

## 定量的画像解析のための情報技術

## Information Technology for Quantitative Bio-Image Analysis

小林 徹也

Tetsuya J. Kobayashi

東京大学生産技術研究所

**要旨** イメージング技術の発展により、生命科学の様々な分野において画像や動画が実験の一次データとして得られるようになってきた。しかし多くの場合、画像の評価方法は「見る」という定性的かつ主観的な方法にとどまり、画像が有する定量的情報が最大限に活用できていない。また最近では、データ取得の簡便さから「見る」ことが不可能なほどの多量の画像も生成されている。画像解析に基づく定量的解析や自動的な情報の取捨選択は、今後の生命科学研究において不可欠であり、バイオイメージングフォーマティクス分野として台頭しつつある。本総説では、バイオイメージングフォーマティクスに関連する背景、基本情報などを豊富な参考文献とともに紹介する。また具体的な画像解析の問題として、核などの粒子オブジェクトの同定、膜などの境界領域の同定、そして分子発現の定量化に関わる画像解析例を紹介する。最後に、今後のこの分野の発展において解決すべき課題を議論する。

**キーワード**：バイオイメージングフォーマティクス、画像解析、定量生物学、システム生物学

## 1. バイオイメージングフォーマティクスの台頭と定量画像解析

バイオイメージング技術の急速な発展により、生命科学の様々な分野において画像や動画が実験の一次データとして得られるようになってきた<sup>1)</sup>。しかし多くの場合、画像の持つ情報の評価方法は画像を「見る」という定性的かつ主観的な方法にとどまっている。しかしながらバイオイメージには、細胞や組織の形状、分子の空間局在、タンパク質の発現量など、単純に「見る」だけでは評価しきれない定量的な情報が含まれている<sup>2)</sup>。また、動画データには時間的変動の情報も含まれる<sup>3)</sup>。そして最近では、膨大なイメージングデータがあまりに簡便に得られるために「見る」ことによりデータを確認することすら不可能になっている場合もある。バイオイメージングデータが潜在的に有するこのような情報を最大限活用するためには、定量的な画像解析や自動的な情報の取捨選択が不可欠になる。バイオイメージングフォーマティクスは生命科学における画像解析の重要性の高まりとともに、近年台頭してきた生命情報の一分野である<sup>4)</sup>。

ではどのようなことが画像解析を活用することによって可能になるのだろうか？最も典型的なものは、細胞内小器官、細胞、組織といったの2D/3D物体の個数、位置、形状などを画像から認識し、その特徴量（体積、長さ、扁平度、接続

関係など）を抽出することである。更に複数の異なるプローブを用いた多色のイメージングデータがあれば、1色で核などを認識し、別色のプローブで特定の分子の発現量などを測ることも可能になる<sup>5)</sup>。

もしデータがタイムラプスで、複数の時間点での情報が得られる場合、特定の細胞や小胞の追跡により、多数の物体の運動が作る流れ場のようなものや<sup>6,7)</sup>、分裂する細胞の系譜(lineage)の情報が抽出できる<sup>8)</sup>。もちろん、各細胞の遺伝子発現の経時変化も計測可能である<sup>9)</sup>。さらに、異なる変異体についてイメージングデータが無数に得られる場合、機械学習的なアルゴリズムを活用して、イメージングデータだけから異なる変異体などを自動で判別する判別器なども作成できる<sup>10)</sup>。このような技術は特にハイスループットスクリーニングなどで威力を発揮する。発生のような多細胞が関わる現象では、野生型と変異体の個体全体での対応関係が複雑になる場合も多い。モーフィングと呼ばれる画像解析技術は、異なる変異体間のグローバルな形状の対応関係を与えAtlasなどを作成するのに活用されている<sup>11)</sup>。

## 2. バイオイメージングフォーマティクスのための解析プラットフォーム

イメージングデータの画像解析をはじめするにはどうしたら良いだろうか？Metamorph<sup>12)</sup>など顕微鏡操作のソフトなどには、基本的な画像解析のコマンドがオプションに含まれている。特にVolocity<sup>13)</sup>など3Dでの表示に対応したソフトはレンダリングの速度も早く、目的の機能がソフトに搭載されていればそれを使うのが良い。輝点トラッキングなどの定番タスク

〒153-8505 東京都目黒区駒場4-6-1  
TEL & FAX: 03-5452-6798  
E-mail: tetsuya@mail.crmind.net  
2012年9月17日受付

についてはG-track<sup>14)</sup>のような商用ソフトもある。しかし実装されていない機能が必要な場合、解析専用のソフトで初めから処理するほうが楽なことが圧倒的に多い。

無料解析ソフトの定番はImageJ<sup>15)</sup>であり、多数のプラグインなどが公開されている(Fiji<sup>16)</sup>など)。Java言語やScala<sup>17)</sup>を学べば自分で専用のプラグインを作成でき、具体的な解析のチュートリアルも公開されている<sup>18)</sup>。有料にはなるが、Matlab<sup>19)</sup>などの商用ソフトは広範囲の画像解析用関数をツールボックスとして提供し、Matlabを使った画像解析の教科書も出版されている<sup>20)</sup>。単純操作の並列処理や、Linuxサーバー上での処理もコマンドラインで可能であり、多数のデータを処理しなければならない場合には有効な選択肢である。さらなるアドバンスドな処理にも多数の関数が共有されており<sup>21)</sup>、高速化にはC言語や画像解析ライブラリーOpen CV<sup>22)</sup>なども活用できる。Image JならばJava Native Interface (JNI)、MatlabならMEXにより、Cなどで書かれた高速な関数を呼び出して利用することができる。最近では、MatlabベースのバイオイメージプラットフォームとしてCell Profiler<sup>23)</sup>やCell Organizer<sup>24)</sup>などの開発も進んでいるので、まずは無料のこれらを活用してみるのも一つの方策である。バイオイメージに特化した解析のサンプルも公開されており学習しやすい。

解析プラットフォームの選択で注意点が二つある。一つ目はGUI作成の簡便さである。自動処理による画像解析の精度をある程度以上高めることは困難な作業である。解析結果に完璧さを求める場合、マニュアルによる補正を自動解析に組み合わせるほうが効率的な場合がほとんどである。GUIの作成が簡単なImageJ (+Java)やMatlabなどを選択しておくことは、開発の後半で大きな意味を持つことになる。二つ目は空間3Dのデータを扱う必要があるか、無いか、という問題である。コンピュータが高速になったとはいえ、3Dデータの表示やインタラクティブな操作は未だに計算的に重く、汎用プラットフォームでは開発の難易度が上がる。高速な3D表示などに対応しかつ様々なデータ形式に対応した、Amira<sup>25)</sup>などの専用ソフトウェアを併用することも考えなければならない。

### 3. バイオイメージ解析、その前に：測定条件の最適化

バイオイメージ解析の成否に関して画像自体のクオリティは最も重要なファクターである。以下では画像解析をはじめの前におさえておくべき計測のポイントを紹介する。

画像データの種類によってポイントは変わる。明視野画像はS/N(シグナル・ノイズ比)は比較的良好だが、画像の輝度値が必ずしも抽出したい細胞の領域などに対応していない。エッジフィルター(輪郭強調)やテクスチャー解析(濃淡変化の特徴化)などによって原画像を変換し、求める領域を抽出しやすくする必要がある。一般に微分干渉顕微鏡による画像は人間が視認しやすいよう擬似的に影がつくが、この非対称性は画像解析には向いていない。むしろ、対称性のよい位相

差像のほうが解析に向いている。場合にもよるが、微分干渉像を解析に利用することは極力避けたほうが良いだろう。

対して、蛍光画像は画像の輝度値が認識すべき対象に対応していることが多い(例えば核を蛍光プローブでラベル化すれば、輝度値の高い領域がおおよそ核になる)。しかし、励起光による退色や細胞・組織への毒性のため一般に画像のS/Nが低い。ノイズフィルターが一般的な対応方法であるが、むしろ計測条件を変えてS/Nを高める条件を見出すことが有効である。測定の空間解像度や1ピクセルあたりの分解能は画像解析に必要なそれよりも高く設定されていることが多い。カメラのピンングによる計測ノイズの低減、低倍レンズの活用によるシグナルの増加によって驚くほど解析の難易度は下がる<sup>26)</sup>。

明視野・蛍光に共通するが、照明光・励起光の不均一性によるバックグラウンドの空間的非一様性も解析の大きな障害になる。可能な限り測定時に均一な照明になるように工夫をする。不可能な場合はサンプル無しで測定した画像から非均一照明の情報を取得して、そのデータを元に補正するやり方が最も有効である。

3Dでの計測の場合、Z軸方向(深度方向)の解像度はX、Y軸のそれと比べて大きく損なわれる。その結果、Z方向での物体の分解能が減少し、例えば蛍光ラベルされた核の空間内での位置を同定する際も、Z方向の分離能がボトルネックになって核認識精度が向上しない、などの影響が出る。カメラのピンングによりX、Yの解像度を犠牲にする代わりに、より弱い励起光で多数のZスライスを計測することにより全体としての認識精度が向上する。

最後に、ここであげた測定系の最適化はその後の画像解析の結果をフィードバックして、逐次的にチューニングしてゆることが大事である。

### 4. 粒子オブジェクトのバイオイメージ解析

バイオイメージ解析において最も典型的な解析は、1分子、細胞内小胞、細胞核などの粒子状オブジェクトの位置、形状を同定し、追跡するタスクである。空間が2次元で、かつ1分子測定のようにバックグラウンドが少ない蛍光測定のデータであれば、商用ベースのソフトウェア<sup>14)</sup>やMatlabのツールが知られている<sup>27)</sup>。解析方法に関する論文も多い<sup>28)</sup>。しかし、組織内や細胞内におけるバイオイメージのようにバックグラウンドシグナルが大きい、もしくは対象とするオブジェクト以外の対象がバックグラウンドとして存在する場合、オブジェクトの同定や追跡はかなり困難な問題になる。また、細胞の特徴的な形状なども種によって異なるため、対象とする系ごとに様々な手法が開発されているのが現状である。例えば増殖する大腸菌の同定と追跡<sup>29)</sup>、酵母の同定と追跡<sup>30)</sup>、線虫胚の核の同定と追跡(明視野画像<sup>31)</sup>、蛍光画像<sup>32)</sup>)などである。iPS細胞などへの応用から明視野画像での細胞同定&追跡も重要なトピックとなっている<sup>33)</sup>。

また3次元での細胞同定と追跡は2次元と異なり手動での

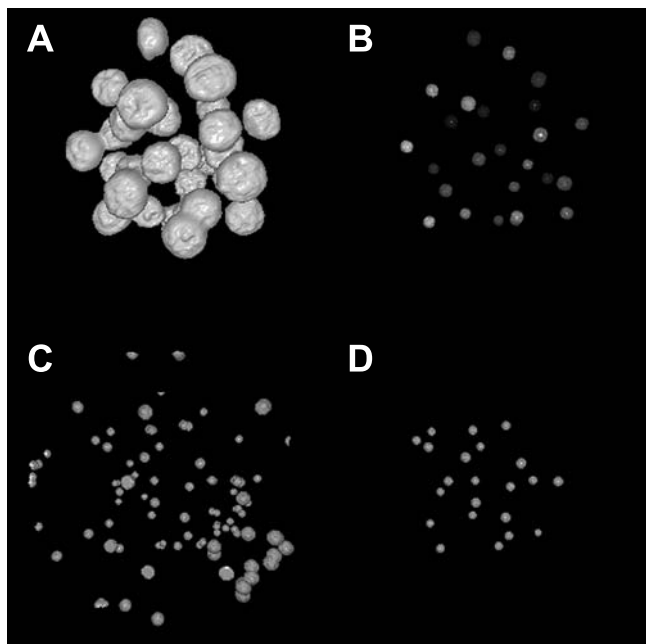


図1 マウス初期胚における3Dでの核同定. 文献<sup>38)</sup>より改変して再掲. (A) 蛍光ラベル化されたデータに閾値処理をした大まかな書く領域. (B) 核の位置を画像解析により同定した結果. (C) 単純に輝度が局所的に高い場所を選んででもエラーが多く、誤った候補が同定される. (D) 胚の輪郭情報や細胞間の距離など様々な情報を使って正しい核の位置を抜き出してくる.

作業が困難を極めるため、画像解析の重要な課題になっている。特に初期発生分野において研究が進んでおり、線虫胚、ショウジョウバエ胚、ゼブラフィッシュ胚における解析がこの数年で大きく進んだ<sup>34~36)</sup>。我々も近年マウス胚を対象として<sup>37)</sup>、3次元での細胞核の同定手法の開発を進めてきた。核を抽出するマルチスケールフィルターを開発して、80~90%程度の精度で核を同定する手法を開発した(図1)<sup>38)</sup>。さらに解析を進め、現在99%の精度を達成している。ここで最も重要になったのは実は画像解析の複雑さではなく、質の高いバイオイメージを取得するという点であった。

とは言え、現在のところ3次元で同定された無数のオブジェクト(100個以上)の追跡となると良い手法は未だ確立していない。また、オブジェクトが増殖で分裂したり細胞死などで消失したりする状況での画像解析は非常に難しく、高度な最適化の手法が必要になってくる<sup>39)</sup>。

### 5. 境界領域のバイオイメージ解析

粒子状オブジェクトに対して、細胞膜などの境界領域の同定は違った難しさがある。組織のように細胞が無数に存在し密着している状態では、膜が均一に染色されていることが重要になる。染色が非均一であれば境界領域が分断されて同定されてしまう。バックグラウンドに膜以外のシグナルが存在すると(例えば膜を染色している蛍光タンパクを輸送する小胞など)、膜のない場所が誤って膜として同定されてしまう。*In vivo* イメージングにおいてこのような状況は頻繁に生じ、

いかにこれらのノイズに対して安定な同定ができるかが大きな課題となる。また、粒子状オブジェクトを同定する問題とのもう一つの差異は、膜の形状の非対称性である。膜はある方向には長く伸びているが、直交方向の厚みは薄い。このような空間的非対称性がある場合、ノイズフィルターなどのパラメータ選択が難しくなり、また連結性の判別もより高度な対処が必要になる。同様の問題は、神経細胞の樹状突起や軸索を画像解析によって認識する場合にも現れる<sup>40)</sup>。

我々はショウジョウバエの羽において、極性形成分子の膜局在をシグナルとして細胞膜の同定を行った。バンドパスフィルターやモルフォロジー演算など古典的な解析手法を組み合わせることで、ある程度の精度を有する手法は作ることができる。この場合でもシグナルのS/Nは大きな問題になり、特にタイムラプスでの測定では精度が大きく犠牲になる。我々は逆にタイムラプスデータの連続する時間点での解析結果を統合することにより精度を上げる手法を開発してこの問題に対応した(Harumoto *et al.* in preparation)。さらに細胞が密接している組織内であれば、直接膜を認識するのではなく、まずその補集合である細胞質部分を同定し、そこから膜を認識するやり方も有効である<sup>41)</sup>。

3次元データにおいて境界領域を同定する問題は潜在的需要は多いが、ほとんど未開拓である。3次元での境界領域構造は、データを3次元に表示をして肉眼で調べる場合でも把握することが難しく、また手動で領域を選択してゆくことも不可能ではないが恐ろしく時間がかかる。画像解析手法のブレークスルーが強く望まれる分野である<sup>42,43)</sup>。

### 6. 分子発現量のバイオイメージ解析

直接物体を認識する問題とは異なるが、複合的な課題として細胞や細胞内小器官における分子発現量の解析がある<sup>44)</sup>。蛍光シグナルなどの強さは例えば細胞内に発現している分子や局在の量、プロモーターの活性などを完全に定量的ではないものの相対的には反映していると考えられることができる。予め別の蛍光シグナルなどを元に細胞や細胞内小器官などを同定しておき、その領域内の該当シグナルを計測することによって解析が可能になる。すでに、細胞ベースのハイスループットスクリーニングや<sup>45)</sup>、遺伝的に同一な細胞集団内における個々の細胞の非遺伝的な発現のばらつきなどを定量化する目的で解析が進められている<sup>46,47)</sup>。

画像解析としては、シグナルを計測する領域が同定できていれば簡単のように思えるが、シグナルの時間発展を計測する場合には蛍光分子の退色などの影響を適切に補正する必要がある<sup>48)</sup>。また、シグナルの絶対量を議論することは非常に難しく、厳密に解析するには1分子を同定して、その数で絶対濃度を推定するような方法が必要になる<sup>49)</sup>。むしろ絶対量にこだわるよりも、細胞内分子の周期的 or 一過的な増減の時間間隔などシグナル絶対値の厳密な定量性を必要としない特性量に注目し、画像解析を活用することが有効である<sup>50,51)</sup>。概日リズムの分野では、励起光による退色や毒性な

どの影響の無い発光プローブを元にした定量的発現動態解析が発展してきた<sup>52)</sup>。発光プローブは一般にシグナルが弱いいため、時間解像度(長い露光時間が必要)とS/Nが大きく犠牲になるが、最近では様々なタイプの発光プローブの開発も進んでいる<sup>53)</sup>。また発生過程のように多数の細胞が関与する現象であれば、胚内での遺伝子発現の空間パターンや<sup>54)</sup>、細胞系譜のどの細胞で遺伝子発現の変化が現れてくるかなどを解析<sup>5)</sup>するのに有効である。

この技術を使って我々は、概日リズム関連遺伝子のプロモーター活性を計測し、外部刺激の強度とタイミングが細胞集団の時刻と振動強度及ぼす影響を定量的に解析した。その結果、特定のタイミング・特定の強さの外部刺激が細胞集団の概日リズムの停止を誘導する Singularity 現象を観測することに成功した。そして、1細胞レベルでの発光測定データを画像解析することによって、1細胞レベルでの概日リズムの変化を網羅的に解析し、Singularity のメカニズムが振動の位相が脱同調することによって実現されることを実証した<sup>55)</sup>。

## 7. バイオイメージングの課題と展望

バイオイメージングに関連する背景、基本情報、そして具体的な問題を紹介した。生命科学における画像解析の重要性は、10年以上前から国内でも認識されており<sup>56,57)</sup>、かつ解決すべきタスクなども明確である。にもかかわらず、バイオイメージングの分野は未だ技術的にも人材的にも未成熟な状態が続いている。このような状況を打開し、今後のバイオイメージングとそれに伴う生命科学の発展において解決すべき課題を最後に2つほどあげる。

一つは画像解析手法の検証の問題である。画像解析による処理の自動化は多数のデータや画像の持つ膨大な情報量を扱うという点で、人手では不可能な解析が可能になる。例えば無数の変異体のデータを画像解析によって特徴化、判別する、もしくは胚発生のように数百、数千の細胞が関与する過程を定量的に特徴化するなどの課題があげられるだろう<sup>58~60)</sup>。ここでは精度の高い画像解析法が重要になるが、実は何が正解なのか検証するデータが少なく、精度自体を評価することもままならない場合が多い。人手で正解データを作成することがひとつの方向であるが、問題のスケールの現実に於いては、複数のイメージングプローブを組み合わせ、片方で画像認識を、もう片方でその結果の検証ができるようなデータをつくり上げることが一見遠回りにも見えるが、長期的には非常に重要になる。

もう一つは、質的に多様なイメージデータへの対応である。バイオイメージデータは扱う系に依存してその多様性が膨大であり、それぞれの画像解析もどうしても個別の問題になってしまう。そして、必ずしも高度な画像解析が必要になるわけではない。このような問題には、その系を扱っている生物系研究者が画像解析アルゴリズムをつくり上げるほうが効率的である。実験研究者に向けた Image J などを用いた画像解

析チュートリアルや勉強会などが最近開催されるようになっており<sup>61)</sup>、すこしずつであるが日本語によるテキストブックも増えてきている<sup>62)</sup>。今後、さらなる画像解析技術の普及と教育が課題になるであろう。

数年前に比べてバイオイメージング分野の注目度は高まり、幾つかの新学術においてもその基礎を構築する試みがなされている。しかし、分野として画像の専門家と生物学者との連携が確立しているとはまだまだ言いがたい。今後生物学者、画像解析の専門家が相互にお互いの技術や知識を身に付け、リソースを提供することによって、有益な連携体制を築いてゆくことがこの分野で世界をリードするために急務となるであろう。

## 謝 辞

本研究は、科学研究費補助金・新学術領域「哺乳類初期発生の細胞コミュニティ」のサポートに基づいている。また、マウス初期胚を用いた核位置の解析は基礎生物学研究所藤森研究室、ショウジョウバエの羽を用いた細胞境界解析は京都大学上村研究室、概日リズム細胞の振動解析は、神戸理研CDBの上田研究室との共同研究である。これらの共同研究者らに感謝したい。

## 文 献

- 1) Goldman, R.D. and Spector, D.L.: *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2009)
- 2) Danuser, G.: *Cell*, **147**, 973–978 (2011)
- 3) Bar-Joseph, Z., Gitter, A. and Simon, I.: *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 552–564 (2012)
- 4) Peng, H.: *Bioinformatics*, **24**, 1827–1836 (2008)
- 5) Murray, J. *et al.*: *Nat. Method*, **5**, 703–709 (2008)
- 6) Wilson, C.A., *et al.*: *Nature*, **465**, 373–377 (2010)
- 7) Sedzinski, J. *et al.*: *Nature*, **476**, 462–466 (2011)
- 8) Lou, X. *et al.*: *IEEE Int. Symp. Biomed. Imag.*, 1557–1560 (2011)
- 9) Locke, J.C.W. and Elowitz, M.B.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 383–392 (2009)
- 10) Misselwitz, B. *et al.*: *BMC Bioinfo.*, **11**, 30 (2010)
- 11) Long, F. *et al.*: *Nat. Method*, **6**, 667–673 (2009)
- 12) <http://www.moleculardevices.com/>
- 13) <http://www.perkinelmer.com/>
- 14) <http://www.g-angstrom.com/products/gtrack.php>
- 15) <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- 16) <http://fiji.sc/>
- 17) <http://www.scala-lang.org/>
- 18) <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/index.html>
- 19) <http://www.mathworks.com/>
- 20) Gonzalez, R.C., Woods, R.E. and Eddins, S.L.: *Digital Image Processing Using MATLAB*, 2nd Edition, Gatesmark Publishing (2009)
- 21) <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/>
- 22) <http://opencv.jp/>
- 23) <http://www.cellprofiler.org/>
- 24) <http://cellorganizer.org/>
- 25) <http://www.amira.com/>

- 26) <http://www.microscopyu.com/tutorials/java/digitalimaging/signaltonoise/index.html>
- 27) <http://physics.georgetown.edu/matlab/>
- 28) Jaqaman, K. *et al.*: *Nat. Method*, **5**, 695–702 (2008)
- 29) Wang, Q. *et al.*: *Cytometry Part A*, **77A**, 101–110 (2010)
- 30) Cookson, S. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, pp. msb4100032-E1 (2005)
- 31) Hamahashi, S., Onami, S. and Kitano, H.: *BMC Bioinfo.*, **15**, 1–15 (2005)
- 32) Santella, A., *et al.*: *BMC Bioinfo.*, **11**, 580 (2010)
- 33) Li, K. *et al.*: *Med. Image Anal.*, **12**, 546–566 (2008)
- 34) Bao, Z. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2707–2712 (2006)
- 35) Keller, P. *et al.*: *Science*, **1065**, 1065–1069 (2008)
- 36) Keller, P.J. *et al.*: *Nat. Method*, **7**, 637–642 (2010)
- 37) Kurotaki, Y. *et al.*: *Science*, **316**, 719–723 (2007)
- 38) Bashar, K. *et al.*: *PloS One*, **7**, e35550 (2012)
- 39) Bise, R., Yin, Z. and Kanade, T.: *IEEE Int. Symp. Biomed. Imag.*, 1004–1010 (2011)
- 40) Peng, H. *et al.*: *Nat. Biotech.*, **28**, 348–353 (2010)
- 41) Ma, D. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18800–18805 (2008)
- 42) Federici, F. *et al.*: *Nat. Method*, **9**, 730–733 (2012)
- 43) Martinez-Sanchez, A., Garcia, I. and Fernandez, J.-J.: *J. Struct. Biol.*, **175**, 372–383 (2011)
- 44) Muzzey, D. and van Oudenaarden, A.: *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **25**, 301–327 (2009)
- 45) Taylor, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3758–3763 (2009)
- 46) Elowitz, M. *et al.*: *Science*, **297**, 1183–1186 (2002)
- 47) Okano, H. *et al.*: *Biophys. J.*, **95**, 1063–1074 (2008)
- 48) Rosenfeld, N. *et al.*: *Science*, **307**, 1962–1965 (2005)
- 49) Taniguchi, Y. *et al.*: *Science*, **329**, 533–538 (2010)
- 50) Lahav, G., Rosenfeld, N. and Sigal, A.: *Nature Genetics*, **36**, 147–150 (2004)
- 51) Suel, G. *et al.*: *Science*, **315**, 1716–1719 (2007)
- 52) Welsh, D.K., Imaizumi, T. and Kay, S.A.: *Meth. Enzymol.*, **393**, 269–288 (2005)
- 53) Gupta, R. *et al.*: *Nat. Method*, **8**, 879–886 (2011)
- 54) Luengo Hendriks, C.L. *et al.*: *Genome Biol.*, **7**, R123 (2006)
- 55) Ukai, H. *et al.*: *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1327–1334 (2007)
- 56) Yasuda, T. *et al.*: *Genome Info. Ser Workshop Genome Inform.*, 144–154 (1999)
- 57) Ohya, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 19015–19020 (2005)
- 58) Krzic, U. *et al.*: *Nat. Method*, **9**, 730 (2012)
- 59) Luengo-Oroz, M. *et al.*: *Cur. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 630–637 (2011)
- 60) Khairy, K. and Keller, P.: *Genesis*, **513**, 488–513 (2011)
- 61) 画像科学夏の勉強会 2012, <http://www.nips.ac.jp/struct/isworkshop2012.html>
- 62) 勝木健雄, 蓬来祐一郎, 金 明哲: デジタル画像処理, 共立出版 (2011)