

論 説

流路を移動する植物プランクトンの 深層学習による自動計数

小長谷 圭 志 (産業イノベーション学科)
寺 田 淑 乃 (農学研究科)・谷 涼 太 (理工学研究科)・
白 石 悠 介 (理工学研究科・修了生)・
中 山 未奈美 (産業イノベーション学科・卒業生)・
高 橋 学・八 木 秀 次 (産業イノベーション学科)・
柴 田 論・穆 盛 林 (理工学研究科)・
清 水 園 子 (南予水産研究センター)・
山 本 智 規 (産業イノベーション学科)

An Automatic Counting of Moving Phytoplankton in Channel using Deep Learning

Keiji KONAGAYA (Department of Industrial Innovation) ,
Yoshino TERADA (Graduate School of Agriculture) ,
Ryota TANI (Graduate School of Science and Engineering) ,
Yusuke SHIRAIISHI (Former Student of Graduate School of Science and Engineering) ,
Minami NAKAYAMA (Former Student of Department of Industrial Innovation) ,
Manabu TAKAHASHI, Hidetsugu YAGI (Department of Industrial Innovation) ,
Satoru SHIBATA, Shenglin MU (Graduate School of Science and Engineering) ,
Sonoko SHIMIZU (South Ehime Fisheries Research Center) ,
Tomonori YAMAMOTO (Department of Industrial Innovation)

キーワード：植物プランクトン、深層学習、移動物体検出、滞留プランクトン、微細流路

Keywords: phytoplankton, deep learning, moving object detection, retained plankton, micro channel

【原稿受付：2022年1月17日 受理・採録決定：2022年1月31日】

要旨

われわれは、植物プランクトンのモデルであるミドリムシを自動計数する手法として、計数板準備を省略した流路方式を採用した。移動する植物プランクトンの顕微鏡データに深層学習を適用し、植物プランクトンの自動計数を行った。赤潮プランクトンの魚類に対する致死濃度レベル 10^3 細胞/mLにおいて、計数板を用いた目視計数との差は16%以下に収まった。

1. はじめに

沿岸海域での赤潮発生とそれによる漁業被害の低減は世界的な課題であり、その対策業務の省力化が望まれている(石田, 1997)。赤潮とは海水や湖沼の色が植物プランクトンの大量発生によって色付くことを指す(日色, 1991)。この原因は富栄養化をはじめとした増殖因子の変動、生物環境の変動が考えられている(日色, 1991)。赤潮による漁業被害を最小限に抑えるには、その発生を早期に予測することが求められる。従来からの赤潮の判断指標として、クロロフィル蛍光(和西, 2007)、分光反射率(稲村ら, 1985)の

測定などが挙げられるが、これらの手法では大量発生しやすい種や有害な種を判別して計数することはできない。それに対して、画像処理技術に基づくヴィジュアルプランクトンレコーダー(Visual Plankton Recorder; VPR)(市川ら, 2014)や分子生物学手法の一つである環境DNA解析では、プランクトンの種類とその量を同時に知ることができるため、注目を集めている。オンサイト分析では、VPRなどの簡易な光学顕微鏡と画像処理を組み合わせた方法が実用化に近い。

光学顕微鏡と画像処理を用いた方法では、検査が三

つの段階に分けられる。すなわち、海水サンプリング、計数板準備、計数の三つである。最初の段階である海水サンプリングにおいては、ドローンやICTを活用して、多地点・複数回に及ぶ作業を省力化する研究が行われている（安藤ら、2016）。宇和海では、愛媛県と愛媛大学により赤潮発生情報のデータベース「You see U-Sea」が公開され、現在は漁協や地方自治体を含む「宇和海水温情報運営協議会」により運営されている。また、三つ目の段階である計数についても自動化の試みがなされている（寺田ら、2019）。ここで、細胞や浮遊物を計数するアルゴリズムを三つに大別すると、研究者が自ら特徴量とその変数の閾値を設計する方法、研究者が特徴量のみを指定し分類方法を学習する方法、特徴量すら設定しない方法がある（藤吉、2019）。こうした深層学習を赤潮プランクトンの自動計数に適用しようという試みは長崎大学を中心とするグループにおいて公開されているものの、仕様や計数精度の詳細な報告はなされていない（総務省、2019）。われわれが対象としている愛媛県宇和海では、プランクトン計数の自動化を2018年より検討してきた（寺田ら、2019）。先に述べた長崎大学らのグループとの違いは、プランクトンを含む計数板の準備作業を不要とする点である。本稿で示す方法は、顕微鏡対物レンズ下に流路を設けてそこに試料を流す方法で、計数板の準備作業を省略している。この方法では希釈から顕微鏡による計数までを連続して自動化できるという大きな利点がある。

このような流路を用いて画像処理により細胞を計測する方法では、FlowCAM[®]が同様の研究で用いられている（宮村ら、2014；小池ら、2014）。しかし、FlowCAMでは細胞よりも遥かに小さいサブ μ mの微粒子までも対象としているため、光学系がワイドレンジ設計であり、高濃度ではかえって定量性が低下するとの報告もある（宮村ら、2014）。そこでわれわれは、植物プランクトンに絞った計数システムとすることで、既存の市販品よりも低価格で計数を実現できるか検討した。具体的には、トリガーなどを用いずに植物プランクトンに合わせた流路、顕微鏡、画像処理系の3つにより構成されるシステムである。

本研究では、顕微鏡観察下の流路を移動する植物プランクトン（ミドリムシ）に対して深層学習を適用し自動計数を試みた。また、日本を含む北西太平洋海域に分布する有害赤潮プランクトン種のいくつかで魚類が斃死する危険濃度の一つ 10^3 細胞/mL程度（Imai et al., 2006; NOWPAP CEARAC, 2007）における計数の可能性を調査した。

2. 実験方法

2.1. 試料

赤潮プランクトンのモデルとして、ユーグレナ門に属するミドリムシ (*Euglena* sp.) (藤めだか) を使用した。細胞濃度は日本を含む北西太平洋海域に生息するいくつかのプランクトン種で魚類が斃死する危険濃度である 10^3 細胞/mL程度における（Imai et al., 2006; NOWPAP CEARAC, 2007; 城, 1985）の二つの値を設定した。水で希釈した後、最終濃度が 1.76×10^3 および 3.08×10^3 細胞/mLとなるように10 mLずつ調整し、1 mLずつ流路に右から左へ連続的に流して計数結果を比較した。試料を交換する際には、水で流路を洗浄したのち、次の試料を注入した。従来法との比較のため、同じ未固定試料をプランクトン計数板 MPC-200（松浪硝子工業製）に注入して、光学顕微鏡で計数し、1 mLあたりに換算して示した。

2.2. 流路構造と計数方法

流路構造の決定においては、海水サンプルの浮遊物のサイズを考えることとした。本研究では赤潮対策省力化を目指しているため植物プランクトンが対象となり、特に大量発生や有害生産物の観点からモニタリングに重要なプランクトンを識別する必要がある。動物プランクトンの多くは0.1 mmを上回る体サイズをもつが、植物プランクトンの多くはこれより小さい（千原ら、1997）。このことに基づき、撮影および計数に用いる微細流路の断面厚を0.1 mmに設定した。なお、環境省は動物プランクトンやそれ以外の浮遊物は0.1 mmメッシュを用いて事前に取り除く方法を示しており（環境省自然環境局生物多様性センター、2013）、これを想定した。顕微鏡の被写界深度が浅いと奥行き方向にプランクトンの見逃しが生じるため、顕微鏡のコンデンサにより調整した。

流路はスライドガラス（25 mm × 75 mm × 1 mm）# 7101（Shangdong Harmowell Trade 製）2枚を0.1 mm厚のフッ素樹脂テープ T6-5S-1P（トラスコ中山製）により離すことで作製した（Fig. 1a）。これらはUVレジックラフトアレンジ（ケミテック製）（アクリレートプレポリマー）を用いて固定した。流路の幅と長さはスライドガラスの寸法から接着部分を除いた部分となり、それぞれ17 mm、70 mmとなった。導入部にはシリコンチューブ（内径0.5 mm、外径1.0 mm）を用いた。

顕微鏡 SD200DL（SWIFT 製）を使い透過明視野照明で撮影される計数可能領域を Fig. 1b に示した。計数可能領域の寸法は幅 W 1.0 mm × 長さ L 1.5 mm × 深さ d 0.1 mm であり、流路断面のうち計測した断面積は $W \times d = 1.0 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^2$ であ

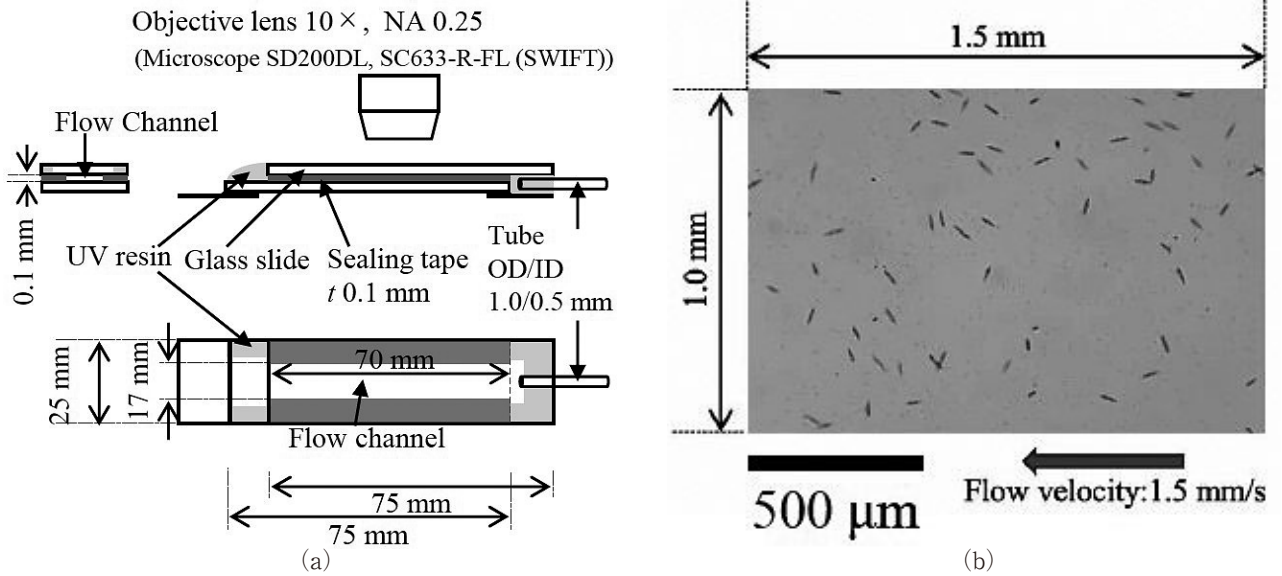


Fig. 1 Schematic diagram of the experimental set-up. (a) Schematic diagram of the flow channel. (b) Exemplar microscopic image of the flowing phytoplankton.

る。顕微鏡の対物レンズは倍率 10 ×、NA 0.25 であった。デジタルカメラ SC633-R-FL (SWIFT 製) (630 万画素) で撮影した。顕微鏡写真および視野寸法はこれよりも狭くした。流路中央の 1 視野について 5 分間撮影した。

2.3. 深層学習

フレームレート f を平均的移動速度 v (1.5 mm/s) と計数領域の流路長手寸法 $L' < L = 1.5$ mm の比率から求まる滞在時間 $T = L' / v$ の逆数にすることで ($f = 1/T = 3$ fps)、フレーム間のプランクトンの重複を実質的に無くすることができる。これにより、プランクトン数の計算は撮影動画フレームから切り出される静止画中の物体検出に帰着させることができる。画像処理には、Python を使用した。学習データと検証データの組み合わせはそれぞれ 800 枚とし、内訳は各濃度で 400 枚とした。

検出枠であるバウンディングボックスの候補を計算する際に必要となるアンカーボックスの数は、学習データの平均 IoU (Intersection Over Union) に基づいて、平均 IoU が 0.5 より大きくかつ増加が漸近に達した 9 とした。アンカーボックスの形状やサイズは、予備検討より求めた。特徴量の抽出を効率化するため、ImageNet データベースから配布されている汎用の特徴抽出層 darknet-53 を使用した。検出層には YOLO (you only look once) v3 を使用した。YOLO は検出と分類を同時に行えるため、高速性を要求される場合に有効である (Redmon and Farhadi, 2018)。パラメーターとして、ミニバッチサイズは 32、初期学習率は 0.001、最大のエポック数は 50 とした。

3. 結果

Fig. 2 に本システムにおいて流路を移動するプランクトンを深層学習により検出しているようすを示す。一方で学習データのうち、15% のプランクトンは太枠で示したように滞留した。計数結果が実測値に対して著しく過剰に算出した (滞留プランクトン数 × フレームレート × 計測時間の積)。そこで、滞留するプランクトンを流れるプランクトンと区別する分類アルゴリズムを追加した。

つまり、各フレーム画像内の細胞にラベルを付け、次のフレーム画像のラベルとの距離が一番近いプランクトンを認識させ、その距離がアンカーボックスの一边未満であれば前フレームと同じ個体ラベルを付けるようにした。そして、3 フレーム連続して存在するプランクトンは滞留プランクトンと判定し、累計数から差し引く処理を行った。すなわち、そのままのプランクトンの累計数 N_{Raw} 、滞留プランクトンの累計数 $N_{\text{Retention}}$ として、真のプランクトンの累計数 N_{Total} を以下の (1) 式により計算した。

$$N_{\text{Total}} = N_{\text{Raw}} - N_{\text{Retention}} \quad \text{式 (1)}$$

今回の場合、試料体積 V は 1 mL であるので、細胞密度は累積数と等しい。

その結果、Table 1 に示すように、計数板を用いた目視計数との差は 1.76×10^3 細胞/mL で 0.9 ~ 6.3%、 3.08×10^3 細胞/mL で 4.2 ~ 16% となり、目視計数との差は 16% 以下に収まった。目視計数の結果も一

一般的には1~2桁の有効桁数で表されることを踏まえると(東京都環境局, 2020)、誤差16%という今回の結果は有効桁数1桁の表示については実用に足ると判断できる。また、今回の濃度は先行研究(宮村ら, 2014)においてFlowCAMの定量性が悪いとされる濃度であった。サンプル自体が異なるため直接比較することはできないものの、今回の結果は流路の断面サイズの変更によりプランクトンの定量性が向上する可能性を示唆した。

今回、われわれは計数板準備を省略した流路を移動するプランクトンの計数において、深層学習と滞留プランクトン補正アルゴリズムの組み合わせが有効であることを示した。プランクトンが滞留する現象は海底におけるシスト形成などで報告されている(千原ら, 1997)。流路を用いた計数においては、平均的移動速度を基準に撮影のフレームレートを決定したため、集団に従わない例外的な移動速度を持つプランクトンを個別に計数する必要があった。今後検討できる他の計数法としては、滞留プランクトンの密度やサイズに着目して分離する方法も考えられる。

深層学習についても今回はImageNetデータベースから取得したdarknet-53を特徴抽出に用いたが、深層学習の精度を比較した文献では単純なCNN(convolutional neural network)4層でもdarknet-53と同じデータベースリソースによるResNet-50と同等の正答率を示すという報告もあり(Itakura and Hosoi, 2020)、実行に必要なメモリのダウンスケールのためには、より最適な層の選定が可能と思われる。

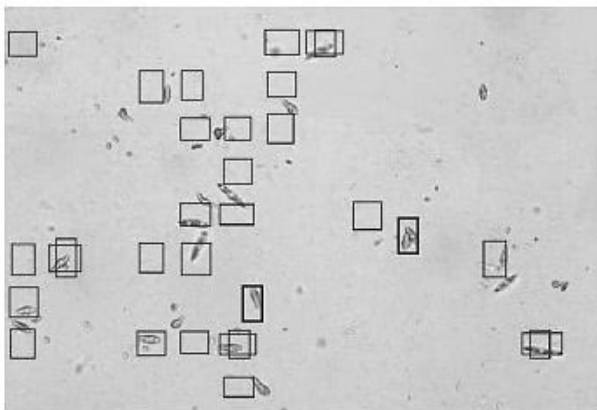


Fig. 2 Microscopic image of the moving phytoplanktons in micro channel. The bold boxes indicate the retained planktons.

4. おわりに

本研究では、微細流路に注入した植物プランクトン(ミドリムシ)について、生物顕微鏡に取り付けた

デジタルカメラを用いて画像を取得し、深層学習を適用して自動計数を試みた。その結果、日本を含む北西太平洋海域に生息する赤潮プランクトン危険濃度範囲の 1.76×10^3 および 3.08×10^3 細胞/mLの二つの条件において本手法が適用でき、計数板準備の作業から計数に至るまでを連続して省力化できる可能性が示された。今回は赤潮の指標となる植物プランクトンのモデルとしてミドリムシを選定したが、今後は赤潮の早期発見に重要なプランクトン(*Karenia mikimotoi*, *Chattonella marina/antiqua*等)の分類と計数が必要であり、形状や動きといった特徴が活用できると考えられる。今後、実際の海水サンプルの前処理方法やそれに続く赤潮プランクトンの分類と計数などについて取り組んでいきたい。

参考文献

- Imai, I., Yamaguchi, M., Hori, Y., 2006. Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton and Benthos Research* 1, 71-84.
- Itakura, K., Hosoi, F., 2020. Automatic Tree Detection from Three-Dimensional Images Reconstructed from 360° Spherical Camera Using YOLO v2. *Remote Sensing* 12, 988.
- NOWPAP CEARAC, 2007. Booklet of Countermeasures against Harmful Algal Blooms (HABs) in the NOWPAP Region 19.
- Redmon, J., Farhadi, A., 2018. YOLOv3: An Incremental Improvement. *arXiv (preprint)*.
- 千原光雄、村野正昭、1997. 日本産海洋プランクトン検索図説. 東海大学出版会.
- 和西昭仁、2007. 衛星によるクロロフィル-a情報を利用した赤潮モニタリングの可能性-I 船舶観測値と衛星推定値との相関. 山口県水産研究センター研究報告 73-80.
- 城久、1985. 大阪湾に発生する赤潮の特性. *生活衛生* 29, 128-141.
- 安藤顕人、岡本拓哉、遠藤慶一、黒田久泰、樋上喜信、小林真也、2016. 赤潮や魚病の発生予測のための海水サンプル採取を支援するシステムの開発. 第15回情報科学技術フォーラム講演論文集 4, 469-473.
- 宮村和良、石坂丞二、2014. 西部瀬戸内海におけるFlowCAM[®]を用いた現場赤潮監視. *日本プランクトン学会報* 61, 41-44.
- 寺田淑乃、坂本理穂、白石悠介、山本智規、清水園子、2019. 赤潮プランクトンの分類・計測システムへの人工知能技術の適用. 計測自動制御学会四国支部 学術講演会 2019 講演概要集 2, 34-37.
- 小池一彦、Thaw M.S.H., 北原茂、2014. FlowCAM[®]を用

- いた植物プランクトンの広範囲・連続モニタリング：
特に赤潮分布調査への応用について．日本プランクトン
学会報 61, 34-40.
- 市川忠史、日高清隆、田所和明、杉崎宏哉、2014. 卓上型
VPR(B-VPR) による動物プランクトン標本の大量解析．
日本プランクトン学会報 61, 55-59.
- 日色和夫、1991. 富栄養化と赤潮発生．環境技術 20, 770-
774.
- 東京都環境局、2020. 平成 30 年度東京湾調査結果報告書～
赤潮・貧酸素水塊調査～．
- 環境省自然環境局生物多様性センター、2013. モニタリン
グサイト 1000 陸水域調査湖沼：プランクトン調査マ
ニュアル．
- 石田祐三郎、1997. 世界に広がる有毒有害赤潮プランクト
ンとその動向～スペインのヴィゴで開催された第 8 回
有毒・有害プランクトンに関する国際会議の報告～．学
術の動向 2, 82-83.
- 稲村実、豊田弘道、藤村貞夫、1985. 植物プランクトン濃
度の定量的遠隔計測における水面反射光の補正法．電子
情報通信学会論文誌 C J68-C, 1101-1108.
- 総務省、2019. 平成 30 年度当初予算 IoT サービス創出支
援事業 成果報告書．
- 藤吉弘亘、2019. 《第 1 回》機械学習の進展による画像認
識技術の変遷．計測と制御 58, 291-297.