダーを開発した（図1、2）。このランダーを用いて、環境DNAやメタゲノム解析などに用いる海水、堆積物、海水ろ過物といったサンプルや環境データを取得して他のサブテーマに提供した。特に、海水ろ過物をin-situで採集できる現場大量ろ過システムMASS Pumpは、新たなアイデアを取り入れ開発したもので特許を申請した。堆積物の層を乱さずに採集する柱状採泥器もシンプルな工夫でサンプルを得ることができるようになった。無人探査機を用いた深海調査を想定し、画像解析から脆弱で低回復な海綿動物と冷水性サンゴ類といった大型底生動物の分類群判別と個体数、被度を効率的に取得できるようにした。本課題全体で開発した技術を広く展開するために、詳細なマニュアルを整備し公表した。テーマ2と共同で深海生態系の最上位捕食者で、かつ希少種である巨大深海魚「ヨコヅナイワシ」を沖合海底自然環境保全地域で確認し

（図4、Fujiwara et al. 2022）、今後、当該海域の重要なモニタリング指標種となることを見出した。ほかにも7新種の発見（Hookabe et al. 2022a, 2022b, 2023, Jimi et al. 2022, 2023, Komai et al. 2023）や魚類個体群密度の新たな推定方法の開発（Aoki et al. 2022）、海山における魚類の多様性把握（Koeda et al. 2021）ができ、沖合海底自然環境保全地域における科学的知見を示した。限られた予算のなかで海洋調査船による沖合海底自然環境保全地域のフィールド調査を実施したが、他の研究プロジェクト航海と連携した航海の実施などにより、フィールド調査の機会を予算規模以上に増加させ、他のテーマも含め調査手法の開発機会を提供した。そして、課題全体として、沖合海底自然環境保全地域において指定後も重要海域選定基準や指定書の事項が維持されているかを評価するための多角的な生物多様性モニタリング手法を示すことができた。

1. 研究開発目的

本サブテーマでは、沖合海底自然環境保全地域において指定後も重要海域選定基準や指定書の事項が維持されているかを評価する必要性を踏まえ、継続的かつ多地点での深海生態系のモニタリングを実現するために、深海調査用大型プラットフォームを用いなくても、サンプルやデータを取得できる技術を開発すること、ならびに画像から大型底生動物の分類群同定と個体数測定を簡便にできる画像解析法を開発し、重要海域選定基準を評価するための画像によるモニタリング法を構築することを目的とした。この目的達成には、実際の沖合海底自然環境保全地域におけるフィールド調査が必要となり、沖合海底自然環境保全地域のうち海山が多く本土から近距離にある「西七島海嶺」をフィールド調査海域とした。

2. 研究目標

サブテーマ1	深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案
実施機関	国立研究開発法人海洋研究開発機構・東京大学生産技術研究所
目標	無人探査機などの映像から大型生物の分類群同定と個体数測定を簡便にできる画像解析法を開発し、映像による生物情報生成法を提示する。各サブテーマに用いるサンプルを提供できるようにする。画像解析法はテーマ1サブテーマ2で実施予定の堆積物中の生物を対象にした画像解析にも応用できるようにする。また、他のサブテーマと情報交換しながら小型フリーフォール式現場観測装置を開発し、環境データ取得や環境DNAやメタゲノムの解析などに用いるサンプルを他のサブテーマに提供する。サブテーマ間との連携・協働によって効率的に研究を推進し、沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法を示す。

3. 研究開発内容

【2020（令和2）年度】

(1)ランダー開発：実海域でランダーの基本システムを作動させるために、システムのデザインを行った。他のテーマやサブテーマと議論し、魚類と大型無脊椎動物の環境DNA解析やメイオセントスと原核生物のメタゲノム解析に供するサンプルのタイプや量を選定し、それらの採集方法を検討した。漁業や資源開発、地質学的変動が生じた場合に変動する環境因子を想定し、それぞれの環境因子を計測する環境計測装置を選定した。環境DNA解析には約100 Lの海水が必要となり、ランダーでの採水は困難であることから、現場で海水をろ過する現場大量ろ過システム（以下、MASS Pump）の設計とプロトタイプを製作した。システムデザインを踏まえ、環境計測装置、メタゲノム解析用サンプルの採水器、MASS Pumpのプロトタイプをランダーに搭載し、陸上実験、浅海域試験などを行い、西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域で調査航海を行い作動試験を実施した。MASS Pumpのプロトタイプをロゼッタ型CTD採水器もしくはフリフォールランダーに搭載し作動試験を行った。その結果、コンタミの少ない非常に綺麗な環境DNA試料を採取することに成功した。同調査航海では、ランダー完成前でも他のテーマやサブテーマの研究開発を推進するために、無人探査機やニスキン採水器といった既存方法で、環境DNA、メタゲノム、画像解析に用いる堆積物、海水、映像を取得し他のテーマやサブテーマに提供した。

(2)大型生物画像解析技術開発：映像から主に大型底生動物の分類群同定と個体数測定を可能にするために、既存の画像解析手法を試行しながら画像解析に用いる学習・検証データを作成した。深層学習による画像解析には主な方法として、画像分類、物体検出、セグメンテーション（塗分け）が挙げられる。このうち本サブテーマでは、後者2つのモデルを検討した。画像分類についてはサブテーマ2において取り組まれたため、相互に情報交換を行った。物体検出モデルでは、既存の海底映像を用い主な生物に画像上の位置や形状と分類ラベルの付与する方法を検討した（アノテーション）。作成されたラベルに基づきYolo v3を用いた深層学習による画像解析モデルの作成を試行した。

(3)プロジェクト推進：サブテーマ間の連携・協働を推進するために、キックオフ会を開催し有識者からの助言を取り込むとともに、適宜情報共有や議論を行いながら、テーマ・サブテーマ間の連携や目標達成に向けた計画をアップデートした。全てのサブテーマの研究開発を推進するために、西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域で調査航海を行った。講演会などに参加し、「国民との科学・技術対話」などを推進し本課題の取り組みについて紹介した。

【2021（令和3）年度】

(1)ランダー開発：前年度のフィールド調査などを踏まえ、他のサブテーマによる原核生物とマイオセントスのメタゲノム解析とマイオセントスの画像解析に適した堆積物サンプルのタイプや量に適合した堆積物採集方法（柱状採泥）の検討と採集器の試作を行った。環境計測装置の再配置、メタゲノム解析サンプル用の採水器、改良したMASS Pump、堆積物採集装置の試作器をランダーに搭載した。陸上実験、浅海域試験の後、西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域において作動試験を行い、長さ20 cmを超える堆積物試料を採取することに成功した。MASS Pumpを搭載して、3時間の現場ろ過を実施した。海水中の懸濁物が非常に多かったため、ろ過途中でフィルターが詰まり、配管が一部破損したが、環境DNA解析を実施したところ、良好な解析結果を得た。前年度同様、ランダー完成前でも他のテーマやサブテーマの研究開発を推進するために、無人探査機やニスキン採水器といった既存方法で、環境DNA、メタゲノム、画像解析に用いる堆積物、海水、映像を取得し他のテーマやサブテーマに提供した。

(2)大型生物画像解析技術開発：画像解析の精度向上と効果的処理方法を確立するために、実映像を用いて解析ソフトウェアなどを調整した。解析に用いる映像として、ホバリング型無人探査機によって解像度の高い海底画像と通常の無人探査機による映像を沖合海底自然環境保全地域で収集した。解像度の高い下向きのスチルカメラ映像を用いて、特徴的な生物のアノテーションを実施し、生物の自動抽出による分布評価を行った。

(3)プロジェクト推進：サブテーマ間の連携・協働を推進するために、拡大アドバイザリー会合を開催し有識者からの助言を取り込むとともに、適宜情報共有や議論を行いながら、テーマ・サブテーマ間の連携や目標達成に向けた計画をアップデートした。また、環境省の担当者と高頻度に情報共有を行った。全てのサブテーマの研究開発を推進するために、西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域で調査航海を行った。講演会などに参加し、「国民との科学・技術対話」などを推進し本課題の取り組みについて紹介した。

【2022（令和4）年度】

(1)ランダー開発：作動試験で洗い出された問題点の対策を講じ、西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域および駿河湾（台風避泊により一部駿河湾で作動試験を実施）でランダーによる深海生態系モニタリングを行った。浮力材を追加してランダーの積載能力を高め、柱状堆積物を採取するためのコアラー3本とMASS Pump 2台を運用した。そして、ニスキン採水器による採水、柱状採泥器による採泥、MASS Pumpによる環境DNA試料の採取、タイムラプス映像の撮影、環境データの取得のいずれも成功した。これによって、ランダーを用いて沖合海底自然環境保全地域をモニタリングできるハードウェアが整った。MASS Pumpによる海水ろ過物は、魚類と大型無脊椎動物の環境DNA解析（テーマ2）に、柱状採泥器で採取した堆積物はマイオセントスのメタゲノム解析（テーマ3）と画像解析（テーマ1サブテーマ2）に提供するなど各種サンプル、環境データを取得し、各サブテーマに提供した。

(2)大型生物画像解析技術開発：昨年度得られた海底映像について、新しいバージョンのモデル（Yolo v5）による物体検知を実施した。セグメンテーションのモデルを用いた被度の抽出については、塗分けを行うためのアノテーションについて、ペイントソフトを用いた方法を取りまとめた。被度を抽出した自動抽出モデルの例を無人探査機による映像を用いて作成した。映像から沖合海底自然環境保全地域の指定書にある分類群である海綿動物や冷水性サンゴ類について重要海域選定基準を踏まえたモニタリング指標を得るための手法を構築した。

(3)プロジェクト推進：本課題のレビューと今後の研究開発につなげるためにアドバイザリー会合を開催し有識者からの助言を取り込むとともに、適宜情報共有や議論を行いながら、テーマ・サブテーマ間の連携や目標達成に向けた計画をアップデートした。また、アドバイザリー会合において環境省に本課題の成果概要を共有した。本課題全体で開発した深海生態系モニタリングが低コスト化しているかを検証するために、ランダーを用いた調査航海経費について民間企業とJAMSTEC間で比較した。本課題全体で構築した深海生態系モニタリング方法のマニュアルを作成しWebで公開した。講演会などに参加し、「国民との科学・技術対話」などを推進し本課題の取り組みについて紹介した。

4. 結果及び考察

【サブテーマ1】深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案

(1)ランダー開発

(1-1)ランダーの概要

低コストで簡便に深海生態系をモニタリングできるフリーフォール式現場観測装置（ランダー）を開発した。ランダーは、三角柱の金属フレーム（高さ約2.35 m、一辺が約1.50 m）にサンプル採集機器や環境計測

機器を搭載し、船上からフリーフォールで深海底に設置し、観測終了後に錘を切離し自己浮上する観測装置である(図1、2、5)。金属フレームの材質は、軽量でかつ海水の腐食に強いチタン製とした。本体の空中重量は装置類と錘を全て取付けた状態で452 kgあり、水中重量は約22 kgである。ランダーのフレームには、海底での観測終了後に自己浮上させるための浮力材が取り付けられている。これらの浮力材により、回収時(錘を切離した後)には約60 kgの浮力を確保した。

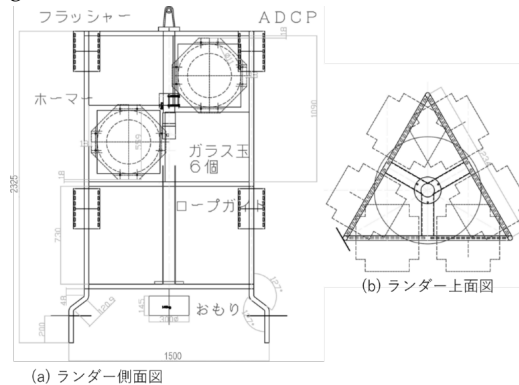


図5. フリーフォールランダーシステムの大きさ (a)：側面図 (b)：上面図。

2020年度は、西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域の正徳海山において、ランダーの基本システムを作動させるために4日間(2020年11月27日～11月30日)の連続観測を実施した。2021年度は、柱状採泥器1本をランダーに付加し、同保全地域の元禄海山において、一昼夜(2021年10月14日～10月15日)の連続観測を実施した。2022年度は、本プロジェクトで開発したランダーの完成形を駿河湾と同保全地域宝永海山において、各々一昼夜(駿河湾：2022年9月22日～9月23日、宝永海山：2022年9月25日～9月26日)の連続観測を実施した。

(1-2) ランダーに搭載したサンプル採集・環境計測装置

完成したランダーには、水温、塩分、圧力、濁度、溶存酸素を計測するRINKO Profiler (CTD)をはじめ、現場大量ろ過システムMASS Pump(2台)、超音波流速計(ADP-DW)、採水器(3本)、柱状採泥器(3本)、ビデオカメラ等の環境計測機器類が搭載されている(表1)。本ランダーは、これらの重量バランスが大きく変わることがなければ、表1に示した環境計測機器以外の装置や代替え装置を取付けることが可能である。構成を変えた場合は、陸上での重量計測やバランス調整等を再度実施する必要がある。浅海で切離しと浮上試験を行うことで観測の確実性は増す。

表1 ランダーシステムに搭載されている環境計測機器類

装置名	個数	仕様(メーカー・型番等)	観測項目/用途
音響切離し装置	1	海洋電子社製 モータ駆動式 切離しトランスポンダー(TMR-6005B)	錘を切離す。切離しが確実に行われたかを検知し信号発信
フラッシャー	1	海洋電子社製 ストロボフラッシャー(10L-CD)	夜間回収時にストロボ発光により浮上位置の発見を容易にする
イリジウムビーコン	1	NOVATECH イリジウムビーコン MMI -513 -12000 (iBCN)	浮上時のランダーの位置情報を知らせる
ROVホーマー	1	Sonardyne Type 7835 ROV-Homer 4000m	ROV用音響ガイダンスシステム。的確な方向と距離を知らせる。
超音波流速計	1	NORTEK Aquadopp-DW	海底近傍における単層の流向・流速を計測
ニスキン採水器	3	GENERAL OCEANICS, INC 20L	ランダー着底6～8時間後の現場海水を採集
MASS Pump	2	JAMSTEC製作	環境DNA用に大量の現場海水をフィルターろ過
RINKO Profiler(CTD)	1	JFE Advantech RINKO-Profiler(ASTD-2XTU)	水温、塩分、圧力、濁度、DO測定
小型深海カメラシステム	1	JAMSTEC製作	1分間の海底映像を約200フレーム取得
柱状採泥器	3	離合社 G.S 型表層採泥器	着底時に自重で採泥器を海底堆積中に差し込み採泥。上下の蓋のトリガーは6～8時間後に作動
錘	1	(株)瀧澤鋳機製作所 ランダー用(TK-25C-Φ300-165)	沈めるための錘。重量は93kg

・現場大量ろ過システム (MASS Pump)

魚類と大型無脊椎動物の環境DNA分析用の海水ろ過物を海底近傍から採集するために、MASS Pumpを開発した。これはフィルター、ろ過用ポンプと流量計およびこれらのコントローラーとバッテリーから構成され、深海の海水を吸引し、ろ過物をフィルターに集積する装置である（図6）。2020年から2022年の航海にかけて、MASS Pumpの試験を計31回実施した。小型軽量である点を活かし、ロゼッタ型CTD採水器、ランダー、ベイトカメラ、フルデプスランダー（他機関所有）、「しんかい6500」といった多岐にわたるプラットフォームに搭載でき（図7、表2）、6時間で最大約180 Lの現場海水をろ過することができた。当初、本プロジェクトの対象水深は2000 mまでであったが、システムの小型化に成功したことから、フルデプス（水深10900 m対応）機の試作も行った。その結果、MASS Pumpの運用を水深386 mから8336 mの範囲で実施できた。システム全体を小型化したため、開発したMASS Pumpの稼働時間は最大で7時間程度となったが、その時間内であっても、超深海のように環境DNA濃度が非常に低いことが推定される領域からも良好なサンプルを取得できた。

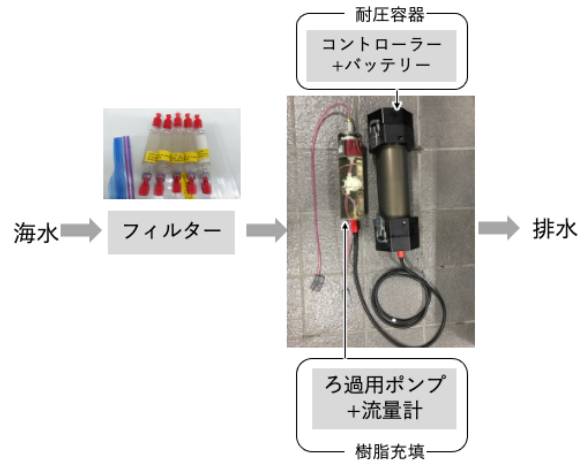


図6. 現場大量ろ過システム（MASS Pump）の構成

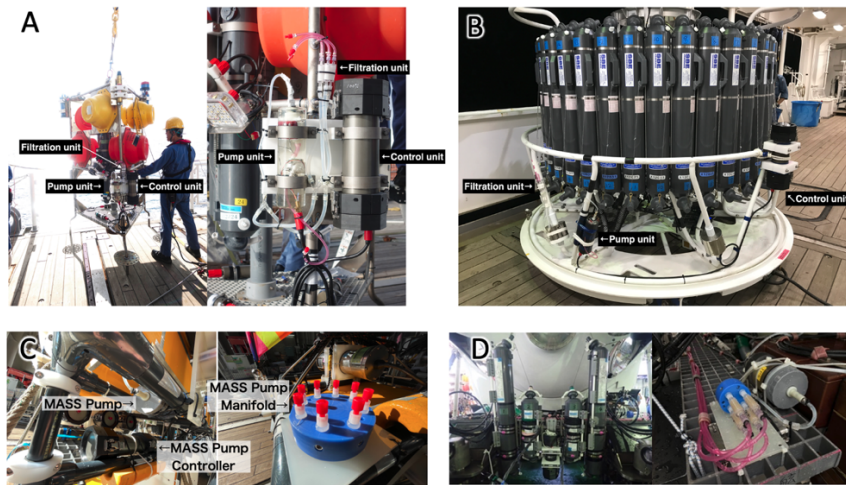


図7. 深海調査用の各種プラットフォームに搭載したMASS Pump。A: ランダーに搭載、B: ロゼッタ型CTD採水器に搭載、C: ベイトカメラ、D: 有人潜水調査船「しんかい6500」

表2. 深海調査用の各種プラットフォームに搭載したMASS Pumpのろ過結果の一部

日付	ろ過時間 (h)	プラットフォーム	海域 (*沖合海底自然環境保全地域)	水深 (m)	ろ過量 (L)
2020/11/17	3:00	ロゼッタ型CTD採水器	相模湾	794	110.1
2020/11/19	1:30	ロゼッタ型CTD採水器	駿河湾	386	56.4
2020/11/26	3:00	ロゼッタ型CTD採水器	正保海山*	2006	101.9
2020/11/27	3:00	ロゼッタ型CTD採水器	正徳海山*	1962	105.2
2020/12/1	6:00	ランダー	正徳海山*	2000	182.1
2020/12/6	3:00	ロゼッタ型CTD採水器	立冬海山*	1990	110.1
2020/12/9	3:00	ロゼッタ型CTD採水器	日光海山*	369	134.9
2021/10/14	3:00	ロゼッタ型CTD採水器	元禄海山南方*	2060	104.9
2021/10/18	3:00	ロゼッタ型CTD採水器	安永海山*	767	ca. 100
2022/8/7	5:00	フルデプスランダー	南西諸島海溝	6529	85.1
2022/8/12	4:00	フルデプスランダー	伊豆・小笠原海溝	7516	102.5
2022/8/15	6:00	フルデプスランダー	伊豆・小笠原海溝	8336	44.7
2022/9/22	7:00	ランダー	駿河湾	1200	105.5
2022/9/22	7:00	ランダー	駿河湾	1200	196
2022/9/22	7:00	ベイトカメラ	駿河湾	1223	292
2022/9/25	N.A.	「しんかい6500」	宝永海山*	2100	186.7

・ニスキン採水器

大型無脊椎動物の環境DNA分析および原核生物のメタゲノム分析用の海水を海底近傍から採集するために、20Lのニスキン採水ボトルを3本ランダーの中央部に取付けた(図4.3(a))。本ランダーにおける採水は、操作および作業を簡便化するため、採水トリガーに「Galvanic Timed Releases」(以下、ガルバニックリリーサー)を用いた(図8)。これにより、ランダーを投入してから任意の時間が経過した後に採水が行われた。ガルバニックリリーサーは、電蝕(ガルバニック腐食)を利用した安価な治具の一種で釣具のスイベルのような形状をしている。一定時間経過すると、ガルバニックリリーサー中央の金属部が溶解し2分割する。この機能を採水器のトリガーに応用した。ガルバニックリリーサーは、海水温に応じて6時間から100日程度までの溶解時間を持つ種類がある。本ランダーでは、AA2タイプのものを取付け、投入後6時間から8時間後の現場海水を採集するようにした。ガルバニックリリーサーは、柱状採泥器のトリガーとしても利用した。

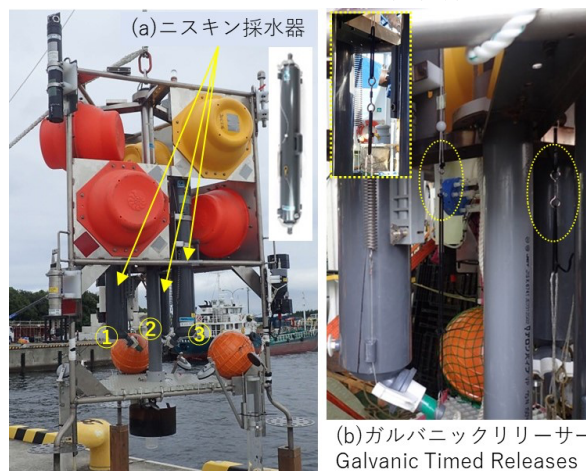


図8. ランダーに取付けた3本のニスキン採水器とGalvanic Timed Releasesの外観。(a) ニスキン採水器、(b) Galvanic Timed Releases (ガルバニックリリーサー)

・柱状採泥器

原核生物とメイオセントスのメタゲノム分析とメイオセントスの画像解析用に層序を乱さずに堆積物を採集するために、ランダーの3本の脚部に、G.S.表層型採泥器に用いられている採泥器(マルチプルコアラーでも使用)を個々に取付け、ランダーが着底すると同時に自重で3本の堆積物コアがサンプリングできるようにした(図9)。採泥器の蓋を閉めるトリガーは、採水器と同様にガルバニックリリーサーを用いた。海底が砂泥質時には、柱状コア3本分の堆積物が採集できた(図9)。

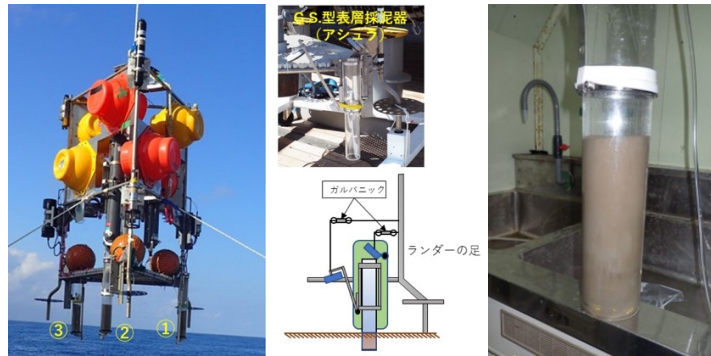


図9 ランダーに搭載した柱状採泥器の外観と採取した堆積物サンプル

・ RINKO Profiler (CTD)

水温、塩分、圧力(水深)、濁度、溶存酸素(DO)の環境計測を行うために、JFEアドバンテック社製のRINKO Profiler(耐圧2000 m仕様:ASTD-2XTUを使用)をランダーに搭載した(図10)。本体の空中重量は約3.8 kgで水中重量は約2.3 kgと軽量でかつ小型である。電源は、充電式リチウムイオン電池が採用されているため、観測時のバッテリー交換の作業が発生しない。測定方法は、一定時間毎にデータを記録する連続(Continuous)モードと、間欠的にデータを記録するバースト(Burst)モードの2種類が選択できる。測定インターバルは0.1~600秒で設定できる。

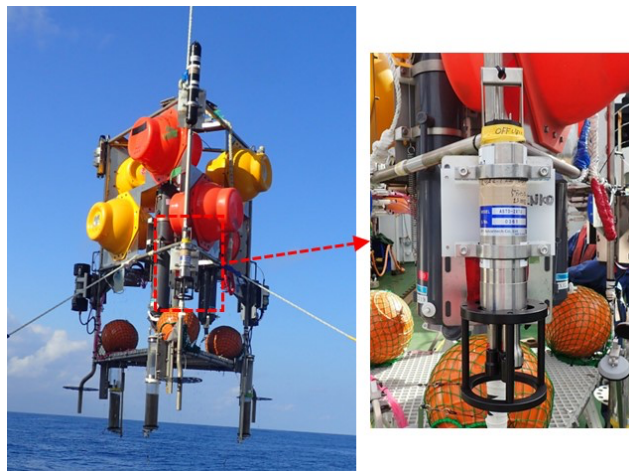


図10. RINKO Profilerの外観

西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域の宝永海山におけるRINKO Profilerによる環境データの時間変動を図11に示した。図中の(a)は水深、密度、(b)は水温、塩分、(c)は溶存酸素、濁度の時間変化を示す。下げ潮時に水温上昇の傾向が見られ(9/26 0:00付近)、併せて、濁度と溶存酸素の濃度減少も見られた。

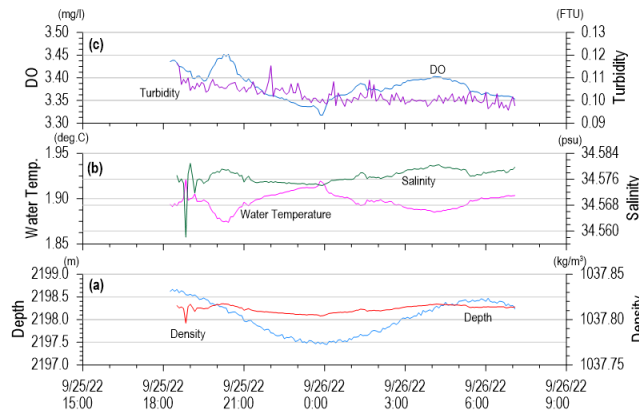


図10. 西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域の宝永海山におけるRINKO Profilerによる環境データの時間変化。(a) 水深、密度 (b) 水温、塩分 (c) 溶存酸素、濁度

・超音波流速計

Aquadop-DW(以下、ADP-DW)は、シングルポイント(単層計測)の超音波流向流速計である。3つの音響変換器を持ち、低反射率で良好な流速測定を可能とするアルゴリズムにより、高精度なデータを取得することができる。本装置では、一定水深における流向流速計の時系列変動を捉えることができる。本装置には、温度、コンパス、傾斜、圧力の各センサーも搭載されている。装置の空中重量は3.6 kgで、水中重量が1.2 kgとコンパクトな設計になっている。専用のアルカリまたはリチウム内蔵バッテリーパックを2個装着することにより、長期間の設置観測も可能である。流向流速の計測地点は、専用ソフトウェアを介して測器から5 m離れた距離まで設定可能である。

図11は、西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域の宝永海山における測流結果である。平均水温は2.31°C、平均流速は0.05 m/sであった。流向の時間変化から、下げ潮時には西向きの流れが、上げ潮時には東向きの流れが支配的であると推察された(図11(b))。これらのデータは、先に示したRINKO Profilerで得られた環境データと併せて、沖合海底自然環境保全地域の環境ベースラインデータとして今後も蓄積していくと共に、海山海底付近の環境がどのような因子によって規定されているのかについて今後解析を進めることが重要である。

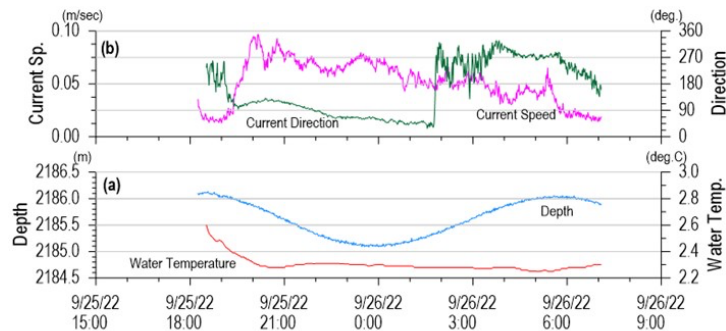


図11. 西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域の宝永海山の深海底における超音波電流計 (ADP-DW) による測流結果。(a) 水深(青線)、水温(赤線)の時間変化 (b) 流速(紫線)と流向(緑線)の時間変化

・小型深海カメラシステム

小型深海カメラシステムは、海底観察用のビデオカメラとライト(LED光源)から構成される5000 m級深海ミニカメラである。カメラ撮影可能時間は、起動後約3.5時間である。カメラは、SONY Actioncam HDR-AZ1×1台(本体バッテリー無)に64 GB microSDを搭載している。本カメラシステムでは、タイマー起動の他に設定した時刻・時間間隔でのプログラム撮影が可能である。バッテリーは18650Bリチウムイオンバッテリー (3400 mAh) を5本使用する。バッテリー5本の内1本はカメラ・制御用で残りの4本はLED光源用に用いる。このカメラシステムにより西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域において1回の設置につき総時間で約3時間分の映像を取得できるようにした(図12)。

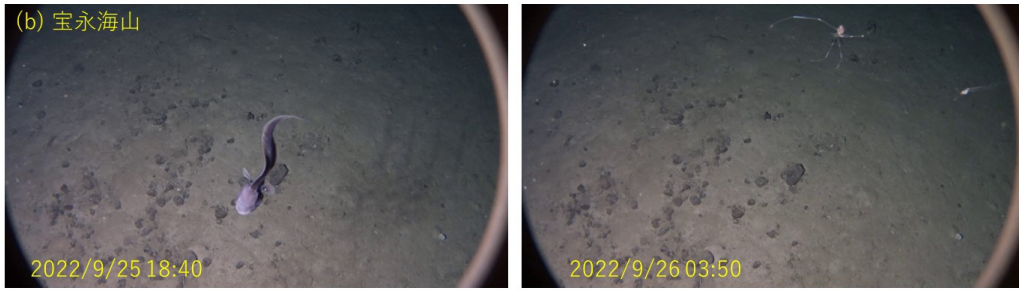


図12. 西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域の宝永海山（下2つ）における海底映像

(2) 大型生物画像解析技術開発

ホバリング型無人探査機で1620万画素の海底画像および1220万画素の4K海底映像、通常の無人探査機で約200万画素の海底映像を取得した。映像・画像から多く出現している種や特徴的な種を選定した結果、主な対象生物として表3の分類群を対象とし、下向きのスチルカメラ画像から各分類群に対し少なくとも20個体以上を目安に画像に分類群と画像上の位置の情報を付加し教師データを作成した。得られた教師データの画像に対して明度変換、回転などの処理を加えることで、データ数を人為的に水増しし（データオーギュメンテーション）、潜航ごとに深層学習のモデルを作成した。このうち、ツノサンゴ目、海綿動物（白い杯状タイプ）、海綿動物（茶色タイプ）、イソバナ属、タテゴトヤギ属、キンメダイ、サンゴイワシ、キンヤギ科、オオキンヤギ科（多数分枝タイプ）、ウデナガゴカクヒトデ属、八放サンゴ（白タイプ）、八放サンゴ（黄色タイプ）、エビ類（マルゴシミノエビおよびイトアシエビ属）、チゴダラ属については、YOLO v3によってモデルを作成した（図13）。海綿動物Rossellidae、オオキンヤギ科（2分枝タイプ）、オオキンヤギ科（単軸タイプ）、八放サンゴ目（Victorgorgiidae）、エビ類（主にイトアシエビ属）についてはYOLO v5を用いた。

作成されたモデルの正答率について、目視結果を正として、自動的な検出のうち、正しく検出された個体数の割合を求めた。30枚以上の画像（静止画または動画からの切り出し）について、目視との比較を行い精度を確認した（表3）。その結果、多くの分類群について、検出した個体数は目視よりも少なかったが、分類群は概ね正しく同定されていた。また、コントラストが高い白い海綿での正答率が高い一方で、コントラストの低い茶色の海綿の正答率が低い傾向がみられた。冷水性のサンゴ類であるキンヤギ科、オオキンヤギ科、八放サンゴ目はおおむね6割以上が検出できていたものの、一部の形状が不安定な種類については3割台の正答率にとどまった。なお、個体数が少ない魚類については高い検出率が得られているが、検証用の選定画像が学習画像と類似することによるバイアスも考えられた。

作成されたモデルの一部については、動画から一定間隔で切り抜いた画像から分類群を自動で検出した結果と、目視によりスチルカメラから抽出した結果との比較を行った（図14）。画角や撮影頻度が異なるため、5分ごとの平均出現数を算出し、傾向が一致するかどうかを確認した。八放サンゴ目Victorgorgiidaeや海綿動物Rossellidaeでは、出現数の大小の傾向を維持しつつ、4K動画の方が画角が広いカウント数が多くなったことに起因し、目視より自動検出のほうが数が増える傾向が見られた。イトアシエビ属では、目視のほうが数が増える傾向が見られたが、これは正答率が低かったことによる可能性がある。

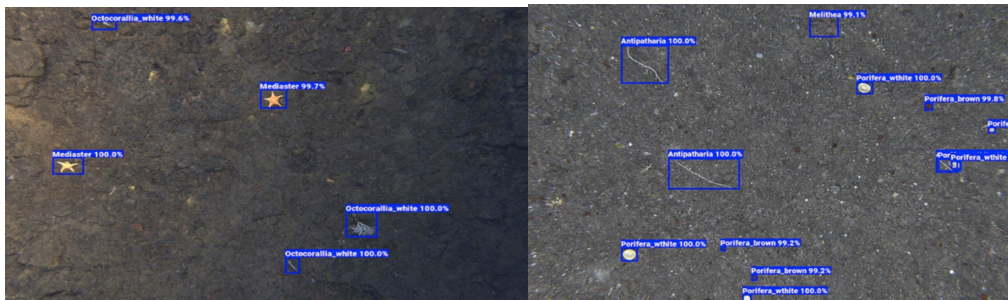


図13. YOLO v3による自動検出の結果の例

表3. 目視抽出と自動検出との比較

分類群		深層学習モデル	正答率(%)	目視	自動	正答数
海綿動物	白い杯状タイプ	YOLO V3	74.5	55	43	41
	茶色タイプ	YOLO V3	7.8	1238	98	97
	Rossellidae	YOLO V5	71.4	14	10	10
刺胞動物	イソバナ属	YOLO V3	90	20	18	18
	タテゴトヤギ属	YOLO V3	75	4	3	3
	キンヤギ科	YOLO V3	35.7	14	5	5
	オオキンヤギ科 2分枝タイプ	YOLO V5	35.3	17	6	6
	オオキンヤギ科 多数分枝タイプ	YOLO V3	65.5	40	27	26
	オオキンヤギ科 単軸タイプ	YOLO V5	65.5	165	109	108
ツノサンゴ目	ツノサンゴ目	YOLO V3	57.9	38	23	22
	八放サンゴ目 (Victorgorgiidae)	YOLO V5	66.7	15	10	10
	八放サンゴ目 (黄色タイプ)	YOLO V3	59.5	42	28	25
	八放サンゴ目 (白タイプ)	YOLO V3	51.7	147	78	76
節足動物	十脚目 (主にイトアシエビ属)	YOLO V5	57.7	26	15	15
	十脚目 (マルゴシミノエビ・イトアシエビ属)	YOLO V3	45.7	70	33	32
棘皮動物	ウデナガゴカクヒトデ属	YOLO V3	82.1	145	168	138
魚類	サンゴイワシ	YOLO V3	100	2	2	2
	チゴダラ属	YOLO V3	87.5	8	9	7
	キンメダイ	YOLO V3	75.6	33	33	25

セグメンテーションによる被度の抽出については、塗分けを行うためのアノテーションの手法について、ペイントソフトを用いた簡便な方法を取りまとめ、作業のマニュアルに記載した。この手法からはセグメンテーションのモデル用のラベル情報だけでなく、ラベルの矩形情報を用いて、個体1つ1つが離れている限りはYOLOのモデル用のラベルも作成することができる。この方法で作成されたラベルによってU-Netを用いたモデルを作成し、無人探査機による映像を用いて被度を自動で抽出する例を作成した(図15)。

以上のように無人探査機の画像を深層学習モデルの物体検出とセグメンテーションによって画像解析することで、脆弱で低回復性にある海綿動物や冷水性サンゴ類の分類群の同定と個体数・被度を効率的に取得できるようになった。これは、沖合海底自然環境保全地域指定の根拠となる重要海域選定基準である「唯一性、又は希少性」、「脆弱性、感受性又は低回復性」、「生物学的多様性」や沖合海底自然環境保全地域の「指定書および保全計画書」にある分類群の評価に資する情報となる。

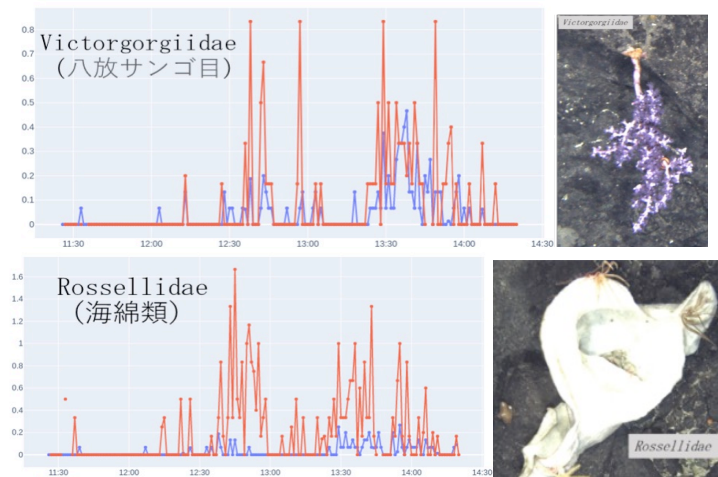


図14. ビデオ画像からの自動検出結果と、スチルカメラからの目視抽出結果との比較。上：八放サンゴ目Victorgorgiidae、下：海綿動物Rossellidae

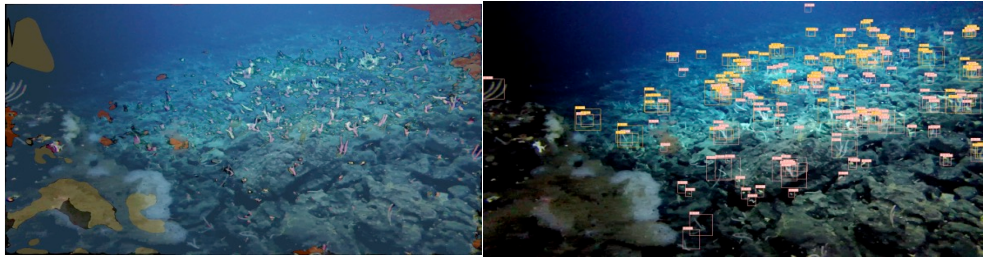


図15. U-Net(左)とYolo (右) の結果。サンゴ類の被度が全体の2%、岩の領域の8%と抽出された

(3) プロジェクト推進

本サブテーマは、テーマ・サブテーマ間との連携・協働による効率的な研究推進と沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法を示すという課題全体のとりまとめを担った。そのために、沖合海底自然環境保全地域における調査航海を実施し全テーマ・サブテーマが使うサンプルやデータを提供すること、アドバイザリーボードなどを開催し課題の進捗などにおける助言享受や情報共有、成果の取りまとめを行った。

・沖合海底自然環境保全地域における調査航海：西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域を対象に、2020年は海洋研究開発機構の海底広域研究船「かいめい」（図17）により11月25日-12月1日、2021年は同船により10月12日-10月17日、2022年は深海潜水調査船支援母船「よこすか」（図17）により9月19日-9月28日でフィールド調査を実施した。これらの航海では、ランダーの作動試験と機能検証、全サブテーマが使用するサンプルとデータの取得、地形調査などを実施した。2022年は台風を避けるために調査の一部を駿河湾で実施した。限られた予算のなかで海洋調査船による沖合海底自然環境保全地域のフィールド調査を実施したが、他の研究プロジェクト航海（環境省からの受託調査航海「沖合海底自然環境保全地域モニタリング」）と連携した航海の実施などにより、フィールド調査の機会を予算規模以上に増加させ、全サブテーマが取り組む調査手法の開発機会を増加できた。



図17. 左：2020年・2021年に西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域の調査に使用した調査船「かいめい」5,747トン。右：2022年に調査に使用した調査船「よこすか」4,439トン

・課題の進捗などにおける助言享受や情報共有：本課題を効果的、効率的に推進するために外部有識者からなるアドバイザリー会合を設置した。アドバイザリーメンバーは、小池勲夫 東京大学名誉教授、中田 薫 水産研究・教育機構・理事、藤井輝夫 東京大学生産技術研究所 教授（2020年度）、藤田敏彦 国立科学博物館動物研究部グループ長、山中寿朗 東京海洋大学 教授（2021-22年度）とした。2020年6月22日にキックオフ会合、2021年3月23日に2020年度アドバイザリー会合、2021年12月24日に2021年度拡大アドバイザリーボード会合、2023年3月24日に2022年度アドバイザリー会合を開催した。各会合には、環境省自然環境局自然環境計画課の担当者、本課題の環境再生保全機構プログラムオフィサー、環境再生保全機構と海洋研究開発機構の事務局も参加した。2021年度拡大アドバイザリーボード会合には環境研究推進委員会（自然共生部会）委員と環境再生保全機構プログラムディレクターも参加した。これらの会合の議論や助言は、その後の課題推進の参考とした。課題参画者間では、航海乗船前、アドバイザリー会合前も含め、適宜、会合やビジネスツールを活用しながら情報共有や連携をとりながら課題に取り組んだ。

・成果の取りまとめ：成果を研究論文として公表することに加え、シンポジウム、プレスリリース、多数のメディア取材、講演会、一般書籍などで広く発信した。また、本課題全体で開発した深海生態系モニタリング法を広く展開するために、詳細なマニュアルを整備しインターネット上で公開した

（https://www.jamstec.go.jp/bioenv/j/mpa-monitoring-method/pdf/monitoring_manual.pdf）。海洋調査、海洋生物研究、分子生物研究の基礎知識と経験を有した者が、深海生態系のモニタリングを行う場合、このマニュアルが参考になると思われる。

(4) 希少種ヨコヅナイワシを確認

2020年、2021年に西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域の正保海山、正徳海山、元禄海山、安永海山および中マリアナ海嶺・西マリアナ海嶺北部沖合海底自然環境保全地域の日光海山、立冬海山において、海底広域研究船「かいめい」に装備されたCTD付きロゼット型採水器を用いた大量採水を行い、計2.6 tの海水を75本のろ過フィルターでろ過した（1本当たり約35 kgの海水をろ過）。これらのろ過フィルターから環境DNAを抽出し、魚類の塩基配列を対象とした遺伝子増幅を行ったのち、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の解読を行った結果、約780万個のDNA断片（リード）から塩基配列情報を得ることができた。その中で、正徳海山の水深1961 m、元禄海山南方の水深2060 m、安永海山の水深1969 mおよび1976 mで採取した海水からヨコヅナイワシの遺伝子配列を検出した（図18、Fujiwara et al. 2022）。ヨコヅナイワシの遺伝子配列が検出されたのはいずれも水深が1900 m以深であり、西七島海嶺に限定されていた。ヨコヅナイワシの遺伝子配列が検出された地点において、解析した各地点の総リード数に占めるヨコヅナイワシ配列の割合は0.5～8.9%であり、平均2.4%の配列がヨコヅナイワシのものであった。またヨコヅナイワシの遺伝子配列の検出は海底付近に限定されており、同一地点であっても海底から大きく離れた場所で採取した海水からはヨコヅナイワシの遺伝子配列を確認することができなかった。

2021年にはヨコヅナイワシの遺伝子配列が確認された海山のうち、元禄海山南方の水深2091 mにベイトカメラを設置したところ、海底設置から約5時間半後にヨコヅナイワシが出現した（図19）。餌カゴに近づいてきたヨコヅナイワシは付近にいたイバラヒゲに対して大きく口を開ける威嚇行動を2回行って、集まっていた魚類を追い払い、餌カゴに噛み付いた後、その場を離れた。撮影した映像から、ヨコヅナイワシの眼が藍色をしていることや皮膚にはかなり凹凸があり、多くの寄生虫が付着していることがわかった。約4分後に同じ個体がカメラの前に姿を現し、餌カゴに近づくことなく遠目を泳ぎ去った。餌カゴのサイズを元に、映像から算出したヨコヅナイワシの全長は253 cm（標準体長222 cm）であった。今回の調査で環境DNA解析もしくはベイトカメラ観察によりヨコヅナイワシを確認した地点の棲息環境は、水深1961～2091 m、水温1.9～2.0°C、塩分34.6、酸素濃度97.6～105.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ であった。

環境DNA解析とベイトカメラ観察を組み合わせた本研究により、ヨコヅナイワシの新たな生息地を発見するとともに、他種に対する威嚇行動を初めて記録した。ヨコヅナイワシは2021年に新種として記載され、これまでにわずか7個体しか採集されていない希少種である。このような「発見の難しい種」を生物密度が非常に低い外洋の深海域で検出できたことは、環境DNA解析が将来にわたる沖合海底自然環境保全地域のモニタリングに非常に有効な手法であることを示した。

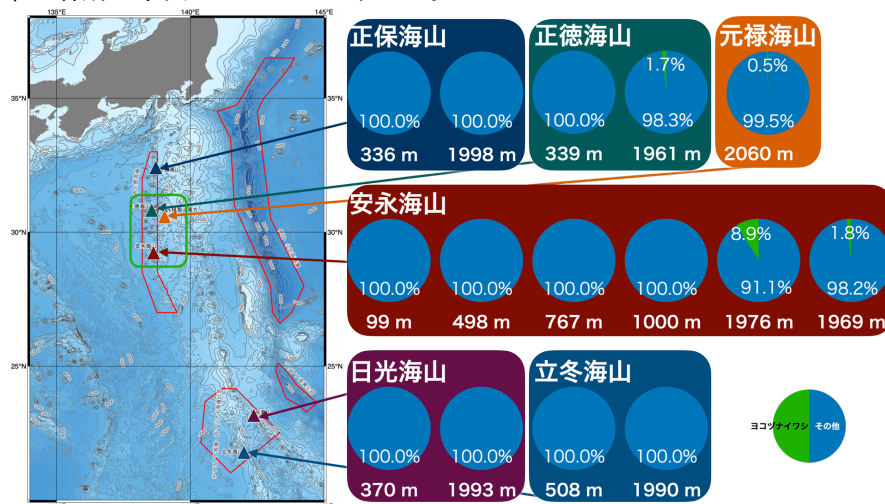


図18. 環境DNA解析による沖合海底自然環境保全地域からのヨコヅナイワシの検出結果

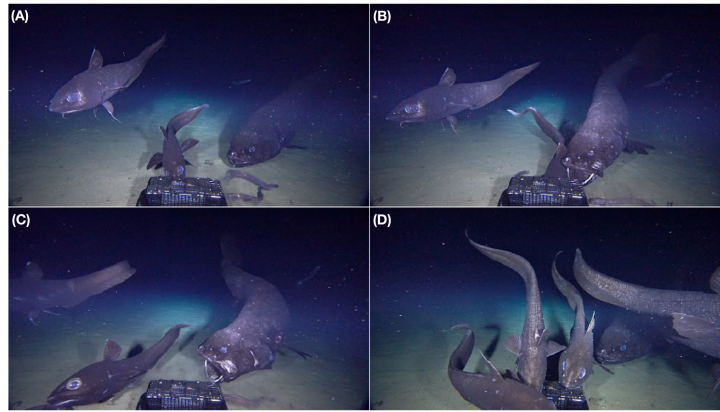


図19. ベイトカメラで撮影したヨコヅナイワシ。2021年10月14日、元禄海山南方（水深2091 m）に設置したベイトカメラにより撮影。(A) ヨコヅナイワシが最初にベイトカメラ前に現れたときの様子（右側の個体）、(B) および (C) 大きく口を開けてイバラヒゲを威嚇するヨコヅナイワシ、(D) ヨコヅナイワシが二度目にベイトカメラ前に現れたときの様子

(5) 新種生物の発見と海山の生物多様性

本課題で実施した調査航海などのサンプルやデータを活用し、沖合海底自然環境保全地域における各海山の生物多様性に関するベースライン情報を創出するために、様々な分類群において分類学的な検討を行った。特に魚類については、無人探査機、自律型無人探査機、ベイトカメラで撮影した映像情報と採集した試料をもとに多様性を比較した (Koeda et al. 2021)。無人探査機の調査は、各海山の山頂付近と基底部付近で計2～4潜航実施した。2020年の調査では合計20目51科81種の魚類が確認された。魚類の生物多様性は海山間で異なり、熱水噴出孔のある日光海山は、4つの海山の中で最も生物多様性が低かった。浅海では上記の方法全てを組み合わせることで調査を実施した結果、無人探査機、自律型無人探査機、ベイトカメラのみで記録された種はそれぞれ23種、7種、12種あり、様々な方法を組み合わせることで海山の魚類相を正確に理解できることが明らかになった。また、これまでに以下に示す8種を新種として報告した (Hookabe et al. 2022, 2023, Jimi et al., 2022a, 2022b, 2023, Kobayashi et al. 2022, Komai et al. 2023)。

1. *Dendrogaster nike* Jimi, Kobayashi, Moritaki, Woo, Tsuchida, Fujiwara, 2023
2. *Periclimes variabilis* Komai, Tsuchida & Fujiwara 2023
3. *Tetrastemma shohoense* Hookabe, Kohtsuka, Fujiwara, Tsuchida & Ueshima, 2023
4. *Asthenactis agni* Kobayashi, Yamamoto, Fujiwara, Tsuchida & Fujiwara, 2022
5. *Branchinotogluma nikkoensis* Jimi, Chen & Fujiwara, 2022
6. *Branchinotogluma sagamiensis* Jimi, Chen & Fujiwara, 2022
7. *Lacydonia shohoensis* Hookabe, Jimi, Yokooka, Tsuchida & Fujiwara, 2022
8. *Genrokunemertes obesa* Hookabe, Koeda, Fujiwara, Tsuchida, Ueshima, 2022

5. 研究目標の達成状況

【サブテーマ1 目標】

無人探査機などの映像から大型生物の分類群同定と個体数測定を簡便にできる画像解析法を開発し、映像による生物情報生成法を提示する。各サブテーマに用いるサンプルを提供できるようにする。画像解析法はテーマ1サブテーマ2で実施予定の堆積物中の生物を対象にした画像解析にも応用できるようにする。また、他のサブテーマと情報交換しながら小型フリーフォール式現場観測装置を開発し、環境データ取得や環境DNAやメタゲノムの解析などに用いるサンプルを他のサブテーマに提供する。サブテーマ間との連携・協働によって効率的に研究を推進し、沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法を示す。

【目標の達成状況】

目標を上回る成果をあげた。

プロジェクト全体目標にある「重要海域の抽出基準のうち、主に唯一性・希少性、絶滅危惧種の生育・生息地、脆弱性・感受性又は低回復性、生物学的生産性、生物学的多様性に関する生物情報等をモニタリング項目とする」に対し、一般的になりつつある無人探査機を用いた深海調査を想定し、機械学習やモデルを用

いた画像解析から重要海域海選定基準の「脆弱性・低回復性」と「多様性」にあたる海綿動物と冷水性サンゴ類といった大型底生動物の分類群判別と個体数、被度を効率的に取得できるようにした。具体的には、画像解析の深層学習のモデルとして、画像の判別 (xception)、物体の検出 (YOLO)、セグメンテーション (塗分け; MASK RCNN/U-NET) について、サブテーマ2とそれぞれを分担して検討し効果的なモデルを採用することができた。また、独特な海洋環境がある場所も「唯一性・希少性」にあたるわけだが、環境因子の計測や映像から、これを評価するデータを取得できるようになった。

フリーフォール式現場観測装置 (ランダー) を開発し、沖合海底自然環境保全地域において環境DNA、メタゲノム、画像解析の分析に用いるサンプル (海水・堆積物・海水ろ過物) と、環境データ (水温・塩分・圧力・濁度・流向流速・溶存酸素) を取得できるようにし、他のテーマやサブテーマに提供した。ランダーが完成する前では、沖合海底自然環境保全地域で調査航海を実施し、各サブテーマにサンプル・データを提供した。ランダーは、深海生態系モニタリングに使われる深海用大型無人探査機や有人潜水調査船、大型ウインチと採水器に比べ小型軽量であり、数百トンクラスの調査船や作業船でオペレーションができる。専門のオペレーターも不要となり簡便な深海生態系モニタリング手法となる。また、ランダーの製作コストは約3000万となった。有人潜水調査船「しんかい6500」の建造費は約120億円、深海用大型無人探査機は約4億円以上、大型ウインチと採水器は約6億円となり、本課題で開発したランダーは既存方法に比べ低コストとなる。ランダーを用いた調査を民間調査会社を実施する場合とJAMSTECが実施する場合の海域調査費を比較したところ調査航海経費の低コスト化ができることがわかった (表4)。

表4. 民間調査会社とJAMSTECが沖合海底自然環境保全地域 (海洋保護区) で海域調査を行った場合の経費比較

組織名	見積もり金額	備考
A社	68,750,000円	調査船664 t 使用
B社	78,639,000円	備船1292 t使用
JAMSTEC	152,558,530円	自社調査船「かいめい」5747 t 使用

調査航海の実施、アドバイザーの助言取り込み、全体会合などを行い、各テーマ・サブテーマが連携・協同して計画が進められるようにし、それぞれが効率的に生物多様性モニタリング手法を開発できるようにした。ここまでは目標どおりの成果となる。

さらに、本課題で開発した技術を広く展開するために、詳細なマニュアルを整備し公表した。テーマ2と共同で深海生態系の最上位捕食者で、かつ希少種である巨大深海魚「ヨコヅナイワシ」を沖合海底自然環境保全地域で確認し、今後、当該海域の重要なモニタリング指標種となることを見出した。ほかにも7新種の発見があり沖合海底自然環境保全地域には未知種が生息するポテンシャルを示し海洋保護区としての重要性をした。限られた予算のなかで海洋調査船による沖合海底自然環境保全地域のフィールド調査を実施したが、他の研究プロジェクト航海と連携した航海の実施などにより、フィールド調査の機会を予算規模以上に増加させ、他のテーマも含め調査手法の開発機会を増加できた。これらは目標を上回る成果と思われる。

6. 引用文献

- Fujiwara, Y., Tsuchida S., Kawato M., Masuda K., Sakaguchi S.O., Sado T., Miya M. and Yoshida T. (2022) Detection of the Largest Deep-Sea-Endemic Teleost Fish at Depths of Over 2,000 m Through a Combination of eDNA Metabarcoding and Baited Camera Observations. *Frontiers in Marine Science* 9:945758. doi: 10.3389/fmars.2022.945758
- Hookabe N, Koeda K, Fujiwara Y, Tsuchida S, Ueshima R. (2022a) First eumonostiliferous nemertean from the Nishi-Shichito Ridge, *Genrokunemertes obesa* gen. et sp. nov. (Eumonostilifera, Nemertea). *PeerJ*, 10:e13857 <https://doi.org/10.7717/peerj.13857>
- Hookabe, N, N. Jimi, H. Yokooka, S. Tsuchida, Fujiwara, Y. (2022b) *Lacydonia shohoensis* (Annelida, Lacydoniidae) sp. nov. a new lacydonid species from deep-sea sunken wood discovered at the Nishi-Shichito Ridge, Northwestern Pacific Ocean. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 101(6) 1-7, DOI:10.1017/S0025315421000862
- Hookabe, N., H. Kohtsuka, Y. Fujiwara, S. Tsuchida, R. Ueshima (2023) Three new species in *Tetrastemma* Ehrenberg, 1828 (Nemertea, Monostilifera) from sublittoral to upper bathyal zones of the northwestern Pacific. *ZooKeys* 1146: 135-146. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1146.95004> (IF:1.496)

- Jimi, N., C. Chen, Y. Fujiwara (2022) Two new species of *Branchinotogluma* (Polynoidae: Annelida) from chemosynthesis-based ecosystems in Japan. *Zootaxa* 5138 (1): 017–030. doi 10.11646/zootaxa.5138.1.2
- Jimi, N., I. Kobayashi, T. Moritaki, S. P. Woo, S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2023) Insights into the diversification of deep-sea endoparasites: phylogenetic relationships within *Dendrogaster* (Crustacea: Ascothoracida) and a new species description from a western Pacific seamount. *Deep-Sea Research I*, <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2023.104025>
- Koeda, K., S. Takashima, T. Yamakita, S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2021) Deep-sea fish fauna on the seamounts of southern Japan with taxonomic notes on the observed species. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(11), 1294, <https://doi.org/10.3390/jmse9111294>
- Komai, T., S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2023) A new deep-sea palaemonid shrimp assigned to *Periclimenes* Costa, 1844 (Decapoda: Caridea) from the West Mariana Ridge, northwestern Pacific. *Zootaxa* 5231 (4): 376–392. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5231.4.2>

II-2 深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発

国立研究開発法人国立環境研究所

生物・生態系環境研究センター 河地 正伸

地域環境研究センター 越川 海

国立研究開発法人海洋研究開発機構

地球環境部門海洋生物環境影響研究センター海洋プラスチック動態研究グループ 北橋 倫（令和2～令和3年度）

【要旨】

メイオベントスは、その群集組成が人為的な攪乱や環境変動により、変化することが知られる一方で、その生物多様性を評価するには、顕微鏡下で堆積物中の個体を同定、計数する必要があり、時間、労力、分類学的知識と経験が必要である。そこで本サブテーマでは、沖合海底自然環境保全地域における深海底堆積物中のメイオベントスを対象として、迅速かつ簡便に、継続的多地点での群集組成のモニタリングを実現するために、堆積物試料の処理法の検討を行い、メイオベントスの画像情報の取得と画像処理、そして深層学習による自動分類・計数システムを構築することを目的としている。これにより、重要海域の抽出基準を評価するためのモニタリング手法の開発の実現を目標とする。画像解析に基づく生物情報の生成に関しては、テーマ1サブテーマ1とも連携、適宜情報共有しながら効率的に研究を推進し、沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法とすることも目標とする。さらに本サブテーマで開発する技術を広く普及するための実用的なマニュアルを整備する。

本サブテーマでは、1) 沖合海底自然環境保全地域等において、堆積物採取、深度別分割、固定保存を行い、2) 堆積物からメイオベントスを効率的に分離・分画する前段階処理方法の検討と運用、2) イメージングフローサイトメトリ (FlowCAM) を用いて、メイオベントス等の画像の取得、自動分類に必要な教師画像データの整備、3) 深層学習による解析と自動分類システムの構築と運用、4) 実用的なマニュアル整備、といった流れで研究を進めた。

堆積物からメイオベントスを分画、回収する工程において、従来法（ステンレス篩によるサイズ分画とLudoxによる回収）と比較して、本サブテーマで考案した方法（Ludoxによる回収とセルストレーナーによるサイズ分画）は、より簡便で高い回収率でメイオベントスを分画できた。FlowCAM画像の深層学習による分類予測モデルの構築では、まずFlowCAM付属のプログラムVisualSpreadSheetのclassification機能とライブラリ機能等を活用して、懸濁粒子の分類及び複数サンプル画像を分類ごとに画像セットに統合する作業を行い、個別画像の抽出、背景合成・正方形化等の画像処理と分類情報との紐付けやデータベース化を行った。層化無作為抽出法で、各フォルダ画像を、教師画像 (60%)、検証用画像 (20%)そして性能評価用テスト画像 (20%)に分割し、マルチレイヤーニューラルネットワーク (MNN) で構成されるXceptionモデルをベースモデルとする分類予測モデルを用いて、予測性能評価を行い、更に分類方法の見直しやパラメータ調整、モデル構造の修正を行うことで分類精度の向上を図った。また対象とする分類群を8クラスから26クラスに拡大することで、正答率の向上も図ることができた。

FlowCAMと深層学習を利用する場合、1試料につきおおよそ20-30分の時間が必要で、その分類・計測の精度は教師画像の整備状況や分類モデルの予測性能によって決まった。一方、従来の検鏡による分類・計数では、1試料につき15-60分の時間が必要で、分類や計測の精度は作業者の経験や技術に依存する。FlowCAMと深層学習を用いる場合、各試料の画像情報が保存されるため、新しい分類システムを利用して繰り返し分類や計数を行うことが可能で、分類や計測結果の検証や更新も可能となる。モニタリング時に多数の試料について分類・計数を行うことが必要な場合、FlowCAMと深層学習を用いることで、作業量や時間を削減できるなど、より効率的な方法となることが期待できる。

1. 研究開発目的

本サブテーマでは、まず堆積物からメイオベントスを効率的に分画する技術について検討をした上で、イメージングフローサイトメトリを用いてメイオベントスの画像を取得、教師画像データを整備する。そして深層学習による画像解析に基づく自動計数・分類システムを構築する。海洋保護区候補海域における調査航海において、本研究で構築した手法の性能評価や改良に取り組むことで、沖合海底自然環境保全地域管理の

ための多角的な生物多様性モニタリング手法の1つとして提示できるようにする。

2. 研究目標

サブテーマ2	深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発
サブテーマリーダー/ 所属機関	河地 正伸／国立研究開発法人国立環境研究所
目標	深海堆積物中に遍在するメイオファウナの分類群同定と個体数測定を迅速かつ簡便に行える画像解析法の開発を行い、テーマ1サブテーマ1と連携・協働して、画像解析による生物情報生成法の構築を担う。また深海小型底生生物のメタゲノム解析を担当するテーマ3サブテーマ2と連携し、画像解析法（本サブテーマ）とメタゲノム解析法の相互検証を行い、両解析手法の相互の精度向上に取り組む。沖合海底自然環境保全地域管理のための多角的な生物多様性モニタリング手法の1つとして提示できるようにする。

3. 研究開発内容

【2020（令和2）年度】

- (1) メイオベントスの分画手法の検討：過去に採取した堆積物試料を用いて、堆積物からメイオベントスを効率的に分離・分画する前段階処理方法の検討を行った。
- (2) FlowCAMによるメイオベントス画像の取得：イメージングフローサイトメトリを用いて、メイオベントスや微小プランクトンの画像を取得、自動分類に必要な教師画像データを整備した。
- (3) 深層学習によるメイオベントスの自動分類システムの構築：教師画像データを基に、機械学習（RAPID、NEC）によるメイオベントスや微小プランクトンの分類を試行し、自動計数・自動分類のための画像解析フィルター及びカーネルの最適化に取り組んだ。
- (4) 堆積物の採取・処理：実海域調査航海において、試験的に堆積物を採取して、現場でメイオベントスの分離・分画処理を行った。

【2021（令和3）年度】

- (1) メイオベントスの分画手法の検討：海洋保護区候補地での実海域調査航海において、継続して堆積物の採取、メイオベントスの分離・分画処理を行った。
- (2) FlowCAMによるメイオベントス画像の取得と深層学習によるメイオベントスの自動分類システムの構築：メイオベントス分画試料を用いて、教師画像データの拡充、自動計数・分類同定のための学習モデルの最適化に取り組んだ。
- (3) 画像解析に関するサブテーマ間連携：テーマ1サブテーマ1と共同で、画像解析による生物情報生成システム構築及び精度向上を図るために、2021年度までに構築した深層学習モデル等に関する情報交換を行った。
- (4) メイオベントスの分類に関するサブテーマ間連携：テーマ3サブテーマ2と協働で、分類精度の向上に取り組むために、2021年度までに採取した堆積物試料から分画したメイオベントスの分類結果等について情報共有を行った。

【2022（令和4）年度】

- (1) 試料収集から試料処理、画像解析、そして自動分類・計数システムによる生物情報収集に至るまでのモニタリングに係るプロトコルを作成した。
- (2) メイオベントス教師画像データのデータベース化に取り組んだ。
- (3) 海洋保護区候補地での実海域調査航海において、モニタリング手法の検証及び精度向上に取り組み、沖

合海底域の実用的なモニタリング手法を提示することができた。

4. 結果及び考察

(1) 画像解析によるメイオベントスの分類・計数の概要

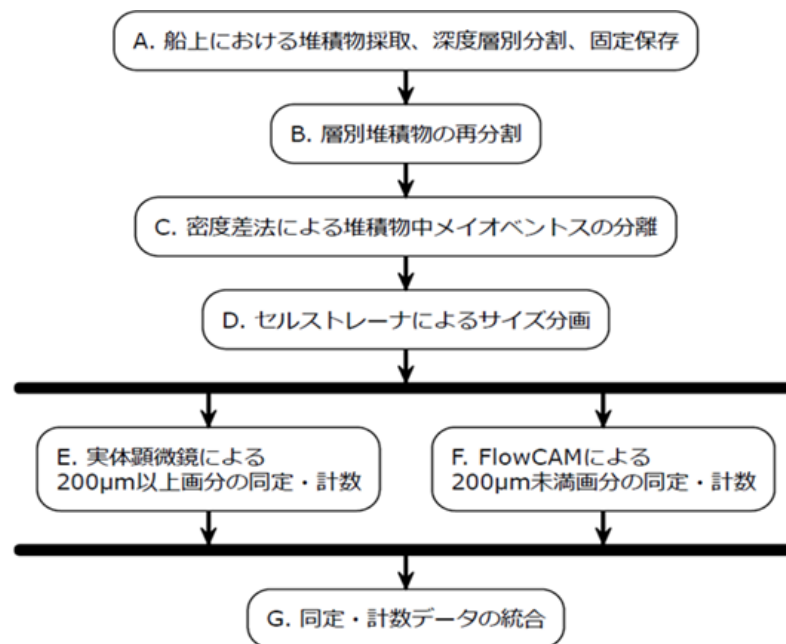


図20. 画像解析によるメイオベントスの分類・計数の作業フロー（工程A～G）

海底堆積物中のメイオベントスの分類・計数の作業フローの概要を図20に示す。堆積物の採取や保存処理は、一般的な海洋調査法に準じた方法を用いることができる（図20. 工程AおよびB）。次いで、堆積物からメイオベントスを分離し、顕微鏡やFlowCAMで観察可能なサンプルを調製する（図20. 工程CおよびD）。堆積物中の砂泥、デブリ、メイオベントスの分離には、ステンレス篩いによるサイズ分画（主に泥分の分離）と、Ludox等の高比重シリカゾル溶液への再懸濁による密度差分離（生物・非生物の分離）を併用した方法が普及している。しかし、ステンレス篩い上に捕集されたメイオベントスを安定して高い効率で回収するには、熟練した技術が求められる。本サブテーマでは、ステンレス篩いの代わりに小型ナイロン製篩い（セルストレーナ）を用いることで、従来法よりも扱いやすく、且つ安定した回収率が得られる手法を考案、採用した。従来法に比べて1回の操作で処理できる堆積物量は少ないが、個体数の多い小型メイオベントスの分析には十分なサンプルを得ることができる。

メイオベントスは1000 µmの篩いを通過する底生動物と定義され、堆積物やデブリから完全に分離されたメイオベントスの実体顕微鏡や倒立顕微鏡による判別は比較的容易である。しかし、200～300 µmの篩いを通過する画分のサンプルは、密度差分離を施した後であっても、分析対象の小型メイオベントスよりも多くの砂泥やデブリが混在してしまう。このため、従来法である顕微鏡観察では、砂泥、デブリ、メイオベントスの判別に長い作業時間が必要となり、サンプル分析のスループットを大きく低下させる。本サブテーマで述べるイメージングフローサイトメトリ（FlowCAM）と深層学習による画像解析技術を組み合わせた方法は、この課題の解決を主要目的の1つとし、工程Dによって分画された孔径200 µmの篩いを通過する画分のサンプルについて適用した（図20. 工程F）。なお、密度差分離処理後に孔径200 µmの篩いに捕捉されるサンプル粒子には砂などの大量の非生物粒子が混在することは少なく、実体顕微鏡下での同定・計数、写真撮影（工程E）が効率的である。実体顕微鏡による ≥ 200 µm画分の観察（図20. 工程E）とイメージングフローサイトメトリによる < 200 µm画分の分析データ（図20. 工程F）と組み合わせて、メイオベントスの計数データを得るアプローチが実用的と言えるだろう。

(2) 深海底からの堆積物コア試料の採取・処理、分画手法の検討

・深海底からの堆積物試料の採取～コア処理（深度層別分割とホルマリン固定）

本サブテーマでは、現場海域における深海底からの採泥は、マルチプルコアラールによる採泥及びROV等に装備したプッシュコアラールを用いて行った。船上に揚がってきた採泥器から採泥管を回収した後は、速やかに実験室に運び込み、採泥管を押し出し器に取り付け、1 cm刻みでコアを押し出しながら、金属ヘラを使って各層（0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5 cm の5層）をボトルに入れた後に、ろ過海水100mLほどを使い、金属ヘラについた堆積物を洗い流してボトルに入れ、中和ホルマリンを5 mL添加（最終濃度約5%）して、実験室内または冷暗所で保管した。内径82 mmの採泥管の場合、1 cm層の堆積物の容積は約52.8 mLである。Ludoxを用いた密度差分離とそれに続く小型ナイロン製篩い（セルストレーナー）を用いた分画には、50 mL容量の遠心管を用いて行った。この方法で処理可能な堆積物量は1本あたり10～15 mLとなる。従ってサンプル・デバイダを用いて、堆積物（全量52.8 mL）を4分割する作業を行い、分注後に遠心して、堆積物容積と重量を測定して保管した。またこの際に、ローズベンガル染色を行った（最終濃度50 mg/Lとなるようにホルマリン固定試料に添加）。

・Ludoxを用いた密度差分離とセルストレーナーによる分画

堆積物中の鉱物性粒子の比重は2.5～2.8 g/mL、メイオベントスの比重はおおよそ1.13 g/mLとされている。Ludoxの比重は1.3～1.4であり、メイオベントスを分離する際に、DWと混合して比重を1.13～1.14 g cm⁻³に調整した溶液を使う。間隙水による希釈を見越して、比重1.18 g cm⁻³に調整する場合(Somerfield and Warwick, 2013)や原液のまま使用することもある。本サブテーマでは、基本的に原液を使用し、図21に示す工程で密度差分離を行った。Ludoxによる回収工程は、一度だと全てのメイオベントスを回収できていない可能性があるため、工程を2回以上繰り返すのが望ましい。

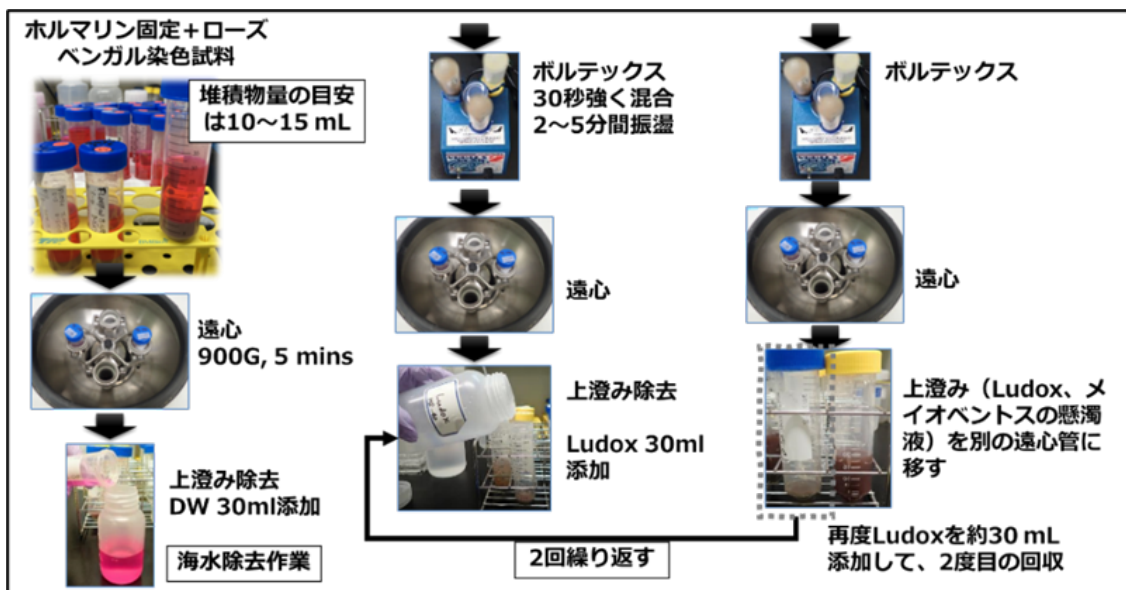


図21. Ludoxを用いた堆積物試料の密度差分離工程

Ludoxで堆積物試料の密度差分離を行うことで、比重の重い鉱物性粒子からメイオベントスを含む画分をLudox-メイオベントス懸濁液として分画した後、速やかにセルストレーナーを用いて分画した。図22左に示すようにセルストレーナーをセットして、Ludox-メイオベントス懸濁液をろ過、DWでファンネルのLudoxを洗い流してろ過することでLudoxを除去した後に、セルストレーナー上のメイオベントスをDWで懸濁しながらスポイトで回収した。DWで懸濁する際にシリンジで圧を掛けるとメイオベントスがセルストレーナーのメッシュから浮遊するため、回収が容易となる（図22右）。メイオベントスの回収には遠心管等の容器あるいはマルチウエルプレートを使用した。長期保存の場合には、ホルマリンを5%、pH9標準緩衝液を0.1%程度、そしてローズベンガル染色液を0.005%程度添加して、冷暗所で保管した。

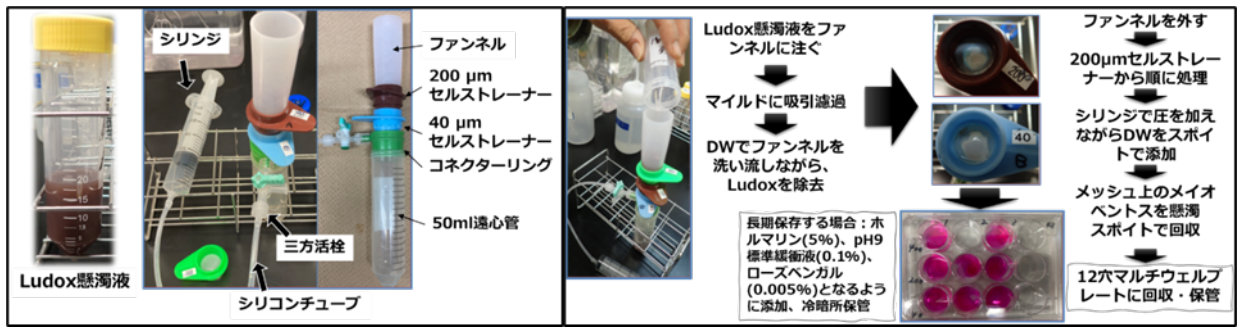


図22. セルストレーナーをセットした状態（左）とメイオベントスの分画、回収工程（右）

・セルストレーナーとステンレス篩の回収効率の比較

従来法のステンレス篩を用いたメイオベントスの分画、回収工程を図4左に示す。作業に要する時間はセルストレーナーの場合、1試料あたり30分程度、従来法のステンレス篩の場合、1試料あたり約30-40分程度で、ほぼ同じくらいの所要時間である。ただしセルストレーナーの場合、Ludox密度差分離工程で遠心する際、4本がけ遠心機の場合は、4試料を一度に処理することも可能で、その後のセルストレーナーによる分画・回収工程は1試料あたり5分程度であるため、多検体の試料を扱う場合には、より短時間で作業を進めることが可能である。またステンレス篩の場合、作業に熟練を要し、慎重に作業した場合であっても回収時にロスが出るがあった。そこでセルストレーナーとステンレス篩の回収効率を定量的に比較するために、生態毒性試験の試験生物として、実験室内で容易に飼育可能なシオダマリミジンコを用いた。事前にホルマリン固定及びローズベンガル染色したシオダマリミジンコを一定数（20個体）、無染色の堆積物試料（容積20ml）に添加（各々のn数は3）して、よく攪拌した後に、セルストレーナー及びステンレス篩を用いた各々の作業工程（図22, 23）で、メイオベントスの分画、回収を行った。その結果、セルストレーナーの方がステンレス篩を用いた従来法の工程よりも、回収率や再現性が明らかに高いことが分かった。またセルストレーナーは作業に要する労力や時間を軽減でき、メッシュサイズを使い分けることで異なるサイズフラクションを容易にかつ高い精度で作成できるといった点でも従来法より優れている。代表的なメイオベントスの1つ、線虫は紐状の形態をしており、63 μmを超える長さの個体であっても63 μm孔径のステンレス篩を通り抜けることがあるが、より小さなメッシュサイズ、例えば20 μmメッシュサイズのセルストレーナーをセットすることで、より小さなサイズの個体も容易に回収でき、同様に解析対象とすることが可能である。

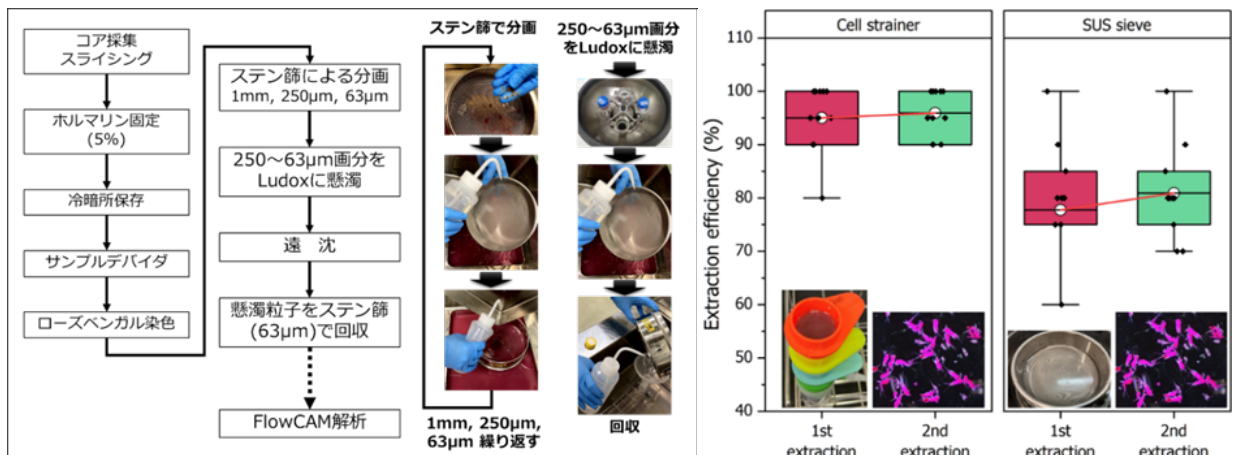


図23. 従来法のステンレス篩を用いたメイオベントスの分画、回収工程（左）とシオダマリミジンコを分画、回収した際の両手法の回収率（n=3）の比較（右）。1st extractionは一回目の回収率、2nd extractionは同じ試料の二回目の回収率

(3) FlowCAMによるメイオベントス（<200 μm画分）画像の取得

セルストレーナーにより分画したメイオベントスのうち、200 μm以上の画分については、実体顕微鏡で同定・計数を行い、200 μm以下の各文について、FlowCAMによる画像取得を行った。本サブテーマでは、

Yokogawa Fluid Imaging Technologies社 (<https://www.fluidimaging.com/>) のFlowCAM 8400 (図24左) を用いてメイオベントス画像を取得した (図5右, 画像取得の手順や装置設定等の詳細はマニュアル (https://www.jamstec.go.jp/bioenv/j/mpa-monitoring-method/pdf/monitoring_manual.pdf) を参照)。



図24. FlowCAM8400の外観 (左) とFlowCAMによる画像取得中の生画像 (右)、大多数はメイオベントス以外の粒子であることが分かる

(4) FlowCAM画像の深層学習による分類予測モデルの構築

深層学習に基づく画像分類は、近年、様々なフレームワークが開発、公開されているが、本サブテーマではpythonおよびGPU対応のtensorflow/keras環境をインストールしたWindows PC上で動作する、Chollet (2016) の131のマルチレイヤーニューラルネットワーク (MNN) で構成されるXceptionモデルをベースモデルとする方法を採用した。Xceptionモデルでは、画像内の一般的なオブジェクトの検出や特徴量を抽出するための学習済みの汎用パラメータが公開されており、特定用途の分類タスクを最小限の追加学習 (転移学習) で実現できる。メイオベントス分類予測モデルの構築では、分類ごとのメイオベントス画像をFlowCAMデータより作成し、それを教師画像として転移学習を行った。分類性能の評価とモデルのチューニングを繰り返すことで構築した分類予測モデルを未分類画像の分類に適用した。学習に用いた画像例を図24に示す。

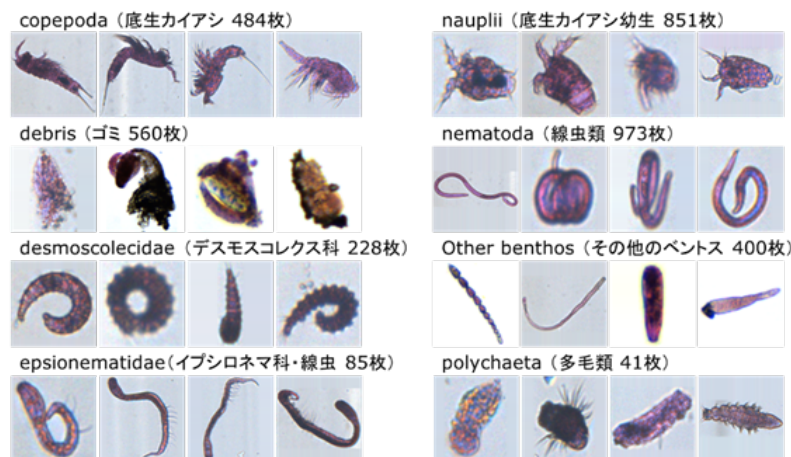


図24. 学習に用いた画像例。沖縄トラフ伊是名海底堆積物 (2017年SIP航海) 中のメイオベントスのFlowCAM画像

FlowCAMデータを用いた教師画像データセットの作成から分類予測モデルの構築までの基本的な流れを図7左に示す。はじめに、機械学習及び手作業による教師画像データの整理工程 (図25左, フローチャート3~4) で、VisualSpreadsheetのClassification機能およびLibrary機能を活用して、個々のサンプルからの特定

分類群の画像の抽出および複数サンプルから取得した画像データの統合を行った（図25右）。またFlowCAMコラージュ形式画像からの粒子画像の抽出と深層学習のための画像前処理（図25左、フローチャート5～6）として、pythonスクリプト等を利用して、画像サイズやフォーマットの変換、規定フォルダへの保存、更に正方形加工処理等を行った。次に深層学習モデルの構築（図25左、フローチャート7～10）として、層化無作為抽出法による各フォルダ画像の分割（教師画像（60%）検証用画像（20%）性能評価用テスト画像（20%））を行い、Keras ImageDataGeneratorを用いて各画像の分類クラスとともに訓練用画像および検証用画像をXceptionモデルに読み込ませて（図25左、フローチャート8）、テスト画像を用いた分類モデルの予測性能評価を行った（図25左、フローチャート9）。予測性能評価の結果に応じて、画像データの追加、分類方法の見直し、モデル構造の修正、パラメータ修正等を行うことで分類精度の向上を図った。マニュアル（https://www.jamstec.go.jp/bioenv/j/mpa-monitoring-method/pdf/monitoring_manual.pdf）に詳細な解説を記載した。

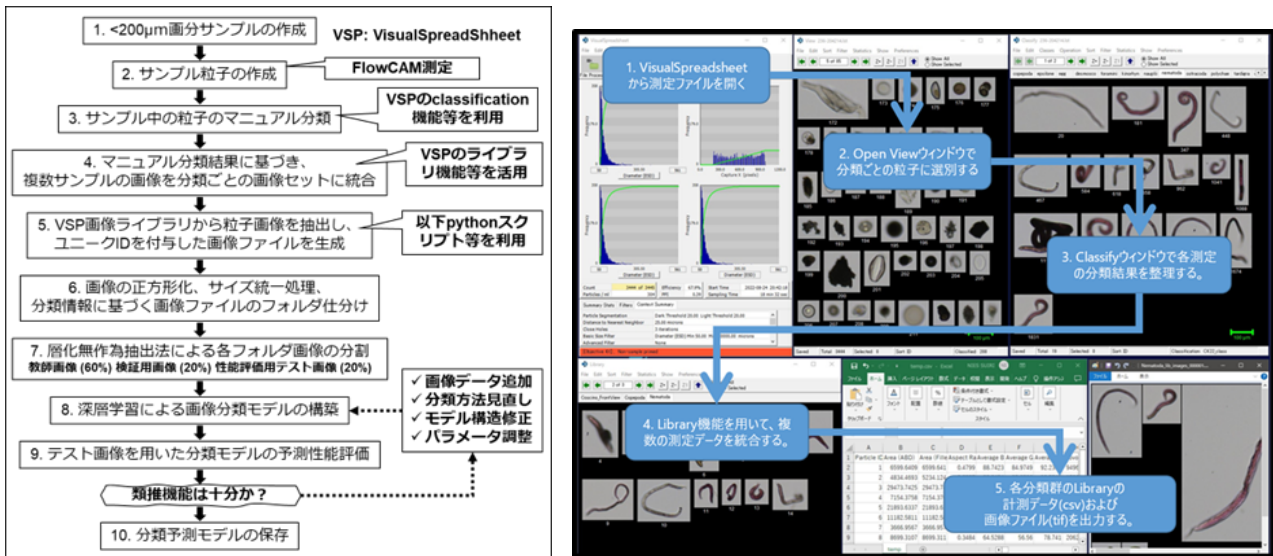


図25. 分類予測モデルの構築までのフローチャート（左）とVisualSpreadsheetを用いた教師画像の整備の流れ（右）

・テスト用画像を用いた分類モデルの予測性能評価

ここで言うテスト用画像とはモデル構築に使用されていない独立した分類情報付き画像セットのことである。テスト用画像を用いて、一時保存したモデルの分類予測性能の評価を行った一例を図26に示す。モデルに画像ファイルリストを引数としてpredictメソッドを実行すると、予測結果の配列が返される。画像ファイルリストの事前分類情報と照合することで、予測性能の評価が可能となる。事前の分類情報と予測結果を混同行列で表し（図26）、precision、recall、f1-score値といった評価指標を計算した（表5）。Precisionは任意の分類に属すると予測された画像の分類正解率で混同行列の任意の縦列の画像数の和に対する正解画像の割合に相当、Recallは任意の分類に属することが予め定義されている画像が予測においても正しく予測される再現率であり、混同行列の任意の横1列の画像数の和に対する予測正解画像の割合に相当する。f1-scoreは、precisionとrecallの調和平均である。なお深層学習モデルを用いた分類システム、分類器として8クラス分類器を構築して自動分類を行った。メイオベントスの主要な分類群であるカイアシ類、カイアシ類幼生、線虫、そしてデスマスコレクス類ではprecision値とrecall値ともに高い値となっていた。これら4分類群は、「重要海域」選定基準のうち脆弱性、生物学的生産性、生物学的多様性に関する情報として特に重要と考えられる。一方で、イブシロネマ類や多毛類は低い値となった。分類群によって、訓練画像数にはバラツキがあり、評価指数の低い分類群は、画像数が少なかったことが主要な原因と考えられた。カイアシ類や線虫並の評価指数を得るには、対象とする分類群あたり、少なくとも500枚程度の訓練画像を整備する必要があると考えられ、今後の課題と言える。

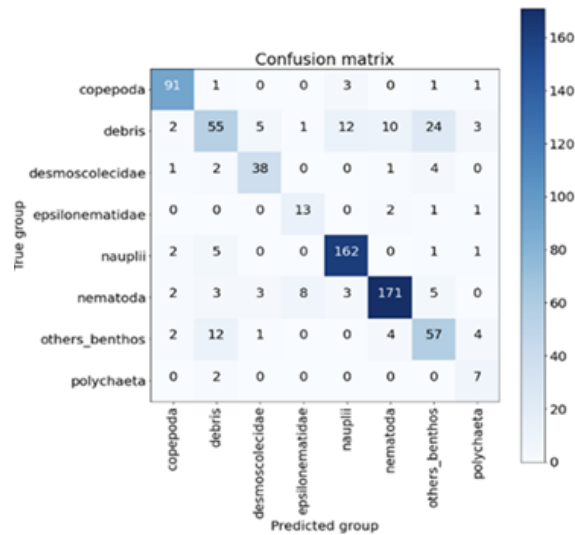


図26. メイオベントス画像分類モデルを用いたテスト画像（727枚）の分類予測結果（混同行列）の一例、左の混同行列の各セルの数値とカラーは対応する画像枚数

表5. メイオベントスの画分類群ごとの性能評価指標値

Category	precision	recall	f1-score
copepoda	0.91	0.94	0.92
nematoda	0.91	0.88	0.89
desmoscolecidae	0.81	0.83	0.82
epsilonematidae	0.59	0.76	0.67
nauplii	0.9	0.95	0.92
polychaeta	0.41	0.78	0.54
others_benthos	0.61	0.71	0.66
debris	0.69	0.49	0.57
accuracy			0.82
macro avg	0.73	0.79	0.75
weighted avg	0.82	0.82	0.81

・ 沖合海底自然環境保全地域堆積物試料の解析

研究実施期間中に3航海に参加、5地点から11コアを採集することができた（表6）。各試料について、ホルマリン固定（一部の試料についてはルゴール固定も実施）、サンプル・デバイダを用いた分割作業とローズベンガル染色を行い、分割した試料のうち約半数について、Ludoxを用いた密度差分離とセルストレーナーによる分画を行い、顕微鏡観察及びFlowCAMを用いた分類・計数に供した。

表 6. 沖合海底自然環境保全地域等から採取された堆積物情報

採集場所(航海番号)	コア数(層数)	採集日
正保海山(KM20-10)	1コア(6層)	2020/11/26
元禄海山列(KM21-E04)	2コア(5層)	2021/10/13, 14
安永海山(KM21-E04)	1コア(5層)	2021/10/20
駿河湾(YK22-17C)	2コア(5層)	2022/9/23
宝永海山(YK22-17C)	5コア(3-5層)	2022/9/26

正保海山(KM20-10)、元禄海山列(KM21-E04)、安永海山(KM21-E04)からのコア試料について FlowCAM 画像を取得して、約 2,800 枚のアノテーション付き画像を作成することができた。それらの画像の大多数は多様な有孔虫(生死不明)、有殻アメーバ、珪藻殻、放散虫(破片含)、デブリであり、カイアシ類、カイアシ類幼生、線虫、デスマスコレクス類といった主要着目 4 グループの画像は計 148 枚に留まった。このようなメイオベントス以外の粒子が大多数を占める試料を自動分類・計数すると、主要着目 4 グループの recall 値(正答率)が著しく低くなった(表 7 左)。これは主要着目 4 グループ以外の粒子が増えたことにより、結果として着目グループの誤答が増えたことによると考えられた。これに対処するために、有孔虫や珪藻といったメイオベントス以外の粒子についても分類の対象とする、すなわち従来の 8 クラス分類器から 26 分類器に拡張する作業を行った。これにより、結果として recall 値及び precision 値を大きく向上することができた(表 7 右)。このことは、サンプル数が増え、メイオベントス以外の生物種やデブリス等の粒子数が増えていった際には、分類器(深層学習モデルを用いた分類システム)自体をバージョンアップする作業、すなわち分類対象を拡張することが必要であることを意味している。

表 7. 教師画像の拡充及び分類器の拡張による評価指数(precision 及び recall)の向上

従来の8クラス分類器の性能			画像拡充により構築した26クラス分類器の性能		
class	precision	recall	class	precision	recall
01_Copepod	0.88	0.55	1. 01_Copepod	0.90	0.86
02_Nauplii	0.83	0.41	02_Nauplii	0.91	0.85
03_Nematoda	0.88	0.20	03_Nematoda	0.98	0.96
04_Desmoscolecida	1.00	0.17	04_Desmoscolecida	0.69	1.00
05_Epsilonematidae, 06_other benthos, 07_debris, 08_polychaeta			05-26_other classes (forminifera, diatom, radiolarian, pollen, others)		

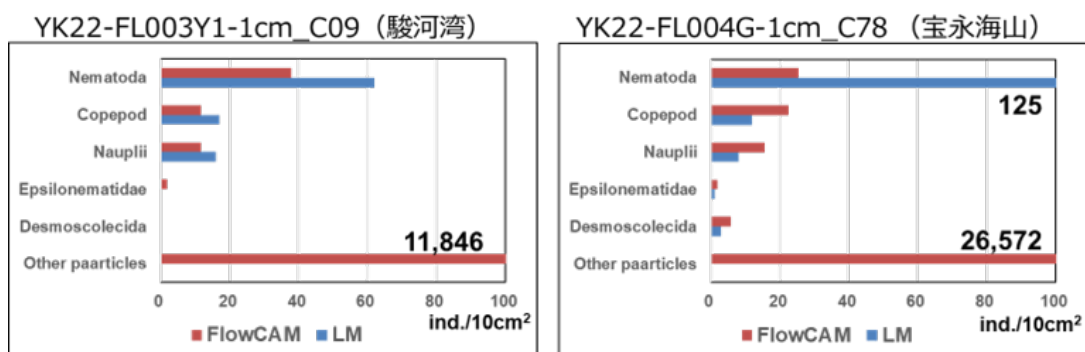


図 27. FlowCAM vs LM メイオベントスの分類・計数結果の比較

堆積物コア試料の 0-1cm の層の 40~200 μm 画分を対象として、まず実体顕微鏡で分類と計数を行い、同じ試料を FlowCAM で測定、自動分類・計数を行った結果を図 27 に示す。両計数結果は類似の傾向を示していたが、線虫類は FlowCAM で過小評価されていた。この傾向は、other particles の割合が高くなるほど顕著になった。理由として考えられるのは、線虫類の多くの画像はアスペクト比が大きいため（図 28）、長さが 50 μm 以上であっても、投影面積が FlowCAM の解析対象閾値を下回っていた可能性がある。例えば、長さ 100 μm x 幅 10 μm の Nematoda の投影面積は 1,000 μm^2 であり、FlowCAM の設定（投影面積が直径 50 μm の円の面積である 1,963 μm^2 以上という設定）では対象外となる。目視・顕微鏡観察の場合は計数されていたが、FlowCAM のフィルタリングにより計数から除外されていた可能性が考えられた。こうした設定を外すと、画像数が数倍から数百倍となり、解析負荷の増大や分類精度への悪影響を及ぼしかねないことから、新たに線虫類に特有の小型・高アスペクト比粒子を計数対象とするフィルター設定を追加することが今後の課題として考えられた。



図 28. 線虫類の FlowCAM 画像、様々な形状が確認されている

・ FlowCAM 画像解析によるメイオベントスのモニタリングのメリットと課題

FlowCAM と検鏡によるメイオベントスの分類、計数について比較を行った（表 8）。所要時間はオーバーラップしていて、それ程の差は無いように見える。しかし検鏡による分類と計数には労力を要し、作業者の経験・技術にも大きく依存する。また多検体試料を長時間に渡って計数するような場合など、分類精度や計数速度が大きく影響を受けることもあるだろうし、標準化された分類・計数基準がなければ、作業者によって大きく異なる結果が出てくる可能性も危惧される。一方、FlowCAM の場合、精度や計数速度は安定しており、同じ分類システムを使うのであれば結果の再現性は高く、また FlowCAM で取得した画像はストックされ続けるので、教師画像を増やして、より精度の高い新たな分類システムを用いて、再分類、再解析といったことも可能である。現段階の分類システムでも一定の分類精度で、主要なメイオベントス群の自動分類と計数を行うことが可能であるが、今後、より多くの堆積物試料を対象として、メイオベントスのより下位の分類群やマイナーな分類群の教師画像を整備し、分類器の改良等の作業を継続することで、より多くのメイオベントス分類群を対象とした分類・計数システムへと発展させるための基盤的な技術開発は実現できたと考えている。なお画像解析に基づく自動分類システムで重要な課題である教師画像の整備には、メイオベントスの分類に習熟した研究者の協力が不可欠であることは言うまでも無い。

表 8. FlowCAM 及び検鏡によるメイオベントスの分類、計数の比較

	FlowCAM	検鏡
計測	15-30分/試料	15-60分/試料
画像抽出・前処理	1分以下/試料	
自動分類	0.004秒/画像	
誤判定画像の除去	1-2分/試料	
計測・作業の律速	粒子密度が高い場合、目詰まり防止に希釈が必要	メイオベントス個体密度や非生物粒子量に依存
分類・計測精度	教師画像の整備状況や分類モデルの予測性能に依存	作業者の経験・技術に依存
全行程の所要時間	20-30分/試料	15-60分/試料
メリット	精度、計数速度が安定している 再現性が高く、再解析も可能 主観的判断による誤りを回避できる	機械学習では認識できない微妙な特徴であっても、経験、知識を活かして正確に同定可能
課題	訓練画像の質、数が分類精度に大きく影響 マイナーグループの教師画像整備	作業内容や作業量で分類精度や計数速度が影響を受ける 標準化された分類・計数基準が必要

5. 研究目標の達成状況

深海堆積物からメイオベントスを簡便かつ高い回収率で分画、回収するための新たなサンプル処理技術を開発できた。またFlowCAM画像の取得から、統一的な画像処理、教師画像データセットの作成、深層学習モデルの構築、分類モデルの性能評価や分類精度向上の検討といった、主要なメイオベントスの自動分類・計測に必要な基盤技術の開発に成功することができたことに加えて、一連の作業工程について詳細な解説を行ったマニュアルを整備できた。

テーマ3サブテーマ2と連携に対し、深海堆積物試料の固定に関して、メタゲノム解析に供することも可能な高濃度ルゴール固定試料(10%)を作成し、セルストレーナーとLudoxを用いたメイオベントスの効率的な分画手法が十分に適用可能であることを確認した。これにより、FlowCAMで画像情報を取得したメイオベントスについても、DNAバーコーディングやメタゲノム解析を行う見込みを立てることができ、両解析手法の精度向上に向けた取り組みを進めることができた。

重要海域海選定基準の生物学的多様性のデータを簡便に取得できるようになった。

以上のことから目標通りの成果をあげることができたと思われる。

6. 引用文献

- Chollet, F. (2017). Xception: Deep learning with depthwise separable convolutions. In Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition (pp. 1251-1258).
- Kitahashi, T., Kawamura, K., Kojima, S., Shimanaga, M., 2014. Bathymetric patterns of α and β diversity of harpacticoid copepods at the genus level around the Ryukyu Trench, and turnover diversity between trenches around Japan. Progress in Oceanography 123, 54-63, doi:10.1016/j.pocan.2014.02.007.
- Somerfield, P.J., Warwick, R.M., 2013. Meiofauna Techniques, Methods for the Study of Marine Benthos, pp. 253-284.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ 1】

- 1) Kawato, M., T. Yoshida, M. Miya, S. Tsuchida, Y. Nagano, M. Nomura, A. Yabuki, Y. Fujiwara, K. Fujikura (2021) Optimization of environmental DNA extraction and amplification methods for metabarcoding of deep-sea fish. *Method X*, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101238> (IF:0.394)
- 2) Koeda, K., S. Takashima, T. Yamakita, S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2021) Deep-sea fish fauna on the seamounts of southern Japan with taxonomic notes on the observed species. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(11), 1294, <https://doi.org/10.3390/jmse9111294> (IF:2.744)
- 3) Aoki, K., Fujiwara Y, Tsuchida S (2022) Estimating deep-sea fish population density from the odour extension area: A theoretical basis and comparison with the conventional methods. *Frontiers in Marine Science*, doi.org/10.3389/fmars.2022.854958 (IF:5.247)
- 4) Fujiwara., Y., Tsuchida S., Kawato M., Masuda K., Sakaguchi S.O., Sado T., Miya M. and Yoshida T. (2022) Detection of the Largest Deep-Sea-Endemic Teleost Fish at Depths of Over 2,000 m Through a Combination of eDNA Metabarcoding and Baited Camera Observations. *Frontiers in Marine Science* 9:945758. [doi: 10.3389/fmars.2022.945758](https://doi.org/10.3389/fmars.2022.945758) (IF:5.247)
- 5) Hookabe N, Koeda K, Fujiwara Y, Tsuchida S, Ueshima R. (2022) First eumonostiliferous nemertean from the Nishi-Shichito Ridge, *Genrokunemertes obesa* gen. et sp. nov. (Eumonostilifera, Nemertea). *PeerJ*, 10:e13857 <https://doi.org/10.7717/peerj.13857> (IF:3.061)
- 6) Hookabe, N, N. Jimi, H. Yokooka, S. Tsuchida, Fujiwara, Y. (2022) *Lacydonia shohoensis* (Annelida, Lacydoniidae) sp. nov. a new lacydonid species from deep-sea sunken wood discovered at the Nishi-Shichito Ridge, Northwestern Pacific Ocean. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 101(6) 1-7, DOI:10.1017/S0025315421000862 (IF:1.559)
- 7) Jimi, N., C. Chen, Y. Fujiwara (2022) Two new species of *Branchinotogluma* (Polynoidae: Annelida) from chemosynthesis-based ecosystems in Japan. *Zootaxa* 5138 (1): 017–030. [doi 10.11646/zootaxa.5138.1.2](https://doi.org/10.11646/zootaxa.5138.1.2) (IF:1.028)
- 8) Kobayashi I, Yamamoto M, Fujiwara Y, Tsuchida S, Fujita T (2022) First Record of the Family Myxasteridae (Asteroidea: Velatida) from Western North Pacific with Description of a New Species of *Asthenactis*. *Species Diversity* 27: 251-258, [doi 10.12782/specdiv.27.251](https://doi.org/10.12782/specdiv.27.251) (IF:0.336)
- 9) Komai T., S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2022) New record of a rarely collected caridean shrimp *Bathypalaemonella pandaloides* (Rathbun, 1906) (Decapoda: Bathypalaemonellidae) from the West Mariana Ridge, northwestern Pacific. *Zootaxa*, [doi 10.11646/ZOOTAXA.5129.2.7](https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.5129.2.7) (IF:1.028)
- 10) Komai, T., Tsuchida, S., Fujiwara, Y. (2023) A new deep-sea palaemonid shrimp assigned to *Periclimenes* Costa, 1844 (Decapoda: Caridea) from the West Mariana Ridge, northwestern Pacific. *Zootaxa* 5231(4): 376–392. (IF: 1.091)
- 11) Hookabe, N., H. Kohtsuka, Y. Fujiwara, S. Tsuchida, R. Ueshima (2023) Three new species in *Tetrastemma* Ehrenberg, 1828 (Nemertea, Monostilifera) from sublittoral to upper bathyal zones of the northwestern Pacific. *ZooKeys* 1146: 135-146. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1146.95004> (IF:1.496)
- 12) Jimi, N., I. Kobayashi, T. Moritaki, S. P. Woo, S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2023) Insights into the diversification of deep-sea endoparasites: phylogenetic relationships within *Dendrogaster* (Crustacea: Ascothoracida) and a new species description from a western Pacific seamount. *Deep-Sea Research I*, <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2023.104025> (IF:3.101)

【サブテーマ 2】

特に記載すべき事項はない。

<査読付き論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

【サブテーマ1】

- 1) 藤倉克則（2021）重要性増す深海の科学的な情報。DMG森精機 『つながり』 40, 36.
- 2) 藤倉克則（2022）熱水噴出域で生きる生物 深海のユニークな生態系。DMG森精機 『つながり』 43, 36.
- 3) 藤原義弘（2023）科学 2023年5月号、「深海のトップ・プレデターを探る——ヨコヅナイワシの発見」（印刷中）

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

- 1) 藤原義弘・吉田尊雄・土田真二・古島靖夫・山北剛久・北橋倫・藤倉克則・小泉佳祐・邬倩倩・浜崎恒二・砂村倫成・中坪典開・大田修平・駒井智幸・KM20-10C乗船者一同（2021）新たな海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）管理のための深海を対象とした生物多様性モニタリング技術開発（KM20-10C Leg1航海概要報告）。海と地球のシンポジウム2021。
- 2) 藤原義弘：第84回海洋技術連絡会（2021）「深海のトップ・プレデターを探る」
- 3) 藤原義弘：第6回海中海底工学フォーラム（2021）「深海のトップ・プレデターを探る～新種の巨大深海魚ヨコヅナイワシの発見～」
- 4) 小枝圭太, 高島創太郎, 山北剛久, 土田真二, 藤原義弘：日本魚類学会（2021）「日本南方の4海山で確認された魚類」
- 5) 邬倩倩・西澤峻平・藤原義弘・土田真二・吉田尊雄・河戸勝・駒井智幸・源利文（2022）環境DNAメタバーコーディングによる深海無脊椎動物の検出。環境DNA学会 あなたが主役のワークショップ, 2022年11月。（優秀発表賞）
- 6) 岡西政典, 松尾拓己, 藤田敏彦, 藤原義弘：日本動物分類学会第57回東京大会（2022）「日本南方沖の海山より得られたツルクモヒトデ目（棘皮動物門：クモヒトデ綱）について」
- 7) 藤原義弘, 土田真二, 河戸勝, 増田殊大, 大類穂子, 佐土哲也, 宮正樹, 吉田尊雄：海と地球のシンポジウム2022（2023）「沖合海底自然環境保全地域からの希少種の発見～環境DNA解析とベイトカメラ調査によるヨコヅナイワシの検出～」
- 8) 藤原義弘：我が国の探査機能の近未来のあり方について考えるシンポジウム（2023）「深海調査コミュニティからの自由意見」
- 9) Fujikura, K. (2023) Marine Living Resources and Biodiversity, G20, RESEARCH AND INNOVATION INITIATIVE GATHERING (RIIG) Meeting on Scientific Challenges and Opportunities for a Sustainable Blue Economy, Dui, India, 2023.5.18.

【サブテーマ2】

- 1) 河地正伸, 越川 海, 大田修平, 北橋倫（2021）イメージングと深層学習によるメイオフアウナのモニタリング手法開発。海と地球のシンポジウム2021, 同予稿集, 66.

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1】

- 1) 藤倉克則（2020）東海大学海洋学部集中講義、2020年8月
- 2) 藤倉克則・長野由梨子（2020）海の生物多様性。トビタテ留学JAPAN「#せかい部×SDGs探究」（主催：文部科学省、2020年11月5日、オンライン講演）
- 3) 藤倉克則（2021）深海の生きものと海洋プラスチック、そしてSDGs（主催：高知県環境活動支援センターえこらぼ、参加者約100名、2021年2月27日@高新文化ホール、オンライン講演）
- 4) 藤倉克則（2021）東海大学海洋学部集中講義、2021年8月
- 5) 藤倉克則（2021）深海生態系の保全と海洋プラスチック研究-SDGs14への科学的とりくみ-（主催：一般社団法人不動産協会 中部支部、参加者約50名、2021年11月26日@名古屋 東京第一ホテル錦）

- 6) 藤倉克則 (2021) 深海に迫りくる危機！JAMSTECが挑む海洋プラスチックと深海生物研究。日揮ホールディングス大海原へ打って出るゼミナール講演、参加者約50名、2021年12月16日、オンライン
- 7) 藤原義弘：ちきゅうのポケット2講演会 (2021) 「ヨコヅナイワシの暮らす海～駿河湾のトップ・プレデターを探る～」
- 8) 藤倉克則 (2022) 深海にいるユニークな生き物 (主催：岩手県、参加者約50名、2022年7月16日@いわてまるごと科学館釜石市民ホールTETTO)
- 9) 藤原義弘 (2022) 深海に生きる～深海生物研究の最前線～。横須賀市夏季大学研修講座。2022年7月21日。
- 10) 藤倉克則 (2022) 東海大学海洋学部集中講義、2022年8月
- 11) 藤倉克則 (2022) 深海生物と海洋プラスチック (主催：岩手県立釜石高等学校、参加者約50名、2022年9月1日@岩手県立釜石高等学校)
- 12) 藤原義弘 (2022) 深海のライオンを探る。宮城県公害衛生検査センター設立50周年記念センター。2022年11月18日。
- 13) 藤原義弘 (2022) 深海のトップ・プレデターを探る。日本動物学会・中部支部大会公開シンポジウム「日本列島の多様な動物たち：高山から深海まで」。2022年11月27日。
- 14) 藤倉克則 (2022) 深海生物や海洋プラスチック問題から教えられたこと (主催：島根県大田市教育委員会 ふるさと夢未来講演会、参加者約300名、@あすてらす・ホール、2022年12月2日)
- 15) 藤原義弘 (2022) 青山学院大学ライフサイエンス特別講演、「深海生物学概論」2022年
- 16) 藤原義弘 (2023) 青山学院大学ライフサイエンス特別講演、「深海生物学概論」2023年1月16日。
- 17) 藤原義弘 (2023) 深海のトップ・プレデターを探る (サンシャイン水族館夜間特別イベント「深海トーク」)。2023年3月5日)
- 18) 藤原義弘 (2023) 深海のトップ・プレデターを探る～いまそこにある危機～ (The 34th General Assembly of the IUBS一般向け公開講演会「生物が支える人と地球」。2023年3月12日)
- 19) 本課題紹介Webページ <https://www.jamstec.go.jp/bioenv/j/mpa-monitoring-method/>

【サブテーマ2】

- 1) 河地正伸, 越川 海 (2022) イメージングと深層学習を活用した次世代水界生物モニタリング技術. 外部連携研究シーズ集, 国立環境研究所 (<https://www.nies.go.jp/seeds/jqjm10000014na75-att/a1644199071508.pdf>)

(4) マスコミ等への公表・報道等

【サブテーマ1】

- 1) 読売新聞 (2020.9.13. 全国版、「New門 深海と地球外生命つなぐ糸」)
- 2) FMヨコハマ (2021.2.15～2.18、2.22～2.25放送、「E-ne！～good for you～／守ろう！私たちの綺麗な海：深海について」)
- 3) プレスリリース (2022.7.1. ヨコヅナイワシが2000 m以深に棲息する：世界最大の深海性硬骨魚類であることを明らかに https://www.jamstec.go.jp/j/about/press_release/20220701/)
- 4) NHK NEWS WEB (2022/07/01, 「新種の大型深海魚 ヨコヅナイワシの撮影に成功 八丈島の沖合」)
- 5) 朝日新聞DIGITAL (2022/07/01, 「2.5mのヨコヅナイワシ、ほかの魚にガオー 深海の硬骨魚で最大か」)
- 6) 時事ドットコム (2022/07/01, 「ヨコヅナイワシ、世界最大と判明 深海硬骨魚類、全長2.5メートル 海洋機構」)
- 7) 毎日新聞 (2022/07/01, 「全長2.5mのヨコヅナイワシ撮影成功 深海の硬骨魚で世界最大」)
- 8) テレビ静岡 (2022/07/01, 「「駿河湾が礎に」 深海の”トッププレデター”2.5m超のヨコヅナイワシ 八丈島南西で発見」)
- 9) FNNプライムオンライン (2022/07/01, 【速報】ヨコヅナイワシ 深海性硬骨魚類で世界最大と判明 全長2.5メートル 海洋研究開発機構」)
- 10) 日テレNEWS (2022/07/01, 「去年新種として報告「ヨコヅナイワシ」、硬い骨を持つ深海魚としては世界最大と判明」)
- 11) テレ朝news (2022/07/01, 「世界最大 深海魚「ヨコヅナイワシ」撮影成功 ノーカット映像で」)

- 12) 日テレNEWS (2022/07/01, 「「ヨコヅナイワシ」撮影に成功 駿河湾の深海で生態系の頂点に君臨」)
- 13) NHK WORLD-JAPAN (2022/07/01, 「Deep-sea camera captures giant 'yokozuna iwashi' in Pacific」)
- 14) 毎日新聞 (2022/07/01, 「2.5メートルヨコヅナイワシ撮影できた 昨年新種報告 世界最大 深海の硬骨魚」)
- 15) The Mainichi (2022/07/01, 「Japanese researchers take video of largest deep-sea bony fish in the world」)
- 16) 静岡新聞 (2022/07/01, 「駿河湾のヨコヅナイワシ まさに”横綱” 全長2.5メートル 海洋研究開発機構が発表」)
- 17) マイナビニュース (2022/07/01, 「全長2.5メートル! 世界最大の深海魚「ヨコヅナイワシ」撮影成功に注目が集まる」)
- 18) 日刊工業新聞 (2022/07/01, 「海洋研究開発機構 「ヨコヅナイワシ」生態研究 ”深海の覇者”の姿暴く」)
- 19) 読売新聞オンライン (2022/07/01, 全長2.5メートルの巨大「ヨコヅナイワシ」、駿河湾南で確認...深海の硬骨魚類では 世界最大」)
- 20) 科学新聞 (2022/07/01, 「世界最大の深海硬骨魚類 ヨコヅナイワシ 全長2.5メートル超 JAMSTECが撮影成功」)
- 21) 日本経済新聞 (2022/07/01, 「深海魚ヨコヅナイワシ撮影 海洋機構 世界最大の2.5メートル」)
- 22) 朝日新聞 (2022/07/01, 2.5メートルのヨコヅナイワシ ただならぬ圧 水深2千メートルで撮影成功 餌カゴがぶり」)
- 23) The Asahi Shimbun (2022/07/01, 「Scientists record behemoth in waters 2 km deep off Shizuoka」)
- 24) The Times (2022/07/01, 「Giant sumo fish lurking in deep off Japan is biggest ever found」)
- 25) Sport Fishing Mag (2022/07/01, 「the Yokozuna Slickhead the World's Largest Deep-Water Fish?」)
- 26) 毎日新聞(Web) (2022/07/01, 「海洋研究開発機構のチーム、ヨコヅナイワシ撮影 全長2.5メートル 世界最大の深海の硬骨魚」)
- 27) Daily Star (2022/07/01, 「Rare footage of world's largest deep sea fish that lives in darkness 6,000ft underwater」)
- 28) The Science Times (2022/07/01, 「Largest Deep Sea Fish Captured in Rare Footage at 6,000-Foot Deep off the Coast of Japan」)
- 29) 静岡新聞 (2022/07/01, 「ヨコヅナイワシ 新たな発見 体長2.5メートル超、口開け威嚇」)
- 30) 河北新聞 (2022/07/01, 「深海の「横綱」は250センチ超 海洋機構「世界最大」と発表」)
- 31) 中国新聞 (2022/07/01, 「トピックス ヨコヅナイワシ 世界最大 深海の硬骨魚類」)
- 32) 愛媛新聞 (2022/07/01, 「ヨコヅナイワシ深海最大」)
- 33) 福井新聞 (2022/07/01, 「ズームアップ 新種深海魚「ヨコヅナイワシ」 硬骨魚類で世界最大」)
- 34) 長崎新聞 (2022/07/01, 「科学トピックス/横綱級イワシは世界最大」)
- 35) 神戸新聞 (2022/07/01, 「<ズーむあっぷ>横綱級イワシは深海最大」)
- 36) 新潟日報 (2022/07/01, 「[まいにちふむふむ] ヨコヅナイワシ 世界最大と判明」)
- 37) Bluebacks web (2022/08/17, 「深海の頂点捕食者”ヨコヅナイワシ”撮影秘話! ~深海生態系の謎に挑む vol. 1」)
- 38) 朝日小学生新聞 (2022/08/04, 「新種の深海魚 ヨコヅナイワシ 全長2.5メートルをこす大物もいた」)

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

(6) その他の成果発表

- 1) 藤原義弘・土田真二・Lindsay D (2021) 深海生物図鑑カレンダー2022。情報印刷、神奈川県

- 2) 藤原義弘（監修）（2021）最驚！世界のサメ大図鑑。あかね書房、東京都
- 3) 藤原義弘（監修）（2022）ぎょ！おどろきの しんかいぎょ。チャイルド本社、東京都
- 4) 藤原義弘（総合監修）（2021）小学館の図鑑NEO 深海生物。小学館、東京都
- 5) 江口暢久・藤倉克則（2023）GET 深海 KADOKAWA図鑑。KADOKAWA、東京都

IV. 英文Abstract

Development of monitoring by image analysis and sampling methods for deep-sea biodiversity

Principal Investigator: Katsunori FUJIKURA

Institution: 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka City, Kanagawa, JAPAN

Tel: 046-867-9555 / Fax: 046-867-9525

E-mail: fujikura@jamstec.go.jp

Cooperated by: National Institute for Environmental Studies, Japan, The University of Tokyo

[Abstract]

Key Words: Deep-sea ecosystem monitoring, Biodiversity, In-situ Free-Fall Deep-Sea Ecosystem Observatory (Lander), Marine protected areas, Image analysis, Environment, Environmental DNA

In 2020, marine protected areas were established on the deep-sea floor to safeguard the biodiversity in Japanese waters. However, as deep-sea ecosystems are likely to be exposed to deep-sea fisheries and resource development, managing marine protected areas while monitoring deep-sea ecosystems is necessary. Currently, deep-sea surveys use large dedicated facilities and are expensive. Management of deep-sea marine protected areas requires continuous research using low-cost, simple methods for monitoring deep-sea ecosystems. Therefore, we developed an In-situ Free-Fall Deep-Sea Ecosystem Observatory (Lander) to monitor deep-sea ecosystems without the use of human-occupied vehicles, large deep-sea remotely operated vehicles (ROV), or research equipment that requires large winches.

The lander can collect seawater, sediment, and particles filtered from seawater, enabling environmental DNA and metagenomic analyses of deep-sea organisms with a maximum depth of 2000 meters. Moreover, it can also measure environmental parameters, including water temperature, salinity, pressure, turbidity, and current direction and velocity. In fact, the lander was successfully deployed in deep-sea marine protected areas to obtain samples and environmental data. The collaborative research team was able to analyze samples and obtain biodiversity data on deep-sea fishes, invertebrates, meiobenthos, and prokaryotes. Therefore, this lander-based survey is effective for deep-sea ecosystem monitoring in deep-sea marine protected areas. This lander is smaller, lighter, and inexpensive than the previous large-scale dedicated facilities, so it can be operated using smaller vessels (e.g., hundreds of ton-class), enabling deep-sea ecosystem monitoring without using large research vessels.

The biodiversity of mega- and meiobenthos is a suitable indicator for assessing ecosystem change in the deep-sea bottom of marine protected areas. Therefore, we developed an image analysis method that can analyze the taxa and populations of these benthos from video and still images.

In addition, a rare and large deep-sea fish *Narcetes shonanmaruae*, which is known as a top predator in the deep-sea food chain and a key species of deep-sea ecosystem, was discovered in a marine protected area. This species is an appropriate indicator for evaluating the soundness of deep-sea floor marine protected areas. Eight new species were discovered from the marine protected area through the research cruises in this project. The deep-sea ecosystem monitoring methods developed in this project will contribute not only to the management of marine protected areas, but also to the promotion of scientific research on deep-sea ecosystems.