

LECTURES

Igor Pro™を用いた生理学データ解析 第1回：用語と基礎概念

東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター
神経生理学研究室

加藤 総夫

要 旨

最近、特に高impactの学術誌に掲載されている生理学論文の実験方法の項に「解析・作図にはIgor Proを用いた」という記述を頻繁に見かける。Igor Proは、一次的生データ観察から、統計解析・時系列解析・画像解析、そして、論文投稿レベルの図の作成に至るまでを可能にする科学技術演算用汎用ソフトウェアである。データの扱いやファイルの概念が一般的なオフィス用ソフトウェアと大きく異なるため、理解しにくく使いにくい、という声を聞くことも多いが、基礎的な概念を正しく理解し、データの扱いの基本を習得すれば、その奥に広がる可能性は無限大に近い。未知の現象を解明することを使命とする生理学者にとっても大きな力となるソフトウェアである。その入り口の「敷居をまたいで」もらうことを目的として、2回にわたり、基礎概念の解説（第1回）とデータ解析の実例（第2回）について述べる。

キーワード：データ解析，時系列データ，画像データ，プログラム

1. Igor Proとは何か？

Igor Pro™は、WaveMetrics社（Oregon; <http://www.wavemetrics.com/>）が開発販売している科学技術データの取込・観察・解析・出版用の汎用統合型ソフトウェアである（Igor Proのマニュアルにならい以下「Pro」を略す）。当初、Interactive Graphic- ORientedの頭文字をとってIgorと命名された、という説明があったが、その説明は最近のversionにはないようだ。1989年にmotorola 680x0系のCPUを持つマッキントッシュ上で動くソフトとして発表された。かつてメーリング・リスト上で「アイゴー」と発音するのか、「イゴール」と発音するのか、それとも「イゴール」か、という議論が交わされたことがあるが、結局、その国の言語事情で好きに呼んでよい、と

いうことに落ち着いたようだ。筆者は滞仏中に使い始めたので、爾来、「イゴール」と発音している。

筆者は93～94年頃、「Pro」がつく前のversion 1.2（本稿執筆時点での最新versionは5.04β）に出会い、マクロを組んで時系列データの相互相関関数および神経活動のパワースペクトル密度関数などを演算し投稿用の図を作成した [1-4]。以来、電気生理データの一次データ観察から、画像解析、投稿論文の図の最終版作成まで、すべてIgorだけでこなしている [5-12]。他のソフトはほとんど必要ないと言っても過言ではない。Version 3.1からIntel x86系でも動くようになり、MacとWindows両方で使えるようになった。IgorはMacでしか使えないという認識は過去の

ものであり、ファイル、マクロなどほとんどの機能は完全互換である。Version upもMac版とWindows版はいつも同時に公開される。Linuxや他のOSには対応していない。日本語版もあるらしいが、version upが遅れているようだし、筆者は見たことがない。

本稿の対象は、主に、以下の3つの範疇に属する人である。(1) 研究室のコンピューターにIgorがインストールされているのを見たことがあるが、(真剣に)使ってみたことはない、という生理学者(院生・ポスドクを含む)、(2) 最近の論文、特に電気生理のデータに複雑な解析を加えて複雑なマルチパネルの図が載っている(high-impact journalsにありがちな)論文のMaterials and Methodsに、「Data were analyzed with Igor Pro」と書いてあるのをしばしば見るのでいったいどういうプログラムなのか興味を持っている生理学者、および、(3) Igorを使って波形処理を試みたことはあるが、なかなかとっつきがたいために、プログラムを書いたり、論文投稿用の図を作ったり、と使いこなすには至っていない、という生理学者である。かつて、とあるアンケートで、Igorは「入門者にとってExcelやOriginと比べ敷居は非常に高いが、奥は広大で、無限大の可能性が広がっている」と評価されていた。本稿の目的は、そのIgorの「敷居」をまたいでもらうことにある。特に、その「無限大の可能性」を支えるのは、何とんでもその豊富な解析用関数群とプログラミングの可能性(とその簡便さ)である。未知の自然界の法則を解き明かし、客観的かつ再現可能な形で公表することが、生理学者を含む自然科学者の重要な使命の一つであることはいままでもない。そのためには「研究に応じて独自にある程度のソフトあるいはマクロを自分でプログラミングすることは現時点では避けられない」(新パッチクランプ実験法) [13] にもかかわらず、実験や教育や論文投稿で忙しくプログラム作成だけをやっているわけにもいかない生理学者にとっては理想的なデータ解析・プログラミング環境である。

II. Igorで解析を行うにあたり知っておかなければならない基礎概念

A. Igorが扱うデータの基本的形式はwaveと呼ばれる

基本的に、Igorはこのwaveと呼ばれるデータ形式を扱うソフトウェアであるといってよい。最も単純なwaveの例は、時系列データで、たとえば、膜電流を1000 Hzで60 s間標本化したとする。これをIgorに読み込んで作られるwaveには、60,000点の1 ms毎の膜電流の値(とその単位)、および、横軸情報(開始時点の値start, 各ポイントの間隔delta, およびその単位)がセットに含まれている(さらにnoteを含むこともできる)。これらの情報を含むデータのセットをwaveと呼ぶ。このような時系列データは1次元(1D wave)だが、2次元データ(2D wave: 画像データなど)、3次元データ(3D wave: 立体データ, 時間変化を伴うCa²⁺ imagingなどの画像データ, あるいは、RGBカラーの画像データなど)、さらに、4次元データ(4D wave: 時間変化と深さ情報を伴うconfocal Ca²⁺ imagingの時系列画像データ, 時間変化を伴うRGBカラーの画像データなど)まで拡張される。各データは実数でも複素数でもテキストでもよい。何次元であろうと、あるいは、実際の波形とは関係のないような「関数」や単なる数値の並びであろうと、これらのデータはwaveと呼ばれる。Igorが扱うwave以外のデータには、variables(変数データ)やstrings(文字列データ)がある。これらはプログラミングの際に重要である。この3種類がIgorの扱う「データ」である。

B. Igorが読み書きする主なファイルをexperimentと呼ぶ

MS Excelがワークシートやマクロやデータが入ったファイルを「ブック」と呼ぶように、Igorのファイルは「experiment」と呼ばれる(図1)。Experimentファイルには、一つの解析に関連するすべての情報が保存されている。上記のwaveやvariables, stringsはもちろん、今までに実行したコマンドの履歴(history, 後述), 作成したProcedure, さらに、表示画面の大きさ・位置な



Fig. 2 Effect of Cd on mEPSC.pxp
IGOR Packed Experiment File
18,901 KB



P2X current summary

図1. Windows XPとMac OS Xで表示された experiment ファイルのアイコン。

どの状態がすべて保存される。したがって、Igor で experiment ファイルを保存し、再びそのファイルを開くと、画面上の表示も含めて保存前の状態が完全に復元される。

Experiment ファイルには「packed」と「unpacked」の2種類あり、前者は、wave や variables, strings, history (後述), procedure (後述) などのデータがすべて一つのファイルの中に詰め込まれたもの。後者はこれらの要素がバラバラのファイルとして特定のフォルダーに収められたもの。後述の Data Browser コマンドを用いれば、packed experiment ファイルの中に詰め込まれている特定の wave などを他の experiment ファイルから読み出すこともできるので、通常は packed experiment として保存することを強く勧める。Windows での拡張子は.pxp。Mac での type および creator はそれぞれ IGR0, IGSU なので、Win・Mac 間の experimental ファイルのやり取りはこれだけ注意すればほぼ完璧である。Version 5 からは、表示されているグラフや表をそのまま個別の新規 experiment ファイルとして保存できるようになったので、いろいろなプロットや解析結果をまとめてマルチパネルの図を作成するときに大変便利である。

C. Data folder は、各 experiment ファイルの中に存在する仮想的フォルダーで、wave などを区分して保存しておくのに便利である

Igor の data folder は、Windows や Mac OS がファイル管理に使うフォルダーとは違うもので、

experiment ファイルの中にだけ存在する。たとえば違う実験日 (experiment ファイルではなくて実際の生理学実験) のデータをまとめて、一つの experiment ファイルの中で解析したいときなど、この data folder をうまく用いると多くの実験データ (しかも control だの washout だのといたった同じ名前の wave を含むことが多い) が混在していても容易に整理できる。一番浅いレベルは「root」で、これは experiment ファイル作成時に自動的に作られる。論文投稿用のマルチパネルの図を作る際にも、Fig. A, B, C... ごとに異なる data folder に必要なデータを格納したりする際に活用する。また、さらに進んだ用法として、複雑な解析マクロプログラムを作成するとき、処理の過程で派生するユーザーに見えなくともよい変数や wave を保存しておくフォルダーとして「Packages」というフォルダーを用いることが慣例になっている。具体的な data folder の操作は、次項に述べる Data Browser ユーティリティで行う。

ところで、Igor は、MS Word や Photoshop などと異なり、複数の experiment ファイルを同時に開くことはできない。いくつかの experiment ファイルに保存されているデータやグラフや解析結果を一つの experiment ファイルにまとめて、たとえばマルチパネルの layout を作成したいときにはこの data folder の活用が必須である。次項に述べる Data Browser を用いてデータを移動してもよいし、version 5 から新たに加わった、今開いている experiment ファイルに他の experiment ファイルを加える方法で加えてもよい (Windows では Alt, Mac では opt を押しながら、メニューバー>Files>Open experiment)。このとき、新たな data folder が自動的に作られる。

D. Data Browser は、wave の閲覧や、複製・移動・削除、あるいは、新規 data folder の作成、data folder 間のデータ移動などをする上で必須のコマンドである

Data Browser は、概念というより、Igor に組み込まれたデータとフォルダー取り扱い用のユーティリティ・コマンドである。メニューバー>Data>Data Browser で起動する (図2)。下記の

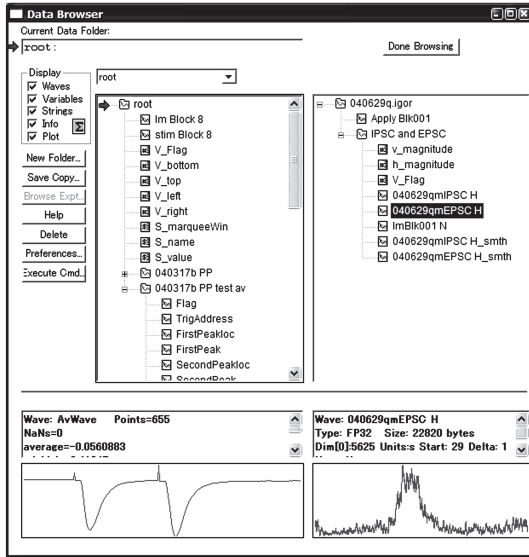


図2. Data Browser. 左側に現在開かれている experiment ファイルの中のフォルダー構造とファイルおよびデータが表示され、右側に別の experiment ファイル中のデータが表示されている。単純なドラッグ操作でファイルのコピーや移動が可能。

ような wave やデータの扱いが可能である。(1) 上述した wave, variable, string といった Igor のデータを異なる data folder 間あるいは異なる experiment ファイル間で移動・複写する。解析が進んでくると、異なる experiment ファイルから wave を呼んでくることしばしば必要になるので、そのためだけでも Data Browser の使い方に慣れておくべきである。(2) Wave や変数の名前を変更する。(3) 新たな data folder を作る。(4) Wave や variable の中身を閲覧したり、平均値などの統計を見たりする。(5) 現在の current folder を指定する。Igor のマニュアルには「初心者が root 以外の data folder を使用することはほとんどないだろう」と書かれているが、たとえ data folder を使用しなくとも、このような wave の管理は必ず必要になってくるので、その際に強力なユーティリティ・コマンドである。

E. Graph, Table, および Layout の 3 種がデータを表示する window である

これらはすべてメニューバー > Windows > から

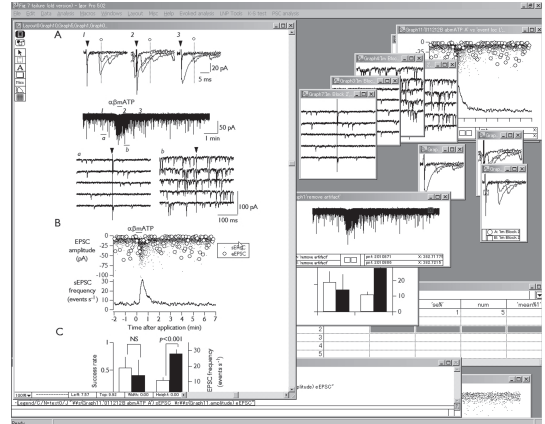


図3. Graph ウィンドウを layout に貼り付け論文投稿用の図を作成している例。

作成される。Graph は上述の wave を何らかの形で表示したもの。縦軸に縦軸、横軸に横軸、というプロットがごく当たり前の 1D wave の Graph 表示。他にも棒グラフ、カテゴリープロット、ヒストグラム、waterfall などのプロットが可能だが詳細は省く。2D wave の画像データを表示した image など graph window に表示される。Table は、その名のとおり、wave を表として表示したもの。Layout は graph や table の上位にあたり、graph や table、さらに、文字や記号を貼り付けて 1 枚の layout が作られる。投稿用の図や PowerPoint に送る図はこの layout として作成する (図3)。1 つの experiment ファイルの中に複数の layout が存在しうる。

F. Procedure, Macro および Function はプログラムを宣言するコマンドである。

Igor の最大の機能は、そのプログラミング能力にある。プログラミング環境を活用する方法を二つ紹介する。

1. 各 experiment ファイルごとのプログラムを Procedure window を用いて作る方法 (入門者向き)

メニューバー > Windows > Procedure Window で、Procedure Window というプログラム画面が開く (図4)。ここに Macro や Function を書き込めば (書き方は後述)、その experiment ファイル限りのプログラムとして利用できる。簡単な

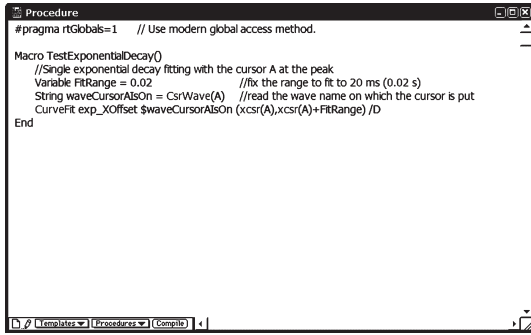


図4. Procedure window.

解析や、データの変換、図の作成用のマクロの作成に便利なので、入門者はまず、このProcedure windowで、マクロ処理の基本をマスターすることをお勧めする。Macroコマンドで宣言すれば(後述)、その名前が、メニューバー>Macroのプルダウンメニューに表示されるのでそれを選択して直接プログラムを実行できる。言うまでもなく、ここに書いたProcedure類は、他のexperimentファイルでは使用できない。

2. すべてのexperimentファイルで使用可能な汎用プログラムを作る方法(中上級者向き)

同じ解析をすべてのデータについて繰り返す、などの高度なルーチン処理を行うには、独立のprocedure fileをつくり、それをIgor立ち上げ時に自動的に読ませるか(常に用いるルーチン)、あるいは、解析をするときに、自動的にもしくは手動で、あるいは、他のプログラムから明示的に読み込む(特定の解析だけに用いられるルーチン)という方法がある。中上級以上にお勧めするので本稿では詳しく扱わないが、Igorの真骨頂・醍醐味はこのような汎用プログラミングにある。筆者の研究室では、電気生理学・画像解析用のカスタム・メードのプログラム十数本をルーチンで使用している。これらのカスタム・メードのプログラムはmenuコマンドを用いることによって、メニューバーに表示され、Igorの機能の一部として使用することができる(図5)。また、Igor XOP toolkitを用いれば、C言語でプログラムした機能を直接Igorのコマンドの一つとして呼び

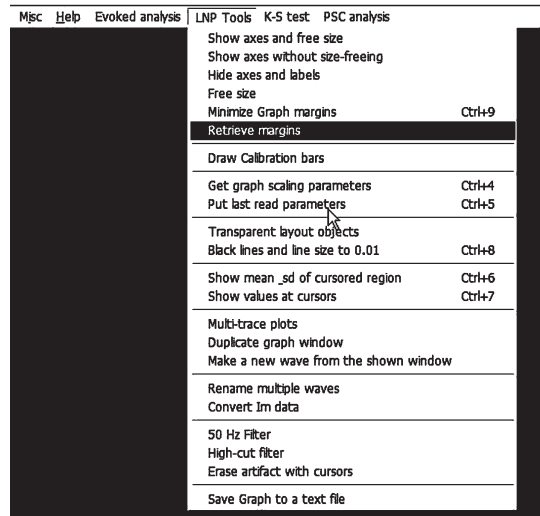


図5. カスタム・メニューはIgorのメニューバーの一つとして表示される。筆者の研究室のメニューバーにはこのようなツール集をはじめ、さまざまなシナプス後電流解析ツールメニューが表示される。

出すこともできる(上級者向け)。しかし、ほとんどの演算処理・命令は下記のFunction文でIgor内蔵コマンドだけを用いて定義できてしまう。

1と2のいずれの方法でも、Igorのプログラムはすべて以下のような構文から成り立っている。

```
Macro Macro_Example ()
    Commands
    ...
End
```

```
Proc Procedure_Example ()
    Commands
    ...
End
```

```
Function Function_Example ()
    Commands
    ...
End
```

Macro文で宣言されるプログラムとProc文で宣言されるプログラムは、前者が、メニューバー

>Macros>に表示され、そこから実行できるのに対し、後者はできない、という以外、文法も実行のされ方も処理速度も全く同じである。後者は他のプログラムから呼び出すか、command領域（詳しくは次回に述べる）に直接タイプして実行する。

一方、Function文で宣言されるプログラムは、(1) Macro文に比べ、変数やwaveの受け渡しに厳密な取り扱いが必要となる、(2) compileされた時にエラーが検出される、(3) compileされて実行されるので圧倒的に処理が速い、などの特徴がある。「Function」という名前から、ある数値を与えると値が帰ってくる「関数」を思い浮かべるが、Igorのfunctionは、それだけにとどまらず、関数、コマンド、条件処理文などを実行するサブルーチンのようなものと考えた方がよい。マニュアルには、「Macroは古いversionのIgorの遺物でこれからのプログラミングは極力Function文を用いて書かれるべきである」とある。

第1回 まとめ

Igorでデータ解析をするために必要な基礎概念を説明した。今回は実際のデータに基づいてその表示と解析、簡単なプログラミングの基礎について概説する。

文 献

1. Fortin G, Kato F, Lumsden A & Champagnat J : Rhythm generation in the segmented hindbrain of chick embryos. *J Physiol (Lond)* **486** : 735-744, 1995
2. Kato F, Morin-Surun MP & Denavit-Saubié M : Coherent inspiratory oscillation of cranial nerve discharges in perfused neonatal cat brainstem in vitro. *J Physiol (Lond)* **497** : 539-549, 1996
3. Morin-Surun M-P, Boudinot E, Kato F, Foutz A & Denavit-Saubié M : Involvement of NMDA receptors in

the respiratory phase-transition is different in the adult guinea pig in vivo and in the isolated brainstem preparation. *J Neurophysiol* **1995** : 770-778, 1995

4. Borday V, Kato F & Champagnat J : A ventral pontine pathway promotes rhythmic activity in the medulla of neonate mice. *NeuroReport* **8** : 3679-3683, 1997
5. Takano K & Kato F : Inspiration-promoting vagal reflex under NMDA receptor blockade in anaesthetized rabbits. *J Physiol (Lond)* **516** : 571-582, 1999
6. Kato F & Shigetomi E : Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Physiol (Lond)* **530** : 469-486, 2001
7. Masaki E, Kawamura M & Kato F : Reduction by sevoflurane of adenosine 5'-triphosphate-activated inward current of locus coeruleus neurons in pontine slices of rats. *Brain Res* **921** : 226-232, 2001
8. Takano K & Kato F : Inspiration-promoting vagal reflex in anaesthetized rabbits after rostral dorsolateral pons lesions. *J Physiol (Lond)* **550** : 973-983, 2003
9. Shigetomi E & Kato F : Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci* **24** : 3125-3135, 2004
10. Masaki E, Kawamura M & Kato F : Attenuation of gap-junction-mediated signaling facilitated anesthetic effect of sevoflurane in the central nervous system of rats. *Anesth Analg* **98** : 647-652, 2004
11. Kato F, Kawamura M, Shigetomi E, Tanaka J & Inoue K : ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system : synaptic purinoceptors : the stage for ATP to play its "dual-role". *J Pharmacol Sci* **94** : 107-111, 2004
12. Kawamura M, Gachet C, Inoue K & Kato F : Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y₁ receptors in the hippocampal slice. *J Neurosci* **24** : 10835-10845, 2004
13. 森島 繁 : コンピュータによるパッチクランプデータ記録法. In : 新パッチクランプ実験技術法, Ed. 岡田泰伸, 吉岡書店, 京都, pp 280-293, 2001