



日本生物学オリンピック 2025

本選 東京大会

実習試験 2(大問 2)

実習試験2に関するお知らせ

Biology Olympiad 2025 の実習試験 2 に関するお知らせ

実習試験 2 ではコンピュータを使った情報処理を含む問題を出題します。下記の文章に従ってソフトウェアなどの基本的な操作を予習してください。本選では FIJI と R が既にインストールされたコンピュータを使用します。ピクセルや輝度といった画像についての基本的な内容については、高校の情報の教科書を参照してください。回帰解析や有意水準など、統計の基本的な内容については、高校の数学と情報の教科書を参照してください。この文章の中でも参考になる文章を紹介します。

1. FIJI のインストール

- a. FIJI は画像解析のためのソフトウェアです。米国の National Institute of Health で研究用の画像処理のために開発された ImageJ に様々な機能拡張が付加されています。ImageJ とともに研究用の画像解析に広く用いられており Windows、Mac、Unix など多くのプラットフォームで動作します。
- b. FIJI は無料で利用することができ、<https://imagej.net/software/fiji/> からダウンロードすることができます。試験では Windows マシンを使用しますので、Windows で動作しているコンピュータに Windows 版のインストーラをダウンロードし、解凍したのちにインストールしてください。
- c. FIJI と ImageJ の間で基本的な操作に差はほとんどありません。下記の内容を実施するにあたって ImageJ について書かれた資料を参考にしてください。問題ありません。

2. FIJI を使って画像を閲覧する

- a. Windows 版の FIJI を起動すると図 1 のようなウィンドウが開きます。
- b. 配布したファイルの一つ、Reidai.tiff をひらきます。File/Open から Reidai.tiff を選択して開いてください。
- c. ある動物の原腸胚を撮影した画像が表示されます (図 2)。細胞の核を染色した胚を共焦点顕微鏡で撮影したものです。画像には 20 個の細胞核が表示されています。

3. 画像の二値化

- a. 次に「二値化」とよばれる方法を用いて細胞の核を選択します。染色を利用して核を選択しましょう。以後の作業で間違ったときは、Reidai.tiff のウィンドウを閉じてください。保存はしなければ、間違った操作はファイルに反映されません。再度 Reidai.tiff を開き、再挑戦できます。図 1 のウィンドウのメニューバーから Image を選択し、開いたプルダウンメニューから Adjust を選択し、さらに開いたプルダウンメニューから Threshold を選んでください。このような操作を Image/Adjust/Threshold と表記します。図 3 のようなウィンドウが開きます。
- b. 画像には様々な強さのシグナルを持つピクセルが並んでいます。スライドバーを操作することで画像の中からどのような輝度のピクセルを選択するか決めることができます。

上のスライダーで輝度の下限値、上のスライダーで輝度の上限値を設定できます。

- c. スライダーの位置を操作して Threshold (閾値) を変化させましょう。画像の中で赤く表示された領域が、閾値を決めることで設定した範囲の中にある輝度をもったピクセルです (図 4)。下限値と上限値の間の輝度を持つピクセルが赤く表示されます。スライダーを動かして下限値を下げると赤く選択された領域が広がり、下限値を上げると赤く選択された領域が狭くなるのを確かめてみてください。
- d. ウィンドウの真ん中左よりのプルダウンメニューから、自動的に閾値を設定する方法を選択することも可能です。ここでいつも同じ方法を選択して閾値を設定することで再現性が担保されます。リストの中の様々な方法については <https://imagej.net/plugins/auto-threshold> を参照してください。高度な内容なので、理解する必要は当座ありません。
- e. 下限値を 94、上限値を 255 に設定してください。図 5 のような状態になります。
- f. 次に、赤く表示した領域を計測します。まずどのようなパラメタを計測するか設定します。図 1 のウィンドウから Analyze/Set Measurements を選択し、図 6 のようにチェックボックスを選択してください。Area を選択することで画像において赤く選択された領域の面積を計測する、という意味になります。
- g. 次に Analyze/Analyze Particles を選択してください。図 7 のようなウィンドウが開きます。Analyze Particles では、画像に存在する複数の選択範囲をまとめて一つのものとして扱うのではなく、別々の領域として、それぞれの領域の面積などを計測します。
- h. Analyze Particles のウィンドウで計測の条件を設定します。size の欄では計測する領域の大きさを選びます。試料を染色して撮影すると、ごみの混入などにより時折小さな輝点が見ることがあります。こうしたものは細胞核ではないと判断できるので測定しません (核ではないものを測定するときは慎重に排除しなくてはなりません)。今回は 30 平方マイクロメートル以上の大きさのものを計測するように設定しましょう。Size の欄を 30-Infinity としてください。30 平方マイクロメートルの大きさから無限大の大きさの領域を測定する、という意味になります。余裕があれば、100, 1000 など自由に大きさを変えてみてください。ウィンドウ下半分のチェックボックスは図 7 の通り選択してください。Exclude on edges は画像の端にかかっている領域は計測しないときに選択します。
- i. Analyze Particles のウィンドウで OK を押すと、ROI マネージャー (図 8) と Results (図 9) が表示され、画像の赤く表示された領域の周りに黄色または青い線が表示されるようになります (図 10)。ROI マネージャーは赤く表示して計測した範囲を管理するためのツールです。図 10 の画像には 1 から 16 までの番号が振られた赤い領域が表示されています。この一つひとつの領域と ROI マネージャーの左半分に表示された 16 個の選択肢が対応しています。ROI マネージャーの左半分で 001-0013 を選択してください。そうすると図 10 の画像の「1」とラベルされた赤い領域が選択され、領域の周囲の線が青くなっているのが確認できます。次に 002-0014 を選択すると画像の「2」の領域が選択されて領域の周囲が青くなっているのが確認できます。このように、一つひとつの

領域が別のものとして扱われているのがわかると思います。

- j. Results には 16 個の計測結果が並んでいます (図 9)。これらは ROI マネージャーと画像と番号で対応しています。Area の列には赤く表示された領域の面積がピクセルの数で表現されています。Min の列には領域内の輝度の最小値 (94 であることが多いことに気が付いたでしょうか)、Max の列には領域内の輝度の最大値が表示されています。Perim の列には赤い領域の周囲長が表示されています。RawIntDens には領域内の輝度の総和が表示されています。3 行目のデータは、図 10 で「3」とラベルされた領域を計測して得られたものです。9 行目、すなわち「9」とラベルされた領域と比べて Area の値が大きいたことが確認できたでしょうか？
 - k. Results の結果はコンピュータに保存することができます。Results ウィンドウ (図 9) の File/Save As を選択して適切なフォルダを選んで保存してください。ファイル名の末尾に“.csv”とつけてください。これでファイルの形式が csv 形式となります。
 - l. Results に表示された結果を並べなおしたり、画像ごとに整理したりするために、エクセルを使うことも可能です。複数の画像の計測結果をまとめるのにも有効でしょう。エクセルのファイルを保存する時は、csv 形式で保存してください。予習の後半で使用するためです。エクセルで表を作成し、csv 形式で保存する方法は各自知っているものと思います。
 - m. 二値化は簡単ではありません。「13」とラベルされた領域は二つの核があることに気づいたでしょうか？ こうした場合は、再度 Reidai.tiff を開いて、13 の二つの核がそれぞれ別の領域になるように Threshold (閾値) を設定して、13 の二つの核だけ再計測するか、全ての核を再計測するかします。二つの核だけ個別に二値かをやり直す場合は、そのことを記録して報告することで、恣意的な解析にならないよう、再現性が担保されるように気をつけます。
4. 円形度の測定

たとえば、細胞 7 の核の形と細胞 9 の核の形を比べると、細胞 7 の核が真円に近い形をしているのに対し、細胞 9 の核は楕円形に近いとの印象を受けます。このことを、定量的な測定によって検証してみましょう。

a. 円形度の測定

3.f~j において測定した Area (面積) と perimeter (周囲長) の値を用いて円形度を求めます。円形度は、面積を S 、周囲長を L とすると、 $\text{円形度} = 4\pi S/L^2$ と表せます。円の半径を r ですと、 $S = r^2\pi$ 、 $L = 2r\pi$ なので、真円の場合には円形度 $= 4\pi^2 r^2 / (2r\pi)^2 = 1$ となります。同じ L をもつ形の場合、 S が最大となるのは真円であるため、真円でなければ円形度は 1 より小さくなります。円形度が 1 に近ければ近いほど真円に近い形だということができます。たとえば、細胞 7、細胞 9 の核についてそれぞれ計測すると、細胞 7 の核の円形度 ~ 0.92 、細胞 9 の核の円形度が ~ 0.86 となり、細胞 7 の核の方が真円に近い形であることを確認することができます。

b. 楕円フィッティング

楕円フィッティングとは、任意の領域に内接する楕円を描くことで、その長軸および

短軸の長さ、また長軸の傾きの角度を計測することにより、領域の大まかな異方性とその方向性を計測する手法です。ImageJ では、Analyze/Set Measurements より Fit ellipse のチェックボックスを選択することで楕円フィッティングを行うことができます。Fit ellipse の計測結果は、Major (長軸長)、Minor (短軸長)、Angle (長軸の傾き) で表されます。このとき、Major/Minor の比率を取ることで、領域がどれくらい等方的な形であるのかを評価することができます。完全に等方的な形である場合には Major/Minor 比は 1 となりますが、異方的になればなるほど Major/Minor 比は大きくなります。たとえば、細胞 7 の核の Major/Minor 比は~1.19、細胞 9 の核の Major/Minor 比は~1.69 となることから、細胞 7 の核の方が等方的な形をしていることを確認することができます。

5. 細胞の位置関係の測定

細胞 7 と細胞 9 は姉妹細胞です。姉妹細胞がどの方向に分裂したか調べたいとき、どのような方法が考えられるのでしょうか。

a. 線分を用いた測定

細胞 7 の核から細胞 9 の核に ImageJ の line ツール (図 1 のウィンドウの左から 5 つ目のボタンを選択する) を用いて直線を引き、Measure (Ctrl+M) を行うと、計測結果として length (線分の長さ)、angle (線分の傾き) が得られます。なお、ImageJ では左から右に引いた水平線の角度が 0° 、右から左に引いた水平線の角度が 180° 、上から下に引いた垂直線の角度が -90° 、下から上に引いた垂直線の角度が $+90^\circ$ と表されることに留意してください。なお、二本の線分の相対角を考える場合には、線分の引き方によって $+30^\circ$ 、 -30° 、 150° 、 210° の計測結果が生じますが、どれも同じ意味となります。この場合、計測結果を $0^\circ \sim 90^\circ$ の間にそろえるためには、エクセルや R において ABS 関数を用いることにより、値を絶対値に変換すること、あるいは $\cos(+\phi) = \cos(-\phi)$ 、または $\sin(90-\psi) = \sin(90+\psi)$ であることを利用して、一旦角度を三角関数に変換し、それを逆三角関数 (arccosine、arcsine) を用いて角度に変換することが有効です。なお、エクセルや R においては、三角関数や逆三角関数で用いる角度はラジアンで表記します。このため、角度データから三角関数の値を求める際には、一旦 RADIANS 関数を用いて度数をラジアンに変換してから三角関数に値を代入する必要があります。同様に、逆三角関数で求めた角度はラジアンで表記されますが、これを DEGREES 関数を用いてラジアンを度数に変換することができます。R での角度や三角関数の扱い方は、後述します。

b. それぞれの領域の重心の座標と三角関数を用いた測定

Analyze/Set Measurements より Centroid のチェックボックスを選択することで、領域の重心の座標を測定することが出来ます。たとえば、細胞 7 の核の重心の座標は $(X_7, Y_7) = (26.646, 69.930)$ 、細胞 9 の核の重心の座標は $(X_9, Y_9) = (37.578, 97.801)$ となります。この時、細胞 7 の核と細胞 9 の核の間の距離 d は、三平方の定理を用いて、

$d = \sqrt{(X_9 - X_7)^2 + (Y_9 - Y_7)^2}$ と求めることができます。また、細胞7の核と細胞9の核の重心を結ぶ直線の傾き θ は、 $\tan \theta = (Y_9 - Y_7)/(X_9 - X_7)$ であることから、逆三角関数 (arctangent) を用いて $\theta = \arctan\{(Y_9 - Y_7)/(X_9 - X_7)\}$ により求めることができます。

6. R のインストール

- a. R は統計解析のためのフリーソフトウェアです。幅広い統計的手法を実行ためのパッケージが公開されていることから、生命科学の研究では広く利用されています。
- b. エクセルで統計解析を行うことも可能です。ただし、エクセルは普及していない国や地域もあり、R などのフリーで研究者であればだれでも使うことが可能なソフトウェアを使用できるようになることが望ましいでしょう。また、エクセルには過去に関数の間違いが報告されたこともあり、研究で使用するには注意が必要です。R のパッケージは研究者コミュニティの中でチェックされ続けています。間違いがあった場合も修正がソフトウェア全体ではなく、パッケージごとであるため、比較的迅速に修正がされています。
- c. R は <https://ftp.yz.yamagata-u.ac.jp/pub/cran/> から自分のコンピュータにあったインストーラをダウンロードしてください。
- d. R を起動してください。図 11 のようなウィンドウが開きます。>のマークの後ろにコマンドを入力します。<https://www.r-project.org/> などにコマンドなどの説明があります。参考にしてください。
- e. まず、グラフを書くためのパッケージをインストールします。`install.packages("ggplot2")` とタイプし、エンターキーを押して実行してください。以後の作業に必要な `ggplot2` というパッケージをインストールします。`ggplot2` については <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/index.html> に正式な記載があります。インターネットで検索することで、より簡単な解説や詳細な説明がありますので参考にしてください。
- f. `library(ggplot2)` とタイプし、エンターキーを押して実行してください。`ggplot2` を使用可能にします。
- g. `getwd()` とタイプして実行してください。これにより現在 R が使用している作業ディレクトリが表示されます。このディレクトリに先ほど保存した csv ファイルを移動させてください。この例の場合は、Results.csv というファイル名を付けたので、この後は Results.csv という名前を使って作業します。自分のつけた名前に置き換えてコマンドをタイプしてください。
- h. `list.files()` とタイプして実行し、Results.csv が表示されるのを確認したのちに、`x = read.csv("Results.csv")` とタイプして実行してください。""の中は自分がつけたファイル名を入れてください。
- i. この状態で x という変数に ImageJ の Results ウィンドウの中身が記録されています。x とタイプして実行すると、Results.csv の内容が R で表示されます (図 12)。x のような

データをデータフレームと呼びます。

- j. 次に R でデータフレームの中の情報を指定する方法を説明します。例えば、x というデータフレームの 2 列目、すなわち Area の列を指定したいときは `x[,2]` とタイプして実行します。すると、Area の列の情報が表示されます。 `x[1,]` を実行すると一行目の内容が表示されます。 `x[1,2]` と実行すると 1 行目の 2 列目のデータが表示されます。 `x[,2]` のように複数の値の集まったものを R ではベクトルと呼びます。
- k. このようにして、データフレームの中身から一部を取り出すことができるので、そのデータをグラフにすることができます。 `hist(x[,7])` と入力して実行すると、図 13 のようなヒストグラムが作成されます。 `hist()` がヒストグラムを作らせるコマンドです。 `x[,7]` というベクトルを使ってヒストグラムを作成させました。 `x[,7]` を `x[,2]` などに変えて、別のヒストグラムが表示されるのを確認してみましょう。
- l. 次に、核の面積と核の中にある輝度値の総和との間の関係を調べてみましょう。 `ggplot(x, aes(Area, RawIntDen)) + geom_point()` と入力して実行すると図 14 のような散布図が表示されます。“ggplot”に続くカッコの中の“x”はグラフを書くために使用するデータフレーム、“aes”のあとのカッコの中の“Area”と“RawIntDen”はそれぞれ X 軸と Y 軸を指定しています。ここまでのコマンドでグラフのデータと軸が定まったので、“+”とその後のコマンドでグラフの中に表示する形式を指定しています。“geom_point()”と指定することで、散布図が描かれます。 `geom_line()` と書けば折れ線グラフが表示されますし、他にもさまざまなグラフの形式を指定することができます。
- m. 次に、相関係数を用いて核の面積と核の中にある輝度値の総和との間の関係を定量的に評価してみましょう。 `cor.test(x[,2],x[,7])` と入力して実行すると図 15 のような結果が表示されます。 sample estimates: cor 0.9621227 と表示されているのが相関係数で、1 に近い値が得られています。自由度、t 値、95%信頼区間や相関係数などの説明については情報の教科書などを参考にしてください。
- n. 次に回帰分析をしてみましょう。核の中の輝度値の総和を核の大きさを説明できるか調べます。回帰分析については教科書などを参考にしてください。目的変数 Y を RawIntDen、説明変数 X を Area とします。このとき X と Y の関係を $Y = aX + b$ というモデルで説明できると考え、a と b の二つの係数を推定します。 `res=lm(x[,7] ~ x[,2])` と入力して実行すると R は a と b を推定し、その結果を res という変数に格納します。次に `summary(res)` と入力して実行し、res に格納した結果を確認します (図 16)。
- o. 図 16 のように結果が表示されます。Coefficients の欄を見てください。Intercept の行で Estimate とあるのが $Y = aX + b$ のモデルを立てた場合の b の推定値です。Std. Error の下にあるのが標準偏差です。t value と Pr(>|t|) は、a と b の値が 0 であるという帰無仮説の元での t 値と p 値です。 `x[,2]` の行では Estimate が a の推定値です。有意水準を 0.05 とした場合、b が 0 である可能性を否定できないのにたいして、a は 0 ではない、と判断できることがわかります。
- p. Multiple R-squared に決定係数が示されています。F-statistics とそれに続く p-value がモデル全体の評価に使われます。

- q. 重回帰分析を行う場合は、 $\text{res} = \text{lm}(x[,7] \sim x[,2] + x[,3])$ のように、説明変数を増やしてください。自分でも重回帰分析を試みてください。文部科学省の高等学校情報科「情報II」教員研修用教材(本編)の第3章の前半、第13章に重回帰分析の説明がありますので適宜参照してください。

https://www.mext.go.jp/a_menu/shotou/zyouhou/detail/mext_00742.html

- r. Rで三角関数を使う際は、 $\cos()$ 、 $\sin()$ 、 $\tan()$ などのコマンドを使用します。括弧の中には角度を弧度法(ラジアン)で入力します。ある箇所の角度が度数法で60度の場合、 $a = 60 * \pi/180$ と実行するとaという変数の中に60度をラジアンに変換した数値が代入されます。 $\cos(a)$ と実行すると度数法で60度の角のcosineが計算できます。逆三角関数は $\text{acos}()$ 、 $\text{asin}()$ 、 $\text{atan}()$ などのコマンドを使用し、たとえば $\text{acos}(0.5)*180/\pi$ と実行させると60と返ってきます。
- s. 絶対値を計算させるにはabs関数を使います。 $\text{abs}(-3)$ と実行すると3と出力されます。
- t. 5のbで行ったようなCentroidの間の距離の計算は、 $\text{sqrt}((x9 - x7)^2 + (y9 - y7)^2)$ とすれば計算できますし、 θ を求めるためには、 $\text{atan}((y9 - y7)/(x9 - x7))$ と実行すると計算できます。
- u. 度数法での角度を弧度法に変換した結果や、絶対値、三角関数を計算した結果をデータフレームに納めたい時の方法を説明します。先ほどのデータフレームxが3行、7列のデータフレームで、7列目に角度の情報が度数法で入っているとします。まず、 $x7 = x[,7]$ と実行して、7列目の結果を選択します。次に $x8 = \cos(x7 * \pi/180)$ とすると、7列目の角度をラジアンに変換したベクトルが作成されます。次に $\text{cbind}()$ というコマンドを使って、xにx8の結果を格納します。 $x = \text{cbind}(x, x8)$ と実行するとxの8列目に計算結果が追加されます。xと実行するとxの中身を見ることができ、計算結果が追加されていることが確認できると思います。

以上でFIJIImageJとRの説明を終了します。より詳しい解説や、上記以外の操作については適宜オンラインの説明や書籍を参照してください。

お知らせの図

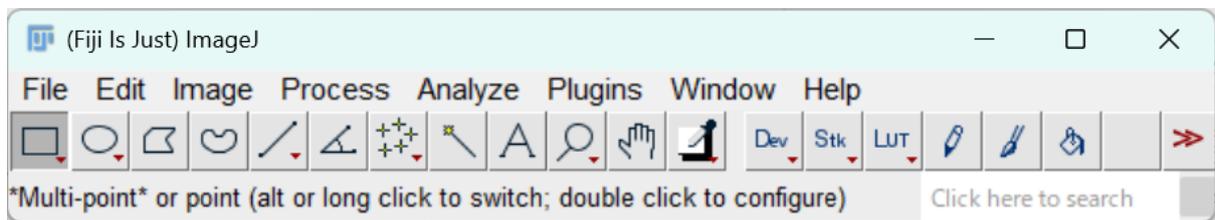


図 1 : FIJI を起動したときに表示されるウィンドウ

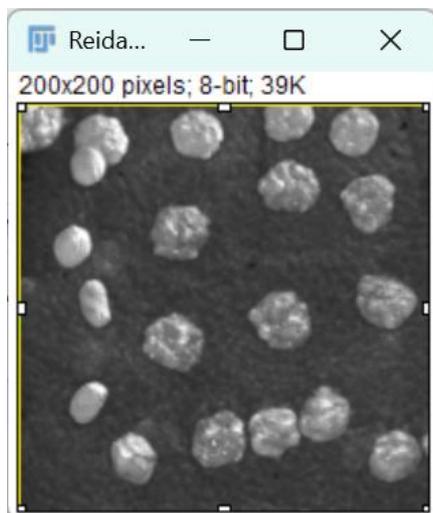


図 2 : FIJI で配布された画像を開くと表示されるウィンドウ

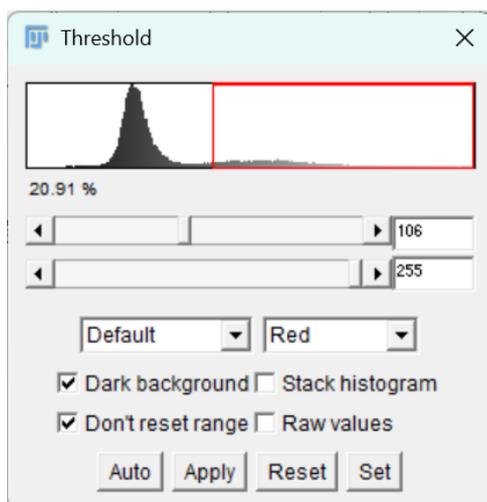


図 3 : Threshold を設定するためのウィンドウ

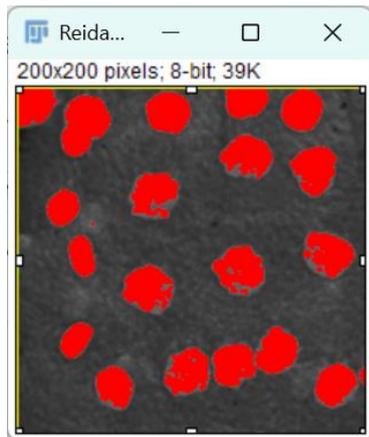


図 4 : Threshold を操作して画像の一部を選択した状態

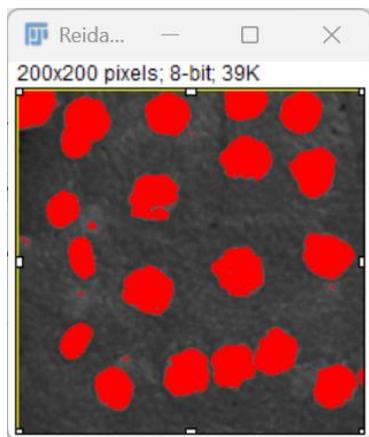


図 5 : 閾値を 94 - 255 に設定した後の画像

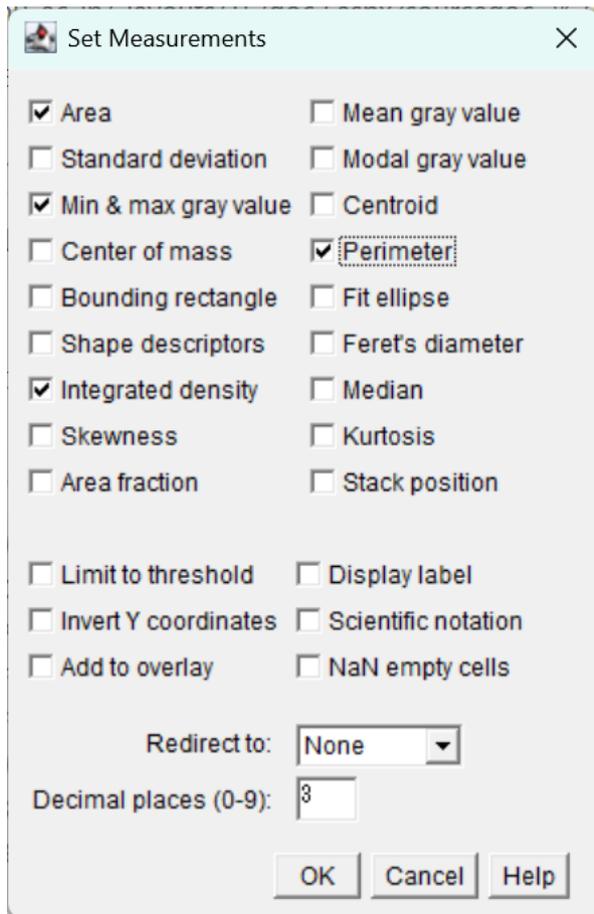


図 6 : Set Measurements のウィンドウ

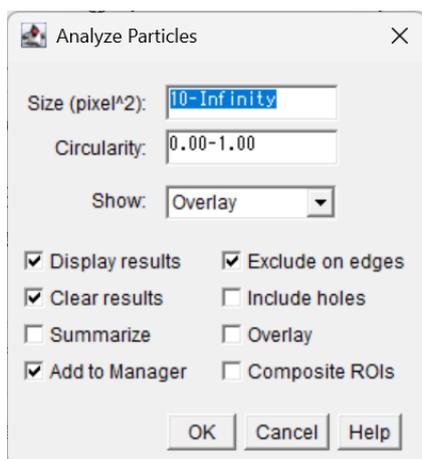


図 7 : Analyze Particles のウィンドウ

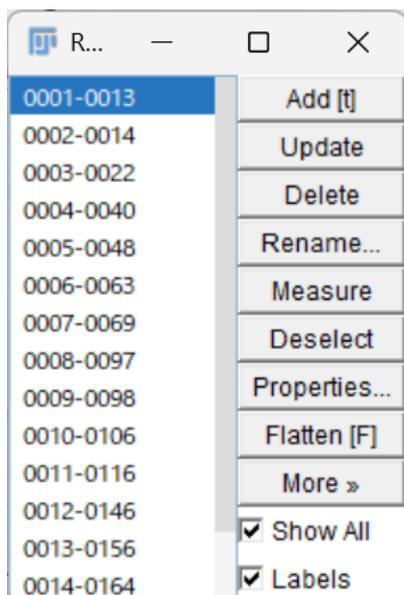


図 8 ROI マネージャーのウィンドウ

The screenshot shows a window titled 'Results' with a table of ROI data. The table has columns for File, Area, Min, Max, Perim., IntDen, and Ravg. The data is as follows:

File	Area	Min	Max	Perim.	IntDen	Ravg
11	599	94	231	96.225	80205.000	802
12	266	94	255	62.426	40183.000	401
13	984	94	236	166.853	141675.000	141
14	543	94	248	92.083	69993.000	699
15	464	94	228	84.083	63391.000	633
16	404	94	255	79.740	62293.000	622

図 9 結果を表した Results ウィンドウ

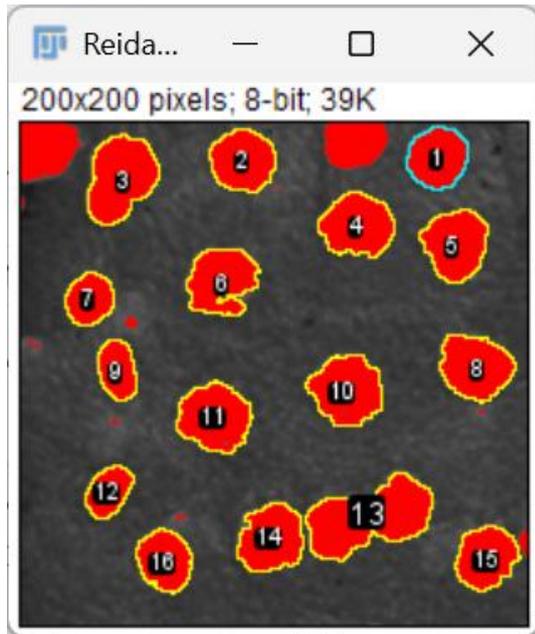


図 10 Analyze Particles を行った後の画像

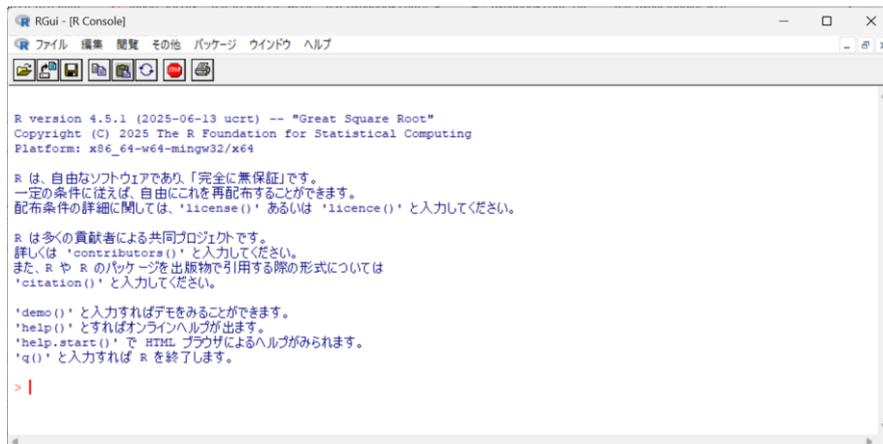
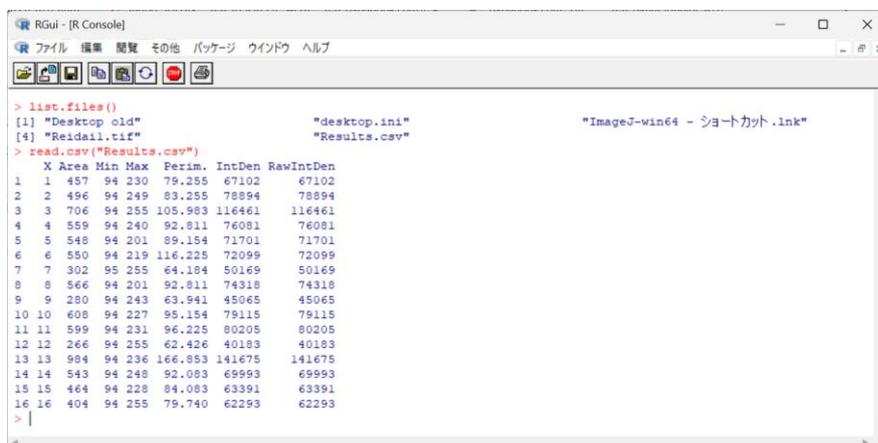


図 11 : 起動時の R の画面




```
RGui - [R Console]
ファイル 編集 閲覧 その他 パッケージ ウィンドウ ヘルプ
> res = lm(x[,7] ~ x[,2])
> summary(res)

Call:
lm(formula = x[, 7] ~ x[, 2])

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-7353  -6187  -1162   3913  16774

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  2921.67    5684.69   0.514   0.615
x[, 2]       137.06     10.38  13.205 2.71e-09 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 7043 on 14 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9257,    Adjusted R-squared:  0.9204
F-statistic: 174.4 on 1 and 14 DF,  p-value: 2.713e-09

> |
```

図 16 : 回帰分析の結果