

画像解析システムを用いた二枚貝幼生の自動識別法の試み

寺崎 誠*・浜口正巳**・薄 浩則**・石岡宏子***

Automated identification of larval bivalves utilizing an image processor

Makoto TERAZAKI*, Masami HAMAGUCHI**, Hironori USUKI** and Hiroko ISHIOKA***

Abstract : The possibility of automated identification of larval bivalves, especially a short-necked clam (*Ruditapes philippinarum*) from other zooplankton occurred in the Seto Inland Sea, was examined by utilizing an image processor. Before image analyses, pre-sorting between larval bivalves and other zooplankton with different mesh sizes and salinity gradient. The aspect ratio (maximum length/maximum breadth), roundness shape factor [RSF: (maximum length²/area) × (π/4)] and unevenness shape factor [USF: (perimeter/area) × 4π] of larval bivalves, copepods, chaetognaths, polychaeta, ostracoda and appendicularian, were measured. An operation combining the aspect ratio, RSF and USF was very effective for sorting and identification of larval valves. The special software (NIRECO Co. Ltd.) for the pattern recognition of rice grain shape was also used in order to distinguish clearly a short-necked clam from other larval bivalves.

Key words : identification, zooplankton, bivalve, image processor

1. はじめに

内湾や沿岸域で重要な水産生物であるアサリ (*Ruditapes philippinarum*) などの二枚貝の資源を管理する上で、産卵直後の初期生態の調査は不可欠である。二枚貝の幼生は着底するまでは浮遊生活を営み、従来、沿岸域で二枚貝の初期生態を調査するためにはポンプ、プランクトンネットが用いられるが、内湾、沿岸ではカイアシ類、枝角類、珪藻、渦鞭毛藻などのプランクトンや非生物が同時に採集されるため、選別作業には多大な労力と時間が必要であった。

1980年代の後半より画像解析システムを利用して植物プランクトン (UHLMAN *et al.*, 1978; ISHII *et al.*, 1987; 辻・

西川, 1981; TSUJI and NISHIKAWA, 1984), 動物プランクトン (JEFFRIES *et al.*, 1984; TERAZAKI and ISHII, 1986; 寺崎, 1990; 角井, 1998) を自動識別する研究が行われるようになった。カイアシ類などの甲殻類では孵化後、成長過程で変態を行い、形態の変化も大きい。それに比べると二枚貝の幼生の成長に伴う外部形態の変化は小さく、画像解析システムによる形状認識の可能性は大きい。本研究では内湾でプランクトンをポンプ採取後、篩を用いたサイズ別区分、塩分勾配 (比重差) を用いた分別などの前処理を施した後、高速画像解析システムによる形状識別によりアサリ幼生のみを自動的に選別することを目的とした。

2. 研究方法

1) 試料の前処理方法の検討

ア) 篩を用いたプランクトンのサイズ区分

1995年10月、南西海区水産研究所近くの宮島長浦の5 m 層よりポンプを用いて500Lの海水を採水し、画像解析を効率よく行うため前処理として5つの目合いの異なる篩 (4 mm, 2 mm, 0.5 mm, 250 μm, 63 μm) を用いて区分した後、5%海水ホルマリンで固定した。各区分ごとに顕微鏡下で出現したプランクトンの分類と計数を実施した。

* 東京大学海洋研究所 〒164-8639 東京都中野区南台1-15-1 Ocean Research Institute, University of Tokyo, 1-15-1 Minamidai, Nakano, Tokyo 164-8639, Japan

** 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-15-5 National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-15 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan

*** 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南勢町中津浜浦422-1 National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-0193, Japan

Table 1. Number of individuals of each zooplankton (per 500 L) collected from Nagaura, Seto Inland Sea with different mesh-size net.

mesh-size (mm)	collected zooplankton (inds./500L)
2-4	Chaetogantha (<i>Sagitta enflata</i>)-1
1-2	Ctenophora-2, Polychaeta-1
0.5-1	Copepoda (<i>Acartia</i>)-2, Copepoda (<i>Oithona</i>)-1
0.25-0.5	Copepoda-75, Copepoda larvae-11, Appendicularia-2, Radiolaria-1, Ctenophora-1, Bivalve larvae-1
0.063-0.25	Copepoda larvae-680, Bivalve larvae-152, Polychaeta-56, Cladocera-17, Cirripedia larvae-10, Chaetognath larvae-4, Shrimp larvae-2, Ctenophora-1, Radiolaria-1

イ) 塩分勾配による分別実験

プランクトンネットによって採集されたカイアシ類および南西海区水産研究所で飼育されたアサリ幼生を用いて、生息環境の塩分条件を変えた時の鉛直分布構造の経時変動を調査した。実験には容量 50 cc、深さ 15 cm の円筒ガラスシリンダーを用いた。塩分を 29.1 PSU, 23.3, 17.5, 14.6 の 4 条件に設定し、水温 22 度で孵化後 16 日目のアサリ幼生を 200 個体ずつ、カイアシ類の場合は宮島長浦より目合 0.1 mm のネットで採集された生体を 4 時間、暗条件下で飼育しその後 20 個体ずつ上記 4 条件の塩分に設定した円筒シリンダーに入れ、暗条件下で 5 分、10 分、15 分、30 分、60 分および 120 分後の鉛直分布構造を調べた。

2) 高速画像解析システムを用いた計測

高速画像解析システム「ルーゼックス-FS」(ニレコ製)を用いて瀬戸内海より採集された動物プランクトンおよび二枚貝幼生の最大長、縦横比、丸さの度合い (RSF: 最大長の 2 乗 $\times \pi$ / 面積 $\times 4$)、凹凸の度合い (USF: 周囲長 / 面積 $\times 4 \pi$) を計測した。計測には各種類 10 個体を用いた。

さらにニレコ (株) の開発した米の形状解析ソフトを用いてアサリ幼生 (D-5, D-10, D-15, D-20)、ヒメアサリ (*Ruditapes variegata*)、ホトトギス (*Musculus senhousia*)、ムラサキガイ (*Mytilus edulis*)、イガイ (*Mytilus coruscus*)、マガキ (*Crassostrea gigas*) およびカイアシ類幼生についての形状識別を試みた。解析試料数は 1 視野 1 試料とし、顕微鏡写真をマクロスタンド及び CCD カメラにより入力した。このソフトの原理は一次元フーリエ変換で試料の輪郭は 256 画素以上あるような倍率に設定し、二値画像よりその輪郭座標を得て重心からの距離をフーリエ解析し、データベースに書き込み、最終的にはグラフィック表示した。重心を中心に外部輪郭を 128 分割した時に得られる輪郭片の凹凸を 0 (直線) から 20 以上に区分した各頻度を求め、結果は最大の区分を 100 としてそれぞれの相対値を棒グラフで示した。計測には各種類および

アサリ幼生の成長段階ごとに 10 個体を使用した。

3. 結果

1) 篩を用いたプランクトンの分別

篩による分別では 1 mm 以上にはクラゲ類、ごかい、矢虫類、0.5 mm 以上には *Acartia*, *Oithona* などのカイアシ類、250 μ 以上にはカイアシ類、尾虫類、クラゲ幼生、放散虫などが見られ、対象生物の二枚貝幼生は 63-250 μ m の範囲に含まれ、この区分には枝角類、フジツ

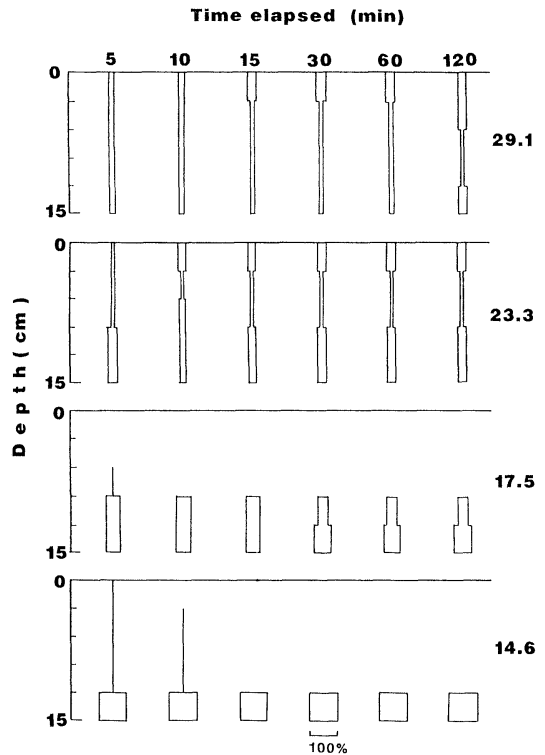


Fig. 1. Time-series vertical distribution of a short-necked calm larvae under different salinity condition.

ボ幼生, *Microsetella* のような小型カイアシ類が検出された (Table 1)。

2) 塩分勾配を用いた分別

原海水 (塩分 29.1 PSU) の入ったシリンダー内ではアサリ幼生 (密度: 16 個体/cc) は上下層に均等に分布しこの状態は塩分 23.3 に下げても保たれるが, 塩分 17.5 以下では 10 分以内にすべての個体は底層に沈降した (Fig. 1)。一方, 現場に多く生息するカイアシ類は塩分 14.5 まで下げてもかなりの個体が上層に滞泳していた (Fig. 2)。

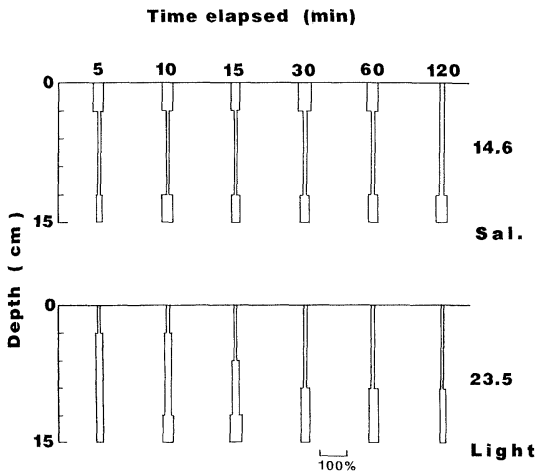


Fig. 2. Time-series vertical distribution of small copepoda, *Oithona* under low salinity (14.6 PSU) and strong light ($23.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{S}^{-1}$) condition.

3) 高速画像解析システムによる計測

マガキ, アサリの幼生の縦横比および形状計数は瀬戸内海から採集されたカイアシ類, 矢虫類, 尾虫類, ゴカイ類などの動物プランクトンの計測値とは大きく異なり (Table 2), アサリ幼生 (178–214 μm) の縦横比は平均 1.11, 形状係数は平均 1.19, カキ幼生 (158–275 μm) では縦横比, 形状係数の平均はそれぞれ 1.12, 1.23 で両者の値はアサリのほうが僅かに小さい傾向がある。しかし *Oithona*, *Acartia* のようなかいあし類では縦横比は 1.3 以上, 形状係数は 4 以上で二枚貝幼生とは大きな差異が認められた。

アサリ幼生の縦横比, 丸さの度合いは成長に伴い小さくなる傾向があり, 凹凸の度合いは成長段階によって異なった (Fig. 3)。瀬戸内海に出現するマガキ, ヒメアサリ, ホトトギスとアサリの幼生の縦横比, 形状係数 (丸さの度合いおよび凹凸の度合い) を比べると, 3つの特性値を組み合わせる事により識別可能であるが, ホトトギス幼生は形状が大変類似しているため, 他の方法を検討する必要があった (Fig. 4)。

外部輪郭線の微妙な差異の識別に用いられる「米の形状解析ソフト」を使用したアサリ幼生, 他の貝およびカイアシ類幼生の形状解析の結果, カイアシ類幼生は凹凸の頻度が貝類に比べて高く, 貝類とは明確に区別できた。またアサリ幼生とマガキ, ヒメアサリ, ホトトギスなど他の貝の幼生とも表示されたグラフのパターンの違いを比較することにより, 区別が可能であったが (Fig. 5), 対象生物のアサリ自身, 発育に伴い形状が若干変化することも明らかになり (Fig. 6), ホトトギスはアサリのD-5幼生の輪郭と類似していた。

4. 考察

瀬戸内海には小は珪藻, 渦鞭毛藻, 繊毛虫, カイアシ

Table 2. Body Length, Aspect Ratio and Roundness Shape Factor of zooplankton occurred in the Seto Inland Sea.

Taxa of zooplankton	Body Length(mm)	Aspect Ratio	Roundness Shape Factor
Copepoda			
<i>Acartia</i> sp.	0.6	1.37	5.5
<i>Oithona</i> sp.	0.5	1.71	4.39
Chaetogantha			
<i>Sagitta enflata</i>	11.2 – 29.6	5.14(1.7)	8.78(0.95)
<i>S. crassa</i>	7.5 – 11.6	5.62(0.82)	9.15(0.53)
Appendicularia	2.1 – 8.9	4.32(1.00)	5.99(1.72)
Polychaeta	6.0 – 20.9	2.53(0.79)	4.92(2.42)
Ostracoda	2.4 – 3.2	1.60(0.19)	1.72(0.15)
Bivalve larvae			
<i>Ruditapes philippinarum</i>	0.18– 0.21	1.11(0.06)	1.19(0.07)
<i>Crossostrea gigas</i>	0.16– 0.28	1.12(0.08)	1.23(0.09)

Note: Figures in the parenthesis show standard deviation.

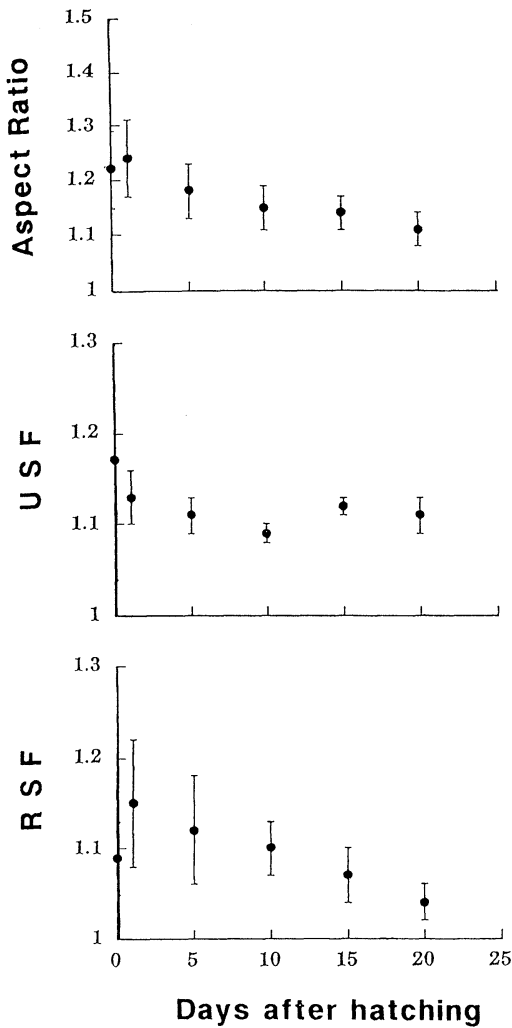


Fig. 3. Aspect ratio, RSF and USF of a short-necked clam in each developmental stage.

類幼生から大はミズクラゲ、矢虫、稚仔魚など様々なプランクトンが生息し、時には赤潮も形成される(岩崎, 1976; 山口, 1998)。この海域にはマガキ、ホトトギス、イガイ、ムラサキイガイ、アサリ、ヒメアサリなどの多くの貝類も生息しているが、これらの貝類は孵化後しばらく海中を浮遊し、やがて着底する。着底時期および大きさは種類によってことなるが、アサリの場合、22℃では受精後5時間で繊毛を生じて回転運動をはじめ、10時間で坦輪子となり22時間で有殻仔貝となり殻長200-230μm、殻高190-220μmに達した時に着底する。実験に使用した瀬戸内海区水産研究所で飼育しているアサリ幼生は孵化後約20日でこの大きさに達する(Fig. 7)。有用水産資源であるアサリの資源調査をするためには、

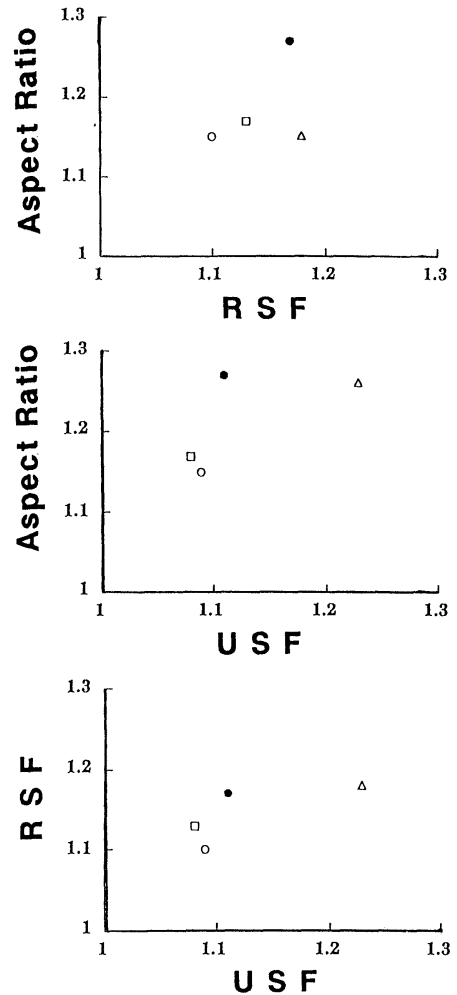


Fig. 4. Correlation of three parameters (Aspect ratio, RSF and USF) of larval bivalves occurred in the Seto Inland Sea: *Ruditapes philippinarium* (○), *R. variegata* (●), *Musculus senhousia* (□) and *Crassostrea gigas* (△).

浮遊期間にプランクトンネットあるいはポンプで採集して生物量を把握する必要がある。この時、問題になるのは同時採集される植物プランクトン、カイアシ類、枝角類、甲殻類幼生などが多量に出現するため、画像解析の手法を使う前に迅速にアサリを含む貝幼生を分離する必要がある。植物プランクトンの場合には、細胞内に葉緑素があるので、蛍光顕微鏡などを利用して他生物や非生物との分離は容易であるが(FURUYA and MARUMO, 1983)、動物プランクトンの場合には有効な前処理が必要となる。なるべく対象生物に他の者が混じらないような条件で画像処理した方が処理時間も短く、かつ精度も良い(寺崎, 1990)。

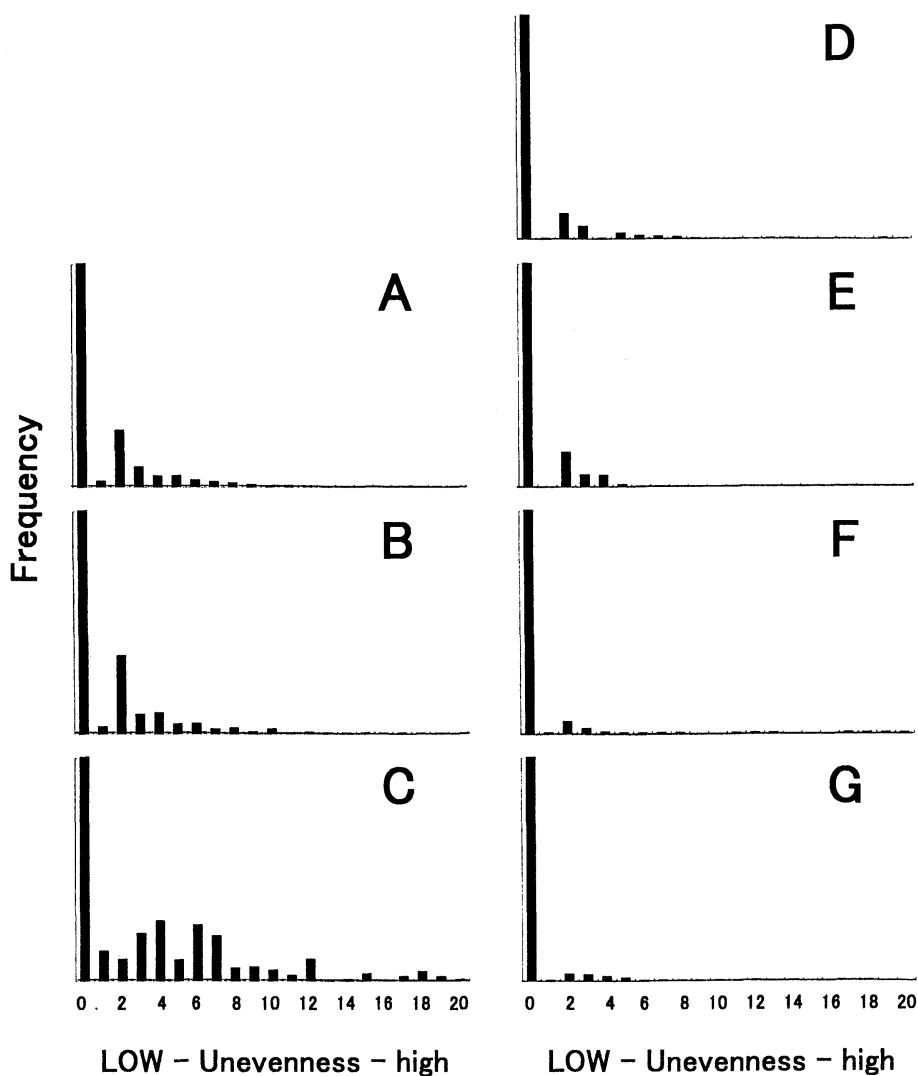


Fig. 5. Unevenness frequency distribution of external border line of larval bivalves and copepoda larvae: A-*Mytilus edulis*, B-*M. coruscus*, C-Copepoda larvae, D-*Crassostrea gigas*, E-*Ruditapes variegata*, F-*Musculus senhousia*, G-*Ruditapes philippinarium* (D-15 stage).

本研究では篩による第一段階の処理を行った後で、塩分に対する順応能力の差異を利用して動物プランクトンの中から二枚貝幼生の抽出を試みた。二枚貝幼生はほとんど $63\text{--}250\ \mu\text{m}$ の区分に含まれるので、篩による分別は有用であった。しかしこの区分には幼生の他に小型カイアシ類、ゴカイ、枝角類などが多く出現したため、第2段階で異なった塩分濃度の条件下で飼育すると貝幼生はカルシウムで形成される硬い殻を持つため、カイアシ類、枝角類などの甲殻類に比べて、体比重も重く、遊泳力も小さいため、塩分濃度を徐々に低くすることにより時間とともにアサリ幼生は沈降する傾向が明らかになり、

この手法で両者の大まかな分離が可能となった。

篩および塩分勾配を利用した前処理により、二枚貝幼生と分離できなかった小型カイアシ類の一部が、画像解析用試料として残される。甲殻類は発育により変態を行い、かつ見る姿勢（方向）によって形態が異なるため、画像解析による識別が困難な場合があるが（寺崎, 1987, 1990）、二枚貝幼生は坦輪子を除き体が扁平で、麻酔やホルマリンなどで固定した時に横向きの姿勢になり、かつ外部輪郭の凹凸が少ないので、画像解析システムを用いた認識は他の生物に比べて容易で、誤査定も少ない。二枚貝幼生とカイアシ類、ゴカイ、矢虫類、枝角類など

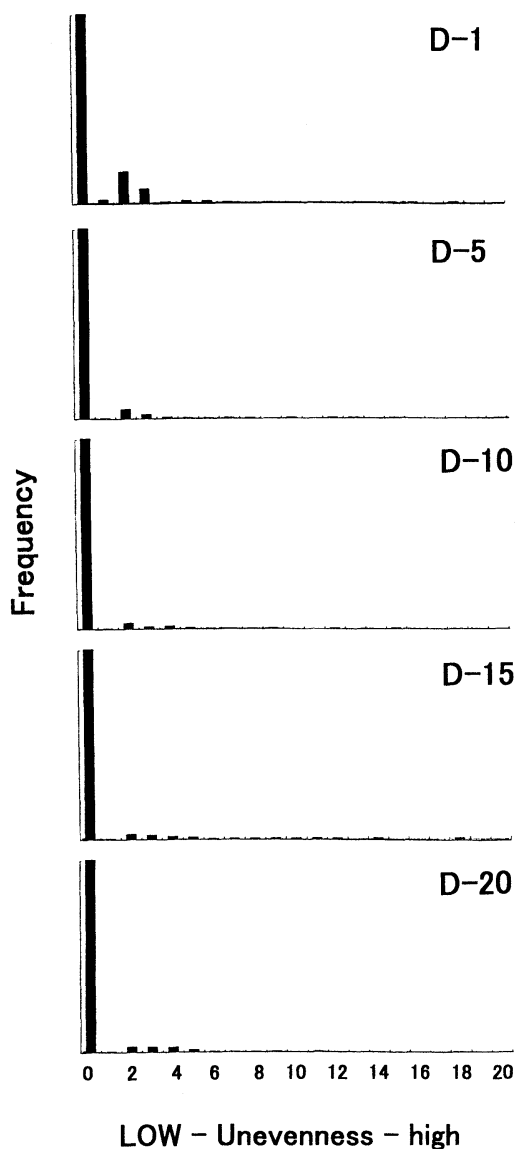


Fig. 6. Unevenness frequency distribution of external border line of a short-necked clam larvae in each developmental stage.

の動物プランクトンとの識別は縦横比, 凹凸の度合, 丸さの度合いなど複数の特性値を組み合わせることで可能である。しかし, ヒメアサリ, ホトトギスなど形態が類似している場合には, 今回用いたような特別のソフト(米の形状解析)の併用も不可欠である。

海洋の動物プランクトンの中には, 赤, オレンジ, 黒, 青など様々な色を帯びているものも多く, 画像解析の手法では微妙な色調の差異の認識も可能である。対象生物のアサリ幼生は無色であるが, 免疫学的方法で着色する

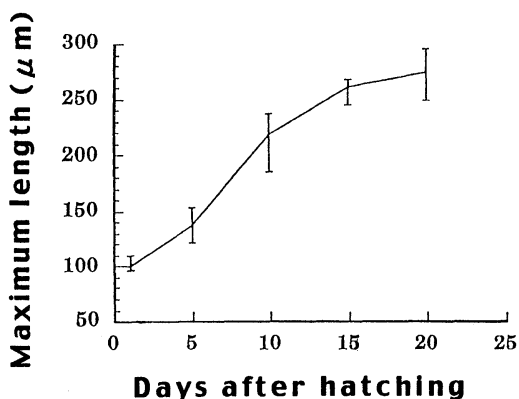


Fig. 7. Growth curve of short-necked clam larvae.

ことができれば, 他の生物との識別も特性値やソフトを使用しなくても容易にできる。

しかし, アサリ幼生自体も孵化後の発育に伴い形態が変化するので, この点も将来検討する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり「米の形状解析ソフト」の使用方法をご教示いただいた株式会社ニレコの田辺寛一郎課長, 白井 修主任に深甚なる謝意を表します。また, 始終, 激励をいただいた瀬戸内海区水産研究所森岡泰啓部長に深く感謝致します。本研究は農林水産技術会議の特別研究「魚介類の初期生態解明のための種判別技術の開発」の一環として行われた。

文 献

- ISHII, T., R. ADACHI, M. OMORI, U. SHIMIZU and H. IRIE (1987): The identification counting and measurement of phytoplankton by an image-processing system. *J. Cons. In. Explor. Mer.* **43**, 253-260.
- 岩崎英雄 (1976): 赤潮—その発生に関する諸問題. 海洋出版, 東京, 126頁.
- FURUYA, K. and R. MARUMO (1983): Size distribution of phytoplankton in the western Pacific Ocean and adjacent waters in summer. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **30**, 21-32.
- JEFFRIES, H. P., M. S. BERMAN, A. D. POULARIKAS, C. KATSINIS, I. MEALS, K. SHERMAN and L. BIVINS (1984): Automated sizing, counting and identification of zooplankton by pattern recognition. *Mar. Biol.*, **78**, 329-334.
- 角井嘉美 (1998): 沿岸海域における浮遊生物組成把握のための計測システム, p.1474-1479, 沿岸の環境圏 (平野敏行監修), フジテクノシステム, 東京.
- 寺崎 誠 (1987): 画像解析法によるプランクトン研究. 沿岸海洋研究ノート, **24**, 99-105.
- 寺崎 誠 (1990): プランクトンのパターン認識. 日本

海洋理工学会誌, **2**, 49-55.

TERAZAKI, M. and T. ISHII(1989): Examination of the possibility of automated identification of chaetognata utilizing an image processor. Bull. Plankton Soc. Japan, **33**, 95-100.

辻 堯・西川 孝 (1981): 画像処理による細胞レベルの微生物量の測定: 2. 従来の測定法法の問題点と画像処理による克服. 化学と生物, **19**, 268-274.

TSUJI, T. and T. NISHIKAWA(1984): Automated identification of red tide phytoplankton *Prorocentrum triestinum* in coastal areas by image analysis. J.

Oceanogr. Soc. Japan, **40**, 425-431.

UHLMAN, D. O. SCHIMPERT and W. UHLMAN(1987): Automated phytoplankton analysis by a pattern recognition method. Int. Rev. ges. Hydrobiol., **63**, 575-583.

山口峰生 (1998): 赤潮, P181-190, 沿岸の環境圏 (平野敏行監修), フジテクノシステム, 東京.

2000年6月14日 受付

2001年4月23日 受理