

<特集「光学顕微鏡法 -その歴史と展望-」>

## バーチャルミクロスコープシステムの応用と展望

伊東 恭子<sup>\*1</sup>, 荻 寛志<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学

<sup>2</sup>京都府立医科大学大学院医学研究科先端技術・医学融合展開講座

## Virtual Microscopy System in Global Applications and Challenges

Kyoko Itoh<sup>1</sup> and Hiroshi Ogi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Pathology and Applied Neurobiology,*

*Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

<sup>2</sup>*Department of Interdisciplinary Research & Development,*

*Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

### 抄 録

バーチャルミクロスコープシステムは、病理学領域等で使用する組織切片や細胞を貼り付けたガラススライドを対象にして、組織・細胞の画像情報（アナログデータ）を高精細のデジタルデータに変換したのち、ディスプレイ上でビューアソフトを用いることにより、ルーベ像から弱・強拡大までの組織・細胞画像の観察・解析を可能とするシステムである。国際的に、当該システムは、病理学領域で教育、研究分野に導入されて以来、その活用が進むとともに、病理診断の方法論を劇的に変貌させ、病理診断の臨床現場でさらに大きく貢献することが期待されている。本稿では、システムの概説に続き、バーチャルミクロスコープシステムのアプリケーションとして、1) データベース作成、2) 教育、3) 研究、4) 臨床に分けて具体例を紹介し、今後の展望と課題を述べる。

キーワード：バーチャルスライド、病理学、教育、研究、臨床診断。

### Abstract

The virtual microscopy system (VMS), or the whole slide imaging, is a method to obtain a high quality digitalized image of the tissue section or cells attached onto the glass slide, so that the digitalized images from the lower to higher magnification can be efficiently observed and/or analyzed on the computer display with a viewer and/or image analysis software. Because of such convenience and a great potential of the VMS, it has been widely used in teaching pathology not only for the undergraduate medical students but also for the residents. In this review, we introduce a variety of applications of the VMS in the field of pathology including, 1) constructing a database for histopathology, 2) teaching histopathology, 3) pathological research, 4) clinical practice in the field of diagnostic pathology, and briefly mention a future perspective with some problems to be solved.

**Key Words:** Virtual microscopy system, Education, Research, Diagnostic pathology.

---

平成29年10月25日受付 平成29年10月31日受理

\*連絡先 伊東恭子 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地  
kxi14@koto.kpu-m.ac.jp

## バーチャルミクロス コピーシステムの概要

バーチャルミクロスコピーシステムとは、病理組織、細胞診用ガラススライドの全体あるいは一部を専用のスキャナ（図1）で高精細にデジタルデータに変換し（バーチャルスライドと呼ぶ）、PC上でビューアソフトを用いて、ルーペ像から弱・強拡大までの組織あるいは細胞画像を瞬時かつ自在に観察、解析できるシステムである。

我々は、ガラス標本を対物レンズ40倍モード（400倍）でスキャンすることにより、弱拡大でも400倍対応の解像度での観察を可能にしている。なお、組織の面積やスキャナの設定によるが、1バーチャルスライドで、およそ2~3GBの容量になる。

当該技術は、病院内や施設間をネットワークで結ぶコンサルテーションネットワークの実現や新しい病理診断法、研究への応用など、今後組織あるいは細胞標本観察に欠かせないものになっていくと考えられている<sup>1)</sup>。以下に、アプリケーションの例を挙げて概説する。

### バーチャルミクロスコピーシステムの アプリケーション

#### 1. データベース作成

病理部門では、従来、膨大な量のガラススライドを年余にわたり保管してきた。しかし、保

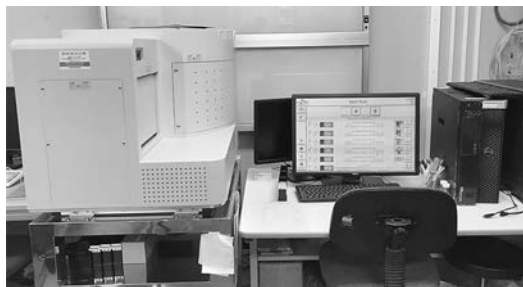


図1 バーチャルスライドスキャナ

同時に、210枚のガラススライドのスキャンが可能である。スキャンの領域、モード（解像度、対物倍率、フォーカス、Z-stackなど）が自由に設定できる。

管に要する場所・スペースの制約、ガラススライドの耐用性には限界があるため、ガラススライドの破損、紛失、脱色などによる経年劣化が避けられず、さらにスライドガラス、カバーガラスの仕様の差異等により、再利用が困難になることがあった。しかし、バーチャルミクロスコピーシステムでは、ガラススライドを高解像度でデジタル化して保管でき、膨大なデータベースとして幅広い施設間で共用、あるいはライブラリ構築が可能になる。

現在、日本病理学会では、AMEDプロジェクト「AI等の利活用を見据えた病理組織デジタル画像（P-WSI）の収集基盤整備と病理支援システム開発」のもと、病理組織デジタル画像（Pathology-Whole Slide Imaging: P-WSI）のビッグデータを全国の研究参加施設より収集・集約し、これを活用して、National Clinical Database（NCD）との共同作業で病理診断精度管理ツール、病理診断支援ツールの開発を進めている。同時に、国立情報学研究所（National Institute of Informatics: NII）と連携して、AIを活用した病理診断ツールの開発を企図している。近い将来、これらのビッグデータを活用して病理診断支援ツールが開発されると、地域医療における病理診断の精度管理や地域医療への貢献が可能になり、さらに最も期待されることは、医師・医学生への教育および医学研究に大きく展開されることである。

#### 2. 教育

##### 1) 学部教育

京都府立医科大学においては、2013年4月から無線LANにも対応したバーチャルミクロスコピーシステムを導入し、医学部医学科学生への病理学教育における実習に活用している（図2）。

従来、顕微鏡を用いたガラス標本による病理組織実習を行っていたが、①ガラス標本の経年劣化、紛失、破損が発生するとそれに対応することを求められるが、稀少例では補充が困難なこと、②学生の人数分のガラス標本作製が必要なこと、③学生ごとに少しずつ所見の異なる組織標本になること、④ディスカッション顕微鏡による鏡頭が全学生同時には行えないことなど



図2 学生実習

学生は、コンピュータで実習室に設置されたサーバにアクセスし、マウスとキーボードを用いて画像倍率、観察範囲などを自在に操作して病理組織像を観察し、学生同士あるいは教員・学生間でディスカッションできる。

から、学生の病理組織の理解、学生同士のディスカッションが時に困難であった。

バーチャルスライドの導入により、ガラス標本に関する諸問題が一気に解消されるとともに、通常のHE染色のみならず、数に限りのある特殊染色、免疫組織化学標本なども供覧が可能になった。あまねく学生が同一のデジタル組織画像を観察し、教員・学生間で、画像をみながらディスカッションできること、参加型学習として発表形式の学習が可能になり Problem based learning の要素をより多く盛り込めること、それにより学生の病理学に関する理解や興味が高まったと考えている。

本学では、4人に1台のコンピュータディスプレイが用意されており、学生はそれを用いて教員の病理組織画像解説を聞き、その後、自身で自由に操作して組織像を観察し、学生同士あるいは教員・学生間で質疑応答ができる。むしろ、自身のPCの持ち込みもできるので、無線でサーバへのアクセスが可能である。現在、バーチャルスライドは一般公開していないが、学生は自身で観察したマイクロ画像をJPEG画像で持ち帰ることができる（なお、画像は取り扱いに注意を要するため、ソーシャルネットワークサービス等にアップロードせぬよう指導を行っ

ている）。昨今の若者は、デジタル画像の取り扱いには慣れており、時に我々教員が驚くような技を成し遂げる。バーチャルミクロスコピーシステム導入の1年後には、美しいJPEG画像にコメント（教員の解説）を付したカラーアトラスが次年度の学生間に出回っていたのには舌を巻いた。

一方で、病理学への興味が旺盛な学生の中には顕微鏡による観察を選択する学生もいるので、将来の病理学者へと育つことを期待して、顕微鏡を用いた個人指導も並行していることを付記する。

## 2) 卒後教育

我々は、「Kyo-Nervenの会」と称した神経病理の勉強会を行っている。2週間に1回のペースで、ほぼ1年間で一通りの神経疾患の病理が学べるように組んでいる。その際にもバーチャルスライドを活用し、希望者にはいつでも本学病理実習室から無線LANでデジタル画像にアクセスできるようにしている。剖検症例の脳脊髄組織標本は、少なくとも一症例50プレパラート以上を要し、かつ特殊染色、数種の免疫組織化学を駆使するため、希望者全員分のガラス標本を用意することは到底不可能である。しかしバーチャルミクロスコピーシステムを用いるとすべての標本を同時に鏡顕することが可能になり、特殊な凝集蛋白封入体などの所見をつぶさに観察し、正確な病理所見を確認できる。このようにバーチャルミクロスコピーシステムを用いた病理の勉強会は、卒後教育にも大いに活用できる。

## 3. 研究

様々な分野の医学研究において、病理組織の形態学的解析、組織計測を含めた画像解析が必要になることがある。バーチャルミクロスコピーシステムは研究における画像定量解析に偉力を発揮する。検索対象となるガラス標本全体をまずスキャンしたうえで、組織全体あるいはアトランダムなROIを設定し、ImageJなどを用いて組織計測を行う方法である。

病理組織における蛋白発現の定量化の一例を挙げて解説する。

1. 腫瘍における膜タンパク A の発現解析 (図 3A, B, C)

2. 腫瘍における核タンパク B の発現解析 (図 3D, E, F)

1) パラフィン切片 (4  $\mu\text{m}$ ) の免疫組織化学をバーチャルスライドスキャナ (Nano Zoomer; Hamamatsu Photonics K. K., Japan) で撮影する (対物 40 倍モード).

2) 専用ビューアー (NDP.view 2, Hamamatsu Photonics K. K., Japan) を用いて解析対象領域を対物 40 倍モードでエクスポートする.

3) ImageJ (1.47v NIH) 等で画像処理し, 免疫染色陽性の核領域, あるいは免疫染色陽性の膜領域の面積を計測し, 陽性比率を算出する.

本法は, 分子標的治療薬の選択に資することを目的とするコンパニオン診断にも応用可能である. また, 免疫組織化学のみならず, コントラストの良い特殊染色にも応用が可能である.

3. 筋ジストロフィーモデルマウスにおける低

分子化合物 A 投与による筋病理の検討 (図 4) モデルマウスの骨格筋組織標本: Masson's trichrome 染色 (MT), Acid Phosphatase 染色 (ACP) をバーチャルスライド化し, 壊死, 線維化の定量, 筋細胞面積を組織計測する.

A) 線維化および壊死の評価

1) ガラススライド: 染色: Masson's trichrome 染色 (MT), Acid Phosphatase 染色 (ACP) はバーチャルスライドスキャナで全面撮影 (対物 40 倍モード)

2) 専用ビューアーを用いて対物 10 倍モードで組織全体の画像をエクスポートする.

3) 組織計測

解析から除外する領域 (筋周膜や切片端など) を示すマスクを手動作成 (Photoshop) 後, 評価領域における各染色 (MT で線維化: 青, ACP で壊死線維: 赤) の陽性領域をそれぞれ求め, 各面積を算出する (ImageJ).

B) 筋線維面積

1) MT 標本はバーチャルスライドスキャナで

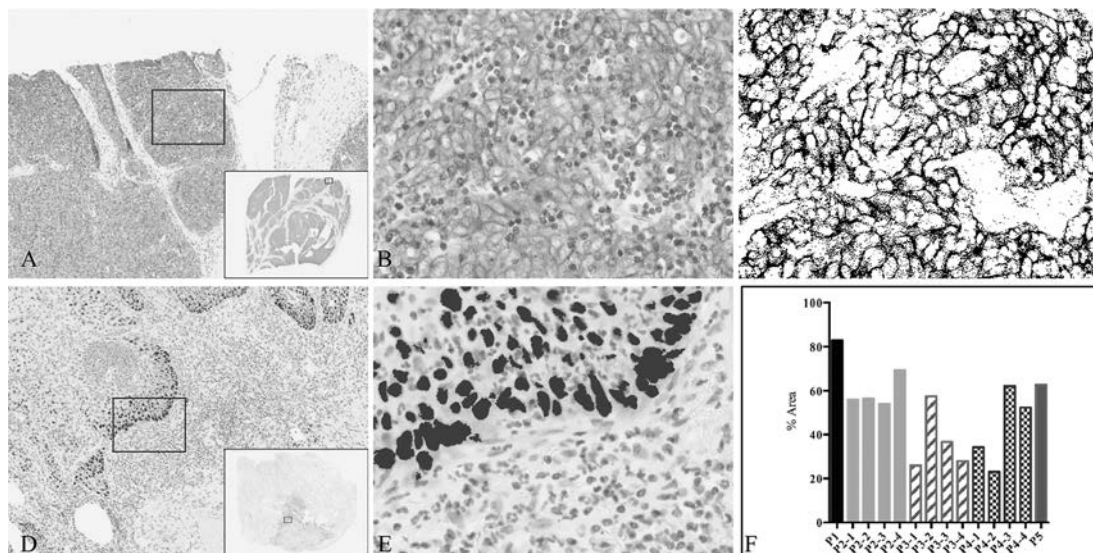


図3 画像解析 I

A: 腫瘍における膜タンパク A の免疫組織化学標本をスキャナでバーチャルスライド化する. 右下枠内はルーペ像を示す. B: ルーペ像 (A) の赤枠部分を 400 倍に拡大する. C: 免疫染色陽性の細胞膜領域を二値化し, 画像解析に用いる.

D: 腫瘍における核タンパク B の免疫染色標本をスキャナでバーチャルスライド化する. 右下枠内はルーペ像を示す. E: ルーペ像 (D) の赤枠部分を 400 倍に拡大後, 免疫染色陽性の核領域を二値化する. F: 計測値を示す.

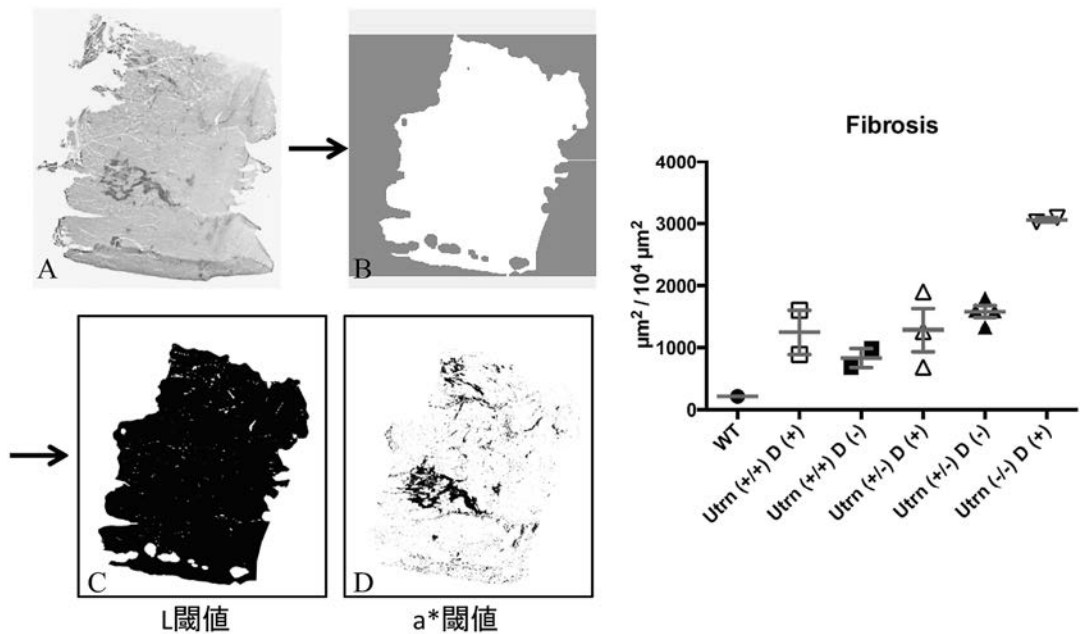


図4 画像解析II：筋疾患における壊死領域の定量解析

A: acid phosphatase (ACP) 染色標本をバーチャルスライド化したルーベ像。

B: 解析から除外する領域を示すマスクを手動作成する (Photoshop)

C, D: 評価領域, 各染色の陽性領域を求め面積を算出する (ImageJ)

Lab 色空間で処理, L\* で二値化し, 評価領域を求め (C), a\* で二値化し, ACP 陽性領域を求める (D). 最終的な評価領域および染色陽性領域は以下で求める

評価指標: 「染色陽性領域面積 / 評価領域面積 × 10<sup>4</sup>」

全面撮影 (対物 40 倍モード), 対物 10 倍モードの画像を専用ビューアーでエクスポートする。

## 2) 組織計測

解析から除外する領域を示すマスクを手動作成し (Photoshop), MT の陽性領域 (筋線維: 赤) を求め面積を算出する (ImageJ). そのうち筋線維面積の平均値, 中央値を求める。

これらの組織全体を対象とした定量解析は, 高精度かつ均質な画像の高速撮影を可能とする高精度ラインセンサを用いたスキャナ機器の発展と, 大容量の画像解析を実施するコンピュータ処理能力の向上により実現されるものである。任意の評価領域の任意の解像度の画像が得られることは, 画像解析の自由度を飛躍的に向上させ, 今後の画像定量解析のあり方を大きく変えるであろう。紹介した以外にも例えば, 免疫組織化学をオーバーレイすることにより, 腫瘍細胞における複数の目的タンパクの発現量,

分布などをガラス上の全組織を対象として恣意性なく高速, かつ正確に測定することができる。現在, 我々は共同研究で, 細胞質, 核, 細胞膜に局限して発現する蛋白を正確に定量化する改良ソフトウェアを開発中である。

## 4. 臨床

バーチャルスライドの臨床応用は最近, 国際的に注目されている。病理診断システムの精度・質管理, 迅速化<sup>1-3)</sup>, コンサルテーションやコラボレーション<sup>4)5)</sup>, 遠隔診断<sup>6)</sup>, 画像解析 (腫瘍の分子発現の定量化など)<sup>7-9)</sup>, 病理医の負担軽減<sup>10)11)</sup>, コストの削減効果<sup>12)</sup> などに関して欧米諸国からの報告がみられる。

病理診断業務において, 検体の管理 (バーコード化など), 電子カルテによる診断システムは, 既にデジタル化されているが, バーチャルスライドを日常診療に用いるためには, いくつかのハードルがある。一つは, バーチャルミ

クロスコピーシステム自体の整備（スキヤナ、デジタルスライド管理システム、通信などのインフラ、ビューアーソフトウェア）が必要なこと、2つ目は、診断にあたる病理医のトレーニングを要することである。後者を促進するためには、バーチャルスライドでガラス全面をスキヤンする作業効率の向上、ビューアーなどソフトウェアの改善（HE染色など色の正規化、ディスプレイの解像度、作動の高速化など）が求められる。とりわけ、多種類の免疫染色・特殊染色標本を（少しのずれは生じるものの）多重化しての解析、ソフトウェアを駆使した組織計測、放射線画像、分子生物学的データなどを統合して、より精度の高い分子病理学的診断を行っていくうえで有用なツールになるのではないかと筆者は考える。

さて、本学附属病院における日常の外科病理診断の間では、臨床病理カンファレンスに用いられることが多い。生検検体、手術検体から切り出した組織標本をバーチャルスライド化し、臨床医、病理医、技師、コメディカルなどと症例検討を行う際に有用である。ルーベ像から解像度の高い強拡大像（400倍）に至るまでがバーチャルスライド一つで提示できるので、各種画像情報とも連関させて評価しやすい。また、CPC（臨床病理症例検討会）に用いられることもある。顕微鏡をディスプレイと連動させガラス標本で組織像を提示する代替法として、あらかじめガラス標本をバーチャルスライド化しておけば、ビューアーソフトウェアをインストールしたPCとディスプレイさえあれば、顕微鏡システムのない施設においても、同等の質のCPCを実施することが可能である。また電子カルテシステムと病理診断システムを連携させれば、画

像を含む臨床情報と病理組織情報が一括に管理でき、臨床研究などに応用できる。

近年日本でも、遠隔診断にバーチャルスライドが用いられるようになってきている。遠隔地からビューアーを用いて、サーバ内の画像を観察できるので、セカンドオピニオンを求めるコンサルテーションへの適用や、オンサイトでない遠隔地からの術中迅速診断が可能になっている。

一方、デジタル化画像は100%の質を担保し得ないので、病理医がお気に入りの顕微鏡でフォーカスや絞りを自在に調節して、名人芸のように微細な所見を読み取ることは困難である。また、油浸レンズを必要とする1000倍の強拡大観察を要する病原性微生物の検索、フォーカスを微妙に操作して所見をとる細胞診などでは、指定した間隔（例えば100nm毎）で‘Z stack’をとることができるものの、画像容量が極端に大きくなり通信に適さないなどの課題が残されている。

## 最 後 に

バーチャルミクロスコピーシステムに関して、本学や他施設での取り組みについて概説した。現状では教育目的が主たるものであるが、本稿で紹介したように、今後は研究への応用が大いに期待される。また、日本病理学会が取り組んでいる、ビッグデータとAIを活用した病理診断ツールの開発によって、地域医療における病理診断の精度管理や病理医不在地域での医療にバーチャルミクロスコピーシステムが貢献する日も決して遠くないのではなかろうか。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

## 文

- 1) Griffin J, Treanor D. Digital pathology in clinical use: where are we now and what is holding us back? *Histopathology* 2017, 70, 134-145. DOI: 10.1111/his.12993.
- 2) Snead DR, Tsang YW, Meskiri A, Kimani PK,

## 献

Crossman R, Rajpoot NM, Blessing E, Chen K, Gopalakrishnan K, Matthews P, Momtahan N, Read-Jones S, Sah S, Simmons E, Sinha B, Suortamo S, Yeo Y, El Daly H, Cree IA. Validation of digital pathology imaging for primary histopathological diagnosis.

- Histopathology 2016; 68; 1063-1072.
- 3) Kamat S, Parwani AV, Khalbuss WE, Monaco SE, Kelly SM, Wiehagen LT, Piccoli AL, Lassige KM, Pantanowitz L. Use of a laboratory information system driven tool for pre-signout quality assurance of random cytopathology reports. *J. Pathol. Inform* 2011; 2: 42.
  - 4) Bauer TW, Slaw RJ, Mc Kenney JK, Patil DT. Validation of whole slide imaging for frozen section diagnosis in surgical pathology. *J. Pathol. Inform* 2015; 6; 49.
  - 5) Lauro GR, Cable W, Lesniak A, Tseytlin E, McHugh J, Parwani A, Pantanowitz L. Digital pathology consultations-a new era in digital imaging, challenges and practical applications. *J. Digit. Imaging* 2013; 26; 668-677.
  - 6) Pare G, Meyer J, Trudel MC, Tetu B. Impacts of a large decentralized telepathology network in Canada. *Telemed. J. E. Health* 2016; 22; 246-250.
  - 7) Dennis J, Parsa R, Chau D, Koduru P, Peng Y, Fang Y, Sarode VR. Quantification of human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemistry using the Ventana Image Analysis System: correlation with gene amplification by fluorescence in situ hybridization: the importance of instrument validation for achieving high (>95%) concordance rate. *Am. J. Surg. Pathol* 2015; 39; 624-631.
  - 8) Helin HO, Tuominen VJ, Ylinen O, Helin HJ, Isola J. Free digital image analysis software helps to resolve equivocal scores in HER2 immunohistochemistry. *Virchows Arch* 2016; 468: 191-198.
  - 9) Hamilton PW, Wang Y, Boyd C, James JA, Loughrey MB, Houghton JP, Boyle DP, Kelly P, Maxwell P, McCleary D, Diamond J, McArt DG, Tunstall J, Bankhead P, Salto-Tellez M. Automated tumor analysis for molecular profiling in lung cancer. *Oncotarget* 2015; 6: 27938-27952.
  - 10) Ho J, Aridor O, Parwani AV. Use of contextual inquiry to understand anatomic pathology workflow: implications for digital pathology adoption. *J. Pathol. Inform* 2012; 3: 35.
  - 11) Stratman C, Drogowski L, Ho J. Digital pathology in the clinical workflow: a time and motion study. *Pathology Visions Conference, San Diego, CA: Digital Pathology Association* 2010; 24-27.
  - 12) Henricks WH. Not so fast? Concrete considerations for digitalmove. In: *Advancing practice, instruction, and innovation through informatics 2009*. Available at: [http://www.captodayonline.com/Archives/0110/0110ha\\_not\\_so\\_fast.html](http://www.captodayonline.com/Archives/0110/0110ha_not_so_fast.html).

## 著者プロフィール



## 伊東 恭子 Kyoko Itoh

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学・教授

略 歴：1982年3月 神戸大学医学部医学科 卒業

1992年4月 神戸大学医学部病理学第一講座助手、1996年11月より講師

1993年6月～1996年10月 ドイツ連邦共和国 Ludwig-Maximilian 大学神経病理学教室へ留学

2000年10月～2002年7月 アメリカ合衆国 Case Western Reserve 大学神経科学教室へ留学

2002年8月 京都府立学校教員（講師） 京都府立医科大学附属脳・血管系老化研究センター病態病理学部門

2008年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学 准教授

2015年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学 教授  
現在に至る

専門分野：神経病理学、発生神経生物学

主な業績：

英文著書

Itoh K. Clinical Neuroembryology. 2nd ed. In: ten Donkelaar HJ, Lammens M, Hori A, editors. Springer, Heidelberg 2014; pp256-257, pp281-282, pp299, pp479-480.

和文著書

伊東恭子. 標準病理学. 第5版 第22章 脳・神経. 坂本穆彦監修 北川昌信・仁木利郎 編集. 医学書院. 東京 2015; pp677-717.

伊東恭子. 第11章 神経・筋疾患. 解明病理学. 第3版 青笹克之総編集. 医歯薬出版株式会社. 東京 2017; pp581-650.

英文原著

1. Itoh K, Cheng L, Kamei Y, Fushiki S, Kamiguchi H, Gutwein P, Stoeck A, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V. Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J Cell Biol* 2004; 165: 145-154.
2. Itoh K, Fushiki S, Kamiguchi H, Arnold B, Altevogt P, Lemmon V. Disrupted Schwann cell-axon interactions in peripheral nerves of mice with altered L1-integrin interactions. *Mol Cell Neurosci* 2005; 30: 131-136.
3. Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano H, Ota M, Itoh K, Hagiwara M, Matsuo M. Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. *Nat Commun* 2011; 2: 308.
4. Itoh K, Fushiki S. The role of L1 cam in murine corticogenesis, and the pathogenesis of hydrocephalus. *Pathol Int* 65: 58-66, 2015.
5. Fujimoto T, Yaoi T, Fushiki S Itoh K. Dp71 is regulated by phosphorylation and ubiquitin-proteasome system in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 492: 349-355.

## 著者プロフィール



## 萩 寛志 Hiroshi Ogi

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科先端技術・医学融合展開講座・助教  
京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学・助教（兼務）

略 歴：1998年3月 大阪大学基礎工学部情報工学科 卒業

1998年4月～2011年9月 大日本スクリーン製造株式会社（現・株式会社 SCREEN ホールディングス）

2015年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科博士課程 修了

2015年4月～現職

専門分野：神経科学、画像処理

主な業績：1. Goto S, Ogi H, Fushiki S, Itoh K. Prenatal and lactational bisphenol A exposure does not alter serotonergic neurons morphologically in the murine dorsal raphe nucleus. *Brain Dev* 2017; 39: 475-82.

2. Ogi H, Itoh K, Ikegaya H, Fushiki S. Alterations of neurotransmitter norepinephrine and gamma-aminobutyric acid correlate with murine behavioral perturbations related to bisphenol A exposure. *Brain Dev* 2015; 37: 739-738.

3. Tando S, Itoh K, Yaoi T, Ogi H, Goto S, Mori M, Fushiki S. Bisphenol A exposure disrupts the development of the locus coeruleus-noradrenergic system in mice. *Neuropathology* 2014; 34: 527-8.

4. Ogi H, Itoh K, Fushiki S. Social behavior is perturbed in mice after exposure to bisphenol A: a novel assessment employing an Intelli Cage. *Brain Behav* 2013; 3: 223-228.

5. Itoh K, Ogi H, Yaoi T, Yoshifuji K, Pooh R, Yamasaki M, Fushiki S. Semilobar holoprosencephaly with a unique traversed sylvian sulcus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 685-688.

6. Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: 563-567.

7. Fujimori A, Yaoi T, Ogi H, Wang B, Suetomi K, Sekine E, Yu D, Kato T, Takahashi S, Okayasu R, Itoh K, Fushiki S. Ionizing radiation downregulates ASPM, a gene responsible for microcephaly in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369: 953-957.