

ハイパースペクトルイメージングと画像解析による 微細藻類モニタリングシステムの開発

大貫慎輔¹, 大田修平^{1,2}, 河野重行³, 大矢禎一¹

¹ 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻

〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5 東京大学 新領域生命棟 101

² 国立環境研究所生物・生態系環境研究センター

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

³ 東京大学フューチャーセンター推進機構 〒277-0871 千葉県柏市若柴元堂 178-3

Shinsuke Ohnuki¹, Shuhei Ota^{1,2}, Shigeyuki Kawano³, and Yoshikazu Ohya¹

Research and development of the monitoring system for micro algae by the image analysis and the hyperspectral imaging techniques

Key words: Image analysis, Hyperspectral imaging, Machine learning, *Haematococcus pluvialis*, Astaxanthin

¹ Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

² Center for Environmental Biology and Ecosystem Studies, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki, 305-8506, Japan

³ Future Center Initiative, The University of Tokyo, Wakashiba, Kashiwa, Chiba, 277-0871, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10b6.00159

1. はじめに

微細藻類は食品に利用されているほか、近年はバイオ燃料の生産も期待されている。単細胞緑藻類である *Haematococcus pluvialis* はその一つであり、赤い色素であるアスタキサンチンを細胞内に蓄積する(Kobayashi et al., 1997)。アスタキサンチンには高い抗酸化作用があり、健康食品や化粧品などに利用されているが生産コストが高く、アスタキサンチン生産効率の向上のためには培養条件の最適化および適切な性質を持った *H. pluvialis* の育種が不可欠である。そこで本研究では、*H. pluvialis* の生育状況をモニターするシステムを開発した(Ohnuki et al., 2013)。本システムは、RGB (赤・緑・青) カラー明視野顕微鏡画像から細胞形態を25の観点で定量する画像解析部と、定量した25の形態情報から生育状況を抽出する多変量解析部からなる。本システムでは培養中の *H. pluvialis* において、(1)アスタキサンチンの量の推定、(2)遊走子の判定、および(3)細胞形態の経時変化の把握が可能である。さらにハイパースペクトルカメラと組み合わせることによって、150色のスペクトル画像からアスタキサンチンだけでなくクロロフィルやルテインおよびベータカロテンの細胞内分布を高い精度で定量化することが可能になった(Nogami et al., 2014)。本稿では、画像解析部のアルゴリズムを解説し、最近の研究例や他の微細藻類への応用例を紹介する。

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-1

2. *H. pluvialis* の産業利用と生活環

H. pluvialis は緑藻で普段緑色をしているが、強光などのストレスによって色素を蓄積し、赤色に変化する(Kobayashi et al., 1997)。この赤色の色素は主にカロテノイドの一種であるアスタキサンチンである。アスタキサンチンは基礎化粧品や健康食品などに利用されており、抗酸化性の機能性色素として注目を集めている。アスタキサンチンの生産には、*H. pluvialis* が利用されており、アスタキサンチンを高蓄積する培養条件などの研究は数多くあるものの、基礎的知見については十分であるとは言い難い。

H. pluvialis は富栄養などの好条件で胞子を形成し分裂増殖した後、発芽して鞭毛細胞を形成する一方で、飢餓や強光などのストレス環境でアスタキサンチンを蓄積したシスト細胞へと変化する(Wayama et al., 2013)。培養液中で細胞形態や色素量は変化するため、生産管理だけでなく生理学的な研究においても、細胞の特徴を測定することは重要である。本研究では、このように様々な細胞の状態をモニターすることが可能な画像解析システムの開発を行った。

3. 画像解析による微細藻類のモニタリングシステム

本研究で開発したモニタリングシステムは、画像解析部と多変量解析部によって構成されている。画像解析部は更に、顕微鏡画像から細胞の形状を認識し計測する技術(画像解析プログラム HaematoCalMorph)と、可視光領域のスペクトル情報をピクセルごとに計測するハイパースペクトルイメージング技術によって構成される(図1)。第3章では、細胞の認識と形状を計測するアルゴリズムに焦点を当てて解説する。ハイパースペクトルイメージング技術については第4章で解説する。



図1. 微細藻類モニタリングシステムの概要

本システムは、画像解析部と多変量解析部によって構成される。画像解析技術とハイパースペクトルイメージング技術そして多変量解析技術の3つの技術を組み合わせ開発した。

3-1. 画像解析プログラム HaematoCalMorph

画像解析部のうち、顕微鏡画像中の細胞を認識し細胞の形態を計測する部分は、Java ベースのプログラムである HaematoCalMorph が担う(Ohnuki et al., 2013)。本項では HaematoCalMorph の画像解析アルゴリズムについて解説する(図2)。

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-2

HaematoCalMorph は、まず入力された RGB カラー画像 (図 2 A) を各チャンネル (図 2 B-D) に分離しノイズ除去などの前処理を行う。その後、輝度勾配の急激な変化に基づいて、輝度の局所的な境界線 (図 2 E) と大域的な境界線 (図 2 F) をそれぞれ Canny 法(Canny, 1986)と二値化で検出し、細胞の境界線を絞り込んで画像を各領域に分割する (図 2 G)。

次に、分割した領域から細胞領域を検出する (図 2 I-J, 図 3)。入力画像の赤チャンネル (図 3 A) を Canny 法で検出した境界線で分割 (図 3 B) すると、細胞内の輝度は暗くばらついていてのに対して、背景の輝度は明るく均一であることがわかる (図 3 C)。そこで、各領域の輝度の平均 (図 3 D) と分散 (図 3 E) を計算すると、それぞれの領域が背景か細胞かを判別する指標となる (図 3 F)。つまり、輝度の平均値と分散で二次元展開すると (図 3 G)、平均値が大きく分散が小さいほど背景で、平均値が小さく分散が大きいほど前景 (=細胞領域) に相当し、この間に閾値を設定することで背景と細胞領域を判定している。

閾値などは、偽陽性をなるべく抑えるように調整した。判定精度を測定するために、32 枚の顕微鏡画像を HaematoCalMorph で解析した結果と、目視により判定・分類した結果を突き合わせた。その結果、HaematoCalMorph が細胞と判定した 245 領域中の、目視でも細胞と判定された割合 (陽性的中率) は 99%と非常に高く、目的にかなったものができた。一方で、目視で判定した 625 細胞中の、HaematoCalMorph が正しく細胞として認識した割合 (認識率) は 61%であった。正しく認識できなかった細胞の殆どはピントが外れている細胞や、胞子または凝集細胞であった。

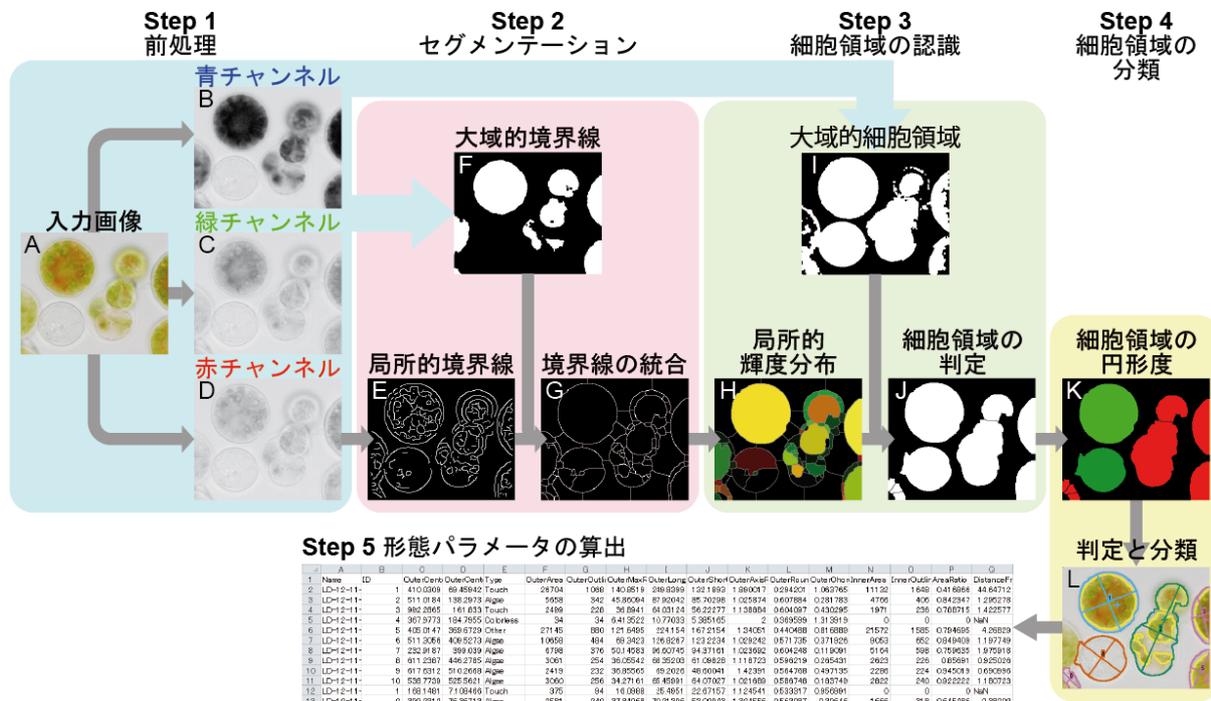


図 2. HaematoCalMorph における画像処理のフローチャート

画像処理のプロセスは 5 つのステップに分けられる。A~L の画像はそれぞれ、(A)入力されたカラー画像、(B)入力画像の青色チャンネル、(C)入力画像の緑色チャンネル、(D)入力画像の赤色チャンネル、(E)Canny 法によ

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-3

て検出された局所的境界線, (F)大域的輝度分布の二値化によって検出された色素領域, (G)局所的境界線 E と大域的境界線 F を統合して得られた境界線, (H)各領域の輝度の平均値と分散 (緑: 低輝度, 赤: 高分散), (I)大域的輝度分布の二値化により推定されたおよその細胞領域, (J)局所的輝度分布 H と大域的細胞領域 I を統合して判定された細胞領域, (K)各細胞領域の円形度 (緑: 高円形度, 赤: 低円形度), (L)各細胞領域を分類して色分けされた出力画像。

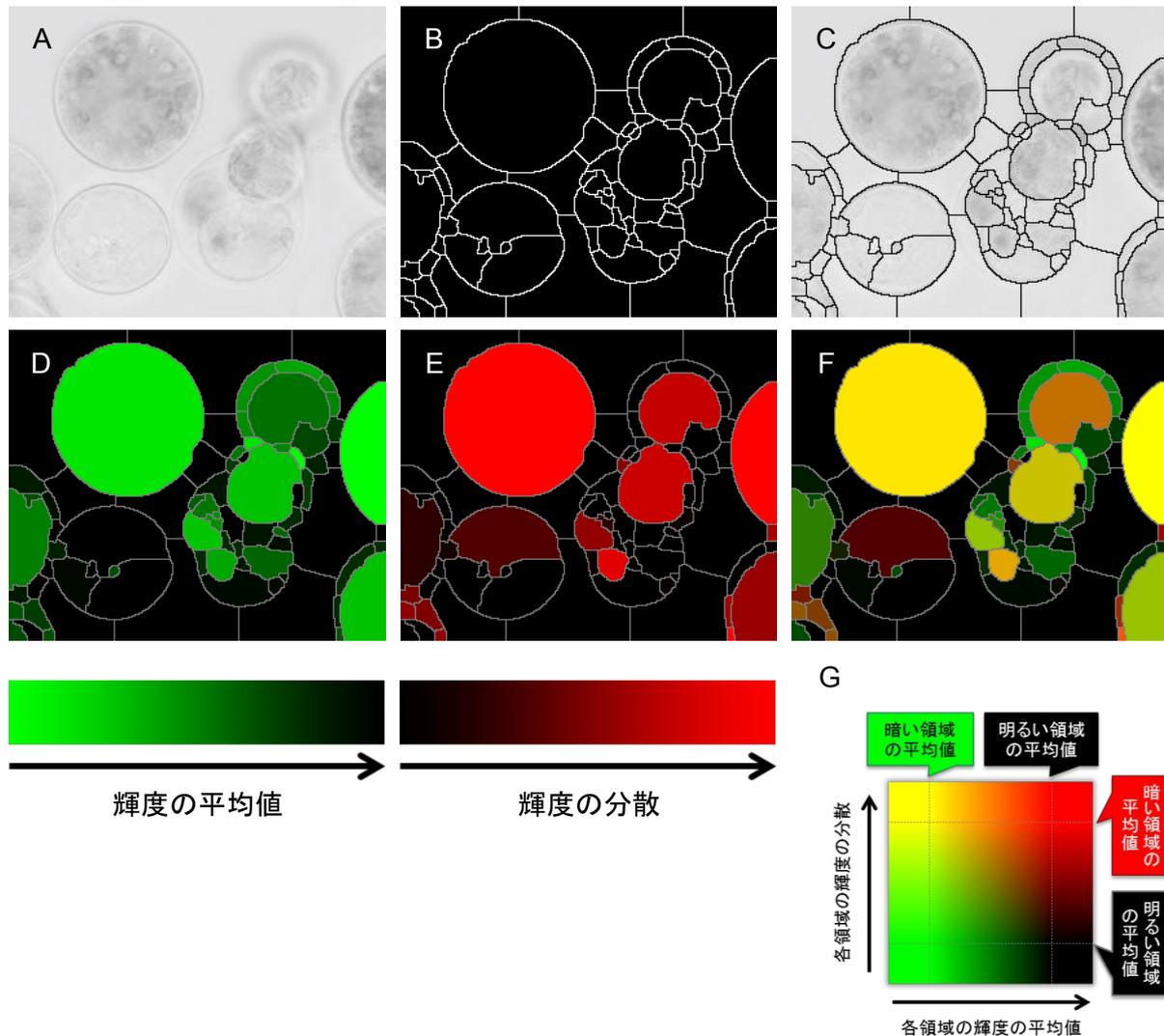


図 3. 細胞領域の判定アルゴリズム

(A) 入力画像の赤チャンネル, (B)赤チャンネル画像から検出された境界線, (C)赤チャンネル画像と境界線の重ね合わせ画像, (D)各領域の輝度の平均値のヒートマップ, (E)各領域の輝度の分散のヒートマップ, (F)各領域の輝度の平均値と分散ヒートマップの重ね合わせ画像, (G)輝度の平均値と分散の二次元展開図。

細胞の領域が判定できたら、HaematoCalMorph は各細胞領域を分類し、細胞ごとに特徴量を計測して出力する (図 2 K-L, 図 4)。HaematoCalMorph は個々の細胞を 4 つのカテゴリに分類する。まず、色素領域がある丸い細胞を Algae (図 4 水色)、色素領域がない細胞を colorless (図 4 赤色) として分類する。次に、凝集や胞子形成によって、輪郭が円形でない領域は other (図 4 緑色) として分類し、解析対象から外す (図 4)。画像の縁に接している細胞も正しい測定ができないので touch (図 4 紫色) と分類し、最後に HaematoCalMorph は個々の細胞の形態やピクセル輝度値などを測定し、サンプルごとに平均値や個数に集計して出力する (図 2 Step 5)。現在のバージョンでは、およそ 55 種類の特徴量を出力するが、モニタリングの実証実験には主にサンプルごとの平均値である 25 パラメータを使用している (表 1)。

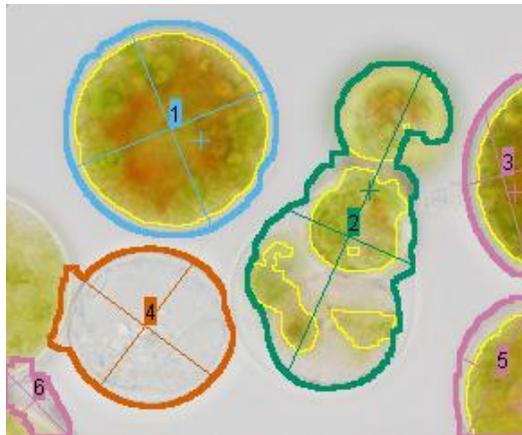


図 4. HaematoCalMorph による細胞領域の分類

HaematoCalMorph は細胞領域を 4 種類に分類し、色分けして表示された画像を出力する。

水色：緑藻細胞 (Algae)

赤色：無色の細胞領域 (colorless)

緑色：その他の細胞領域 (other)

紫色：画像の端に触れている細胞領域 (touch)

表 1. HaematoCalMorph が出力する形態パラメータの内訳

カテゴリ	個々の細胞の値	サンプル毎の平均値	合計
形態情報	13	13	26
色素情報	12	12	24
細胞数	-	5	5
合計	25	30	55

3-2. 画像解析によるモニタリングシステムの実証実験

HaematoCalMorph を使用して微細藻類の生育をモニターできるかどうか調べるために、*H. pluvialis* を 25°C で培養し、12 時間ごとに 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の明るさで光を照射する明暗(LD)条件と、24 時間明るいままの明明(LL)条件の 2 つの条件で培養した。これを 2 週間続けて経時的にサンプリングし、細胞数と色素量および顕微鏡画像を取得した。

得られた形態データのダイナミクスを調べるために、主成分分析を行ったところ、累積寄与率 51% で第一主成分が時間依存的変化を示し、しかもこれは LL 条件と LD 条件で異なっていた (図 5 A)。時間依存的に変化する形態的特徴としては、長軸の長さや細胞の大きさなどがあつた (図 5 B-D)。また緑色の色素は LL 条件と LD 条件で異なっていた (図 5 C)。これらのことから経時変化と条件依存的変化の特徴を捉えることが可能であることがわかった。

次に機械学習による遊走子の判別と追跡を行った。接種後 2 日程度たった細胞には、遊走

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-5

子の他に、鞭毛が消失して運動性を失ったパルメロイド細胞も観察された。遊走子はサイズが小さく細長い傾向があるので、この特徴を捉えられるかどうか形態データと機械学習を組み合わせて遊走子の判別を試みた。平均値の 25 パラメータ全てを使用してランダムフォレストを行ったところ約 90% の高い精度で遊走子を判別し追跡することができた (図 5 E)。

最後に、重回帰による色素量の測定を行った。DMSO で抽出する従来法と RGB 輝度の重回帰で検量線を描いたところ、決定係数 0.975 の高い精度で色素量を測定することができた (図 5 F)。これらの結果から、HaematoCalMorph を使用して微細藻類の生育をモニターできることがわかった。

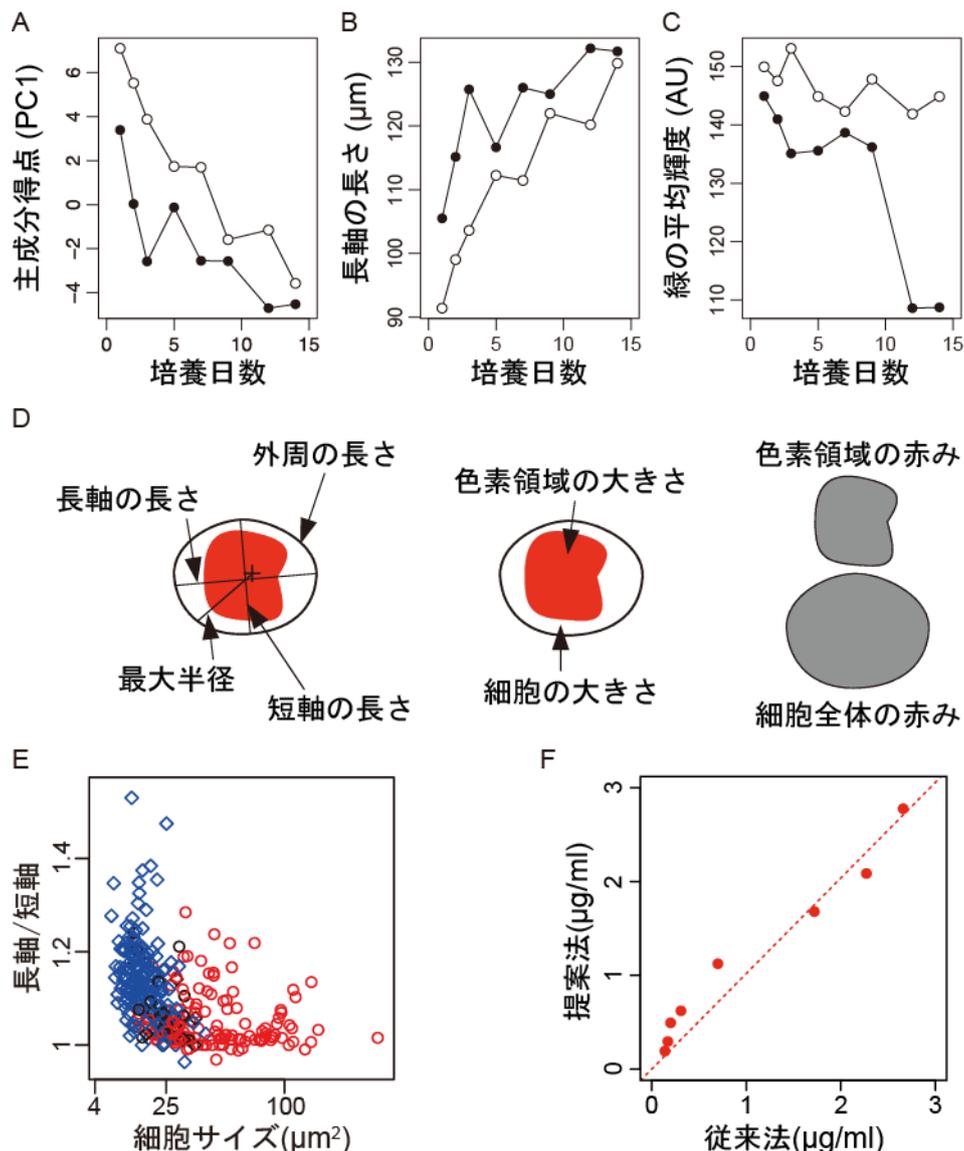


図 5. HaematoCalMorph による微細藻類モニタリング

(A)主成分分析によって得られたPC1得点と培養日数の関係。黒丸はLD、白抜丸はLLを示す。(BとC)長軸の長さ(B)と緑の輝度の平均値(C)と培養日数の関係。(D)PC1と主成分負荷量0.95以上の強い相関があった形態パラメータの模式図。楕円は細胞を表し、赤い領域は細胞内の色素領域を示す。

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-6

細胞内の十字は細胞の中心を表す。(E)ランダムフォレストによる遊走子の判別。341 細胞の形態データ 25 パラメータを学習データとして使用してランダムフォレストで分類器を作成し、得られた分類器で同数のテストデータを分類した結果を示す。ひし形と白抜き丸はそれぞれ遊走子とパルメロイド細胞（またはシスト細胞）を示す。(F)クロロフィルとカロテノイドの含有量の推定。決定係数 $R^2 = 0.975$ 。

3-3. 画像解析プログラムの他の微細緑藻への応用

緑藻は緑から赤色を呈することから青色から緑色の波長に光の吸収帯を持つが、HaematoCalMorph は色素による影響の少ない赤色の波長の画像をベースにして細胞を認識するため、HaematoCalMorph の画像解析アルゴリズムは *H. pluvialis* 以外の単細胞微細藻類に応用可能である。例えば *Parachlorella kessleri* への応用例では、撮影環境に由来するノイズを除去する修正を加えるなどの最小限の調整のみで、細胞を認識することができた (図 6)。現行バージョンの HaematoCalMorph は円形度を測定して丸い細胞のみを形態計測の対象にしているため、細胞集団を形成する藻類や円形でない藻類には向かないが、これらは計測する対象の形状パターンを円形以外の適切な形に修正することによって対応可能となる。

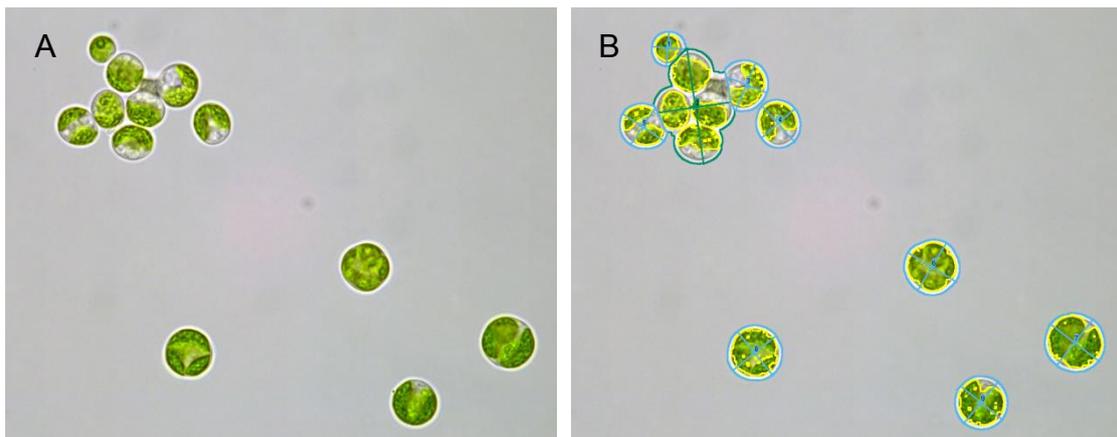


図 6. *Parachlorella kessleri* の顕微鏡画像解析

(A) 画像解析前の顕微鏡写真。(B) 画像解析後の顕微鏡写真。細胞の分類による色分けの凡例は図 4 と同じ。

4. ハイパースペクトルイメージングによる細胞内色素の含有量と分布の推定

H. pluvialis が産生するカロテノイドはアスタキサンチンだけではない。例えば、アスタキサンチンはベータカロテンから生合成され、ベータカロテンはリコピンから生合成される。またリコピンからはルテインも合成される(Lao et al., 2017)。そこで、私たちはこれらの他の色素や細胞内の蓄積状態も詳細にモニタリングするために、ハイパースペクトルイメージング技術と画像解析技術を組み合わせた。

ハイパースペクトルイメージングでは、対物レンズとカメラの間に分光器を挟むことで二次元の顕微鏡画像を分光し、光の波長ごとに顕微鏡画像を取得することが可能である (図 7)。

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-7

二次元の顕微鏡画像を同じ視野で可視光の波長 1 nm ごとに取得すればキューブ状の画像が得られる。この大きな画像データを画像解析技術と組み合わせることで *H. pluvialis* の細胞の波長情報をより詳細に解析する画像解析システムを開発した。



図 7. ハイパースペクトル顕微鏡

本研究で使用したハイパースペクトル顕微鏡は、通常の正立顕微鏡と CCD カメラの間に液晶チューナブルフィルター(LCTF)を挟むだけの簡単な構造である。LCTF は USB で PC に接続され、画面上から透過する波長を 1 nm 単位で指定可能である。透過させる波長を一定時間で連続的に変化させながら、同じタイミングでカメラのシャッターを切る仕組みは、Micro-Manager で LCTF と CCD カメラを同時に制御することによって実現した。

開発したシステムは、取得したハイパースペクトル画像から直接ピクセルごとの含有色素量を測定する。次に HaematoCalMorph で細胞領域を認識する。これにより細胞ごとの色素量と形態を定量する。そして最後に培養液全体の色素量を推定する。つまり、ピクセルレベル、細胞レベル、培養液レベルで色素量を推定することが可能である。

4-1. 色素量の推定法

ピクセルレベルで色素量を推定する場合、得られた画像中の各ピクセルが持つ吸光スペクトル情報に対して、各色素(アスタキサンチン、ベータカロテン、ルテイン、クロロフィル a, クロロフィル b)のモル吸光係数を説明変数とする重回帰分析のモデル式を使用して non-negative least square (Lawson and Hanson, 1995) という拘束条件付きの最小二乗法で近似する。各色素のモル吸光係数は、予め精製標品を使用して吸光スペクトルを取得した(図 8 右下図)。例えば図 8 (左上画像の黄点) に示すピクセルにおいて得られた吸光スペクトル(図 7 左下図)を使用した場合、アスタキサンチンはモル吸光係数の 0.008 倍、ベータカロテンはゼロ倍、ルテインはゼロ倍、クロロフィル a は 0.009 倍、クロロフィル b は 0.005 倍という係数が求まり、これらを全て足すことで、観測したスペクトルを近似することができる(図 7 左下図, 太実線)。これによって得られた係数が、図 8 のピクセル(黄点)における各色素の相対濃度である。同様の解析を全てのピクセルについて行うことで、色素の分布を濃淡で知ることができる(図 8 上段)。本法で得られる色素量が実際の色素量と相関があるかどうか調べるために、培養液レベルの色素濃度を計算し、DMSO 抽出したアスタキサンチンとクロロフィル a および b の色素量と比較したところ、決定係数 R^2 はそれぞれ 0.94, 0.94, 0.88 となり、高い精度で推定できることがわかった。

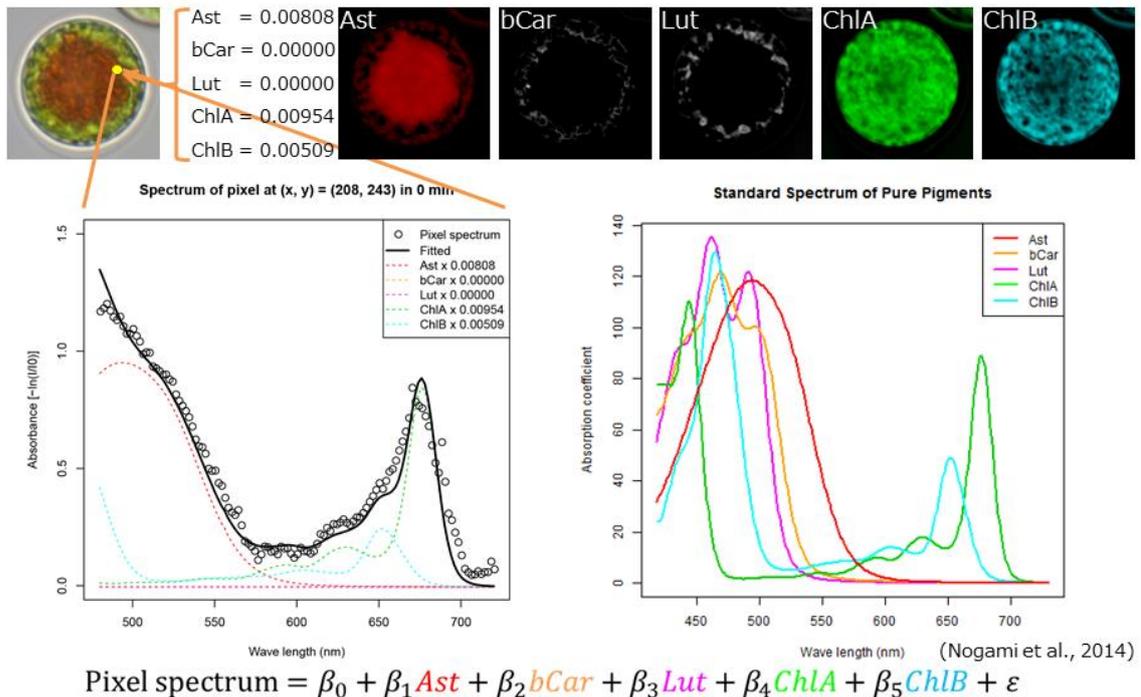


図 8. ハイパースペクトル画像による細胞内色素分布の推定

Ast, bCar, Lut, ChlA, および ChlB は、それぞれアスタキサンチン、ベータカロテン、ルテイン、クロロフィル a、クロロフィル b を示す。上段の色素分布は、各ピクセルで推定された色素の相対濃度を表すグレースケールのヒートマップを疑似カラーで着色した。

4-2. 培養中の細胞の色素量の変化

ハイパースペクトル画像を使用して、微細藻類の生育をモニターできるかどうか調べるために、培養中の細胞における各色素の経時変化を追跡した (図 9)。その結果、クロロフィルは接種後すぐに減少し、その後 3 日で回復した。これは遊走子の出現と関連していた。また、アスタキサンチンも接種後すぐに減少し、その後 2 週間程度で回復した。これはシスト細胞の出現と関連していた。ベータカロテンとルテインは特に LL 条件でほぼゼロであった。これは、アスタキサンチンやルテインの生産に必要なリコピンがアスタキサンチンを生産するために消費されたためではないかと考えられた。これらのことから、ハイパースペクトル画像を使用して、微細藻類の生育をモニターできることがわかった。

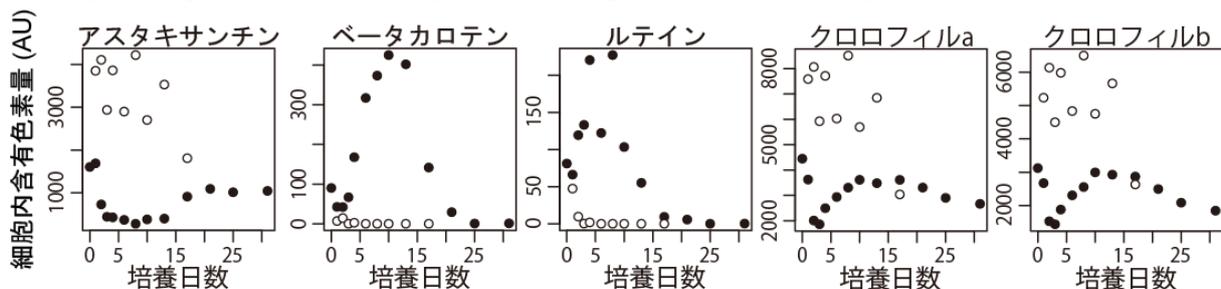


図 9. 細胞内色素含有量の経時変化

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-9

LD 条件と LL 条件で培養した細胞を経時的にハイパースペクトルカメラで撮影し、アスタキサンチンとベータカロテン、ルテイン、クロロフィル a およびクロロフィル b の色素量を **non-negative least square** で推定した。黒塗丸と白抜丸はそれぞれ LD と LL を示す。

次に、様々な細胞のアスタキサンチンとクロロフィルの比の分布を観察した (図 10)。緑色の細胞はゼロ付近にピークがありアスタキサンチンが少ないことがわかった。遊走子では比の分布で値が大きい細胞が少数あることがわかり、遊走子の一部にはアスタキサンチンが局在している細胞があった。中間体は明るい部分と暗い部分が混在し、アスタキサンチンとクロロフィルの比の分布に二峰性がみられた。シスト細胞はゼロ以外の場所にシャープなピークが観察され、アスタキサンチンが均一に分布していた。これらのことから、細胞内の色素分布は細胞の状態によって異なることがわかった。

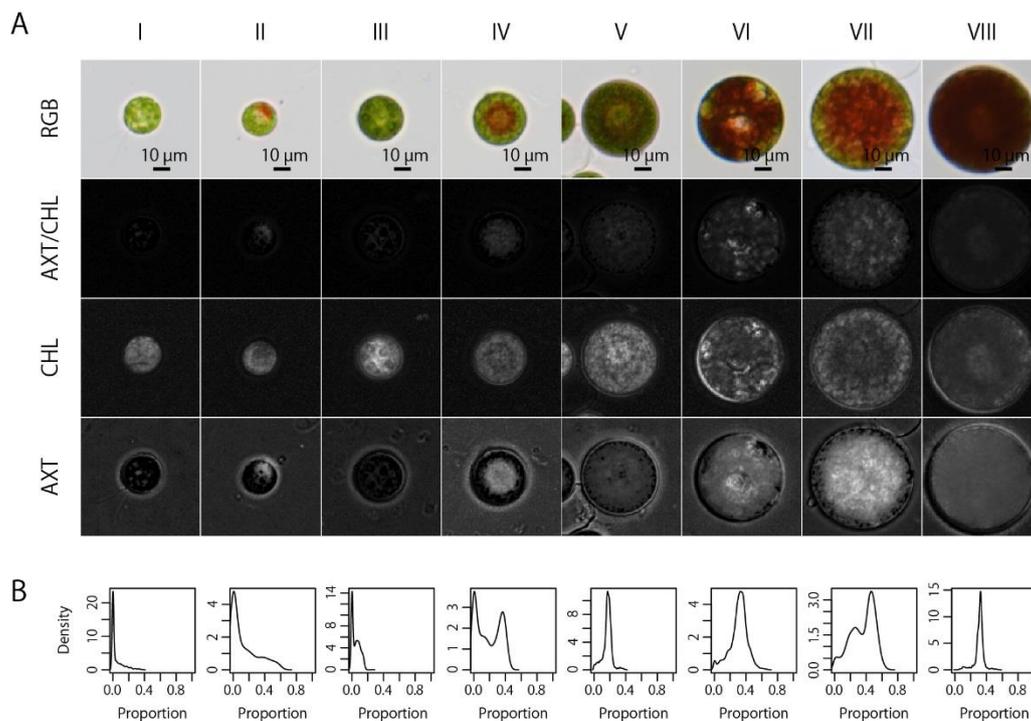


図 10. アスタキサンチンとクロロフィルの細胞内における分布

(A) 様々な状態の *H. pluvialis* 細胞。アスタキサンチン(AXT)とクロロフィル(CHL)の細胞内部分と比(AXT/CHL)をグレースケールで示す。遊走子(IとII)、緑色パルメロイド細胞(IIIとIV)、中間細胞(VとVI)およびシスト細胞(VIIとVIII)を示す。(B) AXT/CHL の密度分布。

4-3. 細胞内におけるアスタキサンチンの挙動

赤い色素が細胞の中心付近に局在している中間細胞を明条件下におくと、約 10 分で赤い色素が中心から全体に広がり、シスト細胞を暗条件下におくと、約 30 分で赤い色素が中心に局在し、アスタキサンチンを含む赤い色素の細胞内分布は 10 分~30 分で劇的に変化する (Ota

et al., 2018)。そこで各時間点において細胞をハイパースペクトルカメラで撮影し、色素分布を観察したところ、クロロフィルの分布は殆ど変化していなかったが、アスタキサンチンの分布は劇的に変化していた (図 11)。

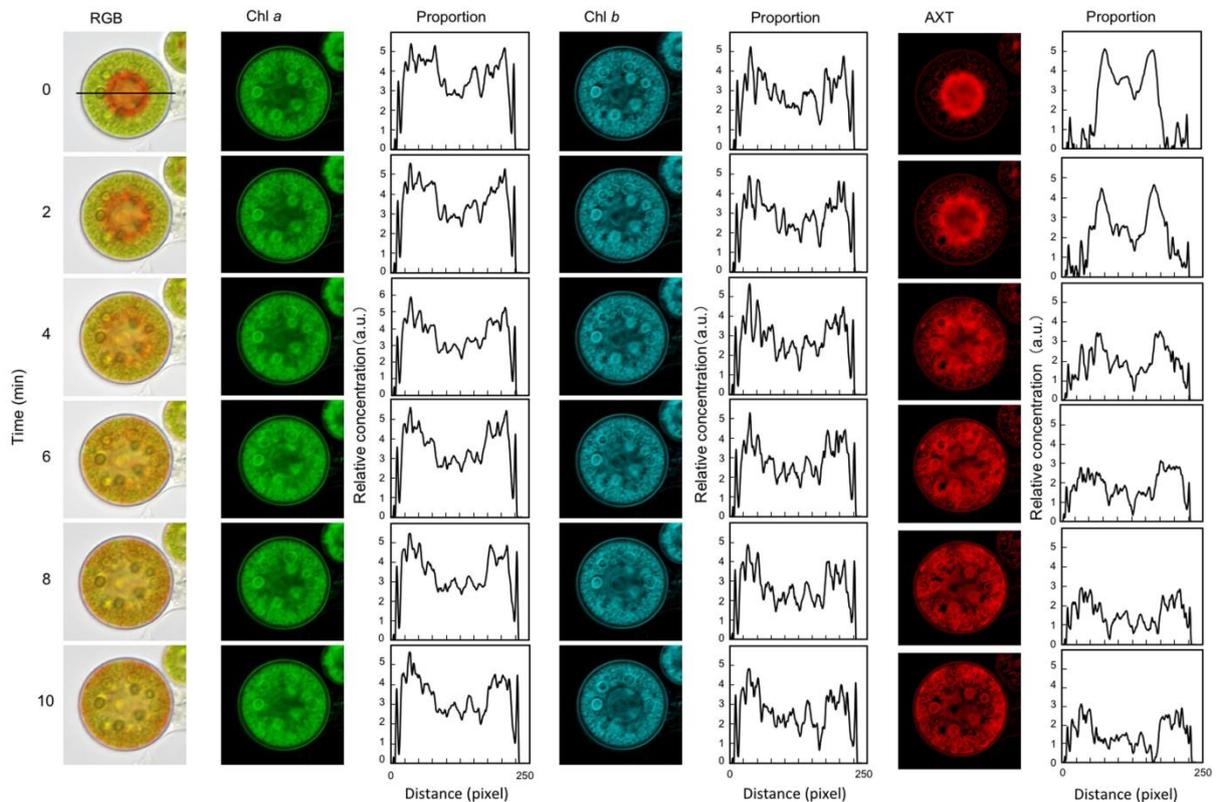


図 11. 細胞内のクロロフィルとアスタキサンチンの動態

顕微鏡画像と相対濃度の分布は 2 分間隔で縦に並べた。相対濃度の横軸は細胞の中央付近における画像上の位置を示す。RGB と Chl a, Chl b, および AXT は、それぞれカラー顕微鏡画像とクロロフィル a の色素分布、クロロフィル b の色素分布およびアスタキサンチンの色素分布。

アスタキサンチンの局在変化には、二つの仮説が考えられている。一方は葉緑体とともに運ばれる可能性(仮説 1)と、もう一方は油滴とともに運ばれる可能性(仮説 2)である(Peled et al., 2012)。本研究では、クロロフィルの分布に変化がなかったことから、仮説 1 は支持されなかった。一方で、仮説 2 については、潰すと赤い油滴が出てくる (図 12A) ことや、蛍光顕微鏡による油滴とアスタキサンチンの共局在の観察 (図 12B) から、仮説 2 が支持された。また、ルテインとベータカロテンはピレノイド付近に局在が観察された (図 12C)。これらの結果と、アスタキサンチンが小胞体 (ER) でベータカロテンから生成されることが知られている(Chen et al., 2015)ことから、アスタキサンチンの合成は、まずピレノイド付近でルテインとベータカロテンが生産され、ER でベータカロテンからアスタキサンチンになったあと、油滴となって運ばれていると考えられた (Ota et al., 2018)。

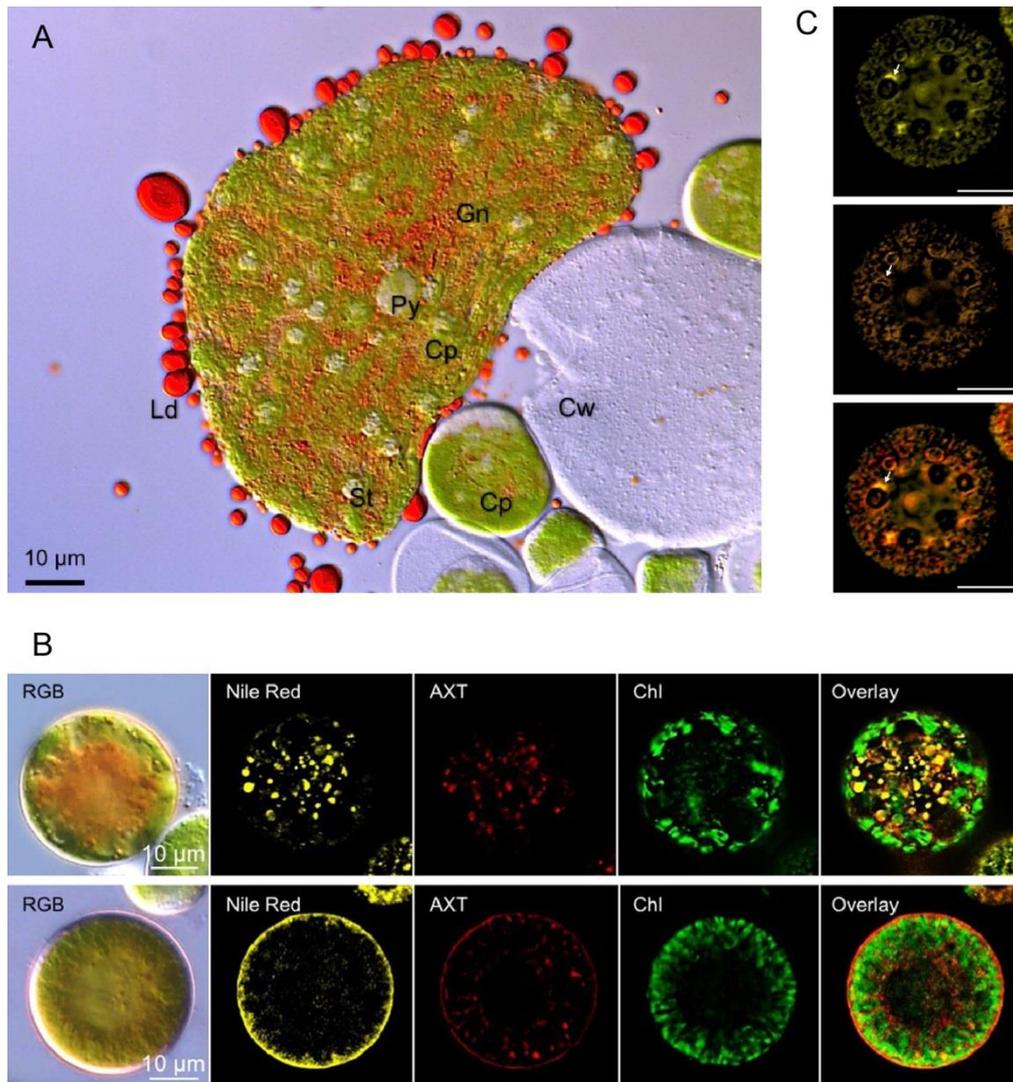


図 12. アスタキサンチンと油滴およびルテインとリコピンの細胞内局在
 (A) 潰したシスト細胞の顕微鏡写真。Cp, 葉緑体; Cw, 細胞壁; Gn, クロロプラストの隙間ネットワーク; Ld, 油滴; St, デンプン粒; Py, ピレノイド。(B) 光照射前 (上段) と光照射 10 分後 (下段) における油滴とアスタキサンチンおよび葉緑体の蛍光顕微鏡写真。RGB: 明視野画像, Nile Red: 油滴蛍光, AXT: アスタキサンチン蛍光, Chl: 葉緑体自家蛍光, Overlay: 重ね合わせ画像。(C) 強光下におけるルテインとベータカロテンの細胞内局在。上からルテイン, ベータカロテン, 重ね合わせ画像を示す。画像は図 11 における光照射後 10 分後の細胞と同じ。スケールバーは 80 ピクセル (= 11.9 μm)。Ota et al. (2018) を改変。

5. おわりに

本研究で我々は, HaematoCalMorph と統計解析を組み合わせることで培養中の *H. pluviialis* の状態を捉えることが可能な微細藻類モニタリングシステムを開発した。HaematoCalMorph とハイパースペクトルイメージング技術を組み合わせることによって, 培養液中の細胞に含まれる

色素量の変化を詳細に把握することが可能になった。開発した技術を使用して、細胞内の色素動態を観察することで、アスタキサンチンの細胞内における挙動の新たな仮説を提案するに至った。

視覚情報は極めて多くの情報を保有しているが、それらを定量的情報として取り出す点に難しさがある。本研究では、細胞を経時的に撮影することで得られた顕微鏡画像を画像解析することによって、時間的空間的な視覚情報を得ただけでなく、可視光領域のハイパースペクトル画像を取得することによって高密度な色覚情報も活用した。これらの技術は更に改良が可能である。例えば、現行バージョンの HaematoCalMorph では 55 パラメータの形態的特徴を設定しているが、パラメータの数を更に増やすことによって、より多くの視覚情報を意味的に取り出すことが可能となる。また、本研究では可視光領域でスペクトル画像を取得したが、色素には紫外領域に吸収帯を持つものも多く、また赤外領域の波長からはラマンスペクトルを得ることが可能であることから、スペクトル画像を撮影する波長領域を更に拡大することによって、視覚では捉えることのできない領域の情報も活用可能となる。画像解析とハイパースペクトルイメージングの組み合わせは、植物の様々な色素の動態を詳細に捉えることを可能にする解析技術と言えるだろう。

6. 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究の遂行にあたり、都筑幹夫先生、野上識博士（東京大学）並びに森田彩氏に多大な協力を頂きました。都筑先生に *Parachlorella kessleri* の顕微鏡写真(図 6) をご提供していただきました。この場をお借りして心から感謝の意を表します。本研究は JST, CREST および日本学術振興会の支援を受けたものである。

7. 引用文献

- Canny, J. 1986. A computational approach to edge-detection. *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.* 8: 679–698.
- Chen G, Wang B, Han D, Sommerfeld M, Lu Y, Chen F, Hu Q. 2015. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus (Chlorophyceae)*. *Plant J.* 81: 95-107.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N. & Tsuji, Y. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 94–97.
- Lao YM, Jin H, Zhou J, Zhang HJ, Cai ZH. 2017. Functional Characterization of a Missing Branch Component in *Haematococcus pluvialis* for Control of Algal Carotenoid Biosynthesis. *Front Plant Sci.* 2;8:1341.
- Lawson, C. & Hanson, R. 1995. Solving Least Squares Problems. *Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA*, 351.
- Nogami, S., Ohnuki, S. & Ohya. 2014. Y. Hyperspectral imaging techniques for the characterization of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 50, 939–947.
- Ohnuki, S., Nogami, S., Ota S., Watanabe K., Kawano S., & Ohya Y. 2013. Image-based monitoring

- system for green algal *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) cells during culture. *Plant Cell Physiol.* 54: 1917–1929.
- Ota, S., Morita, A., Ohnuki, S., Hirata, A., Sekida, S., Okuda, K., Ohya, Y., & Kawano, S. 2018. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci. Rep.* 4: 5617.
- Peled E, Pick U, Zarka A, Shimoni E, Leu S, Boussiba S. 2012. Light-induced oil globule migration in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 48: 1209-1219.
- Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A. and Kawano, S. 2013. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS One* 8: e53618.